

POSSIBILITATEA UTILIZĂRII EXTRACTELOR VEGETALE CA INGREDIENTI NATURALI PENTRU MEDICAMENTE, COSMETICE ȘI ALIMENTE

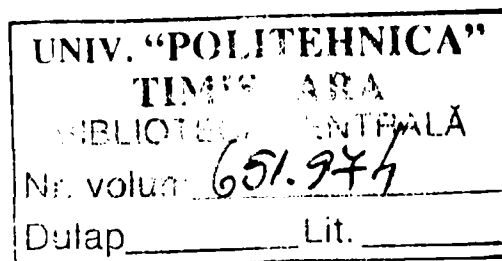
Teză destinată obținerii
titlului științific de doctor inginer
la Universitatea "Politehnica" din Timișoara
în domeniul INGINERIE CHIMICA
de către

Ing. Svetlana Cacig

Conducător științific:
Referenți științifici:

prof.univ.dr.ing. Alfa Xenia Lupea
prof.univ.dr.chim. Ioan Oprean
prof.univ.dr.ing. Lucia Ileana Olariu
conf.univ.dr.ing. Mihai Medeleanu

Ziua susținerii tezei : 23.02.2007



Seriile Teze de doctorat ale UPT sunt:

- | | |
|------------------------|---|
| 1. Automatică | 7. Inginerie Electronică și Telecomunicații |
| 2. Chimie | 8. Inginerie Industrială |
| 3. Energetică | 9. Inginerie Mecanică |
| 4. Ingineria Chimică | 10. Știința Calculatoarelor |
| 5. Inginerie Civilă | 11. Știința și Ingineria Materialelor |
| 6. Inginerie Electrică | |

Universitatea „Politehnica” din Timișoara a inițiat seriile de mai sus în scopul diseminării expertizei, cunoștințelor și rezultatelor cercetărilor întreprinse în cadrul școlii doctorale a universității. Seriile conțin, potrivit H.B.Ex.S Nr. 14 / 14.07.2006, tezele de doctorat susținute în universitate începând cu 1 octombrie 2006.

Copyright © Editura Politehnica – Timișoara, 2006

Această publicație este supusă prevederilor legii dreptului de autor. Multiplicarea acestei publicații, în mod integral sau în parte, traducerea, tipărirea, reutilizarea ilustrațiilor, expunerea, radiodifuzarea, reproducerea pe microfilme sau în orice altă formă este permisă numai cu respectarea prevederilor Legii române a dreptului de autor în vigoare și permisiunea pentru utilizare obținută în scris din partea Universității „Politehnica” din Timișoara. Toate încălcările acestor drepturi vor fi penalizate potrivit Legii române a drepturilor de autor.

România, 300159 Timișoara, Bd. Republicii 9,
tel. 0256 403823, fax. 0256 403221
e-mail: editura@edipol.upt.ro

Cuvânt înainte

Elaborarea unei teze de doctorat este rezultatul unei perioade de muncă asiduă și încununarea eforturilor depuse pe parcursul unei perioade de studiu.

Mulțumiri deosebite se cuvin conducătorului de doctorat, prof. dr. ing. Alfa Xenia Lupea, pentru ajutorul înalt calificat și sprijinul oferit precum și pentru răbdarea și atenția dovedite pe tot parcursul perioadei de studii doctorale.

Doresc să mulțumesc de asemenea și referenților pentru efortul depus.

Și nu în ultimul rând apreciez ca esențial suportul moral și financiar pe care l-am avut în toată această perioadă din partea părinților mei.

Timișoara, februarie 2007

Ing. Svetlana Cacig

Părinților mei,

Cacig, Svetlana

Posibilitatea utilizării extractelor vegetale ca ingrediente naturali pentru medicamente, cosmetice și alimente

Teze de doctorat ale UPT, Seria 4, Nr. 1, Editura Politehnica, 2007, 248 pagini, 57 figuri, 90 tabele.

ISSN: 1842-8223

ISBN: 978-973-625-428-4

Cuvinte cheie:

extracte, flavonoide, *Ziziphus jujuba*, *Hydrangea paniculata*, metode de extracție, activitate antioxidantă

Rezumat:

Utilizarea extractelor vegetale ca ingrediente pentru medicamente, cosmetice și alimente este o problemă de actualitate, valorificarea plantelor fiind o preocupare la nivel național și internațional. În vederea valorificării plantelor în diverse domenii este necesară cunoașterea conținutului lor în principii active, utilizarea unor metode avantajoase de extracție, purificarea extractelor și utilizarea lor în diferite domenii de activitate. Teza prezintă contribuții privind obținerea și caracterizarea unor extracte vegetale din specii ale genului *Ziziphus* și *Hydrangea*, pe de o parte, iar pe de altă parte, posibilitatea folosirii acestor extracte în diverse aplicații în industria alimentară și farmaceutică.

CUPRINS

Introducere	8
PARTEA I. CONSIDERAȚII GENERALE	10
I. FLAVONOIDE	10
I.1. Flavonoide-generalități	10
I.2. Chimia flavonoidelor	11
I.2.1. Structură. Nomenclatură. Clasificare	11
I.2.2. Proprietăți fizice	15
I.2.3. Proprietăți chimice	15
I.3. Extracția și izolarea flavonoidelor	24
I.3.1. Metode clasice de extracție a flavonoidelor	24
I.3.2. Tehnici moderne de extracție a flavonoidelor	25
I.3.2.1. Extracția cu lichide supercritice	25
I.3.2.2. Extracția cu ultrasunete	26
I.3.2.3. Extracția cu microunde	27
I.4. Identificarea flavonoidelor	28
I.4.1. Reacții de culoare	28
I.4.2. Spectroscopia ultraviolet-vizibil	33
I.4.3. Spectroscopia IR	35
I.4.4. Spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară	37
I.4.5. Spectroscopia de masă	39
I.4.6. Metode cromatografice de identificare a flavonoidelor	41
I.4.6.1. Cromatografia pe hârtie	41
I.4.6.2. Cromatografia în strat subțire	43
I.4.6.3. Cromatografia pe coloană	44
I.4.6.4. Cromatografia de lichide de înaltă performanță	45
I.4.6.5. Cromatografia de gaze	48
I.5. Activitatea flavonoidelor	50
I.5.1. Activitatea antioxidantă	50
I.5.2. Activitatea biologică	58
I.5.3. Funcția biologică	61
I.6. Distribuția flavonoidelor în plante	61
I.7. Aplicațiile flavonoidelor	63
I.7.1. Efectele farmacologice ale flavonoidelor	63
I.7.2. Aplicațiile flavonoidelor în industria alimentară	65
I.7.3. Alte aplicații ale flavonoidelor	66
PARTEA A –II-A. CONTRIBUȚII PROPRII	68
II.1. DATE BOTANICE ASUPRA SPECIILOR STUDIATE	68
II.1.1. Genul <i>Ziziphus</i>	68
II.1.2. Genul <i>Hydrangea</i>	72
II.2. OBTINEREA EXTRACTELOR DE <i>ZIZIPHUS</i> ȘI <i>HYDRANGEA</i>	76
II.2.1. Obținerea extractelor apoase de <i>Ziziphus</i> și <i>Hydrangea</i>	76
II.2.2. Obținerea extractelor alcoolice de <i>Ziziphus</i> și <i>Hydrangea</i>	77
II.2.2.1. Obținerea extractelor prin macerare (extracție statică)	77
II.2.2.2. Obținerea extractelor prin extracție la reflux	78
II.2.2.3. Obținerea extractelor prin extracție multiplă (Soxhlet)	79
II.2.2.4. Obținerea extractelor hidrolizate, în vederea îndepărtării resturilor de agliconi	80

II.3. CARACTERIZAREA EXTRACTELOR DE <i>HYDRANGEA PANICULATA</i> ȘI <i>ZIZIPHUS JUJUBA</i>	82
II.3.1. Compușii flavonoidici	82
II.3.1.1. Reacții de culoare specifice pentru principalele clase de flavonoide	82
II.3.1.2. Identificarea flavonoidelor prin cromatografie în strat subțire	82
II.3.1.3. Identificarea resturilor flavonoidice prin spectroscopie IR	85
II.3.1.4. Purificarea extractelor flavonoidice	87
II.3.1.4.1. Purificarea extractelor de <i>Hydrangea paniculata</i>	87
II.3.1.4.2. Purificarea unui extract de <i>Hydrangea aspera</i>	94
II.3.1.4.3. Purificarea unui extract din fructe de <i>Ziziphus jujuba</i>	96
II.3.1.4.4. Purificarea extractelor de <i>Hydrangea</i> și <i>Ziziphus</i> prin flash cromatografie	98
II.3.1.5. Identificarea și dozarea flavonoidelor prin cromatografie de lichide de înaltă performanță	102
II.3.1.6. Analiza cantitativă a flavonoidelor	106
II.3.2. Compușii polifenolici	110
II.3.2.1. Identificarea calitativă a compușilor polifenolici	110
II.3.2.2. Determinarea cantitativă a compușilor polifenolici	110
II.3.3. Antocianidinele	114
II.3.3.1. Analiza calitativă a antocianidinelor	114
II.3.3.2. Analiza cantitativă a antocianidinelor	114
II.3.4. Taninuri	117
II.3.4.1. Identificarea taninurilor prin reacții de culoare și precipitare	118
II.3.4.2. Analiza cromatografică a taninurilor	119
II.3.4.3. Determinarea procentului total de taninuri	119
II.3.5. Determinarea activității antioxidante a extractelor de <i>Hydrangea</i> și <i>Ziziphus</i>	124
II.3.5.1. Determinarea activității antioxidante prin metoda cu $KMnO_4$	124
II.3.5.2. Determinarea activității antioxidante prin metoda DPPH	136
II.4. Posibilitatea utilizării extractelor de <i>Hydrangea</i> și <i>Ziziphus</i> în diverse aplicații	143
II.4.1. Aplicarea extractelor vegetale de <i>Ziziphus jujuba</i> și <i>Hydrangea paniculata</i> ca antioxidanți ai uleiurilor vegetale	143
II.4.1.1. Determinarea indicelui de peroxid a uleiului de floarea soarelui cu adaos de antioxidanți naturali și sintetici, menținut la 25°C și expus la lumină pe o perioadă de 50 de zile.	146
II.4.1.2. Determinarea indicelui de peroxid a uleiului de floarea soarelui cu adaos de antioxidanți naturali și sintetici, menținut la 98°C timp de 12 ore.	150
II.4.1.3. Determinarea indicelui de peroxid a uleiului de floarea soarelui cu adaos de antioxidanți naturali și sintetici, expus la aer (la lumină și întuneric) pe o perioadă de 50 de zile.	156
II.4.1.4. Modelarea matematică statistică a variației indicelui de peroxid pentru uleiul de floarea soarelui tratat cu antioxidanți naturali și sintetici.	163
II.4.1.4.1. Modelarea degradării oxidative în timp a uleiului de floarea soarelui expus la lumină și păstrat la întuneric	164
II.4.1.4.2. Modelarea degradării oxidative în timp a uleiului de floarea soarelui supus tratamentului termic la 98°C	166
II.4.2. Verificarea activității antioxidante a extractelor de <i>Hydrangea paniculata</i> și de <i>Ziziphus jujuba</i> la nivel celular.	168

II.4.3. Determinarea efectului unui extract de <i>Ziziphus jujuba</i> asupra unor parametrii biochimici și asupra activității unor enzime la șobolani	172
II.4.4. Încorporarea unui extract din fructe de <i>Ziziphus jujuba</i> în diverse formulări farmaceutice	185
II.4.5. Aplicații ale extractului de <i>Ziziphus jujuba</i> ca adaos în hrana animalelor	187
Concluzii	202
Bibliografie	210
Anexe	222

INTRODUCERE

Utilizarea extractelor vegetale ca ingrediente pentru medicamente, cosmetice și alimente este o temă de interes, valorificarea plantelor fiind o preocupare la nivel național și internațional. În vederea valorificării plantelor în diverse domenii este necesară cunoașterea conținutului lor în principii active, utilizarea unor metode avantajoase de extracție, purificarea extractelor și utilizarea lor în diferite domenii de activitate.

Pornind de la aceste considerente și având ca bază materialul vegetal recoltat din flora Grădinii Botanice Macea din partea de vest a țării, localitatea Macea, județul Arad, obiectivul acestei teze este obținerea unor extracte vegetale, caracterizarea acestora și valorificarea lor. Materialul vegetal luat în studiu aparține grupului sistematic al Angiospermelor, și anume speciile *Ziziphus jujuba*, *Ziziphus lotus*, *Hydrangea paniculata* și *Hydrangea aspera* și a fost ales datorită conținutului lor puțin studiat de compuși activi din clasa flavonoidelor, unele studii indicând doar prezența flavonoidelor în fructele, respectiv frunzele acestor specii.

Varietățile genului *Ziziphus* (*Rhamnaceae*), *Ziziphus jujuba* și *Ziziphus lotus*, deși originare din China, Africa și America de Nord, în țara noastră sunt răspândite îndeosebi în Dobrogea și în unele parcuri botanice din zona centrală și de vest a țării. Cunoscută în România sub numele de "curmalul chinezesc" sau "măslin dobrogean", au fost studiate în țările de origine din punct de vedere al aplicabilității lor în medicină și farmaceutică, dar foarte puțin din punct de vedere al compoziției lor în principii active. Deși unele studii indică doar prezența flavonoidelor în fructele, respectiv frunzele acestor specii, ne-am propus în lucrarea de față studiul detaliat al acestor principii active, precum și posibilitatea utilizării extractelor vegetale din aceste specii în diverse aplicații.

Varietățile genului *Hydrangea* (*Hydrangeaceae*), *Hydrangea paniculata* și *Hydrangea aspera*, originare din Asia Centrală și de Est, cunoscută în țara noastră sub numele de "hortensia" sunt utilizate în medicină și cosmetică datorită conținutului lor de flavonoide în rădăcină. Ne-am propus studiul de principii active și din frunzele acestor specii.

Teza cuprinde două părți principale:

Partea I, în care sunt prezentate considerațiile teoretice generale cu privire la flavonoide: structură, nomenclatură, clasificare, proprietăți fizice și chimice, activitatea antioxidantă și biologică, metode de extracție și identificare, precum și aplicațiile lor farmacologice, terapeutice și alimentare.

Partea a II a, în care sunt prezentate contribuțiile proprii, cuprinde în primul rând datele generale privind plantele studiate, metodele de extracție și de analiză a principiilor active pentru caracterizarea compușilor chimici prezenți în frunzele și fructele speciilor studiate.

În cadrul tezei de doctorat obiectivele urmărite au fost:

1. Extracția flavonoidelor din materialul vegetal, prin mai multe metode și purificarea extractelor pentru obținerea unor „extracte standardizate”, în vederea aplicării lor în diverse domenii;

2. Determinarea calitativă și cantitativă a conținutului de flavonoide, polifenoli, antocianidine și taninuri;

3. Studiul posibilității de folosire a extractelor ca antioxidanți pentru uleiurile vegetale;

4. Determinarea activității antioxidante prin mai multe metode, pentru a stabili comparativ activitatea antioxidantă a extractelor și pentru a alege care este metoda cea mai eficientă;

5. Testarea activității biologice active a extractelor de *Hydrangea* și *Ziziphus* prin determinarea efectului antioxidant la pretratamentul leucocitelor umane cu flavonoide;

6. Testarea acțiunii extractelor asupra organismelor vii (animale de experiență) și stabilirea efectului lor asupra unor parametrii biochimici, asupra activității unor enzime și urmărirea fenomenelor oxidative în care oxigenul este utilizat în metabolismul eritrocitar, (ceretări pe animale în laboratoare de specialitate, autorizate pentru acest tip de experimente);

7. Incorporarea extractelor în diverse formulări farmaceutice și testarea externă din punct de vedere al difuzibilității epidermice și al efectului antiinflamator al acestor extracte;

8. Aplicații ale unui extract ca adaos în hrana animalelor în vederea îmbunătățirii balanței nutritive în organismul animal.

Studiile întreprinse în cadrul acestei teze au permis identificarea și determinarea cantitativă a principiilor active, în vederea caracterizării chimice cât mai complexe a speciilor *Hydrangea paniculata*, *Hydrangea aspera*, *Ziziphus jujuba* și *Ziziphus lotus* și utilizării extractelor acestora în diverse aplicații.

PARTEA I

CONSIDERAȚII GENERALE

I. FLAVONOIDE

I.1. Flavonoide –generalități

În anul 1930 Albert Szent-Gyorgi a izolat din coaja de lămâie, o substanță numită- citrină, cu rol în permeabilitatea capilarelor; din această cauză flavonoidele au fost denumite inițial "Vitamina P" (pentru permeabilitate), respectiv vitamina C₂, deoarece s-a demonstrat că ele favorizează funcția vitaminei C, îmbunătățind absorbția ei și protejând oxidarea [1].

Flavonoidele sunt un subiect de larg interes și ca urmare a cercetărilor în domeniu, numărul acestora este permanent în creștere. Astfel dacă în anul 1976 sunt citate în literatură în jur de 800 flavonoide diferite, începând din anul 1990, numărul structurilor flavonoidice raportate a crescut la 4000, iar în prezent se cunosc aproape 8000 de flavonoide.

Termenul de flavonoide (lat. *flavus* = galben) a fost utilizat la început pentru flavone, iar mai târziu această denumire a fost extinsă la diverși polifenoli din plante, incluzând mai puțin intens coloratele flavanone, flavan-3-olii necolorați care dau compuși colorați în roșu și albastru-antocianidinele. Diferențele structurale între fiecare grupă rezultă din variația numărului și pozițiile grupărilor hidroxil ca și acilarea și/ sau glicozidarea acestor grupări [2].

Datorită unor proprietăți fizico-chimice și fiziologice flavonoidele sunt incluse în clasa polifenolilor vegetali, dar datorită proprietăților specifice îndeosebi farmacologice alcătuiesc o clasă aparte [3].

Flavonoidele cuprind clase variate de substanțe naturale dintre care multe conferă florilor culoarea galbenă, portocalie, roșie, respectiv albastră florilor și fructelor în special. Ca pigmenți naturali prezenți în plante, pe lângă faptul că sunt substanțe care schimbă culoarea și împodobesc plantele pe parcursul vieții lor, ele constituie și o protecție asupra efectelor nocive produse de agenții oxidanți, cum sunt razele ultraviolete, poluarea mediului, etc [4].

Flavonoidele sunt prezente în plante, în special în grupul sistematic al Angiospermelor, și numai câteva au fost detectate în ciuperci și alge, astfel că nu există reprezentanți ai regnului vegetal care să nu conțină constituenți din clasa flavonoidelor [5]. Toate organele plantei, mai ales cele tinere și în special epidermele, frunzele tinere, mugurii, bobocii sau florile abia deschise sunt bogate în flavonoide. Formele heterozidice (hidrosolubile) se acumulează în vacuole și se concentrează în epiderma frunzelor, iar în cazul florilor sunt depozitate în celulele epidermice, în timp ce agliconii sunt repartizați în cuticula frunzelor și în lemn [6]. Și în regnul animal sunt prezente flavonoidele, dar se consideră că ele provin din regnul vegetal, fiind aduse prin alimentație.

Rezultatele a numeroase cercetări realizate pe materiale vegetale ce conțin flavonoide arată că acestea se pot utiliza nu numai ca și un nou medicament, dar și ca extract preparat pentru utilizare în alimentație (necesarul zilnic de flavonoide din alimente, în special fructe și legume fiind de 1-2 g) și în industria cosmetică [3].

Flavonoidele sunt componenți funcționali majoritari ai multor preparate vegetale sau animale cu utilizări medicale. De asemenea flavonoidele se utilizează în tratamentul a numeroase boli, inhibarea unor enzime specifice, stimularea unor hormoni și neurotransmițători și reducerea activității radicalilor liberi.

Datorită faptului că flavonoidele conțin în structura chimică un număr variabil de grupări fenolice și datorită proprietăților excelente de a forma chelați cu fierul și alte metale tranziționale, acestea prezintă o mare capacitate antioxidantă. Pentru organismul uman activitatea antioxidantă este evidențiată datorită faptului că acestea protejează celulele organismului de radicalii liberi ce se formează ca urmare a numeroase procese ce utilizează oxigenul ca sursă de energie și astfel joacă un rol esențial în protecția fenomenelor de degradare oxidativă.

Proprietățile lor antiradicalice se datorează radicalilor hidroxil și superoxid, grupări reactive care sunt implicate în inițierea proceselor de peroxidare lipidică, capacității lor de a modifica sinteza eicosanoidelor, de a prevenii agregarea plachetară (efect antimicrobian) și de a proteja lipoproteinele de bază de oxidare. Deși unele studii indică că unele flavonoide posedă acțiune prooxidativă, aceasta se produce numai la doze mari, constatându-se în majoritatea investigațiilor existența efectelor antiinflamatoare, antivirale și antialergice, precum și rolul protector în diverse patologii [4].

Metabolizarea flavonoidelor după ingestie, semnificația diferitelor varietăți de flavonoide depinde de tipul de flavonoide, geografie, cultură și sezonul considerat. În studii recente, cantitatea de flavone și flavonoli ce poate fi ingerată este estimată de unii autori până la câteva zeci de mg /zi, iar de către alții autori de 115 mg sau 1-2 g de flavonoide totale zilnic. Pentru a obține rezultate mai precise, s-au depus eforturi considerabile în diferite țări, în domeniul alimentar pentru determinarea vitaminei C și a flavonoidelor, studiile fiind axate pe flavone și/sau flavonoli, flavanone, catechine și antociani [7].

I. 2. Chimia Flavonoidelor

I. 2. 1. Structură. Nomenclatură. Clasificare

Flavonoidele sunt compuși polifenolici ce conțin 15 atomi; două inele benzenice unite printr-o punte liniară de trei atomi de carbon ($C_6-C_3-C_6$) [8].

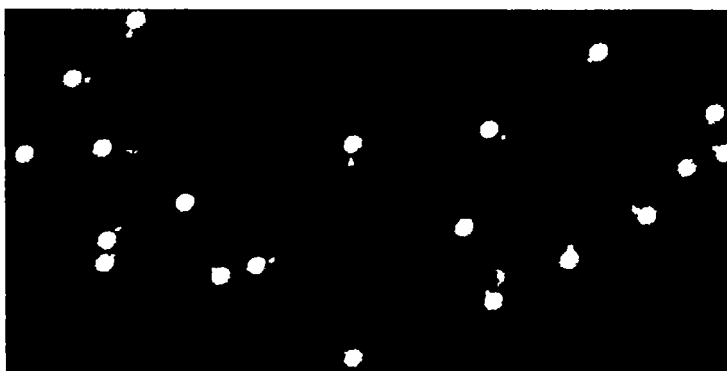
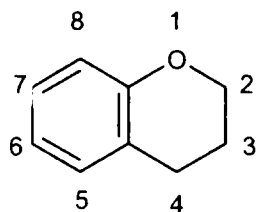
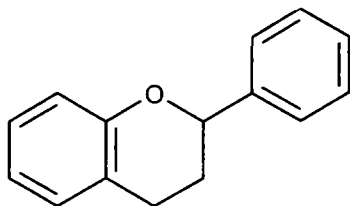


Figura 1. Structura generală a flavonoidelor

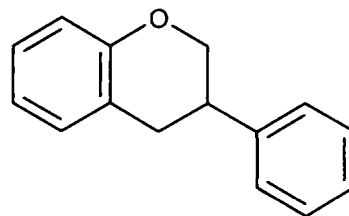
Fragmentul C₃ se găsește într-un heterociclu cu oxigen, piranic, condensat cu un nucleu benzenic, motiv pentru care flavonoidele sunt definite și ca fiind derivați a benzopiranului având un radical fenil substituit în poziția 2 (flavone), în poziția 3 (izoflavone).



benzopiran
(croman)

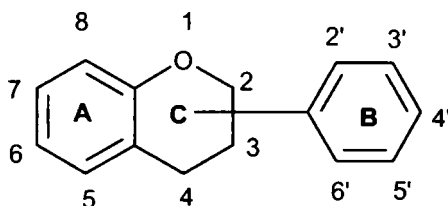


flavan (2-fenilbenzopiran)



izoflavan (3-fenil-benzopiran)

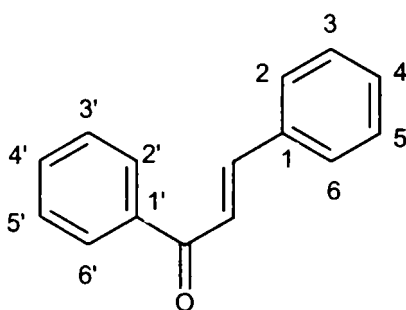
La modul general, structura chimică a flavonoidelor are la bază un schelet C₁₅ cu un inel de croman legat de al doilea inel B (aromatic), în poziția 2, 3 sau 4.



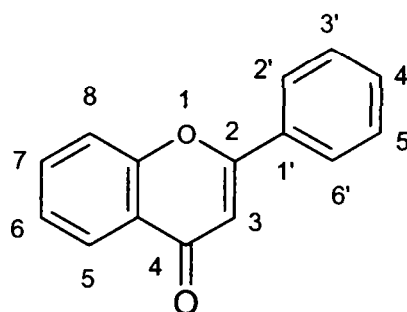
O mare varietate de flavonoide se clasifică în acord cu modul de substituție al inelului C. Starea de oxidare a ciclului heterociclic și poziția ciclului B are importanță în clasificare.

Flavonoidele se subîmpart în mai multe serii de compuși [3]:

1. **Calcone** – reprezintă precursorii direcți ai flavonelor, care apar îndeosebi în flori, lemn și rădăcină și ca și ceilalți compuși flavonoidici se găsesc mai ales sub formă de glicozizi.



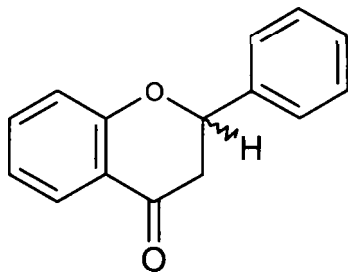
calcone



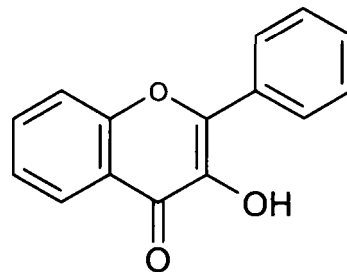
2-fenil-cromona (flavona)

2. **Flavonele** – sunt derivați ai 2-fenil-benzopiranului cu dublă legătură în poziția 2-3. Sunt pigmentii galbeni care se găsesc în flori, fructe și frunze sub formă de glicozizi, iar în lemn și scoarță, atât libere cât și ca glicozizi.

3. **Flavanonele** – sunt derivații 2,3-dihidrogenați ai flavonelor. Sunt incolore și se găsesc în frunze, flori și semințe sub formă de glicozizi, iar în lemn și scoarță libere.



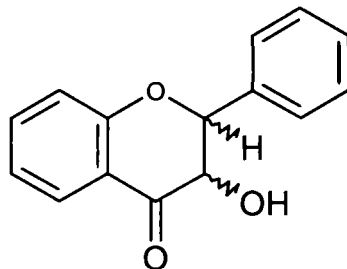
flavanone



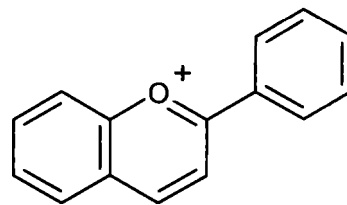
flavonoli

4. **Flavonoli** – 3-hidroxi-flavonele, sunt compușii cei mai răspândiți în speciile vegetale, în general în lemnul angiospermelor.

5. **Flavanonoli (catechine)** – sunt derivații 3-hidroxi-lați a flavanonelelor.



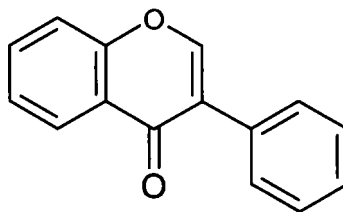
flavanonoli



antocianidine

6. **Antocianidinele** – sunt pigmenții ce dau culoarea roșie și albastră florilor și fructelor. În general se găsesc ca glicozizi numiți antociani. Antocianii există și în alte părți ale plantei având o apariție temporară, de exemplu în plante și frunze toamna.

7. **Izoflavonele** – sunt derivați ai 3-fenilbenzopiranului, ceea ce le încadrează în domeniul flavonoidelor ca proprietăți generale, dar au și proprietăți specifice

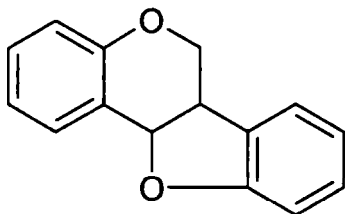


izoflavone

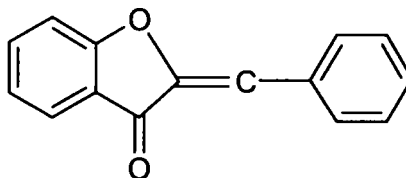
Datorită poziției 3 a nucleului fenilic substituit, ele pot conduce ușor la închiderea de noi cicluri, fie pironice, fie în poziția 2-3, fie în poziția 7-8, unde complicarea structurii poate fi încă mai accentuată.

Dintre izoflavonele cele mai importante, fac parte: pterocarpanii, auronele și rotenoidele.

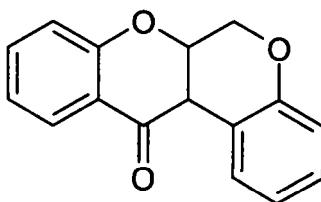
a). **Pterocarpanii** – sunt produși de ciclizare ai izoflavonelor în care între C_6 al nucleului fenilic substituit și gruparea cetonică de la C_4 a ciclului piranic, se închide un nou ciclu furanic. În natură sunt cunoscuți îndeosebi ca fitoalexine.



pterocarpani



aurone



rotenoide

b). **Auronele** – sunt derivați ai benzal-cumaranonei și reprezintă o parte din pigmenții de culoare galben-aurie ai florilor.

c). **Rotenoidele** – sunt izoflavone cu structuri mai complicate. Acestea sunt izoflavone de origine hemiterpenică și care mai închid încă un al doilea ciclu piranic între nucleul benzopiranic (flavanic) și fenilul substituit, din poziția 3.

I.2.2. Proprietăți fizice

Proprietățile fizice depind de clasa de flavonoide și de forma în care se găsesc (liberă, glicozidică sau sulfat). De exemplu flavonele, flavonolii și auronele datorită sistemului conjugat sunt substanțe solide cu colorație de la galben foarte slab până la roșu. Glicozizii (glicozidele) sunt în general solide amorfe, în timp ce agliconii și compușii metoxilați sunt cristalini. Antocianidinele sunt de culoare roșu intens, violet închis, violet și albastru [9].

Culoarea derivaților flavonici se datorează grupărilor cromofore $-C=C-C=$. Gruparea hidroxilică din poziția 3 contribuie la colorația galbenă, iar grupările din pozițiile 3' și 4' la colorația galben închis. Prezența grupărilor OH în poziția 3,3' și 4' accentuează culoarea galbenă [3].

Solubilitatea flavonoidelor depinde de structura caracteristică și de numărul de substituenți prezenți (numărul grupelor polare). Flavonoidele sunt greu solubile în apă, iar agliconii sunt practic insolubili în apă, în schimb sunt solubili în eter etilic. Rutina se dizolvă 1:20 în apă fierbinte și 1:10000 în apă rece. În scopuri preparative se utilizează această diferență de solubilitate la diferite temperaturi, precum și solubilitatea agliconilor în eter etilic, pentru a-i separa de flavonoide [3].

Glicozidele, antocianidinele și sulfații sunt solubili în apă și alcool (alcool metilic și alcool etilic). Agliconii flavonoidelor, îndeosebi cei hidroxilați sunt solubili în alcool (alcool metilic, alcool etilic și n-butanol), iar agliconii metoxilați sunt solubili în solvenți mai puțin polari, cum sunt eterul de petrol și cloroformul.

Flavonoidele cu hidroxil fenolic sunt solubile în soluții alcaline, iar cele hidroxilate se descompun sub acțiunea bazelor tari, ceea ce permite recunoașterea și diferențierea de celelalte, metodă folosită pentru elucidarea structurii [9].

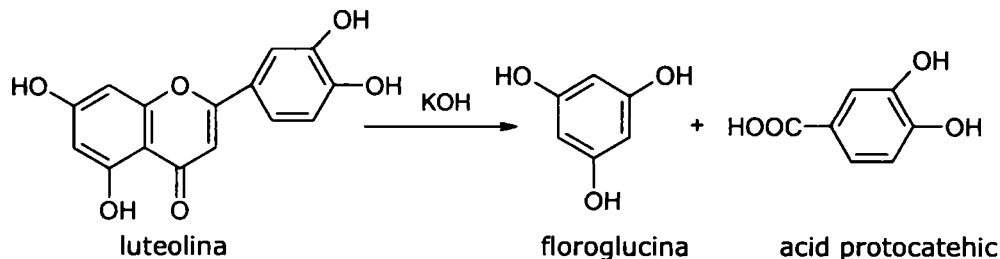
Flavonele, substanțe lipsite de gust și miros sunt solubile în alcool, acetonă, acid acetic, sunt greu solubile în eter etilic și practic insolubile în cloroform, benzen și eter de petrol. Antocianii sunt solubili în apă și alcool, greu solubili în eter, benzen și cloroform [5].

În lumina ultravioletă filtrată, flavonoidele prezintă fluorescență caracteristică. Agliconii flavonoidelor sau flavonoidele ce conțin un hidroxil liber în poziția 3, au fluorescență aurie până la galben verzuie. Când hidroxilul din poziția 3 lipsește sau este blocat prin glicozidare, fluorescența este de culoare brună, iar dacă hidroxilii sunt metoxilați, odată cu creșterea gradului de metoxilare nuanța fluorescenței virează către albastru luminos. În soluții acide, la lumina zilei, fluorescența este galben verzuie cu acid clorhidric și albastră cu soluție de acid sulfuric concentrat, ca urmare a formării sărurilor de flaviliu [3].

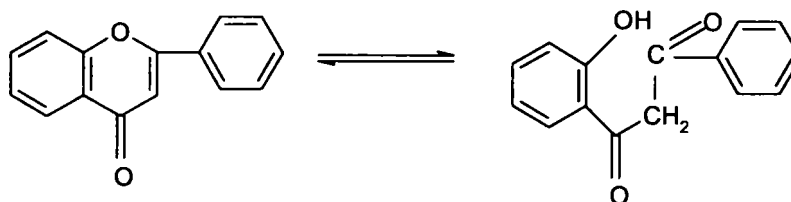
I.2.3. Proprietăți chimice [5, 9,10]

Flavonoidele sunt sensibile la acțiunea bazelor, acizilor, pot fi alchilate, hidrogenate. Prin diferite reacții de oxidare, reducere sau izomerizare, flavonoidele aparținând unei anumite grupe pot fi transformate în compuși aparținând altei grupe de compuși.

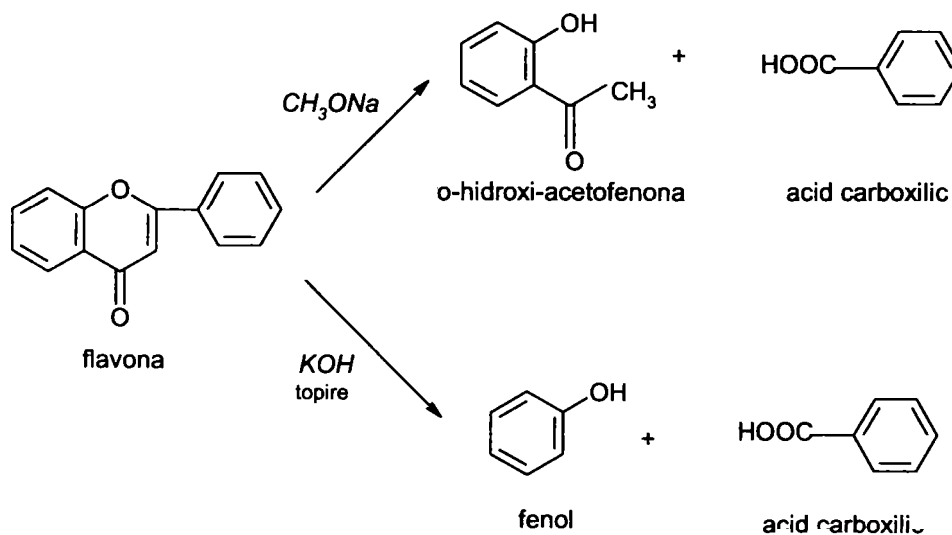
- Reacția cu hidroxizii alcalini. O proprietate comună este degradarea prin topire cu alcalii, când inelul 2-fenilcromonei se rupe și din inelul A se formează un polifenol, iar din inelul B, un acid hidroxibenzoic. Această reacție se folosește la stabilirea structurii flavonoidelor.



Sub acțiunea alcaliilor în soluție, sau a acizilor, inelul piranic se deschide stabilindu-se un echilibru între flavonă și dicetona rezultată. În mediu acid, echilibrul este deplasat spre stânga, se favorizează forma ciclică, în timp ce mediul bazic favorizează forma aciclică [5].

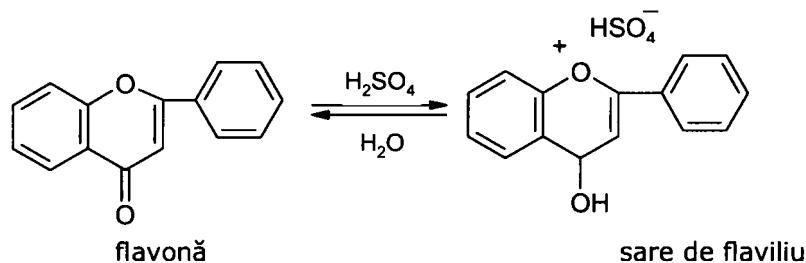


În cele mai multe cazuri, în mediu alcalin sau de alcooxizi, deschiderea ciclului piranic este urmată de ruperea catenei, iar poziția unde se face ruperea depinde de condițiile de lucru și de natura substituenților din C₂, ducând la următorii produși principali:

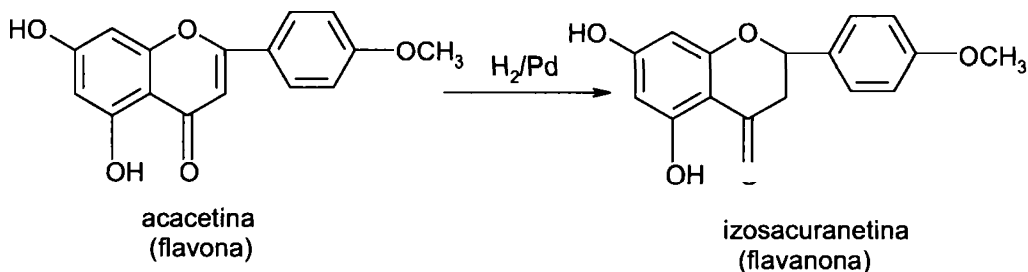


Flavonele și flavonolii se dizolvă în alcalii formând soluții galbene, destul de stabile atunci când flavona nu conține mai mult de cinci grupări hidroxilice sau trei grupări hidroxilice învecinate.

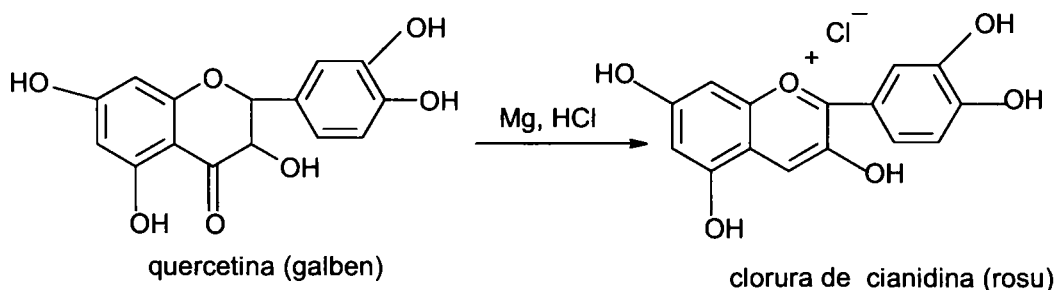
Prin dizolvarea flavonelor în acid sulfuric concentrat se formează săruri de flaviliu colorate galben intens. Prin diluare cu apă sărurile de piriliu hidrolizează și compusul flavonic precipită. Prezența grupărilor hidroxilice pe inelul A și B măresc bazicitatea flavonei.



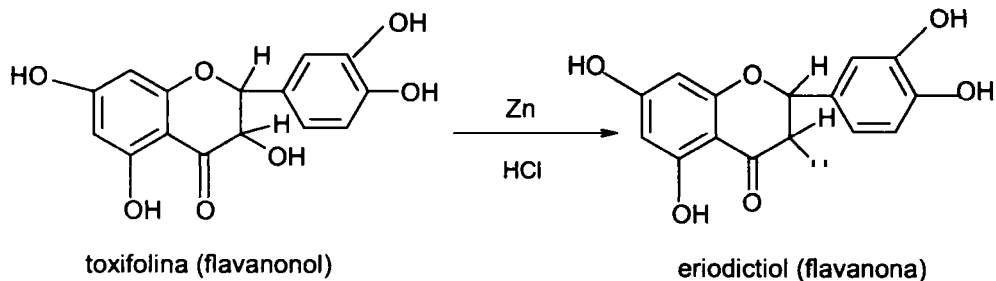
• **Hidrogenarea.** Flavonele se transformă prin hidrogenare în alte flavonoide cu grad de oxidare mai redus. Prin hidrogenarea flavonelor cu negru de paladiu în tetrahidronaftalină, are loc adiția hidrogenului la dubla legătură din inelul piranic și se obțin flavonele corespunzătoare. În mai multe cazuri are loc deschiderea ciclului și se formează dihidrocalcone.



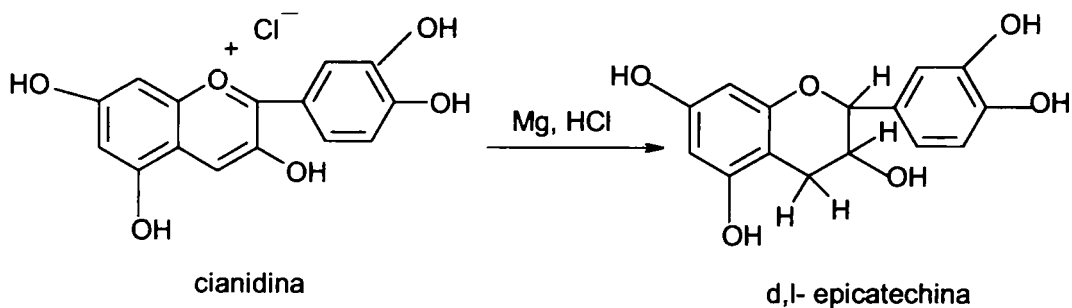
Prin reducere cu Mg și HCl în mediu apos sau cu hidrură de litiu și aluminiu, flavonolii pierd gruparea carbonil cu formare de antocianidine, reacție denumită și „*reacția cianidinei*”. Această reacție se folosește ca test pentru identificarea flavonolilor.



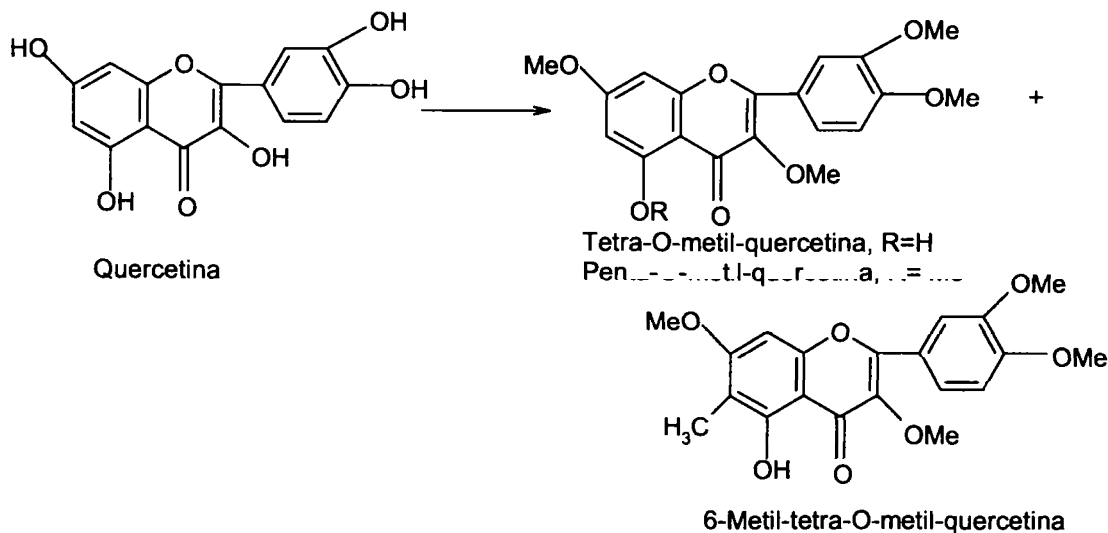
Flavanonolii pot fi reduși cu Zn și HCl la flavanone. De exemplu, toxifolina este redusă la eriodictiol.



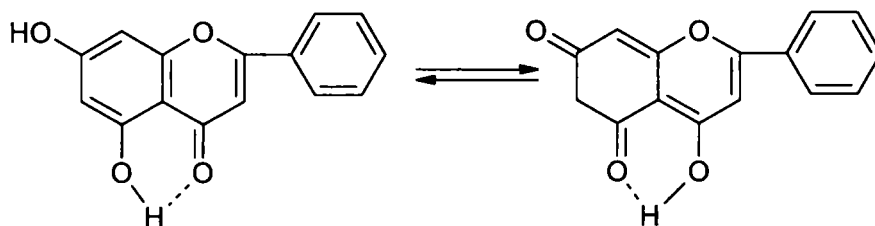
Antocianidinele prin reducere cu Mg și HCl trec în catechine. Din cianidină rezultă d,l-epicatechină.



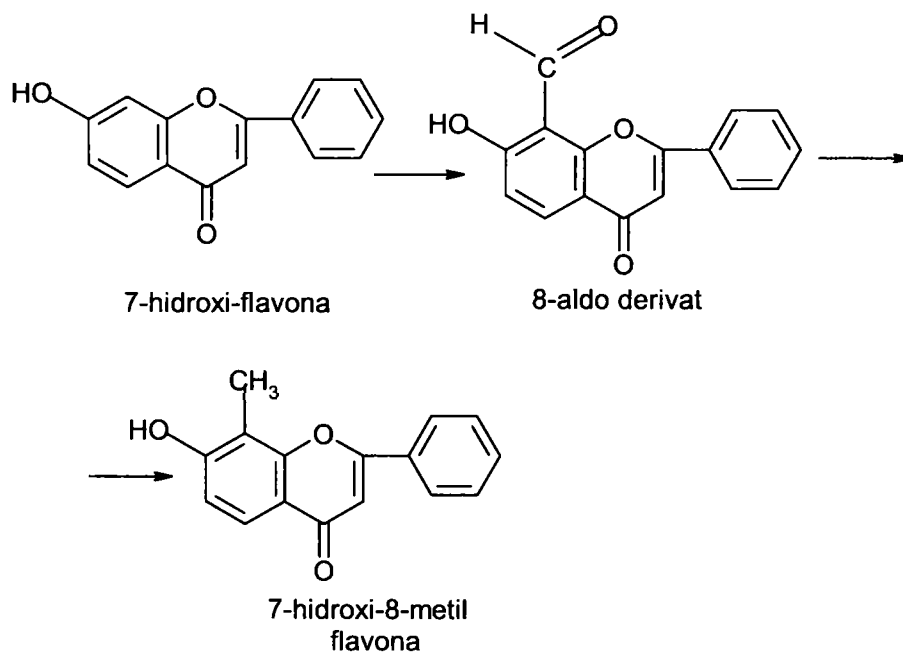
• Metilarea și demetilarea. Grupările hidroxilice ale flavonelor pot fi metilate, gruparea din poziția 7 fiind cea mai reactivă, iar gruparea din poziția 5, mai puțin reactivă datorită posibilității de chelatizare. Metilarea cu CH_3I are loc în mediu alcalin, de KOH sau NaOCH_3 , când are loc o „metilare nucleară”.



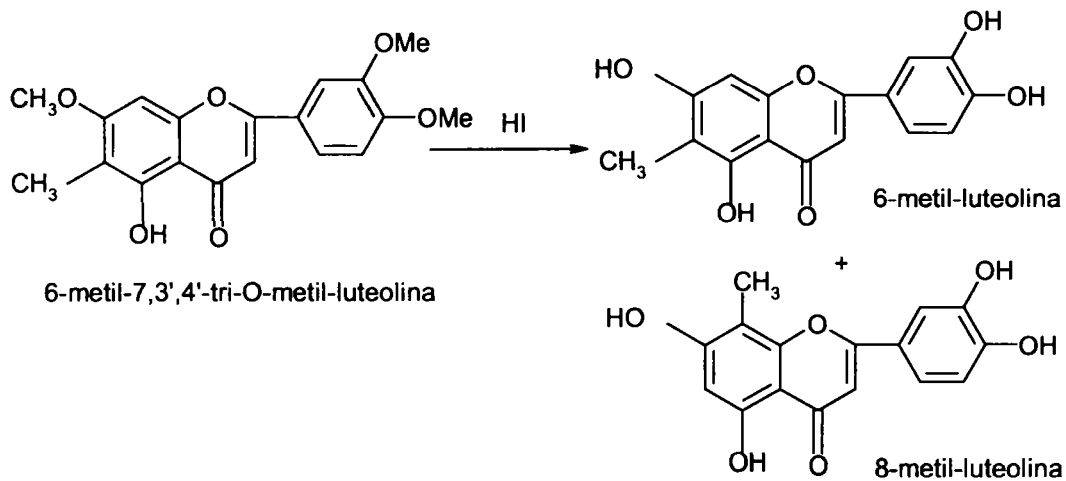
Reacția de metilare „nucleară” care se petrece la tratarea flavonelor cu CH_3I în mediu alcalin este condiționată de prezența grupărilor hidroxilice în poziția 5 și 7, capabile să treacă în forma tautomeră β -dicetonică.



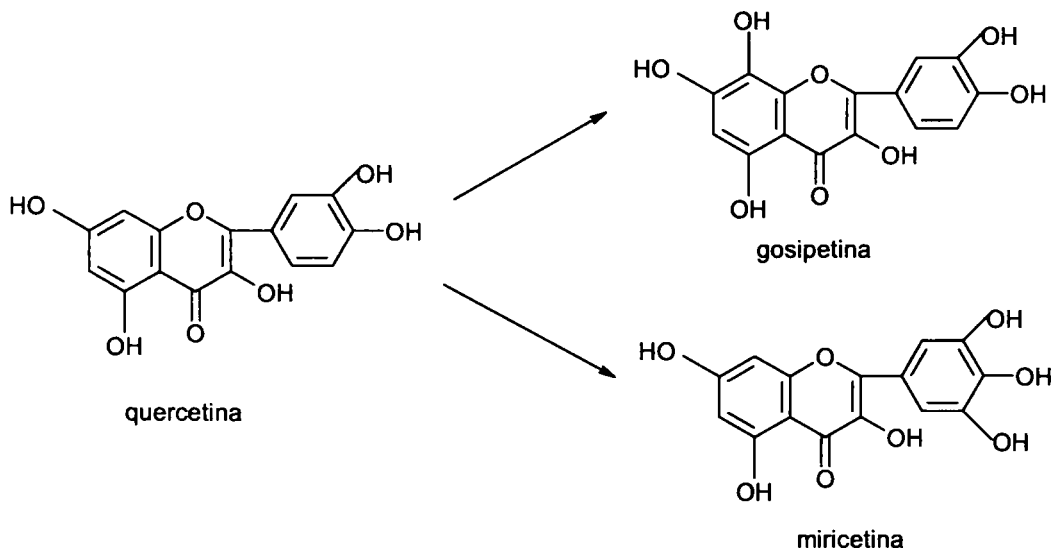
Metilarea „nucleară” se poate produce și printr-un alt procedeu care cuprinde două etape și anume introducerea unei grupări aldehydice și reducerea acesteia cu o cantitate calculată de hidrogen, când se obțin 8-metilflavone sau 6-metil-flavone (când poziția 8 nu este liberă).



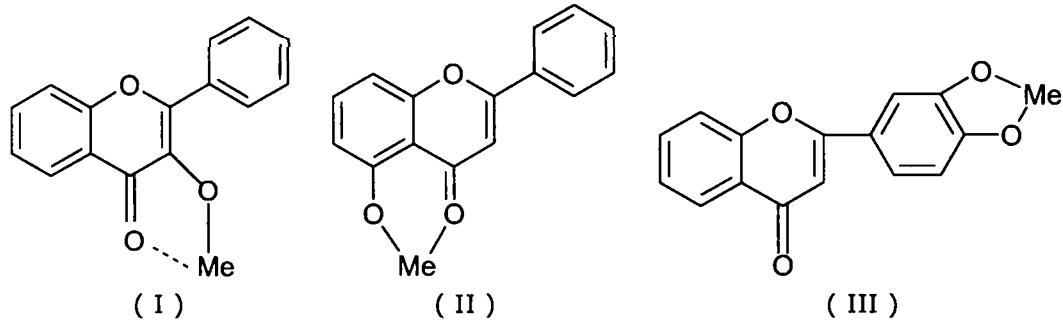
Demetilarea eterilor cu HI sau alți acizi produce în unele cazuri și o izomerizare conducând la un amestec de 6-metil- și 8-metil-luteolină.



• Oxidarea și reducerea „nucleară”. Oxidarea „nucleară” sau hidroxilarea flavonelor permite obținerea unor compuși superiori hidroxilați pornind de la compuși mai simpli. De exemplu în cazul hidroxilării quercetinei, în inelul A s-a obținut gossipetina și prin hidroxilare în inelul B, miricetina.

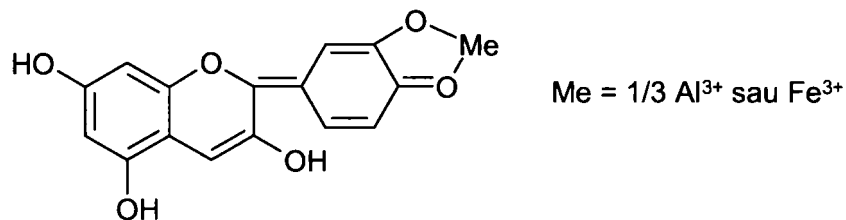


• Formarea complexelor cu metale. Flavonele care conțin o grupare hidroxilică în orto (I) sau peri (II) față de gruparea carbonil, precum și acelea care conțin două grupări în orto în nucleul B (III) formează complexe cu metale.

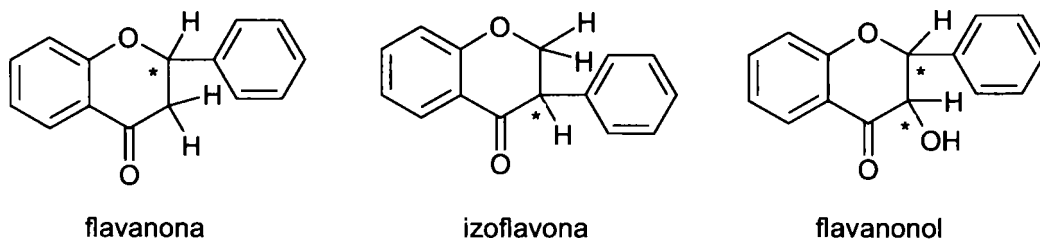


Datorită acestei proprietăți, compușii flavonici au fost utilizați încă din antichitate la vopsirea țesăturilor cu mordanți de Al și Cr. Complecșii cu metalele prezintă în UV o fluorescență caracteristică, ceea ce permite folosirea compușilor flavonoidici ca relevatori în cromatografia pe hârtie pentru cationii metalici. Acțiunea stabilizatoare a flavonelor asupra autooxidării vitaminei C și a adrenalinei constă în blocarea ionilor metalelor grele (în special de Cu^{2+}), care catalizează reacția de autooxidare.

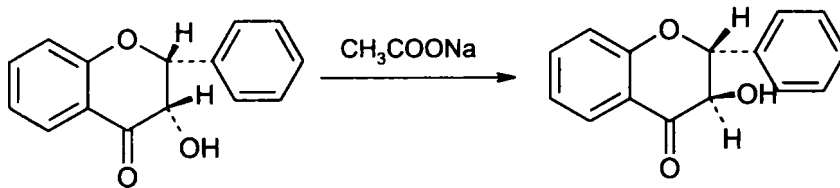
Antocianii și antocianidinele care au pe inelul B două sau trei grupări hidroxilice învecinate, formează cu metalele (Al^{3+} , Fe^{3+}) complecși de culoare albastră închisă.



• **Izomerizarea.** Datorită configurației de la atomul C_2 al flavonoidelor, respectiv C_3 la izoflavone și flavanonoli, acestea prezintă izomerie optică.

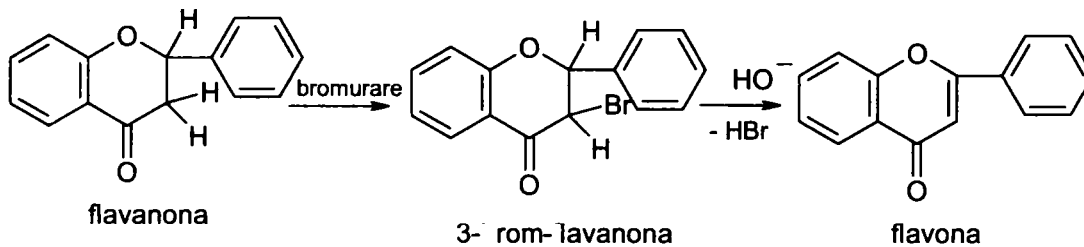


În cazul flavanonolilor mai intervine și asimetria de la carbonul din heterociclu, care poartă gruparea hidroxilică și astfel există patru forme tautomere. Studiul configurației acestor compuși a stabilit că pentru flavanonolii naturali, configurația *trans* este cea mai stabilă. Prin sinteză s-a obținut și configurația *cis*, dar aceasta izomerizează prin tratare cu acetat de sodiu în forma *trans*.

flavanonol, forma *cis* sinteticăflavanonol, forma *trans* naturală

Datorită acestei configurații *trans*, flavanonolii naturali se dehidrogenează în mediu alcalin sau acid, în prezența oxigenului din aer, cu transformare în flavonoli.

Numeroase flavone și glicozizii lor au fost transformate în flavone prin bromurare în poziția 3, urmată de dehidrobromurare sub acțiunea alcaliilor.

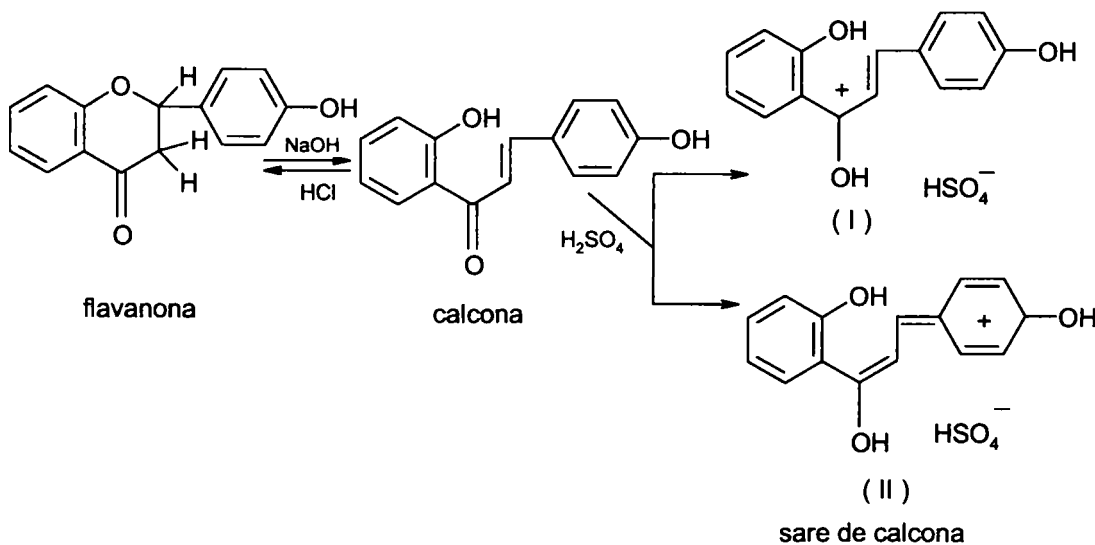


flavanona

3- brom- flavanona

flavona

Deosebit de importantă este izomerizarea flavanonei cu deschiderea ciclului oxigenat, cu formare de calcon. De exemplu prin dizolvarea flavanonei în alcalii diluate se formează soluții incolore sau galben-pal, care prin încălzire se colorează în galben până la roșu, datorită formării calconei, iar după răcire și adăugare de acid clorhidric, calconul cristalizează. De asemenea prin dizolvarea flavanonei în acid sulfuric se obțin soluții colorate în portocaliu-roșu datorită formării sărurilor calconului (I și II):



flavanona

calcon

(I)

sare de calcon

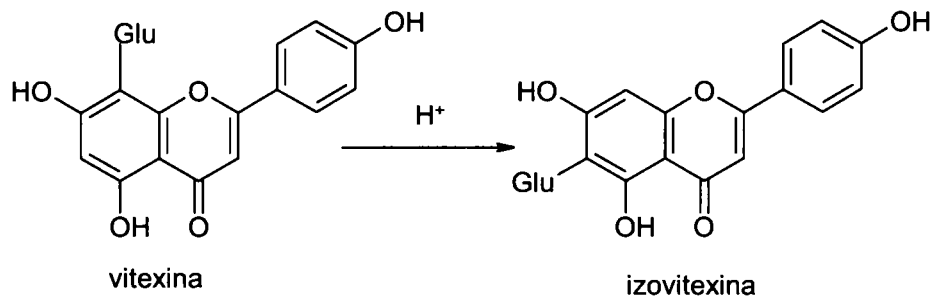
(II)

În cazul sării tip II, datorită posibilității de conjugare cu gruparea hidroxil din poziția 4', culoarea este mai intensă.

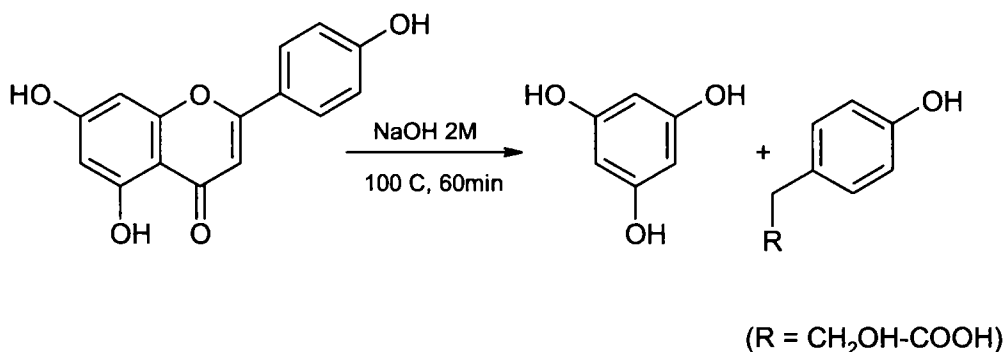
• **Hidroliza.** O-glicozidele flavonoidelor în prezență de acizi pot hidroliza eliberând resturile de zahar și agliconul flavonoidei. În general hidroliza se realizează 1 oră la reflux cu HCl 2 N: metanol = 1:1.

O-glicozidii flavonoidelor necesită condiții mai energice pentru hidroliză și aceasta se realizează cu HCl 2N, prin refluxare la 100°C, timp de 2 ore.

În aceste condiții C-glicozidele nu se hidrolizează, dar pot suferi rearanjare Wessely-Moser, cum este cazul vitexinei.



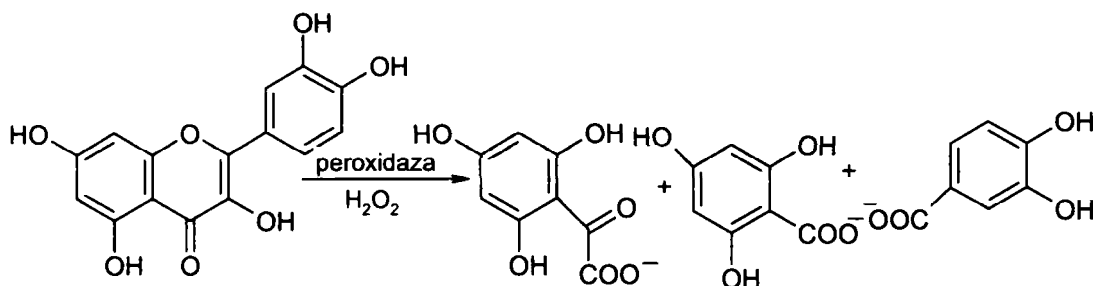
În condiții alcaline (de exemplu la reflux cu NaOH 2M, 100°C, 1 oră) nucleul flavonoidelor se rupe, eliberând substanțe cu moleculă mai mică.



• **Interconversia flavonoidelor.** Există diverse procedee experimentale pentru interconversia flavonoidelor în alți produși, în general cu scopul de a facilita identificarea lor. De exemplu, flavanonele se pot converti în flavone cu diclorodicianobenzochinonă/dioxan și Se_2O_3/Ac_2O , dihidroflavonele la flavonoli cu $AcOK/AcOH/I_2$, izoflavanonele la izoflavone cu Se_2O_3/Ac_2O și $Se_2O_3/alcool\ amilic$. Proantocianidinele (și leucoantocianidinele) la antocianidine prin fierbere cu n-butanol și 5 % HCl concentrat, timp de 1-2 ore.

Calcone sunt convertite la α,β -dibromodihidrocalcone care apoi sunt tratate cu metanol pentru a da α -bromo- β -metoxidihidrocalcone, iar prin încălzire acești compuși trec prin ciclizare la flavone. În cazul tratării unei flavanone cu N-bromosuccinimidă în prezență de peroxid de benzoil se formează 3-bromoflavone care elimină acid bromhidric și formează flavonele corespunzătoare.

• Degradarea enzimatică a flavonoidelor. Degradarea flavonoidelor care are loc sub acțiunea peroxidazei este un proces care duce la formarea hidroxibenzoaților.



Un exemplu al modificării flavonoidelor în plante sunt antocianii, care se pot acumula în decursul ontogenezei plantei, de obicei în plantele tinere, unde pot avea diferite funcții în procesele ce au loc în prezența luminii sau în filtrarea luminii. Prin acest tip de degradare antocianii dispar și de aceea se pot transforma în structuri lipsite de culoare, respectiv din produși solubili pot trece în produși insolubili.

I. 3. Extracția și izolarea flavonoidelor [3, 5, 9, 11-18]

Extracția flavonoidelor din materialul vegetal nu se realizează după o metodă standardizată, neexistând nici un dizolvant comun pentru toți compușii. De obicei materialul vegetal se extrage cu alcool etilic, alcool metilic, eter, apă, amestec acetonă și acid clorhidric și altele.

Extracția flavonoidelor se face folosind pe rând trei sau patru solvenți în ordinea crescândă a polarității, deoarece atât glicozizii cât și agliconii au solubilități foarte diferite, după gradul de metilare sau numărul de unități glucidice.

Un rol esențial îl are și polaritatea solventului. Flavonoidele polare (de exemplu, izoflavonele, flavonele metilate și flavonolii) se extrag cu clorofom, diclormetan, dietileter sau acetat de etil. Glicozidele flavonoidelor și agliconii mai polari se extrag cu alcoolii sau amestec alcool- apă, iar C-glicozidele cu soluții apoase sau apă. Flavan-3-olii (catechine, proantocianidine și taninurile condensate) pot fi extrase direct cu apă, dar cel mai bun solvent pentru catechine este considerat a fi alcoolul metilic, iar pentru procianidine, acetona 70%.

I.3.1. Metode clasice de extracție a flavonoidelor

Metodele cele mai utilizate pentru extracția flavonoidelor sunt: extracția statică –macerarea și extracția repetată– Soxhlet.

Macerarea este tehnica de extracție cea mai utilizată, procedeul care se aplică la prepararea soluțiilor extractive apoase cât și la prepararea soluțiilor extractive alcoolice, timpul de extracție variind de la 30-60 minute pentru extracția apoasă și până la zece zile pentru extracția alcoolică

Extracția repetată- extracția Soxhlet constă în extracția repetată a materialului vegetal cu un solvent organic volatil. Materialul vegetal se extrage în prima etapă cu eter etilic sau eter de petrol în vederea îndepărtării lipidelor și apoi cu acetat de etil sau alcool (alcool metilic sau alcool etilic) în vederea separării flavonoidelor.

Antocianii se pot extrage din țesuturi proaspete (de exemplu petale) prin macerare cu un solvent acid cum este de exemplu amestecul metanol-acid acetic-apă (11:1:5) sau amestec metanol-acid formic-apă (10:1:9) sau cu alcool ce conține HCl 1-2% și diluare cu eter.

Agliconii flavonoidici se pot izola, ca și flavonoidele prin extracții cu solvenți adecvați; agliconii mai puțin polari din clasa izoflavonelor, flavanonelor, flavonelor metilate se extrag bine cu benzen, cloroform, eter etilic sau acetat de etil, iar agliconii polari se extrag bine în acetonă. Agliconii pot fi eliberați prin hidroliza glicozidelor pe cale enzimatică în soluție apoasă, la temperatura camerei sau prin hidroliză acidă, de obicei cu HCl 7% la reflux circa 2 ore.

Pentru obținerea unor flavonoide brute se utilizează și alte procedee de lucru:

- produsul vegetal adus la un grad convenabil de mărunțire se extrage la reflux cu alcool 96%, după care se îndepărtează alcoolul prin distilate la vid. Reziduul care conține clorofilă, rezine, pigmenți lipofilici se reia cu apă la fierbere, se filtrează la cald și se lasă în repaus la gheață, iar după acest repaus care poate fi uneori foarte îndelungat se depun flavonele brute care apoi se purifică.

- *extracția materialului vegetal cu alcool 80%*. Extractele alcoolice se concentrează la un anumit volum și se tratează cu soluție de acetat bazic de plumb. Precipitatul plumbic filtrat se suspendă în alcool și se descompune cu H₂S prin barbotare. Alcoolul se îndepărtează prin distilare sub presiune redusă, iar reziduul se purifică.

Dacă materialul vegetal conține o cantitate mare de glucide (de exemplu, fructele), după ce s-a efectuat extracția cu alcool, acesta se îndepărtează prin distilare sub presiune redusă, se diluează cu apă și se supune fermentării în prezența drojdiei de bere, care va fermenta glucidele, fără a hidroliza flavonoidele. Soluția se centrifughează apoi pentru îndepărtarea masei de fermentație, iar soluția se lasă să cristalizeze la gheață.

În concluzie se poate afirma că pentru izolarea flavonoidelor dintr-un material vegetal, metoda adecvată se stabilește pentru fiecare material vegetal în parte. În unele cazuri se preferă un mod de lucru care combină elemente din schemele de separare descrise anterior.

I.3.2. Tehnici moderne de extracție a flavonoidelor

O îmbunătățire a randamentului de extracție s-a realizat folosind tehnici de extracție cu lichide supercritice, extracție cu ultrasunete și extracție cu microunde.

I.3.2.1. Extracția cu lichide supercritice

Metoda de extracție cu fluide supercritice este o metodă de extracție nedistructivă care face parte din procesele care au loc la presiune ridicată, bazându-se pe puterea de solvatare a fluidelor aflate la temperaturi și presiuni superioare celor corespunzătoare punctului critic.

Gazele comprimate în stare lichidă sau supercritică sunt considerate ca potențiali solvenți pentru principiile active obținute din produsele vegetale.

Avantajele oferite de gazele lichefiate sunt următoarele: posibilitatea excluderii contactului cu oxigenul, inexistența problemelor derivate din prezența reziduurilor de solvenți în extract, utilizarea unor gaze netoxice (dioxid de carbon, freon, gaze inerte, etc.), consum termic redus.

Cel mai utilizat agent de extracție în fază supercritică este dioxidul de carbon, care este preferat datorită următoarelor avantaje: în cazul extracției se lucrează la regimuri termice blânde, putându-se extrage și compuși foarte sensibili (arome, vitamine); solventul este netoxic, biologic și ecologic, nu produce reacții secundare nedorite (oxidări, hidroxilări), realizând chiar protecție față de oxigen; extractul final nu conține substanțe de balast; se poate realiza extracție selectivă, iar din extract se poate face fracționarea componentilor prin alegerea corespunzătoare a parametrilor de separare; solventul nu este rezidual în extract, iar pentru eliminarea lui nu se consumă energie; extractul obținut nu mai necesită purificări; față de procedeele clasice de extracție posedă un grad de libertate în plus, presiunea și consum energetic redus.

Dioxidul de carbon este un solvent nepolar extrăgând cel mai bine compuși nepolari, însă puterea de solvatare și selectivitatea pot fi îmbunătățite prin utilizarea co-solvenților polari, cei mai utilizați fiind etanolul și metanolul și solvenți nepolari, cum sunt hidrocarburile ușoare.

Extracția cu lichide supercritice poate fi utilizată nu numai la izolarea uleiurilor din materialul vegetal, ci și la îmbunătățirea proprietăților fizice și chimice ale acestora, fiind surse importante pentru industria cosmetică. Extracția cu fluide supercritice nu poate schimba culoarea și mirosul extractului final și poate să realizeze aceasta fără a introduce solvent rezidual în preparatele vegetale.

Prin această metodă extracția este accelerată de temperatura și presiunea ridicată, ceea ce determină o intensificare a difuzibilității solventului și în aceeași timp este o posibilitate a desfășurării extracției sub atmosferă inertă și cu protecție față de lumină. Avantajul acestei metode este consumul redus de solvenți, selectivitatea controlată și degradarea termică și chimică redusă, timpul scurt de extracție, față de alte metode cum sunt macerarea și extracția Soxhlet [8].

Prin această metodă s-au extras rutina și izoquercetina din flori de *Sambucus nigra* [8], flavonoidele din *Rhodiola rosea* [19], oronitina și oronitin-5-metileterul din *Patrinia villosa*[20], baicalina, baicaleina și vogonina din *Scutellariae Radix*[21] și flavonoidele din *Ginkgo biloba*[22]. Condițiile de extracție au fost diferite: pentru extracția flavonoidelor din *Patrinia villosa*: 25 Mpa, 45°C, CO₂ cu 20% metanol; în cazul flavonoidelor din *Scutellariae Radix*: dioxid de carbon-metanol-apă (20:2:1:0.9), 50°C și 20 Mpa; pentru flavonoidele din *Ginkgo biloba*: 24.2-31.2 Mpa și 333- 393 K.

I.3.2.2. Extracția cu ultrasunete

Ultrasunetele sunt utilizate mai mult la extracția uleiurilor esențiale și uleiurilor volatile din plante, deoarece este mult mai rapidă și eficientă decât tehnicile clasice.

Extracția cu ultrasunete se folosește îndeosebi pentru extracția substanțelor biologic active, atât din materia primă animală, cât și din cea vegetală. Fenomenul care stă la baza utilizării ultrasunetelor în extracția principiilor active din plante este cavitația, prin efectele termice, mecanice și structurale, sub influența căruia are loc vidarea celulelor prin ruperea membranelor, permitându-se culegerea compușilor celulari sub formă de soluție.

Extracția ultrasonată se poate realiza în două moduri:

- utilizând o baie de extracție cu frecvența de 33 KHz
- utilizând un reactor de sticlă având un sistem ultrasonic conic, cu frecvența de 20 KHz

Prin tratarea cu ultrasunete a sistemului solid –lichid, crește randamentul de extracție, se reduce durata de extracție și se obțin produse de extracție de calitate superioară.

Ultrasunetele sunt utilizate mai mult la extracția uleiurilor esențiale și uleiurilor volatile din plante, deoarece este mult mai rapidă și eficientă decât tehnicile clasice.

Extracția cu ultrasunete este aplicată pentru extracția materialului vegetal utilizând solvenți lichizi, și este un procedeu de extracție mai rapid și mai complet în comparație cu metodele tradiționale cum sunt macerarea/agitarea, deoarece suprafața de contact dintre solid și lichid este mult mai mare, iar timpul de extracție depinde de modul de preparare al probei [23].

Extracția cu ultrasunete este o tehnică rapidă care utilizează amestecuri de solvenți nemiscibili: hexan cu metanol: apă (9:1). Faza hexan extrage lactonele sesquiterpenelor și hidrocarburile, în timp ce faza alcoolică apoasă, flavonoidele [8].

Izoflavonele, flavanonele, flavonele metoxilate și flavonolii sunt mai solubili în solvenți neapoși. Alcoolul metilic este solventul cel mai utilizat și este folosit pentru extracția flavanonelor, flavonelor și flavon-glicozidelor, metoxiflavonelor și dimerilor flavonici, iar alcoolul metilic de 70-80% este foarte bun pentru extracția flavonelor, flavonolilor și catechinilor.

Astfel polifenolii din *Nicotina tobaccum L*, au fost extrași prin ultrasonare la 25°C folosind ca solvent metanolul apos, deoarece acestea este considerat ca și co-dizolvant pentru polifenoli [24]. Flavonoidele catechina, rutina, quercetina, kaemferolul și isoramnetina din frunzele de *Hippophae rhamnoides* au fost izolate prin extracție cu ultrasunete utilizând ca solvent etanol 85%, frecvență de 80Hz, temperatură de 45°C, timp 30 minute [25].

1.3.2.3. Extracția cu microunde

Utilizarea sistemelor cu microunde pe scară largă se datorează avantajelor pe care le oferă: realizarea unei încălziri rapide a produselor procesate cu microunde, durata operației, fiind evaluate la aproximativ o pătrime din cea necesară încălzirii neconvenționale; calitatea produsului este îmbunătățită din punct de vedere al menținerii proprietăților fizice și chimice.

Extracția cu microunde este o tehnică simplă care poate fi completă în câteva minute. Energia microundelor este aplicată probei care este suspendată în solvent, fie într-un recipient închis, fie într-o celulă deschisă, ultimul sistem fiind cel mai utilizat [8].

Tehnica extracției care utilizează un cuptor de microunde în prezență de solvenți este foarte exploatată deoarece este o metodă rapidă care folosește cantități mici de probe din materialul vegetal și în final compoziția extractului este apropiată de cea reală.

Extracția cu microunde a fost utilizată pentru extracția quercetinei și a glicozidelor acestora din frunze de *Psidium guajava* [26], utilizând un sistem de microunde cu putere de 300 W, solvent metanol și timp de reacție 5 minute.

Au fost cercetate condițiile optime pentru extracția cu microunde și în vederea extracției flavonoidelor din frunze de ginkgo. S-a utilizat o putere pentru microunde între 0-140 W, iar condițiile de lucru au fost: solvent (concentrație 0-1000 %) și timp de extracție 1-9 secunde. S-a urmărit randamentul de extracție,

abilitatea de donare a electronului (EDA), conținutul de fenoli totali și variația conținutului de kaemferol și quercetină pentru o putere de 2,450 MHz. Condițiile maxime de extracție au fost obținute pentru kaemferol și quercetină în următoarele condiții: putere 118-132 W, solvent etanol 72 – 86% și timp de extracție 4,9 – 5,5 secunde [27].

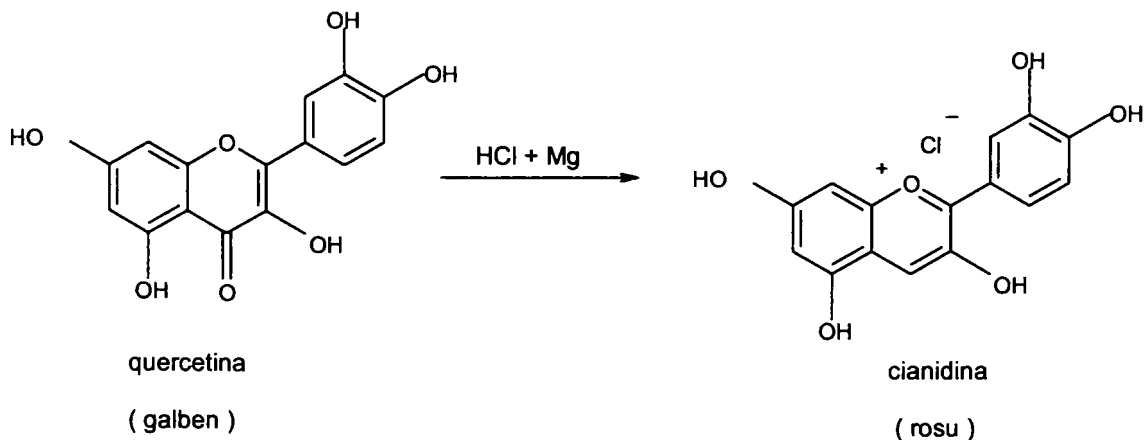
Compușii fenolici din semințe de struguri au fost extrași prin tehnica de extracție la microunde, utilizând următoarele condiții de lucru: putere 300 – 1500 W și timp de extracție 20-200 s [28], iar compoziția chimică a frunzelor de *Acanthopanax Senticosus* a fost determinată utilizând extracția cu microunde la presiune ridicată în următoarele condiții: - pentru flavonoide: solvent alcool 50%, presiune 700 kpa, iradiere cu microunde timp de 10 minute, iar pentru saponine: etanol 70%, 700 kPa și 4 minute, timp de iradiere [29].

I.4. Identificarea flavonoidelor

I.4.1. Reacții de culoare [3, 5, 30-35]

Pentru identificarea diferitelor flavonoide se pot executa diferite reacții de culoare atât pe extracte cât și direct pe țesutul vegetal. Reacțiile de culoare executate direct pe țesutul vegetal dau o orientare valoroasă pentru prelucrarea ulterioară a materialului.

1. *Reacția cianidinei* (Reacția Shibata). Sub acțiunea reducătoare a hidrogenului în stare născândă, nucleul piranic al flavonelor, flavanonei sau flavonoliilor suferă o reducere a funcției cetonice, cu redistribuirea electronilor în interiorul nucleului, și formarea unei săruri de piriliu. Se formează, astfel structura corespunzătoare antocianilor, cu apariția colorației roșii, în mediu acid:



Reacția are loc în mediu alcoolic cu magneziu, zinc și acid clorhidric.

După natura substanței flavonice, colorația poate să fie, mai mult sau mai puțin, specifică:

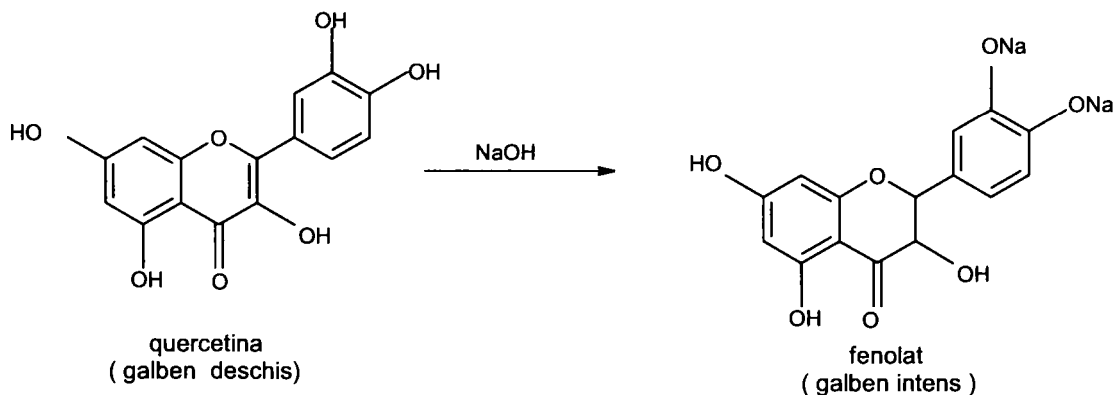
- flavone : crisina.....2 OH – galben auriu; apigenina.....3 OH – portocaliu;
luteolina.....4 OH = portocaliu-roșcat
- flavonoli: fustina.....4 OH = gălbui; quercetina.....5 OH = roșu;
miricetina.....6 OH = roșu închis
- flavanone: = roșu sau violet
- calcone: = nici o colorație
- izoflavone = nici o colorație

Se observă că flavonele, flavonolii și flavonele reduse cu Mg și HCl sau cu amalgam de sodiu sunt colorate în funcție de numărul de grupări OH, de la galben – auriu până la roșu aprins. Intensitatea colorației nu depinde de cantitatea de flavonoid. Grupele metoxi se comportă ca și grupările hidroxilice libere. Au importanță de asemenea și substituenții de la nucleul aromatic B: astfel numai flavonoidele cu grupe OH sau OCH₃ dau compuși colorați intens.

2. *Reacția cu borohidruza de potasiu.* În prezența borohidruzii de potasiu, flavonele dau o colorație albastru-violet, permițând în felul acesta o mai ușoară identificare a lor.

3-Flavonoidele au o fluorescență brună, pe când flavonoidele cu OH –ul de la C₃ liber, au o fluorescență galben-aurie. Cu cât hidroxilii grețați pe nucleul fenil-benzopiranic sunt blocați în număr mai mare (glicozidați, acetilați, metilați), cu atât fluorescența virează către o colorație albastruie strălucitoare.

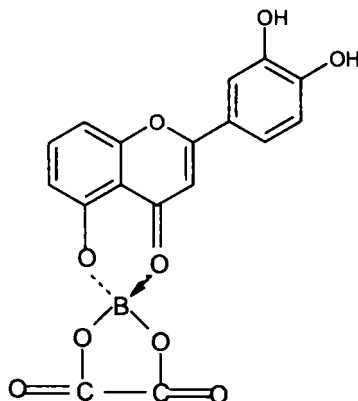
3. *Colorația în mediu alcalin.* Hidroxilii fenolici formează cu cationii alcalini (NH₄⁺, Na⁺, K⁺, Ca²⁺) fenolați de culoare galben-intens conform reacției:



4. *Reacția citro-borică* (reacția Wilson). Majoritatea flavonolilor și polioxicalconele formează un complex cu acid citric și acid boric. Reacția este pozitivă pentru flavone, flavonoli și calcone, prezentând colorație galben-verzuie și este negativă pentru flavanone și izoflavone.

5. *Reacția oxalo-borică* (reacția Tauböck). Reacția oxalo-borică este caracteristică îndeosebi pentru flavonoli. Izoflavonele, flavonele și flavanonele nu dau această reacție.

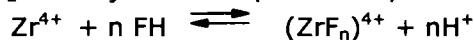
Reacția Tauböck este o reacție de culoare a flavonelor cu acidul boric, în prezența acidului oxalic sau citric, prin care se poate evidenția structura 4-ceto-5-hidroxi, în timp ce gruparea 4-ceto-3-hidroxi nu reacționează, dar poate fi pusă în evidență prin utilizarea sărurilor de Zr³⁺ sau Al³⁺.



Complexul oxalo-boric produce o deplasare batocromă și în plus o fluorescență galbenă sau verde în lumina ultravioletă. Comportarea diferită a flavonelor, izoflavonelor și flavanonelor în testul Tauböck permite deosebiri structurale, colorația galbenă cu fluorescență verde fiind caracteristic îndeosebi flavonolilor.

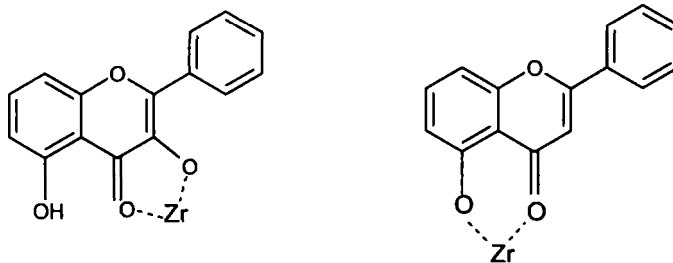
6. *Reacții cu surile unor metale.* Cationii plurivalenți formează cu flavonoidele complecși interni colorați galben intens. În general este mai stabil complexul format în poziția orto între gruparea carbonilică și hidroxilul fenolic (OH la C₃) decât în poziția peri (OH la C₅). Se folosesc de obicei săruri ale unor metale tranziționale di-, tri- și tetravalente.

-*Formarea unor complecși cu zirconiu (IV).* Hidroxiflavonele (FH) care au în poziția orto sau peri față de carbonil, o grupare OH reacționează în soluție metanolică cu Zr⁴⁺, ZrOCl₂ în soluție de acid percloric 0,8 M conform reacției:



Conform acestui echilibru, în prezență de Zr (IV), flavonoidele formează chelați de culoare galbenă. În prezența unui acid mineral echilibrul se deplasează spre stânga și culoarea dispare treptat. Dacă acidul mineral se înlocuiește cu un acid care formează ușor complecși cu ionii metalici, cum ar fi acidul oxalic, culoarea dispare instantaneu. Acidul citric se comportă diferit în funcție de constituția flavonei: formează fie chelați stabili cu ciclul de 5 atomi stabili, fie cei cu ciclul de 6 atomi instabili. Astfel pe baza fluorescenței și colorațiilor care apar se pot face diferențieri structurale privind substituenții de la C₃ și C₅.

Structura complecșilor de zirconiu este următoarea:



Formarea complexului ciclic se recunoaște printr-o deplasare batocromă a maximului benzii III a flavonei din UV îndepărtat în vizibil. Complecșii zirconului tetravalent cu flavonolii și flavonol-3 glicozidele sunt colorați puternic în galben.

Testul "zirconiu-acid citric": 0,5 – 2 mg flavonă se dizolvă în 10 mL metanol, se adaugă 1 mL soluție metanolică $ZrOCl_2$ 2% și 1 mL soluție metanolică de acid citric 2% și se diluează cu apă distilată până la 50 mL. După câteva minute soluția clară este incoloră sau se colorează slab galben și atunci este vorba de o flavonă a cărei OH la C_3 este fixat prin eterificare, esterificare sau printr-o legătură glicozidică. Dacă soluția este colorată în galben, este vorba despre un flavonol cu o grupare OH liberă la C_3 .

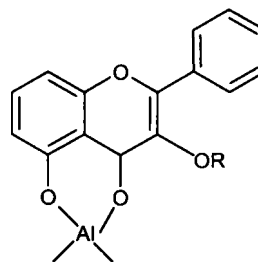
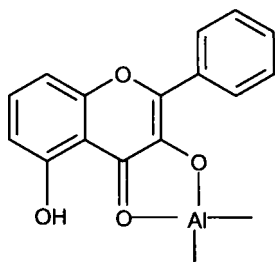
- *Formarea unor complecși cu stibiu (V)*

Reacția cu $SbCl_5$ (reacția Marini-Bettolo) se efectuează în mediu anhidru, în soluție de tetraclorură de carbon, caracterizată prin colorație galbenă sau portocalie pentru flavone și roșie sau violetă, pentru calcone.

- *Formarea unor complecși cu stibiu (III.)* Complecșii flavonoidelor cu clorură de stibiu (III) au în lumina UV o fluorescență galbenă sau verde. În prezența acidului oxalic, fluorescența observată este mai slabă.

- *Formarea unor complecși cu bismut (III).* În prezența bismutului trivalent la lumina zilei, numai flavonolii dau o colorație clară și o fluorescență galben-deschis sau verde. Flavonol-3-glicozidele se colorează numai parțial și slab, pe când flavanonele și izoflavonele nu dau reacția de culoare.

- *Formarea unor complecși cu aluminiu.* Majoritatea flavonoidelor, cu excepția izoflavonelor și a hesperidinei formează cu Al^{3+} complecși colorați, iar clorura de aluminiu este reactivul cel mai frecvent utilizat pentru identificarea flavonoidelor. Examinarea maximelor de absorbție pentru complecșii formați poate da detalii structurale. În soluții alcoolice diluate, reacția este specifică pentru asocierea 3-hidroxi- sau 5-hidroxi-4carbonil-. De asemenea în soluții alcoolice se formează complecși cu grupele 3',4'-dihidroxi- și se observă efecte batocrome puternice. Pe baza acestei reacții se poate face destul de bine diferențierea între flavonoli și flavone: primele arată o colorație clară, spre deosebire de ultimele. La flavonele și flavonolii 3-O substituiți după adăugare de soluție metanolică de $AlCl_3 - HCl$, prin spectroscopie UV se pot evidenția grupele hidroxil sau metoxi de la C_6 .



