

OBȚINEREA UNOR EXTRACTE DE IENUPĂR ȘI POSIBILITATEA DE VALORIFICARE ÎN OBȚINEREA UNOR PREPARATE DE UZ FARMACEUTIC, COSMETIC SAU ALIMENTAR

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

Ing. Carmen-Manuela Pleșa

Conducător științific:
Referenți științifici:

prof. univ. dr. ing. Alfa Xenia Lupea
prof. univ. dr. chim. Vasile Ostafe
conf. dr. ing. Nicoleta Hădărugă
prof. univ. dr. ing. Lucian Rusnac

Ziua susținerii tezei: 27.09. 2011

Seriile Teze de doctorat ale UPT sunt:

- | | |
|---|--|
| 1. Automatică | 8. Inginerie Industrială |
| 2. Chimie | 9. Inginerie Mecanică |
| 3. Energetică | 10. Știința Calculatoarelor |
| 4. Ingineria Chimică | 11. Știința și Ingineria Materialelor |
| 5. Inginerie Civilă | 12. Ingineria sistemelor |
| 6. Inginerie Electrică | 13. Inginerie energetică |
| 7. Inginerie Electronică și Telecomunicații | 14. Calculatoare și tehnologia informației |

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. 50 / 16.09.2011, tezele de doctorat susținute în universitate începând cu 1 octombrie 2006.

Copyright © Editura Politehnica – Timișoara, 2011

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

Prezenta lucrare este rezultatul activității prestate în perioada stagiului ca doctorand cu frecvență la Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului în cadrul Departamentului C.A.I.C.O.N. al Universității „Politehnica” din Timișoara.

Mulțumiri deosebite pentru sprijinul, răbdarea și ajutorul înalt calificat se cuvin conducătorului științific, doamnei prof. univ. dr. ing. Alfa Xenia Lupea.

De asemenea doresc să aduc mulțumiri doamnei conf. dr. ing. Nicoleta Hădărugă de la Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului Timișoara, domnului ș.l. dr. ing. Daniel Ioan Hădărugă de la Universitatea „Politehnica” din Timișoara, respectiv domnului asist. dr. Valentin Ordodi de la Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” din Timișoara pentru entuziasmul constant cu care m-au îndrumat și sfătuit.

Îmi exprim întreaga considerație față de membrii comisiei de doctorat, domnul președinte al comisiei prof. dr. ing. Petru Negrea Universitatea „Politehnica” din Timișoara, domnul prof. univ. dr. chim. Vasile Ostafe de la Universitatea de Vest din Timișoara, doamnei conf. dr. ing. Nicoleta Hădărugă de la Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului Timișoara, prof. univ. dr. ing. Lucian Rusnac decanul Facultății de Chimie Industrială și Ingineria Mediului, Universitatea „Politehnica” din Timișoara, care au răspuns solicitării de a face parte din comisia de analiză a tezei, pentru timpul acordat.

Mulțumesc d-nei doctor Lavinia Noveanu, de la Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” din Timișoara pentru experimentul și interpretarea datelor referitoare la animalele de experiență, precum și d-nei Liliana Vasile pentru rezultatele histologice. Aș dori să mulțumesc d-șoarei Alexandra Gruia și d-lui dr. Valentin Ordodi pentru efectuarea analizelor GC-MS. Totodată adresez mulțumiri colegilor mei, din cadrul Departamentului de Chimie Aplicată și Ingineria Compușilor Organici și Naturali, pentru ajutorul acordat, în special Anei, Marinelei, Sorinei, Adelei, Ioanei și lui Cosmin.

Nu în ultimul rând, mulțumesc soțului și întregii mele familii, care mi-au fost alături și m-au susținut în toți acești ani.

Timișoara, septembrie 2011

Ing. Carmen-Manuela Pleșa (c. Mitar)

Părinților și soțului meu,

Pleșa, Carmen-Manuela

Obținerea unor extracte de ienupăr și posibilitatea de valorificare în obținerea unor preparate de uz farmaceutic, cosmetic sau alimentar

Teze de doctorat ale UPT, Seria 4, Nr. 50, Editura Politehnica, 2011, 230 pagini, 134 figuri, 35 tabele

ISSN: 1842-8223

ISBN: 978-606-554-347-8

Cuvinte cheie:

compuși terpenici, extracte de *Juniperus*, *Juniperus communis*, *Juniperus virginiana*, antioxidanți, eliberări controlate

Rezumat:

Uleiul esențial de *Juniperus* a avut un rol major în timpul epidemiilor de ciumă, holeră sau febră tifoidă. În antichitate, medicii greci, arabi prescriau *Juniperus*ul ca antiseptic. În medicina populară turcă, speciile de *Juniperus* erau folosite în tratamentul diverselor afecțiuni inflamatorii sau infecțioase: infecții acute ale căilor respiratorii însoțite de tuse, infecții micotice, sindroame inflamatorii pelvine, boală hemoroidală, artrite. Ienuperii sunt arbuști din rândul rășinoaselor, cu frunze înțepătoare și cu flori, care la maturitate imită fructele cărnoase. De la ei se întrebuințează frunzele (Folia Juniperi) și mai ales pseudobacele (Fructis Juniperi).

Studiul efectuat a urmărit obținerea de extracte din două specii de *Juniperus* valoroase prin conținutul lor de compuși terpenici și antioxidanți, caracterizarea acestor extracte și posibilitatea de utilizare ca aditivi în creme bază cu aplicații în domenii diverse (farmaceutic sau cosmetic) precum și în medicină - unii componenți ai uleiului de *Juniperus* au prezentat efecte pozitive, *antioxidante*, care facilitează răspunsul bronhodilatator mediat de oxidul nitric (NANi) la nivelul căilor respiratorii de șobolan.

"Teza de doctorat a fost realizată cu sprijin parțial din grantul strategic POSDRU/6/1.5/S/13, ID6998, cofinanțat din Fondul Social European "Investeste în oameni", în cadrul Programului Operațional Sectorial Dezvoltare Resurse Umane 2007-2013"

C U P R I N S

INTRODUCERE. OBIECTIVELE TEZEI	9
PARTEA I. STADIUL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU	11
I.COMPUȘII TERPENICI	11
I.1. DIVERSITATEA COMPUȘILOR TERPENICI DIN PLANTE	11
I.1.1. Terpenoidele – Structură. Nomenclatură. Clasificare	11
I.1.2. Biflavonele aparținătoare genului <i>Juniperus</i>	12
I.2. BIOSINTEZA COMPUȘILOR TERPENICI ÎN PLANTE	13
I.2.1. Biosinteza izopentil difosfatului (IPP)	13
I.2.2. Biosinteza principalelor clase de terpenoide din izopentil difosfat	14
I.2.3. Biosinteza principiilor active din plante	15
I. 3. ROLUL COMPUȘILOR TERPENOIDICI ÎN PLANTE	24
I.3.1. Activitatea antioxidantă a compușilor terpenoidici	24
I.3.1.1. Metoda bazată pe generarea și captarea de radicali DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)	25
I.3.1.2. Metoda decolorării cationului ABTS ^{•+}	27
I.3.1.3. Metoda FRAP (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>)	28
I.3.1.4. Metoda potențialului antioxidant total utilizând Cu(II) ca antioxidant (<i>Total Antioxidant Potential Assay Using Cu(II) as an Oxidant</i>)	28
I.3.1.5. Metodă care determină inhibarea autooxidării induse a lipidelor	29
I.3.1.6. Metoda cu chemiluminescență	29
I.3.1.7. Metoda cu fotochemiluminescență	30
I.3.1.8. Metoda capacității oxidante totale	30
I.4. CHIMIA TERPENELOR	30
I.4.1. Structura chimică, clasificare și proprietăți	30
I.4.2. Biosinteza terpenoidelor	47
I.4.3. Importanța etnofarmacologică a speciilor de <i>Juniperus</i>	47
I.4.4. Utilizarea <i>Juniperus</i> ului în industria alimentară	55
I.5. COMPUȘI DE INCLUZIUNE AI CICLODEXTRINELOR	56
I.5.1. Considerații asupra structurii și proprietăților ciclodextrinelor	56
I.5.2. Proprietăți și direcții de utilizare a ciclodextrinelor	57
I.6. METODE DE EXTRACȚIE ȘI ANALIZĂ A COMPUȘILOR TERPENICI	57
I.6.1. Generalități	57
I.6.2. Alegerea metodei de extracție	58
I.6.3. Selectarea tipului de solvent folosit	58

I.6.4.	Metode de extracție	59
I.6.4.1.	Extracția cu solvenți la rece	59
I.6.4.2.	Extracția cu solvenți la cald	59
I.6.4.3.	Extracția cu ultrasunete	61
I.6.4.4.	Extracția cu microunde	62
I.7.	METODE DE ANALIZĂ, SEPARARE ȘI IDENTIFICARE A COMPUȘILOR TERPENICI	62
I.7.1.	Cromatografia în strat subțire (CSS)	62
I.7.2.	Cromatografia de gaz cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS)	63
I.7.2.	Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC)	63
	PARTEA II – CONTRIBUȚII PROPRII. PARTEA EXPERIMENTALĂ	65
II.1.	DATE BOTANICE REFERITOARE LA SPECIILE <i>JUNIPERUS COMMUNIS</i> ȘI <i>JUNIPERUS VIRGINIANA</i>	65
II.2.	OBȚINEREA EXTRACTELOR DIN SPECIILE STUDIATE	77
II.2.1.	Recoltarea, păstrarea și pregătirea materiei prime	77
II.2.2.	Extracția prin refluxare	77
II.2.2.1.	Obținerea de extracte de <i>Juniperus communis</i> respectiv <i>Juniperus virginiana</i> (pseudobace, frunze aciculare și microblaste)	77
II.2.2.2.	Obținerea extractelor alcoolice din frunze aciculare și pseudobace de <i>Juniperus communis</i> respectiv <i>Juniperus virginiana</i> necesare obținerii nanocapsulelor	77
II.2.3.	Extracția prin ultrasonare	78
II.2.3.1.	Obținerea de extracte în patru solvenți organici din trei părți anatomice de <i>Juniperus communis</i> respectiv <i>Juniperus virginiana</i>	78
II.2.4.	Extracția cu ajutorul unei instalații micropilot prevăzută cu generator de ultrasunete	78
II.2.4.1.	Obținerea de extracte cloroformice	79
II.2.4.2.	Obținerea de extracte alcoolice din pseudobace și frunze aciculare de <i>Juniperus communis</i> respectiv <i>Juniperus virginiana</i>	80
II.2.5.	Obținerea uleiurilor esențiale din pseudobace de <i>Juniperus communis</i> respectiv <i>Juniperus virginiana</i> prin hidrodistilare	81
II.3.	CARACTERIZAREA EXTRACTELOR DE <i>JUNIPERUS COMMUNIS</i> RESPECTIV <i>JUNIPERUS VIRGINIANA</i>	82
II.3.1.	Compuși terpenici	82
II.3.1.1.	Identificarea cineolului și guaiazulenei prin CSS	82
II.3.1.2.	Identificarea compușilor terpenici prin GC-MS	84
II.3.1.3.	Determinarea cantitativă a compușilor terpenici din extracte cloroformice de <i>Juniperus</i> prin gaz cromatografie cu ionizare în flacără	85
II.3.1.4.	Identificarea compușilor terpenici prin spectroscopie UV-VIS	87

II.4.	ANALIZA MULTIVARIATĂ (PCA) A DATELOR GC-MS PENTRU EXTRACTELE DE <i>JUNIPERUS COMMUNIS</i> ȘI <i>JUNIPERUS VIRGINIANA</i>	90
II.5.	DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE A EXTRACTELOR DE <i>JUNIPERUS COMMUNIS</i> RESPECTIV <i>JUNIPERUS VIRGINIANA</i>	93
II.5.1.	Determinarea activității antioxidante, pentru extractele în acetat de etil, prin metoda spectrofotometrică cu DPPH	93
II.5.2.	Identificarea unor compuși cu caracter antioxidant din extractele etanolicе prin cromatografie de lichide de înaltă performanță	94
II.6.	REALIZAREA ELIBERĂRILOR CONTROLATE DIN NANOCAPSULE RESPECTIV DIN UNGUENTE CE CONȚIN ÎNGLOBATE EXTRACTE ALCOOLICE ȘI ULEIURI ESENȚIALE DE <i>JUNIPERUS COMMUNIS</i> RESPECTIV <i>JUNIPERUS VIRGINIANA</i>	99
II.6.1.	Obținerea complexilor prin cristalizare din soluție alcool-apă	99
II.6.2.	Eliberări controlate din nanocapsule ce conțin extracte etanolicе și ulei volatil din pseudobace de <i>Juniperus communis</i> respectiv <i>Juniperus virginiana</i> provenite din diferite localități	100
II.6.3.	Eliberări controlate din unguente ce conțin extracte etanolicе și ulei volatil din pseudobace de <i>Juniperus communis</i> respectiv <i>Juniperus virginiana</i> provenite din diferite localități	100
II.7.	EFECTELE ASUPRA INELULUI DE MUSCULATURĂ NETEDĂ TRAHEALĂ DE ȘOBOLAN A EXPUNERII CRONICE LA ULEIUL DE <i>JUNIPERUS</i>	101
	STUDIUL PROPRIETĂȚILOR ANTIMICROBIENE A EXTRACTELOR DE <i>JUNIPERUS COMMUNIS</i> RESPECTIV <i>JUNIPERUS VIRGINIANA</i>	108
	PARTEA III – CONTRIBUȚII PROPRII. REZULTATE ȘI DISCUȚII	109
III.1.	CARACTERIZAREA EXTRACTELOR REALIZATE DIN CELE TREI PĂRȚI ANATOMICE DE <i>JUNIPERUS COMMUNIS</i> RESPECTIV <i>JUNIPERUS VIRGINIANA</i>	109
III.1.1	Caracterizarea extractelor obținute prin refluxare	109
III.1.2	Caracterizarea extractelor obținute prin ultrasonare	117
III.1.3	Caracterizarea extractelor obținute prin hidrodistilare	129
III.1.4	Analiza componentelor principale pentru extractele obținute prin refluxare și ultrasonare	131
III.1.5	Analiza compușilor volatili în extractele din cele trei părți anatomice de <i>Juniperus communis</i> respectiv <i>Juniperus virginiana</i>	137
III.1.5.1.	Identificarea guaiazulenei și cineolului din uleiuri esențiale de <i>Juniperus communis</i> și <i>Juniperus virginiana</i>	137
III.1.5.2.	Identificarea unor compuși volatili prin gaz	139

	cromatografie cu detector de ionizare în flacără	
III.1.5.3.	Identificarea și dozarea terpenelor prin spectroscopie UV-VIS	141
III.2.	ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ A EXTRACTELOR ETANOLICE ȘI ÎN ACETAT DE ETIL DIN EXTRACTE DE <i>JUNIPERUS COMMUNIS</i> RESPECTIV <i>JUNIPERUS VIRGINIANA</i>	144
III.2.1.	Identificarea compușilor antioxidanți prin cromatografie de lichide de înaltă performanță	144
III.2.2.	Analiza activității antioxidante a extractelor etanolice și în acetat de etil prin metoda cu DPPH	149
III.3.	ANALIZA ELIBERĂRILOR CONTROLATE DIN NANOCAPSULE ȘI UNGUENTE	155
III.3.1.	Analiza eliberărilor controlate din nanocapsule ce conțin extracte etanolice și ulei volatil din pseudobace de <i>Juniperus communis</i> respectiv <i>Juniperus virginiana</i> provenite din diferite localități	155
III.3.2.	Analiza eliberărilor controlate din unguente ce conțin extracte etanolice și ulei volatil din pseudobace de <i>Juniperus communis</i> respectiv <i>Juniperus virginiana</i> provenite din diferite localități	157
III.4.	EFECTELE EXPUNERII CRONICE LA ULEIUL DE <i>JUNIPERUS</i> ASUPRA INELULUI DE MUSCULATURĂ NETEDĂ TRAHEALĂ DE ȘOBOLAN.	162
	Activitatea antimicrobiană a extractelor din frunze aciculare și pseudobace de <i>Juniperus communis</i> și <i>Juniperus virginiana</i>	172
	Concluzii	174
	Bibliografie	179
	Anexe	188

I N T R O D U C E R E

De-a lungul istoriei, uleiul esențial de *Juniperus* a avut un rol major în timpul epidemiilor de ciumă, holeră sau febră tifoidă. În antichitate, medicii greci, arabi prescriau *Juniperusul* ca antiseptic. Vechile triburi din America utilizau pseudobacele de *Juniperus* ca metodă contraceptivă respectiv ca abortiv.

Herboriștii medievali (sec. XV-XVI) prețuiau *Juniperusul* nu doar ca leac împotriva ciumei, dar și pentru a trata mușcăturile de insecte. Este interesant faptul că în limba celtă, cuvântul *Juniperus* însemna mușcător.

Medicina populară iugoslavă privește *Juniperusul* ca leac bun pentru toate bolile. În spitalele franceze, crenguțe de rozmarin și *Juniperus* au fost arse pînă la începutul secolului XX pentru a purifica aerul.

În medicina populară turcă, speciile de *Juniperus* erau folosite în tratamentul diverselor afecțiuni inflamatorii sau infecțioase: infecții acute ale căilor respiratorii însoțite de tuse, infecții micotice, sindroame inflamatorii pelvine, boală hemoroidală, artrite etc. Date experimentale au demonstrat remarcabile efecte antiinflamatoare și analgezice ale speciilor de *Juniperus communis* și *Juniperus oxycedrus*. Pseudobacele de *Juniperus* folosite în medicina indiană ca un remediu naturist pentru infecțiile tractului urinar sunt utilizate și astăzi.

Ienuperii sunt arbuști din rândul rășinoaselor, cu frunze înțepătoare și cu flori, care la maturitate imită fructele cărnoase. De la ei se întrebuintează frunzele (*Folia Juniperi*) și mai ales pseudobacele (*Fructis Juniperi*).

Pseudobacele recoltate în scopuri curative, trebuie să fie mature, negre-albăstrui sau brun-violacee, cu o adâncitură în formă de stea cu trei brațe în vârf, iar la bază cu 6 solzi triunghiulari, bruni.

Obiectivele urmărite în cadrul tezei au fost:

- Extracția compușilor volatili din fiecare parte anatomică (frunze aciculare, pseudobace și microblaste) a două specii de *Juniperus* (*Juniperus communis* și *Juniperus virginiana*) procurate din zone diferite;
- Determinarea calitativă și cantitativă a conținutului de compuși terpenici;
- Aplicarea metodei cu DPPH pe extractele etanolice și în acetat de etil pentru determinarea activității antioxidante a compușilor din cele două specii de *Juniperus*;
- Analizarea spectrofotometrică a complexilor din extractele etanolice și uleiurile volatile de *Juniperus*;
- Realizarea unei instalații micropilot pentru extracție cu generator de ultrasunete;
- Realizarea eliberărilor controlate din nanocapsulele respectiv din unguente ce conțin înglobate extracte alcoolice și uleiuri esențiale de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*
- Studiul comportamentului microbiologic al unor extracte obținute asupra unor microorganisme gram pozitive și gram negative;

- Studiul efectului componentelor din uleiul esențial de *Juniperus* în cazul unor leziuni inflamatorii preexistente ale căilor respiratorii respectiv studiul efectelor componentelor uleiului esențial de *Juniperus* asupra răspunsului bronhodilatator mediat de oxidul nitric

Teza este structurată în trei părți:

- Partea I – Stadiul actual al cunoașterii în domeniul compușilor terpenici prezenți în specii de *Juniperus* (structură, metodele de extracție și identificare a compușilor volatili).
- Partea II – partea experimentală, cuprinde metodele de extracție folosite pentru diferite părți anatomice (frunze aciculare, pseudobace și microblaste de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*) recoltate din regiuni diferite.
- Partea III – în care sunt prezentate rezultatele obținute în urma caracterizării extractelor. În partea finală sunt prezentate efectele expunerii cronice ale uleiului de *Juniperus* asupra inelului de musculatură netedă traheală de șobolan, studiu în baia de organ izolat.

PARTEA I - STADIUL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU

I. COMPUȘII TERPENICI

I.1. Diversitatea compușilor terpenici din plante

În plante există o diversitate de compuși organici însă, se pare că, marea majoritate nu participă la creșterea și dezvoltarea acestora. Aceste substanțe sunt cunoscute ca metaboliți secundari. Majoritatea acțiunilor metaboliților secundari rămân încă necunoscute. Metaboliții primari, se regăsesc în regnul vegetal și îndeplinesc rolul metabolic atât de esențial plantelor. Metaboliții primari și secundari pot fi diferențiați pe baza moleculelor precursorare, structurilor chimice sau originilor biosintetice. De exemplu, ambii metaboliți sunt găsiți printre diterpene (C_{20}) și triterpene (C_{30}) [1].

Compușii terpenici sunt produși importanți utilizați pe scară largă în domenii diverse ca fabricarea detergenților, produselor alimentare și intermediarilor folosiți în medicină datorită caracteristicilor funcționale. Terpenele sunt compuși organici care sunt întâlniți în uleiurile esențiale extrase din plante cum sunt coniferele a căror principalii componenți sunt α -pinenul, β -pinenul, D-3-careenul și limonenul. Aceste uleiuri esențiale sunt extrase în mod normal din plante, de obicei prin distilare și extracție cu solvenți [2].

Printre produsele naturale, terpenele joacă un rol important în terapie. O parte din terpeni au fost utilizați în mod direct ca agenți farmaceutici sau de aromă pentru obținerea produselor farmaceutice [3].

Comparativ cu uleiul esențial din materialul vegetal uscat, conținutul de monoterpeni din materialul vegetal proaspăt a fost mai scăzut, și a prezentat o activitate bactericidă mai scăzută, concluzie ce a fost în concordanță cu raportul anterior unde se menționa că uleiul esențial cu o cantitate mare de monoterpeni în compoziție prezintă o activitate antimicrobiană bună. Unele monoterpeni ca β -pinen și 1,8-cineol prezintă potențial antimicrobian, iar β -felandrenul dezvoltă un efect toxic asupra microorganismelor prezente în cerealele depozitate. Este posibil ca unii compuși, cum sunt α -pinen, terpen-4-ol și cariofilen oxidul, care se constată că sunt responsabili de activitatea bacteriostatică împotriva câtorva microorganisme, s-ar putea să fie implicate într-un sinergism cu ceilalți compuși activi [4].

I.1.1. Terpenoidele – Structură. Nomenclatură. Clasificare

Cea mai cunoscută hemiterpenă este izoprenul, un produs volatil eliberat din țesuturi active fotosintetice. *Izopren sintaza* este prezentă în plastidele plantelor (în special în frunze), dar cantitatea de izopren obținută în funcție de prezența luminii este încă necunoscută.

Monoterpenele (C_{10}) sunt constituite din 2 unități izoprenice, sunt primele terpenoide izolate din terebentină în 1850. Monoterpenele sunt cunoscute ca fiind componente ale uleiurilor volatile, uleiuri esențiale ale plantelor prezente și în flori.

În plantele uscate pot fi găsite în procente de 5%. Monoterpenele pot fi izolate fie prin distilare, fie prin extracție, iar în industrie sunt utilizate ca și compuși de aromă sau în parfumerie.

La fel ca și monoterpenele, multe sesquiterpene se pot găsi în uleiuri esențiale.

În particular, plantele produc o mai mare varietate de terpenoide decât pot produce organismele animale sau microbii, diferența este reflectată de organizarea complexă a biosintezelor terpenoidelor la nivelul țesutului, celular, subcelular și genetic.

Cavitățile secretoare ale plantelor și epidermele glandulare ale petalelor florilor generează și depozitează sau emit uleiuri esențiale. Acestea sunt importante deoarece este încurajată polenizarea de către insecte. Canalele prin care circulă rășina diferitelor specii de conifere produce și acumulează o rășină constituită din terebentină (olefinele monoterpenice) și ulei extras din rășină (acizii rășinii diterpenoidice). Cerurile de suprafață triterpenoidice sunt formate și eliminate din epidermele speciale [1].

I.1.2. Biflavonele aparținătoare genului *Juniperus*

Biflavonele cum sunt cupresflavonele și ametoflavonele sunt foarte întâlnite în plantele aparținătoare genului *Juniperus* (familia Cupressaceae). Deși flavonele monomerică prezintă un centru slab al chiralității și astfel sunt optic inactive, unele biflavone sunt chiral active. Prima biflavonă izolată în 1968 și optic activă a fost 4',4''',7,7'''-tetra-O-metilcupresflavona. Biflavonele glicozidice sunt mai puțin răspândite în natură, iar conform datelor de literatură numai ametoflavonele glicozidice au fost găsite în natură.

Prin studiile fitochimice anterioare cu privire la plantele din nordul Americii, s-au identificat un număr de flavonoide glicozidice, neolignani și fenilpropanoide izolate din frunze și tulpină de *Juniperus communis* var. *depressa*, colectată din Oregon; două din aceste biflavone glicozidice sunt (M)- și (P)-cupresflavonele 4'-O-β-D-glucopiranozidele (figura 1.1).

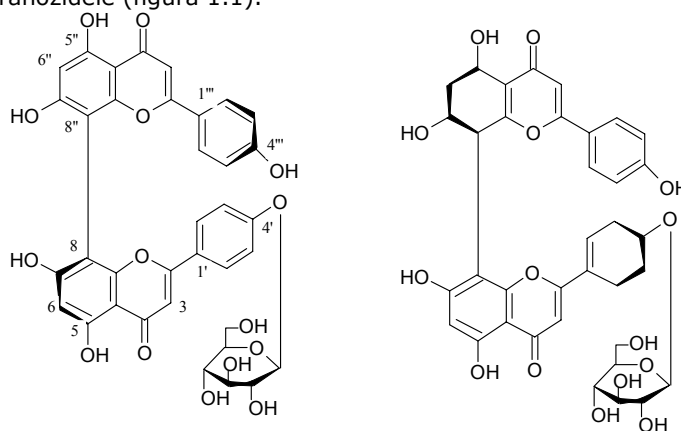


Figura 1.1. - Structurile (M)- și (P)-cupresflavonele 4'-O-β-D-glucopiranozidelor [5].

I.2. Biosinteza compușilor terpenici în plante

I.2.1. Biosinteza izopentil difosfatului (IPP) [1]

Astăzi, biosintezele IPP-ului prin calea acetat/mevalonat sunt acceptate în totalitate. Această cale citozolică de sinteză a IPP-ului implică condensarea în două etape a trei molecule de acetil-CoA catalizată de *tiolază* și *hidroximetilglutaril-CoA sintază*. Produsul rezultat: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) este apoi redus de *HMG-CoA reductază* prin două reacții de cuplare care duc la formarea acidului mevalonic. Urmează două secvențe de fosforilare ATP-dependente ale acidului mevalonic și o decarboxilare finală sub acțiunea *MVAPP-decarboxilazei* asistată de prezența unor molecule macroergice de ATP.

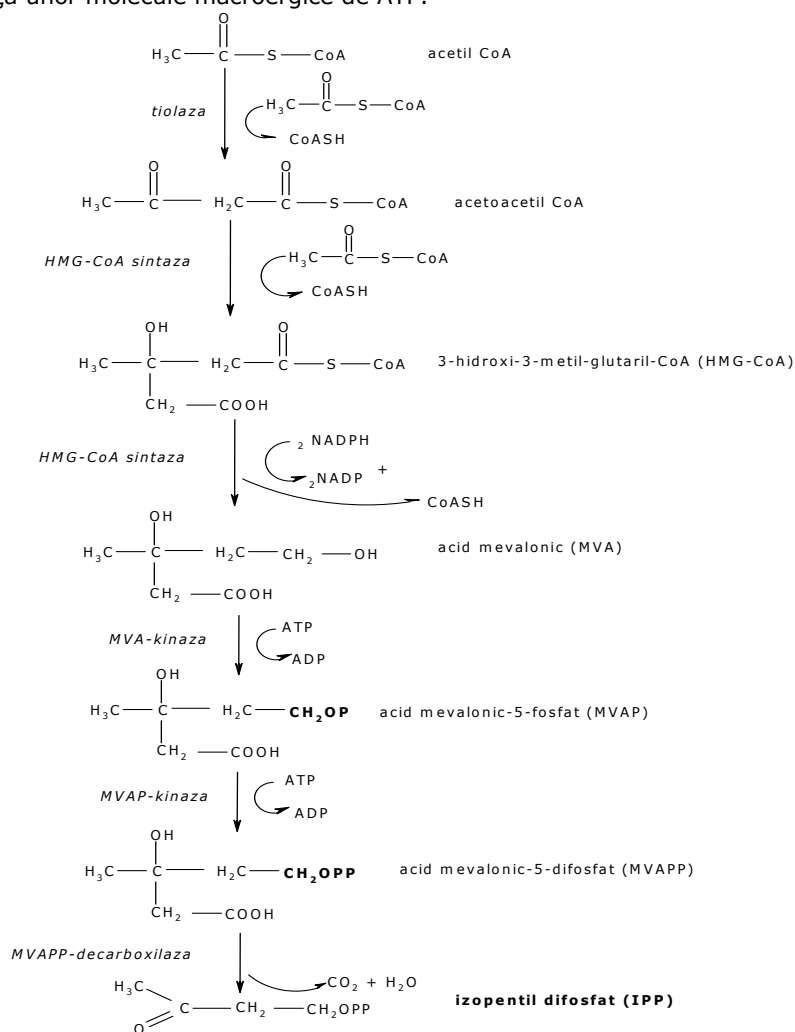


Figura 1.2. - Calea acetat/mevalonat pentru formarea IPP-ului

I.2.2. Biosinteza principalelor clase de terpenoide din izopentil difosfat

Izopentil difosfatul (IPP) este utilizat într-o succesiune de reacții de elongare pentru a produce o serie de omologi ai prenil difosfatului care sunt precursori apropiați ai diferitelor clase de terpenoide.

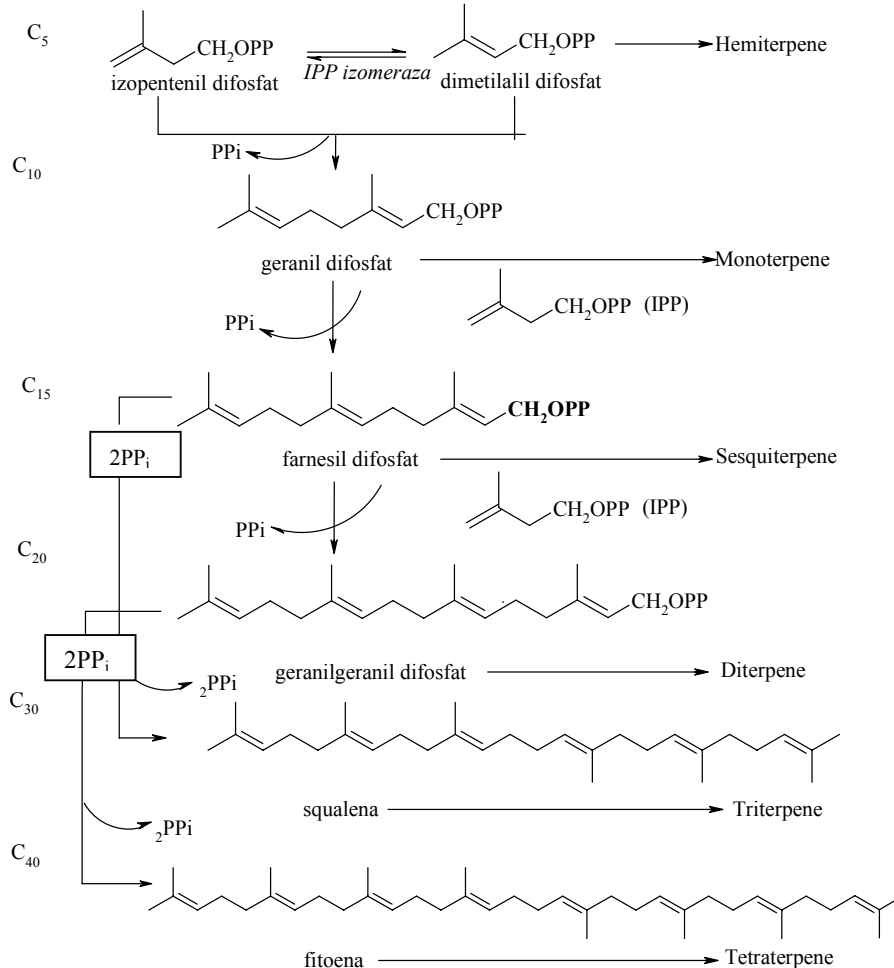


Figura 1.3. - Subclasele majore ale terpenoidelor sunt biosintetizate din unitatea cu 5 atomi de carbon a izopentil difosfatului [1]

Din uleiuri esențiale au fost izolate o serie vastă de sintaze monoterpene specifice angiospermelor și gimnospermelor. Sintazele care produc olefine aciclice (de exemplu mircen) și terpene biciclice (α -pinen și β -pinen) pornind de la GPP (geranil difosfat) sunt cunoscute și ca enzime care transformă GPP-ul în derivați oxigenați, cum este cazul 1,8-cineolului și a bornil difosfatului, precursorul camforului.

O caracteristică interesantă a sintazelor monoterpenice este abilitatea acestor enzime de a produce mai mult de un produs; de exemplu *pinensintaza* provenită din diverse plante produce atât α -pinen cât și β -pinen. Pinenii sunt cele mai întâlnite monoterpene sintetizate de plante și sunt principalii componenți ai terebentinei din cetina brazilor și a molizilor. Compușii sunt toxici pentru gândacii scoarței de copac [1].

I.2.3. Biosinteza principiilor active din plante [6]

Biosinteza principiilor active din plante are loc după secvența:



Biochimia terpenoidelor odorante și aromatizante pornește de la biosinteza izopentenil pirofosfatului (izopren activat), care se poate întâlni la toate organismele vii. Prin condensarea cap-coadă a două molecule de acetilcoenzimă A (Acetil~SCoA) se obține acetoacetilcoenzima A, care se condensează mai departe stereospecific cu încă o moleculă de acetilcoenzimă A, obținându-se un intermediar important al acestei căi de biosinteză, β -hidroxi- β -metilglutarilcoenzima A; acesta trece în acid mevalonic printr-o reducere enzimatică, acidul este fosforilat cu ajutorul ATP-ului la acid 3-fosfo-5-pirofosfomevalonic care se decarboxilează și se defosforilează parțial cu obținerea 3-butenil-3-metilpirofosfatului (izopentenil pirofosfatul), care se izomerizează reversibil la 2-butenil-3-metilpirofosfat (dimetilalilpirofosfat) în prezența unei *izopentenilpirofosfatizomeraze*:

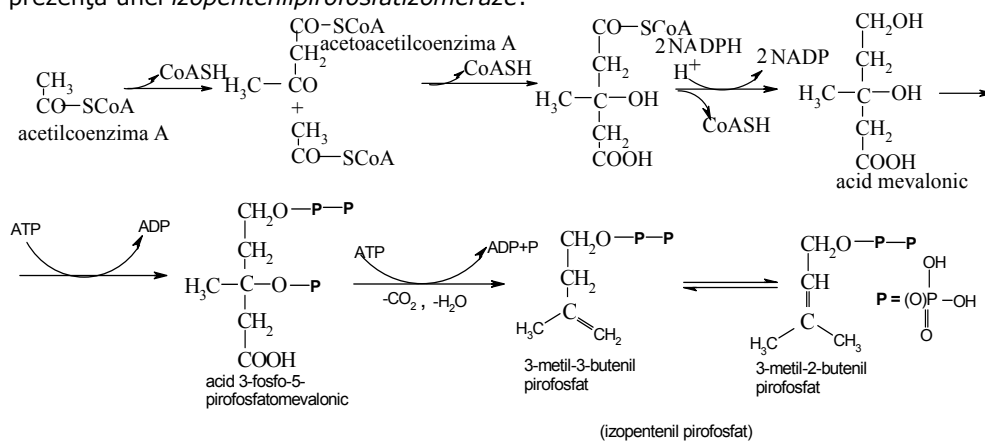


Figura 1.4. - Formarea izopentenil pirofosfatului

Acești izomeri condensează în sistemul cap-coadă cu formarea unui dimer de 10 atomi de carbon, de la care se obține toată grupa de monoterpenoide. Prin condensarea în continuare a moleculelor de izopentenilpirofosfat se obțin precursorii și pentru celelalte grupe de terpenoide.

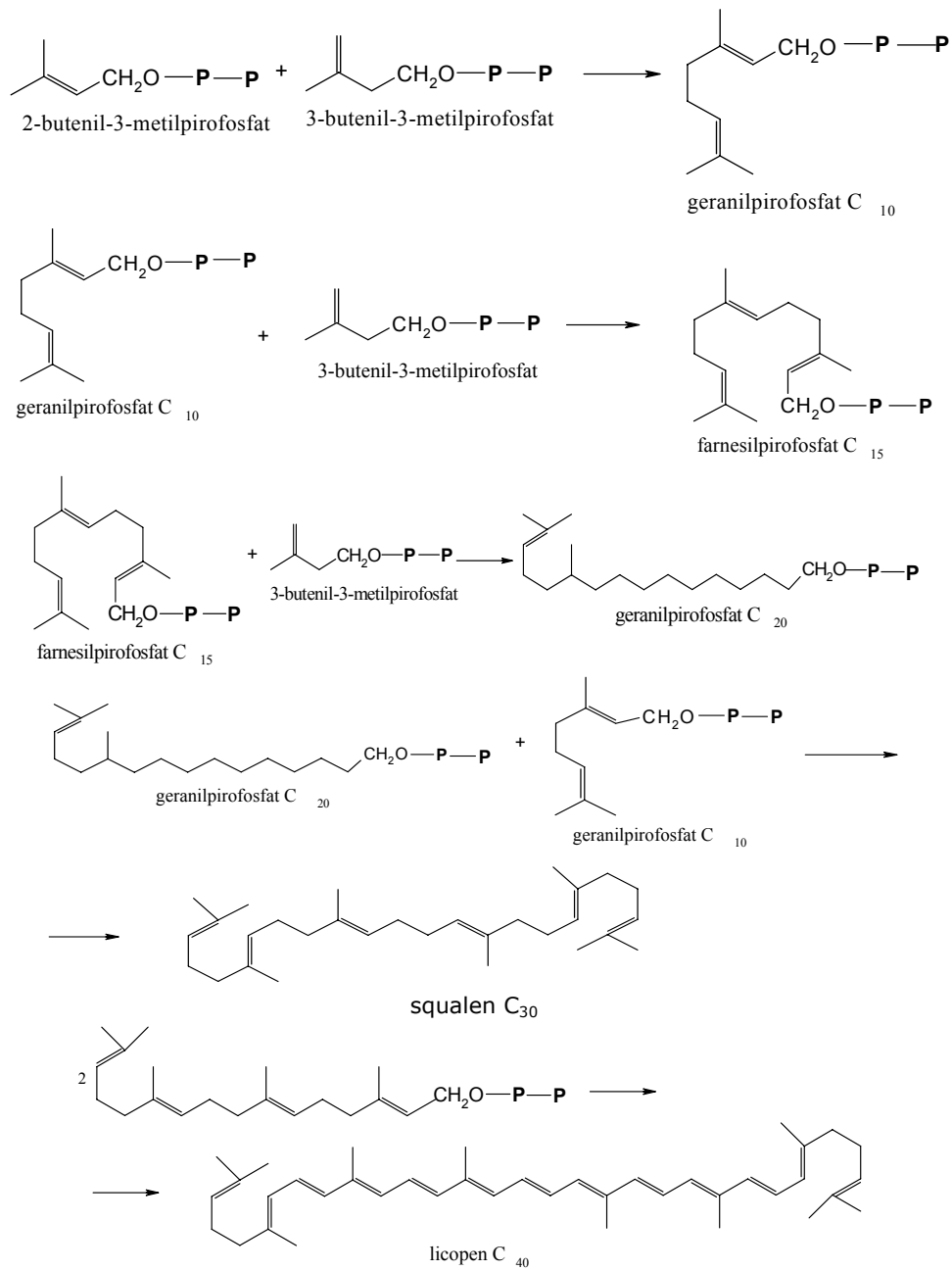


Figura 1.5. - Condensarea izopentenil pirofosfatului în biosinteza terpenoidelor

Monoterpenoidele aciclice reprezintă o parte importantă a uleiurilor volatile, iar pentru biosinteză o schemă exemplificatoare este cea de obținere a geraniolului

și nerolului. Pentru formarea celor două molecule o importanță deosebită o prezintă poziția sterică a celor doi reactanți izopentenilici; se obține fie geranilpirofosfatul, fie nerilpirofosfatul, doi izomeri geometrici.

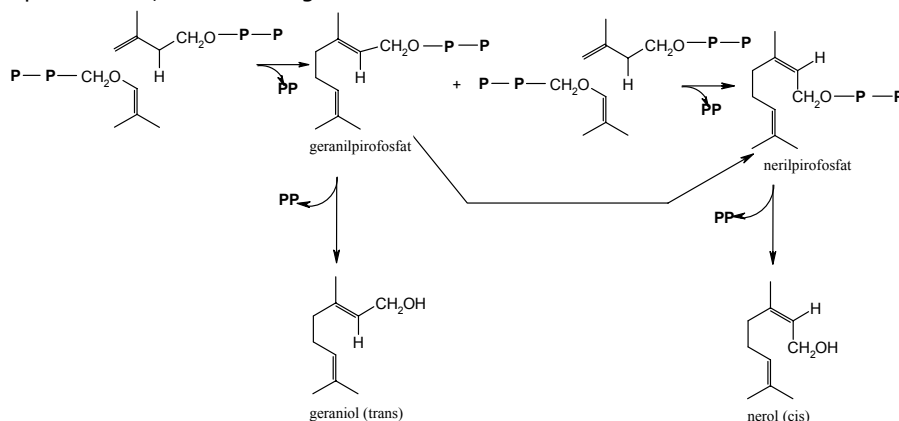


Figura 1.6. - Biosinteza geraniolului și nerolului

În figura 1.7. este prezentată calea de biosinteză a linaloolului, un alt reprezentant al monoterpenoidelor aciclice.

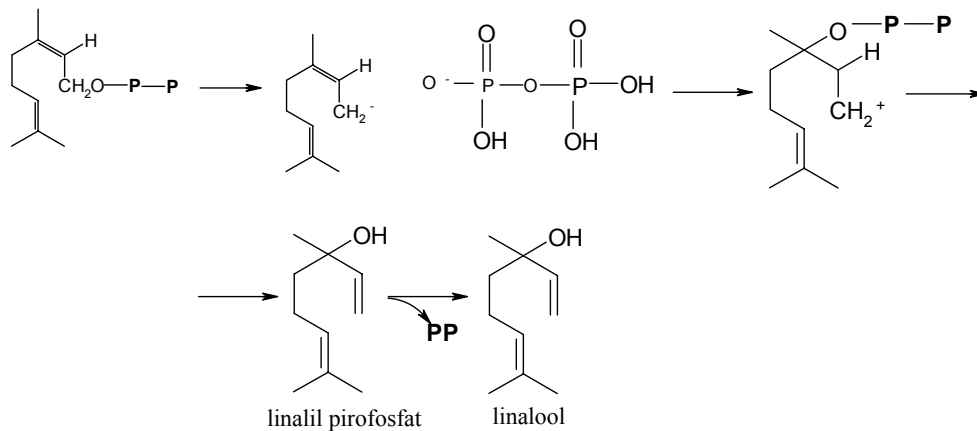


Figura 1.7. - Biosinteza linaloolului [6]

Monoterpenoidele ciclice au drept precursor al biosintezei tot geranil- sau nerilpirofosfatul. De exemplu, biosinteza limonenului poate fi explicată de apariția ca intermediar a unui carbocation ciclic.

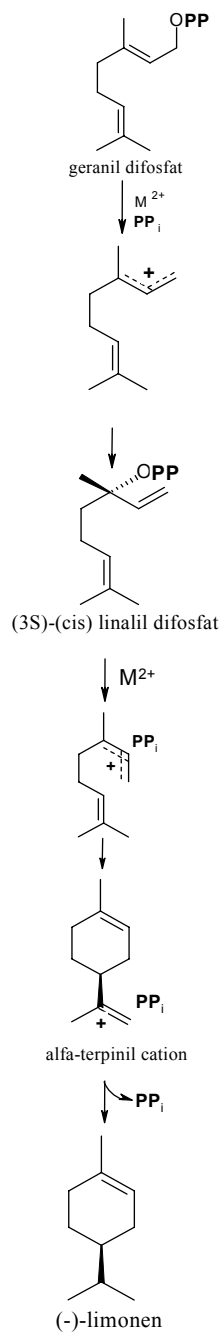


Figura 1.8. - Biosinteza limonenului [1]

Pornind de la cationul aciclic sau ciclic se pot obține și monoterpenele ciclice.

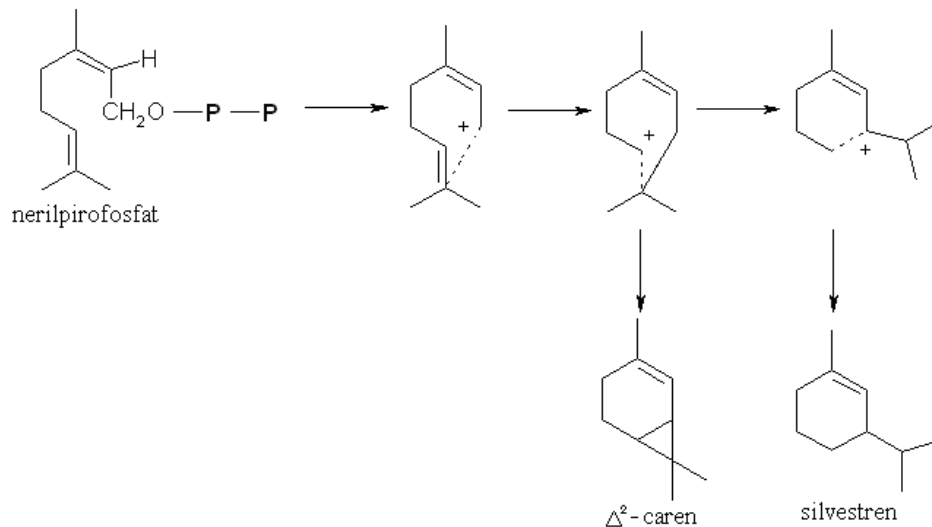


Figura 1.9. - Ciclizarea nerilpirofosfatului [6]

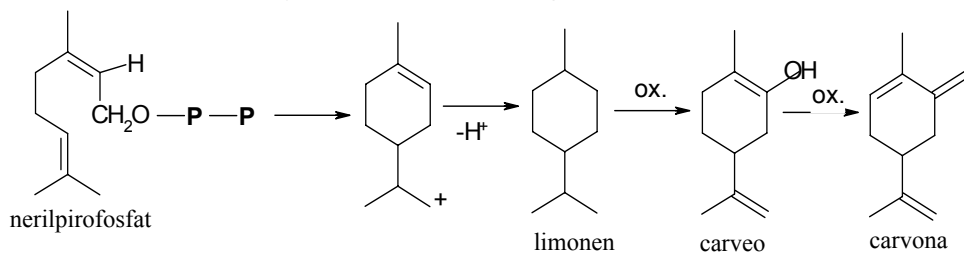


Figura 1.10. - Biosinteza carvonei

1,8-Cineolul (**2**) și 1,4-cineolul (**3**), sunt utilizați în domeniul farmaceutic dar și în industria alimentară (aromatizanti). Cei doi compuși au fost sintetizați prin izomerizarea α -terpineolului (figura 1.11). În sistemele omogene și heterogene s-a utilizat acidul dodecatungstosfosforic ($H_3PW_{12}O_{40}$) ca și catalizator.

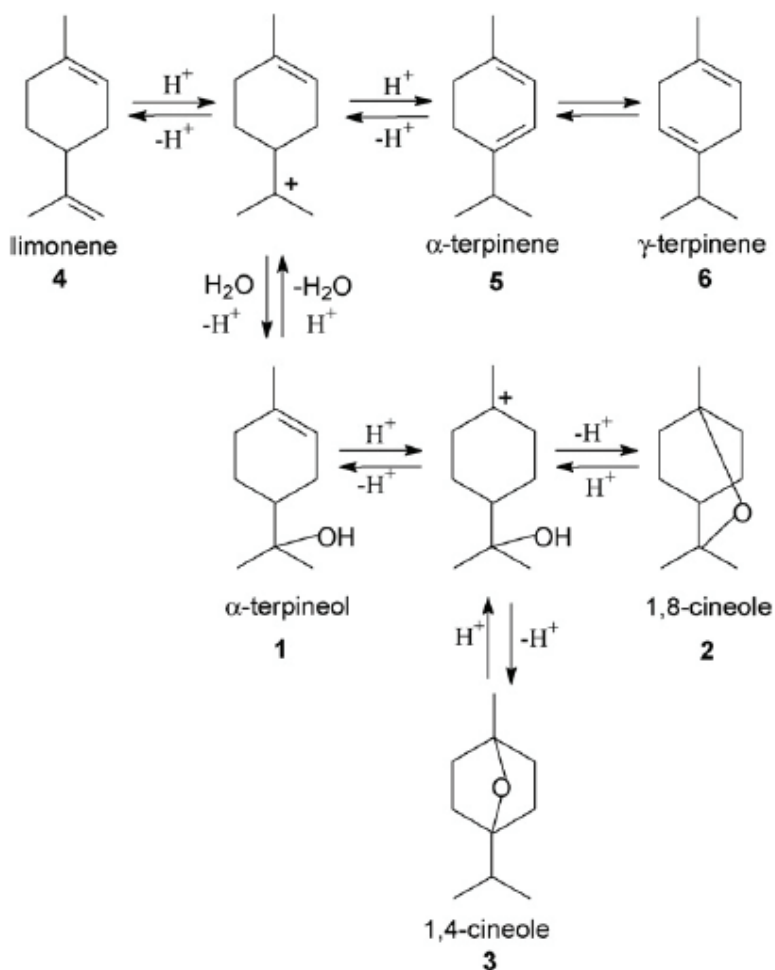


Figura 1.11. – Sinteza 1,8-cineolului și 1,4-cineolului [7]

Biosinteza compușilor din cea de-a doua clasă de terpenoide, sesquiterpenoidele, utilizează geranilpirofosfatul rezultat prin condensarea 3-butenil-3-metilpirofosfatului cu 2-butenil-3-metilpirofosfatul, care condensează în continuare cu o nouă moleculă de 2- sau 3-butenil-3-metilpirofosfat, conducând la farnesilpirofosfat - baza de pornire în biosinteza multor sesquiterpenoide. Într-un mod asemănător se obține și izomerul acestuia, nerolidilpirofosfatul. Biosinteza humulenei, cariofilenei, curcumenului, cedrenului și a altor sesquiterpenoide mai importante sunt prezentate în figura 1.12.

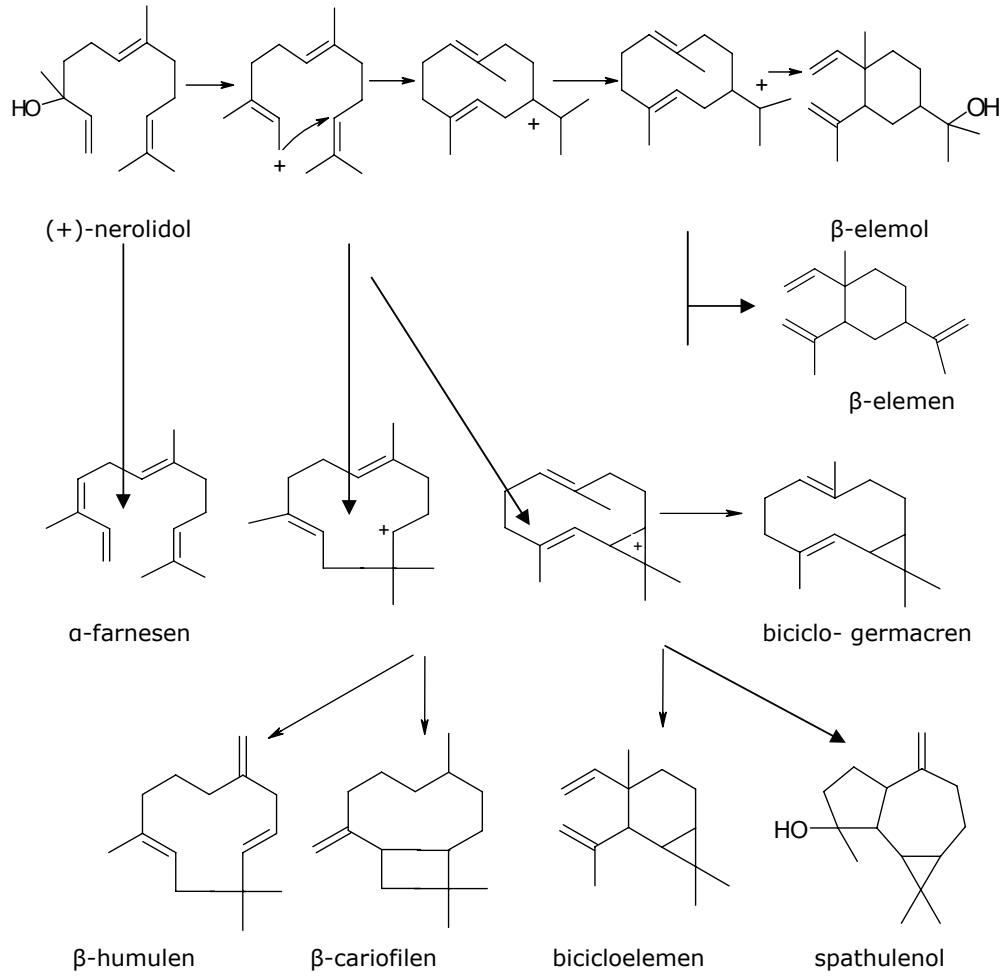
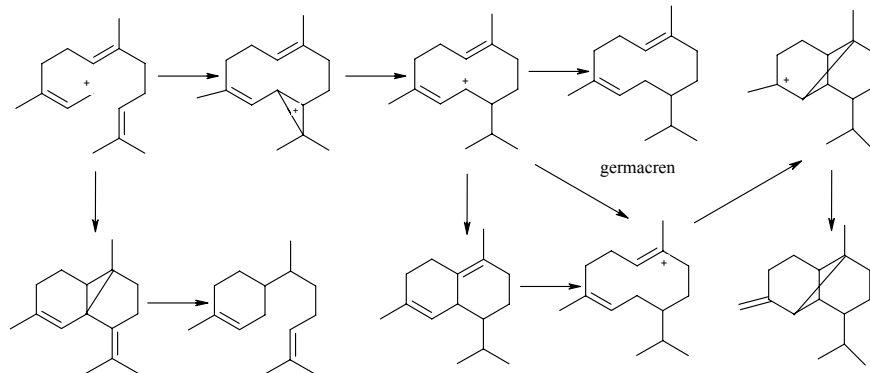


Figura 1.12. - Biosinteza sesquiterpenelor ciclice din 2-trans-6-trans-farnesilpirofosfat



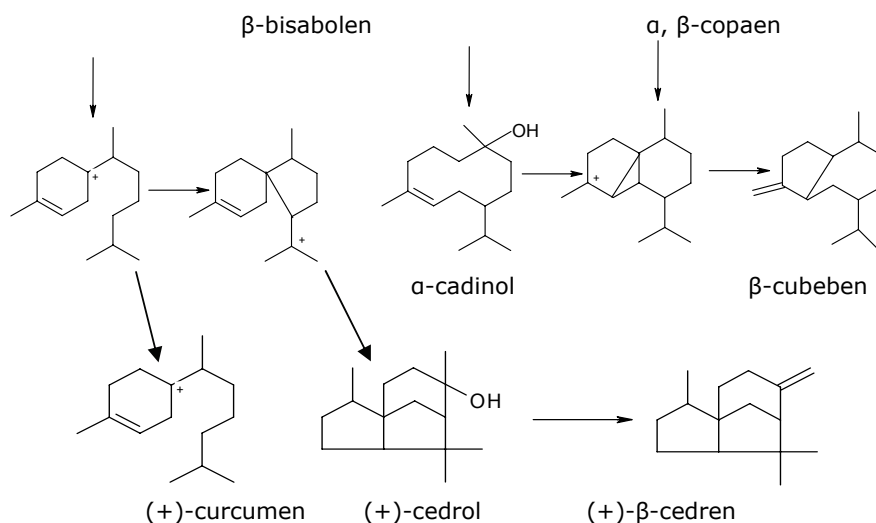


Figura 1.13. - Biosinteza sesquiterpenoidelor ciclice din 2-cis-6-trans-farnesilpirofosfat [6]

În același mod se realizează și biosinteza diterpenelor prin condensarea a două molecule de geranilpirofosfat, cu obținerea geranilgeranilpirofosfatului, ce conduce la fitol prin dehidrogenare, sau la vitamina A prin ciclizare parțială.

Condensarea a două molecule de farnesilpirofosfat conduce la obținerea squalenului, o triterpenă, iar prin ciclizări ale acestuia rezultă sterolii. Mergând mai departe cu condensarea rezultă tetraterpenoide și apoi politerpenoide.

În continuare sunt prezentate câteva scheme generale de obținere prin sinteză totală sau semisinteză (din compuși naturali) a principalilor odoranți-aromatizanți terpenici sau neterpenici.

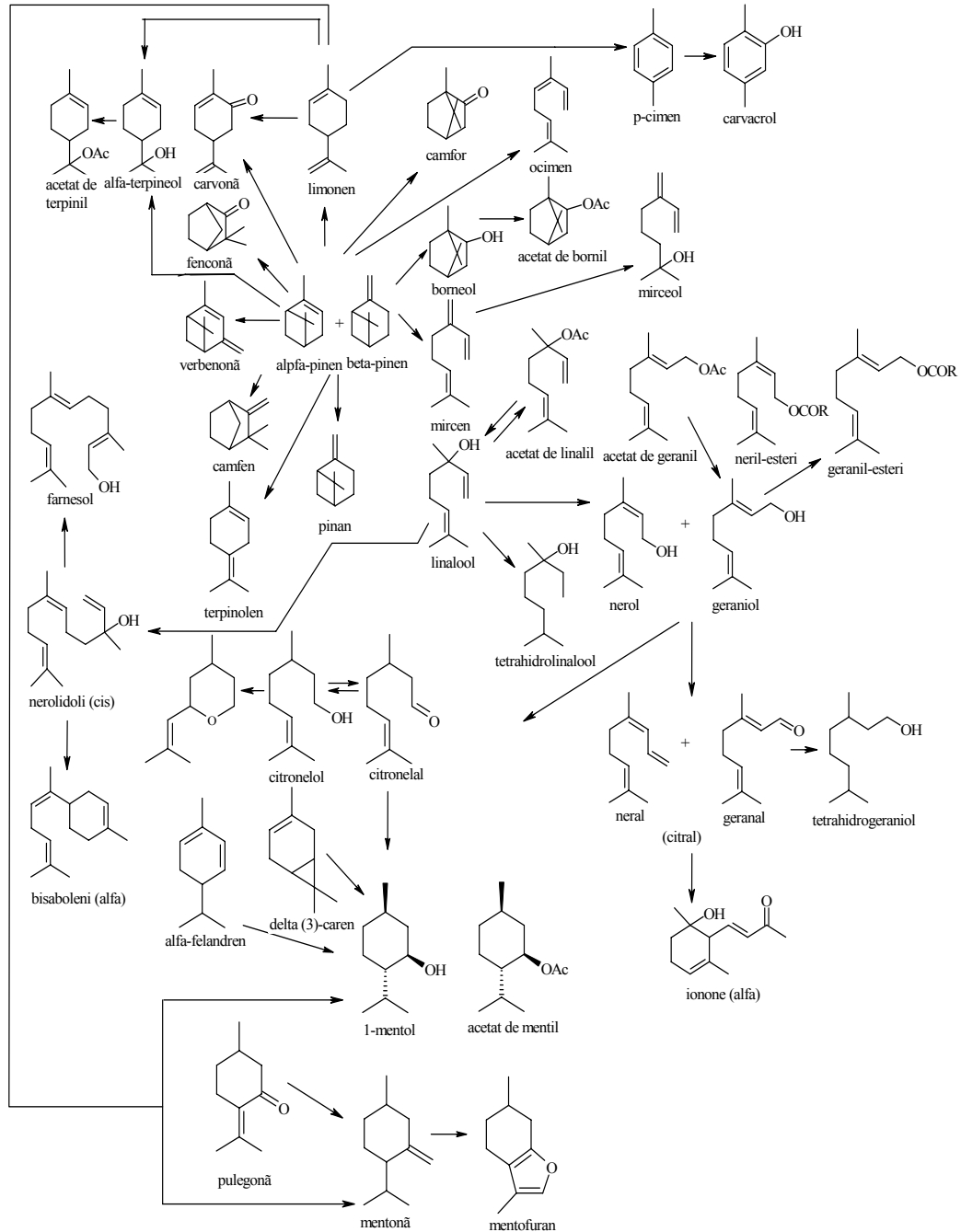


Figura 1.14. - Semisinteza unor compuși odoranți pornind de la piniene [6]

I. 3. Rolul compușilor terpenoidici în plante

I.3.1. Activitatea antioxidantă a compușilor terpenoidici

Un interes deosebit îl manifestă cuantificarea antioxidantilor și determinarea capacității antioxidante pentru compuși aplicați în diverse domenii. Aplicațiile antioxidantilor sunt foarte diversificate în domeniul industrial pentru a preveni degradarea oxidativă a polimerilor, autooxidarea lipidelor, decolorarea pigmentilor naturali și sintetici, ș.a.

Studiile arată că antioxidanții au un rol însemnat și în blocarea stresului oxidativ ce poate cauza ateroscleroza, diabetul, inflamațiile cronice, probleme neurodegenerative și câteva tipuri de cancer. Antioxidanții naturali, în particular din fructe și legume, au câștigat un interes însemnat în cazul consumatorilor și a comunității științifice deoarece, conform studiilor epidemiologice, consumarea frecventă a antioxidantilor naturali este asociată cu un risc scăzut de boli cardiovasculare și cancer. Efectele defensive a antioxidantilor naturali din fructe și legume sunt în legătură cu trei grupe majore: vitamine, fenoli și carotenoide. Acidul ascorbic și fenolii sunt cunoscuți ca antioxidanți hidrofilici în timp ce carotenoidele sunt antioxidanți lipofilici [8].

În industria alimentară, antioxidanții sunt definiți ca acele substanțe care în concentrații mici (în organisme umane cu funcții fiziologice normale) sunt capabile să prevină sau să scadă efectele adverse ale compușilor reactivi, cum sunt compușii reactivi cu oxigen sau cu azot (ROS/RNS). Nu toți reducătorii implicați într-o reacție chimică sunt antioxidanți ci doar acei compuși care sunt capabili să protejeze componentul țintă de oxidare.

În general, antioxidanții sunt definiți ca substanțe care în concentrații mici pot întârzia sau preveni oxidarea substratelor oxidabile.

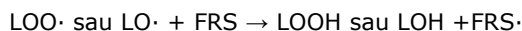
Mecanismele antioxidante prezintă următoarele caracteristici: (1) sunt bariere fizice de prevenire a ROS, de generare sau de acces la importante sit-uri biologice ca de exemplu filtre UV, membrane celulare; (2) sunt compuși chimici care „absorb” energie și electroni, ROS de revenire, cum sunt: carotenoidele, antocianidinele; (3) sunt sisteme catalitice ce neutralizează sau dispersează ROS, de exemplu enzimele antioxidante *superoxid dismutaza*, *catalaza* și *glutathion peroxidaza*; (4) produc inactivarea ionilor metalici pentru a preveni generarea ROS, ca de exemplu feritina, ceruloplasmina, catechinele și (5) sunt antioxidanți de fragmentare a moleculei ce elimină și distrug ROS, cum sunt acidul ascorbic (vitamina C), tocoferolii (vitamina E), acidul uric, glutathionul, flavonoidele.

În literatură au fost testate multe metode și s-au discutat avantajele și limitele acestora. Pentru estimarea eficienței antioxidantilor sintetici sau naturali, se remarcă și metoda FRAP (Ferric ion reducing antioxidant power assay) și metoda bazată pe generarea și captarea de radicali DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) [9]. Se pare că nu s-a ajuns la descrierea celei mai bune metode care face referire la capacitatea antioxidantă totală și care să înlăture și următoarele probleme: determinarea numai a antioxidantilor hidrofilici, stabilirea finalului reacției, sensibilitatea inițiatorilor sau a probelor, posibila interferență între componentele probelor alimentare sau biologice și utilizarea standardelor care pot cauza dificultăți în compararea rezultatelor.

Activitatea antioxidantă și capacitatea antioxidantă sunt termeni care se interpun, deși au sensuri diferite [10]. „Activitatea” ar fi lipsită de sens dacă nu se iau în considerare presiunea și temperatura. Capacitatea antioxidantă oferă

informații despre durată, în timp ce activitatea antioxidantă descrie startul acțiunii antioxidante. Capacitatea antioxidantă în domeniile alimentar și biologic este afectată de mai mulți factori, factori ce includ proprietățile de diferențiere a antioxidantilor din fazele apoase și lipidice, condițiile de oxidare și starea fizică a substratului oxidabil [11]. De exemplu, protecția antioxidantă se modifică semnificativ în funcție de substratul folosit. Când este utilizată emulsie de acid linoleic, ca substrat, α -tocoferolul prezintă o mai bună protecție în comparație cu Trolox (acid 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilic).

Un antioxidant poate împiedica reacțiile radicalice prin eliminarea ROS/RNS și se numește antioxidant primar de rupere a legăturii sau eliminator de radical liber (FRS). Sau, un antioxidant poate inhiba reacțiile de oxidare și este denumit antioxidant secundar sau preventiv. Prezența în cantități mici a antioxidantilor primari poate întârzia sau inhiba radicalii liberi, iar radicalii peroxil sau alcoxil vor împiedica inițializarea și propagarea reacțiilor. Acești antioxidanți sunt capabili să primească radicali peroxil ($\text{LOO}\cdot$) sau alcoxil ($\text{LO}\cdot$) pentru oxidarea speciilor lipidice, conform reacției:

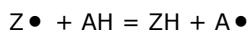


Eficiența antioxidantului este dependentă de abilitatea FRS de a dona un hidrogen radicalului liber. Abilitatea unui FRS de a dona hidrogen unui radical liber depinde de potențialul reducător al unui electron. Potențialul reducător al unui FRS trebuie să fie mai mic de 600mV și corespunde potențialului reducător al acizilor grași polinesaturați care întâlnesc un antioxidant.

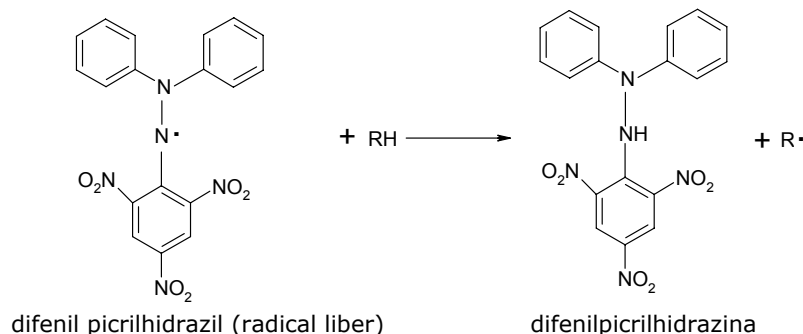
Antioxidanții de prevenire (*superoxid dismutaza, catalaza și peroxidaza*) împiedică formarea radicalilor. Există multe căi de prevenire a oxidării, căi ce includ chelarea metalelor, desactivarea oxigenului singlet, detoxifierea enzimatică ROS, filtrarea UV, inhibarea enzimelor prooxidante, prin cofactorii enzimatici antioxidanți, ș.a [12]. Chelatorii metalelor sunt antioxidanți preventivi prin complexarea cu ionii metalelor tranzitionale, respectiv sunt întârziate reacțiile de inițiere a reacțiilor catalizate de metalele respective și descompunerea hidroperoxizilor lipidici. Alte mecanisme antioxidante includ: eliminarea oxigenului singlet, înlăturarea oxigenului și blocarea efectelor prooxidante prin legarea unor proteine ce conțin metale catalitice [11,13].

I.3.1.1. Metoda bazată pe generarea și captarea de radicali DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

Molecula de DPPH este un radical liber, stabil datorită delocalizării electronilor din moleculă. Delocalizarea provoacă o modificare a culorii în violet cu maximum de absorbție la 520nm. Când o soluție de DPPH reacționează cu un antioxidant care poate dona un proton se obține o formă stabilă a DPPH-ului cu virarea colorației de la violet la galben-pal [7]. Dacă notăm radicalul DPPH cu $\text{Z}\cdot$ și molecula donoare de proton cu AH, prima reacție poate fi de forma:



unde ZH - este forma redusă, iar $\text{A}\cdot$ - este radicalul liber format prin intermediul acestei reacții.



[14]

Metodele ce utilizează ABTS-ul (acid 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic)) sau DPPH-ul (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) ca și captatori de radicali (*scavenging*) sunt metode spectrofotometrice folosite pentru determinarea capacității antioxidante pentru produse alimentare (sucuri, vinuri, infuzii de plante) [15] și compuși chimici. Acești radicali cromogeni liberi și stabili (radicalul violet de DPPH și radicalul anionic albastru-verzui de ABTS) sunt relativ accesibili, prezintă o sensibilitate ridicată și permit analizarea unui număr mare de probe în timp relativ scurt [8].

Radicalul DPPH este un radical organic al azotului și are culoarea puternic purpurie. Este disponibil în comerț și nu trebuie să fie generat anterior experimentului. Această metodă presupune reducerea radicalului cromogen purpuriu de către compușii antioxidanți/reducători la hidrazina corespunzătoare, de culoare galben-pal. Capacitatea reducătoare a antioxidantilor față de DPPH, poate fi evaluată prin rezonanța spinului electronic sau prin monitorizarea scăderii absorbanței la 515-528nm, până când absorbanta rămâne stabilă în mediile organice. Procentul de DPPH (%DPPH_{rămas}) rămas este calculat după cum urmează:

$$\%DPPH_{\text{rămas}} = 100 \times \frac{[DPPH]_{\text{rămas}}}{[DPPH]_{t=0}}$$

%DPPH_{rămas} este proporțional cu concentrația antioxidantului, iar concentrația ce duce la scăderea concentrației inițiale de DPPH cu 50%, este definită ca fiind EC₅₀. Timpul necesar atingerii stării finale, cu EC₅₀, este definit ca fiind T_{EC50}.

Pe baza valorilor T_{EC50}, comportamentul cinetic al antioxidantului este clasificat după cum urmează: <5min (rapid), 5-30min (intermediar) și >30min (lent).

Un parametru similar și nou este „eficacitatea de înlăturare a radicalului (RSE)”, care combină activitatea de înlăturare în funcție de cantitatea de radicali anihilați și rata inițială de înlăturare. RSE este calculat ca fiind raportul dintre rata inițială de îndepărtare (obținută pe durata primului minut) și valoarea EC₅₀. Principala limitare a determinării este aceea că procentul de radical eliminat este dependent de concentrația inițială a radicalului DPPH.

Avantaje

Metoda cu DPPH este simplă și rapidă din punct de vedere tehnic și necesită un spectrofotometru de UV-VIS, motiv ce explică utilizarea la scară largă, în determinarea capacității antioxidante.

Dezavantaje

Există câteva impedimente care limitează aplicarea acestei metode. DPPH-ul poate fi dizolvat doar în medii organice (în special în medii alcoolice) și nu în medii apoase, ceea ce constituie o limitare importantă în interpretarea rolului antioxidantilor hidrofili. Deși utilizată la scară largă pentru măsurarea și compararea stării antioxidante a compușilor fenolici și probelor din alimente, evaluarea capacității antioxidante în funcție de modificările absorbției DPPH-ului ar trebui apreciată cu atenție, din moment ce absorbția radicalului DPPH la 517nm după reacția cu un antioxidant este influențată de lumină [16], oxigen și tipul de solvent. S-a concluzionat că peste o anumită limită a conținutului de apă în solvent, capacitatea antioxidantă a scăzut, deoarece o parte din DPPH coagulează și nu este accesibil cu ușurință reacției cu antioxidanții [17].

La început, s-a crezut că metoda DPPH era o reacție cu transfer de hidrogen, însă studii recente au dovedit contrariul [10]. Transferul inițial de electroni, etapă determinantă a vitezei de reacție, survine foarte repede, în schimb transferul ulterior de hidrogen, are loc foarte lent și depinde de solventul neutru ce acceptă legătura de hidrogen, ca de exemplu metanolul și etanolul. În plus impuritățile bazice și acide din solvent pot influența echilibrul de ionizare al fenolilor determinând o reducere sau o accelerare a constantelor vitezei măsurate [10, 13].

1.3.1.2. Metoda decolorării cationului ABTS^{•+}

Conform acestei metode se adaugă un antioxidant la soluția radicalului preformat al acidului 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic) ABTS și după o perioadă fixă de timp cantitatea rămasă de ABTS^{•+}, cromofor albastru/verde, este cuantificată spectrofotometric la 734nm [18]. Mărima (extensia) depolarizării este calculată ca procent din absorbția redusă. Metoda necesită trasarea unei curbe de etalonare pentru domeniul de concentrație al ABTS^{•+} între 0,033-0,33mM.

Concentrația ABTS^{•+} (în mM) în reacție este calculată din curba de calibrare cu relația:

$$\text{Absorbanta } (\lambda_{734}) = 2,5905 \times [\text{ABTS}^{\bullet+}]$$

iar capacitatea de captare a radicalilor pentru compușii testați cu formula:

$$\text{Captarea ABTS}^{\bullet+} (\%) = \left(1 - \frac{\lambda_{734-S}}{\lambda_{734-C}} \times 100\right)$$

unde: λ_{734-S} reprezintă absorbția probei de control lipsită de captatori de radicali;

λ_{734-C} reprezintă absorbția ABTS^{•+} rămas în prezența captatorului.

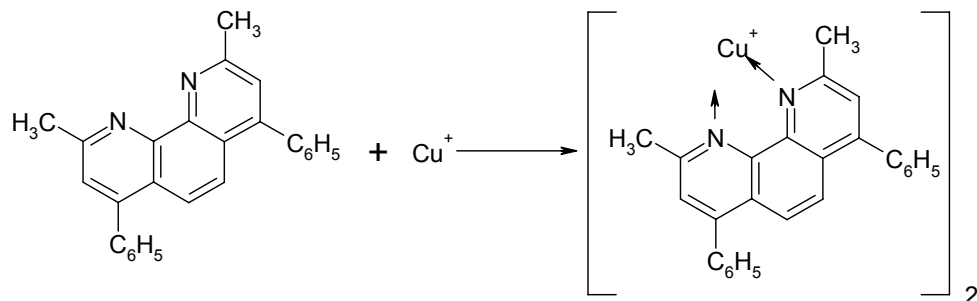
Una dintre metodele cele mai folosite de determinare a activității antioxidante a extractelor vegetale, metoda poate fi aplicată atât pentru compușii hidrofili cât și pentru cei lipofili.

I.3.1.3. Metoda FRAP (*Ferric ion reducing antioxidant power assay*)

Metoda FRAP se bazează pe capacitatea de a reduce complexul galben feric tripiridiltriazina (Fe(III)-TPTZ) la complexul albastru feros (Fe(II)-TPTZ) prin acțiunea antioxidantilor donori de electroni. Culoarea albastră rezultată, determinată spectrofotometric la 593nm nu este considerată ca fiind liniară comparativ cu capacitatea reducătoare totală a antioxidantilor donori de electroni. Sarea ferică este utilizată ca și un oxidant, iar potențialul său redox (<0,70V) este comparabil cu cel al ABTS-ului (0,68V). Prin urmare, în mod esențial, nu există o mare diferență între metoda TEAC și metoda FRAP, cu excepția faptului că, metoda TEAC se realizează la un pH neutru, pe când metoda FRAP necesită condiții acide (valoare scăzută a pH-ului nonfiziologic pH=3,6), pentru a menține solubilitatea fierului. O unitate FRAP este definită ca fiind reducerea unui mol de Fe(III) la Fe(II).

I.3.1.4. Metoda potențialului antioxidant total utilizând Cu(II) ca antioxidant (*Total Antioxidant Potential Assay Using Cu(II) as an Oxidant*)

Metoda este bazată pe reducerea Cu(II) la Cu(I), de către reducătorul (antioxidantul) prezent în probă. În varianta inițială, batocuproina (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina)



formează cu Cu(I) un complex 2:1, un cromofor cu absorbanta maximă la 490nm.

Metoda CUPRAC [21] folosește ca oxidant cromogen reactivul neocuproina Cu(II). Aceasta implică amestecarea soluției antioxidantului (direct sau după hidroliza acidă) cu soluție de CuCl₂, neocuproină și acetat de amoniu la pH 7 și măsurarea absorbantei la 450nm, după 30 minute.

Pentru a-și manifesta întreaga capacitate antioxidantă, glicozidele flavonoidice trebuie hidrolizate la agliconii lor corespunzători. Pentru antioxidantii care reacționează cu viteză mai mică este necesară creșterea temperaturii de incubare în vederea oxidării lor complete cu reactivul CUPRAC.

Avantaje

Valorile CUPRAC sunt comparabile cu valorile TEAC pentru polifenoli, întrucât valorile FRAP sunt în mod considerabil mai mici. Datorită potențialului redox mai mic al reactivului CUPRAC, zaharurile reducătoare și acidul citric – care nu sunt antioxidanți adevărați, însă sunt substraturi oxidabile în alte metode similare, de exemplu în metoda FRAP – nu sunt oxidate cu reactivul CUPRAC. În același timp,

potențialul redox scăzut îmbunătățește ciclul redox, astfel încât reducerea cuprului poate fi un indicator și mai sensibil al activității peroxidante a antioxidanților.

Alte avantaje ale metodei CUPRAC față de alte metode similare sunt:

- a) reactivul CUPRAC este suficient de rapid pentru a oxida antioxidanți de tipul tiolilor, precum glutationul;
- b) reactivul este mai stabil și mai accesibil decât alți reactivi cromogeni (de exemplu, ABTS; DPPH);
- c) este implicat ușor și în mod divers în laboratoarele unde se efectuează teste de rutină;
- d) curbele absorbantei versus curbele concentrației, sunt liniare pe un interval larg, spre deosebire de cele ale altor metode în urma cărora se obțin curbe polinomiale
- e) reacția redox, în urmă căreia rezultă soluții colorate, se efectuează la pH neutru, spre deosebire de condițiile acide ale metodei FRAP (pH=3,6) sau condițiile bazice ale metodei Folin-Ciocalteu (pH=10);
- f) metoda poate măsura concomitent antioxidanții hidrofilii și lipofili (spre deosebire de FCR sau DPPH).

Metoda CUPRAC poate fi realizată în câteva minute pentru acidul ascorbic, acidul uric, acidul galic și quercetină, însă necesită 30-60 minute pentru moleculele complexe.

Dezavantaje

Metodele de reducere a cuprului prezintă probleme similare cu un amestec complex de antioxidanți, în ceea ce privește selectarea unui timp de analiză adecvat [13].

I.3.1.5. Metoda care determină inhibarea autooxidării induse a lipidelor

Această metodă induce artificial autooxidarea acidului linoleic, a particulelor LDL (lipide cu densitate joasă) sau a proteinelor serice, fără o izolare prealabilă a particulelor LDL. Se realizează, fie printr-un element de tranziție, cum ar fi Cu(II), fie prin descompunerea termică a AAPH (2,2-azobis(2amidinopropane)). AAPH este un inițiator ROO[·] solubil în apă și peroxidează componentele lipidice prin formarea dienelor conjugate, determinate spectrofotometric la 234nm. Utilizarea AAPH-ului ca generator al radicalului peroxil, se preferă, în defavoarea Cu(II), deoarece acesta prezintă o asemănare cu reacțiile oxidative din sistemele biologice [17]. Practic, trei mecanisme sunt implicate în activitatea antioxidantă a LDL: activitatea împotriva radicalilor liberi, legarea la situri critice pe LDL și chelarea metalului. În general, oxidarea *in vitro* a LDL, a fost utilizată în mod eficient în mai multe cercetări, pentru a caracteriza capacitatea antioxidantă a unui număr de produse fitochimice.

I.3.1.6. Metoda cu chemiluminescență

Principiul general al acestor metode se bazează pe capacitatea luminolului și a compușilor asemănători, de a emite lumină sub acțiunea radicalilor liberi (chemiluminescență, CL) [20]. Această reacție produce o emisie de lumină cu intensitate redusă, care se poate descompune rapid. Adăugarea *p*-iodofenolului oferă o emisie mai intensă, prelungită și stabilă, a luminii. Emisia luminii este perturbată de antioxidanți, dar va fi restabilită atunci când toți antioxidanții adăugați au fost epuizați. Surse oxidante de radicali peroxil, includ enzima peroxidază din

hreon și H_2O_2 -hemina. Luminolul este cel mai utilizat compus marker, la scară largă, pentru a capta antioxidanții și pentru a converti emisiile slabe în emisii stabile, prelungite.

Adăugarea antioxidantului probei, aduce o fază lag CL (intervalul de timp în care emisia CL nu a fost monitorizată). Amploarea fazei lag (faza de latență) a fost direct legată de concentrația antioxidantului sau rezultă la scăderea emisie CL, exprimată ca procent de inhibare [18].

I.3.1.7. Metoda cu fotochemiluminescență

Această metodă presupune generarea fotochimică a radicalilor liberi superoxid $O_2^{\cdot-}$, combinat cu detectarea CL. Excitația optică a unui fotosensibilizator, are ca rezultat generarea radicalului superoxid. Radicalii liberi sunt monitorizați cu un reactiv CL. Luminolul se comportă ca un fotosensibilizator, precum și ca un reactiv de detectare a radicalului oxidic.

I.3.1.8. Metoda capacității oxidante totale

Metoda TOSC se bazează pe oxidarea acidului α -ceto- γ -metilbutiric (KMBA) la etilenă, prin radicali peroxil furnizați către AAPH. Capacitatea antioxidantă a unei molecule este cuantificată prin capacitatea sa de a inhiba formarea etilenei în comparație cu o probă etalon. Durata formării etilenei este urmărită gaz cromatografic (GC) headspace [21].

Abordarea pentru cuantificarea capacității antioxidante este bazată pe suprafața curbei ce reprezintă inhibarea formării etilenei, ca o funcție de timp și care poate fi până la 300 minute.

Această metodă evidențiază o problemă importantă în ceea ce privește posibilitatea de a evalua antioxidanți diferiți, din diferite surse biologice relevante, radicali peroxil, radicali hidroxil, generați din reacția fierului și ascorbatului, precum și peroxinitritul obținut din 3-morfolinozidonimină *N*-etilcarbamidă [21]. De exemplu, glutationul redus era un agent eficient de înlăturare a radicalilor peroxil, însă un agent relativ slab de înlăturare a radicalilor hidroxil și peroxinitril. Acidul uric, Trolox-ul și acidul ascorbic au fost agenți de înlăturare comparabili, pentru radicalii peroxil și peroxinitric. Metoda TOSC este utilă și robustă, în ceea ce privește diferențierea reactivității unor oxidanți și capacitatea relativă a antioxidanților de a înlătura acești oxidanți [21].

I.4. Chimia terpenelor

I.4.1. Structura chimică, clasificare și proprietăți

Terpenoidele pot fi împărțite în cinci grupe principale (figura 1.14): (1) monoterpene bi- și triciclice - $C_{10}H_{16}$ (camfene, α -fencene, triciclen, etc.); (2) monoterpene alcoolice biciclice - $C_{10}H_{18}O$ (isomerii borneolului, fenholi, hidrații camfenului, etc.); (3) *p*-mentadiene monociclice - $C_{10}H_{16}$ (limonen, terpinolen, α - și γ -terpineni, etc.); (4) *p*-mentenoli monociclici - $C_{10}H_{18}O$ (izomerii α -, β - și γ -terpineoli, 4-terpineoli, etc.); și (5) *p*-mentadioli monociclici - $C_{10}H_{20}O_2$ (1,8- și 1,4-terpine, etc.).

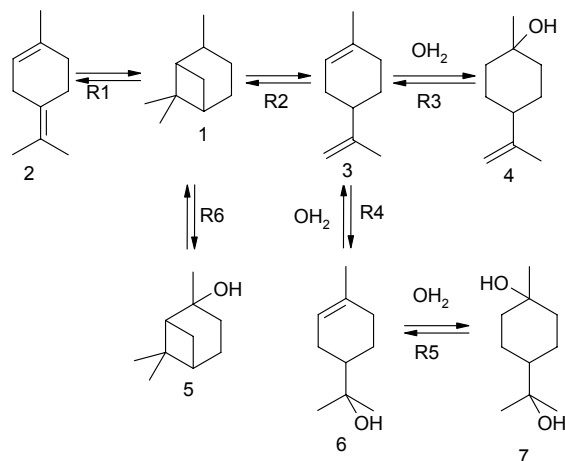
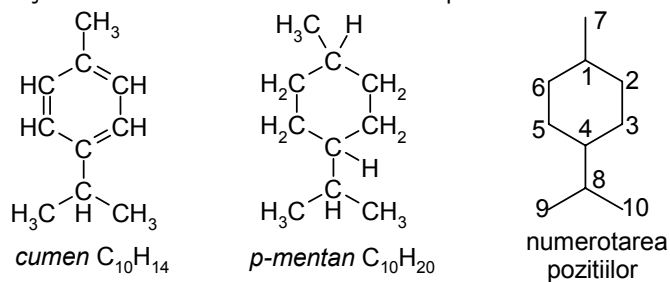


Figura 1.15. - Reprezentarea simplificată a reacțiilor de hidratare și izomerizare ale α -pinenului (1 - α -pinen; 2 - terpinolen; 3 - limonen; 4 - β -terpineol; 5 - pinan-2-ol; 6 - α -terpineol; 7 - 1,8-terpin) [22]

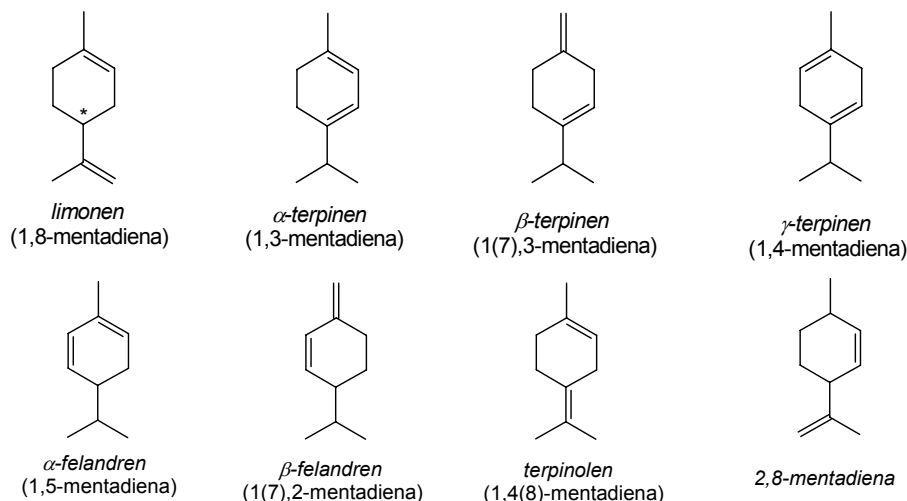
Monoterpenoide monociclice

Hidrocarburi

Compușii din această clasă conțin același schelet ca p-cimenu (p-metil-izopropil benzenul) sau ca p-mentanul (1-metil-4-izo-propilciclohexanul). p-Mentanul servește ca bază a nomenclaturii monoterpenoidelor monociclice.



Terpenii monociclici din natură au toți formula $C_{10}H_{16}$ și sunt mentadiene. Sunt posibile 14 mentadiene dintre care se întâlnesc în lumea vegetală șapte compuși iar cel de-al optulea (β -terpinenul) însoțește probabil întotdeauna α -terpinenul.



(+) Limonenul împreună cu pinenul (monoterpenoid biciclic) sunt printre terpenii cei mai răspândiți. Se izolează din uleiul de coji de portocale și lămâi, din uleiul de bergamot, de chimen, de țelină. (-) Limonenul se găsește în uleiul de ace de brad și de molid, uleiul de mentă rusească și în unele uleiuri de terebentină, iar (+) limonenul (numit și dipenten) în uleiul de camfor, de bergamot, etc. Cei doi izomeri, optic activi, au miros de lămâie [23].

D-limonenul este o monoterpenă naturală ce prezintă, conform studiilor preclinice, o pronunțată activitate chemoterapeutică și o toxicitate minimă. Un studiu clinic al pacienților cu o fază avansată a cancerului la sân a început cu faza I ce face referire la toxicitate, doza maximă tolerată și farmacocinetica, urmată de o evaluare a fazei II.

Interesul cu privire la acest compus, considerat ca fiind un potențial agent chemoterapeutic în cancer, a fost stimulat printr-o pronunțată eficacitate chemopreventivă și chemoterapeutică în tumoarea spontană și carcinogenă indusă la animale de laborator cu o toxicitate extrem de mică. Administrarea în dietă a D-limonenului a dus la creșterea latenței tumorii în etapa progresivă. Cu N-metil-N-nitrozuree (NMU) a fost indusă la șobolani tumorigeneza, iar în etapele de inițiere și de progres cu 7,12-dimetilbenz-(a)antracen (DMBA) s-a indus carcinogeneza. La șobolani la care s-au folosit carcinoamele NMU și DMBA și la care li s-au administrat apoi 10% D-limonen în dietă, s-a constatat un regres al tumorii de 80%; la majoritatea subiecților regresia sunt complete și toxicitatea este minimă.

