

UNIVERSITATEA „POLITEHNICA” DIN TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE CHIMIE INDUSTRIALĂ ȘI INGINERIA MEDIULUI

Ing.Dumitru Condrat

TEZĂ DE DOCTORAT

Conducător științific  
Prof.dr.ing. ALFA XENIA LUPEA

2010

UNIVERSITATEA „POLITEHNICA” DIN TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE CHIMIE INDUSTRIALĂ ȘI INGINERIA MEDIULUI

Ing. Dumitru Condrat

TEZĂ DE DOCTORAT

CONTRIBUȚII LA OBTINEREA  
UNOR EXTRACTE DIN PLANTE (PHANEROGAME)  
CU EFECT ANTIOXIDANT

Conducător științific  
Prof.dr.ing. ALFA XENIA LUPEA

TIMIȘOARA  
2010

## CUPRINS

Introducere	5
PARTEA I. STADIU ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU	7
I.1. Antioxidanți naturali (alimentari)	7
I.1.1. Acidul ascorbic	7
I.1.1.1. Aspecte generale	7
I.1.1.2. Structură.Nomenclatură	7
I.1.1.3. Proprietăți fizice și chimice	8
I.1.1.4. Proprietăți terapeutice	10
I.1.2. Antocianidine	12
I.1.2.1. Aspecte generale	12
I.1.2.2. Structură.Clasificare	13
I.1.2.3. Proprietăți fizice și chimice	14
I.1.2.4. Proprietăți terapeutice	15
I.1.3. Flavonoide	16
I.1.3.1. Aspecte generale	16
I.1.3.2. Clasificare.Structură	16
I.1.3.3. Proprietăți fizice și chimice	17
I.1.3.4. Aplicații terapeutice	19
I.1.4. Glutacionul	20
I.1.4.1. Aspecte generale	20
I.1.4.2. Sinteză	21
I.1.4.3. Proprietăți terapeutice	21
I.1.5. Carotenoide	21
I.1.5.1. Aspecte generale	21
I.1.5.2. Clasificare.Structură	22
I.1.5.3. Nomenclatură	22
I.1.5.4. Proprietăți fizice și chimice	23
I.1.5.5. Aplicații terapeutice	26
I.1.6. Tocoferoli	27
I.1.6.1. Aspecte generale	27
I.1.6.2. Clasificare.Structură	28
I.1.6.3. Proprietăți fizice și chimice	28
I.1.6.4. Efecte terapeutice	30
I.2. Extracția și separarea antioxidantilor naturali	30
I.2.1. Tehnici clasice de extracție	30
I.2.1.1. Extracția simplă (macerarea)	30
I.2.1.2. Extracția multiplă (în trepte)	30
I.2.1.3. Extracția continuă în contracurent cu contact multiplu	30
I.2.1.4. Procedul Soxhlet	31
I.2.2. Tehnici alternative de extracție	31
I.2.2.1. Extracția cu fluide supercritice	31
I.2.2.2. Extracția cu microunde	31
I.2.2.3. Extracția cu ultrasunete	32
I.3. Identificarea substanțelor cu efect antioxidant	33
I.3.1. Metode spectroscopice de cercetare	33

I.3.1.1. Spectroscopia electronică (UV-VIZ)	33
I.3.1.2. Spectroscopia de vibrație (IR)	35
I.3.1.3. Rezonanța magnetică nucleară (RMN)	37
I.3.1.4. Spectrometria de masă (SM)	37
I.3.2. Metode cromatografice de identificare	38
I.3.2.1. Cromatografia pe hârtie	38
I.3.2.2. Cromatografia în strat subțire	39
I.3.2.3. Cromatografia pe coloană	39
I.3.2.4. Cromatografia de gaze	40
I.3.2.5. Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC)	40
I.4. Activitatea antioxidantilor naturali ( alimentari)	42
I.4.1. Aspecte generale	42
I.4.2. Activitatea antioxidantă și antiradical	42
I.5. Aplicații ale antioxidantilor naturali	47
I.6. Acțiunea biologică a antioxidantilor	48
I.7. Date botanice despre plantele din genul Angiospermatophyta și Spermatophyta alese pentru obținerea extractelor cu efect antioxidant	49
I.7.1. Alchemilla vulgaris	49
I.7.2. Allium ursinum	51
I.7.3. Acorus calamus	53
I.7.4. Solidago virga aurea	56
I.7.5. Agrimonia eupatoria	58
I.7.6. Viscum album	60
I.7.7. Veronica officinalis	62
 PARTEA A-II-A. CONTRIBUȚII PROPRII	 64
II.1. Specificații plante uscate din genul Angiospermatophyta și Spermatophyta	64
II.2. Obținerea extractelor vegetale cu efect antioxidant	65
II.2.1. Aspecte generale	65
II.2.2. Extracte apoase	66
II.2.3. Extracte diclormetanice	67
II.2.4. Extracte hidroalcoolice	67
II.2.4.1. Obținerea extractelor prin extracție statică	67
II.2.4.2. Obținerea extractelor prin metoda Soxhlet	70
II.2.4.3. Obținerea extractelor în condiții dinamice	72
II.2.4.4. Obținerea extractelor prin extracție cu ultrasunete	73
II.3. Identificarea calitativă și cantitativă a principiilor active din materiile prime vegetale din clasa Monocotiledonate și Dicotiledonate	74
II.3.1. Extractul diclormetanice	75
II.3.1.1. Frațiunea nesaponificabilă	75
II.3.1.1.1. Identificarea uleiurilor volatile	75
II.3.1.1.2. Identificarea alcaloizilor de bază	75
II.3.1.1.3. Identificarea carotenoidelor	76
II.3.1.1.4. Identificarea substanțelor triterpenice	76



II.3.1.2. Frațiunea saponificabilă	77
II.3.1.2.1. Identificarea acizilor grași	77
II.3.1.2.2. Identificarea antracenolilor	77
II.3.2. Extractul metanolic	77
II.3.2.1. Identificarea glucidelor reducătoare	77
II.3.2.2. Identificarea antocianozidelor	78
II.3.3. Extractul apos	79
II.3.3.1. Identificarea aminoacizilor și proteinelor	79
II.3.3.2. Identificarea glucidelor reducătoare	79
II.3.3.3. Identificarea sărurilor alcaloizilor	79
II.3.4. Acidul ascorbic	80
II.3.4.1. Reacții de identificare	81
II.3.4.2. Metode de determinare cantitativă a acidului ascorbic	83
II.3.4.2.1. Metoda electrochimică	83
II.3.4.2.2. Metoda 2,6-diclorfenol indofenol	86
II.3.5. Antocianidine	88
II.3.5.1. Analiza calitativă a antocianidinelor	88
II.3.5.2. Analiza cantitativă a antocianidinelor	89
II.3.6. Flavonoide	90
II.3.6.1. Reacții de identificare	90
II.3.6.2. Determinarea conținutului total de flavonoide	92
II.3.6.3. Determinarea cantitativă a quercetinei, kamferolului, rutinei și miricetinei din extracte metanolice, etanolice și apoase	95
II.3.7. Taninuri	104
II.3.7.1. Reacții de culoare și precipitare	105
II.3.7.2. Determinarea cantitativă a taninurilor la rece cu soluție de $\text{KMnO}_4$ 0,01N	107
II.3.7.3. Determinarea cantitativă a acidului galic prin cromatografie de lichide de înaltă performanță	108
II.3.8. Compuși polifenolici	112
II.3.8.1. Identificarea calitativă a compușilor polifenolici	113
II.3.8.2. Determinarea conținutului de polifenoli totali	113
II.4. Analiza unor compuși naturali din extractele vegetale cercetate prin spectrometrie de masă	115
II.5. Metode de analiză fizico-chimice a activității antioxidante și antiradical a extractelor vegetale cercetate	128
II.5.1. Metoda spectrofotometrică cu DPPH (1,1-difenil-2 picrilhidrazil)	128
II.5.2. Metoda permanganometrică	133
II.5.3. Metoda chemiluminometrică utilizând luminol	135
II.6. Studiul activității antimicrobiene a extractelor hidroalcoolice vegetale cercetate	144
II.7. Aplicații ale extractelor vegetale cercetate	147
II.7.1. Influența extractului de <i>Solidago virga aurea</i> și a mixturii antioxidante asupra stabilității termice a uleiului de măsline extra virgin prin analiză termică diferențială (TG/DG/DTA)	147
Concluzii	157
Bibliografie	160

Anexe	169
Anexa 1	171
Anexa 2	174
Anexa 3	177
Anexa 4	201

## INTRODUCERE

Printre numeroasele probleme de interes în lumea științifică contemporană sunt și acelea legate de înlocuirea aditivilor de sinteză utilizați în compoziții cu destinații din cele mai diferite (alimente, medicamente, cosmetice, etc.) cu produse naturale extrase din plante, ținând seama de principiile active proprii acestora.

Mecanismele proceselor biochimice care au loc în plantele medicinale prezintă o serie de particularități, unele dintre ele încă neelucidate, iar transformările calitative, consecință a interdependenței dintre procesele metabolice și acțiunea diferiților factori din mediul ambiant, sunt intense și continue.

În vederea valorificării plantelor cercetate este necesară cunoașterea conținutului lor în principii active, utilizarea unor metode de extracție, utilizarea unor metode de analiză fizico-chimice și aplicarea extractelor în diferite domenii de activitate.

Materialul vegetal analizat provine de la Fares S.A.-Orăștie, Tricolorul S.A. Cluj-Napoca și S.C. STEF-MAR S.R.L.-Vâlcea, iar obiectivul principal al acestei teze a constat în analiza activității antioxidante și antiradical a unor extracte din plante și caracterizarea lor în vederea obținerii unei mixturi cu efect antioxidant.

Materialul vegetal din care s-a obținut extractele a constat din: *Alchemilla vulgaris* – partea aeriană; *Allium ursinum* – frunze; *Acorus calamus* – rădăcina; *Solidago virga aurea* – partea aeriană; *Agrimonia Eupatoria* – partea aeriană; *Veronica officinalis* – partea aeriană; *Viscum album* – frunze cu rămurele.

Teza cuprinde două părți:

Partea I, în care sunt prezentate considerațiile teoretice generale despre: principalele clase de produși naturali cu potențial antioxidant, metode clasice și alternative de extracție, metode spectroscopice de cercetare, activitatea antioxidantă/antiradical și aplicațiile antioxidantilor naturali.

Partea a II-a, în care sunt prezentate contribuțiile proprii, care cuprind date cu privire la caracteristicile plantelor studiate, metode de extracție variate cu solvenți diferiți, identificarea calitativă și cantitativă a principiilor active din plantele cercetate, activitatea antioxidantă și antimicrobiană a extractelor vegetale, aplicarea extractului de *Solidago virga aurea* și a mixturii antioxidante obținute în ulei de măsline extra virgin.