- *Formarea unor complecși cu plumb (II).* 3-Oxi-flavonoidele și glicozidele dau cu Pb^{2+} colorații de la galben sau portocaliu la roșu-marونیu, în timp ce în lumina UV se observă o fluorescență galbenă, verde, portocalie sau uneori pete întunecate.

- *Formarea unor complecși cu beriliu.* La lumina zilei, complecșii cu beriliu sunt fluorescenți, dar spre deosebire de alte metale (Sb, Cu sau Zr) prezintă fluorescență verde, fluorescența în lumina UV fiind ceva mai puternică decât în prezența aluminiului sau zirconiului.

Complecșii izoflavonoidelor cu acetatul de beriliu apar în lumina UV ca pete întunecate. Beriliul este util în identificarea flavonoidelor și diferențierea lor structurală. În cazul flavonelor și flavanon-7-glicozidelor în soluții alcaline apar colorații mult mai puternice decât în cazul flavonolilor și flavanol-3-glicozidelor.

- *Formarea unor complecși cu magneziu.* Srurile de magneziu sunt reactivi cu care se poate face diferențierea între 5-oxi-flavone și alte flavonoide datorită fluorescenței albastru intens a primelor. Fustina, o flavon fr OH la C₅ nu d fluorescență albastr, ci verde- albastr. Hesperidina prezintă o fluorescență foarte slab sau deloc în prezența altor sruri de metale, dar prezintă fluorescență slab-albastr în prezența acetatului de magneziu, iar agliconul su, hesperitina prezintă o fluorescență alb luminoasă.

- *Formarea unor complecși cu sruri de cadmiu.* 3-oxi-flavonoidele în prezență de sruri de cadmiu dau o colorație galben, verde sau maro, care permite deosebirea de alte flavonoide. În lumina UV apare fluorescență puternică verde numai la fustin, galben-verzui la flavonoli și portocalie la robinin, care este unică flavanol-3-glicozid ce d o astfel de colorație; celelalte flavanol-3-glicozide dau pete albe sau întunecate.

Caracterizarea polioxiflavonelor se poate face după reacția de reducere pe două căi: modificarea culorii roșii obținute la reducere, în violet până la albastru prin alcalinizare sau formarea complexului cu fier, colorat în violet până la albastru.

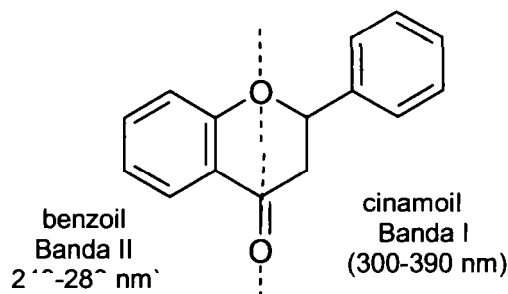
În concluzie identificarea subclaselor de flavonoide se poate realiza ușor pe baza a numeroase reacții specifice de culoare sintetizate în tabelul 1, sau pe baza absorbanțelor specifice a soluțiilor alcoolice în prezența unor reactivi specifici (tabelul 1).

Tabelul 1. Principalele reacții de culoare ale flavonoidelor.

Reactiv	Flavone	Flavonoli	Flavanone	Calcione	Izoflavone
HCl+ Mg	Portocaliu	Roșu	Violet	-	-
HCl + Zn	Roșu	Roz	Roz	-	-
NaOH	Galben	Galben- închis	Galben	Galben	Galben
Citroboric	Verde- galben	Verde- galben Fluorescent	-	Galben	-
SbCl₅	Galben	Galben	Galben	Roșu violaceu	Galben
Acetat de Magneziu	Fluorescență galbenă	Fluorescență galbenă	Fluorescență albastră	Fluorescență galbenă	Fluorescență galbenă
AlCl₃	Galben	Galben- verde	Galben	Galben	Galben

I.4.2. Spectroscopia ultraviolet-vizibil

Spectrul ultraviolet al flavonoidelor în metanol prezintă benzi caracteristice, care depind de sistemul de conjugare al inelelor aromatice [36]. Flavonele și flavonolii absorb de regulă în regiunea 240-400 nm. Se observă ca o caracteristică în această regiune, prezența a două benzi, denumite în mod curent Banda I (frecvent între 300-390 nm) asociată absorbției date de radicalul cinamoil (ciclul B) al structurii flavonoidice și Banda II (între 240-280 nm) asociată absorbției dată de radicalul benzoil (ciclul A).



Poziția benzii I depinde de tipul de flavonoid: flavonele absorb la 310-350 nm, flavonolii 3-O-substituiți la 330-360 și flavonolii la 350-385 nm [9]. Uneori este posibil și un maxim suplimentar, Banda III, în jur de 330 nm, caracteristic îndeosebi flavonelor hidroxilate.

Benzile caracteristice de absorbție ale flavonoidelor în spectrul ultraviolet-vizibil sunt redate în tabelul 2.

Tabelul 2. Benzile caracteristice de absorbție ale flavonoidelor în spectrul UV-VIS [37].

Tipul de flavonoid	Banda I	Banda II
Flavone	310 - 350 nm	250 - 280 nm
Flavonoli (3-OH-substituit)	330 - 360 nm	250 - 280 nm
Izoflavone (5-deoxi-6,7-dioxi)	310 - 330 nm	245 - 295 nm
Izoflavone, dihidroflavonoli	300 - 330 nm	275 - 295 nm
Calcone	340 - 390 nm	230 - 270 nm
Aurone	380 - 430 nm	230 - 270 nm
Antocianidine, Antociani	310 - 350 nm	270 - 280 nm
Flavone	310 - 350 nm	250 - 280 nm

Oxidarea în ciclul B conduce la un efect batocrom, respectiv la o deplasare a absorbției în Banda I către lungimi de undă mai mari, proces aditiv cu creșterea numărului de hidroxili.

Tabelul 3. Deplasarea absorbției UV funcție de gradul de oxidare în ciclul B [3].

Compusul	Oxidarea la		Banda I nm
	Ciclul A	Ciclul B	
Galangina	3,5,7	-	359
Kaemferol	3,5,7	4'	367
Quercetina	3,5,7	3',4'	370
Miricetina	3,5,7	3', 4', 5'	374

Prezența hidroxililor fenolici în diferite poziții ale moleculei poate fi determinată prin studiul comparativ al spectrului UV în metanol după adăos de diferiți reactivi: metoxid de sodiu (NaOMe), acetat de sodiu (NaOAc), clorură de aluminiu (AlCl_3) cu și fără HCl și acid boric (H_3BO_3).

Metoxidul de sodiu este o bază tare care ionizează hidroxilii fenolici prezenți în moleculă și astfel permite recunoașterea existenței grupărilor hidroxil în poziția 3 și 4'. La adăugarea de NaOMe descrește intensitatea benzii, flavonele 4'-hidroxilice prezentând o deplasare batocromică de 45-65 nm față de banda I. Flavonolii (sau 3-hidroxiflavonele) cu hidroxil în poziția 4, de asemenea prezintă o deplasare batocromică de 45-65 nm, dar intensitatea benzii se va diminua. În cazul flavonolilor 3,4'-dihidroxilați, o-dihidroxilați, respectiv a celor cu 3 grupări hidroxil, din care două în poziția orto, spectrul este modificat puternic după câteva minute de la adăugarea de metoxid de sodiu. Apariția unei benzi în jur de 330 nm (Banda III) este caracteristică pentru flavonele 7-hidroxilate.

Acetatul de sodiu este o bază mai slabă decât metoxidul de sodiu și ionizează doar hidroxilii fenolici mai acizi 3, 4' și 7. Ionizarea hidroxilului din 7 afectează banda II și de aceea acetatul de sodiu este un reactiv utilizat pentru determinarea prezenței acestora. La adăugarea de acetat de sodiu se observă o deplasare batocromică de 5-20 nm a benzii II în cazul unei flavone sau flavonol-7-hidroxilați. Flavanonele 5-hidroxilate prezintă o deplasare batocromică de 35 nm. Flavonolii (și cu 5 OH) prezintă o deplasare batocromică de 60 nm.

Cu clorura de aluminiu anhidră, de asemenea se formează chelați cu flavonoidele orto-dihidroxilate, 3-hidroxilate și 5-hidroxilate. Față de cele prezentate anterior, la determinarea spectrului cu AlCl_3 și HCl se obține o deplasare batocromică de 35-55 nm a benzii I (comparativ cu cel metanolic) în cazul unei flavone sau flavonol-5-hidroxilat. O deplasare de 17-20 nm are loc în cazul unei flavone sau flavonol-5-hidroxilat și 6-oxigenat, iar o deplasare de 50-60 nm se observă în cazul unei flavone sau a unui flavonol 3-hidroxilat (cu sau fără 5-OH).

În cazul flavonoidelor (flavone și flavonoli) orto-hidroxilate la inelul B (fără 3-OH, fără 5-OH) la adăugarea de AlCl_3 se obține o deplasare batocromică a benzii I cu 30-40 nm, care se pierde la adăugarea de HCl. Flavonolii orto-dihidroxilați la inelul A (fără 3 OH și fără 5 OH) prezintă o deplasare a aceleași benzi cu 20-25 nm, care se pierde de asemenea la adăugarea de HCl.

Alte flavonoide, cum sunt flavanonele, izoflavonele și flavanonolii prezintă o deplasare batocromică a benzii II. Auronele, calcone și antocianidinele, de asemenea prezintă o deplasare batocromică a benzii I [9].

Tabelul 4. Absorbția specifică în UV a unor flavonoide în soluție metanolică și în prezența de reactivi specifici [3].

Denumirea substanței	Reactivi specifici			
	MeOH	CH ₃ ONa	AlCl ₃	CH ₃ COONa
Kaemferol	253;266;294 322;367	278;316 416	260;268;303 350;424	274;303;387
Luteolina	242;253;267 291;349	266;329 401	247;300 328;426	269;326; 384
Quercetina	255;269; 301;370	247;321;	272;304;333 458	257;274; 329;390
Rutina	259;266 299;359	272;327 410	275;303 433	271;325 393
Miricetina	254;272 301;374	262;285 322;423	271;316 450	269;335

Numeroase articole din literatură [38-43] atestă ca spectroscopia UV este o metodă cel mai frecvent utilizată pentru identificarea sau confirmarea structurii flavonoidelor și a glicozidelor acestora din extracte vegetale, materiale biologice și preparate farmaceutice.

I.4.3. Spectroscopia IR

Un rol important în stabilirea caracteristicilor spectrale în IR ale flavonoidelor îl are gruparea carbonil. În tabelul 5 sunt prezentate valorile absorbției corespunzătoare grupării carbonil (în cm⁻¹) pentru câteva flavone și flavonoli.

Tabelul 5. Valorile absorbției în IR pentru gruparea carbonil [1].

Compus flavonoidic	cm ⁻¹	Compus flavonoidic	cm ⁻¹
Apigenina	1655	Rhamnazina	1665
Luteolina	1650	Galangina	1653
Diosmetina	1658	Vogonina	1658
Patuletina	1640	Robinetina	1610
Quercetina	1662	Kaemferol	1667
Morina	1662		

Specifice în spectrele IR sunt de asemenea și benzile cuprinse între 680 – 870 cm⁻¹ pentru flavone, respectiv 680-855 cm⁻¹ pentru izoflavone, absorbții datorate vibrațiilor de deformare în afara planului (tabelul 6).

De asemenea în spectrele IR se regăsesc și vibrațiile de valență specifice pentru diferite grupări atomice din structura flavonoidului, cum ar fi: vibrații datorate nucleului fenilic, vibrații datorate substituenților de pe nucleul fenilic, vibrații datorate grupării cetonice și hidroxilului din poziția 3 și vibrații datorate substituenților de pe nucleul de benzopironă.

Tabelul 6. Vibrațiile de deformare în afara planului ($680 - 870 \text{ cm}^{-1}$) [3].

Denumirea compusului	cm^{-1}
Apigenina	831
Fisetina	840; 822; 804; 773; 700
Ramnazina	818; 787; 706
Morina	828; 807; 792; 685
Luteolina	860; 822; 793; 740; 648
Diosmetina	850; 821; 771; 747; 747; 680
Quercetina	840; 820; 793; 720; 704
Miricetina	830; 810; 762; 737; 716
Kaemferol	820; 795
Daidzeina	842; 835; 820; 788; 688
Genisteina	842; 835; 820; 788; 702
Prunetina	845; 823; 810; 783; 698

În tabelul 7 sunt prezentate vibrațiile de valență specifice pentru trei dintre flavonoidele mai larg răspândite în plante.

Tabelul 7. Valorile vibrațiilor de valență pentru diferite grupări atomice din structura kaemferolului, quercetinei și izoramnetinei [3].

Substanța	Vibrații datorate nucleului fenilic	Vibrații datorate substituenților de pe nucleul fenilic	Vibrații datorate grupării cetonice și grupării OH din poziția 3	Vibrații datorate substituenților de pe nucleul de benzopironă
Kaemferol	382 $\gamma_{\text{C-H}}$ 1020 $\beta_{\text{C-H}}$ 1485; 1620 $\nu_{\text{C-C}}$ 3071 $\gamma_{\text{C-H}}$	812 $\gamma_{\text{C-H}}$	3300 $\Delta\nu \text{---O=C<}$ 1680 $\Delta\nu >\text{CH=O---H-O}$	820 $\gamma_{\text{C-H}}$
Quercetina	375 $\gamma_{\text{C-H}}$ 1020 $\beta_{\text{C-H}}$ 1472; 1645 $\nu_{\text{C-C}}$	840 $\gamma_{\text{C-H}}$ 865	3700; 3450 $\Delta\nu \text{---O-H--O=C<}$ 1695 $\Delta\nu >\text{C=O---H-O}$	820 $\gamma_{\text{C-H}}$
Izoramnetina	660 $\gamma_{\text{C-H}}$ 1022 $\beta_{\text{C-H}}$ 1480; 1618 $\nu_{\text{C-C}}$	830 $\gamma_{\text{C-H}}$ 860	3250 $\Delta\nu \text{---O-H--O=C<}$ 1680 $\Delta\nu >\text{C=O---H-O}$	815 $\gamma_{\text{C-H}}$

Prezența ozelor în structura glicozidelor este marcată printr-o bandă care poate să prezinte valori cuprinse între $1100 - 950 \text{ cm}^{-1}$, iar în cazul C-glicozidelor de două benzi de slabă intensitate la 1010 și 1040 cm^{-1} .

În studiul flavonoidelor din specia *Origanum vulgare L.*, a fost izolat și caracterizat prin spectroscopie IR, kaemferolul [44], iar din florile speciei *Fagopyrum baldshoanicum* quercetina și glicozidele acesteia [45].

În studiul lor, Bao și colaboratorii săi s-au ocupat de studiul interacțiunii rutinei cu hemoglobina din sângele de vacă aplicând o metodă electrochimică, iar caracterizarea rutinei și a compușilor obținuți s-a realizat tot prin spectroscopie IR [38]. Spectroscopia NIR [46] și FT-IR [47] este de asemenea utilizată în identificarea flavonoidelor din extractele vegetale.

I.4.4. Spectrosopia de rezonanță magnetică nucleară

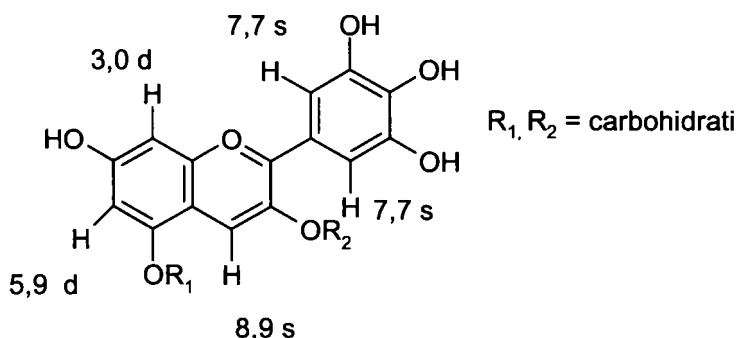
Spectrosopia de rezonanță magnetică nucleară, fie protonică, fie de carbon ^{13}C , este utilă pentru determinarea structurii compușilor flavonici, permițând recunoașterea unor caracteristici structurale importante.

Deplasările chimice medii pentru unele tipuri de protoni sunt prezentate în tabelul 8.

Tabelul 8. Deplasările chimice medii pentru unele tipuri de protoni [9].

ppm	Tipul de protoni
0,0	Tetrametilsilan
0,0 - 0,5	Trimetilsiliciu
1,0 - 1,2	Gruparea metil de la ramnoză
1,7	Gruparea metil de la isopentenil
1,9 - 2,0	CH_3 - acetilați alifatici (zaharuri)
2,2 - 2,4	CH_3 - acetati aromatici
2,7 - 3,0	H-3 de la flavanone (multiplete)
3,0 - 4,8	Protoni de la zaharuri
3,5	CH_3 -gruparea isopentenil
3,7 - 4,1	Metoxili aromatici
4,2 - 6,0	^1H - de la zaharuri; ^1H - de la flavanonoli și flavone (duble duble)
5,9 - 6,0	Metilendioxi
6,0 - 6,8	Protonii 3, 6 și 9 ai flavonelor
7,5 -8,0	Protonul 2 al izoflavonelor
12,0 - 14,0	Protonul hidroxilului

Antocianii se pot recunoaște în spectrul ^1H - RMN după semnalul 8,8 (s, H-4) și semnalele caracteristice ale altor protoni aromatici, ca de exemplu ai glicozidelor, cum este delphinidina.



Flavanonele se recunosc după semnalul dd și 5,4 (H-2, $J=13$ și 2-3 Hz), 3,1 (H-3 trans, $J=13$ și 2-3 Hz) și 2,8 (H-3 cis, $J=17$ și 2-3 Hz). Izoflavonele se pot recunoaște în spectrul ^1H - RMN după semnalele: 4,1 (H-2a, dd, $J=5$ și 8 Hz), 4,5 (H-2b, dd, $J=5$ și 18 Hz) și 4,6 (H-3, dd, $J=8$ și 12 Hz).

În spectrul ^{13}C - RMN se pot recunoște următoarele deplasări chimice, pentru diferite tipuri de atomi de carbon.

Tabelul 9. Deplasările chimice pentru diferitele tipuri de atomi de carbon [9].

ppm	Tipul de carbon
18	C-6 de la ramnoză
30	C-4 flavan-3-oli
42 - 46	C-3 flavanone
56 - 61	Metoxili
60 - 80	C-OH carboxilați
70 - 75	C-3 flavanonoli
80	C-2 flavanone
85	C-2 flavanonoli
100 - 115	C-3 flavone, C-1 carbohidrați C-10 flavone 5-hidroxilate
115-128	CH aromatici
130 - 140	C aromatici sulfatați
145	C-3 de la flavonoli, C-5 de la flavone 5-hidroxilate, C-3 și C-4 de la antocianine
150-165	C aromatic hidroxilat și metoxilat, C-1 la flavone, C-2 antocianine C-2 flavone, C-4' oxigenat, C-9 flavone
175 - 178	Carbonil C-4 cu OH și C-5 de la flavone C-4 de la flavonoli
182	Carbonil C-4 cu OH și C-5 flavone
190-196	Carbonil C-4 flavanone
197 - 200	Carbonil C-4 flavanonoli

De asemenea cu ajutorul spectrelor RMN se pot face diferențieri între C-glicozidic al flavonoidelor și O-glicozidic de la flavonoide. O-glicozidic și C-1 se găsesc în jur de 100 ppm pentru carbohidrații mai comuni, în timp ce carbonul glicozidic se găsește în jur de 75 ppm. Spectrul ^{13}C - RMN pentru flavonoidele glicozidate diferă semnificativ de cel al gliconului prin semnalul dat de atomul de carbon la care se face glicozidare [48]. Pe de altă parte, carbonul C-glicozidic al ligandului agliconic al carbohidraților se găsește în jur de 10 ppm față de valoarea de bază [9].

Flavonolii și izoflavonele din extractul metanolic din frunze de *Cotononeaster simonsii* și din extractul de *Isodon Coresbius* a fost determinată direct din extract prin spectroscopie ^1H - RMN și ^{13}C - RMN [49,50].

În prezent se utilizează solvenți tot mai sofisticati și se urmărește îmbunătățirea capacității de obținere a unor spectre ^{13}C și ^1H -RMN de o rezoluție tot mai înaltă, în special de tip 2D homonuclear și heteronuclear. La alegerea unor solvenți care să permită dizolvarea în grad cât mai mare a agliconilor flavonoidici și glicozidelor acestora, prioritate a avut DMSO, care este considerat cel mai efectiv general solvent pentru glicozidele flavonoidelor. Alți solvenți utilizați sunt piridina, metanolul, acetona- care se utilizează pentru aplicații în care semnalul DMSO (stabilit la 2,25 ppm) este asociat cu semnalul apei (la 3,3 ppm). În cazul utilizării ca solvent a soluției de DMSO cu TMS ca standard intern la temperatură de 30°C, spectrul ^1H -RMN oferă informații privind integrala semnalului de rezonanță, constanta de cuplaj și deplasările chimice[1].

I.4.5. Spectroscopia de masă [51]

Spectrele de masă ale flavonelor se caracterizează printr-un ion molecular intens, care constituie picul de bază în majoritatea cazurilor și care arată stabilitatea sistemului heterociclic. Fragmentările parcurg în general următoarele etape:

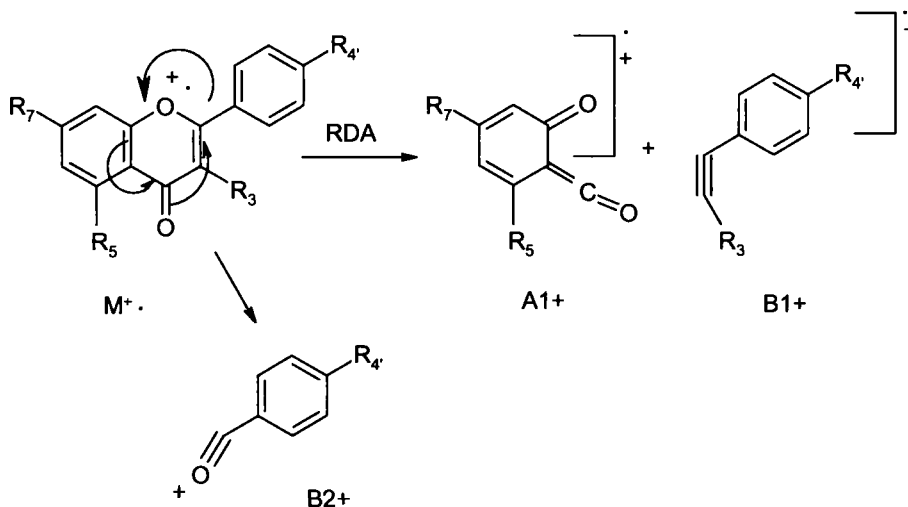
- Retro reacție Diels-Alder, prin care din ionul molecular de bază ($m/e = 222$ u.m.) se obține un fragment majoritar corespunzător inelului A din structură ($m/e = 120$ u.m.) și unul minoritar corespunzător inelului B (radical ion fenil acetilenic, $m/e = 102$ u.m.);
- Fragmentul abundent corespunzător inelului A pierde CO din structură rezultând un radical ion cu $m/e = 97$ u.m.;
- Ionul molecular de bază pierde de asemenea CO trecând în ion de fenil-benzofuran ($m/e = 194$ u.m. sau $m/e = 97$ u.m.).

Spectrele de masă ale izoflavonelor sunt asemănătoare cu cele ale flavonelor, dar în acest caz retro reacția Diels-Alder este un proces de fragmentare foarte important, iar distribuția sarcinilor în cele două fragmente depinde de substituenții din ciclurile A și B.

Izoflavonele se caracterizează de asemenea printr-un ion molecular intens ($M-1$, $m/e = 121$ u.m.), care este și pic de bază în spectrul izoflavonelor și 7-metoxi-izoflavonelor [51].

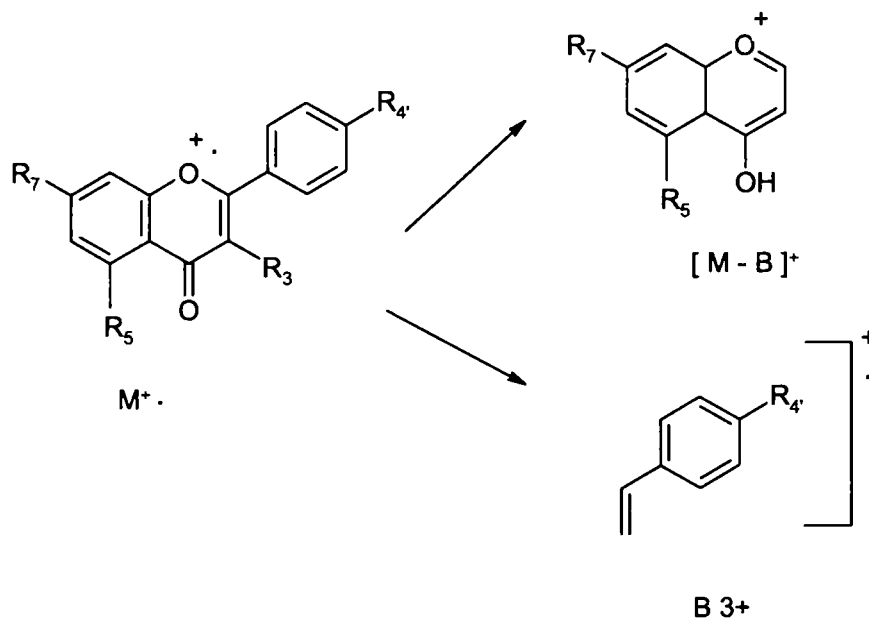
Agliconii flavonoidelor prezintă fragmente caracteristice în spectrul de masă. Spre exemplu, flavonele și flavonolii prezintă în general fragmentele:

M^+ , $[M-H]^+$, și $[M-CO]^+$ și unele fragmente diferite de A^{+1} , $[A+1+H]^+$, și B^{2+} , care sunt originale pentru ruperea retro-Diels-Alder:



În general flavonele și izoflavonele prezintă fragmentele A 1+., [A1 + H]+, B1+, B2+. Flavonolii prezintă [A1 + H]+ și B2+ și de asemenea fragmentul [M-CHO]+. 3-metoxiflavonele prezintă A 1+., [A1 + H]+ ,B1+ și fragmentul [M-CO-Me]+.

Flavanonele prezintă A1+., [A1 + H]+, [B1+2H]+ și fragmentul [M-inel B]+ și B3+:



În general agliconii flavonoidelor cu o grupare metoxi prezintă fragmentul $[M-Me]^+$, care este în mod special intens la flavonoidele 6- și 8- metoxilate. Flavonoidele 2'-hidroxilate, de asemenea se apreciază prin fragmentul $[M-OH]^+$, în timp ce 2-metoxi flavonoidele prezintă fragmentul $[M-OMe]^+$.

Astfel, fragmentul $[M-H_2O]^+$ este comun flavonolilor, flavan-3,4 diolilor și C-glicozizilor, iar fragmentul $[M-55]^+$ sau $[M-56]^+$ indică prezența unui substituent izopentenilic. Este important că unii autori, ca de exemplu Goudard și colaboratorii au raportat posibilitatea diferențierii 5-hidroxi, 6,7-dimetoxi, 7,8-dimetoxi, 5,6,7-trimetoxi- sau 5,7,8-trimetoxiflavonelor, datorită intensității ionilor M și M-15 [9].

În tabelul 10 sunt prezentate fragmentele caracteristice ale agliconilor flavonelor și flavonolilor și interpretarea referitoare la numărul substituenților hidroxilici și metoxilici de pe inelul A și B.

Glicozidele flavonoidice, izoquercetina, hiperina din extractul etanolic din frunze de *Cryptocarya arhersoniana* [31], glicozidele flavonolilor quercetină și kaemferol din extractul de semințe de *Kancolla* [32] au fost analizate prin metode care utilizează spectrometria de masă cuplată cu alte metode: FAB-MS, HR FAB-MS, GC-MS.

Cromatografia de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrometria de masă este o metodă frecvent folosită pentru identificarea fragmentelor caracteristice pentru agliconii flavonoidelor, pentru O-glicozidele și C-glicozidele flavonoidelor, precum și pentru glicozidele flavonoidelor [52].

Tabelul 10. Fragmentele caracteristice agliconilor flavonelor și flavonolilor [9].

	OH	H	OMe	OH	H	OMe
105	-	-	-	0	5	0
120	0	4	0	-	-	-
121	0	4	0	1	4	0
135	-	-	-	0	4	1
136	1	3	0	-	-	-
137	1	3	0	2	3	0
150	0	3	1	1	3	1
151	0	3	1	1	3	1
152	2	2	0	-	-	-
153	2	2	0	3	2	0
165	-	-	-	0	3	2
166	1	2	1	-	-	-
167	1	2	1	2	2	1
168	3	1	0	-	-	-
169	3	1	0	4	1	0
180	0	2	2	-	-	-
181	0	2	2	1	2	2
182	2	1	1	-	-	-
183	2	1	1	3	1	1
184	4	0	0	-	-	-
185	4	0	0	-	-	-
195	-	-	-	0	2	3
196	1	1	2	-	-	-
197	1	1	2	2	1	2
198	3	0	1	-	-	-
199	3	0	1	4	0	1
210	0	1	3	-	-	-
211	0	1	3	1	1	3
212	2	0	2	-	-	-
213	2	0	2	3	0	2
226	1	0	3	-	-	-
227	1	0	3	2	0	3
240	0	0	4	-	-	-
241	0	0	4	1	0	4
255	-	-	-	0	0	5

I.4.6. Metode cromatografice de identificare a flavonoidelor

I.4.6.1. Cromatografia pe hârtie

Datorită solubilității și valorilor R_f diferite, cât și datorită proprietății lor de a da fluorescență în lumina ultravioletă, flavonoidele pot fi ușor identificate prin tehnici cromatografice.

Cromatografia pe hârtie este una din cele mai vechi metode utilizate pentru analiza flavonoidelor. Încă din anul 1958 s-au analizat 228 de flavonoide folosindu-se diverse sisteme de solvenți în diverse proporții. Sistemele de solvenți cel mai des utilizate care conduc la o bună separare a fracțiunilor flavonoidice (atât glicozide cât și agliconi) sunt cele două sisteme Forestal:

- reactiv Forestal pentru glicozide: acid acetic glacial:HCl conc.: apă= 15:3:82, v/v)

- reactiv Forestal pentru agliconi: acid acetic glacial: HCl conc.: apă= 30:3:10, v/v)

Deși sunt cele mai utilizate, sistemele Forestal produc modificări structurale sau distrug pe cromatogramă unele flavonoide, deci nu pot fi utilizate când se dorește eluarea spoturilor flavonice de pe cromatogramă, preferându-se în acest sens soluțiile apoase de acid acetic 15% (pentru flavonoide) și acid acetic 60% (pentru agliconi) sau pur și simplu apa, deoarece protejează nucleul benzopiranic [3].

Pentru identificarea flavonoidelor prin cromatografie pe hârtie, cel mai des se utilizează hârtia Whatmann 1, 2, 3, 4, 11, 20, Schleicher și Schüll Nr. 2043a, 2043 b, 2071 și altele. Solvenții care se utilizează sunt apa, respectiv soluțiile apoase ale acizilor organici, butanolul și amestecurile de acizi organici, amestecuri neutre de solvenți organici cu polaritate mică, apă și metanol. Sistemele hidrofile se utilizează pentru separarea glicozidelor, iar cele lipofile pentru separarea agliconilor.

Sisteme de solvenți cele mai utilizate, în diverse proporții sunt:

etil-metil-cetonă : acetonă : acid formic : apă ; metil-izobutil-cetonă : acid formic : apă; cloroform : metanol : acid formic : apă; benzen : acid formic : apă [53]; m-cresol : acid acetic : apă ; fenol saturat cu apă; benzen : metanol : apă .

Pentru identificarea flavonoidelor: quercetină, kaemferol, izoquercetină și a glicozidelor lor din extracte metanolice vegetale, cel mai utilizat sistem de solvenți este:

butanol : acid acetic : apă = 40 : 10 : 50 [54-56]. Deoarece acest sistem de solvenți deși realizează o separare foarte bună, necesită timp de eluare între 10 și 40 de ore, s-a încercat utilizarea unui sistem mult mai avantajos și anume: metanol : apă : acid acetic (4 : 6 : 0,25, v/v), cu ajutorul căruia s-a încercat identificarea quercetinei, rutinei și quercitrinei [56].

Alte sisteme de solvenți folosite pentru identificarea flavonolului quercetină sunt : AcOH : HCl conc. : apă =30 : 3 : 10, v/v ; fenol : apă (saturat); benzen : acid acetic : apă = 125 : 72 : 3 [57]; AcOEt : apă (saturat); isoOH : apă = 6: 4; n-Heptan : nBuOH : apă = 29 : 14 : 52; AcOH : apă = 15 : 85 [58]. Sistemele de solvenți utilizate pentru identificarea kaemferolului, genisteinei și orientinei sunt: t-butanol : acid acetic: apă = 3:1:1 și acid acetic : apă = 15 : 85 [59].

Pentru detecție se pot folosi soluții apoase ale metalelor polivalente (acetat de plumb, clorură de aluminiu, etc. dau reacții de culoare), soluțiile de carbonat de sodiu 5%, hidroxid de sodiu metanolic [60], soluție etanolică de clorură ferică 0,5%-1%, soluție de Rhodamin B 0,10 %, acid p-toluen-sulfonic.

Astfel pe baza reacției zirconiu-acid citric, folosit la stropirea cromatogramelor, se obțin informații despre substituenții de la C3 sau C5 și anume, pot fi identificate 5-oxi-flavonele cu gruparea hidroxil liberă (ramnazina, kaemferolul, morina, quercetina, miricetina), care dau reacție de culoare cu $ZrOCl_2$ și fluorescență galbenă cu acid citric. Dacă gruparea OH din poziția 3 lipsește sau este glucozidată, reacția de culoare cu $ZrOCl_2$ nu are loc și fluorescența nu apare în prezența acidului citric.

Ca reactiv de stropire pentru vizualizarea flavonoidelor și a unor glicozide ale acestora se mai folosește și soluția apoasă $NaIO_3$ 0,2 % pentru cromatograma obișnuită sau bidimensională [60].

Pentru flavone, ca reactiv de stropire se mai utilizează soluția de borax 0,05 M, care are aceeași performanță ca și reactivii amintiți mai sus sau sistemul iod/iodură de potasiu (0,001 M I_2 în 0,025 M KI) [61]. Aceasta din urmă nu dă

colorații cu flavonele total metilate și cu 3-hidroxi-3',4',4,7-tetrametoxiflavonele, dar culoarea se intensifică în prezența grupelor metoxi vicinale. Flavonele, ca de exemplu apigenina, kaemferolul, quercetina dau spoturi albastre sau gri-albăstrui, în timp ce toate glicozidele corespunzătoare dau spoturi de la galben la galben-brun.

Posibilitatea flavonoidelor de a prezenta fluorescență în lumina UV se utilizează și în cazul cromatografiei pe hârtie. În cazul vizualizării cromatogramei cu AlCl_3 , flavonoidele dau fluorescență galbenă, spre deosebire de cumarine, care nu dau fluorescență. Identificarea izoflavonelor este cea mai grea, deoarece nu dau fluorescență în lumina UV. Cu FeCl_3 , izoflavonele care au la C3 o grupare OH liberă dau colorație la lumina zilei. Flavonele și flavonolii care au grupare OH la atomul de carbon, se vizualizează pe cromatogramă cu reactivul Wilson și apar pete fluorescente de culoare verde [62].

I.4.6.2. Cromatografia în strat subțire

În cromatografia în strat subțire se pot obține variante de lucru combinând o serie de faze mobile și o singură fază staționară, astfel:

- fază staționară: silicagel; faze mobile testate în diverse proporții, la analiza flavonoidelor:
 - benzen: metanol = 92 : 8 [63]
 - benzen : metanol:acid acetic = 45 : 8 : 4, pentru identificarea quercetinei și kaemferolului [63]
 - acetat de etil: acid formic:acid acetic: apă = 100:11:11:27, pentru identificarea digitoxinei, gitoxinei, rutinei și izoquercetinei [64]
 - acid formic: apă: metanol = 1:9:20, pentru identificarea kaemferolului [65]
 - hexan:isopropanol = 9: 1 pentru separarea flavonolilor [66]
 - acetat de etil: etilmetilcetona: acid formic: apă, în diverse proporții, pentru identificarea miricetinei, quercetinei și ramnetinei [67]
 - acetat de etil: metanol: apă = 100 : 16,5 : 18,5, pentru identificarea rutinei [68]
 - metanol: toluen = 30:70; cloroform:acetonă = 15:1 și cloroform: acetonă: n-butanol = 17:2:1 pentru identificarea kaemferolului, rutinei, genisteinei și orientinei [59]
 - toluen: acid acetic = 40:20: pentru identificarea quercetinei [69]
 - toluen: dioxan:acid acetic=95: 25:4 pentru identificarea apigeninei
 - tetraclorură de carbon: acetonă: acid formic = 35: 10:5 pentru identificarea flavanonelor (naringenină), a flavonelor (morină, crisină, quercetină, galangină, apigenină, kaemferol) și a hidroxiflavonelor [70]
- fază staționară: poliamidă; faze mobile testate în diverse proporții:
 - etanol : apă = 1 : 1, pentru identificarea rutinei și quercetinei
 - metanol: apă = 95:5 pentru identificarea quercetinei și kaemferolului [71]
- fază staționară: celuloză; faze mobile testate :
 - BAW (alcool n-butilic/ acid acetic/apă = 4: 1 : 5 și acid acetic 15 %
 - sistemul Forestal (acid acetic: apă: acid clorhidric = 30: 10 : 3), pentru identificarea flavonolilor

- apă: acid acetic : acid hidroclorhidric = 20: 10 : 10, pentru identificarea antocianilor [72]
 - isobutanol: acid acetic : apă = 3: 1 :1
 - acid acetic : apă = 15 : 85, pentru identificarea flavonolilor: quercetin-3-O-glucozida, isormanetin-3-O-glucozida, kaemferol-3,7-O-diglicozida [73]
 - fază staționară: alumină și fază mobilă, toluen : acetona: cloroform: acid formic = 8: 7: 5: 3, pentru identificarea quercetinei, miricetinei și dihidro-compușilor din extracte vegetale [74]
- Alte faze staționare folosite pentru identificarea flavonoidelor sunt:
- adamantan, fază mobilă: apă: acid formic: acid acetic: acetat de etil= 5: 2: 2:18, pentru identificarea quercetinei și rutinei [75]
 - caprona, fază mobilă: - etanol: cloroform = 35: 65;
metanol: cloroform = 20: 80;
acetona: propanol : apă = 5: 4: 1;
cloroform: metanol: formamida = 80 : 19: 1;
acetona: etanol: cloroform = 5: 15 : 80.

Deoarece informațiile privind cromatografia în strat subțire a flavonoidelor sunt numeroase, unii cercetători au încercat centralizarea lor printr-o prelucrare statistică. S-au obținut astfel reprezentări grafice, numite dendrograme, pe baza cărora se poate găsi schema eficientă de analiză cromatografică, precum și valorile R_f probabile pentru compușii flavonoidici separați într-o situație concretă [76].

Prin analiza cromatografică în strat subțire combinată cu analiza spectrofotometrică UV-VIS, s-au putut face diferențieri structurale între 5,6-dihidroxi și 5,8-dihidroxi-flavone [77].

S-au cercetat sisteme performante de cromatografiere pe silicagel modificat prin legarea unor compuși organici (isopropanol, acetat de etil, metil-etil-cetona, dipropil-eter, tetrahidrofuran) și eluare cu n-hexan [78].

I.4.6.3. Cromatografia pe coloană (cromatografia lichid-solid)

Drept adsorbanți se folosesc: magnesol, silicagel, pulbere de celuloză sau poliamidă, sulfat de calciu, Sephadex LH-20, Sephadex G-10, G-25 și G 50 [3, 8].

Sephadexul LH-20 este recomandat pentru separarea proantocianidinelor, iar ca solvent de eluție se utilizează solvenți organici; metanolul și etanolul se folosește pentru eluarea proantocianidinelor, iar acetona pentru separarea polifenolilor cu masă moleculară mare [8].

Oxidul de aluminiu nu este un bun adsorbant pentru separarea flavonoidelor, deoarece formează cu aceștia compuși stabili. Este utilizat pentru separarea unor flavonoli prin eluare cu acid diluat sau metanol acid [79].

Poliamida (pulbere) este preferată, deoarece permite separarea fenolilor și a derivaților acestora, a polihidroxifenolilor, flavonelor, flavanonei, chinonelor și taninurilor. Grupările amido din structura poliamidei sunt responsabile de puterea de retenție pentru formarea punților de hidrogen cu grupările hidroxil fenolice, astfel încât fenolii sunt reținuți în funcție de numărul grupărilor hidroxil, o-difenolii fiind mai ușor reținuți decât monofenolii. Substanța adsorbită este eluată prin înlocuirea cu un solvent. Solvenții cei mai utilizați pentru eluare sunt apa, metanolul, etanolul, acetona, soluțiile alcaline diluate, formamida și dimetilformamida [63].

Separarea agliconilor flavonoidici dintr-un extract metanolic din fructe de *Crataegus*, s-a realizat folosind ca fază staționară: Sephadex LH-20 și fază mobilă: amestec metanol: acetat de etil = 1:2 [60]

Același adsorbant Sephadex LH-20 s-a folosit și la izolarea quercetinei, miricetinei și a compușilor lor dihidro, din extractul metanolic din coajă de *Pinus contorta*, utilizând ca solvenți de eluare, amestecul metanol: etanol = 1: 1. [55]

Miricetina, kaemferolul, quercetina și glicozidele acestora se separă foarte bine pe adsorbantși ca: silicagel, nitroceluloză și poliacrilamidă, folosind ca solvent de eluare apă: metanol= 1: 1 [80].

Extractele de orz și hamei au fost analizate cu rezultate bune cu ajutorul cromatografiei de lichide, metodă propusă pentru standardizare la analiza berii. Agliconii flavonoidici și flavonolii glicozidici s-au separat în regim isocratic, în următoarele condiții de lucru: coloană Sephadex LH-20, eluare cu etanol pentru flavonoli, iar pentru glicozide un amestec acid acetic-apă (2,5 : 97,5, v/v) la care se adaugă un al treilea component, tetrahidrofuran, acetoneitril sau metanol. Detectia s-a realizat în UV la 350 nm, iar identificarea componentelor s-a făcut cu ajutorul cromatografiei în strat subțire bidimensională [81].

I.4.6.4. Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC)

Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) este o tehnică ce oferă acuratețe, rapiditate și sensibilitate ridicată. Comparativ cu cromatografia de gaze, nu este necesară derivatizarea, iar detectia se poate face ușor spectrofotometric.

Folosindu-se un sistem de solvenți (metanol-acid acetic-apă) și o coloană C₁₈, s-au analizat inițial 34 de agliconi flavonoidici, pentru care s-au găsit corelări între timpii de retenție și unele detalii structurale. Metilarea grupelor hidroxil din ciclul A reduce polaritatea compusului și produce o creștere a timpului de retenție, pe când metilarea în inelul B reduce timpul de retenție a agliconului [82].

Identificarea flavonoidelor din extracte farmaceutice și vegetale s-a realizat utilizând diverse faze mobile și staționare. Astfel:

- Pentru identificarea flavonoidelor din extractele alcoolice de *Betula pendula* Roth condițiile de lucru au fost: coloană Hypersil ODS II (60 mm x 4,6 mm), eluent, amestec A: tetrahidrofuran, soluție apoasă 1,8 % și acid ortofosforic 0,255 %; și amestec B: metanol 100%; debit 2 mL/min; detecție UV 210-400 nm. În aceste condiții s-au separat foarte bine compușii: miricetin-3-glicozida, quercetin-3-arabinopiranozida, quercetin-3-arabinofuranozida, quercitrina și derivații apigeninei [83].
- Rutina, quercetina, eupafolina și hispidulina s-au identificat utilizând coloană C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5μm), eluent, A: metanol adus la pH 3 cu acid fosforic; B: metanol/ apă = 1: 1; C: metanol : apă = 7: 3; debit 1mL/min; detecție UV la 339 nm [84].
- Extractul metanolic din frunze de *Glycyrrhiza glabra* purificat pe silicagel CC (Wako-gel C-200), a fost analizat prin HPLC în următoarele condiții: coloană C₁₈ AG-120C (5μm, 4,6 mm x 250 mm), solvent: MeCN-H₂O (1% HOAc), gradient 20%-80% MeCN; debit 0,9 mL/min; temperatura coloanei 40°C, detector UV la 254 nm. S-au separat flavonoidele: genisteina, pinocembrina, prunetina, 6-prenilnaringenina [85].
- Flavonoidele, quercetina, kaemferolul și miricetina din tomate (*Solanum lycopersicum* L.) au fost dozate prin HPLC, folosindu-se o coloană Hypersil-

- ODS (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m), fază mobilă 25:75 (v/v), acetonitril pH 2,4 cu tampon fosfat (25 % în 0,025 M NaH₂PO₄), debit: 1,2 mL/min; detecție UV 266 nm [86].
- Agliconii flavonoidelor quercetina, kaemferol și izoramnetina, din extractele de *Ginkgo biloba* și produse ale acestora s-au identificat în diferite condiții, utilizând diverse tipuri de coloane: Cosmosil 5C₁₈-AR (4,6x 150 mm, 5 μ m); Lichrospher 100 RP-18 (4,0x 125 mm, 5 μ m); Bondapak C₁₈ (3,9 x 300 mm, 10 μ m); Inertsil ODS-2 (4,6 X 250 mm, 5 μ m); Cosnosil 5 C₁₈ -MS (4,6 x 150 mm, 5 μ m); Symetry (4,6 x 150 mm, 5 μ m); Nucleosil 5C₁₈ (4,6 x 150 mm, 5 μ m); Prodigly 5 ODS-2 (4,6 x 250 mm, 5 μ m) și o serie de faze mobile: M1 Tampon fosfat: CH₃CN (77:23); M2 20mM KH₂SO₄: MeOH (51:49); M3 Trietilamina:MeOH (53:47); M4 AcOH 20%: MeOH (68:32); M5 AcOH 1%: THF: MeOH (55: 13 :32); M6 H₃PO₄ 0,3 %: CH₃CN (77:23); M7 MeOH: H₃PO₄ 0,3 %: CH₃CN (30:58:12); M8 MeOH: H₃PO₄ 0,3 %: (1: 1); M9 H₂O : CH₃CN: Isopropanol (100 : 47 : 5) + acid citric 0,40% [87].
 - Identificarea quercetinei și a glicozizilor flavanonelor din sucul de portocale s-a realizat prin HPLC. Condițiile de lucru au fost: coloană C₁₈ (150 x 2,0 mm, 3 μ m), sistem de solvenți (acid formic apos, pH 2,4 (A), acetonitril (B), 80:20, v/v, debit de 200 μ l/min. Pentru separarea simultană a flavonelor și flavonolilor s-a utilizat următorul gradient de eluție: solvent B- gradient liniar 50-60% (2 min), urmată de o eluție izocratică a amestecului de solvenți A-B (33: 65, v/v) pentru 7 minute. Detecția UV a fost realizată la 280 nm pentru flavanone, iar pentru flavone și flavonoli la 265 nm [88].
 - Identificarea și cuantificarea compușilor fenolici din *Phaseolus vulgaris* s-a realizat pe coloană de Nucleosil 120 C₁₈ (25 x 0,46 mm, 5 μ m); eluent A (acid fosforic apos 0,01 M) și B (100% metanol), debit 1 mL/min.; detecție UV cu λ între 210-350 nm. Eluarea s-a realizat cu următorul gradient: 5 % B în condițiile inițiale; 50 % în B pentru 5 minute și final 70 % în B pentru 5 minute. S-au identificat structurile fenolice, proantocianidina, (+) catechina, epicatechina, glicozida quercetinei, rutina, glicozida kaemferolului, precum și derivații de la daidzeină. Prin această metodă s-a încercat corelarea coeficientului de regresie liniară cu concentrația fenolilor și aria picului cromatografic [89].
 - Analiza simultană a flavonoidelor și a compușilor fenolici de diferite polarități din frunzele de *Betula pendula* și *Betula pubescens* s-a realizat cu următorul sistem cromatografic: coloană HP Hypersil ODS (60 X 4,6 mm, 3 μ m), solvent A: (THF soluție apoasă 2,4 % + acid ortofosforic 0,25%) și B: (metanol). Sistemul de eluție a fost la 0-4 minute, 2-12 % B în A, la 4-30 minute, 12-35 % din B în A; la 30-45 minute, 35-60 % B în A.; debitul a fost 2 mL/min, iar analiza a fost monitorizată la 220, 280, 320, 360 nm [90].
 - Compușii fenolici neutri ((+) catechina, (-) epicatechina), flavan-3-ol polimeri și flavonol glicozidele (isoquercetina, hiperina, quercitrina, avicularina și rutina) din sucul de mere au fost separați și quantificați prin HPLC cu fază inversă (RP-HPLC) cu coloană C₁₈ utilizând ca solvent apă acidulată (pH= 2,8)- metanol. Domeniul UV de detecție a fost între 260-350 nm pentru flavonoli [91].
 - Compoziția chimică a fructelor de *Visnea mocanera* a fost analizată prin TLC și HPLC pentru a stabili compoziția lor în compuși fenolici. Analiza compușilor fenolici cu masă moleculară mică și a 3-flavonolilor s-a realizat

utilizând coloană C₁₈ (300 x 3,9 mm). Solvenții de eluare au fost: A: acid acetic 2 % și B: metanol/acid acetic/apă (30: 2: 68, v/v/v), iar detecția a fost simultană la 280 și 340 nm. Analiza agliconilor flavonolilor s-a realizat cu coloană C₁₈ (150 X 3,9 mm); solvenți: apă/metanol/acid acetic (57,5: 37,5 : 5, v/v/v), debit 0,7 mL/min., detecție UV 360 și 254 nm, sau amestec de solvenți: tetrahidrofuran/apă/acid acetic (50 : 47,5 :2,5, v/v/v). Pentru analiza antocianilor s-a folosit același tip de coloană, amestec de solvenți diferit și anume: acid acetic/apă(10:90,v/v), (A) și acid acetic/metanol/apă (10:45:45,v/v),(B); debit 1,0 mL/min și detecție 546 nm (vizibil) și 313 nm (UV). Gradientul a fost liniar, de la 25 la 80 % solvent B, pentru 30 minute și în următoarele 10 minute, 80 % solvent B [92].

- Determinarea a 5-agliconi flavonoidici s-a realizat cu sistemul cromatografic: coloană C₁₈ cu fază inversă (Lichrospher 100: RP-18) și sistemul de gradient (A) metanol și (B) 10 mM acid fosforic și detecție UV-VIS [93].
- Analiza bioflavonoidelor din fructe prin cromatografie HPLC a permis identificarea flavonelor și glicozidelor acestora din fructe de grapefruit, mere, tomate. S-au dozat flavonoidele (quercetina, kaemferolul, miricetina), flavonele (apigenina, luteolina) din sucurile de mere, tomate, grapefruit, lămâie și portocale cu coloană Nova-Pack C₁₈, eluarea s-a realizat în regim isocratic: acetonitril/ tampon fosfat și detecție UV la 370 nm [92].

Pentru că flavonoidele sunt substanțe polare, utilizarea coloanelor cu fază inversă (RP-HPLC) conduce la rezultate net superioare. S-au realizat separări bune cu un aparat Helwett Packard 1084B, eluare cu acid formic-apă (5 : 95, v/v) și în gradient de metanol, debit 2,5 mL/min, detecție UV la 280 nm [94]. Timpii de retenție diferiți pot fi interpretați ca o rezultată a două tendințe opuse: legarea hidrofobă de coloană și formarea de legături cu eluatul. Astfel se poate concluziona că: la flavone și izoflavone- grupa carbonil este puternic acceptoare de protoni, deci dacă în vecinătatea acesteia la C₅ există o grupare hidroxil, se formează o legătură de hidrogen puternică și ca urmare interacțiunea cu solventul de eluare este slabă, iar timpul de retenție crește. Acest lucru este valabil pentru agliconi, pentru că la glicozizi există multiple posibilități de formare a legăturilor de hidrogen. Legătura de hidrogen cu hidroxilul de la C₃ este mult mai slabă și ca urmare timpul de retenție crește mai puțin.

Dacă la C₅ există o grupare OH, introducerea altei grupări hidroxil la C₃ de obicei reduce timpul de retenție și din această cauză și flavonele și flavonolii cu substituenți identici formează perechi greu separabile. Prezența grupelor hidroxil în alte poziții decât 3 și 5 reduce considerabil timpul de retenție. Aceste flavonoide pot fi separate ușor. Prin metilarea unei grupări hidroxil, timpul de retenție se modifică, iar separarea unui flavonoid de metileterul său se face ușor, dar la introducerea unei noi grupe metoxi, separarea nu mai este posibilă.

În cazul glicozidelor, partea zaharică introdusă are caracter hidrofil, iar contribuția la interacțiunile hidrofobe scade de la hexoze la pentoze și metil-pentoze. Formele piranozice și furanozice se pot separa clar de arabinoză, dar la glucoză și ramnoză separarea este dificilă.

Metoda RP-HPLC cu detecție spectrofotometrică UV a fost folosită pentru determinarea majorității componentelor din frunze de *Schisandra chinensis* Baill. Flavonolii (quercetină, kaemferol) și acidul cinamic au fost separați în 12 minute utilizând fază mobilă: acetonitril-soluție apoasă 0,05% de acid ortofosforic (40: 60, v/v) și coloană de sticlă Separon SGX C₁₈, 150 x 3 mm, 5 μm. Debitul a fost de 0,5 mL/min., iar analiza a fost monitorizată la λ= 260 nm [95].

Aceeași metodă RP-HPLC, este folosită și pentru identificarea flavonoidelor din ceapă (*Allium cepa*), țelină (*Apium graveolens*)[96], semințe de *Cuscuta chinensis* [97] (fază inversă- sistemul cromatografic cu acid fosforic 0,025 M - metanol ca fază mobilă). Analiza constituenților fenolici de interes biologic din vinul roșu s-a realizat prin HPLC, utilizând gradient de eluție și detecție "diode array"; fază staționară ODS Hypersil; gradient format din acid acetic, metanol și apă; timpul de efectuare a analizei fiind de 10-50 minute [98].

Prin diferite tehnici HPLC au fost determinate flavonoidele bioactive din *Platyclaudus orientalis*, *Dalbergia odorifera*, *Hippophae rhamnoides* și *Ginkgo biloba* [99-101].

Analize în urme, separări rapide și determinări rapide se obțin în prezent prin cuplarea cromatografiei de lichide de înaltă performanță cu alte tehnici moderne: spectroscopia de masă [102-166,109], cromatografia HPLC-DAD (HPLC-diode array detection) [106-109], HPLC-electrospray mas spectrometry)[110], HPL-DAD-ESIMS[111],HPLC [112], MPLC [113].

O altă metodă cromatografică de separare a flavonoidelor este RP-HPLC cuplat isocratic cu sistemul NP-TLC [112,113], când fracțiunile de flavonoide separate pe coloană 100 RP18 (150 x 4,6 mm), detecție UV 254 nm, sunt colectate, evaporate și aplicate pe plăcuțe de silice, iar dezvoltarea se realizează în trei pași utilizând gradient de eluție, metanol-acetat de etil, ca fază mobilă.

HSCCC (High Speed counter current chromatography) are aplicații preparative pentru separarea isoramnetinei, kaemferolului și quercetinei din extracte prospete de *Ginkgo biloba* și de *Hippophae rhamnoides L.*, când analiza se realizează utilizând coloană Microsorb-MV ODS (150 x 4,6 mm, 5 μm); fază mobilă metanol 0,04% H₃PO₄ (50: 50, v/v), debit 1 mL/min și monitorizare la λ= 254 nm [114].

MPLC (Medium pressure liquid chromatography)[115] este o metodă nouă pentru izolarea compușilor naturali. S-au separat prin această metodă șase compuși fenolici (acid galic, catechina, rutina, naringenina, quercetina și isoramnetina, în următoarele condiții de lucru: coloană LichroCART 250-4, Hypersil ODS (250 mm x 40mm, 7 μm), presiune 14 bar, fază mobilă acetonil și acid formic 1%; debit 1 mL/min.

1.4.6.5. Cromatografia de gaze

Primele încercări de separare prin cromatografie gaz-lichid a unor fenoli simpli datează din 1968, dar rezultate privind fenolii cu o structură mai complexă s-au publicat în anul 1962, când s-au relatat rezultate privind analiza a 36 flavonoide folosindu-se ca fază lichidă un polimer siliconic SE-40. Această metodă a permis separarea, izolarea și identificarea unor cantități de ordinul miligramelor din acești compuși, dar s-a pus problema influenței metilării, acetilării și a legăturilor de hidrogen. Ca urmare, nu s-a găsit o corelare liniară între numărul de substituenți și timpul de retenție, ceea ce indică faptul că substituenții plasați în diferite poziții ale nucleului flavonoidic influențează timpul de retenție în mod diferit în special la flavonele 3 și 5 substituie. Există însă compuși la care timpii de retenție sunt suficient de diferiți pentru a permite identificarea cu ușurință.

Utilizând fază lichidă 15 % SE-30, fază gazoasă He, debit între 120-150 mLmin, s-a constatat că: cu cât crește numărul substituenților, crește și timpul de retenție. Metoxilarea scade timpul de retenție pe când acetilarea crește timpul, dar numai la compușii în care nu există legături de hidrogen. Dacă există legături de

hidrogen, timpul de retenție este cu mult mai mic decât valoarea așteptată. Compușii cu mai mult de două grupe hidroxilice și trei grupe metoxi nu se eluează în timp util pe coloană. Creșterea temperaturii aduce unele avantaje, dar crește paralel pericolul de descompunere a compușilor injectați și scade "viața coloanei", care este solicitată la temperaturi ridicate (p.f. ale flavonoidelor se situează în jur de 200°C) [116].

Identificarea flavonoidelor, îndeosebi a trimetilsilil flavonoidelor și a agliconilor acestora a fost realizată folosind seria OV a polimerilor siliconici ca fază lichidă. Astfel pentru a identifica eterii trimetilflavonoidelor s-a folosit o coloană de polimeri siliconici SE-30, pentru identificarea antocianidinelor. Flavonoidele quercetina, hesperetina, kaemferolul, naringenina, vagonina și baicaleina, s-au identificat pe mai multe tipuri de coloane: 0,5 % OV-1, OV-17, OV-25, 2% OV-210 și 0,5 % OV-225 [117]. Cromatogramele în fază gazoasă au fost obținute la 210°C, iar pentru coloana 0,5 % OV-210 la 190°C, flavonoidele prezintă un pic larg mai slab.

Cromatografia gaz-lichid [111] a fost folosită și la elucidarea structurii flavonoidelor prin identificarea compușilor rezultați la degradarea lor alcalină.

Hidroxi- și metoxi-flavonoidele s-au analizat asociind cromatografia gaz lichid cu spectroscopia FTIR. Prin intermediul acestei tehnici s-au realizat corelări între datele spectrale IR și timpii de retenție, pe baza cărora s-au putut culege informații privind natura substituenților [116], sau s-au putut face predicții asupra timpului de retenție [118]. Asocierea cromatografiei de gaze cu spectroscopia de masă a permis detecția 5-metoxiflavonelor în plasma sanguină (sensibilitatea metodei permițând detecția a 1 ng flavonoid/ mL plasmă sanguină) [119], în extracte vegetale [120-122], ca și pentru cuantificarea activității antiradicalice a unor extracte vegetale [123] și analiza compușilor fenolici din matrici solide [124].

I.5. Activitatea flavonoidelor

I.5.1. Activitatea antioxidantă

Flavonoidele ca pigmenți naturali prezenți în vegetale protejează de efectele nocive produse de agenții oxidanți, cum sunt razele ultraviolete. Datorită prezenței în structura lor a unui număr variabil de grupări fenolice, prezintă proprietatea de a forma chelați cu fier și alte metale tranzitionale, ceea ce le conferă o mare capacitate antioxidantă și de aceea joacă un rol esențial în protecția fenomenelor de degradare oxidativă și au efect terapeutic relevant pentru un număr mare de boli.

Proprietățile lor antiradicalice se datorează inhibării radicalilor hidroxil și peroxid, grupări reactive care sunt implicate în inițierea proceselor de peroxidare lipidică și descriu capacitatea lor de a modifica sinteza eicosanoidelor (cu răspuns anti-prostanoidă și antiinflamator), de prevenire a agregării plachetare (efectul antimicrobian) și de protejare a lipoproteinelor [4].

Capacitatea antioxidantă a flavonoidelor a fost studiată încă de la descoperirea lor, iar studiile farmacologice indică că majoritatea flavonoidelor se găsesc în tractul gastro-intestinal unde se presupune că acționează ca și antioxidanți biochimici în timpul proceselor oxidative energice care are loc în timpul digestiei [125].

Flavonoidele rețin oxigenul reactiv în special din forma superoxizilor anionici, a radicalilor hidroxilici, peroxizilor lipidici sau hidroperoxizilor. Diverse flavonoide au demonstrat eficiența lor pentru a elimina procesele de peroxidare lipidică al acidului linoleic sau a fosfolipidelor din membrane [4], la peroxidarea globulelor roșii la autooxidarea homogenizatelor din creier.

Majoritatea afecțiunilor în care s-au sesizat efecte terapeutice ale flavonoidelor implică distrugerii cauzate de radicali, dar până în prezent mecanismul de acțiune nu a fost în totalitate elucidat, cu toate că cercetările recente au evidențiat unele corelări între structură și activitatea antioxidantă a flavonoidelor.

Primele lucrări publicate privind activitatea antioxidantă a flavonoidelor datează din jurul anului 1970 și s-au axat pe latura aplicativă. Flavonoidele de origine vegetală, sub formă de substanțe pure sau extracte alcoolice s-au dovedit a fi compuși cu rol protector în oxidarea uleiurilor vegetale sau a altor alimente, acizilor grași și a preparatelor cosmetice [126].

Pentru elucidarea relației structură-activitate în clasa flavonoidelor cele dintâi experimente au fost cele de oxidare a acidului ascorbic în diferite condiții catalitice, de temperatură și de pH.

Efectele antioxidante cele mai puternice prezintă quercetina, dihidroquercetina, morina, urmate de rutină, diosmetină, ramnetină, fisetină, luteolină, miricetină, kaemferol, (-) epicatechină și izoflavonele: daidzeina, genisteina și prunetina. Concentrația cea mai mică, determinată experimental, la care un polifenol flavonoidic este antioxidant este de ordinul 10^{-6} , pentru compușii cu activitate ridicată sau 10^{-3} M pentru un antioxidant cu valoare medie [126].

Proprietatea flavonoidelor de a capta radicali liberi a fost cercetată sub diverse aspecte. Astfel ionul superoxid și radicalii liberi de oxigen sunt foarte reactivi și capabili să distrugă o varietate de molecule. A fost demonstrată clar eliberarea acestor radicali în procesele inflamatorii sau în fagocitoze, când țesuturile gazdă sunt atacate. În acest sens, s-a cercetat efectul radicalilor liberi de oxigen asupra microfibrilor de colagen incubate *in vitro*. Într-un sistem generator de radicali liberi

de oxigen, colagenul a fost scindat în peptide cu greutate moleculară mică, degradarea fiind mai drastică, iar procentul de distrugere al colagenului s-a determinat din conținutul de hidroxiprolină prezentă în aceste peptide [125].

În ultimii zece ani, majoritatea cercetărilor privind activitatea antioxidantă a flavonoidelor s-au axat pe inhibări ale oxidărilor la nivel celular, cum ar fi peroxidarea lipidică, enzimatică sau catalizată de ionii metalelor tranzitionale.

S-a ajuns la concluzia că în *peroxidarea lipidică neenzimatică* o dublă legătură între C₂ și C₃, o grupare hidroxilică la C₃ și una cetonică la C₄, pot conferi proprietăți antiperoxidative.

În ceea ce privește *peroxidarea lipidică enzimatică*, după unele opinii, majoritatea flavonoidelor sunt inhibitori potențiali ai lipooxigenazei (LPO), iar inhibarea depinde de concentrație. Cele mai puțin active flavonoide sunt acelea care nu au grupare 3'-OH, ca de exemplu, naringina și naringenina. Alte elemente structurale luate în studiu, stereochimia, metilarea grupei 3-OH, includerea unei grupe cetonice (quercetina, rutina, naringina, naringenina), legarea de un rest zaharic (rutina, naringina) nu produc diferențieri remarcabile în puterea de inhibare a peroxidazei lipidice.

În urma studiului privind acțiunea flavonoidelor în lipooxidarea enzimatică, s-au tras următoarele concluzii:

- *Structurile esențiale pentru un inhibitor de lipoxigenază* sunt: grupa carbonil în poziția 4, grupa hidroxil în 4 și rotația liberă a arilului la C₂.
- *Activitatea de inhibare a lipooxigenazei* este accentuată de: heterociclul planar, grupe 3',4'-dihidroxi în inelul B și prezența grupei 3-hidroxi la heterociclul B. Astfel galangina este un inhibitor slab, crisina este inactivă, luteolina și quercetina sunt mai active decât taxifolina și kaemferolul.
- *Efectul de inhibare descrește* la adăugarea de substituenți hidrofilici: 7-O-hidroxi-etil-quercetina este mai puțin activă decât quercetina.
- *Activitatea de inhibare se pierde* la glicozidare (7-O-hidroxi-etil-rutina) sau la alchilarea principalelor grupe hidroxilice din inelul B.
- *Inhibarea lipoxigenazei nu depinde* de substituentul 5-OH (quercetina față de fisetină).
- *Hidroxietilarea incompletă* a quercetinei care conduce la produși identici celor ce se obțin la metilabilizarea incompletă a hidroxi-etil-rutozidei, pot avea ca efect inhibarea lipoxigenazei.

Relația dintre structură și activitatea antioxidantă a flavonoidelor este o problemă dificil de tratat din următoarele motive:

- nu există un singur mecanism de inhibare a oxidării, fiind vorba de cel puțin trei mecanisme: captarea radicalilor liberi ce apar în diferite situații, inhibarea peroxidării lipidice și inhibarea oxidării acidului ascorbic. Aceste trei mecanisme diferite se cuprind de obicei în termenul de antioxidant, deși ele nu apar neapărat asociate. Departajarea lor este utilă în înțelegerea acțiunii antioxidantilor în fenomenele biochimice, deoarece există mai mulți factori care influențează activitatea antioxidantă și anume: lipofilicitatea, importantă pentru afinitatea față de membranele celulare, adesea locul de acțiune; capacitatea de a lega chelatic ioni ai metalelor tranzitionale (în special Fe și Cu), acțiune prin care poate bloca centrul activ enzimatic (de exemplu al ascorbat-oxidazei), capacitatea de a capta radicali, capacitatea de inhibare a unor enzime [126].
- s-au observat inversări ale proprietăților antioxidante. Astfel la concentrații mari de substrat, unele flavonoide cum ar fi miricetina stimulează ciclooxigenaza, deși inițial s-a constatat inhibarea enzimei. Rezultate recente demonstrează posibilitatea

unui dublu rol, protector în carcinogeneză și în aceeași timp de generare a unor mutații genetice [127].

Estimarea activității antioxidante a flavonoidelor (kaemferol, rutină, luteolină, morină, miricetină) a fost realizată și urmărind efectele de inhibare a peroxidării lipidelor (LPO), metodă care este foarte utilă și pentru determinarea activității antioxidanților -flavonoide și pentru evaluarea activității antioxidante a alimentelor și a plantelor medicinale [128].

Activitatea de legare chelatică a fierului Fe^{2+} s-a determinat prin incubarea soluției de flavonoidă cu complex EDTA- Fe^{2+} pentru formarea complexului flavonoidă- Fe^{2+} , observabil la o anumită lungime de undă specifică, în prealabil determinată, deoarece în acest proces competitiv, cantitatea de complex care se formează este foarte mică și greu de dozat.

În stabilirea relației structură -activitate pentru activitatea de legare chelatică a fierului s-a concluzionat că grupa 3-OH pare să fie mai importantă decât 5-OH, structura cateholică pare mai importantă decât 5-OH. Compuși care pot forma chelați doar datorită grupelor 5-OH și 4-ceto sunt chelați slabi.

Metode de evaluare a activității antioxidante a flavonoidelor

Diverse metode pentru determinarea activității antioxidante sunt utilizate în vederea monitorizării și comparării activității antioxidante a unor compuși din produsele vegetale. Metodele care utilizează specii de generatori de radicali liberi au avantajele că sunt rapide, ușoare, simple și nu necesită echipamente speciale, fiind des folosite pentru testarea capacității compușilor de a acționa ca și inhibitori de radicali liberi sau ca donatori de hidrogen.

Alte metode de determinare a capacității antioxidante utilizează fenomene de chemiluminescență utilizând diverse substanțe fluorescente care detectează radicalii liberi și măsoară activitatea antiradical a antioxidanților împotriva radicalilor liberi ai oxigenului.

Măsurarea individuală a antioxidanților prin separare, nu permite cunoașterea cu certitudine a capacității antioxidante a unui produs datorită efectelor sinergice care pot să se stabilească între compușii prezenți în acesta. Activitatea antioxidantă se exprimă în diverse moduri, și în funcție de diferite standarde de referință.

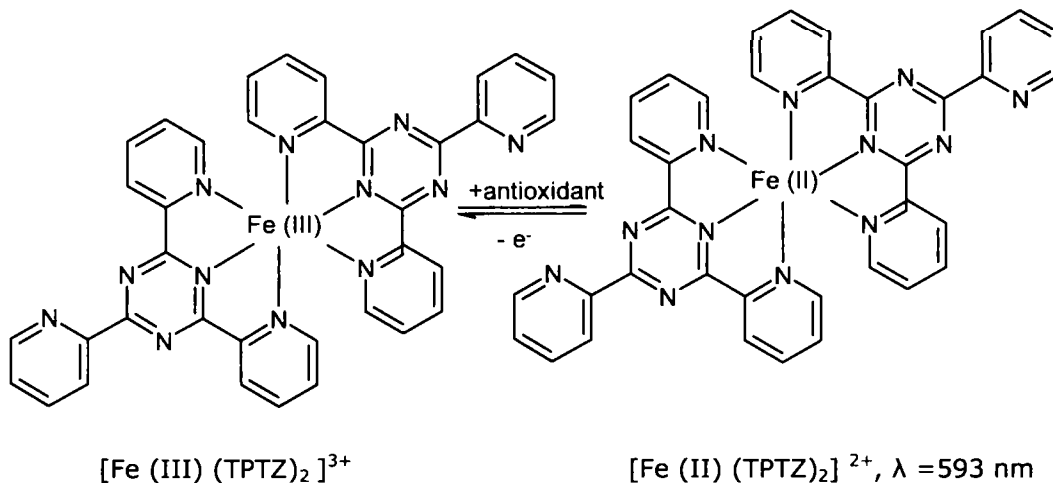
Metoda EAAT („electrochemical antioxidant activity tester”) [129]

Metoda EAAT determină capacitatea antioxidanților de a înlătura radicalul superoxid și se bazează pe măsurarea modificărilor conductivității probei pe măsură ce antioxidanții reduc radicalii liberi din soluția tampon. Cu ajutorul acestei metode sunt cuantificați toți antioxidanții care înlătură superoxidul din probă, cum ar fi: flavonoidele și carotenoizii.

Metoda a fost aplicată pentru determinarea activității antioxidante a fructelor uscate și a sucurilor concentrate (afine, căpșuni, banane).

Metoda FRAP („Feric reducing ability of plasm”) [130, 131]

Metoda FRAP prezintă avantajul reacțiilor de transfer de electroni. Sarea ferică $Fe(III)$ ($TPTZ$)₂Cl₃ ($TPTZ=2,4,6$ -tripiridil-s-triazina) este utilizată ca antioxidant.



Metoda FRAP utilizează o reacție de oxido-reducere pentru măsurarea capacității probelor de a reduce Fe^{3+} la Fe^{2+} . Valorile FRAP au fost exprimate în $\mu\text{M}/\text{probă}/\text{L}$ (μM potențial antioxidant/L, pentru 1 g extract vegetal), rezultatele variind în funcție de condițiile determinării: timp de extracție, temperatură, prezența altor compuși.

Metoda a fost aplicată pentru determinarea capacității antioxidante totale a diferitelor tipuri de ceaiuri (*Camellia sinensis*)[132], a uleiului volatil din frunze de salvie (*Rosmarinus officinalis L.*)[133], și a unor legume și fructe [134,135].

Prin această metodă a fost determinată și activitatea antioxidantă a polifenolilor; reacția fiind urmărită timp de 30 de minute, iar standardele de Fe(II) și probele au fost dizolvate în același solvent pentru a realiza compararea. Polifenolii identificați au inclus flavonoidele quercetină, rutină, catechină și acizii fenolici (acid galic, acid cafeic, acid ferulic), activitatea lor antioxidantă depinzând de extinderea hidroxilării și conjugării [136,137].

Metodă bazată pe acțiunea oxidantă a permanganatului de potasiu în mediu acid [138].

Această metodă se bazează pe acțiunea antioxidantă a permanganatului de potasiu în mediu acid asupra majorității substanțelor reducătoare vegetale. Principiul metodei constă în determinarea vitezei de decolorare a unei soluții 0,1N KMnO_4 în mediu acid, care conține produs de analizat, utilizând ca soluție etalon o soluție de acid ascorbic 1% (un antioxidant recunoscut).

Metoda a fost aplicată pentru sucuri naturale din diferite fructe.

Metoda decolorării cationului ABTS^+ . (acid 6 sulfonic 2,2'-azinobis (3 etilbenzotizolină))[139]

Metoda spectrofotometrică care are la bază utilizarea radicalului cationului ABTS^+ este una dintre cele mai folosite metode de determinare a activității antioxidante a extractelor vegetale și se bazează pe capacitatea antioxidantilor de a „stinge” radicalul ABTS^+ , care este un cromofor albastru (verde, cu maxim de absorbție la 734 nm), în comparație cu analogul hidrosolubil al vitaminei E (Trolox).

Cu ajutorul acestei metode au fost supuse analizei numeroase extracte vegetale care conțin flavonoide: frunze și semințe de *Gingko biloba* L. [140], fructe de *Averrho carambola* L. (epicatechina) [141], boabe de cacao, ceai verde, vin [142].

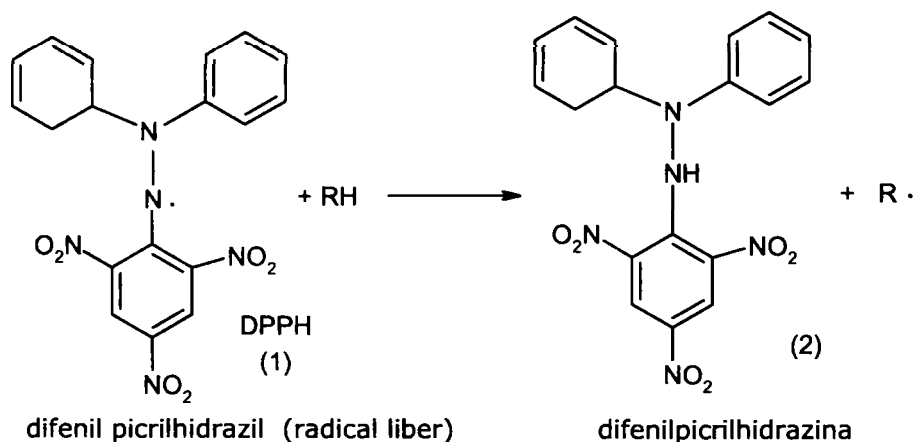
De asemenea s-a încercat utilizarea capacității antioxidante echivalente Trolox (TEAC- „Trolox equivalent antioxidant activity”) în construirea relației structură activitate (SAR) [143].

Metoda bazată pe generarea și captarea de radicali DPPH (α, α -difetil- β -picril-hidrazil) [144]

Pentru a se compara activitatea antioxidantă a unor compuși naturali cu activitatea t-butilhidroxitoluenului (BHT) și t-butilanisolului (BHA), s-a realizat o metodă perfecționată, automatizată bazată pe generarea și captarea de radicali (DPPH- alfa).

Molecula de 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (α, α -difetil- β -picrilhidrazil, DPPH, (1)), este caracterizată ca fiind un radical liber prin eficacitatea delocalizării schimbului de electroni între molecule. Delocalizarea electronilor va da o colorație violetă compusului, caracterizată printr-o bandă de absorbție în soluție etanolică la 520 nm.

Când soluția de DPPH este amestecată cu o substanță care poate dona un proton, atunci se va forma, forma redusă (2) concomitent cu dispariția colorației violete.



Metoda inițială [145] a utilizat ca antioxidant tiolul conținut în aminoacidul cisteină, urmărind reacția dintre radicalul DPPH și molecula de cisteină. (stoechiometrie 1:1). Alți compuși activi, ca, glutationul, aminele aromatice (p-fenilendiamina, p-aminofenolul, α -tocoferolul (vitamina E), și compuși polihidroxiaromatici (hidrochinona și pirogalolul) pot da această reacție.

Ulterior s-au adus simplificări metodei indicând faptul că deși unele reacții sunt mai complexe nu este necesar ca acestea să decurgă mol la mol. Metoda poate fi aplicată și în cazul reacțiilor reversibile, când specia ce conține protonul poate fi adăugată și la sfârșitul reacției [145,146]. A fost introdus și un parametru care ajută la interpretarea rezultatelor metodei DPPH, parametru denumit „concentrație

eficientă” sau valoarea EC_{50} (sau numită de unii autori IC_{50}), care este definită ca fiind concentrația substratului, ce determină reducerea cu 50% a activității DPPH.

Prin această metodă s-a determinat activitatea antioxidantă a extractelor crude din frunze, coajă, flori, fructe de *Cassia fistula* L. [147], frunze verzi și frunze mature de *Ginkgo biloba* L [148], a extractelor apoase de *Melissa officinalis* L., *Oreganum vulgare* L., *Thymus vulgaris* L și *Agrimonia eupatoria* L obținute prin metode convenționale [149].

Puterea antioxidantă a compușilor polifenolici din extractul apos, respectiv alcoolic (50%) din frunze de *Psidium* a fost determinată tot prin metoda DPPH, urmărind scăderea absorbantei și modificărilor colorației pentru radicalul DPPH de la purpuriu la galben. Eficiența antioxidantă (AE) s-a considerat a fi un parametru mai eficient pentru antioxidanții selectați [150].

De asemenea prin această metodă s-au determinat și proprietățile antioxidante a extractelor apoase de propolis [151], a extractelor butanolice și cloroformice din frunze de *Dyera costulata* [152] și a extractelor etanolice din frunze de *Cryptocarya ashersonina* [153]. Activitatea antioxidantă a unor extracte apoase a unor specii de Laminaceae a fost determinată prin metoda DPPH urmărind decolorarea probei cu DPPH și prin măsurarea absorbantei la 517 nm după 20 minute, iar ca și control au fost utilizate standardele: acid ascorbic, BHT, acid galic, quercetina și extract de *Vitis vinifera* [154].

O cale fotochimică a metodei DPPH a fost studiată pe o serie de extracte vegetale din plante braziliene utilizând ca și standarde rutina și extractul de *Ginkgo biloba*. Absorbanta a fost citită după 30 minute de reacție la 518 nm, iar valoarea acesteia a fost convertită în procente activitate antioxidantă, valorile EC_{50} fiind calculate din ecuația de regresie [155].

Un studiu comparativ pentru extractele metanolice și acetone a fost realizat pentru extractele vegetale ale unor plante medicinale și aromatice, stoechiometria reacției fiind: DPPH: extract= 1: 1.5 și 1:0.75 [156].

Activitatea antioxidantă prin metoda DPPH a flavonoidelor și a compușilor fenolici din speciile unor flori din familia *Combretaceae*, „procente de inhibare” a fost exprimată ca fiind absorbanta citită după 15 minute de reacție la lungimea de unde de 517 nm, față de martor quercetina și acidul ascorbic [157].

Activitatea antioxidantă a unei serii de legume [158] și a frunzelor de ginseng corean [159] a fost determinată tot prin această metodă.

Pentru diverse specii de ceaiuri (chinezesc, negru, de mușețel, de mentă, de eucalipt, de salvie) activitatea antioxidantă s-a determinat prin două metode: metoda DPPH și prin metoda chemiluminescenței, utilizând Trolox-ul și quercetina ca standarde [160, 161].

Gradul de distrugere al radicalilor peroxil și a radicalilor DPPH de către flavone, flavanone, flavanoli și flavonolii prezenți în alimente a fost determinată prin ESR (rezonanță electronică de spin). Efectul a fost remarcabil pentru majoritatea flavonoidelor [162].

Detecția compușilor care distrug radicalii în extractul de *Borago officinalis*, a fost realizată printr-o metodă mai modernă „on-line” HPLC-DPPH, care a dat rezultate cantitative foarte bune utilizând fază mobilă în diverse proporții de la 2-80% acetonitril cu 2% acid acetic în apă, detecția în UV la 280 nm [163].

Metoda chemiluminescenței pentru evaluarea activității antioxidante a diferitelor flavonoide

Această metodă a chemiluminescenței cu luminol, implică oxidarea luminolului în mediu bazic cu generarea unei mari energii intermediare și emisia ulterioară determinată de acidul aminoftalic. Reacția este catalizată de ioni de metal, cum este Cu(II) și necesită prezența unui agent de oxidare cum este apa oxigenată. Aceasta determină ca antioxidantul sau compusul antioxidant să reacționeze cu acesta. Activitatea antioxidantă a compușilor antioxidanți este comparată cu potențialul antioxidant al acidului ascorbic [164]. Prin această metodă a fost determinată activitatea antioxidantă a infuziilor din semințe de canar [165].

Activitatea antioxidantă a extractelor alcoolice (metanolice și etanolice) de *Hypericum perforatum*, s-a determinat prin chemiluminescență utilizând sistemul generator: luminol și apă oxigenată la pH=8,6 în prezența tamponului TRIS+ HCl [166].

Aceasi metodă a fost utilizată și pentru extractele din fructe de *Cardui mariani* [167], pentru o serie de extracte apoase de *Hypericum perforatum L.*, *Achillea millefolium L.*, *Mentha piperita*, *Cichorium intybus L.*, *Calendula officinalis*, *Symphytum officinale L.*, *Aristolochia clematitis L.*, *Rosa canina*, *Hippophae rhamnoides* (frunze, scoartă, fructe), *Thymus serpyllum*, *Sambucus nigra*, *Crataegus monogyna* [168], pentru pigmentii din ceaiul negru [169], pentru flavonoidele din propolis [170].

Determinarea potențialului antioxidant total – metoda TRAP (total reactive antioxidant potential) [171]

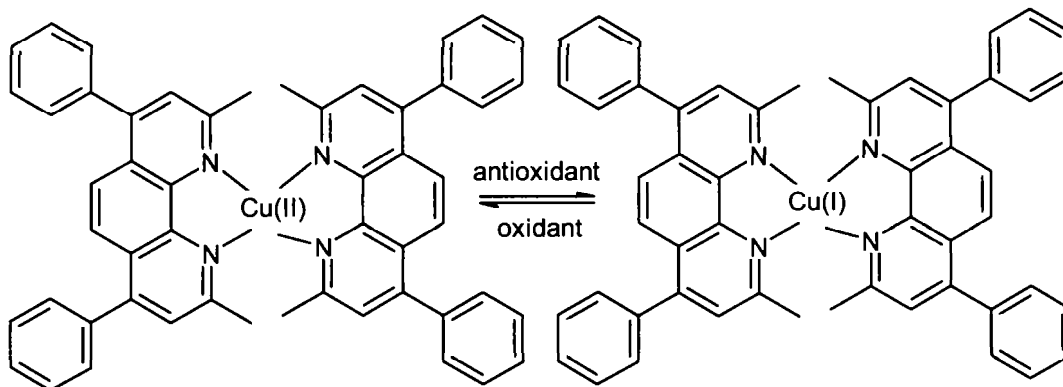
Metoda are la bază utilizarea unui generator de radicali hidrofilici și o substanță care detectează acești radicali (ficoeritrina). Ca și generator de radicali liberi se utilizează ABAP, care este un azo-compus: 2,2'-zobis-(2-amidinpropan). Cuantificarea rezultatelor se face prin urmărirea scăderii fluorescenței ficoeritrinei în urma reacției de oxidare declanșată de ABAP, monitorizare urmărită la fiecare 5 minute, la λ - 495 nm. Valorile TRAP totale au fost calculate prin intermediul sumei valorilor TRAP ale fracțiunilor hidrosolubile, rezultatul exprimându-se în $\mu\text{M/g}$ produs.

Metoda a fost utilizată pentru evaluarea capacității antioxidante a unor legume cum ar fi varza creastă, lăptuca, ceapa, tomatele.

Determinarea potențialului antioxidant total utilizând Cu (II) ca și antioxidant [171]

Această metodă se bazează pe reducerea Cu(II) la Cu(I) de către reducătorii (antioxidanții) prezenți în probă. Un agent cromogenic, batocuprina (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina), formează un complex 2:1 cu Cu (I), cu maxim de absorbție la 490 nm.

S-au găsit și alți compuși cu activitate antioxidantă, ca de exemplu α -tocoferolul care poate reduce 2 moli de Cu(II) la Cu (I).



Mai recent s-a raportat o nouă metodă, care a fost utilizată pentru măsurarea capacității antioxidante a produselor vegetale, folosind tetrabenzociclohexadecina-Cu(II) [1,5,9,13] immobilizat pe silicagel. Absorbanta sorbentului modificat (712 nm) a scăzut când Cu(II) a fost redus de către oxidant [171]. Metoda este aplicată în analiza ceaiurilor și a extractelor biologic active de Echinacea [172].

Alte metode de evaluare a activității antioxidante a flavonoidelor

Alte metode folosite pentru evaluarea activității antioxidante a flavonoidelor sunt:

- Metoda tiocianat, care utilizează un sistem apos, sub formă de emulsie apoasă care conține β -caroten și acid linoleic. Prin această metodă a fost determinată activitatea antioxidantă a extractelor apoase, eterice și etanolice din frunze de *Cydonia vulgaris* [173], a extractelor apoase din fasole (*Vigna radiata* L.) [174] și a extractelor cloroformice și acetonice de salvie (*Salvia sclarea* L.) [175].

- Metoda Rancimat, care se bazează pe abilitatea de formare a peroxizilor ca produși secundari de oxidare, când amestecul de tocoferol și BHA sunt utilizate ca antioxidanți comerciali pentru compararea activității probelor de analizat. A fost aplicată pentru a urmări oxidarea *in vitro* a conținutului de flavonoide din *Picris echioides* [175].

Activitatea antioxidantă a majorității flavonoidelor din *Aspalathus linearis* a fost comparată cu cea a altor polifenoli prezenți ca de exemplu: α -tocoferol, BHT, BHA [176].

- Metoda autooxidării linoleatului de metil, are la bază oxidarea linoleatului de metil în prezența unor antioxidanți și se utilizează îndeosebi pentru studiul activității antioxidante a fructelor comestibile și necomestibile [177, 178].

Determinarea efectului antioxidant asupra moleculelor de lipide prin măsurarea indicelui de peroxid.

Activitatea antioxidantă este studiată pe uleiul de floarea soarelui la 98°C, prin măsurarea indicelui de peroxid periodic timp de 300 minute (la fiecare 60 minute). Această metodă s-a folosit pentru determinarea activității antioxidante a unor flavonoide ca atare (apigenina, luteolina, kaemferolul, miricetina) și a unor extracte metanolice din plante (frunze de *Olea europea*, frunze de *Hypericum*

perforatum, frunze de *Crataegus laevigata*, *Origanum vulgare* și frunze de *Lauris nobilis*), studiu care justifică activitatea pro-oxidantă a flavonoidelor [179].

De asemenea mai sunt studiate și alte metode de determinarea a activității antioxidante, ca de exemplu: RAE („Relative antioxidant efficiency”) [180], TOSC („oxyradical scavening capacity”)[181], metode care sunt folosite mai rar și numai în anumite condiții.

Metoda spectrofotometrică care utilizează pirogalolul este o metodă spectrofotometrică de generare a anionilor superoxid. Această este o metodă folosită pentru determinarea proprietății antioxidante a flavonelor și flavonolilor. Activitatea pro- și antioxidantă depinde de concentrația de flavone din mediu, indicând cum hidroxilarea (pe inelul C) și poziția 3 (flavonoli) schimbă proprietățile antioxidante mai mult decât metoxilarea. Un fenomen similar este observat la hidroxilarea poziției 2' și 4' (inelul B), iar hidroxilarea și metoxilarea în poziția 7 (inelul A), are efect negativ asupra generării activității radicalice [182].

În concluzie, flavonoidele se pot comporta ca și antioxidanți și prooxidanți, această activitate fiind dependentă de o serie de factori, condițiile de analiză, concentrația efectivă care se apropie de centrul donor al radicalului format, stabilitatea radicalilor flavonoidului, ce se formează donând un atom de H la radicalul atacat; lipofilitatea pentru captarea de membrană și de pH-ul mediului. Din această cauză, se știe că flavonoidele sunt libere de toxicitate și efecte secundare, ceea ce le permite diverse aplicații terapeutice.

Pe de altă parte, aspectele structurale relaționate cu activitatea antioxidantă a flavonoidelor sunt studii ale activității de captare a radicalilor liberi, de inhibare a POL, incluzând grupa cateholică, ca și structura fundamentală, împreună cu gruparea carbonil din poziția 4 și conjugarea cu dubla legătură între C₂ și C₃. Gruparea OH liberă din poziția 3 aparent reduce capacitatea antioxidantă prin creșterea delocalizării electronice și conjugarea totală a inelului piranic cu restul moleculei. Structura tipică de antocianidine, crește instabilitatea radicalilor formați și produce o creștere a activității antioxidante, dar în același timp prezența grupării pirogalolice predispozează spre o activitate prooxidantă.

I.5.2. Activitatea biologică

Efectele biologice ale flavonoidelor se explică prin afinitatea lor față de enzime, hormoni și ioni ai metalelor.

Efectele biochimice ale flavonoidelor asupra enzimelor [183]

Numeroasele cercetări întreprinse în vederea stabilirii efectelor biochimice ale flavonoidelor asupra enzimelor au demonstrat capacitatea lor de a inhiba o serie de enzime: hidrolaze (β -glucorinidaza, hialuronidaza, proteaze, fosfolipaze, alcalin fosfataze, aril-sulfotaze), ATP-aze, liaze, oxidoreductaze, kinaze, izomeraze, transferaze, ciclooxigenaze, fosfataza alcalină, cAMP fosfodiesteraza [184-186]. Cazurile de activare a enzimelor de către flavonoide sunt mai rare [185].

Flavonolii ca de exemplu, quercetina, miricetina și kaemferolul inhibă activitatea adenzin desaminazei celulelor endoteliale, iar luteolina și quercetina sunt inhibitori ai tirozin kinazei, acționând asupra creșterii celulelor și metastazelor, și au proprietăți inhibitoare asupra activității 5-nucleotidazei (5'-nucleotid fosfohidrolazei).

Flavonoidele în general inhibă Ca^{2+} intracelular prin reducerea activității lipazei C. De asemenea posedă efecte puternic inhibitorii asupra unor enzime din sistem cum sunt proteinkinaza c, protein tirozin kinaza, fosfolipaza A₂ și altele.

Interacțiile aparente ale diferitelor părți ale moleculei de flavonoidă cu enzimele sunt redate în tabelul 11:

Tabelul 11. Partea moleculei de flavonoide și legarea cu enzime [183].