La subiecții umani și alte câteva specii de mamifere, pe cale orală D-limonenul este complet absorbit și suferă biotransformare în metaboliți activi. Metaboliții predominanți de circulare, acidul perilic, dihidroperilic și limonen-1,2-diol, folosiți ca inhibitori ai proliferării celulare, au un potențial farmacologic mai mare *in vitro* decât compusul principal.

D-limonenul prezintă o toxicitate mică după doze repetitive administrate timp de 1 an la pacienții cu formă avansată de cancer [24].

D-limonenul este o monoterpenă și anume ca geranil-pirofosfat ce poate fi găsit în coaja de portocală și în alte uleiuri esențiale de plante. Este unul dintre puținii compuși cunoscuți care are atât activitate antitumorală *in vivo* cât și de

inhibare a proteinei izoprenilate. D-limonenul prezintă activitate chemopreventivă în cazul tumorilor la ficat și plămâni induse chimic la șobolani.

Terpena, limonen, este preponderent o sursă din interiorul plantelor, iar concentrații mari pot fi obținute în absența oxidanților [25, 26].

Prezența antioxidantului, D-limonen (58%) în frunzele de *P. tomentosa* poate oferi o explicație în ceea ce privește proprietatea hepatoprotectoare a extractului.

Limonenul este consumat în mod predominant ca ingredient prin intermediul alimentelor tradiționale, cum sunt: citricele, morcovii, cafeaua, portocalele și condimentul nucșoară. Investigațiile cu privire la activitățile biologice ale D-limonenului au atribuit o proprietate antioxidantă compusului. D-limonenul este cunoscut prin faptul că induce glutatona (faza II de detoxificare) în ficatul șobolanilor.

Efectul de protejare al enzimelor mitocondriale poate fi atribuit prezenței limonenului din moment ce acesta induce activitatea *glutathion peroxidazei* și protejează împotriva formării radicalilor liberi [27].

Limonenul este considerat ca stabilizator al compușilor de aromă: citralul și aldehida cinamică. Limonenul este folosit în numeroase sinteze, printre care și sinteza compușilor biologici activi, împreună repelenți împotriva țânțarilor [28].

α -Terpinenul se găsește amestecat cu γ -terpinen și poate cu puțin β -terpinen, în unele uleiuri eterice (maghiran, coriandru). Amestecul celor doi terpineni, α și γ se poate obține și prin semisinteză din alți terpeni. Terpinenii nu conțin atomi de carbon asimetrici, deci nu sunt optic activi.

α -Felandrenul dextrogir a fost izolat din uleiul de *molură* (*Foeniculum vulgare*) iar α -felandrenul levogir se găsește în uleiul de *Eucalyptus amygdalina*. β -Felandrenul, în forma dextrogiră, a fost găsit în uleiul de mărăraș (*Phellandrium aquaticum*).

2,8-Mentadiena a fost izolată în stare impură din uleiul de *Chenopodium ambrosioides*.

Monoterpenii ciclici sunt lichide, cu indice de refracție ridicat; unii au activitate optică.

Mentadienele au proprietățile chimice ale hidrocarburilor nesaturate adăunând hidrogen, halogen, acizi halogenați, apă, etc. Reacțiile de adiție pot avea loc la ambele duble legături. În cazul limonenului, când este atacată o singură dublă legătură, aceasta este cea extraciclică. De asemenea și hidrogenarea se produce selectiv în funcție de catalizator. În medii slab acide are loc izomerizarea mentadienelor ca urmare a migrării dublei legături.

Limonenul, mircenul, δ -cadinenul, farnesenul, β -cariofilenul și farnesenul au activitate antitumorală și unele dintre ele sunt utilizate în chemoterapie. Limonenul, mircenul, γ -terpinenul, *p*-cimenul și α -pinenul prezintă activitate antioxidantă [30,31]. Limonenul inhibă activitatea *acetilcolinesterazei*, proliferarea celulelor canceroase [31]. β -Felandrenul este un insecticid natural. Compușii cu schelet cadinan prezintă activitate antifungică. Prezența terpinen-4-olului determină un efect cardiovascular, activitate antiulceroasă și inhibarea activității *acetilcolinesterazei* [30,31]. S-a afirmat că activitate antifungică dezvoltată de uleiul esențial din frunze aciculare de *Juniperus oxycedrus* se datorează prezenței δ -3-carenului. De asemenea, acesta este implicat și în înlăturarea patogenilor din produsele alimentare respectiv a microorganismelor dăunătoare [32].

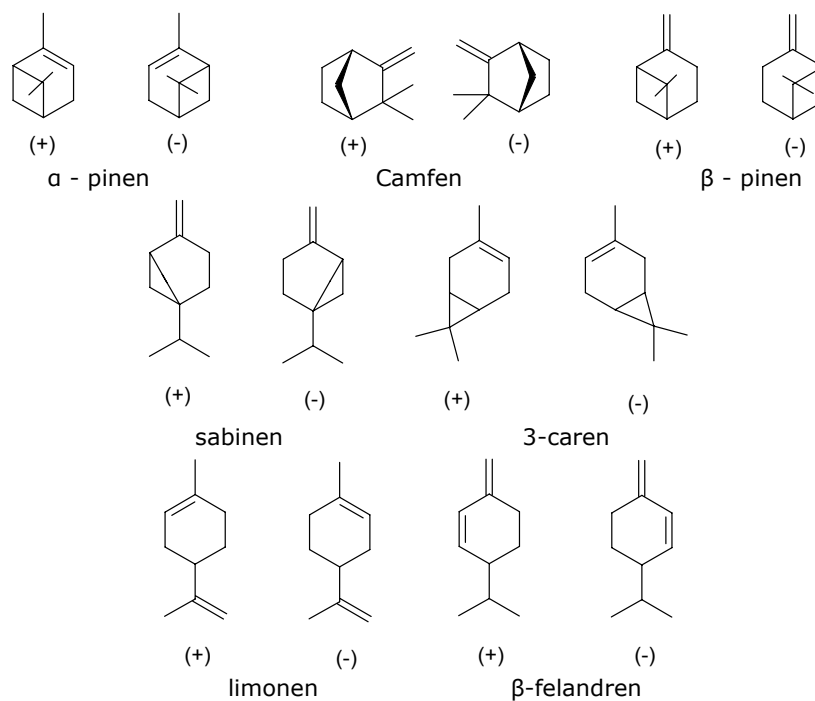
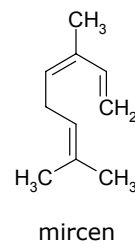
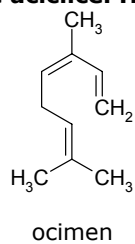


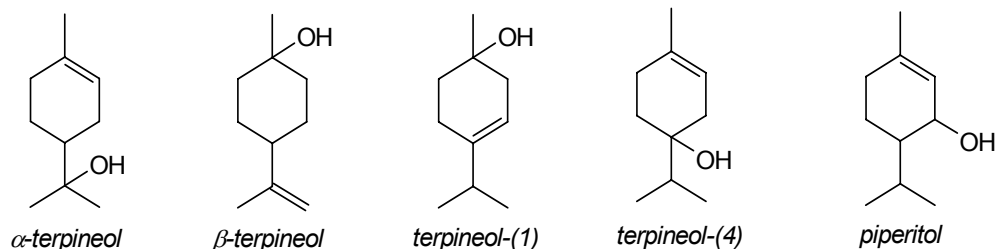
Figura 1.16. - Structura moleculară a perechilor enantiomere a unor monoterpene chirale [29]

Terpenoidele aciclice. Hidrocarburi



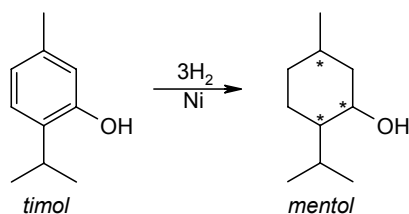
Alcooli, aldehide monoterpene monociclice

Din grupa terpenoidelor monociclice principalii alcooli $C_{10}H_{18}O$ cu o dublă legătură sunt următorii:

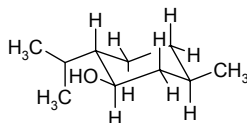


Principalii reprezentanți ai alcoolilor, aldehydelor din grupa monoterpenoidelor monociclice sunt: **α-terpineolul, terpinul, mentolul și mentona.**

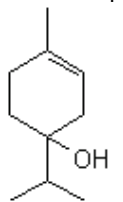
Mentolul. În natură se găsește numai **mentolul levogir.** Acesta este componenta principală a uleiului de izmă (*Menta piperita*) din care se izolează prin cristalizare, pe scară mare dat fiind necesarul pentru industria farmaceutică (anestezic și antiseptic local) și cosmetică (pasta de dinți). (-) Mentolul formează cristale cu p.f.=43⁰C. Prin oxidare cu acid cromic, (-) mentolul trece într-o cetonă (-) mentona. Se poate obține și prin sinteză, prin hidrogenarea catalitică a timolului când se obține un amestec de mentoli diastereoizomeri:



Mentolul are proprietățile chimice ale alcoolilor secundari; se oxidează la mentonă, formează esteri. Inelul ciclohexanic al mentolului are configurație scaun cu substituenții orientați ecuatorial:



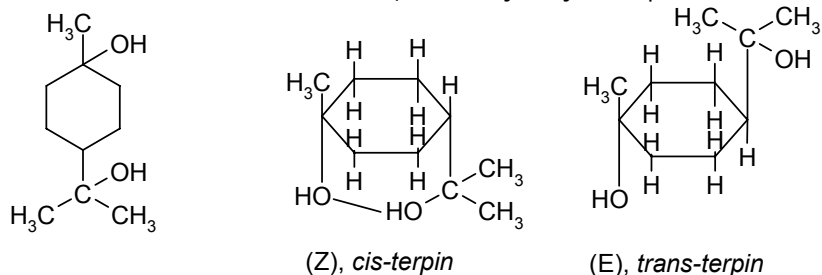
α-Terpineolul este un alcool cu miros puternic de liliac (folosit în parfumerie). A fost obținut prin sinteză dien din izopren și metil-vinil-cetonă.



terpineol-(4)

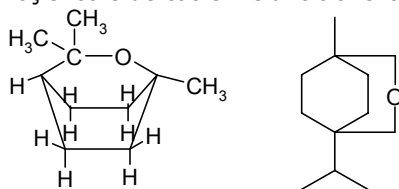
Terpinenul, 1,8-terpinenul, 1,8-dihidroximentanul este un glicol ce poate exista sub forma a doi izomeri, dintre care izomerul **cis** este cel mai stabil

datorită legăturii de hidrogen intramoleculare. Se obțin industrial prin tratarea pinenului sau direct a uleiului de terebentină, cu acizi și adăugare de apă.



Terpinenul este utilizat ca fluidifiant al secreției bronhice.

Prin deshidratarea **cis**-terpinenului rezultă un eter ciclic, eucaliptolul care determină adoptarea conformației baie de către inelul ciclohexanic:

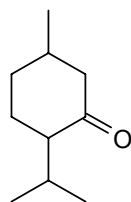


eucaliptol, cineol, 1,8-cineol

Ca toți eterii, **eucaliptolul**, care se extrage din uleiul de eucalipt este inert chimic, dar formează săruri de oxoniu cu acizii minerali. Se folosește ca antiseptic.

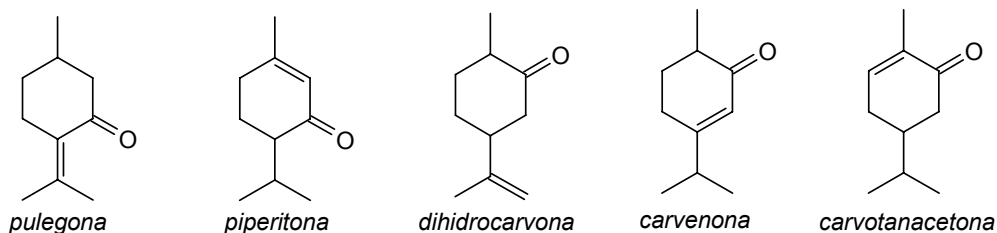
Cetone din grupa monoterpenoidelor monociclice

Cea mai cunoscută cetonă monoterpenoidă monociclică este **mentona** $C_{10}H_{18}O$ care în forma levogiră se găsește alături de (-) mentol și de limonen, în uleiurile de izmă (mentă) de diverse proveniențe.



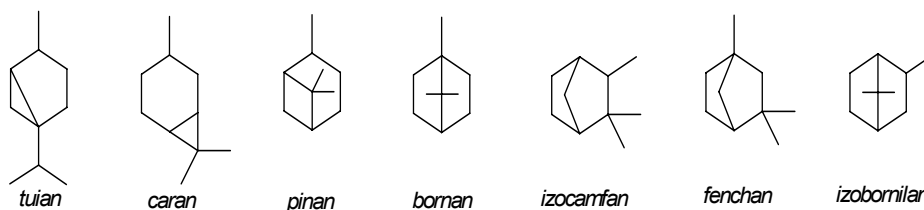
mentona

Reprezentanții cetonelor cu o singură dublă legătură, $C_{10}H_{16}O$ sunt următorii:



Monoterpenoide biciclice

După scheletul lor, monoterpenoidele biciclice se clasifică în șapte grupe mai importante, reprezentate prin următoarele hidrocarburi saturate (C₁₀H₁₈):

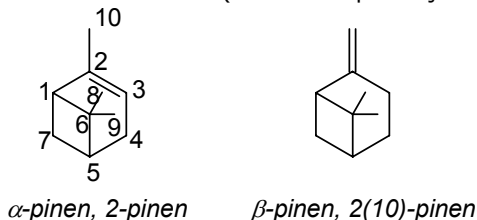


În tuian se recunoaște scheletul mentanului, cu o legătură suplimentară între pozițiile 2,4 prin care ia naștere un inel ciclopropanic. În caran, pinan și bornan, scheletul mentanului poate fi de asemenea recunoscut, restul izopropilic fiind implicat într-o punte intramoleculară, ceea ce dă naștere unor cicluri de trei, patru respectiv cinci atomi de carbon condensate cu inelul ciclohexanic.

Monoterpenii biciclici, propriu-ziși, C₁₀H₁₆, ce apar în natură diferă de sistemele ciclice de bază, de mai sus, prin prezența unei duble legături. Printre aceștia joacă un rol deosebit un monoterpen biciclic din grupa pinanului, **α-pinenul** caracterizat prin ușurința cu care se transformă într-un mare număr de terpenoide biciclice, monociclice, dar și aciclice și o cetonă **camforul** din grupa bornanului.

Grupa pinanului

Principalul reprezentant al clasei și în același timp cel mai răspândit dintre terpeni este **α-pinenul**. Acesta se găsește alături de **β-pinen**, în numeroase uleiuri eterice, în special în **uleiul de terebentină** (60-90% α-pinen și 5-20% β-pinen).



Uleiul de terebentină se obține prin distilarea cu vapori de apă a oleorezinei secretată la răzuirea cojii diverselor specii de conifere, în special pin. Reziduuul acestei distilări este o rășină, colofoniu sau sacăz.

Compoziția uleiului de terebentină variază cu specia botanică din care provine: terebentina franceză, din *Pinus pinaster*, conține α-pinen levogir; terebentina de origine greacă, rusă, suedeză, din *Pinus sylvestris*, conține α-pinen dextrogir [23].

Din datele de literatură se constată că α -pinenul prezintă proprietăți antimicrobiene și antifungice, iar împreună cu izomerul său, β -pinenul, au fost utilizați pentru sinteza feromonilor [30].

Atât α -pinenul cât și β -cariofilenul sunt utilizați ca agenți antimicrobieni, anestezici și antiinflamatori, în timp ce germacrenul D manifestă o varietate de activități în semnalul transmis insectelor, fiind folosit pentru protecția de insecte a cerealelor. Uleiurile esențiale ale *Pinus pinea* și *Bulpleurum frutescens*, a căror constituenți majori sunt α -pinenul și β -cariofilenul, sunt utilizate ca agenți antimicrobieni și antiinflamatori. Germacren D, β -cariofilen și biciclogermacren găsite în uleiurile esențiale ale unor specii *Stachys*, *Cedrela fissilis* și *Origanum dolichosiphon* au rolul de a împiedica dezvoltarea unor microorganisme [32].

Pentru α -pinen s-a demonstrat citotoxicitatea *in vitro* a celulelor umane la carcinomul hepatocelular Hep G2 [33].

Hidratarea α -pinenului este un proces multiplu și conduce la obținerea diverselor produse, printre care se numără α -terpineolul sau 1,8-terpina. În figura 1.17. sunt prezentați compușii rezultați din hidratarea și izomerizarea α -pinenului.

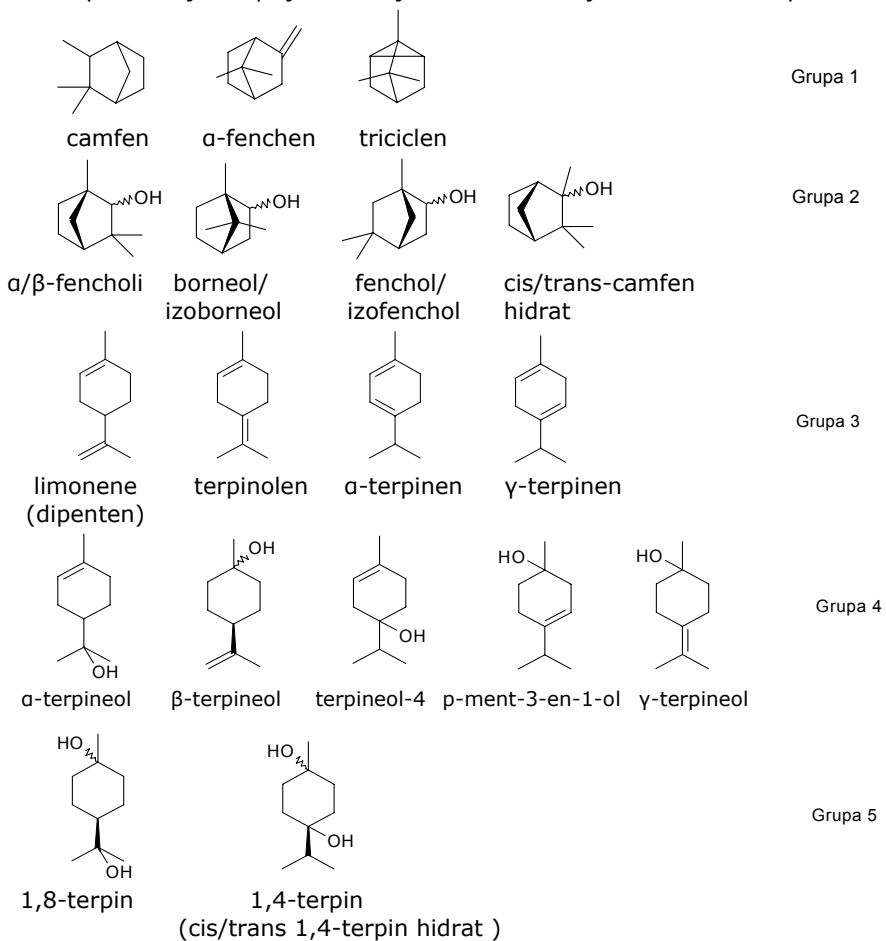
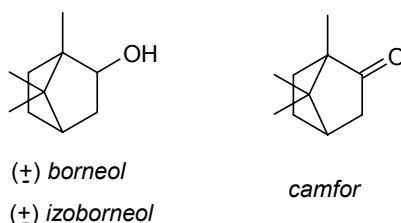


Figura 1.17. - Compușii rezultați din hidratarea și izomerizarea α -pinenului

Prima cale este cataliza acidă (rearanjamentul Wagner–Meerwein) care convertește scheletul biciclo[3.1.1]heptan al α -pinenului la derivații biciclo[2.2.1]heptan sau p-mentan. Produs final se obține în urma reacțiilor de izomerizare, respectiv hidratare, care sunt puternic dependente de condițiile experimentale și de stabilitatea termodinamică a compușilor [34].

Grupa bornanului

Dintre derivații bornanului, cei mai importanți sunt alcoolii izomeri, **borneolul** și **izoborneolul** și cetona biciclică **camforul**. În diferite uleiuri eterice se găsesc atât (+)-borneolul, (-)-borneolul cât și amestecul lor (\pm)-borneolul.



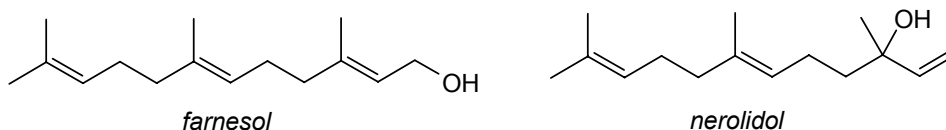
Camforul și ceilalți compuși din grupa bornanului au o punte izopropilidenică $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ - în poziția 1,4-**cis** a ciclohexanului în formă baie. Conformația 1,4-**trans** nu este posibilă.

Sesquiterpenoide

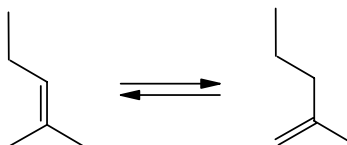
Sunt hidrocarburi cu formula $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$, mult răspândite în uleiurile eterice. Au aspectul unor uleiuri vâscoase. Există **sesquiterpeni monociclici** cu trei duble legături, **sesquiterpeni biciclici** cu două duble legături și **sesquiterpeni triciclici** cu o singură dublă legătură. În natură se întâlnesc de asemenea alcoolii și cetone ce derivă de la aceste hidrocarburi.

Sesquiterpene aciclice

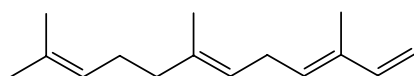
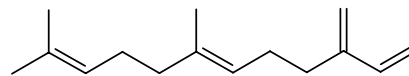
Farnesolul, alcool $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$ se găsește în uleiurile de flori, cum sunt uleiul de mărgăritărel, cel de flori de tei. Izomer cu farnesolul este **nerolidolul** care se găsește în uleiul de neroli și în balsamul de Peru. Pirofosfatul de farnesol este un intermediar în sinteza izoprenoidelor. Nerolidolul izomerizează în farnesol la încălzire cu anhidrida **nerolidol** acetică.



Farnesolul și nerolidolul există sub formă de izomeri izopropilidenici și izopropenilici, similar cu monoterpenoidele aciclice:

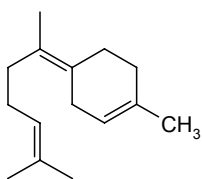
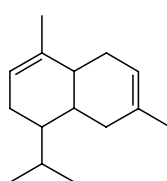
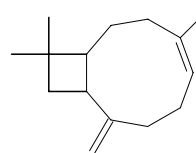


Farnesolul, izomerul β , se găsește în uleiul de hamei și rezultă la deshidratarea nerolidolului. Izomerul α se obține prin deshidratarea farnesolului (cu KHSO_4).

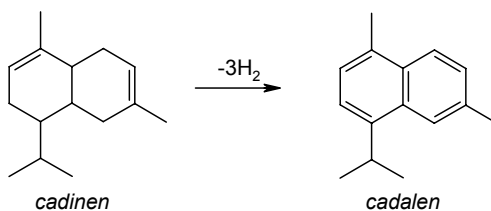
 *α -farnesen* *β -farnesen*

Sesquiterpene ciclice (mono-, di- și triciclice)

Bisabolenul $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$ alături de **cadinen** și **cariofilenă** sunt sesquiterpenii cei mai răspândiți din natură:

*bisabolen**cadinen**cariofilen*

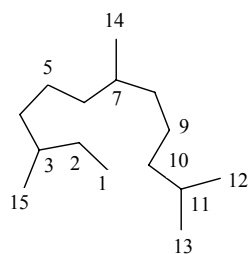
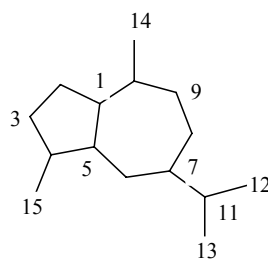
Bisabolenul a fost izolat din mirul de bisabol și din uleiurile de bergamot, lămâie și ace de molid. **Cadinenul** $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$ a fost izolat întâi din uleiul de *Piper cubeba* (Java) și conține în moleculă două duble legături. Prin dehidrogenare trece în **cadalină** care este un derivat al naftalinei.

*cadinen**cadalen*

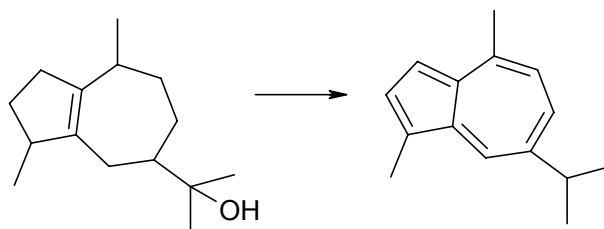
Cariofilena, sesquiterpenă macrocyclică este componenta principală a uleiului de cuișoare (*Eugenia carigophyllata*) și unul din sesquiterpenii $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$ cei mai răspândiți. Conține un sistem ciclic de nouă atomi de carbon condensat cu un inel de patru atomi.

Guaiani și cicloguaiani

Prin formarea unor legături între atomul C_1 și C_{10} și C_2 și C_6 ai farnesanului se produce un schelet biciclic care este scheletul de bază a peste 500 guaiani izolați din plantele superioare (pentru sistemul de numerotare al scheletului s-a adoptat cel al decalinei)

*farnesan**guaian*

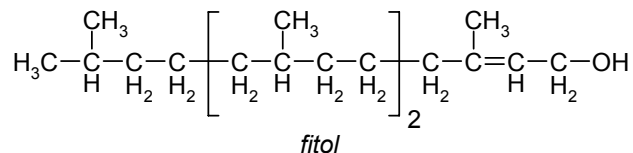
Guaianii sunt cunoscuți și ca proazulene deoarece în natură ei apar frecvent în cursul deshidratării unor terpene (de exemplu sesquiterpenoidele vetivone, guaiol) la azulene (guaia-1,3,5,7,9-pentaene) prin încălzire sau la hidrodistilarea uleiurilor eterice.

*guaiol**guaiazulena*
(albastru-violet)

Diterpenoide. Triterpenoide

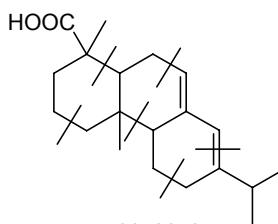
Diterpenii propriu-ziși, $C_{20}H_{32}$ sunt uleiuri vâskoase, care fierb peste $300^{\circ}C$ și se obțin din materiale vegetale prin extracția cu dizolvanți. În afara diterpenilor mono-, bi- și tricyclici în natură se întâlnesc și alcooli, fenoli și oxizi cu schelet diterpenic, ca fitolul și acizii din rășinile de conifere.

Fitolul este o componentă a clorofilei. Molecula fitolului conține doi atomi de carbon asimetrici și poate deci apărea sub forma mai multor izomeri optici.



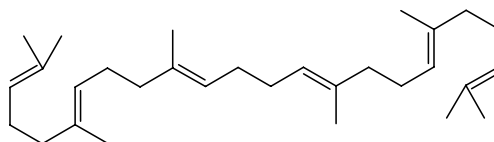
Acizii din rășinile de conifere

Porțiunea nevolatilă a oleorezinelor de conifere, în special a celor obținute din diferite specii de pin (*Pinus pinaster*, *Pinus maritima*) este compusă în cea mai mare parte din acizi carboxilici $C_{20}H_{30}O_2$. Cel mai cunoscut dintre aceștia, **acidul abietic** (are un schelet fenantrenic) se obține din rășina numită **colofoniu** sau **sacâz** ce rămâne după distilarea cu vapori de apă a terebentinei din oleorezina inițială.



acid abietic

Reprezentantul triterpenoidelor este hidrocarbura **squalen** $C_{30}H_{50}$, răspândită atât în lumea animală cât și în cea vegetală.



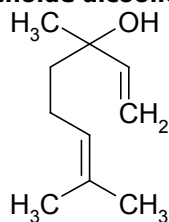
squalen (trans)

Squalenul este un intermediar în biosinteza sterolilor. Molecula squalenului este formată din două jumătăți identice constituite fiecare din resturi de izopren unite „cap la coadă” și împreunate coadă la coadă. Acest mod de construcție se întâlnește și la celelalte triterpenoide, la *carotenoide* și *steroide*.

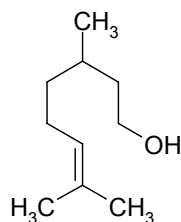
După 1930 au fost evidențiate două grupe de produși naturali cu schelet C_{30} : **triterpenoide pentaciclice** (vezi β -amirina) mult răspândite în natură și **triterpenoidele tetraciclice** mai slab răspândite dar importante prin înrudirea cu *steroidele* [23].

În continuare sunt prezentate structurile unor terpenoide alcoolice, aldehide și cetone terpenice precum și terpenoide ciclice.

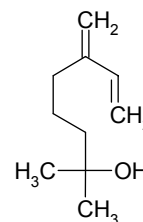
Terpenoide alcoolice



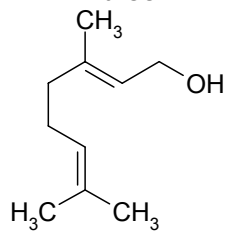
linalool



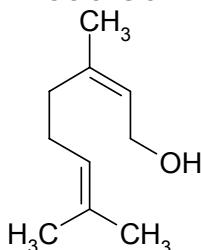
citronellol



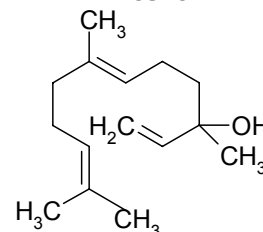
mircenol



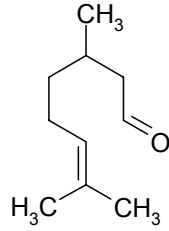
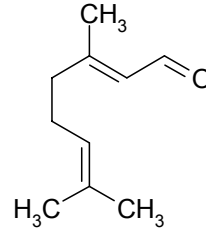
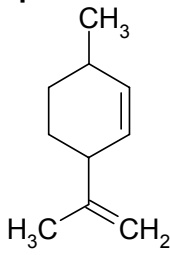
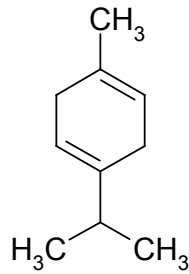
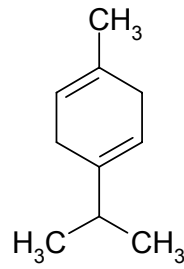
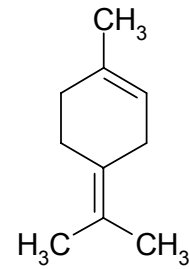
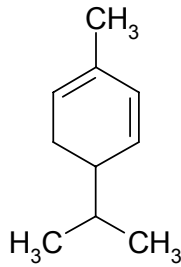
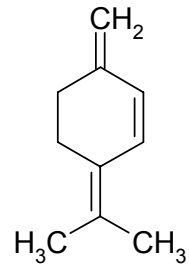
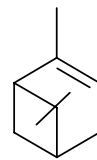
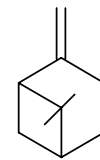
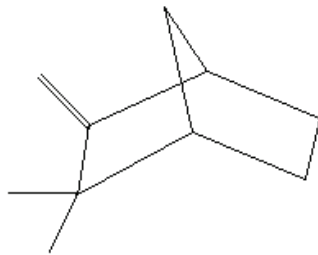
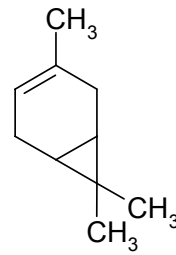
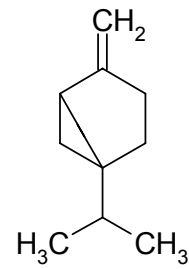
geraniol

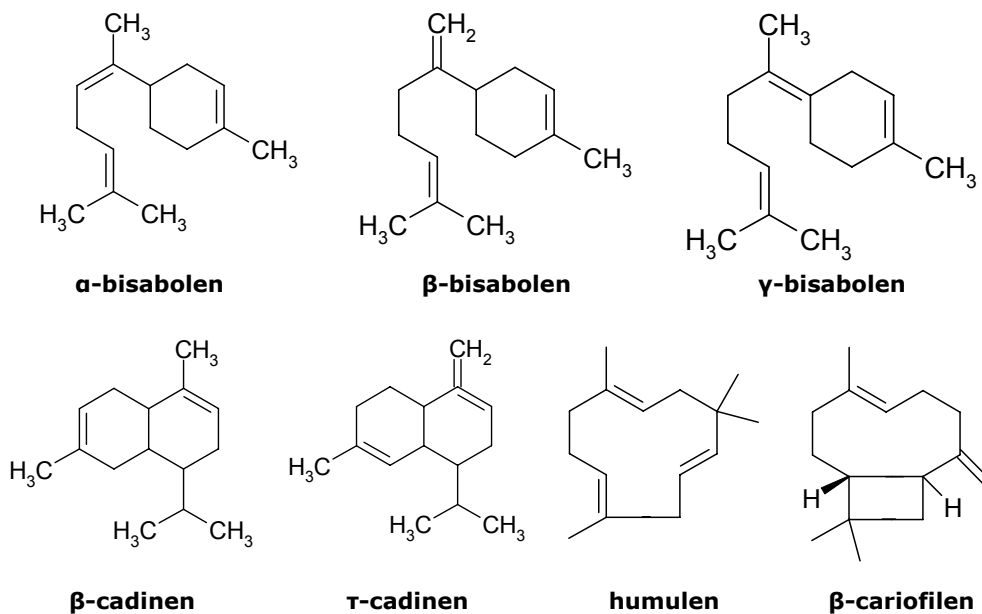


nerol



nerolidol

Aldehide și cetone terpenice**citronelal****citral****Terpenoide ciclice****limonen****α-terpinen****γ-terpinen****terpinolen****α-felandren****β-felandren****α-pinen****β-pinen****camfen****Δ³-caren****sabinen**



α-Humulenul este unul dintre cele mai cunoscute sesquiterpene din regnul vegetal, iar *sesquiterpensintazele* sunt capabile să producă acest compus. α-Humulenul a fost raportat în două specii de plante în care se află doar ca un compus minoritar (*A. annua* (QHS1) și *A. thaliana* (At5g23960)).

Similaritatea structurilor și configurația α-humulenului și zerumbonului conduce la concluzia că α-humulenul este cel mai bun intermediar al sesquiterpenelor olefinice în biosinteza zerumbonei (figura 1.18). Conform datelor de literatură, α-humulenul este prezent în multe uleiuri esențiale din plante, însă nu există o sintază care să producă α-humulen ca produs majoritar.

Zerumbona este componentul majoritar al uleiului de rizom și singurul sesquiterpenoid găsit exclusiv în *Zingiber zerumbet* Smith. S-a specificat, în literatură, că zerumbona prezintă activități antiinflamatoare și anti-HIV [34].

α-Humulenul a dezvoltat activități citotoxice pe un număr de linii de celule tumorale, inclusiv MCF-7. Ceea ce este interesant este faptul că β-cariofilenul nu s-a dovedit a fi toxic pentru celulele fibroblaste umane - 153BR [33].

Sesquiterpenele (E)-nerolidol și α-humulen sunt citotoxice pentru liniile celulare tumorale A-549 și DLD-1 [35].

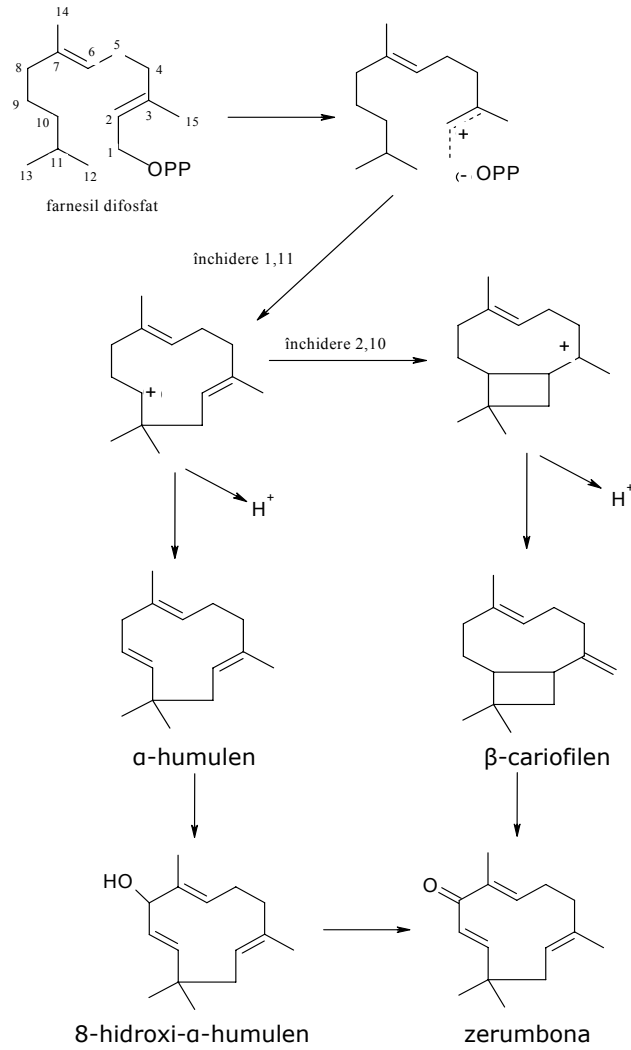
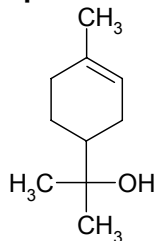
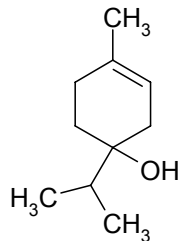
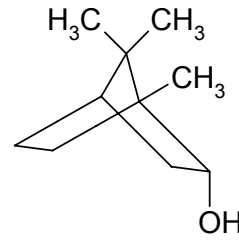


Figura 1.18. - Mecanismul de biosinteză a α -humulenului și zerumbonei din Zingiber zerumbet

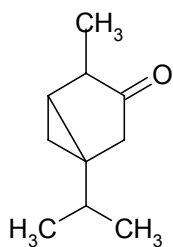
Alcooli terpenici ciclici α -terpineol

1-terpinen-4-ol

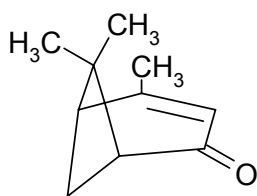


borneol

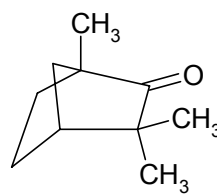
Uleiul esențial din pseudobace de *Juniperus* are proprietăți diuretice, care sunt datorate prezenței terpinen-4-ol [36]. De asemenea, s-a constatat că terpinen-4-olul are efecte cardiovasculare, activitate antiulceroasă și antimicrobiană [30]. Prezența terpinen-4-olului ajută la creșterea ratei de filtrare glomerulară renală [37] (prin aceasta este împiedicată apariția litiazei renale).

Cetone terpenice ciclice [6]

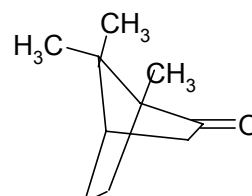
tuionă



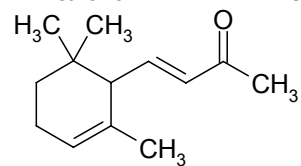
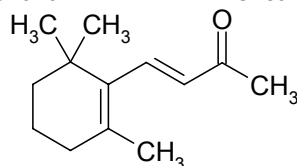
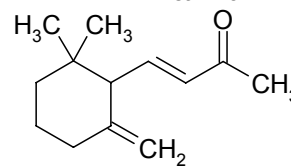
verbenonă



fenconă



camfor

 α -iononă β -iononă γ -iononă

cis-Verbenolul, în organismul uman, are rolul de a inhiba resorbția osoasă [30].

I.4.2. Biosinteza terpenoidelor

În figura 1.19. este prezentată schematic biosinteza terpenoidelor.

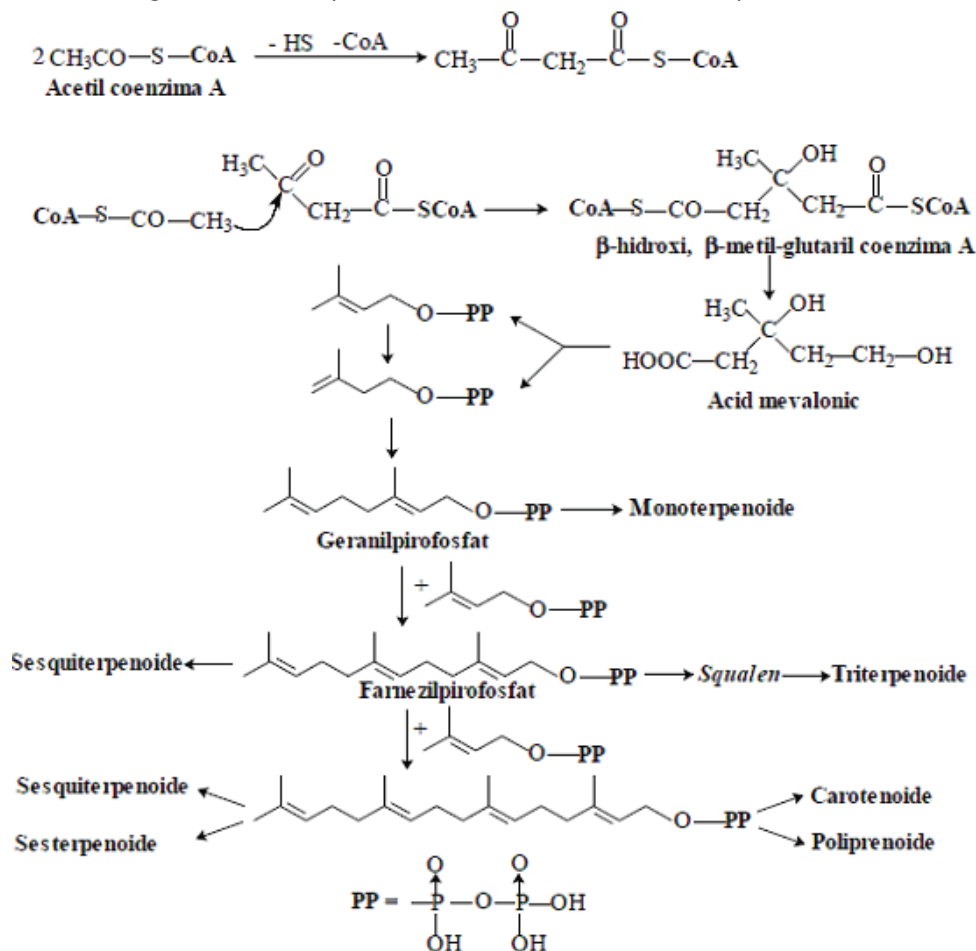


Figura 1.19. - Schema biosintezei terpenoidelor [38]

I.4.3. Importanța etnofarmacologică a speciilor de *Juniperus*

Prin componenții lor activi, uleiurile esențiale au acțiune biologică, având numeroase proprietăți farmacologice (tabelul 1.1. și tabelul 1.2.). Aceste proprietăți farmacoterapeutice recomandă utilizarea acestor uleiuri în fitoterapie, în distonii neuro-vegetative, mici insuficiențe hepato-pancreatice, artrite și reumatism, bronșite și rinite acute, enterocolite de fermentație și infecțioase, litiaze biliare, dermatoze.

Tabelul 1.1. Proprietăți farmacoterapeutice ale unor specii de *Juniperus* [36]

<i>Juniperus communis</i> var. <i>montana</i>	<i>Juniperus communis</i> spp. <i>communis</i>	<i>Juniperus communis</i> ssp. <i>terpineolif.</i>	<i>Juniperus virginiana</i> L.
Antiinflamatoare Analgică Antispastică Reglatoare a sistemului neurovegetativ	Antiseptic Tonic și stimulant asupra glandelor digestive, asupra glandei pancreatice Anticatarală Expectorantă Diuretică Antitusiv Antireumatic (ca adjuvant)	Antiseptică Antilitiazică	Bun decongestionant venos și flebotonic (prin cedrol) Diuretic Antireumatic

Tabel 1.2. Diferite specii de *Juniperus* și acțiunea lor farmacologică [36]

Nr. Crt.	Denumirea botanică	Afecțiuni
1.	<i>J. communis</i> L. subsp. <i>nana</i>	Gripă, gută, indigestie, afecțiuni uretrale Reumatism și hemoroizi
2.	<i>J. excelsa</i>	Bronșită, gripă, tuse
3.	<i>J. foetidissima</i>	Gripă și tuse
4.	<i>J. oxycedrus</i> L. subsp. <i>oxycedrus</i> L.	Boli ale pielii (scabie, eczeme) Răceală, tuse și bronșită Cancer de prostată, hemoroizi, reumatism, litiază renală, afecțiuni uretrale
5.	<i>J. sabina</i> L.	Ulcer, reumatism, răceală, tuse Diabet hiperglicemic (mellitus)

Pseudobacele de *Juniperus* sunt utilizate de obicei pentru recuperarea uleiului esențial și pentru obținerea produselor cu aromă de *Juniperus*. Uleiul esențial din pseudobace de *Juniperus* (ulei de *Juniperus*) este utilizat în procesarea alimentară, farmaceutică și cosmetică. În producerea băuturilor alcoolice, pseudobacele de *Juniperus* sunt utilizate pentru a capta aroma de *Juniperus* sau pentru fermentarea la nivelul substratului și ca agent de aromă [39].

În toată lumea, *Juniperus* este utilizat ca un remediu tradițional în diferite afecțiuni datorită proprietăților sale terapeutice cum ar fi: antiinflamator, diuretic, antiseptic (bactericid și fungicid), hipoglicemic, hipotensiv și analgezic. În aplicațiile medicale sunt utilizate toate părțile plantei împreună cu uleiul esențial. Mai mult, în medicina tradițională este utilizat pentru ameliorarea diferitelor boli: răceală, infecții urinare, probleme dermatologice, bronșite, pneumonii, artrite reumatice, dureri stomacale, urticarie, leucoree, artrite reumatice [40-42].

Conurile se folosesc în industria farmaceutică precum și în diverse tratamente naturiste. Fiind foarte asemănător, *Juniperus*ul se poate confunda cu *Cetina de negi* (*Juniperus sabina*) ale cărei conuri sunt extrem de toxice și nu trebuie recoltate în scopuri terapeutice. În afară de până la 33% zahăr și 10% rășină, ele conțin ulei volatil (0,2 până la 2% depinde de proveniență), care le dă un miros plăcut de rășină. Uleiul esențial de *Juniperus* este în majoritate compus din monoterpene: 80% α -pinen și β -pinen, tuien, sabinen, 5% terpinen-4-ol, α -terpineol, borneol și geraniol; sesquiterpenele (α -cadinen și β -cadinen, cariofilen) sunt găsite în urme. Uleiul esențial din pseudobacele de *Juniperus communis* are

proprietăți astringente, antiseptice și detoxifiante. Despre *Juniperus* se spune că exercită un „efect de curățire” atât pe plan mental, spiritual cât și fizic. Din acest motiv este folosit în numeroase parfumuri, ape de colonie, after shave pentru bărbați.

Uleiul obținut din pseudobace de *Juniperus* a fost testat pe șobolani, Spraque-Dawley, în privința nefrotoxicității, prin administrarea orală a unor doze diferite și s-a constatat că nu este toxic [43].

Uleiul esențial de *Juniperus* face parte din grupul uleiurilor esențiale de plante cu proprietăți antifungice, antivirale și citotoxice. Mai mult, prin componenții lor, diferite substanțe lipofile și volatile ca monoterpene, sesquiterpene și/sau fenilpropanoide, aceste uleiuri pot fi considerate ca parte a sistemului de apărare a plantelor superioare.

Tabelul 1.3. Prezentare selectivă a uleiurilor esențiale din plante aromatice cu activitate antimicrobiană [44, 45].

Originea uleiurilor esențiale	Bacterii Gram (+)	Bacterii Gram (-)	Drojdii, d	Fungi, f	MIC, $\mu\text{g/mL}$
<i>Allium sativum</i>			d	f	64,0
<i>Foeniculum vulgare</i>	+	-			0,25-2,0% (ulei)
<i>Juniperus communis</i>	+	-			1,0-2,0% (ulei)
<i>Lavandula angustifolia</i>			d		0,69-1,8% (ulei)
<i>Salvia sclarea</i>				f	EC ₅₀ : 493-584 $\mu\text{L/L}$
<i>Thymus pulegioides</i>				f	0,16-0,64 $\mu\text{L/mL}$

MIC-concentrația minimă inhibitoare; Gram (+)-Gram pozitive; Gram (-)-Gram negative; EC₅₀-concentrația efectivă a compusului testat care inhibă creșterea fungilor cu 50%.

Extractele de *Juniperus* în diferiți solvenți s-au dovedit active față de *Candida albicans* și față de *Aspergillus niger* [46].

Conform literaturii consultate s-a constatat că speciile autohtone de *Juniperus communis* nu dezvoltă aceeași acțiune antimicrobiană comparativ cu speciile provenite din alte țări [36, 47-51]. Una dintre explicații ar putea fi polaritatea solventului folosit la extracție, după cum se poate observa din datele de literatură [52], unde s-a observat acțiunea inhibitoare a speciei *Juniperus phoenicea* L., printre alte bacterii și asupra bacteriei gram pozitive *S. aureus* și gram negative *Pseudomonas aeruginosa*.

Uleiul esențial din frunze aciculare și pseudobace de *Juniperus communis* provenit din Ungaria, a prezentat activitate antimicrobiană, în primele 24 de ore, asupra tulpinilor *Bacillus cereus* și *Escherichia coli* [53].

Din datele de literatură se constată activitatea antibacterială a compușilor: (+)-ferruginol (abieta-8,11,13-triene-12-ol) și acid (-)-sandaracopimeric (acid isopimara-8(14),15-diene-18-oic) împotriva bacteriilor: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* și *Streptococcus durans*. Acești compuși au fost izolați din *Juniperus excelsa* [54].

Uleiul esențial din pseudobace și semințe de *J. exalsa* prezintă activitate inhibitorie asupra bacteriilor *E. Coli* și *Staphylococcus aureus*, iar compusul cu activitate antibacteriană este karenul [55].

Uleiul esențial din pseudobace de *Juniperus communis* inhibă creșterea subspeciilor de *Aspergillus (niger și flavus)* la o concentrație mai mare de 25g/mL [56].

În literatură există date toxice adiționale precum și valori LD₅₀ orale și la nivelul dermei pentru uleiul esențial de *Juniperus communis* extras din frunze aciculare, lemn sau pseudobace [57].

Tabelul 1.4. Date toxicologice și utilitatea tradițională și etnobotanică a câtorva specii de *Juniperus*

Denumirea plantei	Partea anatomică a plantei	DL ₅₀ oral (g/kg)	DL ₅₀ tegumen tar (g/kg)	Toxicologie adițională	Folosirea tradițională și etnobotanică
<i>Juniperus communis</i>	Cetină/lemn	6,28	>5,00	<p>Șobolani pe cale orală: 6280mg/kg</p> <p>Alte specificații IFRA:</p> <p>< 20 mmoli/L peroxizi, 8% în parfumuri, 100ppm în condimente.</p> <p>IPR-șoareci DL₅₀: 100mg/kg <i>Juniperus communis</i> var. <i>saxatilis</i></p> <p>IPR-șoareci: 3g/kg</p> <p>DL₅₀-tegumentar acut pentru iepuri: >5g/kg</p> <p>Administrarea prin gavaj de ulei obținut din frunze aciculare de <i>Juniperus</i> comun poate cauza avortul în faza avansată a sarcinii, la fel ca în cazul cetinii de pin. Au fost studiate extracte, ale unor specii de <i>Juniperus</i>, folosite în parfumuri și în produse cosmetice ca aditivi biologici. Aceste studii au evidențiat o toxicitate scăzută la animale. Nu s-au înregistrat efecte iritante ale acestor uleiuri asupra pielii.</p>	<p>Este utilizat pentru a reduce febra. Limiștor pentru piele, excelent pentru iritațiile pielii și alergii. S-a constatat ca fiind bun pentru răni care nu se vindecă.</p> <p>Induce un somn odihnitor, reduce stresul și ajută la relaxare.</p> <p>Poate contribui la reducerea inflamației.</p> <p>Este folosit în parfumerie și ca tonic pentru păr.</p> <p>Uleiul esențial are efect hipotensiv la câini, dozele hipotensive pentru om sunt mai mici decât doza pentru animale de laborator.</p> <p>Studiile clinice</p>

				<p>Uleiul de <i>Juniperus</i> a fost testat pe șobolani Sprague-Dawley, prin administrare orală, folosind diferite doze și s-a constatat că nu prezintă efecte nefrotoxice. Nu există nici un studiu care să ateste posibilele efecte asupra pielii sau de hipersensibilitate a uleiului de <i>Juniperus</i> originar din vest.</p> <p>Aparține Clasei D de toxicitate acută, clasei C-D în ceea ce privește mucoasa (neiritant), clasei C cu privire la iritația tegumentară și clasei D (8%) pentru sensibilitate tegumentară.</p>	preliminare au arătat o reducere a agresivității, agitației, precum și a insomniei.
<i>Juniperus mexicana</i>	Cetină/ lemn	>5,00	>5,00	20% în parfumuri	<i>Juniperus tetragona</i> este probabil denumirea corectă a acestor specii. Uleiul are activitate antifungică și antibacteriană.
<i>Juniperus communis</i>	Pseudo- bace	8,00	>5,00	Șobolani pe cale orală: 6280mg/kgIepuri-tegumentar: >5g/kg Alte specificații IFRA: < 20mmoli/L peroxizi, 8% în parfumuri, 100ppm în compuși de aromă.Aparține clasei D de toxicitate acută pe cale orală, clasei C-D în ceea ce privește mucoasa (neiritant), clasei C cu privire la iritația tegumentară, iar sensibilitatea tegumentară se încadrează în clasa D (8%).	Stimulează circulația. Este indicat în tratarea acneei și a eczemei. Se spune că e bun în tratarea anxietății și a stresului.

Studii relativ recente reiau folosirea unor extracte de *Juniperus communis* în tratamentul TBC și a altor boli respiratorii studii realizate prin comparație cu medicamentele consacrate ca: rimfapicină, izoniazidă, streptomycină [58].

Extractele etanolice ca și cele apoase din pseudobace și frunze de *Juniperus oxycedrus* au evidențiat activitate antihelmintică față de oxiuri [59].

S-a demonstrat că extracte de *Juniperus phoeniceae* au determinat o scădere a activității tulpinilor de *Herpes simplex*, virus tip I ceea ce le-ar putea recomanda ca sursă de „potențiali compuși antivirali” [60].

Din pseudobacele de *Juniperus* se face un ceai care are acțiune diuretică și antiseptică, cu bune rezultate în bolile de rinichi. Femeile însărcinate precum și bolnavii care prezintă inflamații manifestate prin urinare cu sânge vor evita folosirea lui. Prin diureza pe care o produce, ceaiul din pseudobace de *Juniperus* aduce ameliorare în reumatism, gută, hidropizie (apă în țesuturi). Ceaiul din pseudobacele acestei plante se mai recomandă în bronșitele acute și cronice, combate setea, crește pofta de mâncare, restabilește activitatea digestivă, înlătură dispepsiile (indigestii) de fermentație, micșorează balonările stomacului, mărește cantitatea de transpirație, eliminând astfel toxinele din corp și pe această cale. Primăvara se recomandă o cură de pseudobace de *Juniperus* sub formă de decoct (10-20 boabe la 1L de apă) sau infuzie 10g (2 lingurițe) pseudobace la 200mL apă, din care se iau 3-4 linguri pe zi.

Vinul de *Juniperus* este recomandat în ateroscleroză, gută, este ușor diuretic și înlătură arsurile din piept și de pe tractul gastrointestinal.

În afara aplicațiilor din medicină și farmacie, extractele sunt folosite ca parfumuri în industria săpunurilor și detergenților, în diverse creme și loțiuni cosmetice [61]. Nivelul maxim admis pentru uleiul volatil din parfumuri este de 0,8%.

În ultimele decenii, prin apariția unor tehnici noi de analiză fie cromatografice, fie spectrale și deci stabilirea mai exactă a componenților prezenți în uleiurile esențiale respectiv în extractele vegetale acestea își redobândesc utilitatea inclusiv pentru aplicații farmaceutice și terapeutice.

Într-un articol general [62] sunt prezentate principalele domenii terapeutice în care pot fi aplicate uleiurile esențiale:

- Chemoprevenția și represiia cancerului (prin compușii monoterpenici, ca de exemplu D-limonen prezent în extracte de *Juniperus communis* și *Juniperus virginiana*)
- Ateroscleroza (de exemplu, α -curcumenul cu acțiune de scădere a nivelului trigliceridelor din ser ca și din ficat; γ -terpinen cu acțiune de inhibare a oxidării LDL gliceridelor)
- Tromboză
- Agenți antibacterieni
- Agenți antivirali (prin alcoolul monoterpenic izoborneol)
- Antioxidanți (prin prezența constituenților fenolici, alcoolilor, aldehydelor și cetonelor monoterpenice dar la activitatea de incubare a radicalilor liberi contribuie și hidrocarburile, esterii prezenți în unele uleiurile vegetale)
- Agenți antidiabetici
- Aromaterapie și masaj aplicat pentru tratamentul bolilor inflamatorii ca alergii, reumatism și artrite.

În cazul speciilor de *Juniperus communis* și *Juniperus virginiana* galbulele (impropriu numite fructe) și uneori frunzele au utilitate terapeutică în medicina umană și veterinară. Principiile active acționează diuretic, sudorific, expectorant,

antitusiv, antispastic, stomahic, eupeptic, antifermentescibil. Acționează asupra epiteliului renal și măresc cantitatea de urină eliminată în timp; acționează asupra glandelor sudoripare și măresc sudorația; favorizează expectorația prin fluidificarea secrețiilor bronșice; neutralizează accesele de tuse; diminuează sau înlătură contracturile mușchilor netezi din organele interne; favorizează digestia prin excitarea sucurilor gastro-intestinale; ajută la stabilirea unei digestii normale; previne fermentația. Se utilizează îndeosebi ca diuretic, antiseptic al căilor urinare și balsamic. Administrarea îndelungată provoacă iritații renale. În prima fază conduce la albuminurie. Cura nu se prescrie în nefrită acută și cronică, în nefroză, deoarece provoacă hematurie și chiar hemoragii intestinale. Se recomandă celor care suferă de artroză, afecțiuni neuromusculoreumatice, în tendopatii, miogeloze. Sucul concentrat se prescrie copiilor ca tonic, în agine și răceli. Spiritul de *Juniperus* se folosește ca frectie în reumatism. Intern, orice tratament cu această plantă poate acționa ca abortiv, prin provocarea de contracții uterine. Poate produce efecte secundare toxice. Intră în compoziția ceaiului antireumatic. Se consideră că intervine asupra metabolismului, provocând reglarea și normalizarea acestuia. **Atenție!** Nici un preparat de *Juniperus* nu se administrează mai mult de 6 săptămâni.

Medicină umană [63]

În uz intern este folosit pentru:

- tratarea bronșitelor cronice, enteritelor și enterocolitelor (infuzie);
- ca adjuvant pentru tratarea diabetului, acneei, eczemelor (infuzie);
- tratarea litiazei vezicale, afecțiunilor pectorale, reumatismului (infuzie);
- tratarea hepatitei epidermice (infuzie sau decoct);
- ușurarea activității digestive prin excitarea sucurilor gastrointestinale (sub formă de decoct, infuzie);
- tratarea anorexiei-lipsa poftei de mâncare (infuzie sau decoct);
- tratarea edemelor renale, edemelor cirotice, edemelor cardio-renale (infuzie concentrată sau decoct diluat);
- tratarea gutei (infuzie concentrată sau decoct slab);
- tratarea hidropiziei – acumulări de lichid în țesuturile și seroasele organismului ca: pleură, pericard, peritoneu, articulații (infuzie);
- activarea eliminării din organism a produselor de dezasimilație toxică prin diureză și transpirație (decoct diluat);
- tratarea gripei, guturaiului (infuzie).

În uz extern este folosit pentru:

- tratarea reumatismului (decoct);
- tratarea nevralgiilor (fricțiuni cu ulei de *Juniperus* 1% în alcool extras din boabe);
- tratarea reumatismului (tinctură);
- tratarea gutei, stimularea circulației periferice;
- tratarea guturaiului;
- combaterea tusei, tratarea gripei. Galbulele de *Juniperus* sunt incluse în mai multe rețete PLAFAR pentru remineralizarea organismului, tratarea tuberculozei pulmonare, etc.

Cosmetică

În cosmetică *Juniperus*ul este indicat pentru:

- întărirea rădăcinii părului, prevenirea căderii lui (tinctură);
- combaterea căderii părului (macerat).

Exemplificare produse comerciale:

- Sirop de ienupăr (Vivasan –Elveția)
- Vin medicinal cu Ienupar (Hofigal)
- Sirop cu muguri de pin, ienupăr și propolis (Tis Farmaceutic)

I.4.4. Utilizarea *Juniperus*ului în industria alimentară

În Scandinavia, lemnul de *Juniperus* este utilizat pentru obținerea recipientelor de mici dimensiuni, în care sunt depozitate produsele lactate cum sunt: brânza și untul, precum și pentru confecționarea cuțitelor din lemn pentru unt. („wooden butter knives“)

Extractele și uleiurile esențiale a *Juniperus*ului comun sunt folosite pentru prepararea băuturilor alcoolice *Jenever* (Ginul olandez), ginul britanic și nealcoolice, a deserturilor congelate, a produselor de patiserie, a cărnii și produselor din carne [64].

Semințele pseudobacelor de *Juniperus communis* au un gust amar de aceea nu pot fi consumate crude ci sunt uscate și utilizate pentru îmbunătățirea aromei produselor din carne, sosurilor și a tocăturilor. În general, pseudobacele sunt zdrobite înainte de utilizare pentru eliberarea aromei. Pseudobacele sunt utilizate și la îmbunătățirea aromei ginului [65]. Ginul poate fi obținut fie prin distilarea alcoolului rafinat și a pseudobacelor de *Juniperus*, fie prin distilare și apoi adăugarea pseudobacelor [61, 66, 67].

Potrivit reglementărilor europene (CEE 1576/89), aroma principală în cel mai frecvent și popular tip de gin (London dry gin), care aparține clasei „ginurilor distilate”, ar trebui să provină din pseudobace de *Juniperus*. Datorită caracteristicilor senzoriale imprimate de pseudobacele de *Juniperus*, ginul a devenit o băutură alcoolică specială. Prin urmare, principalul impact asupra percepției aromei ginului, ar trebui să fie legat de prezența mai multor compuși aromatici volatili și semivolatili din pseudobace de *Juniperus*. Din acest motiv, evaluarea copuşilor volatili și semivolatili ai materiei prime este de mare importanță pentru a asigura caracteristicile senzoriale specifice ginului [68].

De asemenea, *Juniperus*ul este un important condiment în multe bucătări europene, în special în regiunile Alpine, unde acesta crește abundent. Este singurul exemplu de condiment din grupul botanic *coniferae*, și de asemenea unul din câteva exemple de condimente din regiunile cu climă rece. *Juniperus*ul este mult folosit în tradiționalele bucătării din Centrul Europei (ca de exemplu din Sudul Germaniei) în specialitatea numită *Sauerkraut*. Pentru prepararea sa, varza proaspătă este conservată prin fermentație lactică și asezonată cu *Juniperus*, chimen și câteva frunze de dafin. *Sauerkraut* poate fi mâncată crudă (ca un fel de salată), sau poate fi gătită sau prăjită (adesea împreună cu mici cuburi de șuncă).

Generală aplicație a *Juniperus*ului este, cu toate acestea, carnea fiind indispensabil pentru carnea de căprioară, combinat bine cu piper negru, șovârv și frunze de dafin. Boabele de *Juniperus*, corect numite conuri, ar trebui strivite înainte de folosire.

Pseudobacele de *Juniperus* sunt componente de aromă. În unele deserturi, lactate congelate, în bomboane, aluaturi, gelatine, pudinguri ca și în produse de carne. Galbulele uscate sunt folosite sub numele de enibahar, la aromatizarea murăturilor, lichiorurilor și conservelor de carne [63]. Nivelul admis pentru uleiul volatil în aceste preparate variază între 0,006% - 0,01%.

Din experimentele efectuate de Kilic și colab., s-a constatat că unele specii de *Juniperus* – *J. excelsa* și *J. phoenicea* – conțin compuși fenolici (catechină, 0,2mg/g respectiv 0,6mg/g), cu activitate antioxidantă. Antioxidanții naturali pot fi

utilizați în industria alimentară, farmaceutică, dar pot avea și un rol important în prevenirea cancerului și a bolilor cardiace [69].

I.5. Compuși de incluziune ai ciclodextrinelor

I.5.1. Considerații asupra structurii și proprietăților ciclodextrinelor

În urma hidrolizei enzimatică a amidonului, în prezență de *glicoziltransferază*, se pot obține ciclodextrine cu 6-12 unități de glucoză. Dintre acestea, cele care se formează în cantitate mai mare sunt ciclurile cu 6-8 unități cunoscute sub denumirea de α , β și γ -ciclodextrine (α , β și γ -CD).

Principalele particularități ale ciclodextrinelor sunt:

- structura moleculară a ciclodextrinelor de *tip colivie* sau structură de *tip canal* structuri care sugerează faptul că acestea sunt capabile de a „încapsula molecule oaspete mici” în interiorul cavităților moleculare formate din unirea inelară a resturilor de glucoză (figura 1.20.)
- distribuția grupelor hidrofilice și hidrofobice; compușii hidroxilici ocupă ambele margini ale trunchiului de con și prin aceasta conferă ciclodextrinelor solubilitate în soluție apoasă, iar interiorul cavității structurii este hidrofobic datorită prezenței hidrogenilor C(3)H și C(5)H și a oxigenilor legăturii eterice O(4) [70].

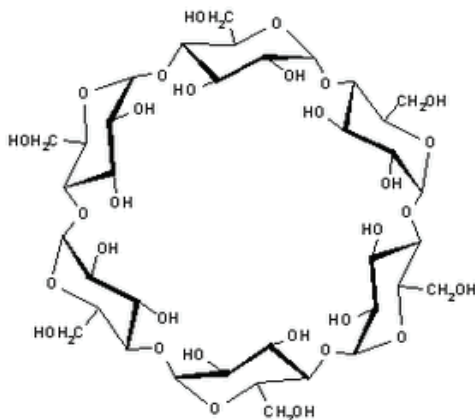


Figura 1.20. - Structura moleculei de ciclodextrină

Ciclodextrinele sunt ușor solubile în apă și pot fi cristalizate sub formă de specii "flămânde" în care cavitățile moleculare nu sunt goale, ci umplute cu molecule de apă. Prin adăugarea unui exces de component oaspete se poate izola compusul de incluziune în formă cristalină.

Ciclodextrinele pot prezenta mai multe forme cristaline. Toate structurile de β -ciclodextrină·12H₂O, β -ciclodextrină·11H₂O și γ -ciclodextrină·13,3H₂O sunt de tip zig-zag. Hidratul de β -ciclodextrină are două forme cristaline β -ciclodextrina·12H₂O și β -ciclodextrina·11H₂O. Diferența principală între cele două forme este bazată în

principal pe distribuția dezordonată a moleculelor de apă din cavitatea β -ciclodextrinei.

Caracteristica cea mai importantă a ciclodextrinelor o reprezintă capacitatea acestora de a forma compuși de incluziune cu o mare varietate de compuși fără a forma legături covalente.

Din moment ce diametrul cavității unei ciclodextrine variază în funcție de numărul de unități de glucoză din inel, selectarea unei ciclodextrine de mărime apropiată de parametrii geometrici ai moleculei oaspete este importantă majoră în formarea complexului de incluziune. Formarea complexelor nu necesită întotdeauna includerea în întregime a moleculei oaspete în cavitatea ciclodextrinei. Chiar și moleculele foarte mari pot fi complexate, atâta timp cât ramificațiile lor, indiferent de lungime, se potrivesc în cavitatea ciclodextrinei.

Prepararea complexelor de incluziune este simplă: agitarea unei soluții apoase de ciclodextrină (rece sau caldă, neutră, acidă sau alcalină în funcție de natura oaspetelui, pentru a preveni ionizarea acestuia), cu molecula oaspete sau cu soluția acestuia. Acest lucru se poate realiza și prin utilizarea unui solvent obișnuit, miscibil sau nemiscibil. Molecula oaspete este în general adăugată soluției calde de ciclodextrină. Echilibrul este atins printr-o agitare intensă și apoi răcire ușoară timp de câteva ore. Conținutul de moleculă oaspete nu poate fi mărit prin repetarea acestui proces, cum ar fi încălzirea și răcirea [71].

I.5.2. Proprietăți și direcții de utilizare a ciclodextrinelor

Cel mai mare interes a fost reprezentat de geometria complexelor formați, între oaspete și CD în soluții apoase, și de factorii responsabili pentru complexare. Din datele de literatură s-a constatat că β -CD a format complexare și cu solvenți neapoși.

Cavitățile ciclodextrinelor oferă protecție pentru hidroxizi, coenzima A și acizi grași, ultimii fiind conservați împotriva oxidării chiar în atmosferă de oxigen pur.

O însemnătate aparte o au și aplicațiile compușilor de incluziune (denumiți și nanocapsule) ai CD în domeniul farmaceutic, cele mai importante sunt clatrații solubili ai α - și β -CD cu 1-butil-1-nitrozo-uree ce pot fi folosiți ca agenți antitumorali, iar compusul Ag-sulfadiazină- β -CD dă rezultate în tratarea arsurilor și rănilor infectate [70].

I.6. Metode de extracție și analiză a compușilor terpenici

I.6.1. Generalități

Cele mai multe componente ale biomasei, indiferent dacă sunt plante sau microorganisme sunt constituite din materiale inerte, insolubile și adesea materiale polimerice, cum este celuloza din plante sau fungi și peretele celular microbial. Prima etapă în extracție este eliberarea și solubilizarea metaboliților secundari din matrice, de dimensiuni reduse, rezultați din extractul inițial.

În extracția lichidă, alegerea solventului de extracție oferă primul și cel mai esențial mod de preparare a probei. Extracția inițială cu solvenți cu o polaritate redusă necesită mai mulți componenți lipofili, în timp ce alcoolii izolează un spectru mai larg de compuși polari și nepolari din material. Împreună cu alegerea solventului de extracție, există și unele abordări diferite față de procedurile actuale de extracție.

În timp ce amestecarea sau agitarea mecanică sunt cele mai întâlnite metode, este posibilă și percolarea sau chiar extracția solid-lichid presurizată.

I.6.2. Alegerea metodei de extracție

Majoritatea proceselor de extracție utilizate pe scară largă au fost în mod tradițional bazate fie pe diferite metode de extracție lichid-vapori fie pe metode de extracție cu vapori. Cea mai recentă metodă, a cărei aplicație a crescut, este extracția cu lichide supercritice (SFE), care se bazează pe încălzirea gazelor comprimate până aproape de presiunea și temperatura lor critică, moment în care nu se poate face distincția între faza lichidă și cea gazoasă.

La ora actuală există un număr mare de metode neconvenționale de extracție, care în principiu folosesc extracția solid-lichid dar care folosesc diverse forme de energie în cadrul procesului, cu scopul de a facilita transferul analiților din probă în solvent. Aceste metode includ: extracția cu ultrasunete, extracția asistată de microunde, extracția cu lichide presurizate precum și extracția turbionară. Chiar și extracția cu folosirea energiei electrice a fost studiată. Tehnicile de extracție solid-lichid care forțază curgerea cum sunt extracția solid-lichid la presiune medie și extracția planară rotativă sunt metode în care solventul de extracție este forțat să treacă prin probă chiar dacă este necesar o forță centrifugă sau presiune mai mare. Aceste metode cresc eficiența extracției și duc la creșterea randamentului și reducerea timpul de extracție [72].

Pentru izolarea substanțelor bioactive din surse naturale sunt utilizate tehnici de extracție diferite [73].

Cea mai simplă metodă de extracție nu necesită un anumit mediu. Presiunea mecanică este aplicată la extracția tradițională a uleiului din semințe. Aceste procese pot fi combinate cu unele metode de pretratament cum ar fi curățarea, măcinarea sau exfolierea înainte de extracție, iar în general este nevoie doar de o presă hidraulică.

Procesele tradiționale de extracție pot fi clasificate astfel: extracția cu solvenți organici: percolarea, macerarea și extracția cu utilizarea aparatului Soxhlet; și extracția cu apă: infuzia, decoctia și antrenarea cu vapori de apă.

I.6.3. Selectarea tipului de solvent folosit

Deși alegerea metodei de extracție poate avea un efect semnificativ asupra calității extractului, solventul influențează cel mai mult compoziția calitativă a extractului.

Unele dintre proprietățile generale ale solventului, care ar trebui luate în considerare în alegerea solventului includ capacitatea de dizolvare a solventului în compușii de interes, ușurința de eliminare a acestuia din extract, toxicitatea și inflamabilitatea. După cum este de așteptat, extractul și compușii țintă pot avea efecte semnificative în selectarea solventului de extracție. Solvenții cu polaritate scăzută se folosesc pentru compușii lipofilici, în timp ce alcoolii se folosesc atât pentru compuși polari cât și pentru cei nepolari, iar apa poate fi folosită doar pentru compușii polari din probă [72].

I.6.4. Metode de extracție

I.6.4.1. Extracția cu solvenți la rece

Percolarea este una dintre cele mai folosite metode în extracția din plante din moment ce nu necesită o cantitate mare de probă sau un timp lung de pretratament. Singurul echipament necesar este un recipient conic din sticlă cu un robinet la bază utilizat pentru a stabili rata de eluare a solventului. Percolarea este un proces continuu în care solventul saturat este înlocuit de solvent proaspăt, dar în mod normal proba este cufundată în solvent, în percolator timp de 24 de ore, de mai mult de trei ori, iar extractul este apoi colectat.

În cazul **macerării** proba este plasată într-un recipient împreună cu solventul. Acest lucru permite solventului să pătrundă în structura celulară pentru a dizolva compușii solubili. Eficiența extracției poate fi crescută prin agitarea ocazională a recipientului cu materialul de extras sau prin utilizarea unui agitator mecanic sau magnetic pentru omogenizarea soluției finale și a solventului saturat. Cum macerarea este o metodă discontinuă de extracție, solventul trebuie reîmprospătat până la epuizarea materialului vegetal. Această metodă necesită etape de filtrare ce pot duce la pierderi de solvent, analit și/sau material vegetal [72].

Macerarea este cea mai simplă și mai ieftină metodă. În cadrul acestei metode, pentru evitarea saturației locale la suprafață și implicit realizarea unei difuzii eficiente, este necesară amestecarea [73].

I.6.4.2. Extracția cu solvenți la cald

Extracția cu aparatul **Soxhlet** este o metodă foarte veche, dar este încă foarte utilizată în extracții din materiale vegetale. Se utilizează de obicei un solvent, deoarece solvenții individuali pot fi distilați la diferite temperaturi, ceea ce duce la îmbogățirea amestecului în solventul cu cel mai mic punct de fierbere. Principalele avantaje ale tehnicii Soxhlet sunt automatizarea și continuitatea metodei de aceea nu necesită multă manipulare. Se pare că este o metodă foarte eficace și este adesea utilizată ca metodă de referință în aplicarea unei noi metode. Un dezavantaj este faptul că materialul supus extracției este încălzit la punctul de fierbere al solventului implicat, iar compușii instabili din punct de vedere termic pot hidroliza, se pot descompune sau pot produce artefacte [72].

Pentru ultimii 120 de ani, extracția Soxhlet a fost una dintre cele mai folosite tehnici de extracție. Această metodă are loc în două etape: (a) extracția pentru izolarea constituenților fitochimici (în cazul plantelor medicinale) și (b) un foarte bun model pentru compararea cu alte metode de extracție alternative. Unul din inconvenientul major al acestei metode este timpul de extracție care poate fi de 8, 16, 24 de ore sau mai mult ceea ce duce la creșterea consumului de energie. Timpul necesar extracției limitează și numărul de probe care pot fi procesate, de aceea nu poate fi folosită ca metodă pentru prepararea produselor comerciale. Utilizarea unei cantități mai mari de solvenți organici necesită și o etapă de recuperare a solventului și o etapă de evaporare pentru concentrarea extractului. Această metodă ridică și probleme în detrimentul mediului înconjurător [74].

Metodele de **infuzie** și **decoctie** sunt metode de extracție cu apă. În tehnica infuziei este adăugată apa fierbinte sau rece peste materialul vegetal măcinat; în cazul decoctiei materialul vegetal este încălzit la fierbere în apă timp de

15 minute. Extracția cu apă este folosită mai mult pentru extracte din plante, însă compușii hidrofilici sunt extrași cu amestec de metanol-apă sau etanol-apă.

Hidrodistilarea este o metodă veche de extracție, de fapt a fost prima metodă folosită pentru obținerea uleiurilor esențiale din plante. Această metodă implică supunerea materialului vegetal la o continuă spălare cu jet de abur, iar compușii organici volatili prezenți sunt preluați de faza gazoasă și separați prin scăderea temperaturii vaporilor prin condensare [72].

Obținerea uleiului esențial din pseudobace mature de *Juniperus* [39]

Uleiul de *Juniperus* este prezent în concentrații relativ scăzute în pseudobace, iar tehnica de recuperare de înaltă performanță poate duce la obținerea unei cantități cât mai mari de ulei. Tehnici variate au fost utilizate pentru extracția uleiurilor esențiale cum ar fi hidrodistilarea, extracția cu lichide supercritice folosind dioxid de carbon, extracția cu solvent și metoda simultană de distilare și extracție. Fiecare tehnică are avantaje și dezavantaje particulare. Cu toate acestea, uleiul de *Juniperus* este obținut cel mai frecvent prin hidrodistilare. Aparatul de hidrodistilare tip Clevenger este utilizat în mod normal pentru recuperarea uleiului de *Juniperus* în laborator. Hidrodistilarea nu numai că produce ulei de *Juniperus* de calitate dar este relativ simplu și sigur comparativ cu alte tehnici de extracție.

Există multe date cu privire la randamentul și compoziția uleiului esențial obținut din pseudobace de *Juniperus* recoltate din diferite părți ale lumii și obținut prin diferite tehnici de extracție. Bazat pe aceste studii, este concludent faptul că atât randamentul de extracție cât și compoziția uleiului de *Juniperus* depind de mulți factori, cum ar fi: solul și climatul de unde provin pseudobacele, procesul de măcinare și tehnica de recuperare a compușilor. În cazul hidrodistilării condițiile de operare influențează beneficiile și compoziția uleiului de *Juniperus*.

Instalația de hidrodistilare tip Clevenger

O instalație de hidrodistilare tip Clevenger, este alcătuită dintr-un balon, un condensator și un separator de ulei esențial (figura 1.21.). Planta măcinată se introduce în balon, în apă fierbinte. În timpul hidrodistilării vaporii și compușii volatili, se ridică din balon în condensator, unde se formează cele două faze nemiscibile, apa aromatică (conține compușii solubili ai uleiului esențial) și uleiul de *Juniperus* format.

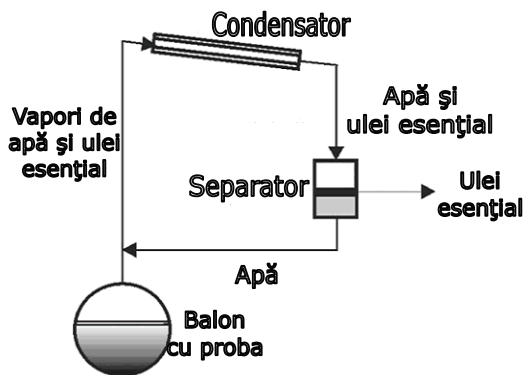


Figura 1.21. - Schema aparatului de hidrodistilare tip Clevenger

În separator, uleiul esențial este separat de apa aromatică, care se reîntoarce pe la baza separatorului în balon. Uleiul de *Juniperus* este transvazat de obicei din separator într-un recipient gradat. Volumul de ulei de *Juniperus* colectat se determină în timpul procesului de hidrodistilare. Înregistrarea timpului se face încă de la prima picătură de ulei de *Juniperus* ieșită din condensator și care ajunge în separator [39].

I.6.4.3. Extracția cu ultrasunete

Extracția cu ultrasunete preia avantajul unei temperaturi (care crește solubilitatea și difuzibilitatea) și presiuni (care favorizează penetrarea și transportul) foarte mari, la interfața dintre soluția de solvent supusă energiei ultrasonice și matricea solidului, combinat cu energia oxidativă a radicalilor creați în timpul ultrasonării, rezultând astfel o putere de extracție mare [72]. Metoda asistată de ultrasunete a fost aplicată pentru extracția dintr-un număr mare de diferite plante, cum ar fi: *Epimedium sagittatum* Maxim [75], *Salvia officinalis* și *Salvia glutinosa* [76], *Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus vulgaris* L. și *Oreganum majorana* [77], florile a patru specii de *Citrus* (portocale, lămâie, *tangerine* și *sour orange*) [78].

Extracția asistată de ultrasunete (USAE) reprezintă cea mai recentă abordare pentru obținerea compușilor valoroși din plante. Această tehnică este superioară tehnicilor convenționale prin reducerea pierderilor și împiedicarea degradării compușilor volatili și termolabili datorită folosirii unei temperaturi reduse și în cele mai multe cazuri la/sau aproape de temperatura camerei. În majoritatea situațiilor USAE este mult mai rapidă, mai eficientă decât metodele convenționale de extracție, conduce la rezultate considerabile cu un consum redus de extractant și nu este necesar ca acesta să fie polar – cum este cazul extracției cu ajutorul microundelor. Cel mai mare dezavantaj este formarea radicalilor liberi care pot produce prin oxidare degradarea unor compuși labili [79].

Extracția prin ultrasonare este folosită pentru izolarea compușilor volatili din produse naturale la temperatura camerei prin utilizare de solvenți organici [78].

Extracția cu ultrasunete poate fi utilizată atât pentru probe solide cât și pentru probe lichide, iar pentru extracția compușilor organici sau anorganici se procedează astfel: probele solide sunt depozitate în flacoane adecvate, se supun extracției 15-30 minute, iar în cele din urmă extractul este separat de reziduurile solide. Problemele potențiale sunt reabsorbția analitului în solid, încălzirea probei, pierderea solventului folosit la extracție și descompunerea analitului datorită încălzirii. Pentru realizarea acestei metode poate fi folosit atât un sistem dinamic cât și unul static. Utilizarea sistemului dinamic poate avea unele avantaje, cum ar fi: analiții sunt eliminați imediat după ce sunt transferați de către solvent din solid. Mai mult, proba este expusă în mod continuu la solvent. Cei mai importanți parametri care trebuie luați în considerare sunt: frecvența și intensitatea de ultrasonare, tipul de solvent, temperatura exterioară și presiunea care pot influența cavitația, precum și extracția analitului. Transductorul ultrasonic electromagnetic, este adesea situat în centrul băii de ultrasunete, de aceea eficiența cavitației este diferită în baia de ultrasunete. Se estimează o posibilă pierdere a energiei ultrasunetelor în recipientul cu probă ce poate fi cauzată de materialul sau grosimea peretelui recipientului cu probă [80].

Metoda de extracție cu ultrasunete este una dintre cele mai importante tehnici de extracție pentru compușii valoroși ai materialelor vegetale și este ușor de adaptat la scară mare sau mică. Comparativ cu alte metode de extracție cum ar fi

extracția asistată de microunde, aparatul de ultrasunete este mult mai ieftin și mai ușor de utilizat [75].

Prin intermediul extracției prin ultrasunete se realizează distrugerea celulelor materialului vegetal, apar efectele de capilaritate, realizarea unei mai bune pătrunderi a solventului în materialul vegetal și intensificarea transferului de masă [76].

I.6.4.4. Extracția cu microunde

Microundele și undele electromagnetice neionizate au o frecvență cuprinsă între 300MHz și 300GHz și sunt poziționate în spectrul electromagnetic între razele X și infraroșii. În zilele noastre, microundele sunt utilizate pentru comunicare și ca vector al energiei. A doua aplicație constă în acțiunea directă a undelor asupra materialului ce are capacitatea de a transforma o parte a energiei electromagnetice absorbite în energie de încălzire.

Principiul de încălzire cu ajutorul microundelor se bazează pe impactul direct asupra materialelor sau solvenților polari și este condus de două fenomene: conducția ionică și rotația dipol, care în cele mai multe cazuri apar în mod simultan [74].

O altă metodă de creștere a eficienței metodelor convenționale de extracție este utilizarea radiațiilor cu microunde. Extracția cu microunde constă în încălzirea solventului în contact cu proba. Procesul implică ruperea legăturilor de hidrogen, ca rezultat al rotației dipol, a moleculei, indusă de microunde și migrarea ionilor ceea ce duce la creșterea pătrunderii solventului în probă, permițând extracția compușilor din extract. Avantajul principal față de metodele de extracție convenționale constă în reducerea consumului de solvent, timp scurt de operare, o reproductibilitate bună și o manipulare minimă a probei în procesul de extracție [72].

Metoda de extracție cu ajutorul microundelor a fost aplicată pentru extracția din diferite plante, cum ar fi: *L. angustifolia Mill.*, Lamiaceae [81], *Olives Aglandau* [82], *Origanum vulgare L.* [83], *Rhizoma Polygoni Cuspidati*, *Flos Carthami* și *Myrica rubra* [84], piper negru și coriandru [85].

I.7. Metode de analiză, separare și identificare a compușilor terpenici

I.7.1. Cromatografia în strat subțire

Cea mai ușoară tehnică cromatografică este cromatografia în strat subțire (CSS) deoarece nu necesită aparatură scumpă și complicată. Singura dificultate este alegerea fazei mobile și staționare pentru proba aplicată. În condiții apropiate este posibilă separarea amestecului din probă și identificarea componentelor prin compararea rezultatelor: migrarea coeficientului R_f , forma spotului și culoarea în comparație cu standardele.

Cromatografia în strat subțire este, în esență, cromatografia lichidă efectuată pe o fază staționară prezentă sub forma unei foi sau al unui strat de particule solide, imobilizate pe un suport plan, sau pe un strat de substanță polimerizată. În prezent, diferitele variante ale CSS stau la baza metodelor cromatografice plane și, din anii 1950, au înlocuit aproape în întregime predecesorul lor, cromatografia pe hârtie.

În contrast cu cromatografia pe coloană lichidă (CLC), de exemplu, CSS se efectuează de regulă, manual și într-o oarecare măsură, pe baza unui sistem. Acest lucru creează provocări suplimentare pentru analist, din moment ce un număr mai

mare de parametri afectează separarea, comparativ cu CLC. S-a constatat că 26 de parametri influențează separarea, cei mai importanți fiind: tipul de adsorbant, tipul de solvent, camera de dezvoltare, preadsorbția unui amestec de solvenți, saturația stratului, diametrul particulelor. Adsorbantul cel mai frecvent ales în CSS este încă siliciul, în timp ce de exemplu, în analizele HPLC adsorbantii nepolari cu fază inversă (RP) au înlocuit aproape în întregime siliciul și alți adsorbantii în fază normală (NP). Valoarea medie a dimensiunii particulelor și distribuția dimensiunii particulelor din gelul de siliciu utilizat ca adsorbant depinde de natura sarcinii de separare: plăcile pentru cromatografia de înaltă performanță în strat subțire (HPTLC), dimensiunea medie a particulei este de aproximativ 5 μm cu o distribuție îngustă a dimensiunii particulelor, iar pentru CSS ea este de aproximativ 12 μm și mărimea și distribuția particulelor este mai largă. Diametrul porilor pentru ambele este de aproximativ 60 Å și suprafața de aproximativ 500 m^2/g [86].

Tehnica HPTLC asigură o mai bună separare a substanțelor, spoturile sunt mai puțin neclare și mai vizibile. Metoda CSS prezintă multe avantaje. Mai întâi de toate, nu necesită o pregătire laborioasă a probei. Cantitatea mică de impurități nu are un impact mare asupra procesului de analiză. Apoi, aceasta este o metodă rapidă și ieftină, care permite analiza simultană a zeci de probe și încetarea examinării atunci când rezultatele sunt satisfăcătoare [86].

1.7.2. Cromatografia de gaz cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS)

Cromatografia de gaze are avantajul că este mai rapidă și mai ieftină, dar dezavantajul că nu poate analiza decât substanțe care au temperatura de fierbere mai mică decât 300°C.