**Obiectivele urmărite** în cadrul tezei de doctorat au fost:

- Determinarea principalilor produși de metabolism secundar din materiile prime vegetale luate în studiu din clasa Monocotiledonate și Dicotiledonate;
- Extracția antioxidantilor naturali din materiile prime vegetale din încrengătura Angiospermatophyta și Spermatophyta prin metode de extracție clasice sau alternative cu solvenți de concentrații diferite;
- Determinarea cantitativă și calitativă a conținutului de: acid ascorbic, antocianidine, flavonoide, compuși polifenolici și taninuri;
- Determinarea activității antioxidante și antiradical a extractelor vegetale prin diferite metode de analiză fizico-chimice;
- Determinarea compușilor cu potențial antioxidant din extractele vegetale cercetate prin spectrometrie de masă;
- Analiza extractului de *Alchemilla vulgaris* prin spectrometrie de masă;

- Determinarea activității antimicrobiene a extractelor vegetale cercetate;
- Aplicarea extractului vegetal de *Solidago virga aurea* și a mixturi antioxidante, ca factori de protecție în uleiul de măsline extra virgin.

## PARTEA I

### STADIU ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU

#### I.1.ANTIOXIDANȚI NATURALI

##### I.1.1. Acidul ascorbic

###### I.1.1.1. Aspecte generale

Factorul hidrosolubil C a fost izolat prima dată în suc de lămâie de către S. S. Zilva în perioada 1923-1925.

În 1927, A.Szent-Györgyi izolează din partea corticală a glandelor suprarenale de porc o substanță instabilă, cu puternice proprietăți oxido-reducătoare, capabilă în doză de 1mg/zi să prevină apariția și dezvoltarea scorbutului la cobai.

Același produs îl obține A.Szent-Györgyi în 1928 din ardei și varză, stabilindu-i formula moleculară  $C_6H_8O_6$ , iar datorită caracterului său acid și reducător i-a atribuit denumirea de „acid hexuronic”.

În 1933, Dr.Tadeusz Reichstein sintetizează în Basel–Elveția acidul ascorbic, care este identic cu vitamina C naturală [1].

Vitamina C este cea mai veche sesizată și mai bine cunoscută vitamină, iar în lipsa acesteia din hrană apare la oameni boala numită scorbut.

Vitamina C are un rol foarte important în organism întrucât are un pronunțat caracter antioxidant.

Protejează de degradări oxidative numeroase substanțe biologice active, stimulează sistemul imunitar, biosinteza colagenului și a acizilor folici, secreția unor hormoni steroidici și a unor transmițători neurotisulari, previne formarea nitrozaminelor în stomac, ia parte în metabolismul aminoacizilor, glucidelor, acizilor grași, fierului, hemoglobinei și a altor substanțe [1, 2].

###### I.1.1.2. Structură. Nomenclatură [1].

Vitamina C sau acidul ascorbic (AAsc) are formula moleculară  $C_6H_8O_6$  iar ca structură este  $\gamma$ -lactona acidului 2,3-dienol-L-gulonic, ce se formează din acidul 2-ceto-gulonic.

Structura moleculară a vitaminei C se caracterizează prin prezența a două grupări –OH enolice vecine, la C-2 și C-3, între care există o dublă legătură, prezența unei grupări alcoolice primare la C-6 și a unui hidroxil secundar la C-5 în poziție L, un ciclu furanic cu funcție lactonică format între atomii C-1 și C-4 și o catenă laterală formată din 2 carboni, legată de C-4 conform figuri 1.

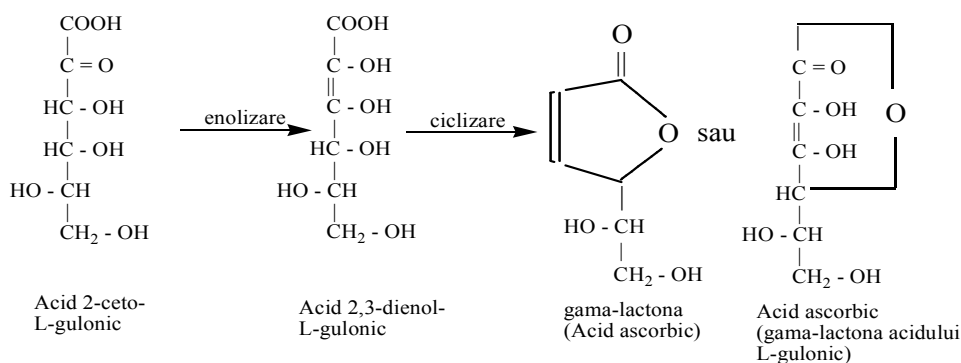


Figura 1. Structura vitaminei C

Dintre analogii structurali ai acidului ascorbic, cu activitate vitaminică, pe primul loc se situează acidul dehidroascorbic (ADAsc), cu care acidul ascorbic formează cel mai important sistem de oxido-reducere din organismele vegetale și animale, sistem redat în figura 2.

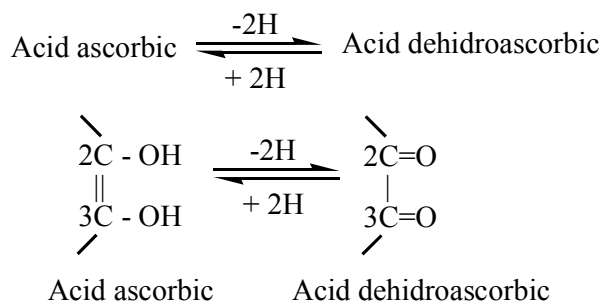


Figura 2. Sistemul de oxido-reducere al acidului ascorbic

În ce privește corelația dintre structură și activitate s-a demonstrat că activitatea biologică și biochimică a acidului ascorbic este determinată de prezența grupării funcționale endiolice care poate trece reversibil în grupări cetonice; de configurația L a hidroxilului de la C-5, singurul izomer fiziologic activ; grupările enolice să fie libere, iar acidul ascorbic și acidul dehidroascorbic să conțină ciclul lactonic între C-1 și C-4. Formele deschise, fără ciclul lactonic, sunt complet inactive.

Integritatea ciclului lactonic în molecula acidului ascorbic este absolut necesară deoarece prin deschiderea acestuia se inactivează gruparea „en-diol”.

### I.1.1.3. Proprietăți fizice și chimice

#### I.1.1.3.1. Proprietăți fizice [1, 3].

Acidul ascorbic este o substanță solidă, albă, cristalină cu punct de topire la 192°C (cu descompunere), fără miros și cu gust acru. Este o substanță optic activă dextrogiră, cu unghiul de (+)32, 5° în apă și (+) 48° în metanol.

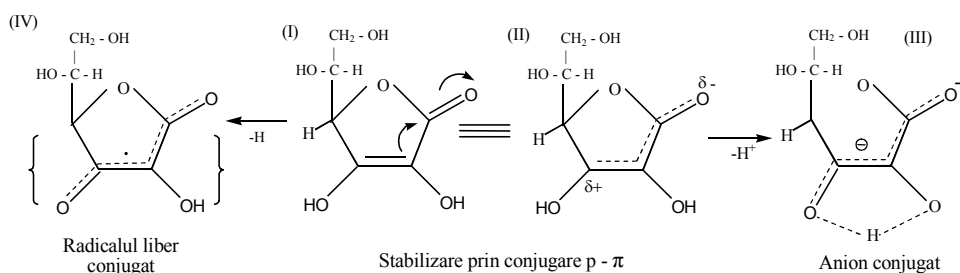
Are un spectru de absorbție caracteristic, cu un maxim la 245nm în soluție slab acidă și la 265nm în mediu alcalin, fapt ce explică prezența unui sistem de duble legături conjugate, cu o grupare –OH enolizabilă.

Este ușor solubil în apă și metanol, greu solubil în alcool etilic, acetonă și glicerină și insolubil în eter, hidrocarburi alifatică și aromatice.

### 1.1.1.3.2. Proprietăți chimice [3].

Acidul L-ascorbic este un reducător puternic datorită structurii de endiol, responsabilă și de aciditatea sa particulară. Structura de endiol este stabilizată prin conjugare cu grupa carbonil din ciclul lactonic (formulele I și II).

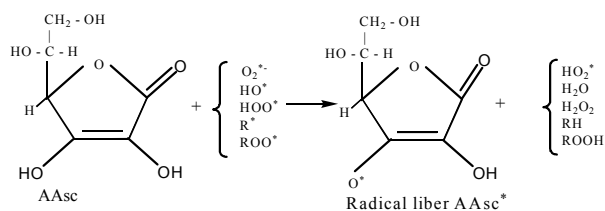
Datorită aceleiași posibilități de conjugare, se explică aciditatea ridicată în prima treaptă (III) și stabilitatea radicalilor liberi (IV) ai acidului L-ascorbic conform schemei 1.



Schema 1. Structuri de endiol pentru acidul ascorbic

Ca donor și acceptor de hidrogen, acidul ascorbic și acidul dehidroascorbic iau parte efectiv la numeroase procese radicalice din alimente și țesuturi conform schemei 2.

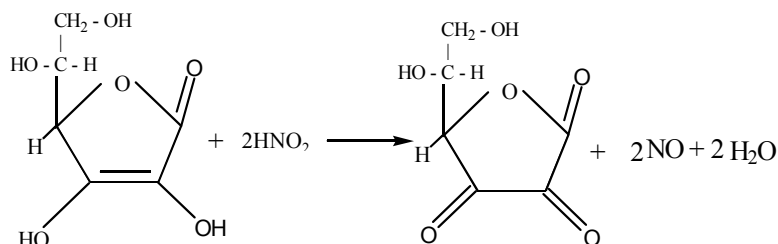
Formarea radicalilor liberi ai acidului ascorbic prin reacții cu diverse specii radicalice dintr-un proces de peroxidare sau autooxidare este favorizată pe de o parte de stabilizarea prin conjugare, iar pe de altă parte de ușurința cu care se stabilizează radicalul prin disproporționare.



Schema 2. Procese radicalice la care participă acidul ascorbic

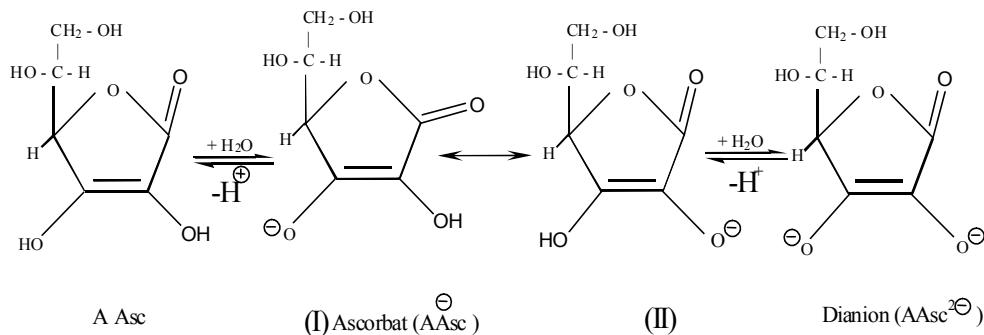
Vitamina C este sensibilă și față de azoți, care în mediu acid eliberează acid azotos, agentul de nitrozare al aminelor secundare cu formarea nitrozaminelor cancerigene.

Reacția are loc cu degajarea oxidului de azot, conform reacției



Ionii metalelor polivalente accelerează procesele oxidative prin mecanism radicalic.

Acidul ascorbic ionizează în apă în două trepte conform schemei 3.