Enzima	Parte a flavonoidei
Adenozin desaminaza	Inelul benzopiranic
Tirozin kinaza	Inelul fenil
5'-Ribonucleotid fosfohidrolaza	Carbohidrați
Fosfolipaza-C	Inelul fenil
Protein kinaza C	Inelul fenil
Protein tirozin kinaza	Inelul benzopiranic
Fosfolipaza A ₂	Inelul fenil
Ciclooxigenaza	Inelul benzopiranic
Lipoxigenaza	Inelul benzopiranic
β-Galactozida	Carbohidrați
β-Galacturonidaza	Carbohidrați
Hialuronidaza	Carbohidrați
Fosfataza alcalină	Inelul fenil
Aril sulfataza	Inelul fenil sau inelul benzopiranic
DOPA decarboxilaza	Inelul fenil
Lipaza	Fenol {Mg ²⁺ chelator}
ATP-aza	Inelul benzopiranic
c-AMP fosfodiesteraza	Inelul benzopiranic
Catechol-O-metil-transferaza	Inelul fenil
Aril hidrolaza	Inelul benzopiranic
Aril reductaza	Metilarea hidroxilului la gr. de la C ₆ /C ₈
Prolin hidrolaza	Inelul benzopiranic
Dehidrogenaza	Inelul fenil
Xantin oxidaza	Gr. OH libere la C ₅ și C ₇
Fosfodiesteraza	Gr. OH libere la C ₅ și C ₇
Ca ²⁺ ATP-aza	Gr. OH libere la C ₅ și C ₇
Lipoxigenaza	Gr. OH libere la C ₅ și C ₇

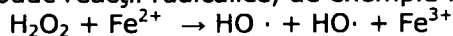
Efectele biochimice ale flavonoidelor asupra hormonilor [183]

Flavonoidele au activitate reglatoare asupra hormonilor prin legarea 17-β-hidroxi steroid dehidrogenazelor, când are loc regularizarea nivelurilor estrogene și androgene la om și a 3-β-hidroxi steroid dehidrogenazei, cu reglarea nivelului de progesteronă, respectiv de androgeni la om.

Quercetina, miricetina, rutina, kaemferolul, galangina, spinerosida și robinina sunt inhibitori puternic non-toxici, ai enzimei ITH deiodinaza în membranele microzomale și din hepatocitele intacte ale șoarecilor. Miricetina, rutina, spinerosida și robinina sunt inhibitori specifici cu mare afinitate pentru L-tetraiodotirozina în legarea TBPA uman. Sunt antagoniști slabi în reacția enzimei T3-5'-deiodinază și sunt inhibitori slabi pentru legarea triiodotirozinei la receptorul nuclear al acesteia.

Interacțiunea flavonoidelor cu metalele în sisteme biologice

În lumea vegetală flavonoidele sunt în mare măsură cele ce dau culoare plantelor, culoare care diferită datorită copigmentării și formării de chelați cu metalele, cum ar fi aluminiul, molibdenul. Pe lângă proprietatea de a da culoare, complexul flavonoidă-metal prezintă interes biologic și proprietăți terapeutice, în special când într-o astfel de interacțiune sunt implicate metale grele toxice, cum ar fi cuprul și fierul, care produc reacții radicalice, de exemplu reacția Fenton:



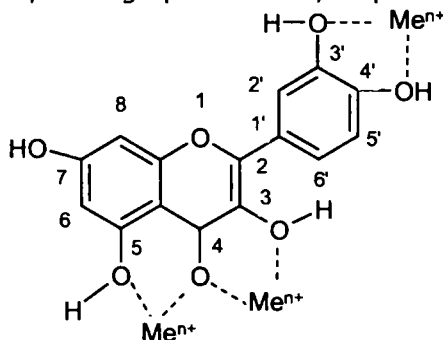
Cuprul (I) reacționează în același fel cu Fe^{2+} .

Afinitatea puternică a flavonoidelor pentru ionii metalelor grele divalente este dependentă de poziția substituenților „hidroxil” de pe ciclurile fenolice. Ionii metalici sunt necesari în o serie de procese fiziologice, dar acumularea lor în organism duce la procese oxidative intense și în final rezultă boli grave în terapia cărora flavonoidele pot fi utile. De aici rezultă și interesul mare pentru interacțiunea flavonoidă-metal.

Formarea complexelor cu ionii metalelor grele este întâlnită în multe sisteme biologice, hemoproteinele, cobaliminele (vitamina B_{12}) și ionii Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{1+} , Mn^{2+} și Ni^{2+} , care sunt esențiali în sistemele biochimice.

Acești ioni de metale sunt esențiali pentru unele funcții fiziologice ca și constituenți ai hemoproteinelor și cofactorilor diferitelor enzime, asemenea catalazei (Fe), ceruplasmina (Cu), superoxid-dismutaza (Zn, Cu), enzime implicate în apărarea antioxidanților. Alți ioni de metale grele sunt inhibitori puternici ai grupării sulfhidril în sistemul anabolic activ ca și pentru enzimele protective, ca sintetaza acidului γ -levulic, ferochelatonă, toate kinazele și dehidrogenazele ca și pentru GSH reductaza.

În cadrul structurii flavonoidelor există trei poziții de formare a complexelor cu metalele în care sunt implicate grupări hidroxil, respectiv hidroxil-carbonil;



Conform numeroaselor studii gruparea OH din poziția 3 apare ca a fi foarte importantă pentru complexii cu Fe comparativ cu OH-ul din poziția 5. Astfel pentru trihidroxietilquercetina (flavonol cu grupări 3 și 5 OH libere) are o activitate de chelatare superioară comparativ cu trihidroxietilrutina (flavonol cu gruparea 5 OH liberă).

De asemenea datorită activității lor în sistemele biologice, flavonoidele au capacitatea de a cataliza transportul de electroni sau de a capta radicali liberi [184].

Având capacitatea de a forma complexe cu proteinele extracelulare, sunt active în infecțiile microbiene produse de un număr mare de microorganisme [174]. Activitatea biologică a flavonoidelor din *Combretum erghrophyllum* (Combretaceae) a fost determinată urmărind activitatea antimicrobiană asupra

bacteriilor Grampozitive și Gramnegative. Apigenina, genkwanina, kaemferolul, quercetin-5,3'-dimetileterul și ramnazina au prezentat activitate antibacteriană remarcabilă față de *Vibrio cholerae* și *Enterococcus faecalis* [187], valorile MIC fiind de ordinul 25-50 μg/mL. Rhamnocitrina și quercetin-5,3'-dimetileterul inhibă *Micrococcus luteus* și *Shigella sonnei* la concentrații de 25 μg/mL [188]. De asemenea, activitatea antimicrobiană a flavonoidelor: kaemferol, quercetină, miricetină, rutină, naringină, formonetină, separate din diferite extracte vegetale a fost testată față de diferite bacterii și fungi [189].

Pentru a evalua efectele biologice ale flavonoidelor, ca și orice medicament sau component al alimentației, unul dintre cele mai importante aspecte este biodisponibilitatea, care e influențată de factori ca, structura chimică, absorbția, distribuția și eliminarea. De exemplu există diferențe de biodisponibilitate între quercetină și catechină în funcție de metabolism. S-a demonstrat că, concentrația plasmatică a metaboliților quercetinei prezintă o viață medie mai lungă decât metaboliții catechinei. Deoarece metaboliții catechinei sunt gluconidați, iar cei ai quercetinei sunt sulfatați, aceasta poate afecta solubilitatea metaboliților din fluidele organismului, responsabile de diferitele căi de eliminare a ambelor flavonoide. Catechinea se elimină în principal prin urină, în timp ce quercetina se elimină prin bilă [4].

I.5.3. Funcția biologică

Deși încă nu se cunoaște exact rolul pe care îl îndeplinesc flavonoidele în vegetale, există unele evidențe experimentale care îl sugerează:

- Capacitatea lor de a absorbi radiațiile ultraviolete pentru a proteja țesutul vegetal de radiațiile dăunătoare
- Colorațiile lor variate și prezența lor în țesuturi, ca de exemplu la flori, sugerează participarea în procesele de reproducere, favorizând atracția insectelor polenizatoare.
- Diferențele de activitate biologică descoperite pe unele dintre flavonoide (antimicrobiană, antimicotică, etc.) și evidențierile experimentale pentru unele dintre ele explică rezistența unor plante contra diverselor infecții și îmbolnăviri; se poate deci afirma că flavonoidele acționează ca fitoalexinele, termen ce sugerează că aceste substanțe prezintă un mecanism chimic de apărare vegetal.
- Capacitatea de inhibare a unor hormoni vegetali prezentată de unele flavonoide sugerează că ele acționează ca regulatori de creștere ai plantelor [184].

I.6. Distribuția flavonoidelor în plante

Foarte puține clase de flavonoide se găsesc în tulpina vegetală, deși în unele specii de *Lonchocarpus subglaucescens* (*Leguminosae*) se găsesc o varietate de flavone, flavonoli, izoflavone, rotenoide, calcone și flavonoli [8].

Flavonele, în general se găsesc în familiile de plante ierbacee, de exemplu: *Labiatae*, *Umbelliferae*, *Compositae*. Astfel apigenina în *Apium graveolens*, *Petroselinum crispum*, iar luteolina în *Equisetum arvense*. Flavonolii se găsesc în general în lemnul Angiospermelor. Quercetina se găsește în *Ruta graveolens*, *Fagopyrum esculentum*, *Sambucus nigra*, și kaemferolul în *Sambucus nigra*, *Cassia senna*, *Equisetum arvense*, *Lamium album*, *Polygonum bistorta*. Antocianii se găsesc în general în fructele de *Vitis Vinifera*, *Ribes nigrum*, *Vaccinium myrtillus*, frunze de

Vaccinium myrtillus, *Hydrangea aspera*, florile de *Althea rosea* var. *nigra*, florile de *Viola tricolor* L. și cele de *Centaurea cyanus* L. [9].

Izoflavonoidele sunt distribuite majoritar în speciile din familia *Leguminosae* [189], unde s-au identificat diverse flavone, flavonoli, izoflavone, rotenoide, calcone și flavonoli. Calconele apar în flori, mai rar în frunze, lemn și rădăcină. Ca și ceilalți compuși flavonoidici se găsesc mai ales sub formă de glicozide, iar corelate împreună cu flavonele se găsesc mai ales în lemn și scoarță [5]. Auronele au fost identificate în florile unor *Compositae* sub formă de glicozide, când determină o colorație galben-aurie intensă. Rotenoidele sunt răspândite în specii din genurile: *Derris* (*D. elliptica*, *D. malaccensis*), *Lonchocarpus* (*L. Urucu*, *L. Utilis*), *Milletia*, *Mundulea* și *Tephrosia*.

Florile de *Arnica montana* (*Asteraceae*) conțin quercetin-3-O-glicozida, luteolin-7-O-glucozida și kaemferol-3-glucozida; florile de *Manzanilla Romana*, *Anthemis nobilis* (*Asteraceae*) conțin apigenin-7-O-glucozida și luteolin-7-O-glicozida; florile de *Calendula officinalis* (*Asteraceae*) conțin glicozidele quercetinei și izoramnetinei; florile de *Primula sp.* (*Primulaceae*) conțin glicozidele quercetinei, gosipetinei și kaemferolului; florile de *Prunus spinosa* (*Rosaceae*) conțin glicozidele quercetina și kaemferol, iar florile de *Sambucus niger* (*Caprifoliaceae*) conțin glicozidele quercetinei, rutină, hiperozide, izoflavone, genistein-4'-glicozida și pterocarpani glicozidați. Frunzele, florile și fructele de *Crataegus sp* (*Rosaceae*) conțin glicozidele quercetinei și apigeninei. Părțile aeriene înflorite ale plantei *Fagopyrum esculentum* Moench, conțin flavone (2-3%) și 5,6% rutină, quercetină și tetrametoxirutozidă [6].

Se remarcă prin prezența flavonoidelor și următoarele: *Citrus aurantium* (*Rutaceae*), *Citrus lemon*, *Citrus medica*, *Polygonum aviculare*, *Polygonum hydropiper* L., *Fagopyrum esculentum* Moench, *Helichysum arenarium*.

Frunzele de *Ginkgo biloba* L. (*Ginkgoaceae*) conțin flavonoide, biflavonoide, proantocianidine, glicozidele kaemferolului, quercetinei și luteolinei. Alți compuși flavonoidici prezenți sunt catechinele, leucoantocianidolii și proantocianidolii dimeri [3, 190].

Conurile de *Humulus lupulus* L. conțin flavonoid glicozide ca: astragalina, quercitrina, izoquercitrina, rutina, kaemferol-3-rutinozida, iar frunzele de *Hamamelis virginiana* L. conțin quercetină, kaemferol și glicozidele acestora [190].

Fructele de *Ziziphus jujuba* Mill. conțin în principal kaemferol și miricetină, fructele verzi conțin taninuri catechice și cumarine, iar cele proaspete și mature mai conțin și quercetină și rutină. Frunzele aceleorași specii conțin rutină, (+) galocatechină și (-) epigalocatechină [190].

Frunzele a numeroase specii de *Hydrangea* conțin flavonoide ca: quercetină, kaemferol, luteolină, rutină și cianidină [190].

O serie de fructe prezintă un conținut ridicat de flavonoide. Astfel merele conțin quercetină, rutină, kaemferol, glicozidele cianidinei, (+) catechina, (-) epicatechina și poretina; portocalele dulci conțin glicozidele pelargonidinei, delfinidinei și petulidinei, hesperidină, narirutina, eriocitrina și diverse flavone; grapefruitul conține naringina, narirutină, hesperitină; lămâia conține rutină, limocitrină, isolimocitrină, hesperidină, eriocitrină, diosmină și luteolin-7-rutinozidă; strugurii conțin: quercetină, glicozida quercetinei, kaemferol, miricetină, izoramnetină, rutină, glicozidele cianidinei, peonidinei, delfinidinei, petudinei și malvidinei, catechine și glicozidele dihidroquercetinei și dihidrokaemferolului; perele conțin quercetină, glicozida quercetinei, izoquercetina, kaemferol, izoramnetină, glicozidele cianidinei, (+) catechina, (-) epicatechina și arbutina; piersicile conțin: miricetină, quercetină, kaemferol, glicozidele quercetinei și kaemferolului printre

care și rutina, glicozidele cianidinei, (+) catechina și (-) epicatechina; *caisele* conțin: quercetină, quercetin-3-O-glicozida, rutină și kaemferol glicozida; *prunele* conțin: glicozidele kaemferolului și quercetinei, glicozidele cianidinei și peonidinei; (+)catechină, (-)epicatechină; *vișinele* conțin: glicozidele kaemferolului și quercetinei, glicozidele cianidinei, (+) catechină și (-) epicatechină [37].

Dintre plantele inferioare, numai la câteva specii a fost identificată prezența flavonoidelor și anume la specia *Chlamidomonos* și la câteva ciuperci dintre fungii imperfecti [3].

I.7. Aplicațiile flavonoidelor

I.7.1. Efectele farmacologice ale flavonoidelor [149]

Dintre efectele farmacologice ale flavonoidelor cele mai reprezentative sunt: activitatea asupra sistemului nervos central, activitatea cardi tonică, activitatea antilipemiantă, activitatea antiulcer, activitatea hepatoprotectoare [183], activitatea antiinflamatoare [127,183], activitatea antitumorală [127] și activitatea antineoplastică [183].

Unele flavonoide (apigenina, crisina, toxifolina, gopipina) au acțiune antiinflamatoare *in vitro* datorită influenței asupra metabolismului acidului arahidonic, prin blocarea ciclooxigenazei și /sau lipoxigenazei, enzime ce intervin în biosinteza prostaglandinelor proinflamatorii și în coagularea sângelui. Alte flavonoide sunt antialergice (izobutirina, hispidulina), hepatoprotectoare (flavanol lignanii) și antispastice (liquiritigenina). De asemenea, a fost pusă în evidență și acțiunea hipoazotermică și antinefritică, antiulceroasă (kaemferolul), care se datorează inhibării factorului PAF (implicat în producerea ulcerățiilor mucoasei tubului digestiv) și leucotrienelor (LTC₄), concomitent cu creșterea sintezei de prostaglandine antiulceroase (PGE).

Flavonoidele au activitate antimicrobiană generală asupra unui număr mare de microorganisme. Astfel ele prezintă activitate antimicrobiană asupra unor bacterii și fungi cum sunt: *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Shigella*, *Helichrysum auroniteus*, asupra unor viruși, în particular HSV-1 și RSV, iar flavonele în particular prezintă activitate antimicrobiană asupra *Schistosoma*, iar flavonolii asupra *P. acnes* și asupra fungilor și bacteriilor gram-pozitive [187].

Un studiu arată ca flavonoidele sunt agenți puternic antitrombotici *in vitro* și *in vivo*, deoarece inhibă activitatea ciclooxigenazei și lipooxigenazei, fiind cunoscut faptul că, acidul arahidronic care este eliberat în condiții inflamatoare este metabolizat de trombocite pentru a forma prostaglandina, endoperoxizii și tromboxanul A₂, important pentru activarea și agregarea trombocitelor [127].

Efectele flavonoidelor asupra vaselor de sânge [183] indică implicarea lor în inhibarea permeabilității capilare și fenomenul Arthus. Astfel, administrate oral și săptămânal, flavonoidele inhibă permeabilitatea vasculară și previn hemoragia pulmonară. Acacetina la 25– 100 mg /kg – doză orală reduce fragilitatea capilară la șoareci și la concentrații de 50 – 100 mg / kg reduce permeabilitatea vasculară, iar patuletina reduce permeabilitatea capilară și de asemenea are efecte antispamodice și hipotensive.

Flavonoidele mențin integritatea vaselor capilare, au efect direct asupra capilarelor, potențează acțiunea acidului ascorbic, inhibă hialuronidaza, inhibă histamina, inhibă oxidarea adrenalinei și au acțiune asupra timpului de sângerare și

coagulare. De asemenea pot relaxa mușchii sistemului cardiovascular diminuând presiunea sângelui și îmbunătățind totodată circulația sângelui la inimă.

În prezent, de mare interes în cazul studiului flavonoidelor este acțiunea lor biologică de prevenire, încetinire și stopare a proceselor proliferative. Astfel, un număr mare de flavonoide naturale s-au identificat ca modulatori ai procesului de carcinogeneză, demonstrându-se efectul lor antimutagenic și anticarcinogen, dar și rolul de agent chimiopreventiv [125].

Experimentele *in vivo* au confirmat rolul protector al quercetinei, ale cărei efecte inhibă frontal celulele cancerigene ale omului: din colon, glanda mamară și ovar, din regiunea gastrointestinală și din sânge.

Sistemele de enzime asupra cărora flavonoidele au efect sunt: *Histidin decarboxilaza și DOPA decarboxilaza; Hialuronidaza; Lactic dehidrogenaza și piruvat kinaza; Catechol-O-metiltransferaza (COMT); Aldoz-reductaza; Protein kinaza C (PKC); Protein tirozin kinaza (PTK); Fosfolipaza A₂ (PLA₂); Adenozin trifosfataza; Fosfolipaza C (PLC); Ornitin decarboxilaza (ODC); Amilaza; Sialidaza (neuraminidaza); Adenilat ciclaza; Nucleotid-fosfodiesteraza ciclică (Pde); ARN și ADN polimerazele; Topoizomeraza; Revers transcriptazele (RTs); Glutathion S-transferaza (GST); Epoxid hidrolaza; Glioxalaza; Lipoxigenaza și Ciclooxygenaza; Aromataza și Xantin oxidaza* [1].

Flavonoidele prezintă efect asupra peroxidării lipidelor și producerii oxiradicalilor, precum și efecte genotoxice, bacterial mutagenice, efecte care au fost urmărite prin testarea mutagenității flavonoidelor conținute în alimente, prin testarea pentru efectele genetice în sisteme non-microbiene *in vitro* și *in vivo*, și prin testarea pentru carcinogenitate în experimente pe animale.

Diverse flavonoide au demonstrat eficiența lor pentru a elimina procesele de peroxidare lipidică a acidului linoleic sau a fosfolipidelor din membrane, a peroxidării globulelor roșii, la autooxidarea homogenizatelor din creier. De asemenea s-a studiat și capacitatea de inhibare *in vitro* în cazul oxidării lipoproteinelor de densitate joasă (LDL) și reducerea citotoxicității LDL oxidazelor. Din această cauză subiecții care au consumat produse bogate în flavonoide au prezentat riscuri scăzute în cazul afecțiunilor cardiovasculare [125].

Datorită proprietăților lor antioxidante, flavonoidele contribuie la reducerea unor procese inflamatorii, cum ar fi artritele și la tratarea uneia din bolile degenerative cele mai răspândite, ateroscleroza. Quercetina inhibă oxidarea lipoproteinelor de densitate joasă (LDL), proces care este o treaptă importantă în formarea plachetelor aterosclerotice și ca urmare în bolile cardiovasculare.

Au fost realizate și studii microbial mutagenice ale flavonoidelor. Peste 70 de flavonoide au fost testate pentru mutagenitate în diverse afecțiuni asupra *Salmonella typhimurium*. Numai un aglicon al flavonoidelor testate a confirmat activitate mutagenică apreciabilă [187].

În ceea ce privește potențialul terapeutic al flavonoidelor, quercetina prezintă pe lângă acțiunea sa datorată proprietății antioxidante, efect antiinflamator; îmbunătățește secreția de insulină și protejează celulele pancreasului de acțiunea radicalilor liberi. În plus inhibă enzima NADH dependentă, un compus ce produce complicații în diabet și chiar și în cataractă. Are acțiune benefică în tratamentul tumorilor de prostată și inhibă secreția de serotonină indusă de colagen. În concluzie, quercetina este activă în diferite boli ca: ateroscleroză, ciroză, tromboză, eczeme, hemoragii, hemoroizi, hipertensiune, psoriazis, hemoragii ale retinei, infecții respiratorii, alergii, astm, varice, cancer de sân [191].

Rutina are reale proprietăți capilar protectoare, antihipertensive, vasodilatatoare, antiinflamatoare. Rutina se remarcă și prin acțiunea sa antioxidantă, fiind utilă în unele patologii ale hematiilor [192].

Genisteina și tangeretina au acțiune în diverse forme de cancer. De asemenea s-a dovedit a fi citotoxică în cancerul hormono dependent (cancer de prostată, cancer mamar) și în leucemie [193]. Naringenina și luteolina au acțiune vasodilatatoare și antiaritmică.

3-Ramnoquercetina prezintă activitate antidiareică și antialergică. 3-Hidroxi flavonele și 3',4'-dihydroxi flavonele și 2',3'-dihydroxi flavonele (fisetina, apigenina, luteolina și genisteina) au acțiune de inhibare în proliferarea celulelor.

În concluzie flavonele cu grupe hidroxilice parțial metilate au acțiune antitumorală, flavonele au activitate antispasmodică, flavanonele antimicotice și antimicrobiană, izoflavonele, acțiunea antiestrogenică, antimutagenică, antimicotice și antimicrobiană, iar calconele au acțiune antimicotice, antibacteriană, citotoxică și antialergică.

În tabelul 12 sunt prezentate câteva din maladiile pentru care în tratament au fost administrate flavonoide.

Tabelul 12. Bolile tratate cu flavonoide [183].

Flavonoidele aplicate	Tinta	Boala
Hidroxiethylrutozid	Sinteza PG	Dureri și inflamații Crampe, oboseală/ picioare obosite/ edeme/glezne umflate
Quercetina, Silimarina		
Quercetina	Aldolaz reductaza	Diabetul zaharat
Rutina/Citrina	Peretele capilar (PG)	Alergie
Cromoglicat disodic	H ⁺ ATP-aza	Alergie
Quercetina	Celule	Alergie
Quercetina	Peretele capilar (PG)	Parodontoza
Quercetina	Na ⁺ /K ⁺ ATP-aza	Cancer
Quercetina	H ⁺ ATP-aza membranei ribozomiale	Infecții cu viruși Răceala comună
Quercetina	Arihidroxilaza Epoxid hidroxilaza	Oncogeneza chimică
Sofalcona, Quercetina	Sinteza PG	Chirurgie orală Stomac Ulcer duodenal
Kaemferol	PAF	Antiulcer
(+)-3-cianidanol Meciadanol, catechine	H ⁺ /K ⁺ ATP-aza gastrică	Antiulcer

I.7.2. Aplicațiile flavonoidelor în industria alimentară

Flavonoidele au un rol important în alimente și alimentație, în vinuri și ceaiurile de plante, datorită gustului lor astrigent.

Pigmenții flavonoidici ai plantelor determină în cele mai multe cazuri culoarea alimentelor, de exemplu a sucurilor, vinurilor și gemurilor, și ca urmare sunt considerați coloranți naturali. Astfel antocianii, pigmenții naturali din plante au un potențial important în industria alimentară, fiind utilizați ca aditivi alimentari siguri și eficienți [36]. Flavonele se folosesc ca antioxidanți la conservarea grăsimilor măbind valoarea lor nutritivă [3].

O serie dintre coloranții naturali care se utilizează sunt:

- Antocianidinele obținute din *Hibiscus sabdifer* care dau colorații de la roz la roșu, cum sunt delfinidina și cianidina.
- Antocianidinele din cireșe, prune, morcovi, struguri, soc, mure, zmeură, duche, varză, roșii sunt: pelargonina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina, malvidina.
- Flavona -apigenina, care uzual se extrage din *Matricaria recutita*, și care dă culoarea galben aur, este considerată ca fiind *colorantul Natural Yellow 1,2*.
- Luteolina- prezentă în *Reseda luteola*, este unul din cei mai vechi coloranți naturali galbeni, utilizat în Europa Centrală. Frunzele și semințele acestei plante sunt cele mai utilizate, deoarece conțin mai mult colorant decât celelalte părți ale plantei. Colorantul este de asemenea prezent în specia *Genista tinctoria*, unde colorația este mai mult verde- galben. Luteolina este denumită comercial ca fiind *colorantul Natural Yellow 2*.
- Protolina –colorantul galben-auriu din *Trifolium pratense*, este cunoscut comercial *colorantul Natural Yellow 10*.

Alt flavonoid utilizat este morina-colorantul portocaliu cu denumirea comercială *Natural Yellow 8,11*.

Alți coloranți de tip flavonoidic sunt *Natural Yellow 13* (din „persian berry”), riboflavina și Riboflavin-5'-fosfat, *Natural Yellow 10* (flavina) [179].

I.7.3. Alte aplicații ale flavonoidelor

Datorită rolului lor protector împotriva radiațiilor ultraviolete, flavonoidele sunt utilizate în componența diferitelor preparate pentru protecția pielii [37].

Ca urmare a proprietății lor de a forma complecși chelați colorați, câteva flavonoide naturale au fost utilizate, încă din cele mai vechi timpuri pentru vopsirea textilelor [194]. Culoarea predominantă a compușilor variază în funcție de structura chimică. Astfel, corespondența este următoarea [180]:

Compus	Culoarea predominantă
Flavone	Alb-crem
Flavonoli	Galben deschis
Calcone	Galben
Aurone	Galben
Antociani	Roșu- albastru

Morina izolată din *Morus tinctoria* a fost folosită înainte drept colorant de mordant aluminiu, deoarece formează cu ionii acestui metal ca și cu ionii de Sc, Ga, Zr, Th, complecși puternic fluorescenți, verde-albastru, folosiți în chimia analitică [192].

Morina și alte flavonoide sunt utilizate în chimia analitică drept reactivi de culoare sau de chelatare [3]. Flavonoidele (rutina, morina, genisteina, quercetina, hesperidina, baicalina, daidzeina) în mediu de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ / apă la pH 10.4 formează cu sărurile de diazoniu, ca de exemplu cu clorura de p-sulfodiazobenzen, compuși azoici colorați, care au aplicații analitice [193].

O serie de flavonoide au fost testate ca insecticide și acaricide. S-a observat o dependență între numărul și poziția grupărilor hidroxil, favorabile fiind pozițiile 5 și 7 din inelul A și prezența grupei carbonil în inelul C, precum și restul ramnozil în glicozide. Prezența a două grupe hidroxil în ciclul B accentuează activitatea.

Rădăcinile speciilor *Derris elliptica*, *D. malaccensis* din familia *Leguminosae-Papilionaceae* se folosesc ca insecticid față de insecte domestice sau care parazitează arborii de cultură. Conținutul lor de 4-8 % rotenonă și prezența altor izoflavone (tefrosina, toxicarolulina, sumatrolina) îi conferă proprietăți antihelmitice și în general vermifuge. Rădăcinile de *Lonchocarpus nicou* D.C. datorită conținutului în rotenone 4-20 % și substanțe tanante, sunt utilizate ca insecticide în America. Speciile *Tephrosia* sunt de asemenea utilizate ca insecticide și vermifuge [3].

CONTRIBUȚII PROPRII

II.1. Date botanice asupra speciilor studiate, genul *Ziziphus*, genul *Hydrangea*

II.1.1. Genul *Ziziphus*

Genul *Ziziphus* aparținând familiei *Rhamnaceae* conține 100 de specii de arbuști și liane cu frunze căzătoare sau permanent verzi, care sunt răspândite în regiunile tropicale și subtropicale ale lumii. Speciile *Ziziphus* pot crește ca arbori și arbuști. (*Z. Mauritania*, *Z. rotundifolia*, *Z. jujuba*) sau exclusiv ca arbuști mici, respectiv tufișuri (*Z. Lotus*, *Z. nummularia*, *Z. obtusifolia*) [190].



Figura 2. *Ziziphus jujuba* Mill.

Frunzele alterne, simple au 3-5 nervuri de la bază și sunt frecvent cu spini; Florile de culoare galben-verde au diametru de 3-4 mm; sunt mici ca dimensiune și sunt dispuse în grup de câte 2-3 de-a lungul ramurilor; sunt bisexuale și sunt în număr de cinci. Petalele pot fi modificate, staminele sunt inserate sub formă de con sau disc, iar ovarul este închis în disc și are 2-4 camere.

Fruitele sunt drupe sferice cu aspect de măslina, de lungime de 2-3 cm, dar există varietăți altoite care produc fructe de lungimea 5-6 cm. Sunt de culoare roșie până la maturitate, iar pulpa lor este hrănitore, comestibilă și dulce [195].

Încadrarea sistematică [195]

Regnul :	Plantae
Subregnul :	Tracheobionta
Încrângătura :	Magnoliophyta
Clasa:	Magnoliopsida
Subclasa:	Rosidae
Ordinul:	Rhamnales
Familia:	Rhamnaceae
Genul:	Ziziphus
Specia:	<i>Ziziphus jujuba</i> Mill. <i>Ziziphus Lotus</i>

Denumire populară: curmalul chinezesc, măslin dobrogean; Denumiri în alte limbi: engleză- jujube

II.1.1.1. Specia *Ziziphus jujuba* Mill. Specia *Ziziphus jujuba* Mill., originală din China (de aceea este denumită și jujuba chinezesc- "Chinese jujube") este un arbușt mic spinos de dimensiune medie cu foliaj verde lucios și lemn foarte dur și puternic.

Foliajul: frunzele alternante, sunt mici, au formă ovată sau ovală, lungime de 1-2 cm și culoare verde-lucios, iar pe o parte și alta a frunzei prezintă de obicei spini.

Florile sunt mici, cu diametru de aproximativ 1-5 cm, de culoare alb până la galben-verzui și se găsesc în număr mare în axila frunzelor. Sunt hermafrodite, au organe masculine și feminine și sunt polenizate de insecte. Perioada de înflorire este extinsă timp de mai multe luni începând cu primăvara târziu până vara.

Fructele sunt drupe sferice sau alungit ovoidale, de culoare roșiatică și conține două semințe. Cele imature sunt verzi, dar își capătă culoarea roșiatică când se usucă, iar fructele mature au culoare brună [196].

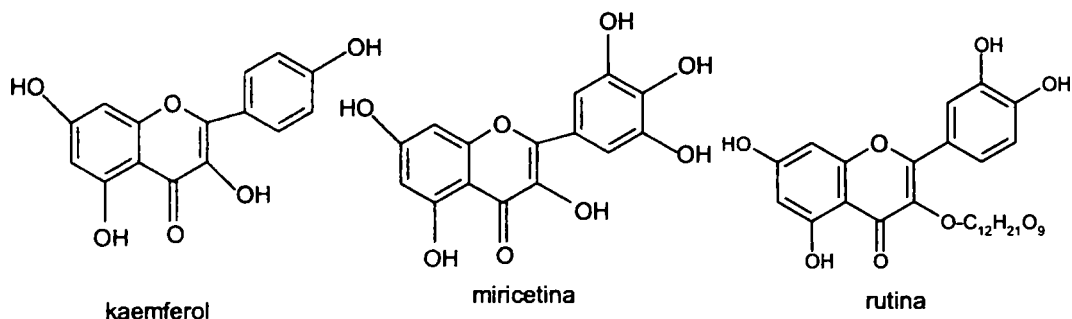
II.1.1.2. Specia *Ziziphus lotus*. Specia *Ziziphus lotus* răspândită îndeosebi în Africa de Nord și America de Nord este un arbușt mic, spinos cu frunze alungit ovale și flori galbene. Fructele sunt drupe sferic – ovale de culoare roșiatică.

II.1.1.3. Aria de răspândire

Specia *Ziziphus* este răspândită în toate regiunile globului astfel: Africa (*Z. lotus*, *Z. mauritania*), Asia (*Z. jujuba* Mill., *Z. mauritania*, *Z. oenoplia*), Australia (*Z. jujuba* Mill., *Z. rotundifolia*), Europa și America de Nord și Sud [196]. În țara noastră este sporadică în zonele stepice uscate din Dobrogea în parcuri botanice.

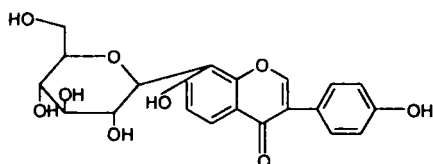
II.1.1.4. Compoziția chimică

Fructele de jujuba sunt bogate în carbohidrați (zaharoză, glucoză, fructoză, amidon), proteine, aminoacizi liberi (acid glutamic, asparagina, arginina, glicină, serină, treonină, acid aspartic) [197], grăsimi, fibre, vitamine (A, C, P și complexul B) și elemente minerale (Fe, P, Ca). Alți constituenți sunt: acizii organici (malic, tartric), succinic, steroli, cumarine, flavonoide (kaemferol, miricetina), terpene glicozidice (acid oleanolic, acid ursolic), saponine, alcaloizi izoquinolinici (steparina, asimilokina și N-nor-nuciferina) și AMP [198].

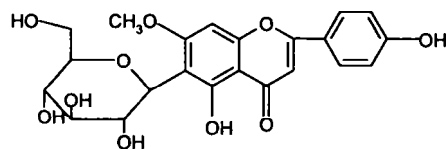


Fructele proaspete mai conțin quercetină [199], iar cele mature polifenoli și rutină [197], iar cele uscate și alcaloizi pirrolidinici [197]. Fructele verzi conțin taninuri catechice, cumarine, triterpene glicozidice (acid ursolic, acid oleanolic), acid malic și acid oxalic.

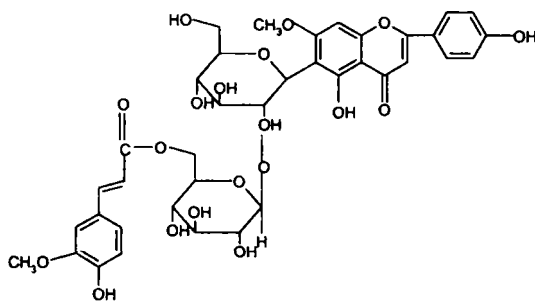
Semințele conțin saponine cu valoare medicinală: jujubogenina și ebelin lactona. Flavonoidele izolate din semințele de *Ziziphus jujuba* sunt: spinosina, puerarina, izozpinozina, swertizina și derivații lor glicozidați [200].



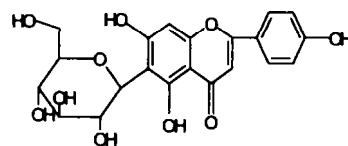
(1)
swertizina



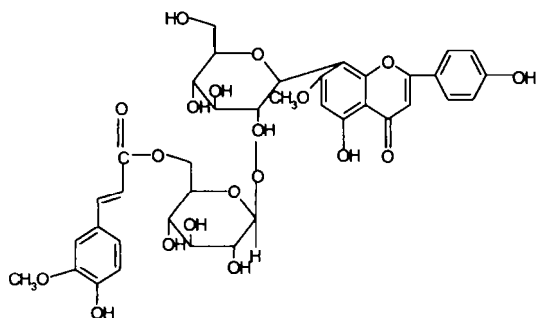
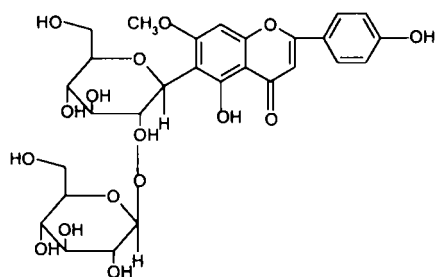
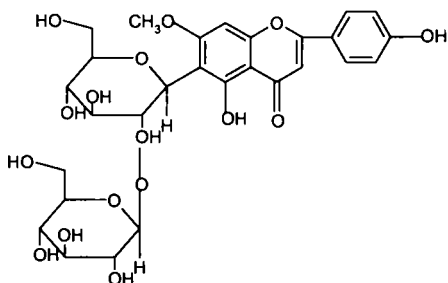
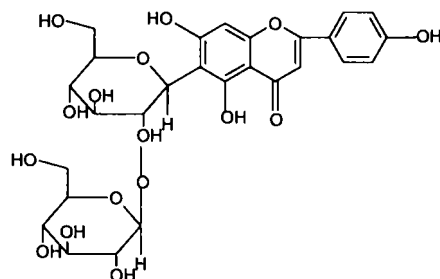
(2)
puerarina



(3)
6-feruloilspinosina



(4)
apigenin-6-C-β-D-glucopiranozida

(5)
spinosina(6)
6-feruloilispinosina(7)
isospinosina(8)
isovitexin-2''-O- -D-glucopiranozida

Frunzele de jujuba conțin proteine, grăsimi, carbohidrați, fibre, amidon, elemente minerale (Ca, P) și vitamine (vitaminele A și C) și taninuri [198]. Alți constituenți prezenți sunt: rutina, neolignani, saponine [201], jujubagenina, octacosanol, acid apitolic, alcaloizi ciclopeptidici (coclaurina, isoboldina, asimilobina, insipina și insirina) [6], ziziphina [202,203] și triterpenoide [204]. Frunzele proaspăt culese conțin jujubasaponinele I-III [204], iar cele uscate conțin saponine și ziziphină [197]. Alți componenți prezenți în frunzele de jujuba sunt alcaloizi ciclopeptidici, lipide și proteine cu sulf. Uleiul din semințe conține acid oleic.

Coaja conține alcaloizi, îndeosebi alcaloizi ciclopeptidici și anume: frangufolina [197], mauritina A, mucronina D, amfibina, numularina A și B [205] și sativanina A și B. De asemenea s-a izolat din coajă și β -sitosterol, acid betulinic, betulină, flavonoide (kaemferol, miricetină) și β -sitosterol-glucozide [197] și proantocianidine [206].

Rădăcina speciei *Ziziphus* este bogată în alcaloizi, triterpenoide pentacidice, acid zizibernalic, coclaurina. Rădăcina de *Z. Lotus* conține alcaloizii ciclopeptidici, lotusina-B, -C, E și F [197].

II.1.1.5. Activitate farmacologică și biologică

Fructele au proprietăți emolente, fluidificând secrețiile bronșice și sunt întrebuințate ca expectorante și antispastice [190].

Decoctul (per os) este folosit pentru creșterea greutatei corporale și pentru a proteja dereglările vitale provocate de tetraclorura de carbon la iepuri. Extractul

etanolic are efecte antiinflamatoare și analgezice și împiedică creșterea de *Bacillus subtilis*. Extractul metanolic marchează împiedicarea sintezei glucanilor solubili în apă pentru bacteria cariogenică *Streptococcus mutans*; principiile active sunt determinate de acidul oleanolic și acidul ursolic.

Jujuba obișnuită are efecte toxice semnificative în experimentele pe animale.

II.1.1.6. Utilizări în alimentație, medicină, farmacie

Dintre primele utilizări ale fructelor de jujuba au fost cele domestice și anume consumul fructelor proaspete sub diverse forme.

În Zimbabwe fructele se consumă atât proaspete cât și dehidratate, iar cele uscate și măcinate (pulverizate) se utilizează pentru coacere și pentru prepararea de gem și pâine tradițională [197]. În India fructele uscate se consumă ca atare, sub formă de compoturi, ca ingredient la prepararea murăturilor, jeleurilor și a diverselor pudre. În Asia de Sud-Est, fructele proaspete se consumă ca atare, fructele verzi se zdrobesc în apă, în vederea preparării unei vechi băuturi populare, iar fructele uscate și pulverizate se păstrează pentru prepararea de sucuri. În Africa, pulpa uscată și fermentată este presată sub formă de diverse prăjituri și turte dulci. În Burma, fructele de jujuba se utilizează pentru vopsirea mătăsii, iar în Kenya, coaja tânără este după dizolvare drept colorant. [199] Frunzele umectate cu apă sunt utilizate ca șampon pentru păr [197].

Pulpa fructelor mature se utilizează pentru prepararea de diverse produse ca: băuturi, sucuri de fructe, conserve, bomboane, gemuri și nectaruri, dar și ca substituent al cafelei. Extractul se utilizează ca ingredient în tonicele herbale sub formă de capsule, tablete, iar fructele crude se utilizează în mixturile pentru supe.

Jujuba este un fruct delicios și este considerat efectiv un remediu natural.

Fructele uscate sunt caracterizate ca având proprietăți anticanceroase, sedative, stomatice și tonice; purifică sângele și tractul digestiv, se utilizează intern în tratamentul oboselii cronice, pierderii apetitului, diareei, anemiei, iritabilității și histeriei. De asemenea este considerat ca fiind un diuretic, emolient, expectorant.

Frunzele sunt astrigente și febrifuge.

Semințele au proprietăți hipnotice, narcotice, sedative, tonice și sunt utilizate intern în tratamentul palpitațiilor, insomniei, epuizării nervoase, insomniilor și transpirației excesive. Amestecate cu ulei se utilizează în tratamentul reumatismului.

Radăcina este utilizată în tratamentul dispepsiei, iar decoctul din rădăcină se utilizează în tratamentul febrei, este vermifug, tenicid și colagog.

Infuziile din flori servesc ca soluții pentru ochi [199].

Planta în general este un remediu pentru anemie, hipertonie, nefrite și boli nervoase, iar în China este utilizată în tratamentul diverselor arsuri [207].

Apa și extractul hidroalcoolic din jujuba obișnuită se utilizează în preparate pentru întreținerea pielii; datorită proprietăților antiinflamatoare și de umectare a acesteia [190].

II. 1.2. Genul *Hydrangea*

Familia *Saxifragaceae* sau *Hydrangeaceae* conține un număr mare de genuri și specii, ale căror caractere morfologice sunt mai mult sau mai puțin diferite.

Genul *Hydrangea* cuprinde arbuști înalți de 1-3 m, dar și copaci mici, iar alții fiind plante agățătoare pot ajunge până la 30 m. Pot fi arbuști cu frunze

căzătoare în cazul speciilor temperate sau cu frunze care sunt permanent verzi [208].

Florile arbuștilor au forme variate, de la forma globuloasă (disc), disc "dantelat" la cea de con de stejar și paniculă. Fiecare floare individuală de hydrangea este relativ mică, totuși aspectul culorii se amplifică aproape de centrul fiecărei flori. În cazul majorității speciilor florile sunt albe, dar în cazul unor specii pot fi albastre, roșii, roz sau purpurii. În cazul acestor specii, culoarea depinde de aciditatea sau alcalinitatea solului (solul acid- flori albastre, neutru- alb-crem, alcalin- roz sau purpuriu). Unele varietăți produc flori cu două nuanțe, în timp ce unele flori au culori contrastante, iar unele au picățele sau dungi de altă culoare. În afară de florile lor atractive, unele specii de hydrangea sunt apreciate și pentru foliajul lor atractiv sau coaja lor [209].

Hydrangea este una din puținele plante care acumulează aluminiul. Aluminiul este prezent în solurile acide și formează complecși în florile de Hydrangea, dându-le colorația albastră [208].

Încadrarea sistematică [208]

Regnul:	Plantae
Încregătura:	Magnoliophyta
Clasa:	Magnoliopsida
Ordinul:	Cornales
Familia:	Hydrangeaceae
Genul:	Hydrangea
Specia:	<i>Hydrangea paniculata</i> <i>Hydrangea aspera</i>

Denumirea populară: hortensia

II.1.2.1. Specia *Hydrangea aspera*

Hydrangea aspera este un arbușt atractiv de dimensiune mare cu muguri păroși și mari, și frunze ca de pluș. Florile mari și alungite apar vara târziu și sunt albastrii cu raze ornamentale albe [209].

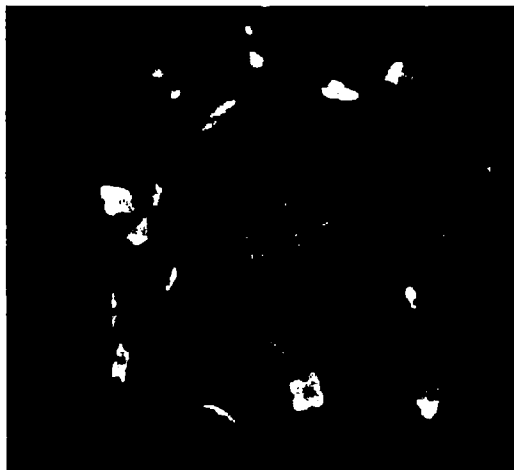


Figura 3. *Hydrangea aspera*

Această familie este foarte mare, iar culoarea florilor de obicei nu se schimbă. Toate varietățile familiei *Aspera* au forme neobișnuite.

Diversele varietăți de *Aspera* sunt originare din Himalaya, China și Taiwan.

II. 1.2.2. Specia *Hydrangea paniculata*

Hydrangea paniculata este un arbust frumos, de talie mare, ajungând la 1-2 m înălțime, cu o ramificație largă, originar din pădurile Chinei și ale Japoniei.

Frunzele sunt ovale cu vârful mai mult sau mai puțin ascuțit, de 5-12 cm lungime și 3-5 cm lățime, serate, verde închis și netede pe față, iar pe dos verde deschis și pufoase.

Florile sunt grupate în panicule (inflorescențe conice, piramidale, de 15-30 cm lungime) acoperind abundant întreaga tufă. Florile își schimbă culoarea în cursul verii. La început sunt verzui, după aceea treptat devin albe, apoi roz, la sfârșitul înfloririi având o culoare roz-roșu-verzui, decolorată [210].



Figura 4. *Hydrangea paniculata*

II.1.2.3. Aria de răspândire

Genul *Hydrangea* cuprinde aproximativ 600 de specii de plante cu flori, care sunt răspândite sau cultivate pe toate continentele, deși sunt native din Asia Centrală și de Est (din Japonia până în China, Himalaya și Indonezia) și din America de Nord și Sud [209]. În țara noastră, hortensia este cultivată în sere și chiar în aer liber pentru florile sale roz sau albe, care sunt grupate într-o fluorescență globulară [211].

II.1.2.4. Compoziția chimică

Constituenții prezenți în frunzele de *Hydrangea* sunt: saponine, hidrangingina, acid hidrogenic, hidrargetina (7-hidroxi-8-metoxi-cumarina), umbeliferona, gume rășini [12], polifenoli [212, 213], taninuri [12, 213, 214] și aluminiu [215]. Unele specii de *Hydrangea* conțin flavonoide (quercetină, miricetină, kaemferol, luteolină, rutină) [6, 214, 216].

Radăcina de hydrangea conține: hidragină, saponine, rășini, rutină, amidon și ulei volatil [208].

Florile de hydrangea în funcție de culoarea lor conțin îndeosebi antociani, [217,218] care dau colorație roșie florilor în solul acid și colorație albastră în solul alcalin [217].

Semințele conțin îndeosebi acizi grași [219].

II. 1.2.5. Activitatea farmacologică și biologică

Atât frunzele cât și rădăcina de hydrangea au proprietăți diuretice, iar datorită conținutului de hidragenol au activitate antialergică, inhibă activitatea hialuronidazei.

II.1.2.6. Utilizări în alimentație, medicină, farmacie, cosmetică

În medicina tradițională se utilizează ca tonic, diaforetic și diuretic pentru îndepărtarea și prevenirea formării pietrelor și nisipului la rinichi.

De asemenea se utilizează ca și cataractic, emetic, iar extern pentru răni de diverse naturi, arsuri, dureri musculare, luxații, remedii contra cancerului. În medicina chineză, rădăcina, frunzele și florile a diverse specii de hydrangea se utilizează în tratamentul malariei [220], dar și ca diuretic și antitusiv.

Frunzele constituie componenta diferitelor preparate pentru tratamentul afecțiunilor pulmonare și hepatice și a iritațiilor gastrice. Datorită faptului că frunzele unor specii de hydrangea sunt dulci (*H. macrophylla*, *H. Umbellata*), acestea sunt și o sursă potențială pentru dulcețuri naturale [190].

În preparatele comerciale se găsesc sub formă de extracte, ceaiuri, capsule, tincturi. Rădăcina se utilizează în preparate diuretice în combinație cu mătasea de cereale și grăsimi, dar și sub formă de tincturi [190].

II.2. Obținerea extractelor de *Ziziphus* și *Hydrangea*

Principii generale:

Extracția flavonoidelor din materialul vegetal nu se realizează după o metodă standardizată, neexistând nici un dizolvant comun, cei mai utilizați solvenți pentru extracția flavonoidelor sunt etanolul, metanolul, acetona și cloroformul.

Ținând seama că în produsele vegetale circulația tuturor substanțelor active se face în mediu apos, extracția optimă a principiilor active se realizează cu apă, dar deoarece unele substanțe printre care chiar și unele flavonoide sunt insolubile în apă, este necesară extracția materialului vegetal cu solvenți polari. Extracția flavonoidelor se poate face și folosind pe rând mai mulți solvenți în ordine crescândă a polarității, deoarece atât glicozidele cât și agliconi au solubilități diferite.

Materialul vegetal din care s-au realizat extractele a fost: frunze și fructe de *Ziziphus jujuba* (ZJ frz; ZJ fru); frunze și fructe de *Ziziphus lotus* (ZL frz; ZL fru); frunze de *Hydrangea paniculata* (Hp frz); frunze de *Hydrangea aspera* (Ha frz).

Recoltarea s-a făcut în anul 2004 în cursul lunilor septembrie sau octombrie, funcție de gradul de maturare. După recoltare, materialul vegetal a fost uscat la temperatura camerei și la lumină difuză, și a fost apoi păstrat în pungi de hârtie și cutii, în condiții de întuneric și temperatura de 20 °C.

Cele două specii de Angiosperme au provenit din Grădina Botanică Macea, județul Arad.

Conținutul de principii active din extracte a fost determinat prin metoda spectrofotometrică, iar pentru unele extracte prin cromatografia de lichide de înaltă performanță. Trasarea spectrelor UV-VIS pentru extracte și curbele de etalonare pentru standardele de flavonoide a fost realizată cu ajutorul unui spectrofotometru UV-VIS Carl Zeiss Yena, iar cromatogramele HPLC au fost realizate cu ajutorul sistemului Agilent 1100 cu pompă binară și degazor de vid.

II.2.1. **Obținerea extractelor apoase din frunze și fructe de *Ziziphus jujuba*, din frunze de *Hydrangea paniculata*, respectiv *Hydrangea aspera*.**

Materialul vegetal mărunțit în prealabil a fost supus extracției cu apă timp de 70 ore la temperatura de 5°C, în raport molar, material vegetal : solvent = 1:10, folosind același solvent, timp și temperatură [221].

Tabelul 13. Condițiile experimentale pentru obținerea extractelor apoase.

Material vegetal supus extracției	Solvent de extracție	Timp de extracție [ore]	Temperatura de extracție [°C]	Principiile active extrase mg /mL extract
Frunze de <i>Ziziphus jujuba</i> (ZJ frz)	Apa	70	15	0,1982 Rutina
Fructe de <i>Ziziphus jujuba</i> (ZJ fru)	Apa	70	15	0,1640 Rutina
Frunze de <i>Hydrangea paniculata</i> (Hp frz)	Apa	70	15	0,3021 Quercetina 0,2195 Rutina
Frunze de <i>Hydrangea aspera</i> (Ha frz)	Apa	70	15	0,2912 Quercetina 0,0115 Rutina

II.2.2. Obținerea extractelor alcoolice din frunze și fructe de *Ziziphus jujuba* și din frunze de *Hydrangea paniculata*, respectiv *Hydrangea aspera*.

II.2.2.1. Obținerea extractelor prin macerare (extracție statică)

Materialul vegetal uscat și mărunțit în prealabil a fost supus extracției cu alcool (alcool metilic sau alcool etilic) timp de 70 de ore la temperatura camerei, iar după filtrare a fost concentrat la 1/3 din volum [221].

În vederea identificării condițiilor optime de obținere a unui extract cu conținut cât mai ridicat de flavonoide s-a lucrat în diverse condiții de extracție. S-a modificat concentrația solventului și timpul de extracție.

Datele experimentale privind extracția prin macerare a flavonoidelor sunt prezentate în tabelele 14, 15 și 16.

Tabelul 14. Obținerea extractelor alcoolice din frunze de *Ziziphus jujuba* (ZJ frz).

Material vegetal	Solvent de extracție	Raport mat.veg.: solv. (g/v)	Temperatura de lucru [°C]	Timp de extracție [ore]	Principiul activ extras mg/mL extract
ZJ frz	Alcool metilic 94%	1 : 10	4	168	1,0099 Rutina
ZJ frz.	Alcool etilic 94%	1 : 10	22 - 24	168	0,1108 Rutina
ZJ frz.	Alcool etilic abs.	1 : 10	22 - 24	168	0,1216 Rutina

Tabelul 15. Obținerea extractelor alcoolice din fructe de *Ziziphus jujuba* (ZJ fru).

Material vegetal	Solvent de extracție	Raport mat. veg.:solv. (g/v)	Temperatura de lucru [°C]	Timp de extracție [ore]	Principiul activ extras mg/mL extract
ZJ fru	Alcool metilic 94 %	1 : 10	10	160	0,0120 Kaemferol
ZJ fru (EZ1)	Alcool metilic 94%	1 : 10	10	80	0,0462 Rutina
ZJ fru	Alcool etilic 96%	1 : 10	20 - 24	100	0,0162 Rutină

Tabelul 16. Obținerea extractelor alcoolice din frunze de *Hydrangea paniculata*, respectiv *Hydrangea aspera* (Hp, Ha).

Material vegetal	Solvent de extracție	Raport mat.veg.: solv. (g/v)	Temperatura de lucru [°C]	Timp de extracție [ore]	Principiul activ extras mg/mL extract
Hp frz	Alcool etilic 70 %	1 : 10	22 - 24	24	1,9823 Rutină
Hp frz	Alcool metilic 94 %	1 : 10	4	168	2,3412 Rutină
Hp frz	Alcool etilic 96 %	1 : 10	22 - 24	168	0,9213 Rutină
Ha frz	Alcool etilic 96 %	1 : 10	22 - 24	168	0,0950 Rutină
Hp frz (E ₁)	Alcool metilic 94 %	1 : 10	22 - 24	50	34,083 Quercetina 9,0525 Rutina
Hp frz (E ₇)	Alcool etilic 96 %	1 : 10	4	100	11,7365 Rutină
Hp frz (E ₈)	Alcool metilic 94 %	1 : 10	4	100	20,9945 Rutină 35,8995 Rutină

În cazul extracției prin macerare alcoolică a flavonoidelor, randamentele cele mai bune se obțin folosind ca solvent alcoolul metilic 94 %, iar condițiile cele mai optime pentru extracție sunt temperatura de lucru de 4°C și timpul de extracție de 100 ore.

II.2.2.2. Obținerea extractelor prin extracție cu solvenți la reflux [26]

Materialul vegetal uscat a fost supus extracției cu alcool (alcool metilic, respectiv alcool etilic) timp de 10 minute la reflux. Extractele astfel obținute au fost concentrate la aproximativ 1/3 din volum.

Solvenții și condițiile de extracție sunt redate în tabelele 17 și 18.

Tabelul 17. Obținerea extractelor alcoolice din fructe și frunze de *Ziziphus jujuba* (ZJ fru, ZJ frz) prin extracție cu solvenți la reflux.

Material vegetal	Solvent de extracție	Raport mat.veg.: solv. (g/v)	Temperatura de lucru [°C]	Timp de extracție [min.]	Principiul activ extras mg/mL extract
ZJ fru	Alcool etilic 96%	1 : 10	80	10	0,4327 Rutina
ZJ frz.	Alcool metilic 94 %	1 : 10	40 - 50	10	0,8685 Rutina
ZJ fru	Alcool etilic 94 %	1 : 10	80	10	0,0215 Rutina 0,0125 Miricetina 0,0482 Kaemferol
ZJ fru	Alcool metilic 94 %	1 : 10	40 - 50	10	0,0135 Miricetina 0,1157 Kaemferol 0,0462 Rutină
ZJ fru	Alcool etilic 70 %	1 : 10	80	60	0,0305 Kaemferol

Tabelul 18. Obținerea extractelor alcoolice din frunze de *Hydrangea paniculata* (Hp frz), respectiv *Hydrangea aspera* (Ha frz) prin extracție cu solvenți la reflux.

Material vegetal	Solvent de extracție	Raport mat. veg.: solv. (g/v)	Temperatura de lucru [°C]	Timp de extracție [min.]	Principiul activ extras mg/mL extract
Ha frz	Alcool etilic 94 %	1 : 10	80	10	0,1364 Luteolina 0,3707 Rutina
Ha frz	Alcool metilic 94 %	1 : 10	40 - 50	10	0,1059 Luteolina 6,6105 Rutina
Hp frz. (e ₃)	Alcool metilic 94 %	1 : 10	40 - 50	10	0,0355 Rutină 0,0315 Quercetina 0,0125 Luteolina
Hp frz.	Alcool etilic 70 %	1 : 10	80	60	0,1521 Rutina

Extractele notate în tabelele 15, 16 și 18 ca e₁, e₃, EZ₁, E₇, E₈, vor fi analizate ulterior prin HPLC.

Ca urmare a rezultatelor obținute s-a putut evidenția faptul că alcoolul metilic 94% este solventul cel mai potrivit pentru extracția glicozidelor flavonoidelor, în cazul nostru rutina, respectiv a agliconului quercetină, iar alcoolul etilic 94% este solventul potrivit pentru extracția kaemferolului și luteolinei. În cazul modificării condițiilor de extracție și anume când s-a utilizat ca solvent de extracție alcoolul etilic 70% și s-a prelungit timpul de extracție la 100 ore s-a observat o scădere remarcabilă a cantității de principii active extrase.

II.2.2.3. Obținerea extractelor de *Hydrangea paniculata* prin extracție multiplă (Soxhlet)

Materialul vegetal a fost extras întâi cu un solvent nepolar: eter de petrol (pentru extractele E₁, E₂, E₃, E₆) și eter etilic (pentru extractele E₄, E₅) în vederea îndepărtării compușilor chimici liposolubili, iar apoi cu un solvent polar: alcool metilic (pentru extractele E₁, E₂, Ha) și alcool etilic (pentru extractul E₃-E₆) pentru extragerea compușilor hidrofilii.

Extracția cu solvenții nepolari s-a realizat prin două metode:

- 1a). extracția materialului vegetal într-un extractor tip Soxhlet timp de 4 ore;
- 2a). extracția materialului vegetal la temperatura camerei, cu agitare mecanică și cu schimbarea solventului la fiecare oră.

Extracția cu solvenți polari s-a realizat de asemenea prin două metode:

- 1b). extracția materialului vegetal într-un extractor Soxhlet timp de 4 ore;
- 2b). extracția materialului vegetal la reflux timp de 20-40 minute.

Obținerea extractelor și condițiile de lucru sunt prezentate în tabelul 19.

Tabelul 19. Obținerea extractelor alcoolice din frunze de *Hydrangea paniculata* (HP frz) prin extracție multiplă (Soxhlet).

Extract	Solvent nepolar	Procedeul de extracție (etapa I)	Solvent polar	Procedeul de extracție (etapa II)	Principiul activ extras mg/ mL extract
E1	Eter de petrol	Extr. Soxhlet	Alcool metilic 94%	Extr. Soxhlet	0,2364 Rutina 9,5935 Quercetina 0,7938 Luteolina
E2	Eter de petrol	Extr. cu agitare la 20-24 °C	Alcool metilic 94%	Extr. reflux 40 minute	8,0885 Rutina 28,4232 Quercetina 3,89 Luteolina
E3	Eter de petrol	Extr. Soxhlet	Alcool etilic 94 %	Extr. Soxhlet	1,83350 Rutina 5,6738 Quercetina 5,5550 Luteolina
E4	Eter etilic	Extr. Soxhlet	Alcool etilic 94 %	Extr. Soxhlet	0,0841 Rutina 5,6630 Quercetina
E5	Eter etilic	Extr. cu agitare la 20- 24 °C	Alcool etilic 94 %	Extr. reflux 40 minute	4,6880 Rutina 9,2600 Quercetina
E6	Eter de petrol	Extr. cu agitare la 20 - 24 °C	Alcool etilic 94 %	Extr. reflux 40 minute	6,4765 Rutina
Ha	Eter de petrol	Extr. cu agitare la 20-24 °C	Alcool metilic 94%	Extr. Soxhlet	11,736 Quercetina

Ca urmare a rezultatelor obținute se poate afirma faptul că în cazul obținerii extractelor alcoolice din frunze de *Hydrangea paniculata* prin procedeul extracției multiple- Soxhlet, alcoolul metilic 94 % este cel mai bun solvent pentru extracția flavonoidelor, iar solventul folosit pentru îndepărtarea compușilor lipofili, cel mai eficient este eterul de petrol .

II.2.2.4. Obținerea extractelor totale de *Ziziphus* și *Hydrangea* în vederea identificării resturilor de agliconi.

Extracția s-a realizat după metoda Hasler [222]. Materialul vegetal uscat (4 g.) și mărunțit în prealabil a fost extras cu alcool metilic 94 % (100 mL) și HCl 25 % (10 mL), timp de 30 minute la reflux pe baie de apă. După răcire la temperatura camerei, amestecul a fost filtrat, iar produsul de pe filtru s-a spălat cu ~ 100 mL metanol. Solventul a fost apoi îndepărtat sub vid, iar extractul a fost adus apoi cu alcool metilic la 100 mL în balon cotat.

Modul și condițiile de extracție sunt redate în tabelul 20.

Tabelul 20. Obținerea extractelor în vederea identificării resturilor de agliconi

Material vegetal	Amestecul de solvenți	Timpul de extracție [min.]	Temperatura de extracție [°C]	Principiul activ extras mg /mL extract
Hp frz	Alcool etilic 96 % și HCl 25 %	30	80	*
Hp frz.	Alcool etilic abs. și HCl 25 %	30	80	*
Hp frz.	Alcool metilic 94% și HCl 20 %	15	40 - 50	0,0920 Quercetina
Hp frz. (e ₂)**	Alcool metilic 94 % și HCl 25 %	30	40 - 50	0,1080 Quercetina 0,1939 Rutina
ZJ fru. (EZ ₂)**	Alcool metilic 94 % și HCl 25 %	30	40 - 50	0,6089 Rutina 0,0138 Miricetina 0,0576 Kaemferol

* Se presupune că ar fi cianidina, dar nu s-a dispus de produs etalon.

** Extractele notate îca e₂, EZ₂ vor fi analizate ulterior prin HPLC.

Extractele de *Hydrangea paniculata* obținute conform procedeeului de la paragraful II.2.2.3. au fost supuse hidrolizei în vederea identificării resturilor de agliconi. Condițiile de lucru sunt redate în tabelul 21.

Tabelul 21. Hidroliza extractelor din frunze de *Hydrangea paniculata*

Extractul	Amestecul de solvenți	Timpul de extracție [min.]	Temperatura de extracție [°C]	Principiul activ extras mg /mL extract
E1 (Hp frz)	Alcool metilic 94 % și HCl 25 %	30	40-50	0,2285 Rutină 1,9161 Quercetină
E3 (Hp frz)	Alcool metilic 94 % și HCl 25 %	30	40-50	2,7116 Quercetină 1,9634 Rutină
E8 (Hp frz)	Alcool metilic 94 % și HCl 25 %	30	40-50	2,2316 Quercetina 1,6163 Rutină

Extractele cu un conținut ridicat de principii active s-au obținut prin hidroliza acidă a extractelor metanolice obținute conform paragrafului II.2.2.3, precum și prin metoda Hasler [222], utilizând ca solvenți alcool metilic 94 % și HCl 25 % și un timp de extracție de 30 minute.

II. 3. Caracterizarea extractelor de *Hydrangea paniculata* și *Ziziphus jujuba*

Pentru cele două specii, *Hydrangea paniculata* și *Ziziphus jujuba* s-au identificat calitativ și s-au determinat cantitativ compușii flavonoidici, compușii polifenolici, antocianidinele și taninurile (conform II.3.1.-II.3.4.).

II.3.1. COMPUȘII FLAVONOIDICI

II.3.1.1. Reacții de culoare specifice pentru principalele clase de flavonoide

În tabelul 22 sunt redată sinoptic principalele reacții de culoare pentru principalele clase de flavonoide prezente în extractele de *Hydrangea* și *Ziziphus*.

Tabelul 22. Reacții de identificare a flavonoidelor.

Reactiv	Flavonoli	Flavone
HCl + Mg	Roșu	Portocaliu
HCl + Zn	Roz	Roșu
NaOH	Galben închis	Galben
Citroboric	Verde galben fluorescent	Verde-galben
SbCl₅	Galben	Galben
Acetat magneziu de	Fluorescență galbenă	Fluorescență galbenă
AlCl₃	Galben verde	Galben

Pentru toate extractele reacțiile au fost pozitive.

Flavanolul quercetină a fost identificat în extractele acidulate, iar rutina, kaemferolul și miricetina în extractele propriu-zise și cele purificate.

II.3.1.2. Identificarea flavonoidelor prin cromatografie în strat subțire

Cromatografia în strat subțire a flavonoidelor se efectuează, cu cele mai bune rezultate, pe strat de poliamidă, respectiv de silicagel, folosind o serie de sisteme de solvenți care conțin metanol, metil-etil-cetonă, acid formic, acid acetic, acetat de etil [63]. Față de suporturile cromatografice indicate de literatură, s-a încercat și un suport de alumină, pentru care rezultatele au fost comparabile.

Pentru identificarea cromatografică a flavonoidelor din extractele propriu-zise s-au folosit plăcuțe cu strat de Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) și plăcuțe cu strat de alumină (Merck), 10 x 15 cm dimensiune, cu o grosime a stratului de 0,25 mm. Pentru a obține o separare cât mai bună a componentilor s-a lucrat cu solvenți cu polaritate diferită. Pentru dezvoltare s-au utilizat solvenții metanol și cloroform ca atare, precum și diverse amestecuri de solvenți.

Uscarea cromatogramelor s-a realizat la temperatura camerei, iar vizualizarea spoturilor s-a realizat la lampa cu raze UV ($\lambda=254$ nm) în cazul plăcuțelor de Kieselgel 60 și la lumina zilei, în cazul plăcuțelor de alumină.

Pentru matorii utilizați, standarde de flavonoide (Sigma Aldrich), s-au obținut valorile R_f , prezentate în tabelul 23, iar valorile R_f pentru extractele propriu-zise sunt prezentate în tabelul 24.

Tabelul 23. Valorile R_f , pentru standardele de flavonoide

Standard	Faza staționară	Faza mobilă	R_f
Quercetină	Kieselgel 60	Metanol	0,6
		Cloroform	0,6
	Alumină	Metanol	0,8
	Kieselgel 60	CHCl ₃ :AcOEt=9:1;	0,8
		CHCl ₃ :AcOEt:HCOOH = 5:4:1;	0,8
		AcOEt:MeOH:H ₂ O = 7,9:1,1:1;	-
	H ₂ O:HCOOH:AcOH: AcOEt = 5:2:2:18;	0,8	
Rutina	Kieselgel 60	Metanol	0,82
		Cloroform	0,82
	Alumină	Metanol	0,64
	Kieselgel 60	H ₂ O:HCOOH:AcOH: AcOEt = 5:2:2:18;	0,6
Kaemferol	Kieselgel 60	Metanol	-
		Cloroform	-
	Alumină	Metanol	-
	Kieselgel 60	H ₂ O:HCOOH:AcOH: AcOEt = 5:2:2:18;	0,91
Miricetină	Kieselgel 60	Metanol	-
		Cloroform	-
	Alumină	Metanol	-
	Kieselgel 60	H ₂ O:HCOOH:AcOH: AcOEt = 5:2:2:18;	0,71
Luteolina	Kieselgel 60	Metanol	0,73
		Cloroform	0,71
	Alumină	Metanol	0,68
	Kieselgel 60	H ₂ O:HCOOH:AcOH: AcOEt = 5:2:2:18;	-

Pentru identificarea cromatografică a flavonoidelor din extractele purificate de *Hydrangea paniculata* (extractele e_1 , E_4 , obținute conform paragrafelor II.2.2.1 și II.2.2.3) s-au folosit plăcuțe cu strat de Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck), iar pentru a obține o separare cât mai bună a componentilor s-a lucrat cu sisteme de solvenți cu polaritate diferită.

Sistemele de solvenți au fost următoarele :

-acid acetic : acid formic: acetat de etil: apă = 10:2:2:3

-acetat de etil : metanol : apă = 10:2:2

În tabelul 25 sunt date valorile R_f obținute pentru extractele purificate din frunze de *Hydrangea paniculata*.

Tabelul 24. Valorile R_f , pentru extractele propriu-zise

Extract	Faza staționară	Faza mobilă	R_f
Extract metanolic de <i>Hydrangea paniculata</i> (E_1)	Kieselgel 60	Metanol	$R_{f1} = 0.60$; $R_{f2} = 0.68$ $R_{f3} = 0.74$; $R_{f4} = 0.88$
	Alumină	Metanol	$R_{f1} = 0.66$; $R_{f2} = 0.75$ $R_{f3} = 0.88$
Extract metanolic de <i>Hydrangea paniculata</i> (E_2)	Kieselgel 60	Metanol	$R_{f1} = 0.58$; $R_{f2} = 0.68$ $R_{f3} = 0.74$; $R_{f4} = 0.88$
	Alumină	Metanol	$R_{f1} = 0.71$; $R_{f2} = 0.75$ $R_{f3} = 0.88$
Extract etanolic de <i>Hydrangea paniculata</i> (E_3)	Kieselgel 60	Metanol	$R_{f1} = 0.42$; $R_{f2} = 0.56$ $R_{f3} = 0.68$; $R_{f4} = 0.83$
	Kieselgel 60	Cloroform	$R_{f1} = 0.38$; $R_{f2} = 0.48$ $R_{f3} = 0.60$
	Alumină	Metanol	$R_{f1} = 0.69$; $R_{f2} = 0.86$
Extract etanolic de <i>Hydrangea paniculata</i> (E_4)	Kieselgel 60	Metanol	$R_{f1} = 0.38$; $R_{f2} = 0.56$ $R_{f3} = 0.60$; $R_{f4} = 0.82$
	Kieselgel 60	Cloroform	$R_{f1} = 0.52$; $R_{f2} = 0.58$ $R_{f3} = 0.83$
	Alumină	Metanol	$R_{f1} = 0.67$; $R_{f2} = 0.85$
Extract etanolic de <i>Hydrangea paniculata</i> (E_5)	Kieselgel 60	Metanol	$R_{f1} = 0.38$; $R_{f2} = 0.56$ $R_{f3} = 0.66$; $R_{f4} = 0.82$
	Alumină	Metanol	$R_{f1} = 0.75$; $R_{f2} = 0.88$
Extract etanolic de <i>Hydrangea paniculata</i> (E_6)	Kieselgel 60	Metanol	$R_{f1} = 0.55$; $R_{f2} = 0.60$ $R_{f3} = 0.66$; $R_{f4} = 0.70$ $R_{f5} = 0.83$
	Alumină	Metanol	$R_{f1} = 0.71$; $R_{f2} = 0.86$
Extract etanolic de <i>Hydrangea paniculata</i> (E_7)	Kieselgel 60	Metanol	$R_{f1} = 0.55$; $R_{f2} = 0.62$ $R_{f3} = 0.66$; $R_{f4} = 0.73$ $R_{f5} = 0.83$
	Kieselgel 60	Cloroform	$R_{f1} = 0.63$; $R_{f2} = 0.73$ $R_{f3} = 0.85$
	Alumină	Metanol	$R_{f1} = 0.73$; $R_{f2} = 0.88$
Extract metanolic de <i>Hydrangea paniculata</i> (E_8)	Kieselgel 60	Metanol	$R_{f1} = 0.54$; $R_{f2} = 0.68$ $R_{f3} = 0.74$; $R_{f4} = 0.88$
	Alumină	Metanol	$R_{f1} = 0.77$; $R_{f2} = 0.91$
Extract etanolic din fructe de <i>Ziziphus jujuba</i> (Z)	Kieselgel 60	$\text{CHCl}_3 : \text{AcOEt} = 9:1$;	$R_{f1} = 0,354$; $R_{f2} = 0,725$
		$\text{CHCl}_3 : \text{AcOEt} : \text{HCOOH} = 5:4:1$;	$R_f = 0,911$;
		$\text{AcOEt} : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 7,9:1,1:1$;	$R_f = 0,714$;
		$\text{H}_2\text{O} : \text{HCOOH} : \text{AcOH} : \text{AcOEt} = 5:2:2:18$;	$R_{f1} = 0,682$; $R_{f2} = 0,650$, $R_{f3} = 0,904$;

unde : E_1 , E_2 , E_3 , E_4 , E_5 , E_6 , E_7 , E_8 sunt extracte alcoolice din frunze de *Hydrangea paniculata* obținute conform procedurilor prezentate în paragrafele II.2.2.1 și II.2.2.3.

Tabelul 25. Valorile R_f pentru extractele purificate.

Extract	Sistem solvenți	R_f
Fr.5 din e ₁	H ₂ O:HCOOH:AcOH: AcOEt = 5:2:2:18	$R_{f1} = 0,21$; $R_{f2} = 0,47$; $R_{f3} = 0,52$ $R_{f4} = 0,60$;
Fr.12 din e ₁	H ₂ O:HCOOH:AcOH: AcOEt = 5:2:2:18	$R_{f1} = 0,50$; $R_{f2} = 0,41$; $R_{f3} = 0,60$
Fr.13 din e ₁	H ₂ O:HCOOH:AcOH: AcOEt = 5:2:2:18	-
Fr.14 din E ₄	H ₂ O:HCOOH:AcOH: AcOEt = 5:2:2:18	-
Fr.16 din E ₄	H ₂ O:HCOOH:AcOH: AcOEt = 5:2:2:18	$R_{f1} = 0,21$; $R_{f2} = 0,47$; $R_{f3} = 0,80$
Fr. 20 din e ₁	H ₂ O:HCOOH:AcOH: AcOEt = 5:2:2:18	$R_{f1} = 0,19$; $R_{f2} = 0,45$; $R_{f3} = 0,80$
Fr.22 din e ₁	H ₂ O:HCOOH:AcOH: AcOEt = 5:2:2:18	$R_{f1} = 0,21$; $R_{f2} = 0,80$
Fr.6 din E ₄	Metanol	$R_{f1} = 0,47$; $R_{f2} = 0,52$; $R_{f3} = 0,82$
Fr. 7 din E ₄	Metanol	$R_{f1} = 0,47$; $R_{f2} = 0,51$; $R_{f3} = 0,82$
Fr.14 din E ₄	Metanol	$R_{f1} = 0,45$; $R_{f2} = 0,53$; $R_{f3} = 0,60$
Fr. 15 din E ₄	Metanol	$R_{f1} = 0,41$; $R_{f2} = 0,57$; $R_{f3} = 0,60$
Fr. 16 din E ₈	Metanol	$R_{f1} = 0,41$; $R_{f2} = 0,53$; $R_{f3} = 0,60$

Pentru extractele eterice (de eter de petrol și eter etilic, obținute conform paragrafului II.2.2.3), s-a identificat prezenta lipidelor prin cromatografie în strat subțire [63]. S-au folosit plăcuțe cu strat de Kieselgel 60 F₂₅₄(Merck) și următorul sistem de solvenți:

-acetat de etil: metanol: apa = 10:1:5

Vizualizarea s-a realizat în atmosferă de iod. Fracțiunea lipidică unitară (un singur spot), apare sub forma de pete galbene pe fundal alb. Valorile R_f sunt redată în tabelul 26.

Tabelul 26. Valorile R_f pentru extractele eterice.

Nr.extractului	Sistem de solvenți	R_f
EP1	AcOEt:MeOH: H ₂ O=10:1:5	$R_{f1} = 0.11$; $R_{f2} = 0.53$; $R_{f3} = 0.94$
EP2	AcOEt:MeOH: H ₂ O=10:1:5	$R_{f1} = 0.60$; $R_{f2} = 0.85$
EP6	AcOEt:MeOH: H ₂ O=10:1:5	$R_{f1} = 0.91$; $R_{f2} = 0.96$
EE4	AcOEt:MeOH: H ₂ O=10:1:5	$R_{f1} = 0.94$; $R_{f2} = 0.98$
EES	AcOEt:MeOH: H ₂ O=10:1:5	$R_{f1} = 0.92$; $R_{f2} = 0.89$

Prin cromatografia în strat subțire s-au identificat flavonoidele sub forma de unu, două sau trei spoturi violete pe fond alb, prezentând R_f -uri crescătoare în funcție de numărul de substituenți. Astfel, quercetina, rutina și luteolina s-au identificat în extractele de *Hydrangea paniculata*, (R_f atribuite fiind: R_f quercetina = 0,6; R_f rutina = 0,8), iar flavonoidele rutina, kaemferolul și miricetina s-au identificat în extractul de *Ziziphus jujuba* (R_f kaemferol = 0,92; R_f miricetina = 0,7).

II.3.1.3. Identificarea resturilor flavonoidice prin spectroscopie IR

Un rol important în stabilirea caracteristicilor spectrale în IR ale flavonoidelor îl are gruparea carbonil.

S-au determinat cu ajutorul unui spectrometru Specord M-80 Carl Zeiss Yena, spectrele IR pentru extracte etanolice și metanolice din frunze de *Hydrangea paniculata* (E₁- E₈); pentru un extract apos din frunze de *Hydrangea paniculata*; pentru un extract etanolic din fructe de *Ziziphus jujuba* (ZJ) și pentru un extract

apos din fructe de *Ziziphus jujuba*. (Anexa 2- figurile I.1-I.8.) Atribuirea benzilor din spectrele IR, pentru extractele obținute sunt prezentate în tabelul 27.

Spectroscopia IR a evidențiat vibrații de valență $\nu_{C=O}$, prin benzi cuprinse între 1630 – 1665 cm^{-1} , benzi tipice scheletului flavonoidelor; vibrații de valență ν_{C-O} prin benzi cuprinse între 1000 - 1350 cm^{-1} , și vibrații de deformare în plan, δ_{C-H} prin benzi cuprinse între 600- 980 cm^{-1} .

Tabelul 27. Atribuirea benzilor din spectrele IR pentru extracte.

Extractul	Banda caracteristică (cm^{-1})	Atribuirea benzii
E₁	1660 1048, 916 684	$\nu_{C=O}$ ν_{C-O} δ_{C-H}
E₂	1662 1028 900	$\nu_{C=O}$ ν_{C-O} δ_{C-H}
E₃	1660 1080 628, 952	$\nu_{C=O}$ ν_{C-C} δ_{C-H}
E₄	1642 1096, 1000 624, 854	$\nu_{C=O}$ ν_{C-O} δ_{C-H}
E₅	1662 1100 630, 960	$\nu_{C=O}$ ν_{C-O} δ_{C-H}
E₆	1662 1090, 1070, 1050 680, 972	$\nu_{C=O}$ ν_{C-O} δ_{C-H}
E₇	1648, 1632 1092, 1070, 1050 678, 972	$\nu_{C=O}$ ν_{C-O} δ_{C-H}
E₈	1645 1096 630, 615	$\nu_{C=O}$ ν_{C-O} δ_{C-H}
Extract apos din frunze de <i>Hydrangea paniculata</i>	1640, 1652, 1660 1072 660, 624, 972	$\nu_{C=O}$ ν_{C-C} δ_{C-H}
Extract etanolic din fructe de <i>Ziziphus jujuba</i> (ZJ fru)	1632 1082, 616, 722, 900	$\nu_{C=O}$ ν_{C-O} δ_{C-H}
Extract apos din fructe de <i>Ziziphus jujuba</i>	1642 1084 728, 618	$\nu_{C=O}$ ν_{C-O} δ_{C-H}

unde :E₁-E₈ sunt extracte alcoolice din frunze de *Hydrangea paniculata*

Extractele alcoolice din frunze de *Hydrangea paniculata* au fost obținute conform procedurilor din II.2.1.1 și II.2.2.3, Extractul etanolic de *Ziziphus jujuba* (ZJ fru) a fost obținut conform metodei prezentate în paragraful II.2.2.1, iar cel apos conform procedurii descris în paragraful II.2.1.

Rezultate obținute constituie obiectul a două lucrări științifice [223,224].

II.3.1.4. Purificarea extractelor flavonoidice

II.3.1.4.1. Purificarea extractelor de *Hydrangea paniculata*

În cazul extractelor alcoolice, din culoarea ca și din spectrele UV-VIS ale extractelor de *Hydrangea paniculata* s-a evidențiat prezența în acestea a clorofilei ($\lambda_{\max} = 640$ nm) și a carotenilor ($\lambda_{\max} = 420$ nm). S-a încercat reținerea acestora pe coloane cu diverse umpluturi: Silicagel 60, alumină activată, Sephadex LH20 și apoi separarea fracțiunilor care conțin flavonoide. S-a ales pentru prelucrare un extract obținut prin extracția materialului vegetal cu metanol (e_1) și un extract obținut prin extracția materialului vegetal cu etanol (E_4), extracte obținute conform procedurii de la paragraful II.2.2.

În vederea determinării conținutului de flavonoide din extracte, în prealabil s-au trasat curbe de etalonare pentru rutină, quercetină, miricetină, luteolină și kaemferol.

Prepararea soluțiilor standard de flavonoide:

Compusul standard (0,1-1 mg) cântărit la balanța analitică cu precizie de $\pm 0,0001$ g a fost transferat într-un balon cotat de 10 mL și dizolvat cu metanol, obținându-se soluția stoc. Prin diluții succesive, din soluțiile standard s-au obținut soluții de concentrații diferite (0,0005 - 0,1 mg/mL) pe baza cărora s-au construit curbele de etalonare (după protocolul prezentat în paragraful II.4.1.4). S-au determinat ecuațiile de regresie și coeficienții de corelare, corespunzătoare curbelor de etalonare. Valorile coeficienților de corelare au fost între 0,9994 - 0,9996. Curbele de etalonare pentru rutină (1 mg/mL), quercetină (1,4 mg/mL), miricetină (0,12 mg/mL), kaemferol (0,15 mg/mL) și luteolină (0,10 mg/mL) sunt prezentate în Anexa 1 (figurile 1.1-1.5).

Pregătirea coloanei

S-a lucrat cu coloane de diverse dimensiuni, pentru:

1. Coloana cu Silicagel 60, cu $\phi = 2$ cm și $h = 20$ cm
2. Coloana cu alumină activată, cu $\phi = 2.5$ cm și $h = 20$ cm
3. Coloana cu Sephadex LH 20, cu $\phi = 1.5$ cm și $h = 35$ cm

Cantitățile de umplutură au fost: 20 g Silicagel 60; 15 g Alumină activată; 25 g Sephadex LH 20; suporturile de Silicagel și Sephadex LH20 au fost lăsate pentru gonflare în solvent într-un pahar Berzelius, iar după 2 ore, suportul s-a introdus în coloană cu ajutorul unei pâlnii, cu grijă pentru a nu se forma bule de aer.

Modul de lucru:

a) 30 mL din extractul e_1 (extract metanolic din frunze de *Hydrangea paniculata* obținut conform paragrafului II.2.2) s-a purificat prin trecere pe coloană de Silicagel 60. Eluarea s-a făcut cu eluent MeOH. S-au cules 20 fracțiuni de 5 mL. Pentru fiecare fracțiune culeasă din eluatul coloanei s-a trasat spectrul UV-VIS pentru identificarea compușilor flavonoidici (240-280 nm, 300-390 nm), a carotenilor (410-500 nm), respectiv a clorofilei (640-690 nm).

Deoarece culoarea eluentului din coloană ca și spectrele UV-VIS au arătat că această purificare nu a permis separarea dorită, dozarea flavonoidelor s-a făcut

pentru fracțiunile 6-9 și 12-17 (cea ce a reprezentat de fapt volumele 30-45 și 60-85 mL din eluat).

În urma purificării extractului metanolic din frunze de *Hydrangea paniculata* (figura 5) flavonoidele au fost identificate începând cu fracțiunea 6 (30 mL). Astfel, rutina, a fost identificată în urme în fracțiunile 6-9, atinge un maxim în fracțiunea 8 (40 mL), după care se remarcă o scădere lentă până la fracțiunea 9, iar începând cu fracțiunea 10, rutina nu a mai fost prezentă în eluat. Quercetina a fost identificată în fracțiunile 12-17, concentrația cea mai mare identificându-se în fracțiunea 14 (70 mL).

Concentrațiile flavonoidelor în fracțiunile reprezentative, obținute ca urmare a purificării extractului este prezentată în tabelul 28.

Tabelul 28. Concentrația flavonoidelor în fracțiunile purificate a extractului e_1 din frunze de *Hydrangea paniculata* (Hp frz).

	Flavonoidul	Nr fracțiune din coloană	A *	Concentrația mg flavonoid /mL eluat	mg flavonoid/ 5 mL fracțiune
Extract de <i>Hydrangea paniculata</i> (Hp frz) (e_1)	Rutină (R)	6	0,1658	0,0562	0,2810
		7	0,1968	0,1001	0,5005
		8	0,9403	0,1523	0,7615
		9	0,1870	0,0862	0,4310
	Quercetina (Q)	12	0,1694	0,0620	0,3100
		13	0,2307	0,1802	0,9010
		14	0,2654	0,2470	1,2350
		15	0,2387	0,1955	0,9775
		16	0,1710	0,0651	0,3255
		17	0,1524	0,0292	0,1460

*Absorbanța (A) la lungimile de undă $\lambda = 264$ nm (Rutina), 375 nm (Quercetina)

Conținutul de flavonoide din fracțiunile purificate este:

$$\Sigma \text{mg Rutină în fr.6 + fr. 7 + fr.8 + fr.9 =}$$

$$= 0,2810 + 0,5005 + 0,7615 + 0,4310 = 1,974 \text{ mg în 20 mL eluat}$$

Prin reunirea lor s-a obținut un concentrat ce conține 0,0987 mg rutină/ mL eluat.

$$\Sigma \text{mg Quercetină în fr.12 + fr. 13 + fr.14 + fr.15 + fr. 16 + fr. 17 =}$$

$$= 0,3100 + 0,9010 + 1,2350 + 0,9775 + 0,3255 + 0,1460$$

$$= 3,895 \text{ mg în 30 mL eluat}$$

Prin reunirea lor s-a obținut un concentrat ce conține 0,1298 mg quercetină/ mL eluat.

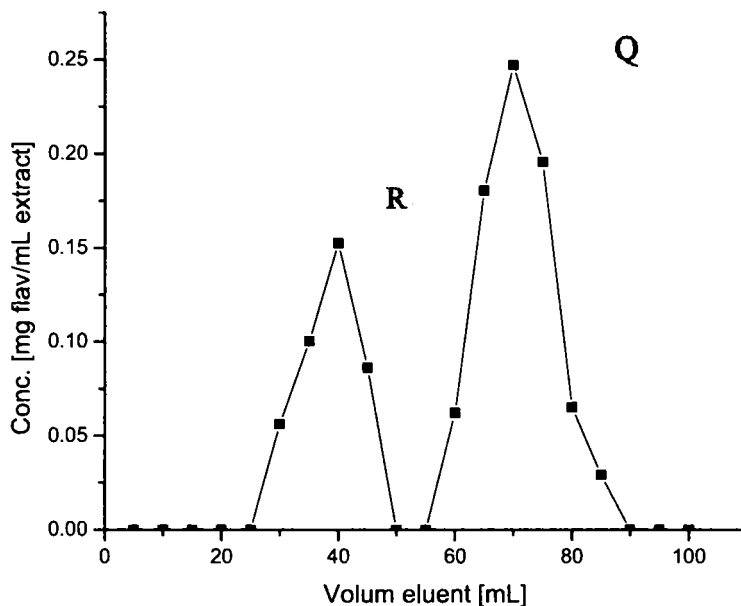


Figura 5. Reprezentarea grafică a fracțiilor separate prin cromatografie pe coloană în cazul purificării pe Silicagel 60, a extractului e_1 din frunze de *Hydrangea paniculata*.

b). O altă parte din extractul e_1 (40 mL) a fost purificat prin trecere pe coloană de alumina activată în vederea îndepărtării clorofilei. Eluarea s-a realizat cu eter de petrol. S-au cules 10 fracțiuni de 5 mL. Fracțiunile au fost analizate în prealabil prin spectroscopie UV și cromatografie în strat subțire pentru identificarea prezenței flavonoidelor.

În extractul metanolic purificat din frunze de *Hydrangea paniculata* (figura 6) flavonoidele au fost identificate începând cu fracțiunea 6 (30 mL). Rutina e prezentă în cantități foarte mici în fracțiunile 6-7, atinge un maxim în fracțiunea 8 (40 mL), după care se remarcă o scădere bruscă în fracțiunea 9, iar începând cu fracțiunea 10, rutina nu a mai fost prezentă în eluat.

Deși datele din literatură indică folosirea aluminei pentru reținerea clorofilei, în cazul extractelor de *Hydrangea* nu a dat rezultate. Din același motiv prezența rutinei s-a urmărit doar pentru câteva fracțiuni. Conținutul de rutină din fracțiunile purificate este redat în tabelul 29.

Conținutul de flavonoide din fracțiunile purificate este:

$$\Sigma \text{mg Rutină în fr.6 + fr. 7 + fr.8 + fr.9 =}$$

$$= 0,0415 + 0,5400 + 0,1000 + 0,0135 = 0,695 \text{ mg în } 20 \text{ mL eluat}$$

Prin reunirea lor s-a obținut un concentrat ce conține 0,0347 mg rutină/ mL eluat.

Tabelul 29. Concentrația flavonoidelor în fracțiunile extractului e_1 din frunze de *Hydrangea paniculata*, purificat pe alumină.

Extract de <i>Hydrangea paniculata</i> (e_1)	Flavonoidul	Nr fracțiune din coloană	A *	Concentrația mg flavonoid /mL eluat	mg flavonoid/ 5 mL fracțiune
	Rutina (R)	6	0,1320	0,0083	0,0415
		7	0,1338	0,0108	0,5400
		8	0,1403	0,0200	0,1000
		9	0,1280	0,0027	0,0135

*Absorbanta (A) la lungimile de undă $\lambda = 264$ nm (Rutina)

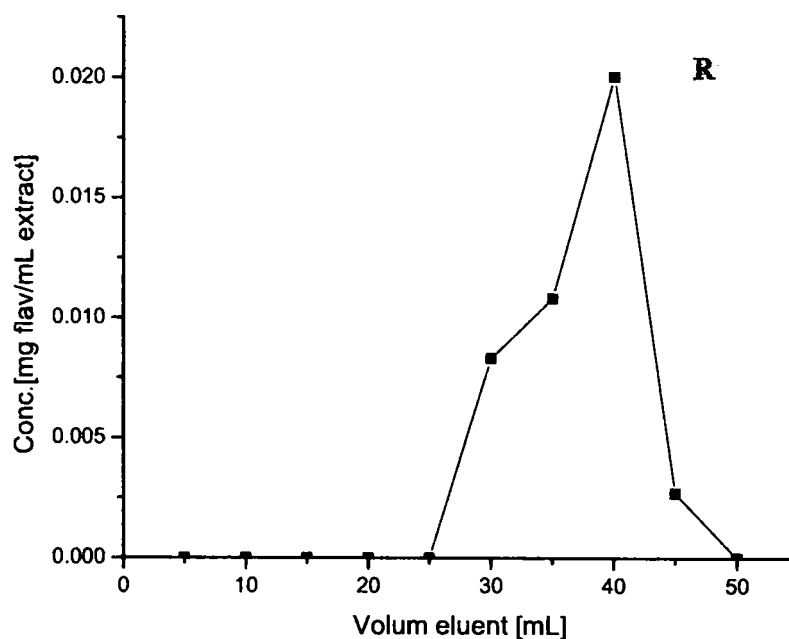


Figura 6. Reprezentarea grafică a fracțiunilor separate prin cromatografie pe coloană în cazul purificării pe alumină, a extractului e_1 din frunze de *Hydrangea paniculata*.

c). În încercarea de reținere pe coloană a clorofilei și a carotenoizilor, pentru purificarea extractului e_1 , în final s-a folosit un suport mai polar, Sephadex LH 20.