În cazul cromatografiei de gaze, faza mobilă este azotul, iar proba este introdusă cu ajutorul unei microsiringi într-un spațiu numit injector sau vaporizator, în care temperatura este mai ridicată decât temperatura de fierbere a componentei celei mai greu volatile. Proba vaporizată este preluată de faza mobilă (numită gaz purtător) care o antrenează în coloana cromatografică. Aici are loc o interacțiune diferențiată a componentelor cu faza staționară, care determină o viteză de migrare diferită și deci separarea lor. Componentele eluate pe rând din coloană ajung în detector, unde ele sunt puse în evidență sub forma unor semnale electrice. Semnalele emise de detector sunt amplificate și ele pot fi înregistrate cu ajutorul unui înregistrator. Diagrama care reprezintă variația semnalului detectorului în funcție de timp se numește cromatogramă și într-o asemenea cromatogramă fiecare componentă apare sub forma unei curbe distincte numită pic cromatografic. Aria delimitată de această curbă este proporțională cu concentrația componentei respective.

Calculul ariei picului se face prin integrare automată. Pentru stabilirea corespondenței cantitative între aria picului și cantitatea componentei respective este necesară efectuarea unei etalonări cu ajutorul componentei respective în stare pură. Prin cuplarea unui gaz cromatograf cu un spectrometru de masă se pot obține informații structurale asupra compușilor prezenți inclusiv se poate confirma greutatea moleculară a acestora.

1.7.3. Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC)

Altă metodă utilizată pentru separarea, determinarea calitativă și cantitativă a probelor lichide este cromatografia de lichide de înaltă performanță. Această tehnică asigură separarea oricărui amestec de substanțe componente

întrucât utilizează detectorul adecvat care permite identificarea și determinarea cantitativă a acestora. Substanțele examinate pot fi identificate de detectoare, prin comparație cu standardul lor. Baza de separare este diferența de afinitate a componentilor celor două faze, faza staționară și faza mobilă. Cel mai cunoscut tip de tehnică HPLC este cromatografia de lichide de înaltă performanță în fază inversată (RP HPLC) și cromatografia de lichide de înaltă performanță cu ioni-pereche (HPLC IP). În sistemul cu fază inversă, faza staționară este ușor polară sau nepolară, în timp ce faza mobilă are o polaritate mai puternică (de exemplu tetrahidrofuran, metanol, acetonitril, apă) [86].

PARTEA II - CONTRIBUȚII PROPRII

PARTEA EXPERIMENTALĂ

II.1. Date botanice referitoare la speciile *Juniperus communis* și *Juniperus virginiana*

Ienupărul *Juniperus communis* L., fam. *Cupressaceae* cunoscut ca ienupărul comun este un arbust conifer, rășinos, microfanerofit, spontan, circumpolar-boreal, întâlnit în pâlcuri sau formând tufărișuri, în rariști și margini de pădure, poieni, pășuni, uneori tinoave, din regiunea colinară până în etajul montan, fiind prezent în întreg lanțul carpatic, între 700 și 1500m altitudine. În munții Apuseni, Podișul Transilvaniei și Munții Rodnei coboară până la 200m; se mai numește *anaperi*, *archiș*, *archit*, *boabe de brad*, *brădișor*, *bradul-ciumei*, *brazi pitici*, *butimoacă*, *cetină*, *cețane*, *ceten*, *cetenă*, *cetină*, *feniar*, *finior*, *ghimpăr*, *ghiper*, *globurău*, *helimoacă*, *hilimoacă*, *ialovăț*, *ieniper*, *ienuper*, *inibahar*, *inipahar*, *iniper*, *ireapăn*, *jerbene*, *jinăpăn*, *jineapăn*, *ce înstină*, *jinept*, *jip mic*, *jireapăn*, *jirepen*, *jâneapăn*, *jneap*, *jneapăn*, *jnepăr*, *jnepen*, *jâneapăn*, *jneap*, *jnepăr*, *jnepen*, *molete*, *șinap*, *șolovăț*, *șncapăn*, *șneapăn*, *șnep*, *șnepen*, *turtel*, *zolovăț*; Engl.: *Juniper*; Franc.: *Genévrier*; Germ.: *Gemeiner Wacholder*. Răspândit în Europa, Asia de Nord, Asia Mică, Africa de Nord, America de Nord [63].

Istoric

Arbust cunoscut în antichitate. Dacii îi spuneau *turtrela*, de unde mai târziu a derivat numele de *turtel* menținut până azi. Ienupărul (*Juniperus*) este un cuvânt de origine latină. Moșii și strămoșii noștri foloseau ramurile cu cetină, cetina (frunzele) și fructele în scopuri medicinale. Ramurile cu cetină se fierbeau, iar cu decoctul obținut se făceau băi împotriva bolilor de sânge. Frunzele se puneau pe jar și se afuma cu ele contra guturaiului. Răceala și afecțiunile interne cu crize acute se tratau cu decoctul obținut prin fierberea pseudobacelor. Tratatrea de hidropizie (dropică) și a bolilor renale se făcea cu un decoct tare din pseudobace de *Juniperus* care se înmoia apoi cu lapte și se bea; în acest scop se mai folosea un amestec din părți egale de pseudobace de *Juniperus*, rădăcină de pătrunjel și rădăcină de urzică. Acestea se fierbeau până ce apa scădea la jumătate. Din acest decoct se bea de mai multe ori pe zi, câte o ceașcă. Înlăturarea pietrelor de la rinichi se făcea cu un decoct obținut prin fierberea pseudobacelor și frunzelor aciculare de *Juniperus* împreună cu coada calului și cozi de cireșe. Din aceste plante se foloseau părți egale. Ele se fierbeau până apa scădea la jumătate. Decoctul se amesteca cu miere și se lua de 3 ori câte o linguriță, înainte de masă. Pentru traterea reumatismului se foloseau frunzele aciculare de *Juniperus*. Acestea se fierbeau, iar decoctul obținut se turna în apa de baie.

Ecologie

Specie rustică, euritermă, heliofită, mezofită, oligotrofă-mezotrofă, amfitolerantă la pH. Crește în plină lumină, nu suportă umbrirea. Vegetează pe soluri revene până la reavăn-jilave. Pot vegeta și pe soluri uscate, dar are nevoie de multă umiditate atmosferică. Are o largă adaptabilitate ecologică față de reacția

ionică a solului. În condițiile naturale preferă terenurile cu reacție ionică slab acidă până la acidă [63].

Descrierea speciei

Tufă deasă, cu ramuri ascendente. Lemn cu duramen gălbui sau brun-roșietic. Alburn îngust-gălbui sau alb-roșietic. Raze medulare vizibile cu lupa. Miros aromatic. Lujeri tineri în trei muchii, bruni. Frunze aciculare, cu o dungă albă pe față, verzi-închis pe dos, drepte, înțepătoare, așezate câte 3 în verticile pe lujer. Flori unisexuate, dispuse dioic, mici; cele bărbătești, galbene, iar cele femeiești, verzi. Polenizare anemofilă. Galbule (semințe + înveliș cărnos) sferice (0,66-0,9mm), la început verzui, apoi negru-albăstrui, brumate. Maturizarea la 2-3 ani. Semințele câte 3, brune, în trei muchii.

Recoltare

Galbulele (*Juniperi fructus* sau *Juniperii baccae*) sunt culese începând cu luna octombrie până în iarnă. Uscarea se realizează în mod natural, în strat subțire, la temperatura camerei, în lipsa razelor solare.



Clasificare științifică

Regnul:	<u>Plantae</u>	Clasa:	<u>Pinopsida</u>	Familia:	<u>Cupressaceae</u>
Diviziunea:	<u>Pinophyta</u>	Ordinul:	<u>Pinales</u>	Genul:	<u>Juniperus</u>

[87]

Compoziția chimică

Pseudobacele de *Juniperus communis* conțin ulei volatil (0,8-1,5%) format din α -pinen, camfen, cadinen, limonen, terpinolen, β – felandren, 1-4-terpineol, mici cantități de alcooli sesquiterpenici, β -pinen, dipenten, mircen, iuniperină (principiu amar), iunen, iunenol, zahăr invertit (circa 30%), zaharoză, grăsimi, pentozani, substanțe proteice, acizii glicerici, glicolici, glucuronic, *l*-ascorbic, acetic, malic, formic, pectine, rășini, săruri minerale cu K, Ca.

Gust dulceag-amăru, aromat, miros balsamic, caracteristic [63].

Ienupăr de Virginia



(Ienupăr din zona estică, frunze aciculare și pseudobace mature)

Clasificarea științifică

Regnul: Plantae Clasa: Pinopsida Familia: Cupressaceae
 Diviziunea: Pinophyta Ordinul: Pinales Genul: Juniperus
 [88]

Ienupărul de Virginia (*Juniperus virginiana* L.), fam. *Cupressaceae*. Arbore înalt până la 30m, frecvent cultivat în scopuri ornamentale și forestiere [63, 89]; se mai numește *cedar roșu* (impropriu denumit [90]), *ienupăr*, *ienupăr roșu*; Germ.: *Virginischer Sadebaum* [63]. Răspândit în America de Nord [90, 91], unde vegetează natural pe o arie vastă în special în zonele cu temperaturi ridicate în timpul verii și moderate iarna [92].

Istoric

Arborele, originar din America de Nord, a fost introdus în Europa către jumătatea secolului al XVII-lea, mai întâi în Anglia, de unde s-a răspândit repede în alte țări. În România, a fost introdus în diferite parcuri și grădini publice și sub formă de arborete experimental. Crescut în masiv strâns, trunchiurile devin cilindrice, lungi, curățate de crăci pe o mare parte de fus, coronamentul rămâne îngust și suficient de redus. În perioada 1905-1906 a fost folosit la împădurirea terenurilor degradate de la Săbed, în Câmpia Transilvaniei.

Ecologie

Extrem de adaptabil din punct de vedere climatic. Optimul de vegetație îl realizează într-un climat relativ dulce și ploios, cu temperatura medie anuală de 15°C. Este adaptat la fum, la frig și secetă, fără a fi rupt de zăpadă și fără a-l supăra inundațiile. Rezistă până la -30°C și chiar -35°C. Temperamentul este de semiombra. Preferă solurile profunde și revene, pe fundul văilor. Poate vegeta pe soluri sărace și uscate precum și pe soluri excesiv de umede, pe coaste stâncoase, sărace și aride fără pretenții de producții. Ca substrat geologic, se dezvoltă pe terenuri de orice natură, părând însă a da preferință celor calcaroase sau cu carbonați.

Descrierea speciei

Arbore cu port alungit piramidal. Trunchi ramificat de la bază; scoarța brună deschis cu pete roșcate. Lujeri tineri subțiri, până la 1cm diametru, nu prea evident muchiați. Frunze solzoase, opuse, rombico-ovate de 0,1-0,2cm, cu vârful drept, înțepător, dezlipit de lujeri, în cursul sezonului de vegetație verzi-închis, iarna galben-brune. Frunzele exemplarelor tinere și cele de pe lujerii viguroși sunt aciculare, lineare, lung ascuțite, înțepătoare, lungi până la 1cm, câte 3 în verticile și

mai mult sau mai puțin perpendiculare pe ax. Flori dioice. Înflorire IV-V. Fructe, pseudobace sub formă de conuri lungi de 6mm, cărnoase, cu gust dulceag, rășinos, cu maturaj anuală, de culoare albastrui brumate, cu 1-2 semințe [63].

Alte specii de *Juniperus*

Tabelul 2.1. Speciile de *Juniperus* împărțite pe secțiuni [93]

Secțiunea Sabina				Secțiunea Juniperus	Secțiunea Caryo cedrus
E1	Em	V	V'		
<i>J. carinata</i>	<i>J. chinensis</i>	<i>J. barbadensis</i> L.	<i>J. angosturana</i>	<i>J. brevifolia</i>	<i>J. drupacea</i>
<i>J. convallium</i>	<i>J. davurica</i>	<i>J. bermudiana</i> L.	<i>J. ashei</i>	<i>J. cedrus</i>	
<i>J. coxii</i>	<i>J. erectopatens</i>	<i>J. blancoi</i>	<i>J. californica</i>	<i>J. communis</i> L. var. <i>communis</i>	
<i>J. indica</i>	<i>J. excelsa</i>	<i>J. gracilior</i>	<i>J. coahuilensis</i>	<i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	
<i>J. komarovii</i>	<i>J. excelsa</i>	<i>J. gracilior</i> var. <i>ekmanii</i>	<i>J. comitana</i>	<i>J. formosana</i>	
<i>J. microsperma</i>	<i>J. foetidissima</i>	<i>J. gracilior</i> var. <i>urbaniana</i>	<i>J. deppeana</i> var. <i>deppeana</i>	<i>J. lutchensis</i>	
<i>J. morrisonicola</i>	<i>J. jarkendensis</i>	<i>J. lucayana</i>	<i>J. durangensis</i>	<i>J. macrocarpa</i>	
<i>J. pingii</i>	<i>J. phoenicea</i>	<i>J. horizontalis</i>	<i>J. flaccida</i> var. <i>flaccida</i>	<i>J. navicularis</i>	
<i>J. przewalskii</i>	<i>J. polycarpos</i>	<i>J. mucronata</i>	<i>J. gamboana</i>	<i>J. oxycedrus</i> L.	
<i>J. pseudosabina</i>	<i>J. polycarpos</i>	<i>J. saxicola</i>	<i>J. jaliscana</i>	<i>J. oxycedrus</i> var. <i>badia</i>	
<i>J. recurva</i>	<i>J. polycarpos</i>	<i>J. scopulorum</i>	<i>J. monosperma</i>	<i>J. rigida</i>	
<i>J. saltuaria</i>	<i>J. polycarpos</i>	<i>J. virginiana</i>	<i>J. monticola</i>	<i>J. rigida</i> var. <i>conferta</i>	
<i>J. squamata</i>	<i>J. procera</i>	<i>J. virginiana</i> var. <i>silicicola</i>	<i>J. occidentalis</i> var. <i>occidentalis</i>	<i>J. taxifolia</i>	
<i>J. tibetica</i>	<i>J. sabina</i> L.		<i>J. osteosperma</i>		
<i>J. wallachiana</i>	<i>J. semiglobosa</i>		<i>J. pinchotii</i>		
	<i>J. semiglobosa</i> var. <i>talassica</i>		<i>J. saltillensis</i>		
	<i>J. thurifera</i> L.		<i>J. standleyi</i>		

*E1-Frunze netede, o singură sămânță, emisfera estică, Em- Frunze netede, mai multe semințe, emisfera estică; V- Frunze netede, emisfera vestică; V'- Frunze așezate în zig-zag, din emisfera vestică.

Juniperus communis subsp. *alpina* denumit „ienupărul montan”, este un arbust de 0,5-1,5m înălțime. În Europa crește la altitudini de 1700-2500m, iar în Corsica până la 1000m. Uleiul esențial din părțile anatomice supraterane este produs la nivel local pentru comercializare [94, 95].

Juniperus nana este întâlnit în zonele de joasă altitudine din nordul Europei și în munții înalți din Europa Centrală și Sudică. Este un arbust dioic, cu o înălțime mai mică de 50cm și mai mult de 3m în diametru. Galbulele sunt mici (diametru de 4-5mm), iar frunzele sunt mici (1-1,5×9-10mm), ascuțite, apropiate și distribuite ascendent [96]. Arbuști de *Juniperus communis* ssp. *nana* se întâlnesc și în regiunea montană din Sardinia, Corsica [97] și Italia [98].

Juniperus hemisphaerica se găsește în deosebi în zonele muntoase din sudul Europei, nord-estul Africii, nord-vestul Africii și în Regatul Unit al Marii Britanii [97]. Este un arbust, ce prezintă galbule de dimensiuni relativ mari (6-7 (10) mm) și frunze aciculare mai mari decât la *J. nana* (1-1.5×15-17 mm) [98] *Juniperus communis* ssp. *hemisphaerica* poate ajunge până la 2,5m înălțime. Conurile ajung la maturitate în același timp ca în cazul speciei *Juniperus sabina* [99].

Juniperus communis var. *saxatilis* este un arbust mic. Această specie de *Juniperus* este foarte răspândită în țările nordice și la altitudini ridicate. Cel puțin, acestea sunt caracteristicile care îl diferențiază de *Juniperus communis* var. *communis*. Totuși, caracteristicile de habitat sunt diverse pentru *Juniperus communis* var. *saxatilis*; într-un habitat acest arbust poate fi întâlnit sub diferite forme [100].

În California, în locuri cu condiții climatice asemănătoare cu cele din Alpi, Pirinei și Corsica, sunt întâlnite patru varietăți de *Juniperus communis*: *depressa*, *montana*, *jackii* și *sibirica* [101].

Juniperus excelsa crește în regiunile montane din Iran, iar pseudobacele sunt folosite pentru obținerea uleiului comercial de *Juniperus* [102]. Această specie mai poate fi întâlnită, la altitudini între 500 și 2300m, în Grecia, Crimeea, zonele de deal din estul bazinului mediteraneean, Marea Neagră și în sudul Mării Caspian [103]. În urma unui studiu efectuat pe pseudobacele acestei specii, provenite de pe muntele Kalamoun din Siria, de la diferite altitudini, s-a constatat că germinarea semințelor de la 2100 m a fost influențată de durata perioadei de căldură și de zonele de frig [104].

Juniperus foetidissima este răspândit în Turcia, Grecia, Albania, Iugoslavia, Siria și Crimeea. Arborele atinge până la 10-20m, poate crește la soare și supraviețuiește fără apă timp îndelungat. Pseudobacele la maturitate au culoarea roșu-brun spre negru, diametrul de 7-12mm și pot prezenta 1-2 semințe, foarte rar 3 (ceea ce le diferențiază de *Juniperus excelsa*, a cărui pseudobace conțin 4-6 semințe). La ruperea frunzelor cu mâna se eliberează un miros neplăcut [105].

Juniperus seravschanica este un arbore veșnic verde, ce poate ajunge până la 20m înălțime [106], răspândit în munții din Asia Centrală și nordul Afganistanului [107]. Crește la altitudini de 900m până la 2300m; între 1400-3100m se întâlnește specia *J. semiglobosa*, iar peste 2500m apare specia *J. pseudosabina* [108]. Unele date de literatură specifică existența speciei *J. semiglobosa* și la altitudine de 2500m [109]. Acest arbust crește foarte încet ajungând în aproximativ 300 de ani la 20m și în diametru până la 50-100cm [108]. Pseudobacele de *J. seravschanica* sunt sub formă de conuri, ajung la maturitate după al doilea an de înflorire [107]. Au fost izolate două flavonoide din această specie: isoquercitrina respectiv flavonglicozida zervschanozida (5,6,8,31,41-pentahidroxii-7-O-β-D-glucopiranozil flavona) [106].

Extractele din pseudobace au activitate diuretică, antiinflamatoare și anticoleră. Ele sunt utilizate în reumatism, paralizia membrelor inferioare, dureri de cap și ca expectorant în bronșită și laringită [107].

Semințele de *Juniperus polycarpus* var. *seravschanica* au fost utilizate în medicina tradițională pentru tratarea bolilor de rinichi, dar și pentru efectul lor diuretic și abortiv în Uzbekistan. Trei, din terpenoidele analizate (cedrol, sugiol și acid 12,15-dihidroxiabda8(17), 13-dien-19-oi), au prezentat activitate împotriva malariei [110].

Juniperus chinensis este un arbore cu frunze aciculare permanent verzi. Este răspândit în Japonia, Coreea și China [111]. Compușii antioxidanți izolați din tulpină de *J. chinensis* au fost: quercetina, naringenina, taxifolina, aromadendrina respectiv isoquercitrina. Extractul etanolic din pseudobace de *J. chinensis* (Corea) a prezentat efect hipoglicemic, în schimb extractul apos a avut un efect hipolipidic mai accentuat decât extractul etanolic [112]. În frunzele aciculare de *J. chinensis* s-a găsit cea mai mare cantitate de (-)-yateină, figura 2.1.

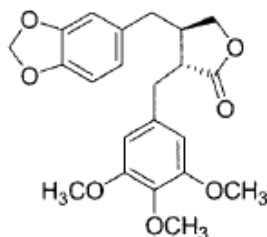


Figura 2.1. (-)-Yateina ((3*R*,4*R*)-4-(1,3-benzodioxol-5-ilmetil) dihidro-3-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-2(3*H*)-furanona) [113]

Juniperus procera, denumit Arar, este cunoscut ca *Juniperus* african; răspândit în zonele montane din estul Africii până în estul Sudanului, la Zimbabwe și în sud-vestul Peninsulei Arabice. Această specie de *Juniperus*, este un arbore ce poate atinge 20-25m (mai rar 40). La nivel local este utilizat în tratarea tuberculozei și a icterului [114]. *Juniperus procera* este o plantă perenă dioică, mai rar un arbore monoecioic. Este ienupărul cel mai înalt din lume. Acesta are două faze de dezvoltare, stadiul tânăr și adult. Acestea pot fi distinse prin forma trunchiului și a coroanei. Au o formă piramidală, atunci când sunt tineri. Poate ajunge până la 45m înălțime la maturitate. Conurile de sex masculin sunt mici și rotunde, cele de sex feminin sunt rotunjite, iar la maturitate devin cărnoase și moi. Poate fi întâlnit la altitudini între 1800-3200m, mai des între 2200-2500m [115]. Totarolul izolat din această specie are activitate împotriva malariei [116].

Juniperus recurva crește la altitudini de 3000-4000m și este o specie originară din Himalaya, răspândită în nordul Pakistanului până în sud-vestul Chinei. Uleiul esențial conține cantități însemnate de podophyllotoxină [117]. *Juniperus recurva* var. *coxii* este un arbust cu ramuri lungi, frunze de 6-10mm [118].

Juniperus sibirica Burgsdorf., este una dintre cele cinci specii ale genului *Juniperus*, ce poate fi întâlnită în Serbia. Pentru prima dată a fost descoperită în Rusia [45].

Juniperus thurifera crește în zonele calcaroase din vestul bazinului mediteranean. Se găsește în Alpi (Franța și Italia), în munții din Peninsula Iberică (Spania), precum și în Corsica și Algeria. Arborii pot ajunge până la înălțimi de 5-10m (în mod excepțional 20m). Pseudobacele ajung la maturitate după 22 de luni și conțin în medie 3,5 semințe (1-7) [119]. *Juniperus thurifera* are două subspecii:

thurifera și *africana*. Diferențele dintre cele două sunt date de diametrul pseudobacelor (*thurifera*: 7-12mm, *africana*: 5-6mm), numărul semințelor (*thurifera*: 2-5, *africana*: 1-2), masa pseudobacelor (*thurifera*: 240-300mg, *africana*: 130-200mg) și prezența prodelfinidinei (*thurifera*: foarte scăzută, *africana*: mare) [120].

Juniperus drupaceae aparține genului *Arceuthos*, familia Cupressaceae. Arborele poate ajunge până la 10-20m înălțime, frunzele au lungimi de 15-25mm, iar pseudobacele au formă globulară, inițial de culoare verde dar la maturitate prezintă o culoare violet-albăstruie spre brun. Poate fi întâlnit în Turcia, dar și în Siria, Lebanon și Peninsula peloponeză a Greciei [121] la altitudini de 600-2050m dar și la 350-1250m (Masivul Parnon) [122]. În al doilea an, pseudobacele mature, sunt utilizate la obținerea unui suc concentrat de fructe specific turcesc, numit „pekmez”. Cantitatea de nutrienți principali din 100g fruct de *J. drupaceae* este de 34,97g zahăr, 1499mg Ca, 1445mg P și 12,79mg Zn [121].

Juniperus oxycedrus (denumit și ienupărul înțepător) provine din regiunile mediteraneene [123], Monaco și Portugalia [41] este un arbore ce poate atinge până la 8m; crește în zonele de deal și terenuri stâncoase [123], până la 1600m altitudine [41]. A fost descoperit și la o altitudine de 1300-1350m în Bulgaria [124]. Prezintă trei subspecii: *rufescens*, *badia* și *macrocarpa* [125]. Uleiul esențial din pseudobacele și frunzele aciculare, ale acestei specii, au fost utilizate în medicina umană și veterinară [123]. Pseudobacele sunt utilizate în bucătăriile europene pentru aroma lor [41]. Testele farmacologice au demonstrat, în cazul acestei specii, că prezintă o toxicitate acută redusă, însă prezintă activitate antiinflamatoare și analgezică semnificativă [43]. Extractele în diclormetan și metanol din frunze aciculare de *J. oxycedrus* (din Spania) reduc presiunea sanguină la șobolanii normotensivi, inhibă răspunsul la histamină, serotonină respectiv acetilcolină și prezintă activitate antiinflamatorie [126,127]. Uleiurile esențiale din pseudobace și microblaste de *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* prezintă efect „scavenging” față de radicalul DPPH. Microblastele prezintă activitate hipoglicemică, prin inhibarea α -amilazei [128].

Juniperus phoenicea este o specie întâlnită în Egipt, în bazinul mediteranean, din Portugalia până în Israel [129] și se extinde până în zona muntoasă din vestul Arabiei [130, 131], nordul Africii și Algeria [129]. Uleiul esențial al frunzelor aciculare și al pseudobacelor a prezentat efecte citotoxice (asupra liniei de celule tumorale de la nivelul creierului, plămânilor, ficatului și glandelor mamare) și antimicrobiene [132].

Juniperus formosana (cu speciile *Juniperus chekiangensis*, *J. formosana* var. *con-color*, *J. formosana* f. *tenella*, *J. mairei*) este caracterizată prin arbuști sau arbori de până la 15 m înălțime, coaja de culoare brun; de obicei, coroana are formă piramidală sau cilindrică. Frunzele sunt așezate câte 3, în spirale, liniar-lanceolate, cu 2 benzi albe. Conurile de formă globulară sau elipsoidă, 4-6 mm, la maturitate sunt brun roșcate, adesea au 3 semințe [133].

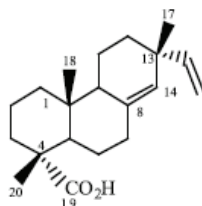
Juniperus pingii este un arbust sau arbore hermafrodit. Unele frunze sunt așezate în spirală, de culoare verde-albăstrui, iar celelalte sunt verzi. La maturitate conurile sunt negre, de formă globulară și prezintă câte o sămânță. Poate fi întâlnit la altitudini de 2600-4900m [134].

Juniperus chengii, arbori de până la 9 m înălțime, ramurile sunt arcuite, frunzele aciculare așezate câte 3 în spirală, prezintă caneluri longitudinale. Conurile la maturitate sunt negre-purpuri, globular alungite prezentând o singură sămânță. Se întâlnește la altitudini de 3100-3200m [135].

Juniperus baimashanensis, arbuști de 60 cm înălțime; ramurile sunt așezate aproape paralel, nu în unghi, sunt subțiri și drepte. Frunzele aciculare sunt distribuite în spirală, câte 3; prezintă caneluri longitudinale. Conurile sunt brun închise la maturitate prezentând câte o sămânță. Crește la altitudini de circa 3400m [136].

Juniperus sabina are frunze așezate în scară, crește pe pământ, arbustul are o formă eliptică cu un diametru până la 20m [99]. În urma unui studiu pe linii de celule tumorale s-a descoperit un efect pozitiv al extractelor din pseudobace de *J. sabina* [137].

Juniperus lucayana poate fi întâlnită în Cuba, Jamaica și insulele Bahamas [138]. Acidul sandaracopimaric – este un compus prezent în extractele părților supraterane de *Juniperus lucayana* – și are efect antifungic, împotriva fungului fitopatologic, *Botrytis cinerea* (atacă cerealele, strugurii și căpșunile) [139].



Acid sandaracopimaric (acid (-)-pimara-8(14), 15-dien-19-oic) [139]

Principali componenți ai speciilor de *Juniperus communis*

O caracteristică a compoziției chimice a organismelor vegetale este numărul deosebit de mare al substanțelor organice care constituie produșii intermediari ai metabolismului sau formează reziduuri ale metabolismului vegetal. Uleiurile eterice sau uleiurile esențiale (metaboliți secundari), se găsesc răspândite în diferitele organe vegetale, formând depozite în vacuole, în punși sau canale speciale, intercelulare. Uleiurile esențiale sunt complecși naturali, sisteme multicomponente alcătuite în special din terpeni și derivații lor oxigenați alături de alți componenți nonterpenici.

Uneori, în uleiurile eterice se găsesc și cantități mici de alte substanțe, ca gliceride și componenții lor, pigmenți, chiar și glucide, pectine, biflavonoide, etc.

De multe ori, într-un organ al unei plante se găsesc un număr mai mare de monoterpeni diferiți. De exemplu, în scoarța de *Juniperus communis* au fost găsiți următorii monoterpeni:

Camfen	β-Felantren	Mircen	α-Terpinen
Caren	Limonen	α-Pinen	γ-Terpinen
para-Cimen	cis-Mentan	β-Pinen	Terpinolen

Unul și același compus terpenoidic este prezent în cantități diferite în speciile de *Juniperus* ca de exemplu:

Sabinen	10 – 40% în <i>Juniperus communis</i> L., ssp. <i>communis</i>
	9 – 28% în <i>Juniperus communis</i> L., ssp. <i>terpineoliferum</i>

Așa cum se poate observa din tabelul 2.2., compoziția uleiului esențial din *Juniperus* variază în limite largi dependent de specie și locul unde crește [140, 141].

Tabelul 2.2. Constituenții principali (%) ai uleiurilor esențiale din pseudobace de *Juniperus* mature (R) și imature (U) [141]

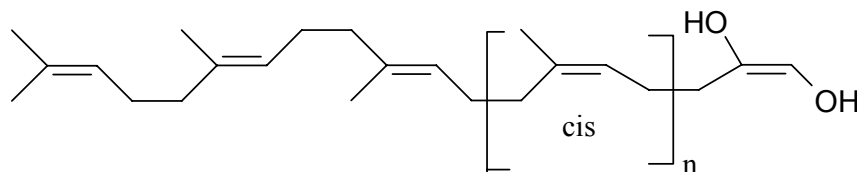
Specii de ienupăr (locul de recoltare)	Pseudobace	Locația A	Locația B	Locația C	Locația D	Locația E
<i>J. communis</i> L. (Polonia)	R*	α -pinen, 39,9	mircen, 15,7	terpinen-4-ol, 5,5	limonen, 4,5	α -terpineol, 3,9
	***	α -pinen, 60,1	mircen, 5,5	terpinen-4-ol, 2,9	cariofilen, 2,5	limonen, 1,9
	***	α -pinen, 22,9	p-cimen, 9,7	limonen, 6,5	β -pinen, 5,6	bornilacetat, 3,2
<i>J. communis</i> L. (Montenegro, 1000m altitudine)	R	α -pinen, 39,2	mircen, 18,2	sabinen, 17,8	limonen, 5,2	germacren D, 3,8
	R	α -pinen, 30,5	sabinen, 28,0	mircen, 27,5	limonen, 3,1	β -pinen, 1,7
<i>J. communis</i> L. (Iran, 2000m altitudine)	U	α -pinen, 49,4	sabinen, 21,8	mircen, 9,3	β -pinen, 2,1	limonen, 1,2
	?	sabinen, 36,8	α -pinen, 19,9	limonen, 10,6	germacren D, 8,1	mircen, 4,8

Notă: * - pseudobace provenite din comerț, ** - uleiuri comerciale, ? - nu sunt indicate în lucrare

În unele cazuri α -pinenul este prezent la nivel de 30-39% în uleiul esențial obținut din fructe coapte din mai multe țări, dar nu este reprezentativ pentru locații diferite din aceeași țară. Mircenul apare în procente variabile, între 4,8-18%.

Prezența α -pinenului este deosebit de benefică, acesta fiind responsabil de diferite bioactivități ca: **antimicrobian, antioxidant, repelent, anticancerigen** [142, 143].

Caracteristic unor glicolipide ca și unor glicoproteine este prezența în moleculă a *poliprenolilor* ca de exemplu a C_{95} , *poliprenol* – cu o structură asemănătoare cu cea a dolicolilor întâlniți la animale de tip poliizoprenic, $H-(C_5H_8)_n-OH$:



Formula generală a unui *poliprenol*

Poliprenolii din *Juniperus communis* apar fie liberi fie esterificați cu acizi grași iar numărul resturilor de izopren variază între 14-21 [144]. Acești *poliprenoli* din plante stimulează sistemul imunitar, repararea celulelor, spermatogeneza, activitatea antistres, activitate antiulcerogenă.

O mențiune specială pentru *Juniperus virginiana* L. care este propus ca sursă pentru obținerea **podophyllotoxinei**, substanță de bază pentru obținerea unor medicamente folosite în tratamentul cancerului, artritelor reumatoide, psoriazisului și sclerozei multiple [145].

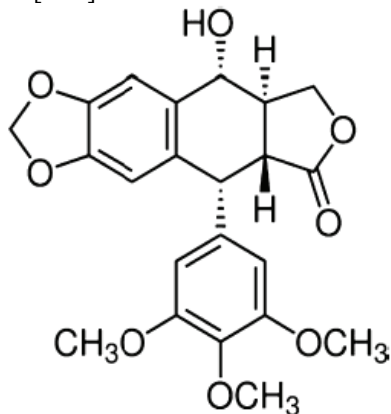


Figura 2.2. Structura *podophyllotoxinei* [146]

Podophyllotoxina este un compus valoros din punct de vedere farmaceutic și devine important în comerț, ca materie primă pentru semisinteza agenților antitumorali, *Eposin* și *Teniposide* [111]. În cazul plantelor de *Juniperus virginiana* L. colectate din pădurile din Nordul Americii, conținutul de podophyllotoxină în extractul eteric a variat între 1,06 – 1,56 mg/g fiind maxim pentru probele recoltate în perioada ianuarie-aprilie [145]. Frunzele aciculare de *Juniperus virginiana* provenite din Verona, au prezentat un conținut de podophyllotoxină de 0,218-0,221 %

masa uscată, în extractele obținute prin hidrodistilare. Însă în uleiul esențial al aceluși frunze aciculare, podophyllotoxina a fost absentă [146]. În frunzele aciculare de *Juniperus virginiana* provenite din Mississippi concentrația de podophyllotoxină a fost de 0,147-0,290 (% masă uscată) [147].

Pe lângă podophyllotoxină (PDP) au mai fost analizați și analogii cu potențial terapeutic prezenți în diferite specii de *Juniperus*: podophyllotoxona (PDPT); deoxipodophyllotoxin (dPDP); dimetilpodophyllotoxin (dmPDP). S-a constatat că dPDP se găsește în cantitatea cea mai mare (329000μg/100g masa uscată în extractul organic *J. x-media* Pfitzeriana), urmată de PDP (100000 μg/100g masa uscată în extractul total *J. x-media* Pfitzeriana) respectiv PDPT (555μg/100g în extractul anterior amintit), iar dPDP s-a găsit în cantități extrem de mici. Extractul organic a fost obținut prin ultrasonarea amestecului de frunze aciculare, în metanol:cloroform (80:20). Prin ultrasonarea amestecului – reziduu anterior obținut, în apă:metanol (90:10) s-a obținut extractul apos. Extractul total este amestecul dintre extractul organic și cel apos [148].

Un experiment realizat în Dakota asupra variației concentrației de nutrienți pe perioada dezvoltării speciei de *Juniperus virginiana* a evidențiat că în general, concentrația de azot, fosfor, sulf și magneziu a crescut semnificativ în cursul evoluției plantei. Concentrația în calciu zinc și fier au rămas constante, iar concentrația de potasiu a scăzut până în iulie după care s-a redresat până la valoarea inițială [149].

Uleiul volatil, care are importanță practică, este obținut prin antrenare cu vapori de apă a ramurilor și fructelor mature ale plantelor de *Juniperis communis* L. var. *montana*, *Juniperus communis* L. ssp. *communis*, *Juniperus virginiana*, ssp. *terpinneoliferum*, *Juniperus virginiana* L., ale căror componenți principali sunt prezentați în tabelul 2.3.

Tabelul 2.3. Principalii componenți ai uleiurilor eterice de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*

Tip de compus	<i>J. communis</i> L. <i>var. montana</i>	<i>J. communis</i> L. <i>ssp. communis</i>	<i>J. virginiana</i> L. <i>ssp. terpineolif</i>	<i>J. virginiana</i> L.
MONOTERPENE	90% α -pinen (40-90 %), β -pinen sabinen, limonen (10-40%)	>50% α -pinen, β -pinen limonen majoritar γ -terpinen	50-82% α -pinen (34-46%) sabinen (9-28%) mircen (6-8%)	
ALCOOLI MONOTERPEN ICI	linalool, α -terpineol	terpinen-1-ol-4	linalool, terpinen-1-ol-4 (5-10%)	
SESQUITERPENE NE Hidrocarburi	β -cariofilen α - și γ -cadinen	β -cariofilen, germacran B α -muurolen	α - muurolen	36-62%, α - cedren, β -cedren, tujopsen, cuparen cedrol pseudocedrol cedrenol, widrol γ -eudesmol
Alcooli	α -cardinol	α -eudesmol elemol elemoferol		
Esteri terpenici	acetat de bornil, acetat de terpenil (30%)	acetați de bornil, acetat de terpenil		
Aldehide și cetone			camfolenică, camforă pinocamforă, geijeronă juniononă	
Acizi	camfolenic			
Cumarine		umbeliferonă		

II.2. Obținerea extractelor din speciile studiate

II.2.1. Recoltarea, păstrarea și pregătirea materiei prime

Materia primă: frunzele aciculare, pseudobacele și microblastele de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana* au fost culese în perioada noiembrie-decembrie între anii 2008-2010 din diverse regiuni muntoase și de câmpie din țară: de la Lipova (la o altitudine de 700m), Macea (98m), Albac (1300m), precum și din străinătate: Austria (Ștubalte, Steiermark-1100m), Siria (Slumfe, Latakia-829m) și Suedia (Fróson, Östersund-468m). După recoltare, materialul vegetal corespunzător celor trei părți anatomice, a fost uscat la temperatura camerei, separat și păstrat în cutii de carton, la întuneric.

Înainte de extracție materialul vegetal – pseudobace, frunze aciculare, microblaste – a fost mărunțit cu (cu ajutorul unei râșnițe (HE 840S, HE. HOUSE Corporation) la o viteză 13.500 rpm).

II.2.2. Extracția prin refluxare

II.2.2.1. Obținerea de extracte de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana* (pseudobace, frunze aciculare și microblaste)

Obiectivul acestui studiu a fost identificarea calitativă și cantitativă a compușilor volatili în funcție de solventul organic folosit, de tipul de plantă și de proveniența acesteia.

Pentru găsirea unei metode eficiente și a unui solvent de extracție potrivit s-au folosit mai mulți solvenți și anume, acetat de etil, cloroform, hexan, tetrahidrofuran și toluen.

Materiale utilizate:

Materia primă pentru obținerea extractelor în solvenți organici au fost pseudobace, frunze aciculare și microblaste de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana* uscat, recoltat din toate regiunile amintite anterior, în 2008-2010. Solvenții utilizați au fost acetat de etil, cloroform, hexan, tetrahidrofuran (p.a., Chimopar, București) respectiv hexan (HPLC, Sigma,). Ca agent de uscare: sulfat de sodiu (Fluka).

Mod de lucru:

2 grame pseudobace, respectiv frunze aciculare, microblaste (*Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*), mărunțite în prealabil, au fost extrase cu 15mL solvent organic, prin refluxare, timp de 30 minute. Amestecul obținut a fost filtrat, uscat pe sulfat de sodiu și păstrat la frigider (4°C) până în momentul determinării compoziției extractului și a activității sale antioxidante.

II.2.2.2. Obținerea extractelor alcoolice din frunze aciculare și pseudobace de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus* necesare obținerii nanocapsulelor

Materiale utilizate:

Ca materie primă pentru obținerea extractelor alcoolice - din pseudobace - s-a folosit material vegetal (de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*) uscat, recoltat din toate regiunile amintite anterior, în 2008-2010. Alcoolul etilic

(96%) folosit a fost procurat de la Chimopar, București, iar sulfatul de sodiu a fost produs Fluka.

Mod de lucru:

2 grame pseudobace (*Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*), mărunțite în prealabil, au fost extrase cu 15mL alcool etilic, prin refluxare, timp de 30 minute. Amestecul obținut a fost filtrat, uscat pe sulfat de sodiu și păstrat la frigider (4°C) până în momentul analizelor (identificarea unor compuși antioxidanți cu ajutorul cromatografiei de lichide de înaltă performanță) și obținerea de nanocapsule cu β -ciclodextrină, realizarea eliberărilor controlate din nanocapsule.

II.2.3. Extracția prin ultrasonare

II.2.3.1. Obținerea de extracte în patru solvenți organici din trei părți anatomice de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*

Ținând cont de avantajele extracției prin ultrasonare și de faptul că unii componenți sunt termolabili, a fost realizată extracția asistată de ultrasunete din pseudobace, frunze aciculare și microblaste.

Materiale utilizate:

Materialul vegetal (pseudobace, frunze aciculare și microblaste) a fost colectat din specia de *Juniperus communis* crescut spontan în zone deluroase din România (Lipova -700m, Albac - 1200m), din Austria (Stubalte, Steiermark-1100m) și Siria (Slumfe, Latakia-829m). Probele de *Juniperus virginiana*, varianta cultivată, au fost colectate din Grădina Botanică "Macea", România-98m, respectiv din arbori crescuți spontan din Siria (octombrie 2009). Solvenții utilizați pentru extracție la cald prin ultrasonare au fost acetat de etil, cloroform, tetrahidrofuran, toluen (Chimopar, București) și hexan (Sigma-Aldrich). Extractele filtrate au fost uscate pe sulfat de sodiu anhidru (Fluka Chemie AG).

Baia de ultrasonare folosită are următoarele caracteristici: HK2200, 100W, 50 kHz.

Mod de lucru [78]:

1 gram de pseudobace, frunze aciculare și microblaste (*Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*), mărunțite în prealabil, au fost extrase cu 6mL solvent organic, prin ultrasonare, timp de 10 minute la temperatura camerei. Amestecul obținut a fost filtrat, uscat pe sulfat de sodiu și păstrat la frigider (4°C) până în momentul analizelor: de identificare a componenților volatili.

II.2.4. Extracția cu ajutorul unei instalații micropilot prevăzută cu generator de ultrasunete

Extracția cu solvenți organici din frunze aciculare și pseudobace de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana* s-a realizat folosind o instalație micropilot de concepție originală. Instalația realizată are la bază un minireactor prevăzut cu un generator de ultrasunete și un sistem de agitare. Acest minireactor a avut doar rol de sistem automat de extracție. Ținând seama de unele date de literatură care recomandă pentru alt tip de extracție și temperatura de 30°C [150], am lucrat la 3 temperaturi diferite 30°C, 35°C, 40°C pentru solvent cloroform și 45°C, 50°C, 55°C pentru solvent alcool etilic.

Minireactorul folosit are capacitatea de 1,5L și poate fi utilizat până la 80% din capacitate vasului și a fost prevăzut cu un dispozitiv de agitare mecanică acționat de un motor electric de turație reglabilă. Generatorul de ultrasunete a dus la îmbunătățirea gradului de extracție pentru compușii volatili dar secundar, ca efect nedorit a dus la încălzirea mediului de extracție. Temperatura extractului a fost monitorizată pe toată perioada extracției cu ajutorul traductorului de temperatură conectat la un sistem de achiziție digitală a datelor.

Ca solvent s-a ales cloroformul, deoarece în experimetele anterioare de extracție cu ultrasunete unii compuși s-au obținut în cantități mai mari.

Extractul astfel obținut a fost concentrat la evaporatorul rotativ și utilizat pentru testarea activității antimicrobiene.

II.2.4.1. Obținerea de extracte cloroformice

În figura 2.3 este prezentată instalația micropilot pentru extracție cu generator de ultrasunete realizată, formată din:

- o dispozitiv de agitare mecanică cu palete acționat de un motor electric cu turație reglabilă;
- o un generator de ultrasunete (A Hielscher UP50H ultrasonic processor (Hielscher, Germany) frecvența de 30 kHz și puterea de 50 W);
- o un sistem de reglare a temperaturii alcătuit din: traductor de temperatură (termocuplu de tip J confecționat din fier), un regulator proporțional integral derivativ (PID, E5CK Omron) și un element de execuție (electrovalvă tip Burkert).

Deoarece o mare parte a energiei transmisă masei de reacție de către generatorul de ultrasunete, se transformă în căldură, este necesară răcirea controlată a sistemului în vederea menținerii unei temperaturi constante pe tot parcursul desfășurării extracției. Masa de reacție este permanent uniformizată pe parcursul extracției cu ajutorul dispozitivului de agitare mecanică cu palete acționat de un motor electric cu turație reglabilă.

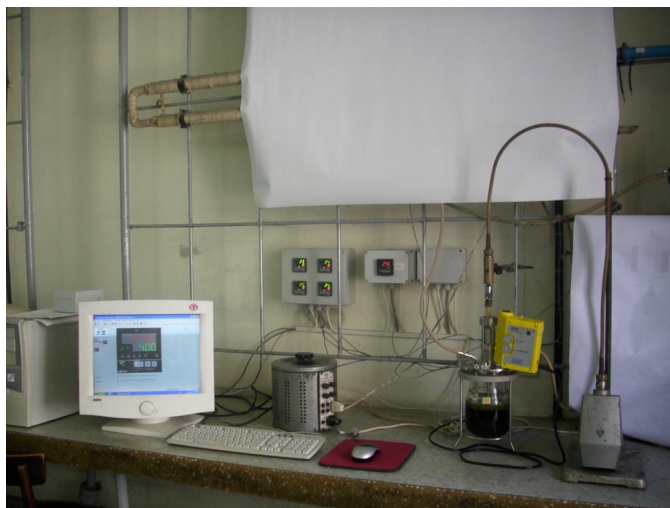


Figura 2.3. - Instalația micropilot pentru extracție, cu generator de ultrasunete

Schema automatizată a instalației de reglare a temperaturii în timpul extracției

În procesul de extracției un parametru important este temperatura, care poate fi controlată cu ajutorul unei instalații automatizate de reglare a temperaturii. Pentru menținerea temperaturii constante pe tot parcursul extracției s-a folosit o instalație ce este prezentată schematic în figura 2.4.

Componentele sistemului de control sunt: traductor de temperatură, regulator și element de execuție-electrovalvă.

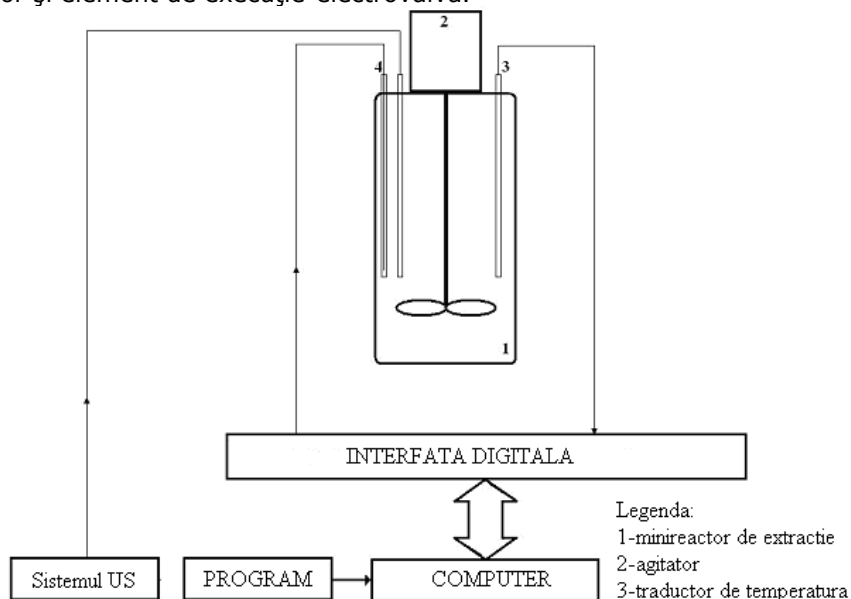


Figura 2.4. - Schema instalației de reglare a temperaturii

II.2.4.2. Obținerea de extracte alcoolice din pseudobace și frunze aciculare de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*

Prin extracția cu minireactorul folosind alcool etilic ca solvent s-a urmărit obținerea unei cantități mai mari de extract, concentrarea acestuia și testarea activității antimicrobiene.

Materiale utilizate:

Materia primă folosită pentru obținerea extractelor cloroformice este aceeași ca în experimentele II.2.4.1.

Extracția s-a realizat la 45°C, 50°C și 55°C.

Mod de lucru:

70 grame pseudobace și frunze aciculare (*Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*), mărunțite în prealabil, au fost extrase cu 960mL alcool etilic (96%, p.a. Chimopar, București), timp de 2 ore la o temperatură constantă de 45, 50 respectiv 55°C. La fiecare 15 minute (pentru temperatura de 45°C) s-au colectat câte 4mL extract. Fiecare extract a fost filtrat, concentrat la evaporatorul rotativ și păstrat la frigider (4°C) până în momentul analizelor: respectiv testarea pe microorganisme gram positive și gram negative.

Materiale utilizate:

Ca materie primă pentru obținerea extractelor cloroformice - din pseudobace și frunze aciculare - s-a folosit material vegetal (de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*) uscat recoltat de la Macea și de la Lipova în octombrie 2009. Cloroformul folosit a fost procurat de la Chimopar, București, iar sulfatul de sodiu a fost produs Fluka.

Mod de lucru:

70 grame pseudobace sau după caz 70g frunze aciculare (*Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*), mărunțite în prealabil, au fost extrase cu 960mL cloroform (p.a. Chimopar, București), timp de 2 ore la o temperatură constantă de 30, 35 respectiv 40°C. La fiecare 15 minute (pentru temperatura de 30°C) s-au colectat câte 4mL extract. Fiecare extract a fost filtrat, uscat pe sulfat de sodiu și păstrat la frigider (4°C) până în momentul analizelor: determinarea calitativă, la GC-MS și cantitativă, la GC-FID, a unor compuși volatili.

II.2.5. Obținerea uleiurilor esențiale din pseudobace de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana* prin hidrodistilare

Obiectivul urmărit a fost obținerea uleiurilor esențiale din pseudobace prin hidrodistilare și nanoîncapsularea extractelor. Din datele de literatură [128] s-a constatat că cea mai mare cantitate de ulei esențial se află în pseudobace, motiv pentru care la extracția prin hidrodistilare am folosit numai pseudobace.

Materiale utilizate:

Materia primă folosită pentru obținerea uleiurilor esențiale - din pseudobace - a fost materialul vegetal (de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*) uscat, recoltat de la Macea, Lipova și Albac în 2008-2009.

Mod de lucru [39, 151, 152]:

50 g pseudobace de *Juniperus virginiana*, respectiv de *Juniperus communis* au fost mărunțite și extrase cu 500mL apă distilată. La balonul de 1000mL în care s-a adăugat amestecul (apă/material vegetal), s-a atașat un refrigerent și un vas colector. Separarea uleiului esențial de hidrodistilat s-a făcut cu ajutorul unei pâlnii de separare. După 3 ore [128, 105, 153-158] de hidrodistilare s-a obținut uleiul esențial care a fost uscat pe sulfat de sodiu și păstrat la frigider. Randamentul de extracție al uleiului esențial a fost de 1,25% (V/m), procent comparabil cu literatura [105, 123, 151, 156]. Principalele caracteristici ale acestuia sunt: aspect limpede, culoare galben pai, miros puternic caracteristic de *Juniperus*. S-a determinat indicele de refracție cu ajutorul unui refractometru de tip Abbé $n_D^{20} = 1,5128$.



Figura 2.5. - Ulei esențial de *Juniperus* obținut prin hidrodistilare

După ce acest ulei esențial a fost analizat prin cromatografie de gaz cuplată cu spectrometrie de masă a fost aplicat sub formă de aerosoli pe animale de experiență ce prezentau emfizem pulmonar.

II.3. Caracterizarea extractelor de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*

II.3.1. Compuși terpenici

Prezența compușilor terpenici în extractele din frunze aciculare, pseudobace și microblaste de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana* a fost evidențiată prin cromatografie în strat subțire, gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă și gaz cromatografie cu ionizare în flacără.

II.3.1.1. Identificarea guaiazulenei și cineolului prin CSS

Identificarea guaiazulenei și a cineolului din uleiul esențial de *Juniperus* s-a realizat atât prin cromatografie în strat subțire precum și prin gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă.

Metodă:

Analiza cromatografică în strat subțire, ca și în Farmacopeea Europeană [161], s-a realizat folosind plăci (Merck) Silicagel 60 F₂₅₄, de dimensiune 20×20 cm. În paralel cu uleiurile esențiale (diluante la nevoie cu hexan) s-au supus cromatografierii și soluțiile în hexan ale standardelor de guaiazulenă și cineol (Merck, New Jersey). Developarea plăcii s-a realizat pe o distanță de aproximativ 15cm, iar ca fază mobilă s-a folosit sistemul acetat de etil:toluen = 1:19 (V/V). Uscarea cromatogramelor s-a făcut la temperatura camerei, iar pentru vizualizarea spoturilor s-a folosit soluție de anisaldehydă (0,5%) în acid acetic:acid sulfuric:metanol = 2:1:17 (V/V). Plăcile au fost activate după încălzire timp de 5 minute la 100°C.

Uleiurile esențiale obținute prin hidrodistilare au evidențiat două spoturi principale, unul de culoare roșie în jumătatea de sus a plăcii cromatografice (în cazul guaiazulenei), iar cel de-al doilea de culoare brun-violetă în jumătatea de jos a plăcii cromatografice (în cazul cineolului). Spoturile de culoare violet intens, corespunzătoare monoterpenelor și sesquiterpenelor, s-au aflat mai jos decât spoturile specifice guaiazulenei și cineolului.

Guiazulena apare în uleiurile obținute prin hidrodistilare datorită deshidratării sub acțiunea temperaturii ridicate din alcoolul guaiol (vezi pagina 43).

În cazul uleiurilor esențiale spoturile specifice guiazulenei și cineolului sunt greu de identificat datorită concentrațiilor ridicate ale altor compuși terpenoidici. Astfel, în cazul pseudobacelor și frunzelor aciculare de *Juniperus virginiana* autohtonă, uleiul esențial diluat cu hexan, probele 3 și 5 din figura 2.6., spoturile corespunzătoare cineolului și guiazulenei sunt foarte slabe fiind acoperită de către mono- și sesquiterpene (ca de exemplu limonen) în partea superioară a cromatogramei sau de către alcooli mono- și sesquiterpenici (ca terpinen-4-ol) în jumătatea inferioară a plăcii cromatografice.

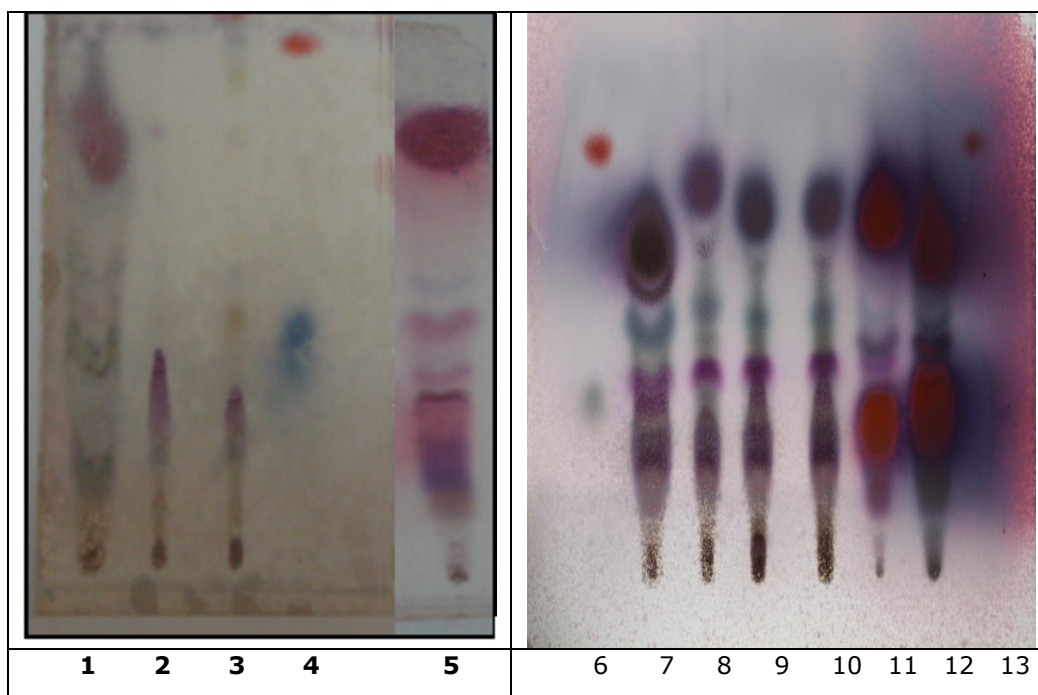


Figura 2.6. - Cromatogramele unor extracte din pseudobace, frunze aciculare de *Juniperus communis* și *Juniperus virginiana* și a unor produse comerciale

unde:

- 1, 11** = ulei esențial din *Juniperus virginiana* (produs comercial Austria, 2009)
- 2** = ulei esențial din *Juniperus virginiana* pseudobace
- 3** = ulei esențial din *Juniperus virginiana* frunze aciculare
- 4, 6, 13** = soluție etalon guiazulenă și cineol în hexan
- 5** = ulei esențial din *Juniperus virginiana* (produs comercial Germania, 2008)
- 7, 8, 9, 10** = ulei esențial din *Juniperus communis* pseudobace
- 12** = ulei esențial din *Juniperus virginiana* (produs comercial Novi Sad 2007)

Cum se poate observa din cromatograme, toate probele, indiferent de specia de *Juniperus* respectiv de partea anatomică a plantei conțin guiazulenă și cineol

alături de alți compuși terpenici care nu pot fi identificați prin această tehnică de analiză. Din acest motiv, pentru identificarea acestora a fost necesară analiza unora dintre extracte prin metode mai sensibile și anume s-a aplicat analiza gaz-cromatografică.

II.3.1.2. Identificarea compușilor terpenici prin GC-MS

Metodă:

Compușii volatili din extractele obținute prin refluxare, ultrasonare și hidrodistilare au fost evidențiați prin gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă. S-a utilizat un sistem de tip gaz cromatograf Hewlett Packard HP 6890 Series cuplat cu detector de masă selectiv Hewlett Packard 5973 (GC-MS); factorul de calibrare a fost 1.0. Pentru sistemul GC s-a utilizat o coloană capilară de tip HP-5 MS. Programul de temperatură a fost setat de la 50°C la 250°C cu o viteză de încălzire de 6°C/minut, iar ca și gaz transportor a fost utilizat heliul. Concentrațiile procentuale relative pentru compușii volatili din cele două specii de *Juniperus* au fost calculate pe baza ariilor picurilor cromatografice GC. Identificarea principalilor compuși s-a realizat utilizând datele privind indicii Kovats obținuți anterior pentru compuși etalon [159, 160] și/sau pe baza spectrelor de masă experimentale comparate cu spectrele din baza de date NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library 2.0.

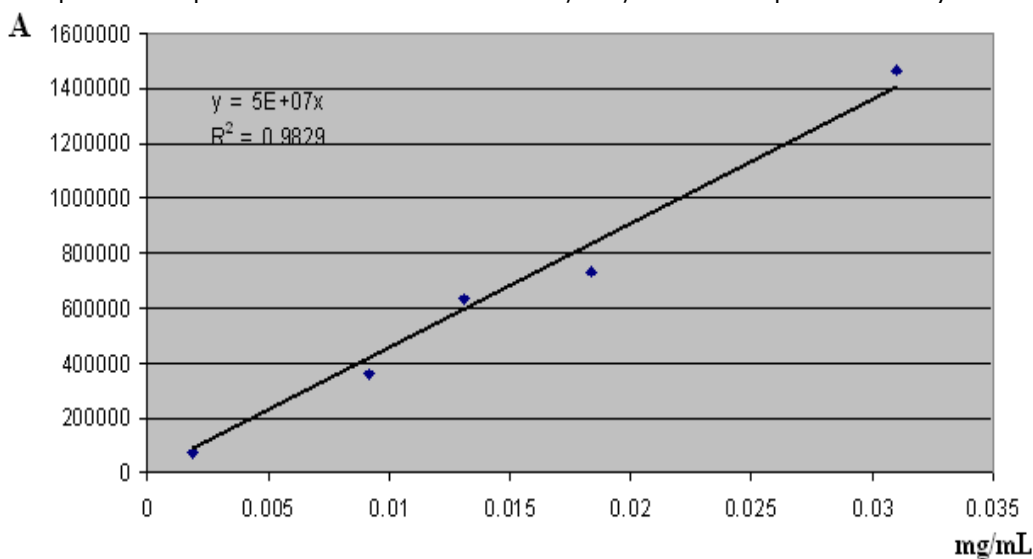


Figura 2.7. - Curba de calibrare pentru cineol
 $Aria (Abundența \times min) = 5 \cdot 10^7 \cdot concentrația (mg/mL)$

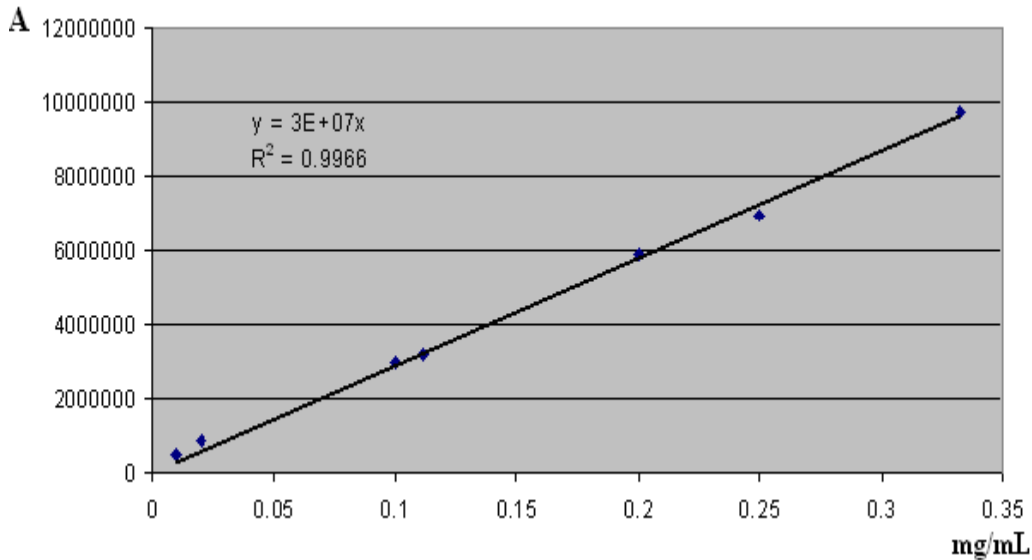


Figura 2.8. Curba de calibrare pentru guaiazulenă
 $Aria (Abundența \times min = 3 \cdot 10^7 \cdot concentrația (mg/mL))$

Curbele de etalonare pentru cineol și guaiazulenă sunt prezentate în figurile 2.7., 2.8. și permit calcularea concentrației absolute a cineolului și guaiazulenei în uleiurile esențiale din specii de *Juniperus*.

II.3.1.3. Determinarea cantitativă a compușilor terpenici din extracte cloroformice de *Juniperus* prin gaz cromatografie cu ionizare în flacăra

Metodă:

Extractele cloroformice obținute cu ajutorul instalației micropilot prevăzută cu generator de ultrasunete au fost analizate prin gaz cromatografie cu ionizare în flacăra. Analiza cromatografică s-a realizat folosind următorii parametri: coloană tip HP5, sistem de GC model 6890N, temperatura cuptorului de 300°C, debitul de H₂ de 40mL/min, debitul aerului 250mL/min, temperatura inlet-ului de 250°C, iar gazul purtător a fost N₂.

Trasarea curbelor de etalonare

Conținutul în limonen și α-pinen a extractelor analizate s-a calculat cu ajutorul unei curbe etalon, stabilite în paralel și în aceleași condiții cu extractul. S-au luat în lucru 1; 2; 3; 5; 6; 8; 12; 15; 20; 25; 35; 40; 50; 70; 90; 990; 9990 μL soluție etalon de limonen și α-pinen 10μg/mL la care s-a adăugat 10μL cloroform.

Curba de etalonare pentru α-pinen este reprezentată în figura 2.9:

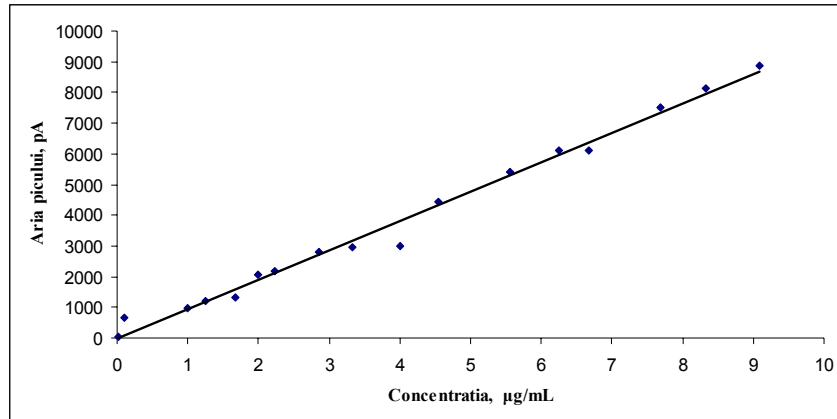


Figura 2.9. - Curba de etalonare pentru α -pinen

Pe baza înălțimii picului a fost stabilită ecuația dreptei și s-a calculat coeficientul de corelare:

$$y = 955.15x + 9.6347; \quad r^2 = 0.9894$$

unde: y - înălțimea picului pentru α -pinen la minutul $t = 3.96$

x - concentrația de α -pinen, $\mu\text{g/mL}$

Curba de etalonare pentru limonen este reprezentată în figura 2.10:

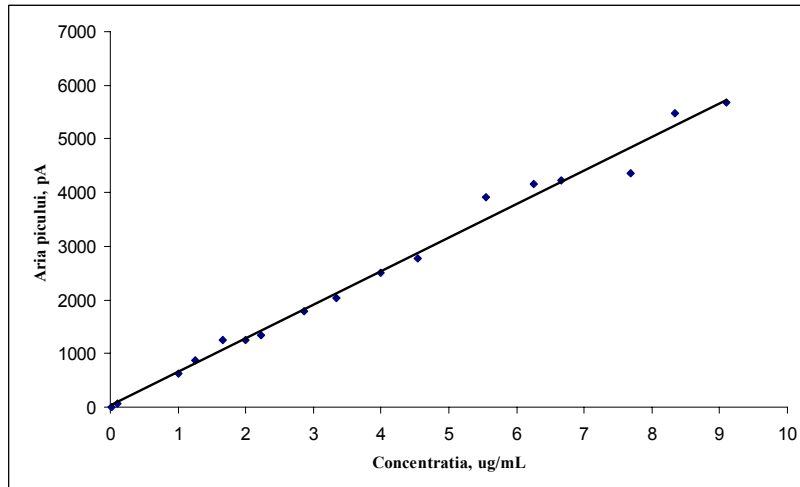


Figura 2.10. - Curba de etalonare pentru limonen

Pe baza înălțimii picului a fost stabilită ecuația dreptei și s-a calculat coeficientul de corelare:

$$y = 626.82x + 35.805; \quad r^2 = 0.9898$$

unde: y - înălțimea picului pentru limonen la minutul $t = 5.27$

x - concentrația de limonen, $\mu\text{g/mL}$

Conținutul în limonen și α -pinen a extractelor analizate este prezentat în capitolul III - Rezultate și discuții.

II.3.1.4. Identificarea compușilor terpenici prin spectroscopie UV-VIS

S-au înregistrat spectrele UV-VIS ale extractelor alcoolice și hidrodistilatelor de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana* precum și cele ale soluțiilor de standarde de β -pinen (la 280nm și 275nm), rutină (275nm), *p*-cimen (242nm), limonen (245nm) și 1-terpinen-4-ol (241nm). Curbele de etalonare pentru aceste cinci standarde sunt prezentate în figurile 2.11.-2.16.

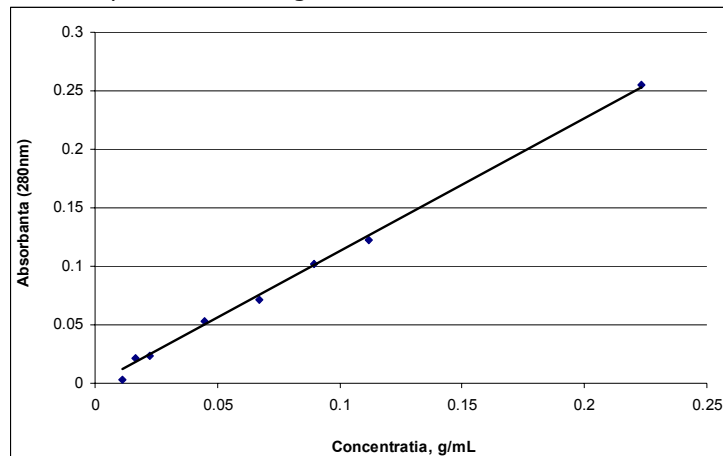


Figura 2.11. - Curba de etalonare pentru β -pinen, la 280nm

Pe baza absorbanelor citite la 280nm, a fost stabilită ecuația dreptei și s-a calculat coeficientul de corelare:

$$y = 1,1315x; \quad r^2 = 0,9966$$

unde: y – absorbanta pentru β -pinen, la 280nm

x – concentrația de β -pinen, g/mL

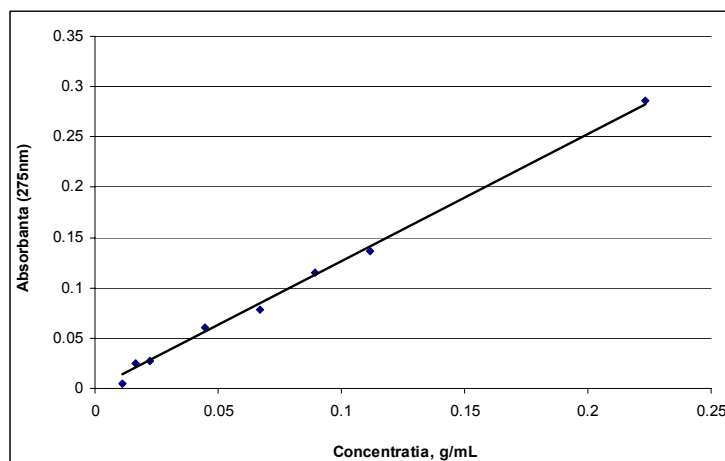


Figura 2.12. - Curba de etalonare pentru β -pinen, la 275nm

Pe baza absorbanelor citite la 275nm, a fost stabilită ecuația dreptei și s-a calculat coeficientul de corelare:

$y = 1,2662x;$ $r^2 = 0,9967$
 unde: y – absorbanta pentru β -pinen, la 275nm
 x – concentrația de β -pinen, g/mL

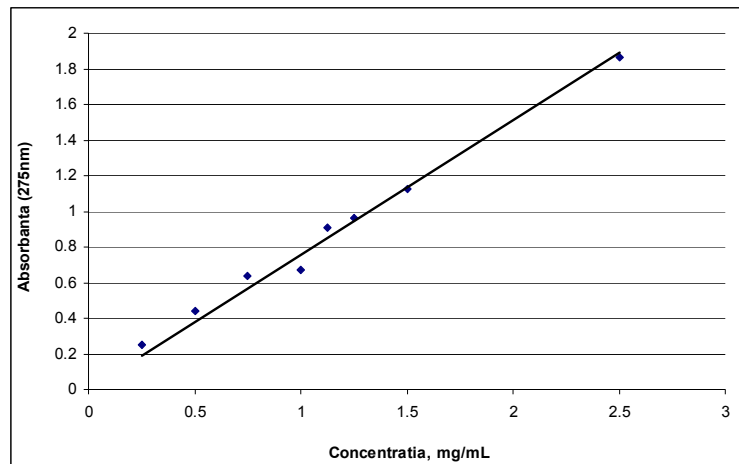


Figura 2.13. - Curba de etalonare pentru rutină, la 275nm

Pe baza absorbanelor citite la 275nm, a fost stabilită ecuația dreptei și s-a calculat coeficientul de corelare:

$y = 0,7573x;$ $r^2 = 0,9867$
 unde: y – absorbanta pentru rutină, la 275nm
 x – concentrația de rutină, mg/mL

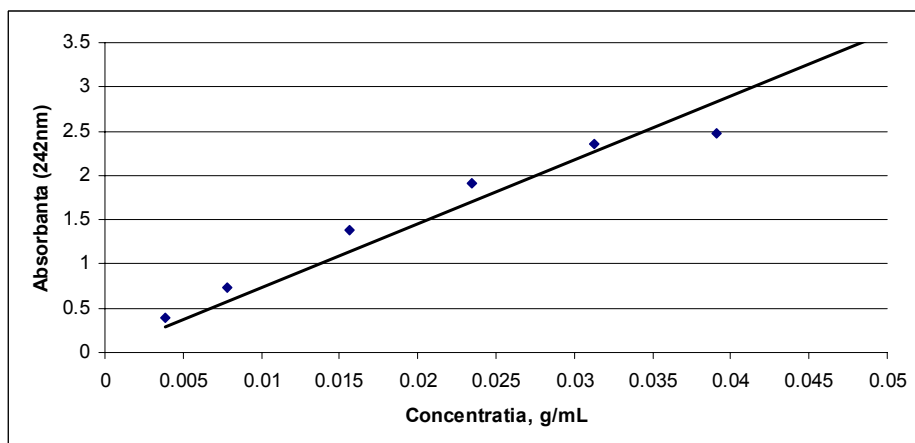


Figura 2.14. - Curba de etalonare pentru p-cimen

Pe baza absorbanelor citite la 242nm, a fost stabilită ecuația dreptei și s-a calculat coeficientul de corelare:

$y = 72,416x;$ $r^2 = 0,9246$
 unde: y – absorbanta pentru p-cimen, la 242nm
 x – concentrația de p-cimen, g/mL

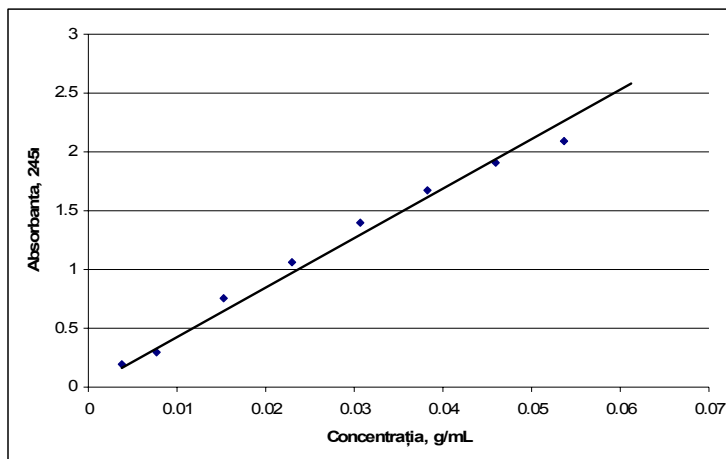


Figura 2.15. - Curba de etalonare pentru limonen

Pe baza absorbanțelor citite la 245nm, a fost stabilită ecuația dreptei și s-a calculat coeficientul de corelare:

$$y = 42,108x; \quad r^2 = 0,9819$$

unde: y – absorbanta pentru limonen, la 245nm
x – concentrația de limonen, g/mL

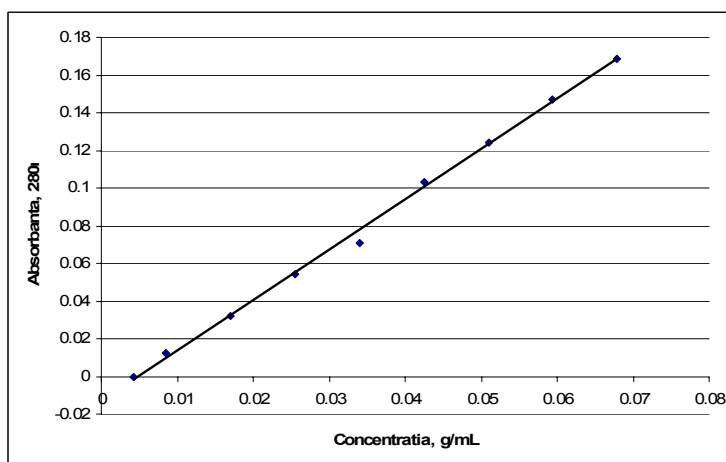


Figura 2.16. - Curba de etalonare pentru 1-terpinen-4-ol

Pe baza absorbanțelor citite la 241nm, a fost stabilită ecuația dreptei și s-a calculat coeficientul de corelare:

$$y = 26,516x; \quad r^2 = 0,9979$$

unde: y – absorbanta pentru 1-terpinen-4-ol, la 241nm
x – concentrația de 1-terpinen-4-ol, g/mL

Conținutul în β -pinen, β -cariofilen, *p*-cimen, limonen și 1-terpinen-4-ol a extractelor alcoolice analizate este prezentat în capitolul III – Rezultate și discuții.

Modul de preparare al extractelor alcoolice din pseudobace de *Juniperus communis* (recoltate de la Albac și din Austria) respectiv de *Juniperus virginiana* (recoltate de la „Grădina Botanică Macea” în 2008 și 2009) a fost descris la paragraful II.2.2.2., iar în cazul hidrodistilatelor la paragraful II.2.5.2.

Toate experimentele au fost realizate utilizând spectrofotometru UV-VIS model M501, Single Beam Scanning UV/VISible.

II.4. Analiza multivariată (PCA) a datelor GC-MS pentru extractele de *Juniperus communis* și *Juniperus virginiana*

Cantitatea foarte mare de date de gaz cromatografie obținută în urma analizei GC-MS a uleiurilor volatile nu permite o prelucrare pertinentă și face chiar imposibilă evaluarea corectă a datelor achiziționate. Un instrument statistic foarte potrivit pentru astfel de cazuri, aplicabil în cazul matricilor (bidimensionale sau chiar multidimensionale) de date cu un număr mare de variabile, este analiza componentelor principale PCA (Principal Component Analysis).

Analiza statistică multivariată a datelor GC a fost realizată utilizând analiza PCA pentru concentrațiile relative ale principalilor biocompuși identificați în extractele de *Juniperus*. Această procedură s-a utilizat pentru identificarea importanței unor compuși bioactivi la gruparea probelor (funcție de specie, partea anatomică a plantei și sursa de proveniență, dar și după metoda de extracție sau solventul utilizat pentru extracție). Pentru analiza statistică multivariată s-a utilizat un program *in house* cu date centrate și metoda de validare încrucișată. Analiza componentelor principale este baza pentru analiza multivariată a datelor și presupune o aproximare a matricii datelor ca un produs de două matrici reduse ce reprezintă "forma obiectelor", respectiv "forma variabilelor". Prima componentă principală, PC_1 , indică varianța maximă în spațiul proprietăților, cea de-a doua direcție, PC_2 , este perpendiculară pe PC_1 și prezintă aceleași caracteristici și așa mai departe. Reprezentarea grafică a acestor componente principale conduce la informații privind similaritățile și grupările posibile ale obiectelor studiate sau a proprietăților, respectiv importanța acestor proprietăți pentru model [162, 163].

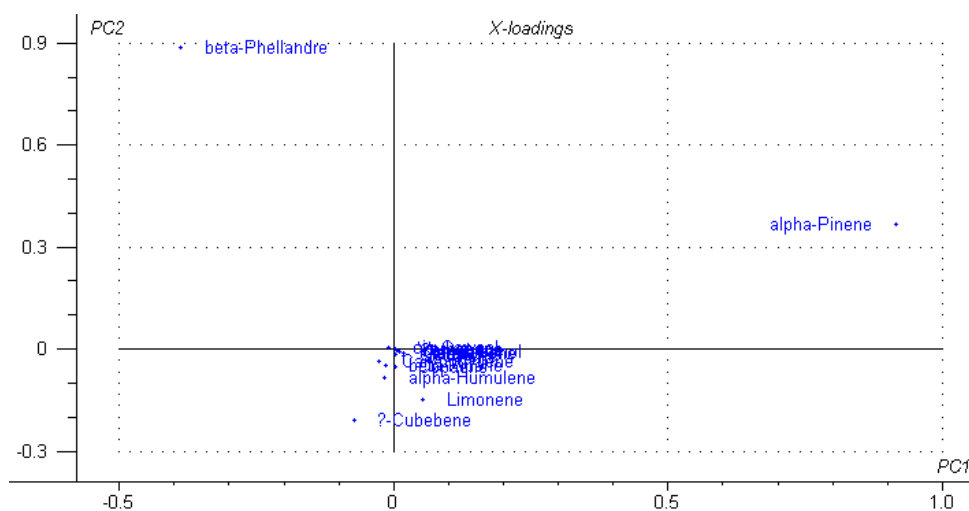


Figura 2.17. - Graficul înregistrărilor din analiza PCA a tuturor datelor GC ale compuşilor principali din extractele de *Juniperus*

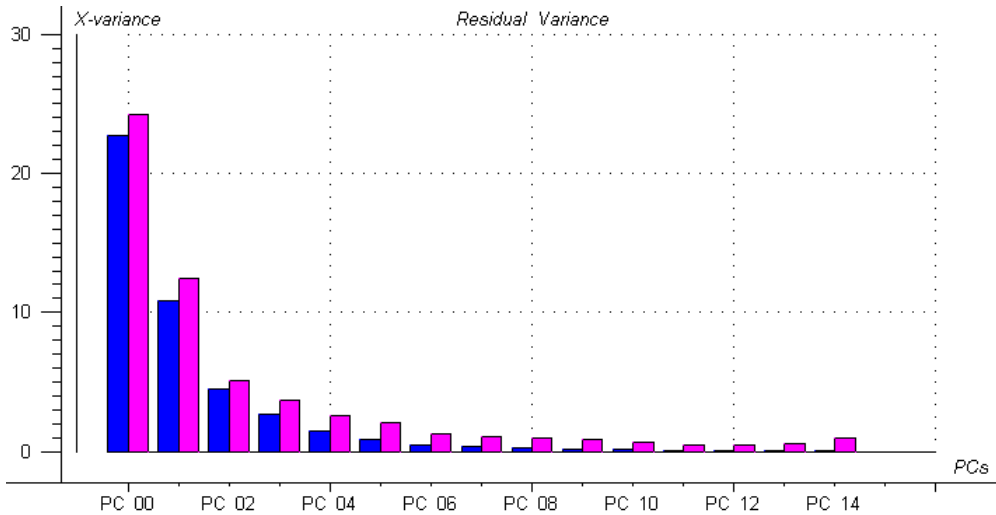


Figura 2.18. -Varianța reziduală a PC-urilor din analiza PCA a tuturor datelor GC ale compuşilor principali din extractele de Juniperus

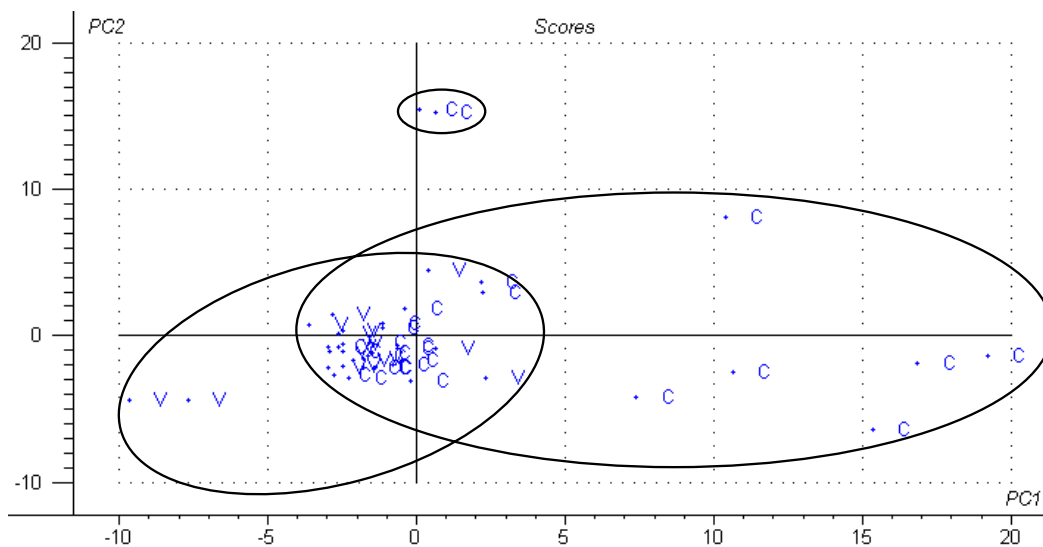


Figura 2.19. - Graficul "scorurilor" din analiza PCA a datelor GC pentru compuşii principali (fără α -pinen și β -felandren) din extractele de Juniperus (variabilă dependentă – specia de Juniperus: C – communis, V – virginiana)

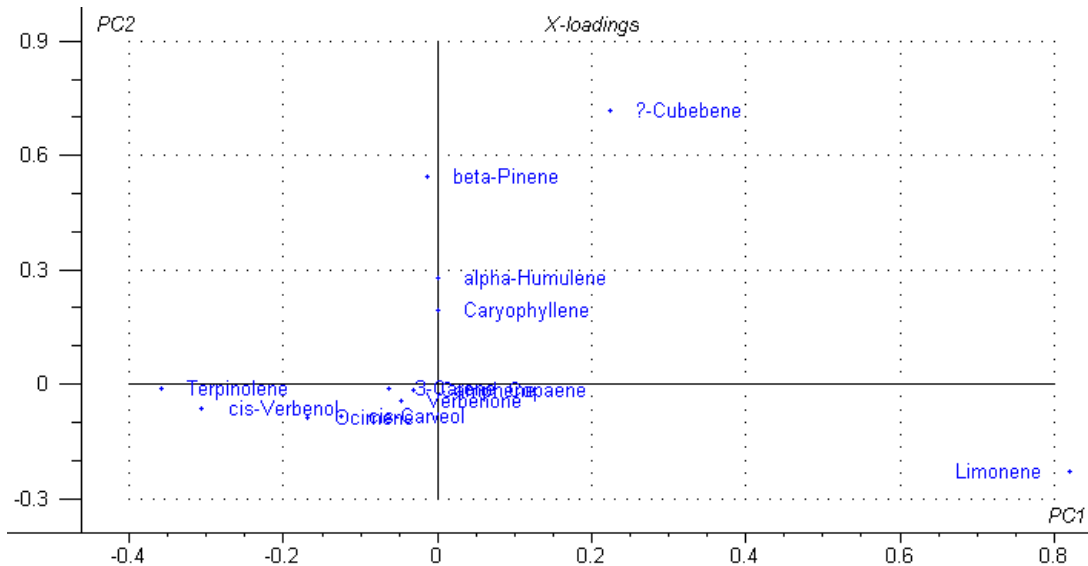


Figura 2.20. - Graficul "înregistrărilor" din analiza PCA a datelor GC pentru compușii principali (fără α -pinen și β -felandren) din extractele de *Juniperus* (variabilă dependentă: specia de *Juniperus*)

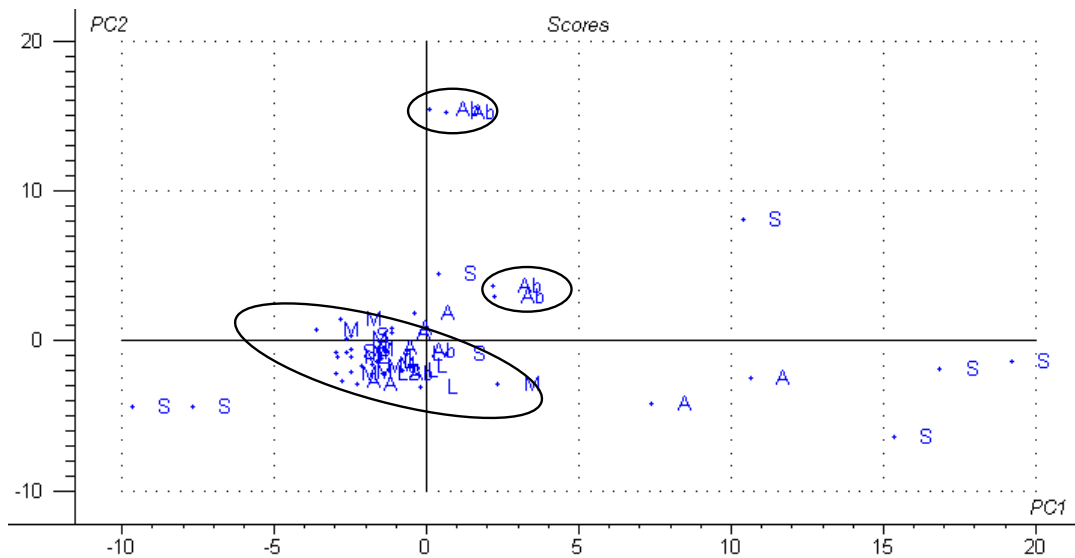


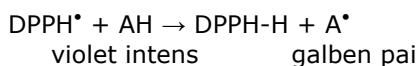
Figura 2.21. - Graficul "scorurilor" din analiza PCA a datelor GC pentru compușii principali (fără α -pinen și β -felandren) din extractele de *Juniperus* (variabilă dependentă - sursa de proveniență: M - Macea, Ab - Albac, L - Lipova, S - Siria, A - Austria)

Rezultatele studiului realizat au făcut obiectului unei lucrări științifice [164].