Schema 3. Ionizarea în trepte a acidului ascorbic

Exponentul de aciditate în prima treaptă,  $pK_a = 4,04$  este cu puțin mai mare ca cel al acizilor grași și mai mic decât cel al acidului acetic ( $pK_{a \text{ acid acetic}} = 4,76$ ), iar în treapta a doua,  $pK_a = 11,4$  deci un acid foarte slab.

Monoanionul este stabilizat prin conjugare II, ceea ce explică aciditatea ridicată a acidului ascorbic în prima treaptă.

Acidul ascorbic în cele două forme ale sale, redusă și oxidată, este foarte sensibil la acțiunea diversilor factori degradativi, cum ar fi: temperatura, sărurile, zaharurile, pH-ul, oxigenul dizolvat și atmosferic, ionii metalelor grele, enzimele și raportul molar dintre forma redusă și oxidată [3].

#### I.1.1.4. Proprietăți terapeutice

Vitamina C are un rol biologic deosebit de important, domeniul său de activitate fiind foarte larg, încât se poate aprecia că nu există proces fiziologic sau metabolic la care să nu participe [4].



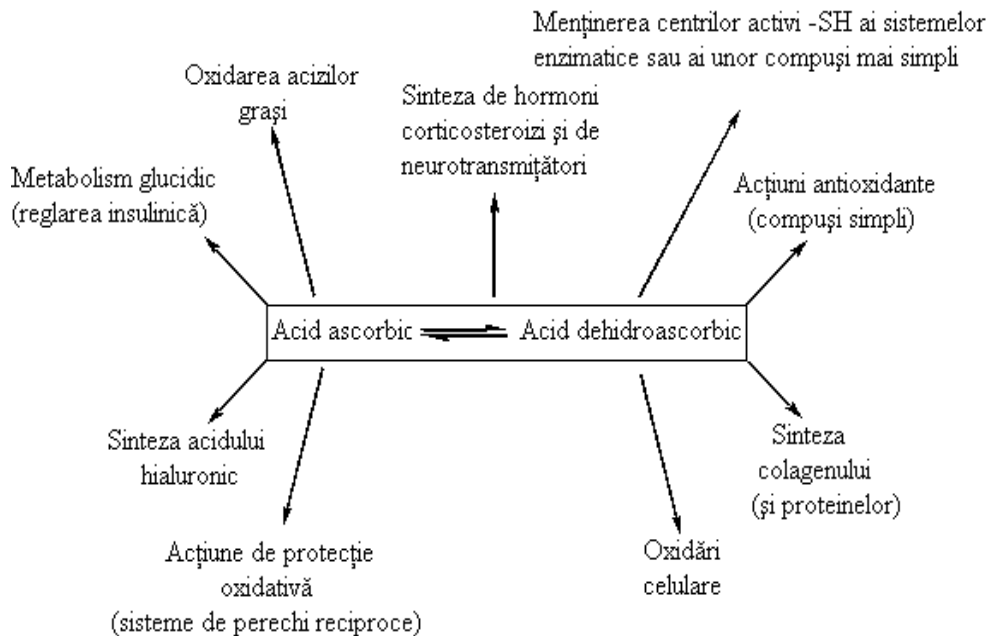


Figura 3. Implicațiile sistemului AAsc-ADAsc în metabolism [5]

- Astmul și alergiile

Consumul redus de vitamina C în dietă și concentrația scăzută de vitamina C în sânge sunt factori de risc față de astm și alergii [5].

Reducând nivelul histaminei răspunzătoare de inflamarea țesuturilor capilare bronhice, vitamina C îmbunătățește funcționarea plămânilor și respirația, prin creșterea volumului de aer inspirat și expirat [6].

- Boli cardiovasculare

Multe cercetări au demonstrat că un consum sporit de vitamina C (200-250mg/zi) reduce semnificativ riscul atacurilor de cord.

Doze medii de vitamina C sunt capabile să diminueze cheagurile de sânge, care pot bloca arterele, făcând imposibilă alimentarea cu oxigen a inimii și determinând atacul de cord [5].

- Cancer

Doze mari de vitamina C scad semnificativ numărul formelor de cancer și anume: cancerul cervical, de esofag, de stomac, de pancreas, endometrial, intestin subțire și gros, de sân, etc.

Doze foarte mari de vitamina C (de ordinul gramelor) sporesc eficiența chimioterapiei și reduc daunele terapiei de radiație, dacă se iau treptat înaintea terapiei, spre a preveni efectele nedorite (crampe abdominale, diaree, ș.a.) [7].

- Cataracta

Studiile de populații au demonstrat că un consum sporit de vitamina C timp de mai mulți ani de zile, a avut ca efect o incidență scăzută a cataractei.

Într-o experiență făcută pe persoane susceptibile de operație de cataractă, suplimentate cu 0,5-2g vitamina C timp de două săptămâni, s-a constatat creșterea

semnificativă a vitaminei C în țesuturile oculare, față de pacienții care au consumat cantitățile indicate (RDA) de 60mg/zi, dar cantități mai mari de 3g sunt asociate cu riscul detașării retinei [8].

- Diabet

Apariția acestei afecțiuni se datorează și conținutului scăzut de vitamina C din sânge.

Suplimentarea cu vitamina C și alți antioxidanți naturali ( $\alpha$ -tocoferol, caroteni, etc.) stimulează eliberarea insulinei, reducând formarea sorbitolului, compus care afectează rinichii, retina și nervii.

Având o structură chimică asemănătoare cu a glucozei, concurează cu aceasta în absorbția celulară, fiind mai defavorizat decât glucoza, deoarece spre a preveni riscul sărăcirii celulare și expunerea la stres oxidativ, diabeticii au nevoie de cantități mai mari de vitamina C.

- Îmbătrânire

Mortalitatea persoanelor în vârstă, consumatoare a unor doze sporite de vitamina C (150-200mg/zi) este mai scăzută cu 30-35% comparativ cu vârstnicii care consumă 30mg/zi.

Alte studii au arătat că un consum sporit de acid ascorbic mărește durata de viață, la femei cu 1-2 ani, iar la bărbați cu 4-6 ani. Scăderea ritmului de îmbătrânire a oamenilor în vârstă se datorează în special creșterii funcției imunitare, ca urmare a regenerării celulelor albe sanguine [5,9].

## I.1.2. Antocianidine

### I.1.2.1. Aspecte generale

Antocianidinele sunt glicozizi a căror aglicon este un pigment numit antocianidină. Derivații hidroxilați sau metoxilați ai sării de 7-hidroxi-2-fenilbenzopiriliu se găsesc în plante sub formă de glicozide (având un rest de monozaharid legat de una din grupele -OH) numite antociani [10].

Culoarea pigmentilor antocianici este influențată și de efectul de copigmentare, adică de prezența altor pigmenți însoțitori sau chiar a unor substanțe incolore [11].

Pigmenții antocianici sunt localizați în sucii vacuolar al țesuturilor vegetale și în funcție de pH pot forma săruri de flavilium, de culoare roșie (pH=3), chinone, de culoare violetă (pH=8,5) sau săruri complexe ale chinonelor, de culoare albastră (pH=8).

S-a constatat că toate clasele de antociani sunt antioxidanți puternici, îmbunătățind calitatea și valoarea produsului alimentar [12].

Proprietățile antioxidante și antiradicalice oferă antocianilor rolul de fitoconservanți, atât în stare pură, cât și în compoziții complexe.

### I.1.2.2. Structură. Clasificare

Trebuie menționat, că pigmenții cu structură flavilică se caracterizează printr-o diversitate mare, amplificată datorită variațiilor structurale în funcție de pH și de complexare, manifestând practic toate culorile spectrului [13].

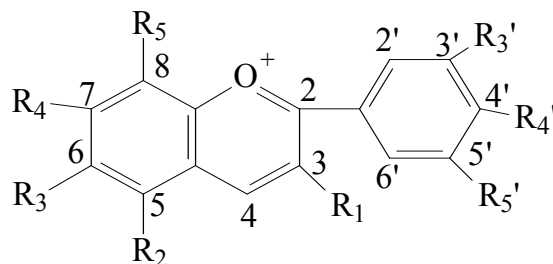


Figura 4. Structura și numerotarea cationului flaviliu

Termenul “**aglicon**” are o subînțelegere mai largă. În acest fel se denumesc atât antocianidinele, care există în starea liberă în natură, cât și cele obținute în urma eliminării resturilor de glucide. Se consideră, că în plantele superioare predomină 6 agliconi de bază: **cianidina**, **delfinidina**, **pelargonidina**, **peonidina**, **malvidina** și **petunidina**, denumiri care provin de la speciile vegetale, în care agliconii respectivi au fost determinați pentru prima dată [13].

Uneori locurile superioare în această clasificare se oferă primilor trei agliconi [14].

Întrădeavăr, după principiile nomenclurii substanțelor organice, peonidina poate fi considerată ca 3'-metoxicianidina, dar petunidina și malvidina pot fi privite, ca 3'-metoxidelfinidină și respectiv, ca 3',5'-dimetoxidelfinidină [15].

Tabel 1. Compoziția a 6 agliconi antocianici principali [13].

Aglicon	Cod	Substituenții nucleului A					Substituenții nucleului B		
		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>3'</sub>	R <sub>4'</sub>	R <sub>5'</sub>
<b>Pelargonidină</b>	Pl	OH	OH	H	OH	H	H	OH	H
<b>Cianidină</b>	Cy	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	H
<b>Delfinidină</b>	Dl	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	OH
<b>Peonidină</b>	Po	OH	OH	H	OH	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
<b>Petunidină</b>	Pt	OH	OH	H	OH	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OH
<b>Malvidină</b>	Mv	OH	OH	H	OH	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>

Mult mai rar în natură se întâlnesc agliconi de următoarele trei tipuri:

- **3-dezoxiagliconi**: apigenidina, luteolinidina, tricetinidina;
- **agliconi metoxibenzopirilici**: rozinidina, europenidina - acestea sunt 7,3'-dimetoxicianidina și respectiv 5,3'- dimetoxidelfinidină;
- **6-hidroxiagliconi**: aurantinidina.

Tabel 2. Compoziția agliconilor prezenți mai rar în natură

Aglicon	Cod	Substituții nucleului A					Substituții nucleului B		
		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>3'</sub>	R <sub>4'</sub>	R <sub>5'</sub>
<b>Apigenidină</b>	Ap	H	OH	H	OH	H	H	OH	H
<b>Luteolinidină</b>	Lu	H	OH	H	OH	H	OH	OH	H
<b>Tricetinidină</b>	Tr	H	OH	H	OH	H	OH	OH	OH
<b>Rozinidină</b>	Ro	OH	OH	H	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
<b>Europenină</b>	Eu	OH	OCH <sub>3</sub>	H	OH	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OH
<b>Aurantinidină</b>	Au	OH	OH	OH	OH	H	H	OH	H

### I.1.2.3. Proprietăți fizice și chimice

#### I.1.2.3.1. Proprietăți fizice

Antocianidinele sunt solubile în alcool și apă, greu solubile în eter, benzen și cloroform [16].

Atât antocianozidele cât și antocianidinele se prezintă în stare cristalizată, în deosebi când sunt sub formă de sare cu acizi.