Mod de lucru:

50 mL din extractul e_1 a fost purificat pe Sephadex LH-20, folosind ca eluent MeOH. S-au cules 40 de fracțiuni de 5 mL. Frațiunile au fost verificate în prealabil prin cromatografie în stat subțire și prin spectroscopie UV în vederea identificării flavonoidelor

În urma purificării extractului metanolic din frunze de *Hydrangea paniculata* (figura 7) flavonoidele au fost identificate începând cu fracțiunea 5 (25 mL). Rutina a fost identificată în fracțiunile 5-12, atinge un maxim în fracțiunea 10 (50 mL), după care se remarcă o scădere în fracțiunea 12, iar începând cu fracțiunea 13, rutina nu a mai fost prezentă în eluat. Quercetina a fost identificată în fracțiunile 15-35, concentrația cea mai mare identificându-se în fracțiunea 20 (100 mL).

Conținutul de flavonoide din fracțiunile purificate este:

$$\begin{aligned} \Sigma \text{mg Rutină în fr. 5 - 12} &= 0,3077 + 0,6851 + 1,0080 + 1,2580 + 0,9800 + \\ &0,6120 + 0,1871 + 0,0821 \\ &= 5,1200 \text{ mg în } 40 \text{ mL eluat} \end{aligned}$$

Prin reunirea lor s-a obținut un concentrat ce conține 0,1280 mg rutină/ mL eluat.

$$\begin{aligned} \Sigma \text{mg Quercetină în fr. 17-30} &= 2,1258 + 2,4300 + 2,6510 + 3,0051 + \\ &2,8120 + 2,3120 + 2,0121 + 2,0008 + 1,8218 + 1,6521 + 1,4851 + 1,2580 + \\ &1,2021 + 1,1081 = 27,8700 \text{ mg quercetină în } 70 \text{ mL eluat} \end{aligned}$$

Prin reunirea lor s-a obținut un concentrat ce conține 0,3982 mg quercetină / mL eluat.

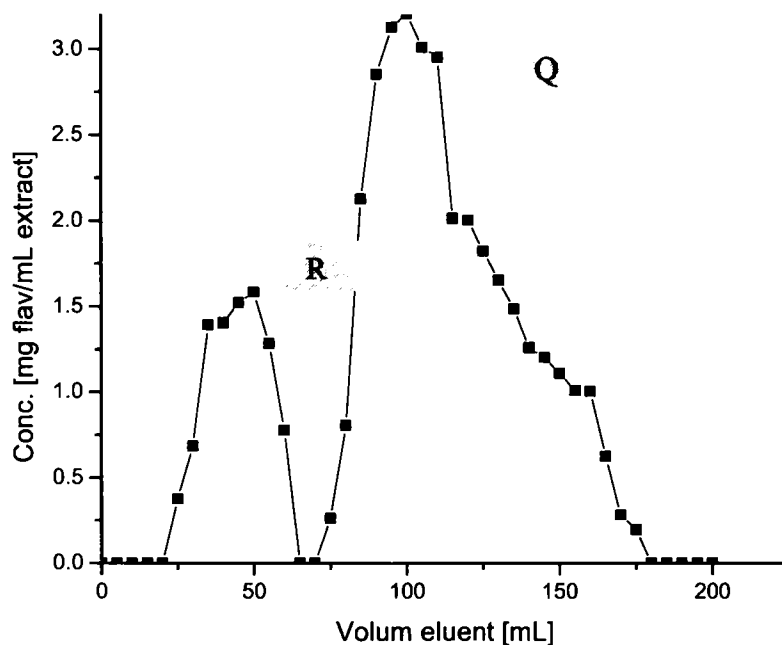


Figura 7. Reprezentarea grafică a fracțiunilor separate prin cromatografie pe coloană în cazul purificării pe Sephadex LH-20, a extractului e_1 din frunze de *Hydrangea paniculata*.

Tabelul 30. Concentrația flavonoidelor în fracțiunile extractului e₁ din frunze de *Hydrangea paniculata*, purificat pe Sephadex LH-20.

	Flavonoidul	Nr fracțiune din coloană	A *	Concentrația	
				mg flavonoid /mL eluat	mg flavonoid/ 5 mL fracțiune
Extract de <i>Hydrangea paniculata</i> (e ₁)	Rutina (R)	5	0,1696	0,0615	0,3077
		6	0,2231	0,1372	0,6851
		7	0,2686	0,2016	1,0080
		8	0,3039	0,2516	1,2580
		9	0,2126	0,1224	0,9800
		10	0,2646	0,1960	0,6120
		11	0,1525	0,0374	0,1871
		12	0,1377	0,0164	0,0821
	Quercetina (Q)	15	0,1644	0,0524	0,2621
		16	0,2208	0,1610	0,8051
		17	0,3577	0,4251	2,1258
		18	0,3893	0,4860	2,4300
		19	0,4123	0,5302	2,6510
		20	0,4490	0,6010	3,0051
		21	0,4290	0,5624	2,8120
		22	0,3771	0,4624	2,3120
		23	0,3460	0,4024	2,0121
		24	0,3448	0,4001	2,0008
		25	0,3262	0,3643	1,8218
		26	0,3086	0,3304	1,6521
		27	0,2913	0,2970	1,4851
		28	0,2678	0,2516	1,2580
		29	0,2619	0,2404	1,2021
		30	0,2522	0,2216	1,1081
		31	0,2679	0,2519	1,0076
		32	0,2415	0,2010	1,0050
		33	0,2019	0,1246	0,6231
		34	0,1665	0,0564	0,2820
		35	0,1625	0,0487	0,1950

*Absorbanța (A) la lungimile de undă $\lambda = 264$ nm (Rutina), 375 nm (Quercetina)

d). 30 mL din extractul E₄ (extract etanolic din frunze de *Hydrangea paniculata*, obținut conform paragrafului II.2.2.) a fost purificat pe Sephadex LH-20, folosind ca eluent MeOH. S-au cules 22 fracțiuni de 5 mL. Fracțiunile au fost verificate în prealabil prin cromatografie în strat subțire și spectroscopie UV în vederea identificării flavonoidelor.

În urma purificării extractului metanolic din frunze de *Hydrangea paniculata* (figura 8) flavonoidele au fost identificate începând cu fracțiunea 6 (30 mL). Rutina a fost identificată în fracțiunile 5-8, atinge un maxim în fracțiunea 7 (35 mL), după care se remarcă o scădere bruscă în fracțiunea 8, iar începând cu fracțiunea 9, rutina nu a mai fost prezentă în eluat. Quercetina a fost identificată în fracțiunile 12-18, concentrația cea mai mare identificându-se în fracțiunea 15 (75 mL).

Tabelul 31. Concentrația flavonoidelor în fracțiunile extractului E₄ din frunze de *Hydrangea paniculata*, purificat pe Sephadex LH-20.

	Flavonoidul	Nr fracțiune din coloană	A *	Concentrația mg flavonoid /mL eluat	mg flavonoid/ 5 mL fracțiune
Extract de <i>Hydrangea paniculata</i> (E ₄)	Rutina (R)	5	0,1374	0,0160	0,0800
		6	0,1417	0,0220	0,1100
		7	0,1480	0,0310	0,1550
		8	0,1339	0,0110	0,0550
	Quercetina (Q)	12	0,3660	0,4410	2,2050
		13	0,5294	0,7560	3,7800
		14	0,6601	1,0080	5,0400
		15	0,7898	1,2580	6,2900
		16	0,6689	1,0251	5,1255
		17	0,4547	0,6120	3,0600
		18	0,4070	0,5200	2,6000

*Absorbanța (A) la lungimile de undă $\lambda = 264$ nm (Rutina), 375 nm (Quercetina)

Conținutul de flavonoide din fracțiunile purificate este:

$$\begin{aligned} \Sigma \text{mg Rutină în fr.5 + fr.6 + fr.7 + fr.8} &= 0,0800 + 0,1100 + 0,1550 + \\ &0,0550 = \\ &= 0,4 \text{ mg în } 20 \text{ mL eluat} \end{aligned}$$

Prin reunirea lor s-a obținut un concentrat ce conține 0,020 mg rutină/ mL eluat.

$$\begin{aligned} \Sigma \text{mg Quercetină în fr. 12- fr. 18} &= 2,2050 + 3,7800 + 5,0400 + 6,2900 + \\ &5,1255 + 3,0600 + 2,6000 = \\ &= 28,1005 \text{ mg în } 35 \text{ mL eluat} \end{aligned}$$

Prin reunirea lor s-a obținut un concentrat ce conține 0,8028 mg quercetină / mL eluat.

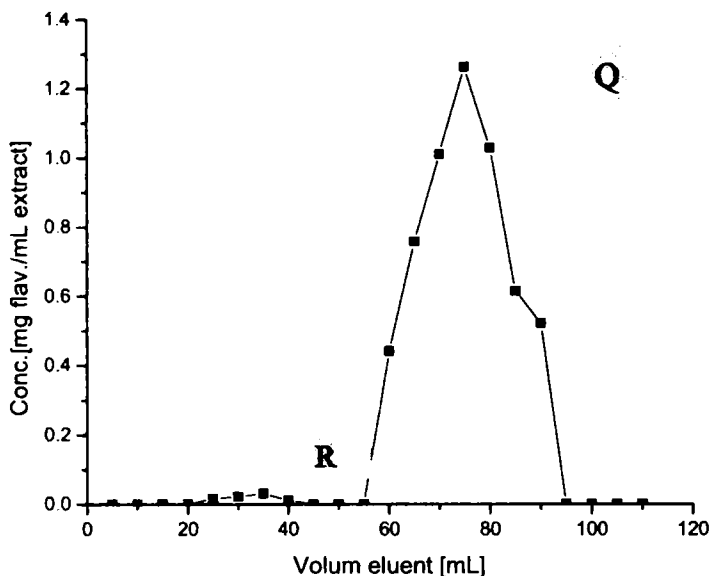


Figura 8. Reprezentarea grafică a fracțiunilor separate prin cromatografie pe coloană în cazul purificării pe Sephadex LH-20, a extractului E₄ din frunze de *Hydrangea paniculata*

II.3.1.4.2. Purificarea unui extract din frunze de *Hydrangea aspera* (Ha)

S-a urmărit purificarea unui extract metanolic din frunze de *Hydrangea aspera* pe coloană cu Sephadex LH-20, în vederea identificării flavonoidelor. Extractul a fost obținut prin extracția continuă (Soxhlet) conform paragrafului II.2.2.3.

Pe coloană a fost introdus un volum de 20 mL extract, după care acesta a fost eluat cu metanol. S-au colectat 20 fracțiuni de câte 5 mL. Fiecărei fracțiuni i s-a determinat conținutul în flavonoide prin trasarea spectrului UV-VIS.

În urma trecerii extractului metanolic din frunze de *Hydrangea aspera* pe coloana cu Sephadex LH 20 (figura 9) flavonoidele au fost identificate începând cu fracțiunea 6 (30 mL). Flavonoidul - rutină a fost identificat în fracțiunile 6-17, concentrația cea mai mare identificându-se în fracțiunea 11, după care concentrația a scăzut până la fracțiunea 17, iar din fracțiunea 18, rutina nu a mai fost prezentă în eluat.

Conținutul de flavonoide din fracțiunile purificate este:

$$\begin{aligned} \Sigma \text{mg Rutina în fr. 6- fr. 17} &= 1,3560 + 2,8605 + 4,2100 + 6,2715 + 7,6150 \\ &+ 7,9210 + 6,7250 + 6,6330 + 6,1595 + 4,3655 + 2,6605 + 1,3875 = \\ &= 58,165 \text{ mg în } 60 \text{ mL eluat} \end{aligned}$$

Prin reunirea lor s-a obținut un concentrat ce conține 0,9694 mg rutină/ mL eluat.

Tabelul 32. Concentrația flavonoidelor în fracțiunile extractului de *Hydrangea aspera*, purificat pe Sephadex LH-20.

	Flavonoidul	Nr. fracțiune din coloană	A *	Concentrația mg flavonoid /mL eluat	mg flavonoid/ 5 mL fracțiune
Extract de <i>Hydrangea aspera</i> (Ha)	Rutina (R)	6	0,3177	0,2712	1,3560
		7	0,5303	0,5721	2,8605
		8	0,7211	0,8420	4,2100
		9	1,0124	1,2543	6,2715
		10	1,2022	1,5230	7,6150
		11	1,2455	1,5842	7,9210
		12	1,0765	1,3450	6,7250
		13	1,0635	1,3266	6,6330
		14	0,9965	1,2319	6,1595
		15	0,7430	0,8731	4,3655
		16	0,5021	0,5321	2,6605
		17	0,3222	0,2775	1,3875

*Absorbanța (A) la lungimea de undă $\lambda=264$ nm (Rutina)

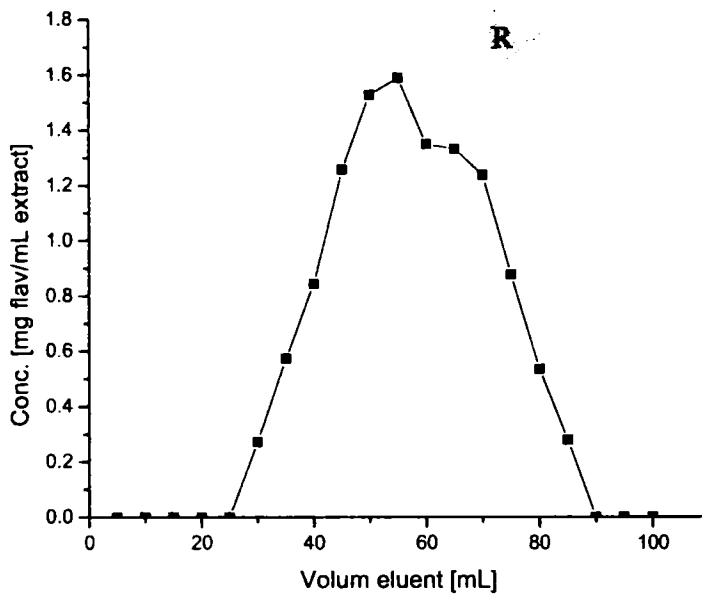


Figura 9. Reprezentarea grafică a fracțiilor separate prin cromatografie pe coloană în cazul purificării pe Sephadex LH-20, a extractului E₄ din frunze de *Hydrangea aspera*.

II.3.1.4.3. Purificarea pe coloană Sephadex LH-20 a unui extract din fructe de *Ziziphus jujuba*

Extractul a fost obținut conform procedurii descris la paragraful II.2.2.

În vederea purificării s-a utilizat o coloană de sticlă cu Sephadex LH20 cu dimensiunile 1,5 x 35 cm.

Pregătirea coloanei s-a realizat ca în cazul de la paragraful II.3.1.4.

Mod de lucru :

Pe coloană s-au introdus 50 mL extract concentrat, iar eluarea s-a realizat cu metanol 94%. S-au colectat 25 de fracțiuni de câte 10 mL. Fiecărei fracțiuni obținute prin eluarea de pe coloana cu Sephadex LH-20 i s-a determinat conținutul de flavonoide prin trasarea spectrului UV-VIS.

Flavonoidele au fost identificate din fracțiunea 7, astfel: miricetina a fost identificată în fracțiunile 7, 8 și 9, kaemferolul în fracțiunile 12 - 17 și rutina în fracțiunile 20-23. În extract nu a fost identificată quercetina.

Tabelul 33. Concentrația flavonoidelor în fracțiunile extractului din fructe de *Ziziphus jujuba*, purificat pe Sephadex LH-20.

	Flavonoidul	Nr fracțiune din coloană	A *	Concentrația mg flavonoid /mL eluat	mg flavonoid/ 10 mL fracțiune
Extract de <i>Ziziphus jujuba</i> (Z) fru)	Miricetina (M)	7	0,0191	0,0142	0,1420
		8	0,0230	0,0285	0,2850
		9	0,0207	0,0201	0,2010
	Kaemferol (K)	12	0,1473	0,0102	0,1020
		13	0,1735	0,1300	1,3000
		14	0,1741	0,1328	1,3280
		15	0,1462	0,0052	0,0520
		16	0,1459	0,0041	0,0410
		17	0,1453	0,0010	0,0100
		Rutina (R)	20	0,1542	0,0398
	21		0,2710	0,2052	2,0520
	22		0,3520	0,3198	3,1980
	23		0,1526	0,0376	0,3760

*Absorbanța (A) la lungimile de undă: $\lambda = 264$ nm (Rutina), 269 nm (Kaemferol), 375 nm (Quercetina), 378 nm (Miricetina)

Conținutul de flavonoide din fracțiunile purificate este:

$$\begin{aligned} \Sigma \text{mg Miricetina în fr.7- fr. 9} &= 0,142 + 0,285 + 0,201 \\ &= 0,628 \text{ mg în } 30 \text{ mL eluat} \end{aligned}$$

Prin reunirea lor s-a obținut un concentrat ce conține 0,0209 mg miricetină / mL eluat.

$$\begin{aligned} \Sigma \text{mg Kaemferol în fr.12 - fr.16} &= 0,102 + 1,300 + 1,328 + 0,052 + 0,041 \\ &= 2,833 \text{ mg în } 50 \text{ mL eluat} \end{aligned}$$

Prin reunirea lor s-a obținut un concentrat ce conține 0,0566 mg kaemferol / mL eluat.

$$\begin{aligned} \Sigma \text{mg Rutina în fr.20 - fr. 23} &= 0,398 + 2,0520 + 3,1980 + 0,3760 = \\ &= 6,024 \text{ mg în } 40 \text{ mL eluat} \end{aligned}$$

Prin reunirea lor s-a obținut un concentrat ce conține 0,1506 mg rutină / mL eluat.

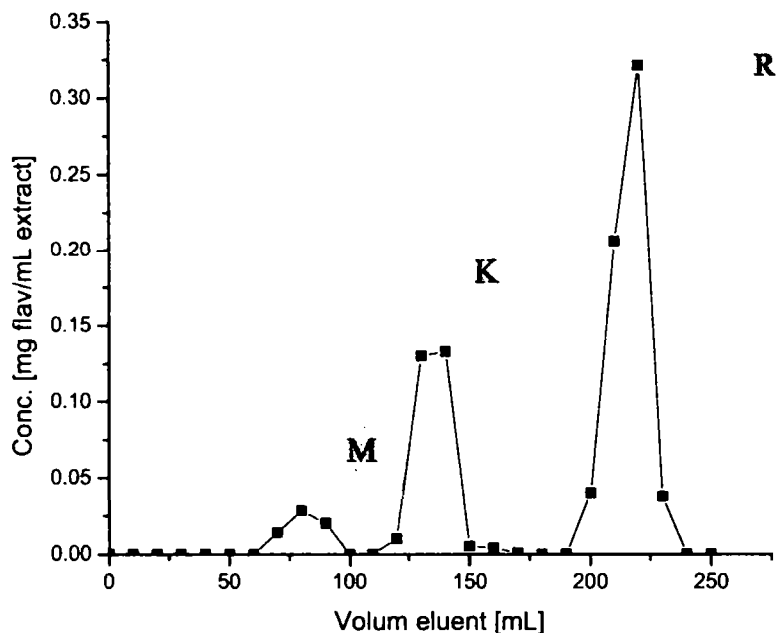


Figura 10. Reprezentarea grafică a fracțiunilor separate prin cromatografie pe coloană în cazul purificării pe Sephadex LH-20, a extractului din fructe de *Ziziphus jujuba*

II.3.1.4.4. Purificarea extractelor de *Hydrangea paniculata* și *Ziziphus jujuba* prin flash cromatografie

În vederea purificării extractelor de *Hydrangea paniculata* și *Ziziphus jujuba* s-a utilizat și tehnica flash cromatografică. Din extractele concentrate obținute conform paragrafului II.2.2., s-au luat volume de 30 mL în cazul extractului de *Hydrangea paniculata*, respectiv de 20 mL în cazul extractului de *Ziziphus jujuba* și au fost filtrate prin membrane filtrante PTFE având mărimea porilor 0,45 μm .

Filtratul obținut a fost trecut pe coloana ISOLUTE Flash Si II condiționată prin eluare cu metanol p.a. și apoi prin celula de flux Hellma. Condițiile de eluare au fost: debit de 2 mL/min, presiune de 200 mbar, iar fază mobilă utilizată, metanol:apă (acidulată) cu 2% acid fosforic în raport 50:50. Detecția flavonoidelor s-a efectuat prin spectrofotometrie de UV-VIS la lungimea de undă 264 nm pentru rutină, 269 nm pentru kaemferol, 375 nm pentru quercetină și 378 nm pentru miricetină. S-au colectat un număr de 20 fracțiuni a câte 5,0 mL în cazul extractului de hydrangea, respectiv 25 fracțiuni a câte 10 mL în cazul extractului de jujuba.

În urma purificării extractului metanolic din frunze de *Hydrangea paniculata* (figura 11) flavonoidele au fost identificate începând cu fracțiunea 5 (25 mL). Astfel, rutina a fost identificată în urme în fracțiunile 5, 6, 7, atinge un maxim în fracțiunea 8 (40 mL), după care se remarcă o scădere lentă până la fracțiunea 12, iar începând cu fracțiunea 13, rutina nu a mai fost prezentă în eluat. Quercetina a fost

identificată în fracțiunile 16-18, concentrația cea mai mare identificându-se în fracțiunea 17 (85mL).

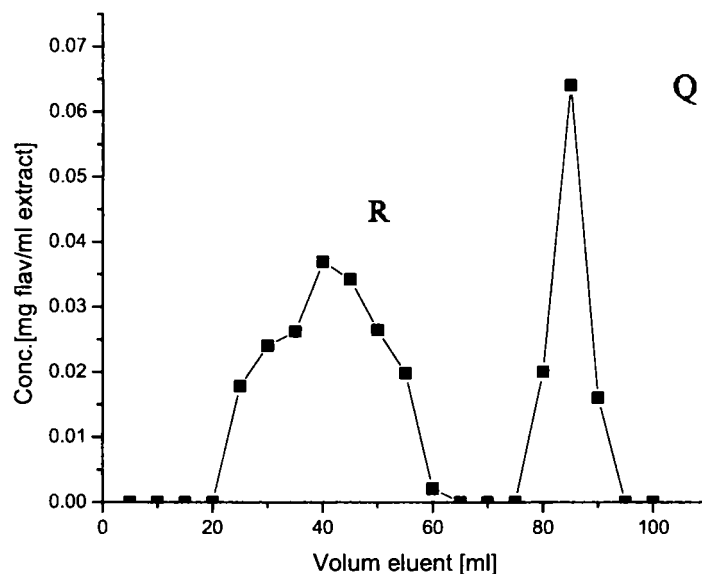


Figura 11. Reprezentarea grafică a fracțiilor separate prin flash cromatografie în cazul purificării extractului din frunze de *Hydrangea paniculata*

Ca urmare a purificării extractului de *Ziziphus jujuba*, flavonoidele au fost identificate din fracțiunea 7 (70 mL) (figura 12), astfel: miricetina a fost identificată în fracțiunile 7 și 8; kaemferolul a fost identificat în urme în fracțiunea 12 (120 mL), atinge un maxim în fracțiunea 14 (140 mL), după care se remarcă o scădere bruscă până la fracțiunea 16; iar rutina a fost identificată în fracțiunile 19-22, concentrația cea mai mare identificându-se în fracțiunea 21 (210 mL).

Concentrațiile flavonoidelor în fracțiunile reprezentative, obținute ca urmare a purificării extractelor prin flash cromatografie sunt prezentate în tabelul 34.

-Pentru extractul de *Hydrangea paniculata*, conținutul de flavonoide este:

$$\begin{aligned} \Sigma \text{mg Rutină în fr.5 + fr.6 + fr.7 + fr.8} &= 0,5125 + 0,5425 + 0,5605 + \\ &1,1500 = \\ &= 2,7655 \text{ mg în } 20 \text{ mL eluat} \end{aligned}$$

Prin reunirea lor se obține un concentrat ce conține 0,1382 mg rutină / mL eluat.

$$\begin{aligned} \Sigma \text{mg Quercetină în fr. 16- fr. 18} &= 2,5100 + 0,2595 + 2,4725 \\ &= 5,2420 \text{ mg în } 15 \text{ mL eluat} \end{aligned}$$

Prin reunirea lor se obține un concentrat ce conține 0,3494 mg quercetină / mL eluat.

- Pentru extractul de *Ziziphus jujuba*, conținutul de flavonoide este:

Σ mg Miricetina în fr.7 + fr. 8 = 0,282 + 2,630 = 0,694 mg în 20 mL eluat
Prin reunirea lor se obține un concentrat ce conține 0,0347 mg miricetină /

mL eluat.

Σ mg Kaemferol în fr.12 - fr.17 = 0,111 + 1,321 + 1,348 + 0,091 + 0,011 =
= 2,882 mg în 50 mL eluat

Prin reunirea lor se obține un concentrat ce conține 0,057 mg kaemferol / mL eluat.

Σ mg Rutina în fr.19 - fr. 22 = 0,408 + 2,085 + 3,210 + 0,386 =
= 6,089 mg în 40 mL eluat

Prin reunirea lor se obține un concentrat ce conține 0,152 mg rutină / mL eluat.

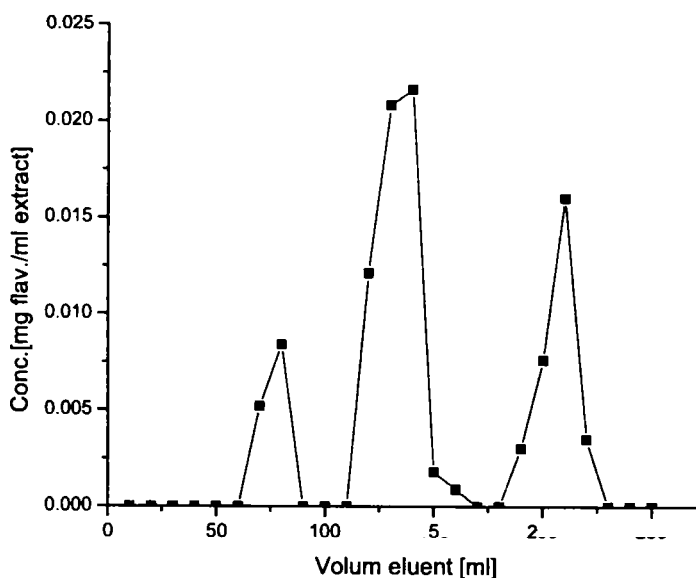


Figura 12. Reprezentarea grafică a fracțiunilor separate prin flash cromatografie în cazul purificării extractului din fructe de *Ziziphus jujuba*

Tabelul 34. Concentrația flavonoidelor în fracțiunile purificate a extractelor de *Hydrangea paniculata*, respectiv *Ziziphus jujuba* prin flash cromatografie.

Extract de <i>Hydrangea paniculata</i> (e ₁)	Flavonoidul	Nr fracțiune din coloană	A *	Concentrația mg flavonoid /mL eluat	mg flavonoid/ 5 mL fracțiune		
	Rutină (R)		5	0,1985	0,1025	0,5125	
6			0,2028	0,1085	0,5425		
7			0,2053	0,1121	0,5605		
8			0,2886	0,2300	1,1500		
9			0,2519	0,1780	0,8900		
10			0,2054	0,1122	0,5610		
11			0,2024	0,1080	0,5400		
12			0,1390	0,0182	0,0910		
Quercetina (Q)				16	0,5020	1,3052	2,5100
				17	1,0519	2,8241	0,2595
	18	0,4945		1,2845	2,4725		
Extract de <i>Ziziphus jujuba</i> (ZJ fru)	Flavonoidul	Nr fracțiune din coloană	A *	Concentrația mg flavonoid /mL eluat	mg flavonoid/ 10 mL fracțiune		
	Miricetina (M)	7	0,0229	0,0282	0,2820		
		8	0,0263	0,0412	0,4120		
	Kaemferol (K)	12	0,1475	0,0111	0,1110		
		13	0,1739	0,1321	1,3210		
		14	0,1745	0,1348	1,3480		
		15	0,1470	0,0091	0,0910		
		16	0,1453	0,0011	0,0110		
	Rutina (R)	19	0,1549	0,0408	0,4080		
		20	0,2734	0,2085	2,0850		
		21	0,3529	0,3210	3,2100		
		22	0,1534	0,0386	0,3860		

*Absorbanta (A) la lungimile de undă: $\lambda = 264$ nm (Rutina), 269 nm (Kaemferol), 375 nm (Quercetina), 378 nm (Miricetina)

Conținutul de rutină și quercetină din extractul metanolic din frunze de *Hydrangea paniculata* (e₁) purificat pe diverse suporturi a fost:

- în cazul separării pe Silicagel 60: 0,0987 mg / mL eluat și 0,1298 mg quercetină /mL eluat
- în cazul separării pe alumină activată: 0,0347 mg rutină / mL eluat
- în cazul separării pe Sephadex LH-20: 0,1280 mg rutină/mL eluat și 0,3982 mg quercetină / mL eluat

Deoarece conținutul cel mai mare de flavonoide a fost obținut prin purificarea extractului pe suport de Sephadex LH-20, se poate concluziona că acest suport este foarte bun pentru separarea compușilor flavonoidici din extracte, motiv pentru care suportul a fost folosit și pentru purificarea unui extract metanolic din frunze de *Hydrangea aspera* și a unui extract metanolic din fructe de *Ziziphus jujuba*.

De asemenea s-a realizat și purificarea unor extracte metanolice din frunze de *Hydrangea paniculata* și din fructe de *Ziziphus jujuba* utilizând tehnica flash cromatografică pentru a verifica eficiența separării prin cromatografia pe coloană.

Rezultatele obținute au fost apropiate cu cele obținute prin cromatografia pe coloană, aceasta fiind și o metodă de verificare a eficienței coloanei utilizate pentru separarea pe coloană a flavonoidelor din extracte.

II.3.1.5. Identificarea și dozarea flavonoidelor prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC)

După cum s-a putut observa și din analiza în UV a extractelor de *Hydrangea paniculata*, rutina și quercetina au fost prezente atât în extractele propriu-zise cât și în cele purificate, iar luteolina numai în unele extractele metanolice. În cazul extractelor de *Ziziphus jujuba*, au fost identificate alături de rutină și flavonoidele miricetină și kaemferol.

Standardele utilizate au fost cele folosite la trasarea curbelor de etalonare:

- quercetina, reactiv Sigma, minim 96%;
- quercetin-3β-D- rutozida (rutina), reactiv Sigma, minim 95%
- kaemferol, reactiv Sigma, minim 90%.
- miricetina, reactiv Sigma, aprox. 85%.
- luteolina, reactiv Sigma, aprox. 85%.

S-au realizat cromatogramele HPLC pentru :

- extractele E₁, E₂, E₃, E₄, E₅, E₇, E₈ din frunze de *Hydrangea paniculata* folosind ca standard quercetina și quercetin-3β -D-rutinozida (rutina), (Anexa 3- figurile 1A-7A)
- extractele e₁, e₂, e₃ din frunze de *Hydrangea paniculata*, utilizând ca standard quercetina, quercetin-3β -D-rutinozida (rutina) și luteolina. (Anexa 3, figurile 1B-3B)
- extractele EZ1, EZ2 din fructe de *Ziziphus jujuba* utilizând ca standard miricetina, kaemferolul și rutina. (Anexa 3, figurile 1C- 2C)
- pentru fracțiunile 7, 8, 9, 10, 11, 12 din extractul e₁ purificat pe Sephadex LH-20. (Anexa 4 -figurile 4.1. - 4.6)

Aparatura:

HPLC Agilent 1100 cu pompa binară și degazor sub vid, coloana Nucleosil C18, 5 μm, 4x125 mm, detector UV cu lungime de undă variabilă, soft HPChemStation;

Condițiile de lucru au fost diferite atât funcție de tipul de coloană cât și în privința fazei mobile.

a). Pentru analiza extractelor propriu-zise din funze de *Hydrangea paniculata*, (E_1 - E_8 , și e_1 , e_2 , e_3) și extractele EZ1, și EZ2 din fructe de *Ziziphus jujuba*, condițiile de lucru au fost:

- coloană Nucleosil RP C18, 150 x 4,6 mm, 5 μ m
- volumul de injectare: 20 μ L
- debit: 1,5 mL/min
- temperatura coloanei: 25°C
- faza mobilă
A: apa bidistilată:H₃PO₄ =98:2 (pH=2,5); B: acetomitril
- eluarea s-a realizat după metoda gradientului liniar în următoarele condiții:
Start: 50% A, 50% B
80% B după 12 min, iar după 15 min, compoziția eluentului a fost schimbată la 50% B până la sfârșitul analizei (20 min)
- detecție λ = 280 nm

Timpii de retenție și concentrațiile flavonoidelor în extracte sunt prezentate în tabelele 35 și 36.

Tabelul 35. Timpii de retenție și concentrațiile flavonoidelor în extractele propriu-zise de *Hydrangea paniculata*.

Extracte <i>Hydrangea paniculata</i>	Compusul analizat	t_R [min]	mg/mL extract	flavonoid/ 100g mat. vegetal
E ₁	Rutina	4,446	0,2364	236,4350
	Quercetina	11,501	9,5935	9593,5555
	Luteolina	14,251	0,7938	79,380
E ₂	Rutina	4,674	8,0885	8088,515
	Quercetina	12,299	28,4232	28,4232
	Luteolina	14,352	3,89	3,890
E ₃	Rutina	4,509	1,8335	1833,35
	Quercetina	12,541	5,6738	56738
	Luteolina	14,425	5,5550	555,55
E ₄	Rutina	4,491	0,08411	120,1642
	Quercetina	12,991	5,663	8090,1428
E ₅	Rutina	4,513	4,6880	4688
	Quercetina	12,257	9,2600	9260
E ₆	Rutina	3,964	6,4765	6476,5
E ₇	Rutina	4,468	11,7365	11736,5
E ₈	Rutina	4,408	20,9945	25899,5
	Quercetina	12,066	35,8995	35899,5
e ₁	Quercetina	12,298	34,083	85207,5
	Rutina	4,446	9,0525	22631,437
e ₂	Quercetina	13,027	5,4138	13534,6
	Rutina	3,849	0,9655	2423,875
e ₃	Quercetina	12,557	0,3950	1975,25
	Rutina	4,887	0,7890	3945

unde : $E_1, E_2, E_3, E_4, E_5, E_7, E_8$ sunt extractele din frunze de *Hydrangea paniculata*,

e_1, e_2, e_3 sunt extracte din frunze de *Hydrangea paniculata* obținute conform procedeele de la paragraful II.2.

Tabelul 36. Timpii de retenție și concentrațiile flavonoidelor în extractele din fructe de *Ziziphus jujuba*.

Extracte Ziziphus jujuba	Compusul analizat	t_R [min]	mg/mL extract	mg flavonoid/100g mat. vegetal
EZ ₁	Rutina	3,182	0,0462	213,0625
EZ ₂	Rutina	3,113	0,60893	60,893
	Miricetina	9,221	0,0694	86,8375
	Kaemferol	15,802	0,2882	360,3

unde: EZ₁, EZ₂, sunt extracte din fructe de *Ziziphus jujuba*, obținute conform procedeele de la paragraful II.2

b). Pentru fracțiunile din extractul din frunze de *Hydrangea paniculata* purificat pe coloană de Sephadex LH 20 s-a evidențiat prezența rutinei, iar rezultatele au fost comparabile în funcție de faza mobilă folosită. În acest caz, condițiile de lucru au fost :

- Coloană : LiChrosorb RP18, 150x 4,6 mm, 5 μ m
- Faza mobilă: metanol : apă în diverse proporții, (pH 3 cu acid fosforic), pentru a evidenția care este raportul cel mai optim pentru o mai bună separare. Au fost încercate următoarele faze mobile:

Faza mobilă 1 (FM₁): metanol : apă = 5 : 5

Faza mobilă 2 (FM₂): metanol : apă = 4.2 : 5.8

Faza mobilă 3 (FM₃): metanol : apă = 4 : 6

- Viteza volumetrică de curgere $v = 1$ mL/min ;
- Detecție UV $\lambda = 360$ nm.

În cazul folosirii FM₁, analiza HPLC nu a fost concludentă, deoarece valorile concentrațiilor au fost diferite (figura 4.1. și figura 4.2.); iar în cazul folosirii fazei mobile FM₂ rezultatele au fost comparabile cu cele anterioare (figurile 4.3- 4.5). În acest caz prezența rutinei a fost identificată începând cu fracțiunea 7 și până în fracțiunea 12. Concentrația maximă de rutină s-a atins în fracțiunea 9, scăzând apoi treptat spre fracțiunea 12 Deși rutina a început să apară încă din fracțiunea 7, ea coeluează cu alt compus, însă acest interferent dispare în următoarele fracțiuni. În cazul utilizării FM₃, (figura 4.6) se observă doar modificări ale rezoluției separării, ale simetriei picului, lățimii picului și a timpului de retenție.

Timpii de retenție și concentrațiile flavonoidelor în extracte sunt prezentate în tabelul 37.

Tabelul 37. Timpii de retenție și concentrațiile flavonoidelor în extractul metanolic e₁ din frunze de *Hydrangea paniculata*, purificat pe Sephadex LH-20.

Produs analizat	Compusul analizat	Faza mobilă	t _R [min]	Concentrația Rutina/mL fr. extr.
Standard	Rutină	FM1	4,807	-
		FM2	8,581	-
		FM3	11,982	-
Frațiunea 7	Rutină	FM1	4,670	0,0086
		FM2	8,793	0,8651
		FM3	-	-
Frațiunea 8	Rutină	FM1	4,621	0,0056
		FM2	8,392	2,5012
		FM3	-	-
Frațiunea 9	Rutină	FM1	-	-
		FM2	8,286	9,5241
		FM3	-	-
Frațiunea 10	Rutină	FM1	-	-
		FM2	8,353	3,0810
		FM3	-	-
Frațiunea 11	Rutină	FM1	-	-
		FM2	-	1,2051
		FM3	11,525	1,2342
Frațiunea 12	Rutină	FM1	-	-
		FM2	-	-
		FM3	11,950	urme

Metoda de analiză folosită (HPLC) s-a dovedit a fi precisă și selectivă pentru identificarea și cuantificarea flavonoidelor prezente în materialul vegetal. Rezultatele cercetării constituie obiectul unei lucrări științifice [225].

II.3.1.6. Analiza cantitativă a flavonoidelor

Analiza cantitativă a flavonoidelor a fost realizată conform metodei prevăzută în Farmacopeea Română, X [221], folosind ca substanță etalon rutina.

Materialul vegetal a fost recoltat în anii 2003, 2004 și 2005 și păstrat în condiții asemănătoare.

a). Obținerea extractelor

Pentru obținerea extractului alcoolic, 1 g material vegetal, pulverizat în prealabil a fost supus extracției cu 100 mL alcool etilic 50%, la reflux pe baie de apă timp de 30 minute. Soluția fierbinte a fost filtrată prin vată într-un balon cotate și după răcire s-a completat la 100 mL prin spălarea rezidului cu același solvent. **(soluția A)**

b). Determinarea conținutului de flavonoide

10,0 mL soluție A s-a diluat cu metanol (R) la 25 mL într-un balon cotate, iar după agitare soluția s-a lăsat în repaus 10 minute, după care s-a filtrat, îndepărtându-se primele fracțiuni de filtrat. La 5,0 mL filtrat s-a adăugat 5 mL acetat de sodiu 100g/L (R) și 3 mL clorură de aluminiu 25 g/L, iar după o prealabilă agitare s-a completat cu metanol(R) la 25 mL, într-un balon cotate **(soluția probă)**. După 15 minute, s-a completat din nou cu metanol(R) la 25 mL și s-a determinat absorbanta soluției la 430 nm, folosind ca lichid de compensare o soluție obținută în aceleași condiții cu soluția -probă, din 5,0 mL filtrat, 8,0 mL apă și metanol (R) la 25 mL într-un balon cotate.

a) Trasarea curbei de etalonare [226]

Concentrația în flavonoide a probei de analizat s-a calculat cu ajutorul unei curbe etalon pentru rutină, stabilite în paralel și în aceleași condiții cu soluția-probă, luând în lucru: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 mL soluție etalon de rutină 0,1 g/L în metanol(R), 5 mL acetat de sodiu 100 g/L (R), 3 mL clorură de aluminiu 25 g/L (R) și metanol (R) adusă la 25 mL. S-a folosit ca lichid de compensare o soluție, din 8 mL apă și metanol(R) adusă la 25 mL, la balon cotate.

Curba de etalonare obținută este prezentată în figura 13.

Cantitatea de flavonoide corespunzătoare absorbantei citite este:

$$X = A / 0,9163 \text{ mg rutină}$$

$$\text{Flavonoide ,\% exprimat în rutină} = (X \cdot 4) / g$$

unde: X = mg flavonoide corespunzătoare absorbantei citite

g = cantitatea de material vegetal folosit pentru analiză

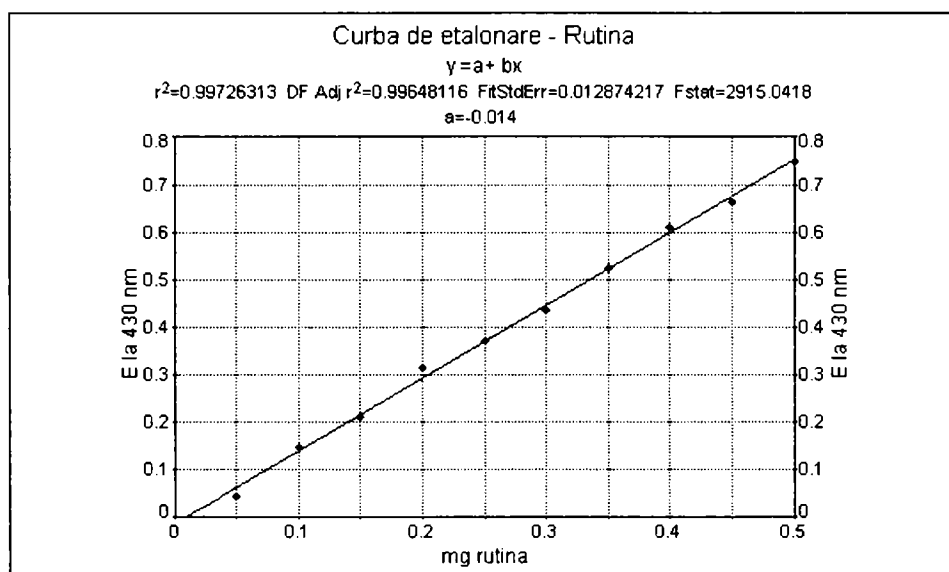


Figura 13. Curba de etalonare pentru rutină

Valorile procentuale obținute pentru fiecare din materialele vegetale studiate sunt prezentate în tabelul 38.

Tabelul 38. Conținutul total de flavonoide exprimat în rutină

Produs vegetal	Flavonoide g% (exprimate în rutină, %)
frunze <i>Ziziphus jujuba</i> 2003	2,3760
frunze <i>Ziziphus jujuba</i> 2004	2,6340
frunze <i>Ziziphus lotus</i> 2004	2,5127
frunze <i>Ziziphus jujuba</i> 2005	2,2260
frunze <i>Ziziphus lotus</i> 2005	2,2320
fructe <i>Ziziphus jujuba</i> 2003	0,1685
fructe <i>Ziziphus jujuba</i> 2004	0,3064
fructe <i>Ziziphus lotus</i> 2004	0,3474
fructe <i>Ziziphus jujuba</i> 2005	0,2520
fructe <i>Ziziphus lotus</i> 2005	0,3461
frunze <i>Hydrangea paniculata</i> 2003	1,7522
frunze <i>Hydrangea aspera</i> 2003	0,4483
frunze <i>Hydrangea paniculata</i> 2004	2,2787
frunze <i>Hydrangea aspera</i> 2004	1,3423
frunze <i>Hydrangea paniculata</i> 2005	1,8436
frunze <i>Hydrangea aspera</i> 2005	2,3630

Continutul de Flavonoide din frunzele speciei Ziziphus

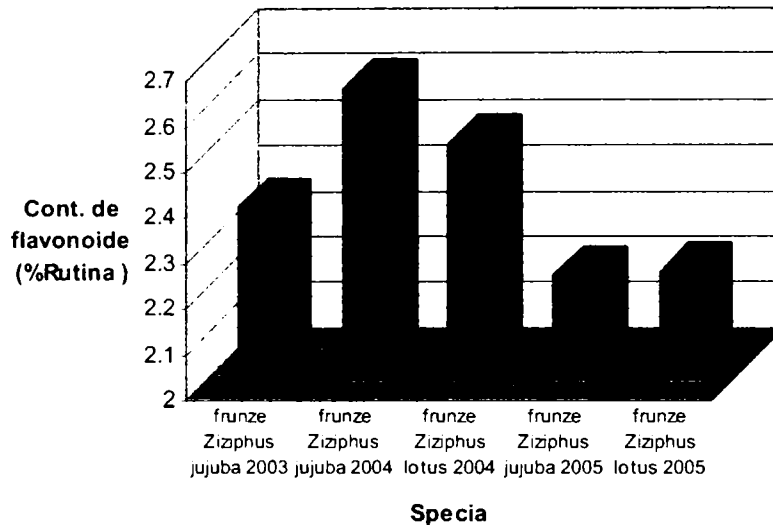


Figura. 14. Variația conținutului de flavonoide pentru frunze din specia Ziziphus.

Continutul de Flavonoide din fructele speciei Ziziphus

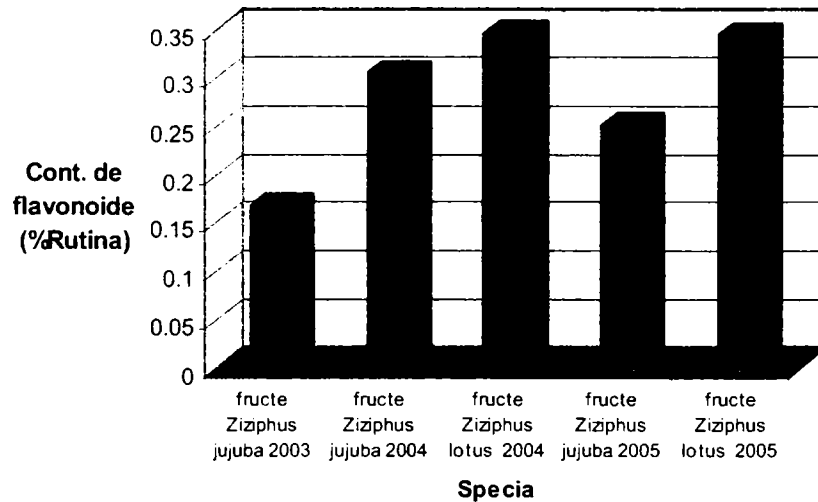


Figura 15. Variația conținutului de flavonoide pentru fructe din specia Ziziphus.

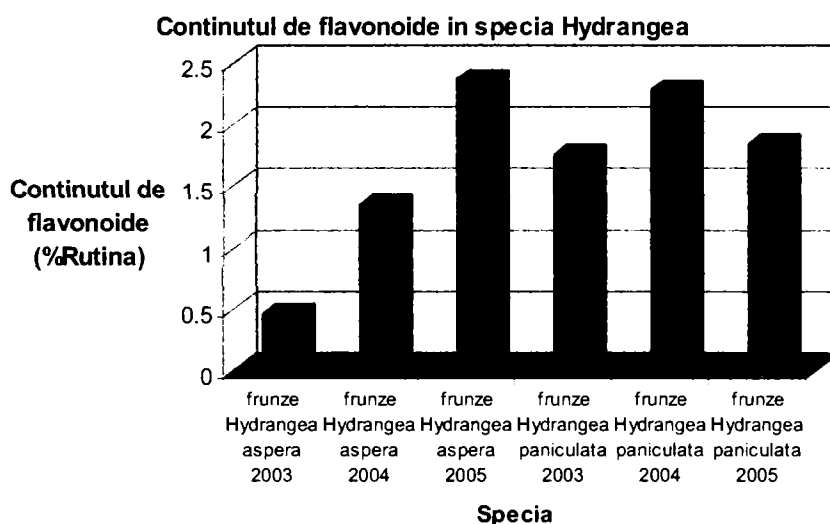


Figura16. Variația conținutului de flavonoide pentru frunze din specia Hydrangea.

În cazul speciei *Ziziphus*, atât pentru frunze cât și pentru fructe de *Ziziphus jujuba*, cât și pentru frunze de *Ziziphus lotus*, conținutul de flavonoide este cel mai mare pentru materialul vegetal din anul 2004, cel mai mic pentru cel din anul 2003, și mediu pentru materialul vegetal din anul 2005.

Pentru fructe de *Ziziphus jujuba*, conținutul de flavonoide cel mai ridicat este în materialul vegetal din anul 2004, cel mai mic fiind cel din anul 2003.

În cazul speciei *Hydrangea*, conținutul cel mai mare de flavonoide se găsește în frunzele de *Hydrangea aspera* din anul 2005 și *Hydrangea paniculata* din anul 2004, iar conținutul cel mai mic de flavonoide se găsește în frunze de *Hydrangea aspera* din anii 2003 și 2004.

Aceasta s-ar putea explica prin condițiile climatice ale anilor respectivi de colectare a materialului vegetal.

Tabelul 39. Condițiile climatice ale anilor în care s-a recoltat materialul vegetal*.

Condițiile climatice	Anul 2003	Anul 2004	Anul 2005
Temperatura medie anuală, [°C]	12,8	19,4	11,6
Precipitații total, mm	600	780	730
Temperatura maximă absolută, [°C]	38 (luna VIII)	36 (luna VII)	29 (lunile VI, VIII)
Temperatura minimă absolută, [°C]	-21,6 (luna I)	- 12,5 (luna I)	-9 (luna II)

* Condițiile climatice au fost obținute de la centrul de observații meteorologice al Grădinii Botanice Macea, județul Arad.

O corelare între condițiile climatice și conținutul de principii active ar fi posibilă numai dacă perioada studiată ar fi de minimum 5 ani. În consecință, explicațiile ce se pot da sunt generale și privesc procesele biochimice fundamentale proprii plantelor verzi. Radiația solară care intensifică fotosinteza determină modificarea pigmentării în raport direct cu intensitatea radiației incidente ce cade pe frunze. În cazul fructelor are loc acumularea glucidelor specifice, cum este fructoza.

Dacă se compară conținutul în rutină al diverselor extracte și se încearcă o corelare primară cu condițiile climatice se pot trage următoarele concluzii:

- pentru frunzele de *Ziziphus jujuba* și *Ziziphus lotus*, conținutul de rutină este cel mai mare în anul 2004 caracterizat prin temperatură medie anuală cea mai mare; acest conținut % rutină mai mare se menține și pentru fructele de *Ziziphus jujuba* și *Ziziphus lotus* provenite din anul 2004;
- % rutină mai mare din frunzele de *Hydrangea paniculata* și *Hydrangea aspera* provenite din recolta anului 2004 ar avea aceeași explicație;
- acest % mai mare de rutină poate fi explicat și prin faptul că în anul 2004 precipitațiile totale au avut valoarea cea mai mare.

II.3.2. COMPUȘII POLIFENOLICI

Polifenolii din frunze și fructe de *Ziziphus jujuba* și *Ziziphus lotus* și conținutul de polifenoli din frunze de *Hydrangea paniculata* și *Hydrangea aspera* au fost evidențiați prin cromatografie în strat subțire, respectiv au fost dozați cantitativ [221,227].

II.3.2.1. Identificarea calitativă a compușilor polifenolici

Identificarea calitativă a compușilor polifenolici s-a realizat prin cromatografierea în strat subțire a extractelor etanolice 5%: 1 g pulbere de material vegetal aparținând speciilor studiate a fost supus extracției cu 29 mL alcool etilic 50%, pe baie de apă până la temperatura de fierbere a solventului, după care s-a întrerupt fierberea și s-a răcit soluția. Extractele astfel obținute au fost filtrate și s-au adus la un volum de 20 mL cu același solvent.

În paralel s-a supus cromatografierii și standardul de pirocatechina (catechol, Merk).

Analiza cromatografică a extractelor s-a realizat folosind ca fază staționară placuțe de Silicagel (Merck), iar ca fază mobilă sistemul de solvenți:

Toluen: Acetat de etil: Acid formic: Apă = 5 : 100 : 10 : 10

După uscarea cromatogramei la aer cald, vizualizarea spoturilor s-a realizat la lampa cu raze UV.

Extractele au evidențiat un spot principal de culoare roșu-brun la același $R_f = 0,76$ cu martorul.

II.3.2.2. Determinarea cantitativă a compușilor polifenolici

Metoda de analiză:

Analiza cantitativă a polifenolilor a fost realizată folosind ca substanță etalon, pirocatechina [227], respectiv cinarina [221] și reactivii (R) prevăzuți de Farmacopee.

S-a lucrat cu același material vegetal ca cel prezentat la paragraful II.3.1.6.

Pentru obținerea extractului alcoolic, 1 g material vegetal a fost supus extracției cu 100 mL alcool etilic 50%, la reflux pe baie de apă timp de 30 minute. Soluția fierbinte a fost filtrată prin vată într-un balon cotat și după răcire s-a completat la 100 mL prin spălarea rezidului cu același solvent (**soluția A**).

a) *Determinarea conținutului de polifenoli totali*

La 5,0 mL soluție A s-a adăugat 5 mL acid fosfowolframic, soluție (R), și după agitare s-a filtrat, îndepărtând primele fracțiuni de filtrat. În continuare 5,0 mL filtrat s-au diluat cu carbonat de sodiu (R) 200g/l la 10 mL, într-un balon cotat (**soluția probă**). După 1 minut s-a determinat absorbanta soluției la 660 nm, folosind ca lichid de compensare o soluție preparată din 0,5 mL filtrat și adus cu apă la 10 mL, într-un balon cotat.

c). *Trasarea curbei de etalonare*

Conținutul în polifenoli totali ai probei de analizat s-a calculat cu ajutorul unei curbe etalon, stabilite în paralel și în aceleași condiții cu soluția de probă, luând în lucru 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,45; 0,50 mL soluție etalon de pirocatechină 0,1 g/l, 0,25 mL acid fosfowolframic- soluție (R) și carbonat de sodiu (R) 200 g/l la 10 mL, în fiecare balon cotat; S-a folosit ca lichid de compensare o soluție preparată din 0,25 mL acid fosfowolframic -soluție (R) și apă la 10 mL într-un balon cotat.

Curba de etalonare obținută este reprezentată în figura 17.

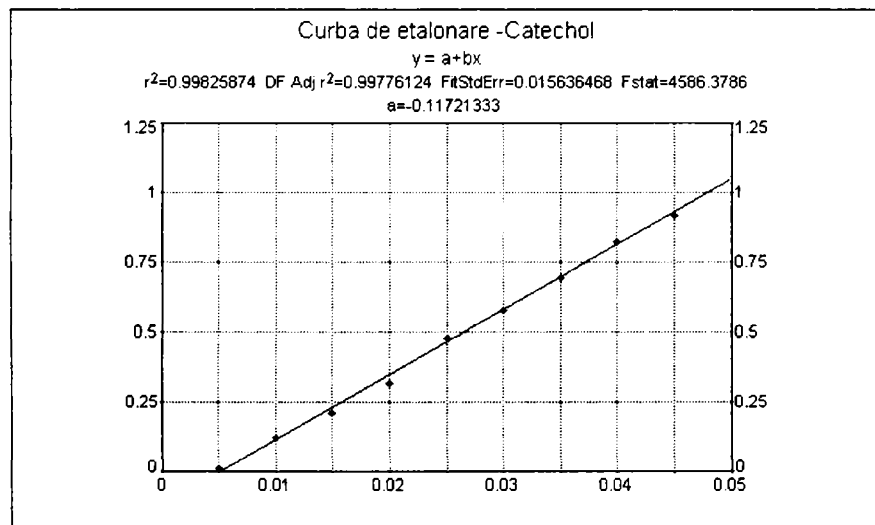


Figura 17. Curba de etalonare pentru pirocatechina (catechol).

Conținutul de polifenoli din extractele luate în analiză sunt prezentate în tabelul 40.

Tabelul 40. Conținutul de polifenoli tip pirocatechina din extracte.

Produs vegetal	Absorbanța la 660 nm	Conținutul total de polifenoli (mg pirocatechină)	% Compuși polifenolici
frunze <i>Ziziphus jujuba</i> 2003	0.4366	0.0237	11.875
frunze <i>Ziziphus jujuba</i> 2004	0.4897	0.0260	13.010
frunze <i>Ziziphus lotus</i> 2004	0.4982	0.0264	13.195
frunze <i>Ziziphus jujuba</i> 2005	0.3922	0.0218	10.900
frunze <i>Ziziphus lotus</i> 2005	0.2880	0.0172	8.600
fructe <i>Ziziphus jujuba</i> 2003	0.2619	0.0174	8.705
fructe <i>Ziziphus jujuba</i> 2004	0.2448	0.0155	7.770
fructe <i>Ziziphus lotus</i> 2004	0.2911	0.0175	8.760
fructe <i>Ziziphus jujuba</i> 2005	0.1537	0.0116	5.800
fructe <i>Ziziphus lotus</i> 2005	0.1061	0.0096	4.800
frunze <i>Hydrangea paniculata</i> 2003	0.4317	0.0235	11.770
frunze <i>Hydrangea aspera</i> 2003	0.2521	0.0158	7.925
frunze <i>Hydrangea paniculata</i> 2004	0.4922	0.0261	13.069
frunze <i>Hydrangea aspera</i> 2004	0.3840	0.0215	10.753
frunze <i>Hydrangea paniculata</i> 2005	0.4365	0.0237	11.850
frunze <i>Hydrangea aspera</i> 2005	0.3645	0.0206	10.300

Continutul de Compuși polifenolici în frunze din specia *Ziziphus*

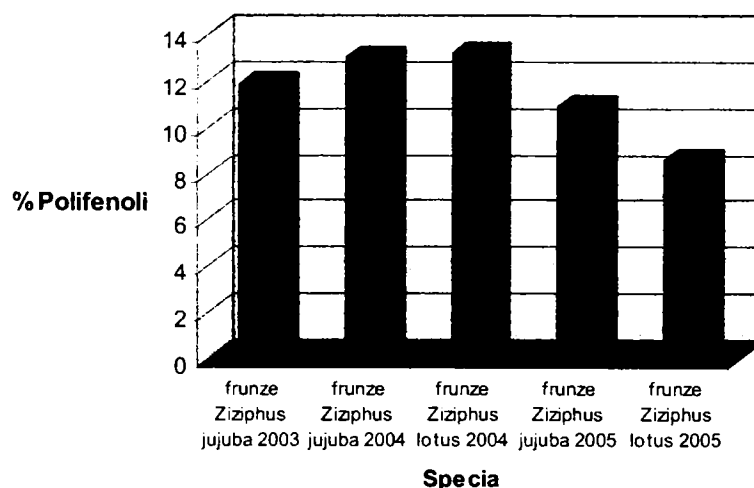


Figura 18. Variația conținutului de polifenoli în funze din specia *Ziziphus*.

Rezultatele indică un conținut mare de polifenoli de tip pirocatechina în jur de 8- 13,0 %, în frunze de *Ziziphus jujuba* din 2004 și frunze de *Ziziphus lotus* 2004.

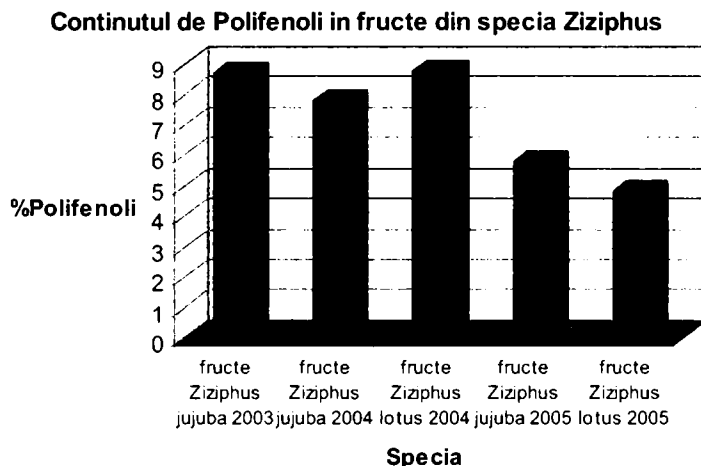


Figura 19. Variația conținutului de polifenoli în fructe din specia Ziziphus.

Conținutul cel mai mare de polifenoli de tip pirocatechina este în fructe de *Ziziphus jujuba* din anul 2003 și fructe de *Ziziphus jujuba* din 2004, iar conținutul de polifenoli scade remarcabil în anul 2005, an în care temperatura media anuală a fost mai scăzută și cantitatea totală de precipitații a fost mai ridicată.

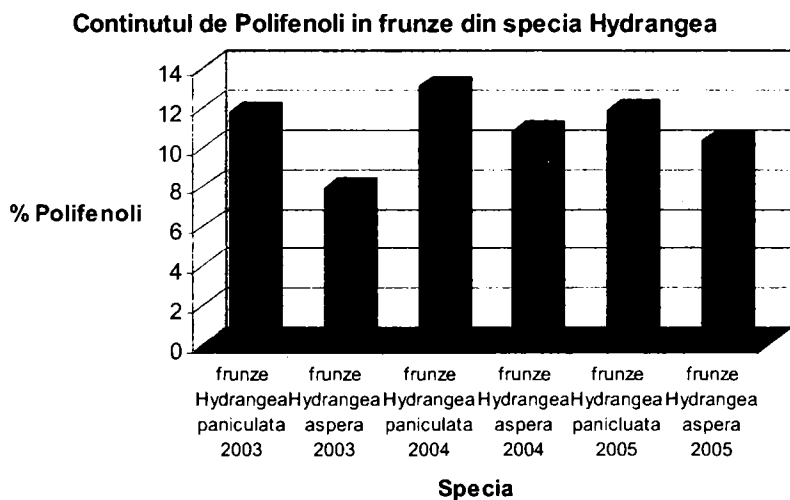


Figura 20. Variația conținutului de polifenoli în frunze din specia Hydrangea.

Rezultatele analizei cantitative indică faptul că un conținut ridicat de polifenoli prezintă frunzele de *Hydrangea paniculata* din 2003 și *Hydrangea paniculata* din 2004, pe când în cazul speciei *Hydrangea aspera*, conținutul cel mai

mare de polifenoli este în materialul vegetal din 2004 și cel mai mic în cel din 2003, an cu un conținut mai mic de precipitații și cu temperatură absolută de 38°C.

II.3.3. ANTOCIANIDINELE

Ca și flavonoidele sau taninurile, care constituie clase distincte de compuși prezenți în materialele vegetale, și antocianidinele constituie o clasă de substanțe mai mult sau mai puțin apropiate sub aspectul structurii chimice, dar care se aseamănă prin originea lor și prin unele proprietăți fizico-chimice comune. De menționat că antocianidinele sunt considerate ca fiind compuși care aparțin clasei flavonoidelor, dar unii autori susțin că aparțin și clasei taninurilor, mai exact taninurilor catechice.

II.3.3.1. Analiza calitativă a antocianidinelor

Analiza calitativă a compușilor antocianidinici prezenți în frunzele speciilor *Hydrangea paniculata* și *Hydrangea aspera* și fructele și frunzele speciei *Ziziphus jujuba* și *Ziziphus Lotus*, a fost realizată prin cromatografie în strat subțire.

Metoda: 20 mL din soluția extractului antocianidinic (obținut conform paragrafului II.3.3.2.) au fost refluxați pe baie de apă cu 20 mL acid clorhidric 2N, timp de 30 minute. Masa de reacție s-a extras de două ori cu câte 10 mL acetat de etil. Extractele s-au reunit, iar soluția acidă rămasă după epuizarea acetatului de etil s-a tratat de două ori cu 10 mL butanol. Extractele au fost apoi reunite și supuse analizei pentru identificarea antocianidinelor.

Analiza cromatografică a extractelor s-a realizat folosind ca fază staționară plăcuțe de celuloză (Merck), 10 x10 cm, iar ca fază mobilă, sistemul Forestal:

acid clorhidric: apă: acid acetic = 3: 10 : 30

Plăcuțele au fost uscate la întuneric după care au fost examinate în lumina zilei, spoturile fiind evidențiate datorită colorației proprii.

Cianidina este prezentă în toate extractele vegetale analizate sub forma unui spot de culoare roșie la valorile: $R_f = 0,43$ pentru extractele din frunze și $R_f = 0,41$ pentru extractele din fructe, aceeași valoare cu R_f -ul matorului de cianidină, conform literaturii de specialitate [228].

II.3.3.2. Analiza cantitativă a antocianidinelor

Determinarea cantitativă a compușilor antocianidinici se realizează prin metode care sunt bazate pe culoarea roșie proprie a acestor substanțe. Aceste metode de determinare sunt metode spectrofotometrice în care determinarea procentului total de antocianidine se realizează prin spectrofotometrarea soluțiilor la lungimi de undă caracteristice (480-560 nm), alegerea lungimii fiind dependentă de solventul utilizat.

Determinarea conținutului total de antociani din frunzele speciei Hydrangea

S-a determinat conținutul total de antocianidine pentru materialul vegetal recoltat în anii 2004 și 2005.

Pentru analiza cantitativă s-a folosit tehnica indicată de Markakis [228] bazată pe cunoașterea absorbantei molare specifice a antocianilor la 530 nm.

Metoda: 1 g pulbere de produs vegetal a fost extras la rece (4°C), timp de 24 ore, cu 100 mL amestec alcool etilic: acid clorhidric 1,5 N (85:15). Soluția astfel obținută, a fost filtrată și completată până la 100 mL cu același solvent. A fost citită absorbanta soluției la 530 nm.

Calculul concentrației totale de antocianidine se face cu formula [228]:

$$Ant(mg/ml) = \frac{A_p \cdot d}{98,2 \cdot p}$$

unde:

- A_p - absorbanta soluției la 535 nm;
- d - factorul de diluție (mL);
- 98,2 - valoarea absorbantei soluției 1% cianidină în solvent alcool etilic: acid clorhidric, măsurat într-o cuvă de 1cm, la 530 nm ;
- p - cantitatea de material vegetal luată pentru analiză, în g.

Tabelul 41. Conținutul total de antocianidine din extracte de *Ziziphus jujuba*, respectiv *Hydrangea paniculata*.

Produs vegetal	Antocianidine (mg cianidină/100g mat. vegetal)
frunze <i>Ziziphus jujuba</i> 2004	33,776
frunze <i>Ziziphus lotus</i> 2004	67,567
frunze <i>Ziziphus jujuba</i> 2005	67,163
frunze <i>Ziziphus lotus</i> 2005	65,314
fructe <i>Ziziphus jujuba</i> 2004	14,972
fructe <i>Ziziphus lotus</i> 2004	24,243
fructe <i>Ziziphus jujuba</i> 2005	19,603
fructe <i>Ziziphus lotus</i> 2005	36,397
frunze <i>Hydrangea paniculata</i> 2004	86,518
frunze <i>Hydrangea aspera</i> 2004	113,888
frunze <i>Hydrangea paniculata</i> 2005	73,008
frunze <i>Hydrangea aspera</i> 2005	80,823

Continutul de Antocianidine in frunzele speciei Ziziphus

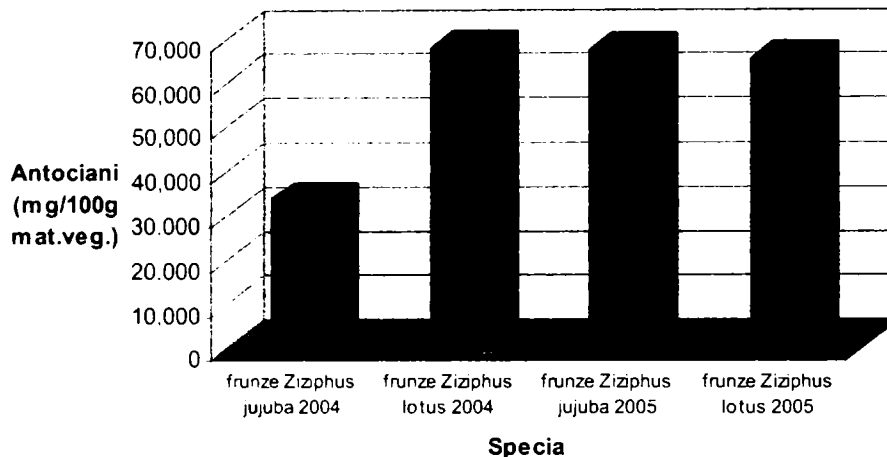


Figura 21. Variația conținutului de antocianidine din frunzele speciei Ziziphus

Continutul de Antocianidine in fructele speciei Ziziphus

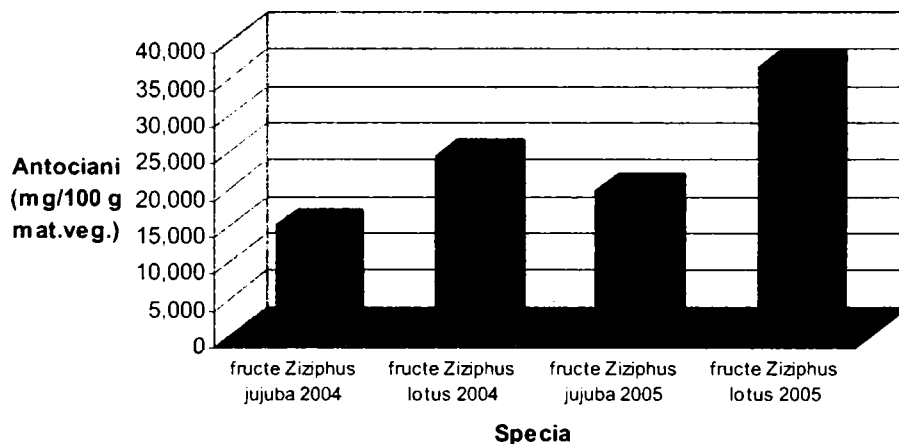


Figura 22. Variația conținutului de antocianidine din fructele speciei Ziziphus.

Rezultatele obținute indică faptul că, cantitatea de antocianidine exprimată ca mg cianidină / 100 g material vegetal variază:

- între 30 – 70 mg pentru frunze de *Ziziphus jujuba*
- între 14 – 20 mg pentru fructe de *Ziziphus jujuba*
- între 65 – 67 mg pentru frunze de *Ziziphus lotus*
- între 24 – 36 mg pentru fructe de *Ziziphus lotus*

Conținutul de antocianidine din frunzele speciei *Ziziphus jujuba* este scăzut pentru materialul vegetal din anul 2004 și aproape dublu pentru materialul vegetal din anul 2005, iar în cazul speciei de *Ziziphus lotus*, conținutul de antocianidine este

aproape același. Pentru fructele speciei *Ziziphus* conținutul de antocianidine este mai mare pentru materialul vegetal din anul 2005 față de cel din anul 2004.

Continutul de Antocianidine in frunzele speciei *Hydrangea*

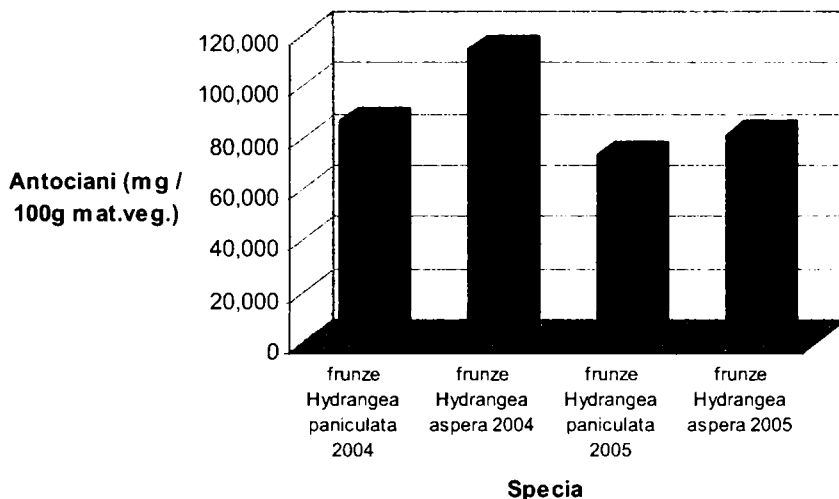


Figura 23. Variația conținutului de antocianidine din frunzele speciei *Hydrangea*.

De asemenea conținutul de antocianidine în cazul speciei *Hydrangea* este mai mare pentru materialul din anul 2005, față de materialul vegetal recoltat în anul 2004.

II.3. 4. TANINURI

Din punct de vedere chimic, taninurile se împart în două mari subclase și anume:

- (a) taninuri catechice sau taninuri condensate nehidrolizabile
- (b) taninuri galice sau hidrolizabile

În funcție de natura lor chimică, taninurile pot fi identificate prin reacții generale ale clasei de compuși, prin reacții caracteristice pentru cele două subclase de taninuri și prin reacții de diferențiere a lor.

Analiza calitativă și cantitativă a taninurilor a fost realizată pe material vegetal uscat (frunze de *hydrangea*, frunze de *jujuba*), recoltat în lunile septembrie (frunze de *Hydrangea paniculata*, *Hydrangea aspera*, *Ziziphus jujuba*, *Ziziphus lotus*) în anii 2004 și 2005. Celelalte materiale vegetale luate în studiu și anume fructele de *Ziziphus jujuba* și fructele de *Ziziphus lotus* nu conțin taninuri.

II.3.4.1. Identificarea taninurilor prin reacții de culoare și precipitare

Reacțiile de identificare au fost realizate pe extracte obținute astfel:

1 g produs vegetal a fost supus extracției cu 30 mL apă fierbinte, iar balonul a fost menținut 30 minute pe baia de apă în fierbere. După răcire soluțiile au fost filtrate, filtratul fiind utilizat pentru realizarea diferitelor reacții de culoare și precipitare [3].

II.3.4.1.1. Reacții generale pentru taninuri

a). Reacția cu soluție de gelatină 1%. La 5 mL soluție de extract s-au adăugat câteva picături de soluție gelatină 1% ; s-a observat formarea un precipitat care este solubil în exces de reactiv.

b). Reacția cu acetat de Pb 10%. La 5 mL extract s-a adăugat 0,5 mL soluție Pb 10 % ; s-a constatat formarea unui precipitat galben.

c). Reacția cu FeCl_3 1% în etanol. La 5 mL soluție de extract vegetal s-a adăugat 0,5 mL soluție etanolică 1% de FeCl_3 ; s-a observat formarea unei colorații verde-albastru închis.

II.3.4.1.2. Reacții caracteristice pentru taninurile catechice

a). Reacția cu soluție de vanilină clorhidrică (sau sulfurică) 1%. La 1 mL soluție de extract s-a adăugat 0,5 mL soluție vanilină clorhidrică 1% ; s-a format o soluție colorată în roșu datorită condensării derivaților catechinici cu vanilina, compuși colorați în roșu în mediu acid.

b). Reacția cu apa de brom. La 5 mL soluție de extract s-a adăugat 2 mL apă de brom în mediu de acid acetic; s-a observat formarea de precipitat galben.

II.4.4.1.3. Reacții de diferențiere a taninurilor

a). Reacția cu FeCl_3 sau alaun feric 1%. Taninurile catechice, în funcție de concentrație conduc la formarea de colorații sau precipitate de culoare verde închis. Taninurile galice formează în aceleași condiții colorații sau precipitate albastre.

b). Reacția Styasny. La extractul tanic s-a adăugat o soluție acidă de formaldehidă, iar după fierbere la reflux timp de aproximativ 30 minute s-a format un precipitat de culoare roșie. Amestecul format s-a filtrat, iar la filtrat s-a adăugat acetat de sodiu până la neutralizare, iar apoi câteva picături de FeCl_3 sau alaun feric. În cazul taninurilor galice se formează colorații violet-albastre foarte intense.

În tabelul 42 sunt prezentate rezultatele reacțiilor de identificare pentru materialul vegetal colectat în anul 2005 și anume: frunze de *Ziziphus jujuba*, frunze de *Ziziphus lotus*, frunze de *Hydrangea paniculata* și frunze de *Hydrangea aspera*.

Prin reacțiile de culoare s-au evidențiat următoarele aspecte:

- toate cele patru extracte analizate conțin taninuri din cele două subclase;

- frunzele de *Hydrangea* conțin cea mai mare cantitate de taninuri totale evidențiată de abundența precipitatelor formate și de intensitatea colorațiilor comparativ cu celelalte extracte.

Tabelul 42. Reacții de identificare a taninurilor

Reacția de identificare (reactivul utilizat)	<i>Ziziphus jujuba</i> , frunze	<i>Ziziphus lotus</i> , frunze	<i>Hydrangea paniculata</i> , frunze	<i>Hydrangea aspera</i> , frunze
Soluție gelatină 1%	precipitat alb gălbui	precipitat alb gălbui	precipitat alb gălbui	precipitat alb gălbui
Soluție acetat de plumb 10%	precipitat galben-verzui	precipitat galben-verzui	precipitat galben-brun	precipitat galben-brun
Soluție de clorură ferică, 1%	precipitat verde-albastru	precipitat verde-albastru	precipitat verde-închis	precipitat verde-închis
Soluție vanilină clorhidrică 1%	colorație roșie	colorație roșie	colorație roșie-portocalie	colorație roșie-portocalie
Apă de brom	precipitat galben	precipitat galben	precipitat galben	precipitat galben
Soluție alaun feriamoniacal 1%	precipitat verde	precipitat verde	precipitat verde-închis	precipitat verde-închis
Soluție formaldehida acidă + Acetat de sodiu și alaun feriamoniacal	precipitat roșu colorație albastră-violetă	precipitat roșu colorație albastră-violetă	precipitat roșu colorație albastră-violetă	precipitat roșu colorație albastră-violetă

II.3.4.2. Identificarea cromatografică a taninurilor

Soluțiile extractive apoase din frunze de *Ziziphus jujuba*, *Ziziphus lotus*, *Hydrangea paniculata*, *Hydrangea aspera* (material vegetal din anul 2005) s-au analizat calitativ prin cromatografie în strat subțire.

În vederea identificării cromatografice a taninurilor din extracte s-au folosit plăcuțe de celuloză (Merck), iar pentru a obține o mai bună separare a componentelor s-a utilizat sistemul de solvenți:

n-butanol : acid acetic : apă = 4 : 1 : 5

Ca soluție etalon s-a folosit soluția hidroalcoolică de pirogalol (standard, Merck).

Pirogalolul, apare în extractele studiate sub forma unui spot de culoare violetă, la același $R_f = 0,76$ cu cel al standardului.

Prin cromatografie în strat subțire s-a identificat pirogalolul în frunzele de *Ziziphus jujuba* și *Ziziphus lotus*, precum și în frunzele de *Hydrangea paniculata* și *Hydrangea aspera*.

II.3.4.3. Determinarea procentului total de taninuri [221]

S-a determinat conținutul total de taninuri pentru frunze de *Ziziphus jujuba* și *Ziziphus lotus*, frunze de *Hydrangea paniculata* și *Hydrangea aspera*, recoltate în anii 2004 și 2005.

Metoda se bazează pe dozarea polifenolilor totali din produsul vegetal, respectiv a polifenolilor rămași după precipitarea taninurilor cu pulbere de piele standardizată sau caseină standard. Diferența între cele două dozări reprezintă chiar taninurile prezente în produsul vegetal analizat. Menționăm că fața de metoda din Farmacopee am folosit în locul pulberii de piele în vederea precipitării taninurilor, caseina standard.

Metoda are la bază reacția de culoare între compușii polifenolici și acidul fosfowolframic, produsul colorat fiind spectrofotometrat la lungimea de undă de 715 nm. În paralel se prepară un standard ce folosește pirogalolul ca substanță de referință și care se tratează în condiții identice cu proba, cu același reactiv, acidul fosfowolframic. Decelarea compusului colorat în albastru este realizată prin spectrofotometrare la aceeași lungime de undă.

Mod de lucru:

Într-un balon prevăzut cu refrigerent de reflux, s-au introdus 1 g produs vegetal pulverizat și s-au adăugat 150 mL apă. S-a încălzit la fierbere timp de 30 minute, agitând din când în când. După răcire, conținutul balonului s-a adus cantitativ cu apă într-un balon cotat și s-a completat la 250 mL. După decantare, soluția s-a filtrat îndepărtând primii 50 mL de filtrat.

Polifenolii totali. 5,0 mL filtrat s-a diluat cu apă la 25 mL într-un balon cotat. La 5,0 mL din această soluție s-a adăugat 1,0 mL acid fosfowolframic soluție (R)(conform [221]) într-un balon cotat, s-a agitat și s-a completat cu carbonat de sodiu 150g/L la 50 mL. După 2 minute de la adăugarea ultimului reactiv s-a determinat absorbanta soluției de polifenoli totali la 715 nm (A_1), folosind ca lichid de compensare apa.

Polifenolii neadsorbiți pe caseină. 10,0 mL filtrat s-au introdus într-un balon cu dop rodat de 25 mL, s-a adăugat 0,10 g caseină, s-a agitat energic timp de 1 oră și s-a filtrat. 5,0 mL din acest filtrat s-a diluat cu apă la 25 mL, într-un balon cotat. Într-un balon cotat de 50 mL s-au introdus 5,0 mL din acest filtrat, 1,0 mL acid fosfowolframic soluție (R), s-a agitat și s-a completat până la semn cu carbonat de sodiu 150g/L. După 2 minute de la adăugarea ultimului reactiv s-a determinat absorbanta soluției de polifenoli neadsorbiți de caseină la 715 nm (A_2), folosind ca lichid de compensare apa.

Determinarea cantitativă a taninurilor cu ajutorul pirogalolului. 50,0 mg pirogalol s-a dizolvat în 20 mL apă și s-a completat cu același solvent la 100 mL, într-un balon cotat. La 5,0 mL din acest filtrat s-a adăugat 1,0 mL acid fosfowolframic soluție (R) într-un balon cotat, s-a agitat și s-a completat cu carbonat de sodiu 150 g/ L la 50 ml. După 2 minute de la adăugarea ultimului reactiv și la cel mult 30 minute de la dizolvarea pirogalolului s-a determinat absorbanta soluției de pirogalol la 715 nm (A_3), folosind ca lichid de compensare apa.

Valorile citite pe baza cărora s-au făcut calculele au fost:

Extracte 2004	A_1	A_2	A_3
ZJ frz	0,1383	0,0924	4,0
ZJ fru	0,1049	0,0541	4,0
Hp frz	0,2320	0,1784	4,0

Ha frz	0,1470	0,1631	4,0
Extracte 2005	A ₁	A ₂	A ₃
ZJ frz	0,1645	0,0890	4,0
ZJ fru	0,1338	0,0780	4,0
Hp frz	0,2378	0,1876	4,0
Ha frz	0,1851	0,1541	4,0

Calculul conținutului de tanin prezent în produsul vegetal are la bază următoarea formulă :

$$\text{Tanin g\%} = \frac{3,125 \cdot (A_1 - A_2) \cdot 100}{A_3 \cdot m_p}$$

unde : A₁, A₂ – absorbanta soluțiilor colorate obținute în urma reacției cu acidul fosfowolframic (A₁ - înainte de reacția cu caseina; A₂ – după precipitarea cu caseina);
A₃ – absorbanta soluției de pirogalol;
m_p – cantitatea de caseină luată în lucru.

Procentul total de taninuri determinat pentru materialul vegetal studiat este redat în tabelul 43.

Tabelul 43. Procentul de taninuri din extractele vegetale studiate

Material vegetal	Taninuri % (g taninuri/ 100 g produs vegetal)
frunze <i>Ziziphus jujuba</i> 2004	5,8591
frunze <i>Ziziphus lotus</i> 2004	4,2971
frunze <i>Ziziphus jujuba</i> 2005	3,557
frunze <i>Ziziphus lotus</i> 2005	3,9636
frunze <i>Hydrangea paniculata</i> 2004	3,9136
frunze <i>Hydrangea aspera</i> 2004	2,4141
frunze <i>Hydrangea paniculata</i> 2005	4,0117
frunze <i>Hydrangea aspera</i> 2005	3,5372

Rezultatele obținute indică faptul că, cantitatea de taninuri exprimată ca taninuri % (g taninuri / 100 g material vegetal) variază:

- între 3 – 5 %, pentru frunze de *Ziziphus jujuba*
- între 3 – 4 %, pentru frunze de *Ziziphus lotus*
- între 3 - 4 %, pentru frunze de *Hydrangea paniculata*
- între 2 - 4 %, pentru frunze de *Hydrangea aspera*

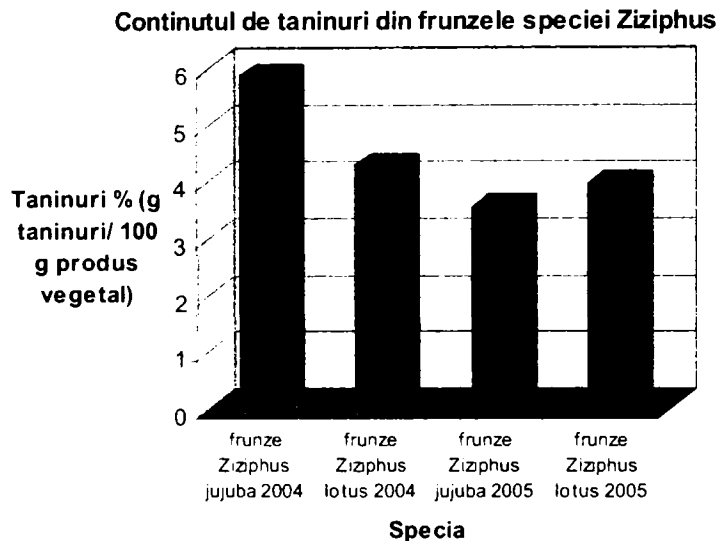


Figura 24. Variația conținutului de taninuri pentru frunze din specia Ziziphus.

Conținutul de taninuri din frunzele speciei Ziziphus și Hydrangea variază în funcție de anul recoltării materialului vegetal. Astfel, materialul vegetal recoltat în anul 2004 conține un % mai mare de taninuri față de materialul vegetal recoltat în anul 2005.

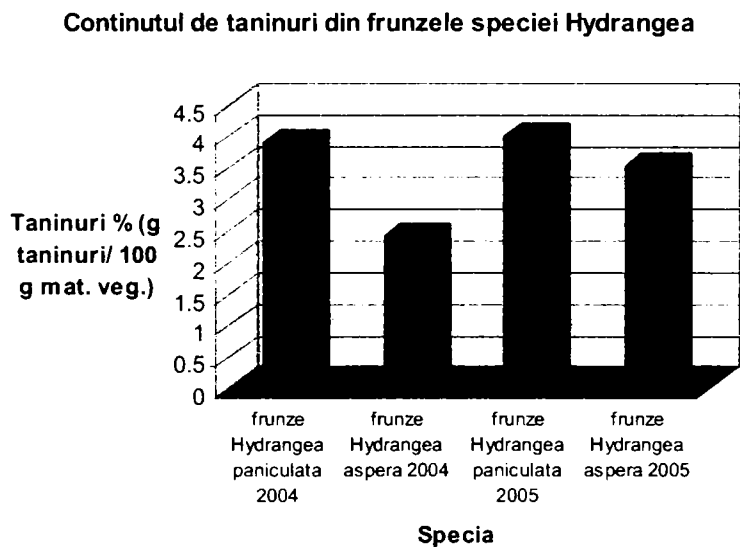


Figura 25. Variația conținutului de taninuri pentru frunze din specia Hydrangea.

Rezultate și discuții:

▪ Prezența **flavonoidelor** la cele două specii a fost studiată atât sub aspect calitativ (reacții de culoare, spectroscopie IR, cromatografie în strat subțire, cromatografie de lichide de înaltă performanță) cât și sub aspect cantitativ (metoda spectrofotometrică).

Sub aspectul cantitativ, conținutul de flavonoide a fost determinat pentru materialul vegetal colectat în anii 2003, 2004 și 2005. Conținutul de flavonoide a variat și în funcție de condițiile climatice a anilor de colectare a materialului vegetal, fiind cuprins între valorile 2,226- 2,634 (% rutină) pentru frunze de *Ziziphus*, între 0,168 – 0,374 (% rutină) pentru fructe de *Ziziphus*; între 1,752 – 2,278 (% rutină) pentru frunze de *Hydrangea paniculata*; între 0,448 – 2,363 (% rutină) pentru frunze de *Hydrangea aspera*.

▪ **Polifenolii** de tip catechol din frunze și fructe de *Ziziphus jujuba* și *Ziziphus lotus* și din frunzele de *Hydrangea paniculata* și *Hydrangea aspera* au fost evidențiați prin cromatografie în strat subțire, respectiv au fost dozați cantitativ.

Cercetările realizate indică un conținut mare de polifenoli de tip catechol în jur de 8- 13,0 %, în frunze de *Ziziphus jujuba* din 2004 și frunze de *Ziziphus lotus* 2004. Conținutul cel mai mare de polifenoli de tip catechol a fost determinat în fructele de *Ziziphus jujuba* din anul 2003 și în fructele de *Ziziphus jujuba* din 2004, iar conținutul de polifenoli cel mai scăzut s-a identificat în materialul vegetal din anul 2005, an în care temperatura medie anuală a fost mai scăzută și cantitatea totală de precipitații a fost mai ridicată.

▪ Prezența **antocianidinelor** în varietățile genurilor *Ziziphus* și *Hydrangea* a fost studiată atât sub aspect calitativ cât și sub aspect cantitativ.

Analiza cantitativă a evidențiat, cantitatea de antocianidine exprimată ca mg cianidină / 100 g material vegetal astfel:

- între 30 – 70 mg pentru frunze de *Ziziphus jujuba*.
- între 14 – 20 mg pentru fructe de *Ziziphus jujuba*;
- între 65 – 67 mg pentru frunze de *Ziziphus lotus*;
- între 24 – 36 mg pentru fructe de *Ziziphus lotus*.

▪ Prezența **taninurilor** la speciile studiate indică faptul că, cantitatea de taninuri exprimată ca taninuri % (g taninuri / 100 g material vegetal) variază astfel:

- între 3 – 5 %, pentru frunze de *Ziziphus jujuba*;
- între 3 – 4 %, pentru frunze de *Ziziphus lotus*;
- între 3 – 4 %, pentru frunze de *Hydrangea paniculata*;
- între 2 – 4 %, pentru frunze de *Hydrangea aspera*.

II.3.5. Determinarea activității antioxidante a extractelor de *Ziziphus* și *Hydrangea*

Determinarea activității antioxidante s-a realizat prin mai multe metode, pentru a urmări comparativ activitatea antioxidantă a extractelor și pentru a stabili care este metoda cea mai eficientă de determinare a activității antioxidante. S-au aplicat 2 metode de determinare a activității antioxidante:

1. Metoda cu permanganat de potasiu [138]
2. Metoda DPPH [144-148]

II.3.5.1. Determinarea activității antioxidante prin metoda cu permanganat de potasiu

S-a studiat capacitatea antioxidantă globală a extractelor apoase de *Ziziphus* și *Hydrangea*, urmărind activitatea antioxidantă totală a amestecului de compuși cu caracter reducător aflați în aceste extracte.

Determinarea activității antioxidante se bazează pe reacția de oxidare a substanțelor organice cu caracter reducător, aflate în extractele de plante, de către permanganat de potasiu, în urma căreia se produce decolorarea soluției de permanganat. Capacitatea antioxidantă este invers proporțională cu timpul de decolorare a soluției de permanganat de o anumită concentrație [138].

În vederea determinării activității antioxidante s-a utilizat ca material vegetal fructe și frunze de *Ziziphus jujuba*, fructe și frunze de *Ziziphus lotus*, frunze de *Hydrangea paniculata* și frunze de *Hydrangea aspera*, recoltat în anii 2004 și 2005.

Ca substanță etalon s-a utilizat acidul ascorbic (Merck).

Obținerea extractelor apoase:

4 g material vegetal uscat mărunțit în prealabil a fost supus extracției cu 40 mL apă timp de 70 ore la 5°C. După filtrare, extractele au fost păstrate la temperatură de 5°C până în momentul efectuării analizei.

Metode de determinare a activității antioxidante a extractelor apoase

Metoda A. Principiul metodei constă în determinarea vitezei de decolorare a unei soluții de KMnO_4 0,1 N în mediu acid, în care s-a adăugat extract, utilizând ca soluție etalon un antioxidant cunoscut, și anume o soluție de acid ascorbic 1% [138].

Mod de lucru:

Într-un pahar Erlenmeyer se introduc 10 mL soluție de KMnO_4 0,1 N, 8 mL apă distilată, 1 mL soluție H_2SO_4 20% și 1 mL extract apos. Concomitent cu pipetarea extractului se pornește cronometrul, măsurându-se timpul de decolorare al soluției de permanganat de potasiu. S-au efectuat analize pentru mai multe volume de extract.