II.5. Determinarea activității antioxidante a extractelor de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*

II.5.1. Determinarea activității antioxidante, pentru extractele în acetat de etil, prin metoda spectrofotometrică cu DPPH

Antioxidanții au capacitatea de a reduce radicalul DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) la difenil-picrilhidrazină, de culoare galbenă. Această metodă se bazează pe reducerea DPPH-ului din soluție alcoolică în prezența antioxidantului donor de hidrogen, reducere în urma căreia se formează non-radicalul DPPH-H. DPPH-ul este utilizat, de obicei, ca reactiv în scopul evaluării capacității antioxidante a radicalului liber. DPPH-ul este un radical stabil (λ_{\max} 517nm) ce acceptă un electron sau hidrogen de la o substanță donoare de protoni pentru a forma o moleculă diamagnetică stabilă [165].



Cu ajutorul metodei spectrofotometrice cu DPPH s-a determinat activitatea antioxidantă a extractelor etanolice și în acetat de etil precum și a standardelor de limonen, 1-terpinen-4-ol, *p*-cimen și β -pinen.

Mod de lucru:

În cuva de cuarț s-au introdus 2,6mL alcool etilic 96%, 0,3mL extract vegetal și 0,3mL soluție alcoolică de DPPH 1mM, după care cuva s-a introdus în locașul spectrofotometrului. A fost înregistrată absorbanta la 517nm și variația acesteia în timp. Înregistrările au fost efectuate cu spectrofotometru Lambda 25, UV/VIS Spectrometer.

Activitatea antioxidantă corespunzătoare procentului de DPPH a fost calculată cu formula [166]:

$$\% = \frac{A_{(t=0)} - A_{(t=15)}}{A_{(t=0)}} \times 100$$

unde: $A_{(t=0)}$ = absorbanta probei la timpul $t=0$ min

$A_{(t=15)}$ = absorbanta probei la timpul $t=15$ min.

Curba de etalonare DPPH

Pe baza spectrelor de absorbție în VIS ale soluțiilor de DPPH de diferite concentrații (figura 2.22.) s-a obținut curba de etalonare: *Absorbantă* (517nm) = *f* (*c*, mM) (figura 2.23.).

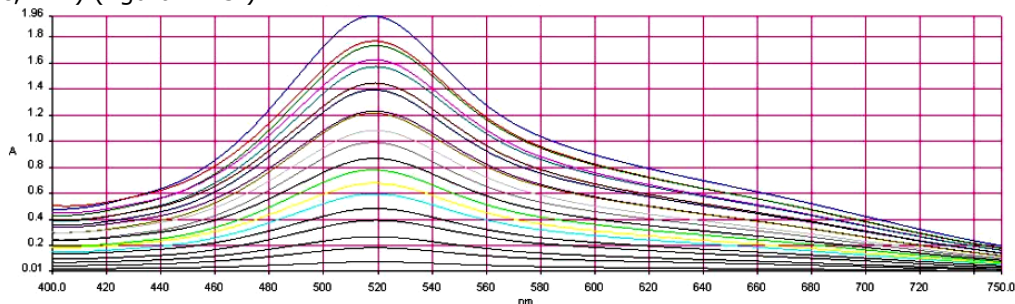


Figura 2.22. - Spectrele în VIS ale soluțiilor DPPH etalon

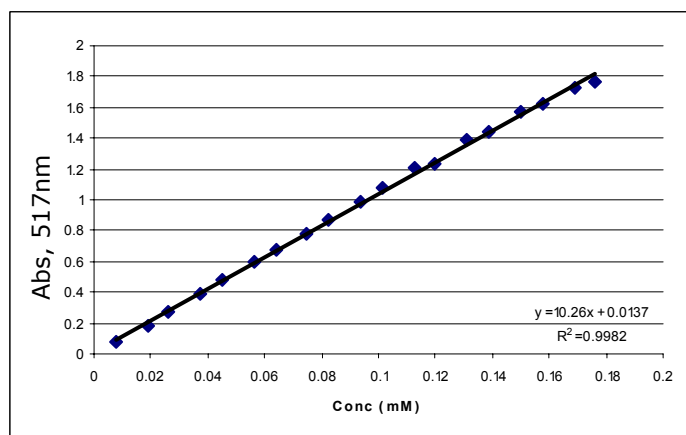


Figura 2.23. - Curba de etalonare pentru DPPH

$$c = 10,26 \times \text{Absorbanța } (\lambda_{517}) [\text{DPPH}^*] + 0,0137 \quad (1)$$

Rata medie (v_m) a consumării DPPH-ului a fost calculată pentru toate extractele ca raportul între concentrație (Δc , μM) și timp (Δt , s), Ec. (2):

$$v_m = -\frac{\Delta c}{\Delta t} \quad (2)$$

II.5.2. Identificarea unor compuși cu caracter antioxidant din extractele etanolice prin cromatografie de lichide de înaltă performanță

În vederea identificării prezenței compușilor cu caracter antioxidant, cu structură flavonică extractele alcoolice au fost supuse analizei prin cromatografie de lichide de înaltă performanță în paralel cu standarde corespunzătoare (flavonă, crisină, quercetină, rutină). Pentru aceasta s-a utilizat un cromatograf tip Jasco echipat cu pompă cuaternară PU-2080 Plus, unitate de amestecare cu gradient cuaternar LG-2080-04, unitate de degazare DG-2080-54 4, coloană nucleosil C18, cu dimensiunile $4,6 \times 250$ mm și diametrul particulelor $5 \mu\text{m}$, detector spectrofotometric UV-2070 Plus Intelligent UV/VIS Detector cu posibilitate de achiziție, model Jasco ver. 1.7.403.1, LC-Net II / interfață ADC.

Condiții de lucru:

- ▲ coloană Nucleosil C18, $4,6 \times 250$ mm, $5 \mu\text{m}$
- ▲ volumul de injectare $20 \mu\text{L}$
- ▲ debitul $1,0 \text{ mL/min}$
- ▲ temperatura coloanei 25°C

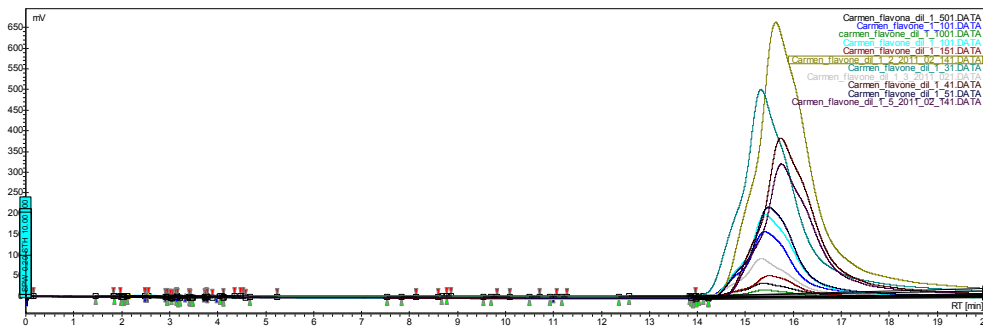
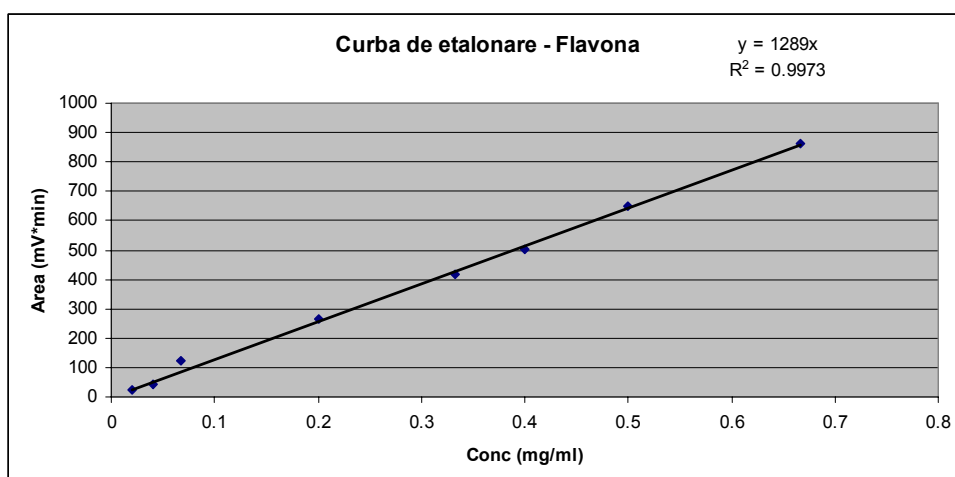
- ▲ faza mobilă:
 - A: acetonitril (HPLC)
 - B: apă (HPLC)
- ▲ detecție 254 nm .

Cromatogramele obținute pentru standardele de flavonă, crisină, quercetină și rutină (de concentrație $0,01 \text{ g/5 mL}$ (2 g/L)) sunt prezentate în figurile 2.24., 2.26., 2.28., 2.30 iar cromatogramele corespunzătoare extractelor alcoolice sunt prezentate în figurile A.95-A.101.

Flavona (RT 15.8 min)

Tabel 2.4. Date HPLC pentru curba de etalonare a flavonei (2-fenil-cromonă)

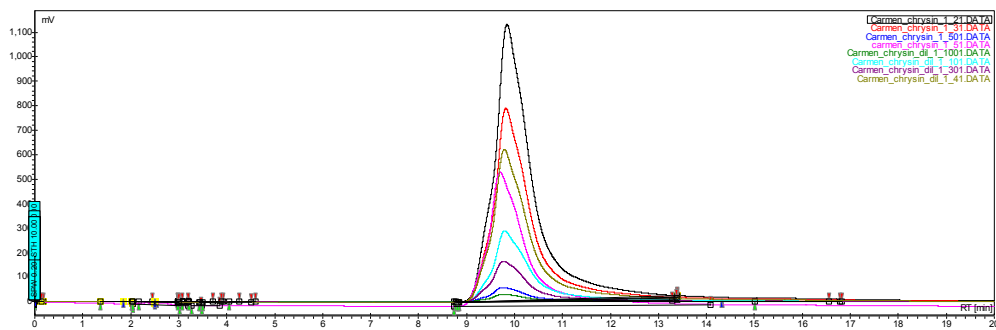
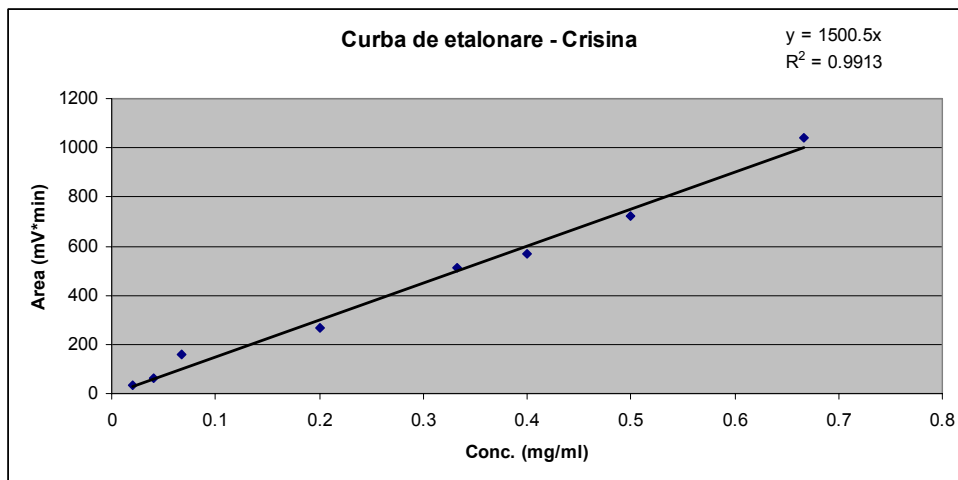
Nr.	Concentrație (mg/mL)	Area HPLC (mV·min)
1	0.667	862.7
2	0.500	650.5
3	0.400	503.6
4	0.333	418.7
5	0.200	265.5
6	0.067	121.4
7	0.040	40.7
8	0.020	22.3

**Figura 2.24.** - Cromatogramele HPLC ale standardului de flavonă**Figura 2.25.** - Curba de etalonare pentru flavonă

Crisina (RT 9.8 min)

Tabel 2.5. Date HPLC pentru curba de etalonare a crisinei (5,7-dihydroxiflavonă)

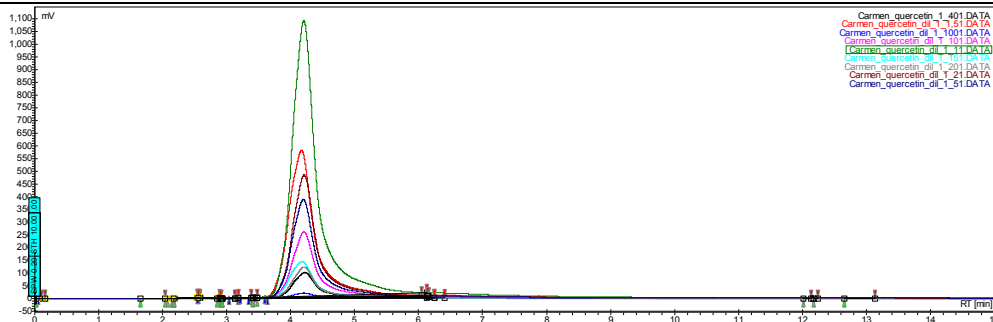
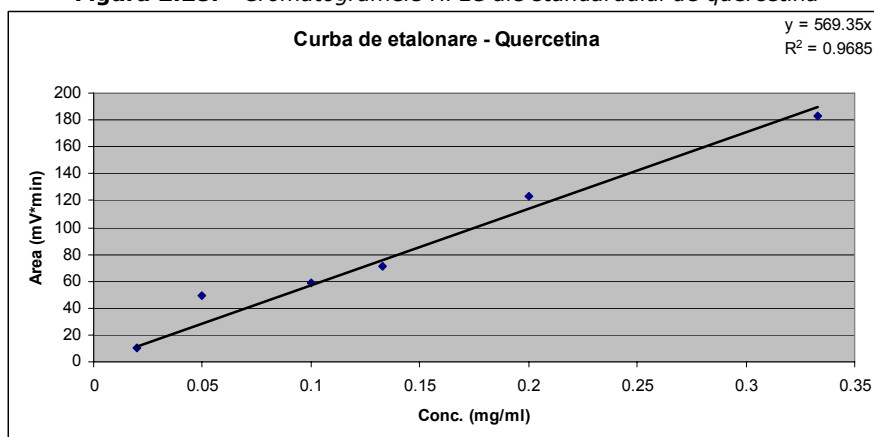
Nr.	Concentrație (mg/mL)	Area HPLC (mV·min)
1	0.667	1039.7
2	0.500	721.1
3	0.400	568.4
4	0.333	511.4
5	0.200	268.2
6	0.067	156.5
7	0.040	60.3
8	0.020	32.4

**Figura 2.26.** - Cromatogramele HPLC ale standardului de crisină**Figura 2.27.** - Curba de etalonare pentru crisină

Quercetină (RT 4.2 min)

Tabel 2.6. Date HPLC pentru curba de etalonare a quercetinei (3,3',4',5,7-penta-hidroxiflavona)

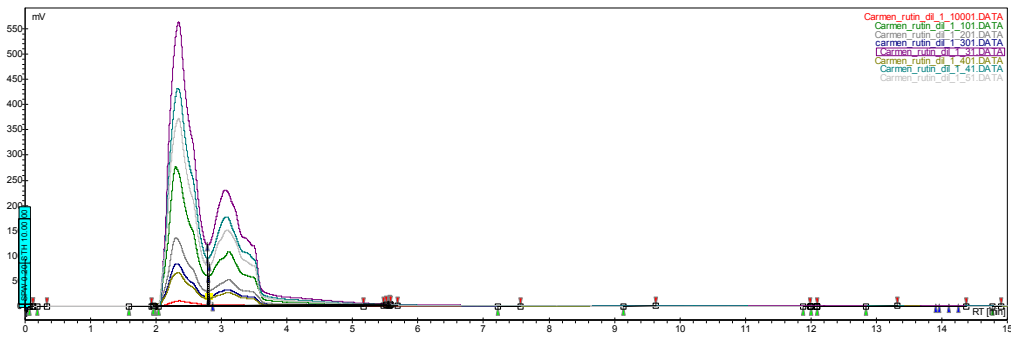
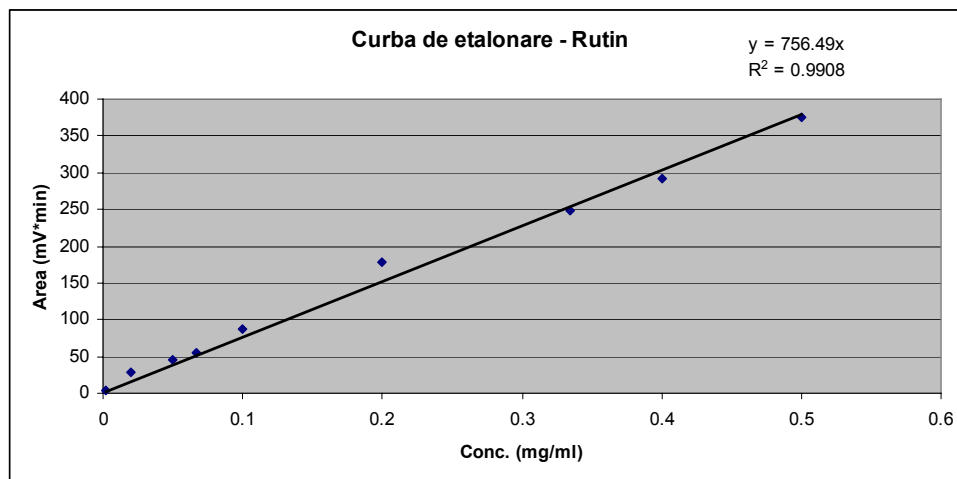
Nr.	Concentrație (mg/mL)	Area HPLC (mV·min)
1	1	504.3
2	0.8	281.4
3	0.667	226
4	0.333	182.5
5	0.2	122.8
6	0.133	70.8
7	0.1	59.1
8	0.05	49.1
9	0.02	10.5

**Figura 2.28.** - Cromatogramele HPLC ale standardului de quercetină**Figura 2.29.** - Curba de etalonare pentru quercetină

Rutină (RT 2-3.6 min)

Tabel 2.7. Date HPLC pentru curba de etalonare a rutinei (quercetin-3-rutinozid)

Nr.	Concentrație (mg/mL)	Area HPLC (mV·min)
1	0.5	374.7
2	0.4	291.6
3	0.334	248.7
4	0.2	178.5
5	0.1	87.2
6	0.067	54.7
7	0.05	44.7
8	0.02	29.2
9	0.002	4.7

**Figura 2.30.** - Cromatogramele HPLC ale standardului de rutină**Figura 2.31.** - Curba de etalonare pentru rutină

II.6. REALIZAREA ELIBERĂRILOR CONTROLATE DIN NANOCAPSULE RESPECTIV DIN UNGUENTE CE CONȚIN ÎNGLOBATE EXTRACTE ALCOOLICE ȘI ULEIURI ESENȚIALE DE *JUNIPERUS COMMUNIS* RESPECTIV *JUNIPERUS VIRGINIANA*

II.6.1. Obținerea complexșilor prin cristalizare din soluție alcool-apă

Protejarea și eliberarea controlată a biocompușilor din extractele și uleiurile volatile de *Juniperus communis* L. și *Juniperus virginiana* L. (pseudobace) de diverse proveniențe s-a realizat prin micro/nanoîncapsularea în β -ciclodextrină. Astfel, s-au cântărit la balanța analitică masele de β -ciclodextrină corespunzătoare unei molarități de 1:1 raportat la compusul/compușii bioactivi principali din extracte sau uleiuri, s-au dizolvat în 4 ml apă distilată, s-au introdus în minireactorul cu termostatare și agitare magnetică (figura 2.32.) și s-au încălzit la temperatura de $\sim 50^{\circ}\text{C}$. Peste soluția de β -ciclodextrină s-a introdus în picături, în decurs de 15 minute, volumele de extract (4 ml) sau soluții etanolice de ulei volatil (79 mg ulei volatil dizolvat în etanol 96%, concentrație masică de 2.4%) din speciile *Juniperus* (volum corespunzător unor rapoarte molare biocompuși principali:ciclodextrină de $\sim 1:1$). Soluția s-a picurat dintr-o pâlnie de picurare montată la partea superioară a refrigerentului instalației de complexare. După introducerea soluției alcoolice s-a agitat amestecul un timp prestabilit, apoi s-a răcit lent, în timp de 4 ore până la temperatura camerei. S-a depozitat la frigider ~ 12 ore pentru perfectarea cristalizării după care s-a filtrat la vid, s-a spălat cu etanol 96%, s-au uscat cristalele la temperatura ambiantă și s-au cântărit. Filtratul s-a supus din nou cristalizării pentru ~ 12 ore la rece, după care s-a filtrat în mod similar, s-a spălat și s-a uscat. S-au determinat randamentele de recuperare a nanocristalelor ca raport dintre masa de nanoparticule obținută și suma maselor de biocompuși (calculată) și β -ciclodextrină utilizate la nanoîncapsulare (tabel 2.8).

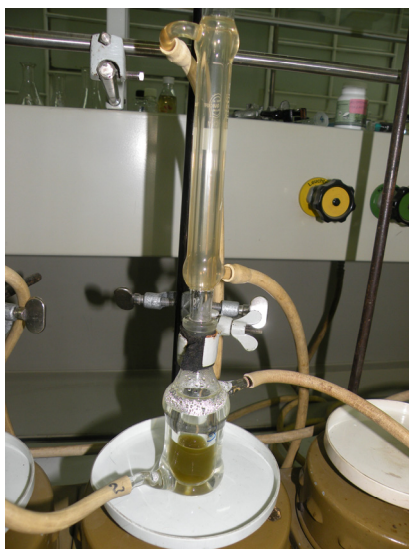


Figura 2.32. - Sistem microreactor utilizat pentru nanoîncapsularea extractelor și uleiurilor volatile de *Juniperus* în ciclodextrine prin metoda cristalizării din soluție alcool-apă

Tabel 2.8. Caracteristicile probelor de *Juniperus* și rezultatele obținute la complexare cu β -CD

Nr	Cod	Caracteristici	V _{extract} (mL)	m _{UV} (mg)	m _{βCD} (mg)	m _{compl.} (mg)	η (%)
1	EEJv-bCD1	Extract etanolic din pseudobace de <i>Juniperus virginiana</i> (Macea, 2008)	4	-	673	470	69.9
2	EEJv-bCD2	Extract etanolic din pseudobace de <i>Juniperus virginiana</i> (Macea, 2009)	4	-	672	615	91.5
3	EEJc-bCD1	Extract etanolic din pseudobace de <i>Juniperus communis</i> (Austria 2010)	4	-	671	576	85.8
4	EEJc-bCD2	Extract etanolic din pseudobace de <i>Juniperus communis</i> (Albac, 2010)	4	-	671	430	64.1
5	UvJv-bCD1	Ulei volatil din pseudobace de <i>Juniperus virginiana</i> (Macea, 2008)	-	79	671	430	64.1
6	UvJv-bCD2	Ulei volatil din pseudobace de <i>Juniperus virginiana</i> (Macea, 2009)	-	79	671	424	63.2
7	UvJc-bCD1	Ulei volatil din pseudobace de <i>Juniperus communis</i> (Austria 2010)	-	80	671	436	65.0
8	UvJc-bCD2	Ulei volatil din pseudobace de <i>Juniperus communis</i> (Albac 2010)	-	79	671	604	90.0

II.6.2. Eliberări controlate din nanocapsule ce conțin extracte etanolice și ulei volatil din pseudobace de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana* provenite din diferite localități

Eliberările controlate au constat în îmbogățirea unei soluții de alcool etilic (de 20%, 60% și 96%) în compușii prezenți în nanocapsulele analizate.

Materiale și metodă:

Concentrarea în compușii volatili de *Juniperus* a fost înregistrată cu un Spectrofotometru de UV-VIS, Lambda 25. Înregistrările s-au făcut cu programul KinLab, timp de 14,5 minute, la 275nm, la temperatura camerei, în cuvă de cuarț.

Cantitatea de nanocapsule folosită pentru analiză a fost între 0,0010-0,0019g în funcție de gradul de concentrare al complexșilor.

Mod de lucru:

Într-o cuvă de cuarț cu diametrul de 10mm s-au cântărit între 0,0010-0,0019g complex, s-au adăugat, încet, 3mL alcool etilic. S-au folosit trei concentrații diferite pentru alcool etilic (20%, 60% și 96%). Valorile absorbantei au fost înregistrate la fiecare 3 secunde. Cu aceste date s-a calculat concentrația de rutină (în extractele alcoolice) și de β -pinen (din uleiurile volatile), capitolul III - Rezultate și discuții.

II.6.2. Eliberări controlate din unguente ce conțin extracte etanolice și ulei volatil din pseudobace de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana* provenite din diferite localități

Eliberările controlate din unguente au constat în îmbogățirea unei soluții de alcool etilic (de 20%, 60% și 96%), apă distilată și ser fiziologic (0,9%NaCl) în compușii prezenți în nanocapsulele înglobate în unguentele analizate.

Materiale și metodă:

Concentrarea în compușii volatili de *Juniperus* a fost înregistrată cu un Spectrofotometru de UV-VIS, Lambda 25. Înregistrările s-au făcut cu programul WinLab, din 5 în 5 minute, la 280nm, la temperatura camerei, în cuvă de cuarț.

Cantitatea de unguent folosită pentru analiză a fost între 0,3-0,4g în funcție de gradul de concentrare al complexelor.

Mod de lucru:

Într-o cuvă de cuarț cu diametrul de 10mm s-au cântărit între 0,3-0,4g unguent, s-au adăugat, încet, 7mL alcool etilic, apă distilată sau ser fiziologic. S-au folosit trei concentrații diferite pentru alcool etilic (20%, 60% și 96%). Valorile absorbției au fost înregistrate la fiecare 3 secunde. Cu aceste date s-a evaluat eliberarea compușilor principali din unguentele ce conțin extractele alcoolice și din uleiurile volatile analizate, capitolul III - Rezultate și discuții.

II.7. Efectele asupra inelului de musculatură netedă traheală de șobolan a expunerii cronice la uleiul de *Juniperus***Studiu în baia de organ izolat**

Experimentele au fost realizate sub îndrumarea și sprijinul direct al disciplinei de Fiziologie din cadrul Universității de Medicină și Farmacie „Victor Babeș”, Timișoara și s-au respectat toate procedurile și normele stabilite de Directiva din 24 noiembrie 1986 al Consiliului Europei (86/609/EEC), legile României legate de protecția animalelor precum și normele interne stabilite de Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” Timișoara.

Reglarea calibrului căilor respiratorii depinde de echilibrul dintre activarea sistemului nervos vegetativ parasimpatic, cu efect bronhoconstrictor prin mediație colinergică reprezentată de acetilcolină și activarea sistemului nervos vegetativ simpatic, cu efect bronhodilatator prin mediație adrenergică reprezentată de epinefrină. Ambele căi nervoase sunt distribuite în căile respiratorii atât la nivelul fibrelor musculare traheo-bronșice, cât și la nivelul ganglionilor colinergici, a glandelor submucoase și a sistemului vascular local [167, 168].

La nivelul căilor respiratorii există un al treilea tip de mediație, noncolinergică – nonadrenergică (NANC) structurat în două componente: o componentă excitatorie (NANCe), cu efect bronhoconstrictor indus prin eliberarea de substanță P și o componentă inhibitorie (NANCi), cu efect bronhodilatator indus prin eliberare de oxid nitric (NO) [169, 170].

Terminațiile nervoase superficiale din căile aerifere sunt situate la mai puțin de 1 μm față de lumenul traheo – bronșic. Cele situate intraepitelial și subepitelial îndeplinesc rolul de „receptori de iritație” și sunt răspunzătoare de bronhoconstricția reflexă mediată de substanța P, în condițiile expunerii la toate tipurile de iritanți endobronșici, inclusiv la fumul de țigară. Excitarea „receptorilor de iritație” stă la originea transmiterii unui influx către sistemul nervos central prin intermediul nervului vag. Rezultatul este o stimulare a fibrelor parasimpatice (vagale) eferente care descarcă acetilcolină la nivelul fibrelor musculare traheo-bronșice, determinând contracția acestora. Substanța P stimulează producția unei game largi de mediatorii ai inflamației și de specii reactive ale oxigenului, de către celulele inflamatorii rezidente (macrofagul, eozinofilul, mastocitele și limfocitele), care devin astfel răspunzătoare de alterarea integrității epitelului respirator. Denudarea epitelială determină expunerea unui număr crescut de „receptori de iritație” și eliberarea din epitelul lezat a unor factori chemotactici pentru celulele inflamatorii, întreținând

astfel inflamația locală. Eliberarea speciilor reactive ale oxigenului, cum ar fi anionul superoxid ($O_2^{\cdot-}$), peroxidul de hidrogen (H_2O_2) și radicalul hidroxil ($\cdot OH$), generate sub acțiunea NAD(P)H-oxidazei și a xantin-oxidazei, amplifică hiperreactivitatea fibrelor musculare pe cale neurală, determină hipersecreția de mucus, vasodilatație și creșterea permeabilității vasculare, declanșând și întreținând *inflamația neurogenă* a căilor respiratorii [171].

Oxidul nitric sau monoxidul de azot este un gaz incolor, cu timp de înjumătățire în sistemele biologice de 3 – 30 msec. Este sintetizat din aminoacidul L-arginină sub acțiunea *nitric-oxid sintazei* (NOS). La nivelul căilor respiratorii se descriu 3 izoforme ale NOS, două exprimate constitutiv (NOS ϵ și NOS η) și una inducibilă, (NOS ι). Izoforma NOS ϵ este exprimată de către celula endotelială, iar NO produs are rol în răspunsul vasodilatator local. Izoforma NOS η este exprimată de terminațiile nervoase de la nivelul căilor respiratorii și de către epiteliul respirator, iar NO produs are rol de neurotransmițător în cadrul căii NANC ι [169]. Izoforma NOS ι este exprimată de celula endotelială și epiteliul respirator doar în prezența factorilor proinflamatori, iar cantitățile suplimentare de NO pot exercita efecte duale asupra căilor respiratorii [173]. În acest sens, NO reprezintă un factor bronhodilatator și, în același timp, o moleculă citotoxică care contribuie la distrugerea epiteliului și inducerea bronhoconstricției reflexe. Citotoxicitatea NO se manifestă în prezența unor factori oxidanți, cum sunt cei conținuți în fumul de țigară, care generează speciile reactive ale oxidului nitric: oxidul nitric (NO \cdot), cationul nitrozoni (NO^+), anionul nitroxil (NO $^-$) și peroxinitritul (ONOO $^-$) [174].

Interesul pentru efectele biologice ale uleiurilor esențiale a crescut considerabil în ultimii ani. Printre acestea se numără și uleiul de *Juniperus*, un produs natural larg utilizat în industria farmaceutică și alimentară, precum și în parfumerie și cosmetică. Modele experimentale *in vitro*, plasează uleiul de *Juniperus* pe lista uleiurilor esențiale cu proprietăți antiinflamatorii și antioxidante. În acest sens, componente ale uleiului de *Juniperus* inhibă producția de metaboliți ai acidului arahidonic, producția de citokine proinflamatorii, precum și expresia genelor proinflamatorii, și/sau îndeplinesc rolul de *scavengeri* ai speciilor reactive ale oxigenului și ale oxidului nitric [175].

Studiul nostru a urmărit evaluarea *proprietăților antiinflamatorii și antioxidante* ale uleiului de *Juniperus* la nivelul căilor respiratorii traheo-bronșice de șobolan și a cuprins următoarele aspecte: utilizarea unei metode de expunere directă a căilor respiratorii la uleiului de *Juniperus* administrat prin nebulizare, un model experimental standardizat de bronhopneumopatie obstructivă cronică (BPOC) indusă prin expunerea cronică a șobolanilor la fumul de țigară, un model experimental standardizat de studiu *in vitro*, în baia de organ izolat, a reactivității inelului traheal și un model de studiu morfologic clasic (colorația standard cu hematoxilină – eozină) al fragmentelor de trahee și plămâni.

Obiectivele studiului

- Studiul efectelor expunerii cronice la uleiul de *Juniperus* administrat prin nebulizare (aerosoli), asupra reactivității musculaturii netede traheale de șobolan, normală și expusă inițial fumului de țigară, prin utilizarea unui model experimental standardizat de *studiu în baia de organ izolat*
- Evaluarea *răspunsului contractil* al musculaturii netede traheale de șobolan la agonistul fiziologic (clorhidrat de acetilcolină) și a *răspunsului relaxant* la agonisti cu mecanisme de acțiune diferită (bitartrat de epinefrină, nitroprusiat de sodiu dihidrat, diclorhidrat de pirenzepină)

- Corelarea *modificărilor funcționale* evidențiate prin studiul *in vitro* a reactivității musculaturii netede traheale de șobolan, în baia de organ izolat, cu *modificările morfologice* evidențiate prin examenul histopatologic, induse de expunerea cronică la uleiul de *Juniperus* și fumul de țigară
- Evaluarea *efectelor antiinflamatorii* și *antioxidante* ale uleiului de *Juniperus* în cazul modificărilor induse de expunerea cronică la fumul de țigară

Material și metode

1. Pregătirea loturilor

Studiul a fost efectuat pe un lot de 40 de șobolani Sprague-Dawley (femele), cu greutate cuprinsă între 200 și 300 grame, proveniți de la Biobaza UMF „Victor Babeș” Timișoara, care au fost împărțiți în 4 loturi:

- Lotul 1 (n = 10) - șobolani care nu au fost expuși la fumul de țigară și/sau uleiul de *Juniperus* (lotul martor)
- Lotul 2 (n = 10) - șobolani care au fost expuși la uleiul de *Juniperus*
- Lotul 3 (n = 10) - șobolani expuși la fumul de țigară
- Lotul 4 (n = 10) - șobolani expuși inițial la fumul de țigară și apoi la uleiul de *Juniperus*

Pe toată durata experimentului, șobolanii au beneficiat de condiții standard de creștere și dezvoltare, respectiv temperatură 22°C, umiditate 55%, ritm circadian 12 ore de lumină/întuneric, și au avut acces *ad libitum* la apă și hrană standardizată (Institutul Cantacuzino București). Experimentele s-au desfășurat conform normelor în vigoare privind protecția animalelor.

Expunerea cronică la fumul de țigară

Șobolanii au fost plasați într-o incintă de sticlă etanșă, cu volumul de aproximativ 20 litri, prevăzută cu: (a) un „dispozitiv” pentru generarea automată a fumului de țigară, alcătuit dintr-o trompă de vid acționată de un flux de aer comprimat, cu debitul 3L/min la o presiune de 0,12 MPa, și (b) un orificiu de evacuare a excesului de aer și a fumului de țigară, cu rolul de a evita apariția suprapresiunii în incinta de expunere.

Debitul de aer generat la o presiune subatmosferică a asigurat „fumarea” țigării atașată sistemului la exteriorul incintei de expunere și, în același timp, antrenarea fluxului principal al fumului de țigară rezultat în interiorul incintei de expunere (figura 2.34).

Șobolanii aparținând loturilor 3 și 4 au fost expuși la fumul de țigară timp de 6 săptămâni, 5 zile pe săptămână. Pentru expunere au fost utilizate câte 2 țigări cu filtru/zi, cu un conținut de 0,8 mg *tari*/țigară și 0,6 mg nicotină/țigară. Fiecare țigară a fost „fumată” în decurs de 10 min. După fiecare expunere șobolanii au fost lăsați să respire în atmosfera din incintă, timp de 30 de min.

Convențional, fumul de țigară cuprinde 2 faze: *faza tar* și *faza gazoasă*. Faza tar este definită ca materialul reținut când fluxul principal este trecut printr-un filtru de fibră de sticlă Cambridge. Această fază cuprinde 99,9% din *materialul particulat* cu mărimea > 0,1 μm și > 10¹⁷ radicali liberi/g. Faza gazoasă reprezintă *materialul particulat* care traversează filtrul Cambridge și cuprinde > 10¹⁵ radicali liberi/puff [176].

Expunerea la uleiul de *Juniperus*

Șobolanii aparținând loturilor 2 și 4 au fost expuși la uleiul de *Juniperus* timp de 3 săptămâni, 5 zile pe săptămână. La fiecare expunere, cu durata de 20 de min,

În incinta de sticlă etanșă a fost nebulizat un volum de 1,84 mL/zi ulei volatil obținut prin hidrostilarea pseudobacelor de *Juniperus communis*. După fiecare expunere șobolanii au fost lăsați să respire în atmosfera din incintă timp de 20 de min. Pentru administrarea uleiului de ieunupăr s-a utilizat un nebulizator de tip „Pari – Boy” (Welch Allyn, Germania) cu flux continuu de 5-6 L/min (figura 2.33.).



Figura 2.33. - Instalația de expunere cronică la fum de țigară și la uleiul de *Juniperus*. Nebulizatorul Pari Boy

Obținerea inelului de musculatură netedă traheală

Animalele au fost sacrificate prin administrarea intraperitoneală de tiopental sodic, în doză de 50 mg/kg corp, urmată de dislocare cervicală și exsangvinare. După sacrificare, s-a deschis cavitatea toracică printr-o incizie sternală și s-a izolat traheea din care au fost secționat inele de musculatură netedă traheală cu lungimea de 2 – 2,5 mm.

Studiul in vitro al reactivității inelului de musculatură netedă traheală

Aparatura utilizată

Inelele de musculatură netedă traheală (MNT), fixate în prealabil pe un sistem de prindere, au fost introduse în două băi de organ cu volumul de 10 mL, aparținând unei instalații BIOPAC MP 100 (BIOPAC System Inc, USA), prevăzută cu un traductor izometric de forță și un micrometru manual de control al întinderii preparatului. Tensiunea izometrică generată de inelele de MNT în cursul experimentului a fost măsurată continuu cu ajutorul unui traductor de forță izometric FORT 10 (World Precision Instruments Inc.). Datele obținute au fost amplificate, achiziționate și stocate în memoria unui calculator cu ajutorul unei interfețe hardware MP 100 și a unui program software dedicat BIOPAC AcqKnowledge, versiune 3.7.2 (BIOPAC System Inc. USA) (figura 2.34.).



Figura 2.34. - Instalație de baie de organ BIOPAC cu unitate de achiziție MP 100 și traductor de forță izometric FORT 10

Reactivi

Pentru obținerea soluțiilor de lucru s-au folosit reactivi puri din care s-au preparat diluțiile necesare. S-au utilizat următorii reactivi:

- *Clorhidrat de acetilcolină* (ACh) – agonist neselectiv al receptorilor muscarinici M1 – M3, cod catalog Sigma A6625
- *Bitartrat de epinefrină* (EPI) – agonist neselectiv al receptorilor α_1 și β_2 – adrenergici, cod catalog Sigma E4375
- *Nitroprusiat de sodiu dihidrat* (NPS) – donator de oxid nitric (NO), cod catalog 71778 (Fluka)
- *Diclorhidrat de pirenzepină* (PIR) – blocant selectiv al receptorilor muscarinici M1, cod catalog Sigma P7412

Substanțele pure au fost solubilizate în apă distilată, cu excepția pirenzepinei care a fost dizolvată într-o soluție de alcool etilic 50%. Formula de calcul a volumului de soluție de lucru utilizat pentru a obține concentrația dorită în baia de organ a fost următoarea:

$$V = \frac{C_B \times (10 - v)}{C_S - C_B}$$

unde: V = volumul soluției de lucru utilizat, C_S = concentrația soluției de lucru, C_B = concentrația dorită în baia de organ, 10 = volumul băii de organ (mL), v = volumul de lichid dezlocuit în baia de organ de către dispozitivul de prindere al preparatului vascular.

Soluția viabilă Krebs - Henseleit

Pentru menținerea viabilității preparatului în baia de organ a fost utilizată o soluție viabilă *Krebs - Henseleit*, termostată la 37°C și aerată continuu cu un amestec de O₂ 95% și CO₂ 5%. Soluția Krebs-Henseleit utilizată a avut următoarea compoziție: NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2,5 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucoză 11,1 mM, Na₂EDTA 0,026 mM. pH-ul soluției a fost verificat pe tot parcursul experimentului la intervale de 30 de minute (pH = 7,4).

Inelele de MNT (musculatură netedă traheală) au fost pretensionate la 1,5 g forță și au fost echilibrate timp de 60 de minute. Pe tot parcursul echilibrării, preparatele au fost spălate cu soluție Krebs – Henseleit la intervale de 15 min.

Etapele experimentului:

- I. Echilibrarea preparatului a fost verificată prin obținerea a două răspunsuri contractile similare la acetilcolină 10⁻⁵ M (diferența între forțele generate de cele două contracții succesive < 10 -15%).
- II. Răspunsul contractil al inelelor de MNT a fost evaluat prin determinarea curbei doză-efect la acetilcolină, pentru doze cumulative cuprinse între 10⁻⁷ M și 10⁻⁴ M (figura 2.35.), iar forța de contracție generată a fost exprimată în valori absolute (cN).
- III. Răspunsul relaxant al inelelor de MNT a fost evaluat prin determinarea curbelor doză-efect la epinefrină (figura 2.36.), nitroprusiat de sodiu (figura 2.37.) și respectiv la pirenzepină (figura 2.38.), utilizându-se pentru fiecare doză cumulative cuprinse între 10⁻⁷ M și 10⁻⁵ M. Curbele au fost obținute pe fondul precontrației cu acetilcolină, în doză submaximală de 10⁻⁵M, iar rezultatul a fost exprimat ca % relaxare din precontrația indusă de aceasta.

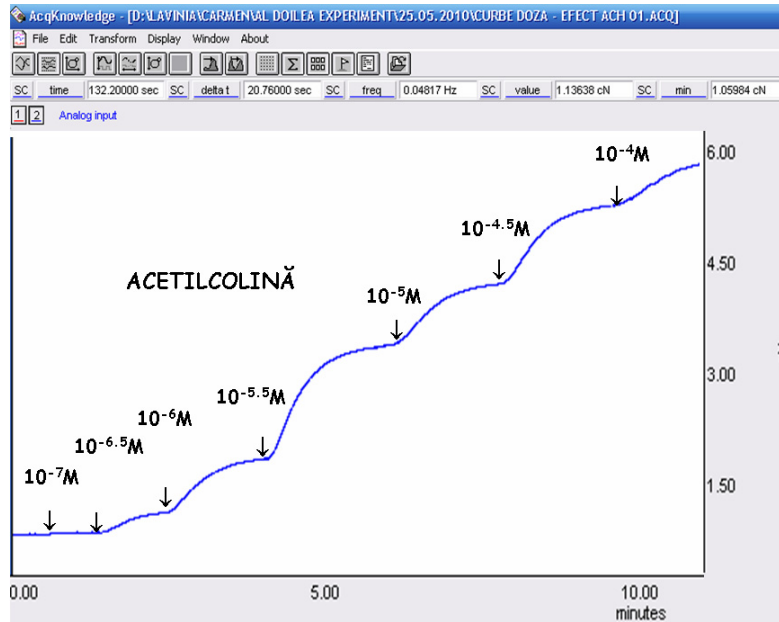


Figura 2.35. - Grafic de lucru: curba doză - efect la acetilcolină ($10^{-7}M - 10^{-4}M$)

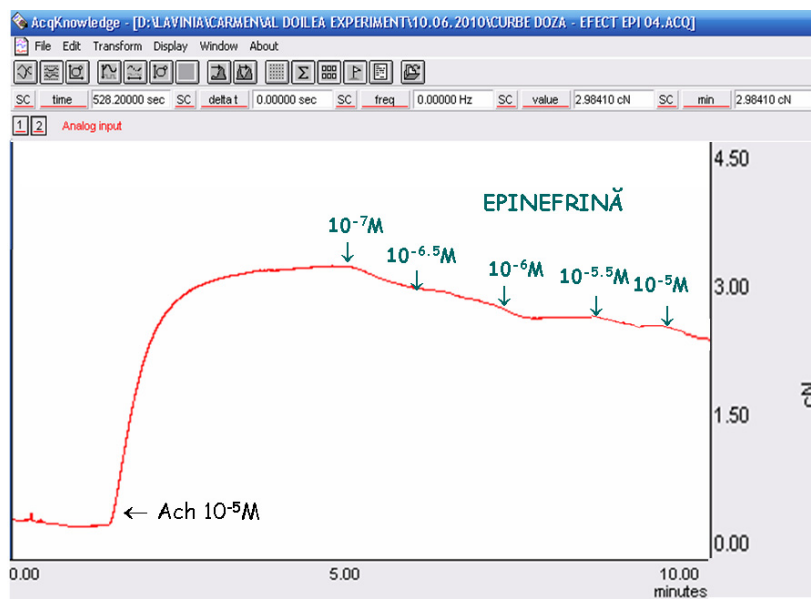


Figura 2.36. - Grafic de lucru: curba doză-efect la epinefrină ($10^{-7}M-10^{-5}M$)

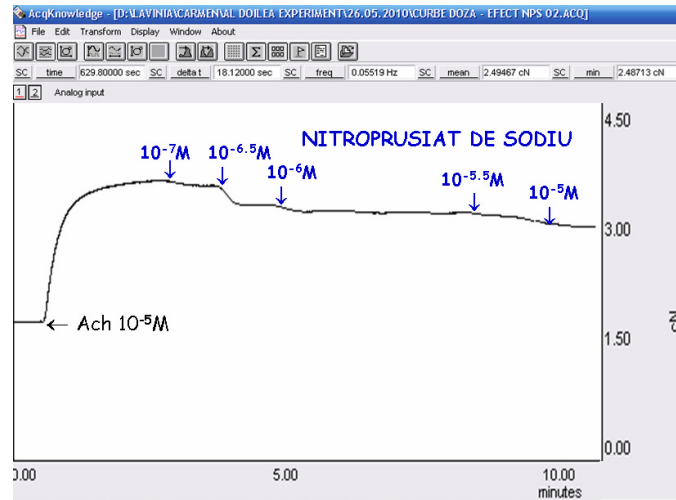


Figura 2.37. - Grafic de lucru: curba doză – efect la nitropusiat de sodiu ($10^{-7}M - 10^{-5}M$)

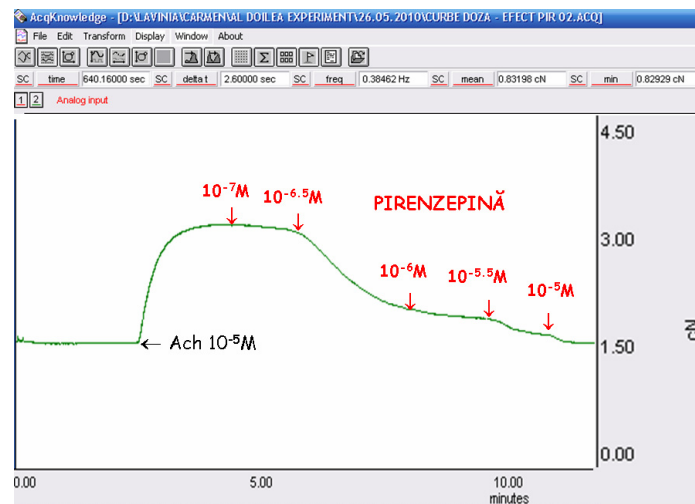


Figura 2.38. - Grafic de lucru: curba doză – efect la pirenzepină ($10^{-7}M - 10^{-5}M$)

Examenul histopatologic

Fragmentele de trahee și plămân, recoltate imediat după sacrificarea animalului, s-au prelucrat prin fixare în formaldehidă 10%, includere la parafină și secționare la 4-5 μm (s-au efectuat secțiuni seriate, în medie 4-5 secțiuni/caz). Studiul morfologic s-a efectuat pe secțiuni colorate cu hematoxină-eozină (tehnica standard) aplicată tuturor cazurilor studiate.

Analiza statistică

Datele achiziționate au fost prelucrate statistic cu ajutorul programului software dedicat GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, SUA). Tendințele centrale ale variabilelor obținute de la n inele diferite au fost exprimate ca medie (M), iar cele de dispersie ca eroare standard (ES). Distribuția normală, de tip Gaussian, a

variabilelor în seriile de valori analizate a fost confirmată cu ajutorul testului Kolmogorov – Smirnov. S-a optat pentru acest test de apreciere a normalității distribuției unei serii de valori datorită numărului relativ redus de date obținute de la un eșantion.

În scopul aprecierii globale a reactivității inelului de MNT s-a optat pentru calcularea mai multor variabile ale ecuației Hill pentru o relație de tip sigmoidal, iar pentru compararea curbelor doze – răspuns estimate cu ajutorul acestei ecuații s-a utilizat testul F.

Parametrii care au fost utilizați pentru aprecierea globală a reactivității inelului de MNT au următoarea semnificație:

- Bottom - răspunsul minim estimat
- Top - răspunsul maxim estimat
- EC₅₀ (-log[M]) - concentrația necesară atingerii a 50% din răspunsul contractil maxim
- IC₅₀ (-log[M]) - concentrația necesară atingerii a 50% din răspunsul relaxant maxim
- Hill Slope - panta curbei doză-răspuns.

Studiul proprietăților antimicrobiene a extractelor de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*

Determinarea activității antimicrobiene a extractelor din frunze aciculare și pseudobace de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana* s-a realizat prin metoda difuzimetrică. În literatura de specialitate, metoda difuzimetrică este cunoscută sub denumirea de Testul Kirby – Bauer. Metoda are la bază proprietatea substanțelor antimicrobiene de a difuza într-un mediu de cultură solid pe care se însămânțează cultura bacteriană de testat.

Mod de lucru:

Activitatea antimicrobiană a extractelor etanolice din frunze aciculare și pseudobace de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*, determinată prin metoda difuziei în agar cu discuri impregnate a fost testată pe cinci specii bacteriene: bacterii gram pozitive - *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulazo-pozitiv* - și gram negative: *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Escherichia coli*.

Reactivi: - mediu de cultură pentru activitatea antimicrobiană - Müller-Hinton agar [177].

S-a realizat o suspensie de bacterii cu o concentrație de 0,5 pe scala MacFarland apoi s-a însămânțat placa Petri utilizând un tampon steril înmuiat în suspensia bacteriană și trecut pe toată suprafața mediului din placa Petri. Discurile de filtru, (sterilizate în prealabil la 120°C timp de 20 minute) au fost impregnate cu câte 50μL extract:

Au fost testate următoarele extracte etanolice, în paralel cu solventul, alcool etilic 96%.

- extract etanolic din frunze aciculare de *Juniperus viginiana* Macea (2009)
- extract etanolic din frunze aciculare de *Juniperus communis* Lipova (2009).
- extract etanolic din pseudobace de *Juniperus viginiana* Macea (2009).

Discurile impregnate au fost aplicate aseptice pe suprafața fiecărei plăci Petri cu ajutorul unei pensete sterile.

Fiecare disc a fost ușor presat pentru a asigura un contact bun cu suprafața mediului. Plăcile inoculate au fost incubate timp de 24 de ore la 37°C (în termostat).

PARTEA III - CONTRIBUȚII PROPRII

REZULTATE ȘI DISCUȚII

III.1. Caracterizarea extractelor realizate din cele trei părți anatomice de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*

Analiza calitativă a extractelor – obținute prin refluxare, ultrasunare, respectiv în instalație micropilot prevăzută cu generator de ultrasunete și prin hidrodistilare – s-a realizat cu ajutorul gaz cromatografiei cuplate cu spectrometrie de masă. În toate cazurile, prin analiza GC-MS a extractelor de *Juniperus* s-au separat un număr foarte mare de componente volatile (în majoritatea extractelor peste 100).

Trebuie notat faptul că în toate extractele s-a identificat un număr semnificativ de monoterpenoide monociclice (limonen, terpinolen și β -felandren) și biciclice (α -pinen, β -pinen, 3-careen, camfen, cineol și verbenonă), respectiv sesquiterpenoide biciclice (cariofilen) și monociclice (α -humulen).

III.1.1. Caracterizarea extractelor obținute prin refluxare

Extractele obținute prin refluxare din frunze aciculare de *Juniperus communis* (Lipova) au prezentat 129 de picuri cromatografice relevante (figura 3.1.), iar cele de *Juniperus virginiana* (Macea) 137 componente (figura 3.2.).

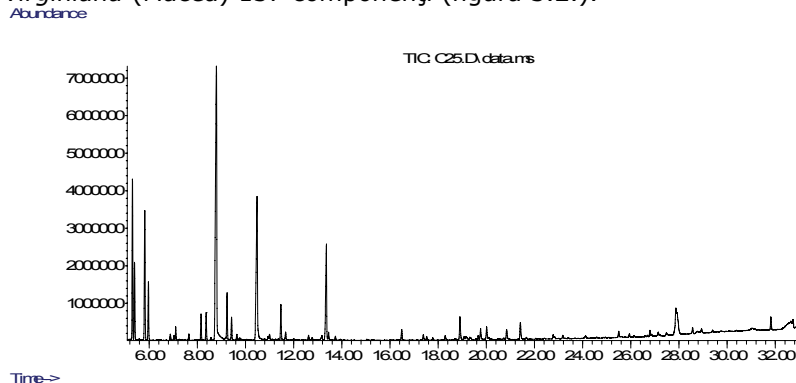


Figura 3.1. - Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în toluen din frunze aciculare de *Juniperus communis* (Lipova)

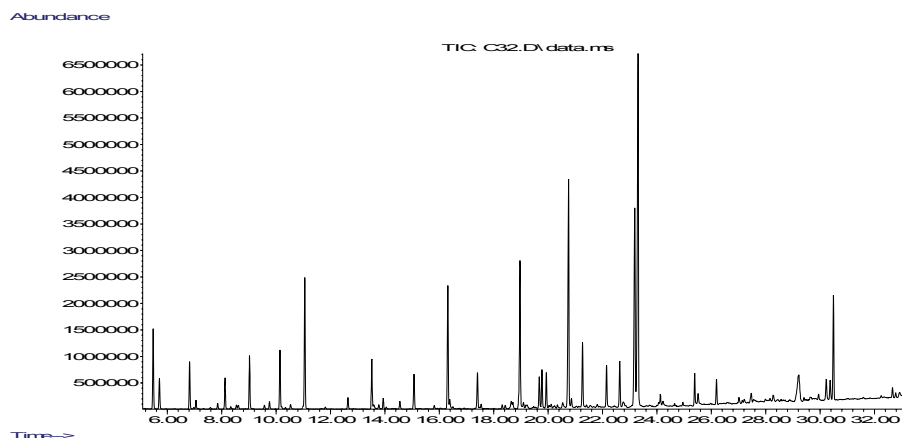


Figura 3.2. - Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în cloroform din frunze aciculare de *Juniperus virginiana* (Macea)

Extracțele obținute prin refluxare din frunze aciculare de *Juniperus communis* au prezentat aproximativ aceiași componenți majoritari, cu procente care au variat în limite relativ mici. Astfel, procentul cel mai mare l-a avut **α -pinenul** (în procente de 36,15% în extractul în toluen al frunzelor aciculare provenite din Suedia, Anexe, figura A.1.), apoi **limonenul** (19,22%, extractul în cloroform din frunzele aciculare din Siria, Anexe, figura A.2.) și **β -cubebenul** (17,43%, extractul în hexan (Siria), Anexe, figura A.3., tabelul 3.1.). Procentul de α -pinenul (33,7%) este comparabil cu cel obținut conform unor date de literatură [178] prin extracția cu lichide supercritice, din frunze aciculare de *Juniperus communis*.

Doar în extracțele din frunze aciculare de *Juniperus virginiana* (Macea) s-a găsit 1,8-cineol (eucaliptol) între 0,11-0,17%, cantitatea cea mai mare fiind în extractul hexanic.

Tabelul 3.1. Identificarea componentelor din extractele frunzelor aciculare de *Juniperus* obținute prin refluxare (% din aria totală)

Nr. Crt.	Componente	SIRIA						AUSTRIA						LIPOVA					
		THF	CLF	H	EA	T	3.23	CLF	H	EA	T	11.48	CLF	H	EA	T	7.46		
1.	<i>α</i>-Pinen	6.51	16.4	6.29	17.37	3.23	30.64	20.99	29.67	11.48	29.99	31.17	13.81	0.08	0.07	0.18	0.22	0.18	
2.	Camfen	-	-	-	-	-	0.16	0.11	0.18	-	0.18	0.22	0.08	0.18	0.22	0.18	0.22	0.07	
3.	<i>β</i> -Felandren	0.26	1.36	0.84	0.69	0.56	2.41	1.29	2.22	0.91	4.49	1.15	8.12	2.25	4.49	1.15	1.15	2.25	
4.	<i>β</i> -Pinen	0.73	1.9	0.81	0.79	0.42	2.25	1.66	2.53	1.08	2.57	2.31	0.47	0.91	2.57	2.31	0.47	0.91	
5.	Ocimen	0.08	0.12	0.04	0.12	-	0.1	0.03	-	-	-	-	0.02	0.05	-	-	-	0.05	
6.	3-Caren	-	0.17	-	-	-	0.98	2.65	3.39	-	1.75	0.25	-	-	1.75	0.25	-	-	
7.	T-Terpinen	-	-	-	-	-	1.07	-	0.57	-	2.27	0.99	-	-	2.27	0.99	-	-	
8.	Limonen	7.37	19.22	9.44	18.79	3.93	1.77	1.82	1.65	0.99	2.68	2.5	2.08	0.05	2.68	2.5	2.08	1.38	
9.	cis- <i>β</i> -Terpineol	-	-	-	-	-	0.47	-	-	-	0.74	1.26	0.05	-	0.74	1.26	0.05	-	
10.	Terpinolen	-	-	-	-	-	0.49	0.38	0.38	0.11	1.01	0.31	0.32	-	1.01	0.31	0.32	-	
11.	Linalool	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
12.	dis-Verbenol	-	-	-	-	-	0.13	0.2	0.07	-	0.16	0.62	-	-	0.16	0.62	-	-	
13.	Bisabolen epoxid	0.04	0.13	0.17	0.12	0.07	0.02	0.22	0.22	-	0.18	-	0.1	0.03	0.18	-	0.1	0.03	
14.	Carveol	0.01	-	0.06	0.16	0.03	0.03	0.11	0.13	-	0.25	0.08	0.01	-	0.25	0.08	0.01	-	
15.	D-Verbenonă	-	-	-	-	0.02	0.04	0.03	0.03	-	0.14	0.15	-	0.02	0.14	0.15	-	0.02	
16.	Germaacren D	-	0.66	-	0.74	0.17	3.82	12.57	4.19	4.03	0.85	3.28	-	-	0.85	3.28	-	-	
17.	Cedren	-	0.08	-	0.09	-	-	-	0.06	-	0.03	-	-	-	0.03	-	-	-	
18.	Copaen	2.06	2.16	4.31	1.5	0.94	0.65	0.5	0.49	0.2	-	-	0.04	0.07	-	-	0.04	0.07	
19.	<i>β</i> -Elemen	-	-	-	-	-	1.14	8.05	2.2	2.34	-	-	0.88	1.45	-	-	1.62	0.88	
20.	Cariofilen	0.5	1.37	-	1.44	0.29	1.71	1.7	1.51	0.62	0.56	0.67	0.44	0.36	0.56	0.67	0.44	0.36	
21.	<i>α</i> -Humulen	0.38	1.08	2.24	1.09	0.2	1.59	1.65	1.27	0.61	0.45	0.53	0.27	0.29	0.45	0.53	0.27	0.29	
22.	<i>β</i>-Cubeben	2.98	8.57	17.43	9.28	1.61	1.23	6.77	2.78	1.82	1.73	3.31	2.14	1.65	1.73	3.31	2.14	1.65	
23.	T-Cadinen	2.26	6.4	13.56	7.25	1.37	4.21	0.35	1.07	0.24	1.56	-	0.18	0.29	1.56	-	0.18	0.29	
24.	<i>β</i> -Cadinen	0.84	2.14	4.64	2.53	0.49	6.03	-	2.13	0.66	1.23	0.28	0.47	0.74	1.23	0.28	0.47	0.74	
25.	T-Elemen	0.11	2.19	2.15	0.39	0.16	1.36	2.26	0.84	0.18	2.25	-	1.89	0.14	2.25	-	1.89	0.14	
26.	Spatulenol	-	-	-	-	-	0.4	0.46	0.36	0.18	-	-	-	-	-	-	-	-	
27.	T-Cadinol	0.51	1.44	3.08	1.83	0.35	0.39	0.46	0.13	0.30	-	-	-	0.13	-	-	-	0.13	
28.	<i>P</i> -cimen	-	-	-	-	-	0.78	0.46	0.79	0.30	1.22	1.08	0.26	-	1.22	1.08	0.26	-	

Tabelul 3.2. Identificarea componentelor din extractele frunzelor aciculare de *Juniperus* obținute prin refluxare (% din aria totală)

Nr. Crt.	Componente	JUNIPERUS COMMUNIS						JUNIPERUS VIRGINIANA							
		CLF	H	EA	T	THF	CLF	SIRIA H	EA	T	THF	CLF	MACEA H	EA	T
1.	α-Pinen	32.49	26.33	33.64	36.15	2.31	10.4	13.63	7.58	2.48	1.51	1.15	1.4	0.66	0.47
2.	Camfen	-	-	-	-	-	-	0.1	-	-	0.03	0.01	-	-	-
3.	β-Felandren	10.53	7.42	6.99	8.11	0.74	5.28	7.12	1.97	0.73	0.11	-	14.38	7.98	-
4.	β-Pinen	1.59	4.91	0.92	1.02	0.39	4.33	6.6	0.88	0.34	0.33	0.07	0.4	0.28	0.17
5.	Ocimen	-	-	-	-	0.12	0.19	0.04	0.34	0.08	-	-	-	0.06	-
6.	3-Caren	-	-	-	-	0.7	1.53	1.03	1.8	0.63	0.08	0.09	0.15	-	0.05
7.	T-Terpinen	-	-	-	-	-	-	0.17	-	-	0.19	1.99	-	0.42	0.09
8.	Limonen	2.67	1.51	1.71	2.15	0.37	2.45	3.06	0.67	0.19	0.6	1.09	1.09	0.54	0.58
9.	cis-β-Terpineol	-	-	-	-	-	0.36	0.81	-	0.09	0.45	0.19	0.13	0.17	0.07
10.	Terpinolen	-	-	-	-	0.09	0.33	0.47	-	-	0.13	0.48	0.17	0.24	-
11.	Linalool	-	-	-	-	-	0.11	0.06	-	-	0.06	-	0.08	0.06	0.08
12.	cis-Verbenol	0.55	-	-	-	-	-	0.06	0.05	0.08	-	0.01	0.02	-	-
13.	Bisabolen epoxid	-	-	-	-	0.51	3.12	0.03	2.5	1.24	-	-	-	0.03	-
14.	Carveol	-	-	-	-	0.12	0.28	0.29	0.07	0.1	-	-	-	0.09	0.08
15.	D-Verbenonă	-	-	-	-	-	0.07	0.05	0.11	0.08	-	0.01	-	-	-
16.	Germanen D	-	-	-	-	-	3.07	2.26	-	0.21	2.76	2.39	6.68	3.05	3.34
17.	Cedren	-	-	-	-	-	0.12	0.02	0.83	0.3	0.03	-	-	0.02	0.03
18.	Copaen	-	-	-	-	0.32	1.15	0.58	0.49	0.17	-	0.07	-	-	-
19.	β-Elementen	2.23	2.95	2.15	2.44	-	-	1.42	0.19	0.15	0.22	0.07	-	0.13	0.16
20.	Cariofilen	2.79	4.54	3.24	3.02	1.15	3.54	2.53	3.7	1.18	1.18	1.48	0.02	1.23	0.92
21.	α-Humulen	2.44	3.52	2.8	2.87	0.68	2.52	-	2.3	0.73	0.12	0.16	0.18	0.13	0.09
22.	β-Cubeben	5.45	7.67	6.68	7.13	1.14	-	-	3.45	1.06	0.07	0.04	-	-	-
23.	T-Cadinen	1.82	1.75	2.22	2.05	0.28	0.68	0.63	1.01	0.31	0.26	1.2	0.15	0.32	0.12
24.	β-Cadinen	0.48	0.6	0.56	0.78	0.63	1.38	7.31	2.05	0.64	0.43	1.49	0.29	0.51	0.18
25.	T-Elementen	0.66	1.32	0.9	0.78	-	-	-	-	-	0.2	-	0.03	0.14	0.13
26.	Spatulenol	1.16	1.22	0.92	0.74	-	0.51	-	-	-	-	-	-	-	-
27.	T-Cadinol	0.6	0.52	0.72	0.67	-	0.16	0.15	-	0.09	-	-	-	0.09	-
28.	Hedycariol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29.	P-cimen	0.68	-	-	-	-	0.33	0.24	0.40	0.14	0.09	0.14	0.12	0.12	0.07
										18.23	9.30	32.10	15.25	18.22	

În cazul extractelor din frunze aciculare de *Juniperus virginiana*, compusul majoritar al materialului vegetal provenit din Siria este **α -pinenul** (13,63%, în extractul în hexan, Anexe, figura A.4.), iar pentru cel provenit de la Macea este **hedicariolul** (32,10%, în extractul în hexan, Anexe, figura A.5., figura A.6., tabelul 3.2).

În urma analizelor GC-MS a extractelor din pseudobace de *Juniperus communis* și *Juniperus virginiana*, în primul caz compusul majoritar este **α -pinenul** (cu un maxim de 19,73% în extractul în acetat de etil, urmat de 14,42% în extractul în tetrahidrofuran, Anexe, figura A.7.), iar în cel de-al doilea caz **β -felandrenul** este compusul majoritar (cu un maxim de 46,64%, extractul în acetat de etil, Anexe, figura A.8., tabelul 3.3).

Pseudobacele de *Juniperus virginiana* (Macea) prezintă în componența lor 1,8-cineol, între 0,03-0,09%, cea mai mare cantitate fiind în extractul cloroformic și hexanic. 1,8-Cineolul a fost prezent și în extractul cloroformic din pseudobacele de *Juniperus communis* (Albac), în procent de 0,01%.

Extractele din microblaste de *Juniperus communis* obținute prin refluxare (tabelele 3.4 și 3.5) prezintă ca și compuși principali **α -pinenul** (55,98% - extractul în hexan (Siria); 51,62% - extractul în acetat de etil (Austria), Anexe, figura A.9.; 40,98% - extractul în toluen (Suedia), Anexe, figura A.10.; 34,96% - extractul în acetat de etil (Lipova), Anexe, figura A.11.) și **limonenul** (15,61% - extractul în cloroform (Austria), Anexe, figura A.12.).

În extractul cloroformic din microblaste de *Juniperus virginiana* (Macea), procentul de 1,8-cineol a fost de 0,24%, iar în extractul hexanic de *Juniperus virginiana* (Siria) a fost de 0,06%.

Tabelul 3.3. Identificarea componentilor din extractele pseudobacelor de *Juniperus* obținute prin refluxare (% din aria totală)

Nr. Crt.	Componenti	JUNIPERUS COMMUNIS						JUNIPERUS VIRGINIANA					
		THF	CLF	H	EA	T	THF	CLF	H	EA	T		
1.	α-Pinen	14.42	12.36	12.77	19.73	11.09	1.74	2.58	2.68	2.57	1.04		
2.	Camfen	0.25	0.22	0.2	0.17	0.15	0.03	-	0.05	-	-		
3.	β-Felandren	9.38	10.53	8.44	10.51	6.82	26.95	35.89	46.64	16.77	16.77		
4.	β -Pinen	9.25	9.04	8.8	10.1	6.72	2.59	3.97	4.27	4.27	1.64		
5.	Ocimen	-	-	-	-	0.03	-	0.18	0.02	0.09	-		
6.	3-Caren	0.71	0.64	0.66	0.61	0.44	-	-	0.08	0.05	0.05		
7.	T-Terpinen	0.37	1.7	0.29	0.28	0.21	1.02	1.59	-	0.09	-		
8.	Limonen	4.74	5.04	4.54	4.75	3.28	0.83	1.45	1.29	1.21	0.47		
9.	cis- β -Terpineol	0.74	0.99	0.84	0.76	0.28	0.62	0.95	0.85	0.42	0.18		
10.	Terpinolen	0.75	0.54	0.82	0.76	0.57	0.32	0.37	0.5	0.45	0.23		
11.	Linalool	0.43	0.09	0.08	0.07	0.05	0.03	0.1	0.05	0.06	-		
12.	cis-Verbenol	0.04	0.04	0.09	0.09	0.11	-	-	-	-	-		
13.	Bisabolen epoxid	0.02	0.07	0.01	0.16	0.01	-	0.12	0.05	0.11	0.02		
14.	Carveol	0.11	0.35	0.27	0.06	0.1	0.03	0.06	0.02	0.04	-		
15.	D-Verbenonă	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	-	-	-	-	-		
16.	Germacren D	2.8	4.16	4.62	3.42	2.15	3.26	6.05	7.04	6.07	2.86		
17.	Cedren	-	-	-	-	-	-	0.07	0.02	-	-		
18.	Copaen	0.33	0.32	0.3	0.55	0.43	-	-	0.09	-	-		
19.	β -Elemen	2.22	0.09	2.7	2.04	1.62	0.18	0.18	0.23	0.15	0.11		
20.	Cariofilen	1.91	4.21	2.27	1.83	1.36	1.2	2.13	2.1	1.92	-		
21.	α -Humulen	1.67	-	1.96	1.59	1.16	1.12	0.04	0.2	0.18	0.07		
22.	β -Cubeben	7.78	7.97	8.94	-	4.91	1.12	2.27	2.11	1.75	0.74		
23.	T-Cadinen	0.36	0.5	0.38	0.2	0.27	0.12	0.43	0.31	-	-		
24.	β -Cadinen	0.91	0.64	0.72	0.65	0.43	0.11	-	0.18	-	-		
25.	T-Elemen	2.34	1.07	5.63	4.43	2.6	0.09	0.1	0.74	0.25	0.05		
26.	Spatulenol	0.57	-	0.75	0.56	0.99	-	-	-	-	-		
27.	T-Cadinol	0.09	-	0.09	0.08	-	-	-	-	-	-		
28.	<i>p</i> -cimen	0.26	0.28	0.22	0.22	-	-	-	0.25	-	0.12		

Tabelul 3.4. Identificarea componentelor din extractele microblastelor de *Juniperus* obținute prin refluxare (% din aria totală)

Nr. Cr.	Componente	JUNIPERUS COMMUNIS															
		SIRIA			AUSTRIA			LIPOVA			T						
		THF	CLF	EA	H	T	THF	CLF	H	EA	H	T	THF	CLF	H	EA	T
1.	α-Pinen	12.69	48.56	38.72	55.98	6.91	8.22	14.47	16.02	51.62	17.16	21.75	9.36	17.16	21.75	34.96	5.31
2.	Camfen	0.09	0.35	0.27	-	0.06	0.05	0.02	0.11	0.3	0.19	0.42	0.08	0.16	0.19	0.42	0.06
3.	β -Felandren	0.15	0.64	0.66	1.18	0.23	0.63	1.4	1.16	0.9	0.26	19.54	0.26	16.64	19.54	12.07	1.11
4.	β -Pinen	0.89	3.27	2.42	3.68	0.57	0.75	1.35	1.29	2.11	0.85	2.33	0.85	1.87	2.33	2.64	0.51
5.	Ocimen	0.02	0.12	0.32	0.07	0.03	0.02	0.07	0.09	0.11	-	-	-	-	-	0.18	-
6.	3-Caren	0.19	1.18	0.7	0.7	0.32	0.16	0.06	0.06	-	0.15	0.3	0.15	0.23	0.3	-	0.16
7.	T-Terpinen	-	-	-	0.34	-	-	-	-	-	0.23	0.56	0.23	0.57	0.56	-	-
8.	Limonen	0.41	5.5	2.17	0.8	0.13	9.54	15.61	13.31	11.73	1.37	3.59	1.37	2.79	3.59	-	0.22
9.	cis- β -Terpineol	-	-	-	-	-	0.1	0.08	0.04	-	0.69	0.66	0.69	0.66	2.24	-	0.04
10.	Terpinolen	0.28	0.95	0.45	1.32	0.09	-	-	-	-	0.39	0.91	0.39	0.91	0.72	-	-
11.	Linalool	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.	cis-Verbenol	0.12	0.38	0.14	0.41	0.11	0.08	0.28	0.42	0.7	0.32	1.37	0.32	0.6	1.37	2.16	0.59
13.	Bisabolen epoxid	0.19	0.18	0.1	0.05	0.45	0.09	0.23	0.63	-	0.13	0.2	0.13	0.45	0.2	-	0.07
14.	Carveol	0.12	0.43	0.1	0.23	-	0.02	0.59	0.08	0.25	0.36	0.39	0.36	0.39	0.39	0.27	-
15.	D-Verbenonă	0.07	0.3	0.14	0.17	0.06	0.03	0.1	0.13	0.18	0.08	0.23	0.08	0.2	0.23	0.82	0.27
16.	Germaçren D	-	-	-	2.63	-	-	-	0.42	-	-	0.5	-	-	0.5	-	-
17.	Cedren	-	-	-	0.09	-	-	0.05	-	-	-	-	-	0.84	-	0.75	0.3
18.	Copaen	0.47	1.81	0.75	1.53	0.24	0.89	1.89	2.27	1.47	-	-	-	0.84	-	0.87	0.31
19.	β -Elemen	-	0.22	-	0.17	-	-	0.19	0.21	-	-	-	-	0.12	-	-	-
20.	Carlofilen	0.24	0.9	0.72	0.82	0.34	0.27	0.65	0.73	0.62	0.1	0.47	0.1	0.3	0.75	0.5	-
21.	α -Humulen	0.11	0.52	0.36	0.44	0.18	0.24	0.56	0.64	0.44	0.03	0.54	0.03	0.17	0.54	0.17	-
22.	β -Cubeben	0.39	1.8	0.84	0.84	0.19	1.5	0.16	4.15	1.63	0.42	1.63	0.42	-	1.63	-	-
23.	T-Cadinen	0.18	-	0.54	0.53	-	1.14	3.34	3.24	2.29	-	0.21	-	-	0.21	-	-
24.	β -Cadinen	-	-	-	-	0.37	0.54	1.11	1.45	1.23	-	-	-	-	-	-	-
25.	T-Elemen	-	-	-	0.19	-	-	-	-	-	0.2	0.72	0.2	0.16	0.72	0.12	-
26.	Spatulenol	-	-	-	0.08	-	-	-	-	-	0.07	0.37	0.07	0.18	0.37	-	-
27.	T-Cadinol	0.27	-	-	-	-	0.33	-	0.85	0.46	-	-	-	0.18	0.31	-	0.11
28.	P-cimen	-	-	-	-	0.13	0.12	0.23	0.17	0.13	1.48	4.19	1.48	3.01	4.19	2.81	0.29

Tabelul 3.5. Identificarea componenților din extractele microblastelor de *Juniperus* obținute prin refluxare (% din aria totală)

Nr. Crt.	Componenți	JUNIPERUS COMMUNIS						JUNIPERUS VIRGINIANA							
		CLF	SUE	DIA	T	THF	CLF	SIR	IA	T	THF	CLF	MACEA	H	EA
1.	α-Pinen	28.88	30.14	27.58	40.98	7.65	25.51	18.91	35.24	4.69	12.12	28.43	21.64	14.36	3.82
2.	Camfen	-	-	-	-	0.06	0.34	0.48	-	0.12	0.07	0.13	0.23	-	0.06
3.	β -Felandren	10.04	9.24	1.56	3.57	1.07	2.38	4.57	3.74	1.46	7.05	10.84	12.57	10.51	5.21
4.	β -Pinen	1.12	1.48	1.46	1.03	0.25	0.71	1.44	2.13	0.38	0.77	1.13	1.11	0.85	0.31
5.	Ocimen	-	-	-	-	0.18	0.3	-	0.62	0.12	0.04	0.06	-	0.33	-
6.	3-Caren	-	-	-	-	1.89	0.14	4.71	0.25	-	1.11	-	2.3	-	0.51
7.	T-Terpinen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.09	-	-	-	-
8.	Limonen	3.11	2.51	4.5	1.17	0.33	0.87	0.78	-	0.19	0.57	0.88	0.98	0.66	0.3
9.	cis- β -Terpineol	0.53	0.56	-	-	0.12	0.68	1	0.39	0.06	0.2	0.53	0.63	0.24	0.17
10.	Terpinolen	-	-	-	-	-	0.16	0.46	-	-	0.26	0.53	0.39	0.25	0.16
11.	Linalool	-	-	-	-	-	-	0.22	-	0.12	0.4	0.74	1	0.73	0.45
12.	cis-Verbenol	-	-	-	-	0.12	0.38	0.14	0.41	0.11	0.08	0.28	0.42	0.7	0.32
13.	Bisabolen epoxid	-	-	-	-	0.31	0.1	0.89	0.47	-	0.01	0.08	0.09	0.19	-
14.	Carveol	-	-	-	-	0.43	0.26	0.1	0.38	0.03	0.04	0.69	0.01	0.09	-
15.	D-Verbenonă	-	-	-	-	0.07	0.3	0.14	0.17	0.06	0.03	0.1	0.13	0.18	0.08
16.	Germacren D	-	-	-	-	1.43	3.02	4.95	5.33	1.09	0.96	1.81	2.19	2.09	1.22
17.	Cedren	-	-	-	-	-	0.07	-	-	0.06	-	-	0.13	-	-
18.	Copaen	-	-	-	-	0.3	0.74	0.95	0.91	0.17	-	-	-	-	-
19.	β -Elemen	-	2.49	2.65	-	1.33	3.46	3.99	4.27	0.8	0.04	0.08	0.11	0.1	0.1
20.	Cariofilen	2.58	3.15	1.63	4.62	0.46	1.25	2.02	1.63	0.42	1.98	4.62	4.13	3.1	1.15
21.	α -Humulen	2.27	2.68	1.57	4.18	0.4	0.96	1.16	1.23	0.22	0.2	0.47	0.43	0.35	0.13
22.	β -Cubeben	5.36	6.56	6.62	6.61	0.87	2.54	3.48	3.3	-	-	-	-	-	-
23.	T-Cadinen	0.66	0.93	0.67	0.77	0.35	0.71	0.98	1.1	0.22	-	0.09	0.13	0.16	0.07
24.	β -Cadinen	0.59	1.14	1.54	0.71	0.84	1.77	2.38	2.78	0.56	-	-	0.25	0.37	0.14
25.	T-Elemen	0.66	0.98	0.95	1.75	0.94	2.34	0.67	1.07	0.48	-	-	0.13	-	0.01
26.	Spatulenol	2.58	2.12	1.54	1.62	0.31	0.65	2.01	1	0.19	-	-	-	-	0.43
27.	T-Cadinol	-	0.58	-	-	0.22	-	1.13	0.64	0.16	-	-	-	-	-
28.	p-cimen	0.90	0.85	1.07	-	0.40	0.79	0.90	1.19	0.24	-	-	0.25	-	0.12

III.1.2. Caracterizarea extractelor obținute prin ultrasonare

În ceea ce privește extractele din frunze aciculare obținute prin ultrasonare, compusul majoritar este **α -pinenul** (41% - extractul în cloroform (Lipova), Anexe, figura A.13.; 40,59% - extractul în hexan (Lipova) Anexe, figura A.14.; 37,87% - extractul în acetat de etil (Lipova) Anexe, figura A.15.) pentru extractele de *Juniperus communis* (tabelul 3.6). Unele dintre extractele de *Juniperus virginiana*, respectiv materialul vegetal din Siria, prezintă ca și compus principal **α -pinenul** (25,91% - extractul în hexan, Anexe, figura A.16.), iar frunzele aciculare de la Macea **β -felandrenul** (12,95% - extractul în cloroform, Anexe, figura A.17., tabelul 3.7).

În extractul cloroformic de *Juniperus virginiana* (Macea) s-a găsit 0,15% 1,8-cineol, iar în cel hexanic și în toluen 0,10% respectiv 0,11%.

Din tabelul 3.8 se poate observa că în cazul pseudobacelor analizate avem trei compuși majoritari: **β -felandrenul** (41,71% - extractul în toluen (*Juniperus virginiana* de la Macea), Anexe, figura A.18.), **α -pinenul** (27,97% - extractul în cloroform (*Juniperus communis* de la Albac-2009), Anexe, figura A.19.), **β -pinenul** (18,04% - extractul în cloroform (*Juniperus communis* de la Albac-2008), Anexe, figura A.20.) și **β -cubebenul** (15,21% - extractul în hexan (*Juniperus communis* de la Albac-2008), Anexe, figura A.21.). Variația procentului compușilor volatili din același tip de material vegetal, cules din aceeași regiune se poate datora condițiilor de mediu din anul respectiv și gradului de maturitate al pseudobacelor.

În cazul microblastelor, compușii principali sunt **α -pinenul** (35,71% - extractul în cloroform (Albac, 2008), Anexe, figura A.22.; 34,81% - extractul în hexan (Lipova), Anexe, figura A.23.; 32,74% - extractul de *Juniperus virginiana* în hexan (Macea), Anexe, figura A.24; 32,29% - extractul în hexan (Albac-2008), Anexe, figura A.25.) și **β -felandrenul** (23,67% - extractul în hexan (Lipova), Anexe, figura A.23., tabelul 3.9).

1,8-Cineolul a fost identificat și în extractele din microblaste de *Juniperus virginiana*, între 0,10-0,23%, cel mai mare procent fiind reprezentat de extractul cloroformic.