Ca săruri cu acizi sunt colorate de la roșu la negru, cu reflexe metalice. Sub formă de baze sau fenolați, prezintă diferite nuanțe, de la violet la albastru.

În plante, antociani sunt complexați adesea cu aluminiu și pectine sau sub formă de săruri de calciu, ceea ce explică marea varietate de nuanțe de roșu-violet-albastru. Acestea sunt protocianinele.

Prezintă puncte de topire caracteristice și solubilității în solvenți după gradul de hidrofilie [17].

#### I.1.2.3.2. Proprietăți chimice

a) Aciditatea:

Hidroliza acidă prezintă un proces distructiv, care contribuie la destabilizarea antocianilor.

Antocianii acetilați, posedând grupări esterice, suferă hidroliza la încălzire ușoară sau chiar la rece, pierzând restul acidului carboxilic [18]. Resturile di- și oligozaharidice hidrolizează mai greu, ruperea legăturii între resturile glucidelor având loc în condiții mai drastice (60°C, 40min, HCl 0,5n).

Cel mai greu se va hidroliza partea de legătură Agl-O-Glu sau Agl-O-Alc, cu formarea agliconului și eliberarea glucidei sau alcoolului respectiv (80°C, 60min, HCl 1,5n).

Evident, în aceste condiții se rupe legătura eterică a eterului fenolic, care este mai stabil decât eterul alchilic.

b) Reacții de culoare [17].

Antocianii care au pe inelul B două sau trei grupări hidroxilice învecinate, formează cu metalele Al<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup> complecși de culoare albastru închis.

c) Reacții de identificare.

Antocianii sunt identificați în primul rând prin colorația lor naturală. Soluțiile apoase în mediu acid au întotdeauna o colorație roșie.

Prin alcanizare treptată colorația se schimbă trecând mai întâi, prin stadiul de leucobază incoloră. Culoarea apoi virează către violet și albastru ca urmare a formării structurii chinonice și a unui sistem de duble legături conjugate [17].

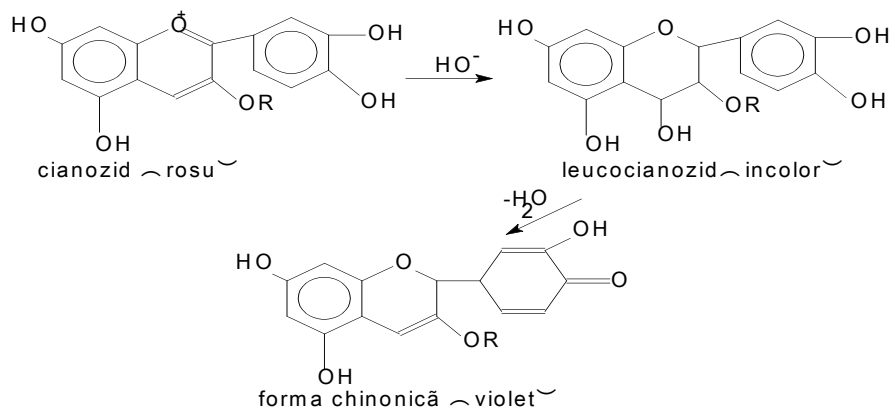


Figura 5. Identificarea antocianilor în funcție de pH [17]

#### I.1.2.4. Proprietăți terapeutice

- Protecția sistemului cardiovascular.

Scăderea masei trombocitelor se însoțește cu mărirea timpului de coagulare a sângelui de două ori și reducerea aditivității celulelor sanguine la colagenul fibrilar [19]. Se presupune că antocianii nu suferă o degradare totală în sistemul digestiv. Descoperirea urmelor de antociani naturali nedegradați în urina oamenilor sănătoși, după opt ore de la administrarea orală a sucurilor de coacăză și de boz confirmă presupunerea de mai sus [20].

S-a dovedit că antociani prezenți în extractele cercetate contribuie la dilatarea vaselor sanguine prin intermediul formării oxidului de azot.

Mecanismul producerii acestei vasodilatații se realizează prin două căi: activarea enzimelor fosforilante și reglarea homeostazei ionilor de  $\text{Ca}^{2+}$  [21].

S-a demonstrat că delfinidina pură contribuie la creșterea biosusceptibilității  $\text{Ca}^{2+}$ , care la rândul lui, activează oxidul de azot în sinteza celulelor endoteliale [22].

- Activitate antitumorală.

Captarea sau inhibarea radicalilor liberi poate să prevină sau să minimizeze probabilitatea de apariție a unor boli cronice larg răspândite.

Compararea activității extractelor antocianice asupra celulelor umane intestinale normale și asupra celulelor cancerului intestinal demonstrează că se suprimă dezvoltarea a circa 60% de celule cancerigene prin blocarea fazelor ciclului celular G1/G0 și G2/M.

Totuși într-o măsură mai mică, circa 10% este prezentată și inhibarea concomitentă a celulelor normale [23].

Mecanismul include creșterea și scăderea expresiei unor gene, fapt important, care confirmă efectul protector al antocianilor la nivelul molecular și ereditar [24].

Puterea inhibitoare a extractelor bogate în antociani depinde de profilul lor antocianic, care variază în diferite surse vegetale. Astfel, puterea inhibitoare a extractelor antocianice asupra celulelor de cancer intestinal uman HT-29 se micșorează în serie :scoruşe > afine > struguri [23].

### I.1.3. Flavonoide

#### I.1.3.1. Aspecte generale

Flavonoidele reprezintă ansamblul de compuși alcătuit din flavonoli, flavone, catechine, izoflavone, fenoli existenți în produsele vegetale și care prin structura lor posedă proprietăți antioxidante ce le conferă capacitatea de a interveni activ în controlul reacțiilor oxidative din organism [25].

Acțiunea lor este fie directă, de inhibare a radicalilor liberi, fie indirectă prin protecția sau regenerarea antioxidanților primari ( $\alpha$ -tocoferol) [26].

Sursa de bioflavone o reprezintă plantele și produsele derivate, astfel că prin acești compuși biologic activi pot interveni eficient în reducerea peroxidării lipidelor, întârziind declanșarea sau evoluția multor boli cronice larg răspândite: arteroscleroză, infarctul de miocard, cancerul, tromboza, cataracta, etc. [5,27,28].

Compușii flavonici din plante pot să amelioreze (încetinească) o serie de etape în dezvoltarea carcinogenezei, a mecanismelor care implică modelarea reacțiilor de peroxidare a lipidelor [29].

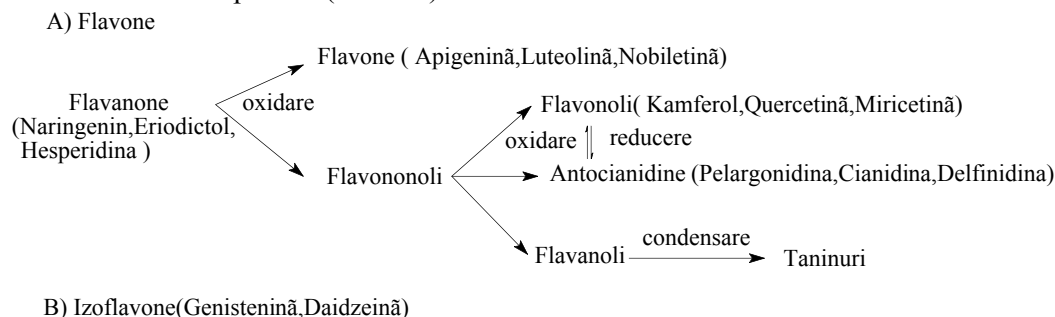
La ora actuală există probe atât experimentale cât și epidemiologice care indică că starea nutrițională joacă un rol esențial în apărarea antiradicalică [30].

De aceea o suplimentare moderată și bine controlată în flavonoide combinate cu alți antioxidanți naturali ( $\alpha$ -tocoferol, vitamina C) poate diminua frecvența de apariție a anumitor boli legate de agresiunea oxidantă [31].

#### I.1.3.2. Clasificare. Structură [5].

Flavonoidele conțin în molecula lor un nucleu benzenic (nucleul A) condensat cu un nucleu piranic (nucleul B) de care se leagă în poziția 2 un al doilea nucleu benzenic (nucleul C) care conține ca și nucleul A grupări hidroxilice, grupări care le conferă proprietăți de polifenoli.

Din punct de vedere chimic, flavonoidele pot fi clasificate după gradul de oxidare al ciclului piranic (ciclul B) în următoarele clase:



Schema 4. Clasificarea flavonelor după gradul de oxidare [5]

Din punct de vedere structural, flavonoidele sunt compuși fenolici în molecula căroră se află heterociclii condensați, benzopiranul sau benzofuranul, în care heteroatomul este oxigenul. La acest dicitlu se condensează un alt nucleu benzenic.

Formulele de bază ale acestora sunt:

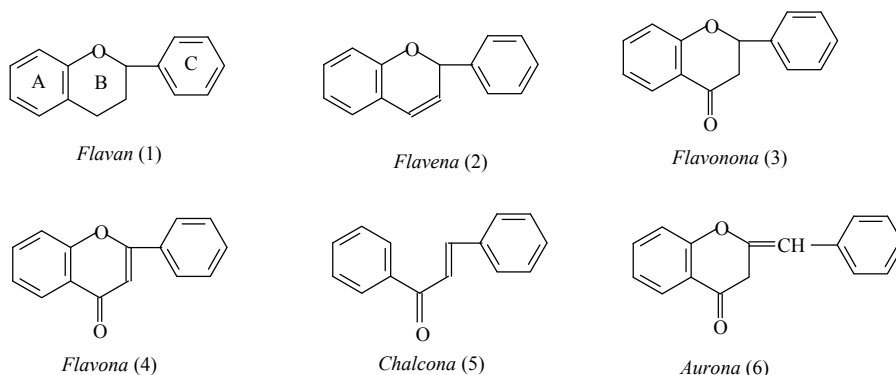


Figura 6. Formulele structurale ale principalelor nuclee de origine ale flavonoidelor

### I.1.3.3. Proprietăți fizice și chimice

#### I.1.3.3.1. Proprietăți fizice

Proprietățile fizice sunt dependente de clasa de flavonoide și de forma în care se găsesc (liberă, glicozidică sau sulfat).

Flavonele, flavonolii, flavanonele și auronele, datorită sistemului conjugat sunt substanțe solide cu colorația de la galben foarte slab până la roșu.

Glicozizii sunt în general solide amorse, în timp ce agliconii și compușii metoxilați sunt cristalini [32].

Solubilitatea flavonoidelor depinde de structura caracteristică. Diferența de structură între fiecare familie de flavonoide rezultă din variația numărului și a modelului de substituție al grupărilor –OH și nivelul lor de glicoliză [33].

Flavonoidele sunt greu solubile în apă, iar agliconii sunt practic insolubili în apă, în schimb sunt solubile în eter etilic. Rutina se dizolvă 1:20 în apă fierbinte și 1:10000 în apă rece.

În scopuri preparative se utilizează această diferență de solubilitate la diferite temperaturi, precum și solubilitatea agliconilor în eter etilic pentru a-i separa de flavonoide [17].