Tabelul 44. Activitatea antioxidantă a extractelor apoase din materialul vegetal recoltat în anul 2004.

Extract de:	Volumul de extract adăugat [mL]	Timpul de decolorare la 20°C [sec]
<i>Ziziphus jujuba</i> - fructe 2004	1	616
	2	221
	3	100
	5	53
<i>Ziziphus jujuba</i> - frunze 2004	1	60
	2	18
	3	2
	5	instantaneu
<i>Ziziphus lotus</i> - fructe 2004	1	362
	2	180
	3	67
	5	41
<i>Ziziphus lotus</i> - frunze 2004	1	38
	2	2
	3	instantaneu
	5	instantaneu
<i>Hydrangea paniculata</i> - frunze 2004	1	362
	2	138
	3	54
	5	11
<i>Hydrangea aspera</i> -frunze 2004	1	210
	2	180
	3	53
	5	9

Tabelul 45. Activitatea antioxidantă a extractelor apoase din materialul vegetal recoltat în anul 2005.

Extract de:	Volumul de extract adăugat [mL]	Timpul de decolorare la 20°C [sec]
<i>Ziziphus jujuba</i> - fructe 2005	1	327
	2	122
	3	40
	5	22
<i>Ziziphus jujuba</i> - frunze 2005	1	19
	2	4
	3	2
	5	instantaneu

<i>Ziziphus lotus</i> - fructe 2005	1	158
	2	62
	3	50
	5	25
<i>Ziziphus lotus</i> - frunze 2005	1	16
	2	4
	3	2
	5	instantaneu
<i>Hydrangea paniculata</i> - frunze 2005	1	63
	2	14
	3	4
	5	2
<i>Hydrangea aspera</i> -frunze 2005	1	61
	2	14
	3	5
	5	1

Capacitatea antioxidantă a extractelor apoase s-a raportat la etalon, soluție de acid ascorbic 1%, măsurându-se timpul de decolorare a soluției violete de KMnO_4 pentru diferite diluții ale soluției etalon. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 46.

Tabelul 46. Activitatea antioxidantă pentru diferite diluții ale soluției etalon de acid ascorbic.

Diluția soluției 1% acid ascorbic v/v	Volumul soluției de acid ascorbic adăugat [mL]	Timpul de decolorare la 20°C [sec.]
1:4	2	260
	3	2
	5	instantaneu
1:5	2	300
	3	25
	5	2
1:6	2	410
	3	219
	5	5

Analizând rezultatele obținute se observă că timpul de decolorare cel mai scurt, adică capacitatea antioxidantă cea mai mare o prezintă extractele din frunze de *Ziziphus*. În cazul extractelor din frunze de *Ziziphus jujuba* și *Ziziphus lotus*, rezultatele cele mai concludente s-au obținut folosindu-se pentru analiză 3 mL extract apos, iar capacitatea antioxidantă a acestor extracte este comparabilă cu soluția de acid ascorbic 1%, diluție 1:4. Pentru extractele din fructe de *Ziziphus jujuba* și *Ziziphus lotus*, rezultatele cele mai concludente s-au obținut folosindu-se

5 mL extract, iar capacitatea antioxidantă a extractelor este comparabilă cu soluția de acid ascorbic 1%, diluție 1:6.

Pentru extractele din frunze de *Hydrangea aspera* și *Hydrangea paniculata*, rezultate concludente și comparabile se obțin folosindu-se pentru analiză 5 mL extract apos, iar capacitatea antioxidantă a acestor extracte este comparabilă cu soluția de acid ascorbic 1%, diluție 1:6.

În cazul speciei *Ziziphus jujuba*, extractele din frunze au activitate antioxidantă mai ridicată decât cele din fructe.

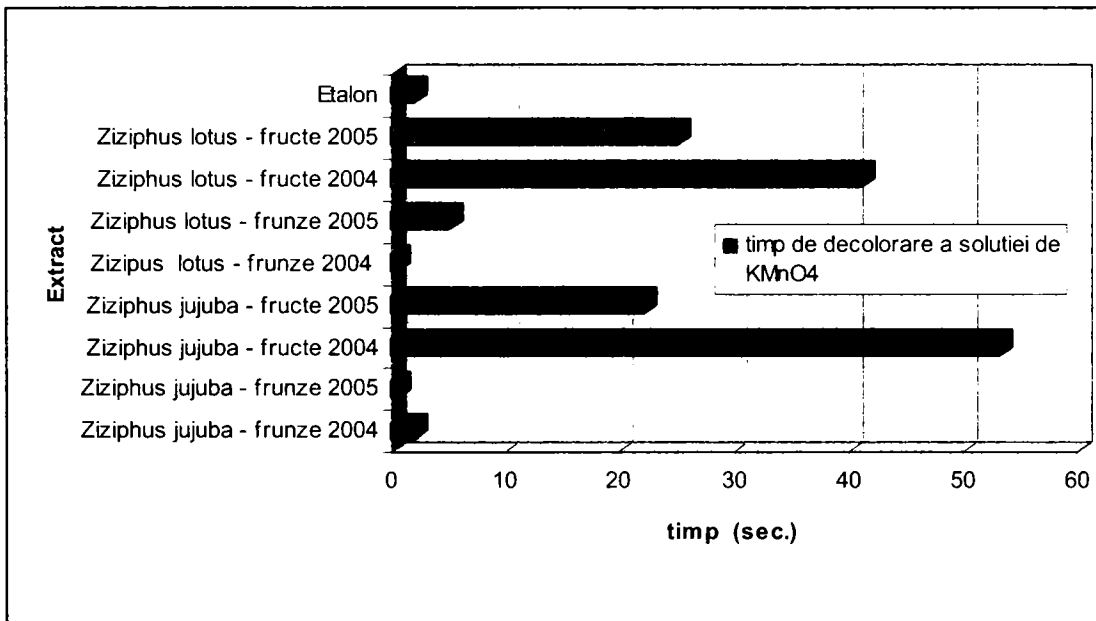


Figura 26. Estimarea capacității antioxidante în funcție de timpul de decolorare a soluției de $KMnO_4$ pentru extractele de *Ziziphus*

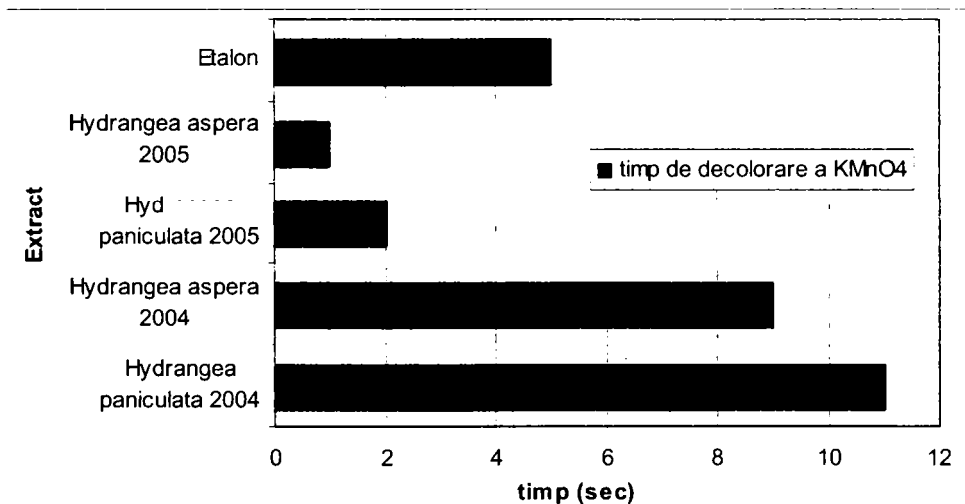


Figura 27. Estimarea capacității antioxidante în funcție de timpul de decolorare a soluției de $KMnO_4$ pentru extractele de *Hydrangea*

Reprezentând comparativ activitatea antioxidantă a extractelor studiate se poate concluziona că extractele din frunze de *Ziziphus lotus* având cel mai mic timp de decolorare au o capacitate antioxidantă mare și în același timp caracteristici antioxidante apropiate față de cele din frunze de *Ziziphus jujuba*. În schimb activitatea antioxidantă a extractelor din frunze de *Hydrangea* este mai mică comparativ cu extractele din frunze de *Ziziphus*, și mult mai ridicată față de extractele din fructe de *Ziziphus*, care prezintă cel mai mare timp de decolorare a soluției de permanganat de potasiu, deci capacitate antioxidantă mică.

Metoda B – Metoda spectrofotometrică de analiză a activității antioxidante

Mod de lucru:

Volum de câte 0,2 mL (v mL) extracte apoase din frunze de *Hydrangea paniculata* și din fructe *Ziziphus jujuba* (obținute conform paragrafului II.2.1.) s-au adăugat unui amestec format din:

1,5 mL KMnO_4 0,01 M; 3,5 mL H_2SO_4 1 N; 20-v mL apă distilată.

Momentul adăugării extractului a fost considerat momentul zero. Semnalul spectrofotometric a fost înregistrat la 503 nm cu ajutorul unui spectrofotometru UV-VIS Carl Zeiss Yena prevăzut cu o interfață Axxion Chromatography pentru determinarea activității antioxidante.

Extractele au fost păstrate la temperatură de 5°C și au fost analizate pe o perioadă de 40 de zile. Variația concentrației de permanganat de potasiu a fost determinată pe baza unei curbe de etalonare (figura 28).

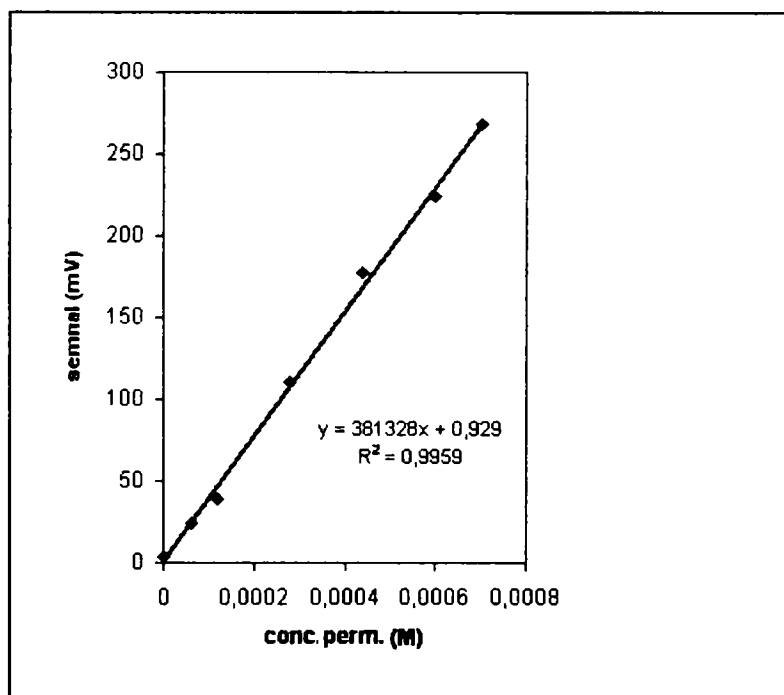


Figura 28. Curba de etalonare - permanganat de potasiu

Pe baza acestei curbe, concentrația de permanganat de potasiu (x) poate fi determinată cu formula:

$$x = \frac{y - 0,929}{381328}$$

S-a determinat activitatea antioxidantă a extractelor în zilele 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24, și 32 și 40 de la prepararea lor.

Activitatea antioxidantă a extractelor de *Ziziphus jujuba* și *Hydrangea paniculata* sunt prezentate în figurile 29 și 30.

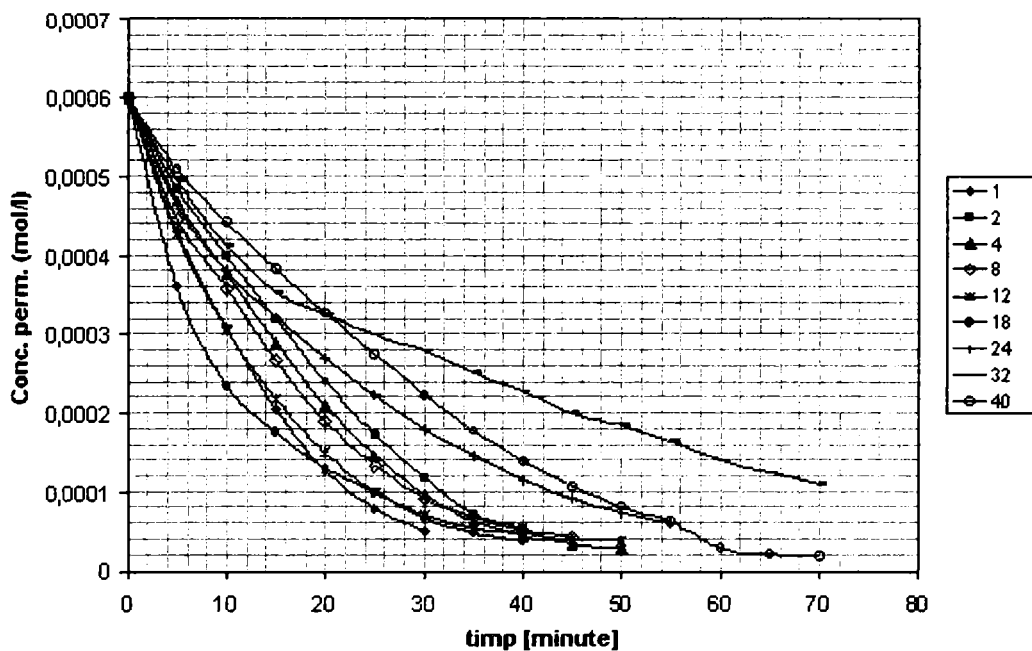


Figura 29. Variația concentrației de permanganat de potasiu după adăugarea de 0,2 mL extract din *Ziziphus jujuba* (E1) la 1,2, 4, 8, 12, 18, 24, 32 și 40 zile de la prepararea extractului

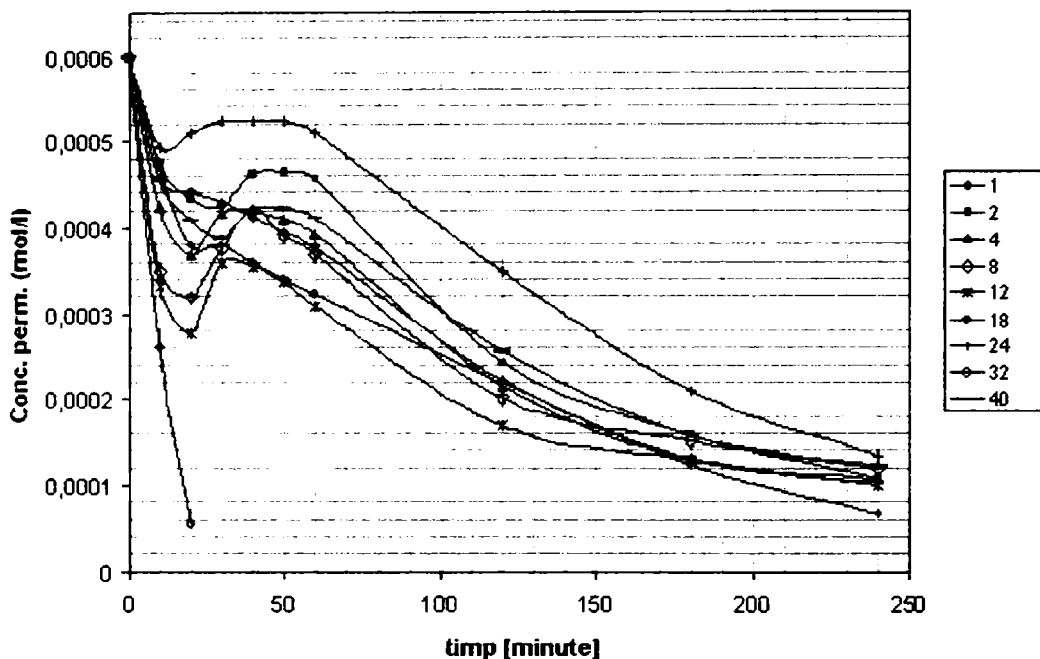


Figura 30. Variația concentrației de permanganat de potasiu după adăugarea de 0,2 mL extract din frunze de *Hydrangea paniculata* (E2) la 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24, 32 și 40 zile de la prepararea extractului

Pentru a compara cantitativ activitatea antioxidantă am propus următoarea formulă de calcul:

$$A_{50} = \frac{t_{s\ standard}}{t_{proba}} \cdot \frac{C_{s\ standard}}{m_{mat.veg.}} \cdot \frac{V_{s\ standard}}{V_{proba}} \cdot V_{extract}$$

A_{50} - activitatea antioxidantă, exprimată ca timpul în care proba determină scăderea concentrației agentului oxidant (permanganat de potasiu) la jumătate, comparativ cu cea a unui standard (acid ascorbic) (mmol equivalent standard / g material vegetal)

t_{proba} - timpul în care proba induce reducerea la jumătate a concentrației de permanganat de potasiu la jumătate (min)

$t_{standard}$ - timpul în care standardul (acid ascorbic) induce reducerea la jumătate a concentrației de permanganat de potasiu (min) [0,65 minute după cum se constată din figura 31]

$C_{standard}$ - concentrația standardului (acid ascorbic) (mmol/mL) [0,01 mmol/mL]

$m_{mat.veg.}$ - masa (g) de material vegetal supus extracției [4 g]

V_{proba} - volumul de extract supus analizei [0,2 mL]

V_{standard} - volumul de standard supus analizei [1 mL]

V_{extract} - volumul (mL) de extract obținut [40 mL]

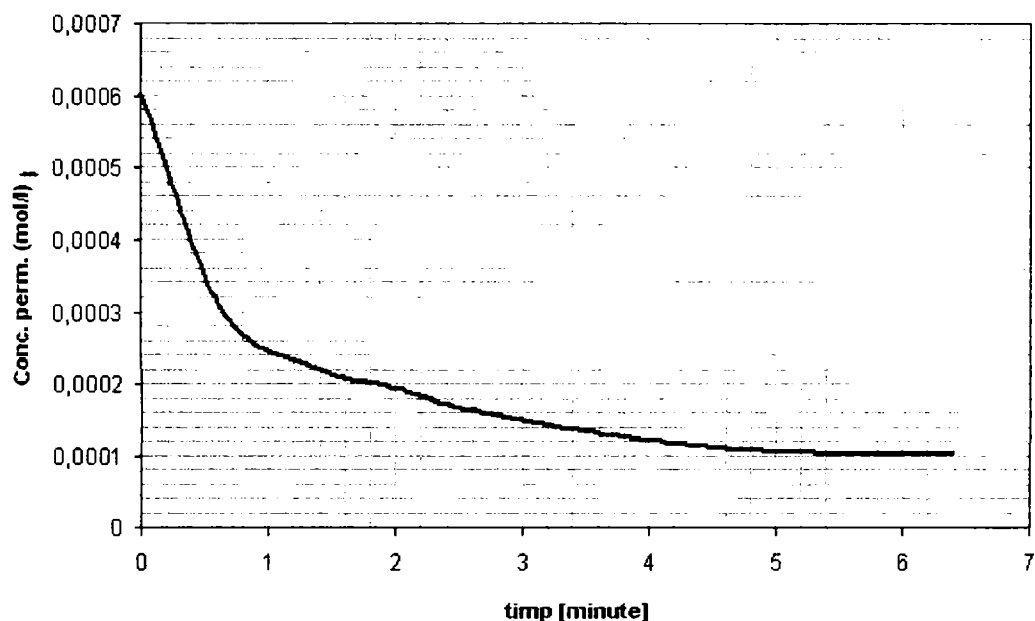


Figura 31. Variația concentrației de permanganat de potasiu după adăugarea de 1 mL acid ascorbic 0,01 mol/l (mmol/mL)

Variația valorilor A_{50} este prezentată în tabelul 47.

Tabelul 47. Valorile A_{50} pentru extractele studiate

Ziua	A_{50} (mmol echivalent acid ascorbic / g material vegetal)	
	<i>Ziziphus jujuba</i>	<i>Hydrangea paniculata</i>
1	0.1935	0.0228
2	0.1231	0.0200
4	0.1401	0.0223
8	0.1563	0.0245
12	0.1935	0.0317
18	0.2902	0.0278
24	0.1195	0.0145
32	0.0813	0.2257
40	0.0903	0.0200

Capacitatea antioxidantă globală fiind invers proporțională cu timpul de decolorare a soluției de KMnO_4 este invers proporțională cu timpul în care concentrația soluției de KMnO_4 ajunge la o valoare minimă.

După cum se poate observa din cele două grafice (figurile 29 și 30) în cazul extractului de *Hydrangea paniculata* se observă o creștere a concentrației de permanganat de potasiu în ziua 40, deci o activitate antioxidantă scăzută, comparativ cu extractul de *Ziziphus jujuba*, care prezintă o activitate antioxidantă ridicată chiar și după ziua 40 de la prepararea extractului. În primul caz datorită activității antioxidante scăzute a extractului, are loc reducerea Mn(VII) la Mn(IV) cu formarea precipitatului de MnO_2 , iar în cazul al doilea pentru extractul de *Ziziphus jujuba* cu activitate antioxidantă ridicată, are loc reducerea Mn(VII) la Mn(II). Există însă și o altă posibilitate și anume să se datoreze unor procese fermentative probabile care s-au produs în extract.

Rezultatele obținute duc la concluzia că extractul din fructe de *Ziziphus jujuba* are activitate antioxidantă mai mare decât extractul din frunze de *Hydrangea paniculata*.

Rezultatele obținute au constituit obiectul unei lucrări științifice [229].

Aceeași metodă care se bazează pe reacția de reducere a permanganatului de potasiu și care urmărește decolorarea în timp a soluției de permanganat s-a folosit pentru determinarea activității antioxidante a aceluși extracte (din frunze de *Hydrangea paniculata*-E1 și din fructe de *Ziziphus jujuba*- E2) care au fost păstrate în condiții diferite.

Mod de lucru: Volume v , funcție de intensitatea activității antioxidante determinate prin metoda anterioară din extracte apoase (obținute conform paragrafului II.2.1.) diluate 1/10 din *Ziziphus jujuba* ($v = 0,2$ mL), respectiv *Hydrangea paniculata* ($v = 0,6$ mL) s-au adăugat unui amestec format din: 1,5 mL $KMnO_4$ 0,01 M; 3,5 mL H_2SO_4 2M; 10- v mL apă distilată.

Momentul adăugării extractului este considerat momentul zero. Semnalul spectrofotometric a fost înregistrat la 503 nm cu ajutorul unui spectrofotometru prevăzut cu o interfață Axxion Chromatography pentru determinarea activității antioxidante.

Pentru a urmări variația activității antioxidante în condiții diferite, extractul de *Hydrangea paniculata* a fost păstrat la temperatura de 20°C, iar cel de *Ziziphus jujuba* la 5°C. Variația concentrației de permanganat de potasiu a fost determinată pe baza curbei de etalonare din figura 31.

Pentru extractul de *Hydrangea paniculata* s-a urmărit variația concentrației de permanganat de potasiu la adăugarea de 0,6 mL extract după o zi, respectiv 40 zile de la prepararea extractului, și pentru extractul de *Ziziphus jujuba*, variația concentrației de permanganat de potasiu la adăugarea de 0,2 mL extract după 2,4,18 și 40 zile de la preparare.

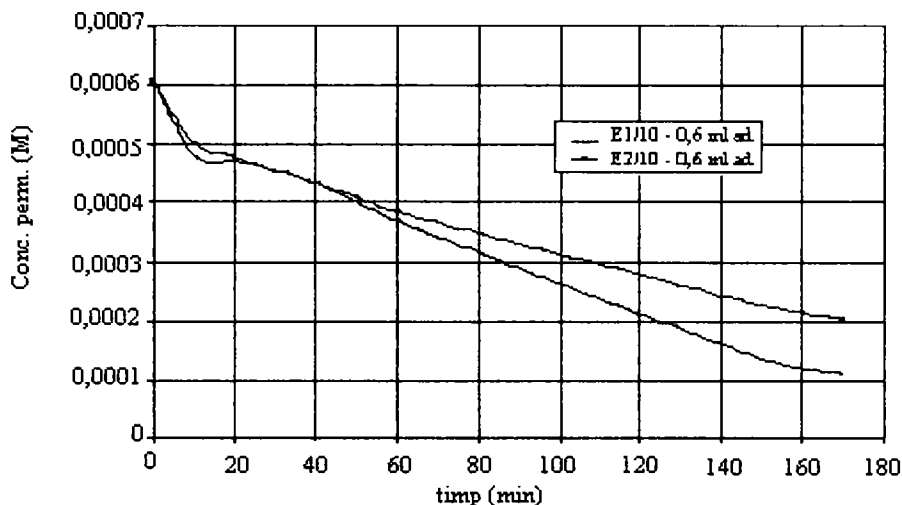


Figura 32. Variația concentrației de permanganat de potasiu după adăugarea de 0,6 mL extract *Hp frz* (E1) – diluat 1/10 și *ZJ fru* (E2) diluat 1/10- în ziua 1.

Comparativ se poate observa cum concentrația de permanganat scade în ziua 40 (figura 33). Extractele de *Ziziphus jujuba* prezintă o scădere a concentrației de permanganat de potasiu, ceea ce semnifică că activitatea lor antioxidantă este ridicată și de aceea a fost suficientă numai adăugarea a numai 0,2 mL extract.

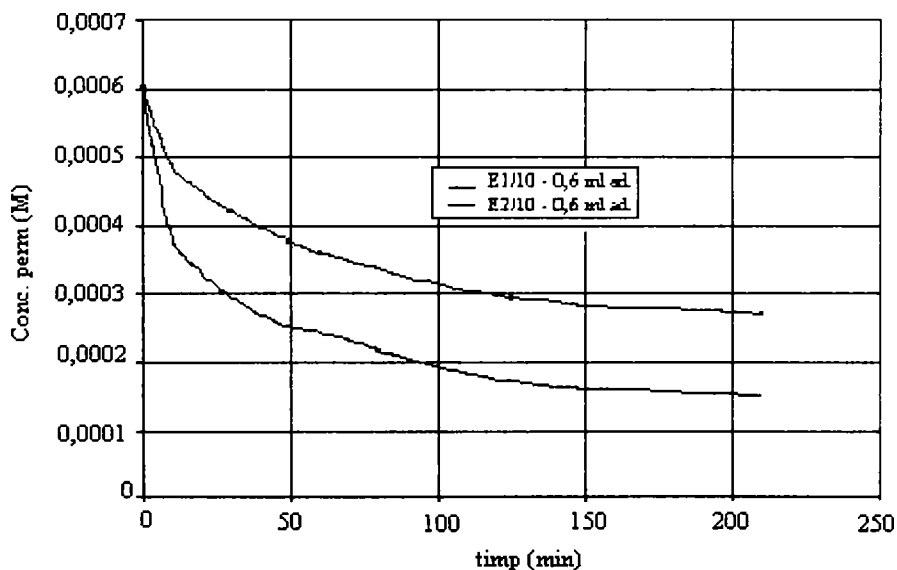


Figura 33. Variația concentrației de permanganat de potasiu după adăugarea de 0,6 mL extract *ZJ fru* (E2) – diluat 1/10 și *Hp frz* (E1) diluat 1/10 - în ziua 40.

De asemenea s-a urmărit evoluția comparativă a extractului de *Ziziphus jujuba* după 2,4,18,40 zile de la prepararea extractului (figura 34).

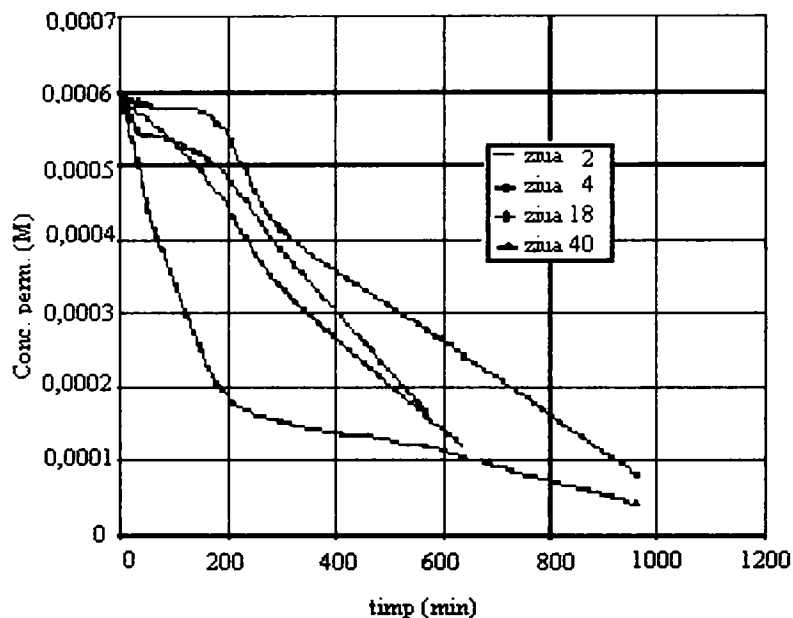


Figura 34. Variația concentrației de permanganat de potasiu după adăugarea de 0,2 mL extract ZJ fru (E2) - diluat 1/10 - în ziua 2, 4, 18 și 40.

În cazul extractului de *Hydrangea paniculata* diluat 1/10 la adăugarea unui volum de 0,5 mL după 2,4,18 și 40 zile de la prepararea extractului evoluția activității antioxidante diferă (figura 35). Se observă o creștere a concentrației de KMnO_4 în ziua 40, deci o activitate antioxidantă scăzută.

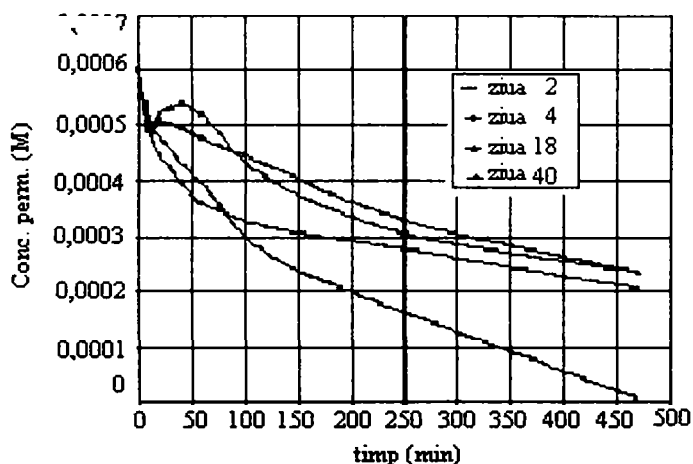


Figura 35. Variația concentrației de permanganat de potasiu după adăugarea de 0,6 mL extract E1 (*Hydrangea paniculata*) - diluat 1/10 - în ziua 2, 4, 18 și 40

Probabil în primul caz, pentru extractul de *Ziziphus jujuba*, scăderea rapidă a concentrației de KMnO_4 se datorează activității antioxidante ridicate a extractului, când are loc reducerea Mn(VII) la Mn (IV), iar în cazul al doilea pentru extractul de *Hydrangea paniculata*, când activitatea antioxidantă este scăzută are loc reducerea Mn(VII) la Mn(V) cu formarea precipitatului de MnO_2 .

Scăderea activității antioxidante în ziua 40 este de asemenea determinată de procesele fermentative care au loc în cazul extractului de *Hydrangea paniculata*.

Exprimarea cantitativă a activității antioxidante se face în funcție de timpul de reducere a concentrației de KMnO_4 la jumătate A_{50} , folosind o formulă asemănătoare cu cea propusă anterior, dar în care se ține seama și de diluție (Dil).

$$A_{50} = \frac{t_{s \text{ tan dard}}}{t_{\text{proba}}} \cdot \frac{C_{s \text{ tan dard}}}{m_{\text{matvegetal}}} \cdot \frac{V_{s \text{ tan dard}}}{V_{\text{proba}}} \text{Dil} \cdot \frac{V_{\text{extract}}}{100}$$

Tabelul 48. Valorile A_{50} pentru extractele studiate:

Extract	A_{50} Ziua 2	A_{50} Ziua 4	A_{50} Ziua 18	A_{50} Ziua 40
<i>Hydrangea paniculata</i>	0.0001	0.000043	0.00005	0.000076
<i>Ziziphus Jujuba</i>	0.00011	0.000097	0.000076	0.00032

Pe baza rezultatelor obținute se poate afirma că extractul din fructe de *Ziziphus jujuba* are activitate antioxidantă mai mare decât extractul din frunze de *Hydrangea paniculata*. O cauză a activității antioxidante reduse a extractului de *Hydrangea paniculata* sunt și procesele fermentative care au avut loc și au dus la dezvoltarea unor mucegaiuri superioare în extract vizibile la microscop.

Rezultatele obținute au constituit obiectul unei lucrări științifice [230].

II.3.5.2. Determinarea activității antioxidante prin metoda cu DPPH

Determinarea activității antioxidante pentru extractele metanolice din fructe și frunze de *Ziziphus jujuba*, frunze și fructe de *Ziziphus lotus*, frunze de *Hydrangea paniculata* și frunze de *Hydrangea aspera* s-a realizat și prin metoda spectrofotometrică ce utilizează radicali liberi de 1,1 difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

Comparativ s-a determinat activitatea antioxidantă pentru standarde, și anume pentru quercetină, rutină, acid galic, acid ascorbic.

Principiul metodei:

Metoda are la bază reacția dintre molecula de DPPH, care este caracterizată ca fiind un radical liber, cu o substanță care poate dona protoni, formând astfel forma redusă. Substanța care poate dona protonul în acest caz este molecula de antioxidant prezentă în extractele supuse analizei, respectiv standardele utilizate.

Metoda cu DPPH-ul poate fi folosită pentru probele solide sau lichide și nu este specifică unui anumit antioxidant.

DPPH-ul este folosit pentru a testa abilitatea antioxidantilor de a acționa ca fixatori ai radicalilor liberi sau ca donori de protoni. Dacă soluția de DPPH de culoare mov este amestecată cu o substanță ce poate dona un proton ia naștere forma redusă cu pierderea culorii violet, iar reacția redox la grupa picril prezentă încă va determina o colorație galben pal. Electronul neîmperecheat al radicalului liber DPPH absoarbe la $\lambda_{\max}=517$ și are culoarea mov, iar culoarea se modifică de la mov la galben când electronul neîmperecheat al DPPH-ului se cuplează cu un hidrogen de la antioxidantul captator al radicalilor liberi, formându-se astfel forma redusă, DPPH-H [231].

Materialul vegetal folosit pentru obținerea extractelor și analiză a fost frunze și fructe și *Ziziphus jujuba* (ZJ frz, ZJ fru), frunze și fructe de *Ziziphus lotus* (ZL frz, ZL fru), frunze de *Hydrangea paniculata* (Hp frz) și frunze de *Hydrangea aspera* (Ha frz), recoltat în anii 2004 și 2005.

Obținerea extractelor:

1 g material vegetal uscat mărunțit în prealabil a fost supus extracției cu 100 mL metanol timp de 24 ore la 5°C. După filtrare, extractele au fost păstrate la temperatură de 5°C până în momentul efectuării analizei.

Mod de lucru:

Într-o eprubetă s-au introdus 4 mL soluție metanolică DPPH 20 mg/L și 0,25 mL extract vegetal și s-a urmărit continuu spectrofotometric variația absorbanței la 517 nm timp de 60 de minute la temperatura camerei. Rezultatele experimentale sunt prezentate în tabelele 49 și 50, iar reprezentarea grafică a variației absorbanței funcție de timp este redată în figurile 36 și 37.

Tabelul 49 . Valorile absorbantelor pentru extractele vegetale 2004.

Timp [min]	ZJ frz	ZJ fru	ZL frz	ZL fru	Hp frz	Ha frz
0	1,0436	1,0436	1,0436	1,0436	1,0436	1,4036
1	0,8976	0,9311	0,9875	0,9984	0,8054	0,8698
5	0,8604	0,9173	0,9666	0,9886	0,7504	0,8286
10	0,8425	0,9126	0,9538	0,9830	0,7103	0,7982
15	0,8314	0,9090	0,9463	0,9789	0,6802	0,7731
20	0,8235	0,9071	0,9418	0,9754	0,6580	0,7565
25	0,8175	0,9047	0,9371	0,9718	0,6418	0,7392
30	0,8123	0,9034	0,9339	0,9680	0,6276	0,7285
35	0,8077	0,9010	0,9311	0,9668	0,6166	0,7180
40	0,8032	0,9029	0,9287	0,9654	0,6075	0,7096
45	0,8003	0,8984	0,9258	0,9640	0,5987	0,7039
50	0,7970	0,8980	0,9238	0,9630	0,5931	0,6969
55	0,7946	0,8975	0,9215	0,9618	0,5879	0,6928
60	0,7914	0,8971	0,9196	0,9615	0,5821	0,6887

Tabelul 50. Valorile absorbantelor pentru extractele vegetale 2005.

Timp [min]	ZJ frz	ZJ fru	ZL frz	ZL fru	Hp frz	Ha frz
0	0,7261	0,7261	0,7261	0,7261	0,7261	0,7261
1	0,7000	0,7206	0,6947	0,6984	0,6262	0,5829
5	0,6696	0,7007	0,6681	0,6808	0,5691	0,5327
10	0,6572	0,6917	0,6611	0,6698	0,5445	0,5215
15	0,6494	0,6866	0,6552	0,6624	0,5307	0,5116
20	0,6425	0,6815	0,6502	0,6571	0,5208	0,5027
25	0,6349	0,6775	0,6468	0,6528	0,5131	0,4960
30	0,6306	0,6751	0,6439	0,6474	0,5035	0,4888
35	0,6256	0,6741	0,6406	0,6443	0,4965	0,4823
40	0,6211	0,6694	0,6390	0,6403	0,4895	0,4762
45	0,6172	0,6675	0,6362	0,6368	0,4830	0,4709
50	0,6133	0,6657	0,6354	0,6338	0,4770	0,4664
55	0,6084	0,6635	0,6348	0,6309	0,4708	0,4598
60	0,6057	0,6618	0,6322	0,6275	0,4659	0,4560

unde: ZJ frz = extract metanolic din frunze de *Ziziphus jujuba*
 ZJ fru = extract metanolic din fructe de *Ziziphus jujuba*
 ZL frz = extract metanolic din frunze de *Ziziphus lotus*
 ZL fru = extract metanolic din fructe de *Ziziphus lotus*
 Hp frz = extract metanolic din frunze de *Hydrangea paniculata*
 Ha frz = extract metanolic din frunze de *Hydrangea aspera*

Activitatea antioxidantă corespunzătoare procentului de DPPH a fost calculată cu formula [148]:

$$\% \text{Activitate antioxidantă} = \frac{A_{(t=0)} - A_{(t=60)}}{A_{(t=0)}} \cdot 100$$

unde: $A_{(t=0)}$ = absorbanța probei la $t = 0$ min
 $A_{(t=60)}$ = absorbanța probei la $t = 60$ min

În cazul extractelor vegetale recoltate în anul 2004, valorile sunt redată în tabelul 51, iar pentru extractele vegetale din 2005 în tabelul 52.

Tabelul 51. Activitatea antioxidantă a extractelor vegetale 2004.

Extracte din materialul vegetal din anul 2004	Activitatea antioxidantă [%]
ZJ frz	24,16
ZJ fru	14,04
ZL frz	11,88
ZL fru	7,87
Hp frz	44,22
Ha frz	34,01

Tabelul 52. Activitatea antioxidantă a extractelor vegetale 2005.

Extracte din materialul vegetal din anul 2005	Activitatea antioxidantă [%]
ZJ frz	16,58
ZJ fru	8,86
ZL frz	12,93
ZL fru	13,58
Hp frz	35,84
Ha frz	37,20

Din reprezentarea grafică a absorbăței soluțiilor de DPPH cu adaos de extracte din familia Angiospermelor se poate observa că cea mai mare capacitate antioxidantă apare în cazul extractelor obținute din materialul vegetal din anul 2004, și anume activitatea antioxidantă cea mai mare o are extractul din frunze de *Hydrangea paniculata*.

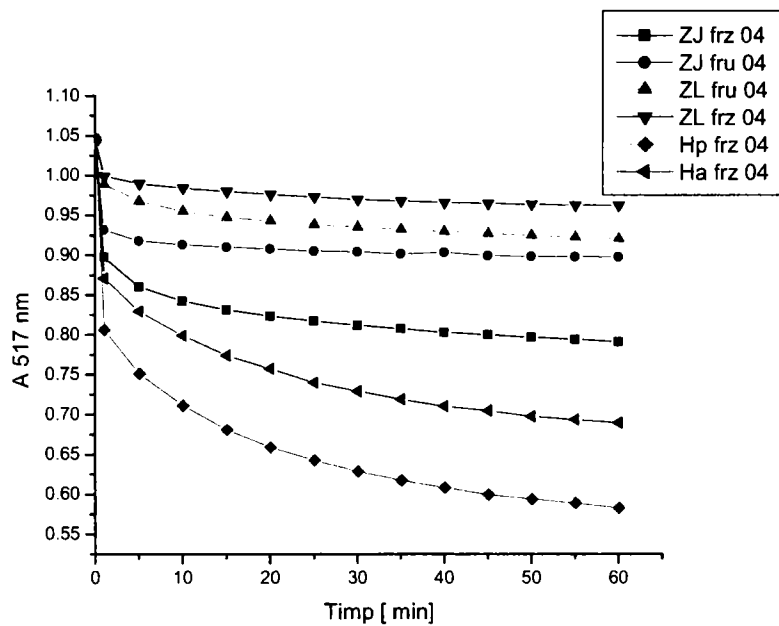


Figura 36. Capacitatea de captare a radicalului DPPH pentru extractele vegetale 2004.

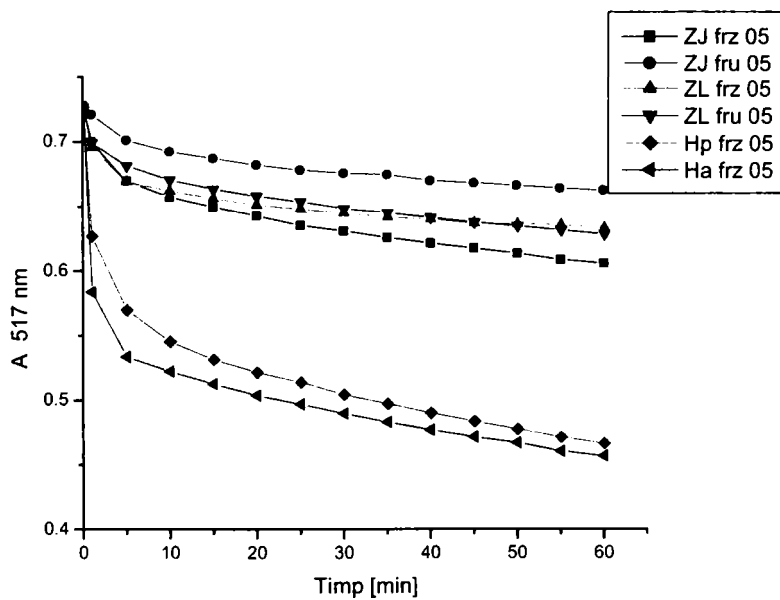


Figura 37. Capacitatea de captare a radicalului DPPH pentru extractele vegetale 2005.

Activitatea antioxidantă a extractelor obținute din material vegetal din anul 2004 variază astfel:

Hydrangea paniculata frunze > *Hydrangea aspera* frunze > *Ziziphus jujuba* frunze > *Ziziphus jujuba* fructe > *Ziziphus lotus* frunze > *Ziziphus lotus* fructe

În cazul extractelor obținute din materialul vegetal din anul 2005, activitatea antioxidantă cea mai mare o are extractul din frunze de *Hydrangea aspera*, iar pentru celelalte activitatea antioxidantă variază:

Hydrangea aspera frunze > *Hydrangea paniculata* frunze > *Ziziphus jujuba* frunze > *Ziziphus lotus* fructe > *Ziziphus lotus* frunze > *Ziziphus jujuba* fructe

Încercarea de a realiza o corelare între activitatea antioxidantă a diferitelor extracte și conținutul total de flavonoide, exprimat ca % rutină nu respectă seria în totalitate, ci doar pentru aceeași parte anatomică a plantei aparținând aceleași specii, respectiv familii ca de exemplu frunze.

Hp frz 2004 (% rutină 7,27) > Ha frz 2004 (% rutină 1,34)

ZJ frz 2004 (% rutină 2,63) > ZL frz 2004 (% rutină 2,51)

Pentru fructe însă activitatea antioxidantă variază invers față de conținutul % rutină:

ZJ fru 2004 (% rutină 0,3) > ZL fru 2004 (% rutină 0,34)

Acest lucru ar putea fi explicat, fie de diferența relativ mică, fie de faptul că în fructe sunt prezenți polifenoli în cantități mai mari, ceea ce ar putea avea influențe serioase.

Comparativ s-a determinat activitatea antioxidantă pentru standarde, câte 0,25 mL soluții de quercetină, rutină, acid galic, acid ascorbic (1 mg/mL). Valorile absorbantei sunt redată în tabelul 53, iar reprezentarea grafică a variației extincției funcție de timp este redată în figura 38.

Tabelul 53. Valorile absorbantei pentru soluțiile de quercetină, rutină, acid ascorbic și acid galic:

Timp [min]	Quercetina 1mg/mL	Rutina 1 mg/mL	Acid ascorbic 1 mg/mL	Acid galic 1 mg/mL
0	0,8571	0,8087	0,8571	0,8571
1	0,3777	0,55	0,5827	0,057
5	0,2065	0,5231	0,5693	0,0544
10	0,1605	0,5097	0,5649	0,0536
15	0,1250	0,5011	0,5615	0,0534
20	0,1182	0,4941	0,5593	0,0525
25	0,0881	0,4897	0,5581	0,0524
30	0,078	0,4867	0,5567	0,0521
35	0,0714	0,4845	0,5554	0,0518
40	0,0686	0,4816	0,5545	0,0517
45	0,0673	0,4800	0,5529	0,0516
50	0,0676	0,4791	0,5527	0,0515
55	0,0659	0,4779	0,5526	0,0515
60	0,0653	0,4776	0,5519	0,0511

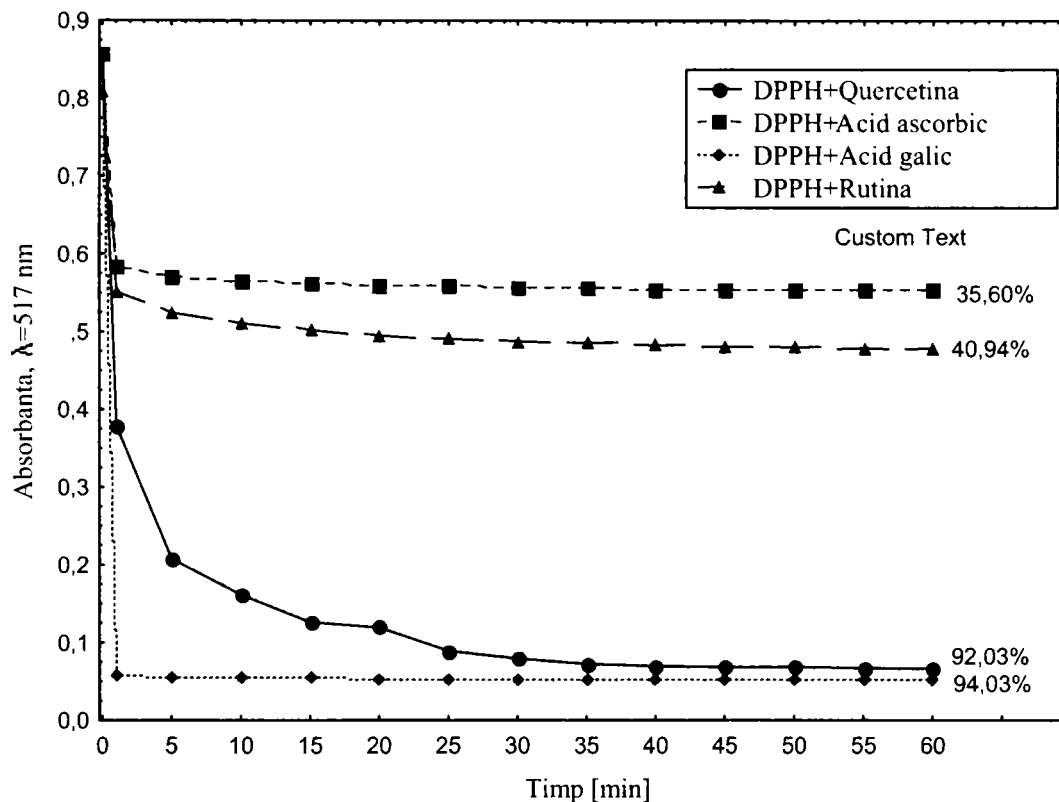


Figura 38. Capacitatea de captare a radicalului DPPH pentru standarde (valorile din capătul curbelor cinetice indică procentul de captare a radicalilor DPPH)

Activitatea antioxidantă corespunzătoare procentului de DPPH a fost calculată cu aceeași formulă [148].

Tabelul 54. Activitatea antioxidantă a standardelor

Standarde de concentrație 1 mg/mL	Activitatea antioxidantă [%]
Quercetina	92,38
Acid ascorbic	35,60
Acid galic	94,03
Rutina	40,94

Eficiența ca antioxidant a quercetinei (92,38%) și a acidului galic (94,03%) reiese atât din valorile activității antioxidante calculate cât și din faptul că soluția de DPPH cu adaos de quercetină, respectiv acid galic s-a decolorat de la mov la galben pal după 5 minute.

Activitatea antioxidantă în cazul standardelor variază aparent astfel:

Acid galic > Quercetina > Rutina > Acid ascorbic

În concluzie se poate afirma că, cea mai mare activitate antioxidantă, prezintă extractul de *Hydrangea paniculata* 2004, activitate antioxidantă aproape identică cu cea a standardului de rutină, iar extractul din frunze de *Hydrangea*

aspera 2005 prezintă activitate antioxidantă apropiată de cea a rutinei. Activitatea extractelor din frunze de *Hydrangea paniculata* 2005, *Hydrangea aspera* 2005, *Hydrangea aspera* 2004 este la fel de mare ca și cea a soluției de acid ascorbic 1 mg/mL, iar extractul de *Hydrangea paniculata* 2004 are activitate ușor mai ridicată decât a rutinei. Activitatea antioxidantă mai mică a extractelor comparativ cu quercetina este explicabilă, deoarece în plante, flavonoidele sunt prezente în special sub formă de glicozide.

II.4. Posibilitatea utilizării extractelor de *Hydrangea* și *Ziziphus* în diverse aplicații

În cadrul primei părți a cercetărilor experimentale proprii au fost stabilite condițiile pentru obținerea unor extracte apoase sau alcoolice de *Ziziphus jujuba* și *Hydrangea paniculata* pentru care au fost determinate tipul și conținutul de flavonoide, polifenoli și taninuri. Odată stabilit conținutul acestora în principii antioxidante, în partea a doua a contribuțiilor proprii s-au efectuat cercetări pentru a stabili:

- Posibilitatea folosirii extractelor ca antioxidanți pentru uleiurile vegetale (II.5.1);
- Capacitatea antioxidantă a flavonoidelor la nivel celular (II.5.2.);
- Efectul extractelor asupra unor parametri biochimici și asupra activității unor enzime la șobolani (II.5.3);
- Încorporarea extractelor din frunze de *Hydrangea paniculata*, respectiv din fructe de *Ziziphus jujuba* în diverse formulări farmaceutice (II.5.4.);
- Aplicații ale extractului din fructe de *Ziziphus jujuba* ca adaos în hrana animalelor (II.5.5).

II.4.1. Aplicarea extractelor vegetale de *Hydrangea paniculata* și *Ziziphus jujuba* ca antioxidanți ai uleiurilor vegetale

Oxidarea uleiurilor vegetale în special a celor de uz alimentar este o problemă care în prezent ridică numeroase discuții și una dintre cauzele majore ale scăderii valorii nutriționale a lipidelor alimentare. Pe de altă parte oxidarea uleiurilor limitează conservabilitatea lor în timp și conduce la produși de degradare oxidativă volatili și nevolatili, care le modifică fundamental calitățile organoleptice[232].

Antioxidanții sunt substanțe capabile de a întârzia sau inhiba autooxidarea, respectiv procesele de oxidare a diferitelor sisteme cu oxigen atmosferic sau specii chimice reactive derivate de la acesta. În mod curent în vederea inhibării oxidării uleiurilor se adaugă antioxidanți de sinteză de tipul BHA (E320, t-butilanisol), BHT (E321, t-butilhidroxitoluen), diverși galați, polifenoli și derivați [232].

Interesul crescut pentru înlocuirea antioxidanților sintetici din alimente cu cei naturali a sprijinit căutarea surselor vegetale și alegerea de materii prime pentru identificarea de noi antioxidanți.

În literatură s-a demonstrat că „potențialii antioxidanți” sunt substanțe reactive și pot acționa și ca prooxidanți în funcție de sistem cum se observă pentru acidul galic și derivați, pentru extractele de ceai verde și flavone. Ca și o regulă generală antioxidanții extrași din plante pot avea activitate prooxidantă la concentrații mici și activitate antioxidantă peste anumite valori critice [179,233,234].

Ca și „potențiali antioxidanți” pentru uleiul luat în analiză s-au utilizat extracte din varietățile genului *Hydrangea* și genului *Ziziphus*.

S-a lucrat cu ulei de floarea soarelui netratat cu antioxidanți și obținut prin presare la rece. S-a studiat efectul antioxidant al extractelor de *Ziziphus* și *Hydrangea* comparativ cu antioxidanți reprezentați de flavonoide pure și unui antioxidanți folosiți curent în industrie: acidul ascorbic și acidul galic. S-a lucrat în

condiții diferite: temperatură ambiantă, la lumină și la întuneric, respectiv probele au fost supuse la tratament termic la 98 °C.

Activitatea antioxidantă a compușilor din extractele de *Ziziphus* și *Hydrangea* s-a determinat prin urmărirea evoluției în timp a valorilor indicelui de peroxid la uleiul de floarea soarelui tratat cu antioxidanți naturali- extractele vegetale ca atare și tratat comparativ cu antioxidanți sintetici. Valoarea indicelui de peroxid este aplicabilă pentru urmărirea formării peroxizilor în special în primele stadii ale oxidării.

Experimentele au fost organizate astfel:

- ulei cu adaos de antioxidanți naturali și sintetici menținut la 25°C și expus la lumină pe o perioadă de 50 zile;
- ulei cu adaos de antioxidanți naturali și sintetici menținut la 98°C timp de 12 ore;
- ulei cu adaos de antioxidanți naturali și sintetici expus la aer, respectiv păstrat la lumină și

întuneric pe o perioadă de 50 zile.

Conținutul în compuși flavonoidici în probe a fost :

- $142,25 \cdot 10^{-5}$ moli rutină în 100 mL ulei (Ufs + extract E1)
- $4,24 \cdot 10^{-5}$ moli miricetină; $40,42 \cdot 10^{-5}$ moli kaemferol; $7,56 \cdot 10^{-5}$ moli rutină în 100 mL ulei (Ufs + extract E2)
- $130,73 \cdot 10^{-5}$ moli rutină în 100 mL ulei (Ufs + extract E3)
- $4,31 \cdot 10^{-5}$ moli miricetină; $40,86 \cdot 10^{-5}$ moli kaemferol; $7,98 \cdot 10^{-5}$ moli rutină /100 mL ulei (Ufs + extract E4)
- $64,69 \cdot 10^{-5}$ moli rutină /mL; $261,05 \cdot 10^{-5}$ moli quercetină /mL; $17,11 \cdot 10^{-5}$ moli luteolină în 100 mL ulei (Ufs + extract E5)
- $5,81 \cdot 10^{-5}$ moli rutină /mL; $10,42 \cdot 10^{-5}$ moli quercetină; $4,36 \cdot 10^{-5}$ moli luteolină în 100 mL ulei (Ufs + extract E6)

Materialul vegetal folosit pentru obținerea extractelor a fost: fructe și frunze de *Ziziphus jujuba*, fructe și frunze de *Ziziphus lotus*, frunze de *Hydrangea paniculata* și frunze de *Hydrangea aspera*, recoltat în anul 2004.

Obținerea extractelor: 1 g material vegetal uscat mărunțit în prealabil a fost supus extracției cu 40 mL metanol 94% la reflux timp de 10 minute. După filtrare, extractele au fost concentrate la 1/3 din volum. Au fost păstrate la temperatură de 5°C până în momentul folosirii lor după ce li s-a determinat conținutul în compuși flavonoidici.

Determinarea indicelui de peroxid

Indicele de peroxid reprezintă un parametru care indică conținutul total de hidroperoxizi și peroxizi ai lipidelor și materialelor care conțin lipide. Hidroperoxizii sunt produșii primari ai oxidării lipidelor și joacă un rol important în autooxidările viitoare ale lipidelor, iar pentru inhibarea formării și /sau acțiunii acestor specii instabile sunt utilizați antioxidanții ca mijloc al aprecierii activității antioxidante. De exemplu, se determină activitatea antioxidantă a extractelor vegetale, prin adăugarea acestora în ulei și păstrarea acestuia în diverse condiții.

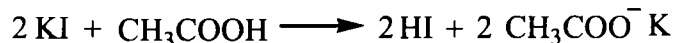
Indicele de peroxid, perioada de inducție (definită ca timpul până indicele de peroxid atinge valoarea de 20 mechiv O₂/kg și factorii de protecție) sunt măsurați și utilizați pentru a stabili activitatea relativă a extractelor [235].

Deși valoarea indicelui de peroxid este aplicabilă pentru urmărirea formării peroxizilor în primele stadii ale oxidării, acuratețea metodei este discutabilă, iar rezultatele variază funcție de procedeul folosit și funcție de temperatura de lucru, astfel încât în cursul oxidării valoarea indicelui de peroxid atinge un maxim apoi scade.

S-a putut demonstra că, cantitatea de oxigen ce trebuie adsorbită, respectiv cantitatea de peroxizi ce trebuie formați pentru a produce o râncezire notabilă variază cu compoziția uleiului (grăsimile mai saturate necesită adsorbția unei cantități mai mici de oxigen pentru a deveni râncede) funcție de prezența antioxidanților, a urmelor de metale, de condițiile de oxidare [231].

Metoda standard de determinare a indicelui de peroxid se bazează pe oxidarea iodului de către hidroperoxizi și peroxizi. În această metodă hidroperoxizii și peroxizii oxidează iodul la iodură prin titrarea acestuia cu soluție standard de tiosulfat, folosind ca și indicator amidon.

Reacțiile acestei metode sunt:



unde ROOOH este hidroperoxidul lipidic

Reactivi:

- Soluție acid acetic:cloroform=3:2
- Soluție saturată de iodură de potasiu
- Soluție de tiosulfat de sodiu exact 0,01N
- Amidon soluție 1%

Mod de lucru [236]:

Într-un Erlenmayer cu dop rodat de 250 mL s-au introdus 2,5g ulei. S-a adăugat 15 mL amestec acid acetic:cloroform și s-a agitat pentru dizolvare. S-a adăugat 0,25 mL soluție saturată de iodură de potasiu și s-a agitat timp de 1 minut. S-a adăugat 15 mL apă distilată. S-a titrat cu soluție de tiosulfat de sodiu 0,01N în prezență de amidon, până ce culoarea violetă a dispărut. În paralel s-a realizat o probă martor.

Determinările s-au efectuat triplicat pentru fiecare probă în parte.

Indicele de peroxid se calculează cu relația :

$$\text{IP} = (\text{V}_p - \text{V}_M) \cdot N \cdot 1000 / m_p$$

unde:

V_p = volumul soluției de tiosulfat de sodiu 0,01N folosit la titrarea probei martor

V_M = volumul soluției de tiosulfat de sodiu 0,01N folosit la tirarea probei

N = normalitatea soluției de tiosulfat de sodiu

m_p = masa probei

Indicele de peroxid se exprimă în mechiv O₂ /kg probă [237].

Activitatea antioxidantă a extractelor vegetale în uleiul de floarea soarelui se calculează ca variația, exprimată în procente, a indicelui de peroxid al probelor față de cel al uleiului control (uleiul netratat cu antioxidanți).

$$\% \text{ activitate antioxidantă}_{\text{ulei de floarea soarelui}} = 100 \times \left[1 - \frac{IP_s}{IP_c} \right] \quad [233]$$

unde: IP_s=variația indicilor de peroxid al probelor

IP_c= variația indicilor de peroxid al uleiului control

II.4.1.1. Determinarea indicelui de peroxid a uleiului cu adaos de antioxidanți naturali și sintetici menținut la 25°C și expus la lumină pe o perioadă de 50 zile

Câte 0,1 mL din extractele vegetale, respectiv din soluțiile standardelor utilizate s-au dizolvat în 100 mL ulei de floarea soarelui fără adaos de antioxidanți, obținut prin presare la rece. Emulsia astfel obținută s-a menținut la 25°C pe o perioadă de 50 de zile. S-au prelevat probe zilnic până în ziua 12, apoi perioada a fost extinsă prelevând probe în zilele 15, 20 și 50. S-a determinat indicele de peroxid efectuând în paralel și o probă control. Determinările au fost efectuate în triplicat pentru fiecare probă în parte [179,234].

Valorile indicelui de peroxid sunt redată în tabelele 55 și 56, iar dependența indicelui de peroxid (IP) funcție de timp pe parcursul oxidării uleiului de floarea soarelui cu adaos de extracte și antioxidanți sintetici în condiții de lumină, temperatură de 25°C, pe o perioadă de 50 de zile este redată în figurile 39 și 40.

Unde E1 = extract metanolic din frunze de *Ziziphus jujuba*
 E2 = extract metanolic din fructe de *Ziziphus jujuba*
 E3 = extract metanolic din frunze de *Ziziphus lotus*
 E4 = extract metanolic din fructe de *Ziziphus lotus*
 E5 = extract metanolic din frunze de *Hydrangea paniculata*
 E6 = extract metanolic din frunze de *Hydrangea aspera*
 Q = standard de quercetina ;
 R = standard de rutina;
 AG = standard de acid galic;
 K = standard de kaemferol;
 M = standard de miricetina.
 (Concentrația standardelor a fost de 1mg/mL).

Tabelul 55. Variația indicilor de peroxid (IP) la probele de ulei adaos de extracte Vegetale

Timp [zile]	IP Ufs	IP Ufs+E1	IP Ufs+E2	IP Ufs+E3	IP Ufs+E4	IP Ufs+E5	IP Ufs+E6
0	0,4	2,0	0,8	1,0	1,2	0,2	1
1	0,8	2,0	1,6	1,2	2,0	0,8	1
2	2,8	2,4	3,2	2,2	2,8	1,6	2,2
3	3,6	3,2	4,3	4,4	2,8	3,2	2,8
4	6,4	3,6	5,2	4,6	3,6	3,2	6,8
5	7	4,4	6,4	4,8	6,8	4,0	6,8
6	7,2	6,4	7,0	6,4	7,2	7,2	7,2
7	8,8	7,2	7,2	7,6	7,6	9,2	9,2
8	8,8	8,2	7,2	7,6	8,2	10,4	9,2
9	9,6	9,2	8,0	8,2	8,8	10,8	9,2
10	9,6	10,2	8,0	8,6	9,0	11,2	10,2
11	15,2	12,2	8,0	10,3	9,2	11,2	13,2
12	15,6	13,6	8,0	12,6	10,8	11,2	18,8
15	16	14,0	8,0	14,8	11,6	11,2	22,4
20	29,2	16	21,2	17,2	18,8	14,0	27,2
30	30,4	18,8	26,4	19,2	18,8	14,0	27,2
50	95,2	43,2	48,0	47,2	49,6	64	51,2

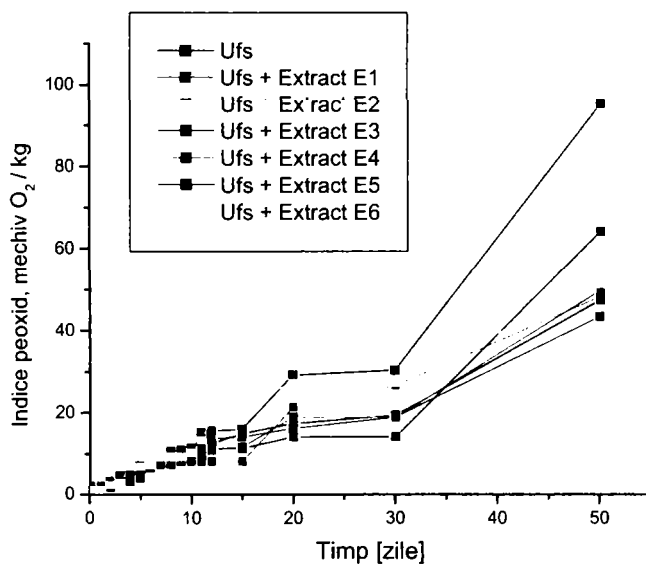


Figura 39. Reprezentarea grafică a variației indicelui de peroxid la uleiul de floarea soarelui cu adaos de antioxidanți naturali- extracte vegetale

Tabelul 56. Variația indicilor de peroxid (IP) la probele cu adaos de antioxidanți sintetici (standarde)

Timp [zile]	IP Ufs	IP Ufs+Q	IP Ufs+R	IP Ufs+K	IP Ufs+M	IP Ufs+AG
0	0,4	1,2	0,8	1,2	1,2	1,6
1	0,8	2,0	1,2	1,6	2,0	1,6
2	2,8	2,8	2,4	2,0	2,4	2,4
3	3,6	4,4	4,4	4,8	4,8	4,4
4	6,4	4,8	4,4	5,0	4,8	4,6
5	7	4,8	4,4	6,2	5,2	5,0
6	7,2	8,4	8,0	7,6	7,0	5,2
7	8,8	13,6	9,2	10,4	7,2	8,4
8	8,8	14,0	9,2	10,8	7,2	8,4
9	9,6	14,6	10	12,0	9,6	8,4
10	9,6	18,0	12,2	12,6	9,6	8,4
11	15,2	20,2	12,4	12,8	13,2	8,8
12	15,6	20,6	16,0	12,8	16,8	9,6
15	16	21,0	18,2	20,2	20,0	13,6
20	29,2	21,2	19,2	23,6	21,2	19,2
30	30,4	22,4	21,2	24,4	22	21,6
50	95,2	65,2	49,2	53,2	57,2	51,2

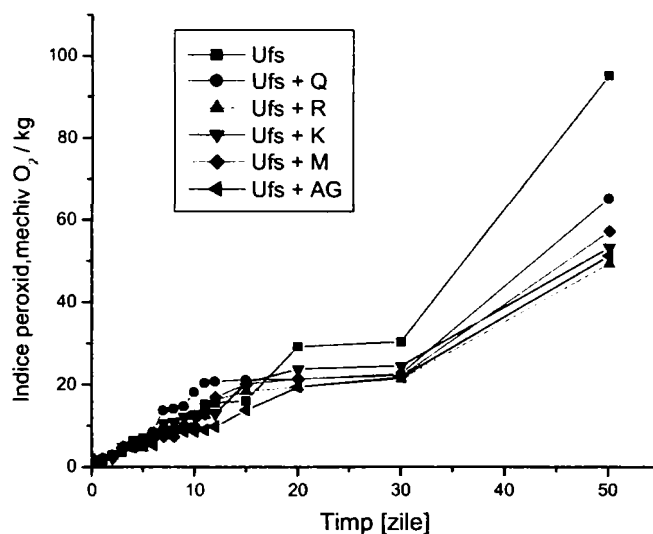


Figura 40. Reprezentarea grafică a variației indicelui de peroxid la uleiul de floarea soarelui cu adaos de antioxidanți sintetici – standarde de flavonoide.

Pentru toate cele 11 tipuri de probe de ulei, cu adaos de antioxidanți naturali (extractele E1-E6), respectiv cu adaos de antioxidanți sintetici, indicii de peroxid variază crescător.

Activitatea antioxidantă a standardelor de flavonoide în uleiul de floarea soarelui expus la lumină, temperatură de 25°C, timp de 50 zile a fost confirmată prin urmărirea variației indicelui de peroxid. Astfel standardele de flavonoide prezintă o ușoară activitate prooxidativă în primele 10 zile de analiză, după care activitatea antioxidantă este remarcabilă.

Activitatea antioxidantă, de protejare a uleiului de floarea soarelui împotriva oxidării variază în ordinea:

Quercetină < Kaemferol < Miricetină < Acid galic < Rutină

Concentrația molară a antioxidanților de mai sus așezați funcție de puterea antioxidantă este următoarea:

Quercetina ($33,1 \cdot 10^{-5}$ M) < Kaemferol ($34,9 \cdot 10^{-5}$ M) < Miricetina ($31,5 \cdot 10^{-5}$ M) <

Acid galic ($58,8 \cdot 10^{-5}$ M) < Rutina ($16,3 \cdot 10^{-5}$ M)

Se poate observa că de fapt concentrațiile molare ale flavonoidelor sunt aproximativ egale (concentrația $16,3 \cdot 10^{-5}$ M pentru rutină, după hidroliza restului de zahar ar duce la $32,89 \cdot 10^{-5}$ M pentru quercetina rezultată), deci este clar că în serie cel mai puternic antioxidant este rutina, iar cel mai slab quercetina.

În ceea ce privește produsul de sinteză, acidul galic, acesta la o concentrație molară de ~ 1,76 ori mai mare decât a flavonoidelor are o activitate antioxidantă mai mare dar cu toate acestea inferioară celei a rutinei.

Adaosul de antioxidanți naturali își manifestă activitatea antioxidantă, indicii de peroxid depășind valoarea 10 abia după 8 zile, în cazul uleiului cu adaos de extract metanolic E5, iar pentru celelalte probe abia după zilele 10-11.

Din analiza rezultatelor obținute se evidențiază faptul că:

- extractele de *Ziziphus* și *Hydrangea* prezintă activitate antioxidantă, activitate de protecție împotriva oxidării uleiului în condiții de păstrare a acestuia la 25°C la lumină pe o perioadă de 30 zile, după care efectul protector scade (indicii de peroxid crește).

- activitatea antioxidantă cea mai mare a avut-o extractul din frunze de *Hydrangea paniculata*, cele mai modeste rezultate s-au obținut pentru extractul din frunze de *Hydrangea aspera*.

- activitatea antioxidantă a celor șase extracte crește în ordinea:

Ha frz < ZJ fru < ZL fru < ZL frz < ZJ frz < Hp frz (E6 < E2 < E4 < E3 < E1 < E5)

Conținutul total de flavonoide, respectiv de rutină în extractele așezate în ordinea crescătoare a activității lor antioxidante este:

	Ha frz	ZJ fru	ZL fru	ZL frz	ZJ frz	Hp frz
frz						
Σ Flavonoide ($\cdot 10^{-6}$ M)	20,59	52,22	53,15	130,73	142,25	342,85
Σ Rutină ($\cdot 10^{-6}$ M)	4,36	7,56	7,98	130,73	142,25	64,69

Se poate observa că activitatea antioxidantă a extractelor este independentă de familie, specie sau parte anatomică, dar crește odată cu creșterea conținutului total de flavonoide din extract.

În ceea ce privește conținutul de rutină din extract, acesta influențează în același mod activitatea oxidantă cu excepția extractului din frunze de *Hydrangea paniculata*, a cărei activitate antioxidantă nu poate fi corelată și cu conținutul de rutină, ci doar cu cel de flavonoide totale.

Compararea valorilor absolute ale indicilor de peroxid pentru uleiurile tratate cu extracte din cele două specii de Angiosperme și cele tratate cu compuși flavonoidici standard, respectiv cu un antioxidant de sinteză sunt comparabile în anumite limite; este evident faptul că și în cazul etaloanelor, respectiv a antioxidantului sintetic, după 30 de zile indicele de peroxid crește brusc.

II.4.1.2. Determinarea indicelui de peroxid a uleiului cu adaos de antioxidanți naturali și sintetici menținut la 98°C timp de 12 ore

Câte 0,1 mL din extractele vegetale respectiv din soluțiile standardelor utilizate s-au dizolvat în 100 mL ulei de floarea soarelui fără adaos de antioxidanți, obținut prin presare la rece. Emulsia astfel obținută s-a menținut la 98°C timp de 12 ore. La intervale de 60 de minute s-au prelevat probe pentru care s-a determinat indicele de peroxid efectuând în paralel și o probă control [179]. Determinările au fost efectuate triplicat pentru fiecare probă în parte.

Valorile indicilor de peroxid sunt prezentate în tabelul 57 și 58.

Unde: E1 = extract metanolic din frunze de *Ziziphus jujuba*
E2 = extract metanolic din fructe de *Ziziphus jujuba*
E3 = extract metanolic din frunze de *Ziziphus lotus*
E4 = extract metanolic din fructe de *Ziziphus lotus*
E5 = extract metanolic din frunze de *Hydrangea paniculata*
E6 = extract metanolic din frunze de *Hydrangea aspera*

Tabelul 57. Valorile indicilor de peroxid funcție de timp la probele de ulei cu adaos de antioxidanți sintetici- standarde de flavonoide.

Timp [ore]	IP Ufs	IP Ufs+Q	IP Ufs+R	IP Ufs+K	IP Ufs+My	IP Ufs+AG
0	0,8	7,2	7,2	8,4	8,8	7,6
1	1,2	7,6	7,2	8,6	8,8	7,6
2	1,6	7,8	7,6	8,8	9,2	8,4
3	1,6	8	7,6	9,2	9,2	8,4
4	1,8	8	7,8	9,2	9,4	8,6
5	2	8,2	8,4	12,0	9,6	11,2
6	2,4	8,4	8,4	12,2	16	12,8
7	5,6	8,4	15,6	19,2	31,2	23,2
8	6	29,2	27,6	36	33,2	30,8
9	6	29,2	27,6	36,2	33,2	31,2
10	6,2	30	28	36,4	34,4	31,6
11	11,2	30,5	28,4	42	34,4	31,6
12	12	45,2	39,6	42,8	49,2	32

Unde: Q = quercetină; R = rutină; K = kaemferol; My = miricetina;
AG = acid galic

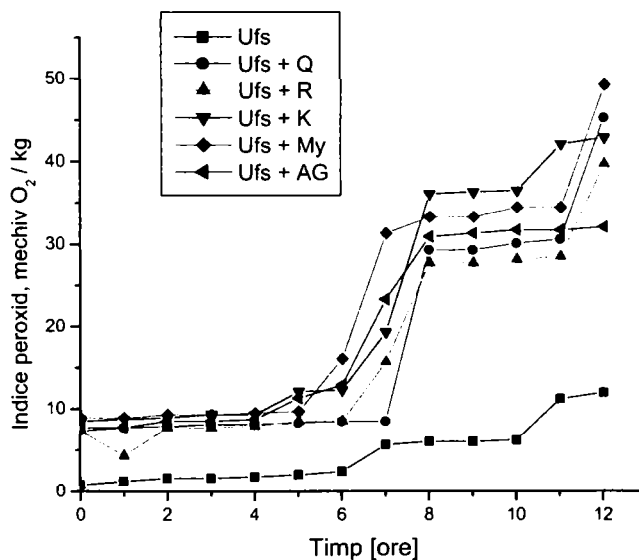


Figura 41. Dependența indicilor de peroxid funcție de timp pe parcursul oxidării uleiului de floarea soarelui cu adaos de antioxidanți sintetici, la 98°C

Pe baza valorilor indicilor de peroxid funcție de timp pe parcursul tratamentului termic al probelor la 98°C, probe ce conțin patru flavonoide etalon, respectiv un antioxidant sintetic se observă două perioade de timp distincte:

- o prima perioadă în jur de 6 – 7 ore în care indicele de peroxid crește relativ încet pentru toate probele ca și pentru martor; de notat că pentru toate probele de ulei tratat valoarea indicelui de peroxid este de aproximativ 8-10 ori mai mare decât cea a martorului.
- a doua perioadă în care indicele de peroxid din intervalul 6 – 8 ore crește brusc pentru probele tratate ca și pentru martor de 2,8 – 3 ori, după care urmează pentru alte 3 – 4 ore de încălzire, un interval în care rămâne constant până la o viitoare reluare a procesului.

Pentru acest interval se evidențiază faptul că rutina are acțiunea protectoare mai mare fiind urmată în ordine de :

Rutina > Quercetina > Acid galic > Miricetina > Kaemferol

Faptul că probele au valori ale indicelui de peroxid mult mai mari față de martor sugerează faptul că în cursul procesului de încălzire a uleiului la 98°C activitatea antioxidantă a flavonoidelor se transformă în activitate prooxidantă [233].

Tabelul 58. Valorile indicilor de peroxid (IP) în timp la probele de ulei cu adaos de extracte vegetale.

Timp [ore]	IP Ufs	IP Ufs+E1	IP Ufs+E2	IP Ufs+E3	IP Ufs+E4	IP Ufs+E5	IP Ufs+E6
0	0,8	1,6	1,6	2,8	0,8	1,6	0,8
1	1,2	2	1,6	3,6	1,6	2,4	1,2
2	1,6	2,4	2	4,4	1,6	2,4	2,4
3	1,6	2,4	2,8	4,8	1,8	2,8	2,8
4	1,8	2,6	2,8	4,8	2,8	3,0	3,0
5	2	2,8	5,2	6	2,8	3,6	3,2
6	2,4	3,2	5,4	7,2	3,6	3,8	5,2
7	5,6	3,6	8	7,2	3,6	8,4	8,2
8	6	4	10,2	10	4,4	14	9,2
9	6	4,4	13,6	12,4	4,8	15,6	9,8
10	6,2	4,4	17,2	12,4	4,8	16,4	11,8
11	11,2	4,8	17,6	13,6	8,8	16,4	12
12	12	5,2	17,8	33,6	17,2	16,6	14

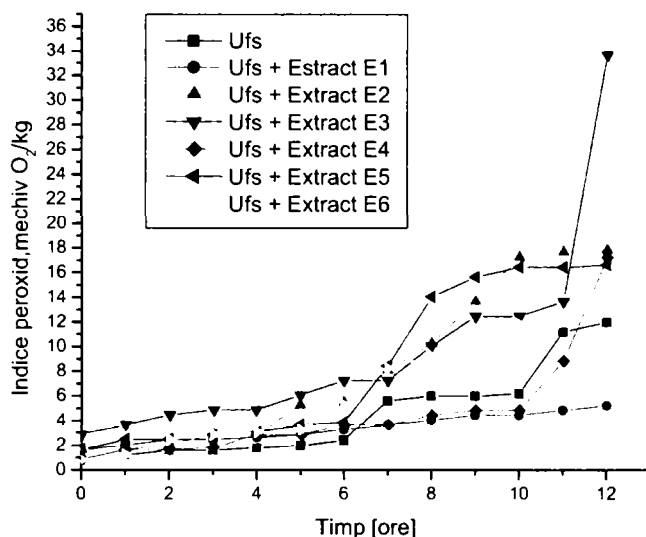


Figura 42. Dependența indicilor de peroxid funcție de timp pe parcursul oxidării uleiului de floarea soarelui cu adaos de antioxidanți naturali (extracte vegetale), la 98°C.

Urmărind evoluția aceluiași parametri în timp și pentru probele tratate cu extractele E1-E6 (concentrația în principii active, vezi paragraful II.4.1) se observă:

- o prima perioadă în jur de 6 ore în care indicele de peroxid crește relativ încet pentru toate probele ca și pentru martor; în cazul extractelor, în această perioadă indicele de peroxid înregistrează o creștere de numai 2 până la maximum 3 ori față de valoarea acestuia pentru martor.
- o a doua perioadă de 1-3 ore în care indicele de peroxid crește chiar de până la 4 ori fără ca după aceasta să existe pentru toate probele un interval clar în care să rămână relativ constant până la o viitoare reluare a procesului.

Extractele de ZJ frz (E1) și ZL fru (E4) au demonstrat cea mai bună acțiune protectoare, valorile indicelui de peroxid în acest caz fiind sub valorile pentru proba martor.

Dacă se urmărește evoluția în timp a valorilor indicilor de peroxid în cazul uleiului tratat cu extracte din specia *Ziziphus jujuba*, se observă că extractul din frunze are o capacitate antioxidantă mai mare comparativ cu extractul din fructe de *Ziziphus lotus*.

$$ZL\ fru < ZJ\ frz \quad (E4 < E1)$$

Ca și în cazul uleiului păstrat la rece, în cazul uleiului prelucrat termic se respectă creșterea activității antioxidante odată cu creșterea conținutului de flavonoide și de rutină în extractul adăugat.

Pe baza valorilor indicelui de peroxid pentru uleiurile tratate cu standarde de flavonoide și acid galic (tabelul 59), respectiv cu extracte (tabelul 60) s-a calculat activitatea antioxidantă [233]:

$$\% \text{ activitate antioxidantă}_{\text{ulei de floarea soarelui}} = 100 \times \left[1 - \frac{IP_s}{IPC} \right]$$

unde: IP_s = variația indicilor de peroxid a probelor de ulei cu adaos de antioxidanți;

IP_c = variația indicilor de peroxid a uleiului control (netratat cu antioxidanți).

Tabelul 59. Activitatea antioxidantă a antioxidanților sintetici (standarde de flavonoide, respectiv acid galic) în uleiul de floarea soarelui supus tratamentului termic la 98°C.

Timp[ore]	Quercetina	Rutină	Kaemferol	Miricetina	Acid galic
1	0	100	50	100	100
2	25	50	50	50	0
3	0	50	0	50	0
4	20	40	20	40	0
5	16	0	-200	33	-200
6	25	25	-137	-350	-225
7	75	-75	-125	-366	-225
8	-323	-292	-430	-369	-346
9	-323	-292	-434	-369	-353
10	-322	-285	-418	-374	-344
11	-124	-103	-223	-146	-130
12	-239	-189	-207	-260	-117

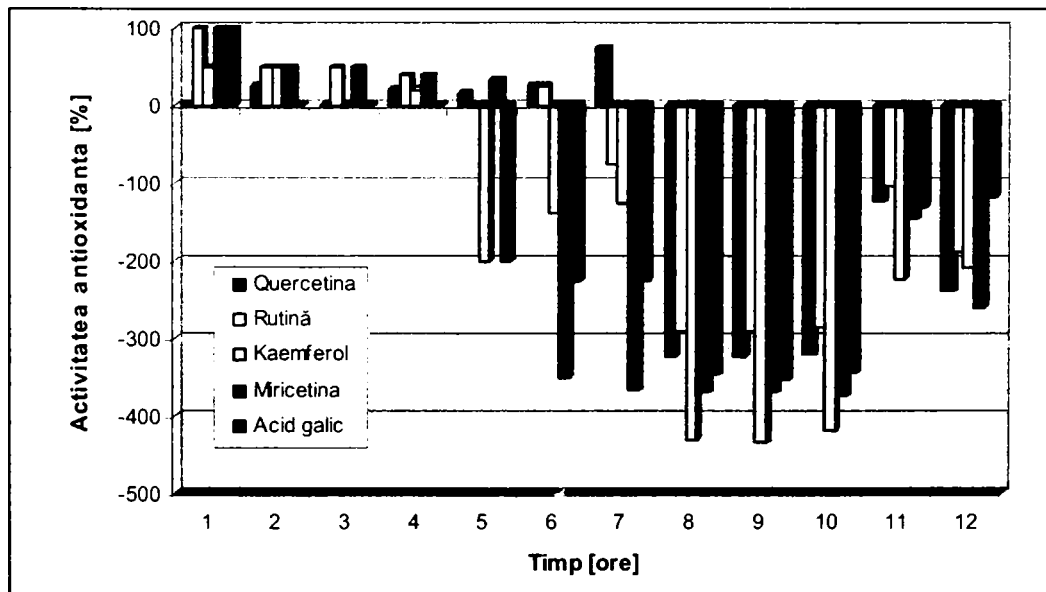


Figura 43. Dependența activității antioxidante funcție de timp a antioxidanților standard și sintetici, în uleiul de floarea soarelui supus tratamentului termic la 98°C.

Se poate observa că în prima oră de tratament termic activitatea antioxidantă calculată funcție de oxidarea matorului la aceeași concentrație în

probă este cea mai scăzută pentru kaemferol și quercetină, restul flavonoidelor având o activitate comparabilă.

Dacă se reprezintă activitatea antioxidantă în ordinea creșterii acesteia:

Quercetina < Kaemferol < Miricetina ≈ Acid galic ~ Rutina

se poate observa o concordanță cu cea stabilită în cadrul paragrafului II.4.1.1. pentru probele de ulei cu adaos de antioxidanți de flavonoide și acid galic, care a fost:

Quercetina < Kaemferol < Miricetina < Acid galic < Rutina

După prima oră de încălzire activitatea antioxidantă scade până la dispariție în cazul acidului galic.

Pe măsura avansării procesului de încălzire activitatea scade pentru toți compușii, iar după 5 ore începe să se manifeste o activitate prooxidantă pentru kaemferol și acid galic, urmează după 6 ore și pentru miricetină, ca după 8 ore de încălzire practic toți compușii să manifeste activitate prooxidantă.

Tabelul 60. Activitatea antioxidantă a extractelor vegetale, în uleiul de floarea soarelui supus tratamentului termic la 98°C.

Timp[ore]	E1	E2	E3	E4	E5	E6
1	0	100	-100	-100	-100	0
2	0	50	-100	0	0	-50
3	0	-50	-150	-25	-50	-150
4	0	-20	-100	-100	-40	-120
5	0	-200	-166	-66	-66	-200
6	0	-137	-175	-75	-38	-177
7	58	-33	8	42	-42	-54
8	53	-65	-38	31	-138	-62
9	46	-130	-85	23	-169	-73
10	48	-101	-78	26	-174	-104
11	30	-53	4	23	-42	-8
12	67	-44	-175	-46	-34	-18

În cazul uleiurilor tratate cu extractele vegetale E1-E6 după o oră de încălzire la 98°C mai prezintă activitate antioxidantă numai extractul de ZJ fru pentru care însă nu putem explica această activitate prin conținutul său de principii active. Pentru toate celelalte extracte activitatea antioxidantă scade la zero (E1, E6) sau apare activitate prooxidantă.

De remarcat că în unele cazuri (E1 și E4) pe măsura prelungirii timpului de încălzire poate să reapară o activitate antioxidantă, lucru evidențiat și prin scăderea indicelui de peroxid sub valoarea indicelui de peroxid al matorului.

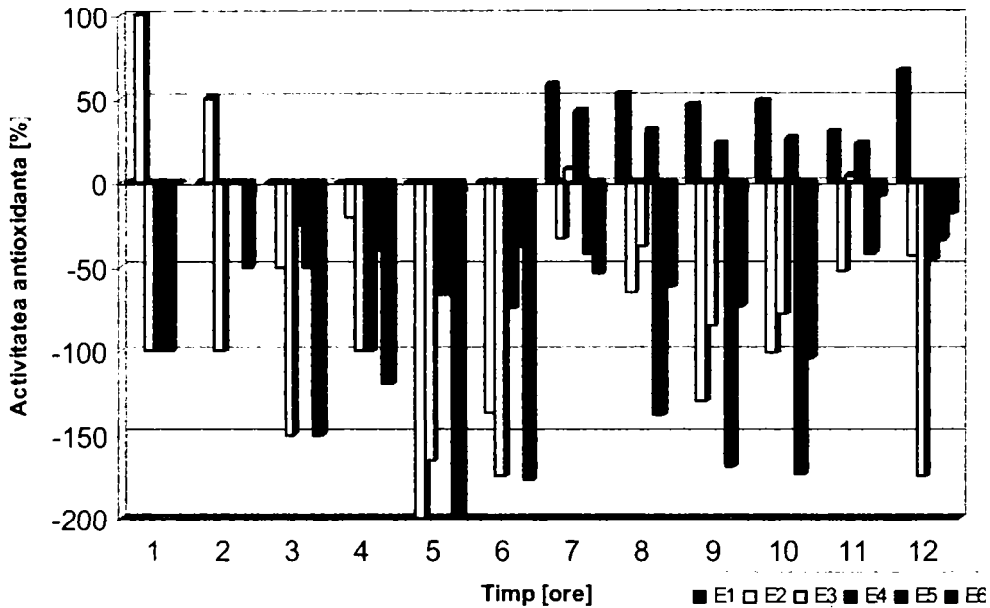


Figura 44. Dependența activității antioxidante funcție de timp, a extractelor vegetale în uleiul de floarea soarelui supus tratamentului termic la 98°C.

unde: E1 = ZJ frz; E2 = ZJ fru; E3 = ZL frz; E4 = ZL fru; E5 = Hp frz; E6 = Ha frz

Rezultatele obținute constituie obiectul unei lucrări științifice trimisă spre publicare [238].

II.4.1.3. Determinarea indicelui de peroxid a uleiului cu adaos de antioxidanți naturali și sintetici expus la aer (lumină și întuneric) pe o perioadă de 50 zile

S-a lucrat cu câte șapte seturi de probe și anume: ulei alimentar, ulei cu adaos de soluții apoase de quercetină (Q), rutină (R), extract apos din fructe de *Ziziphus jujuba* (E7), extract extract apos din frunze de *Ziziphus jujuba* (E8) și extract etanolic din fructe de *Ziziphus jujuba* (E9).

În vederea efectuării analizei, 100 mL de ulei a fost depozitat în sticle închise la culoare. Probele au fost păstrate unele la întuneric, altele la lumină.

Analize au fost efectuate după cum urmează:

- Determinarea indicelui de peroxid s-a făcut în triplicat luând probe în zilele 1, 5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 .
- Conținutul în compuși flavonoidici în probe a fost:
 - $6,97 \cdot 10^{-5}$ moli rutină / 100 mL ulei (Ufs+E7)
 - $58,33 \cdot 10^{-5}$ moli rutină / 100 mL ulei (Ufs +E8)
 - $3,06 \cdot 10^{-5}$ moli rutină/ 100 mL ulei (Ufs+E9)
 - $165,43 \cdot 10^{-5}$ moli rutină / 100 mL ulei (Ufs+R)
 - $330,86 \cdot 10^{-5}$ moli quercetină / 100 mL ulei (Ufs+Q)

Tabelul 61. Valorile indicelui de peroxid ale uleiului de floarea soarelui cu adaos de antioxidanți (quercetină, respectiv rutină), expus la lumină:

Timp [zile]	IP Ufs	IP Ufs + Q	IP Ufs + R
0	0,770	0,770	0,770
1	0,799	0,396	0,387
5	1,197	0,796	2,366
10	5,841	4,727	6,332
15	3,137	2,657	1,600
20	2,504	1,174	1,987
25	14,409	6,696	6,682
30	11,739	8,928	9,013
35	11,502	8,772	13,870
40	16,406	10,749	10,481
45	10,628	11,781	8,692
50	21,113	16,591	22,707

unde: IP Ufs = indicele de peroxid al uleiului de floarea soarelui păstat în aceleași condiții;
 IP Ufs + Q = indicele de peroxid al uleiului de floarea soarelui cu adaos de quercetină;
 IP Ufs + R = indicele de peroxid al uleiului de floarea soarelui cu adaos de rutină.

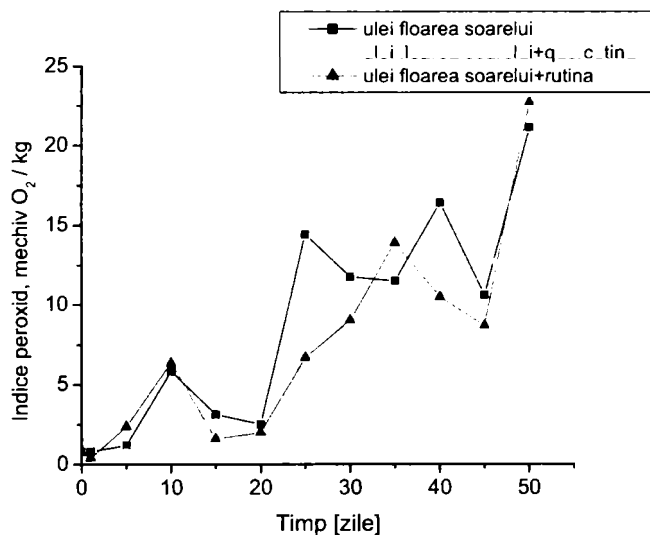


Figura 45. Reprezentarea grafică a variației indicelui de peroxid la uleiul de floarea soarelui cu adaos de antioxidanți (quercetină, respectiv rutină) expus la lumină.