Tabelul 3.6. Identificarea componentelor din extractele frunzelor aciculare de *Juniperus* obținute prin extracția asistată de ultrasunete (% din aria totală)

Nr. Crt.	Componente	SIRIA			AUSTRIA			LIPOVA					
		CLF	H	EA	T	CLF	H	EA	T	CLF	H	EA	T
1.	α-Pinen	15.62	23.47	20.8	7.67	30.44	27	28.51	18.49	41	40.59	37.87	32.8
2.	Camfen	-	0.14	-	-	0.18	0.29	0.16	0.21	0.22	0.23	0.2	0.17
3.	β -Felandren	0.78	1.28	0.95	0.28	8.77	7.86	7.24	7.04	16.31	16.33	16.47	13.45
4.	β -Pinen	1.13	1.98	1.77	0.86	2.11	2.06	2.19	1.42	2.97	3.33	2.19	1.06
5.	Ocimen	0.05	-	-	-	0.06	0.04	-	0.03	-	-	0.24	-
6.	3-Caren	-	-	-	-	2.49	2.65	2.7	1.61	-	-	-	0.04
7.	T-Terpinen	-	-	-	-	0.15	-	-	-	0.4	0.39	0.47	0.35
8.	Limonen	12.63	19.8	17.96	7.73	1.64	1.43	1.65	0.94	3.28	3.32	3.4	2.69
9.	cis- β -Terpineol	-	-	-	-	0.36	0.29	0.13	0.07	0.57	0.6	0.84	0.19
10.	Terpinolen	-	-	-	-	1.03	0.3	0.46	0.27	0.78	0.83	0.61	0.53
11.	Linalool	-	-	-	-	-	-	-	-	0.06	0.05	0.05	0.03
12.	cis-Verbenol	0.21	-	-	0.05	0.42	0.49	1.02	0.38	0.14	0.36	0.75	0.28
13.	Bisabolen epoxid	0.06	-	-	0.18	1.26	0.38	0.62	0.35	-	-	0.05	-
14.	Carveol	0.11	-	0.36	-	0.14	0.15	0.33	0.12	-	-	0.05	-
15.	D-Verbenonă	0.07	-	0.17	-	0.14	0.09	0.16	0.08	0.09	0.09	0.17	0.14
16.	Germacren D	0.68	1.81	0.69	0.36	13.88	13.76	12.03	7.43	3.06	3.34	3	1.9
17.	Cedren	0.26	0.3	-	-	-	0.04	0.05	-	0.59	-	0.48	0.1
18.	Copaen	1.94	2.85	1.83	0.56	0.52	0.46	0.55	0.31	0.06	-	-	-
19.	β -Elemen	-	-	-	-	5.14	4.99	4.42	2.8	1.65	1.84	1.64	0.91
20.	Cariofilen	0.75	1.3	1.19	0.32	1.26	1.31	1.28	0.66	0.57	0.64	0.52	0.34
21.	α -Humulen	0.86	1.34	1.14	0.39	1.32	1.34	1.26	0.7	0.71	0.76	0.68	0.39
22.	β -Cubeben	4.32	6.93	6.55	2.09	4.9	-	4.47	2.59	5.53	6.17	5.41	3.19
23.	T-Cadinen	7.54	8.76	10.34	2.48	0.71	0.78	0.86	0.42	0.19	0.39	0.18	-
24.	β -Cadinen	2.26	3.3	3.33	1.36	1.77	6.3	1.56	0.85	0.4	-	0.4	0.24
25.	T-Elemen	-	-	-	0.2	2.24	3.22	2.67	0.44	6.02	6.73	5.76	3.43
26.	Spatulenol	-	-	-	1.03	0.53	0.39	0.51	0.42	0.82	0.82	1.03	0.53
27.	T-Cadinol	1.56	2.38	2.39	-	-	0.13	-	0.09	-	-	-	-
28.	P-cimen	-	-	-	-	0.83	0.60	0.74	0.46	-	1.34	1.35	0.84

Tabelul 3.7. Identificarea componentelor din extractele frunzelor aciculare de *Juniperus* obținute prin extracția asistată de ultrasunete (% din aria totală)

Nr. Crt.	Componente	S I R I A						M A C E A		
		CLF	H	EA	T	CLF	H	T		
1.	α-Pinen	17.68	25.91	17.66	5.01	2.03	0.39	0.72		
2.	Camfen	-	0.18	-	-	-	-	-	-	-
3.	β-Felandren	5.35	8.31	3.16	0.72	12.95	6.8	11.43		
4.	β -Pinen	1.39	2	0.9	1.89	0.19	0.12	0.26		
5.	Ocimen	0.33	-	0.73	0.05	0.07	-	-		
6.	3-Caren	2.83	2.81	3.08	0.62	0.24	0.11	0.05		
7.	T-Terpinen	-	-	-	-	-	-	-		
8.	Limonen	1.93	2.17	1.48	0.73	0.64	0.36	0.53		
9.	cis- β -Terpineol	-	0.73	0.38	0.2	0.76	0.3	0.14		
10.	Terpinolen	-	0.35	-	0.18	0.29	0.14	0.23		
11.	Linalool	-	-	-	-	0.12	0.07	0.05		
12.	cis-Verbenol	0.51	1	0.94	0.2	-	-	-		
13.	Bisabolen epoxid	3.18	-	1.76	0.22	-	-	-		
14.	Carveol	-	-	0.18	-	0.13	0.06	0.09		
15.	D-Verbenonă	0.44	0.32	0.4	0.09	-	-	-		
16.	Germaeren D	-	1.42	-	1.6	7.04	6.5	5.96		
17.	Cedren	-	0.96	0.65	0.08	0.03	0.05	-		
18.	Copaen	0.81	0.74	0.79	0.37	-	-	-		
19.	β -Elemen	-	0.85	-	0.83	0.25	0.27	0.28		
20.	Cariofilen	7.19	6.32	7.13	3	1.86	1.6	1.34		
21.	α -Humulen	4.43	4.09	4.53	1.89	0.18	0.16	0.12		
22.	β -Cubeben	6.9	7.98	6.84	3.98	-	-	-		
23.	T-Cadinen	1.88	2.54	1.87	0.28	0.18	0.16	0.13		
24.	β -Cadinen	3.91	3.41	3.93	0.69	0.32	0.27	0.23		
25.	T-Elemen	0.51	2.85	0.49	1.69	0.27	0.32	0.2		
26.	Spatulenol	-	0.61	-	0.16	-	-	-		
27.	T-Cadinol	-	-	-	-	-	-	-		
28.	P-cimen	-	-	-	-	-	-	-		

Tabelul 3.8. Identificarea componentelor din extractele pseudobacelor de *Juniperus* obținute prin extracția asistată de ultrasunete (% din aria totală)

Nr. Crt.	Componente	JUNIPERUS COMMUNIS												JUNIPERUS VIRGINIANA											
		A L B A C						M A C C E A						M A C C E A						M A C C E A					
		Pseudobace mature (2008)		Pseudobace verzi (2008)		Pseudobace mature (2009)		Pseudobace verzi (2009)		Pseudobace mature (2008)		Pseudobace verzi (2008)		Pseudobace mature (2009)		Pseudobace verzi (2009)		Pseudobace mature (2008)		Pseudobace verzi (2008)		Pseudobace mature (2009)		Pseudobace verzi (2009)	
CLF	H	EA	T	CLF	H	EA	T	CLF	H	EA	T	CLF	H	EA	T	CLF	H	EA	T	CLF	H	EA	T		
1.	α-Pinen	14.77	6.86	11.95	11.74	14.43	13.91	15.06	12.44	27.97	22.21	22.79	22.78	19.16	17.50	19.37	13.13	1.45	1.6	-	-	-	-	2	
2.	Camfen	0.1	0.05	0.1	0.08	0.13	0.12	0.04	0.03	0.18	0.13	0.12	0.15	0.02	0.13	0.14	0.10	-	0.04	-	-	-	-	-	
3.	β-Felandren	14.11	6.46	12.4	12	11.90	11.52	12.76	10.99	10.49	11.20	11.22	10.14	18.72	17.52	17.71	14.18	27.4	35.05	25.47	41.71	-	-	-	
4.	β-Pinen	18.04	9.02	17.62	16.51	13.40	13.01	12.26	13.23	1.28	1.14	8.51	9.73	9.92	9.06	9.65	6.94	2.02	2.67	1.82	-	-	-	-	
5.	α-Pinen	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6.	3-Caren	0.99	0.42	0.89	0.84	0.56	0.52	-	0.44	0.04	-	-	-	0.04	-	0.06	0.01	-	-	-	-	-	-	-	
7.	γ-Terpinen	0.3	0.18	0.29	0.32	-	0.17	0.21	-	0.19	0.21	0.20	0.22	0.32	0.32	0.34	0.37	-	-	-	-	-	-	-	
8.	Limonen	1.92	0.89	1.86	1.72	1.59	1.50	1.52	1.53	2.38	2.57	2.36	2.59	2.86	2.80	2.28	0.63	0.81	0.59	1	-	-	-	-	
9.	cis-β-Terpineol	0.89	0.8	0.78	0.39	0.38	0.33	0.37	0.33	0.33	0.39	0.32	0.31	0.49	0.56	0.49	0.65	0.19	0.32	0.71	0.84	-	-	-	
10.	Terpinolen	0.68	0.51	0.67	0.61	0.49	0.61	0.58	0.47	0.70	0.99	0.77	0.76	0.07	1.08	0.98	0.63	0.23	0.4	0.22	0.26	-	-	-	
11.	Linalool	0.08	0.08	0.07	0.07	0.04	0.04	0.05	0.04	0.09	0.07	0.05	0.06	0.10	0.13	0.08	0.12	0.04	0.04	0.06	-	-	-	-	
12.	cis-Verbenol	0.08	0.07	0.26	0.67	-	0.03	0.02	-	0.06	-	0.02	-	0.10	0.06	0.13	0.10	-	-	-	-	-	-	-	
13.	Bisabolol epoxid	0.03	0.17	0.26	0.67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
14.	Carveol	0.13	0.04	0.02	0.11	0.06	-	-	0.02	-	0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
15.	Germacren D	4.75	7.36	4.93	4.29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16.	Germacren D	0.25	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17.	Copaen	0.57	-	0.42	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	0.38	0.42	0.29	0.22	0.27	0.24	0.25	-	-	-	-	
18.	β-Elemen	4.17	3.57	2.52	2.09	3.37	0.27	3.41	3.38	-	3.30	2.75	-	1.99	0.21	4.34	2.36	0.14	0.22	0.17	0.2	-	-	-	
19.	Carlofilen	3.91	4.82	4.14	3.42	5.71	5.82	5.29	4.70	1.97	2.94	2.66	1.59	3.96	4.49	-	4.19	1.26	2.02	1.76	2.03	-	-	-	
20.	α-Humulen	2.49	3.73	2.87	2.36	4.08	4.13	3.82	3.36	1.78	2.48	2.20	1.47	2.82	3.20	3.06	3.05	0.09	0.17	0.14	0.16	-	-	-	
21.	β-Cubeben	10.06	15.21	10.46	9.34	10.35	10.57	9.97	8.48	11.47	13.74	11.00	9.31	7.31	9.23	8.38	7.68	1.3	1.89	2.04	1.9	-	-	-	
22.	T-Cadinen	0.37	0.28	0.22	-	-	0.24	0.18	0.15	-	0.15	0.13	-	0.11	0.12	0.10	0.12	-	-	-	-	-	-	-	
23.	β-Cadinen	0.41	-	0.46	0.57	0.53	0.55	0.46	0.44	0.87	1.13	0.88	0.77	0.55	0.55	0.60	0.65	-	-	-	-	-	-	-	
24.	T-Elemen	4.73	15.88	9.27	8.05	6.08	7.01	6.51	5.28	1.49	-	1.67	-	3.21	1.65	3.49	-	0.14	0.73	0.49	0.68	-	-	-	
25.	Spatulenol	0.4	0.49	0.46	0.39	0.56	0.49	0.50	0.47	0.33	0.37	0.31	0.25	0.48	0.38	0.42	0.55	0.15	0.23	-	-	-	-	-	
26.	T-Cadinol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
27.	D-Verbenonă	0.02	-	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
28.	p-cimen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tabelul 3.9. Identificarea componentelor din extractele microblastelor de *Juniperus* obținute prin extracția asistată de ultrasunete (% din aria totală)

Nr. Crt.	Componente	JUNIPERUS COMMUNIS												JUNIPERUS VIRGINIANA							
		AUSTRIA			LIPOVA			ALBA C (2008)			ALBA C (2009)			MACEA		EA		T			
		CLF	H	EA	T	CLF	H	EA	T	CLF	H	EA	T	CLF	H	EA	T	CLF	H	EA	T
1.	α-Pinen	15.89	19.4	23.35	12.6	29.9	34.81	27.99	19.04	35.71	32.29	26.7	12.3	9.29	11.11	11.16	5.97	25.8	32.74	23.64	18.23
2.	Camfen	0.1	-	-	0.08	0.27	0.29	0.23	0.16	0.23	0.2	-	0.06	-	-	-	0.05	0.14	0.19	-	0.18
3.	β-Felandren	12.56	15.51	19.31	10.88	19.68	23.67	17.85	14.26	5.87	5.05	4.71	1.8	14.23	13.24	14.36	6.98	9.47	6.65	9.32	6.02
4.	β-Pinen	0.84	1.16	1.7	0.9	2.39	2.52	2.9	1.83	1.1	1.38	2.47	1.13	0.61	0.51	0.48	0.35	0.81	0.99	1.01	0.65
5.	Ocimen	-	-	-	-	-	-	-	-	0.04	-	-	0.72	0.03	-	-	-	-	-	-	0.03
6.	3-Caren	1.18	1.51	1.79	1.06	0.2	0.21	0.18	-	0.26	-	-	-	0.78	0.95	1.05	0.56	2.48	-	2.23	1.69
7.	γ-Terpinen	-	-	0.26	-	0.46	0.36	0.6	0.32	-	0.36	-	0.36	-	0.46	0.35	-	0.46	-	-	0.13
8.	Limonen	1.23	1.7	1.88	-	3.45	4.22	3.07	2.38	7.44	6.19	5.05	2.02	0.84	0.70	0.72	0.43	-	0.55	0.57	0.44
9.	cis-β-Terpineol	0.39	0.59	1.44	-	1.83	0.99	1.72	0.5	0.06	0.11	0.11	-	1.52	1.60	1.54	0.73	0.33	0.52	0.68	-
10.	Terpinolen	-	-	0.16	1.15	0.49	0.55	0.59	0.39	0.36	0.4	0.33	0.11	-	-	-	0.34	0.21	0.33	0.26	0.15
11.	Linalool	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.73	0.8	0.74	0.54
12.	cis-Verbenol	0.32	1.06	1.83	0.38	1.78	1.83	1.25	0.49	0.07	0.11	0.09	-	0.61	0.47	0.53	0.20	0.05	-	0.06	-
13.	Bisabolen epoxid	-	-	-	-	0.43	0.11	0.37	-	0.16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14.	Carveol	-	-	-	0.04	0.52	0.43	0.35	0.16	-	-	0.03	0.04	-	-	-	-	-	-	-	-
15.	D-Verbenonă	0.14	0.41	0.28	0.22	0.34	0.34	0.53	0.32	0.08	0.08	0.1	0.04	-	-	-	-	-	-	-	-
16.	Germaçren D	2.38	3.8	3.14	1.37	0.64	0.39	0.59	0.41	8.67	11.09	14.42	2.79	-	4.29	-	-	2.92	3.45	2.97	1.55
17.	Cedren	-	0.16	-	-	-	0.18	0.13	-	-	-	-	0.14	-	-	-	0.53	-	-	-	0.04
18.	Copaen	-	-	0.22	-	-	-	-	-	0.14	0.17	0.11	0.05	-	-	-	0.93	-	-	-	-
19.	β-Elemen	0.75	1.22	1.07	0.3	0.53	0.38	0.67	0.39	3.56	4.85	3.85	1.05	-	1.34	0.93	0.46	0.15	0.19	0.16	-
20.	Cariofilen	0.46	0.84	0.8	0.28	0.22	0.24	0.23	0.15	0.84	1.25	1.88	0.25	1.03	1.31	0.90	0.42	3.92	2.91	3.2	2.38
21.	α-Humulen	0.43	0.81	0.71	0.24	0.48	0.14	0.4	0.05	0.75	1.07	1.49	0.21	0.78	0.91	0.60	0.29	0.39	0.3	0.33	0.2
22.	β-Cubeben	0.59	0.93	0.57	-	1.59	0.93	1.79	1.4	3.46	4.53	-	0.97	3.50	-	-	3.01	1.46	-	-	-
23.	γ-Cadinen	0.26	0.44	0.45	-	-	-	-	-	1.46	2.15	1.13	0.36	-	-	-	-	-	-	-	-
24.	β-Cadinen	0.47	0.82	0.74	-	-	-	-	-	3.05	3.87	2.72	0.84	-	-	-	-	0.22	-	-	-
25.	γ-Elemen	0.14	1.37	1.07	-	1.26	1.12	0.97	0.48	0.77	2.03	4.25	0.71	0.41	2.64	0.55	0.70	-	-	-	-
26.	Spatulenol	0.35	0.45	0.65	0.2	0.41	0.66	0.38	0.21	0.44	0.53	0.48	0.16	1.53	1.60	1.52	0.78	-	-	-	-
27.	γ-Cadinol	-	-	-	-	0.11	-	-	-	1.72	0.95	2.5	0.31	-	-	-	-	0.07	-	-	-
28.	p-cimen	0.70	0.89	1.15	0.60	0.41	5.47	-	2.91	1.35	1.05	0.92	0.45	1.57	1.64	2.00	1.02	0.18	-	-	-

THF – tetrahidrofuran, CLF – cloroform, H – hexan, EA – acetat de etil, T – toluen

Rezultatele obținute din analiza GC-MS indică un conținut ridicat de α -pinen, β -felandren și β -cubeben. Prin compararea celor două metode de extracție – refluxare și ultrasonare – se observă că în cazul frunzelor aciculare (figura 3.3), pseudobacelor (figura 3.4), α -pinen-ul s-a extras mai bine prin ultrasonare, în schimb în cazul microblastelor situația este invers (figura 3.5).

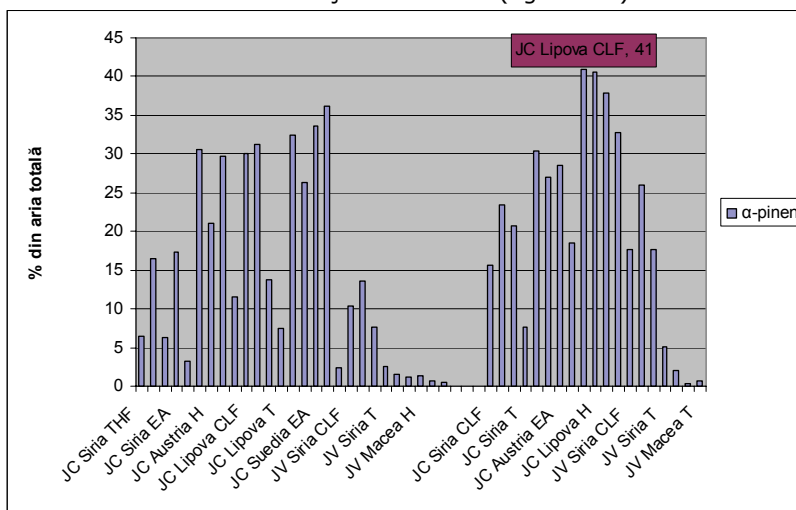


Figura 3.3. - α -Pinenul din frunzele aciculare de *Juniperus communis* (JC) și *Juniperus virginiana* (JV) obținute prin refluxare (stânga) și prin ultrasonare (dreapta) (THF-tetrahidrofuran, EA-acetat de etil, H-hexan, CLF-cloroform, T-toluen)

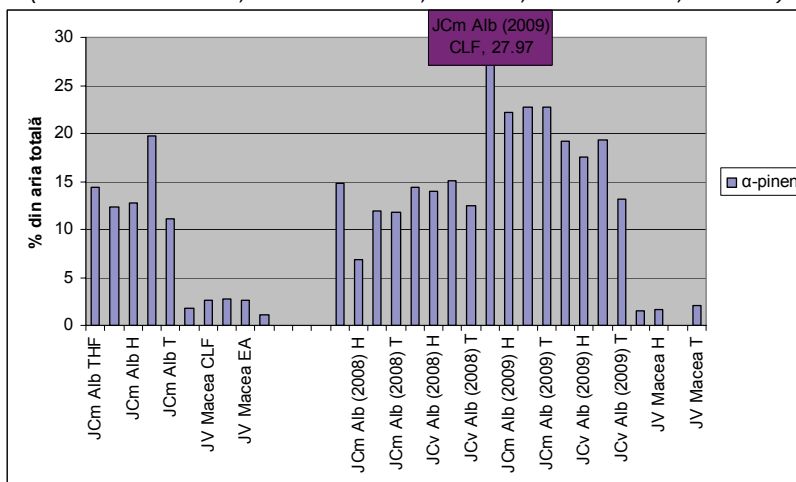


Figura 3.4. - α -Pinenul din pseudobace mature (JCm), pseudobace verzi (JCv) de *Juniperus communis* și pseudobace mature de *Juniperus virginiana* (JV) obținute prin refluxare (stânga) și prin ultrasonare (dreapta) (Alb-Albac, THF-tetrahidrofuran, EA-acetat de etil, H-hexan, CLF-cloroform, T-toluen)

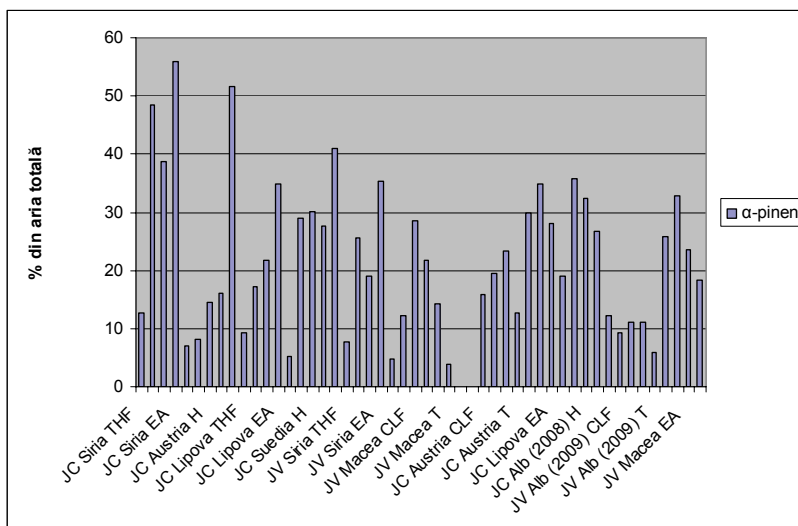


Figura 3.5. - α -Pinenul din microblaste de *Juniperus communis* (JC) și *Juniperus virginiana* (JV) obținute prin refluxare (stânga) și prin ultrasonare (dreapta) (Alb-Albac, THF-tetrahidrofuran, EA-acetat de etil, H-hexan, CLF-cloroform, T-toluen)

În cazul frunzelor aciculare (figura 3.6) și a microblastelor (figura 3.7), cel mai mare conținut în β -felandren îl prezintă extractele de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana* obținute prin ultrasonare. β -Felandrenul, din pseudobace (figura 3.8) s-a extras aproximativ la fel, atât prin refluxare cât și prin ultrasonare.

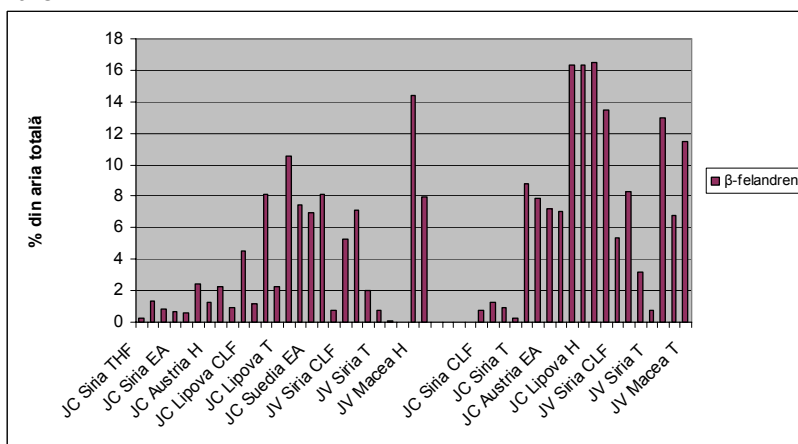


Figura 3.6. - β -Felandrenul din frunze aciculare de *Juniperus communis* (JC) și *Juniperus virginiana* (JV) obținute prin refluxare (stânga) și prin ultrasonare (dreapta) (THF-tetrahidrofuran, EA-acetat de etil, H-hexan, CLF-cloroform, T-toluen)

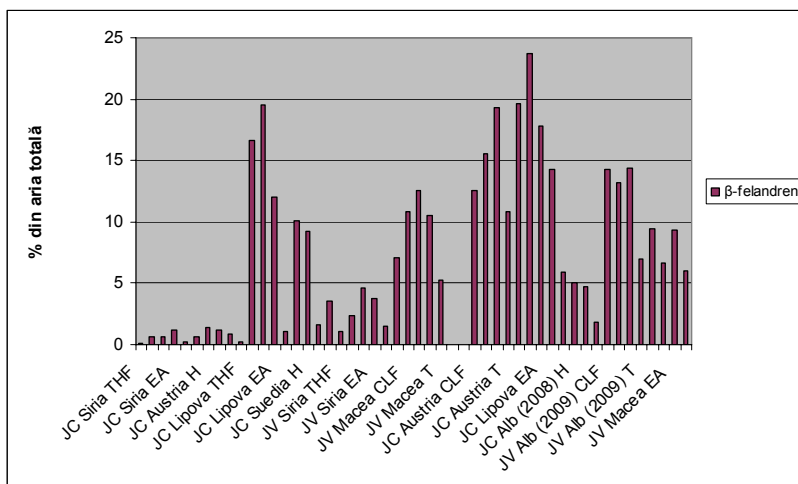


Figura 3.7. - β -Felandrenul din microblaste de *Juniperus communis* (JC) și *Juniperus virginiana* (JV) obținute prin refluxare (stânga) și prin ultrasonare (dreapta) (Alb-Albac, THF-tetrahidrofuran, EA-acetat de etil, H-hexan, CLF-cloroform, T-toluen)

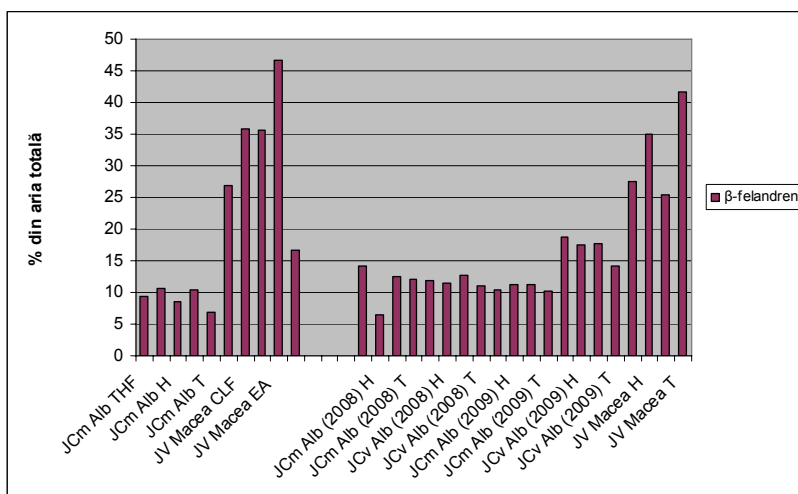


Figura 3.8. - β -Felandrenul din pseudobace mature (JcM), pseudobace verzi (JcV) de *Juniperus communis* și pseudobace mature de *Juniperus virginiana* (JV) obținute prin refluxare (stânga) și prin ultrasonare (dreapta) (Alb-Albac, THF-tetrahidrofuran, EA-acetat de etil, H-hexan, CLF-cloroform, T-toluen)

β -Cubebenul a fost extras relativ asemănător prin cele două metode de extracție în cazul frunzelor aciculare (figura 3.9), în schimb din pseudobace procentul cel mai mare este extras prin ultrasonare (figura 3.10), iar prin refluxare, cel mai mare procent s-a obținut din microblaste (figura 3.11).

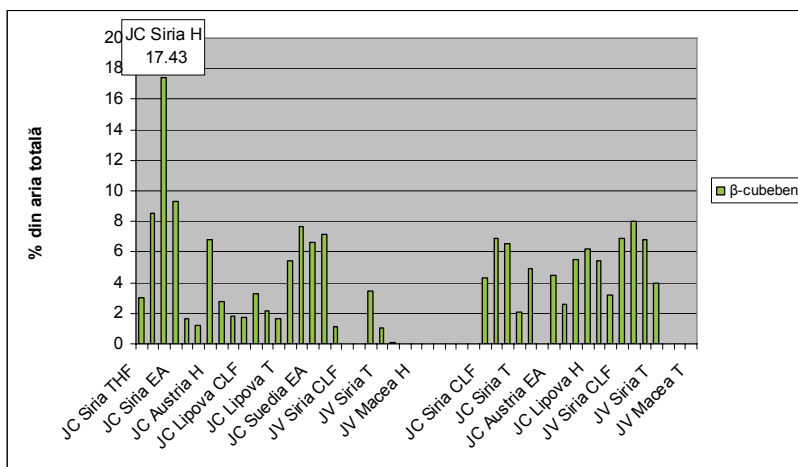


Figura 3.9. - β -Cubebenul din frunze aciculare de *Juniperus communis* (JC) și *Juniperus virginiana* (JV) obținute prin refluxare (stânga) și prin ultrasonare (dreapta) (THF-tetrahidrofuran, EA-acetat de etil, H-hexan, CLF-cloroform, T-toluen)

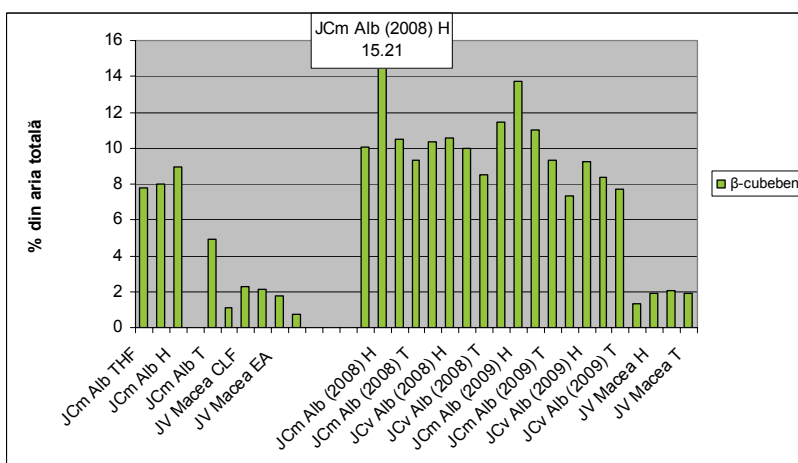


Figura 3.10. - β -Cubebenul din pseudobace mature (JcM), pseudobace verzi (JcV) de *Juniperus communis* și pseudobace mature de *Juniperus virginiana* (JV) obținute prin refluxare (stânga) și prin ultrasonare (dreapta) (Alb-Albac, THF-tetrahidrofuran, EA-acetat de etil, H-hexan, CLF-cloroform, T-toluen)

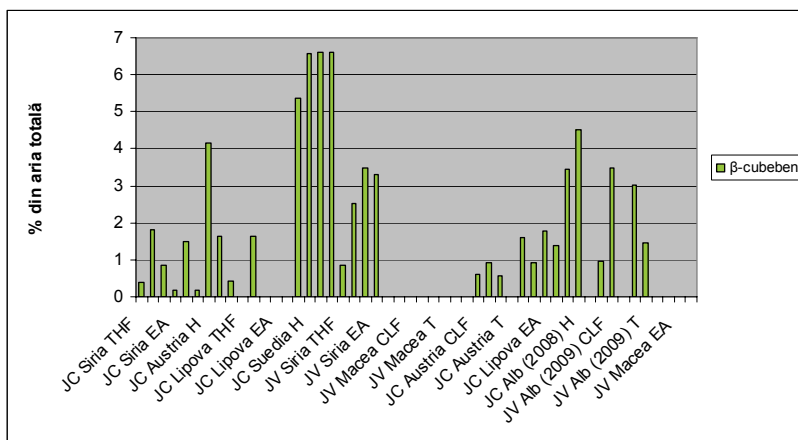


Figura 3.11. - β -Cubebenul din microblaste de *Juniperus communis* (JC) și *Juniperus virginiana* (JV) obținute prin refluxare (stânga) și prin ultrasonare (dreapta) (Alb-Albac, THF-tetrahidrofuran, EA-acetat de etil, H-hexan, CLF-cloroform, T-toluen)

Rezultatele obținute pentru limonen, indică obținerea celui mai mare procent prin refluxare, cum este cazul pseudobacelor (figura 3.12) și a microblastelor (figura 3.13), iar în cazul frunzelor aciculare (figura 3.14) pot fi folosite ambele metode de extracție.

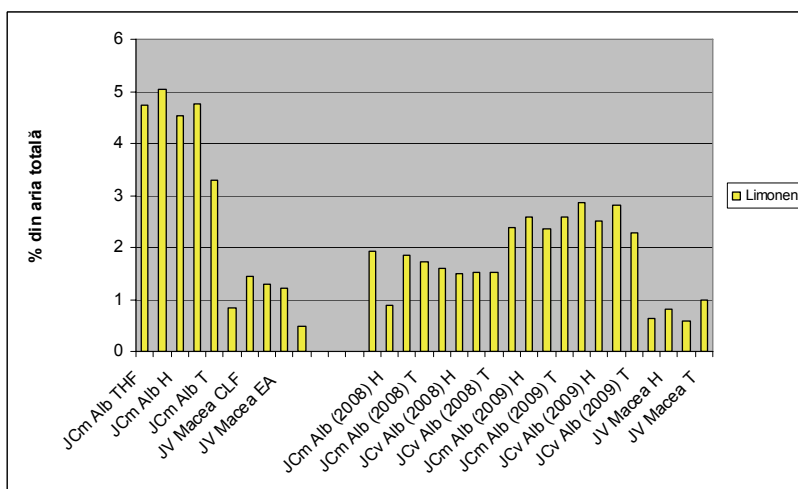


Figura 3.12. - Limonenul din pseudobace mature (JcM), pseudobace verzi (JcV) de *Juniperus communis* și pseudobace mature de *Juniperus virginiana* (JV) obținute prin refluxare (stânga) și prin ultrasonare (dreapta) (Alb-Albac, THF-tetrahidrofuran, EA-acetat de etil, H-hexan, CLF-cloroform, T-toluen)

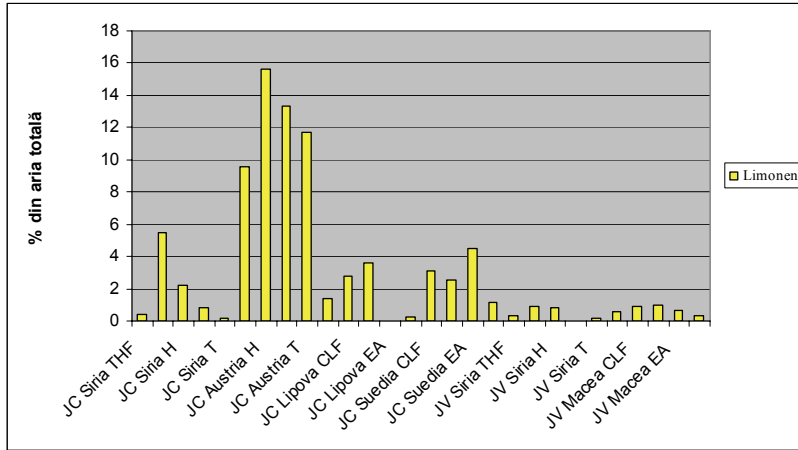


Figura 3.13. - Limonenul din microblaste de *Juniperus communis* (JC) și *Juniperus virginiana* (JV) obținute prin refluxare (stânga) și prin ultrasonare (dreapta) (Alb-Albac, THF-tetrahidrofuran, EA-acetat de etil, H-hexan, CLF-cloroform, T-toluen)

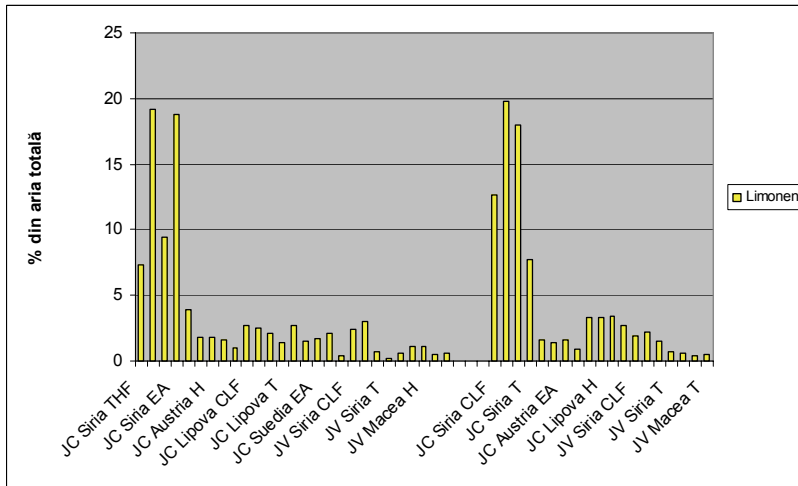


Figura 3.14. - Limonenul din frunze aciculare de *Juniperus communis* (JC) și *Juniperus virginiana* (JV) obținute prin refluxare (stânga) și prin ultrasonare (dreapta) (THF-tetrahidrofuran, EA-acetat de etil, H-hexan, CLF-cloroform, T-toluen)

Metoda de extracție asistată de ultrasunete este cea mai potrivită pentru a obține procente mari de cariofilen, indiferent de partea anatomică luată în considerare – frunze aciculare (figura 3.15), pseudobace (figura 3.16) și microblaste (figura 3.17).

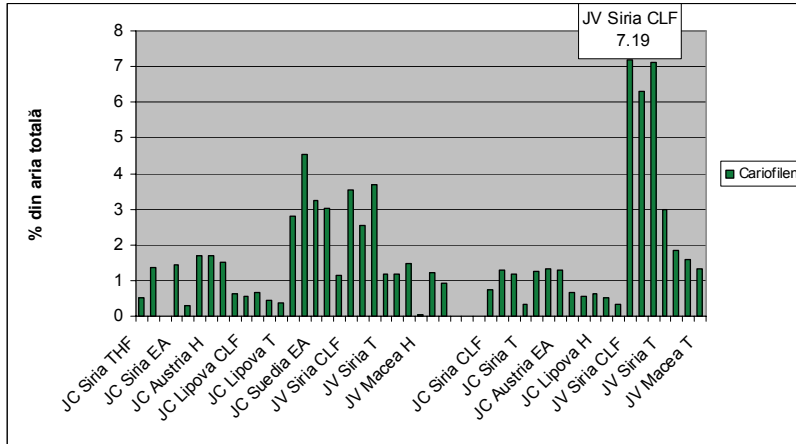


Figura 3.15. - Cariofilenul din frunze aciculare de *Juniperus communis* (JC) și *Juniperus virginiana* (JV) obținute prin refluxare (stânga) și prin ultrasonare (dreapta) (THF-tetrahidrofuran, EA-acetat de etil, H-hexan, CLF-cloroform, T-toluen)

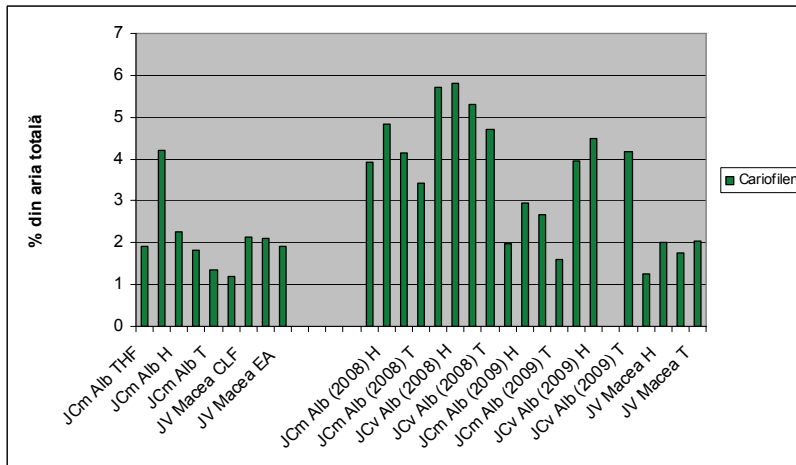


Figura 3.16. - Cariofilenul din pseudobace mature (JCm), pseudobace verzi (JCv) de *Juniperus communis* și pseudobace mature de *Juniperus virginiana* (JV) obținute prin refluxare (stânga) și prin ultrasonare (dreapta) (Alb-Albac, THF-tetrahidrofuran, EA-acetat de etil, H-hexan, CLF-cloroform, T-toluen)

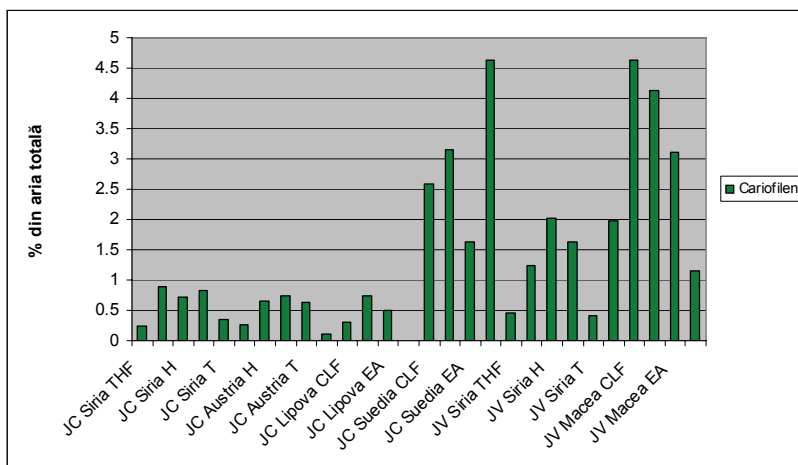


Figura 3.17. - Cariofilenul din microblaste de *Juniperus communis* (JC) și *Juniperus virginiana* (JV) obținute prin refluxare (stânga) și prin ultrasonare (dreapta) (Alb-Albac, THF-tetrahidrofuran, EA-acetat de etil, H-hexan, CLF-cloroform, T-toluen)

III.1.3. Caracterizarea extractelor obținute prin hidrodistilare

Compușii principali, din uleiul volatil obținut prin hidrodistilare din pseudobace de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*, sunt α -pinenul, β -cubebenul și β -felandrenul (figura 3.18.). Variația conținutului de α -pinen respectiv β -cubeben din același tip de material vegetal, cules din aceeași regiune se poate datora condițiilor de mediu din anul respectiv.

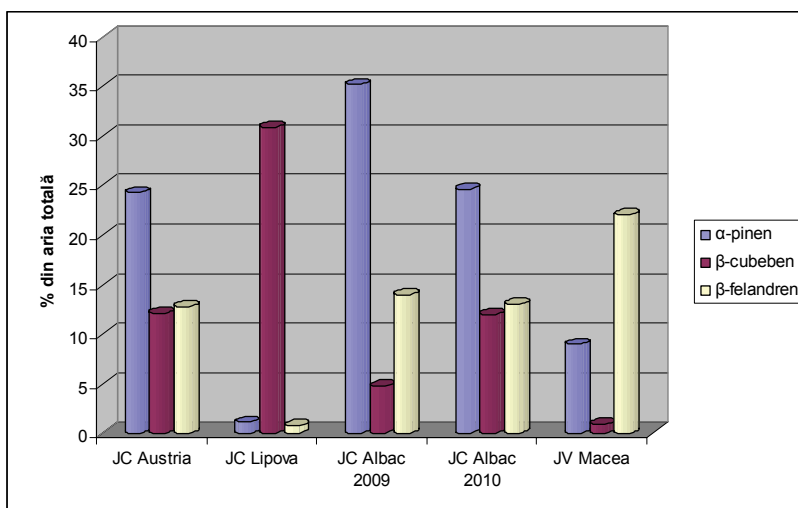


Figura 3.18. - Compușii principali ai uleiurilor volatile de *Juniperus communis* (JC) și *Juniperus virginiana* (JV)

Tabelul 3.10. Identificarea componentelor din extractele pseudobacilor de *Juniperus* obținute prin hidrodistilare (% din aria totală), timpul de retenție și indicii Kovats

Nr. Crt.	Componente	RI	KI	JUNIPERUS COMMUNIS				JUNIPERUS VIRGINIANA	
				AUSTRIA	L IPOVA	ALBA C 2009	ALBA C 2010	MA	CEA
1.	α-Pinen	5.693	935.2	24.26	1.13	35.16	24.6	8.96	
2.	Camfen	6.257	957.2	0.17	-	0.26	0.17	0.08	
3.	β-Felandren	6.798	977.2	12.76	0.78	13.96	13.02	22.06	
4.	β-Pinen	7.033	985.7	1.35	0.25	13.53	1.37	4.96	
5.	Ocimen	7.309	995.4	-	-	-	-	-	
6.	3-Caren	7.556	1003.9	-	-	-	-	0.22	
7.	1-Terpinen	7.607	1005.7	-	-	-	-	-	
8.	Limonen	8.096	1022.2	1.83	0.66	6.25	1.91	3.88	
9.	cis-β-Terpineol	9.564	1069.4	-	0.04	-	-	-	
10.	Terpinolen	9.735	1074.7	1.25	0.53	0.99	1.26	-	
11.	Linalool	10.194	1088.9	-	-	0.05	-	-	
12.	cis-Verbenol	11.034	1114.5	-	-	-	-	0.2	
13.	Bisabolen epoxid	12.17	1148.6	-	-	-	-	-	
14.	Carveol	13.989	1202.8	-	-	-	-	0.63	
15.	D-Verbenonă	14.489	1217.8	-	-	-	-	-	
16.	Germaeren D	15.517	1248.6	-	-	-	-	-	
17.	Cedren	15.898	1260.1	-	0.05	-	0.03	-	
18.	Copaen	16.005	1263.4	0.39	0.53	0.19	0.41	0.39	
19.	β-Elementen	16.486	1278	3.09	7.36	1.45	3.05	1.16	
20.	Cariofilen	17.767	1317.2	2.25	4.13	-	2.23	0.45	
21.	α-Humulen	18.284	1333.1	2.14	4.33	1.29	2.16	1	
22.	β-Cubeben	18.895	1352.2	12.1	30.85	4.78	11.96	0.92	
23.	T-Cadinen	19.659	1376.2	0.53	0.95	0.3	0.53	0.58	
24.	β-Cadinen	19.765	1379.5	2.92	4.43	1.34	2.85	0.79	
25.	T-Elementen	20.846	1414	3.89	7.48	1.7	3.78	0.85	
26.	Spatulenol	21.667	1440.5	0.75	1.21	0.59	0.76	1.43	
27.	T-Cadinol	22.785	1477.2	0.56	0.58	-	0.54	0.69	

Concluzii

Rezultatele obținute la extracția prin refluxare sau cu ultrasunete a compușilor volatili din diferite părți anatomice ale speciilor de *Juniperus communis* și *Juniperus virginiana* sunt următoarele:

- cel mai bun solvent pentru extracția asistată de ultrasunete a fost hexanul, iar pentru refluxare a fost acetatul de etil.
- pseudobacele conțin un procent mai mare de compuși volatili în comparație cu frunzele aciculare și microblastele celor două specii analizate.
- α -pinenul a fost un compus majoritar al extractelor (max. 55,98% în extractul hexanic obținut prin refluxare din microblaste de *Juniperus communis*, Siria).
- cel mai mare procent în β -pinen (18,04%) s-a regăsit în extractul cloroformic din pseudobace mature de *Juniperus communis* (Albac, 2008).
- limonenul (19,22%) s-a regăsit în extractul în cloroform obținut prin refluxare din frunzele aciculare de *Juniperus communis* (Siria).

Rezultatele obținute au făcut obiectul unei lucrări științifice [179, 180].

- extractul hexanic obținut prin refluxare din frunze aciculare de *Juniperus communis* (Siria) a prezentat cel mai mare procent de β -cubeben (17,43%);
 - procentul cel mai mare de β -felandren a fost în extractele obținute prin refluxare din pseudobace de *Juniperus virginiana* (Macea) în cloroform și acetat de etil (35,89-46,64%).
 - utilizarea băii de ultrasunete pentru identificarea compușilor volatili din cele două specii *Juniperus communis* și *Juniperus virginiana* poate fi o tehnică bună de extracție. Această metodă este destul de rapidă, nu este costisitoare și este ușor de întreținut.
 - prin compararea părților anatomice de *Juniperus communis* și *Juniperus virginiana* analizate, se poate afirma că cel mai mare conținut de cariofilen se află în pseudobace.
 - cariofilenul a fost extras mai bine de solvenții mai hidrofobi și anume de cloroform și hexan.
 - cineolul a fost prezent, cu preponderență, în extractele obținute prin refluxare și ultrasunete din cele trei părți anatomice de *Juniperus virginiana* (Macea).
 - în uleiul volatil obținut prin hidrodilare din pseudobace de *Juniperus communis* din diferite locații sunt, cu o excepție, α -pinenul și β -felandrenul.
 - a treia componentă remarcabilă ca prezență în uleiurile volatile este β -cubebenul. Procentul total al celor trei compuși ajungând la 42-50%.
- Rezultatele obținute au făcut obiectul a două lucrări științifice [181, 182].

III.1.4. Analiza componentelor principale pentru extractele în obținute prin refluxare și ultrasunete

Analiza statistică multivariată (PCA) a relevat faptul că, concentrațiile relative ale compușilor volatili extrași cu solvenți hidrofobi sunt importante pentru clasificarea probelor. Astfel, analiza PCA utilizând toate datele pentru concentrațiile relative ale principalilor compuși luați în considerare a condus la clasificarea probelor în funcție de specie, de partea anatomică, de solvent și de metoda de extracție. Variația datelor a fost 88%, care a fost explicată de primele trei componente principale (PC_1 52%, PC_2 28% și PC_3 8%); cele mai importante variabile independente pentru această clasificare au fost concentrația relativă pentru α -pinen

pentru clasificare după PC_1 și cea pentru β -felandren pentru clasificarea după PC_2 (figurile 3.19. și 3.20).

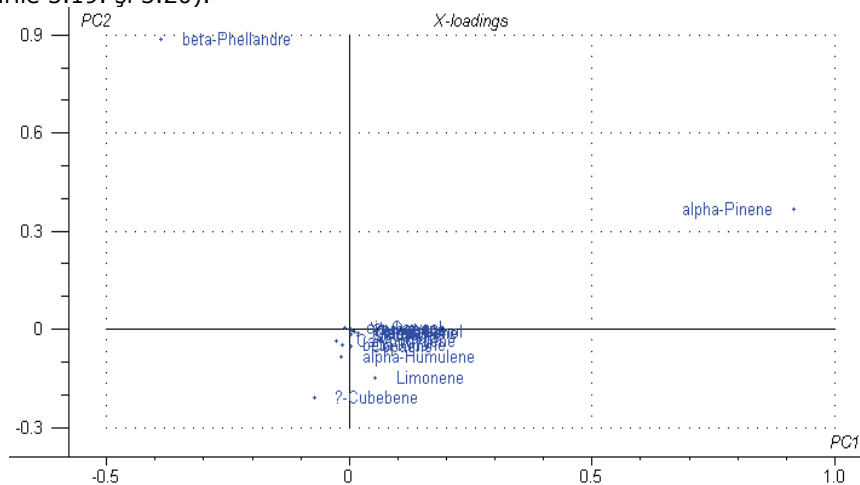


Figura 3.19. - Graficul înregistrărilor din analiza PCA a tuturor datelor GC ale compușilor principali din extractele de *Juniperus*

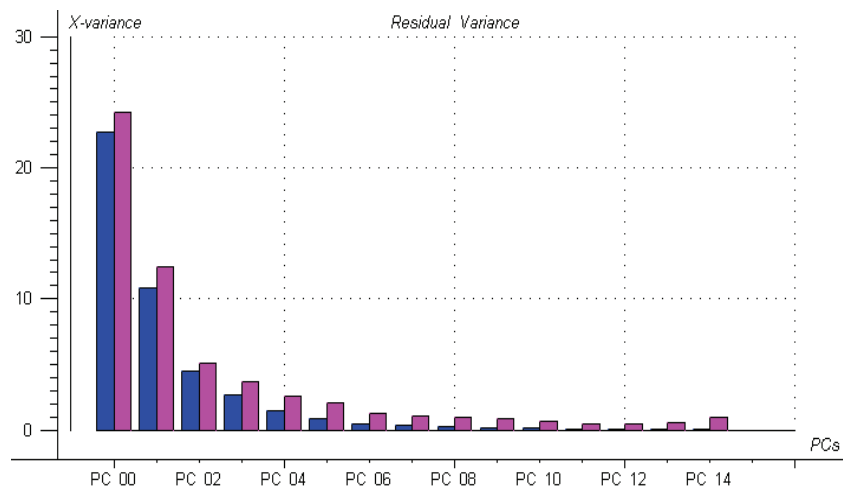


Figura 3.20. - Variația reziduală a PC-urilor din analiza PCA a tuturor datelor GC ale compușilor principali din extractele de *Juniperus*

Analiza PCA a datelor GC la utilizarea ca variabilă dependentă pentru clasificare, specia de *Juniperus* a indicat o grupare destul de bună a probelor în două grupe: *Juniperus communis* (C) și *Juniperus virginiana* (V); unele dintre probe sunt prezente în ambele clase. Aceste probe sunt foarte bine clasificate funcție de specia de *Juniperus* utilizată dacă se iau în calcul doar concentrațiile relative ale compușilor mai puțin concentrația (tuturor compușilor considerați, cu excepția α -pinenului și β -felandrenului). Cele mai multe probe sunt grupate în centrul graficului "scorurilor" (figura 3.21.), dar unele probe de *Juniperus communis* (cod "C") sunt situate în dreapta acestui grafic; câteva dintre probele de *Juniperus virginiana* (cod "V") se

grupează în stânga graficului. Cele mai importante variabile pentru această clasificare au fost concentrațiile de limonen, β -pinen și β -cubeben, iar varianța a fost explicată în proporție de 39% de PC_1 și 29% de PC_2 .

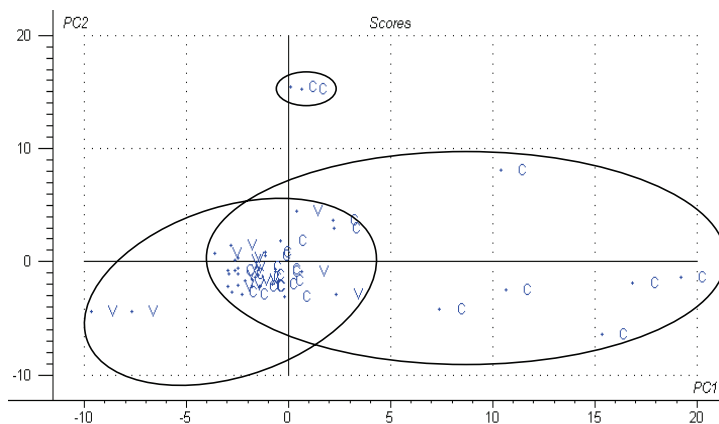


Figura 3.21. - Graficul "scorurilor" din analiza PCA a datelor GC pentru compușii principali (fără α -pinen și β -felandren) din extractele de *Juniperus* (variabilă dependentă - specia de *Juniperus*: C - communis, V - virginiana)

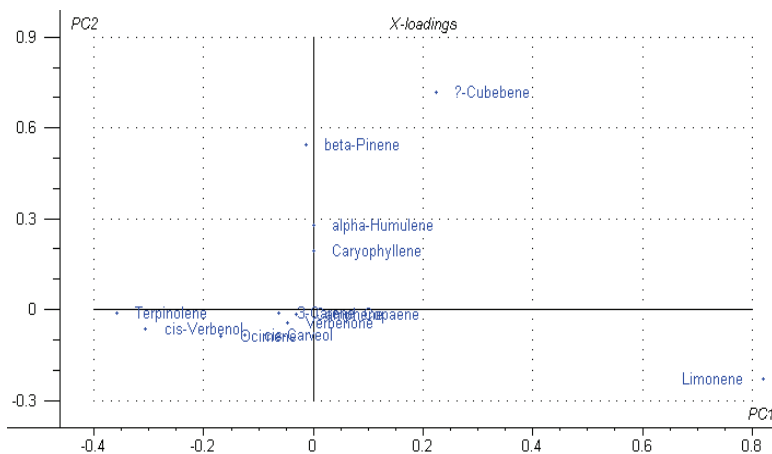


Figura 3.22. - Graficul "înregistrărilor" din analiza PCA a datelor GC pentru compușii principali (fără α -pinen și β -felandren) din extractele de *Juniperus* (variabilă dependentă: specia de *Juniperus*)

Încercarea de clasificare a acestor probe funcție de partea anatomică a plantei, de metoda de extracție sau de solventul utilizat pentru extracție nu a condus la rezultate semnificative; totuși, extracția prin ultrasonare este mai bine grupată decât extracția prin refluxare. Pe de altă parte, sursa de proveniență a probelor de *Juniperus* este o variabilă dependentă ce conduce la o clasificare mult mai bună dacă se utilizează în analiza multivariată doar datele GC de concentrații relative pentru compușii selectați din care s-au înlăturat compușii majoritari (α -

pinenul și β -felandrenul); probele de proveniență autohtonă sunt foarte bine grupate în centrul și în partea superioară a graficului "scorurilor" (figura 3.23), în timp ce probele din Siria și Austria se distribuie de-a lungul axei PC₁ mai puțin grupat.

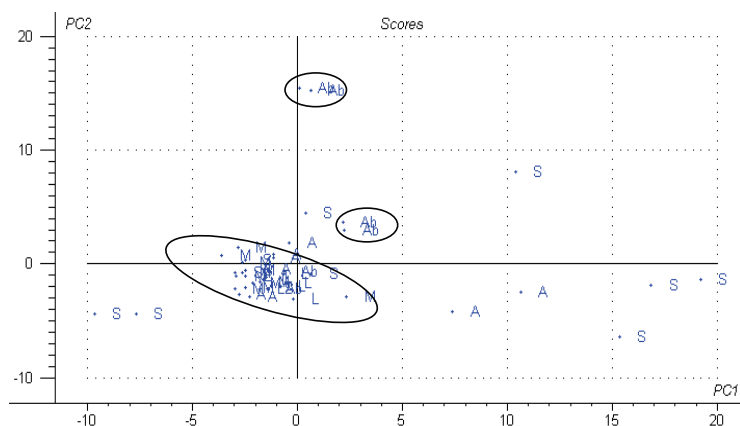


Figura 3.23. - Graficul "scorurilor" din analiza PCA a datelor GC pentru compușii principali (fără α -pinen și β -felandren) din extractele de *Juniperus* (variabilă dependentă – sursa de proveniență: M – Macea, Ab – Albac, L – Lipova, S – Siria, A – Austria)

Dacă se iau în considerare metodele de extracție utilizate, analiza PCA a permis o oarecare clasificare a probelor în special în partea stângă a graficului scorurilor pentru probele extrase prin ultrasonare, respectiv în centru-dreapta pentru probele extrase prin refluxare la cald. Varianța datelor a fost explicată în proporție de 69% de primele trei componente principale (figura 3.24.).

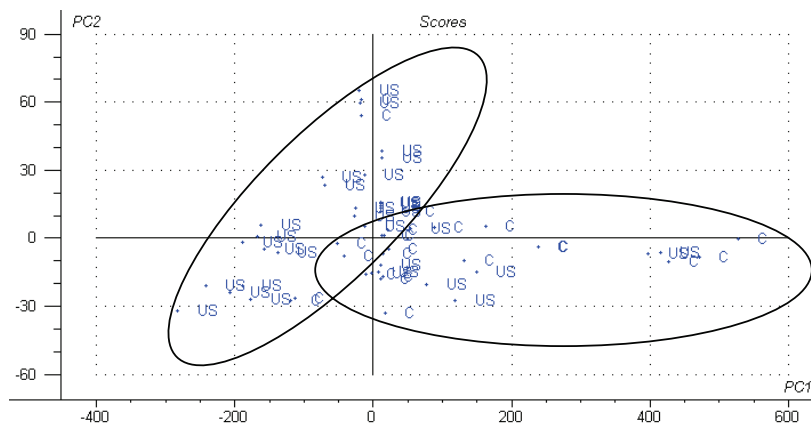


Figura 3.24. - Graficul scorurilor din analiza PCA a datelor GC pentru toate probele de *Juniperus*, la utilizarea ca variabilă de clasificare metoda de extracție (C – refluxare la cald, sau US – ultrasonare)

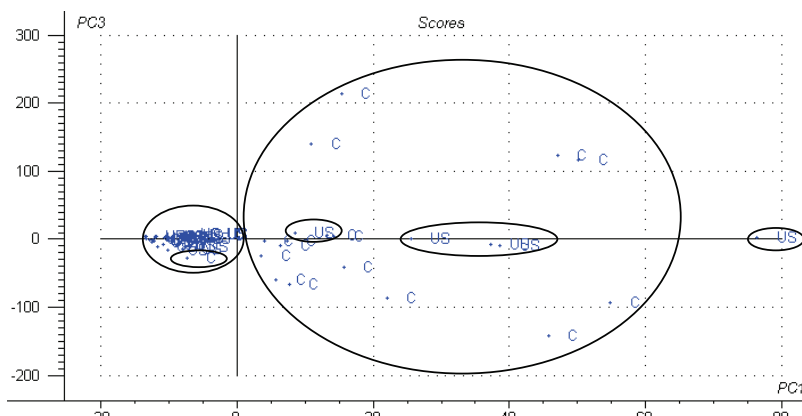


Figura 3.25. - Graficul scorurilor din analiza PCA a datelor GC pentru toate probele de *Juniperus*, la utilizarea ca variabilă de clasificare metoda de extracție (C – refluxare la cald, sau US – ultrasonare), după eliminarea datelor pentru componentele volatile mai importante (α -pinen, α -tuien, β -felandren, elemol)

S-a încercat efectuarea analizei multivariate cu datele GC din care s-au eliminat variabilele care reprezintă concentrațiile relative pentru compușii volatili mai importanți (α -pinen, α -tuien, β -felandren, elemol). S-a constatat o grupare foarte bună a probelor obținute prin ultrasonare în stânga graficului scorurilor (figura 3.25.), respectiv o distribuție mai mare a probelor obținute prin refluxare la cald în partea dreaptă, deși există câteva cazuri de intersectare a celor două grupuri. Varianța explicată a datelor este de 71% pentru primele trei componente principale (29% PC₁, 35% PC₂ și 7% PC₃).

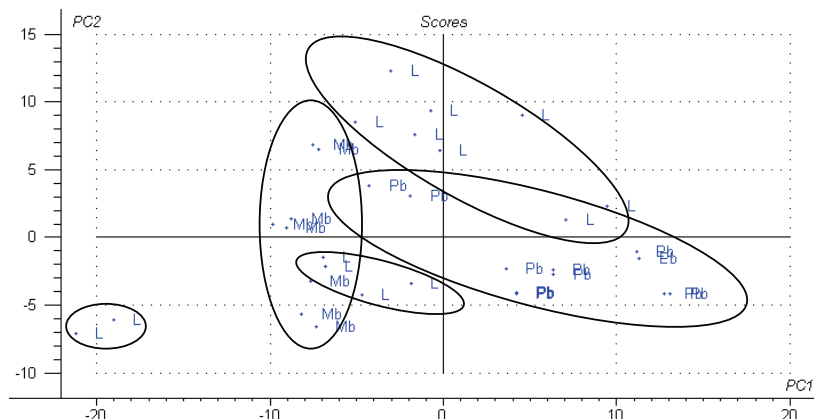


Figura 3.26. - Graficul scorurilor din analiza PCA a datelor GC pentru toate probele de *Juniperus* obținute prin ultrasonare, la utilizarea ca variabilă de clasificare partea de plantă (L – frunze aciculare, Pb – pseudobace, Mb – microblaste), după eliminarea datelor pentru componentele volatile mai importante (α -pinen, α -tuien, β -felandren, elemol)

Cele mai bune clasificări la analiza statistică multivariată a datelor GC pentru compușii volatili din speciile *Juniperus* studiate s-au obținut în cazul utilizării ca

variabile de clasificare partea de plantă, respectiv zona de recoltare. Astfel, în cazul extractelor efectuate prin ultrasonare din diverse părți de plantă s-a observat o grupare foarte bună în cazul probelor de microblaste (Mb) în partea stângă a graficului scorurilor și pentru probele de pseudobace (Pb) în partea centrală-dreapta la utilizarea datelor pentru compușii volatili de concentrații medii și scăzute (figura 3.26.). Variația datelor a fost explicată în proporție de 62% pentru primele trei componente principale și 73% pentru primele patru componente principale, responsabile pentru această clasificare fiind în special β -pinenul, β -cubebenul, limonenul, manoolul și germacren D-4-olul (figura 3.27.). O clasificare similară se obține în cazul utilizării regiunii de recoltare a probelor ca variabilă de clasificare, probele din România fiind situate în special în partea din centru-dreapta a graficului scorurilor la utilizarea aceluși date GC, în timp ce probele din Siria sunt plasate în cadranul stâng-inferior. Există o oarecare similaritate între probele din Austria și unele probe din Albac (cadranul stâng-superior), respectiv între probele din Siria și cele din Lipova. Majoritatea probelor de la Macea sunt similare probelor din Albac (partea dreaptă a graficului).

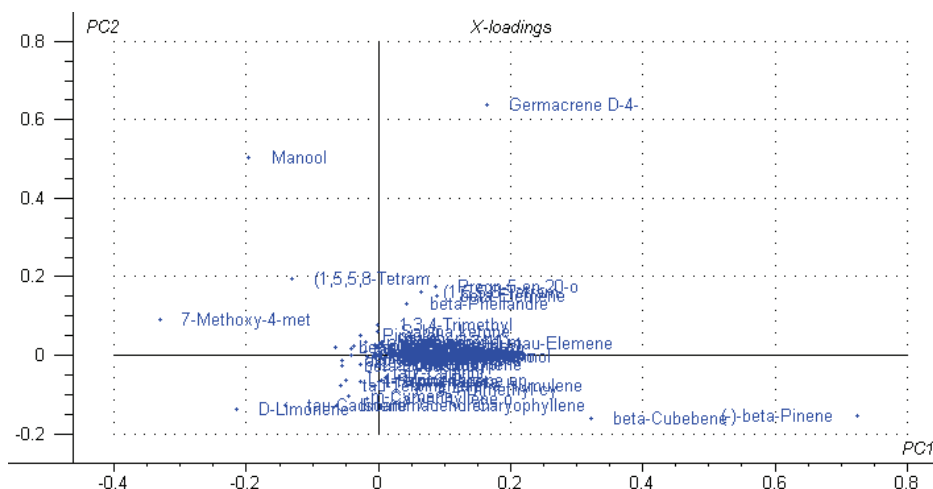


Figura 3.27. - Graficul înregistrărilor din analiza PCA a datelor GC pentru toate probele de *Juniperus* obținute prin ultrasonare, la utilizarea ca variabilă de clasificare partea de plantă (L – frunze aciculare, Pb – pseudobace, Mb – microblaste), după eliminarea datelor pentru componentele volatile mai importante (α -pinen, α -tuien, β -felandren, elemol)

Concluzii

În urma analizelor gaz cromatografice și statistice multivariate în cazul extractelor din specii *Juniperus* se pot trasa următoarele concluzii:

- principalii compuși identificați în toate probele de *Juniperus* sunt terpenoidele hidrocarbonate: monoterpene (cum sunt pinenii, felandrenul și limonenul) și sesquiterpenele (cubeben);
- cele mai multe probe de *Juniperus communis* și *Juniperus virginiana* se grupează bine în urma analizei statistice multivariate la utilizarea concentrațiilor procentuale relative ale terpenelor menționate; pinenul și limonenul au fost cele mai concentrate componente volatile în probele de *Juniperus communis*;

- probele autohtone obținute în acetat de etil și hexan (în special cele din Grădina Botanică "Macea", care sunt de cultură) de *Juniperus* se clasifică foarte bine utilizând concentrațiile celorlalți compuși volatili, mai puțin importanți decât monoterpenele din punct de vedere cantitativ, cum sunt sesquiterpenele cubeben, humulen, cariofilen și copaen;
- analiza statistică multivariată PCA a relevat faptul că utilizarea solvenților hidrofobi cloroform sau toluen pentru extracția compușilor volatili din probele studiate nu a condus la diferențieri semnificative între probe, majoritatea grupându-se în perechi corespunzătoare solvenților; această grupare duală poate fi explicată prin valorile apropiate ale logaritmului coeficientului de partiție octanol-apă ($\log P$): 1,97 pentru cloroform [183] și 2,69 pentru toluen [184];
- probele obținute prin ultrasonare (în cloroform și toluen) se clasifică mult mai bine atât la compararea cu probele obținute prin refluxare la cald, cât și la evaluarea similarității-disimilarității probelor funcție de specie, parte de plantă sau regiune de recoltare, cel mai probabil datorită unei extracții mai complete și reproductibile prin această metodă și chiar a posibilității degradării unor compuși la temperaturi mai ridicate în condițiile refluxării la cald (în special pentru toluen).

Rezultatele obținute au făcut obiectul a două lucrări științifice [164, 185].

III.1.5. Analiza compușilor volatili în extractele din cele trei părți anatomice de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*

III.1.5.1. Identificarea guaiazulenei și cineolului din uleiuri esențiale de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*

Randamentul de ulei esențial a fost ceva mai mare pentru *Juniperus virginiana* față de cele pentru *Juniperus communis*. Astfel, randamentele celor doi compuși din pseudobacele de *Juniperus virginiana* și *Juniperus communis* au fost 0,31 și 0,28%, în timp ce pentru frunze aciculare au fost mai mici (0,25 respectiv 0,22%).

S-a efectuat cromatografia calitativă în strat subțire (CSS) [186,187] pentru uleiurile esențiale obținute din *Juniperus virginiana* respectiv *Juniperus communis*, recoltate din partea de vest a României, pentru uleiurile esențiale din *Juniperus virginiana* comerciale din Austria, Germania și Serbia și pentru soluțiile standard de cineol și guaiazulenă (figura 2.6.). După dezvoltare cineolul poate fi observat în jumătatea inferioară, spot brun-violet ($R_f \sim 0,42$), iar guaiazulena poate fi identificată în zona superioară ca o zonă de culoare roșie ($R_f \sim 0,89$).

Compușii cheie care pot fi importanți pentru activitatea împotriva insectelor (de exemplu, împotriva moliiilor, *Tinea sarcitella*) sunt cineolul și guaiazulena. Pentru a stabili concentrația absolută a acestor compuși în uleiurile esențiale din speciile de *Juniperus*, au fost obținute curbele de etalonare GC-MS. Pentru standardul de cineol timpul de retenție a fost de 8,6 min, iar pentru standardul de guaiazulena timpul de retenție a fost 26,3 min. Ecuațiile drepte pentru acești compuși au fost:

Pentru cineol:

$$\text{Aria} [\text{Abundență} \times \text{min}] = 5 \times 10^7 \times \text{Concentrația} [\text{mg/mL}]$$

Pentru guaiazulenă:

$$\text{Aria} [\text{Abundență} \times \text{min}] = 3 \times 10^7 \times \text{Concentrația} [\text{mg/mL}]$$

Astfel pot fi calculate concentrațiile absolute a cineolului și guaiazulenei în uleiurile esențiale ale speciilor de *Juniperus* analizate. Concentrația absolută de

chineol (figura 3.28.) a fost mai mare în uleiurile esențiale din frunze aciculare (3,7 pentru *Juniperus virginiana* respectiv 3,5 $\mu\text{g/ml}$ pentru *Juniperus communis*), decât în uleiurile din pseudobace (0,5 $\mu\text{g/ml}$ pentru *Juniperus virginiana* și 2,6 $\mu\text{g/ml}$ pentru *Juniperus communis*).

Guaiazulena a fost, de asemenea, mai concentrată în probele de *Juniperus virginiana*, în special în uleiul esențial din frunze aciculare (0,7 $\mu\text{g/ml}$); în uleiul esențial corespunzător de *Juniperus communis*, concentrația acestui compus a fost 0,24 $\mu\text{g/mL}$.

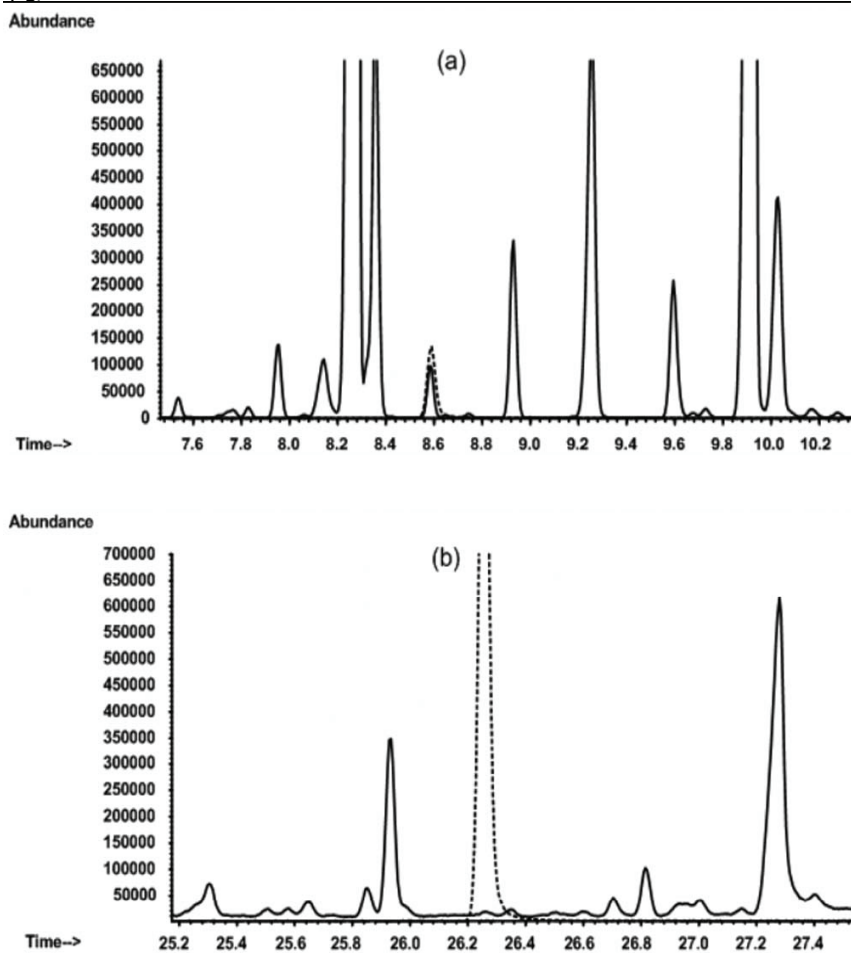


Figura 3. 28a și 3. 28b. - Cromatogramele GC-MS pentru uleiul din frunze aciculare de *Juniperus virginiana* și standardul de cineol (reprezentat punctat, a) și pentru uleiul de *Juniperus virginiana* și guaiazulena (reprezentată punctat, b)

Din cromatograma obținută pentru uleiurile esențiale de *Juniperus*, aceste spoturi sunt dificil de identificat din cauza concentrațiilor mai mari a altor compuși terpenoidici. Astfel, pentru uleiuri esențiale din pseudobacele și frunzele aciculare *Juniperus virginiana* autohtone (probele 3 respectiv 5, diluate cu hexan), spoturile

corespunzătoare cineolului și guaiazulenei sunt foarte mici și sunt acoperite de cantitățile mai mari de mono- și sesquiterpene (de exemplu, limonen), în jumătatea superioară a cromatogramei și de alcooli mono- și sesquiterpenici (de exemplu terpinen-4-ol), în jumătatea inferioară a cromatogramei.

Concluzii

Analiza prin cromatografia în strat subțire a probelor de uleiuri esențiale din *Juniperus*, a scos la iveală abundența monoterpenelor, sesquiterpenelor și alcoolilor corespunzători, ceea ce a făcut dificilă evaluarea prezenței cineolului și guaiazulenei în uleiurile esențiale din *Juniperus*.

Compușii de interes - cineolul și guaiazulena - au fost prezenți în concentrații absolute scăzute; primul a fost prezent în concentrație mai mare în uleiurile esențiale de *Juniperus communis* (2,6- 3,5 $\mu\text{g/mL}$) iar guaiazulena a fost identificată doar în uleiul esențial de *Juniperus virginiana* (0,7 $\mu\text{g/mL}$ în ulei esențial din frunze aciculare).

Rezultatele obținute au făcut obiectul unei lucrări științifice [188].

III.1.5.2. Identificarea unor compuși volatili prin gaz cromatografie cu detector de ionizare în flacără

Dacă analiza calitativă și semicantitativă a extractelor obținute cu ajutorul mini-reactorului asistat de ultrasunete s-a realizat prin cromatografiei GC-MS (Anexe, figurile A.26. - A.94.). În scopul exprimării cantitative a extractelor cloroformice s-a folosit analiza gaz cromatografică cu detector de ionizare în flacără și s-a realizat prin exprimarea concentrației în funcție de α -pinen și limonen. Media valorilor concentrației, celor doi compuși în extractele analizate, sunt prezentate în tabelul 3.11.

Tabelul 3.11. Concentrația în α -pinen și limonen din frunzele aciculare și pseudobacele de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*

Produs vegetal	Concentrația exprimată în funcție de α -pinen, $\mu\text{g/mL}$	Concentrația exprimată în funcție de limonen, $\mu\text{g/mL}$
Frunze aciculare <i>J. communis</i> Lipova	0.107	0.039
Frunze aciculare <i>J. communis</i> Macea	0.130	0.051
Frunze aciculare <i>J. virginiana</i> Macea	0.008	0.011
Pseudobace <i>J. virginiana</i> Macea	0.004	0.165

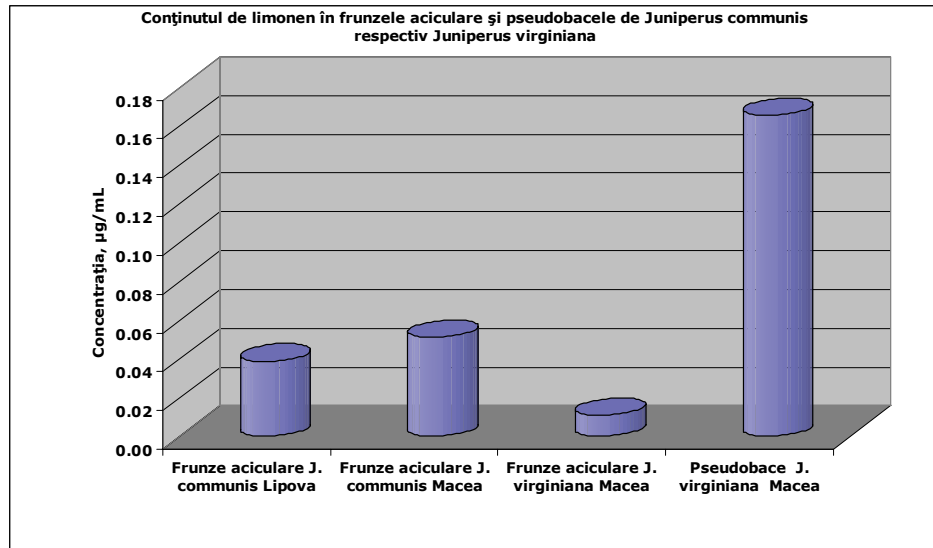


Figura 3.29. - Variația conținutului de limonen în frunzele aciculare și pseudobacele de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*

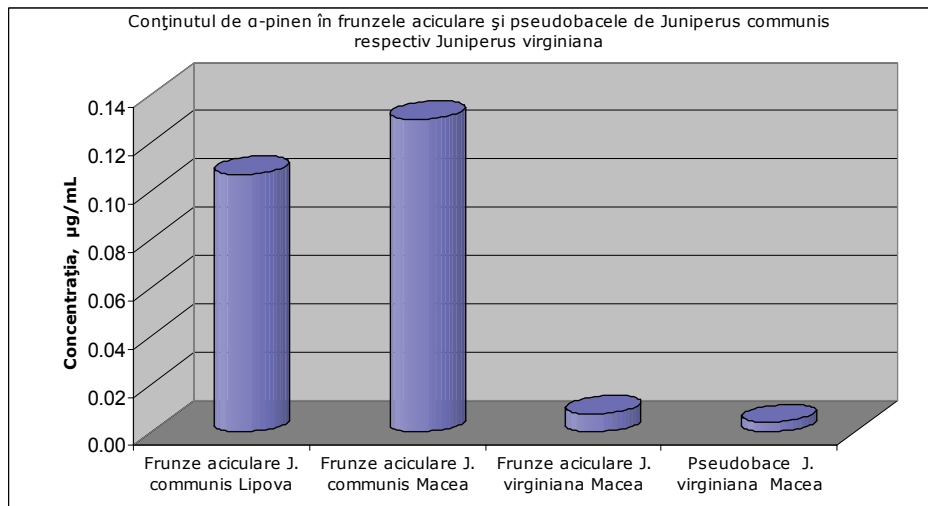


Figura 3.30. - Variația conținutului de α -pinen în frunzele aciculare și pseudobacele de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*

Rezultatele obținute experimental indică cel mai ridicat conținut de limonen în pseudobacele de *Juniperus virginiana*. Se observă că, în cazul pinenului cea mai mare cantitate se află în frunzele aciculare de *Juniperus communis* de la Macea urmate de cele de la Lipova. În ceea ce privește, frunzele aciculare de *Juniperus virginiana* de la Macea, acestea conțin o cantitate mică atât de limonen cât și de α -pinen.

III.1.5.3. Identificarea și dozarea terpenelor prin spectroscopie UV-VIS

În vederea realizării analizei cantitative a terpenelor în extractele alcoolice și hidrodistilatele din pseudobace de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*, s-au trasat spectrele UV-VIS ale extractelor (figurile A.95.- A.101.) și s-au comparat cu spectrele UV-VIS ale standardelor de *p*-cimen și limonen (figurile 3.31.-3.32.).

Rezultatele obținute pentru conținutul de compuși volatili raportat la partea anatomică de *Juniperus* folosită au condus la concluzia că pseudobacele conțin cel mai mare procent din acești compuși. Pentru dozarea unor terpeni prin spectroscopie UV-VIS am ales extractele alcoolice și uleiurile volatile obținute din pseudobace.

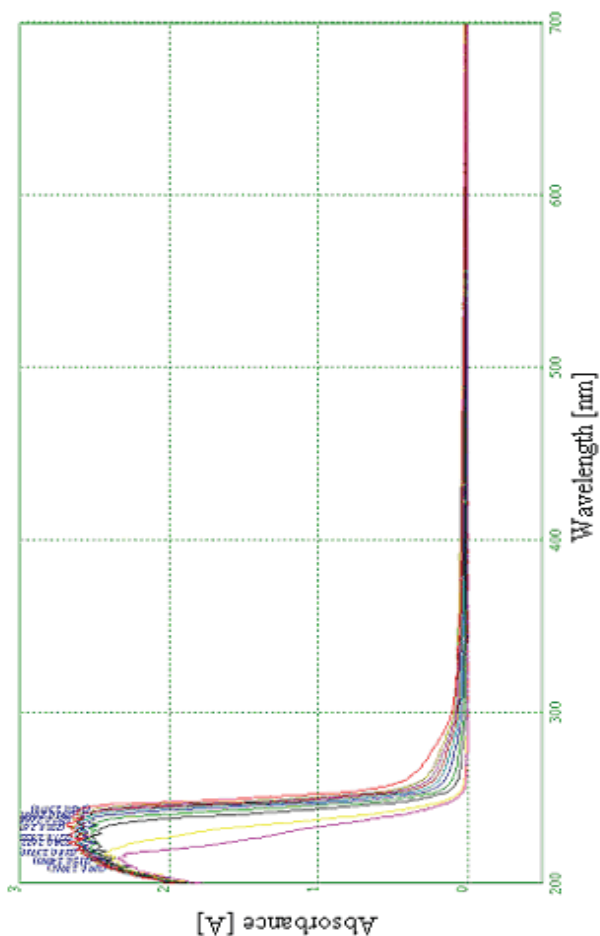


Figura 3.31. - Spectrul UV-VIS al limonenului

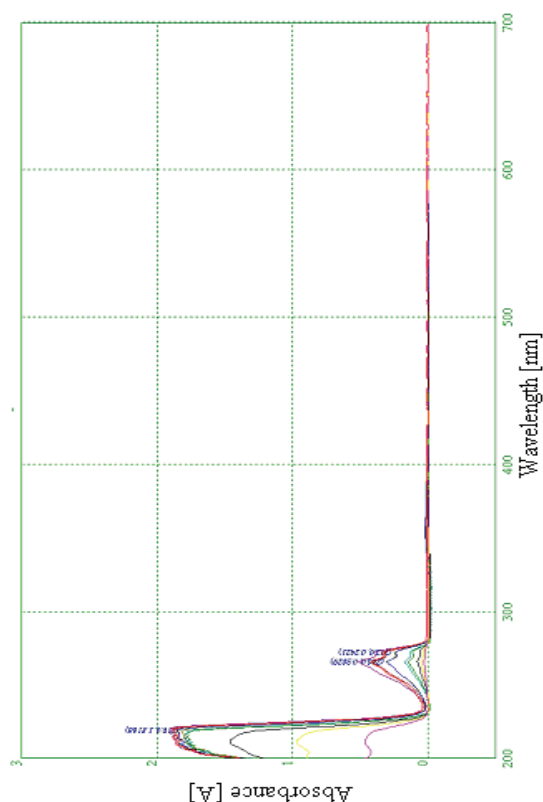


Figura 3.32. - Spectrul UV-VIS al *p*-cimenului

Conform spectrelor înregistrate, standardele de terpen (concentrație 0,9g/mL) au maximele de absorbție la următoarele lungimi de undă:

Standardul	λ (nm; UV)
1-Terpinen-4-ol	222
Limonen	234
β -Pinen	223
<i>p</i> -Cimen	221, 260

Pentru trasarea spectrelor UV-VIS ale extractelor pe intervalul 200-700nm s-au realizat diluții de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8mL, volume ce au fost aduse la 2mL cu alcool etilic 96%.

Extractul din pseudobace	λ (nm; UV)
Extract etanolic de <i>J.c. Austria</i>	211, 233, 268, 339
Extract etanolic de <i>J.c. Albac</i>	243, 284, 349
Extract etanolic de <i>J.v. Macea (2008)</i>	221; 276; 340
Extract etanolic de <i>J.c. Macea (2009)</i>	230; 276; 332
Hidrodistilat de <i>J.c. Albac</i>	246
Hidrodistilat de <i>J.c. Macea (2008)</i>	244
Hidrodistilat de <i>J.c. Macea (2009)</i>	242

Analizând spectrele de absorbție UV-VIS ale extractelor obținute (figurile A.95.-A.101.) se pot constata următoarele: extractele alcoolice și hidrodistilatele prezintă un maxim de absorbție pe domeniul 211-246nm în ultraviolet, maxime asociate prezenței terpenelor folosite ca standard, dar singurele care prezintă relevanță ar fi maximumul de la 260nm corespunzător *p*-cimenului și cel de la 234nm corespunzător limonenului.

Pe baza curbelor de etalonare s-a calculat cantitatea de terpeni din extractele alcoolice și hidrodistilatele obținute conform metodologiei în subcapitolele II.2.2.2. și II.2.5.2. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 3.12.

Tabelul 3.12. Conținutul de *p*-cimen și limonen în hidrodistilatele și extractele alcoolice obținute din pseudobace de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana* din diferite regiuni

Nr. crt.	Extract analizat	<i>p</i> -cimen, g/mL	limonen, g/mL
1.	Extract etanolic de <i>J.c.</i> (Austria)	0.036	0.062
2.	Extract etanolic de <i>J.c.</i> (Albac)	0.032	0.052
3.	Extract etanolic de <i>J.v.</i> (Macea, 2008)	0.014	0.019
4.	Extract etanolic de <i>J.v.</i> (Macea, 2009)	0.025	0.036
5.	Hidrodistilat de <i>J.c.</i> (Albac)	0.028	0.045
6.	Hidrodistilat de <i>J.v.</i> (Macea, 2008)	0.015	0.021
7.	Hidrodistilat de <i>J.v.</i> (Macea, 2009)	0.026	0.041

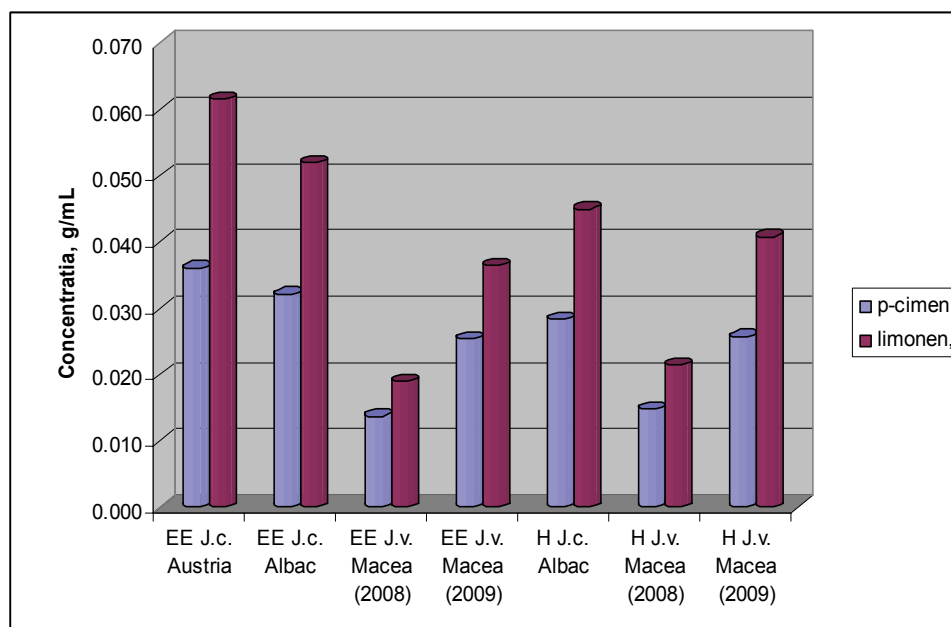


Figura 3.33. - Variația conținutului de *p*-cimen respective limonen în extractele etanolice (EE) și hidrodistilatele (H) din pseudobace de *Juniperus communis* și *Juniperus virginiana* din diferite regiuni

În toate extractele limonenul se regăsește în cantitate mai mare decât *p*-cimenul. Cantitatea de limonen este pentru unele locații ceva mai mare în extractele alcoolice față de hidrodistilate. Această diferență se observă și în cazul *p*-cimenului. Variația conținutului de *p*-cimen între extractele alcoolice și uleiul volatil din același tip de material (pseudobace *Juniperus virginiana*), cules din aceeași regiune (Macea) se poate datora condițiilor de mediu din anul respectiv (figura 3.33.).

Rezultatele obținute experimental indică un conținut de limonen mai ridicat din pseudobacele culese din Austria. De asemenea se observă că în anul 2009 pseudobacele de *Juniperus virginiana* erau mai bogate în limonen decât pseudobacele culese în 2008, ceea ce ar putea fi cauzat de diferențele climatice.

III.2. Activitatea antioxidantă a extractelor etanolice și în acetat de etil din extracte de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*

III.2.1. Identificarea compușilor antioxidanți prin cromatografie de lichide de înaltă performanță

În urma analizei RP-HPLC a extractelor etanolice de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*, obținute conform metodologiei prezentată în subcapitolul II.2.2.2., s-au obținut cromatogramele prezentate în figurile 3.34.-3.40.

Identificarea calitativă a compușilor antioxidanți s-a făcut comparativ cu standardele de rutină, quercetină, flavonă și crisină, pe baza timpilor de retenție. Suprapunerile cromatogramelor standardelor sunt prezentate în figurile 2.25. 2.27., 2.29., 2.31.- capitolul II – Partea experimentală.

Conform spectrelor înregistrate, standardele de compuși antioxidanți (concentrație 2g/L) au maximele de absorbție la următoarele lungimi de undă:

Standard	Timp de retenție (min)
Rutină	2-3,6
Quercetină	4,2
Crisină	9,8
Flavonă	15,8

Cromatogramele obținute în urma analizei RP-HPLC (dectecție la 254nm) a extractelor etanolice din frunzele aciculare și a pseudobacele de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*, sunt prezentate în figurile 3.33.-3.39.

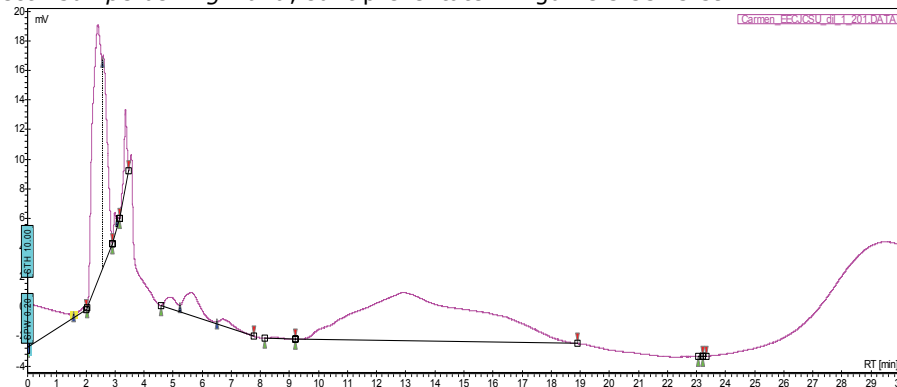


Figura 3.34. - Extract etanolic din frunze aciculare de *Juniperus communis* (Suedia)

În cazul extractului etanolic prezentat în figura 3.34., se observă prezența unui pic bine conturat, ($t_R=2,408-2,592\text{min}$) ce corespund rutinei, precum și alt pic ($t_R=3,36-4,97\text{min}$) ce corespunde quercetinei.

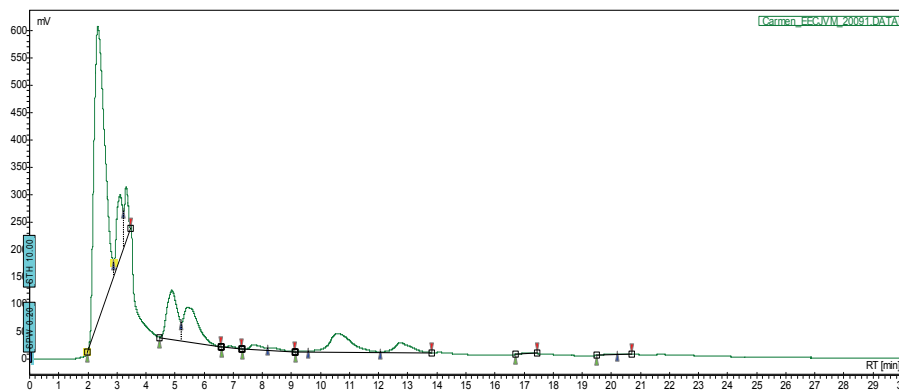


Figura 3.35. - Extract etanolic din frunze aciculare de *Juniperus virginiana* (Macea, 2009)

După cum se observă din figura 3.35., picul ($t_R=2,333-3,097$) este specific rutinei, iar celelalte două ($t_R=3,312-4,89$) corespund quercetinei.

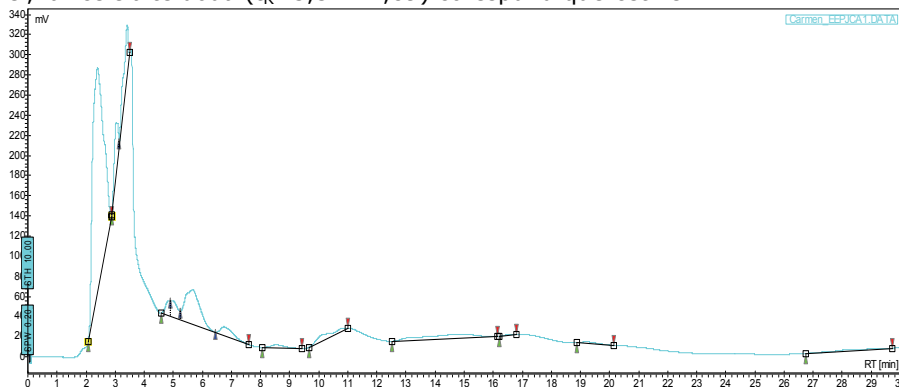


Figura 3.36. - Extract etanolic din pseudobace de *Juniperus communis* (Austria)

În cromatograma din figura 3.36. se observă prezența rutinei ($t_R=2,375-3,022$) și a quercetinei ($t_R=3,402-4,907$).

Cromatogramele (figurile 3.37. și 3.38.) rezultate în urma analizei RP-HPLC a extractului etanolic din pseudobace autohtone de *Juniperus communis*, evidențiază prezența rutinei ($t_R=2,315-3,027$), quercetinei ($t_R=3,163-4,832$) și a flavonei ($t_R=10,757-16,725$) în pseudobacele de la Lipova; în cazul celor de la Albac prezența rutinei ($t_R=2,328-3,088$), quercetinei ($t_R=3,317-4,917$) și a crisinei ($t_R=8,39-10,617$).