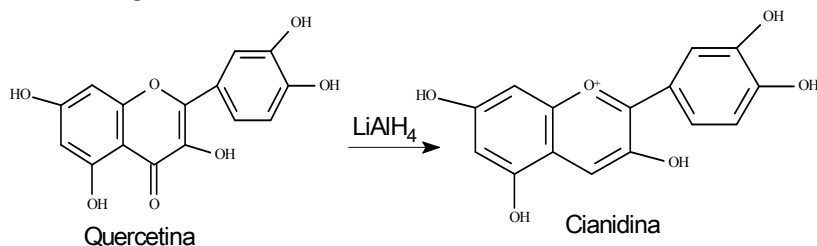
Flavonoidele cu hidroxil fenolic sunt solubile în soluții alcaline, iar cele hidroxilate se descompun sub acțiunea bazelor tari, ceea ce permite recunoașterea și diferențierea de celelalte, metodă folosită pentru elucidarea structurii [34].

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

#### I.1.3.3.2. Proprietăți chimice[3,32].

Structura diversificată a flavonoidelor permite participarea la reacții de hidrogenare, izomerizare, oxidare, fiind transformate în compuși care aparțin altor clase de substanțe.

a). Reacția de hidrogenare



Flavonele se transformă prin reducere în alte flavonoide cu grad de oxidare mai redus. Prin reducere cu  $\text{LiAlH}_4$ , flavonolii pierd gruparea carbonil cu formare de antocianidine, reacție denumită și „reacția cianidinei”.

b). Reacția cu hidroxizi alcalini

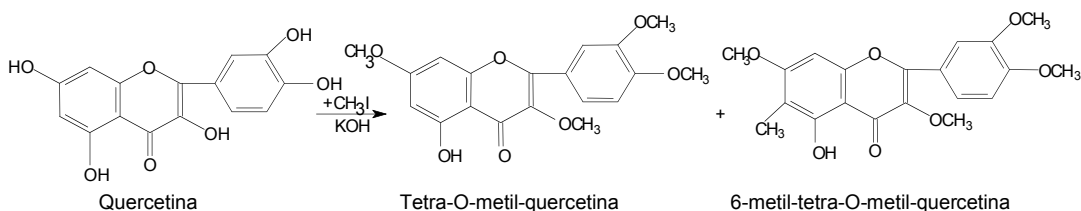
Această reacție se folosește la stabilirea structurii flavonoidelor. În urma acestei reacții rezultă un polifenol din inelul A și un acid dihidroxibenzoic din inelul C.

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

Prin diluare cu apă, sărurile de piriliu hidrolizează și compusul flavonic precipită. Prezența grupărilor hidroxilice pe inelul A și C măresc bazicitatea flavonei.

c). Reacția de metilare și dimetilare

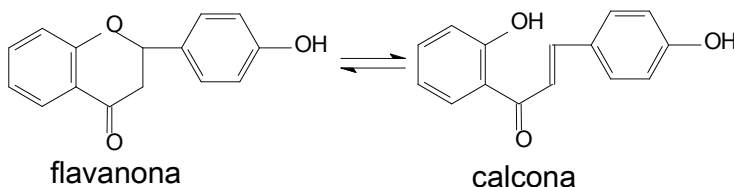
Grupările hidroxilice din pozițiile 5 și 7 pot fi metilate, poziția 5 este mult mai reactivă decât poziția 7. Metilarea cu  $\text{CH}_3\text{I}$  are loc în mediu alcalin de  $\text{KOH}$  sau  $\text{NaOCH}_3$ , când are loc o „metilare nucleară”.



d). Reacția de izomerizare

Studiul configurației acestor compuși a stabilit că pentru flavanonolii naturali configurația trans este cea mai stabilă. Prin sinteză s-a obținut și configurația cis, dar aceasta izomerizează în prezența acetatului de sodiu în forma trans.

Prin dizolvarea flavanonelelor în soluții de alcalii diluate se formează soluții, care prin încălzire se colorează în galben până la roșu, datorită formării calconei, iar după răcire și adăugare de acid clorhidric, calcona cristalizează.



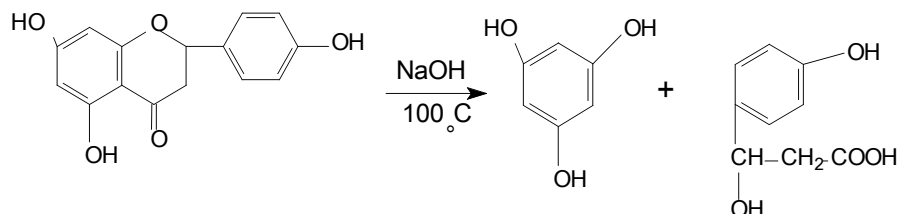


e). Reacția de hidroliză

O-glicozidele flavonoidelor în prezența de acizi pot hidroliza eliberând resturile de glucide reducătoare și agliconul flavonoidei. Hidroliza se realizează cu acid clorhidric 2N:metanol = 1:1, timp de 60 minute, la reflux.

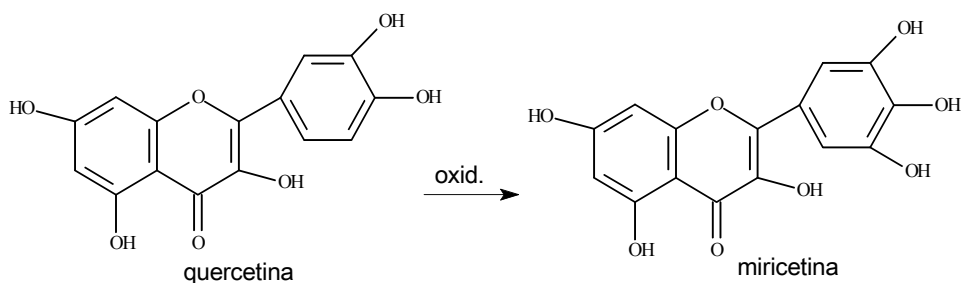
O-glicozidele flavonoidelor necesită condiții mai energice pentru hidroliză și aceasta se realizează cu acid clorhidric 2M, prin refluxare la 100°C, timp de 120 minute.

În condiții alcaline (reflux cu NaOH 2M, 100°C, 60 min.) nucleul flavonoidelor se rupe, rezultând compuși cu masa moleculară mai mică.



f). Reacția de hidroxilare

Oxidarea „nucleară” sau hidroxilarea flavonelor permite obținerea unor compuși complecși hidroxilați plecând de la compuși mai simpli. De exemplu în cazul hidroxilării quercetinei în nucleul C s-a obținut miricetina.



g). Reacții de culoare

Flavonoidele care au pe inelul C două sau trei grupări hidroxilice învecinate formează cu metalele ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ) complecși de culoare albastru închis.

#### I.1.3.4. Aplicații terapeutice

- Boli cardiovasculare

Flavonoidele influențează benefic procesele biochimice atât la nivelul peretelui arterial, cât și la nivelul sângelui.

S-a constatat că urme din flavonoidele ingerate se localizează în membrana citoplasmatică a celulei, cu predominanță în celulele endoteliale, unde intervin prin proprietățile lor antioxidante în rezistența tisular-vasculară [35].

Compușii flavonici pot să mențină la nivel scăzut excesul de acid arahidonic, pot să reducă agregabilitatea trombocitelor, precum și tendințele de instalare a trombozei.

Din aceste considerente, există un interes crescut față de consumul unor alimente sau băuturi pe bază de plante, în care se găsesc flavonoli,

flavone, catechine, a căror acțiune biologică este dovedită în prevenirea acumulării radicalilor liberi și în controlul reacțiilor oxidative ce intervin în aterogenează [36].

- Acțiune antitumorală

Pentru o serie de compuși flavonici și flavonolici a fost stabilită o relație între acțiunea antitumorală și capacitatea de a preveni metastazele în unele sarcoame. Acțiunea antitumorală depinde de structura chimică, gradul de polimerizare al flavonoidelor, molecula activă fiind monomerul [37].

Administrarea de compuși antioxidanți în rația alimentară este un factor foarte important pentru protejarea sănătății.

Flavonoidele care se găsesc atât în partea aeriană a plantelor cât și în extractele comestibile obținute din plante reprezintă componente substanțiale ale dietei umane.

Prin urmare, flavonoidele luate din hrană ca substanțe biologice active pot fi folosite în tratarea și prevenirea bolilor cronice larg răspândite [5].

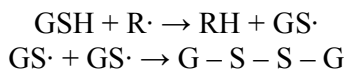
## I.1.4. Glutathion

### I.1.4.1. Aspecte generale

Glutathionul (GSH) este prezent în toate celulele vii, intervenind în toate procesele redox din acestea cât și în menținerea funcționării optime a acestora.

Prezent în toate produsele vegetale și animale, ingerarea lui nu mărește sensibil concentrația sa în organism.

Glutathionul este cofactor al peroxidazelor, captează direct radicalii liberi conform următorului mecanism:



Radicalul liber este stabilizat prin reducere, iar glutathionul este oxidat în radical glutathionil ( $\text{GS}\cdot$ ), doi radicali glutathionil formează glutathionul oxidat ( $\text{G-S-S-G}$ ).

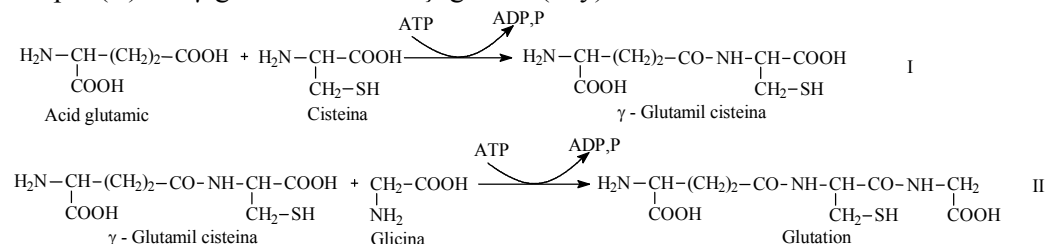
Glutathionul îmbunătățește puterea antioxidantă a  $\alpha$ -tocoferolului; în vitro, diminuează peroxidarea microzomială dar numai în prezență de vitamină E; se postulează că o proteină a microzomilor utilizează glutathionul pentru a regenera vitamina E [38].

Funcțiile glutathionului [5] :

- absolut necesar dezvoltării și supraviețuirii celulei;
- participă la o serie de reacții chimice metabolice: reacții de acetilare, acilare, alchilare, de chelatare a ionilor metalici, de fosforilare, de oxidare, rezultând legăturile chimice coordinative, covalente respectiv de hidrogen;
- este implicat în multe procese chimice esențiale: transportul aminoacizilor, sinteza proteinelor și acizilor nucleici, în metabolizarea xenobioticelor (poluanților, edulcoranților, emulgatorilor, conservanților și medicamentelor), în modularea activității enzimatică (în special a enzimelor proteolitice sau glicolitice).

### I.1.4.2. Sinteză [5].

Sinteza glutationului are loc în toate celulele corpului în două trepte, ambele trepte sunt dependente de prezența adenozintrifosfatului (ATP), cu eliberare de adenozindifosfat (ADP) și anion de fosfat (P) care asigură energia necesară sintezei din acid glutamic (Glu) și cisteină (Cys) în prima treaptă (I); respectiv în a doua treaptă (II) din  $\gamma$ -glutamil cisteina și glicină (Gly).