Cum este de așteptat pentru toate cele trei tipuri de probe, indicele de peroxid variază crescător. După 25 de zile depășește valoarea 10 în cazul uleiului netratat. Adaosul de quercetină, respectiv rutină își face simțită acțiunea

antioxidantă, indicele de peroxid depășind valoarea 10 după 40 de zile pentru uleiul cu adaos de quercetină, respectiv după 35 de zile pentru cel cu adaos de rutină.

Tabelul 62. Valorile indicelui de peroxid ale uleiului de floarea soarelui cu adaos de antioxidanți (quercetină, respectiv rutină), păstrat la întuneric:

Timp [zile]	IP Ufs	IP Ufs + Q	IP Ufs + R
0	0,77	0,77	0,77
1	0,799	0,768	0,386
5	0,788	0,791	1,599
10	6,282	3,101	3,85
15	3,446	3,461	3,82
20	15,723	2,392	2,353
25	15,159	5,268	10,912
30	18,34	7,574	8,858
35	9,956	7,29	10,203
40	10,985	10,255	15,956
45	19,341	8,748	10,301
50	21,34	17,929	23,188

unde: IP Ufs = indicele de peroxid al uleiului de floarea soarelui păstrat în aceleași condiții;
 IP Ufs + Q = indicele de peroxid al uleiului de floarea soarelui cu adaos de quercetină;
 IP Ufs + R = indicele de peroxid al uleiului de floarea soarelui cu adaos de rutină.

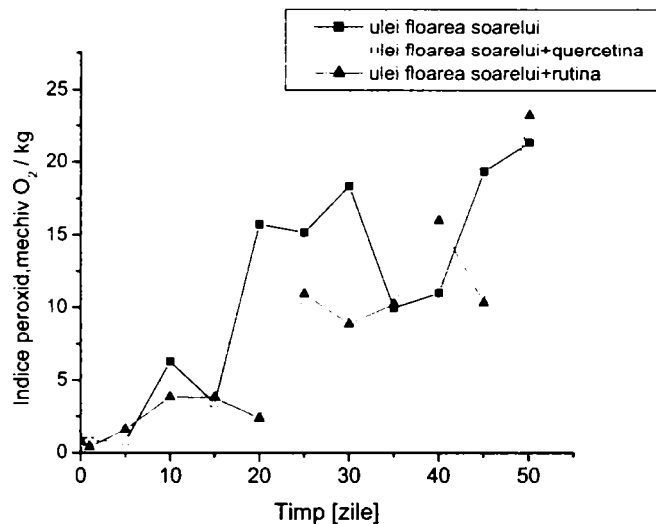


Figura 46. Reprezentarea grafică a variației indicelui de peroxid la uleiul de floarea soarelui cu adaos de antioxidanți (quercetină, respectiv rutină) păstrat la întuneric

În cazul probelor de ulei păstrate la întuneric, indicele de peroxid crește depășind valoarea 10 în intervalul 15-30 zile, apoi scade în ziua 35 și crește din nou. Pentru proba de ulei cu adaos de quercetină, indicele de peroxid crește lent

până în ziua 15, apoi prezintă o scădere în ziua 20, urmată din nou de o creștere, iar în cazul probei cu adaos de rutină variația este aproximativ identică.

Tabelul 63. Valorile indicelui de peroxid ale uleiului de floarea soarelui cu adaos de extracte apoase ZJ fru (E7), respectiv ZJ frz (E8) expus la lumină:

Timp [zile]	IP Ufs	IP Ufs+ E7	IP Ufs+ E8
0	0,770	0,770	0,770
1	0,799	1,123	3,526
5	1,197	6,301	3,142
10	5,841	3,640	5,812
15	3,137	2,368	2,351
20	2,504	11,423	10,545
25	14,409	13,110	10,923
30	11,739	8,946	10,492
35	11,502	8,272	15,487
40	16,406	4,519	8,779
45	10,628	8,340	10,210

unde: IP Ufs = indicele de peroxid al uleiului de floarea soarelui păstrat în aceleași condiții;
 IP Ufs+E7 = indicele de peroxid al uleiului de floarea soarelui cu adaos de extract apos din fructe de *Ziziphus jujuba*;
 IP Ufs+E8 = indicele de peroxid al uleiului de floarea soarelui cu adaos de extract apos din fructe de *Ziziphus jujuba*.

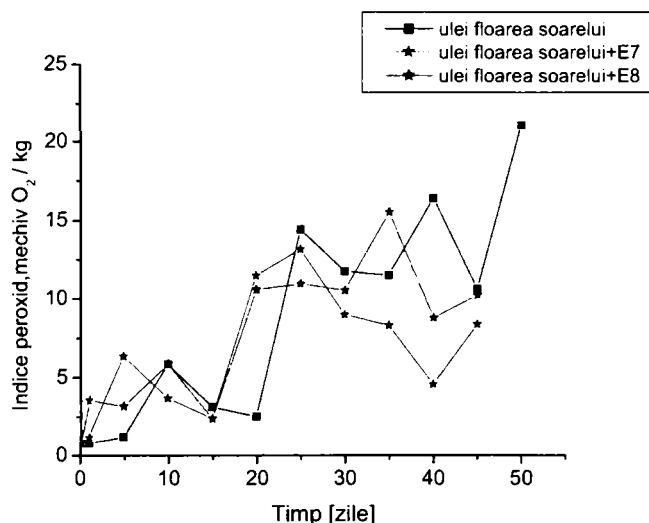


Figura 47. Reprezentarea grafică a variației indicelui de peroxid la uleiul de floarea soarelui cu adaos de extracte apoase ZJ fru (E7), ZJ frz (E8) expus la lumină.

Indicele de peroxid, pentru uleiul cu adaos de extract E7 înregistrează valori peste 10 ceva mai devreme decât uleiul netratat, iar apoi scade și crește din nou, dar nesemnificativ. Efectul pozitiv nu mai este așa de bun în cazul uleiului cu adaos de extract E8, valoarea indicelui de peroxid revenind spre valoarea 10 în ziua 45.

Tabelul 64. Valorile indicelui de peroxid ale uleiului de floarea soarelui cu adaos de extracte apoase, ZJ fru (E7), respectiv ZJ frz (E8) păstrat la întuneric:

Timp [zile]	IP Ufs	IP Ufs+ E7	II Ufs+ E8
0	0,770	0,770	0,770
1	0,799	4,700	7,081
5	0,788	3,186	4,710
10	6,282	5,832	3,517
15	3,446	3,111	2,758
20	15,723	10,594	10,908
25	15,159	12,160	11,703
30	18,340	8,372	9,418
35	9,956	10,718	11,740
40	10,985	2,762	2,340
45	19,341	5,970	13,180
50	21,34		

unde: IP Ufs = indicele de peroxid al uleiului de floarea soarelui păstrat în aceleași condiții;
 IP Ufs+E7 = indicele de peroxid al uleiului de floarea soarelui cu adaos de extract apos din fructe de *Ziziphus jujuba*;
 IP Ufs+E8 = indicele de peroxid al uleiului de floarea soarelui cu adaos de extract apos din frunze de *Ziziphus jujuba*.

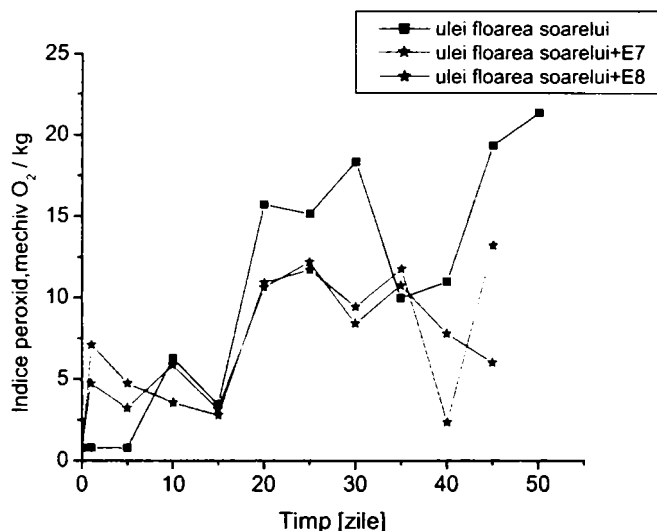


Figura 48. Reprezentarea grafică a variației indicelui de peroxid la uleiul de floarea soarelui cu adaos de extracte apoase ZJ fru (E7), respectiv ZJ frz (E8), păstrat la întuneric.

Indicele de peroxid, pentru uleiul cu adaos de extracte E7, respectiv E8 înregistrează valori peste 10 începând din ziua 20, identic ca și uleiul netratat, iar apoi prezintă variații oscilante până în ziua 35, după care scade. În continuare efectul pozitiv nu mai este așa de bun în cazul uleiului cu adaos de extract E7, valoarea indicelui de peroxid scăzând sub valoarea 10 după ziua 35, iar în cazul

uleiului cu adaos de extract E8, după o scădere bruscă în ziua 40, crește peste valoarea 10 .

Tabelul 65. Valorile indicelui de peroxid ale uleiului de floarea soarelui cu adaos de extract ZJ fru etanolic (E9) expus la lumină:

Timp [zile]	IP Ufs	IP Ufs+ E9
0	0,770	0,77
1	0,799	5,933
5	1,197	6,657
10	5,841	7,606
15	3,137	6,184
20	2,504	13,445
25	14,409	13,521
30	11,739	13,087
35	11,502	13,093
40	16,406	3,966
45	10,628	19,850
50	21,113	

unde: IP Ufs = indicele de peroxid al uleiului de floarea soarelui păstrat în aceleași condiții;

IP Ufs+E9 = indicele de peroxid al uleiului de floarea soarelui cu adaos de extract alcoolic din fructe de *Ziziphus jujuba*.

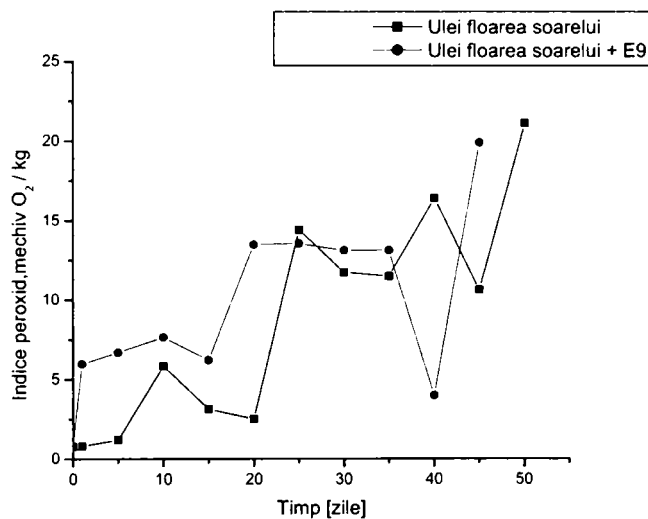


Figura 49. Reprezentarea grafică a variației indicelui de peroxid la uleiul de floarea soarelui cu adaos de extract ZJ fru etanolic (E9) expus la lumină.

În cazul probelor de ulei cu adaos de extract E9, indicele de peroxid crește lent depășind valoarea 10 în ziua 20, apoi scade brusc în ziua 40 și crește semnificativ în continuare.

Tabelul 66. Valorile indicelui de peroxid ale uleiului de floarea soarelui cu adaos de extract ZJ fru etanolic (E9) păstrat la întuneric:

Timp [zile]	IP Ufs	IP Ufs+ E9
0	0,770	0,77
1	0,799	13,039
5	0,788	9,075
10	6,282	8,835
15	3,446	13,372
20	15,723	15,993
25	15,159	16,103
30	18,340	8,981
35	9,956	13,461
40	10,985	5,425
45	19,341	19,320
50	21,34	

unde: IPUfs = indicele de peroxid al uleiului de floarea soarelui păstrat în aceleași condiții;
 IP Ufs+E9 = indicele de peroxid al uleiului de floarea soarelui cu adaos de extract alcoolic din fructe de *Ziziphus jujuba*.

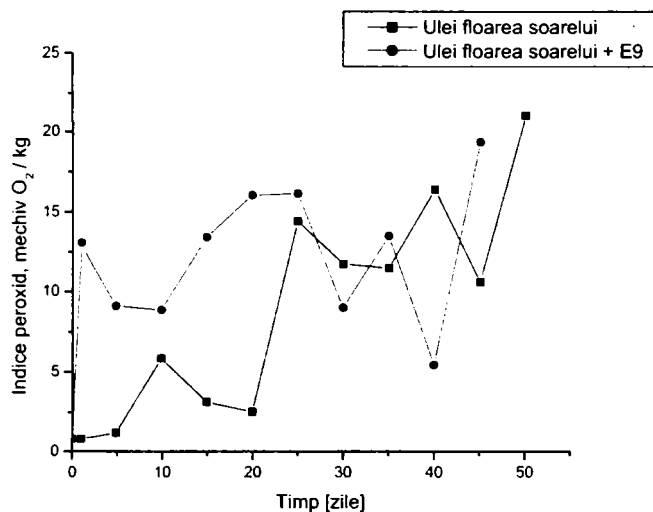


Figura 50. Reprezentarea grafică a variației indicelui de peroxid la uleiul de floarea soarelui cu adaos de extract ZJ fru etanolic(E9), păstrat la întuneric.

Valoarea indicelui de peroxid al probei de ulei cu adaos de extract E9 prezintă o creștere neobișnuită încă din prima zi, urmată de scădere. Variația se repetă de trei ori: se ating maxime în zilele 25, 35, 45 și minime în zilele 10, 30 și 40.

Cum era de așteptat pentru toate tipurile de probe indicele de peroxid variază crescător. Adaosul de antioxidanți sintetici- standarde de flavonoide, quercetină respectiv rutină își face simțită acțiunea antioxidantă, indicele de peroxid

depășind valoarea 10 abia după 30 zile în cazul uleiului cu adaos de quercetină, respectiv după 40 zile în cazul uleiului cu adaos de rutină.

Efectul antioxidantilor naturali (extracte vegetale) este pozitiv în cazul probelor cu adaos de extract etanolic E9, însă în cazul probelor cu adaos de extracte apoase, indicele de peroxid înregistrează scăderi bruște în zilele 15, respectiv 35.

În cazul probelor păstrate la întuneric se observă variații crescătoare și descrescătoare ale valorii indicilor de peroxid. Efectul pozitiv al adaosului de extract alcoolic din fructe de *Ziziphus jujuba* este mult mai mare față de efectul adaosului de extracte apoase din fructe, respectiv frunze de *Ziziphus jujuba*. Adaosul extractelor apoase de *Ziziphus jujuba* are un efect mai bun în probele păstrate la întuneric față de probele expuse la lumină.

Deci se poate concluziona că probele păstrate la întuneric se comportă mai bine decât cele expuse la lumină.

Aceste variații periodice, crescătoare și descrescătoare ale indicelui de peroxid pentru toate uleiurile se datorează mecanismului radicalic al oxidării ca și conținutului de acizi grași nesaturați al acestora. Producții primari, hidroperoxizii și peroxizii izomeri suferă transformări rapide în produși secundari și terțiari ai procesului, iar prin structura lor, aceștia pot fi generatori de noi radicali, iar procesul oxidării radicalice se reia pentru compușii cu moleculă mai mică.

II.4.1.4. Modelarea matematică statistică a variației indicelui de peroxid pentru uleiul de floarea soarelui tratat cu antioxidanți naturali și sintetici

În multe cazuri practice legătura dintre doi sau mai mulți parametri care descriu un anumit proces este suficient de strânsă astfel încât variația unui parametru poate fi controlată și exprimată pe baza variației celorlalți parametri. Legăturile funcționale de acest fel se numesc legături stohastice sau probabilistice. Studiul legăturilor de acest fel a condus la dezvoltarea teoriei corelației multiple [238,239].

Din punct de vedere matematic parametrii studiați sunt variabile aleatoare, variația lor într-un domeniu limitat fiind determinată de factori întâmplători, iar fiecare parametru urmează, în general, o lege de distribuție bine determinată.

Utilizând determinările experimentale au rezultat o serie de date care pot fi folosite la evaluarea efectului comparativ al parametrilor mășurați prin realizarea unei analize de corelare multiplă dintre valoarea indicelui de peroxid pentru uleiul de floarea soarelui netratat, ca variabilă dependentă, funcție de timpul de păstrare al uleiului și indicele de peroxid al uleiului tratat cu antioxidanți, ultimii ca variabile independente. Stabilirea legăturilor dintre aceste variabile ar putea avea aplicații practice directe. Aceste modele ale gradului de oxidare al uleiurilor sunt valabile pentru domeniul studiat.

Modelarea matematică statistică s-a realizat pentru:

- uleiul alimentat tratat cu antioxidanți naturali și sintetici, expus la aer (lumină și întuneric) pe o perioadă de 50 zile;
- uleiul de floarea soarelui preluat la 98°C pe un interval de timp de 12 ore.

II.4.1.4.1. Modelarea matematică a procesului de degradare oxidativă în timp a uleiului de floarea soarelui expus la lumină și păstrat la întuneric

S-a lucrat cu șase seturi de probe: ulei de floarea soarelui-Ufs, ulei cu adaos de antioxidant-quercețină, rutină, extract apos de fructe de *Ziziphus jujuba* (E1), extract apos de frunze de *Ziziphus jujuba* (E2), extract etanolic de fructe de *Ziziphus jujuba* (E3), pentru care s-a determinat indicele de peroxid.

Tabelul 67. Valorile indicelui de peroxid în cazul probelor expuse la lumină

Timp [zile]	IP Ufs	IP Ufs+Q	IP Ufs+R	IP Ufs+E1	IP Ufs+E2	IP Ufs+E3
0	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77
1	0,799	0,76	0,873	0,782	0,826	1,933
5	1,197	0,796	2,366	6,301	3,142	6,657
7	3,942	2,954	4,19	7,042	3,95	7,606
10	5,841	4,727	6,332	8,64	5,812	6,184
15	4,137	2,657	1,6	2,368	2,351	13,445
17	9,62	3,9	1,873	6,289	5,167	13,521
20	12,505	4,174	1,987	11,423	10,545	13,89
25	14,409	6,696	6,682	13,11	10,923	14,467
30	11,739	8,928	9,013	8,946	10,492	13,087
35	11,502	8,772	13,87	8,272	15,487	13,093
40	16,406	10,749	12,481	14,519	18,779	13,966
45	17,628	11,781	18,692	18,34	20,21	19,85
50	21,113	16,591	22,707	20,308	22,06	21,069

În cazul unei corelări multiple: $y=f(x_1, x_2)$, semnificația notațiilor este:

y	- IP pentru uleiul de floarea soarelui netratat
x_1	- timpul de păstrare al uleiului
x_2	Cazul I - IP al Ufs+quercețină(Q)
	Cazul II - IP al Ufs+rutină(R)
	Cazul III - IP al Ufs+extractapos din fructe de <i>Ziziphus jujuba</i> (E1)
	Cazul IV - IP al Ufs+extractapos din frunze de <i>Ziziphus jujuba</i> (E2)
	Cazul V - IP al Ufs+extractalcoolic din fructe de <i>Ziziphus jujuba</i> (E3)

După prelucrarea datelor experimentale s-au calculat [239]:

- indicatorul preciziei modelului, R^2 :

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_{icalc} - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}$$

- coeficientul de corelație, R:

$$R = \sqrt{1 - \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_{i\text{calc}})^2}{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}}$$

- deviația standard, σ a valorilor măsurate y față de valorile calculate pe baza ecuației de regresie Y , care poate servi la calcularea intervalului de încredere pentru fiecare valoare individuală y :

$$\sigma = \left(\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_{i\text{calc}})^2}{n} \right)^{1/2}$$

n - numărul de seturi de date,

y - variabila dependentă,

$y_{i\text{calc}}$ - valoarea rezultată pentru y pe baza ecuației de regresie,

\hat{y}_i - valoarea experimentală,

\bar{y} - media aritmetică a valorilor experimentale.

Prin utilizarea programului Statistica 6.0 s-au prelucrat și analizat datele experimentale, obținându-se o serie de modele statistice. Ecuațiile de regresie determinate pentru indicii de peroxid ai uleiului de floarea soarelui expus la lumină în funcție de timpul de păstrare și indicele de peroxid al probelor tratate cu antioxidanți cu indicatori de adecvanță corepunzători sunt prezentate în tabelul 68.

Tabelul 68. Ecuațiile și indicatorii de adecvanță determinați

Cazul	Antioxidant	Ecuația	Indicatori de adecvanță			
			R^2	R	F	σ
I	Quercetină	$y=1,1016+0,3334 \cdot x_1+0,1918 \cdot x_2$	0,9074	0,9526	53,879	2,2186
II	Rutină	$y=0,8744+0,4783 \cdot x_1-0,2333 \cdot x_2$	0,9162	0,957	60,135	2,1102
III	E1	$y=0,0713+0,2428 \cdot x_1+0,4545 \cdot x_2$	0,945	0,9722	94,737	1,7076
IV	E2	$y=1,0954+0,2296 \cdot x_1+0,36316 \cdot x_2$	0,915	0,956	59,214	2,1252
V	E3	$y= -0,0741+0,2985 \cdot x_1+0,270 \cdot x_2$	0,917	0,957	60,873	2,0984

Valorile coeficienților de corelare indică o bună corelare în cazul antioxidanților sintetici dar și naturali. Analiza corelativă realizată pe baza ecuațiilor arată că între variația indicilor de peroxid pentru uleiul de floarea soarelui netratat și cel tratat cu acești antioxidanți în timp există corelări bune, în special pentru probele tratate cu extract apos din fructe de ZJ (E1).

Tabelul 69. Valorile indicelui de peroxid în cazul probelor păstrate la întuneric

Timp [zile]	IP Ufs	IP Ufs+Q	IP Ufs+R	IP Ufs+E1	IP Ufs+E2	IP Ufs+E3
0	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77
1	0,799	0,768	0,386	1,7	1,081	3,039
5	0,788	0,791	1,599	3,186	4,71	9,075
7	4,561	1,952	2,619	4,741	4,991	9,13
10	6,282	3,101	3,85	5,832	3,517	8,835
15	5,446	3,461	3,82	3,111	6,758	13,372
17	12,469	4,012	4,891	7,35	7,189	14,108
20	15,723	4,392	8,353	10,594	10,908	15,993
25	15,159	5,268	10,912	12,16	11,703	16,103
30	18,34	7,574	8,858	8,372	9,418	14,068
35	19,956	7,29	10,203	10,718	11,74	16,84
40	20,985	10,255	15,956	12,762	12,34	18,681
45	19,341	14,748	18,301	15,97	13,18	19,32
50	21,34	17,929	23,188	21,068	25,56	22,31

În cazul probelor păstrate la întuneric ecuațiile statistice determinate pentru indicii de peroxid ai uleiului de floarea soarelui, în funcție de timpul de păstrare și indicele de peroxid al uleiului tratat cu antioxidanți sunt prezentate în tabelul 70.

Tabelul 70. Ecuațiile și indicatorii de adecvanță determinați

Cazul	Antioxidant	Ecuația	Indicatori de adecvanță			
			R ²	R	F	σ
I	Quercetină	$y=0,867+0,815 \cdot x_1-1,149 \cdot x_2$	0,942	0,970	88,265	2,135
II	Rutină	$y=1,232+0,697 \cdot x_1-0,566 \cdot x_2$	0,907	0,952	53,521	2,691
III	E1	$y=1,520+0,440 \cdot x_1+0,073 \cdot x_2$	0,892	0,944	45,232	2,903
IV	E2	$y=1,818+0,5147 \cdot x_1-0,144 \cdot x_2$	0,893	0,945	46,175	2,876
V	E3	$y=-0,062+0,361 \cdot x_1+0,299 \cdot x_2$	0,899	0,948	48,963	2,809

Valorile indicatorilor de adecvanță sunt satisfăcătoare, fapt ce denotă corelări apreciable în cazul regresiei multiple. Parametrii de corelare calculați fiecare pe baza celuilalt argumentează o capacitate de predicție foarte bună a modelului matematic.

Rezultatele experimentale au dovedit că în funcție de condițiile de păstrare stabilitatea uleiului la autooxidare crește în ordinea: expunere la lumină < păstrare la întuneric. Antioxidanții folosiți au redus gradul de oxidare al uleiurilor, lucru sesizat din valorile mai mici ale indicilor de peroxid.

II.4.1.4.2. Modelarea matematică a procesului de degradare oxidativă în timp a uleiului de floarea soarelui prelucrat la 98°C

S-a lucrat cu opt seturi de probe: ulei de floarea soarelui (Ufs), ulei cu adaos de antioxidant-quercetină, rutină, acid galic, extract metanolic ZJ frz (E1), extract metanolic ZJ fru (E2), pentru care s-a determinat indicele de peroxid. Valorile indicilor de peroxid sunt prezentate în tabelele 57 și 58.

În cazul unei corelări multiple: $y=f(x_1, x_2)$, semnificația notațiilor este:

y	- IP pentru uleiul de floarea soarelui netratat	
x ₁	- timpul de păstrare al uleiului	
x ₂	Cazul I	- IP al Ufs+quercetină(Q)
	Cazul II	- IP al Ufs+rutină(R)
	Cazul III	- IP al Ufs+acid galic(AG)
	Cazul IV	- IP al Ufs+extract(E1) metanolic din frunze de <i>Ziziphus jujuba</i>
	Cazul V	- IP al Ufs+extract(E2) metanolic din fructe de <i>Ziziphus jujuba</i>

Ecuțiile de regresie determinate pentru indicii de peroxid ai uleiului de floarea soarelui prelucrat la 98°C în funcție de timpul de păstrare și indicele de peroxid al probelor tratate cu antioxidanți sintetici și naturali, precum și indicatori de adecvanță corepunzători sunt prezentați în tabelul 71.

Tabelul 71. Ecuțiile și indicatorii de adecvanță determinați

Cazul	Antoxidant	Ecuția	Indicatori de adecvanță		
			R ²	R	σ
I	Quercetină	$y = -0,3602 + 0,56117 \cdot x_1 + 0,098 \cdot x_2$	0,847	0,920	1,571
II	Rutină	$y = -0,5049 + 0,4723 \cdot x_1 - 0,1408 \cdot x_2$	0,851	0,922	1,552
III	Acid galic	$y = -0,4304 + 0,8043 \cdot x_1 - 0,0173 \cdot x_2$	0,817	0,904	1,718
IV	E1	$y = -0,0752 + 0,2883 \cdot x_1 + 1,9526 \cdot x_2$	0,870	0,933	1,450
V	E2	$y = -0,1855 + 0,6398 \cdot x_1 - 0,1379 \cdot x_2$	0,825	0,908	1,679

Valorile coeficienților de adecvanță indică o bună corelare pentru antioxidanții sintetici cât și pentru cei naturali. Analiza corelativă realizată pe baza ecuațiilor arată că între variația indicilor de peroxid pentru uleiul de floarea soarelui netratat și cel tratat cu antioxidanți studiați în timp există corelări apreciable, în special pentru probele tratate cu extracte vegetale.

Rezultatele cercetărilor au constituit obiectul a 4 lucrări științifice [241-244] și a unei lucrări trimise la o conferință internațională [245].

II.4.2. Determinarea activității antioxidante a flavonoidelor la nivel celular

Deși oxigenul este indiscutabil esențial pentru viața organismelor, s-a dovedit că el poate participa și la distrugerea țesuturilor precum și la blocarea abilității acestora de a funcționa normal ca urmare a generării în timpul proceselor metabolice a radicalilor liberi. În ciuda capacității antioxidante proprii a sistemului celular daunele produse la nivelul ADN-ului precum și asupra proteinelor sugerează că aceste specii reactive joacă un rol important în dezvoltarea unor boli precum cancerul, ateroscleroza, artritele și unele boli neurodegenerative [246].

Cu excepția unor circumstanțe speciale cum ar fi radiația ionizantă, razele UV, radicalii liberi sunt produși în celule ca urmare a unor reacții de transfer de electroni care pot fi catalizate uneori de anumite enzime. Sursa majoră de generare a radicalilor liberi în condiții normale o constituie transferul unui electron care are loc la nivelul mitocondriilor și a reticulului endoplasmatic [247].

Flavonoidele exercită un rol important nutrițional, semnificația lor rezultând din creșterea capacității antioxidante a sistemului imunitar uman și interacționează ușor și rapid cu radicalii liberi stăgând astfel reacțiile radicalice înainte ca celulele să fie semnificativ afectate. Deoarece o moleculă de antioxidant poate să reacționeze doar cu un singur radical liber, organismul uman are permanent nevoie de refacerea și reînnoirea resurselor antioxidante [246, 247].

S-a urmărit testarea extractelor brute etanolice și a fiecărui flavonoid din punct de vedere al prevenirii și/sau atenuării stresului oxidativ la nivel celular (leucocitele din sângele sănătos), precum și determinarea efectului antioxidant al pretratamentului leucocitelor umane cu flavonoide.

Determinarea efectului antioxidant al pretratamentului leucocitelor umane cu flavonoide la diferite concentrații s-a bazat pe metoda "cozii de cometă" ce urmează principiul electroforezei în gel de agaroză [247,248].

Reactivi :

- acetonitril (HPLC); acid fosforic 85%, Merck; metanol p.a., Merck;
- standarde de flavonoide: miricetina (90%), quercetina (98%), kaemferol (90%), luteolina (90%), rutina (95%), Sigma Aldrich;
- mediu de celule RPMI 1640; PBS (tampon salin fosfat); FCS (ser fetal de vițel); Histopaque (Ficoll-Hypaque density 1077 g/L); H₂O₂, soluție 0,1 %;
- agaroză, Aldrich; clorură de sodiu, 2mM; Na₂EDTA, 1mM ; Tris 10 mM; Triton X-100, 1%, Merck; NaOH, 1N; Tris-HC tampon (pH=7,5)
- bromura de etidiu, soluție 10mg/mL, BIORAD Company;
- apa bidistilată;
- etanol 94%
- acid clorhidric 25%.

Aparatura:

- HPLC Agilent 1100 cu pompa binară și degazor sub vid, coloana Nucleosil C18, 5 μm, 4x125 mm, detector UV cu lungime de undă variabilă, soft HPChemStation;
- pH-metru InaLab;
- balanță analitică Kern;
- rotavapor Model LABORTA control 400;

- centrifugă Hettich;
 - omogenizator Vortex;
 - baie termostat;
 - aparat de electroforeză în gel de agaroză orizontal;
 - microscop cu fluorescență tip Nikon. Extractele etanolice de flavonoide din *Hydrangea paniculata* și *Ziziphus jujuba* au fost obținute după metoda lui Hasler și Stichler, conform paragrafului III.2.5.[222].
- Conținutul de flavonoide s-a determinat prin HPLC.

Pregătirea celulelor umane:

Aproximativ 100 μ L sânge proaspăt prelevat de la un donator uman sănătos s-a tratat într-o eprubetă de polipropilenă cu 1 mL mediu RPMI și 10% FCS. Amestecul obținut s-a lăsat pe gheață 30 minute, după care în amestec s-a prelins cu ajutorul unei micropipete 1 mL Ficoll. Proba astfel obținută s-a centrifugat la 3600 rot./min. timp de 15 minute la 4° C. După centrifugare leucocitele separate sub forma unui inel de culoare gri roz pal au fost extrase cu ajutorul unei pipete Pasteur, resuspendate în 1 mL PBS omogenizate cu ajutorul unui Vortex. (soluția A) [248, 249]. În 11 tuburi Ependorf etichetate s-au introdus câte 85 μ L din soluția A (conținând între 20000-30000 de leucocite), peste care s-au adăugat următoarele:

- 100 μ L PBS (E1- control)
- 100 μ L soluții etanolice standard de flavonoide de concentrații diferite (miricetina 0,15 %, quercetina 2,7%, respectiv 0,08%, kaemferol 0,02 %, luteolina 0,07 %, rutina 0,5%, respectiv 0,15%) * în PBS

(*Concentrațiile soluțiilor standard de flavonoide au fost identice cu cele determinate experimental din extractele etanolice de *Hydrangea paniculata* și *Ziziphus jujuba*) (E2- E8)

- 100 μ L extract etanolic de *Hydrangea paniculata*, respectiv de *Ziziphus jujuba* (E9-E10)
- 100 μ L H₂O₂ 0,1 % (E11)

Probele E1-E10 au fost incubate la 37° C timp de 30 minute.

Proba E11 a fost menținută la întuneric la 4° C pe perioada de incubare a celorlalte. După expirarea perioadei de incubare, probele E2-E10 au fost tratate cu soluție 0,1% H₂O₂ în PBS și păstrate la întuneric timp de 5 minute pe gheață.

Pregătirea și electroforeza leucocitelor pretratate [248,250]

- Gelul de agaroză, preparat prin încălzirea la 40° C a unei soluții 1% agaroză în PBS a fost întins pe suprafața a 11 lamele de sticlă menținute timp de 10 minute în prealabil la 4°C. După o parțială solidificare a acestuia, din probele pregătite anterior s-au prelevat volume de câte 50 μ L, conținând între 15000 și 20000 de celule; Lamelele au fost păstrate timp de 10 minute pe gheață până la solidificarea completă a gelului;
- Lamelele au fost apoi imersate într-o soluție rece (4 °C) de liză proaspăt preparată după următorul protocol (NaCl 2 mM, Na₂EDTA 1 mM, Tris 10 mM ajustată la pH=10 cu NaOH 1 N, și 1% Triton X-100) și menținute în această soluție timp de 60 minute;
- După expirarea perioadei de liză, lamelele au fost introduse în cuva de electroforeză umplută cu soluție tampon preparată astfel: soluție NaOH 300 mM și soluție Na₂EDTA 1 mM, pH =13. Electroforeza s-a efectuat timp de 50 minute la o tensiune de 30 V, la temperatura de 4° C și la întuneric

- După expirarea timpului de electroforeză lamelele au fost scoase din tancuri și spălate de 2-3 ori cu soluție tampon de neutralizare (Tris-HCl pH=7,5) păstrate la întuneric și temperatură scăzută (4°C)
- Lamelele neutralizate au fost tratate cu 30 μ L soluție 10 mg/mL bromură de etidiu acoperite cu o folie de aluminiu și depozitate până la analiză într-o cameră întunecoasă cu umiditate relativă 70%, pentru a preveni uscarea completă a gelului.

Cuantificarea degradării leucocitelor:

- Măsurătorile experimentale s-au făcut prin examinarea directă a lamelelor la un microscop cu fluorescență tip Nikon la o lungime de undă a radiației excitate la 520 nm, respectiv la o lungime de undă a radiației emise 620 nm.
- Clasificarea celulelor s-a făcut după o metodă rapidă de evaluare vizuală folosind o scală gradată de la 0 - 4 astfel:

gradul 0- celule degradate, mai puțin de 5% din total; (nedeградate)
 gradul 1- celule degradate între 5-25% din numărul total; (slab degradate)
 gradul 2- celule degradate între 25-45% din numărul total; (mediu degradate)
 gradul 3- celule degradate între 45-70% din numărul total; (puternic degradate)
 gradul 4- celule degradate mai mult de 70% din numărul total.(foarte puternic degradate)

Tabelul 72. Efectul soluțiilor standard de flavonoide asupra degradării leucocitelor.

Tipul de tratament utilizat	Procentul de celule cu grade diferite de deteriorare [%]				
	Gr.0	Gr.1	Gr.2	Gr.3	Gr.4
Soluție etanolică de miricetina (0.15 %) +100 μ L H ₂ O ₂ 0.1%	12.5 \pm 0.3	18.5 \pm 1.2	37.9 \pm 2.2	18.6 \pm 4.7	12.5 \pm 3.6
Soluție etanolică de quercetina (2.7%) +100 μ L H ₂ O ₂ 0.1%	7.1 \pm 0.5	9.51 \pm 0.1	40.5 \pm 2.6	22.3 \pm 4.7	20.6 \pm 2.5
Soluție etanolică de quercetina (0.08%) +100 μ L H ₂ O ₂ 0.1%	6.0 \pm 0.5	11.5 \pm 1.1	35.8 \pm 2.1	28.3 \pm 1.4	18.4 \pm 1.4
Soluție etanolică de luteolina (0.07%) +100 μ L H ₂ O ₂ 0.1%	18.2 \pm 0.3	20.3 \pm 0.4	33.7 \pm 1.9	20.3 \pm 2.8	8.5 \pm 0.6
Soluție etanolică de kaemferol (0.02%) +100 μ L H ₂ O ₂ 0.1%	6.0 \pm 0.5	11.5 \pm 1.1	35.8 \pm 2.1	28.3 \pm 1.4	28.4 \pm 2.4
Soluție etanolică de rutina (0.15%) +100 μ L H ₂ O ₂ 0.1%	2.1 \pm 0.2	6.4 \pm 1.5	41.8 \pm 2.1	17.6 \pm 2.3	32.1 \pm 1.7
Proba de control (alcool etilic)	3.0 \pm 0.2	8.4 \pm 1.6	36.8 \pm 1.4	14.2 \pm 2.1	38.6 \pm 1.4
Celule + soluție de H ₂ O ₂ 0.1% în PBS (100 μ L)	-	1.5 \pm 0.1	7.9 \pm 0.6	25.4 \pm 3.2	65.2 \pm 2.1

După cum se observă din datele tabelului 72, toate flavonoidele testate au scăzut procentul de celule deteriorate (grad 3 și 4) în urma atacului apei oxigenate. Din datele preliminare s-a putut constata că luteolina și apoi miricetina au prezentat cea mai ridicată activitate antioxidantă, în cazul luteolinei înregistrându-se o diminuare de 50% a celulelor de gradul 3 și 4 existente în proba de control și o reducere de aproape 4 ori în cazul în care celulele au fost expuse acțiunii apei oxigenate. Activitatea de prevenire a oxidării leucocitelor din sângele uman este mai redusă atunci când celulele au fost tratate cu extractele etanolice de *Hydrangea paniculata* și *Ziziphus jujuba*, după cum se constată și din datele prezentate în tabelul 73.

Tabelul 73. Efectul extractelor etanolice de *Hydrangea paniculata* și *Ziziphus jujuba* asupra degradării leucocitelor.

Tipul de tratament utilizat	Procentul de celule cu grade diferite de deteriorare [%]				
	Gr.0 < 5 %	Gr.1 5 – 25%	Gr.2 25-45 %	Gr.3 45-70 %	Gr.4 > 70 %
Extract etanolic de <i>Hydrangea paniculata</i> +100 μ L H ₂ O ₂ 0.1%	6.4 ± 0.2	15.4± 2.3	34.8± 2.4	22.7± 4.7	20.7± 3.6
Extract etanolic de <i>Ziziphus jujuba</i> + 100 μ L H ₂ O ₂ 0.1%	7.9± 0.4	16.7± 1.8	41.8± 1.4	16.6± 2.5	17.0± 2.5
Proba de control (alcool etilic)	6.0± 0.5	11.5± 1.1	35.8± 2.1	28.3± 1.4	18.4± 1.4
Celule + soluție de H ₂ O ₂ 0.1% în PBS (100 μ L)	18.2± 0.3	20.3± 0.4	33.7± 1.9	20.3± 2.8	8.5± 0.6

Studiile efectuate au evidențiat faptul că toate flavonoidele luate în studiu au prezentat o activitate antioxidantă semnificativă, unele dintre ele (luteolina și miricetina) deși în concentrații mici (0.07%, respectiv 0.15%) reduc la jumătate deteriorările pricinuite de radicalii liberi la nivel celular.

Referitor la activitatea antioxidantă a flavonoidelor se poate concluziona că, fiecare flavonoid are o capacitate antioxidantă mai mare când acționează singur, decât atunci când el acționează combinat cu alte flavonoide, iar capacitatea antioxidantă crește cu creșterea concentrației flavonoidului în soluție, această creștere nefiind însă proporțională cu concentrația.

Rezultatele cercetării constituie obiectul unei lucrări științifice trimisă spre publicare[251].

De asemenea s-a realizat o investigație a activității antioxidante a unei serii de flavonoide prin metode computaționale, care a constituit obiectul unei lucrări comunicate la „Zilele Academice Arădene”, ediția XVI-a Arad, 12-14 mai, 2006 [252].

II.4.3. Determinarea efectului unui extract de *Ziziphus jujuba* asupra unor parametrii biochimici și asupra activității unor enzime la șobolani

Deoarece sistemele oxido reducătoare sunt importante în organismele umane, fenomenele oxidative în care oxigenul este utilizat în metabolismul eritrocitar sunt următoarele: autooxidarea flavoproteinelor, a glutationului prin intermediul *glutation reductazei* și a *methemoglobin-reductazei*, precum și oxidarea prin flavoproteine a NADH produs prin glicoliza aerobă.

Insuficiența mecanismelor reducătoare (*catalaza*, *glutation peroxidaza*, *glutation reductaza*) duce la acumularea de methemoglobină în eritrocite în cantități patologice. În cazurile în care hemoglobina este instabilă, se poate forma methemoglobină, care se leagă de glutacion sau de alte substanțe din eritrocit având ca rezultat niște agregate care migrează pe suprafața internă a membranei, legându-se de aceasta prin legături disulfidice [253].

Prin reacțiile de oxido reducere ale unor medicamente rezultă H_2O_2 ce ar putea induce hemoliza, dacă nu i s-ar opune sisteme protectoare din hematii formate. Dintre ele se pot enumera: glutacionul, *glutation peroxidaza*, *catalaza* și *superoxid dismutaza*, care acționează prompt în momentul producerii peroxidului de hidrogen.

Glutation peroxidaza descompune H_2O_2 mult mai eficient decât *catalaza*.

Catalaza și *glutation peroxidaza* au un rol deosebit de important în protejarea membranei celulare de oxidarea distructivă determinată de H_2O_2 , iar în caz de insuficiență a activității *glutation peroxidazei* se constată o creștere a activității *catalazei* [254].

În literatura studiată nu au fost întâlnite referiri la efectul posibil al extractelor de *Ziziphus jujuba* asupra parametrilor sanguini ai organismelor animale și asupra activității unor enzime eritrocitare.

În cadrul tezei s-au realizat cercetări axate îndeosebi pe relevarea acțiunii extractului apos din fructe de *Ziziphus jujuba* asupra organismelor vii, urmărind totodată și fenomenele oxidative în care oxigenul este utilizat în metabolismul eritrocitar. Datorită conținutului extractului în compuși flavonoidici, reacțiile de oxido-reducere a acestora sunt acționate de sistemele protectoare din hematii și de enzimele oxidoreducătoare, care acționează prompt în momentul producerii peroxidului de hidrogen.

În colaborare cu Catedra de Biochimie a Facultății de Medicină Veterinară a Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului Timișoara, au fost efectuate cercetări cu scopul de a identifica:

- Modificări ce apar la nivelul **principalilor parametrii sanguini**
- Modificări ce apar la **nivelul activității unor enzime eritrocitare**
- Modificări ce apar **la nivelul unor organe**
- Modificări ce apar la nivelul **formulei leucocitare**

la șobolani tratați cu extract apos de *Ziziphus jujuba*.

S-au determinat parametrii biochimici: conținutul unor indicatori ai instalării stresului oxidativ: malondialdehida (MDA) și glutacionul (GSH) [247]; activitățile enzimelor oxidoreducătoare: *glutation peroxidaza* (GSH-px), (E.C.1.11.1.9), *glutation reductaza* (GSH-red), (E.C.1.6.4.2), *catalaza eritrocitară* (CAT), (E.C.1.11.1.6) și *superoxid dismutaza* (SOD), (E.C.1.15.1.1.) precum și activitățile *fosfatazei alcaline* (PA), (E.C.2.6.1.12), *alanin amino transferazei* (ALAT), (E.C.2.6.1.2) și *aspartat amino transferazei* (ASAT), (E.C.2.6.1.1) [255].

Au fost determinate de asemenea modificările care apar la nivelul unor organe (ficat, rinichi, splină) și modificările care apar la nivelul formulei leucocitare [254].

II.4.3.1. Influența unui extract apos de Ziziphus jujuba asupra unor enzime oxidoreducătoare și a unor parametrii biochimici

Material și metodă:

Experimentul a fost realizat pe două loturi de câte 10 șobolani Wistar, în vârstă de un an, femele, în greutate de 230 – 250g.

Șobolani au fost menținuți tot timpul experimentului în condiții corespunzătoare atât din punct de vedere al microclimatului cât și al calității furajelor.

Celor două loturi experimentale li s-a administrat zilnic timp de 14 zile după cum urmează :

- Lotul M- 0,5 mL apă distilată;
- Lotul L - 0,5 mL extract apos de *Ziziphus jujuba* (0,1640 mg rutina / mL extract).

Sacrificarea s-a făcut după o prealabilă anestezie, respectându-se condițiile impuse de Legea 205 /2004, art.7, 18, 22 și reglementările nr. 143/400/2002 și 37/2002, privind protecția animalelor vertebrate în cazul utilizării pentru experimente și alte scopuri științifice.

S-a recoltat sânge prin puncție cardiacă pe anticoagulant (heparină). După sacrificare s-au recoltat de la fiecare individ, următoarele organe: **ficat, rinichi și splină**.

S-a determinat concentrația de malondialdehidă (MDA) și glutation (GSH) activitățile următoarelor enzime oxidoreducătoare: *catalaza* (CAT), *superoxid dismutaza* (SOD), *glutacion peroxidaza* (GSH-px), *glutacion reductaza* (GSH-red), precum și activitatea transaminazelor *alaninamino transferaza* (ALAT), *aspartatamino transferaza* (ASAT) și *fosfataza alcalină* (PA) prin metode colorimetrice [254,255].

Ca urmare a studiilor efectuate s-a determinat și influența extractului de *Ziziphus jujuba* asupra formulei leucocitare, formula leucocitară fiind un examen calitativ și cantitativ al elementelor figurate albe, stabilindu-se procentul fiecărei varietăți din mai multe leucocite numărate.

Prepararea hemolizatului

S-a prelevat câte 1 mL sânge, care s-a centrifugat 10 minute după care s-a îndepărtat stratul superior și apoi s-a adăugat 5 mL soluție izotonică de NaCl 0.85%; după agitare s-a centrifugat din nou și s-a prelevat supernatantul repetându-se spălarea de 3 ori.

0,2 mL eritrocit s-a adăugat la un volum de cel puțin 4 mL H₂O bidistilată și s-a lăsat în repaus timp de 10 minute la temperatura camerei. După agitare, amestecul s-a centrifugat pentru îndepărtarea stromei și s-a reținut supernatantul.

Metodele de analiză

Determinarea malondialdehidei (MDA) [254]

Principiul metodei. Metoda se bazează pe reacția dintre malondialdehidă cu acidul tiobarbituric, cu formarea unui produs colorat roșu cu maxim de absorbție la 532 nm.

Modul de lucru :

Se întocmește o curbă etalon conform tabelului de mai jos.

Eprubeta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
mL sol.standard	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
mL apă	49,5	49	48,5	48	47,5	47	46,5	46	45,5	45
Conc. etalon $\mu\text{mol/l}$	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

Se pregătesc 3 probe: proba de analizat, martor și probele etalon. Peste 0,5 mL plasmă se adaugă 0,5 mL reactiv de lucru 4, în martor se adaugă 0,5 mL apă distilată și 0,5 mL reactiv de lucru 4, iar în probe, peste 0,5 mL din fiecare etalon se adaugă 0,5 mL reactiv de lucru 4. Se mențin eprubetele în baia de apă la fierbere timp de 30 minute, se centrifugează și se determină absorbanta supernatantului la 532 nm.

Reactivi:- Reactiv TBA: 0,7 g TBA p.a se dizolvă în acid percloric 10% prin încălzire la 50°C. (soluția e stabilă 4 săptămâni la 20°C). (1)
 - Acid tricloracetic: 20%. (2)
 - Standard MDA: 164 mg 1,1,3,3 tetrahidroxipropan dizolvat în apă
 - Reactiv de lucru: 1 parte reactiv 1 + 3 părți reactiv 2.

Determinarea glutationului [255]

Principiul metodei: Glutationul redus formează cu acidul dinitro tiobarbituric (DNTB) un produs colorat care are maximum de absorbție la 412 nm.

Modul de lucru: 0,2 mL sânge total se hemolizează cu 2 mL apă.

0,1 mL hemolizat se tratează cu 5 mL reactiv Drabkin, pentru determinarea hemoglobinei din hemolizat.

Pentru determinarea glutationului se procedează conform protocolului de mai jos, astfel:

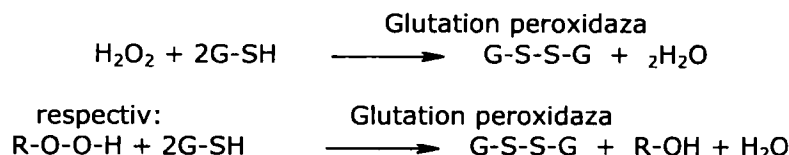
	Reactivi	Probă	Martor (blanc)
1.	Hemolizat	2 mL	-
2.	Apă distilată	-	2 mL
3.	Agent de precipitare (acid metafosforic glacial și EDTA Na_2 , NaCl)	3 mL	3 mL
Se lasă în repaus 5 minute și se filtrează			
4.	Filtrat	2 mL	2 mL
5.	Na $_2$ HPO $_4$ 0,3 M	8	8
6.	DNTB	1	1
Se citește absorbanta la 412 nm			

$$\text{Calculul: } \text{Conc.glutation } ((\mu \text{ moli/g Hb}) = \frac{A_p - A_m}{cH_b} \cdot 30,4$$

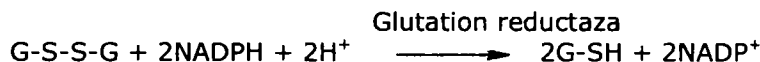
unde: cH_b = concentrația H_b din hemolizat

Determinarea glutation peroxidazei [255]

Principiul metodei: Glutation peroxidaza catalizează descompunerea apei oxigenate sau a unui peroxid în prezența donorului de hidrogen, glutationul redus.



Cel mai potrivit substrat pentru determinarea enzimei este terț-butil peroxidul. Viteza de formare a glutationului oxidat este măsurată cu ajutorul glutation reductazei, urmărind fotometric la λ 360 nm oxidarea coenzimei reduse $\text{NADPH} + 2\text{H}^+$.



Modul de lucru: Reactivii sunt adăugați în ordine în cuve cu un volum critic de 1 mL, conform tabelului următor.

Nr. crt	Reactivi	Probă (μl)	Martor (blanc)(μl)
1.	Tris-HCl, 1M EDTA 5m M, pH 8	100	100
2.	Glutation G-SH 0,1M	20	20
3.	Glutation reductază, 10 n/mL	100	100
4.	NADPH + H ⁺ , 2m M	100	100
5.	Hemolizat 1:20	10	10
6.	Apă distilată	170	660
Se incubează la 37°C timp de 10 minute			
7.	Butilhidroxiperoxid 7 mM	-	10

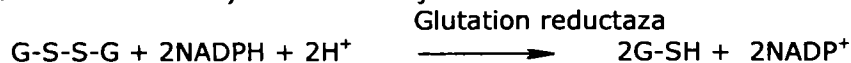
Rata va fi de aproximativ 0,015-0,02 OD unit/min, care se exprimă în UI/g Hb.

$$\text{Glu-px } (\mu \text{ moli/g Hb}) = \frac{\Delta A}{A_{Hb}} \cdot 32.15$$

A_{Hb} = absorbanța hemolizat

Determinarea glutation reductazei [254]

Principiul metodei: se bazează pe reacția de transformare a glutationului din forma oxidată (G-S-S-G) în forma redusă (G-SH), în prezența NADPH₂ (nicotinamid adenin dinucleotida-forma redusă) conform reacției:



Modul de lucru: Se realizează proba și martorul (blanc) conform tabelului de mai jos.

Nr. crt	Reactivi	Probă	Martor
1.	Sol NADH+H ⁺ 6mM	0,5	0,5
2.	Apă distilată	-	0,1
3.	Hemolizat	0,1	-
Se incubează 5 minute la 37°C			
4.	G-S-S-G	0,1	0,1
Se citește absorbanta la 360 nm			

$$\text{Calculul: Glu - red } (\mu \text{ moli/g Hb}) = \frac{A_p - A_m}{\text{min}} \cdot \frac{2120}{cH_b}$$

cH_b = conc. H_b din hemolizat

Oxidarea NADPH+H⁺ este urmărită la 360 nm.

Determinarea catalazei eritrocitare [255]

Principiul metodei: Catalaza sanguină s-a determinat prin metoda colorimetrică Sinha. Această metodă se bazează pe faptul că dicromatul de potasiu este redus în mediul acid, de către peroxidul de hidrogen la acetat cromic, compus colorat în verde care se poate fotocolorimetra la 570 nm.

Catalaza sanguină se lasă să acționeze asupra unei cantități fixe de H₂O₂, o perioadă determinată de timp, apoi reacția enzimatică este oprită prin adăugarea unui amestec de dicromat de potasiu în soluție de acid acetic glacial, iar cantitatea de H₂O₂ rămasă este determinată prin diferență față de o probă etalon.

Reactivi: - tampon fosfat după Sørensen preparat din:

Soluția a: fosfat monopotasic 66,7 mM. KH₂PO₄ - se usucă 1-2 h la 110°C
9,8 g KH₂PO₄, se solvă în apă demineralizată și lipsită de CO₂ și se diluează la 1000 mL;

Soluția b: fosfat disodic 66,7 mM - sarea anhidră - se usucă 1-2 h la 110°C
9,479 g Na₂HPO₄, se solvă în apă demineralizată și lipsită de CO₂, se completează la 1000 mL.

Se amestecă 39,2 mL din soluția a cu 60,8 mL din soluția b și se aduce la 100 mL cu apă demineralizată pentru a se obține un pH = 7.

- H₂O₂ 0,16 M
- Soluție bicromat de potasiu 0.1%
- CH₃COOH glacial

Modul de lucru: Peste 0,1 mL de sânge s-au adăugat 0,4 mL soluție tampon fosfat cu pH = 7 și 0,5 mL H₂O₂ 0,16 M. După o scurtă agitare, s-a incubat un minut la termostat la temperatura de 25⁰ C. S-au adăugat apoi 2 mL soluție de K₂Cr₂O₇ 1% în acid acetic glacial. Probele s-au supus apoi fierberii timp de 10 minute, apoi soluțiile s-au răcit sub jet de apă și s-au citit densitățile optice la λ = 570 nm. În paralel s-a efectuat și o probă etalon cu 0,5 mL H₂O₂ 0,16 M

Calculul :

Activitatea catalazică (μM H₂O₂/min,mL) = $A_{\text{etalon}} - A_{\text{probă}} / A_{\text{etalon}} \times 10 \times \text{diluție}$.

Determinarea superoxid dismutazei (SOD) [255]

Principiul metodei.

Metoda se bazează pe capacitatea superoxid dismutazei de a inhiba reducerea sării de tetrazoliu Nitro Blue Tetrazolin (NBT), de către radicalii superoxid. O unitate enzimatică de SOD reprezintă cantitatea de enzimă care produce 50% inhibiție în condiții standard. Radicalii superoxid sunt generați în mediu de reacție prin fotoreducerea riboflavinei.

Reactivi:

- soluția NBT -1,5mM în apă distilată;
- soluție EDTANa₂ 0,1 M în apă distilată adusă la pH 7,8 cu NaOH 0,1 N;
- soluție riboflavină 0,12 M în apă distilată.;
- soluție tampon fosfat de potasiu 36 mM, pH =7,8.

Modul de lucru: Se pregătește mediul de reacție format din: 2,55 mL soluție tampon fosfat; 0,20 mL soluție EDTANa₂; 0,1 mL plasmă sau hemolizat; 0,1 mL soluție NBT; 0,05 mL soluție riboflavină.

Paralel se face o probă martor cu aceeași compoziție, cu excepția hemolizatului care va fi înlocuită cu soluție tampon.

Martorul și proba au fost supuse iluminării timp de 5 minute la un bec de neon într-o incintă întunecată, după care se citește extincția la 560 nm.

În martor, deoarece lipsește enzima, radicalii superoxid formați prin fotoreducerea riboflavinei, reduc sarea de tetrazoliu la un formazan, intensitatea culorii albastre fiind maximă (100% inhibiție).

În probă, SOD descompune o parte din radicalii superoxid, iar cantitatea de formazan formată este mai mică.

Procentul de inhibiție realizat de enzima din probă se calculează utilizând relația:

$$100 - \frac{A_p}{A_m} \times 100 = a\% \text{ inhibiție}$$

Pentru a exprima rezultatele obținute în unități enzimatică, a% inhibiție se raportează la mg/mL proteină în probă.

$$U / \text{mg} = \frac{a\% \text{ inhibiție}}{50\% \text{ inhibiție} \cdot \text{mg} / \text{ml}}$$

Determinarea fosfatazei alcaline (E.C.3.1.3.1.- ortofosforic monoester fosfohidrolaza)[255]

Principiul metodei: Fosfatasa alcalină este o enzimă care acționează asupra substratului β -glicerofosfat de sodiu în mediu alcalin și îl hidrolizează eliberând fosfatul anorganic. Activitatea fosfatazelor serice se exprimă în unități de activitate fosfatazică. Se definește ca o unitate fosfatazică, activitatea unui ser care acționează în condiții standardizate de timp, temperatură și concentrație asupra unui substrat (ester fosforic) și eliberează 1 mg P raportat la 100 cm³ ser.

Principiul metodei constă în determinarea fosforului anorganic din ser după incubare timp de o oră în prezența soluției substrat la 37°C. În paralel s-a efectuat o probă martor determinând fosforul anorganic din ser imediat după adăugarea substratului. Rezultatul activității fosfatidice se obține scăzând din rezultatul probei de determinat rezultatul probei martor.

Reactivi:

- Soluție inițială de β -glicerofosfat. (1 g glicerofosfat de sodiu și 0,85 g barbiturat de sodiu se solubilizează cu 30 mL apă distilată și se aduce la balon cotat de 100 mL cu apă distilată. Deasupra se adaugă 3 mL eter de petrol și se păstrează la gheață).
- Soluție alcalină de lucru (substrat). (Într-un balon cotat de 100 mL, ce conține 3 mL ulei de petrol, 50 mL din soluția inițială și 2,8 mL NaOH n/10 și se adaugă apă până la semn. pH-ul trebuie să fie 8,6).
- Acid tricloracetic 20 %
- Soluție molibdat de amoniu (25 g molibdat de amoniu se dizolvă în 300 mL apă distilată și se adaugă 75 mL acid sulfuric concentrat și se aduce la balon cotat de 500 mL cu apă distilată).
- Soluție etalon (0,4394 g KH₂PO₄ și apă distilată la 1000 mL; soluția etalon diluată se prepară din 1 mL soluție concentrată și apă distilată la 10 mL (10 μ gP/mL).
- Soluție acid ascorbic 1,5%.

Mod de lucru:

În trei eprubete de centrifugă se introduc, respectiv se prelucrează:

<i>Reactivi (mL)</i>	<i>Proba</i>	<i>Martor</i>	<i>Etalon</i>
Substrat (β -glicerofosfat de Na)	2,5	2,5	-
Termostatare (numai proba) la 37°C, 1 minut			
Ser	0,25	0,25	-
Proba se "incubează" timp de 30 minute la 37°C			
Apă distilată	-	-	1,5
Etalon	-	-	0,75
Acid tricloracetic 20%	2,25	2,25	0,25

Proba de determinat se lasă 10 minute în repaus și se centrifughează 5 minute la 3000 rot/minut.

Proba martor se efectuează adăugând imediat cei trei reactivi, după care se centrifughează în aceleași condiții.

Supernatant	1,5	1,5	1,5
Molibdat de amoniu	0,6	0,6	0,6
Apă distilată	0,8	0,8	0,8
Acid ascorbic 1,5%	0,1	0,1	0,1

Se citește absorbanta după 10 minute la $\lambda = 600 \text{ nm}$.

Calcul:

$$\text{mg P} / 100 \text{ mL} = \frac{A_p - A_m}{A_{et} - A_m} \cdot c_{et} \cdot 100$$

Determinarea activității transminazelor serice (alanin amino-transferaza ALAT și aspartat amino-transferaza ASAT) [255]

Determinarea activității alanin amino-transferaza (ALAT)

Principiul metodei: Prin tratare cu soluția alcalină de 2,4-dinitrofenilhidrazina, acidul piruvic format prin reacția dintre alanină și acidul α -cetoglutaric formează hidazona respectivă, care în mediu alcalin produce o colorație brun roșcată, intensitatea culorii fiind proporțională cu activitatea enzimatică și se estimează fotometric.

Reactivi:

- soluție tampon fosfat (Sorensen) 0,1 N
- soluție substrat de ALAT : 200mM DL alanina și 2mM acid α -cetoglutaric
- soluție NaOH 0,4 N
- soluție 2,4 dinitrofenilhidrazină 1 mM
- soluție etalon piruvat 2mM

Mod de lucru urmează protocolul din tabel:

Reactivi (mL)	Proba analiză	Proba etalon	Proba martor
Soluție substrat	0,5	0,5	0,5
Ser	0,1	-	-
Soluție etalon	-	0,1	-
Proba se "incubează" timp de 30 minute la 37°C			
Soluție 2,4-dinitrofenilhidrazină	0,5	0,5	0,5
Ser	-	-	-
Se agită. Se lasă în repaus 20 minute la temperatura camerei.			
Soluție NaOH 0,4 n	5,0	5,0	5,0

Se citește absorbanta probelor la $\lambda = 530 \text{ nm}$.

Pentru calculul, activității ALAT, exprimată ca U.I = [μ moli substrat transformat /min /L (37°C)] se aplică relația:

$$U.I._{ALAT} = \frac{A_{proba} - A_{martor}}{A_{etalon} - A_{martor}} \cdot C_{etalon} \cdot 10^3 \cdot \frac{1}{t} = \frac{A_p - A_m}{A_e - A_m} \cdot 2 \cdot 10^3 \cdot \frac{1}{30} = \frac{A_p - A_m}{A_e - A_m} \cdot 66,7$$

C_{etalon} = concentrația soluției etalon (2 μ M)

t = 30 minute

Determinarea activității aspartat amino-transferaza (ASAT)

Principiul metodei: Acidul piruvic reacționează cu 2,4-dinitrofenilhidrazina formând hidrazona respectivă, în mediu alcalin formând o colorație brun-roșcată, iar intensitatea culorii este proporțională cu activitatea enzimatică și se estimează fotometric.

Reactivi:

- soluție substrat ASAT pentru acid DL aspartic 200 mM și acid cetoglutaric 2mM
- soluție NaOH ~ 0,4 N
- soluție 2,4-dinitrofenilhidrazină 1 mM
- soluție etalon de piruvat 2 mM

Mod de lucru:

Reactivi (mL)	Proba analiză	Proba etalon	Proba martor
Soluție substrat	0,5	0,5	0,5
Ser	0,1	-	-
Soluție etalon	-	0,1	-
Proba se "incubează" timp de 60 minute la 37°C			
Ser	-	-	0,1
Soluție 2,4-dinitrofenilhidrazină	0,5	0,5	0,5
Se agită. Se lasă în repaus 20 minute la temperatura camerei.			
Soluție NaOH 0,4 n	5,0	5,0	5,0

Activitatea enzimatică se calculează după relația:

$$U.I._{ASAT} = \frac{A_p - A_m}{A_e - A_m} \cdot C_{etalon} \cdot \frac{1}{t} \text{ [}\mu\text{ moli piruvat/ minut/L(37°C)]}$$

C_{etalon} = concentrația soluției etalon de piruvat de sodiu (2 μ M)
t = 60 minute.

Rezultate și discuții:

Valorile parametrilor biochimici determinați în urma administrării extractului de *Ziziphus jujuba* asupra unor organisme vii aflate în stres oxidativ sunt prezentate global în tabelul 74. Rezultatele au fost exprimate ca media \pm eroarea standard. (Valorile absorbanțelor citite cu ocazia fiecărei analize pe baza cărora s-a întocmit tabelul 74 sunt prezentate în Anexa 5).

Tabelul 74. Valorile medii ale parametrilor MDA, GSH, CAT, GSH-px, GSH-red, ALAT, ASAT și PA la șobolanii tratați cu extract de *Ziziphus jujuba*.

Lot	MDA($\mu\text{moli/mg}$)	GSH ($\mu\text{moli/mL}$)	CAT (UI)	SOD (UI)
M	19,07 \pm 1,19	7,03 \pm 0,10	12,98 \pm 4,58	14,98 \pm 1,41
L	30,20 \pm 2,80	6,21 \pm 0,48	50,34 \pm 2,88	15,39 \pm 3,73
Valori normale	22,07 \pm 1,14	6,57 \pm 1,04	11,87 \pm 0,53	12,58 \pm 1,94

Lot	GSH-red (UI)	GSH-px (UI)	ALAT (UI)	ASAT (UI)	PA (UI)
M	6,62 \pm 0,08	46,58 \pm 2,85	23,97 \pm 0,22	17,09 \pm 0,03	25,80 \pm 0,13
L	8,32 \pm 0,04	48,93 \pm 2,22	24,81 \pm 4,88	13,19 \pm 6,74	16,64 \pm 1,31
Valori normale	7,80 \pm 1,09	43,83 \pm 4,82	32 \pm 8	71 \pm 15	24,9 - 33,2

unde: M- lot martor

L - lot experimental

Parametrul care indică nivelul peroxidării lipidelor și deci a instalării stresului oxidativ este malonaldehida (MDA). În acest sens a fost determinat conținutul în MDA din serul șobolanilor supuși experimentului.

Valorile MDA sunt prezentate în figura 51.

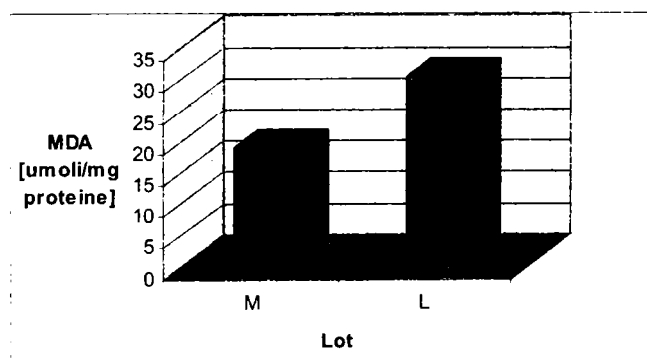


Figura 51. Reprezentarea grafică a valorilor MDA la șobolanii tratați cu extract de *Ziziphus jujuba*

unde: M= lot martor, L= lot tratat

• În urma administrării extractului se observă o creștere evidentă a valorilor MDA și anume 30,20 \pm 2,80 $\mu\text{moli/mg}$ la lotul experimental față de 19,07 \pm 1,19 $\mu\text{moli/mg}$ la lotul martor, (o creștere de 1,58 ori la lotul experimental față de martor), ceea ce indică instalarea stresului oxidativ provocat de administrarea extractului.

Au fost investigate atât substanțele simple (GSH) cât și câteva din enzimele care fac parte din sistemul de apărare al organismului viu (CAT, SOD, GSH-px, GSH-red).

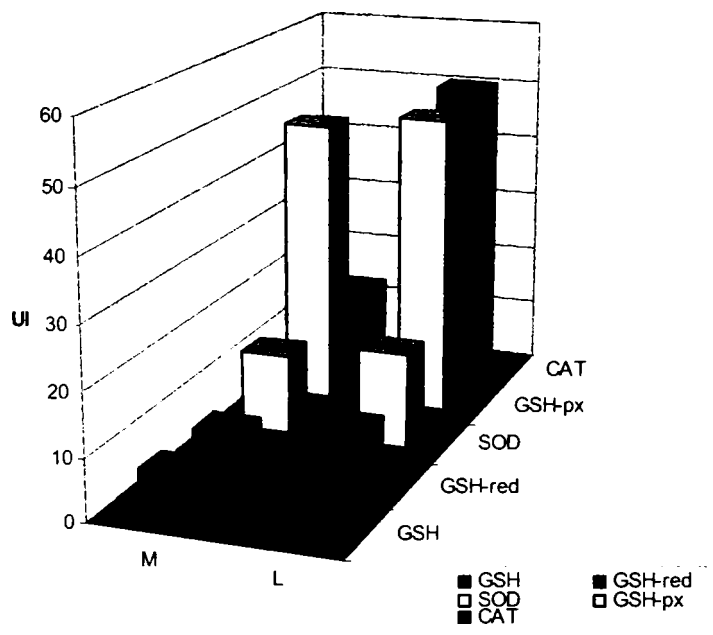


Figura 52. Reprezentarea grafică a valorilor activității enzimelor GSH, GSH-px, GSH-red, CAT și SOD la șobolanii tratați cu extract de *Ziziphus jujuba*

G-SH poate acționa ca prooxidant la concentrații mici, ceea ce conduce la formarea radicalului superoxid ($O_2\cdot^-$) și a peroxidilor având drept consecință umflarea mitocondriilor și eliberarea GSH-px din membrane.

- În urma determinării nivelului de glutation redus (G-SH) s-a constatat o scădere semnificativă la lotul experimental ($6,21 \pm 0,48 \mu\text{mol} / \text{mL}$) față de lotul martor ($7,03 \pm 0,10 \mu\text{mol} / \text{mL}$), o scădere cu 8,88%, care s-ar putea datora componentelor extractului ce acționează la această concentrație.

- În ceea ce privește activitatea catalazei (CAT) se constată o creștere semnificativă, de 3,87 ori la lotul experimental ($50,34 \pm 2,88 \text{ UI}$) față de lotul martor ($12,98 \pm 4,58 \text{ UI}$). Creșterea, la acest nivel a catalazei eritrocitare se explică prin acțiunea acestei enzime în detoxifierea obținută prin reacția catalizată de SOD asupra H_2O_2 . Catalaza poate acționa ca un protector al superoxid dismutazei (SOD) prin inactivarea H_2O_2 , între cele două enzime existând un tandem mutual al interacțiunii CAT- SOD. Catalaza reduce cantități foarte mari de H_2O_2 fiind controlată de NADPH care exercită efecte protectoare asupra sa în cursul stresului oxidativ. De asemenea, catalaza acționează și ca protector asupra modificărilor induse de radicalul superoxid asupra ADN-ului. Această activitate deosebit de crescută a catalazei (CAT) se presupune ca fiind o consecință a acțiunii componentelor extractului de *Ziziphus jujuba*, cum ar fi o serie de compuși antioxidanți și detoxifianți ca rutina, kaemferolul, miricetina.

- Superoxid dismutaza (SOD) determinată în experiment este EC-SOD care conține Cu, Zn și o glicoproteină, fiind o enzimă tetramerică, care constituie cea mai mare parte a activității SOD din plasmă, limfă și lichidul sinovial. Substratul este posibil să aibă o concentrație ceva mai crescută datorită unei ușoare creșteri a

activității SOD (de fapt a sistemului SOD) de la $14,98 \pm 1,41$ UI la $15,39 \pm 3,73$ UI în cazul lotului experimental, deși diferența de activitate nu este semnificativă.

- Glutacion peroxidaza (GSH-px) este o enzimă care joacă un rol protector major în menținerea integrității membranelor eritrocitare chiar în condiții de stres oxidativ. Această enzimă acționează la concentrații foarte mici de H_2O_2 , fiind principala enzimă utilizată de celule pentru detoxifiere putând neutraliza și peroxidii lipidici rezultați în cursul respirației mitocondriale. În cadrul studiului realizat se observă o creștere a activității GSH-px la lotul experimental ($48,93 \pm 2,22$ UI) față de activitatea enzimei $46,58 \pm 2,85$ UI la lotul martor.

- Activitatea glutacion reductazei este în concordanță cu activitatea catalazei. Se observă o creștere cu 21 % a activității GSH-red la lotul experimental ($8,32 \pm 0,04$ UI) față de $6,65 \pm 0,32$ UI la lotul martor.

Glutacion reductaza acționează împreună cu catalaza (CAT) și superoxid dismutaza (SOD) în îndepărtarea peroxidizilor formați în exces.

Pentru a observa dacă administrarea extractului de *Ziziphus jujuba* afectează funcția hepatică s-au determinat și activitatea enzimelor ALAT și ASAT.

- În ceea ce privește activitatea enzimelor ALAT din hepatocite s-a observat că în urma administrării extractului valorile activității ALAT nu suferă modificări importante ($23,88 \pm 0,74$ UI pentru lotul martor și $24,81 \pm 4,88$ UI pentru lotul experimental) menținându-se la valori destul de apropiate, în schimb activitatea ASAT denotă o scădere a activității la lotul experimental ($13,19 \pm 6,74$ UI) cu 18,7 % față de valorile medii ale activității ASAT la lotul martor ($17,08 \pm 6,80$ UI).

Valorile activității alanin aminotransferazei (ALAT) și a aspartat aminotransferazei (ASAT) sunt prezentate în tabelul 74.

- Activitatea ambelor enzime se situează sub valoarea normală a acestor enzime: 32 ± 8 UI la ALAT, respectiv 71 ± 15 UI la ASAT.

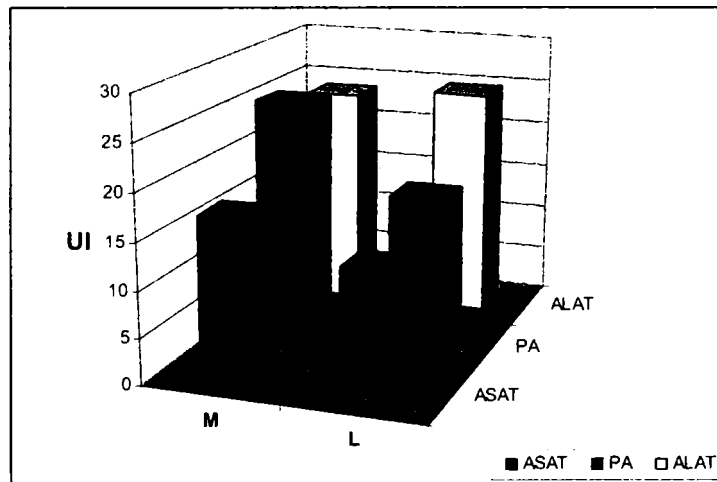


Figura 53. Efectul comparativ al extractului de *Ziziphus jujuba* asupra activității enzimelor ALAT, ASAT și PA

- Activitatea fosfatazei alcaline PA prezintă valori cu 35,4 % mai scăzute ($16,64 \pm 1,31$ UI) la lotul experimental față de lotul martor ($25,75 \pm 0,45$) și cu 33,2% mai scăzute față de valorile normale ($24,9 - 33,2$ UI) din literatura de specialitate, modificări care sunt nesemnificative în cazul scăderii PA.

Se poate concluziona că administrarea extractului de *Ziziphus jujuba* nu influențează în mod negativ activitatea funcției ficatului, relevată prin activitățile scăzute atât ale ASAT cât și ale PA, indicatori ai funcționării și afectării hepatocitelor [256].

Rezultatele obținute constituie obiectul unei lucrări științifice trimisă spre publicare [257].

II.4.3.2. Modificările survenite la nivelul unor organe de șobolan sub influența extractului de *Ziziphus jujuba*

Studiul s-a axat pe observarea eventualelor modificări la nivelul unor organe, la șobolani cărora li s-a administrat extract de *Ziziphus jujuba*.

Examenle citohistologice au fost realizate prin metodele: hematoxilizină-eozină, ticromină Mallory [258].

Observațiile histologice nu au relevat modificări semnificative la nivelul organelor studiate (ficat, rinichi, splină).

Efectul secțiunilor obținute prin ficat a relevat un aspect fin granular al hepatocitelor, fără vacuolizări. Nucleii hepatocitelor au avut de asemenea un aspect fin granulat, ceea ce denotă prezența eucromatinei, respectiv faptul că materialul genetic este activ, procesele de transcripție și translație fiind intense.

În organele hematoformatoare s-a remarcat o ușoară activitate a capacității hematopoetice.

II.4.3.3. Modificări care apar la nivelul formulei leucocitare la șobolani tratați cu extract de *Ziziphus jujuba*.

Ca urmare a studiilor efectuate anterior s-a determinat și influența extractului de *Ziziphus jujuba* asupra formulei leucocitare [258-260].

Formula leucocitară reprezintă un examen calitativ și cantitativ al elementelor figurate albe, stabilindu-se procentul fiecărei varietăți din mai multe leucocite numărate.

Procentul fiecărei varietăți de leucocite se calculează cu formula:

$$\frac{\text{Numar leucocite dintr-o clasa} \times 100}{\text{Numarul total de leucocite numarate}}$$

Formula leucocitară reprezintă un indiciu deosebit de important cu privire la starea de sănătate a organismului animal, ea suferind modificări semnificative în stările patologice produse de infecții bacteriene și de diverse disfuncții metabolice provocate de influența diferiților factori externi sau interni asupra acestuia. [258,260]

Valorile formulei leucocitare sunt prezentate în tabelul 75.

Tabelul 75. Formula leucocitară la șobolanii tratați cu extract de *Ziziphus jujuba*

Nr.	Ht (%)	Formula leucocitară (%)				
		Neutrofile	Euzenofile	Bazofile	Limfocite	Monocite
M	44,55 ± 0,17	28,63 ± 0,70	2,01 ± 0,07	0,27 ± 0,08	60 ± 0,43	2,14 ± 0,16
L	38,11 ± 0,38	25,57 ± 0,58	4,38 ± 0,30	0,27 ± 0,08	64,94 ± 1,84	5,06 ± 0,68

Prin studiul formulei leucocitare s-a observat că administrarea extractului nu influențează în mod negativ numărul componentelor formulei leucocitare, care se mențin în domeniul valorilor normale conform literaturii de specialitate[260].

În concluzie, administrarea extractului de *Ziziphus jujuba* (la o concentrație de 2 mL / kg corp) denotă o acțiune generatoare de stres oxidativ relevant prin valorile crescute ale MDA, prin scăderea cantității de GSH și prin activitățile enzimelor CAT și SOD și prezintă o afectare (asemănătoare acțiunii unei substanțe toxice) a tuturor enzimelor implicate în sistemul antioxidant de apărare.

Nu a fost influențată în mod negativ activitatea funcției ficatului, relevată prin activitățile ce se încadrează în valorile normale atât ale ALAT, ASAT cât și ale PA, ca indicatori ai funcționării și afectării hepatocitelor, iar observațiile histologice nu au relevat modificări semnificative la nivelul organelor studiate (ficat, rinichi, splină).

II.4.4. Obținerea și testarea unor formulări farmaceutice pe bază de extracte din fructe de *Ziziphus jujuba*, respectiv din frunze de *Hydrangea paniculata*

Extractele apoase au fost obținute prin extracția la 4°C timp de 100 ore a materialului vegetal în raport 9 g material vegetal: 90 ml apă. După filtrarea și concentrarea extractelor s-a determinat conținutul de flavonoide:

- 0,1982 mg rutină și 0,0326 mg quercetină / mL pentru extract din fructe de *Ziziphus jujuba*
- 0,2195 mg rutină și 0,30210mg quercetină / mL pentru extract din frunze de *Hydrangea paniculata*.

Formulările farmaceutice au avut ca bază unguentul simplu (emulsie de tip A/U): 10 g lanolină anhidră, 90 g vaselină albă și hidrogelul carbopol 940 1%: 1.0 g carbopol, 12,0 g propilenglicol, 0,70 g trietanolamină și 100 g soluție conservantă 0.1% [261].

Extractele apoase au fost încorporate în preparate în proporțiile: 1%, 2 %, 5% și 10 %. Formulările farmaceutice realizate au fost experimentate extern respectând normele deontologice, la Clinica Universitară de Dermatologie Timișoara pe un lot de 16 pacienți voluntari cu vârste cuprinse între 14 și 75 ani, având diverse afecțiuni dermatologice. Toți pacienții au suportat bine tratamentul cu unguent. Nu s-au înregistrat reacții adverse (tabelul 76 și tabelul 77).

Tabelul 76. Rezultatele testării formulărilor farmaceutice pe bază de extract de *Ziziphus jujuba*

Subiect	Tipul formulei testate	Afecțiunea	Rezultate tratament
M.A. 20 ani, sex F	A	Pitiriazis rozat Gibert iritat	Bine suportat, fără reacții adverse
G.R. 60 ani, sex F	B	Eczematidă	Erupția cedează în 10 zile fără reacții adverse
M.B. 21 ani, sex F	C	Lichen plan cu erupție pe mâini	Ameliorarea afecțiunii
P.A. 14 ani, sex F	D	Urticarie figurată	Efect bun, fără reacții adverse
C.V. 60 ani, sex M	E	Piodermită -membrul inferior stâng	Bine suportat, fără reacții adverse
P.C. 75 ani, sex F	F	Celulită erizipelatoidă-gamba stângă	Eritemul și edemul cedează în 10 zile
S.A. 75 ani sex F	G	Dermatită eczematiformă	Ameliorare locală după 2 zile
D.A. 50 ani, sex F	H	Erupție fotoalergică la mâini	Ameliorare locală

Tabelul 77. Rezultatele testării formulărilor farmaceutice pe bază de extract de *Hydrangea paniculata*

Subiect	Tipul formulei testate	Afecțiunea	Rezultate tratament
M.P. 27 ani, sex M	A	Perionixis	Eritemul
P.A. 13 ani, sex M	B	Prurigo suprainfectat	Rezultate bune, unguentul a fost bine suportat
C.D. 22 ani, sex F	C	Dermatită eczematiformă gambă	Evoluție vaforabilă
V.A. 40 ani, sex F	D	Vascularită vasculară (gambă)	Efect bun, fără reacții adverse
C.L. 50 ani, sex M	E	Urticarie figurată	Efect bun, fără reacții adverse
G.C. 25 ani, sex F	F	Celulită erizipelatoidă-gamba stângă	Eritemul și edemul cedează în 10 zile
O.M. 45 ani sex F	G	Erupție fotoalergică la mâini	Ameliorare locală
R.A. 50 ani, sex F	H	Dermatită eczematiformă	Ameliorare locală după 2 zile

unde: A - unguent simplu cu 1 % extract
 B - unguent simplu cu 2 % extract
 C - unguent simplu cu 5 % extract
 D - unguent simplu cu 10 % extract

E - hidrogel cu 1 % extract
 F - hidrogel cu 2 % extract
 G - hidrogel cu 5 % extract
 H - hidrogel cu 10 % extract

Ca urmare a aplicațiilor locale s-a evidențiat o bună difuzibilitate epidermică și ameliorări, chiar după câteva zile de la începutul tratamentului. Acest lucru a dovedit efectul antiinflamator al formulărilor farmaceutice realizate și recomandă continuarea cercetărilor. Rezultatele cercetărilor au constituit obiectul unei lucrări științifice [262].

II.4.5. Aplicații ale extractului de *Ziziphus jujuba* ca adaos în hrana animalelor

Organismele animale, inclusiv *Galinae* au capacitatea de a metaboliza compușii antioxidanți. Balanța dintre antioxidanți și pro-oxidanți din celule este responsabilă pentru reglarea diferitelor căi metabolice în vederea echilibrării sistemului imunitar, a greutății corporale, a dezvoltării și protecției în cazul condițiilor de stress, ce sunt asociate inclusiv cu producția de carne de pasăre și ouă de consum [263].

Această balanță poate fi regularizată de antioxidanții dietari care includ vitamina E, flavonoidele [2] și carotenoizii [264]. În vederea îmbunătățirii acestei balanțe nutritive, s-a încercat introducerea în apa de băut, a unui extract apos din fructe de *Ziziphus jujuba* ce conține compuși flavonoidici (0,6089 mg rutină/ mL extract), precum și o serie de vitamine: vitamina A, vitamina B₂, vitamina C; aminoacizi, glucide, proteine, acizi grași și β-caroten

Cercetările au fost efectuate în colaborare cu disciplinele: Nutriție animală și controlul sanitar-veterinar al furajelor, Morfologie, Biochimie, Radiologie și Zootehnie generală și ameliorarea animalelor din cadrul Facultății de Medicină Veterinară a Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului Timișoara.

Material și metodă

Testarea s-a efectuat în sistem intensiv de exploatare pe așternut permanent pe 5 loturi de câte 11 găini din rasa italiană, în vârstă de 26 săptămâni, notate C (lotul control), respectiv E1-E4 (loturile experimentale).

Perioada experimentului a fost de 119 zile (17 săptămâni).

Apa și nutrețurile au fost administrate „ad libitum”, iar colectarea ouălor s-a făcut în cuptoare tip „capcană” Extractele au fost administrate în apa de băut. În acest scop s-au realizat diluții ale extractelor astfel încât conținutul de rutină să varieze între 15 și 75 mg rutină/L.

Experimentul a fost efectuat prin metoda grupelor pe 5 loturi de câte 11 găini din rasa italiană. Loturile au fost evidențiate astfel:

- Lotul control (C);
- Lotul experimental 1 (E1), căruia i s-a administrat extract de *Ziziphus jujuba* cu un conținut de 75 mg rutină/L apă de băut;
- Lotul experimental 2 (E2), căruia i s-a administrat extract de *Ziziphus jujuba* cu un conținut de 50 mg rutină/L apă de băut;
- Lotul experimental 3 (E3), căruia i s-a administrat extract de *Ziziphus jujuba* cu un conținut de 30 mg rutină/L apă de băut);
- Lotul experimental 4 (E4), căruia i s-a administrat extract de *Ziziphus jujuba* cu un conținut de 15 mg rutină/L apă de băut.

Hrănirea păsărilor s-a făcut cu nutreț combinat rețeta 2004P [265], rețetă specifică găinilor ouătoare. Deoarece s-a dorit totodată și o verificare a metabolismului calciului și corelarea cu efectul antioxidant al extractelor, pe baza datelor din literatură [266], loturile tratate au primit un furaj cu un conținut de calciu redus la jumătate față de cel al lotului de control.

La sfârșitul perioadei experimentale s-au determinat pentru fiecare lot :

- masa corporală a găinilor în perioada experimentului și la sfârșitul perioadei experimentale prin cântărire individuală
- starea de sănătate, prin observații zilnice
- masa ouălor (albuș, gălbenuș, coajă) prin metode clasice;
- parametrii chimici sanguini ai găinilor; ca urmare a analizelor efectuate pe probe de sânge recoltate la sfârșitul perioadei experimentale;
- consumul mediu zilnic de nutrețuri [267];
- studiul funcției hepatice, ca urmare a recoltării și examinării ficatului prelevat de la găinile sacrificate în urma experimentului (3 găini/lot)[268].
- examenul radiologic al membrilor inferioare; s-a realizat pe câte trei probe din fiecare lot prin expunerea radiografică a metapodiului și acropodiului. Examenul radiologic a fost efectuat cu ajutorul aparatului Röntgen cu incidența 55 kVp, 6,5 mAs cu expunere 0,06 secunde și o placă DFF de 60 cm [268].
- Un alt indicator studiat a fost consumul mediu zilnic de nutrețuri.

Au fost efectuate determinări privind starea de sănătate a găinilor la încheierea testării (parametrii biochimici sanguini, masa corporală), productivitatea de ouă (productivitatea săptămânală, productivitatea zilnică, producția de ouă cu coaja fisurată, producția medie individuală de masă de ou, albuș, gălbenuș, coajă), precum și calitatea acestora (compoziția oului). S-a realizat de asemenea și studiul funcției hepatice și examenul radiologic al membrilor inferioare la finalul testării.

Determinările au fost realizate prin metode uzuale [268], iar rezultatele au fost prelucrate statistic prin metoda Student cu $P = 95\%$ [269].

Parametrii biochimici sanguini s-au determinat prin metode chimice, astfel: determinarea proteinei serice s-a realizat prin metoda Weichselbaum; albumina serică prin metoda colorimetrică ($\lambda=637$ nm); transaminazele ALAT și ASAT prin metoda Reitman Frenkel; calciul seric s-a determinat prin metoda Elliot; fosforul seric prin metoda fără deproteinizare, metodă colorimetrică ($\lambda=660$ nm) și fosfataza alcalină serică a fost determinată prin metoda colorimetrică ($\lambda=504$ nm) [267].

În vederea realizării calculelor statistice s-au considerat valorile experimentale ca fiind șirul de valori $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ și astfel s-au calculat următorii parametri:

- Valoarea aritmetică \bar{x}

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

unde n – numărul de valori (de determinări)

- Varianta S_s^2

$$S_s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}$$

- Abaterea medie pătratică (abaterea standard), S_s

$$S_s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

- Eroarea medie pătratică (abaterea standard de selecție modificată), S

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

- Eroarea de medie pătratică a mediei, S_m

- Eroarea mijlocie a mediei, $\pm S \bar{x}$

- Coeficient de variație, CV (%)

$$CV (\%) = \frac{S \bar{x}}{\bar{x}} \cdot 100$$

- Interval de certitudine a mediei: $\pm \bar{x} \cdot tSm$

- Limita superioară a intervalului de certitudine al mediei: $\bar{x} + tSm$

- Limita inferioară de certitudine al mediei: $\bar{x} - tSm$

Rezultate și discuții:

Starea de sănătate a păsărilor din loturile experimentale a fost bună pe întreaga perioadă a experimentului, lucru dovedit prin rezultatele analizelor redade. Rezultatele obținute indică faptul că extractele testate au influențat creșterea în greutate a păsărilor, dar calitatea și producția de ouă s-au încadrat în limitele normale.

a). Parametrii fiziologici ai păsărilor din loturile experimentale la încheierea testării.

- Parametrii biochimici sanguini sunt prezentați în tabelul 78.

Tabelul 78. Parametrii biochimici sanguini ai găinilor la încheierea testării

Nr. crt.	Parametru biochimic	U.M/	Lotul	Valoarea	Limite fiziologice
1.	Proteina serică	g/dl	C	4,81	5,2 ± 0,3
			E1	5,57	
			E2	5,21	
			E3	5,37	
			E4	5,20	
2.	Albumina serică	g/dl	C	2,21	2,3 ± 0,4
			E1	1,98	
			E2	2,04	
			E3	2,15	
			E4	2,00	
3.	Transaminaza ALAT	U/I	C	100,0	100,0 ± 60,0
			E1	106,8	
			E2	95,4	
			E3	86,4	
			E4	100,0	
4.	Transaminaza ASAT	U/I	C	12,35	12,0 ± 8,0
			E1	13,34	
			E2	13,98	
			E3	13,76	
			E4	13,76	
5.	Calcemia	mg/dl	C	24,19	30,0 ± 5,0
			E1	19,86	
			E2	22,39	
			E3	20,46	
			E4	20,46	
6.	Fosfataza alcalină	u/100 mL	C	53,70	41,0 ± 30,0
			E1	54,60	
			E2	54,10	
			E3	53,90	
			E4	54,10	

Se observă că parametrii biochimici se încadrează în limitele fiziologice normale.

-Masa corporală a găinilor din cele 5 loturi a fost determinată prin cântărire individuală la începutul și la sfârșitul perioadei experimentale.

Evoluția masei corporale a găinilor pe loturi este redată în tabelele 79 și 80.

Tabelul 79. Evoluția masei corporale a găinilor în perioada experimentului – 17 săptămâni.

Nr. Crt.	Denumire	Loturi				
		C	E1	E2	E3	E4
1	Masa corporală inițială $x \pm CV$ (%)	1450	1450	1450 ± 6	1450 ± 7	1450 ± 5
2.	Valoarea medie inițială x (g)	1450	1450	1450	1450	1450
3.	Intervalul de certitudine al mediei $x \pm tSm$ (g)	1450 ± 38	1450 ± 35	1450 ± 40	1450 ± 47	1450±33
4.	Masa corporală finală $x \pm Sx$ (g)	1730 ± 6	1700 ± 6	1620 ± 6	1500 ± 7	1400± 5
5.	Valoarea medie finală x (g)	1730	1700	1620	1500	1400
6.	Interval de certitudine al mediei $x \pm tSm$ (g)	1730 ±41	1700 ± 44	1620 ± 41	1500 ± 50	1400±34
7.	Diferența 1-4 (g)	280	250	170	50	50
8.	Diferența 1-4 (%)	100	89,28	60,71	17,85	-17,85

Tabelul 80. Evoluția masei corporale medii a găinilor la sfârșitul perioadei experimentale

Nr. Crt.	Specificare	Valoarea la sfârșitul experimentului
1.	Masa corporală medie a găinii (g)	Lot C 1730 Lot E1 1700 Lot E2 1620 Lot E3 1500 Lot E4 1400
2.	Valoarea medie x (g)	1590
3.	Limita de siguranță ± tSm (g)	± 172
4.	Interval de certitudine al mediei $x \pm tSm$ (g)	1590 ± 172
5.	Limita superioară $x \pm tSm$ (g)	1762
6.	Limita inferioară $x - tSm$ (g)	1418
7.	Valori ce se exclud	1400
8.	Eroarea mijlocie a mediei Sx (g)	± 28
9.	$x \pm Sx$ (g)	1590 ± 28
10.	CV (%)	1,74

Dacă se consideră creșterea în greutate a lotului martor de 100 %, pentru loturile tratate, greutatea scade progresiv, 89,28 -17,85, până la negativă 17,85 %. Acest lucru poate fi pus pe seama micșorării constante de către noi a conținutului de calciu din hrană conform unor date din literatură când s-a pornit de la ipoteza că aceasta ar putea fi compensate în totalitate prin efectul benefic al principiilor antioxidante.