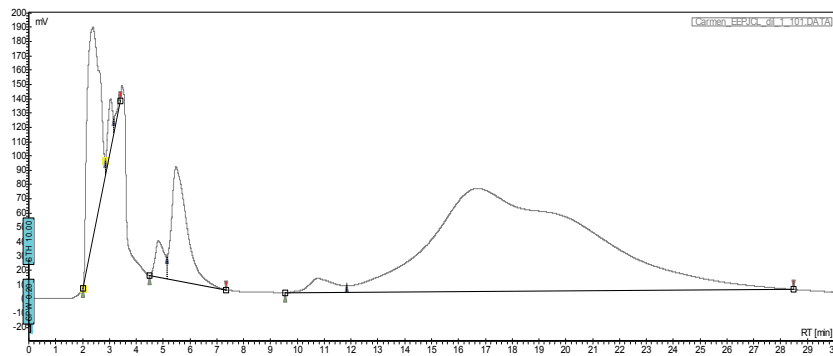


Figura 3.37. - Extract etanolic din pseudobace de *Juniperus communis* (Lipova)

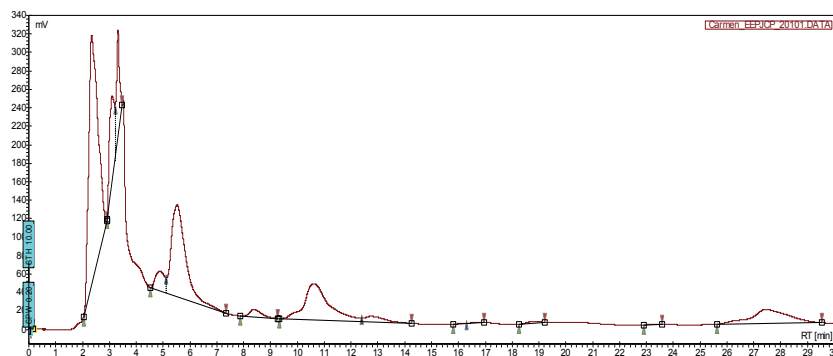


Figura 3.38. - Extract etanolic din pseudobace de *Juniperus communis* (Albac, 2010)

În extractele obținute din pseudobace de *Juniperus virginiana* (Macea, 2008 și 2009) se observă diferențe semnificative în funcție de anul de recoltare al acestora. Astfel se observă prezența quercetinei ($t_R=2,937-4,285$) în extractul pseudobacelor recoltate în 2008, în schimb în cazul celor recoltate în 2009, timpii de retenție corespund rutinei ($t_R=2,373-3,047$) și quercetinei ($t_R=3,325-4,843$)

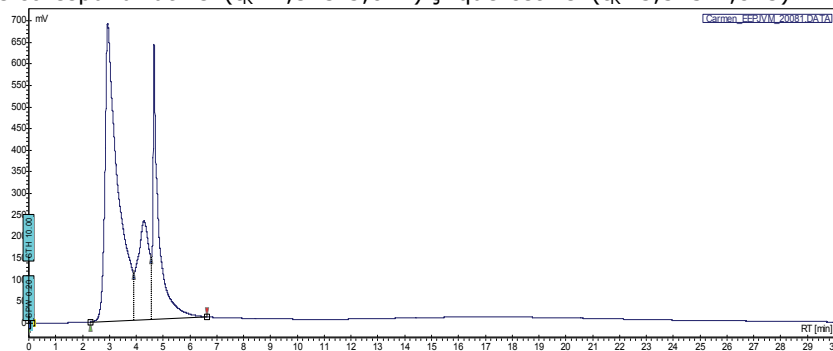


Figura 3.39. - Extract etanolic din pseudobace de *Juniperus virginiana* (Macea, 2008)

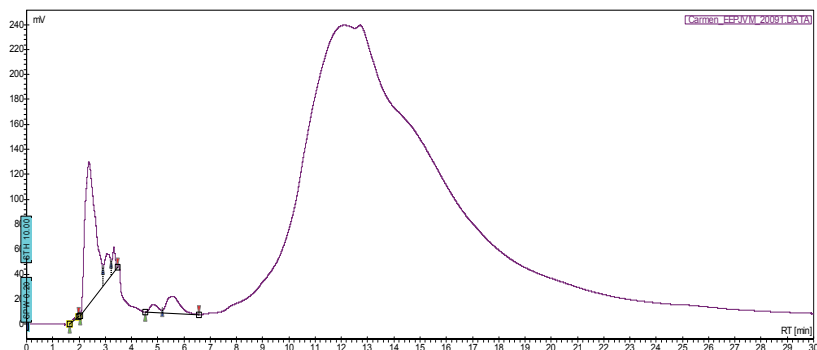


Figura 3.40. - Extract etanolic din pseudobace de *Juniperus virginiana* (Macea, 2009)

Concentrația extractelor etanolice, din frunze aciculare și pseudobace de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*, în rutină, quercetină, crisină și flavonă este redată în tabelul 3.13.

Tabelul 3.13. Conținutul de **rutină, quercetină, crisină și flavonă** în extractele alcoolice obținute din frunze aciculare și pseudobace de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana* din diferite regiuni

Nr. crt.	Extract etanolic analizat	Concentrația în rutină, mg/mL	Concentrația în quercetină, mg/mL	Concentrația în crisină, mg/mL	Concentrația în flavonă, mg/mL
1.	Frunze aciculare de <i>J.c.</i> Suedia	0.008	0.001		0.013
2.	Frunze aciculare de <i>J.v.</i> Macea (2009)	0.298	0.066	0.0002	
3.	Pseudobace de <i>J.c.</i> Austria	0.127	0.005		
4.	Pseudobace de <i>J.c.</i> Lipova	0.103	0.017		0.009
5.	Pseudobace de <i>J.c.</i> Albac (2010)	0.139	0.015	0.028	
6.	Pseudobace de <i>J.v.</i> Macea (2008)		0.271		
7.	Pseudobace de <i>J.v.</i> Macea (2009)	0.068	0.004		

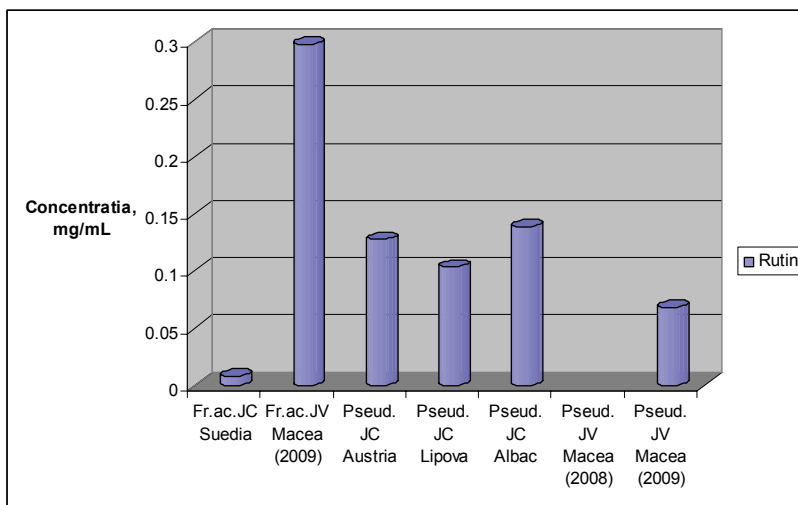


Figura 3.41. - Variația conținutului de rutină în extractele etanolice din frunzele aciculare (*Fr.ac*) și pseudobacele (*Pseud*) de *Juniperus communis* (*JC*) respectiv *Juniperus virginiana* (*JV*) din diferite regiuni

Din rezultatele obținute se observă că, cel mai mare conținut în compuși antioxidanți, exprimat cantitativ ca mg rutină/mL extract se găsește în frunzele aciculare de *Juniperus virginiana* (Macea). Comparând rezultatul obținut cu conținutul în rutină al pseudobacelor de *Juniperus virginiana* (Macea), se constată o diferență semnificativă între cele două recolte (figura 3.41), fapt ce se poate datora condițiilor de mediu.

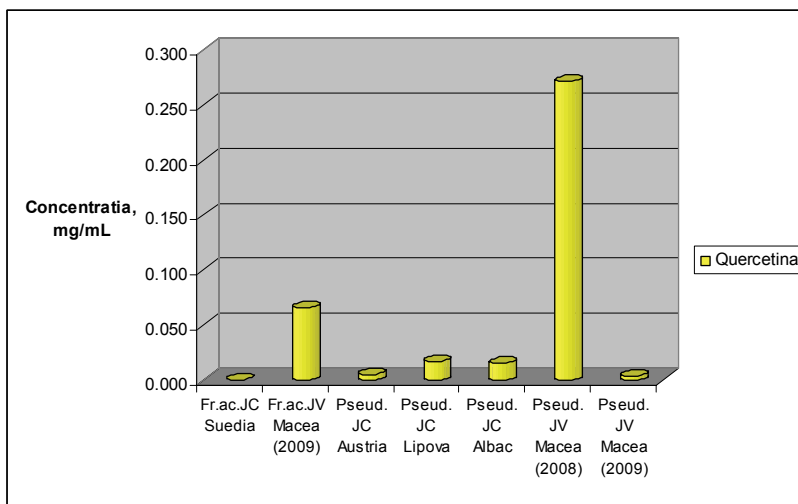


Figura 3.42. - Variația conținutului de quercetină în extractele etanolice din frunzele aciculare (*Fr.ac*) și pseudobacele (*Pseud*) de *Juniperus communis* (*JC*) respectiv *Juniperus virginiana* (*JV*) din diferite regiuni

Rezultatele obținute prin analiza RP-HPLC indică faptul că, cantitatea de compuși antioxidanți exprimată ca mg quercetină/mL extract este mai ridicată pentru extractul obținut din pseudobace de *Juniperus virginiana* recoltat de la Macea (2008), în schimb, în cazul extractului din 2009, cantitatea este foarte mică. Din figura 3.42 se constată existența unei concentrații mai mari de quercetină în frunzele aciculare comparativ cu pseudobacele (*Juniperus virginiana* de la Macea).

În concluzie, conținutul de compuși antioxidanți, exprimat prin conținutul de flavone este mai ridicat în extractele alcoolice obținute din părți anatomice (frunze aciculare și pseudobace) de *Juniperus virginiana* față de *Juniperus communis*.

III.2.2. Analiza activității antioxidante a extractelor etanolicе și în acetat de etil prin metoda cu DPPH

Au fost determinate activitățile antioxidante ale extractelor din frunze aciculare, microblaste și pseudobace de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana* prin metoda descrisă la II.2.2.1 și II.2.2.2 (vezi Partea experimentală). Pentru aceste extracte, înregistrările au fost efectuate cu spectrofotometrul Perkin Elmer, Lambda EZ Series.

S-a analizat activitatea antioxidantă a extractelor etanolicе și a celor în acetat de etil, activitate comparată cu activitatea antioxidantă a soluțiilor de standarde de tipul β -pinen, *p*-cimen, 1-terpinen-4-ol (de concentrație 0,9g/mL).

Capacitatea de captare a radicalilor DPPH (activitatea antioxidantă) a soluțiilor standard analizate este prezentată în tabelul 3.14.

Tabelul 3.14. Activitatea antioxidantă a soluțiilor standard

Soluție standard	β -Pinen	<i>p</i> -Cimen	1-Terpinen-4-ol
Activitate antioxidantă [%]	72.76	8.45	56.96

În tabelul 3.15. sunt prezentate valorile absorbanțelor probelor standard la 517nm, absorbanță la care s-au realizat conform literaturii determinări cu DPPH pentru numeroși compuși naturali [189].

Tabelul 3.15. Variația absorbanțelor soluțiilor probelor standard de terpene

Timp [min]	β -Pinen	<i>p</i> -Cimen	1-Terpinen-4-ol
0	0.4879	0.5031	0.4684
1	0.3171	0.496	0.3504
2	0.2519	0.491	0.3002
3	0.2171	0.4875	0.27
4	0.1965	0.4843	0.252
5	0.1812	0.4814	0.2391
6	0.1712	0.4782	0.2287
7	0.1623	0.4761	0.2228
8	0.1559	0.4736	0.2166
9	0.1507	0.4714	0.2134
10	0.1464	0.4694	0.2097
11	0.1429	0.4676	0.2077
12	0.14	0.4658	0.2055
13	0.1372	0.464	0.203
14	0.1348	0.4623	0.2025
15	0.1329	0.4606	0.2016

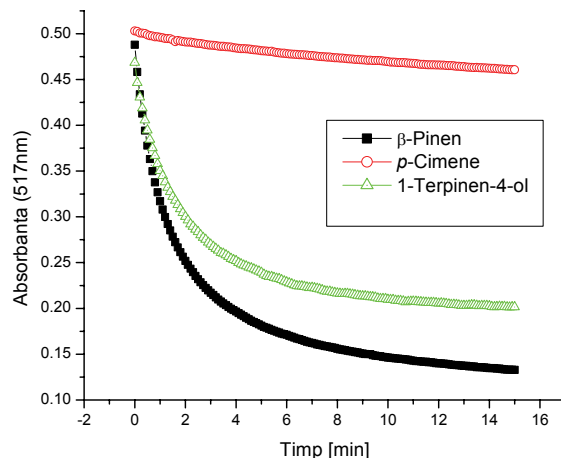


Figura 3.43. - Capacitatea de captare a radicalului DPPH pentru standardele de terpene

În cazul extractelor de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*, urmărind spectrofotometric variația în timp a absorbanței la 517nm (figurile 3.43-3.46) s-a remarcat faptul că cea mai bună activitate antioxidantă o au extractele în acetat de etil obținute din frunze aciculare de *Juniperus virginiana* Siria:

Tablelul 3.16. Activitatea antioxidantă a extractelor în acetat de etil și etanol de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*

Nr. crt.	Partea anatomică a plantei	Extract	Activitatea antioxidantă [%]
1.	Frunze aciculare	<i>Juniperus virginiana</i> în acetat de etil Siria	91.62
2.		<i>Juniperus communis</i> în acetat de etil Siria	86.56
3.		<i>Juniperus communis</i> în acetat de etil Austria	84.66
4.		<i>Juniperus communis</i> în acetat de etil Albac	66.72
5.		<i>Juniperus communis</i> în acetat de etil Lipova	89.98
6.		<i>Juniperus virginiana</i> în acetat de etil Macea	63.51
7.	Pseudo bace	<i>Juniperus communis</i> în etanol Austria	77.81
8.		<i>Juniperus communis</i> în acetat de etil Albac 2010 (mature)	85.82
9.		<i>Juniperus communis</i> în acetat de etil Albac 2010 (verzi)	72.41
10.		<i>Juniperus communis</i> în etanol Albac	84.04
11.		<i>Juniperus virginiana</i> în etanol Macea	80.59
12.	Micro blaste	<i>Juniperus virginiana</i> în acetat de etil Macea	38.93
13.		<i>Juniperus communis</i> în acetat de etil Siria	90.90
14.		<i>Juniperus communis</i> în acetat de etil Austria	83.42
15.		<i>Juniperus communis</i> în acetat de etil Albac	77.54
16.		<i>Juniperus communis</i> în acetat de etil Macea	78.84
17.		<i>Juniperus virginiana</i> în acetat de etil Macea	89.69

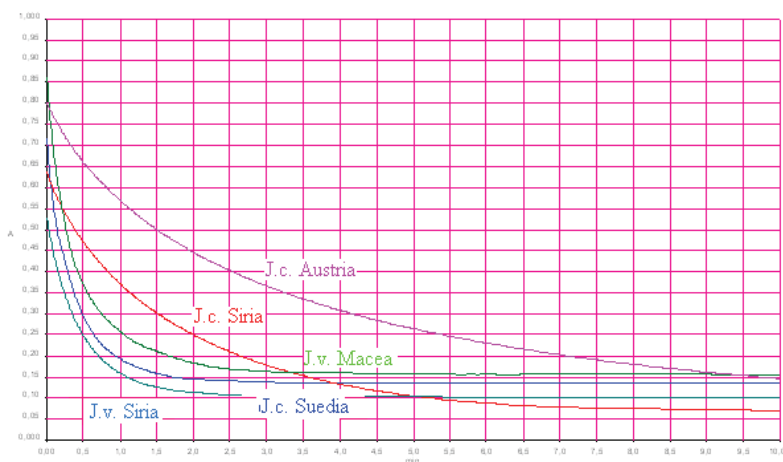


Figura 3.44. - Variația în timp a absorbției soluției de DPPH la 517nm, în prezența extractelor din microblaste de *Juniperus communis* (J.c.) și *Juniperus virginiana* (J.v.) în acetat de etil

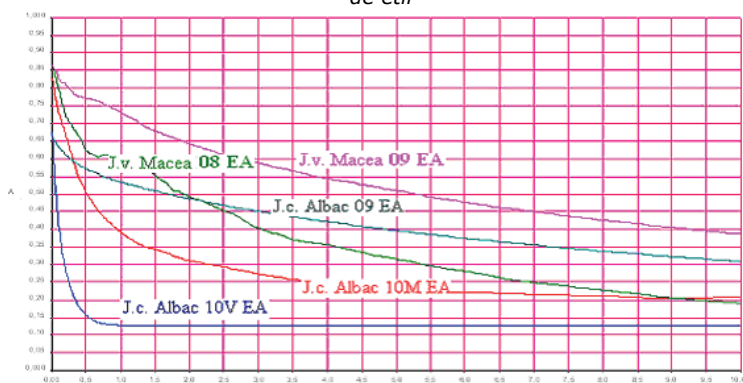


Figura 3.45. - Variația în timp a absorbției soluției de DPPH la 517nm, în prezența extractelor din pseudobace (08-recoltate în 2008, 09-recoltate în 2009, 10M-mature din 2010, 10V-verzi din 2010) de *Juniperus communis* (J.c.) și *Juniperus virginiana* (J.v.) în acetat de etil (EA)

Calculul vitezei medii s-a făcut pe baza ecuației și a curbelor prezentate mai jos. Capacitatea de captare a radicalului DPPH în cazul mai multor extracte este prezentată în figurile 3.44-3.46.

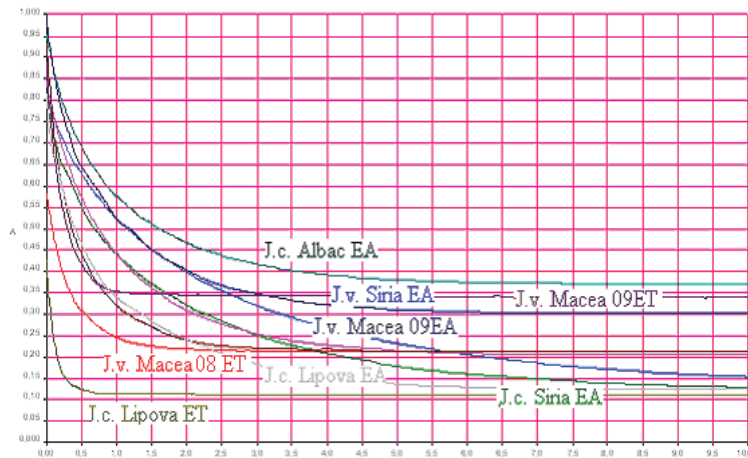


Figura 3.46. - Variația în timp a absorbantei soluției de DPPH la 517nm, în prezența extractelor din frunze aciculare de *Juniperus communis* (J.c.) și *Juniperus virginiana* (J.v.) în acetat de etil (EA) și etanol (ET)

Evaluarea activității antioxidante a extractelor etanolice din pseudobace a condus la viteze medii de reacție: între 0,027 – 0,0013 μ M/s pentru Gin (din comerț), 0,132 – 0,043 μ M/s pentru extractul de *Juniperus communis* (Austria), 0,123 – 0,044 μ M/s în cazul extractului de *Juniperus communis* (Albac) și între 0,059 – 0,020 μ M/s pentru extractul de *Juniperus virginiana* (Grădina Botanică "Macea"), figura 3.47.

Rezultatele obținute au făcut obiectul unei lucrări științifice comunicate și publicate [190]

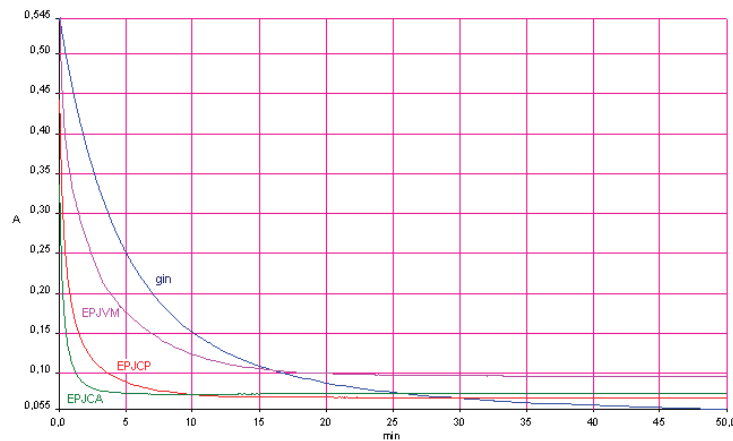


Figura 3.47. - Variația în timp a absorbantei soluției de DPPH, la 517nm, în prezența ginului și extractelor alcoolice din pseudobace de *Juniperus communis* (JC) și *Juniperus virginiana* (JV) (EPJVM-extract etanolic de *Juniperus virginiana* (Grădina Botanică "Macea"), EPJCP- extract etanolic de *Juniperus communis* (Albac), EPJCA- extract etanolic de *Juniperus communis* (Austria))

Determinarea vitezelor medii de reacție pentru porțiunea cvasiliniară a curbei $c(\mu\text{M}) = f(t,s)$, a indicat o valoare maximă pentru extractul din frunze aciculare de *Juniperus communis* recoltate din Siria ($0,17\mu\text{M/s}$), urmată de viteza medie a extractului din frunze aciculare de *Juniperus communis* Lipova ($0,16\mu\text{M/s}$), figura 3.48.

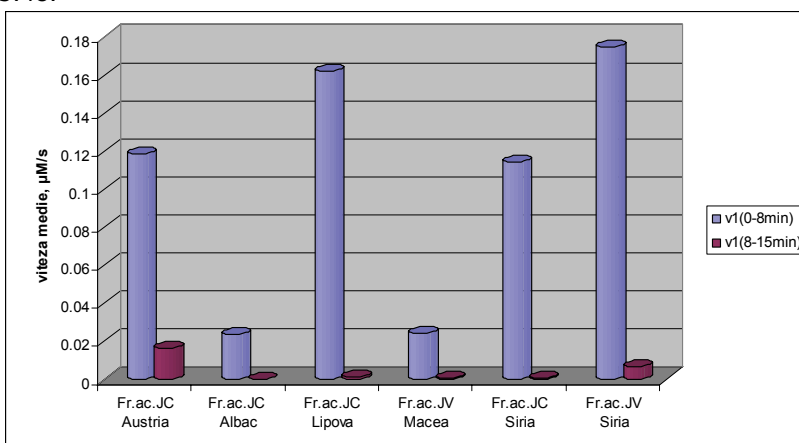


Figura 3.48. - Variația în timp a absorbanței soluției de DPPH la 517nm, în prezența extractelor din frunze aciculare (Fr.ac.) de *Juniperus communis* (JC) și *Juniperus virginiana* (JV) în acetat de etil

Evaluarea activității antioxidante a extractelor de microblaste de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana* a condus la viteze medii de reacție având valori însemnate în cazul celor provenite din Siria, Austria și Macea, după cum se poate observa din figura 3.49.

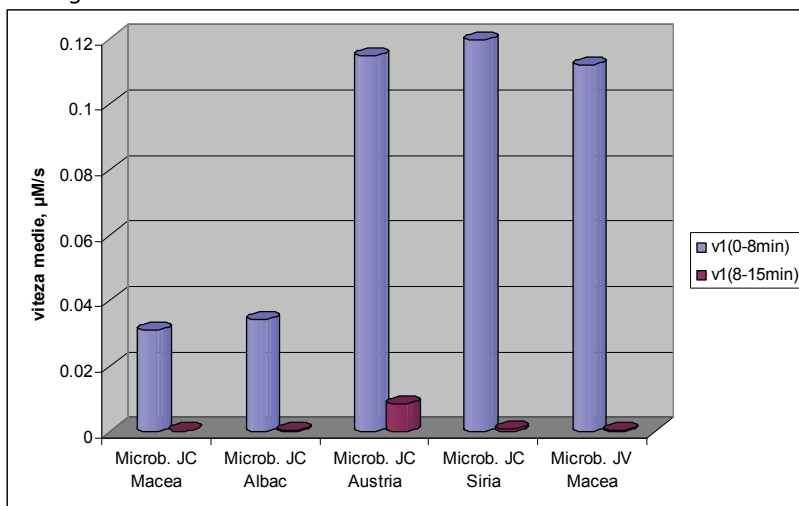


Figura 3.49. - Variația în timp a absorbanței soluției de DPPH la 517nm, în prezența extractelor în acetat de etil din microblaste (Microb.) de *Juniperus communis* (JC) respectiv *Juniperus virginiana* (JV)

Viteza medie de reacție prezintă valorile cele mai ridicate în cazul extractului în acetat de etil din pseudobacele de *Juniperus virginiana* recoltate de la Macea.

După cum se poate observa din figura 3.50, pseudobacele verzi prezintă valori mai ridicate ale vitezei de reacție, în primele secunde ale înregistrării spectrofotometrice.

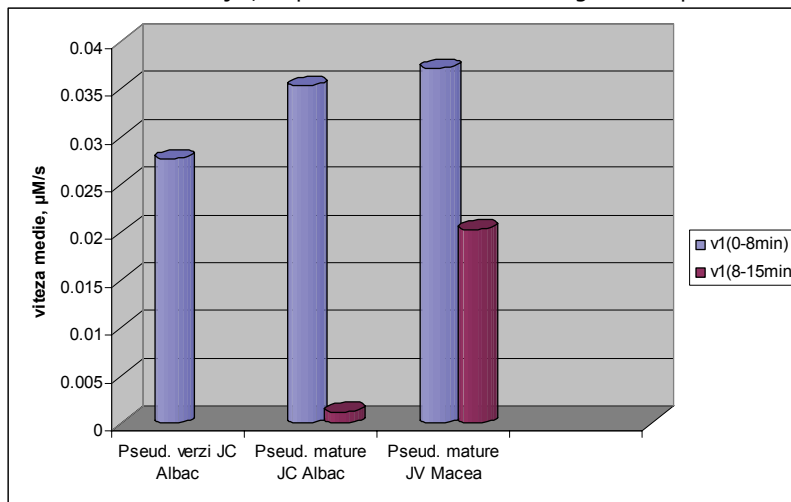


Figura 3.50. - Variația în timp a absorbanței soluției de DPPH la 517nm, în prezența extractelor în acetat de etil din pseudobace (Pseud) de *Juniperus communis* (JC) și *Juniperus virginiana* (JV)

Concluzii

În urma analizelor privind activitatea antioxidantă a unor extracte în alcoolice și în acetat de etil, determinată prin metoda cu DPPH, se pot desprinde următoarele concluzii:

- au fost evaluate din punct de vedere al activității antioxidante extractele în acetat de etil din frunze aciculare, pseudobace și microblaste precum și extractele alcoolice din pseudobacele de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*
- extractul în acetat de etil obținut din frunze aciculare de *Juniperus virginiana* Siria a prezentat cea mai bună activitate antioxidantă (91,62%)

Capacitatea de captare a radicalilor liberi (*scavenging*) s-a exprimat în funcție de viteza medie de reacție.

- prin compararea vitezelor medii de reacție a ginului din comerț cu extractele noastre, acesta are activitatea cea mai redusă (0,0013μM/s)
- în cazul extractelor etanolice s-a constatat că extractul etanolic obținut din pseudobace de *Juniperus communis* (Austria) a prezentat cea mai mare viteză de reacție (0,132 μM/s)
- în cazul extractelor în acetat de etil cea mai mare viteză de reacție (1,22μM/s) s-a înregistrat în primele 8 minute de analiză, în cazul extractului din frunze aciculare de *Juniperus communis* (Austria).

III.3. Analiza eliberărilor controlate din nanocapsule și unguente

III.3.1. Analiza eliberărilor controlate din nanocapsule ce conțin extracte etanolice și ulei volatil din pseudobace de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana* provenite din diferite localități

S-au luat în studiu un număr de patru uleiuri volatile și patru extracte etanolice din cele două specii de *Juniperus* analizate. Complexii cu β -ciclodextrină s-au obținut în modul prezentat în Partea experimentală. Analiza eliberărilor controlate din nanocapsule s-a realizat prin spectroscopie de UV-VIS.

Majoritatea componentelor identificați prin GC-MS în uleiurile volatile de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana* fac parte din clasa hidrocarburilor monoterpene.

S-a ales interpretarea eliberărilor controlate din extractele etanolice funcție flavonoidul rutină [191].

În urma analizei spectrofotometrice s-a constatat că maximul de absorbție al complexilor este la 275nm de aceea înregistrările eliberărilor extractelor din nanocapsule precum și exprimarea concentrațiilor au fost realizate, pentru toate probele, la această lungime de undă.

Concentrația în monoterpene ($\lambda_{\max} = 275\text{nm}$), din complexii ce conțin ulei volatil a fost între 7,5 mM – din pseudobace de *Juniperus virginiana* (Macea, 2008 și 2009) în etanol 20% – și 63,8 mM – din pseudobace de *Juniperus virginiana* (Macea, 2008) în etanol 96%.

Complexii ce conțin extracte etanolice au eliberat compus activ cu o concentrație în rutină între 0,0036mM – din pseudobace de *Juniperus virginiana* (Macea, 2008) în etanol 20% - și 0,39mM – din pseudobace de *Juniperus virginiana* (Macea, 2009) în etanol 96%.

Evaluarea eliberărilor controlate a complexilor s-a realizat timp de 14,5 minute. În cazul complexilor ce conțin extracte etanolice din pseudobace, în primele 8 minute, s-au obținut următoarele valori pentru viteza medie: între 0,3 – 0,9 $\mu\text{M/s}$ pentru extractul de *Juniperus communis* (Austria); 0,4 – 11 $\mu\text{M/s}$ pentru extractul de *Juniperus communis* (Albac); 0,55 $\mu\text{M/s}$ în cazul extractului de *Juniperus virginiana* (Grădina Botanică "Macea"-2008) și între 0,2 – 40 $\mu\text{M/s}$ pentru extractul de *Juniperus virginiana* (Grădina Botanică "Macea"-2009). În următoarele 6,5 minute valorile vitezei medii au fost mai mici pentru majoritatea extractelor: între 0,1 – 2,3 $\mu\text{M/s}$ pentru extractul de *Juniperus communis* (Austria); 0,9 – 4,8 $\mu\text{M/s}$ pentru extractul de *Juniperus communis* (Albac); 0,6-1,2 $\mu\text{M/s}$ în cazul extractului de *Juniperus virginiana* (Grădina Botanică "Macea"-2008) și între 0,5 – 16,4 $\mu\text{M/s}$ pentru extractul de *Juniperus virginiana* (Grădina Botanică "Macea"-2009), figura 3.51.

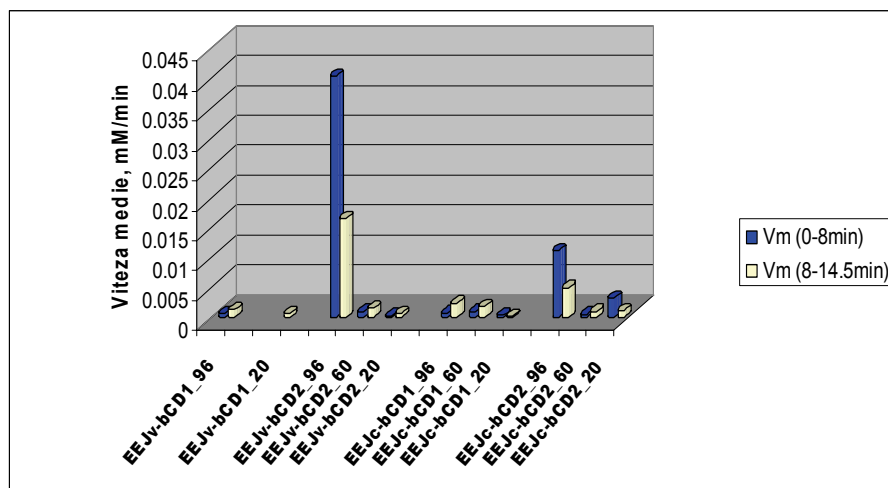


Figura 3.51. – Variația vitezei medii de eliberare (EE) raportat la flavonoidul rutină din complecși ai extractelor alcoolice de *Juniperus communis* (Jc) respectiv *Juniperus virginiana* (Jv) unde: bCD1, bCD2 = β -ciclodextrină, 96, 60, 20 – concentrațiile alcoolului etilic

Rezultatele obținute în urma eliberării în etanol 96%, 60% respectiv 20% sunt descrescătoare, asemănător cu concentrația alcoolului. Variația vitezei medii din același tip de material vegetal, cules din aceeași regiune se poate datora condițiilor de mediu din anul respectiv (figura 3.51.)

În urma eliberărilor controlate, în primele 8 minute, din complecși ce conțin uleiuri volatile de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana* s-au obținut următoarele valori ale vitezei medii: între 0,9mM/s pentru hidrodilatatul de *Juniperus communis* (Austria); 2,9 – 3,1mM/s pentru hidrodilatatul de *Juniperus communis* (Albac); 0,4 – 23,8mM/s în cazul hidrodilatatului de *Juniperus virginiana* (Grădina Botanică "Macea"-2008) și între 0,6 – 3,2mM/s pentru hidrodilatatul de *Juniperus virginiana* (Grădina Botanică "Macea"-2009). După următoarele 6,5 minute, în unele cazuri, valorile vitezei sunt puțin mai mici: între 1,04mM/s pentru hidrodilatatul de *Juniperus communis* (Austria); 3,03 – 3,96mM/s pentru hidrodilatatul de *Juniperus communis* (Albac); 0,8 – 16mM/s în cazul hidrodilatatului de *Juniperus virginiana* (Grădina Botanică "Macea"-2008) și între 0,7 – 3,2mM/s pentru hidrodilatatul de *Juniperus virginiana* (Grădina Botanică "Macea"-2009).

Valorile mai mari în cazul complecșilor ce conțin uleiuri volatile se datorează β -pinenului, a cărui concentrație este mai mare în uleiurile volatile, în comparație cu rutina din extractele alcoolice.

Variația vitezei medii de eliberare (în etanol 96, 60 și 20%) raportat la β -pinen din complecși ai uleiurilor volatile de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana* este prezentată în figura 3.52.

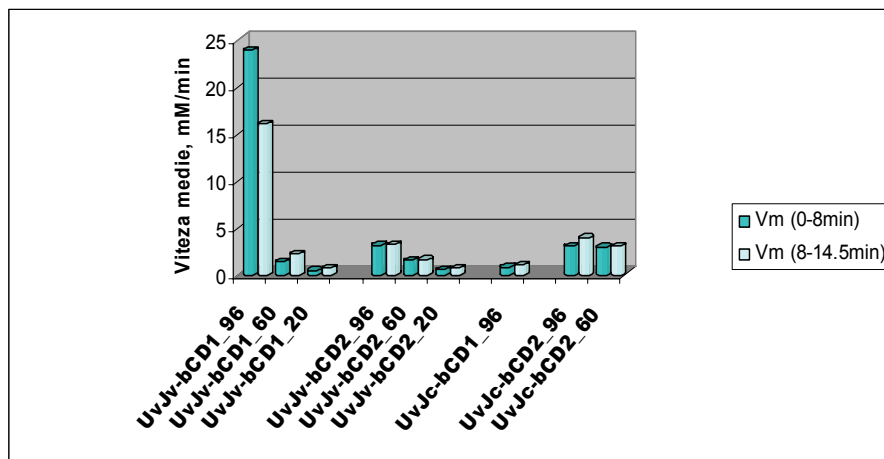


Figura 3.52. – Variația vitezei medii de eliberare (în etanol 96, 60 și 20%) raportat la conținutul de monoterpene din complecși ai uleiurilor volatile de *Juniperus communis* (Jc) respectiv *Juniperus virginiana* (Jv)

unde Uv-ulei volatil.

III.3.2. Analiza eliberărilor controlate din unguente ce conțin extracte etanolice și ulei volatil din pseudobace de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana* provenite din diferite localități

S-au luat în studiu un număr de patru uleiuri volatile și patru extracte etanolice din cele două specii de *Juniperus* analizate. Complecșii cu β -ciclodextrină s-au obținut în modul prezentat în Partea experimentală. Analiza eliberărilor controlate din unguente s-a realizat prin spectroscopie de UV-VIS.

În urma analizei spectrofotometrice s-a constatat că maximum de absorbție al complecșilor din unguente este la 280nm, specific unor monoterpene, de aceea înregistrările eliberărilor controlate s-au realizat la această lungime de undă.

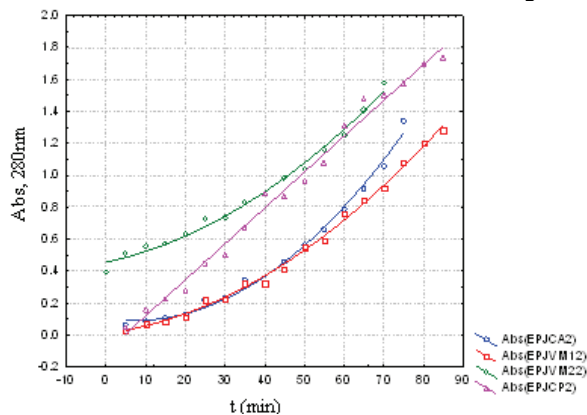


Figura 3.53. - Eliberări controlate din unguente ce conțin înglobate extracte alcoolice (E) din pseudobace (P) de *Juniperus communis* (JC) respectiv *Juniperus virginiana* (JV) în etanol 20% (2) (A-Austria, M1-Macea, 2008, M2-Macea, 2009, P-Albac)

În figura 3.53. sunt reprezentate eliberările controlate în etanol 20% din unguentele ce conțin extracte etanolice ale celor două specii de *Juniperus* și se observă o alura a curbei asemănătoare în cazul extractelor de *Juniperus communis* (Austria) și *Juniperus virginiana* (Macea, 2008), în paralel, din unguentul ce conține extract de *Juniperus communis* (Albac) se observă o eliberare liniară.

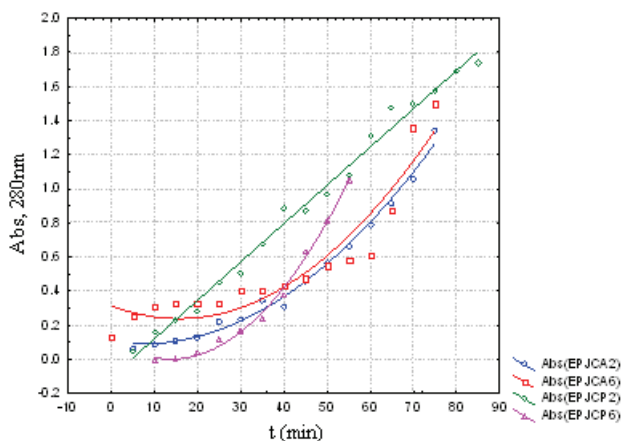


Figura 3.54. - Eliberări controlate din unguente ce conțin înglobate extracte etanolice din pseudobace (P) de *Juniperus communis* (JC) în etanol 20% (2) și 60% (6) (A-Austria, M1-Macea, 2008, M2-Macea, 2009, P-Albac)

Prin compararea eliberărilor controlate din unguente ce conțin extracte etanolice de *Juniperus communis* și *Juniperus virginiana* (figurile 3.54.-3.55.) se observă că cele mai bune rezultate s-au obținut în etanol 20%. Aceasta se poate datora eliberării compușilor hidrofilii din unguentele analizate.

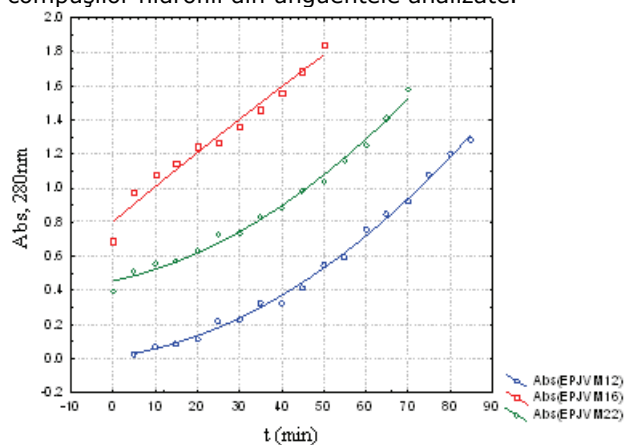


Figura 3.55. - Eliberări controlate din unguente ce conțin înglobate extracte etanolice din pseudobace (P) de *Juniperus virginiana* (JV) în etanol 20% (2) și 60% (6) (M1-Macea, 2008, M2-Macea, 2009)

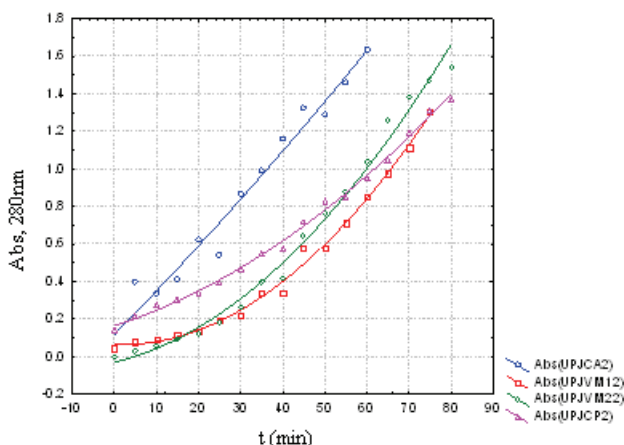


Figura 3.56. - Eliberări controlate din unguente ce conțin înglobate uleiuri volatile (U) din pseudobace (P) de *Juniperus communis* (JC) respectiv *Juniperus virginiana* (JV) în etanol 20% (2) (A-Austria, M1-Macea, 2008, M2-Macea, 2009, P-Albac)

În urma analizei eliberărilor controlate în etanol 20% respectiv 60% din uleiurile volatile ale celor două specii de *Juniperus* studiate, figurile 3.56.-3.57., se constată o eliberare foarte bună din unguentele ce conțin uleiuri de *Juniperus virginiana* în special în etanol de concentrație mai mică. Acest fapt poate fi consecința existenței unei cantități mai mari de compuși hidrofilii în uleiurile de *Juniperus virginiana* față de cele de *Juniperus communis*.

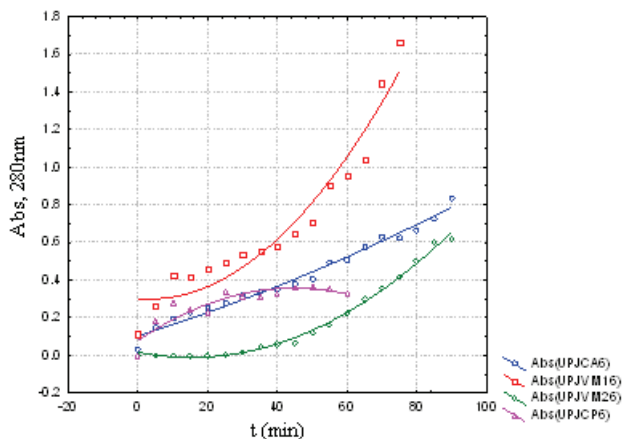


Figura 3.57. - Eliberări controlate din unguente ce conțin înglobate uleiuri volatile (U) din pseudobace (P) de *Juniperus communis* (JC) respectiv *Juniperus virginiana* (JV) în etanol 60% (6) (A-Austria, M1-Macea, 2008, M2-Macea, 2009, P-Albac)

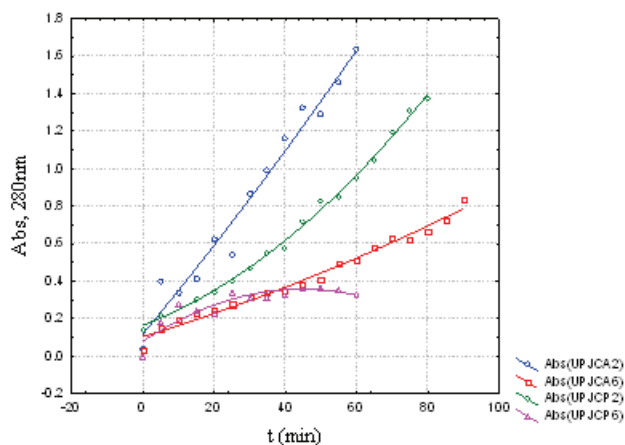


Figura 3.58. - Eliberări controlate din unguente ce conțin înglobate uleiuri volatile (U) din pseudobace (P) de *Juniperus communis* (JC) în etanol 20% (2) și 60% (6) (A-Austria, P-Albac)

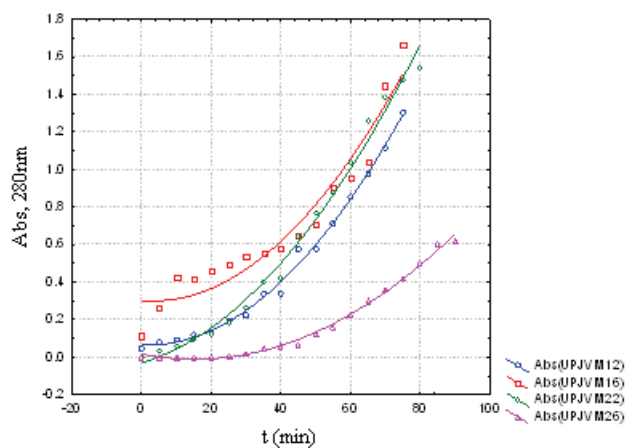


Figura 3.59. - Eliberări controlate din unguente ce conțin înglobate uleiuri volatile (U) din pseudobace (P) de *Juniperus virginiana* (JV) în etanol 20% (2) și 60% (6) (M1-Macea, 2008, M2-Macea, 2009)

Prin compararea eliberării în etanol de 20% și 60% din uleiurile volatile de *Juniperus communis* (figura 3.58.) și *Juniperus virginiana* (figura 3.59.) se observă o eliberare mai bună din unguentele ce conțin uleiuri volatile de *Juniperus virginiana*.

S-a încercat realizarea eliberărilor controlate din unguente și în etanol 96%, dar rezultatele nu au fost foarte bune, consecința ar putea fi o eliberare mult mai bună a compușilor hidrofilii. Acest lucru este demonstrat și de creșterea eliberărilor în paralel cu scăderea concentrației de etanol.

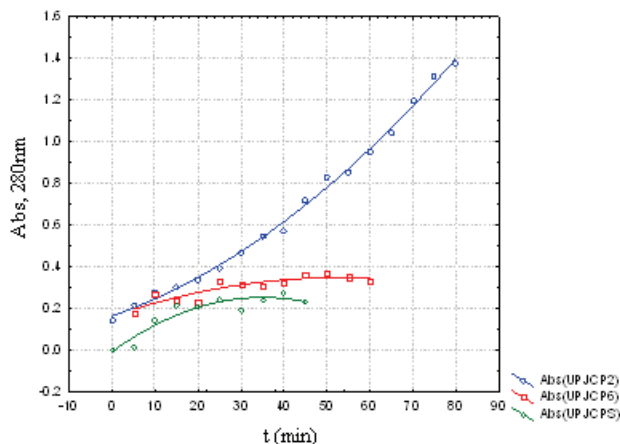


Figura 3.60. - Eliberări controlate din unguente ce conțin înglobate uleiuri volatile (U) din pseudobace (P) de *Juniperus communis* (JC) în etanol 20% (2) și 60% (6) și ser fiziologic (S) (P - Albac)

Din figurile 3.60.-3.61. se poate constata o eliberare însemnată în primele 25 de minute în cazul unguentelor ce conțin ulei din pseudobace de *Juniperus communis*, Albac și *Juniperus virginiana*, Macea 2009.

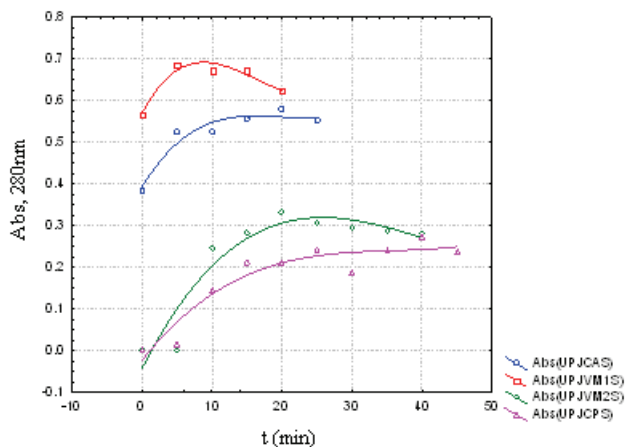


Figura 3.61. - Eliberări controlate din unguente ce conțin înglobate uleiuri volatile (U) din pseudobace (P) de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana* (JV) în ser fiziologic (S) (A-Austria, M1-Macea, 2008, M2-Macea, 2009, P-Albac)

Concluzii:

Pentru realizarea eliberărilor controlate din nanocapsule, în etanol de diferite concentrații, s-a urmărit spectrofotometric variația absorbantei, la 275nm, timp de 14,5 minute. Pe baza vitezei medii de reacție calculate se pot face următoarele aprecieri:

- în cazul complexilor ce conțin extracte etanolice, valorile vitezei medii au fost mai mari în primele 8 minute, iar extractul de *Juniperus virginiana* (Macea-2009) a prezentat cea mai mare valoare ($40\mu\text{M/s}$).

- complexii ce conțin uleiuri volatile au prezentat valori apropiate pentru cele două intervale luate în considerare. Cea mai mare valoare (23,8 mM/s) s-a înregistrat în cazul extractului de *Juniperus virginiana* (Macea-2008). Interpretarea eliberărilor controlate s-a realizat funcție de monoterpene în cazul uleiurilor volatile și față de flavonoidul rutină pentru extractele etanolice.

- în cazul extractelor etanolice rezultatele vitezei medii de reacție sunt descrescătoare, în paralel cu scăderea concentrației alcoolului.
- complexii ce conțin uleiuri volatile au prezentat valori mai mari ale vitezei medii de reacție, comparativ cu extractele etanolice, deoarece concentrația acestora în monoterpene este mai mare.

Pentru eliberările controlate din unguente, în etanol de diferite concentrații și ser fiziologic s-a urmărit spectrofotometric variația absorbantei, la 280nm din care se pot evidenția următoarele concluzii:

- cele mai bune eliberări au fost obținute în etanol 20% din unguente ce conțin atât extracte etanolice cât și uleiuri volatile obținute din pseudobacele celor două specii de *Juniperus*
- în ser fiziologic s-a eliberat cel mai bine uleiul volatil de *Juniperus communis* (Albac) și *Juniperus virginiana* (Macea, 2009).

III.4. Efectele expunerii cronice la uleiul de *Juniperus* asupra inelului de musculatură netedă traheală de șobolan

Răspunsul contractil al inelelor de MNT a fost evaluat prin determinarea curbei doză-efect la acetilcolină pentru doze cumulative cuprinse între 10^{-7} M și 10^{-4} M, iar forța de contracție generată a fost exprimată în valori absolute (cN). *Răspunsul relaxant* al inelelor de MNT a fost evaluat prin determinarea curbelor doză-efect la epinefrină, nitroprusiat de sodiu și respectiv la pirenzepină, utilizându-se pentru fiecare doze cumulative cuprinse între 10^{-7} M și 10^{-5} M. Curbele au fost obținute pe fondul precontractiei cu acetilcolină, în doză submaximală de 10^{-5} M, iar rezultatul a fost exprimat ca % de relaxare din precontractia indusă de aceasta.

1. Curba doză - efect la acetilcolină

Acetilcolina (ACh) reprezintă agonistul fiziologic răspunzător de contracția musculaturii netede a căilor respiratorii, prin acțiune pe receptorii muscarinici de tip M1 și M3. Mecanismul de semnalizare intracelulară presupune activarea unei enzime fosfolipazei C membranare și generarea de mesageri secundari [192].

În cazul receptorului M3, se formează un complex care mediază un efect bronhoconstrictor direct [192, 193], iar în cazul receptorilor M1 un efect bronhoconstrictor indirect [192, 194].

Acetilcolina acționează și asupra receptorilor muscarinici de tip M2 care au rolul unor „autoreceptori” care reglează, prin mecanism feedback negativ, eliberarea de acetilcolină la nivelul fibrei musculare traheo-bronșice [169, 193]

Rezultatele privind parametrii de apreciere globală a răspunsului contractil al musculaturii netede trahale (MNT) de șobolan la doze cumulative de acetilcolină sunt prezentate în tabelul 3.16., iar datele privind forța de contracție (cN) a MNT de șobolan la doze cumulative de acetilcolină sunt redată în tabelul 3.17. Parametrii au fost estimați cu ajutorul ecuației Hill cu patru variabile (Anexe, tabel 2A)

Tabelul 3.16. Parametrii de apreciere globală a răspunsului contractil al MNT de șobolan la doze cumulative de **acetilcolină**

	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	p
Bottom	- 0,16 ± 0,30	- 0,23 ± 0,26	- 0,12 ± 0,27	- 0,97 ± 0,72	< 0,001
Top	2,88 ± 0,28	3,59 ± 0,25	3,00 ± 0,23	5,43 ± 0,44	
LogEC₅₀	- 5,5 ± 0,14	- 5,51 ± 0,10	- 5,56 ± 0,12	- 5,76 ± 0,14	
Hill Slope	0,74 ± 0,23	0,73 ± 0,16	0,76 ± 0,20	0,57 ± 0,14	

Notă: datele sunt prezentate ca medie ± eroare standard

Tabelul 3.17. Forța de contracție (cN) a MNT de șobolan la doze cumulative de **acetilcolină**

Doze (log[M])	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4
-7	0,05 ± 0,03	0,05 ± 0,04	0,10 ± 0,03	0,05 ± 0,04
-6,5	0,34 ± 0,21	0,39 ± 0,19	0,41 ± 0,21	0,87 ± 0,39
-6	0,72 ± 0,45	0,84 ± 0,31	0,82 ± 0,45	1,63 ± 0,49
-5,5	1,46 ± 0,48	1,84 ± 0,38	1,59 ± 0,48	2,88 ± 0,52
-5	1,93 ± 0,48	2,32 ± 0,43	2,13 ± 0,44	3,61 ± 0,50
-4,5	2,49 ± 0,64	3,10 ± 0,50	2,60 ± 0,42	4,50 ± 0,49
-4	2,66 ± 0,46	3,30 ± 0,45	2,83 ± 0,46	4,82 ± 0,50

Notă: datele sunt prezentate ca medie ± eroare standard

Din analiza curbelor doză – efect rezultă că răspunsul contractil al inelelor de MNT la acetilcolină a fost mai mare în cazul loturilor de șobolani expuse cronic la uleiul de *Juniperus*, diferența fiind semnificativă statistic în cazul lotului 2 comparativ cu lotul 1 tratat cu ulei de *Juniperus*, martor ($p < 0,001$), cât și a lotului 4 expus inițial la fum de țigară comparativ cu lotul 3 expus la fum de țigară ($p < 0,001$). Deși răspunsul contractil la acetilcolină a fost mai mare în cazul lotului 3, expus cronic la fum de țigară, comparativ cu lotul 1, diferența nu a avut semnificație statistică ($p = 0,51$). Cel mai amplu răspuns contractil la acetilcolină s-a obținut în cazul lotului 4, diferența fiind semnificativă statistic comparativ răspunsul lotului 1 ($p < 0,001$) și lotul 2 ($p < 0,001$) (figura 3.62.).

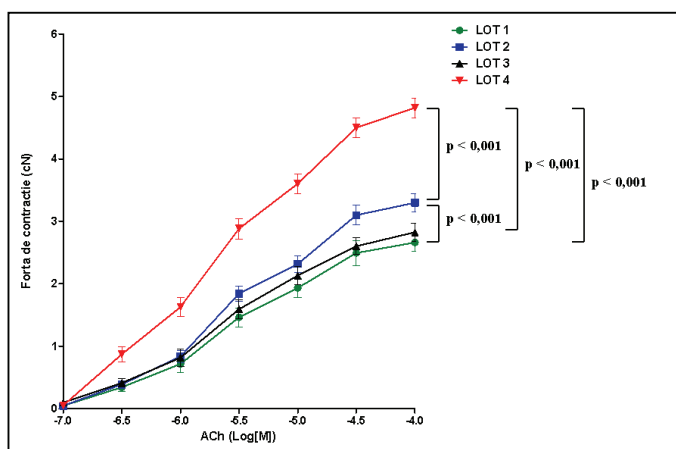


Figura 3.62. – Reprezentare grafică a curbelor doză – efect la **acetilcolină** ($10^{-7}M - 10^{-4}M$) pentru toate loturile studiate

În studiul nostru, expunerea la uleiul de *Juniperus* a determinat creșterea semnificativă a răspunsului contractil la acetilcolină, atât în cazul preparatelor de MNT normale, cât și a celor expuse inițial la fumul de țigară. Expunerea la uleiul de *Juniperus* a transformat o creștere nesemnificativă a răspunsului contractil la acetilcolină, indusă de expunerea cronică la fumul de țigară, într-o hipereactivitate la acetilcolină, caracteristică „inflamației neurogene”, cel mai probabil ca urmare a efectului „iritativ” cronic asupra epiteliului respirator [193].

Rezultatele obținute pot fi apreciate ca fiind similare datelor din literatură referitoare la componentele hiperreactivității musculare indusă de alterarea mecanismului colinergic de reglare a tonusului traheo-bronșic [195-197].

2. Curba doză - efect la epinefrină

Epinefrina (EPI) reprezintă agonistul fiziologic răspunzător de relaxarea musculaturii netede a căilor respiratorii având un efect *bronhodilatator direct* concomitent cu eliberarea de acetilcolină [198].

Rezultatele privind parametrii de apreciere globală a răspunsului contractil al MNT de șobolan la doze cumulative de epinefrină sunt prezentate în tabelul 3.18., iar datele privind forța de contracție (% din precontractia cu acetilcolină $10^{-5}M$) a MNT de șobolan la doze cumulative de epinefrină sunt redată în tabelul 3.19. Parametrii au fost estimați cu ajutorul ecuației Hill cu patru variabile (Anexe, tabel 3A).

Tabel 3.18. Parametrii de apreciere globală a răspunsului relaxant (% din precontractia cu acetilcolină $10^{-5}M$) al MNT de șobolan la doze cumulative de epinefrină

	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	P
Bottom	- 0,36 ± 2,49	-2,83 ± 5,5	1,64 ± 1,11	1,15 ± 2,27	< 0,001
Top	30,78 ± 1,29	25,85 ± 2,18	13,64 ± 0,82	16 ± 1,55	
LogIC₅₀	- 6,26 ± 0,07	- 6,32 ± 0,16	- 6,12 ± 0,09	-6,15 ± 0,14	
Hill Slope	1,44 ± 0,31	1,02 ± 0,39	2,078 ± 0,83	1,9 ± 1,13	

Notă: datele sunt prezentate ca medie ± eroare standard

Tabel 3.19. Răspunsul relaxant (% din precontractia cu acetilcolină $10^{-5}M$) al MNT de șobolan la doze cumulative de epinefrină

Doze (log[M])	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4
-7	2,12 ± 1,62	2,10 ± 1,62	2,00 ± 1,52	1,58 ± 1,14
-6,5	9,27 ± 1,18	8,31 ± 1,18	3,05 ± 1,46	3,54 ± 2,44
-6	21,63 ± 3,01	17,23 ± 3,01	9,63 ± 3,24	11,32 ± 6,30
-5,5	28,31 ± 4,97	21,66 ± 4,97	12,30 ± 3,62	14,68 ± 6,77
-5	30,40 ± 5,06	24,93 ± 5,06	14,16 ± 3,66	17,37 ± 6,83

Din analiza curbelor doză - efect rezultă că răspunsul relaxant la epinefrină a scăzut semnificativ în cazul lotului 2 tratat cu ulei de *Juniperus* comparativ cu lotul 1 martor ($p < 0,001$) și la lotul 3 expus la fumul de țigară comparativ cu lotul 1 ($p < 0,001$). Deși a crescut în cazul lotului 4 expus la fumul de țigară și tratat cu ulei de *Juniperus* comparativ cu lotul 3 ($p < 0,001$), răspunsul relaxant la epinefrină a rămas semnificativ mai mic comparativ cu lotul 1 ($p < 0,001$) (figura 3.63).

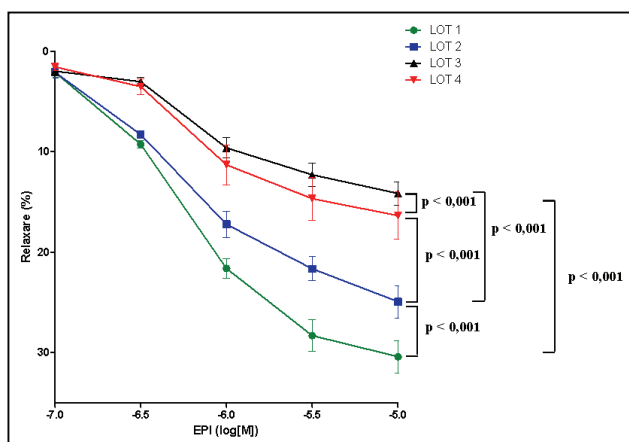


Figura 3.63. - *Reprezentare grafică a curbelor doză – efect la epinefrină ($10^{-7}M - 10^{-4}M$) pentru toate loturile studiate*

În studiul nostru, expunerea cronică la uleiul de *Juniperus* a determinat scăderea semnificativă a răspunsului relaxant indus de epinefrină. În contextul unei hiperreactivității la acetilcolină, acest rezultat poate fi considerat parte a „disbalanței” mecanismelor nervoase de reglare a tonusului traheo-bronșic, caracteristică „inflamației neurogene”. Această disbalanță poate îmbrăca două aspecte: pe de o parte „disbalanța” dintre componenta simpatică bronhodilatatoare și cea parasimpatică bronhoconstrictoare, iar pe de altă parte „disbalanța” dintre componenta simpatică β_2 - adrenergică, bronhodilatatoare și componenta α_1 - adrenergică, bronhoconstrictoare.

În virtutea datelor din literatură, mecanismul cel mai probabil este reprezentat de reducerea efectului inhibitor al epinefrinei asupra eliberării prejoncționale a acetilcolinei și inactivarea receptorilor β_2 -adrenergici exprimați de fibra musculară traheo-bronșică [167]. În contextul studiului nostru, în cadrul căruia s-a obținut un răspuns bronhoconstrictor paradoxal la doze de epinefrină mai mare de $10^{-5}M$, nu poate fi neglijată nici posibilitatea implicării unui mecanism bronhoconstrictor mediat de receptorii α_1 - adrenergici (cale de semnalizare intracelulară similară receptorilor M1), exprimați atât la nivelul fibrelor musculare traheo-bronșice, cât și, la nivel prejoncțional, în ganglionii colinergici intramurali și fibrele colinergice postganglionare [171,199]

3. Curba doză - efect la nitroprusiatul de sodiu

Nitroprusiatul de sodiu reprezintă un donor de oxid nitric (NO). În studiul nostru am pornit de la premisa că NO exogen are un efect bronhodilatator direct prin activarea *guilatciclazei* solubile și creșterea GMPc (guanozinmonofosfat) la nivelul fibrei musculare traheo-bronșice. Răspunsul bronhodilatator nu poate fi influențat decât de măsura în care molecula de NO exogenă este transformată, în prezența unor factori oxidanți, într-o moleculă citotoxică de tipul peroxinitritului ($ONOO^-$) cu efect bronhoconstrictor direct. În acest sens, cel mai important aspect îl reprezintă păstrarea „bioactivității” moleculei de NO în prezența anionului superoxid ($O_2^{\cdot-}$), produs de celulele inflamatorii din căile respiratorii sau prezent în componența fumului de țigară [176].

Rezultatele privind parametrii de apreciere globală a răspunsului contractil al MNT de șobolan la doze cumulative de nitroprusiat de sodiu sunt prezentate în

tabelul 3.20., iar datele privind forța de contracție (% din precontractia cu acetilcolină $10^{-5}M$) a MNT de șobolan la doze cumulative de nitroprusiat de sodiu sunt redată în tabelul 3.21. Parametrii sunt estimați cu ajutorul ecuației Hill cu patru variabile (Anexe, tabel 4A).

Tabel 3.20. Parametrii de apreciere globală a răspunsului relaxant (% din precontractia cu acetilcolină $10^{-5}M$) al MNT de șobolan la doze cumulative de nitroprusiat de sodiu

	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	P
Bottom	0,14 ± 1,40	-0,48 ± 3,97	1,06 ± 0,55	-2,78 ± 4,48	< 0,001
Top	26,09 ± 1,28	29,72 ± 1,52	21,63 ± 0,72	27,9 ± 1,89	
LogIC₅₀	- 6,03 ± 0,05	- 6,42 ± 0,09	- 5,90 ± 0,03	-6,31 ± 0,12	
Hill Slope	1,35 ± 0,26	1,73 ± 0,60	1,84 ± 0,26	1,19 ± 0,39	

Notă: datele sunt prezentate ca medie ± eroare standard

Tabel 3.21. Răspunsul relaxant (% din precontractia cu acetilcolină $10^{-5}M$) al MNT de șobolan la doze cumulative de nitroprusiat de sodiu

Doze (log[M])	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4
-7	1,17 ± 1,12	2,29 ± 1,12	1,03 ± 0,41	1,24 ± 1,16
-6,5	5,41 ± 0,78	12,29 ± 0,78	2,90 ± 0,57	8,65 ± 1,29
-6	13,42 ± 1,96	25,22 ± 1,96	9,11 ± 1,45	18,76 ± 2,69
-5,5	22,40 ± 3,44	28,37 ± 3,44	18,67 ± 2,14	24,88 ± 5,74
-5	24,88 ± 3,73	30,07 ± 3,73	21,10 ± 2,71	27,11 ± 6,32

Notă: datele sunt prezentate ca medie ± eroare standard

Din analiza curbelor doză - efect rezultă că răspunsul relaxant la nitroprusiatul de sodiu a crescut în cazul loturilor expuse cronic la uleiul de *Juniperus*, diferența fiind semnificativă statistic în cazul lotului 2 ($p < 0,001$) comparativ cu lotul 1, cât și în cazul lotului 4 comparativ cu lotul 3 ($p < 0,001$). Răspunsul relaxant al inelelor de MNT la nitroprusiatul de sodiu a fost mai mic în cazul lozurilor de șobolani expuse cronic la fumul de țigară, diferența fiind semnificativă statistic în cazul lotului 3 comparativ cu lotul 1 ($p < 0,001$). Cel mai amplu răspuns relaxant la nitroprusiatul de sodiu s-a obținut în cazul lotului 2, diferența fiind semnificativ mai mare comparativ cu lotul 3 ($p = 0,003$) și lotul 4 ($p = 0,003$) (figura 3.64.).

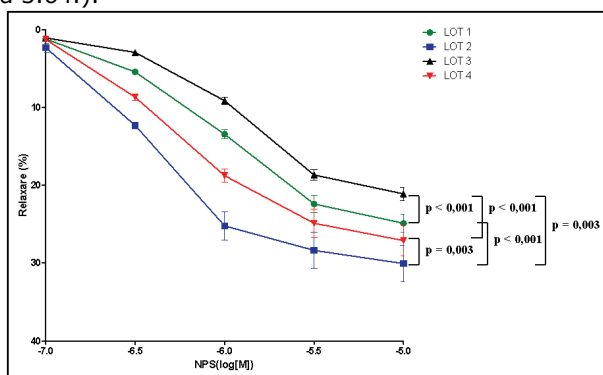


Figura 3.59. - Reprezentare grafică a curbelor doză - efect la nitroprusiat de sodiu ($10^{-7}M - 10^{-4}M$) pentru toate loturile studiate

În studiul nostru, expunerea la uleiul de *Juniperus* a determinat creșterea răspunsului relaxant la nitroprusiatul de sodiu, atât în cazul preparatelor de MNT

normale, cât și a celor expuse inițial la fumul de țigară. Acest efect dovedește că uleiul de *Juniperus* are în compoziția sa substanțe cu proprietăți antioxidante, care împiedică inactivarea NO exogen prin transformarea sa în peroxinitrit (ONOO^-). În contextul datelor din literatură, rezultatul obținut ne permite să apreciem că efectul rămâne valabil și în cazul NO endogen, chiar dacă, în condițiile „inflamației neurogene”, are loc pe de o parte, scăderea producției de NO cu rol de neurotransmițător în cadrul sistemului NANCi și pe de altă parte, creșterea producției de NO ca moleculă citotoxică prin activarea NOSi [170].

4. Curba doză - efect la pirenzepină

Pirenzepina este un antagonist selectiv al receptorilor muscarinici de tip M1 [167, 168].

Rezultatele privind parametrii de apreciere globală a răspunsului contractil al MNT de șobolan la doze cumulative de pirenzepină sunt prezentate în tabelul 3.22., iar datele privind forța de contracție (% din precontractia cu acetilcolină 10^{-5}M) a MNT de șobolan la doze cumulative de pirenzepină sunt redate în tabelul 3.23. Parametrii sunt estimați cu ajutorul ecuației Hill cu patru variabile (Anexe, tabel 5A)

Tabel 3.22. Parametrii de apreciere globală a răspunsului relaxant (% din precontractia cu acetilcolină 10^{-5}M) al MNT de șobolan la doze cumulative de pirenzepină

	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	P
Bottom	$0,77 \pm 2,19$	$-0,40 \pm 2,31$	$0,34 \pm 2,81$	$-5,5 \pm 5,39$	< 0,001
Top	$95,68 \pm 1,52$	$95,36 \pm 1,62$	$96,20 \pm 2,10$	$103,9 \pm 5,40$	
LogIC₅₀	$-6,17 \pm 0,02$	$-6,15 \pm 0,02$	$-6,10 \pm 0,02$	$-5,99 \pm 0,05$	
Hill Slope	$3,00 \pm 0,32$	$2,24 \pm 0,22$	$2,34 \pm 0,34$	$1,22 \pm 0,21$	

Notă: datele sunt prezentate ca medie \pm eroare standard

Tabel 3.23. Răspunsul relaxant (% din precontractia cu acetilcolină 10^{-5}M) al MNT de șobolan la doze cumulative de pirenzepină

Doze (log[M])	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4
-7	$1,42 \pm 0,45$	$1,74 \pm 0,95$	$2,21 \pm 2,69$	$1,75 \pm 1,67$
-6,5	$9,40 \pm 5,83$	$11,79 \pm 5,83$	$8,67 \pm 5,36$	$13,46 \pm 7,09$
-6	$74,32 \pm 10,76$	$66,93 \pm 10,74$	$62,19 \pm 8,44$	$51,69 \pm 12,72$
-5,5	$90,74 \pm 5,25$	$86,66 \pm 5,25$	$88,54 \pm 12,76$	$79,99 \pm 11,24$
-5	$99,42 \pm 1,28$	$99,59 \pm 1,28$	$99,28 \pm 1,01$	$98,87 \pm 2,68$

Notă: datele sunt prezentate ca medie \pm eroare standard

Din analiza curbelor doză – efect rezultă că răspunsul relaxant la pirenzepină a scăzut în cazul loturilor expuse cronic la uleiul de *Juniperus*, diferența fiind semnificativă statistic în cazul lotului 2 ($p = 0,04$) comparativ cu lotul 1, cât și în cazul lotului 4 comparativ cu lotul 3 ($p = 0,002$). Răspunsul relaxant al inelelor de MNT la pirenzepină a fost mai mic în cazul loturilor de șobolani expuse cronic la fumul de țigară, diferența fiind semnificativă statistic în cazul lotului 3 comparativ cu lotul 1 ($p = 0,005$). Cel mai mic răspuns relaxant la pirenzepină s-a obținut în cazul lotului 4, diferența fiind semnificativă statistic comparativ cu lotul 1 ($p < 0,001$) și lotul 2 ($p < 0,001$) (figura 3.64.).

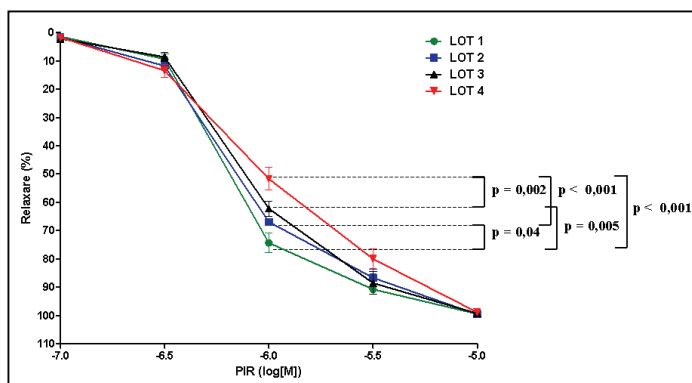


Figura 3.64. - Reprezentare grafică a curbelor doză - efect la pirenzepină ($10^{-7}M - 10^{-4}M$) pentru toate loturile studiate

În studiul nostru, expunerea la uleiul de *Juniperus* a determinat scăderea răspunsului relaxant la pirenzepină, atât în cazul preparatelor de MNT normale, cât și a celor expuse inițial la fumul de țigară. Acest rezultat, subliniază mecanismul complex al hiperreactivității la acetilcolină, indusă de componente ale uleiului de *Juniperus*, care implică cu certitudine și efectul bronhoconstrictor indirect, mediat de receptorii M1 [200].

5. Examenul histopatologic

S-au evaluat modificările histopatologice induse de fumul de țigară și/sau expunerea la uleiul de *Juniperus* asupra traheei și a parenchimului pulmonar, prin secțiuni colorate cu hematoxină-eozină (tehnica standard) aplicată tuturor preparatelor studiate. Pentru compararea rezultatelor s-au utilizat fragmente de trahee (figura 3.65.) și de plămân (figura 3.66.) prelevate de la șobolani neexpuși (proba martor) care au constituit **lotul 1**.

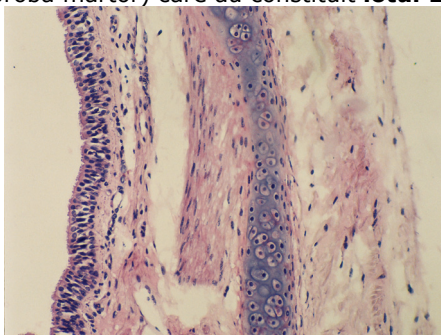


Figura 3.65. - Secțiune prin trahee. Lot de șobolani neexpuși. Fără alterari ale epiteliului de suprafață (HE x 200)

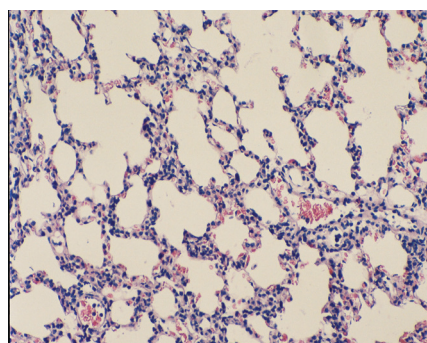


Figura 3.66. - Secțiune histologică din plămân. Lot șobolani neexpuși. Aspecte cvasinormale: septuri alveolare subțiri, rare capilare hiperemiate și celule inflamatorii (col.HE x 200)

Expunerea la fumul de țigară (lotul 3)

Principalele modificări induse de expunerea cronică la fumul de țigară, în cazul preparatelor de **trahee**, au fost: prezența ariilor extinse de denudare ale epitelului respirator, alternând cu o îngroșare neuniformă a epitelului respirator, hiperplazia celulelor caliciforme în epiteliul respirator, edemul laminei propria, cu congestie venulo-capilară, respectiv infiltrat inflamator polimorf, localizat subepitelial și perivascular, în care s-a remarcat prezența macrofagelor, precum și microfocare supurative extinse în toată grosimea traheei și peritraheal (figura 3.67., figura 3.68., figura 3.69.).

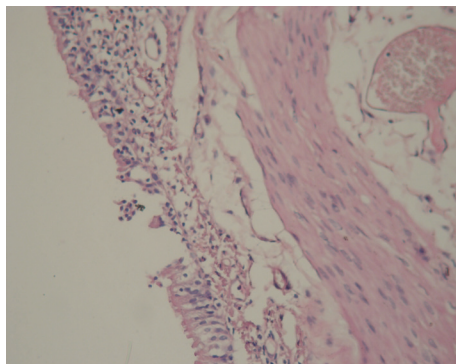


Figura 3.67. - Secțiune prin trahee. Lot șobolani expuși la fumul de țigară. Arie extinsă de exulcerare focală a epitelului respirator; abundent infiltrat inflamator subepitelial și perivascular (col. HE x 200)

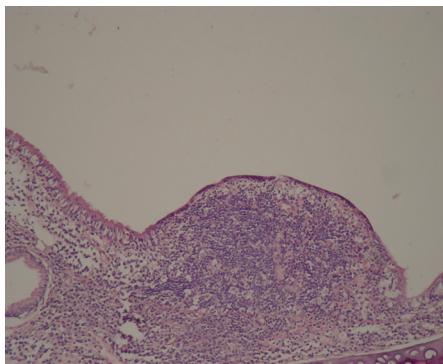


Figura 3.68. - Secțiune prin trahee. Lot șobolani expuși la fumul de țigară. Mucoasă traheală cu îngroșare neuniformă a epitelului, limfocite în migrare intraepitelial, infiltrat inflamator polimorf subepitelial și perivascular, congestie venulo-capilară în lamina propria (col. HE x 400).

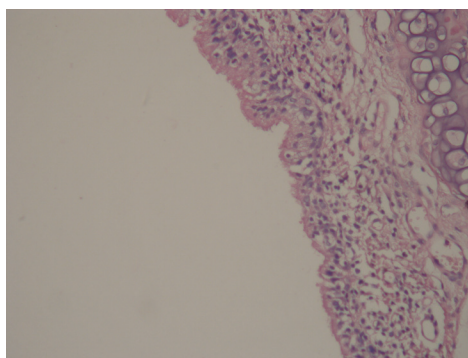


Figura 3.69. - Secțiune prin trahee. Lot șobolani expuși la fumul de țigară. Exulcerare extinsă a epitelului mucoasei în dreptul hiperplaziei țesutului limfoid, în care se remarcă macrofage, hiperplazia celulelor caliciforme în epiteliul respirator; submucoasa cu infiltrat inflamator polimorf, microfocare supurative extinse în toată grosimea traheei și peritraheal (col. HE x 200)

Principalele modificări induse de expunerea cronică la fumul de țigară în cazul preparatelor de **plămâni** au fost: prezența unor focare de emfizem pulmonar, alternând cu alveole pulmonare ușor colabate și emfizemul pulmonar predominant panacinar, generalizat sau mai evident subpleural, cu ducte alveolare și alveole destinse, septuri alveolare subțiri și pe alocuri rupte (figura 3.70., figura 3.71.).

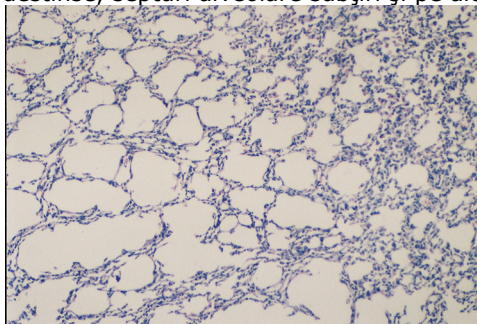


Figura 3.70. - Secțiune prin plămâni. Lot șobolani expuși la fumul de țigară. Focare de emfizem pulmonar alternând cu alveole pulmonare ușor colabate (HE x 200)

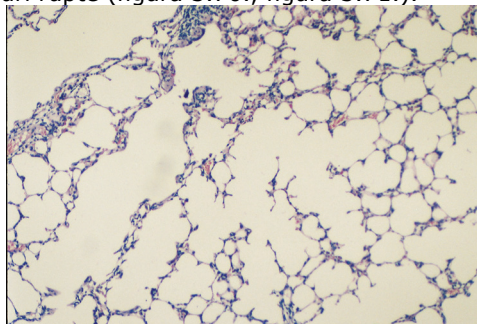


Figura 3.71. - Secțiune prin plămâni. Lot șobolani expuși la fumul de țigară. Emfizem pulmonar panacinar. Ducte alveolare și alveole destinse; septuri alveolare subțiri, rupte (col.HE x 200)

Expunerea la uleiul de *Juniperus* (lotul 2)

Principalele modificări induse de expunerea cronică la uleiul de *Juniperus*, în cazul preparatelor de **trahee**, au fost: arii discrete de exulcerare ale epitelului mucoasei, aspecte de discretă traheită cronică, nespecifică, cu moderată fibroză a laminei propria și a submucoasei, infiltrat inflamator polimorf la nivelul mucoasei traheale (figura 3.72., figura 3.73., figura 3.74.).

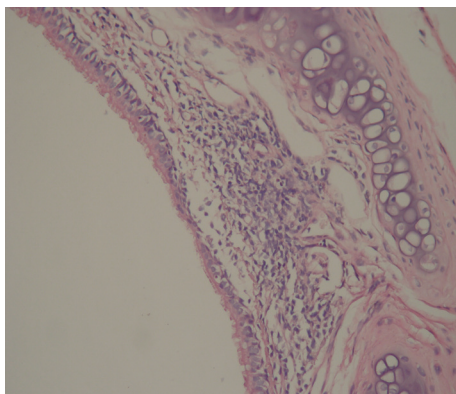


Figura 3.72. - Secțiune prin trahee. Lot șobolani expuși la uleiul de ienupăr. Discretă arie de exulcerare a epitelului mucoasei în dreptul unei proliferări limfoide difuze în lamina propria (col. HE x 400)

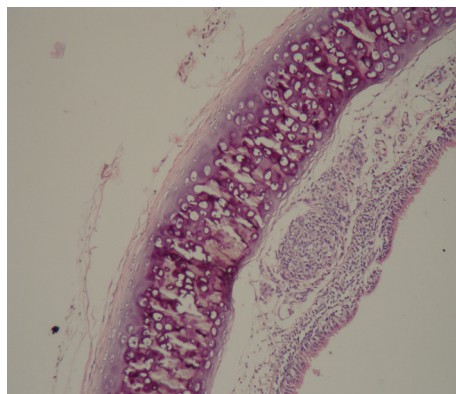


Figura 3.73. - Secțiune prin trahee. Lot șobolani expuși la uleiul de ienupăr. Aspecte de discretă traheită cronică, nespecifică, cu acumulare de țesut limfoid și moderată fibroză a laminei propria și submucoasei (col. HE x 100).

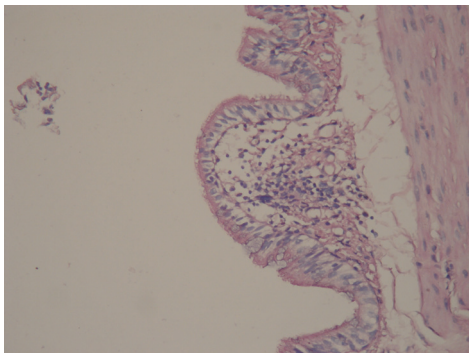


Figura 3.74. - Secțiune prin trahee. Lot șobolani expuși la uleiul de ienupăr. Transformare pseudopolipoidă a mucoasei traheale cu axe conjunctive, edemațiate cu infiltrat inflamator polimorf (col. HE x 200)

Expunerea la fumul de țigară și uleiul de *Juniperus* (lotul 4)

Nu s-au obținut diferențe semnificative între modificările histopatologice ale preparatelor de trahee și plămâni obținute de la lotul 4 și lotul 3.

Concluzii

- Componente ale uleiului de *Juniperus*, administrat prin nebulizare, au avut un efect „iritativ” asupra mucoasei căilor respiratorii la șobolan și au determinat „inflamația neurogenă” a căilor traheo-bronșice, caracterizată funcțional prin hiperreactivitatea inelului de musculatură netedă traheală la acetilcolină și susținută morfologic prin leziunile epitelului traheal și prezența infiltratului inflamator.
- Expunerea cronică la uleiul de *Juniperus*, administrat prin nebulizare, a determinat alterarea mecanismelor fiziologice de reglare neurogenă a tonusului traheo-bronșic, cu apariția „disbalanței” dintre componenta simpatică, bronhodilatatoare și componenta parasimpatică, bronhoconstrictoare, respectiv a „disbalanței” dintre componenta simpatică $\beta 2$ - adrenergică, bronhodilatatoare și componenta simpatică $\alpha 1$ - adrenergică, bronhoconstrictoare.
- Pe fondul unor leziuni inflamatorii preexistente ale căilor respiratorii, induse de expunerea cronică la fumul de țigară, componente ale uleiului de *Juniperus*, administrat prin nebulizare, au potențat răspunsul bronhoconstrictor al inelului de musculatură netedă traheală, evaluat în baia de organ izolat, și nu au influențat infiltratul inflamator, evidențiat prin studiu morfologic, de la nivelul acestuia.
- Componente ale uleiului de *Juniperus*, administrat prin nebulizare, au crescut „bioactivitatea” oxidului nitric de la nivelul căilor respiratorii de șobolan, atât în condiții normale, cât și în condițiile unor leziuni preexistente, induse de expunerea cronică la fumul de țigară.
- Componente ale uleiului de *Juniperus* exercită, pe de o parte efecte pozitive, antioxidante, care facilitează răspunsul bronhodilatator mediat de oxidul nitric (NANCI) la nivelul căilor respiratorii de șobolan, și, pe de altă parte, exercită efecte negative, iritative și proinflamatorii, determinate cel mai probabil de calea de administrare prin nebulizare.

Rezultatele obținute au făcut obiectul a două lucrări științifice publicate în *European Journal of Medical Research*, Berlin, Germania, 2010 [201] și în „*Studia Universitatis „Vasile Goldiș”, Seria Științele Vieții*”, **2011**, 21(2), 319-327 [202].

Activitatea antimicrobiană a extractelor din frunze aciculare și pseudobace de *Juniperus communis* și *Juniperus virginiana*

Conform datelor de literatură, α -pinenul, limonenul, δ -3-carenul, terpinen-4-olul, α -terpineolul și β -cariofilenul [30] prezintă activitate antimicrobiană, iar *p*-cimenul a inhibat doar tulpina *S. aureus* [203].

Activitatea antimicrobiană, a extractelor *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana* obținute cu ajutorul instalației micropilot prevăzută cu generator de ultrasunete și concentrate la evaporatorul rotativ, a fost testată prin aprecierea gradului de inhibare a unor microorganisme patogene, *in vitro*. Testarea extractelor s-a efectuat atât pe microorganisme din specia bacteriilor gram pozitive cât și gram negative.

Reacția culturilor de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulazopozitiv*, *Proteus*, *Piocianic* și *Escherichia coli* la acțiunea extractelor alcoolice din frunze aciculare și pseudobace de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana* este redată în figura 3.75.

În ceea ce privește acțiunea antimicrobiană față de *Staphylococcus aureus* (figura 3.75.a) pentru care în literatura [204] este menționată activitatea extractului apos din microblaste de *Juniperus lucayana*, noi am avut o reacție pozitivă pentru extractul etanolic din frunze aciculare de *Juniperus communis* (Lipova). Diametrul zonei de inhibiție a fost de 17,56mm (reprezentat în figura 3.75. printr-un halou verde).

De remarcat este faptul că, celelalte specii de microorganisme patogene utilizate s-au dovedit a fi rezistente la acțiunea extractelor de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana* analizate (simbolizate, în figura 3.75, cu un halou roșu).

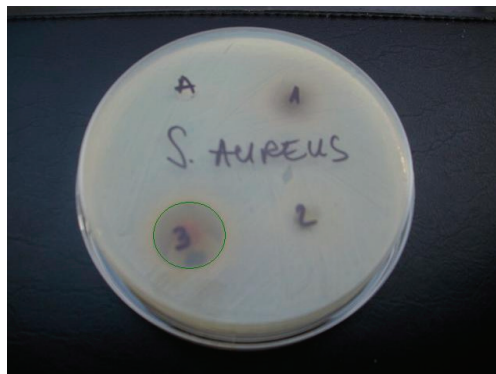
(a) *Staphylococcus aureus*(b) *Staphylococcus coagulazo-negativ*(c) *Pseudomonas aeruginosa*(d) *Proteus*(e) *Escherichia coli*

Figura 3.75. - Reacția culturilor de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulazo-pozitiv*, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Escherichia coli* la acțiunea extractelor alcoolice din frunze aciculare și pseudobace de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana* unde A= Alcool etilic 96%, 1=extract etanolic din frunze aciculare de *Juniperus virginiana* (Grădina Botanică „Macea”), 2= extract etanolic din pseudobace de *Juniperus virginiana* (Grădina Botanică „Macea”), 3= extract etanolic din frunze aciculare de *Juniperus communis* (Lipova)

CONCLUZII

În cadrul primei părți a tezei s-a realizat o prezentare a datelor din literatură privind stadiul actual al cunoașterii în domeniul speciilor de *Juniperus* din familia *Cupressaceae* și a posibilelor aplicații în industria farmaceutică, cosmetică, alimentară, sau ca antioxidanți naturali. Un subcapitol al lucrării privește compușii naturali cu schelet izoprenic, în particular compușii terpenici prezenți în compoziția extractelor obținute din *Juniperus*.