Ambele reacții sunt catalizate de enzime specifice denumite  $\gamma$ -glutamilcisteinsintetază, respectiv glutationsintetază și implică prezența ionilor de magneziu ( $\text{Mg}^{2+}$ ).

### I.1.4.3. Proprietăți terapeutice

Glutationul este antioxidantul natural cu cea mai mare pondere în asigurarea sănătății.

Glutationul protejează sau este benefic în: astm, bronșite, cancer, afecțiuni cardiovasculare, colesterol mărit, depresii, diabet, eczeme, sisteme enzimatice, sistemul digestiv, afecțiuni hepatice, HIV, hipertensiune, afecțiuni imunitare, intoxicații, îmbătrânire, neuropatie, protector al neuronilor, afecțiuni oculare, afecțiuni virale [5, 39].

### I.1.5. Carotenoide

#### I.1.5.1. Aspecte generale

Primul pigment carotenoidic a fost separat din morcovi (*Daucus carota*), de către Wackenroder (1831) care i-a și atribuit numele de carotină. Ulterior s-a dovedit că produsul separat era un amestec de mai mulți compuși [40].

Carotenoizii sunt pigmenți naturali, neazotați, galbeni sau portocalii, universal răspândiți, se cunosc peste 600 de carotenoizi, dintre care cel mai răspândit este  $\beta$ -carotenu, pigmentul de culoare portocalie a morcovilor.

Foarte răspândiți sunt  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -carotenu, criptoxantina, licopenul, zeaxantina și luteina. Acești pigmenți pot fi localizați în cromoplaste, contribuind la realizarea culorii unor legume și fructe [1].

Fiind insolubile în apă, dar solubile în aceiași solvenți ca și lipidele pe care le însoțesc, acestea au fost incluse în clasa lipidelor nepolare și nesaponificabile, denumite de către unii autori, drept lipocromi [41].

Carotenoizii sunt molecule foarte autooxidabile a căror degradare este favorizată de prezența acizilor grași polinesaturați și micșorată de antioxidanți (ex.BHT) sau de captatori de radicali liberi (difenilamină) [4].

Puterea antioxidantă a carotenilor este mai puternică la presiuni parțiale mai scăzute de oxigen [42].

### I.1.5.2. Clasificare.Structură [1,40].

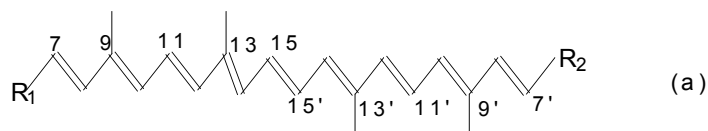
Carotenoidele aparțin la două grupe de compuși naturali:

- hidrocarburi, denumite carotine;
- derivați oxigenați ai hidrocarburilor de bază denumite xantofile, care înglobează eteri, epoxizi, combinații carbonilice, acizi, esteri, glicozizi și multe altele.

Carotenoidele propriu-zise ( $C_{40}$ ) conțin o catenă polienică plasată între două grupări terminale R, identice sau diferite, care aparțin uneia dintre structurile prezentate în figura 7.

În carotenoide, sistemul polienic joacă un rol de cromofor (grupă care imprimă culoarea) cu orientare planară, cu legăturile simple C–C de tip  $\sigma$ -cis sau  $\sigma$ -trans, pentru a reduce la minim tensiunile conformaționale.

Cele mai importante carotenoide corespund prezenței, la unul sau la ambele capete ale sistemului polienic, a ciclurilor de  $\alpha$ - sau  $\beta$ -iononă sau a unui rest de pseudoiononă.



Pentru  $R_1$  și  $R_2$  aparținând uneia din structurile de mai jos:  
 $\beta$ -Ionona;  $\alpha$ - Ionona ; Pseudoionona; cicluri de 5 atomi; cicluri de 6 atomi

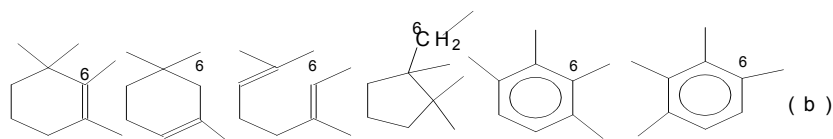


Figura 7. Structuri de bază ale carotenoidelor ( $C_{40}$ ) și numerotația în:  
a) - sistemul polienic; b) - în grupele terminale și simbolurile aferente

### I.1.5.3. Nomenclatură [40].

A fost fixată inițial de Karrer (1947) prin „reguli definitive pentru nomenclatura carotenoidelor”, acceptate de IUPAC și completate ulterior, în anii 1960 și 1971, de IUPAC-IUB.

Modul de numerotație pentru sistemul polienic și pentru resturile terminale au fost indicate în figura 7.

Din această convenție rezultă că  $\alpha$ -carotina se va denumi corect drept  $\beta$ ,  $\epsilon$ -carotină.

Înseamnă că toate carotenoidele vor avea în nomenclatura semi-sistematică două litere grecești, urmate de denumirea științifică sau uzuală a lor.

Eliminarea unui număr oarecare de atomi de hidrogen din structurile carotenoidelor se indică prin prefixul dehidro-, iar adăugarea de hidrogen se indică prin prefixul hidro- precedat de numărul atomilor de hidrogen adăugați.

Denumirea produșilor rezultați prin scindarea oxidativă a carotenoidelor  $C_{40}$ , numite apo-carotenoide, se face cu prefixul apo-, urmat de numărul atomilor de carbon cu funcțiunile oxigenate și numele fragmentului rămas.

#### I.1.5.4. Proprietăți fizice și chimice

##### I.1.5.4.1. Proprietăți fizice

Proprietățile fizice ale carotenoidelor sunt dictate de sistemul polienic conjugat și de natura grupelor terminale.

Carotenoidele  $C_{40}$  conțin un sistem polienic cu cel puțin 8-9 legături conjugate, ceea ce conferă culoare și absorbție specifică în UV-VIS.

Dublele legături neconjugate influențează puțin asupra culorii și absorbției în domeniile UV și VIS [40].

Toți pigmentii carotenoidici sunt solubili în grăsimi. În solvenți organici polari se dizolvă numai xantofilele.

Solubilitatea carotenoidelor condiționează utilizarea lor drept coloranți alimentari liposolubili, dar dispersabili în medii apoase prin protejare cu emulgatori sau macromolecule [43].

Toate carotenoidele sunt substanțe solide, frumos cristalizate, cu punct de topire cuprins între 175°C și 225°C. Multe dintre acestea se descompun în apropierea punctului de topire.

Descompunerea este accelerată de prezența oxigenului, acizilor și bazelor. Câteva maxime de absorbție în UV-VIS sunt date în tabelul 3.

Tabel 3. Maxime de absorbție ale unor carotenoidi în solvenți organici [40]

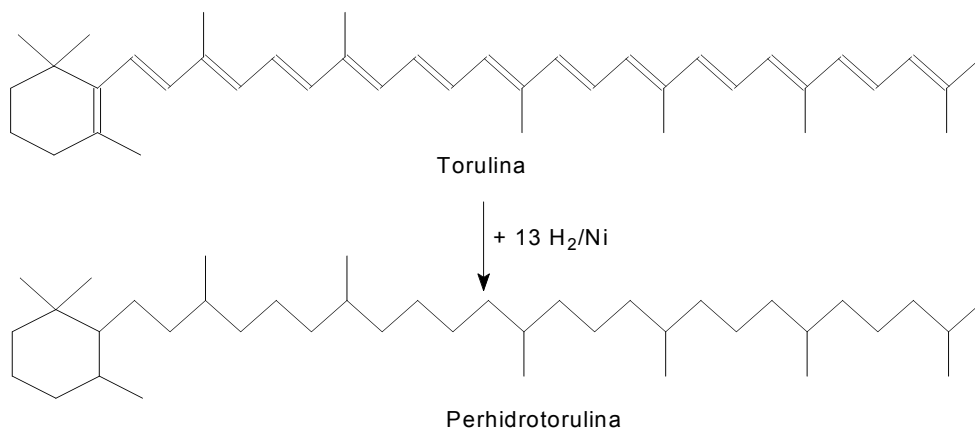
Componenta carotenoidică	Lungimea de undă * (nm) în solvenții:								
	Eter de petrol			Hexan			Etanol		
0	1			2			3		
Aloxantina		450	479	436	460	489	427	450	478
$\beta$ -Apo-8'-Carotenal		459	492					463	
$\beta$ -Apo-10'-Carotenal		438	472					451	
Astacina		473						478	
Astaxantina		468			468			478	
Auroxantina	382	408	427	380	400	425	381	402	427
Bixina	432	456	490				429	457	484
Cantaxantina		463			467			474	
Capsantina		475			475	504		476	
$\alpha$ -Carotina	422	448	473	420	442	472	423	444	473
$\beta$ -Carotina	425	448	475	425	450	477	427	449	475
$\gamma$ -Carotina	437	462	494	437	462	492	440	460	489
$\delta$ -Carotina	431	456	489	428	458	490			

0	1			2			3		
ε-Carotina	416	440	476	415	439	470	417	440	470
β-Criptoxantina	425	449	527	423	448	475	428	449	473
Licopina	446	472	505	448	473	504	446	472	503
Luteina	421	445	474	420	445	470	416	441	470
Neoxantina	418	442	467	415	435	462	415	438	467
Neurosporen	414	439	467	416	440	470	416	441	470
Rodoxantina	456	487	521	458	489	524		496	538
Violaxantina	418	442	466		443	472	417	440	469

\*) Dintre cele trei lungimi de undă caracteristice, numai cea mediană este certă la toate carotenoidele în solvenții prezentați, celelalte semnale apar mai mult sau mai puțin conturate.

#### I.1.5.4.2. Proprietăți chimice [40, 44].

##### a). Reacția de hidrogenare

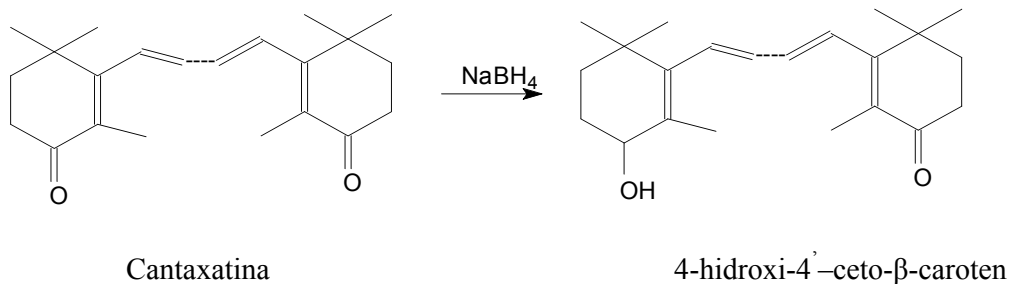


Întregul sistem de duble legături adăunează hidrogen în cataliza eterogenă (Ni, Pt sau Pd).