- Starea de sănătate a loturilor de găini s-a apreciat prin observații zilnice. Pe parcursul perioadei experimentului nu s-a înregistrat nici un caz de îmbolnăvire.

b). Producția de ouă și calitatea acestora

Evoluția producțiilor de ouă în perioada experimentului este redată în tabelul 81.

Tabelul 81. Producția zilnică de ouă / lot în perioada experimentală

Săpt.	Lot	Luni	Martți	Miercuri	Joi	Vineri	Sâmbătă	Duminică	Total
1.	C	8	8	9	9	9	9	9	61
	E1	10	9	9	9	9	9	9	64
	E2	8	10	11	9	8	8	8	62
	E3	8	9	10	6	9	9	8	59
	E4	10	9	9	6	8	8	9	59
2.	C	10	8	9	9	8	8	9	61
	E1	8	9	8	11	9	9	9	63
	E2	9	8	9	9	9	9	7	60
	E3	6	9	9	8	8	9	10	59
	E4	9	9	8	8	6	8	9	57
3.	C	8	10	11	9	8	8	8	62
	E1	9	10	8	9	9	9	9	63
	E2	10	8	8	9	8	9	8	60
	E3	8	8	6	10	9	9	9	59
	E4	9	8	8	8	8	8	8	57
4.	C	9	9	9	10	8	8	9	62
	E1	9	9	7	11	9	9	9	63
	E2	7	9	9	9	9	8	9	60
	E3	6	9	9	8	8	8	9	57
	E4	5	9	9	8	8	8	8	55
5.	C	9	9	8	9	9	7	9	60
	E1	9	10	9	9	9	9	9	64
	E2	8	7	9	9	9	9	9	60
	E3	8	8	6	9	9	9	8	57
	E4	8	5	9	9	8	8	8	55
6.	C	9	9	8	10	9	9	9	63
	E1	8	8	10	9	9	9	9	62
	E2	6	9	9	8	8	9	10	59
	E3	8	5	10	8	9	9	8	57
	E4	7	8	8	6	9	8	8	54
7.	C	7	10	11	8	9	9	9	63
	E1	7	9	9	10	9	9	9	62
	E2	7	9	9	10	8	8	8	59
	E3	6	8	9	9	8	8	8	56
	E4	7	8	8	5	9	8	8	53
8.	C	8	8	9	9	10	11	10	65
	E1	8	9	9	10	8	8	9	61
	E2	10	8	8	6	9	9	8	58
	E3	6	8	7	9	8	7	7	52
	E4	10	8	8	6	9	9	8	58
9.	C	9	9	9	10	9	9	9	64
	E1	9	8	9	9	9	8	9	61

	E2	7	9	8	9	8	8	9	58
	E3	6	8	8	9	8	8	8	55
	E4	8	7	9	8	5	7	7	51
10.	C	9	11	10	8	9	9	9	65
	E1	6	9	9	10	8	9	9	60
	E2	6	9	9	8	8	9	8	57
	E3	7	9	8	8	6	8	8	54
	E4	5	7	7	8	7	9	8	51
11.	C	8	8	10	8	8	9	9	60
	E1	8	7	9	9	9	9	9	60
	E2	8	5	10	8	9	9	8	57
	E3	6	8	8	7	9	8	8	54
	E4	4	8	7	9	8	7	7	50
12.	C	11	8	8	7	10	10	10	64
	E1	10	7	8	8	9	9	9	60
	E2	6	8	9	9	8	8	8	56
	E3	7	8	8	5	9	8	8	53
	E4	7	7	4	8	7	9	8	50
13.	C	8	9	9	9	10	10	9	64
	E1	8	8	11	7	9	9	8	60
	E2	5	9	9	8	8	8	8	55
	E3	6	8	7	9	8	7	7	52
	E4	7	6	8	4	7	9	8	49
14.	C	9	9	8	11	9	9	10	65
	E1	8	9	10	6	9	9	8	59
	E2	9	8	5	8	8	9	8	55
	E3	8	7	9	8	5	7	7	51
	E4	7	7	8	8	4	7	7	48
15.	C	8	9	9	10	11	9	9	65
	E1	10	8	8	6	9	9	8	58
	E2	7	8	8	5	9	8	8	53
	E3	6	6	6	8	7	9	8	50
	E4	7	7	7	8	7	4	7	47
16.	C	10	11	8	9	9	9	9	58
	E1	9	8	8	7	8	9	9	58
	E2	6	9	8	8	6	8	8	53
	E3	6	8	6	6	9	7	8	50
	E4	7	7	7	7	4	7	7	46
17.	C	8	11	9	11	9	8	8	64
	E1	5	9	9	10	7	8	8	56
	E2	8	7	9	8	5	7	7	51
	E3	7	6	8	4	7	9	8	49
	E4	7	7	7	4	6	7	8	46

Reprezentarea grafică a evoluției producției de ouă pe lot este redată în figura 54.

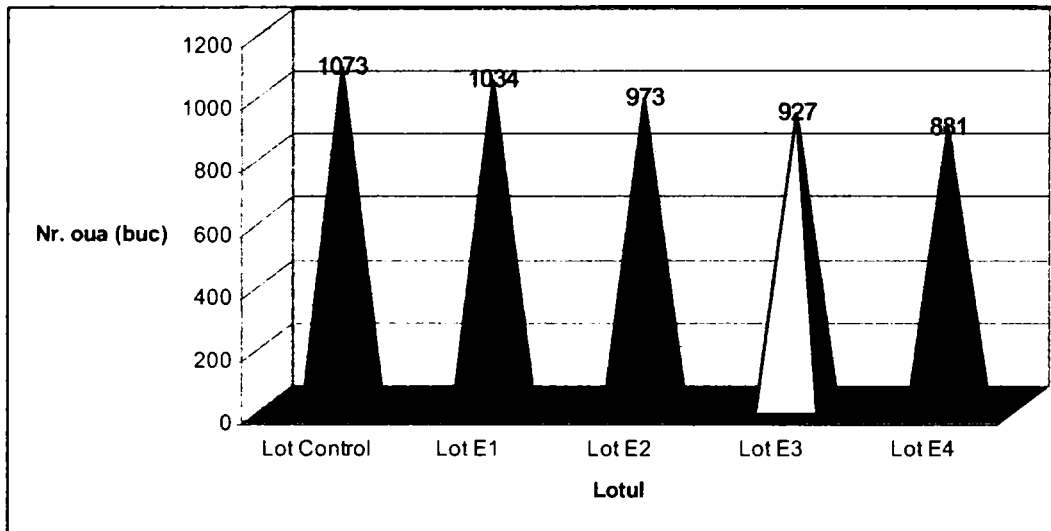


Figura 54. Producția de ouă pentru cele cinci loturi experimentale

Producția de ouă la cele 5 loturi de găini pe perioada experimentului este redată în tabelele 82 și 83.

Tabelul 82. Producția de ouă la cele 5 loturi experimentale pe perioada experimentului.

Nr. Crt.	Specificare	Valoarea la sfârșitul experimentului
1.	Producția de ouă (buc)	Lot C 1073 Lot E1 1034 Lot E2 973 Lot E3 927 Lot E4 881
2.	Valoarea medie \bar{x} (buc)	978
3.	Limita de siguranță $\pm tSm$ (buc)	± 97
4.	Intervalul de certitudine al mediei $\bar{x} \pm tSm$ (buc)	978 ± 97
5.	Limita superioară $\bar{x} - tSm$ (buc)	881
6.	Valori ce se exclud	-
7.	Eroarea mijlocie a mediei $\pm Sx$ (buc)	± 16
8.	CV (%)	1,63
9.	$\bar{x} \pm Sx$	978 ± 16

Tabelul 83. Evoluția producției procentuale de ouă la cele cinci loturi experimentale

Nr. Crt.	Specificare	Valoarea la sfârșitul experimentului
1.	Producția de ouă (%)	Lot C 82,0 Lot E1 79,0 Lot E2 74,3 Lot E3 70,8 Lot E4 67,3
2.	Valoarea medie \bar{x} (%)	74,70
3.	Limita de siguranță $\pm tSm$ (%)	$\pm 7,40$
4.	Interval de certitudine al mediei $\bar{x} \pm tSm$ (%)	74,70 \pm 7,40
5.	Limita superioară $\bar{x} + tSm$ (%)	82,10
6.	Limita inferioară $\bar{x} - tSm$ (%)	67,30
7.	Valori ce se exclud	-
8.	Eroarea mijlocie a mediei Sx (%)	$\pm 1,19$
9.	$\bar{x} \pm Sx$ (%)	1,59
10.	CV (%)	74,70 \pm 1,19

Producția zilnică de ouă pe perioada experimentală pentru cele 5 loturi de găini este redată în tabelul 84.

Tabelul 84. Producția zilnică de ouă

Specificare	\bar{x}	$\bar{x} \pm tSm$	$\bar{x} \pm Sx$	CV (%)
Lot				
C	9	9 \pm 0,20	9 \pm 0,01	0,08
E1	8,70	8,70 \pm 0,20	8,70 \pm 0,01	0,09
E2	8,20	8,20 \pm 0,20	8,20 \pm 0,01	0,11
E3	7,80	7,80 \pm 0,20	7,80 \pm 0,01	0,13
E4	7,40	7,40 \pm 0,20	7,40 \pm 0,01	0,14

Producția săptămânală de ouă pe perioada experimentală la cele 5 loturi experimentale este redată în tabelul 85.

Tabelul 85. Producția săptămânală de ouă pe perioada experimentului

Specificare	Lot C	Lot E1	Lot E2	Lot E3	Lot E4
\bar{x} (buc)	63,10	60,80	57,20	54,40	51,80
$\pm tSm$ (buc)	$\pm 0,90$	$\pm 1,20$	$\pm 1,60$	$\pm 1,70$	$\pm 2,00$
$\bar{x} \pm tSm$	63,10 \pm 0,90	60,80 \pm 1,20	57,20 \pm 1,60	54,50 \pm 1,70	51,80 \pm 2,00
$\bar{x} + tSm$	64,0	62,0	58,80	56,20	53,80
$\bar{x} - tSm$	62,2	59,60	55,60	52,50	49,80
$\pm Sx$	$\pm 0,10$	$\pm 0,10$	$\pm 0,20$	$\pm 0,20$	$\pm 0,20$
$\bar{x} \pm Sx$	63,10 \pm 10	60,80 \pm 0,10	57,20 \pm 0,20	54,50 \pm 0,20	51,80 \pm 0,20
CV (%)	0,16	0,21	0,31	0,35	0,45

Producția de ouă pentru cele 5 loturi experimentale scade, scăderi care nu sunt foarte semnificative, ele putând fi corelate cu scăderea greutateii, scădere care se încadrează totuși în variațiile normale. De asemenea o explicație este și faptul că întreținerea păsărilor s-a făcut liber, în padocuri, pe loturi și doar cuibarele au fost amplasate în cadrul unui mic adăpost.

Producția procentuală de ouă cu coaja fisurată de la cele 5 loturi de găini este redată în tabelul 86.

Tabelul 86. Producția de ouă cu coaja fisurată

Nr. Crt.	Specificare	Valoarea la sfârșitul experimentului
1.	Producția de ouă cu coaja fisurată (%)	Lot C 5,80 Lot E1 6,80 Lot E2 7,90 Lot E3 12,1 Lot E4 19,5
2.	Valoarea medie \bar{x} (%)	10,32
3.	Limita de siguranță $\pm tSm$ (%)	$\pm 7,13$
4.	Interval de certitudine al mediei $\bar{x} \pm tSm$ (%)	$10,32 \pm 7,13$
5.	Limita superioară $\bar{x} + tSm$ (%)	17,45
6.	Limita inferioară $\bar{x} - tSm$ (%)	3,19
7.	Valori ce se exclud	-
8.	Eroarea mijlocie a mediei Sx (%)	$\pm 1,14$
9.	$\bar{x} \pm Sx$ (%)	11,08
10.	CV (%)	$10,32 \pm 1,14$

Reprezentarea grafică a producției de ouă cu coaja fisurată este redată în figura 55.

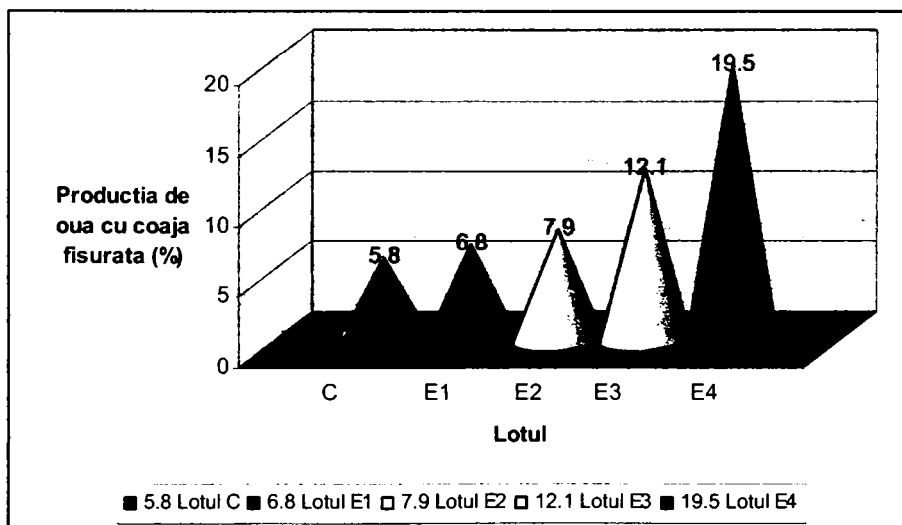


Figura 55. Producția de ouă cu coaja fisurată pentru cele 5 loturi experimentale.

Producția de ouă cu coaja fisurată prezintă o creștere, fapt care nu poate fi interpretat riguros, deoarece nu am avut siguranța unui control permanent în momentul recoltării ouălor.

Masa ouălor și a componentelor sale sunt redată în tabelul 87.

Tabelul 87. Producția medie individuală de masă- ou și structura ouălor la loturile experimentale.

Nr. crt.	Indicatorul	Lotul	Masa medie (g)	% raportat la lotul C
1.	Masa oului (g)	C	64,30 ± 0,53	100,00
		E1	61,20 ± 0,21	95,17
		E2	60,30 ± 0,32	93,77
		E3	54,60 ± 0,09	84,91
		E4	50,20 ± 0,45	78,07
2.	Producția de ouă (g/zi)	C	52,72 ± 0,43	100,00
		E1	48,34 ± 0,05	91,69
		E2	44,80 ± 0,19	84,97
		E3	38,65 ± 0,23	73,31
		E4	33,78 ± 0,35	63,88
3.	Masa albușului (g)	C	39,34 ± 0,29	100,00
		E1	38,23 ± 0,39	97,17
		E2	37,64 ± 0,16	95,67
		E3	34,02 ± 0,05	86,47
		E4	31,03 ± 0,32	78,87
4.	Masa gălbenușului (g)	C	18,68 ± 0,15	100,00
		E1	15,89 ± 0,08	89,87
		E2	15,83 ± 0,06	89,53
		E3	14,13 ± 0,07	79,92
		E4	13,19 ± 0,12	74,60
5.	Masa coji (g)	C	7,28 ± 0,12	100,00
		E1	7,08 ± 0,06	97,25
		E2	6,83 ± 0,09	93,81
		E3	6,45 ± 0,15	88,59
		E4	5,98 ± 0,25	82,14

Calculule statistice în cazul determinării masei oului la loturile experimentale sunt redată în tabelul 88.

Tabelul 88. Variația masei oului la loturile experimentale

Nr. Crt.	Specificarea	Valoarea la sfârșitul experimentului
1.	Masa oului (g)	Lot C 64,30 Lot E1 61,20 Lot E2 60,30 Lot E3 54,60 Lot E4 50,20
2.	Valoarea medie \bar{x} (g)	58,10
3.	Limita de siguranță $\pm tSm$ (g)	$\pm 7,00$
4.	Intervalul de certitudine al mediei $\pm tSm$ (g)	$58,10 \pm 7,00$
5.	Limita superioară $\bar{x} + tSm$ (g)	65,10
6.	Limita inferioară $\bar{x} - tSm$ (g)	51,10
7.	Valori ce se exclud	50,20
8.	Eroare mijlocie a mediei $\pm sx$ (g)	$\pm 1,12$
9.	CV (%)	
10.	$\bar{x} \pm Sx$	$58,10 \pm 1,12$

Compoziția oului la cele 5 loturi experimentale este redată în tabelul 89.

Tabelul 89. Compoziția ouălor la loturile experimentale

Nr.crt.	Specificare/unitate	Albuș	Gălbenuș	Coajă
1.	Masă (g) Lot C	39,34	17,68	7,28
	Lot E1	38,23	15,89	7,08
	Lot E2	37,64	15,83	6,83
	Lot E3	34,02	14,13	6,45
	Lot E4	31,03	13,19	5,98
2.	Valoarea medie \bar{x} (g)	35,06	15,34	6,72
3.	Limita de siguranță $\pm tSm$ (g)	$\pm 4,51$	$\pm 2,17$	$\pm 0,65$
4.	Interval de certitudine $\bar{x} \pm tSm$ (g)	$35,06 \pm 4,51$	$15,34 \pm 2,17$	$6,72 \pm 0,65$
5.	Limita superioară $\bar{x} + tSm$ (g)	39,57	17,51	7,37
6.	Limita inferioară $\bar{x} - tSm$ (g)	30,55	13,17	6,07
7.	Valori ce se exclud	-	17,68	5,98
8.	Eroarea mijlocie a mediei $\pm x$ (g)	$\pm 0,72$	$\pm 0,34$	$\pm 0,10$
9.	$\bar{x} \pm sx$ (g)	$35,06 \pm 0,72$	$15,34 \pm 0,34$	$6,72 \pm 0,10$
10.	CV (%)	2,06	2,26	1,54

Reprezentarea grafică a variației masei și compoziției ouălor la cele 5 loturi experimentale la sfârșitul perioadei experimentale arată că dacă pentru lotul tratat cu 75 mg/L apă băut sunt foarte apropiate de cele ale lotului martor, pe măsura scaderii cantității de rutină, valorile sunt mult mai mici (figura 56).

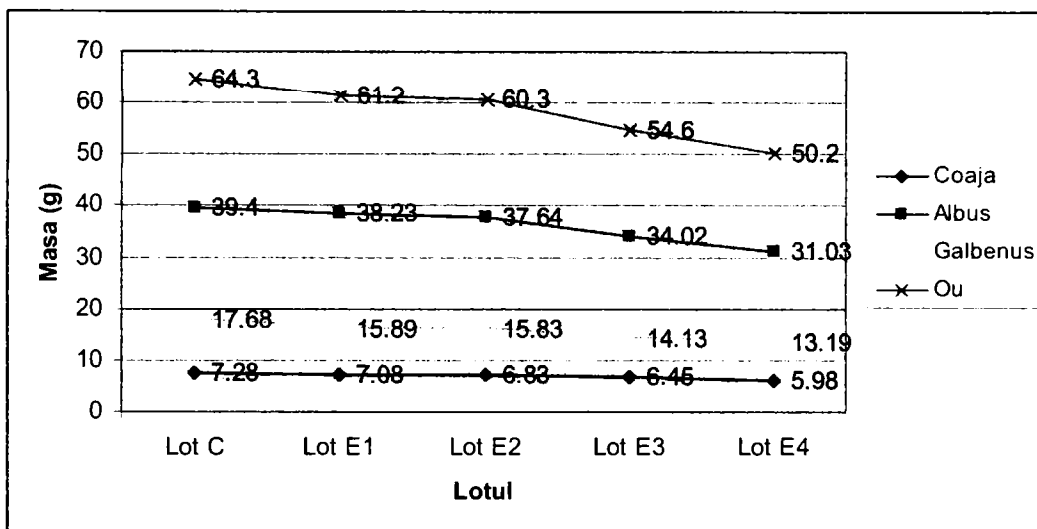


Figura 56. Compoziția ouălor la loturile experimentale

Consumul mediu zilnic de nutrețuri s-a stabilit prin diferența între cantitățile administrate și resturile colectate zilnic din hrănitoare. Consumul mediu zilnic de furaje/ lot la cele 5 loturi experimentale este redat în tabelul 90.

Tabelul 90. Consumul total mediu zilnic de furaje / lot

Nr. crt.	Specificarea	Valoarea
1.	Consumul total mediu zilnic de furaj (g / zi / lot)	Lot C 1524 Lot E1 1560 Lot E2 1572 Lot E3 1620 Lot E4 1680
2.	Consumul total mediu zilnic raportat la lotul C (%)	Lot C 100 Lot E1 102,36 Lot E2 103,14 Lot E3 106,29 Lot E4 110,23
3.	Valoarea medie \bar{x} (g zi / lot)	1591,20
4.	Limita de siguranță $\pm tSm$ (g/zi/lot)	$\pm 75,20$
5.	Intervalul de certitudine al mediei $\bar{x} \pm tSm$ (g/zi/lot)	$1591 \pm 75,20$
6.	Limita superioară $\bar{x} + tSm$ (g / zi / lot)	1666,40
7.	Limita inferioară $\bar{x} - tSm$ (g/zi/lot)	1516,00
8.	Valori ce se exclud	1680,00
9.	Eroarea mijlocie a mediei $\pm Sx$	$\pm 12,10$
10.	CV (%)	0,76
11.	$\bar{x} \pm Sx$	$1591,2 \pm 12,10$ (g/zi/lot)

Reprezentarea grafică a consumului mediu zilnic de furaj (g/zi /lot) este redată în figura 57.

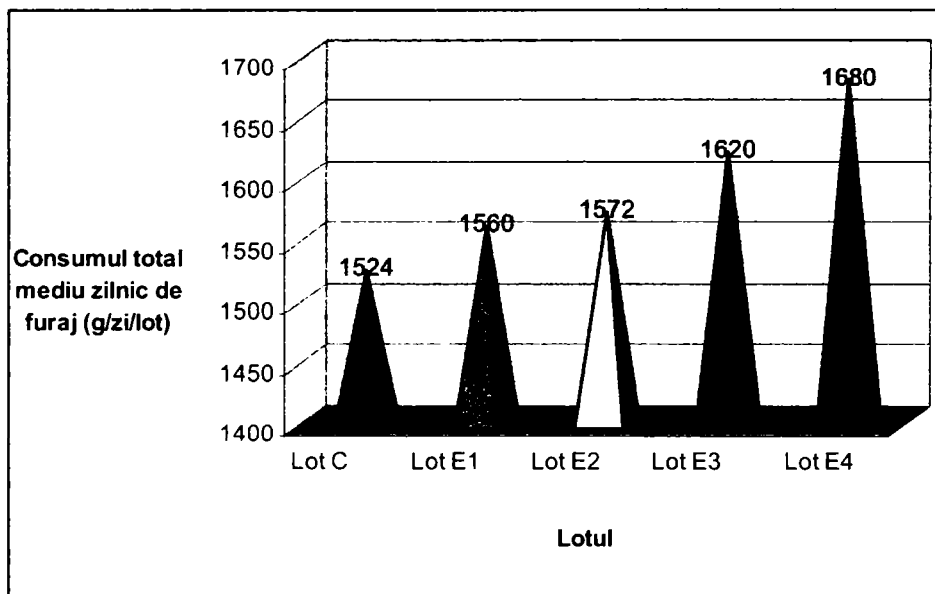


Figura 57. Consumul total mediu zilnic de furaj (g/zi/lot)

Consumul mediu de furaj a fost mai mare pentru lotul E4. O posibilă explicație ar fi conținutul de rutină mai mic, administrat în apă și care poate ar influența apetitul. Timpul limitat al experimentului, determinat și de timpul scăzut de viață al Galinaceelor, nu permite explicații sigure. S-ar impune ca acest tip de experimente să fie realizat pe 2-3 generații de păsări.

c). Studiul funcției hepatice

În vederea stabilirii măsurii în care diferite concentrații de principii active din extractul de *Ziziphus jujuba*, utilizat în apa de băut a păsărilor a influențat funcția hepatică s-a determinat aspectul macroscopic și masa ficatului de la câte trei găini din fiecare lot.

Aspectul macroscopic al ficatului a fost normal la toate probele examinate cu excepția lotului E4 la care s-a constatat o creștere a ficatului cu 11,3 % comparativ cu lotul C.

d). Examenul radiologic al membrilor inferioare

La examenul radiologic efectuat pe câte patru probe de metapodiu + anapodiu/ lot din membrele inferioare ale păsărilor au rezultat următoarele: aspect radiografic normal, regiunea metacarpiană + falange cu oscificare în limite fiziologice, compactă osoasă bine conturată (1-5 mm) cu zona de proiecție a tendoanelor fără modificări.

În concluzie probele luate în studiu au aspecte radiografice normale care se încadrează în tipologia radiografică a regiunii la păsări. Nu există diferențe sesizabile radiografic în ceea ce privește componentele osoase și țesuturi moi, existente în probe.

Rezultatele testării extractului de *Ziziphus jujuba*, ca adaos în apa de băut a păsărilor permit următoarele concluzii:

- Parametrii biochimici sanguini s-au încadrat în limitele fiziologice normale;
- Starea de sănătate a găinilor s-a menținut corespunzătoare, ceea ce s-a reflectat în rezultatele observațiilor zilnice. Pe perioada experimentului nu s-a înregistrat nici un caz de îmbolnăvire;
- Observațiile histologice la nivelul ficatului, nu au relevat modificări semnificative ; cu excepția lotului E4 la care s-a constatat o creștere a ficatului cu 11,3 % comparativ cu lotul C.
- Producția procentuală de ouă este apropiată de valorile lotului control 79,0 ÷ 70,8 în cazul loturilor E1, E2, și E3, și mai mică în cazul lotului E4, datorită poate și conținutului mai redus de rutină din extract;
- Structura ouălor (albuș, gălbenuș, coaja) și masa acestora au avut valori apropiate pentru loturile experimentale și lotul control.

Rezultatele cercetării constituie obiectul unei lucrări științifice publicate [270].

CONCLUZII

- Varietățile genului *Ziziphus* (*Rhamnaceae*), *Ziziphus jujuba* și *Ziziphus lotus*, deși originare din China, Africa și America de Nord, în țara noastră sunt răspândite îndeosebi în Dobrogea și în unele parcuri botanice din zona centrală și de vest a țării. Cunoscute în România sub numele de "curmalul chinezesc" sau "măslin dobrogean", au fost studiate în țările de origine din punct de vedere al aplicabilității lor în medicină și farmaceutică, dar foarte puțin din punct de vedere al compoziției lor în principii active. Deși unele studii indică doar prezența flavonoidelor în fructele, respectiv frunzele acestor specii, în lucrare ne-am propus studiul detaliat al principiilor active din aceste specii, precum și posibilitatea găsirii pentru extractele vegetale respective a unor aplicații.

Varietățile genului *Hydrangea* (*Hydrangeaceae*), *Hydrangea paniculata* și *Hydrangea aspera*, originare din Asia Centrală și de Est, cunoscute în țara noastră sub numele de "hortensia" sunt utilizate în medicină și cosmetică datorită conținutului lor în flavonoide din rădăcină, în lucrare ne-am propus studiul detaliat de principii active din frunzele acestor specii.

- Având ca bază aspectele teoretice cuprinse în prima parte de considerații generale a tezei, contribuțiile proprii au fost realizate pe materialul vegetal recoltat în anii 2003, 2004 și 2005 din flora Grădinii Botanice Macea din partea de vest a țării, localitatea Macea, județul Arad.

- Principalii constituenți identificați în frunzele de *Hydrangea paniculata* sunt: quercetina, rutina și luteolina; în frunzele de *Hydrangea aspera*: quercetina, rutina și luteolina; în frunzele de *Ziziphus jujuba*, respectiv *Ziziphus lotus*, rutina; și în fructele de *Ziziphus jujuba*, respectiv *Ziziphus lotus*, kaemferolul, miricetina și rutina.

- Prima etapă a studiului a constat în extracția flavonoidelor din materialul vegetal, prin mai multe metode de extracție și anume, extracția statică (macerarea), extracția cu solvenți la reflux și extracția multiplă (Soxhlet).

În cazul extracției statice cu apă a flavonoidelor din materialul vegetal, conținutul de principii a fost scăzut, datorită faptului că flavonoidele sunt foarte puțin solubile în apă, în cazul extracției alcoolice, rezultatele au fost comparabile.

Astfel, în cazul extracției prin macerare alcoolică a flavonoidelor, randamentele cele mai bune s-au obținut în cazul folosirii ca solvent a alcoolului metilic 94 %, iar condițiile cele mai optime pentru extracție au fost temperatura de 4°C și timpul de extracție de 100 ore. În cazul extracției la reflux s-a evidențiat faptul că alcoolul metilic 94% este solventul cel mai potrivit pentru extracția glicozidelor flavonoidelor, cum este rutina, iar alcoolul etilic 94% este solventul potrivit pentru extracția kaemferolului și luteolinei.

În cazul obținerii extractelor alcoolice prin procedeul extracției multiple- Soxhlet, alcoolul metilic 94 % este cel mai bun solvent pentru extracția flavonoidelor, iar solventul folosit pentru îndepărtarea compușilor lipofili, cel mai eficient este eterul de petrol.

Identificarea resturilor de agliconi, în cazul extractelor cu un conținut ridicat de principii active s-a realizat prin hidroliza acidă a extractelor, utilizând ca solvenți alcool metilic 94 % și HCl 25 % și un timp de extracție de 30 minute.

În urma rezultatelor obținute am stabilit că solventul cel mai potrivit pentru extracția flavonoidelor este alcoolul metilic 94%, iar condițiile de extracție cele mai avantajoase sunt temperatura de 4°C și timpul de extracție de 100 ore.

▪ A doua etapă a studiului a constat în purificarea extractelor și studiul posibilităților de aplicarea în diverse domenii.

Deoarece în cazul extractelor alcoolice din frunze de *Hydrangea paniculata* s-a evidențiat prezența clorofilei ($\lambda_{\max} = 640 \text{ nm}$) și a carotenilor ($\lambda_{\max} = 420 \text{ nm}$), s-a încercat reținerea acestora pe diverse faze staționare: silicagel 60, alumina activată și Sephadex LH-20, utilizând ca fază mobilă metanolul.

Rezultatele cele mai bune de separare s-au obținut utilizând ca fază staționară Sephadex LH-20, când conținutul de principii active separate a fost cel mai mare. Aceași fază staționară s-a utilizat și pentru purificarea unui extract din frunze de *Hydrangea aspera* și a unui extract din fructe de *Ziziphus jujuba*.

S-a încercat și o separare a flavonoidelor prin flash cromatografie, utilizând coloană ISOLUTE Flash Si II condiționată cu metanol, când rezultatele au fost apropiate cu cele obținute prin cromatografia pe coloană, aceasta fiind și o metodă de verificare a eficienței coloanei utilizate pentru separarea pe coloană a flavonoidelor din extracte.

▪ Prezența **flavonoidelor** la cele două specii a fost studiată atât sub aspect calitativ, prin reacții de culoare, spectroscopie IR, cromatografie în strat subțire, cât și sub aspect cantitativ metoda spectrofotometrică și cromatografia de lichide de înaltă performanță.

Reacțiile de culoare au indicat prezența principalelor clase de flavonoide în extracte.

Spectroscopia IR a evidențiat vibrații de valență $\nu_{C=O}$, prin benzi cuprinse între $1630 - 1665 \text{ cm}^{-1}$, benzi tipice scheletului flavonoidelor; vibrații de valență ν_{C-O} prin benzi cuprinse între $1000-1350 \text{ cm}^{-1}$ și vibrații de deformare în plan, δ_{C-H} prin benzi cuprinse între $600 - 980 \text{ cm}^{-1}$.

Cromatografia în strat subțire a permis identificarea flavonoidelor sub forma de unu, două sau trei spoturi violete pe fond alb, prezentând R_f -uri crescătoare în funcție de numărul de substituenți. Astfel, quercetina, rutina și luteolina s-au identificat în extractele din frunze de *Hydrangea paniculata*, iar flavonoidele rutina, kaemferolul și miricetina s-au identificat în extractul din fructe de *Ziziphus jujuba*.

Cromatografia de lichide de înaltă performanță cuplată cu un spectrofotometru UV-VIS a permis concomitent cu separarea și identificarea componentelor și determinarea concentrației fiecărui flavonoid prezent în fracțiune. Astfel în extractele de *Hydrangea paniculata*, a fost identificată rutina și quercetina atât în extractele propriu-zise cât și în cele purificate, iar în cazul extractelor de *Ziziphus jujuba*, au fost identificate alături de rutină și flavonoidele miricetină și kaemferol.

Sub aspectul cantitativ, conținutul de flavonoide a fost determinat pentru materialul vegetal colectat în anii 2003, 2004 și 2005. Conținutul de flavonoide a variat și în funcție de condițiile climatice a anilor de colectare a materialului vegetal. Conținutul de flavonoide a variat între valorile 2,226- 2,634 (% rutină), pentru frunze de *Ziziphus*, între 0,168 - 0,374 (% rutină) pentru fructe de *Ziziphus*; între 1,752 - 2,278 (% rutină) pentru frunze de *Hydrangea paniculata*; între 0,448 - 2,363 (% rutină) pentru frunze de *Hydrangea aspera*.

În cazul speciei *Ziziphus*, atât pentru frunze cât și pentru fructe de *Ziziphus jujuba*, cât și pentru frunze de *Ziziphus lotus*, conținutul de flavonoide este mediu pentru materialul vegetal din anul 2003, este mult mai mare pentru cel din anul 2004, an cu cea mai mare temperatură medie anuală ($19,4 \text{ }^\circ\text{C}$), iar în anul 2005, conținutul de flavonoide este redus la jumătate. Pentru fructe de *Ziziphus jujuba*,

conținutul de flavonoide cel mai ridicat este în materialul vegetal din anul 2004, cel mai mic fiind la cel din anul 2003.

În cazul speciei *Hydrangea*, conținutul cel mai mare de flavonoide se găsește în frunzele de *Hydrangea aspera* din anul 2005 și *Hydrangea paniculata* din anul 2004, iar conținutul cel mai mic de flavonoide se găsește în frunzele de *Hydrangea aspera* din anii 2003 și 2004.

Variația conținutului de flavonoide din materialul vegetal s-ar putea explica și prin condițiile climatice diferite ale anilor respectivi de colectare a materialului vegetal (temperatură, precipitații).

- **Polifenolii** de tip pirocatechina din frunze și fructe de *Ziziphus jujuba* și *Ziziphus lotus* și din frunzele de *Hydrangea paniculata* și *Hydrangea aspera* au fost evidențiați prin cromatografie în strat subțire, respectiv au fost dozați cantitativ.

Cercetările realizate indică un conținut mare de polifenoli de tip pirocatechina în jur de 8- 13,0 %, în frunze de *Ziziphus jujuba* din 2004 și frunze de *Ziziphus lotus* 2004. Conținutul cel mai mare de polifenoli de tip pirocatechina a fost determinat în fructe de *Ziziphus jujuba* din anul 2003 și fructe de *Ziziphus jujuba* din 2004, iar conținutul de polifenoli cel mai scăzut s-a identificat în materialul vegetal din anul 2005, an în care temperatura media anuală a fost mai scăzută și cantitatea totală de precipitații a fost mai ridicată.

Rezultatele analizei cantitative în cazul varietăților genului *Hydrangea*, indică faptul că un conținut ridicat de polifenoli prezintă frunzele de *Hydrangea paniculata* din 2003 și *Hydrangea paniculata* din 2004, pe când în cazul speciei *Hydrangea aspera*, conținutul cel mai mare de polifenoli este în materialul vegetal din 2004 și cel mai mic în cel din 2003.

- Prezența **antocianidinelor** în varietățile genurilor *Ziziphus* și *Hydrangea* a fost studiată atât sub aspect calitativ cât și sub aspect cantitativ.

Analiza cantitativă a evidențiat, cantitatea de antocianidine exprimată ca mg cianidină / 100 g material vegetal astfel:

- între 30 – 70 mg pentru frunze de *Ziziphus jujuba*
- între 14 – 20 mg pentru fructe de *Ziziphus jujuba*
- între 65 – 67 mg pentru frunze de *Ziziphus lotus*
- între 24 – 36 mg pentru fructe de *Ziziphus lotus*

Conținutul de antocianidine din frunzele speciei *Ziziphus jujuba* a fost scăzut pentru materialul vegetal din anul 2004 și aproape dublu pentru materialul vegetal din anul 2005, iar în cazul speciei de *Ziziphus lotus*, conținutul de antocianidine a fost aproape același. Pentru fructele speciei *Ziziphus* conținutul de antocianidine a fost mai mare pentru materialul vegetal din anul 2005 față de cel din anul 2004.

În cazul speciei *Hydrangea*, conținutul de antocianidine a fost mai mare pentru materialul din anul 2005, față de materialul vegetal recoltat în anul 2004.

Analiza calitativă a compușilor antocianici în extractele vegetale studiate, realizată prin cromatografie în strat subțire a evidențiat prezența cianidinei atât în extractele de *Hydrangea* cât și în extractele de *Ziziphus*.

- Conținutul de **taninuri** din frunzele speciei *Ziziphus* și *Hydrangea* variază în funcție de anul recoltării materialului vegetal, materialul vegetal recoltat în anul 2004 prezentând un % mai mare de taninuri față de materialul vegetal recoltat în anul 2005.

Analiza calitativă a taninurilor s-a realizat prin reacții de culoare și precipitare- reacții de identificare a taninurilor, și prin cromatografie în strat subțire.

Reacțiile de identificare a taninurilor au permis punerea în evidență a taninurilor numai în frunzele de *Hydrangea* și frunzele de *Ziziphus*, în schimb

cromatografia în strat subțire a permis identificarea pirogalolului în frunzele de *Ziziphus jujuba* și *Ziziphus lotus*, precum și în frunzele de *Hydrangea paniculata* și *Hydrangea aspera*.

Cantitatea de taninuri exprimată ca taninuri % (g taninuri / 100 g material vegetal) variază astfel:

- între 3 – 5 %, pentru frunze de *Ziziphus jujuba*
- între 3 – 4 %, pentru frunze de *Ziziphus lotus*
- între 3 - 4 %, pentru frunze de *Hydrangea paniculata*
- între 2 - 4 %, pentru frunze de *Hydrangea aspera*

Unul dintre obiectivele principale ale lucrării a fost studiul posibilităților de folosire a extractelor ca antioxidanți pentru uleiurile vegetale. Pentru aceasta s-a determinat activitatea antioxidantă prin două metode: metoda cu permanganat de potasiu și metoda DPPH.

Analizând rezultatele obținute se observă că timpul de decolorare cel mai scurt, adică capacitatea antioxidantă cea mai mare o prezintă extractele din frunze de *Ziziphus*. În cazul speciei *Ziziphus jujuba*, extractele din frunze au activitate antioxidantă mai ridicată decât cele din fructe.

Reprezentând comparativ activitatea antioxidantă a extractelor studiate se poate concluziona că extractele din frunze de *Ziziphus lotus* având cel mai mic timp de decolorare au o capacitate antioxidantă mare și în același timp caracteristici antioxidante apropiate față de cele din frunze de *Ziziphus jujuba*. În schimb activitatea antioxidantă a extractelor din frunze de *Hydrangea* este mai mică comparativ cu extractele din frunze de *Ziziphus*, și mult mai ridicată față de extractele din fructe de *Ziziphus*, care prezintă cel mai mare timp de decolorare a soluției de permanganat de potasiu, deci capacitate antioxidantă mică.

În cazul extractelor din frunze de *Ziziphus jujuba* și *Ziziphus lotus*, capacitatea antioxidantă este comparabilă cu soluția de acid ascorbic 1%, diluție 1:4, iar pentru extractele din fructe de *Ziziphus jujuba* și *Ziziphus lotus*, ca și pentru cele din frunze de *Hydrangea paniculata* și *Hydrangea aspera*, capacitatea antioxidantă a extractelor este comparabilă cu soluția de acid ascorbic 1%, diluție 1:6.

În cazul determinării activității antioxidante prin metoda spectrofotometrică bazată tot pe reacția de reducere a permanganatului de potasiu, urmărind decolorarea în timp a soluției de permanganat, când determinarea activității antioxidante s-a urmărit în zilele 1,2, 4, 8, 12, 18, 24, 32 și 40 de la obținerea extractului, rezultatele au evidențiat faptul că extractul din frunze de *Ziziphus jujuba* are o capacitate antioxidantă mai mare decât extractul din frunze de *Hydrangea paniculata*.

În cazul determinării activității antioxidante prin metoda cu DPPH, se poate observa că, cea mai mare capacitate antioxidantă apare în cazul extractelor obținute din materialul vegetal din anul 2004, și anume activitatea antioxidantă cea mai mare o are extractul din frunze de *Hydrangea paniculata*, activitate antioxidantă aproape identică cu cea a standardului de rutină. Activitatea extractelor din frunze de *Hydrangea paniculata* 2005, *Hydrangea aspera* 2005 este la fel de mare ca și cea a soluției de acid ascorbic 1 mg/mL.

Pe baza conținutului de principii active și a activității antioxidante a extractelor de *Ziziphus jujuba* și *Hydrangea paniculata*, s-a studiat: posibilitatea folosirii extractelor ca antioxidanți pentru uleiurile vegetale, capacitatea antioxidantă a flavonoidelor din extractele din frunze de *Hydrangea paniculata* și din fructe de *Ziziphus jujuba* la nivel celular, efectul acestora asupra unor parametri biochimici și

asupra activității unor enzime la șobolani precum și aplicații ale acestora ca adaos în hrana animalelor.

▪ În cazul folosirii extractelor din frunze de *Hydrangea paniculata* și din fructe de *Ziziphus jujuba* ca antioxidanți pentru uleiurile vegetale s-a studiat efectul antioxidant al extractelor comparativ cu antioxidanți reprezentați de flavonoide pure și unii antioxidanți folosiți curent în industrie: acidul ascorbic și acidul galic. S-a lucrat în condiții diferite: temperatură de 25 °C, lumină și întuneric și cu ulei supus tratamentului termic la 98 °C. S-a lucrat în paralel cu standarde și cu extracte urmărind variația indicelui de peroxid timp de 50 de zile.

Standardele de flavonoide prezintă o ușoară activitate prooxidativă în primele 10 zile de analiză, după care activitatea antioxidantă este remarcabilă. În ceea ce privește produsul de sinteză, acidul galic, acesta, la o concentrație molară de ~ 1,76 ori mai mare decât a flavonoidelor are o activitate antioxidantă mai mare dar cu toate acestea inferioară celei a rutinei.

Din analiza rezultatelor obținute se evidențiază faptul că:

- extractele de *Ziziphus* și *Hydrangea* prezintă activitate antioxidantă, activitate de protecție împotriva oxidării uleiului în condiții de păstrare a acestuia la 25°C la lumină pe o perioadă de 30 zile, după care efectul protector scade (indicele de peroxid crește).

- activitatea antioxidantă cea mai mare a avut-o extractul din frunze de *Hydrangea paniculata*; cele mai modeste rezultate s-au obținut pentru extractul din frunze de *Hydrangea aspera*.

Se poate observa că activitatea antioxidantă a extractelor este independentă de familie, specie sau parte anatomică, dar crește odată cu creșterea conținutului total de flavonoide din extract. În ceea ce privește conținutul de rutină din extract, acesta influențează în același mod activitatea oxidantă cu excepția extractului din frunze de *Hydrangea paniculata*, a cărui activitate antioxidantă nu poate fi corelată și cu conținutul de rutină, ci doar cu cel de flavonoide totale.

Compararea valorilor absolute ale indicilor de peroxid pentru uleiurile tratate cu extracte din cele două specii de Angiosperme și cele tratate cu compuși flavonoidici standard, respectiv cu un antioxidant de sinteză sunt comparabile în anumite limite. Este evident faptul că și în cazul etaloanelor, respectiv a antioxidantului sintetic, după 30 de zile indicele de peroxid crește brusc.

S-a urmărit evoluția aceluiași parametri în timp și pentru probele de ulei tratate cu adaos de extracte din frunze de *Ziziphus jujuba*, *Ziziphus lotus*, *Hydrangea paniculata*, *Hydrangea aspera* și din fructe de *Ziziphus jujuba*, respectiv *Ziziphus lotus*. Se observă: o prima perioadă în jur de 6 ore în care indicele de peroxid crește relativ încet pentru toate probele ca și pentru martor. În cazul extractelor, în această perioadă indicele de peroxid înregistrează o creștere de numai 2 până la maximum 3 ori față de valoarea acestuia pentru martor. Urmează o a doua perioadă de 1-3 ore în care indicele de peroxid crește chiar de până la 4 ori fără ca după aceasta să existe pentru toate probele un interval clar în care să rămână relativ constant până la o viitoare reluare a procesului.

Extractele din frunze de *Ziziphus jujuba* și din fructe de *Ziziphus lotus* au demonstrat în acest caz, cea mai bună acțiune protectoare, valorile indicelui de peroxid fiind sub valorile pentru proba martor.

Dacă se urmărește evoluția în timp a valorilor indicilor de peroxid în cazul uleiului tratat cu extracte din specia *Ziziphus jujuba*, se observă că extractul din frunze are o capacitate antioxidantă mai mare comparativ cu extractul din fructe de *Ziziphus lotus*.

Ca și în cazul uleiului păstrat la rece, în cazul uleiului prelucrat termic se respectă creșterea activității antioxidante odată cu creșterea conținutului de flavonoide și de rutină în extract.

În cazul determinării indicelui de peroxid a uleiului cu adaos de antioxidanți naturali și sintetici expus la aer (lumină și întuneric) pe o perioadă de 50 zile, pentru toate tipurile de probe indicii de peroxid variază crescător. Adaosul de antioxidanți sintetici- standarde de flavonoide, quercetină, respectiv rutină își face simțită acțiunea antioxidantă, indicii de peroxid depășind valoarea 10 abia după 30 zile în cazul uleiului cu adaos de quercetină, respectiv după 40 zile în cazul uleiului cu adaos de rutină. Efectul antioxidanților naturali (extracte vegetale) este pozitiv în cazul probelor cu adaos de extract etanolic, însă în cazul probelor cu adaos de extracte apoase, indicii de peroxid înregistrează scăderi bruște în zilele 15, respectiv 35.

În cazul probelor păstrate la întuneric se observă variații crescătoare și descrescătoare ale valorii indicilor de peroxid. Efectul pozitiv al adaosului de extract alcoolic din fructe de *Ziziphus jujuba* este mult mai mare față de efectul adaosului de extracte apoase din fructe, respectiv frunze de *Ziziphus jujuba*. Adaosul extractelor apoase de *Ziziphus jujuba* are un efect mai bun în probele păstrate la întuneric față de probele expuse la lumină.

Aceste variații periodice, crescătoare și descrescătoare a indicelui de peroxid pentru toate uleiurile se datorează mecanismului radicalic al oxidării ca și conținutului de acizi grași nesaturați al acestora. Producții primari, hidroperoxidii și peroxidii izomeri suferă transformări rapide în produși secundari și terțiari ai procesului, iar prin structura lor, aceștia pot fi generatori de noi radicali și procesul oxidării radicalice se reia pentru compuși cu moleculă mai mică.

În cadrul studiului activității antioxidante a extractelor pe uleiurile vegetale s-a realizat și o modelare matematică statistică a variației indicelui de peroxid pentru uleiul de floarea soarelui tratat cu antioxidanți naturali și sintetici

Modelarea matematică statistică s-a realizat pentru:

- uleiul alimentar tratat cu antioxidanți naturali și sintetici, expus la aer (lumină și întuneric) pe o perioadă de 50 zile,
- uleiul de floarea soarelui prelucrat la 98°C pe un interval de timp de 12 ore.

Valorile indicatorilor de adecvanță sunt satisfăcătoare, fapt ce denotă corelări apreciable în cazul regresiei multiple. Parametrii de corelare calculați fiecare pe baza celuilalt argumentează o capacitate de predicție foarte bună a modelului matematic.

Rezultatele experimentale au dovedit că în funcție de condițiile de păstrare stabilitatea uleiului la autooxidare crește în ordinea: expunere la lumină < păstrare la întuneric. Antioxidanții folosiți au redus gradul de oxidare al uleiurilor, lucru sesizat din valorile mai mici ale indicilor de peroxid.

Valorile coeficienților de adecvanță indică o bună corelare pentru antioxidanții sintetici cât și pentru cei naturali. Analiza corelativă realizată pe baza ecuațiilor arată că între variația indicilor de peroxid pentru uleiul de floarea soarelui netratat și cel tratat cu antioxidanți studiați în timp există corelări apreciable, în special pentru probele tratate cu extracte vegetale.

▪ S-a urmărit testarea extractelor brute etanolice și a fiecărui flavonoid din punct de vedere al prevenirii și/sau atenuării stresului oxidativ la nivel celular (leucocitele din sângele sănătos), precum și determinarea efectului antioxidant al pretratamentului leucocitelor umane cu flavonoide.

Rezultatele obținute au evidențiat faptul că toate flavonoidele luate în studiu au prezentat o activitate antioxidantă semnificativă, unele dintre ele

(luteolina și miricetina) deși în concentrații mici (0.07%, respectiv 0.15%) reduc la jumătate deteriorările pricinuite de radicalii liberi la nivel celular.

Se poate concluziona că, fiecare flavonoid are o capacitate antioxidantă mai mare când acționează singur, decât atunci când el acționează combinat cu alte flavonoide, iar capacitatea antioxidantă crește cu creșterea concentrației flavonoidului în soluție, această creștere nefiind însă proporțională cu concentrația.

- S-au realizat cercetări privind efectul unui extract de *Ziziphus jujuba* asupra unor parametrii biochimici și asupra activității unor enzime la șobolani, cercetări axate îndeosebi pe relevarea acțiunii extractului apos din fructe de *Ziziphus jujuba* asupra organismelor vii, urmărind totodată și fenomenele oxidative în care oxigenul este utilizat în metabolismul eritrocitar. S-au determinat în acest scop o serie de parametrii biochimici ca și activitățile unor enzime. Au fost determinate de asemenea modificările care apar la nivelul unor organe (ficat, rinichi, splină) și modificările care apar la nivelul formulei leucocitare.

Administrarea extractului de *Ziziphus jujuba* a prezentat o acțiune generatoare de stres oxidativ relevant prin valorile crescute ale malondialdehida, prin scăderea cantității de glutation și prin activitățile enzimelor catalaza și superoxid dismutaza. De asemenea a prezentat o afectare (asemănătoare acțiunii unei substanțe toxice) a tuturor enzimelor implicate în sistemul antioxidant de apărare. Nu a fost influențată în mod negativ activitatea funcției ficatului, relevată prin activitățile ce se încadrează în valorile normale atât ale alaninamino transferazei, aspartatamino transferazei, cât și ale fosfatazei alcaline, ca indicatori ai funcționării și afectării hepatocitelor, iar observațiile histologice nu au relevat modificări semnificative la nivelul organelor studiate (ficat, rinichi, splină).

- Incorporarea unui extract din fructe de *Ziziphus jujuba* și a unui extract din frunze de *Hydrangea paniculata* în diverse formulări farmaceutice a permis testarea externă din punct de vedere al difuzibilității epidermice și al efectului antiinflamator a acestor extracte.

Ca urmare a aplicațiilor locale s-a evidențiat o bună difuzibilitate epidermică și ameliorări chiar după câteva zile de la începutul tratamentului. Rezultatele obținute recomandă continuarea cercetărilor.

- În vederea îmbunătățirii balanței nutritive în organismul animal, s-a încercat introducerea în apa de băut a păsărilor a unui extract din fructe de *Ziziphus jujuba* ce conține compuși flavonoidici (0,6089 mg rutină/ mL extract).

Rezultatele testării extractului de *Ziziphus jujuba*, ca adaos în apa de băut a păsărilor au permis următoarele concluzii:

Parametrii biochimici sanguini s-au încadrat în limitele fiziologice normale. Starea de sănătate a găinilor s-a menținut corespunzătoare, ceea ce s-a reflectat în rezultatele observațiilor zilnice. Observațiile histologice la nivelul ficatului, nu au relevat modificări semnificative cu excepția unui lot la care s-a constatat o creștere a ficatului cu 11,3 % comparativ cu lotul control. Producția procentuală de ouă a fost apropiată de valorile lotului control, 79,0 ÷ 70,8 în cazul primelor trei loturi (75-30mg rutină/L apă de băut) și mai mică în cazul ultimului lot (15 mg rutină /L apă de băut), datorită probabil conținutului mai redus de rutină administrat. Structura ouălor (albuș, gălbenuș, coaja) și masa acestora au avut valori apropiate pentru loturile experimentale și lotul control.

Studiile întreprinse în cadrul acestei teze au permis identificarea și determinarea cantitativă a principiilor active, în vederea caracterizării chimice cât mai complexe a speciilor *Hydrangea paniculata* și *Ziziphus jujuba* și utilizării extractelor acestora în diverse aplicații, ceea ce ar recomanda utilizarea acestor extracte vegetale ca ingrediente naturali în scopurile propuse prin obiectivele tezei.

Rezultatele cercetărilor experimentale din teza de doctorat au fost valorificate prin 3 lucrări trimise spre publicare [238, 251, 257] și 11 publicate, dintre care: 2 lucrări în *Revista de Chimie*, cu impact ISI [225, 241], 1 lucrare în *Proc.Nat. Sci.*, Novi Sad, ISSN 0352-4906, cotate ISI (CSI Thompson Scientific Master Journal List) [229], 1 lucrare publicată în volumul electronic al unui simpozion cu participare internațională și ISSN 1582-9391, ce va fi inclusă în *Analele Universității din Craiova*, Seria Agricultură, Montanologie, Cadastru, clasificată CNCSIS de tip B [270], 1 lucrare publicată în *Scientific and Technical Bulletin of "Aurel Vlaicu" University*, Series: Chemistry, Food Science of Engineering, revistă clasificată CNCSIS de tip B [242], 3 lucrări trimise spre publicare și 6 lucrări publicate în *Studia Universitatis Vasile Goldiș*, Seria Științele Vieții, revistă ce apare sub egida unui comitet de redacție, dar care nu a depus dosar pentru clasificare [223, 224, 230, 243, 244, 262].

BIBLIOGRAFIE

1. J.B. Harborne, *The Flavonoids: Advances in research since*, Chapman & Hall, London, 1986
2. N.Cotelle, *Curent Topics in Medicinal Chemistry*, **1**, 2001, 569-590
3. I. Ciulei, E. Grigorescu, U. Stănescu, *Plante Medicinale, Fitochimie și Fitoterapie*, vol 1, Editura Medicală, 1993
4. S. Martinez-Florez, J. Gonzales-Gallego, J.M. Culebras, M.J. Tunon, *Nutr. Hosp*, **XVII (6)**, 2002, 271-278
5. C.Bodea, *Tratat de Biochimie vegetală*, vol II, Editura Academiei, 1965
6. V. Istudor, *Farmacognozie, Fitochimie, Fitoterapie*, vol. 1, Ed. Medicală, București, 1998
7. A.A. Franke, L.J. Custer, C.Arakaki, S.P. Murphy, *Journal of Food Compound and Analysis*, **17 (1)**, 2004, 1-24
8. Oyvind M.Andersen, K.R. Markham, *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications*, Taylor &Francis Group, LLC, 2006, <http://www.amazon.com>
9. *Flavonoides*, <http://www.docencia.udea.edu.co/Flavonoides.html>
10. M.T. Popovic, *Biohemija Biljaka*, Ed. Verzal, Novi Sad, 2001
11. U.Bogs, D.Bremer, *Pharm.*, **25**, 1970, 410-418 ; CA **74**,126573f (1971)
12. O.Carpena, E.Revilla, *EFCE Publ.Ser.*, **12**, 363-370, 1980; CA **94**, 117142e (1981)
13. J. Michaud, FR 1.500.400 (Cl.C.07g/1967), 23 sept 1966; CA **69**: 69686v (1968)
14. H.S.Moon, B.R. Lee, K.H. Lee, US 6,641,975 B1 (U.S.Cl. 424/1958,), 5 June, 2001
15. S.H.Wender, N.Okla, US 2,681,907 (Cl 260-210/ 1952), 22 June, 1954
16. I., Raskin, A. Poulev, US 20020132021 (Cl 424/773) 19 september, 2002.
17. G. I. Rossuskaya, F. D. Dargaeva, *Farmatsiya*, 37(4), 27-29, 1988; CA **109**, 134878(1988)
18. K. Karwowska, E. Malgorzata, Pol.PL. 122.936 (Cl. A. 61k 035/78), 15 Jun. 1984; CA **102**, 12351c (1985)
19. A. Petsalo, J.Jalonen, A. Tolonen, *J. Chromatogr.A.*, **1112(1-2)**,2006, 224-231
20. J. Peng, G. Fan, Y.Chai, Y.Wu, *J.Chromatogr.A.*, **1102(1-2)**, 2006, 44-50
21. M.C.Lin, M.J.Tsai, K.C. Wen, *J.Chromatogr. A.*, **830(2)**, 1999, 387-395
22. K.L. Chiu, Y.C. Cheng, J.H. Chen, C.J. Chang, P.W. Yang, *The Journal of Supercritical Fluids*, **24(1)**, 2002, 77-87
23. C. Santos-Buelga, G. Williamson, *Methods in polyphenol analysis*, Westle Research Centre, Switzerland, 2003, <http://www.rsc.org/is/books>
24. Z.Gu, J. Cai, J.Yang, Q.Su, *J. of Separation Science*, **28 (2)**, 2004, 184-188

25. Y.Zu, C.Li, Y. Fu, C. Zhao, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **41(3)**, 2006, 714-719
26. J. Huang, Z. Zhang, *Analytical Sciences*, **20**, 2004, 335-397
27. J.H.Kwon, H.J.Kang, J.Lee, S.Kim, K.S. Song, H.K.Kim, *Food Chemistry: Food Composition and analysis, Sesion 76D*, <http://ift.confex.com>
28. N.Hong, V.A. Yaylayan, G.s Ranghavan, J.R. Pare, J.M. Belanger, *Nat. Prod. Lett.*, **15(3)**, 2001, 197-204
29. Z. Liu, G.Yan, F.Bu, J. Sun, X.Hu, H.Zhang, Z.Liu, *Chem Anals. (Warsaw)*, **50**, 2005, 851
30. L. Hörhammer, R. Hansel, *Arhiv der Phar.*, **286/58(8)**, 1953, 425-431
31. L. Jurd, *Phytochemistry*, **8(2)**, 1969, 445-462; *CA* **47** (1969), 82549t
32. J.Mears, T.Marby, *Phytochemistry*, **11(1)**, 1972, 411-412; *CA* **76** (1972), 99979e
33. C.W. Wilson, *J. Am. Soc.*, **61**, 1939, 230-233
34. S. Shibata, A. Kasokara, *J.Pharmac. Soc. Japan*, **72**, 1952, 1386; *CA* **47** (1953), 1335g
35. L. Hörhammer, K.H., Müller, *Arhiv der Pharm*, **287/59(6)**, 1954, 310-313
36. *Flavonoides*, <http://www.membres.lycos.fr/jjww/flavonoide.html>
37. K.Robards, M. Antolovich, *Analyst*, **112**, 1997, 11R-34R
38. X. Bao, Z. Zhu, NQ. Li, J. Chen, *Talanta*, **54**, 2001, 591-596
39. F. Zsila, Z.Bikadi, M. Simonyi, *Biochem Pharmacology*, **65**, 2003, 447-476
40. K.Heinz, A. Rosler, D.P.C.Wong, *J. Nat. Prod*, **48(5)**, 1985, 837-840
41. J.Greenham, J.B. Harborne, C.A. Williams, *Phytochem. Anal.*, **14**, 2003, 100-118
42. I.Dini, G.C. Tenore, A. Dini, *Food Chemistry*, **84**, 2004, 163-168
43. H.N.A. Hasson, B.N. Barsoum, I.H.I. Habib, *J.Pharm. Biomed. Anal.*, **20**, 1999, 315-320
44. A. Matei, G. Subaş-Barbu, E. Grigorescu, *Farmacia* **XX (9)**, 1972, 561-564
45. I. Matei, E. Aminoresei, E. Grigorescu, *Farmacia* **XX (5)**, 1972, 279-283
46. S.Sun, D.Du, Q.Zhou, H.W. Leung, H.W. Yeung, *Analytical Sciences*, **17**, supplement, 2001, 455
47. S.K. Kang, *J. Nat. Prod*, **54 (2)**, 1991, 542-546
48. F. Barberan, F. Ferreres, *Tetrahedron*, **40 (22)**, 1984,
49. E. Palme, A.R. Bilia, I. Moreli, *Phytochemistry*, **42 (3)**, 1996, 903-905
50. H. Hao, S. Handong, Z. Shouxun, *Phytochemistry*, **42 (4)**, 1996, 1247-1248
51. N. Morita, M.Arisawa, *Heterocycles*, **4(2)**, 1976, 373-392
52. F. Cuyckens, M.Claeys, *J. Mass. Spectrom.*, **39**, 2004, 1-15
53. L. Rejo, *J.Chromatogr.*, **1**, 1958, 338-373
54. A.S. Sadykov, Z.P. Pakudina, P.K Denliev, *Dokl. Akad.Nauk, Uz. SSR*, **6**, 1960, 23-26; *CA* **57**: 5024 d,e (1962)
55. K. Szoke-Szotyori, E. W. Jurics, *Z. Lebensm-Unters. Forsh.*, **135 (4)**, 1967, 192-198 ; *CA* **68** (1968): 36589 s

56. T. Bodalski, N. Cisowski, *Diss.Pharm. Pharmacol.*, **19**(1), 1967, 99-104; CA 67: 61605 f;
57. E. Wong, A. O., Taylor, *J. Chromatogr.*, **9**, 1962, 449-454; CA 59: 15582a (1963)
58. G. Gunter, *Handbook of Cromatogr*, vol I, Easton, Pennsylvania, 1972
59. S.B. Ilic, S.S. Konstantinovic, Z.B. Todorovic, *Faeta Universitatis, Series: Physics, Chemistry and Technology*, **3**(1), 2004, 67-71

60. M.Masood, A.Pandey, *Proc. Natl .Acad. Sci. India*, **52**(1), 1982, 112-114, CA 99: 115277g (1983)
61. Van Genderen, H.Hendrick, J. V. Brederode, G. Niemann, *J. Chromatogr.*, **256**(1),1984, 151-153
62. A. Guseva, M.N. Nestyuk, *Biokhimija*, **18** , 1953, 480-483
63. G.Stahl, *Thin Layer Chromatography*, Berlin, 1956, p374-377
64. S.Pepeljnjak, Z.Kalodera, M.Zovko, *Acta. Pharm.*, **55** , 2005, 431-435
65. F. Hadizadeh, N.Khalili, H. Hosseinzadeh, R. Khaur-Aldina, *J.of Pharm. Research*, 2003, 254-265
66. E.Obszewska, W.Kroszczynski, B. Lopuszyzyska, *Acta Chromatografica*, **14**, 2004, 237-240
67. Z. Males, M. Medic-Saric, F.Bucar, *Croatica Chemica Acta*, **71**(1), 1998, 69-79
68. Rita Spiteri, Analysis of Rutin, <http://www.cis.um.edu.mt/~phcy/symp98/RitaSpiteri.html>
69. M.Nikolova, S.Berkov, S.Ivancheva, *Acta Chromatographica*, **14**, 2004, 110-114
70. M.Medic-Sauric, I. Jasprica, A.Smolcic-Budalo, A.Mornar, *Croatica Chemica Acta*, **77** (1-2), 2004, 361-366
71. M. Retezeanu, E. Tarpo, R. Drocan, A. Teodorescu, *Farmacia XX*, **3**, 1972, 167-171
72. M. Hernandez et al, *J. Agric. Food. Chem.* **44**, 1996, 3512-3515
73. H.Park, H.C. Cha, *Korean J. Biol. Sci.*, **7** , 2003, 327- 330
74. S.A.R. Vercruyse, J.A.Delcour, P.Dondeyne, *J. Chromatogr.*, **324**, 1985, 495-497
75. N.A.Tyukavkina, K.I. Lapteva, N.G. Devyatko, *Zh. Anal. Khim*, **24** (**5**), 1968, 777-781; cf CA 62: v930b (1969)
76. L. Nagerls, *J. Chromatogr.*, **171**, 1979, 321-330
77. F.Barberan, F.Ferreres, F. Tomas, *Tetrahedron*, **41**(23), 1985, 5733
78. P.G. Pretta, C. Gardena, P.L. Mauri, *J.of Chromat. Biomedical Applications*, **693**(1), 1977, 249-255
79. F. Gomez-Garibay, O. Tellez-Valdez, G. Moreno-Torres, J.S. Calderon, *Z. Naturforsch*, **57c**, 2002, 579
80. Z. Yuzhen, W. Fuheng, *Hippophae*, **10**(1), 1997, 39-41
81. Mc. Murrough, *J.Chromatogr.*, **24**, 1982, 262-265
82. J. Daigle, E.J. Conkerton, *J. Chromatogr.*, **24**, 1982, 262-265
83. M. Keinänen, *J.Agric. Food. Chem*, **41**, 1991, 1986-1990
84. Oloveira et al, *J.Braz. Chem. Soc.*, **12** (**2**), 2001, 243-246
85. H.Hayashi et al, *Phytochemistry*, **42**(3), 1996, 701-704
86. Ö. Tokusoglu, M.K. Ünal, Z. Yildirim, *Acta Chromatographica*, **13**, 2003, 196-207
87. L. Chin, Y.R. Lin, C.Y. Huang, K.C., Wen, *Journal of Food and Drug Analysis*, **8** (**4**), 2000, 289-296

88. M. Careri, L.Elviri, A. Mangia, M. Musci, *J.Chromatogr.*, **A 881**, 2000, 449-460
89. A. Escarpa, M.C. Gonzales, *Chromatographia*, **52 (1/2)**, 2000, 33-38
90. M.Keinänen, R. Julkunen-Titto, *J. Chromatogr. A.*, **793** , 1998, 370-377
91. B. Suarez. Valles, J.santamaria Victorero, J.J.Mangas Alonso, D.Blanco Gomis, *J.Agric. Food. Chem*, **42**, 1994, 2732-2736
92. M.Hernandez-Perez, T. Hernandez, C. Gomez-Cordones, I. Estrella, R.M. Babasal, *J. Agric. Food. Chem.*, **44**, 1996, 3512-3515
93. H. Ohta, S.Y.Tsui, T. Ishii, Y.Nogata, K. Kosumoto, 2 nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-2), <http://www.mdpi.org/ecsoc/september> 1-30, 1998
94. A. Crozier, M.E.J.Lean, M.Mc.Donald, C.Black, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1997, 590-595
95. R.Sladkovsky, P.Solich, L.Opletal, *J.Pharm. Biomed. Anal.*, **24** ,2001, 1049-1054
96. A. Crozier, E.Jenses, M.J. Lean, M.S. MsDonald, *J. Chromatogr. A*, **761**, 1997, 315-321
97. M.Ye, Y.Li, Y.Yan, H.Liu, X.Ji, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **28** ,2002, 621-628
98. M.Lopez, F.Martinez, C.Del Valle, C.Orte, M. Miro, *J. Chromatogr. A.*, **922**, 2001, 359-363
99. Yan-hua Lu, Zhi-Young Liu, Zheng-tao Wang, Dong-Zhi Wei, *Pharm. Biomed. Anal.*, **41(4)**, 2006, 1186-1190
100. R.X. Liu, Q. Wang, H.Z. Guo, L. Li, K.S. Bi, De-An Guo, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **39(3-4)**, 2005, 469-476
101. R. Aguilar-Sanchez, F.Ahuatl-Garcia, M.M. Davila-Jimenez, M.R. Elizalde-Gonzalez, M.R.G. Guevara-Villa, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **38(2)**, 2005, 239-249
102. T. Beek, *J. Chromatogr. A*, **967**, 2002, 21-55
103. X.Guo He, *J. Chromatogr. A*, **880(1-2)**, 2000, 203-232
104. X. He, L.Lin, L.Lian, *J. Chromatogr. A*, **855**, 1996, 127-132
105. V.Carbone, P.Montora, N.Tommasi, C.Pizza, *J. of Pharm. Biomed. Anal.* **34(2)**, 2004, 295-304
106. W.Li, J.F.Fitzlof, *J. Chromatogr. B*, **765**, 2001, 99-105
107. B.Klejdus, L.Lojkova, O.Lapcik, R.Koblovska, J.Moravcova, V.Kulan, *J. Sep. Sci.*, **28**, 2005; www.jss-journal.de
108. R.Colombo, F.M.Lancas, J.H. Yariwake, *J.Cromatogr. A.*, **1103**, 2006, 118-124
109. U.Svedström, H. Vuorela, R.Kostiainen, I.Laakso, R.Hiltunen, *J.Chromatogr.A.*, **1112 (1-2)**, 2006, 103-111
110. F. Panzeri, F.Peterlongo, *J. Chromatogr. A*, **825** , 1998, 9-16
111. S. Bekassy, N. Nogradi, *Acta Chin. Acad. Sc.Hung.*, **59** , 1969, 425-429
112. F.A.Barberan, M.I.Gill, P.Cremin, A.L. Waterhouse, B.Pierse, A.Kader, *J.Agric. Food Chem.*, **49** , 2001, 4748-4760
113. M.A. Hawryl, E.Soczewinski, *Chromatographia*, **52 (3/4)**, 2000, 175-178
114. F. Yang, J. Quan, T. Y. Zhang, Y. Ito, *J. Chromatogr. A*, **803**, 1998, 298-301

115. T. Wennberg, Y. P. Pauka, H. Vuorela, *Chromatographia*, **53** (Supl. S 240-S245), 2001
116. E. Horvath, J. Mink, *Talanta*, **42 (7)**, 1995, 979-982
117. T. Katagi, A. Horri, Y. Oomua, H. Miyakama, T. Kyu, Y. Ikeda, K. Isoi, *J. Chromatogr.*, **79**, 1973, 45-56
118. P. Payares, D. Diez, Y. Olivera, R. Vivas, I. Gomez, *J. Chromatogr.*, **771 (1-2)**, 1997, 213-219
119. M. Careri, A. Mangia, H. Musci, *J. Chromatogr.* **794(1-2)**, 1998, 263-297
120. E. Obszewska, W. Krorzczynski, B. Lopuszynska, *Acta Chromatographica*, **14** 2004, 237-240
121. Y.C. Fiamegos, C.G. Nanos, J. Vervoort, C.D. Stalikas, *J. Chromatogr. A.*, **1041 (1-2)**, 2004, 11-18
122. F. Deng, S.W. Zito, *J. Chromatogr. A.*, **986(1)**, 2003, 121-127
123. <http://preprint.chemweb.com/medichem/0207002>
124. J. Kroholm, P.R. Ruiz, S.P. Porras, K. Hartonen, R. Carabis-Martinez, M. Riekkola, *J. Chromatogr. A.*, **1022**, 2004, 9-16
125. A. Chiriac, M. Albuлесcu, *Seria Monografii de Chimie*, Nr. 25, Tipografia Universităţii de Vest din Timişoara, Timişoara, 1999
126. A. Chiriac, M. Albuлесcu, *Seria Monografii de Chimie*, Nr. 26, Tipografia Universităţii de Vest din Timişoara, Timişoara, 1999
127. R.J. Nijveldt, E. van Nood, D.E.C. van Hoorn, P.G. Boelens, K. van Norren, P.A.M. van Leeuwen, *Am. J. Clin. Nutr.*, **74**, 2001, 418-425
128. B. Yang, A. Kotani, K. Aral, F. Kusu, *Analytical Sciences*, **17**, 2001, 599-604
129. R. Segal, A. Popa, C. Craiu, *Analele Universităţii Aurel Vlaicu, Arad*, 2000, 11-16
130. I.F.F. Benzie, J.J. Strain, *Anal. Biochem.*, **239**, 1996, 70-76
131. K. Kranl, K. Schlesier, R. Bitsch, H. Hermann, M. Rohe, V. Böhn, *Food Chemistry*, **93**, 2005, 171-175
132. I.F.F. Benzie, Y.T. Szeto, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1999, 633-686
133. E. Stefanovitz-Banyai et al., *Acta Biologica Szegediensis*, **47 (1-4)**, 2003, 111-113
134. B. Ou, D. Huang, M. Hanpsh-Woodill, J.A. Flanagan, E.K. Deemer, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2002, 3122-3128
135. M.I. Gill, F.A. Tomas-Baeberan, B. Hess-Pierse, D.M. Holcroft, A.A. Kader, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 2000, 4581-4589
136. R. Pulido, L. Bravo, F. Saura-Calixto, *J. Agric. Food Chem.*, **48(8)**, 2000, 3396-3402
137. V. Katalinic, M. Milos, T. Kulisic, M. Jukic, *Food Chemistry*, **94**, 2006, 550-557
138. L. Pârvulescu, *Estimarea calităţii sucurilor de fructe cu ajutorul analizoarelor automate*, Editura Orizonturi Universitare, Timişoara, 2003
139. N. Pellegrini, M. Serafini, B. Colombi, D. Del Rio, S. Salvatore, M. Bianchi, F. Brighenti, *American Society for Nutritional Sciences*, 2003, 2812-2819
140. L.M., Goh, P.J., Barlow, *Food Research International*, **35(9)**, 2002, 815-820
141. G. Shui, L.P. Leong, *J. Chromatogr. A.*, **1022**, 2004, 67-75

142. J.W.Lee, Y. J. Kim, H. J. Lee, C. Y. Lee, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 2003, 7292-7295
143. M.M.J.T.J.Arts et al, *Food Chemistry*, **80**, 2003, 409-411
144. P. Molyneux, Songlanakarín *J. Sci. Technol.*, **26(2)**, 2004, 211-219
145. M.S. Blois, *Nature*, **181**, 1958, 1199-1200
146. L.R.Fukumoto, G.Mazza, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 2000, 3597-3604
147. P. Siddhuraju, P.S. Mohan, K. Becker, *Food Chemistry*, **79**, 2002, 61-67
148. M. E. Wojtaszek, Z. Kruczynski, J. Kasprzak, *Food Chemistry*, **79**, 2002, 79-84
149. L. Heilerova, M.Buckowa, P. Tarapcik, S. Silhat,, J. Labuda, *Czech. J. Food Sci.*, **21(2)**, 2003, 78-84
150. Qian et al., *J. Zhejiang Univ. SCI*, **5(6)**, 2005, 376-683
151. T. Nagai, R. Inoue, H. Inoue, N. Suzuki, *Food Chemistry*, **80**, 2003, 29-33
152. Subhadhirasakul, et al, *Sonklankarin J. Sci Technol.*, **25 (3)**, 2003, 351-357
153. M.Ricardo et al., *Arhivoc*, (**VI**), 2004, 127-136
154. N. Erdemoglu, N.N. Turran, I. Cakici, B. Sener, A. Aydm, *Phytother. Res.*, **20**, 2006, 9-13
155. L.L. Mensor, F.S. Menezes, Gilda G. Leitao, A. S. Reis, T.C. dos Santos, C.S. Coube, S.G. Leitao, *Phytother. Res.*, **15**, 2001, 127-130
156. G. Miliauskas, P.R. Venskutonis, T.A. van Beek, *Food Chemistry*, **85(2)**, 2004, 231-237
157. A. Meda, C.E. Lamien, M. Romito, J. millogo, D.B. Nacoulma, *Food Chemistry*, **91**, 2005, 571-577
158. N. Turkmen, F. Sari, Y.S. Velioglu, *Food Chemistry*, **93**, 2005, 713-718
159. C. H. Jung, H-M Seog, I-W Choi, H-Y. Cho, *Food Chemistry*, **92**, 2005, 713-718
160. A.K. Atou et al., *Food Chemistry*, **89(1)**, 2005, 37-36
161. P.Apati et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32**, 2003, 1045-1053
162. H.Linderberg, Madsen, C.Moller Andersen, L.V.Jorgensen, L.H. Skibsted, *Eur. Food. Res. Technol.*, **211**, 2000, 240-246
163. D.Bandoniene, M.Murkovic, *J.Biochem. Biophys. Methods*, **53(1-3)**, 2002, 45-49
164. S.R. Georgetti, R. Casagrande, V.M. Di Mambro, A.ECS. Azzolini, M.J.V. Fonseca, *AAPS PharmSci* 2003; **5(2)**, article 20 (<http://www.pharmsci.org>)
165. M.J. Novas, A.M. Jimenez, A.G. Asuero, *Journal of Analytical Chemistry*, **59** (1), 2004, 75-76
166. C. Nichita, M. Giurginca, A. Meghea, *Rev. Chim. (București)*, **56**, Nr.6., 2005, 621-623
167. C. Nichita, *Rev. Chim. (București)*, **56**, Nr.8., 2005, 821-824
168. A. Meghea, N.Iftimie, M. Giurginca, , *Rev. Chim. (București)*, **55**, Nr.12, 2004, 1024-1028
169. Z. Yaping, Y. Wenli, W. Dapu, L.Xiaofeng, H. Tianxi, *Food Chemistry*, **80**, 2003, 115-118
170. C. Hainhong, D. Junwei, X. Yuang, H. Yanwei, T. Yifeng, <http://chemistrymag.org/cji/2004/06c095ne.html>

171. D. Huang, B.Ou, R.L. Prior, *J. Agric. Food. Chem.*, **53**, 2005, 1841-1856
172. O. Zaporozhetis et al, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 2004, 21-25
173. A. Yildirin, M. Oktay, V.Bilalogu, *Turk. J. Med. Sci.*, **31**, 2001, 23-37
174. V.L.A.G. Lima et al, *Rev. Nutr. Campina*, **17(1)**, 2004, 53-57
175. I. Gulcin, M.T. Uguz, M. Oktay, S. Beydemir, O.I. Kufrevioglu, *Turk. J. Agric. For.*, **28**, 2004, 25-33
176. A. Gadov, E. Joubert, C.F. Hanamann, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1997, 632-638
177. M.J. Kahkonen et al., *J.Agric. Food Chem.*, **47**, 1999, 3954-3962
178. M.Watanabe, Y. Ohshita, T. Tsushida, *J.Agric. Food Chem.*, **45**, 1997, 1039-1044
179. M. Škerget, P. Kotnik, M.Hadolin, A.R. Hraš, M. Simonič, Ž. Knez, *Food Chem.* **48**, 2000, 191-198
180. M.Toti, M. Piattelli, M. Baratta, G. Ruberto, *J.Agric. Food Chem.*, **44**, 1996, 497-501
181. K.K. Adom, R.H. Liu, *J.Agric. Food Chem.*, **50**, 2002, 6182-6187
182. L. Magnani, E. M. Gaydou, J. C. Hubaund, *Analytica Chimica Acta*, **411**, 2000, 209-216
183. K.Raj Narayana, M. Sripal Redaly, M.R. Chaluvadi, D.R. Krishna, *Indian Journal of Pharmacology*, **33**, 2001, 2-16
184. B.H.Havsteen, *Pharmacology & Therapeutics*, **96**, 2002, 67-202
185. M.T. Gatto et. Al, *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 2002, 269-272
186. L.A. Sesink et al, *J. Nutr.*, **133**, 2003, 773-776
187. M.M. Cowan, *Clinical Microbiology Reviews*, **12(4)**, 1999, 564-582
188. N.D. Martini, D.R. Katerere, J.N. Eloff, *J. Ethnopharmacol.* **93(2-3)**, 2004, 207-212
189. www.friedli.com/herbs/phytochem/flavonoids.html.info
190. Y. Leung, I.Albert, S. Foster, *Encyclopedia of common natural ingredients*, A Willey Interscience Publication, New York, 1996
191. <http://www.bodywise.org/ingredients/quercetin.html>
192. J.C. Onyilagha, E. Grotewold, *Recent. Res. Devel.Plant. Sci.*, **2**, 2004
193. Q.Yu, X.K. Chen, Z.M. Luo, C. Yang, H.K. Mai, *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*, **24(8)**, 2004, 991-994
194. C. D. Nenişescu, *Chimie Organică*, Editura Didactică și Pedagogică, Bucureşti, 1980
195. www.chemsrvO.pph.inivie.ac.at/ska/ziplant.html
196. <http://www.crfq.org/pubs/ff/jiujube.html>
197. [www.civil.soton.ac.uk/icuc/cd icuc ber tamarid/content/ber/ber book.html](http://www.civil.soton.ac.uk/icuc/cd%20icuc%20ber%20tamarid/content/ber/ber_book.html)
198. F. Crăciun, O. Bojor, M. Alexa, *Farmaciaz naturii*, vol.I, Editura Ceres, Bucureşti, 1976, p.287
199. Morton, J. *Indian Jujube*, p 272-275, www.hort.prdue.edu/newcrop/morton/indian-jujube.html
200. Cheng G., Bai Yanjing și alții, *Tetrahedron*, **56** (45), 2000, 8915-8920
201. H. L. Meiselman, B.L. Halpern, G.P., Dateo, *Physiology and Behavior*, **17**, 1976, 313-317
202. L.M. Kennedy, *Physiology and Behavior*, **24**, 1980, 135-143

203. Y. Kurikara et al, *Tetrahedron*, **44**(1), 1998, 61-66
204. R. Suttstri, I. S., Lee, A.D. Kinghorn, *Journal of Ethnopharmacology*, **47**,1995, 9-26
205. R. Tschesche, I. Khoklar, H. Wilhelm, G. Eckhardt, *Phytochemistry*, **75**, 1976, 541-542
206. A. Malikaela., *Chem. Nat. Compd*, (Engl. Transl.), **33**, 1997, 2165-3173
207. www.ibiblio.org/ziziphus_jujuba
208. *Wikipedia*, the free encyclopedia, <http://en.wikipedia.org/wiki/hydrangea>
209. [www. Botany. com](http://www.Botany.com)
210. L. Lifan, M. Drăgan, *Hortensiile*, Ed. Ceres, 1985
211. *Enciclopedia Florei și Faunei din România*, [www. Eukarya.ro](http://www.Eukarya.ro)
212. A. Yagi, Y. Ogata, T. Yamauchi, I. Nishioka, *Phytochemistry*, **16**, 1977, 1098-1100
213. R.K. Ibrahim, *Phytochemistry*, **9**, 1970, 1211-1213
214. E. C. Bate-Smith, *Phytochemistry*, **17**, 1978, 267-270
215. J.f. Ma, S. Hiradate, K. Nomto, T. Iwashita, H. Matsumoto, *Plant. Physiol.*, **113**, 1997, 1033-1039
216. B.A. Bohm, K.W. Nicholls, U.G. Bhat, *Biochemical Systematics an Ecology*, **13** (4), 1985, 441-445
217. K. Takeda, T. Yamashita, A. Takhashi, C.F. Timberlake, *Phytochemistry*, **29**(4), 1990, 1089-1091
218. Y. Osawa, M. Koizumi, N. Saito, *Phytochemistry*, **10** , 1971, 1591-1593
219. B. Breuer, T.Stuhfauth, H. Fock, H. Huber, *Phytochemistry*, **26**(5), 1987, 1441-1445
220. N. Murakami, H.M. Mostaqul, S. Tamura, S.Itagaki, T. Horii, M. Kobayashi, *Bioorganic Medicinal Chemistry Lett.*, **11 (18)**, 2001, 2445-2447
221. *Farmacopeea Română*, ediția a-X-a, Editura Medicală, București, 1993
222. A. Hasler, O. Stichler, *J.Chromatogr.*, **508**, 1990, 236-240
223. A. Ardelean, **S. Cacic**, A. X. Lupea, *Studia Universitatis Vasile Goldiș*, Seria Științele Vieții, Vol. **15**, 2005, 55-57
224. **S. Cacic**, A.X. Lupea, A. Ardelean, M.Pop, "Studii preelminare pentru obținerea unor extracte din *Ziziphus jujuba*" , *Studia Universitatis Vasile Goldiș*, Seria Științele Vieții, Vol. **16**, 2006, 83-87
225. **S. Cacic**, F. Radu, A.X. Lupea, I. Ifrim, "Analiza flavonoidelor din *Hydrangea paniculata* și *Ziziphus jujuba* prin flash cromatografie și cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC)", *Rev.Chim.*(București), Nr. **57 (12)**, 2006, 1197-1201
226. C. Georgescu, Teză de doctorat, Universitatea "Babeș-Bolyai", Cluj-Napoca, Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului, Cluj Napoca, 2002
227. T. Ozen, A.K.Ayan, C.Cirak, K.Kevseroglu, *Chem. of Natural Compounds*, **41**, 2, 2005, 232-233

228. P.Markakis, *Antocyanins as Food Colors*, Ed. Academic Press, 1982
229. **S. Cacic**, M.R. Szabo, A.X.Lupea, "Spectrophotometric methods for the study of the antioxidant activity applied on *Ziziphus jujuba* and *Hydrangea paniculata* aqueous extracts", *Zbornik Matice Srpske za prirodne nauke /Proc. Nat. Sci., Matice Srpska*, Novi Sad, **110**, 2006, 87-93, ISSN 0352-4906
230. **S. Cacic**, M.R. Szabo, A.X. Lupea, A. Ardelean, "Determination of the antioxidant activity of *Ziziphus jujuba* and *Hydrangea incognita*", *Studia Universitatis Vasile Goldiș*, Seria Științele Vieții, Vol. **15**, 2005, 69-72
231. A.Prakash, *Analytical Progress*, **19** (2), 2001
232. A.X. Lupea, *Transformări ale biocompușilor procesați în scop alimentar*, Editura CEP USM, Chișinău, 2004
233. N.Y. Yanishlieava, E.M. Marinova, *Eur.Lipid. Sci.Technol.*, **103**, 2001, 752-767
234. S.Naz, R. Siddiqi, H. Sheikh, S.A. Sayeed, *Food Research International*, **38**, 2005, 127-134
235. M. Antolovich, P.D.Prenzler, E.Patsalides, S. McDonald, K.Pobards, *Analyst*, **127**, 2002, 183-188
236. IUPAC Standard Method for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, 7th edition, 1987
237. ***AOAC Official Method 965.33.Peroxid Value of Oils and Fats. Titration Method, 1995
238. A.X. Lupea, **S.Cacic**, M.Pop, F.Radu, Flavone și flavonoli din specii de plante (Angiosperme) și activitatea lor antioxidantă și prooxidantă, *Revista de Chimie*, trimisă la redacție ianuarie 2007.
239. Gh. Constantin, R. Negrea, *Lecții de statistică descriptivă*, Universitatea de Vest Timișoara, 2004
240. T. Todincă, M. Geantă, *Modelarea și simularea proceselor chimice*, Ed. Politehnica, Timișoara, 1999
241. M. Pop, M.Glevitzky, **S. Cacic**, A. X. Lupea, "Studiul proprietăților de inhibare a proceselor oxidative din uleiurile vegetale folosind antioxidanți din familia Rhamnaceae", *Rev. Chim.(București)*, Nr. **57 (11)**, 2006, 1119-1122
242. **S.Cacic**, M. Glevitzky, M. Pop, A.X.Lupea, "Statistical mathematical modeling of sunflower oil oxidation dynamics. The antioxidants addition influence.", *Scientific and Technical Bulletin of "Aurel Vlaicu" University, Series: Chemistry, Food Science of Engineering*, **XII, Vol .11**, 2006, 8-13, ISSN 1582-1021
243. M. Pop, M. Glevitzky, **S. Cacic**, A.X. Lupea, "Modelarea matematică a variației indicelui de peroxid în cazul uleiului de floarea soarelui tratat cu antioxidanți naturali, respective sintetici", *Studia Universitatis Vasile Goldiș*, Seria Științele Vieții, Vol. **16**, 97-102, 2006
244. I. Bogdan, M. Glevitzky, **S.Cacic**, M. Pop, A.X. Lupea, " Aspecte privind influența antioxidanților naturali și sintetici asupra gradului de oxidare al uleiului de măsline", *Studia Universitatis Vasile Goldiș*, Seria Științele Vieții, Vol. **16**, 103-106, 2006

245. M. Glevitzky, M.Pop, **S.Cacig**, D. Silaghi-Perju, "Models based on experimental data of oil stability and antioxidants influence", MicroCAD 2007- Internațional Scientific Conference, University of Miskolc, Hungary, 22-23 March 2007
246. M.G.L.Hertog, PCH Hollman, D.P.Venema, *J.Agric. Food Chem.*, **40**, 1992, 1591-1598
247. M. E.J. Lean, M. Norrozi, I.Kelly, J.Burns, D.Talwar, N. Sattar, *Diabetes*, **48**, 1999, 176-181
248. M. Noroozi, W.J.Angerson, M.E.J. Lean, *Am. J. Clin. Nutr.*, **67**,1998, 1210-1218
249. A. R.,Collins, V.,Harrington, J., Drew, R., Melvin, *Carcinogenesis*, **24** (3), 2003, 511-515
250. P. R. Heaton, R.Ransley, C.J.Charlton, S.J.Mann, J. Stevenson, B.H.E.Smith, J.M. Rawlings, E.J. Harper, *J. Nutr.*, **132**, 2002, 1598S-1603S
251. **S.Cacig**, F.Radu, A.X. Lupea, "Comparative studies concerning the antioxidant activity of flavonoids from *Hydrangea paniculata* and *Ziziphus jujuba*, *Revue Roumaine de Biochimie*, trimisă spre publicare.
252. M. Medeleanu, **S.Cacig**, A.X. Lupea, D.Condrat, "Investigarea activității antioxidante a unei serii de flavonoide prin metode computaționale", *Zilele Academice Arădene*, ediția a XVI- a, Arad, 12-14 mai 2006
253. R.Olinescu, *Peroxidarea în chimie, biologie și medicină*, Editura Științifică și Enciclopedică, București, 1982
254. E., Beutler, *Red Cell Metabolism*, Ed. Grune & Stratton, New York, 1981, p 69-89
255. I.Chișu, L.Olariu, C.Tulcan, *Analize de Biochimie Veterinară*, Editura Marineasa, Timișoara, 2005
256. M. Willard, A. Tvedten, *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, Washington, 1982, 216-219
257. **S. Cacig**, L. Olariu, A.X. Lupea, C. Tulcan, M. Petcu, L. Cărpinișan, D. Arherie, "The effect of *Ziziphus jujuba* extract on the enzyme's activity in rats", *Veterinary Clinical Pathology* , trimisă spre publicare (înregistrată cu numărul #07-923)
258. S. Ghergariu, A. Kadar, M. Spinu, *Manual de laborator clinic*, Editura All Medica, București, 2000, p 265-270
259. G. Pârvu, *Supravegherea nutrițională metabolică a animalelor*, Ed. Ceres, București, 2000
260. M. Willard, A.Tvedten, *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, Washington, 1980, pg. 216-219
261. E. Merică, *Tehnologia produselor cosmetice*, vol I, Editura Corson, Iași, 2000
262. **S. Cacig**, A.X. Lupea, A. Ardelean, F. Radu, "Obținerea și testarea unor formulări farmaceutice pe bază de extract de *Ziziphus jujuba*", *Studia Universitatis Vasile Goldiș*, Seria Științele Vieții, Vol. **16**, 89-91, 2006
263. P.F. Surai, J.E. Dvorska, *Feed. Mix*, **9**, 2001, 8-10

264. P.F. Surai, R.C. Noble, B.K. Speake, *Brit. Poultry Sci.*, **40**, 1999, 406-410
265. E. Crăiceanu, M. Matiuți, *Nutriție generală. Alimentația erbivorelor*, Editura Brumar, Timișoara, 2002
266. M. Matiuți, "Utilizarea unor surse minerale neconvenționale în hrana găinilor", Teză de doctorat, USAB Timișoara, Facultatea de Medicină Veterinară, 1998
267. G. Burlacu, *Metode și tehnici pentru măsurarea valorii nutritive a nutrețurilor*, Ed. Ceres, București, 1991
268. H. Bîrza, J. May, S. Ghergariu, V. Hagi, *Patologie și clinică medicală veterinară*, Ed. Știința, Chișinău, 1992
269. G. Sandu, *Modele experimentale în zootehnie*, Editura Coral Sanvet, București, 1995
270. M. Matiuți, **S. Cacicig**, A.X. Lupea, A. Borozan, "The effect of *Ziziphus jujuba* extract on qualitative and quantitative eggs production", The scientific conference with international Participation, "Durable Agriculture- Agriculture of the future", The second edition, Craiova, 23-24 november 2006, publicație electronică, ISSN 1582-9391

ANEXE

Aparatura utilizată în determinările experimentale:

1. Determinarea conținutului de flavonoide, polifenoli, antocianidine, taninuri din extracte și trasarea curbelor de etalonare pentru standarde s-a realizat pe un spectrofotometru SPECORD M-40, Carl Zeiss Yena;
2. Determinările de spectru infraroșu s-au realizat în fereastră de NaCl în nujol pe un aparat SPECORD M-80, Carl Zeiss Yena;
3. Cromatogramele HPLC s-au realizat cu ajutorul sistemului HPLC Agilent 1100 cu pompa binară și degazor sub vid, detector UV cu lungime de undă variabilă, soft HPChemStation;
4. Electroforeza leucocitelor pretratate în cazul determinării activității antioxidante la nivel celular s-a realizat cu ajutorul unui aparat de electroforeză în gel de agaroză orizontal;
5. Examinarea directă a lamelelor în vederea cuantificării degradării leucocitelor s-a realizat la un microscop cu fluorescență tip Nikon;
6. Determinările parametrilor biochimici și determinarea activității enzimelor oxidoreducătoare s-a realizat pe un spectrofotometru UV-VIS Shimadzu;
7. Determinările modificărilor de organe s-au efectuat cu ajutorul microscopului Olympus CX 41;
8. Determinările microscopice: formula leucocitară s-a realizat cu hemocimetru Bürker- Türk.