În prima etapă parte a cercetărilor experimentale proprii s-a urmărit folosirea unor metode de extracție și a unor solvenți, pentru îmbunătățirea randamentului de extracție și anume: extracția prin refluxare folosind șase solvenți organici, extracție prin ultrasunare în patru solvenți organici și extracția prin antrenare de vapori de apă.

În majoritatea datelor de literatură găsite, pentru obținerea uleiului esențial de *Juniperus*, ca metodă de extracție s-a folosit hidrodistilarea.

Pentru testarea activității antimicrobiene și obținerea unei cantități mai mari de extract am realizat o instalație micropilot pentru extracție. Această instalație de concepție proprie este formată dintr-un minireactor de laborator prevăzut cu un generator de ultrasunete și un sistem de agitare și control al temperaturii cu ajutorul unei instalații automatizate de reglare a acesteia.

Pentru determinarea cantitativă a compușilor terpenici din extracte cloroformice de *Juniperus* s-a apelat la gaz cromatografie cu ionizare în flacără după trasarea curbilor de etalonare pentru standardele de α -pinen și limonen.

Protejarea și eliberarea controlată a biocompușilor din extractele și uleiurile volatile de *Juniperus communis* L. și *Juniperus virginiana* L. (pseudobace) de diverse proveniențe s-a realizat prin micro/nanoîncapsularea în β -ciclodextrină. Imediat după obținerea nanocapsulelor s-au determinat randamentele de recuperare a nanocristalelor ca raport dintre masa de nanoparticule obținută și suma maselor de biocompuși (calculată) și β -ciclodextrină utilizate la nanoîncapsulare.

Pentru caracterizarea nanocapsulelor s-a realizat identificarea unor compuși terpenici prin spectroscopie UV-VIS folosind standarde de β -pinen, *p*-cimen, 1-terpinen-4-ol și limonen.

Cantitatea foarte mare de date de gaz cromatografie obținută în urma analizei gaz cromatografice cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS) a extractelor a fost evaluată cu un instrument statistic (analiza componentelor principale - PCA – Principal Component Analysis) aplicabil în cazul matricilor (bidimensionale sau chiar multidimensionale) de date cu un număr mare de variabile.

Analiza statistică multivariată a datelor GC a fost realizată utilizând analiza PCA pentru concentrațiile relative ale principalilor biocompuși identificați în extractele de *Juniperus*. Această procedură s-a utilizat pentru identificarea importanței unor compuși bioactivi la gruparea probelor (funcție de specie, partea anatomică a plantei și sursa de proveniență, dar și după metoda de extracție sau solventul utilizat pentru extracție).

Pentru studiul efectelor asupra inelului de musculatură netedă traheală de șobolan a expunerii cronice la uleiul de *Juniperus* s-a utilizat baia de organ izolat și s-a realizat și examenul histopatologic al traheei și plămânului animalului de experiență analizat.

În cea de-a doua etapă a cercetărilor experimentale proprii s-a urmărit caracterizarea chimică a extractelor obținute utilizând cromatografia de gaze cuplată

cu spectrometria de masă, cromatografia de lichide de înaltă performanță și spectrofotometria de ultraviolet-vizibil.

Pentru cromatografia de gaze cuplată cu spectrometria de masă s-a făcut extracția în acetat de etil, alcool etilic, cloroform, hexan, tetrahidrofuran, toluen. Au fost identificați, în unele extracte peste 100 de compuși volatili, dintre care 29 sunt preponderenți:

- în extractul obținut prin refluxare din frunze aciculare de *Juniperus communis*: α -pinen, limonen, β -cubeben, β -felandren, β -pinen, cariofilen, copaen, α -humulen, τ -cadinen, β -cadinen, τ -elemen, τ -cadinol, carveol, *p*-cimen;
- în extractul obținut prin refluxare din frunze aciculare de *Juniperus virginiana*: hedicariol, germacren D, α -pinen, cariofilen, limonen, *cis*- β -terpineol, β -cadinen, β -pinen, τ -cadinen, β -elemen, τ -elemen, τ -terpinen, terpinolen, α -humulen, β -felandren, 3-caren, β -cubeben, linalool, cedren, camfen, copaen, ocimen, *cis*-verbenol, D-verbenona, bisabolen epoxid, *p*-cimen;
- în extractul obținut prin refluxare din pseudobace de *Juniperus communis*: α -pinen, β -felandren, β -pinen, β -cubeben, limonen, germacren D, τ -elemen, β -elemen, cariofilen, α -humulen, β -cadinen, terpinolen, *cis*- β -terpineol, 3-caren, spatulenol, linalool, τ -terpinen, τ -cadinen, copaen, camfen, carveol, τ -cadinol, *cis*-verbenol, D-verbenona, bisabolen epoxid, *p*-cimen;
- în extractul obținut prin refluxare din pseudobace de *Juniperus virginiana*: β -felandren, germacren D, β -pinen, α -pinen, cariofilen, β -cubeben, τ -terpinen, *cis*- β -terpineol, terpinolen, β -elemen, τ -cadinen, β -cadinen, α -humulen, τ -elemen, carveol, linalool, camfen, limonen, bisabolen epoxid, *p*-cimen;
- în extractul obținut prin refluxare din microblaste de *Juniperus communis*: α -pinen, β -pinen, copaen, limonen, β -cubeben, terpinolen, τ -cadinol, cariofilen, bisabolen epoxid, 3-caren, τ -cadinen, β -felandren, carveol, *cis*-verbenol, α -humulen, camfen, D-verbenona, β -elemen, β -cadinen, τ -elemen, ocimen, *p*-cimen;
- în extractul obținut prin refluxare din microblaste de *Juniperus virginiana*: α -pinen, 3-caren, germacren D, β -elemen, β -felandren, τ -elemen, β -cubeben, β -cadinen, cariofilen, carveol, α -humulen, τ -cadinen, limonen, spatulenol, bisabolen epoxid, copaen, β -pinen, τ -cadinol, ocimen, *cis*-verbenol, *cis*- β -terpineol, D-verbenona, camfen, terpinolen, *p*-cimen;
- în extractul obținut prin ultrasonare din frunze aciculare de *Juniperus communis*: α -pinen, germacren D, β -felandren, β -elemen, β -cubeben, 3-caren, τ -elemen, β -pinen, β -cadinen, limonen, α -humulen, cariofilen, bisabolen epoxid, terpinolen, τ -cadinen, spatulenol, copaen, *cis*-verbenol, *cis*- β -terpineol, camfen, τ -terpinen, D-verbenona, carveol, ocimen, τ -cadinol, *p*-cimen;
- în extractul obținut prin ultrasonare din frunze aciculare de *Juniperus virginiana*: α -pinen, cariofilen, β -cubeben, β -felandren, α -humulen, β -cadinen, bisabolen epoxid, 3-caren, limonen, τ -cadinen, β -pinen, copaen, τ -elemen, *cis*-verbenol, D-verbenona, ocimen, germacren D, β -elemen, terpinolen, *cis*- β -terpineol, carveol;

- în extractul obținut prin ultrasonare din pseudobace de *Juniperus communis*: α -pinen, β -felandren, β -pinen, β -cubeben, τ -elemen, cariofilen, α -humulen, β -elemen, limonen, germacren D, terpinolen, β -cadinen, *cis*- β -terpineol, spatulenol, 3-caren, copaen, τ -terpinen, τ -cadinen, camfen, linalool, bisabolen epoxid, *cis*-verbenol, carveol, cedren, τ -cadinol, D-verbenona, ocimen;
- în extractul obținut prin ultrasonare din pseudobace de *Juniperus virginiana*: β -felandren, germacren D, β -cubeben, cariofilen, β -pinen, α -pinen, limonen, *cis*- β -terpineol, τ -elemen, terpinolen, β -elemen, α -humulen, spatulenol, linalool, τ -cadinol, τ -terpinen, 3-caren, carveol, camfen, *p*-cimen;
- în extractul obținut prin ultrasonare din microblaste de *Juniperus communis*: α -pinen, β -felandren, germacren D, limonen, β -cubeben, β -pinen, β -elemen, τ -elemen, *cis*- β -terpineol, β -cadinen, cariofilen, *cis*-verbenol, spatulenol, 3-caren, α -humulen, τ -cadinen, τ -cadinol, terpinolen, τ -terpinen, D-verbenona, cedren, camfen, copaen, carveol, bisabolen epoxid, ocimen, *p*-cimen;
- în extractul obținut prin ultrasonare din microblaste de *Juniperus virginiana*: α -pinen, β -felandren, cariofilen, germacren D, 3-caren, β -pinen, linalool, limonen, *cis*- β -terpineol, α -humulen, terpinolen, camfen, β -elemen, β -cadinen, τ -terpinen, *cis*-verbenol, cedren, ocimen;
- în extractul obținut prin hidrodistilare din pseudobace de *Juniperus communis*: α -pinen, β -cubeben, β -felandren, τ -elemen, β -pinen, β -elemen, β -cadinen, limonen, α -humulen, cariofilen, terpinolen, spatulenol, τ -cadinen, τ -cadinol, copaen, camfen, cedren, linalool, *cis*- β -terpineol, germacren D;
- în extractul obținut prin hidrodistilare din pseudobace de *Juniperus virginiana*: β -felandren, α -pinen, β -pinen, limonen, spatulenol, β -elemen, α -humulen, β -cubeben, τ -elemen, β -cadinen, τ -cadinol, carveol, τ -cadinen, cariofilen, copaen, 3-caren.

Din rezultatele obținute la extracția prin refluxare și ultrasonare din speciile de *Juniperus* analizate, cu privire la solvent și partea anatomică analizată, s-au constatat următoarele:

- cel mai bun solvent pentru extracția asistată de ultrasunete a fost hexanul, iar pentru refluxare a fost acetatul de etil;
- pseudobacele conțin un procent mai mare de compuși volatili în comparație cu frunzele aciculare și microblastele.

În urma analizei statistice multivariate a componentelor principale pentru extractele în hexan și acetat de etil obținute prin refluxare s-a ajuns la concluzia că metoda de extracție și hidrofobicitatea solventului utilizat pentru aceste extracții nu a prezentat o influență semnificativă în ceea ce privește compoziția compușilor volatili.

Analiza prin cromatografie în strat subțire a probelor de uleiuri esențiale de *Juniperus*, a scos la iveală importanța monoterpenelor, sesquiterpenelor și alcoolilor corespunzătoare, ceea ce a făcut dificilă evaluarea prezenței cineolului și guaiazulenei în uleiurile esențiale de *Juniperus*.

Dozarea terpenelor, din extractele etanolicе și hidrodistilate, s-a realizat prin spectroscopie UV-VIS folosind standardele de β -pinen, *p*-cimen, limonen, 1-terpinen-4-ol.

Spectrele UV-VIS au evidențiat existența unor benzi în domenii comune cu cele ale standardelor folosite: domeniul 220-260nm.

Conținutul total de terpeni exprimat ca și concentrație echivalentă de: a) *p*-cimen a fost între 0,014g/mL și 0,036g/mL; b) limonen a variat între 0,019g/mL și 0,062g/mL. Minimele și maximele concentrației standardelor s-au înregistrat în cazul aceluiași extracte, respectiv extract etanolic de *Juniperus communis* Macea-2008 și extract etanolic de *Juniperus communis* Austria.

Prezența flavonoidelor, din extractele alcoolice, a fost studiată sub aspect cantitativ prin cromatografie de lichide de înaltă performanță. În extractele analizate au fost determinate rutina, quercetina, crisina și flavona. S-a constatat că:

- rutina se găsește în majoritatea extractelor analizate (concentrația maximă găsită 0,298mg/mL în extractul din frunze aciculare de *Juniperus virginiana* Macea-2009);
- quercetina a fost identificată în toate extractele (concentrația maximă a fost 0,271mg/mL în extractul din pseudobace de *Juniperus virginiana* Macea-2008);
- crisina și flavona au fost prezente doar în două din extractele analizate: în extractul din frunze aciculare de *Juniperus virginiana* Macea-2009 (0,0002mg/mL) și în extractul din pseudobace de *Juniperus communis* Albac-2010 (0,028mg/mL), respectiv flavona în extractul din pseudobace de *Juniperus communis* Lipova (0,009mg/mL) și extractul din frunze aciculare de *Juniperus communis* Suedia (0,013mg/mL).

Pentru analiza activității antioxidante a extractelor alcoolice și în acetat de etil s-a utilizat metoda spectrofotometrică, cu DPPH. Capacitatea de captare a radicalilor liberi (*scavenging*) s-a exprimat în funcție de viteza medie de reacție:

- cea mai mare viteză de reacție s-a înregistrat în primele 8 minute de analiză, în cazul extractului în acetat de etil din frunze aciculare de *Juniperus communis* provenite din Austria – 1,22μM/s.

Eliberarea controlată din nanocapsule, în etanol de diferite concentrații, s-a urmărit spectrofotometric prin variația absorbanței, la 275nm, timp de 14,5 minute. Interpretarea eliberărilor controlate s-a realizat funcție de monoterpene în cazul uleiurilor volatile și față de flavonoidul rutină pentru extractele etanolice. Rezultatele au fost următoarele:

- în cazul complexilor ce conțin extracte etanolice, valorile vitezei medii au fost mai mari în primele 8 minute, iar extractul de *Juniperus virginiana* (Macea-2009) a prezentat cea mai mare valoare (40μM/s);
- complexii ce conțin uleiuri volatile au prezentat valori apropiate pentru cele două intervale luate în considerare. Cea mai mare valoare s-a înregistrat în cazul extractului de *Juniperus virginiana*, Macea-2008 (23,8 mM/s);
- complexii ce conțin uleiuri volatile au prezentat valori mai mari ale vitezei medii de reacție, comparativ cu extractele etanolice, deoarece concentrația acestora în monoterpene este mai mare;
- în cazul extractelor etanolice rezultatele vitezei medii de reacție sunt descrescătoare, în paralel cu scăderea concentrației alcoolului.

Partea finală a lucrării cuprinde studiul efectelor asupra inelului de musculatură netedă traheală de șobolan a expunerii cronice la uleiul de *Juniperus*.

Pe baza rezultatelor obținute se pare că unii componenți ai uleiului de *Juniperus*, administrat prin nebulizare:

- au avut un efect „iritativ” asupra mucoasei căilor respiratorii la șobolan și au determinat „inflamația neurogenă” a căilor traheo-bronșice;
- au crescut „bioactivitatea” oxidului nitric de la nivelul căilor respiratorii de șobolan, atât în condiții normale, cât și în condițiile unor leziuni preexistente, induse de expunerea cronică la fumul de țigară;
- exercită efecte pozitive, *antioxidante*, care facilitează răspunsul bronhodilatator mediat de oxidul nitric (NANi) la nivelul căilor respiratorii de șobolan;
- dar concomitent s-au observat și efecte negative, *iritative* și *proinflamatorii*, determinate cel mai probabil de calea de administrare prin nebulizare.

Expunerea cronică la uleiul de *Juniperus*, administrat prin nebulizare, a determinat:

- *alterarea mecanismelor fiziologice de reglare neurogenă a tonusului traheo-bronșic*, cu apariția „disbalanței” dintre componenta simpatică, bronhodilatatoare și componenta parasimpatică, bronhoconstrictoare;
- pe fondul unor leziuni inflamatorii preexistente ale căilor respiratorii, induse de expunerea cronică la fumul de țigară, componente ale uleiului de *Juniperus*, administrat prin nebulizare, *au potențat răspunsul bronhoconstrictor* al inelului de musculatură netedă traheală, evaluat în baia de organ izolat, și *nu au influențat* infiltratul inflamator, evidențiat prin studiul morfologic, de la nivelul acestuia.

Activitatea antimicrobiană *in vitro* a scos în evidență că extractul etanolic din frunze aciculare de *Juniperus communis* a avut efecte semnificative asupra *Staphylococcus aureus*.

Rezultatele cercetărilor experimentale care au stat la baza elaborării acestei teze de doctorat au fost valorificate după cum urmează:

- **3 lucrări ISI publicate:**
 - ❖ *Planar Chromatography* 24(2), 130-135, **2011**;
 - ❖ *Revista de Chimie* 62(5), 508-513, **2011**;
 - ❖ *Revista de Chimie* 62 (9), 941-946, **2011**.
- **2 lucrări comunicate și publicate în Proceedings:**
 - ❖ 14th International Eco-Conference @ 6th Safe Food, 22-25 Septembrie 2010, 439-446, Novi Sad, Serbia, ISBN 978-86-83177-41-7.
 - ❖ 3rd International Conference „Research People and Actual Tasks on Multidisciplinary Sciences” 8 – 10 iunie **2011**, 218-222, Lozenec, Bulgaria, ISSN 1313-7735.
- **3 lucrări publicate în rezumat la:**
 - ❖ *2nd International Conference on Chemistry and Chemical Engineering*, Mai **2010**, Timișoara, Romania;
 - ❖ *1st International Conference on Food Chemistry, Engineering&Technology*, iunie **2010**, Timișoara, Romania
 - ❖ *21st European Student Conference, Charite University, esc*, Berlin, Germania, octombrie 2010 și publicat în *European Journal of Medical Research*, Berlin, Germania, 15(suppl 1):I-XXII, 1-240, **2010**, ISSN 0949-2321.
- **2 lucrări publicate în reviste BDI:**
 - ❖ *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 17(1), 54-57, **2011**, ISSN 2069-0053, Timișoara.
 - ❖ „*Studia Universitatis „Vasile Goldiș”, Seria Științele Vieții*”, 21(2), 319-327, **2011**, ISSN 1584-2363.

BIBLIOGRAFIE

1. Buchanan B., Gruissem W., Jones R., *Biochemistry&Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, **2000**, pag. 1252-1264.
2. Hengde Li, Kazuhiro Tamura, *J. Chem. Thermodynamics*, **2006**, 38, 1036-1041.
3. Abu-Lafi S., Odeh I., Dewik H., Qabajah M., Hanus L.O., *Bioresource Technology*, **2008**, 99, 3914-3918.
4. Shunying Z., Yang Y., Huaidong Yu, Yue Y., Dong L., Guolin Z., *Wuhan University Journal of Natural Sciences WUJHS*, **2006**, 11(3), 699-703.
5. Inatomi Y., Iida N., Murata H., Inada A., Murata J., Lang F. A., Iinuma M., Tanakae T., Nakanishi T., *Tetrahedron Letters*, **2005**, 46, 6533-6535.
6. Hădărugă D., Hădărugă N., *Compuși odoranți și aromatizanți*, Editura Politehnica, Timișoara, **2003**
7. Lana L.E.J., Silva Rocha K.A., Kozhevnikov I.V., Gusevskaya E.V., *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **2006**, 259, 99-102.
8. Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L., Byrne D. H., *Journal of Food Composition and Analysis*, **2006**, 19, 669-675.
9. Szabo M. R., Idițoiu C., Chambre D., Lupea A. X., *Chemical Papers*, **2007**, 61(3), 214-216.
10. MacDonald-Wicks L.K., Wood L.G., Garg M.L., *J Sci Food Agric*, **2006**, 86(13), 2046. doi:10.1002/jsfa.2603
11. Frankel E.N., Meyer A.S. *J Sci Food Agric* **2000**, 80(13), 1925. doi:10.1002/1097-0010 (200010)80:13<1925::AID-JSFA714>3.0.CO;2-4
12. Laguerre M., Lecomte J., Villeneuve P., *Prog Lipid Res*, **2007**, 46, 244. doi:10.1016/j. plipres.2007.05.002
13. Karadag A, Ozcelik B., Saner S., *Food Anal. Methods*, **2009**, 2, 41-60, DOI 10.1007/s12161-008-9067-7
14. Molyneux P., *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, **2004**, 26(2), 211-219.
15. Kim D.O., Lee K.W., Lee H.J., Lee CH.Y., *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 3713-3717.
16. Ozcelik B., Lee J.H., Min D.B., *J. Food Sci.*, **2003**, 68(2), 487. doi:10.1111/j.1365-2621.2003.tb05699.x
17. Magalhaes L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J.L., *Anal Chim Acta*, **2008**, 613, 1-19. doi:10.1016/j.aca.2008.02.047
18. Gulcin I., *J. of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **2008**, 23, 149-152.
19. Apak R., Guch K.G., Ozyurek M., Karademir S.E., *J. of Agric. Food. Chem.*, **2004**, 52, 7970-7973.
20. Roginsky V., Lissi E., *Food Chemistry*, **2005**, 92, 235-254, doi:10.1016/j.foodchem.2004.08.004
21. Regoli F., Winston G.W., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1999**, 156, 96-105. doi:10.1006/taap.1999.8637
22. Lupea A.X., Ardelean A., Gharibeh-Branic A., *Biochimie vegetală*, Editura Artpress, Timișoara, **2009**, 285-297.
23. Vigushin D. M., Poon G. K., English A. B. J., Halbert G. W., Pagonis Ch., Jarman M., R. Coombes Ch., *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1998**, 42, 111-117.

24. Xiaoguang Ch., Hasuma T., Yano Y., Yoshimata T., Kamoi H., Otani Sh., *Chinese Journal of Cancer Research*, **1998**, 10(3), 162-168.
25. Klen J., Wolkoff P., *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, **2004**, 77, 235-243.
26. Pandima Devi K., Sreepriya M., Balakrishna K., Devaki T., *Molecular and Cellular Biochemistry*, **2005**, 272, 171-177.
27. Motskute D., Nivinskene O., *Chemistry of Natural Compounds*, **1999**, 35 (6), 635-637.
28. Wise A., Borg-Karlson A.K., Persson M., Norin T., Mustaparta H., *Journal of Chemical Ecology*, **1998**, 24(2), 273-287.
29. Moronkola D.O., Ogunwande I. A., Walker Tameka M., Setzer W. N., Oyewole I.O., *J. Nat. Med.*, **2007**, 61, 63-66.
30. Butkienė R., Nivinskienė O., Mockutė D., *Chemija*, **2005**, 16(1), 53-60.
31. Butkienė R., Nivinskienė O., Mockutė D., *Chemija*, **2003**, 14(1), 52-56.
32. Cavaleiro C., Pinto E., Gonçalves M.J., Salgueiro L., *Journal of Applied Microbiology*, **2006**, 100, 1333-1338, doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02862.x, ISSN 1364-5072
33. Cole R.A., Bansal A., Moriarity D. M., Haber W.A., Setzer W.N., *J. Nat. Med.*, **2007**, 61, 414-417.
34. Yu F., Okamoto Sho, Nakasone K., Adachi K., Matsuda S., Harada H., Misawa N., Utsumi R., *Planta*, **2008**, 227, 1291-1299.
35. Sylvestre M., Pichette A., Lavoie S., Longtin A., Legault J., *Phytother. Res.*, **2007**, 21, 536-540.
36. Pepeljnjak S., Kosalec I., Kalodera Z., Blaževi N., *Acta Pharm.*, **2005**, 55, 417-422,
37. Kumar P., Bhatt R.P., Singh L., Shailja, Chandra H., Prasad R., *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, **2010**, 6(1), 87-91.
38. Tarabasanu C., Boscornea C., Gorduza V., *Compusi naturali - alimente*, Ed. SemnE, **2001**.
39. Svetomir Z., Tamara D., Radosav P., Miodrag L., Vlada B., *Biochemical Engineering Journal*, **2008**, 39, 547-553.
40. Lesjak M.M., Beara I., Orčić D.Z., Anačkov G.T., Balog K.J., Francišković M.M., Mimica-Dukić N.M., *Food Chemistry*, **2011**, 124, 850-856, doi:10.1016/j.foodchem.2010.07.006
41. Orhana N., Berkkanb A., Orhana D.D., Aslana M., Erguna F., *Journal of Ethnopharmacology*, **2011**, 133, 759-764, doi:10.1016/j.jep.2010.11.002.
42. Akkol E. K., Güvenç A., Yesiladac E., *Journal of Ethnopharmacology*, **2009**, 125, 330-336, doi:10.1016/j.jep.2009.05.031
43. Craig A. M., Karchesy J. J., Blythe L. L., González-Hernández M., Swan L.R., *Toxicology Letters*, **2004**, 154, 217-224, doi:10.1016/j.toxlet.2004.08.004
44. Reich-Ling J., Schnitzler P., Saschke U., Saller R., *Forsch.KomplementMed*, **2009**, 16, 79-90.
45. Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V., *J.Appl.Microbial*, **1999**, 86, 985-990.
46. El-Ghorab A., Shaaban H.A., El-Massry K.F., Shibamoto T., *J.Agric.Food Chem.*, **2008**, 56, 5021-5025.
47. Sati S.C., Joshi S., *African Journal of Microbiology Research*, **2010**, 4(12), 1291-1294, ISSN 1996-0808.
48. Rezvani S., Ali Rezai M., Mahmoodi, *Rasāyan J. Chem.*, **2009**, 2(2), 257-260.
49. Rezvani S., *Asian Journal of Chemistry*, **2010**, 22(2), 1652-1654.
50. Unlu M., Vardar-Unlu G., Vural N., Donmez E., Cakmak O., *Chemistry of Natural Compounds*, **2008**, 44(1), 129-131.

51. Reichlinga J., Schnitzler P., Suschke U., Saller R., *Forsch Komplementmed*, **2009**, 16, 79–90, DOI: 10.1159/000207196
52. Hayouni El A., Abedrabba M., Bouix M., Hamdi M., *Food Chemistry*, **2007**, 105, 1126–1134, doi:10.1016/j.foodchem.2007.02.010
53. Tserennadmid R., Takó M., Galgóczy L., Papp T., Vágvölgyi C., Gerő L., Krisch J., *Cent. Eur. J. Biol.*, **2010**, 5(5), 641-648, DOI: 10.2478/s11535-010-0058-5.
54. Muhammad I., Mossa J. S., El-Ferally F. S., *Phytotherapy Research.*, **1992**, 6(5), *Juniperus* Bibliography by Workform
55. Ardoğan B.C., Baydar H., Kaya S., Demirci M., Özbaşa D., Mumcu E., *Arch. Pharm. Res.*, **2002**, 25(6), 860-864.
56. Shin S., *Arch. Pharm. Res.*, **2003**, 26(5), 389-393.
57. Anthony C., Date Dweck. Toxicity of Essential Oil, Dweck FLS, FRSC, FRSPH, **2009**.
58. Gordien A.J., Gray A.I., Franzblau S.G., Seidel V., *J. Ethnopharmacol.*, **2009**, 26, 500-505.
59. Kozan E., Küpeli E., Yasilada E., *J. Ethnopharmacol.*, **2006**, 108(2), 211-216.
60. Sassi A.B., Harzallah-Schiri F., Bourgougnon N., Aouni M., *Nat. Prod. Res.*, **2008**, 22 (1), 53-65.
61. Chatzopoulou, P., Katsiotis, S., *Planta Med.*, **1993**, 59, 554-556.
62. Amr E.E., *Phytothes. Res.*, **2007**, 21, 308-323.
63. Pârvu C., *Enciclopedia Plantelor – Plante din flora României*, vol. II, Editura Tehnică, Bucureşti, **2003**.
64. Mastelić J., Miloš M., Kuštrak D., Radonića A., *Croatica Chemica Acta CCACAA*, **2000**, 73 (2) 585-593.
65. Riddle, J.M., Harvard University Press, **1992**, 31
http://en.wikipedia.org/wiki/Juniperus_communis
66. Namara K. M., Howell J., Huang Yongli, Robbat Jr A., *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1164, 281–290, doi:10.1016/j.chroma.2007.07.042
67. Damjanović B., Skala D., Baras J., Petrović-Djakov D., **2006**, *Flavour Fragr. J.*, 21, 875–880, DOI: 10.1002/ffj.1711
68. Vichi S., Riu-Aumatell M., Mora-Pons M., Guadayol J.M., Buxaderas S., López-Tamames E., *Food Chemistry*, **2007**, 105, 1748–1754.
69. Kilic A., Hafizoglu H., Tümen I., Dönmez I.E., Sivrikaya H., J. Hemming, *Eur. J. Wood Prod.*, **2011**, 69, 63–66, DOI 10.1007/s00107-010-0433-y
70. Popa A., Luca C., Mihăilă Gh., Compuşi de incluziune, Editura Ştiinţifică, Bucureşti, **1992**, 116-127.
71. Hădărugă N.G., Contribuţii privind protejarea şi eliberarea controlată a principiilor bioactive, *Teză de doctorat*, Timişoara, 2005, pag. 12-14.
72. Yrjönen T., *Extraction and Planar Chromatographic Separation Techniques in the Analysis of Natural Products*, Academic Dissertation, Helsinki **2004**
73. Cravotto G., Boffa L., Mantegna S., Perego P., Avogadro M., Cintas P., *Ultrasonics Sonochemistry*, **2008**, 15, 898–902.
74. Mandal V., Mohan Y., Hemalatha S., *Pharmacognosy Reviews*, **2007**, 1(1), 7-18.
75. Zhang H., Yang X.H., Zhao Li.D., Wang Y., *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **2009**, 10, 54–60.
76. Veličković D.T., Milenović D.M., Ristić M.S., Veljković V.B., *Biochemical Engineering Journal*, **2008**, 42, 97–104.

77. Roldán-Gutiérrez J.M., Ruiz-Jiménez J., Luque de Castro M.D., *Talanta*, **2008**, 75, 1369–1375.
78. Alissandrakis E., Daferera D., Tarantilis P.A., Polissiou M., Harizanis P.C., *Food Chemistry*, **2003**, 82, 575–582.
79. Jannat M. Roldán-Gutiérrez, J. Ruiz-Jiménez, M.D. Luque de Castro, *Talanta*, **2008**, 75, 1369–1375.
80. Rezić I., *Ultrasonics Sonochemistry*, **2009**, 16, 63–69.
81. Sahraouia N., Vian M.A., Bornard I., Boutekedjiret Ch., Chemat F., *Journal of Chromatography A*, **2008**, 1210, 229–233.
82. Virot M., Tomaoa V., Ginies Ch., Visinoni F., Chemat F., *Journal of Chromatography A*, **2008**, 1196–1197, 57–64, doi:10.1016/j.chroma.2008.05.023.
83. Bayramoglu B., Sahin S., Sumnu G., *Journal of Food Engineering*, **2008**, 88, 535–540.
84. Wang J.X., Xiao X.H., Li G.K., *Journal of Chromatography A*, **2008**, 1198–1199, 45–53.
85. Ramanadhan B., Microwave extraction of essential oils (from black pepper and coriander) at 2.46 GHz, Teză de doctorat, A Thesis Submitted to the College of Graduate Studies and Research in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in the Department of Agricultural and Bioresource Engineering University of, Saskatoon, Saskatchewan S7N5A9 CANADA, octombrie **2005**
86. Kucharska M., Grabka J., *Talanta*, **2010**, 80, 1045–1051.
87. *Juniperus communis*, http://en.wikipedia.org/wiki/Juniperus_communis (12.02.2010)
88. *Juniperus virginiana*, http://en.wikipedia.org/wiki/Juniperus_virginiana (12.02.2010)
89. Zhang J. W., Klopfenstein N. B., Peterson G. W., *Silvae Genetica*, **1997**, 46(1), 11–16.
90. Vinutha A. R., Rudloff E., *Canadian Journal of Chemistry*, **1968**, 46, 3743–3750.
91. Eller F.J., Clausen C.A., Green F., Taylor S.L., *Industrial Crops and Products*, **2010**, 32, 481–485, doi:10.1016/j.indcrop.2010.06.018
92. Ormsbee P., Bazzaz F.A., Boggess W.R., *Oecologia* (Berl.), **1976**, 23, 75–82.
93. Adams R.P., *Biochemical Systematics and Ecology*, **2004**, 32, 559–563, doi:10.1016/j.bse.2003.09.009
94. Gonny M., Cavaleiro C., Salgueiro L., Casanova J., *Flavour Fragr. J.*, **2006**, 21, 99–106, DOI: 10.1002/ffj.1527
95. Ottavioli J., Gonny M., Casanova J., Bighelli A., *Verlag Helvetica Chimica Acta AG*, **2009**, Chemistry & Biodiversity, 6, 2192–2199
96. Lapenna M. R., Fascetti S., *Scandinavian Journal of Forest Research*, **2010**, 25(Suppl 8), 109–114.
97. Thomas P. A., El-Barghathi M., Polwart A., *Journal of Ecology Journal of Ecology* **2007**, 95, 1404–1440, doi: 10.1111/j.1365-2745.2007.01308.x
98. Marongiu B., Porcedda S., Piras A., Sanna G., Murreddu M., Loddo R., *Flavour Fragr. J.*, **2006**, 21, 148–154, DOI: 10.1002/ffj.1549
99. Verdú M., Villar-Salvador P., García-Fayos P., *Functional Ecology*, **2004**, 18, 87–93.
100. Khantemirova E. V., Semerikov V. L., *Russian Journal of Genetics*, **2010**, 46(5), 546–554.

101. Dodd R.S., Poveda M.M., *Biochemical Systematics and Ecology*, **2003**, 31, 1257–1270.
102. Shanjanian P.S., Mirza M., Calagari M., Adams R.P., *Industrial Crops and Products*, **2010**, 32, 83–87.
103. Doğan H. H., Karadelev M., Işiloğlu M., *Turk J Bot*, **2011**, 35, 219-237; doi:10.3906/bot-1004-303
104. Abdullah-Al-Refai, El-Kateb H., Stimm B., Mosandl R., *Forstliche Forschungsberichte Munchen*, **2003**, 192, *Juniperus* Bibliography by Workform
105. Tunalier Z., Kirimer N., Baser K. H. C., *Chemistry of Natural Compounds*, **2002**, 38(1), 43-47.
106. Yuldashev M. P., Rasulova L. Kh., *Chemistry of Natural Compounds*, **2001**, 37(3), 226-227.
107. Basher K. H. C., Kurkcuoglu M., Demirci B., Gusakova S. D., Sagdullaev Sh. Sh., Maltzev I. I., Aripov Kh. N., *Chemistry of Natural Compounds*, **1999**, 35(4), 397.
108. Sultangaziev O., Schueler S., Geburek Th., *Flora*, **2010**, 205, 532–539; doi:10.1016/j.flora.2009.12.019
109. Chub A. V., *Cultura speciilor forestiere în Kârgâzstan*, **1973**, *Juniperus* Bibliography by Workform
110. Okasaka M., Takaishi Y., Kashiwada Y., Kodzhimatov O.K., Ashurmetov O., Lin A. J., Mark Consentino L., Lee K.-H., *Phytochemistry*, **2006**, 67, 2635–2640.
111. Miyata M., Itoh K., Tachibana S., *J. Wood Sci.*, **1998**, 44, 397-400.
112. Ju J.B., Kim J.S., Choi C. W., Lee H. K., Oha T.-K., Kim S. Ch., *Journal of Ethnopharmacology*, **2008**, 115, 110–115, doi:10.1016/j.jep.2007.09.012
113. Hwang G. S., Phuong N.T., Park K.R., Kim Y.H., Kim K. H., Kang J.S., *Arch Pharm Res.*, **2004**, 27(1), 35-39.
114. Mujwah A.A., Mohammed M.A., Ahmed M.H., *Arabian Journal of Chemistry*, **2010** 3, 85–88, doi:10.1016/j.arabjc.2010.02.003
115. Belaine S., *Somatic Seblework Belaine (MEJS)*, **2009**, 1(2), 95-105.
116. Samoylenko V., Dunbar C. D., Gafur Md. A., Khan Sh. I., Ross S. A., Mossa J. S., El-Ferally F. S., Tekwani B. L., Bosselaers J., Muhammad I., *Phytother. Res.*, **2008**, 22, 1570 –1576; DOI: 10.1002/ptr.2460
117. Kour A., Shawl A.S., Rehman S., Sultan Ph., Qazi P. H., Suden P., Khajuria R. K., Verma V., *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **2008**, 24, 1115–1121, DOI 10.1007/s11274-007-9582-5
118. Melville A. B., *Flora of China*, **1999**, 4, 69–77.
119. Montesinos D., García-Fayos P., Verdú M., *Acta Oecologica*, **2010**, 36, 120-125, doi:10.1016/j.actao.2009.10.010
120. Romo A., Boratyński A., *Ann. Bot. Fennici*, **2007**, 44, 72-75.
121. Akinci I., Ozdemir F., Topuz A., Kabas O., Canakci M., *Journal of Food Engineering*, **2004**, 65, 325–331, doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.01.029
122. Boratynski, A., Browicz, K., *Arboretum Kornickie*, **1983**, 27, *Juniperus* Bibliography by Workform
123. Koukos P.G., Papadopoulou K.I., Papagiannopoulos A.D., *Holz als Roh-Werkstoff, Springer Verlag*, **2002**, 60, 152-153, DOI 10.1007-soo1070100226
124. Aleksandrov A. Kh., Yurukov S., Peev G., *Nauka-za-Gorata (Știința Pădurii)*, **1993**, 30(3), *Juniperus* Bibliography by Workform

125. Medini H., Marzouki H., Chemli R., Khouja M. L., Marongiu B., Piras A., Porcedda S., Tuveri E., *Chemistry of Natural Compounds*, **2009**, 45(5), 739-741.
126. Karaman I., Sahin F., Güllüce M., Ögütçü H., Sengül M., Adigüzel A., *Journal of Ethnopharmacology*, **2003**, 85, 231-235, doi:10.1016/S0378-8741(03)00006-0
127. Salido S., Altarejos J., Nogueras M., Sánchez A., Pannecouque C., Witvrouw M., Clercq E., *Journal of Ethnopharmacology*, **2002**, 81, 129-134.
128. Loizzo M.R., Tundis R., Conforti F., Saab A. M., Statti G. A., Menichini F., *Food Chemistry*, **2007**, 105, 572-578, doi:10.1016/j.foodchem.2007.04.015
129. Achak N., Romane A., Alifriqui M., Adams R.P., *Journal of Essential Oil Research*, **2009**, 21, 337-341.
130. Ennajar M., Afloulous S., Romdhane M., Ibrahim H., Cazaux S., Abderraba M., Raies A., Bouajila J., *Journal of Food Science*, **2011**, 76(2), doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01995.x
131. El-Bana M., Shaltout K., Khalafallah A., Mosallam H., *Flora*, **2010**, 205, 171-178, doi:10.1016/j.flora.2009.04.004
132. El-Sawi S.A., Motawae H.M., Alib A.M., *Afr. J. Trad. CAM*, **2007**, 4 (4), 417 - 426.
133. Hayata, *Juniperus formosana*, *J. Coll. Sci. Imp. Univ. Tokyo*, 25(19), 209, *Flora of China*, **1999**, 4, 69-77.
134. Cheng ex Ferré W. C., *Juniperus pingii*, *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse* 79, 76, *Flora of China*, **1999**, 4, 69-77.
135. Fu L. K., Yu Y. F., *Juniperus chengii*, *Novon* 1998, 7, 443, *Flora of China*, **1999**, 4, 69-77.
136. Yu Y. F., Fu L. K., *Juniperus baimashanensis*, *Novon* 1998, 7: 443, *Flora of China*, **1999**, 4, 69-77.
137. Jafarian-Dehkordi A., Emami S.A., Saeidi M., Sadeghi H., *Journal of Research in Medical Sciences*, **2004**, 5, 205-209.
138. Adams R.P., Almirall A.L., Hogge L., *Flavour Fragr. J.*, **1987**, 2, 33-36.
139. Núñez Y.O., Salabarria I.S., Collado I.G., Hernandez-Galan R., *Rev. Latinoamer. Quim.*, **2010**, 38 (3), 145-152.
140. Gorgaev M.I., Ignatova L.A., *Chemistry of Juniperus*, Naulsa Alma-Ata, **1969**, 54.
141. Butkienė R., Nivinskienė O., Mockutė D., *Juniperus Essential Oil Res.*, **2006**, 18, 489-494.
142. Lis-Balchin M., Ochocka J.R., Deans S.G., *Juniperus Essential Oil Res.*, **1999**, 11(3), 393-397.
143. Youdim K.A., Deans S.G., Finlayson H.J., *Juniperus Essential Oil Res.*, **2004**, 14(3), 210-215.
144. Sasak W., Mankowski T., Chojnacki T., Daniewski W.M., *Febs Letters*, **1976**, 64(1) 55-58.
145. Maqbool M., Cushman K.E., Gerard P.D., Bedir E., Lata H., Moraes R.M., *Future For Medicinal And Aromatic Plants*, **2004**, 629, 87-92.
146. Gawde A.J., Cantrell Ch.L., Zheljzskova V.D., *Industrial Crops and Products*, **2009**, 30, 276-280.
147. Gawde A. J., Zheljzskov V. D., Maddox V., Cantrell Ch. L., *Industrial Crops and Products*, **2009**, 30, 59-64, doi:10.1016/j.indcrop.2009.01.010
148. Kusari S., Zühlke S., Spiteller M., *Phytochem. Anal.* **2011**, 22, 128-143, DOI 10.1002/pca.1258

149. Baer N. W., *TB 86 South Dakota Agricultural Experiment Station*, **1985**, 86; *Juniperus Bibliography by Workform*
150. Sousa M.F.V.Q., Lopes C.E., Pereira Jr.N., *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **2002**, 19(3), 277 - 285.
151. Butkienė R., Nivinskienė O., Mockutė D., *Chemija*, **2007**, 18(3), 35–40.
152. Butkienė R., Nivinskienė O., Mockutė D., *Chemija*, **2004**, 15(4), 57–63.
153. Sezik E., Kocakulak E., Baser K. H. C., Ozek T., *Chemistry of Natural Compounds*, **2005**, 41(3), 352-354.
154. Cavaleiro C., Salgueiro L.R., da Cunha A.P., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Bighelli A., Casanova J., *Biochemical Systematics and Ecology*, **2003**, 31, 193–201.
155. Shahmir F., Ahmadi L., Mirza M., S. A. A. Korori, *Flavour Fragr. J.*, **2003**, 18, 425–428, DOI: 10.1002/ffj.1243
156. Butkienė R., Nivinskienė O., Mockutė D., *Chemija.*, **2009**, 20(3), 196–202.
157. Sezik E., Kocakulak E., Özek T., Başer K. H. C., *Acta Pharmaceutica Scientia*, **2009**, 51, 109-120.
158. Ennajar M., Bouajila J., Lebrihi A., Mathieu F., Savagnac A., Abderraba M., Raiesf A., Romdhane M., *J. Sci. Food Agric.*, **2010**, 90, 462–470, DOI 10.1002/jsfa.3840
159. Hădărugă, N.G., Hădărugă, D.I., Lupea, A.X., Păunescu, V., Tatu, C., *Rev. Chim.-București*, **2005**, 56(8), 876-882.
160. Costescu, C.I., Hădărugă, N.G., Hădărugă, D.I., Riviș, A., Ardelean, A., Lupea, A.X., *Rev. Chim.-București*, **2008**, 59(7), 739-744.
161. ***Farmacopeea Europeană, Ed. a III-a, 2001.
162. Esbensen, K., Schonkopf, S., Midtgaard, T., *Multivariate Analysis in Practice, Computer-Aided Modelling AS*, Trondheim, **1996**.
163. Gordon, A.D., *Classification. Methods for the Exploratory Analysis of Multivariate Data*, Chapman & Hall, London, **1981**.
164. Gharibeh Branic A., Pleșa C.M., Hădărugă N.G., Ardelean A., Hădărugă D.I., Ordodi V.L., Gruia A.T., Lupea A.X., A Comparative Study of *Juniperus communis* and *Juniperus virginiana* Extracts: The Influence of Method, Solvent, and Provenience, *Revista de Chimie*, București, **2011**, 62(5), 508-513.
165. Tohma H. S., Gulçin I., *International Journal of Food Properties*, **2010**, 13(4), 667.
166. Pop M., Glevitzky M., Cacig S., Lupea A.X., *Rev. Chim. (București)*, **2006**, 57(11), 1119-1122.
167. Kusindarta DL, Atoji Y and Yamamoto Y., *Archives of Histology and Cytology*, **2004**, 67 (1), 41-55.
168. Atoji Y, Kusindarta DL, Hamazaki N, Kaneko A. *Brain Research*, **2005**, 1031(7), 90-100.
169. Mihalas G, Bunu C, Noveanu L, Siska IR, Borza C, Tănăsie G. Responsivitatea bronșică. De la experiment la studiu clinic. Editura Orizonturi Universitare, Timișoara, **2003**, ISBN 973 - 638 - 84 - X.
170. Ricciardolo FLM., *Thorax*, **2005**, 58, 175-182.
171. Barnes PJ., *Respiration Physiology*, **2001**, 125 (1-2), 145-154.
172. Sekizawa K, T. Fukushima T, Ikarashi Y, Maruyama Y, Sasaki H., *Br J Pharmacol.*, **1993**, 110(2), 816–820.
173. Kobzik L., Bredt D.S., Lowenstein C.J., Drazen J., Gaston B., Sugarbaker D., Stamler J.S., *Am J Respir Cell Mol Biol.*, **1993**, 9(4), 371-377.
174. Kuo P. C., Schroeder R. A., *Ann. Surg.*, **1995**, 221, 220–235.

175. Maria G.M., *Molecules*, **2010**, 15, 9252-9287.
176. Munteanu I., Didilescu C., *Pneumologia*, **2007**, 56 (1), 41-46.
177. Ribeiro de Paiva S., Figueiredo M.R., Aragão T.V., Kaplan M.A.C., *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **2003**, 98(7), 959-961.
178. Orav A., Koel M., Kailas T., Müürisepp M., *Procedia Chemistry*, **2010**, 161-167, doi:10.1016/j.proche.2009.12.023
179. **Pleșa C.M.**, Hădărugă N.G., Hădărugă D.I., Ordodi V., Gruia A., Gharibeh Branic A., Lupea A.X., Identification of Volatile Compounds from *Juniperus communis* and *Juniperus virginiana* Extracts, *2nd International Conference on Chemistry and Chemical Engineering*, Timișoara, România, Mai **2010**, pp. 38
180. **Pleșa C.M.**, Hădărugă N.G., Ardelean A., Hădărugă D.I., Branic A.G., Lupea A.X., *Juniperus communis* and *Juniperus virginiana* tetrahydrofuran extracts, *3rd International Conference „Research People and Actual Tasks on Multidisciplinary Sciences”*, Lozenec, Bulgaria, 8 – 10 iunie **2011**, 218-222, ISSN 1313-7735.
181. **Pleșa C.M.**, Gharibeh Branic A., Hădărugă D.I., Ordodi V., Ardelean A., Toța C.E., Hădărugă N.G., Lupea A.X., *Juniperus communis* and *Juniperus virginiana* Extracts and Possibility for Use in Food Industry, *1st International Conference on Food Chemistry, Engineering&Technology*, Timișoara, Romania, June **2010**, pp. 13.
182. **Pleșa C.M.**, Hădărugă N.G., Hădărugă D.I., Ordodi V.L., Gruia A.T., Gharibeh Branic A., Ardelean A., Lupea A.X., Caryophyllene from *Juniperus communis* and *Juniperus virginiana* Romanian extracts, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, Timișoara, România, **2011**, 17(1), 54-57.
183. Hansch, C., Anderson, S.M., *Journal of Organic Chemistry*, **1967**, 32(8), 2583-2586.
184. Fujita, T.; Iwasa, J.; Hansch, C., *Journal of American Chemical Society* **1964**, 86(23), 5175-5180.
185. **Pleșa C.M.**, Hădărugă D.I., Hădărugă N.G., Gharibeh Branic A., Ardelean A., Lupea A.X., *Juniperus communis* and *Juniperus virginiana* hydrophobic extracts: a multivariate analysis approach, *Revista de Chimie*, București, **2011**, 62(9), 508-513.
186. Háznagy-Radnai E., Czigle S., Máthé I., *J. Planar Chromatogr.*, **2007**, 20, 189-196.
187. Horváth G., Szabó L.G., Lemberkovics E., Botz L., Kocsis B., *J. Planar Chromatogr.*, **2007**, 17, 300-304.
188. Hădărugă N.G., Gharibeh Branic A., Hădărugă D.I., Gruia A., **Pleșa C.**, Costescu C., Ardelean A., Lupea A.X., Comparative Study of *Juniperus communis* and *Juniperus virginiana* Essential Oils: TLC and GC Analysis, *Journal of Planar Chromatography*, **2011**, 24(2), 130-135 DOI: 10.1556/JPC.24.2011.2.9 0933-4173/\$ 20.00 © Akadémiai Kiadó, Budapest.
189. Yang X., Zhao H. T., Wang J., Meng Q., Zhang H., Yao L., Zhang Y. C., Dong A. J., Ma Y., Wang Z. Y., Xu D. C., Ding Y., *Journal of Medicinal Plants Research*, **2010**, 4(16), 1668-1672.
190. **Pleșa C.M.**, Hădărugă N.G., Hădărugă D.I., Ardelean A., Gharibeh Branic A., Lupea A.X., Antioxidant Activity of *Juniperus communis* L. and *Juniperus virginiana* L. Extracts and Gin Type Products, *14th International Eco-Conference @ 6th Safe Food*, Novi Sad, Serbia, ISBN 978-86-83177-41-7, Septembrie, 2010, 8, Procededing: *14th International Eco-Conference @ 6th Safe Food*, 2010, Novi Sad, Serbia 22 – 25 Septembrie, **2010**, pp. 9.

191. Innocenti M., Michelozzi M., Giaccherini C., Ieri F., Vincieri F.F., Mulinacci N., *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55, 6596-6602.
192. Caulfield M.P. *Pharmacology & Therapeutics*, **1993**, 58(3), 319-379.
193. Malcolm P. Caulfield, Nigel J. M. Birdsall N.J.M., *Pharmacological Reviews*, **1998**, 50 (2), 279-290.
194. Barnes PJ., *Molec Asp Med*, **1990**, 11, 351-423.
195. Coulson F.R., Fryerr A.D., *Pharmacology & Therapeutics*, **2003**, 98(1), 59-69.
196. Aas P., Maclagan J., Br. J. Pharmacol., **1990**, 101(1), 73-76.
197. Hirshman C.A., Lande B., Croxton T.I., *Life Sciences*, **1999**, 64(6-7), 443-448.
198. Barnes PJ., *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, **1995**, 152, 838-860.
199. Norris A., Leeson M.E., Jackson D.M., Holroyde M.C., *Pulmonary Pharmacology*, **1990**, 3(4), 180-184.
200. Reinheimer T., Bernedo P., Klapproth H., Oelert H., Zeiske B., Racke K., Wessler I., *AJP - Lung Physiol.*, **1996**, 270(5), 722-728.
201. Sturza A., **Pleșa C.**, Ordodi V., Noveanu L., Mirica N., Fira-Mladinescu O., Lupea A.X., Muntean D., Effects of *Juniperus communis* Aerosols on Vasomotor Responses in Aortic Rings from Rat Subjected to Passive Smoking, 21st European Student Conference, Charite University, esc, Berlin, Germania, octombrie **2010**, *European Journal of Medical Research*, Berlin, Germania, 15(suppl 1), I-XXII, 187, ISSN 0949-2321.
202. **Pleșa C.M.**, Ordodi V.L., Noveanu L., Vasile L., Ardelean A., Lupea A.X., Effects of *Juniperus Communis* Aerosols on Trachea and Lung from Rat Subjected to Passive Smoking, „Studia Universitatis „Vasile Goldiș“, Seria Științele Vietjii”, **2011**, 21(2), 319-327, ISSN 1584-2363.
203. Filipowicz N., Kamiński M., Kurlenda J., Asztemborska M., Ochocka J. R., *Phytother. Res.*, **2003**, 17, 227-231, DOI: 10.1002/ptr.1110
204. Nuñez Y.O., Salabarría I.S., Collado I.G., Hernández-Galán R., *Phytochemistry*, **2007**, 68, 2409-2414, doi:10.1016/j.phytochem.2007.05.030

ANEXE

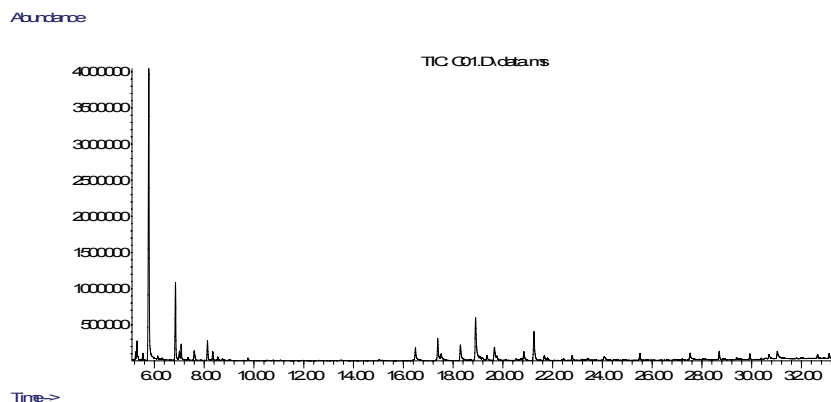


Figura A. 1. - Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în toluen din frunze aciculare de *Juniperus communis* (Suedia)

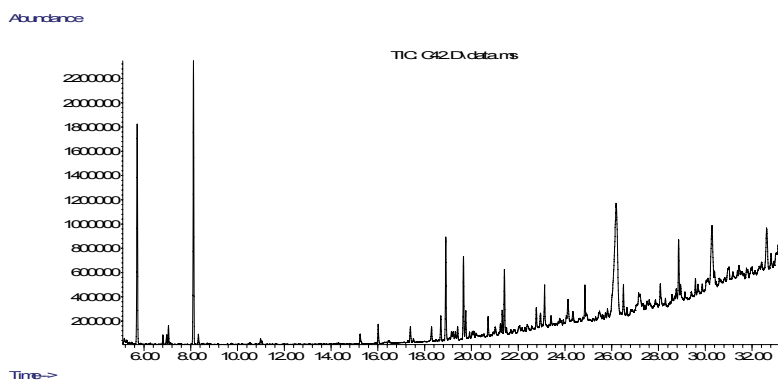


Figura A. 2. - Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în cloroform din frunze aciculare de *Juniperus communis* (Siria)

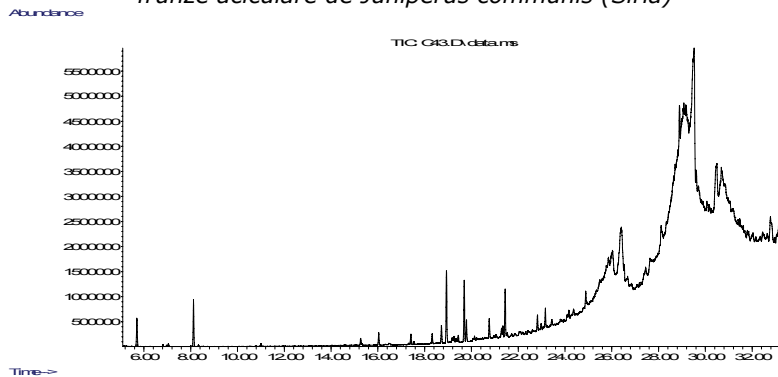


Figura A. 3. - Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în hexan din frunze aciculare de *Juniperus communis* (Siria)

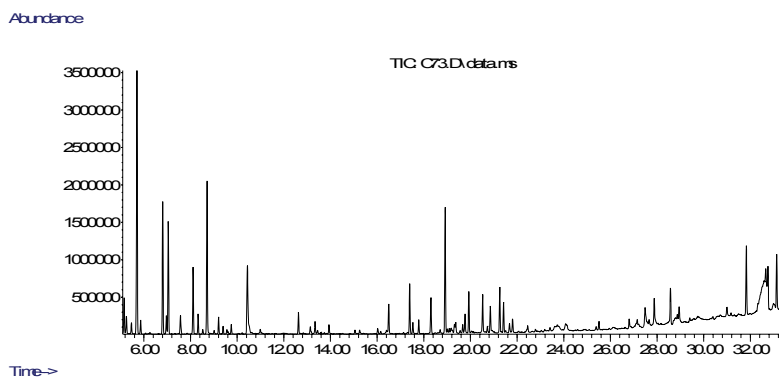


Figura A. 4. - Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în hexan din frunze aciculare de *Juniperus virginiana* (Siria)

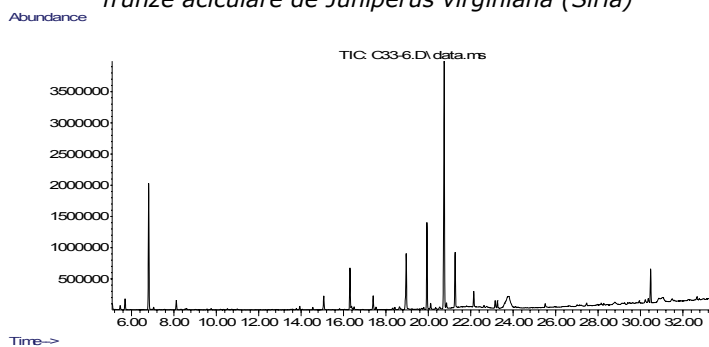


Figura A. 5. - Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în hexan din frunze aciculare de *Juniperus virginiana* (Macea)

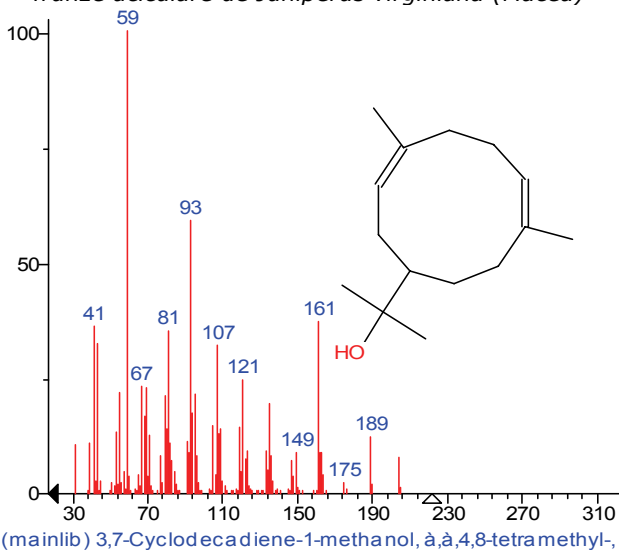


Figura A. 6. - Spectrul de masă din baza de date NIST pentru hedericariol

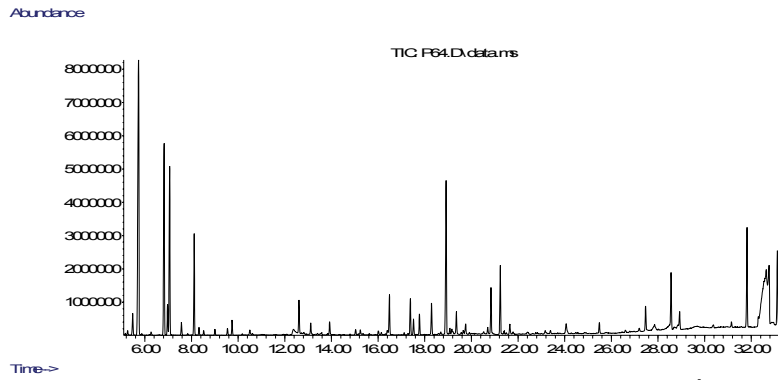


Figura A.7. - Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în acetat de etil din pseudobace de *Juniperus communis* (Albac)

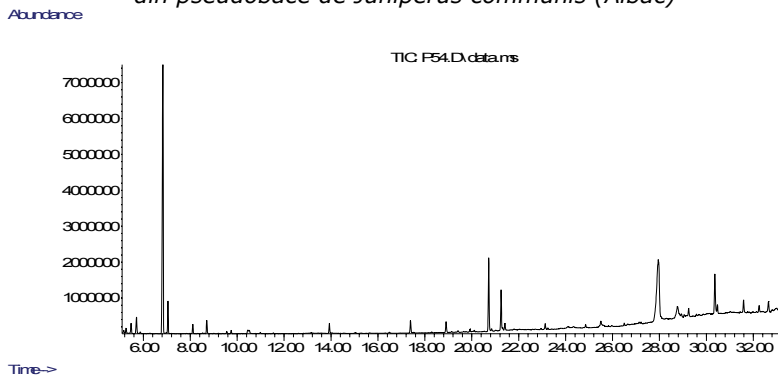


Figura A.8. - Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în acetat de etil din pseudobace de *Juniperus virginiana* (Macea)

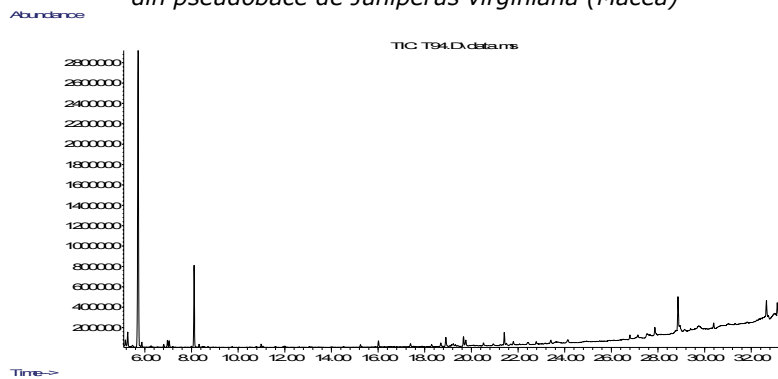


Figura A.9. - Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în acetat de etil din microblaste de *Juniperus communis* (Austria)

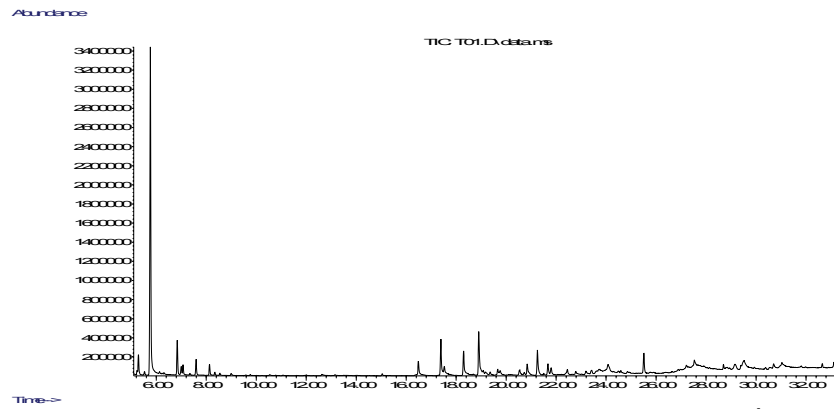


Figura A.10. - Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în toluen din microblaste de *Juniperus communis* (Suedia)

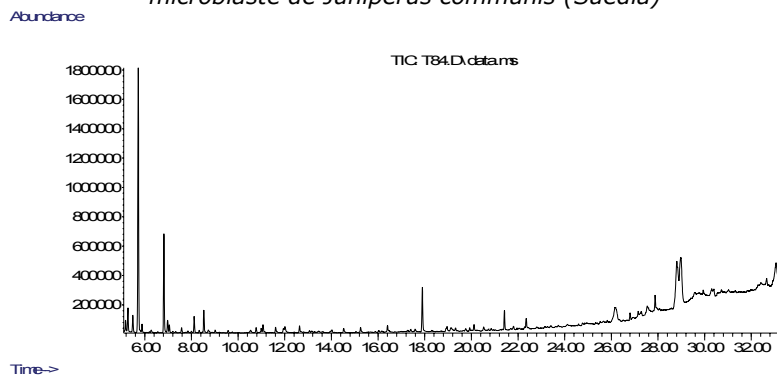


Figura A.11. - Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în acetat de etil din microblaste de *Juniperus communis* (Lipova)

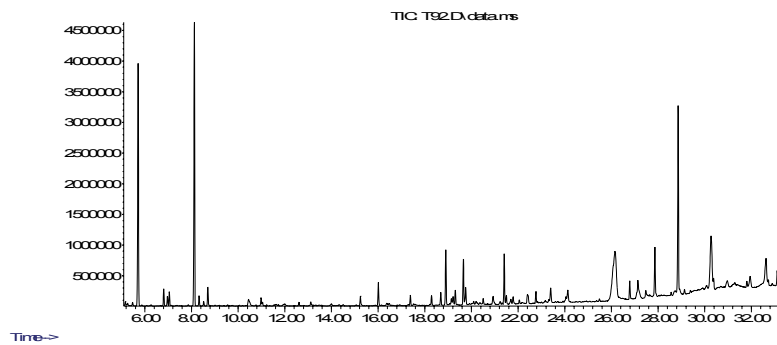


Figura A.12. - Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în cloroform din microblaste de *Juniperus communis* (Austria)

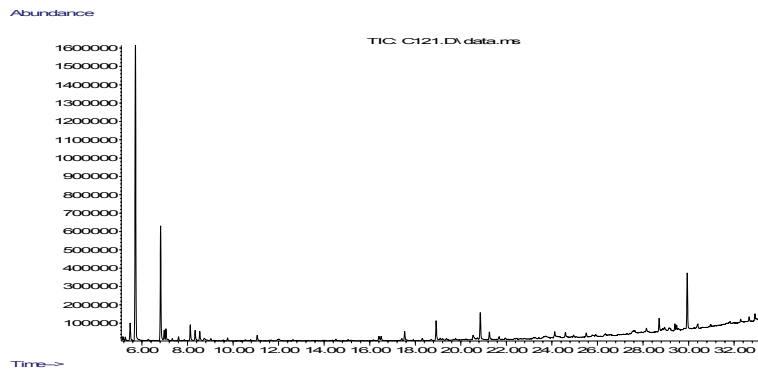


Figura A.13. - Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în cloroform din frunze aciculare de *Juniperus communis* (Lipova)

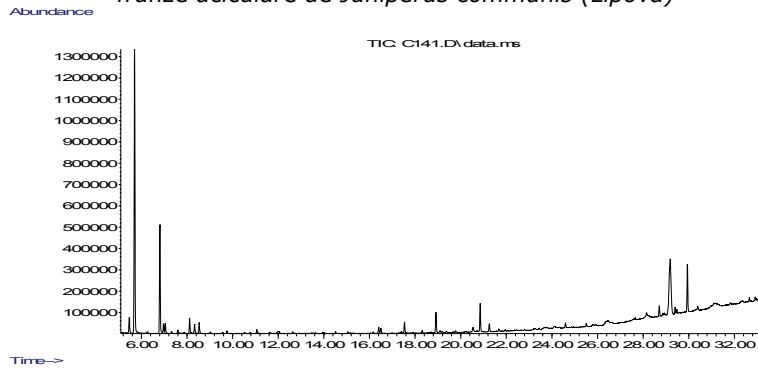


Figura A.14. - Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în hexan din frunze aciculare de *Juniperus communis* (Lipova)

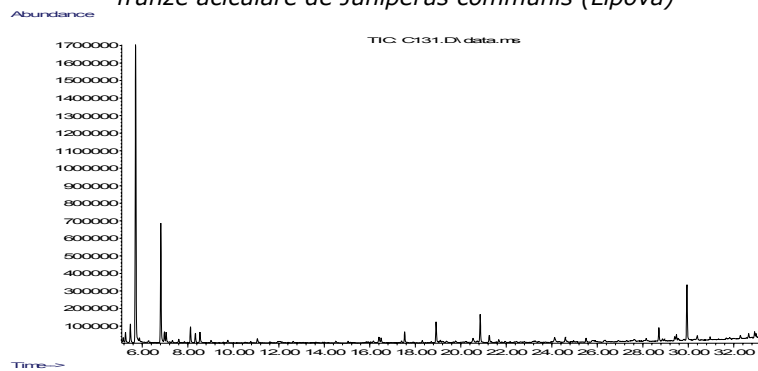


Figura A.15. - Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în acetat de etil din frunze aciculare de *Juniperus communis* (Lipova)

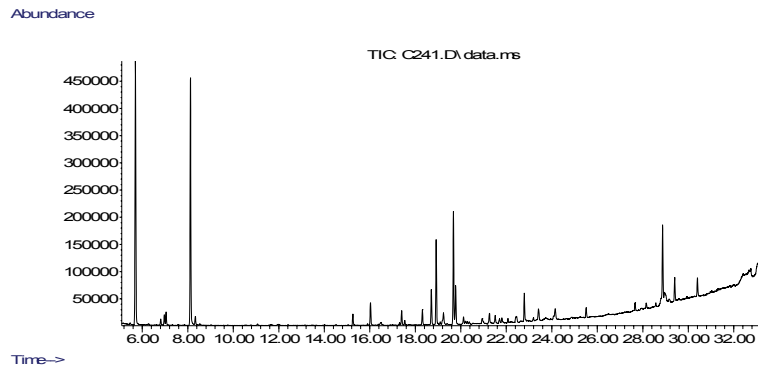


Figura A.16.- Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în hexan din frunze aciculare de *Juniperus virginiana* (Siria)

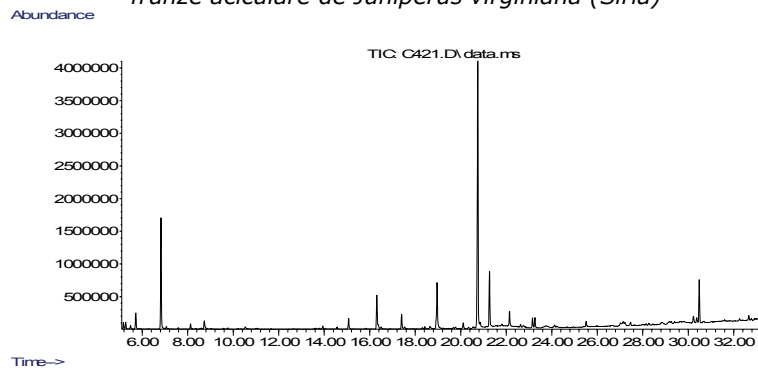


Figura A.17.- Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în cloroform din frunze aciculare de *Juniperus virginiana* (Macea)

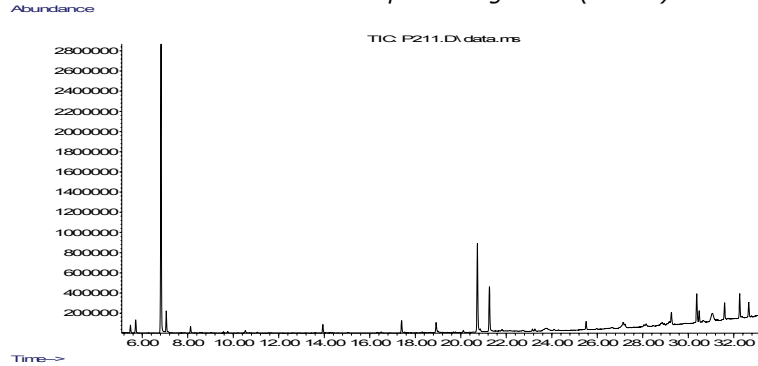


Figura A.18.- Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în toluen din pseudobace de *Juniperus virginiana* (Macea, 2008)

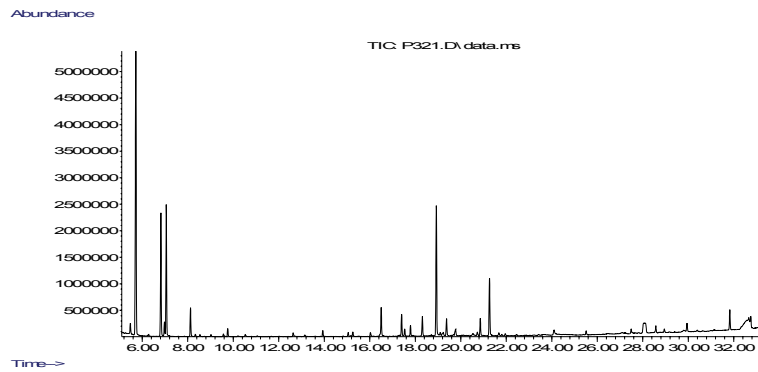


Figura A.19.- Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în cloroform din pseudobace mature de *Juniperus communis* (Albac, 23.05.2009)

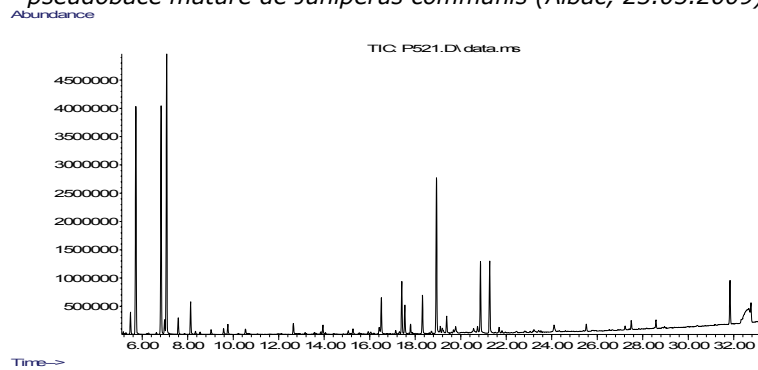


Figura A.20.- Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în cloroform din pseudobace mature de *Juniperus communis* (Albac, 18.10.2008)

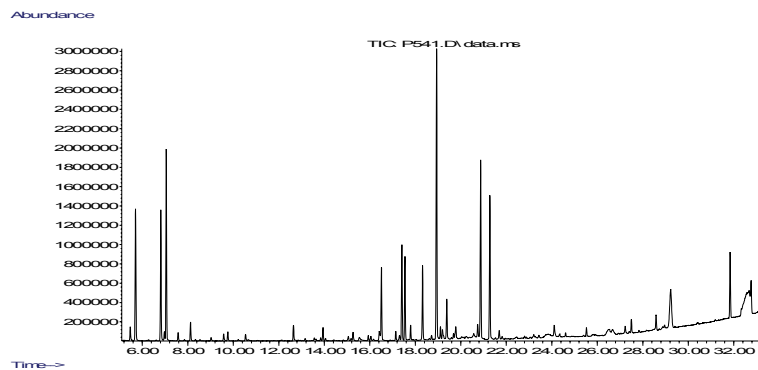


Figura A.21.- Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în hexan din pseudobace mature de *Juniperus communis* (Albac, 18.10.2008)

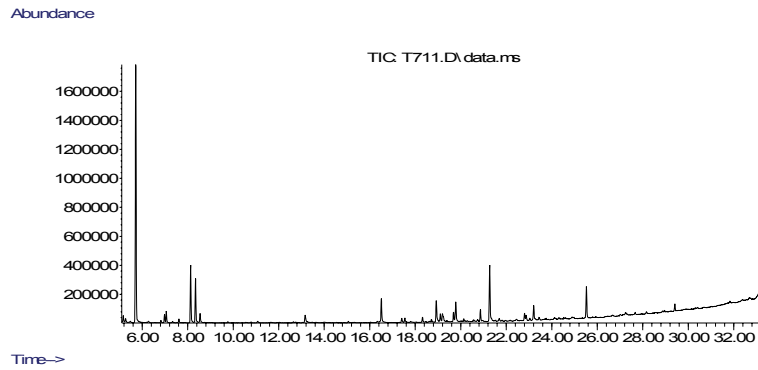


Figura A.22. - Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în cloroform din microblaste de *Juniperus communis* (Albac, 18.10.2008)

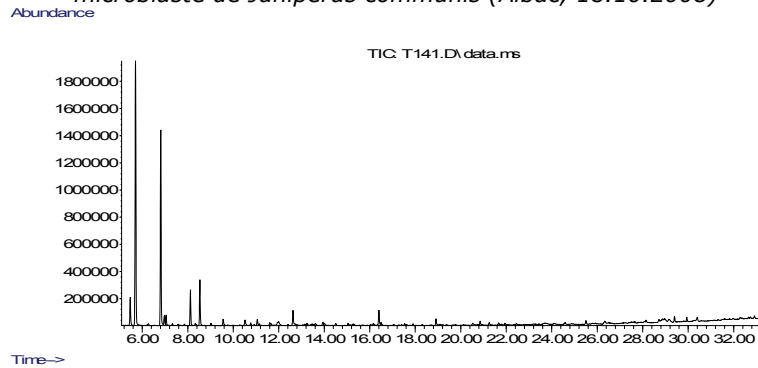


Figura A.23. - Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în hexan din microblaste de *Juniperus communis* (Lipova)

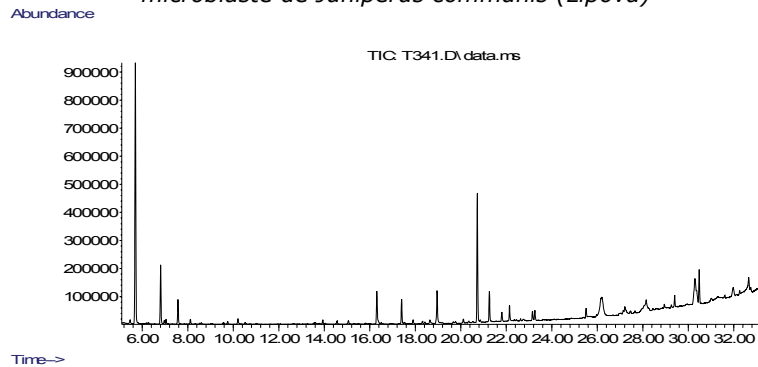


Figura A.24. - Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în hexan din microblaste de *Juniperus virginiana* (Macea)

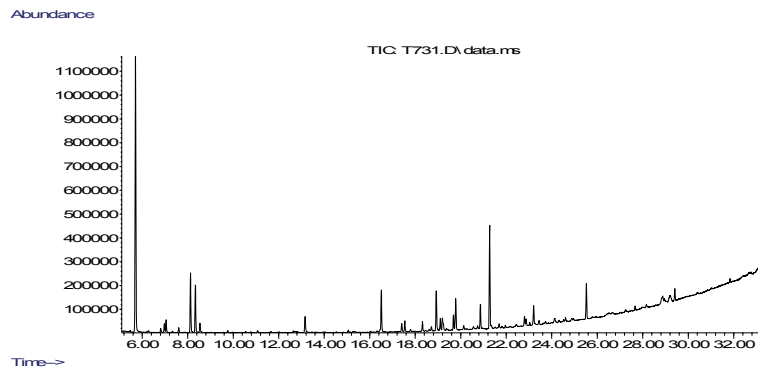


Figura A.25. - Gaz cromatograma din analiza GC-MS a extractului în hexan din microblaste de *Juniperus communis* (Albac, 18.10.2008)

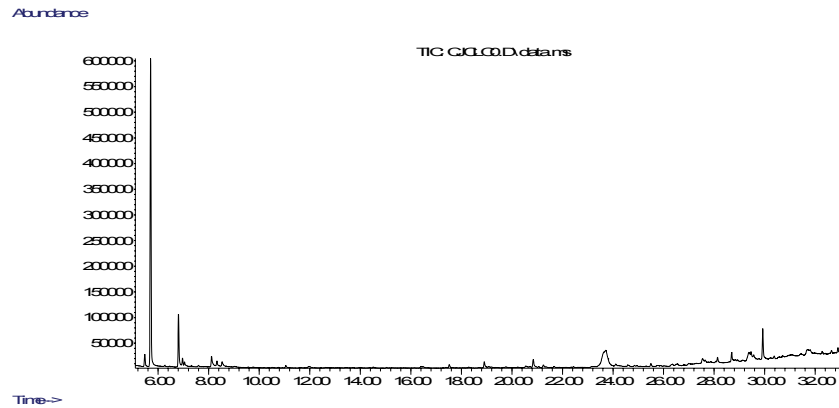


Figura A.26. - Extract din cetină de *Juniperus communis* Lipova (la minutul 0) în cloroform

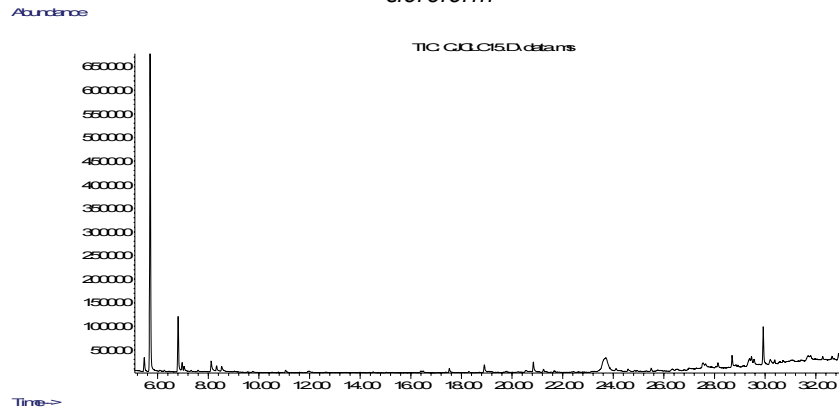


Figura A.27. - Extract din cetină de *Juniperus communis* Lipova (la minutul 15) în cloroform

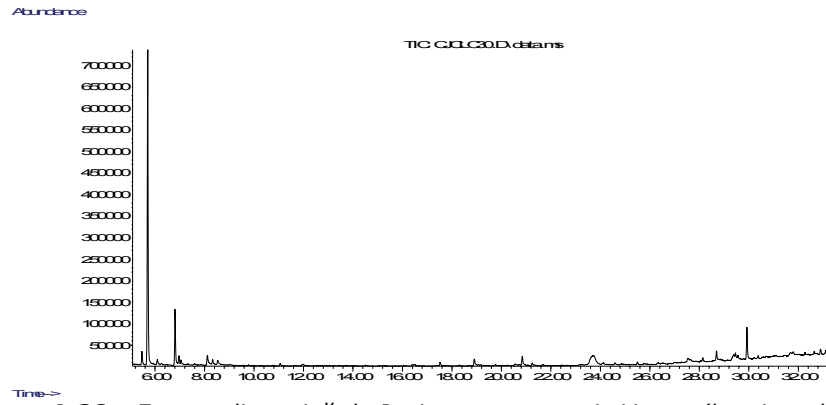


Figura A.28. - Extract din cetină de *Juniperus communis* Lipova (la minutul 30) în cloroform

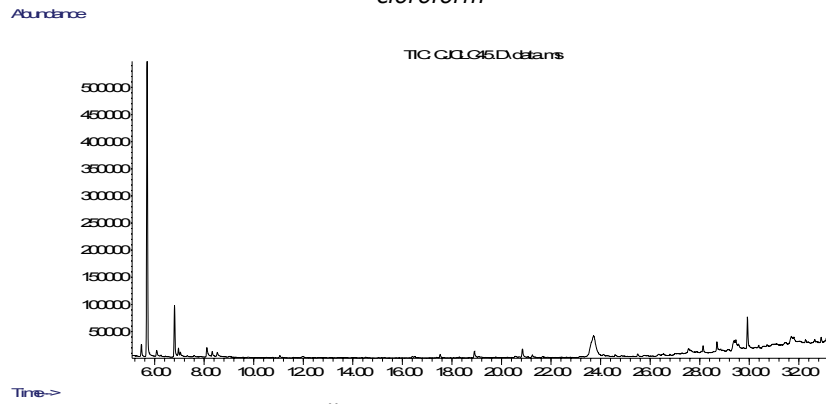


Figura A.29. - Extract din cetină de *Juniperus communis* Lipova (la minutul 45) în cloroform

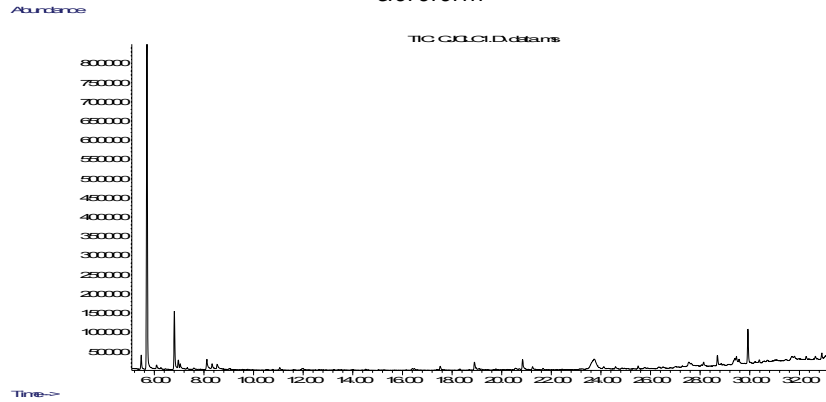


Figura A.30. - Extract din cetină de *Juniperus communis* Lipova (la minutul 60) în cloroform

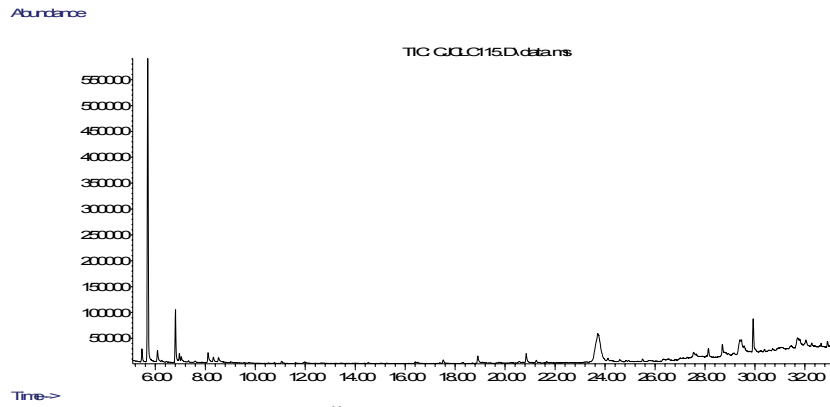


Figura A.31.- Extract din cetină de *Juniperus communis* Lipova (la minutul 75) în cloroform

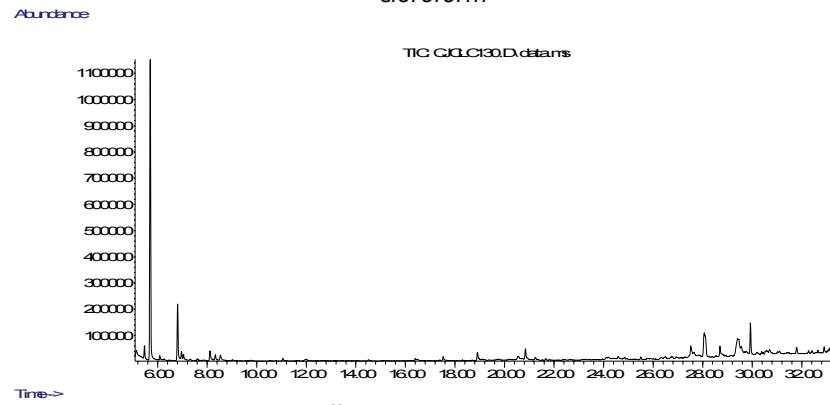


Figura A.32.- Extract din cetină de *Juniperus communis* Lipova (la minutul 90) în cloroform

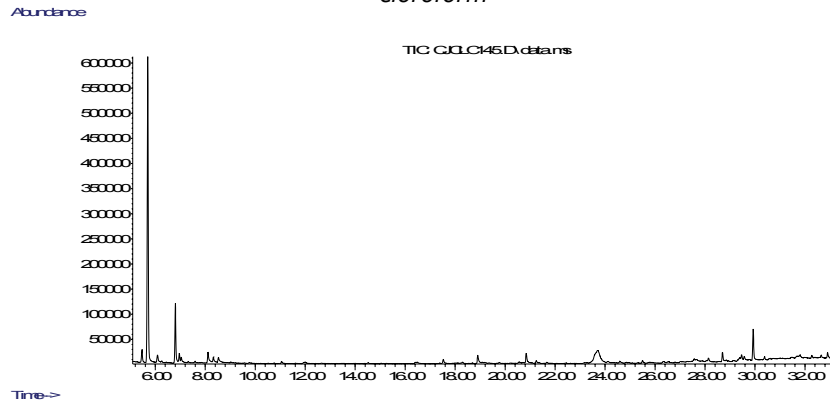


Figura A.33.- Extract din cetină de *Juniperus communis* Lipova (la minutul 105) în cloroform

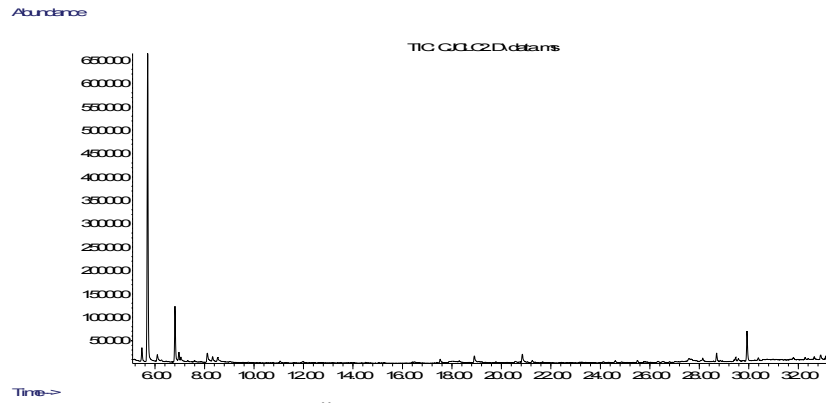


Figura A.34.- Extract din cetină de *Juniperus communis* Lipova (la minutul 120) în cloroform