##### b). Reacția cu hidrurile metalice

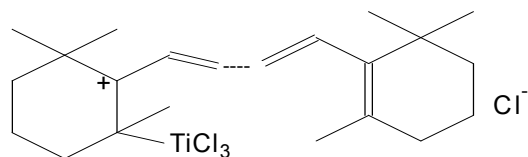
Hidrurile metalice (BH<sub>4</sub>, KBH<sub>4</sub>, LiBH<sub>4</sub>, LiAlH<sub>4</sub>, etc. ), au efect reducător numai asupra grupelor funcționale carbonilice și epoxidice.

Reducerea cu  $\text{LiAlH}_4$  se realizează în eter anhidru, iar cu  $\text{NaBH}_4$  și  $\text{KBH}_4$  se lucrează fie în solvenți organici apoși, fie direct în mediul apos conform reacției.

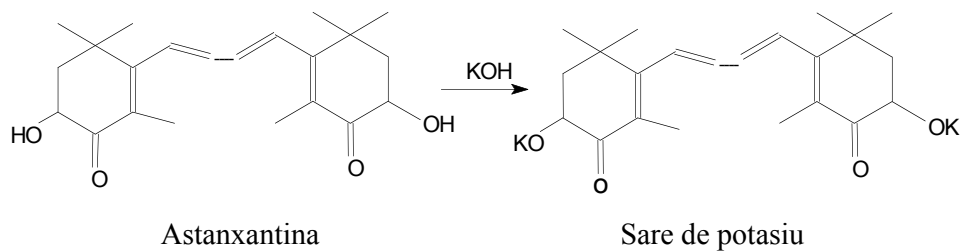


c). Reacția de halogenare

Carotenoidele se pot halogena direct și indirect, selectiv și neselectiv, ca în cazul oricărui sistem polienic conjugat.

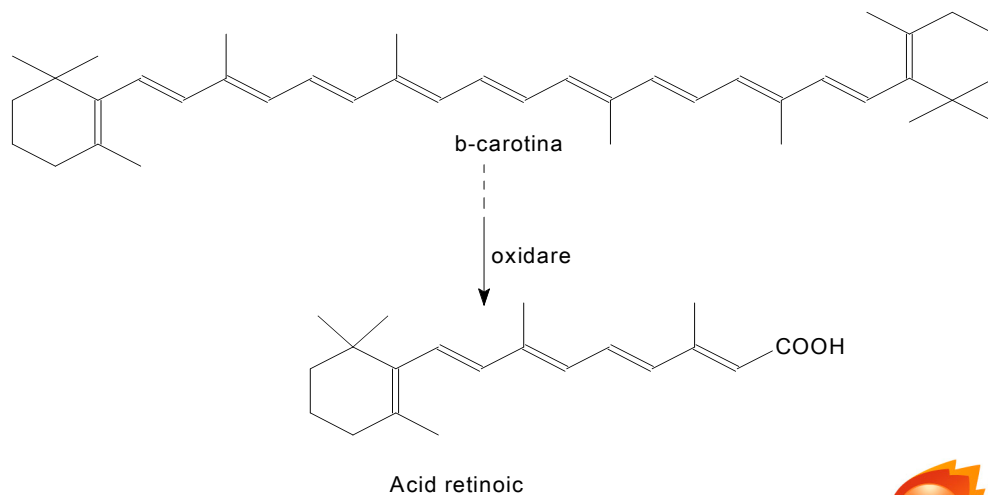


d). Reacția cu bazele



Cele mai multe carotenoide sunt stabile față de baze. Fac excepție câteva xantofile a căror grupă  $-\text{OH}$  reacționează cu bazele tari cu formare de alcoxi, conform reacției.

e). Reacția de oxidare



Reacțiile de oxidare se pot realiza sub acțiunea oxidanților tipici cum ar fi: reactiv Bayer, acidul cromic, apă oxigenată, peroxizi, hidroperoxizi, etc.

Prin reacții de reducere cu hidruri și oxidări directe ale funcțiilor oxigenate se pot obține retinoide.

Carotenoidele, ca orice sistem polienic mărginit de atomi de carbon alilici, suferă autooxidare sub acțiunea directă a oxigenului atmosferic.

Procesul este accelerat de temperaturi ridicate, iluminare intensă în domeniul UV, de creșterea activității apei și de pH acid ( $\leq 3$ ). Între produși de autooxidare predomină carotenalii.

#### **I.1.5.5. Aplicații terapeutice**

- **Imunitatea**

Ele reglează și stimulează funcția imunitară prin activarea și creșterea numărului de celule albe sanguine (leucocite) ca și a substanțelor chimice care transmit semnalele între celulele sistemului imunitar.

Ei protejează de stresul oxidativ glanda timus și măduva osoasă, producătorii celulelor albe [45]. În timp ce efectul imunitar al vitaminei A este mai puternic pentru copii, carotenoizi sunt mai importanți pentru sporirea imunității persoanelor vârstnice.

- **Cancer**

Sporirea funcției imunitare sporește apărarea corpului față de cancer, deoarece celulele imunitare controlează atât substanțele cauzatoare de cancer, cât și celulele anormale, canceroase, pe care le distrug.

Multe studii s-au efectuat cu  $\beta$ -caroten sau amestecul lui cu alți antioxidanți, dar în special prin alimentație cu legume și fructe, cel mai util dintre caroteni s-a dovedit a fi licopenul, având rol în împiedicarea proliferării celulelor canceroase umane [5].

Riscul scăzut al cancerului de sân premenopauzal, poate în cazul dietelor bogate în vegetale a fost pus în special pe seama efectului sinergetic al  $\beta$ -carotenului, luteinei și zeaxantinei (împreună cu alți carotenoizi) [46].

Licopenul mai este eficient și în protecția față de cancerul cervical, al tractului digestiv, de sân și de plămâni [47].

- **Boli cardiovasculare**

Consumul sporit de  $\beta$ -caroten ca atare este asociat cu scăderea incidenței bolilor cardiovasculare.

Datorită capacității de a fi încorporat în membranele celulare, inclusiv sanguine, acesta exercită asupra acestora un efect antioxidant [5, 48].

Deoarece vitaminele E și C sunt superioare, un efect maxim se obține în combinație cu acestea.

Tomatele și vegetalele bogate în licopen contribuie în mod special la reducerea riscului de infarct miocardic ca urmare a protejării de oxidare a LDL, colesterolului, dar și ca urmare a reducerii concentrației sanguine în colesterol (cu metabolizarea colesterolului în acizii biliari) [49].



- Afecțiuni ale pielii

Carotenoizii previn și tratează efectele nedorite ale expunerilor solare la nivelul pielii, manifestate prin erupții și urticării, sau prin așa denumita protoporfirie eritropoetică.

Această afecțiune apare după o expunere solară prelungită și se manifestă prin senzația de arsură, umflături și înroșirea pielii. Aplicarea pe piele a  $\beta$ -carotenului sub formă de unguente sau doze orale de  $\beta$ -caroten micșorează afectarea pielii de către razele ultraviolete A, dar nu și de razele ultraviolete B.

- Afecțiuni oculare

Luteina și zeaxantina sunt carotenoizii care protejează cel mai mult ochii. Ei intră în compoziția retinei și datorită culorii galbene absorb radiațiile albastre, dăunătoare luminii.

Împreună cu vitamina C și bioflavonoidele, luteina și zeaxantina sunt protectori predominanți ai ochilor [50]. Vitamina A rezultată prin metabolizarea carotenoizilor este necesară dezvoltării și menținerii țesuturilor epiteliale, care protejează suprafețele externe și interne ale corpului.

Un deficit cauzează reducerea, întărirea și deteriorarea țesuturilor epiteliale ale ochiului [5].

## I.1.6. Tocoferoli

### I.1.6.1. Aspecte generale

Vitaminele E sau tocoferolii (tokos = progenitură, ferein = a naște) constituie un grup de compuși cunoscuți și sub denumirea de vitaminele antisterilității sau vitamine de fecunditate.

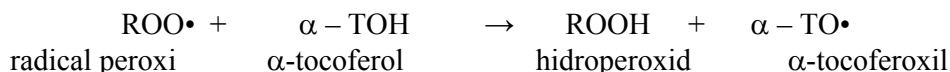
Au un caracter antioxidant pronunțat, protejând de degradări oxidative diferite substanțe biologic active, cum sunt vitaminele A, D, F, acizi grași nesaturați, diferiți pigmenți, hormoni, eritrocite, enzime, etc. [51].

În 1962 Tappel postulează că rolul principal, dacă nu chiar unic, al vitaminei E ( $\alpha$ -TOH) din alimente este de a acționa ca antioxidant și de a asigura o protecție contra activității radicalilor liberi, mai ales a acizilor grași polinesaturați.

Studii pe animale au demonstrat o lipoperoxidare intensă în țesuturile animalelor hrănite cu regimuri carentate și că invers, această peroxidare este redusă după suplimentarea cu  $\alpha$ -tocoferol.

Sunt implicate două mecanisme de protecție:

- Vitamina E, încorporată în membrane, le mărește rigiditatea și stabilitatea deoarece lanțul fitil al tocoferolului formează un complex cu acizi grași;
- Vitamina E reacționează ca un donor de hidrogen, datorită electronului liber pe care îl posedă, și activează radicalii liberi ai peroxidului inițial, cu formarea unui radical tocoferoxil inofensiv datorită stabilizării prin rezonanță [52].



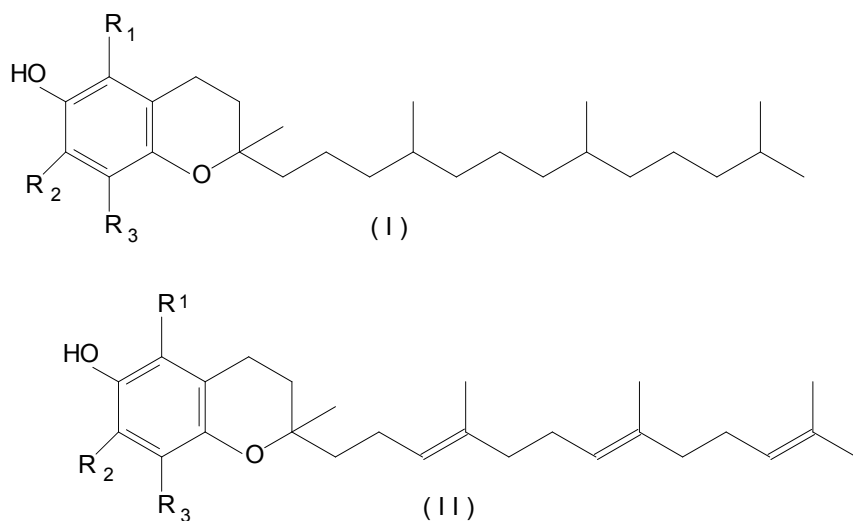
Studii conduse în vitro arată că tocoferolul nu este eficace decât la o concentrație critică, iar glutatationul coboară această valoare [4].

### I.1.6.2. Clasificare.Structură [1,3].

Denumirea generică de „tocoferol” desemnează un grup de compuși chimici derivați de la heterociclul croman (benzopiran) pe care este greșit radicalul hidroxilic (–OH) în poziția a șasea, un radical (–R) cu 15 atomi de carbon în poziția a doua și radicali metil (–CH<sub>3</sub>) în diferite poziții.