Reactivi:

- quercetina, minim 96%, Sigma Aldrich
- quercetin-3 β -D- rutozida (rutina), minim 95%, Sigma Aldrich
- kaemferol, minim 90%, Sigma Aldrich
- miricetina, apox. 85%, Sigma Aldrich
- luteolina, aprox. 85%, reactiv Sigma Aldrich
- catechol, Merck
- acid ascorbic, Merck
- pirogalol, minim 99,5 %, Merck
- DPPH, Sigma Aldrich
- Silicagel 60, Sephadex LH-20, Pharmacia, Suedia
- Alcool etilic, min 94 %, Chimopar
- Alcool metilic, min 94 %, Chimopar
- Eter de petrol, min. 95%, Chimopar
- Eter etilic anhidru, Chimopar
- Cloroform, min 93 %, Chimopar
- Acetat de etil, min 99 %, Chimopar
- Acid acetic glacial, min 96 %, Reactivul București,
- Alcool butilic normal, min 95 % Reactivul București
- Clorură de aluminiu (AlCl₃ · 6 H₂O), min 90 %, Reactivul București
- Clorură ferică (FeCl₃ · 6 H₂O), Fluka Chemie
- Permanganat de potasiu, min 99,5 %, Reachim
- Acid fosforic, min 85%, Merck
- Acetonitril (HPLC), Merck

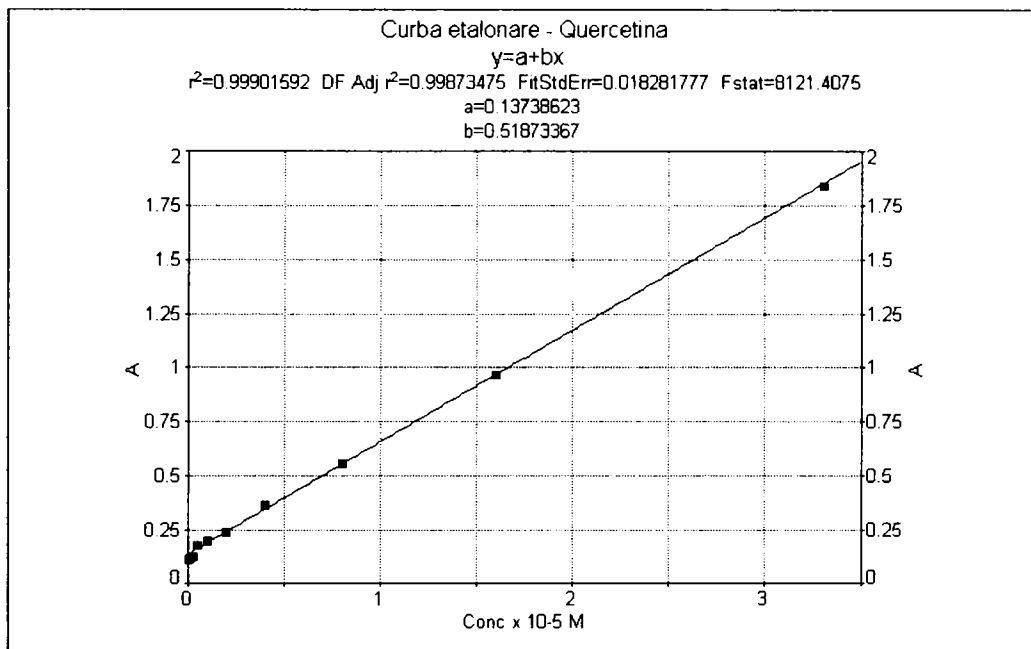
ANEXA 1. Curbele de etalonare pentru standardele de flavonoide

Figura 1.1. Curba etalonare - Quercetină

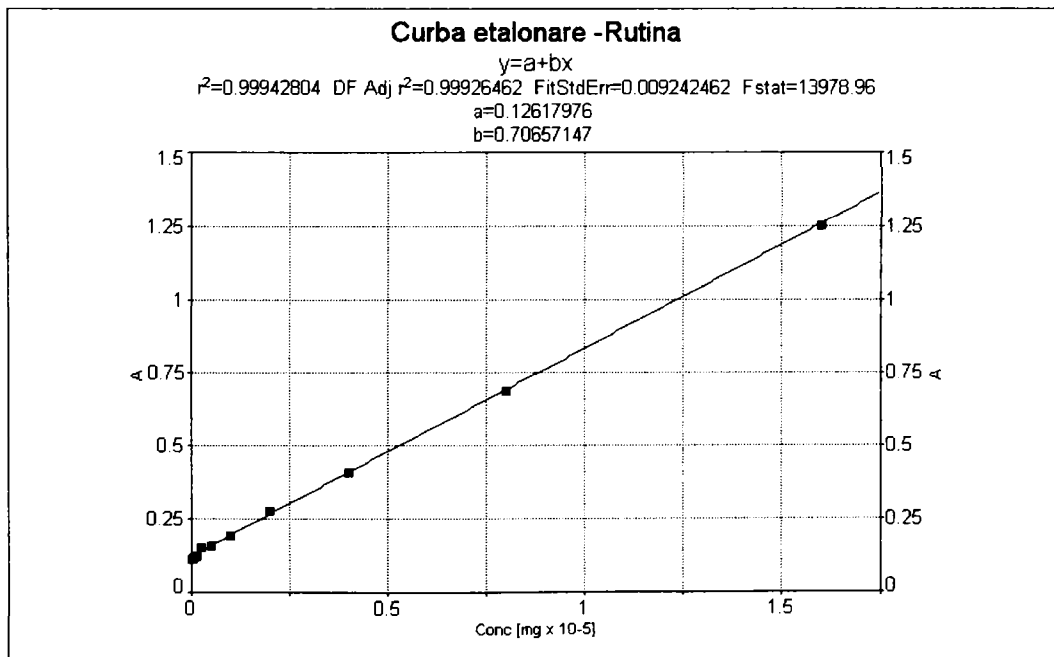


Figura 1.2. Curba etalonare -Rutină

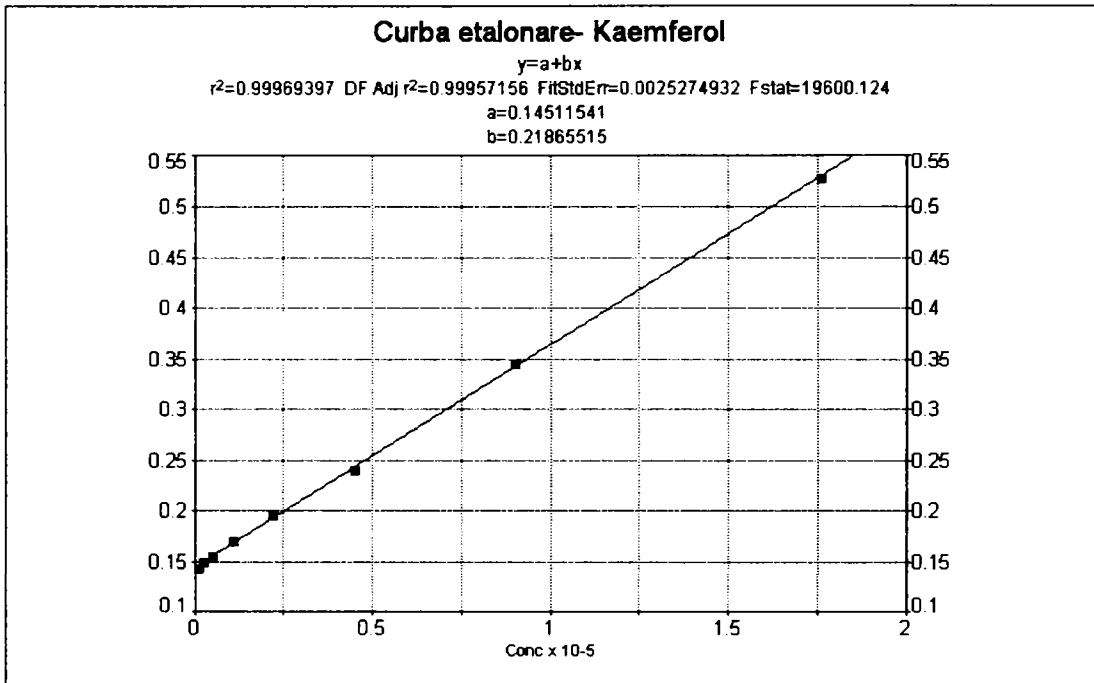


Figura 1.3. Curba etalonare- Kaemferol

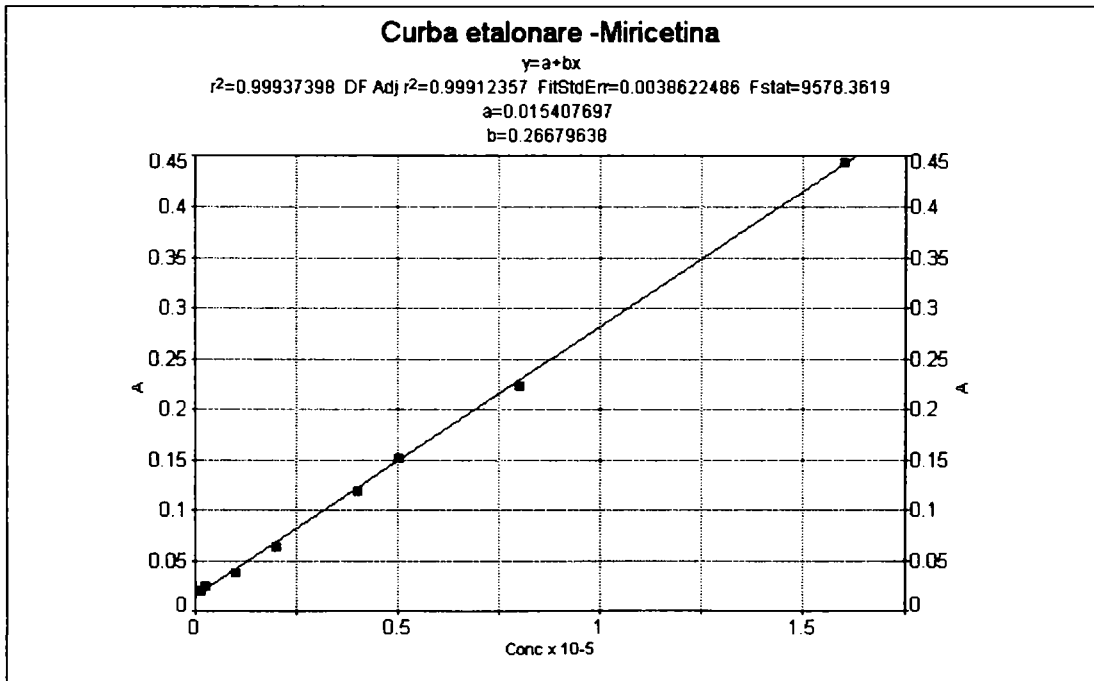


Figura 1.4. Curba etalonare- Miricetina

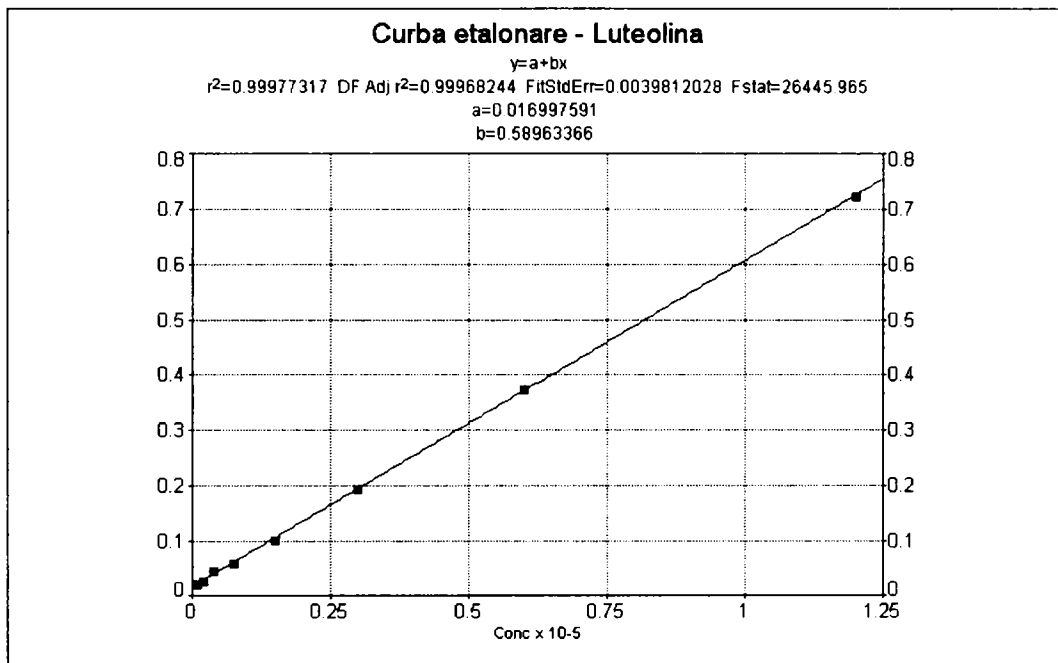


Figura 1.5. Curba etalonare- Luteolina

ANEXA 2. Spectrele IR ale extractelor de *Hydrangea paniculata* și *Ziziphus jujuba*

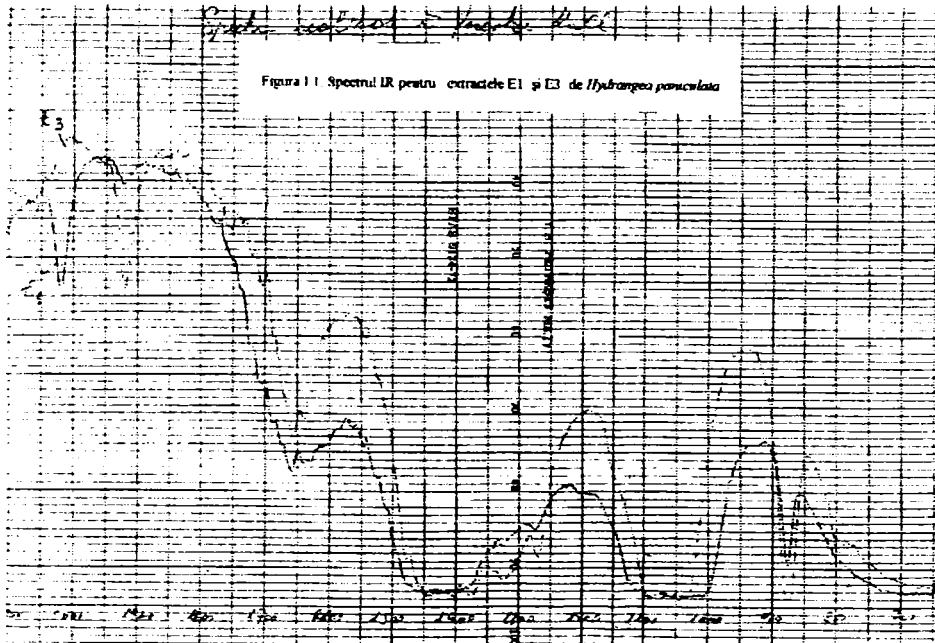


Figura I.1. Spectrul IR pentru extractele E1 și E3 de *Hydrangea paniculata*

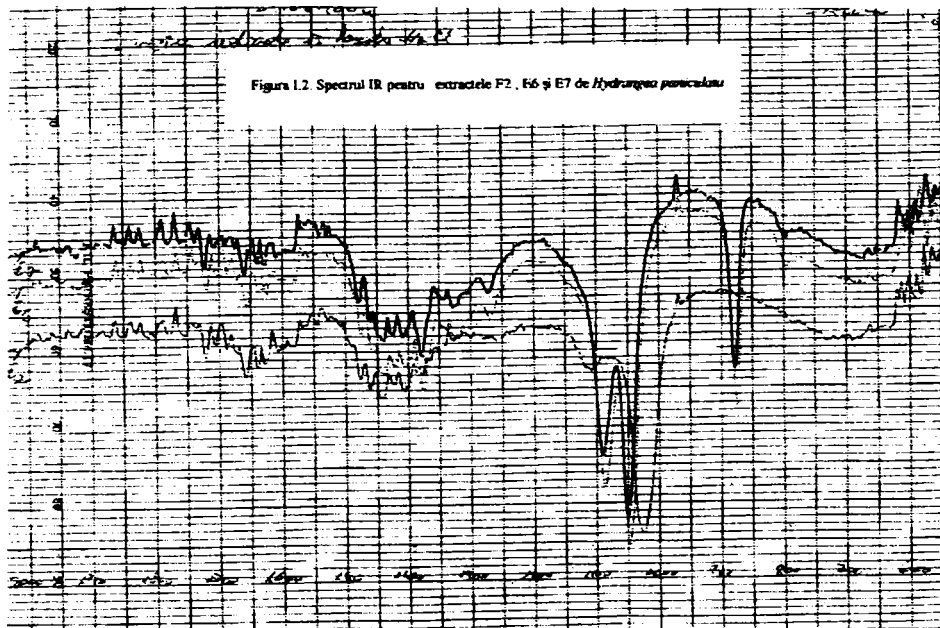


Figura I.2. Spectrul IR pentru extractele E2, E6 și E7 de *Hydrangea paniculata*

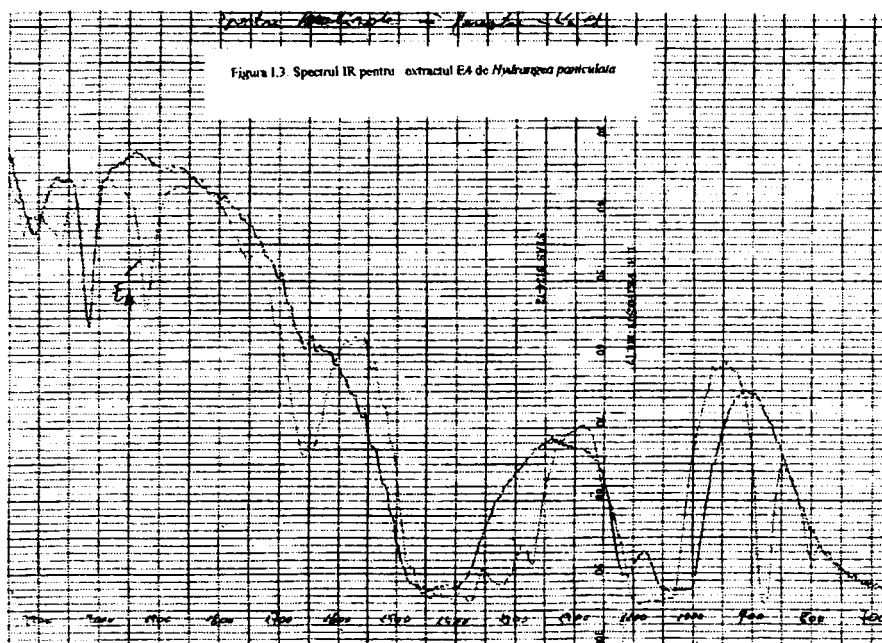


Figura I.3. Spectrul IR pentru extractul E4 de *Hydrangea paniculata*

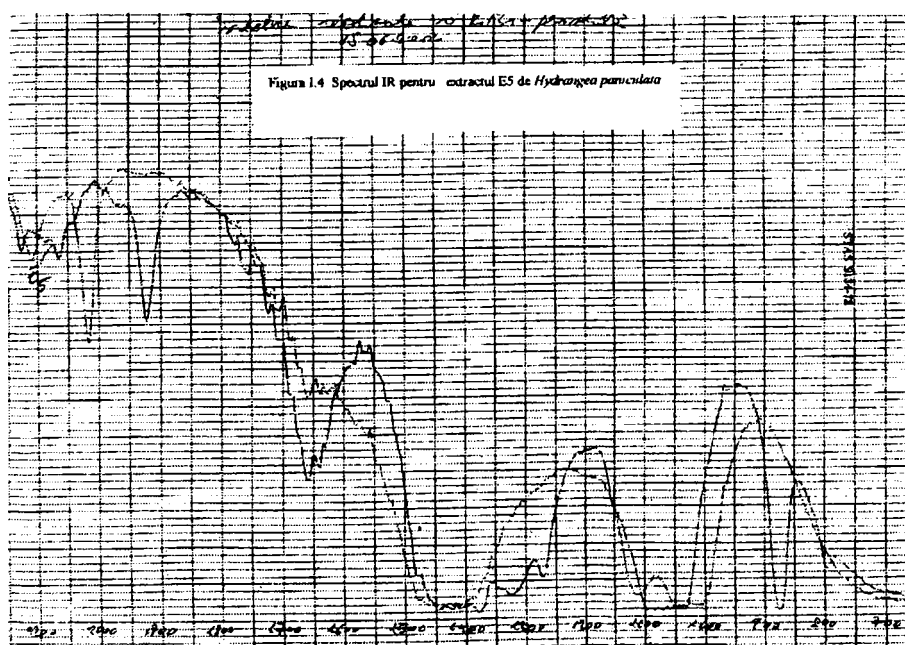


Figura I.4. Spectrul IR pentru extractul E5 de *Hydrangea paniculata*

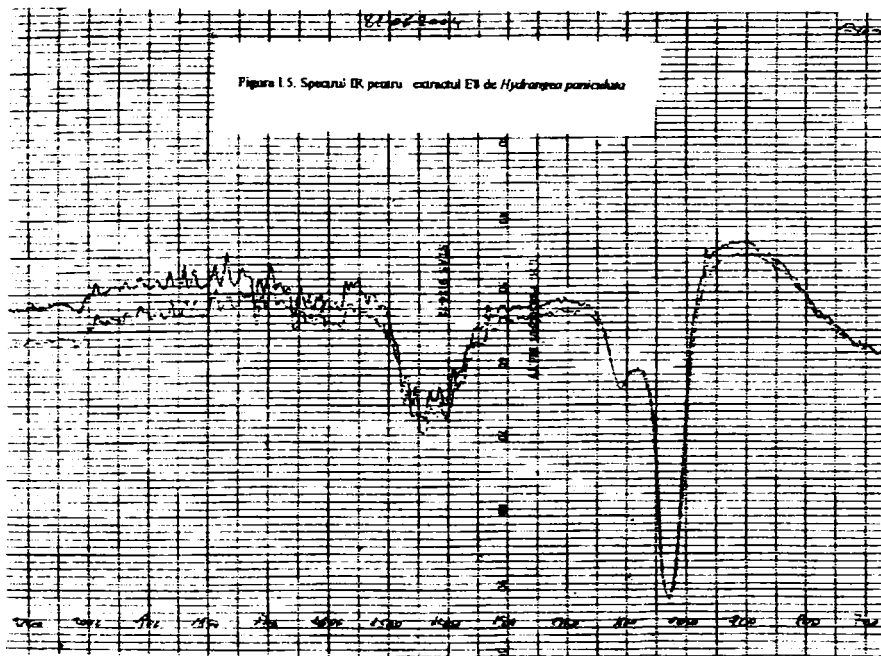


Figura I.5. Spectrul IR pentru extractul E8 de *Hydrangea paniculata*

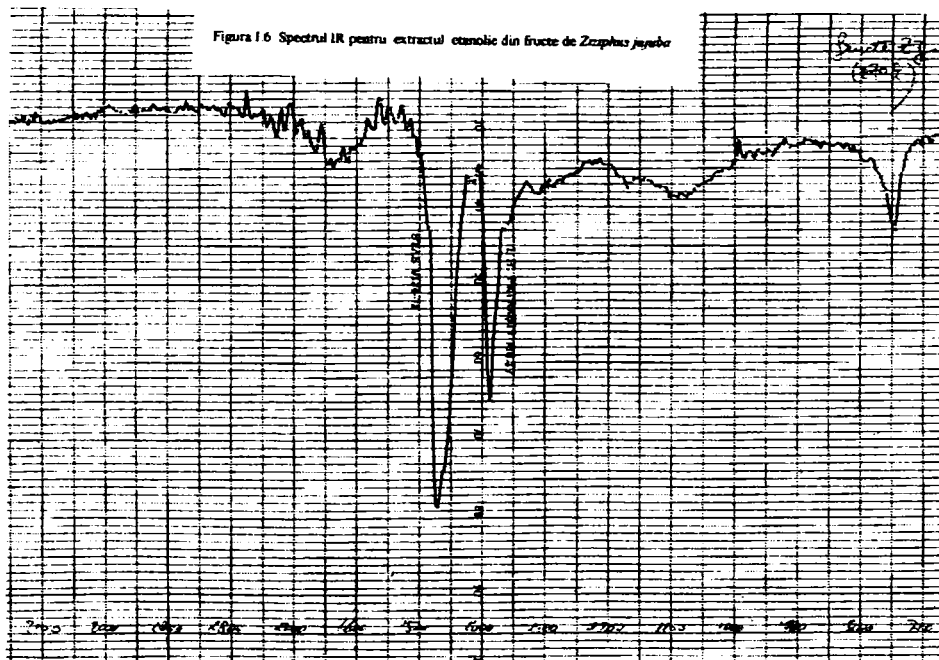


Figura I.6. Spectrul IR pentru extractul etanolic din fructe de *Ziziphus jujuba*

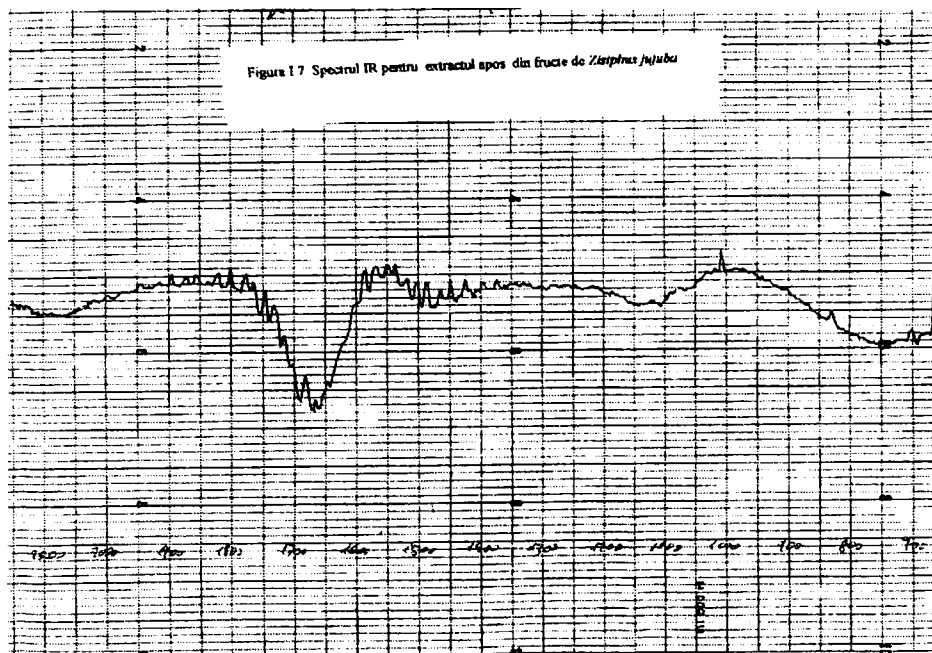


Figura I.7. Spectrul IR pentru extractul apos din fructe de *Ziziphus jujuba*

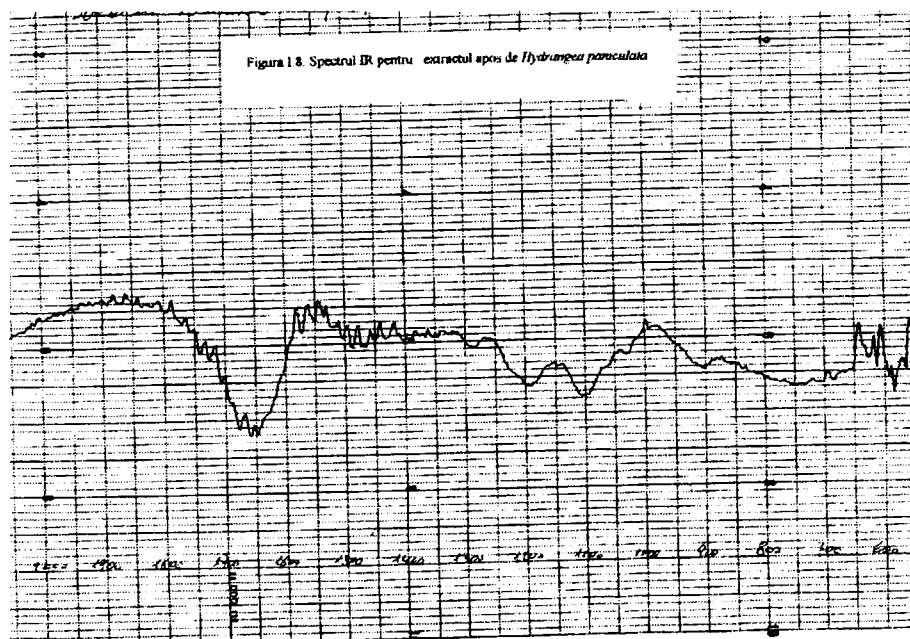
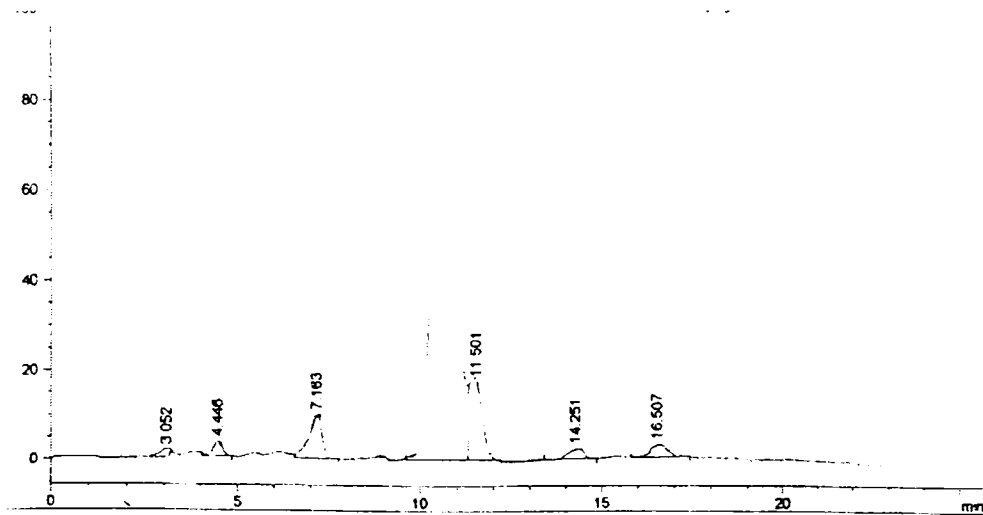
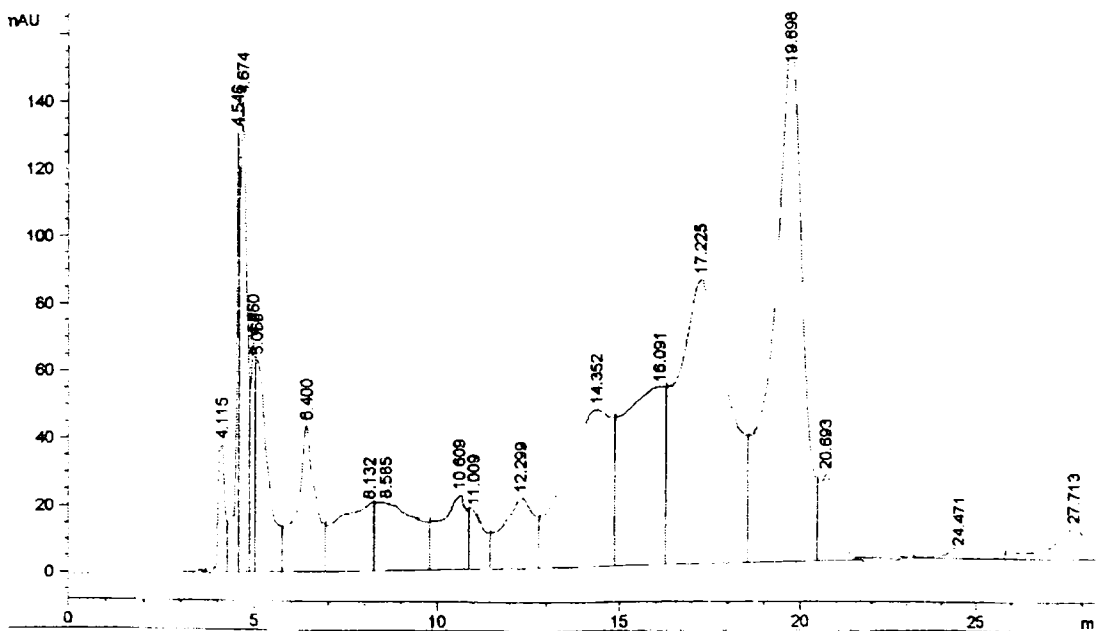


Figura I.8. Spectrul IR pentru extractul apos de *Hydrangea paniculata*

ANEXA 3. Cromatogramele HPLC pentru extractele propriu-zise de *Hydrangea paniculata* și *Ziziphus jujuba*Figura 1A. Cromatograma HPLC a extractului E1 de *Hydrangea paniculata*Figura 2A. Cromatograma HPLC a extractului E2 de *Hydrangea paniculata*

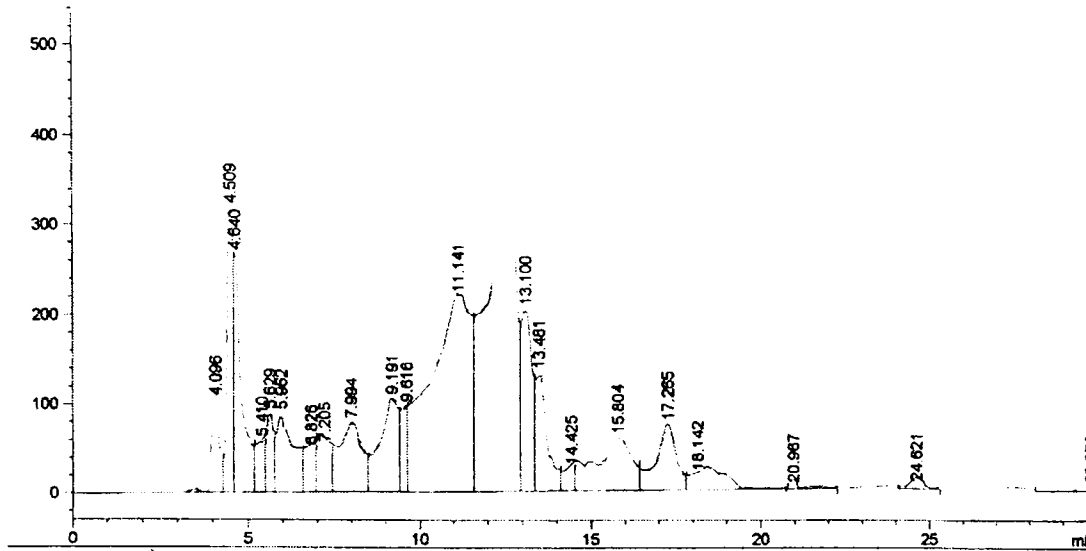


Figura 3A. Cromatograma HPLC a extractului E3 de *Hydrangea paniculata*

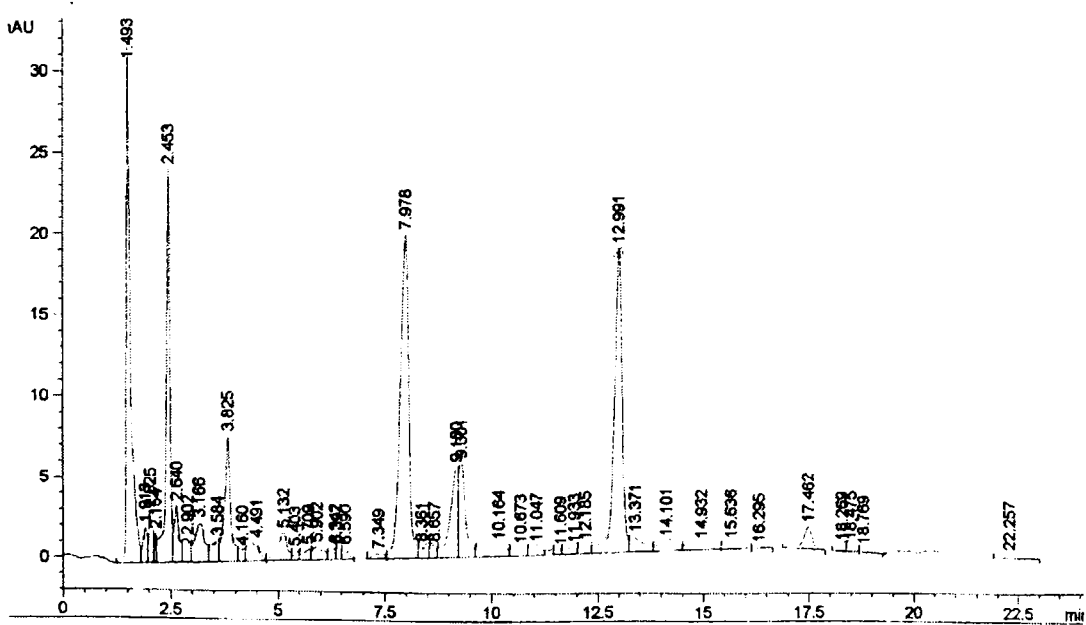


Figura 4A. Cromatograma HPLC a extractului E4 de *Hydrangea paniculata*

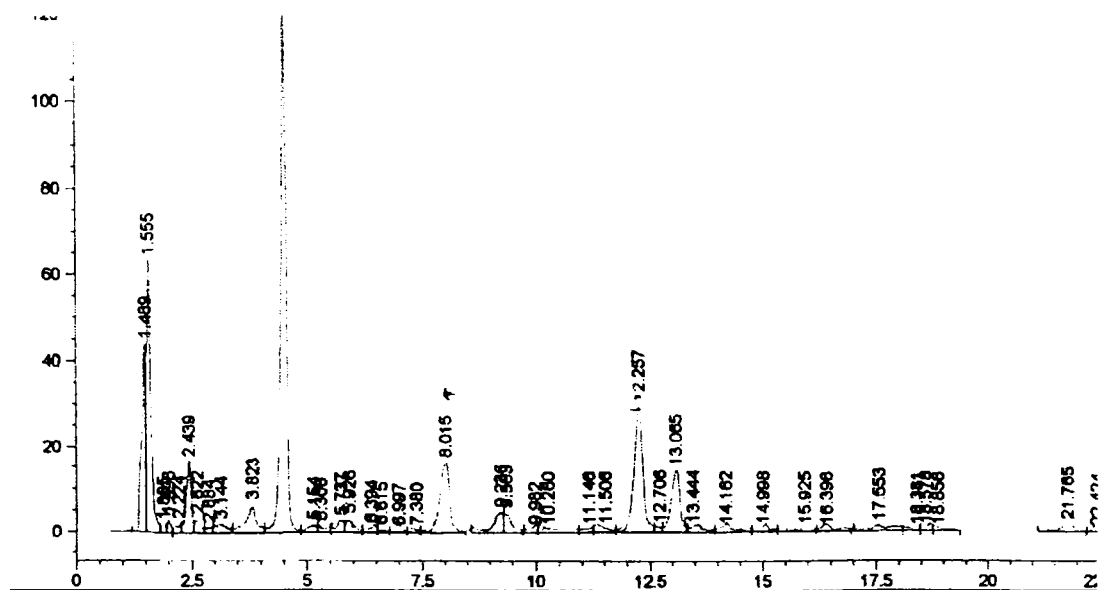


Figura 5A. Cromatograma HPLC a extractului E5 de *Hydrangea paniculata*

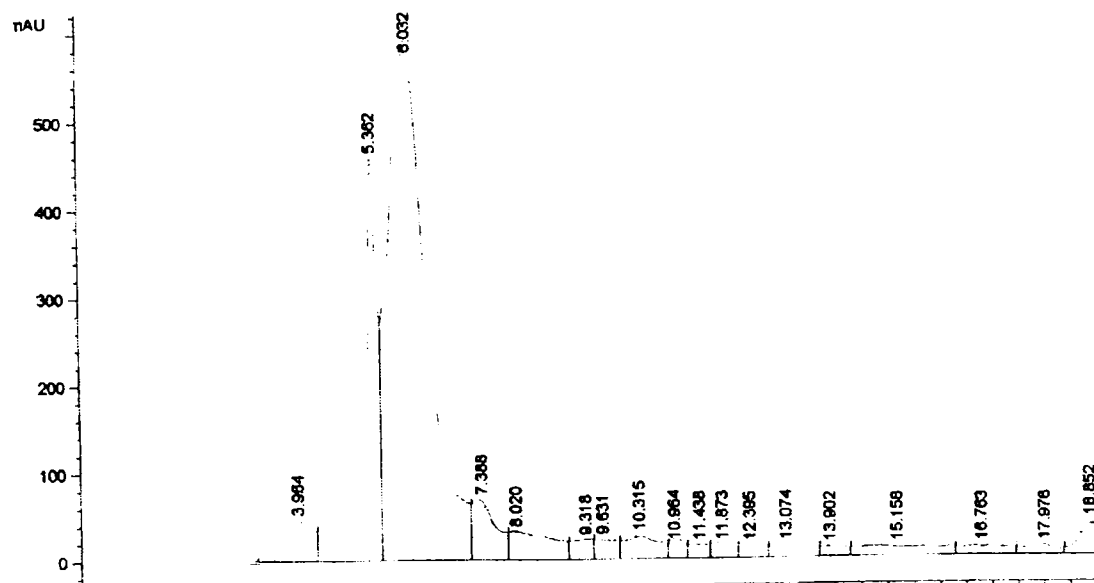


Figura 6A. Cromatograma HPLC a extractului E6 de *Hydrangea paniculata*

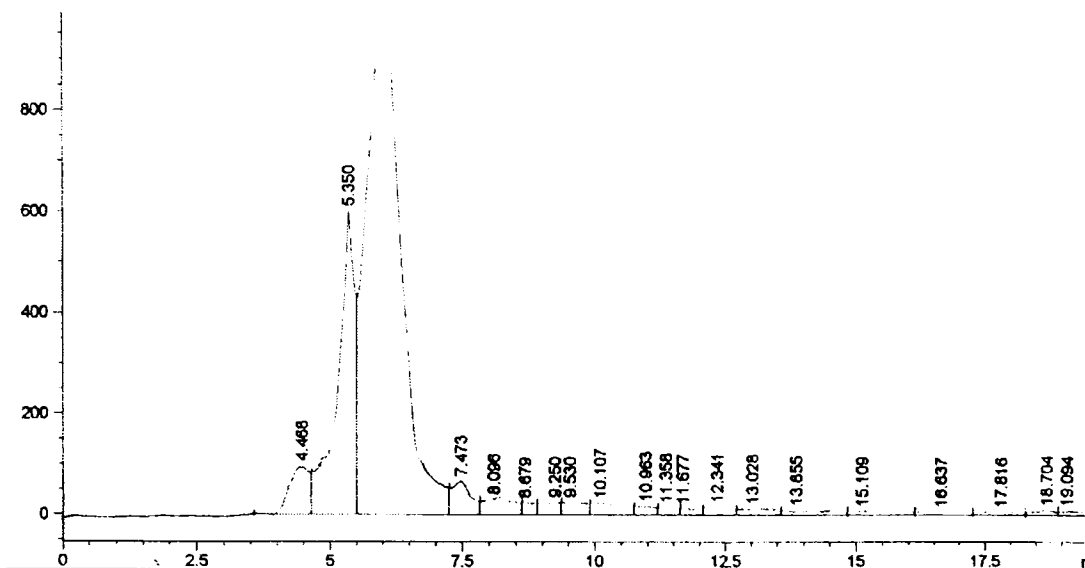


Figura 7A. Cromatograma HPLC a extractului E7 de *Hydrangea paniculata*

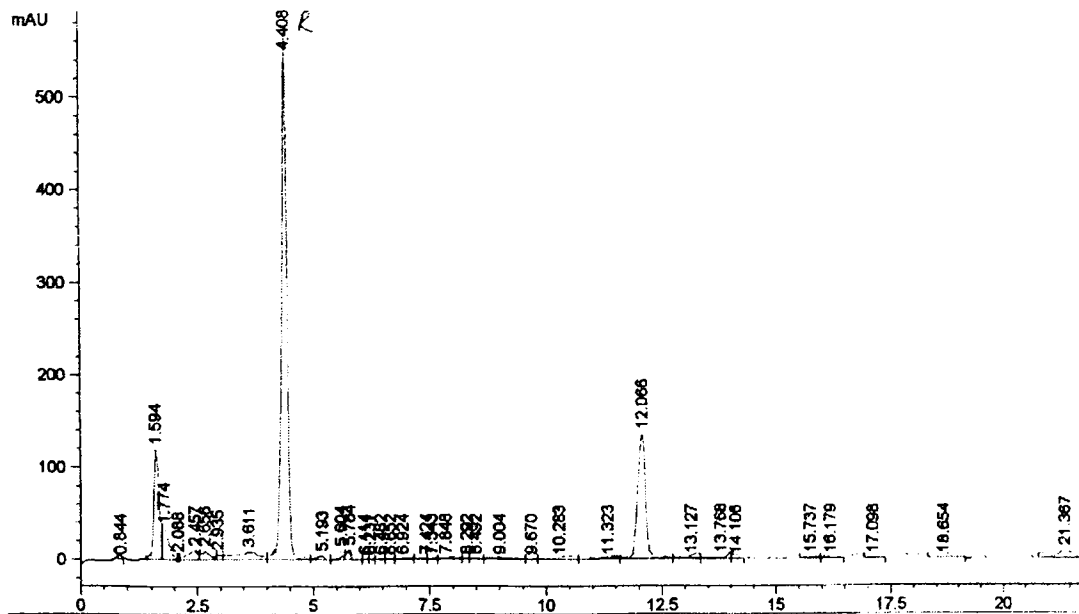


Figura 8A. Cromatograma HPLC a extractului E8 de *Hydrangea paniculata*

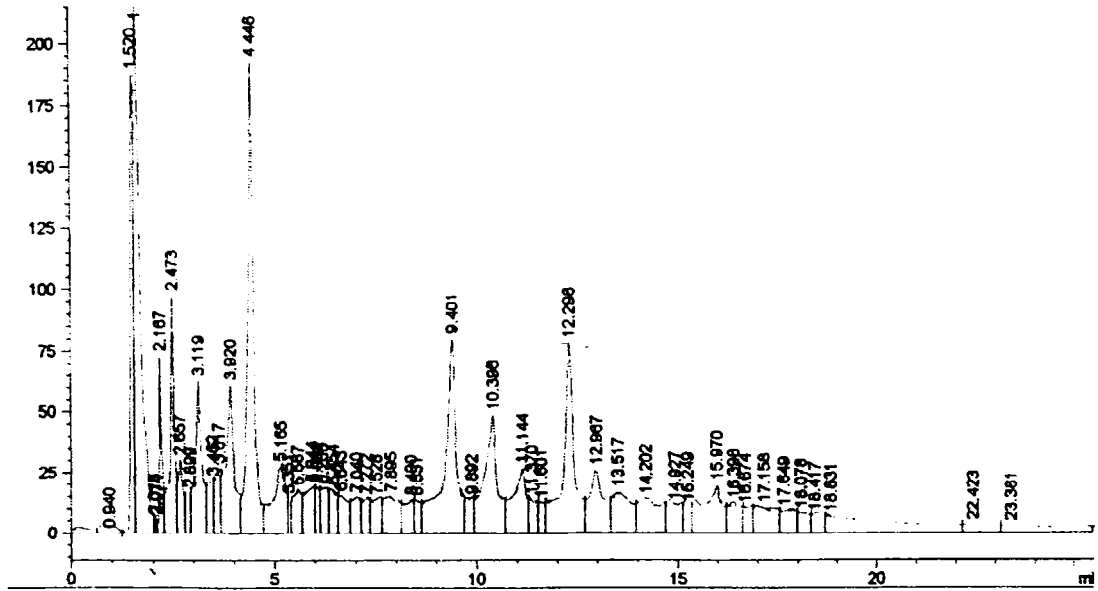


Figura 1B. Cromatograma HPLC a extractului e_1 de *Hydrangea paniculata*

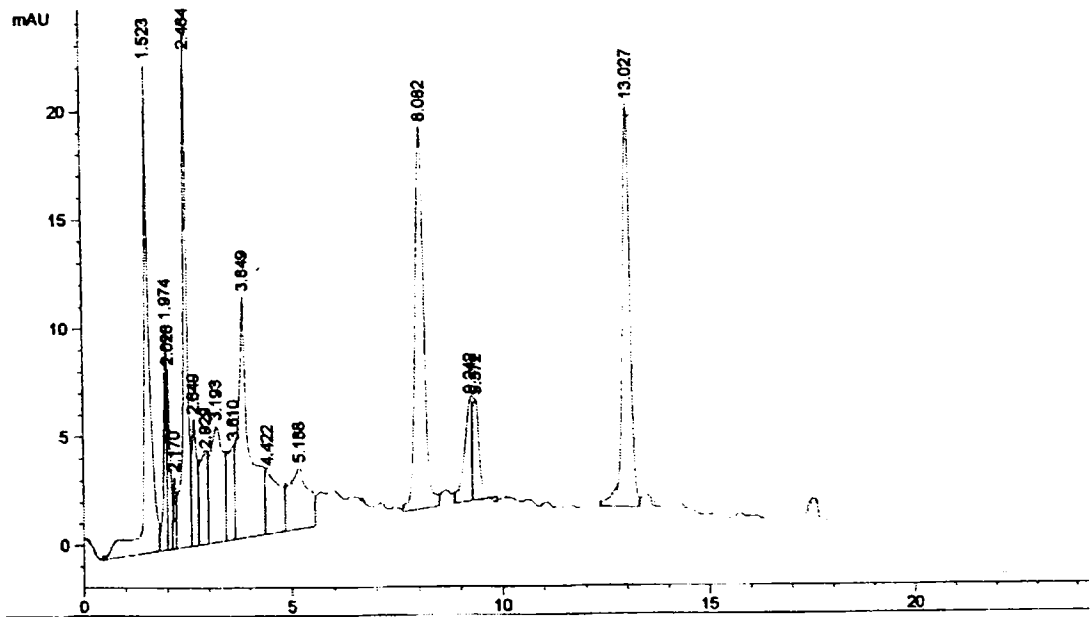


Figura 2B. Cromatograma HPLC a extractului e_2 de *Hydrangea paniculata*

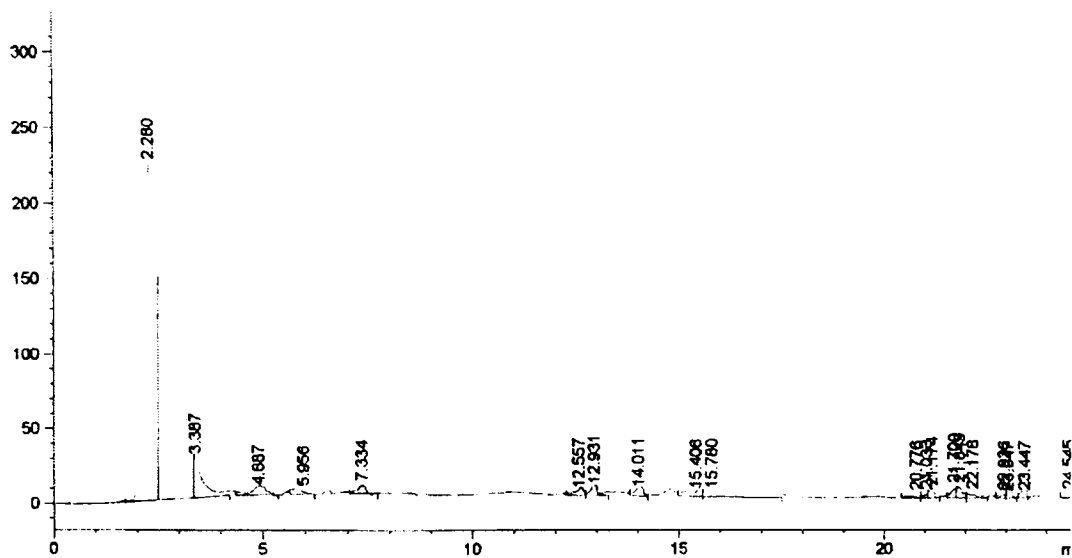


Figura 3B. Cromatograma HPLC a extractului e₃ de *Hydrangea paniculata*

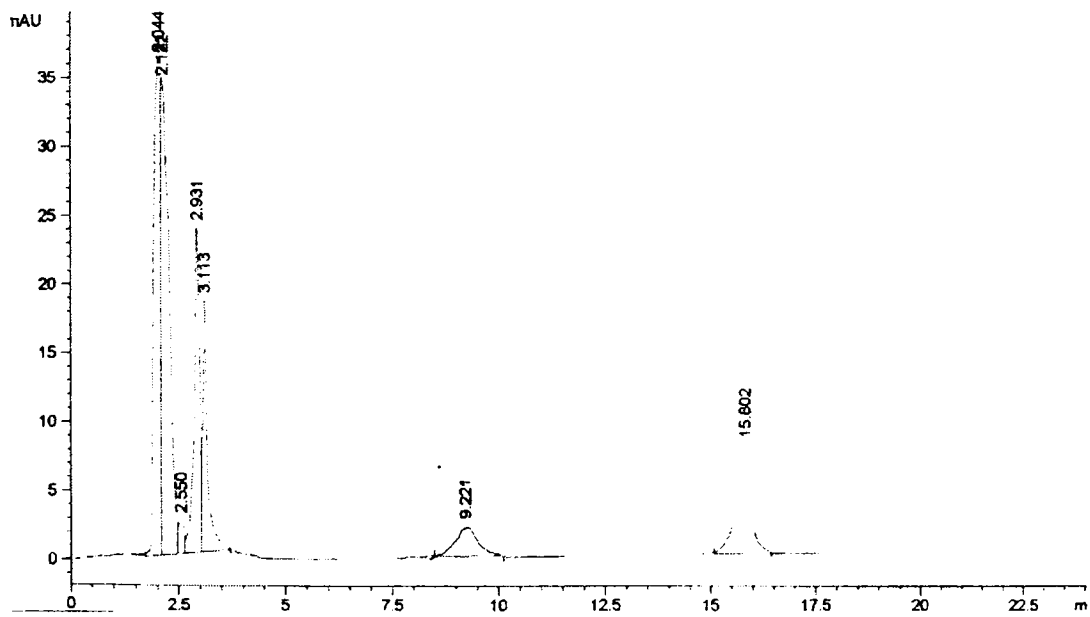


Figura 1C. Cromatograma HPLC a extractului EZ1 de *Ziziphus jujuba*

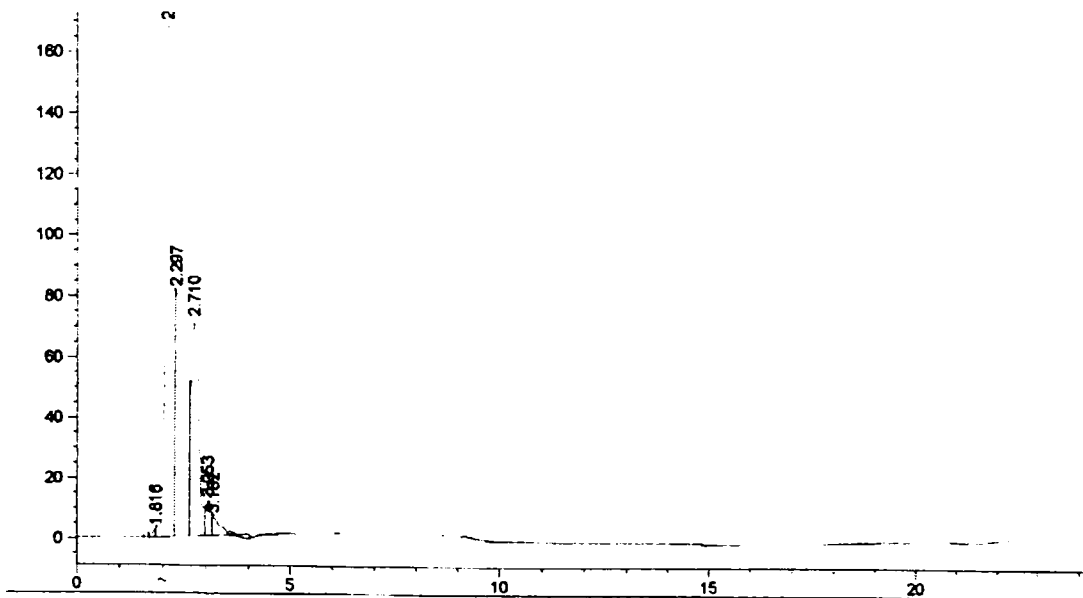
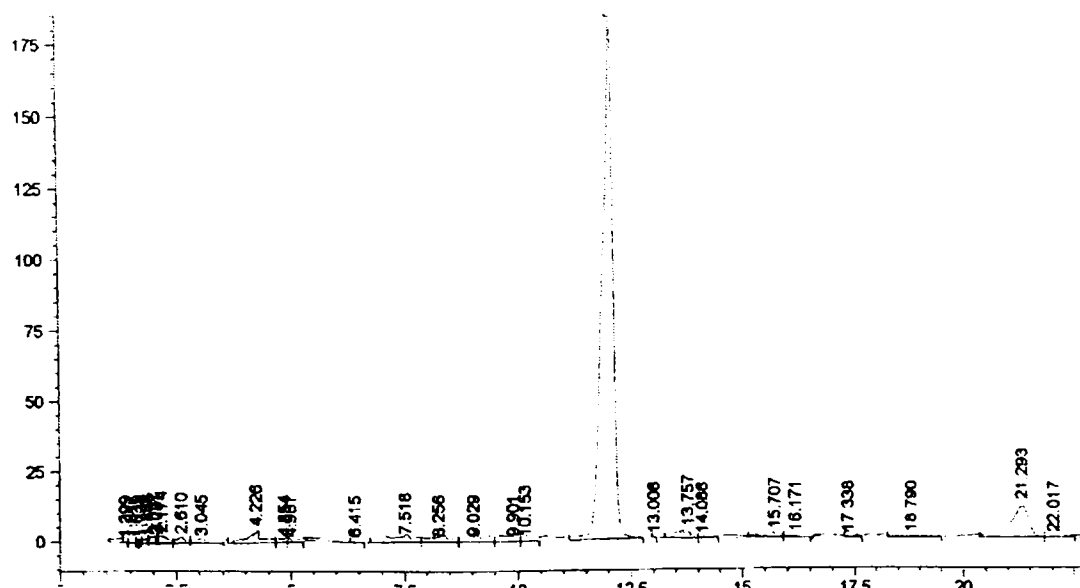
Figura 2C. Cromatograma HPLC a extractului EZ2 de *Ziziphus jujuba*

Figura S1. Cromatograma HPLC a quercetinei

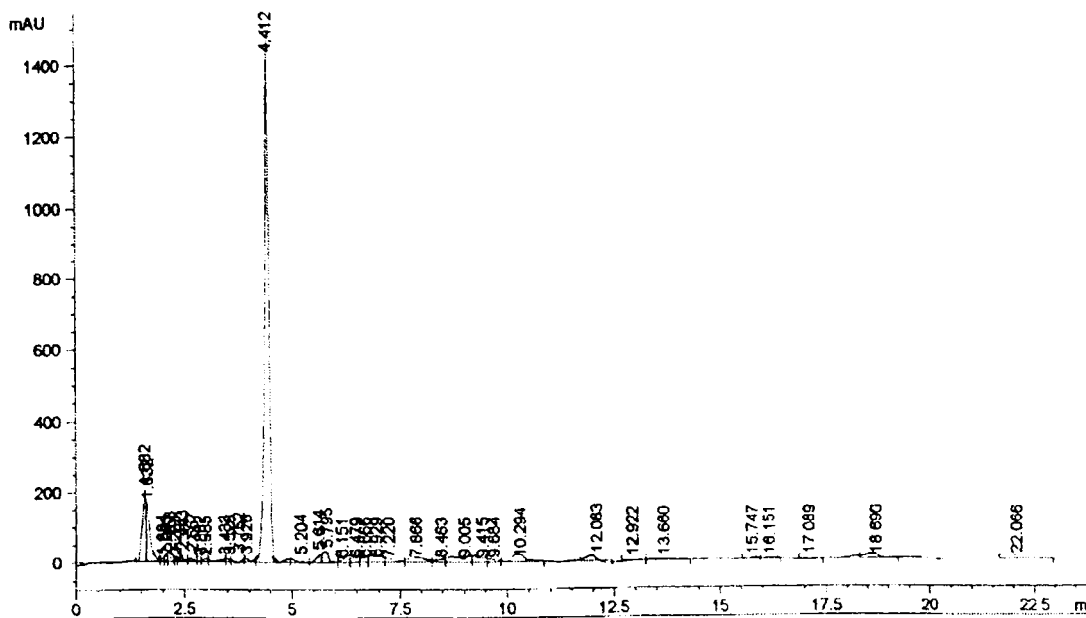


Figura S2. Cromatograma HPLC a rutinei

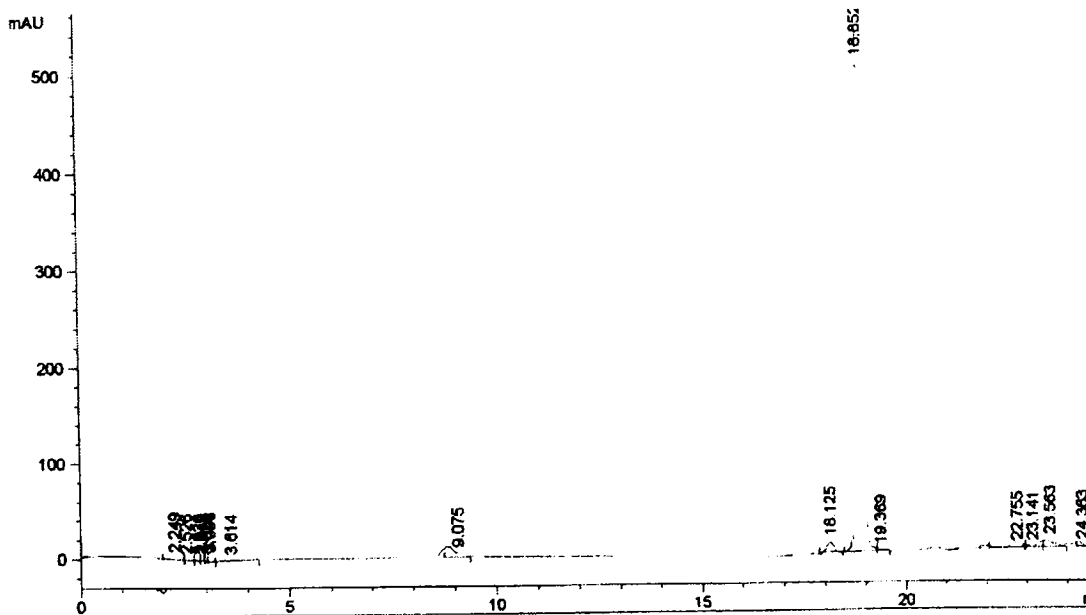


Figura S3. Cromatograma HPLC a kaempferolului

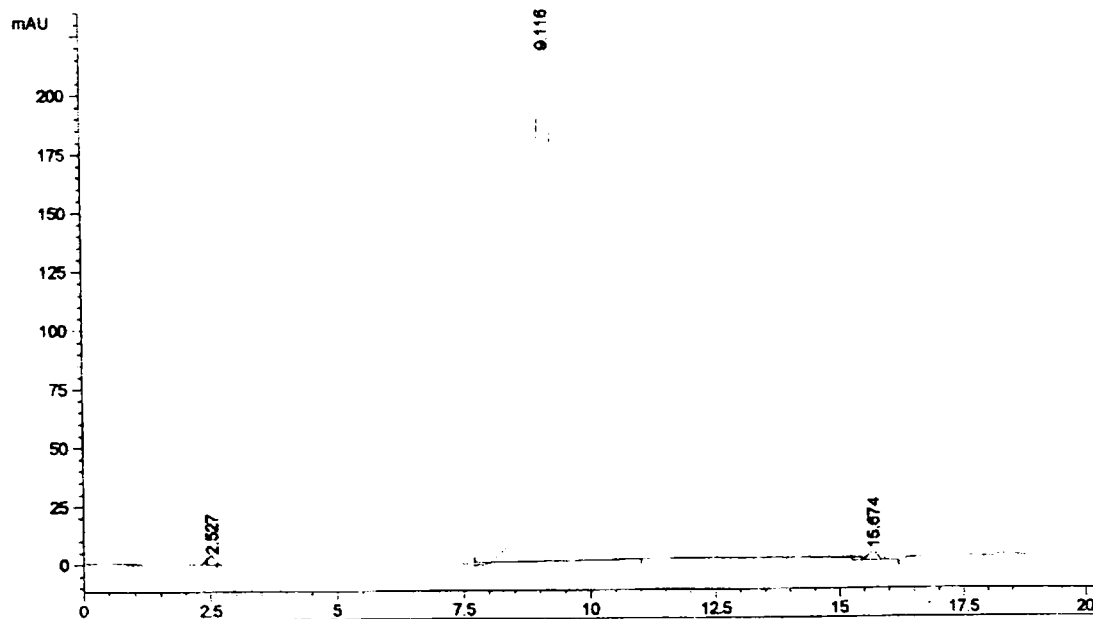


Figura S4. Cromatograma HPLC a miricetinei

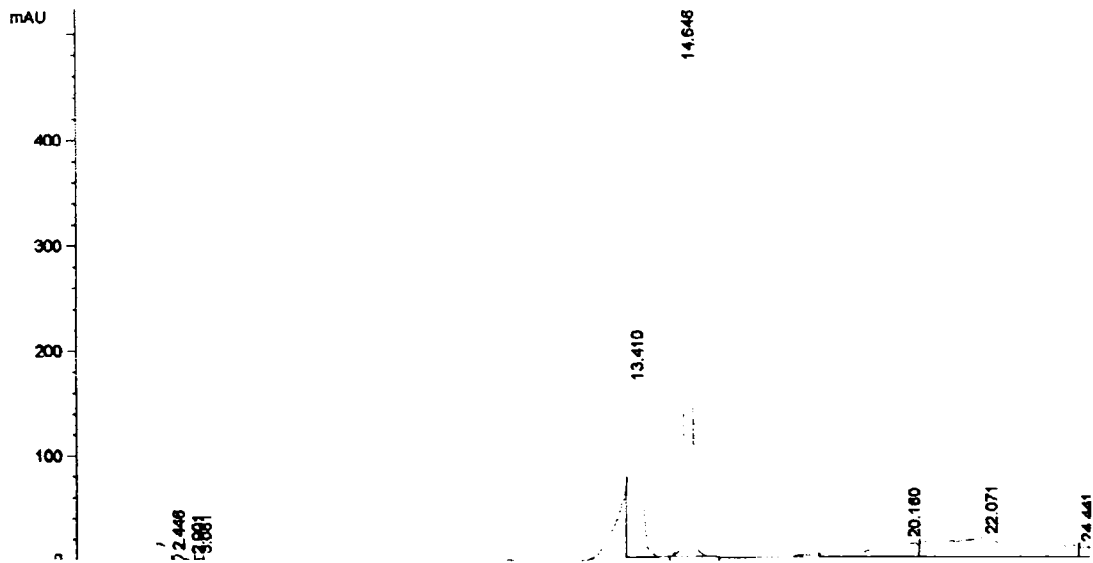


Figura S5. Cromatograma HPLC a luteolinei

ANEXA 4. Cromatogramele HPLC pentru fracțiunile extractului de *Hydrangea paniculata*, purificat pe Sephadex LH-20.

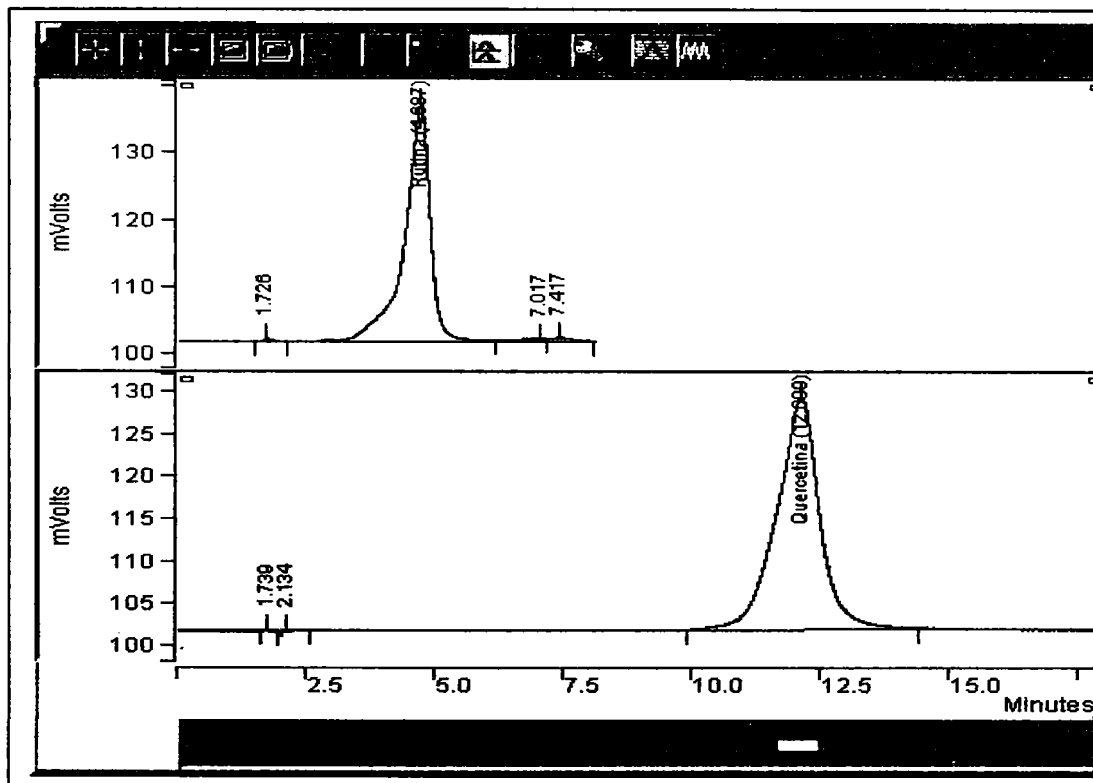


Figura 4.1. Cromatogramele standardelor de **rutină** și **quercetină**. Col. LiChrosorb (VARIAN)RP18, 150 x 4,6 mm, dp 5 μm . F.M: **50% MeOH**, 50% H_2O , pH 3 (cu acid fosforic), $v = 1,0 \text{ mL/min}$, detecție UV 360 nm.

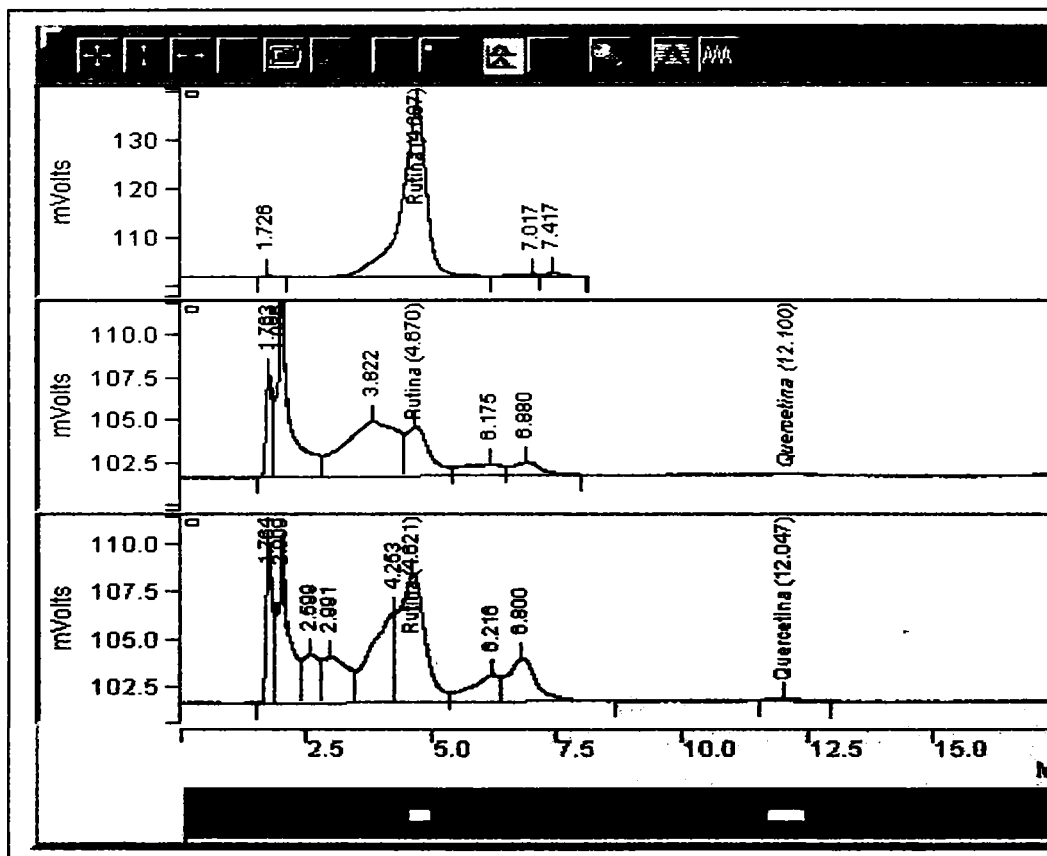


Figura 4.2. Cromatogramele standardului de **rutină** (panoul superior), fracțiunii 7 (panoul din mijloc) și fracțiunii 8 (panoul inferior). Col. LiChrosorb (VARIAN)RP18, 150 x 4,6 mm, dp 5 μ m. F.M: **50% MeOH**, 50% H₂O, pH 3 (cu acid fosforic), $v = 1,0$ mL/min, detecție UV 360 nm (tabel 37).

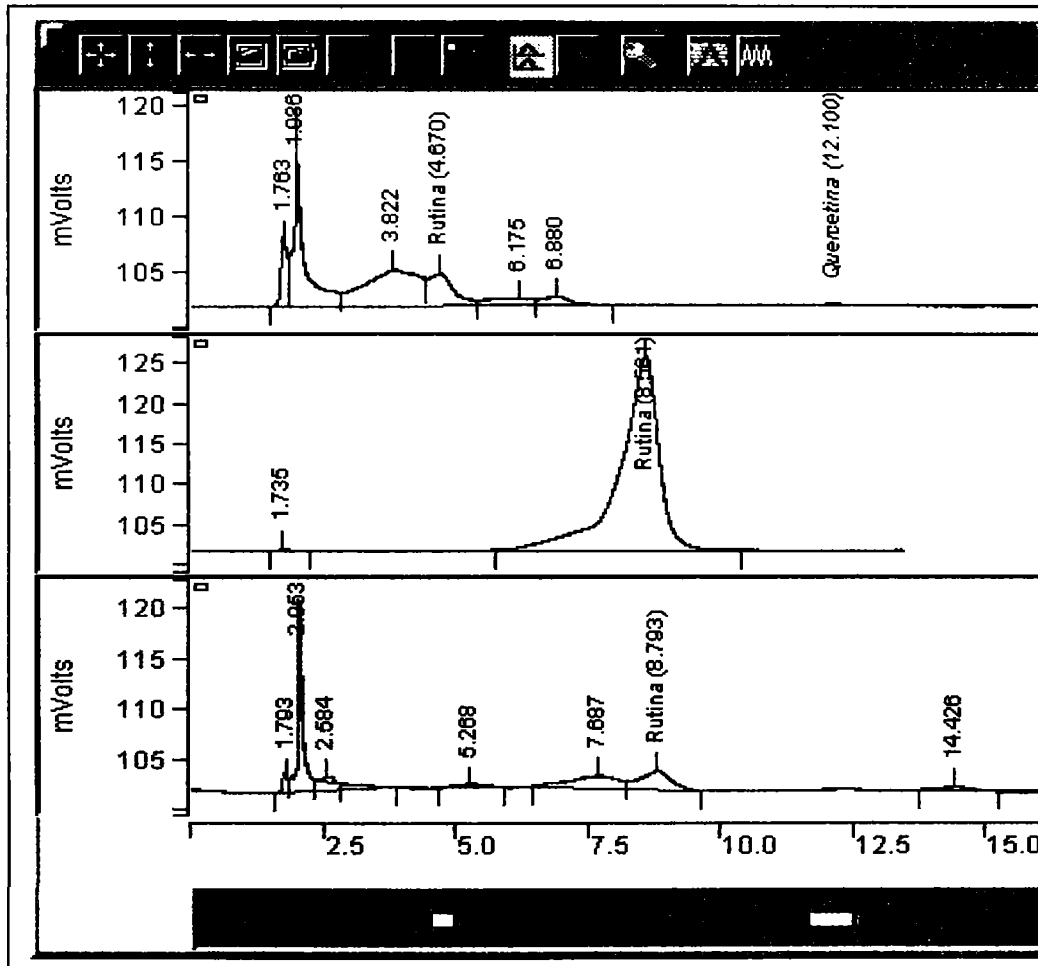


Figura 4.3. Cromatogramele fracțiunii 7 eluată cu F.M: **50% MeOH**, 50% H₂O, pH 3 (panoul superior) și ale standardului de **rutină** (panoul din mijloc) respectiv a fracțiunii 7 (panoul inferior) eluate cu F.M: **42% MeOH**, 58% H₂O, pH 3 (cu acid fosforic). Col. LiChrosorb (VARIAN)RP18, 150 x 4,6 mm, dp 5 μm, v = 1,0 mL/min, detecție UV 360 nm (tabel 37).

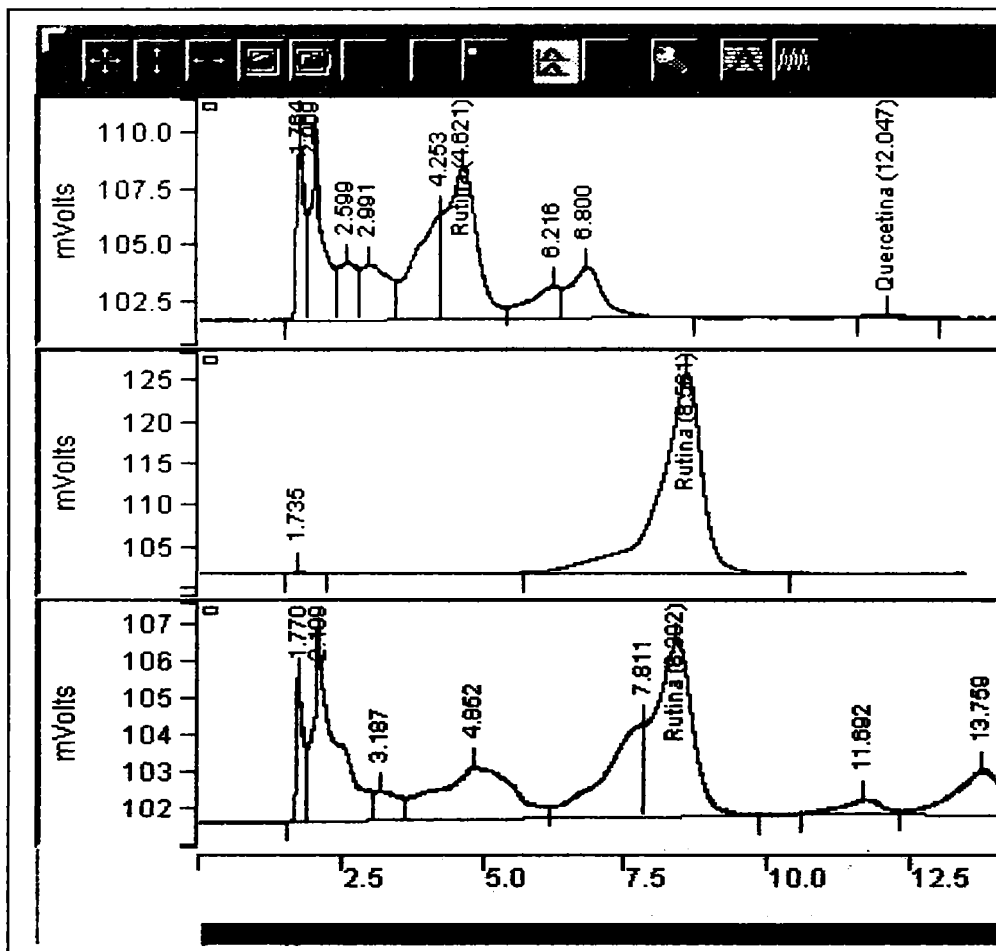


Figura 4.4. Cromatogramele fracțiunii 8 eluată cu F.M: **50% MeOH**, 50% H₂O, pH 3 (panoul superior) și ale standardului de **rutină** (panoul din mijloc) respectiv a fracțiunii 8 (panoul inferior) eluate cu F.M: **42% MeOH**, 58% H₂O, pH 3 (cu acid fosforic). Col. LiChrosorb (VARIAN) RP18, 150 x 4,6 mm, dp 5 μm, v = 1,0 mL/min, detecție UV 360 nm (tabel 37).

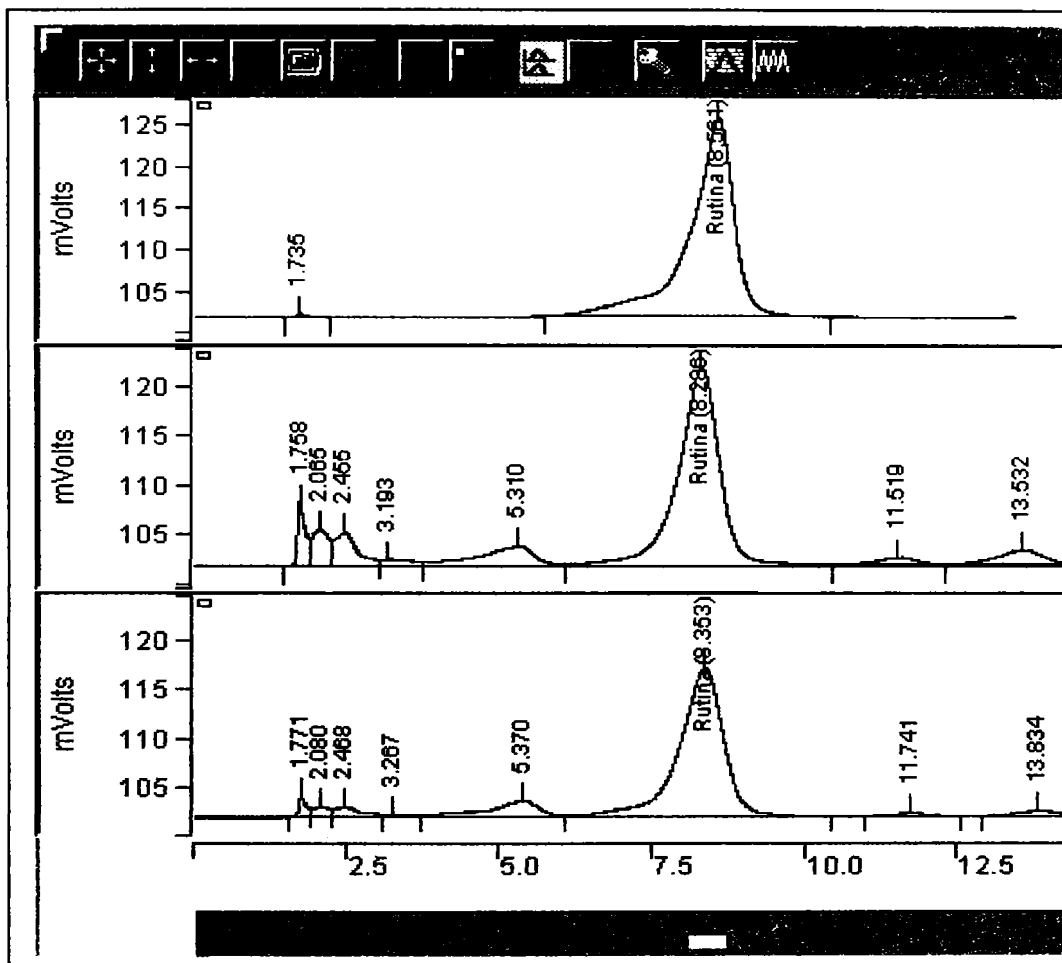


Figura 4.5. Cromatogramele standardului de **rutină** (panoul superior), fracțiunii 9 (panoul din mijloc) și fracțiunii 10 (panoul inferior). Col. LiChrosorb (VARIAN) RP18, 150 x 4,6 mm, dp 5 μ m. F.M: **42% MeOH**, 58% H₂O, pH 3 (cu acid fosforic), $v = 1,0$ mL/min, detecție UV 360 nm (tabel 37).

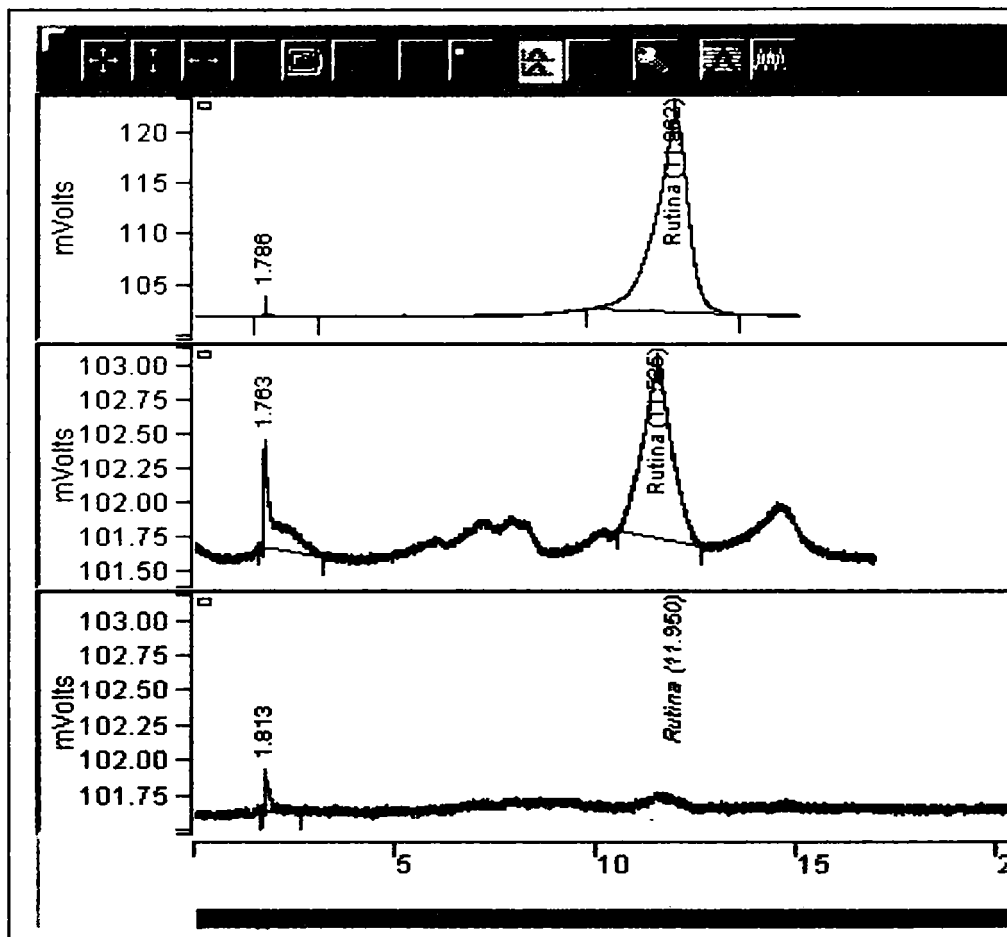


Figura 4.6. Cromatogramele standardului de **rutină** (panoul superior), fracțiunii 11 (panoul din mijloc) și fracțiunii 12 (panoul inferior). Col. LiChrosorb (VARIAN) RP18, 150 x 4,6 mm, dp 5 μ m. F.M: **40% MeOH**, 60% H₂O, pH 3 (cu acid fosforic), v = 1,0 mL/min, detecție UV 360 nm (tabel 37).

ANEXA 5. Valorile absorbanțelor în cazul determinării parametrilor biochimici

Valorile absorbanțelor citite în cazul determinării parametrilor biochimici (paragraful II.4.3.1.) pe baza cărora s-a întocmit tabelul 74.

- Determinarea malondialdehidei (MDA)

Lot	A ($\lambda = 632 \text{ nm}$)									
M	0,603	0,625	0,615	0,620	0,612	0,620	0,625	0,621	0,605	0,615
L	0,599	0	0,876	0,609	0,810	0,874	0,860	0,789	0,876	0,876

$$A_{\text{etalon}} = 0,464$$

- Determinarea glutationului (G-SH)

Lot	A ($\lambda = 412 \text{ nm}$)									
M	1,065	1,031	1,015	1,020	1,061	1,062	1,062	1,0610	1,060	1,061
L	0,008	0,011	0,008	0,009	0,010	0,007	0,008	0,0110	0,007	0,008

- Determinarea glutationperoxidazei (Glu-px)

Lot	A									
M	0,176	0,182	0,178	0,181	0,179	0,178	0,181	0,181	0,182	0,178
L	0,264	0,217	0,231	0,263	0,218	0,264	0,265	0,218	0,232	0,267

- Determinarea glutationreductazei (Glu-red)

Lot	A ($\lambda = 360 \text{ nm}$)									
M	0,227	0,174	0,225	0,230	0,178	0,224	0,223	0,221	0,224	0,225
L	0,228	0,227	0,225	0,226	0,225	0,227	0,227	0,227	0,227	0,228

- Determinarea catalazei eritrocitare (CAT)

Lot	A ($\lambda = 570 \text{ nm}$)									
M	0,112	0,125	0,076	0,082	0,131	0,124	0,122	0,122	0,124	0,125
L	0,125	0,112	0,132	0,126	0,125	0,127	0,127	0,127	0,127	0,128

- Determinarea superoxid dismutazei (SOD)

Lot	A ($\lambda = 560 \text{ nm}$)									
M	0,282	0,370	0,362	0,278	0,294	0,274	0,272	0,322	0,284	0,282
L	0,297	0,310	0,235	0,236	0,312	0,298	0,297	0,237	0,312	0,312

$$A_m = 0,631$$

- Determinarea alanin aminotransferazei (ALAT)

Lot	A ($\lambda = 530 \text{ nm}$)									
M	0,139	0,140	0,139	0,138	0,139	0,140	0,140	0,140	0,139	0,138
L	0,066	0,193	0,068	0,069	0,069	0,067	0,068	0,069	0,067	0,068

A_{etalon} = 0,163

- Determinarea aspartat aminotransferazei (ASAT)

Lot	A ($\lambda = 530 \text{ nm}$)									
M	0,183	0,126	0,131	0,182	0,129	0,130	0,130	0,130	0,131	0,132
L	0,182	0,147	0,186	0,148	0,147	0,147	0,148	0,148	0,147	0,148

A_{etalon} = 0,116