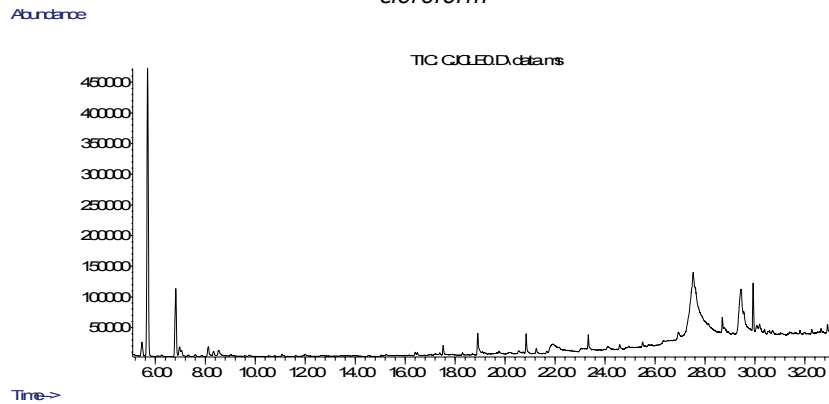


Figura A.35.- Extract din cetină de *Juniperus communis* Lipova (la minutul 0) în etanol 96%

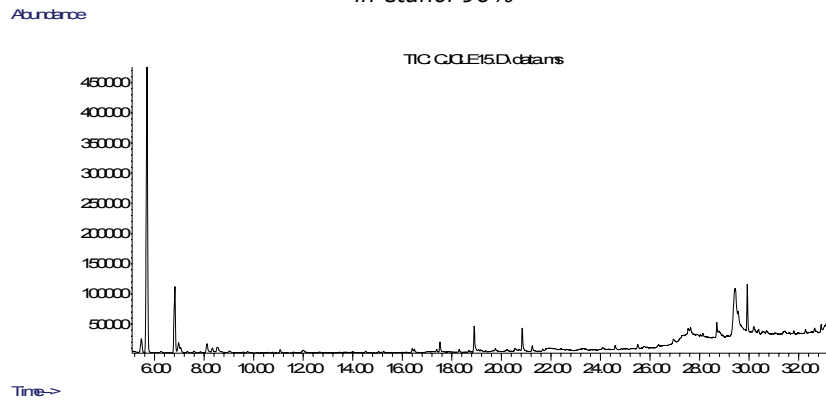


Figura A.36.- Extract din cetină de *Juniperus communis* Lipova (la minutul 15) în etanol 96%

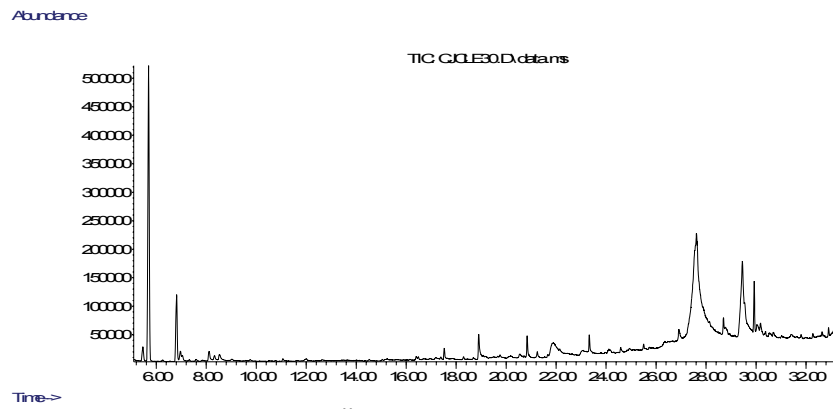


Figura A.37. - Extract din cetină de *Juniperus communis* Lipova (la minutul 30) în etanol 96%

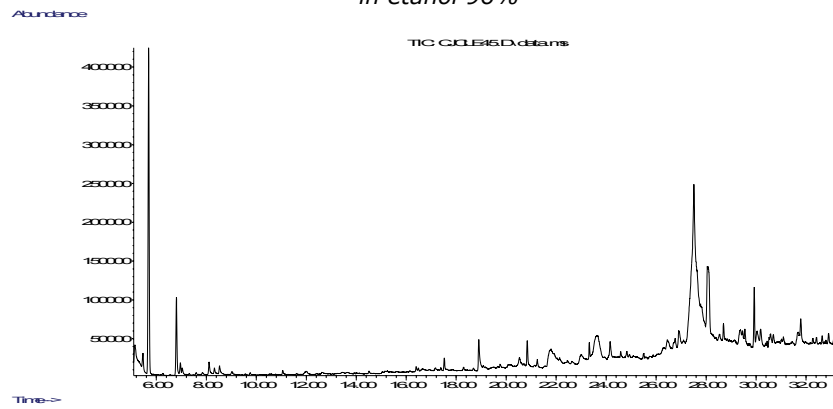


Figura A.38. - Extract din cetină de *Juniperus communis* Lipova (la minutul 45) în etanol 96%

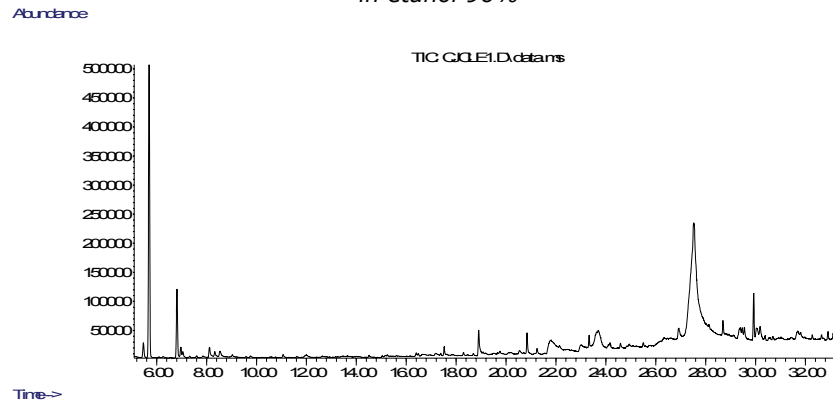


Figura A.39. - Extract din cetină de *Juniperus communis* Lipova (la minutul 60) în etanol 96%

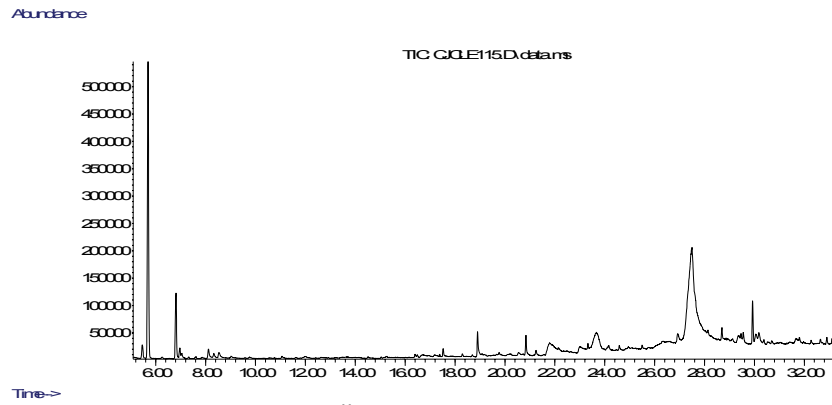


Figura A.40. - Extract din cetină de *Juniperus communis* Lipova (la minutul 75)
în etanol 96%

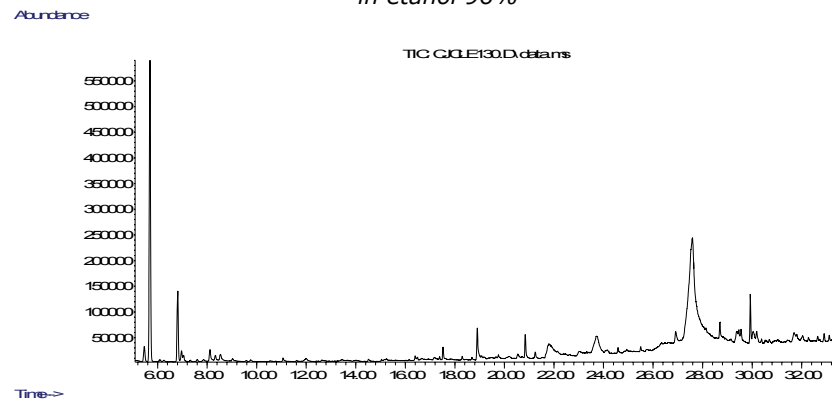


Figura A.41. - Extract din cetină de *Juniperus communis* Lipova (la minutul 90)
în etanol 96%

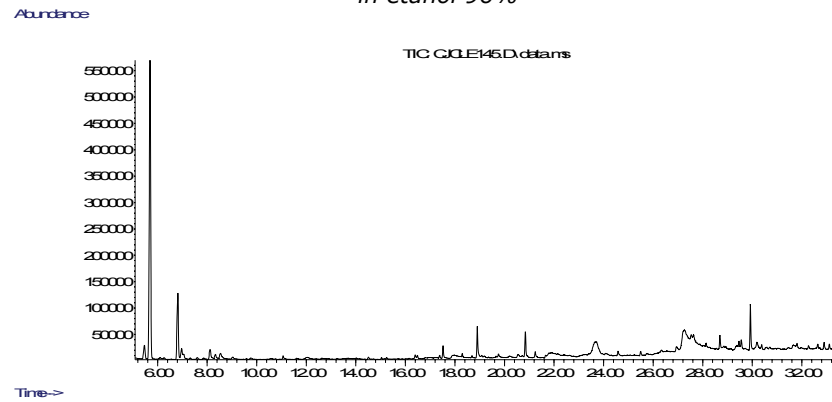


Figura A.42. - Extract din cetină de *Juniperus communis* Lipova (la minutul 105)
în etanol 96%

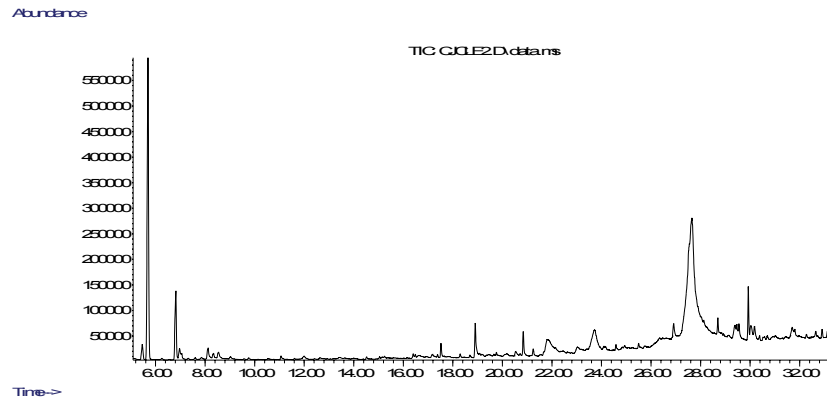


Figura A.43. - Extract din cetină de *Juniperus communis* Lipova (la minutul 120) în etanol 96%

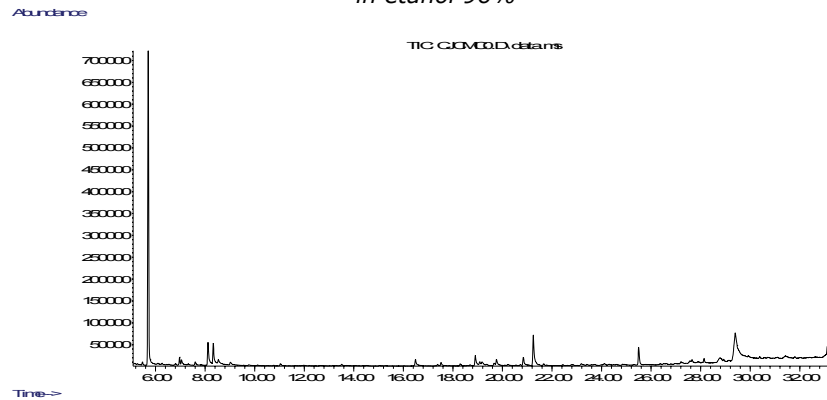


Figura A.44. - Extract din cetină de *Juniperus communis* Macea (la minutul 0) în cloroform

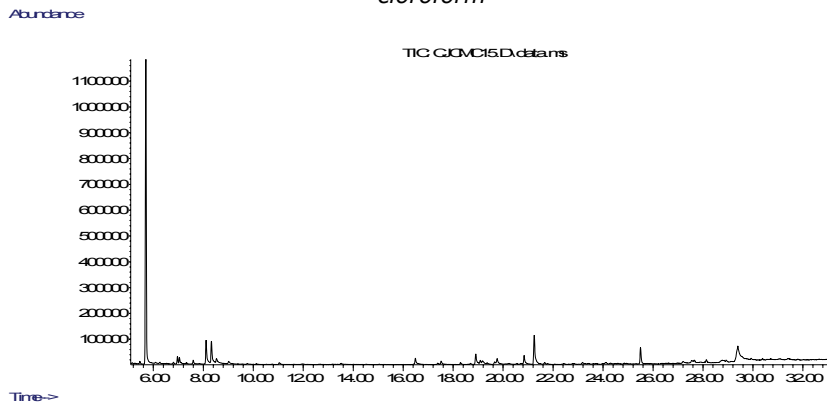


Figura A.45. - Extract din cetină de *Juniperus communis* Macea (la minutul 15) în cloroform

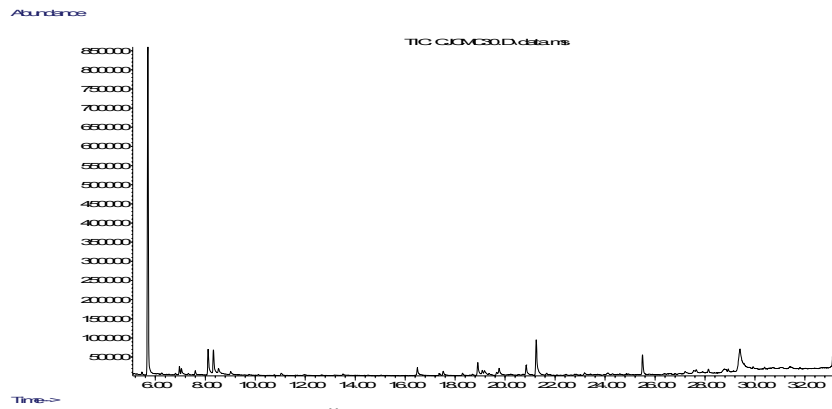


Figura A.46. - Extract din cetină de *Juniperus communis* Macea (la minutul 30) în cloroform

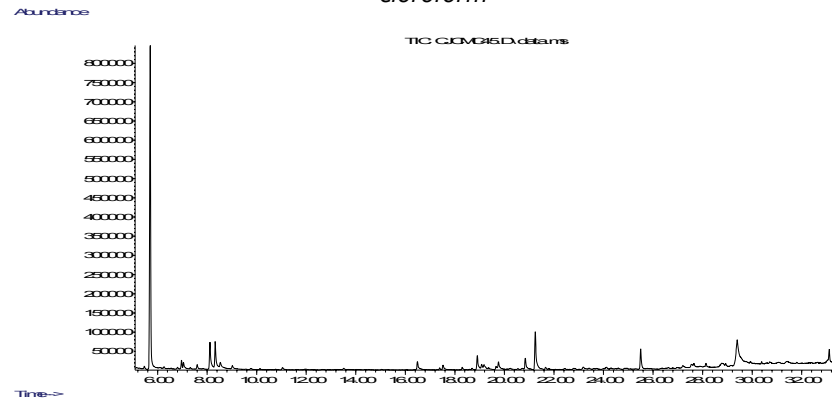


Figura A.47. - Extract din cetină de *Juniperus communis* Macea (la minutul 45) în cloroform

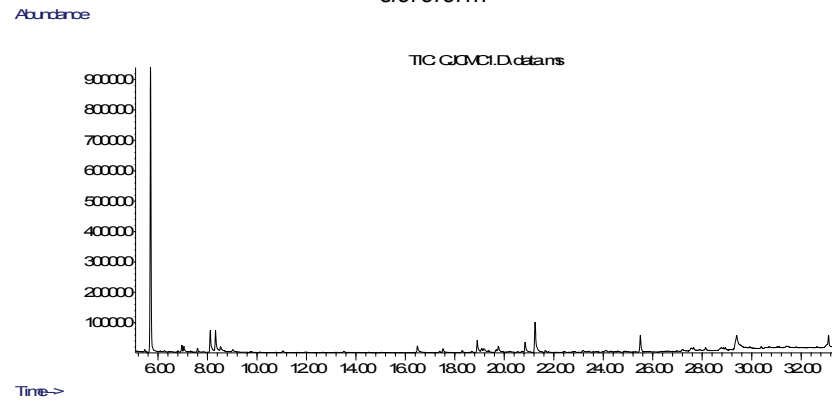


Figura A.48. - Extract din cetină de *Juniperus communis* Macea (la minutul 60) în cloroform

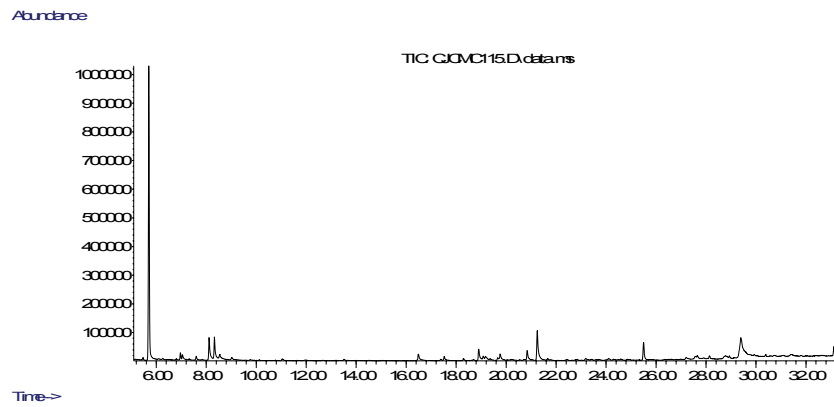


Figura A.49.- Extract din cetină de *Juniperus communis* Macea (la minutul 75) în cloroform

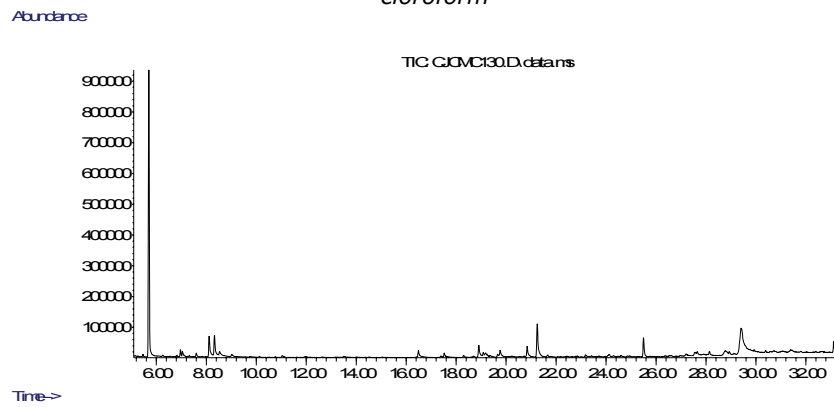


Figura A.50.- Extract din cetină de *Juniperus communis* Macea (la minutul 90) în cloroform

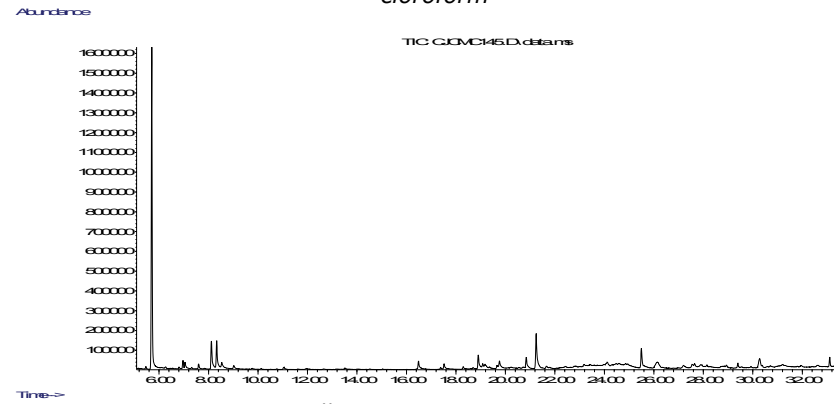


Figura A.51.- Extract din cetină de *Juniperus communis* Macea (la minutul 105) în cloroform

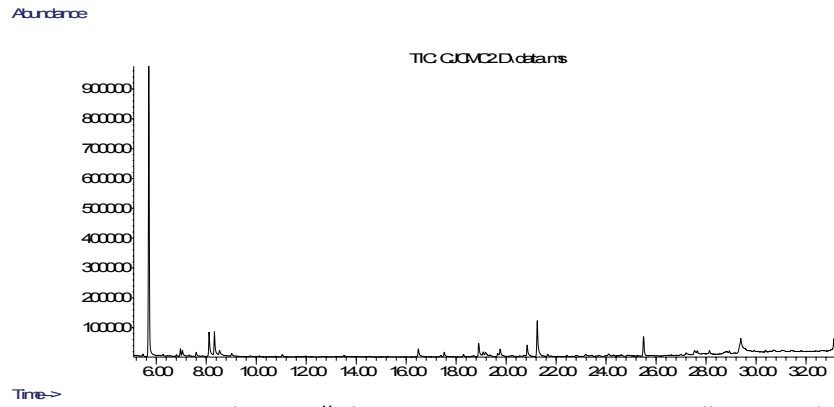


Figura A.52.- Extract din cetină de *Juniperus communis* Macea (la minutul 120) în cloroform

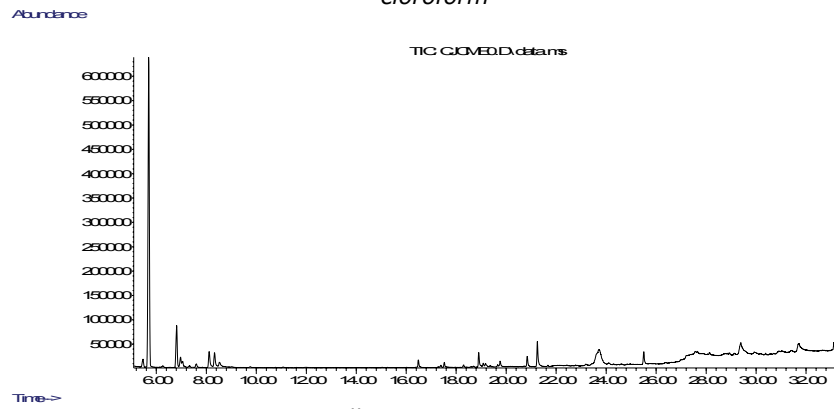


Figura A.53.- Extract din cetină de *Juniperus communis* Macea (la minutul 0) în etanol 96%

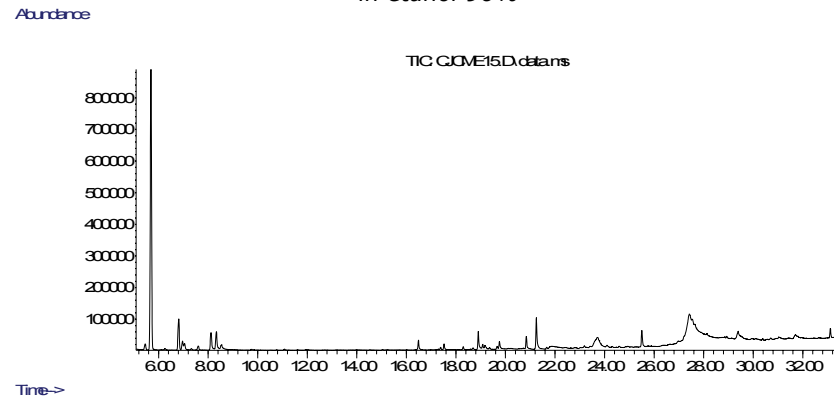


Figura A.54.- Extract din cetină de *Juniperus communis* Macea (la minutul 15) în etanol 96%

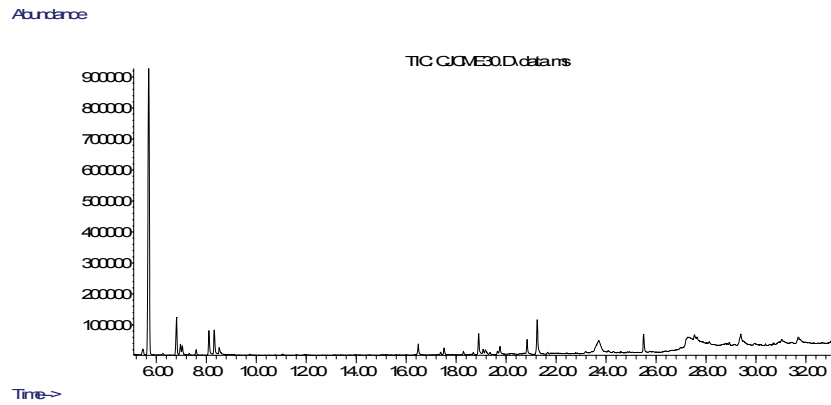


Figura A.55. - Extract din cetină de *Juniperus communis* Macea (la minutul 30) în etanol 96%

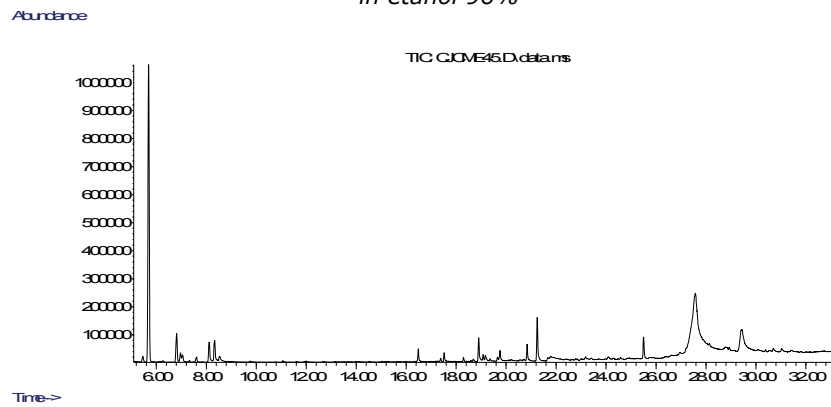


Figura A.56. - Extract din cetină de *Juniperus communis* Macea (la minutul 45) în etanol 96%

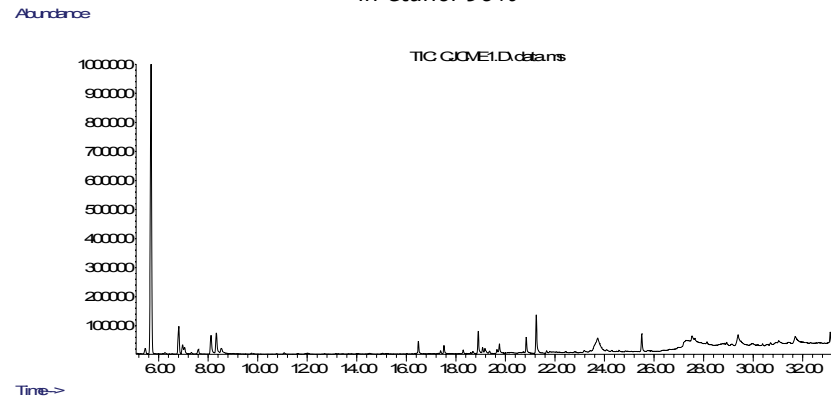


Figura A.57. - Extract din cetină de *Juniperus communis* Macea (la minutul 60) în etanol 96%

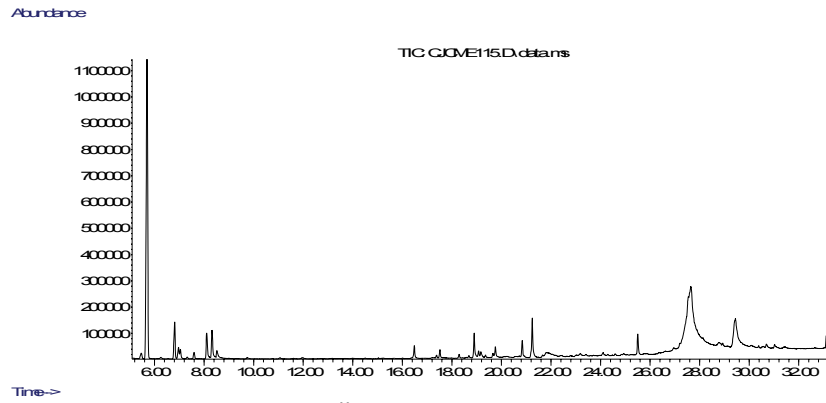


Figura A.58. - Extract din cetină de *Juniperus communis* Macea (la minutul 75) în etanol 96%

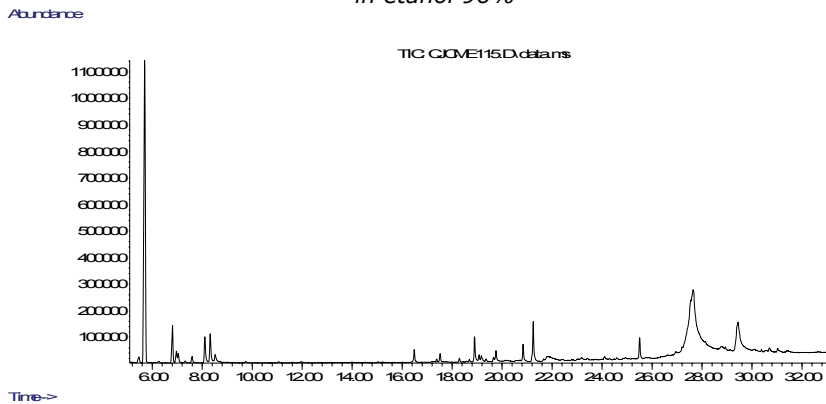


Figura A.59. - Extract din cetină de *Juniperus communis* Macea (la minutul 90) în etanol 96%

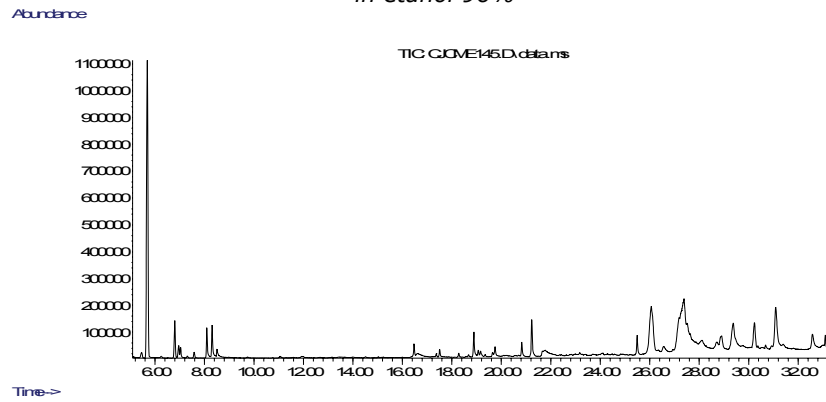


Figura A.60. - Extract din cetină de *Juniperus communis* Macea (la minutul 105) în etanol 96%

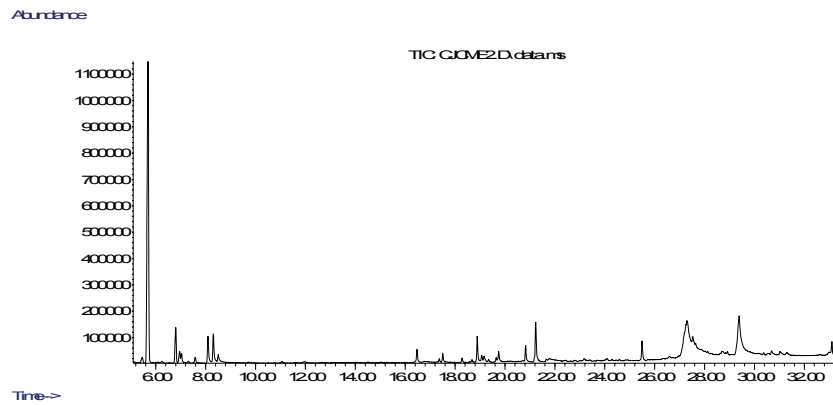


Figura A.61. - Extract din cetină de *Juniperus communis* Macea (la minutul 120) în etanol 96%

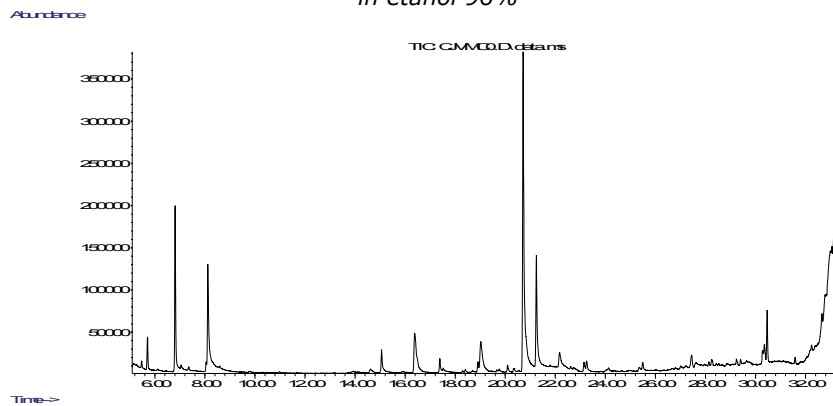


Figura A.62. - Extract din cetină de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 0) în cloroform

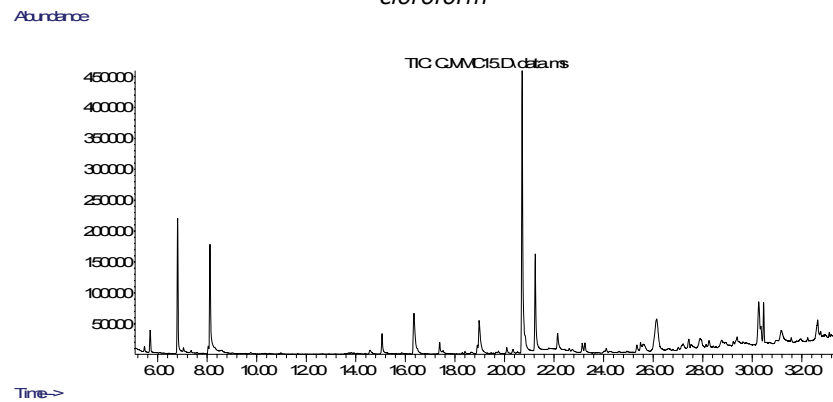


Figura A.63. - Extract din cetină de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 15) în cloroform

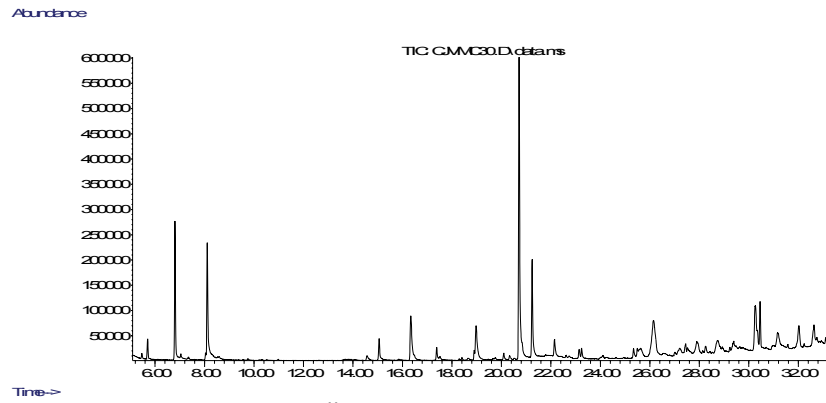


Figura A.64. - Extract din cetină de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 30) în cloroform

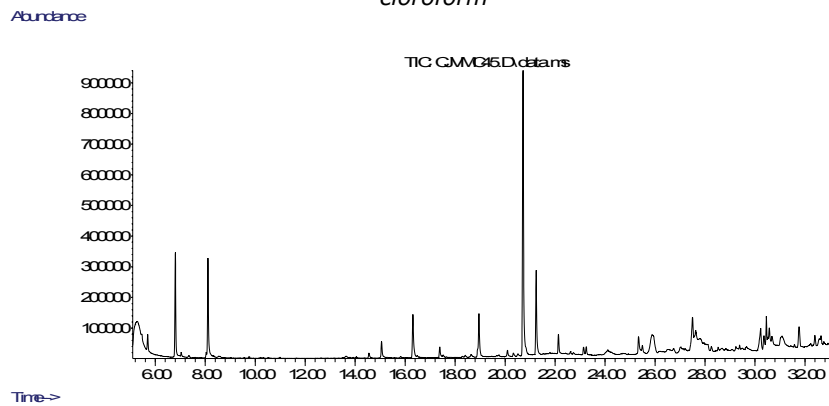


Figura A.65. - Extract din cetină de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 45) în cloroform

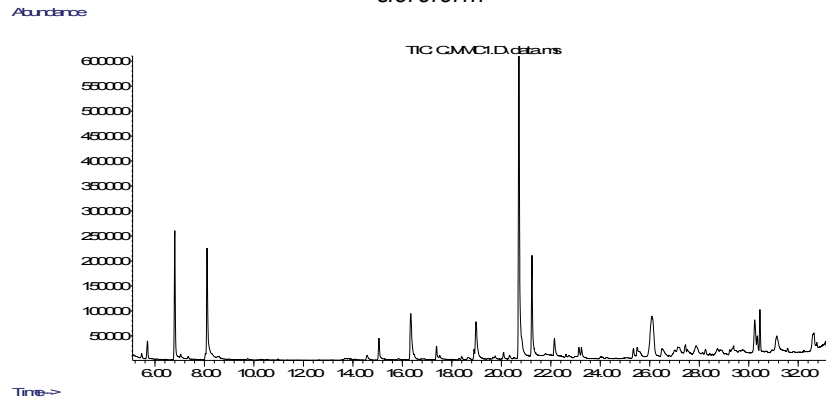


Figura A.66. - Extract din cetină de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 60) în cloroform

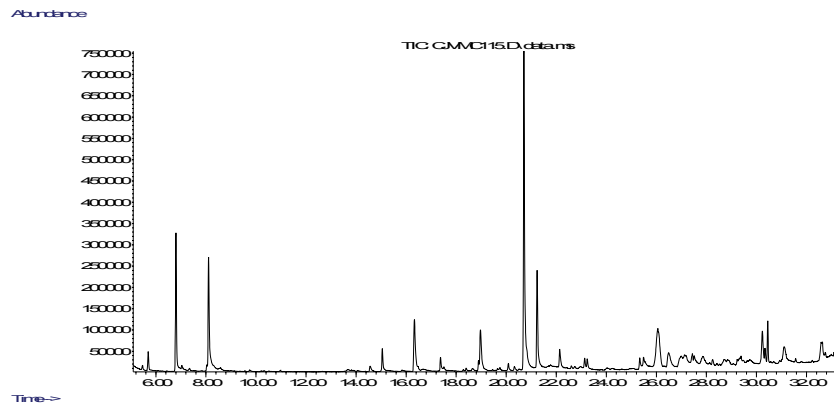


Figura A.67. - Extract din cetină de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 75) în cloroform

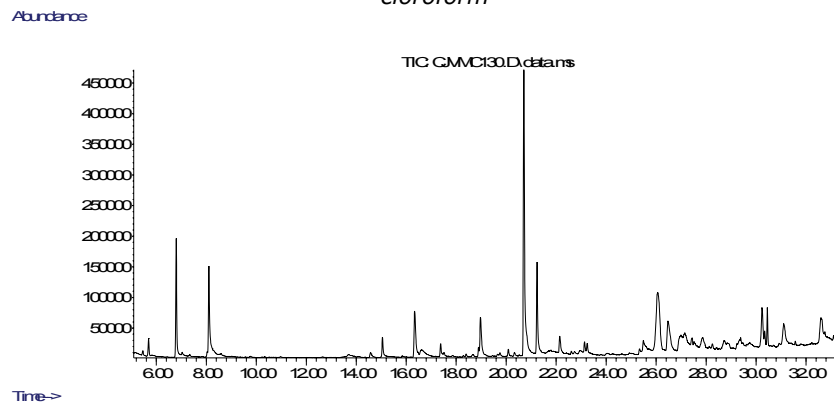


Figura A.68. - Extract din cetină de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 90) în cloroform

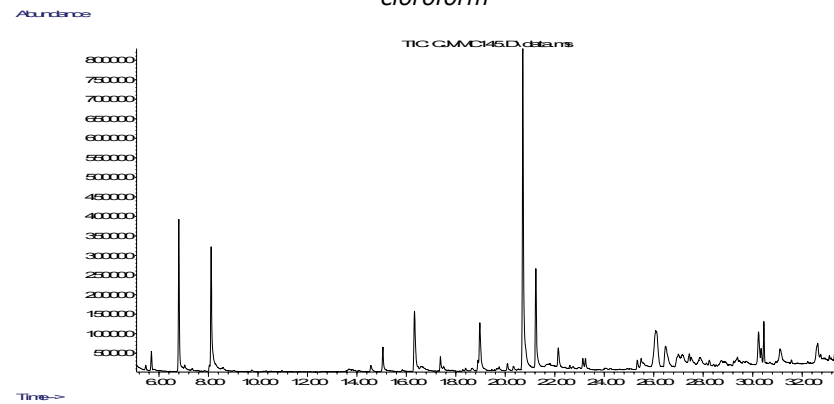


Figura A.69. - Extract din cetină de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 105) în cloroform

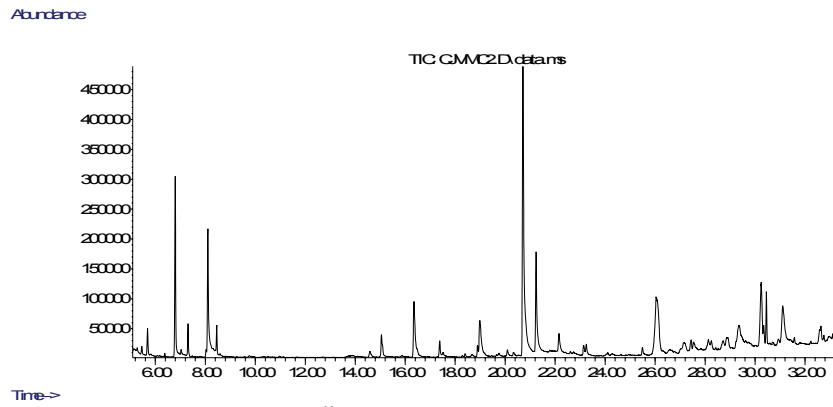


Figura A.70.- Extract din cetină de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 120) în cloroform

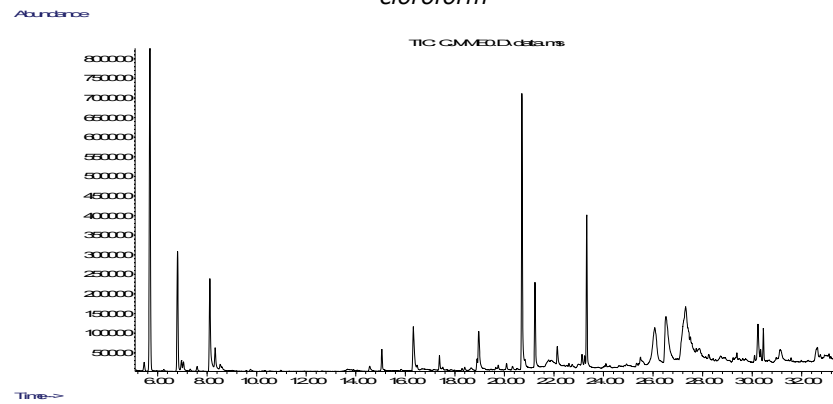


Figura A.71.- Extract din cetină de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 0) în etanol 96%

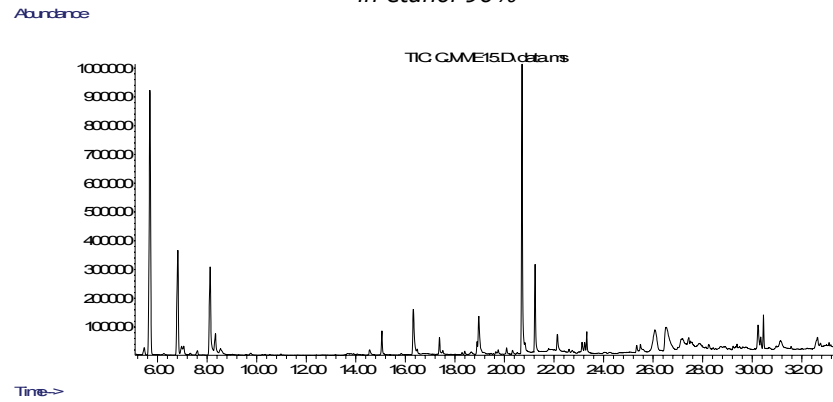


Figura A.72.- Extract din cetină de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 15) în etanol 96%

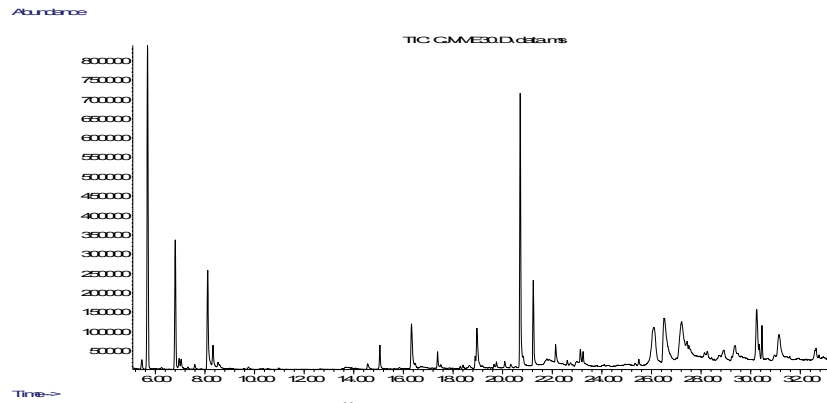


Figura A.73. - Extract din cetină de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 30) în etanol 96%

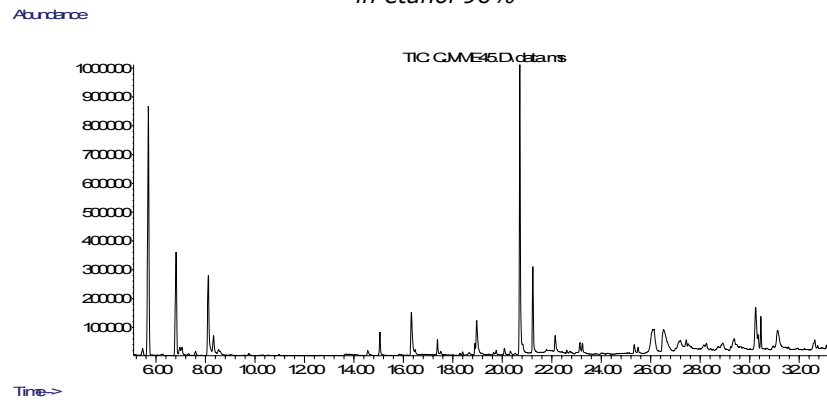


Figura A.74. - Extract din cetină de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 45) în etanol 96%

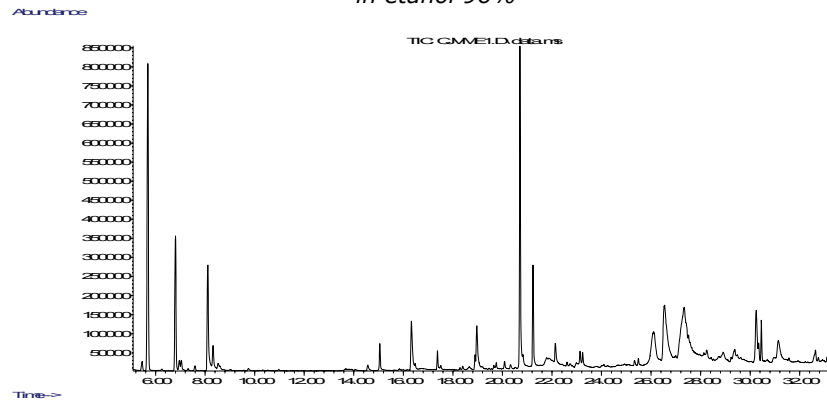


Figura A.75. - Extract din cetină de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 60) în etanol 96%

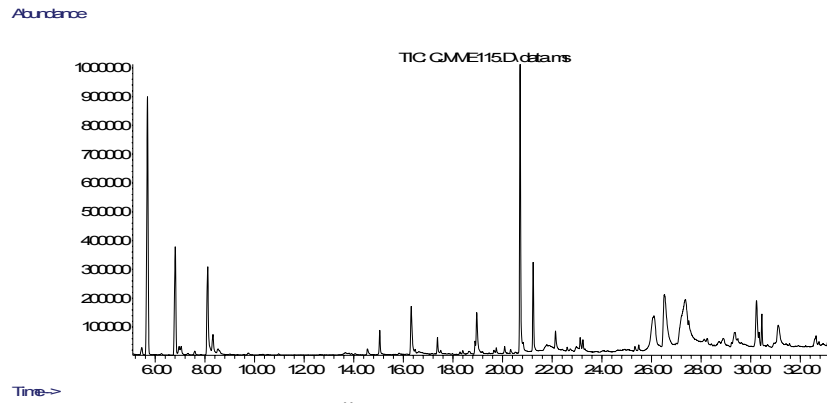


Figura A.76.- Extract din cetină de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 75)
în etanol 96%

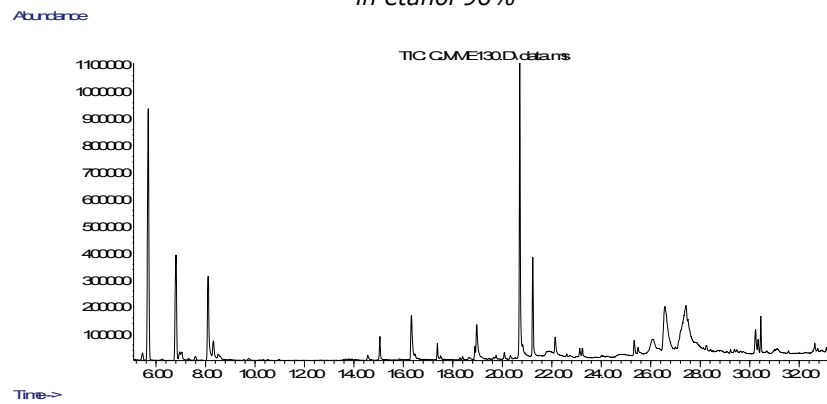


Figura A.77.- Extract din cetină de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 90)
în etanol 96%

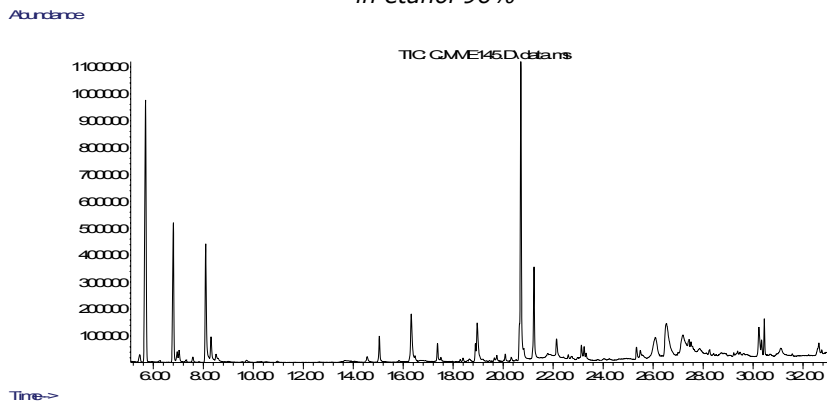


Figura A.78.- Extract din cetină de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 105)
în etanol 96%

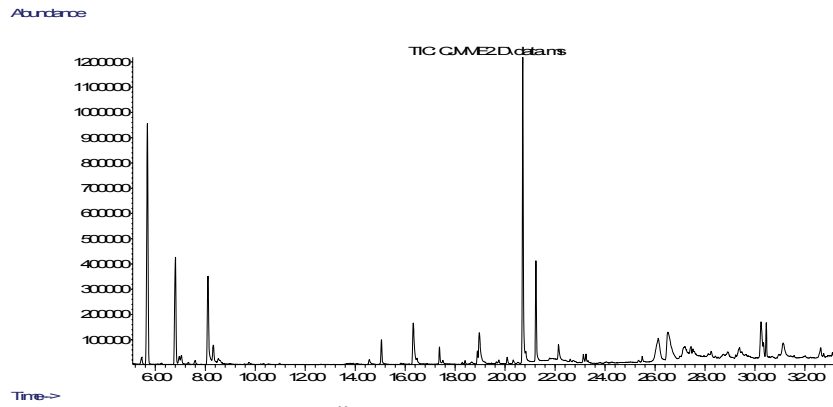


Figura A.79.- Extract din cetină de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 120) în etanol 96%

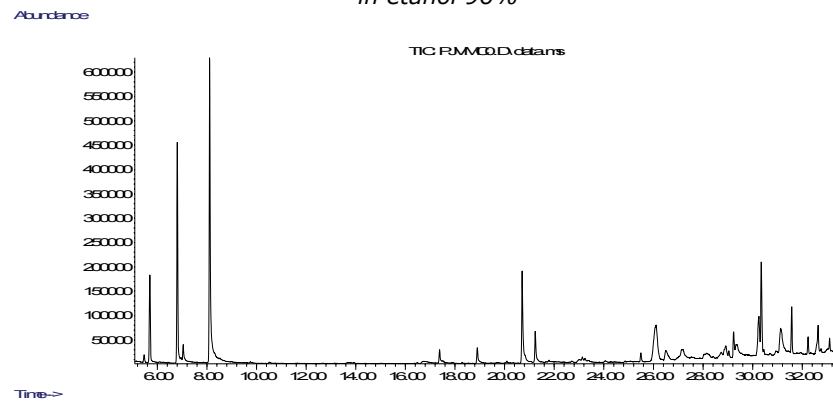


Figura A.80.- Extract din pseudobace de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 0) în cloroform

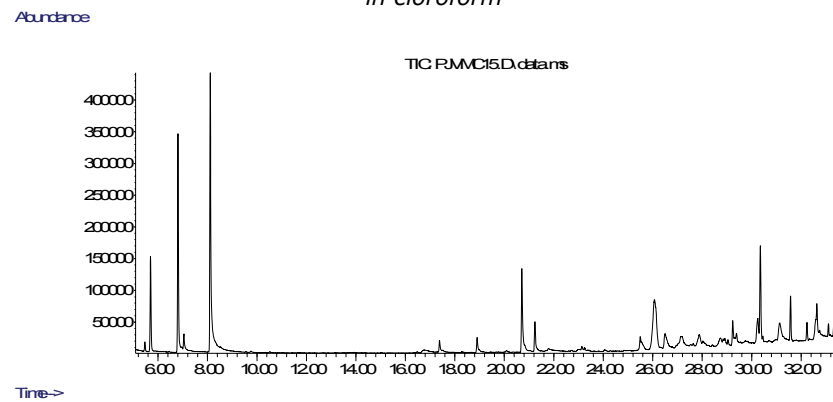


Figura A.81.- Extract din pseudobace de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 15) în cloroform

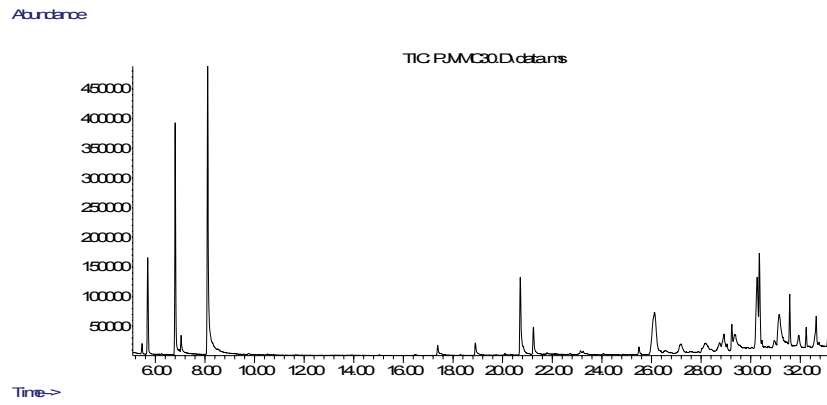


Figura A.82. - Extract din pseudobace de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 30) în cloroform

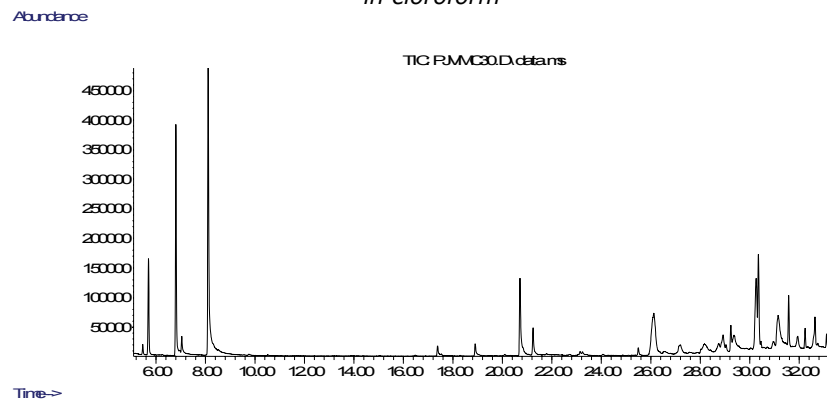


Figura A.83. - Extract din pseudobace de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 45) în cloroform

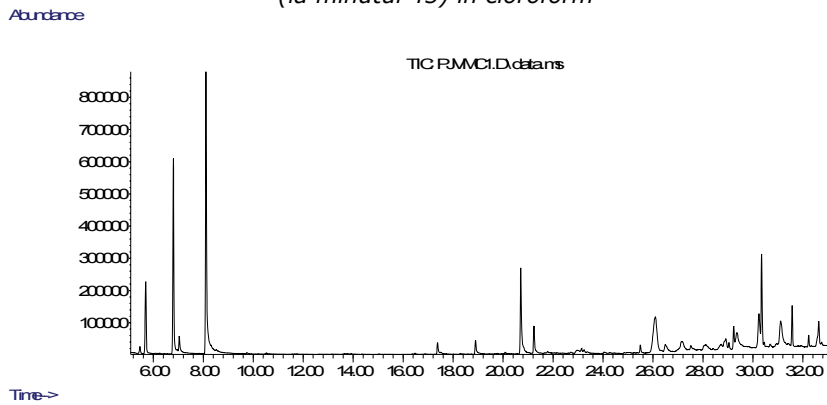


Figura A.84. - Extract din pseudobace de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 60) în cloroform

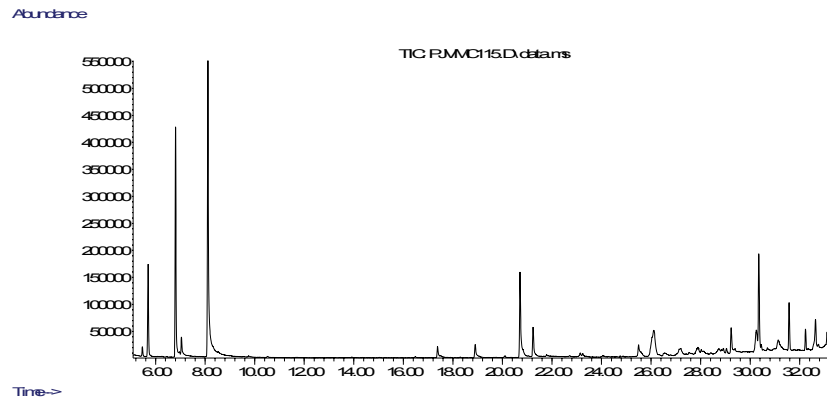


Figura A.85.- Extract din pseudobace de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 75) în cloroform

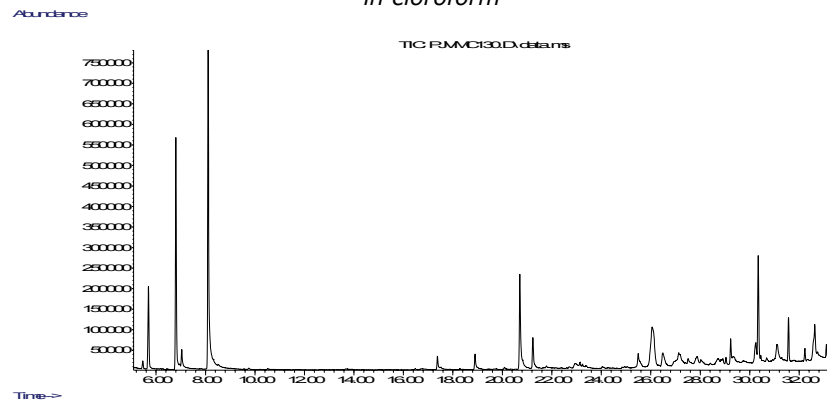


Figura A.86.- Extract din pseudobace de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 90) în cloroform

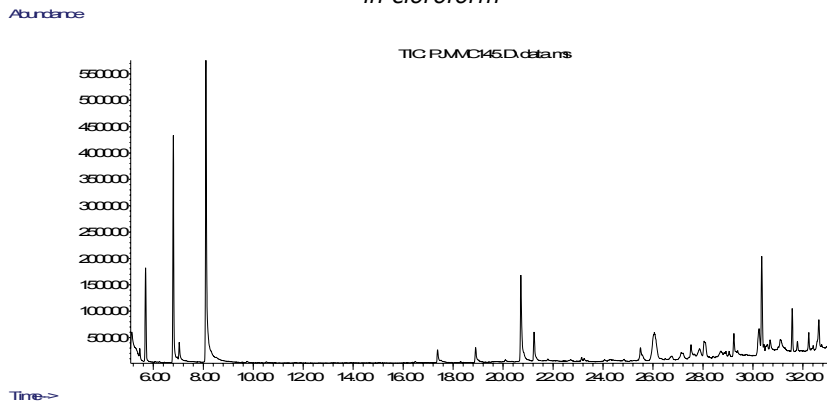


Figura A.87.- Extract din pseudobace de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 105) în cloroform

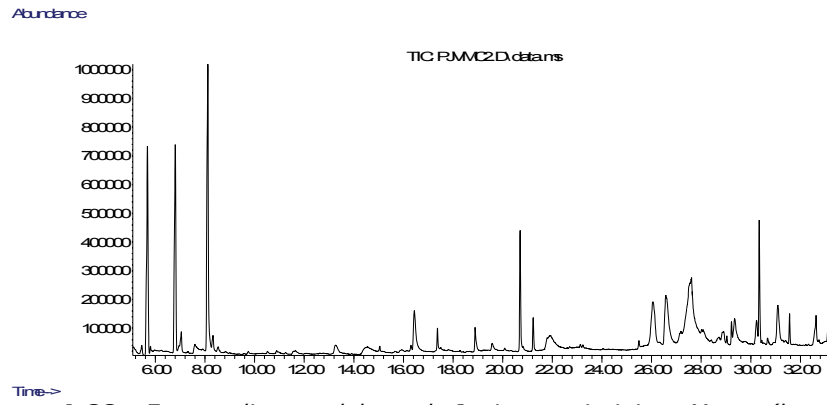


Figura A.88. - Extract din pseudobace de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 120) în cloroform

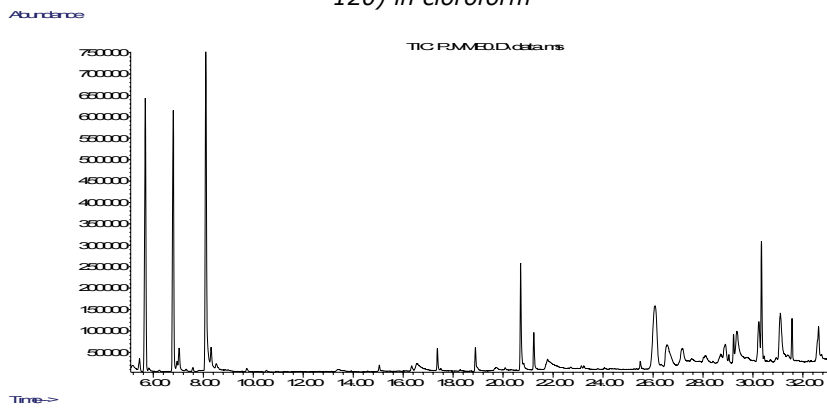


Figura A.89. - Extract din pseudobace de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 0) în etanol 96%

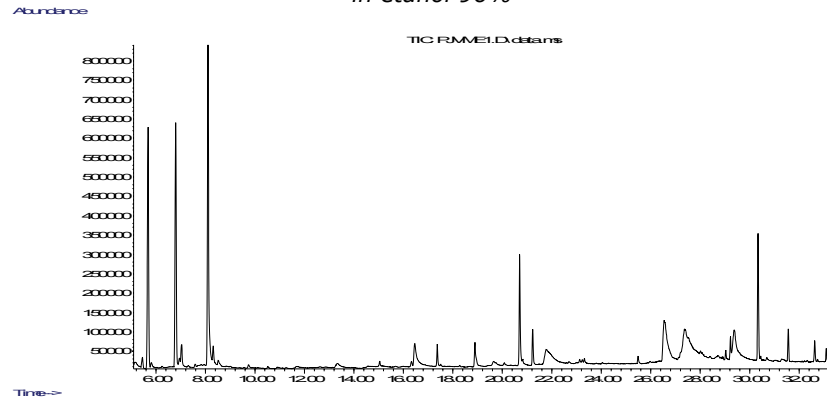


Figura A.90. - Extract din pseudobace de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 60) în etanol 96%

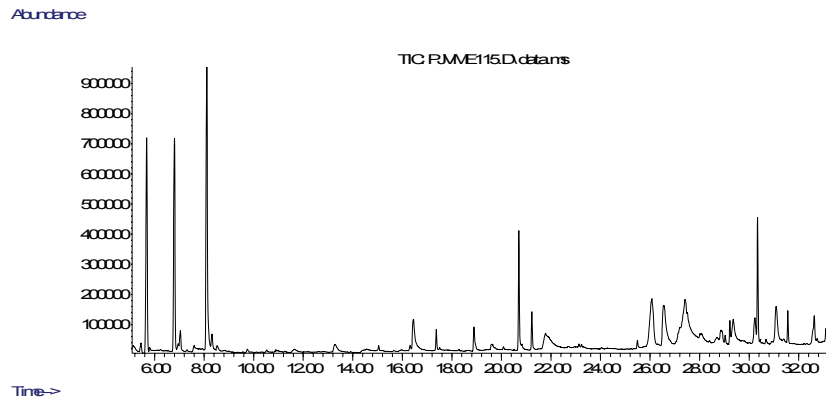


Figura A.91.- Extract din pseudobace de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 75) în etanol 96%

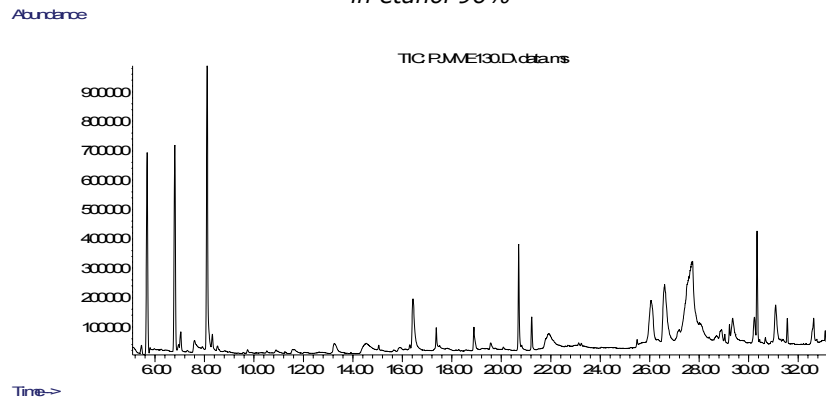


Figura A.92.- Extract din pseudobace de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 90) în etanol 96%

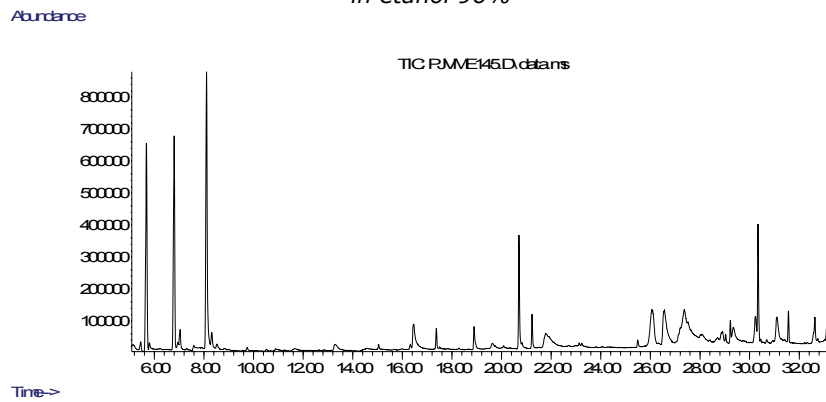


Figura A.93- Extract din pseudobace de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 105) în etanol 96%

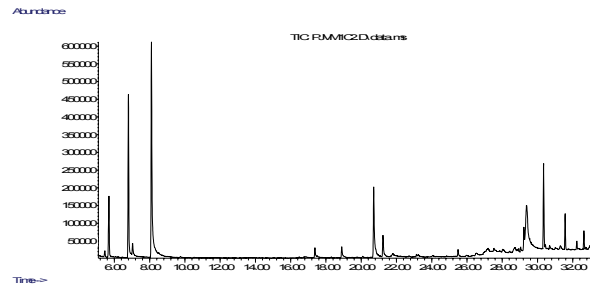


Figura A.94.- Extract din pseudobace de *Juniperus virginiana* Macea (la minutul 120) în etanol 96%

Cromatograme UV-VIS pentru extractele etanolice și hidrodistilatele de *Juniperus communis* respectiv *Juniperus virginiana*

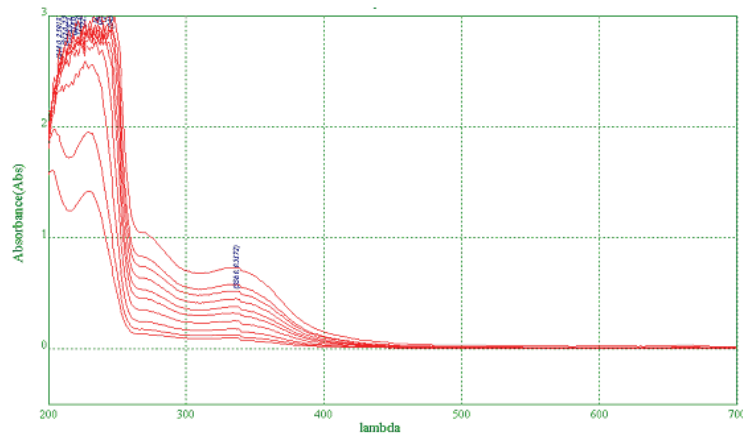


Figura A.95.- Spectre UV-VIS ale extractului de pseudobace de *Juniperus communis* Albac

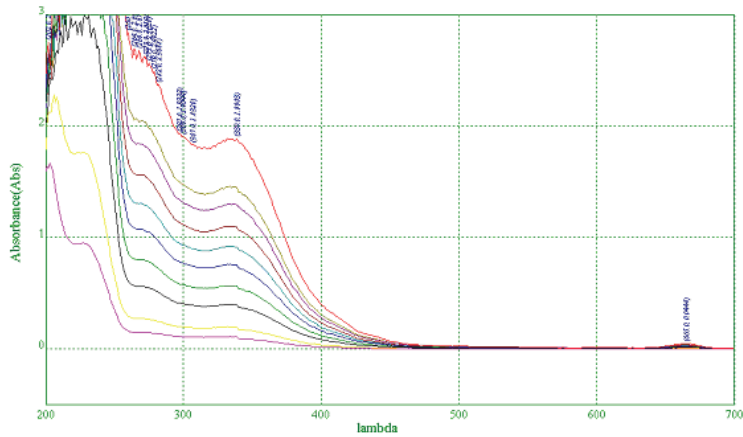


Figura A.96.- Spectre UV-VIS ale extractului de pseudobace de *Juniperus communis* Austria

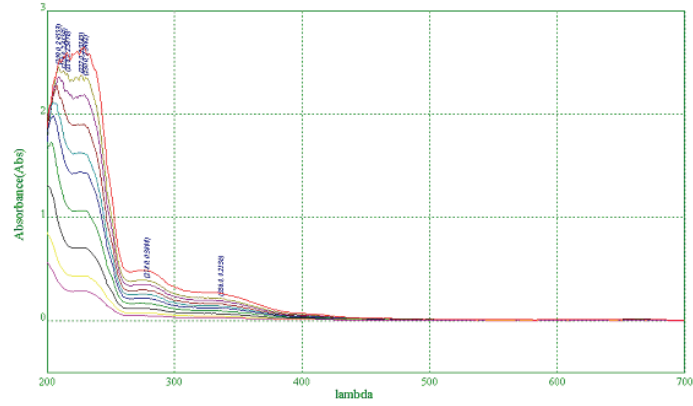


Figura A.97.- Spectre UV-VIS ale extractului de pseudobace de *Juniperus virginiana* Macea (2008)

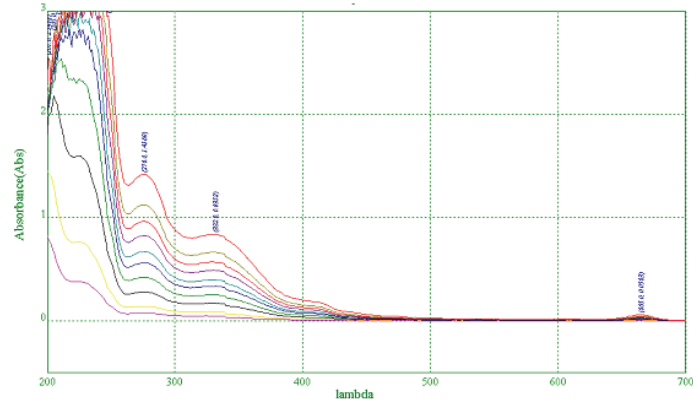


Figura A.98.- Spectre UV-VIS ale extractului de pseudobace de *Juniperus virginiana* Macea (2009)

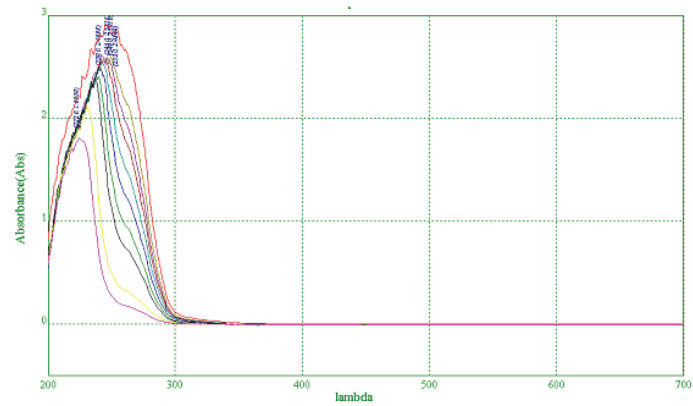


Figura A.99.- Spectre UV-VIS ale hidrodistilatului din pseudobace de *Juniperus communis* Albac

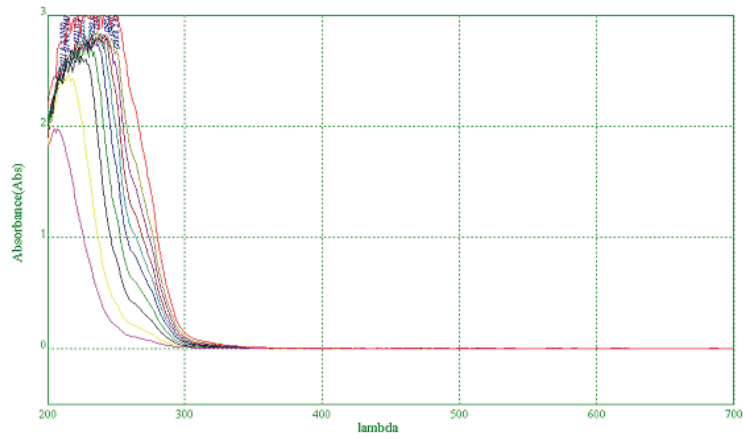


Figura A.100.- Spectre UV-VIS ale hidrodilatului din pseudobace de *Juniperus virginiana* Macea(2008)

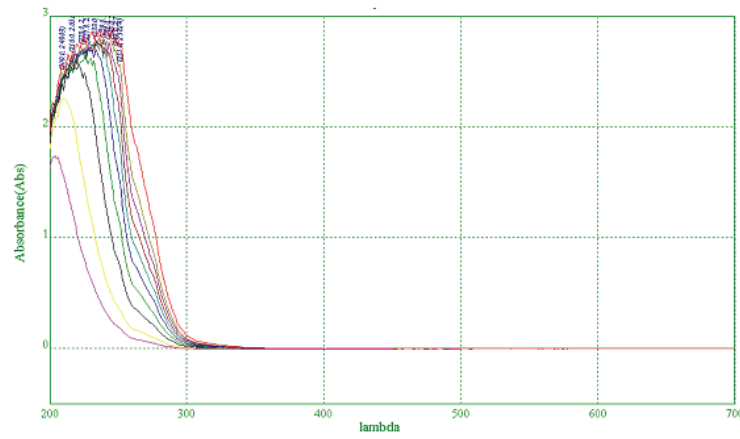


Figura A.101.- Spectre UV-VIS ale hidrodilatului din pseudobace de *Juniperus virginiana* Macea(2009)

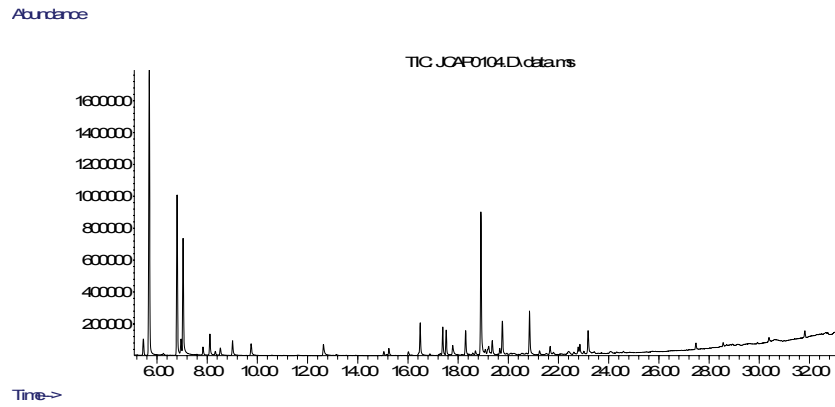


Figura A.102. - Ulei din pseudobace de *Juniperus communis* Austria

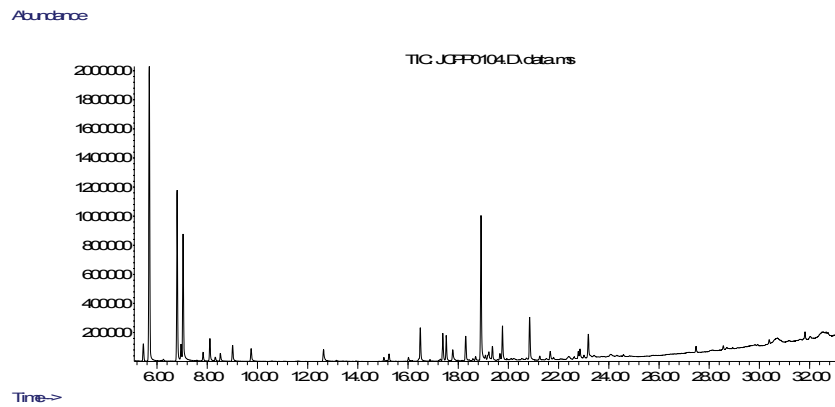


Figura A.103. - Ulei pseudobace de *Juniperus communis* Potionci (cules in 2010)

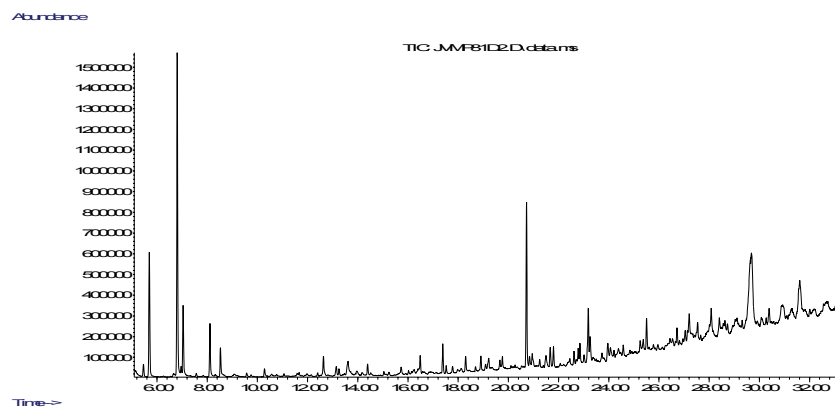


Figura A.104. - Ulei din pseudobace de *Juniperus virginiana* Macea (cules in 2009)

Tabel 1A. ANALIZA GraphPad CURBA DOZĂ – EFECT LA ACETILCOLINĂ

Comparison of Fits	
Null hypothesis	One curve for all data sets
Alternative hypothesis	Different curve for each data set
P value	< 0.0001
Conclusion (alpha = 0.05)	Reject null hypothesis
Preferred model	Different curve for each data set
F (DFn, DFd)	40.30 (12,264)

Different curve for each data set				
Best-fit values	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4
Bottom	-0,1687	-0,2375	-0,1251	-0,9774
Top	2,887	3,595	3,008	5,431
LogEC50	-5,526	-5,512	-5,568	-5,765
HillSlope	0,7464	0,7381	0,7675	0,5701
EC50	0,000002977	3,07E-06	2,7E-06	1,72E-06
Span	3,056	3,832	3,133	6,408

Std. Error				
Bottom	0,3042	0,2633	0,2719	0,726
Top	0,2894	0,2572	0,2387	0,4455
LogEC50	0,1439	0,1002	0,1221	0,1437
HillSlope	0,2334	0,1604	0,2043	0,1408
Span	0,5385	0,4731	0,4612	1,108

95% Confidence Intervals				
Bottom	-0.7765 to 0.4391	-0.7636 to 0.2886	-0.6684 to 0.4183	-2.428 to 0.4733
Top	2.309 to 3.465	3.081 to 4.109	2.531 to 3.485	4.541 to 6.321
LogEC50	-5.814 to -5.239	-5.713 to -5.312	-5.812 to -5.325	-6.052 to -5.478
HillSlope	0.2800 to 1.213	0.4176 to 1.059	0.3594 to 1.176	0.2888 to 0.8515
EC50	1.536e-006 to 5.771e-006	1.938e-006 to 4.875e-006	1.540e-006 to 4.736e-006	8.870e-007 to 3.328e-006
Span	1.980 to 4.132	2.887 to 4.777	2.212 to 4.055	4.194 to 8.622

Goodness of Fit				
Degrees of Freedom	66	66	66	66
R2	0,8429	0,9189	0,8761	0,9387
Absolute Sum of Squares	12,06	8,876	9,886	13,06
Sy.x	0,4274	0,3667	0,387	0,4448

Tabel 2A. ANALIZA GraphPad CURBA DOZĂ – EFECT LA EPINEFRINĂ

Comparison of Fits	
Null hypothesis	One curve for all data sets
Alternative hypothesis	Different curve for each data set
P value	< 0.0001
Conclusion (alpha = 0.05)	Reject null hypothesis
Preferred model	Different curve for each data set
F (DFn, DFd)	24.12 (12,184)

Different curve for each data set				
Best-fit values	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4
Bottom	-0,3681	-2,833	1,643	1,152
Top	30,78	25,85	13,64	16
LogEC50	-6,26	-6,324	-6,123	-6,156
HillSlope	1,44	1,023	2,078	1,966
EC50	5,49E-07	4,74E-07	7,54E-07	6,99E-07
Span	31,14	28,68	11,99	14,85

Std. Error				
Bottom	2,497	5,5	1,143	2,276
Top	1,291	2,189	0,8273	1,558
LogIC50	0,07069	0,1688	0,09022	0,1463
HillSlope	0,3155	0,3919	0,8362	1,137
Span	3,282	7,18	1,578	3,074

95% Confidence Intervals				
Bottom	-5.399 to 4.663	-13.91 to 8.247	-0.6601 to 3.946	-3.433 to 5.737
Top	28.17 to 33.38	21.44 to 30.26	11.97 to 15.30	12.86 to 19.14
LogEC50	-6.403 to -6.118	-6.665 to -5.984	-6.304 to -5.941	-6.450 to -5.861
HillSlope	0.8048 to 2.076	0.2335 to 1.813	0.3928 to 3.762	-0.3248 to 4.258
EC50	3.956e-007 to 7.622e-007	2.165e-007 to 1.036e-006	4.961e-007 to 1.146e-006	3.546e-007 to 1.377e-006
Span	24.53 to 37.76	14.22 to 43.15	8.814 to 15.17	8.656 to 21.04

Goodness of Fit				
Degrees of Freedom	46	46	46	46
R ²	0,9133	0,8626	0,755	0,5669
Absolute Sum of Squares	570,8	570,1	383,7	1336

Tabel 3A. ANALIZA GraphPad CURBA DOZĂ – EFECT LA NITROPRUSIAT DE SODIU

Comparison of Fits	
Null hypothesis	One curve for all data sets
Alternative hypothesis	Different curve for each data set
P value	< 0.0001
Conclusion (alpha = 0.05)	Reject null hypothesis
Preferred model	Different curve for each data set
F (DFn, DFd)	17.56 (12,184)

Different curve for each data set				
Best-fit values	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4
Bottom	0,1493	-0,4838	1,067	-2,782
Top	26,09	29,72	21,63	27,9
LogIC50	-6,034	-6,424	-5,904	-6,311
HillSlope	1,358	1,732	1,845	1,193
IC50	9,25E-07	3,77E-07	1,25E-06	4,89E-07
Span	25,94	30,2	20,56	30,68

Std. Error				
Bottom	1,409	3,971	0,5559	4,48
Top	1,284	1,527	0,722	1,894
LogIC50	0,056	0,09679	0,03367	0,1254
HillSlope	0,2685	0,6083	0,2668	0,3902
Span	2,345	4,78	1,051	5,8

95% Confidence Intervals				
Bottom	-2.689 to 2.987	-8.484 to 7.517	-0.05343 to 2.186	-11.81 to 6.244
Top	23.50 to 28.68	26.64 to 32.79	20.18 to 23.09	24.09 to 31.72
LogIC50	-6.147 to -5.921	-6.619 to -6.229	-5.972 to -5.836	-6.563 to -6.058
HillSlope	0.8170 to 1.899	0.5068 to 2.958	1.308 to 2.383	0.4064 to 1.979
IC50	7.134e-007 to 1.199e-006	2.404e-007 to 5.900e-007	1.068e-006 to 1.459e-006	2.733e-007 to 8.750e-007
Span	21.21 to 30.66	20.57 to 39.83	18.45 to 22.68	19.00 to 42.37

Goodness of Fit				
Degrees of Freedom	46	46	46	46
R ²	0,9365	0,8096	0,961	0,8655
Absolute Sum of Squares	288,3	1341	133,1	748,3
Sy.x	2,504	5,4	1,701	4,033

Tabel 4A. ANALIZA GraphPad CURBA DOZĂ – EFECT LA PIRENZEPINA

Comparison of Fits	
Null hypothesis	One curve for all data sets
Alternative hypothesis	Different curve for each data set
P value	< 0.0001
Conclusion (alpha = 0.05)	Reject null hypothesis
Preferred model	Different curve for each data set
F (DFn, DFd)	6.323 (12,184)

Different curve for each data set				
Best-fit values	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4
Bottom	0,7747	-0,4027	0,3406	-5,5
Top	95,68	95,36	96,2	103,9
LogIC50	-6,175	-6,152	-6,101	-5,999
HillSlope	3,006	2,242	2,349	1,226
IC50	6,68E-07	7,04E-07	7,93E-07	1E-06
Span	94,91	95,77	95,86	109,4
Std. Error				
Bottom	2,199	2,315	2,819	5,391
Top	1,521	1,602	2,103	5,405
LogIC50	0,02402	0,02313	0,02713	0,05245
HillSlope	0,3222	0,2216	0,3465	0,2158
Span	2,768	3,065	3,909	9,583

95% Confidence Intervals				
Bottom	-3.655 to 5.204	-5.068 to 4.262	-5.338 to 6.019	-16.36 to 5.362
Top	92.62 to 98.75	92.14 to 98.59	91.96 to 100.4	92.99 to 114.8
LogIC50	-6.223 to -6.127	-6.199 to -6.106	-6.155 to -6.046	-6.105 to -5.893
HillSlope	2.357 to 3.655	1.795 to 2.688	1.651 to 3.048	0.7917 to 1.661
IC50	5.978e-007 to 7.471e-007	6.326e-007 to 7.840e-007	6.994e-007 to 8.995e-007	7.857e-007 to 1.278e-006
Span	89.33 to 100.5	89.59 to 101.9	87.98 to 103.7	90.07 to 128.7

Goodness of Fit				
Degrees of Freedom	46	46	46	46
R ²	0,9779	0,9788	0,9665	0,9539
Absolute Sum of Squares	1926	1680	2769	3346
Sy.x	6,471	6,043	7,759	8,529