Cu alte cuvinte, tocoferolii sunt derivați ai tocolului.În plus, în alimente se găsesc derivați ai tocotrienolului (II).

Intensitatea activității vitaminice a tocoferolilor cu aceeași catenă laterală, depinde de numărul grupărilor metilice (–CH<sub>3</sub>) din nucleul aromatic.



	I	II
$R_1=R_2=R_3=CH_3$	$\alpha$ - Tocoferol	$\alpha$ - Tocotrienol
$R_2=H, R_1=R_3=CH_3$	$\beta$ - Tocoferol	$\beta$ - Tocotrienol
$R_1=H, R_2=R_3=CH_3$	$\gamma$ - Tocoferol	$\gamma$ - Tocotrienol
$R_1=R_2=H, R_3=CH_3$	$\delta$ - Tocoferol	$\delta$ - Tocotrienol

Figura 8. Componentele vitaminei E: I- Tocoferoli; II- Tocotrienoli [3]

Activitatea biologică a tocoferolilor și a derivaților acestora este dependentă atât de numărul și poziția grupărilor metilice substituie la nucleul aromatic, cât și de felul și lungimea catenei.

### I.1.6.3. Proprietăți fizice și chimice [1,3,11].

#### I.1.6.3.1. Proprietăți fizice

Tocoferolii sunt substanțe uleioase, de culoare galben deschis cu densitatea medie de 0,953 g/cm<sup>3</sup>. În spectrul IR apar benzi specifice cromanului.

Sunt insolubili în apă, dar solubili în grăsimi animale, uleiuri vegetale, alcool, eter de petrol, benzen, etc.

Tocoferolii se obțin cu greu în stare solidă, din preparate înalt purificate (numai  $\alpha$ - și  $\gamma$ -tocoferolul până în prezent). Restul tocoferolilor se prezintă în stare cristalină numai sub formă de 3,5 -dinitrobenzoați.

$\alpha$ -Tocoferolul racemic se prezintă ca un ulei galben, cu punct de fierbere la 135°C și cu indice de iod de 220.

Prezintă spectre de absorbție caracteristice în ultraviolet și în infraroșu.

$\alpha$ -Tocoferolul în soluție alcoolică este dextrogir, iar în soluție benzenică levogir.

În lumină ultravioletă, maximul de absorbție pentru  $\alpha$ -tocoferol este de 292 nm, pentru  $\beta$ -tocoferol la 287 nm, pentru  $\gamma$ -tocoferol la 298 nm.

În soluții alcaline și la temperaturi sub 40°C, tocoferolii sunt în general stabili.

Ei pot fi separați, purificați și identificați prin cromatografie pe coloană, în strat subțire sau pe hârtie, folosind ca absorbantți oxid de aluminiu, carbonat de zinc și hârtie impregnată cu ulei de parafină sau carbonat de zinc.

### 1.1.6.3.2. Proprietăți chimice

Cea mai importantă proprietate chimică este oxidarea. Astfel din  $\alpha$ -tocoferol, printr-o oxidare blândă cu clorură ferică sau azotat de argint se obține p-tocoferilchinona și p-tocoferilhidrochinona, iar prin oxidare cu acid azotic concentrat se obține o-tocoferilchinona de culoare roșie.

În soluții alcaline și la temperaturi sub 40°C, tocoferolii sunt în general stabili.

Reacțiile de oxidare au loc ușor, chiar în prezența sărurilor (I și II din figura 9). Echilibrul redox dintre II și III (figura 9), precum și ciclizarea în mediu acid a  $\alpha$ -tocoferilhidrochinonei, stau la baza determinărilor analitice ale vitaminei E.

Echilibrul redox dintre II și III (figura 9) explică funcția de antioxidant natural a vitaminei E (bioantioxidant).

Sensibilitatea la acțiunea oxigenului, ionilor metalelor polivalente și luminii ultraviolete, motivează pierderile mari de vitamina E în timpul rafinării uleiurilor vegetale, implicit a margarinei, shorteningurilor și uleiurilor pentru salate.

Tocoferolii intervin în funcție de reproducție asigurând activitatea normală a organelor genitale și prevenind sterilitatea.

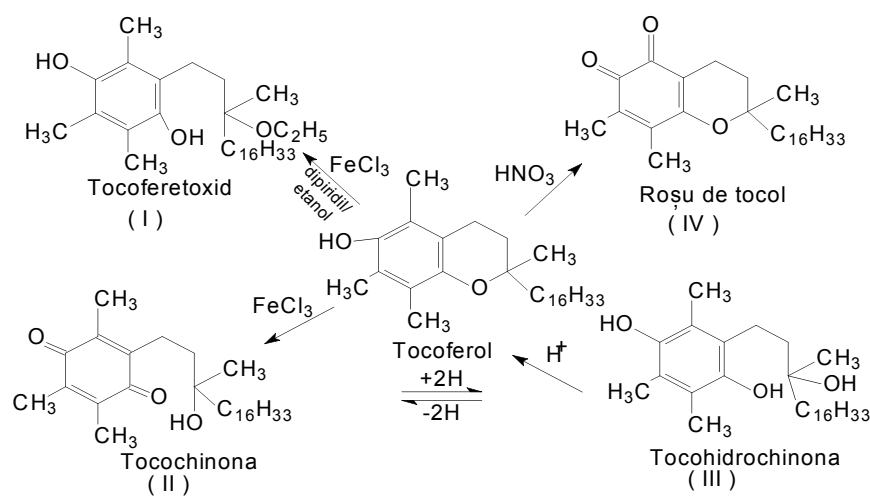


Figura 9. Producții de oxidare ai tocoferolului în vitro (I, IV) și în vivo (II, III) [3]

#### **I.1.6.4. Efecte terapeutice**

În carență apar degenerări testiculare, pierderea mobilității spermatozoizilor, degenerări uterine, scăderea fecundității, resorbții embrionare [53].

De asemenea, intervin în procesul de respirație celulară la nivelul țesutului muscular (mușchii striati și mușchiul cardiac).

Ca antioxidant principal el protejează în primul rând față de bolile cardiovasculare, afecțiuni ale sistemului nervos și imunitar, dar poate fi benefic pentru o serie foarte mare de afecțiuni: acnee, alcoolism, alergii, boala lui Alzheimer, anemie, anghină, arsuri solare, artrită reumatoidă, afecțiuni cardiace, astm, ateroscleroză, boli autoimunitare, cancer, cardiopatie, cataractă, afecțiuni cervicale, cicatrice, colită ulcerativă, hipercolesterolemie, congestie cerebrală, crampe la picioare, depresii, dermatite seboreice, diabet, dischinezie tardivă, epilepsie, afecțiune fibrochistică (sân), fibromalgie, etc. [5,54,55].

### **I.2. Extracția și separarea antioxidantilor naturali**

#### **I.2.1. Tehnici clasice de extracție**

##### **I.2.1.1. Extracția simplă**

Este operația în care solidul și dizolvantul se află un anumit timp în contact într-un recipient. Extracția decurge lent, iar la atingerea concentrației de echilibru se separă fazele, operația realizându-se în regim nestaționar [56].

Macerarea se bazează pe amestecarea fazei solide cu solventul, urmată de filtrarea suspensiei obținute.

Această operație necesită o dispersare cât mai accentuată a substanței solide, agitare eficientă și separare cât mai cantitativă a soluției de reziduul rămas după extracție.

Macerarea este tehnica de extracție cea mai utilizată, procedeul care se aplică atât în cazul extractelor apoase cât și extractelor alcoolice, timpul de extracție variind de la 1-3 ore la temperatura de 4°C pentru extracția apoasă și până la zece zile pentru extractele alcoolice.

Digerarea este o macerare la cald. Macerarea și digerarea se folosesc pentru extracția produșilor naturali organici din țesuturile vegetale și animale.

##### **I.2.1.2. Extracția multiplă (în trepte)**

Este operația în care solidul, sub formă de particule este fix, iar dizolvantul se deplasează periodic sau continuu spălând în trepte, din solid, componentul sau componentii de extras.

Se obțin extracte din ce în ce mai concentrate în solut și un rafinat (faza solidă) epuizat în solut [57].

##### **I.2.1.3. Extracția continuă în contracurent cu contact multiplu**

Este operația în care solidul (inert + solut) și dizolvantul circulă continuu în contracurent; în orice secțiune a aparatului se stabilește o concentrație constantă în fazele solidă și lichidă, iar operația decurge în regim staționar [58].

#### **I.2.1.4. Procedeu Soxhlet [59].**

Procedeu Soxhlet se bazează pe principiul unei extracții periodice continue ; este simplă, eficientă, comodă și datorită acestor calități are o largă utilizare practică.

Procedeu are marele avantaj de a fi continuu, de a permite o bună extracție dar și dezavantajul de a folosi o cantitate mare de solvent și timpul mare de extracție necesar.

După ce extracția s-a efectuat complet, substanța extrasă se separă de solvent fie prin răcirea soluției și cristalizarea substanței extrase, fie prin îndepărtarea solventului prin distilare.

Materialul vegetal se extrage în prima etapă cu un solvent nepolar (diclorometan, eter de petrol) în vederea îndepărtării lipidelor și apoi cu etanol sau metanol în vederea separării compușilor cu potențial antioxidant.

În concluzie se poate afirma că pentru determinarea calitativă și cantitativă a principiilor active dintr-un material vegetal metoda de extracție adecvată se stabilește pentru fiecare material vegetal în parte.

În unele cazuri se preferă un mod de lucru care combină elemente din metodele clasice de separare descrise anterior.

### **I.2.2. Tehnici alternative de extracție**

#### **I.2.2.1. Extracția cu fluide supercritice [60, 61, 62].**

Extracția cu fluide supercritice este o operație de separare caracteristică proceselor care au loc la presiune ridicată, bazată pe puterea de solvatare a substanțelor aflate la temperaturi și presiuni superioare celor corespunzătoare punctului critic.

Cel mai utilizat agent de extracție în fază supercritică pentru industria alimentară a devenit dioxidul de carbon ( $\text{CO}_2$ ), preferat datorită următoarelor avantaje: presiunea și mai ales temperatura punctului critic au valori accesibile tehnologic și compatibile cu tratamentele aplicabile produselor alimentare ( $P_c=7,38$  MPa,  $T_c= 31,06^\circ\text{C}$ ); se lucrează la regimuri termice blânde, putându-se extrage și compuși foarte sensibili (arome, coloranți, vitamine, pigmenți, etc. ); solventul este netoxic, biologic și ecologic; nu provoacă reacții secundare nedorite (oxidări, hidrolize, reduceri, condensări, adiții, etc.), realizând protecție față de oxigen; extractul final nu conține substanțe de „balast”; față de tehnicile clasice de extracție posedă un grad de libertate în plus, presiunea; solventul este accesibil, necoroziv, ieftin, neinflamabil; se poate realiza extracție selectivă; extractul se poate fracționa prin alegerea corespunzătoare a parametrilor de stare; extractul obținut nu mai necesită purificări ulterioare; un consum energetic mai redus decât în tehnicile clasice de extracție folosite în scopuri similare.

#### **I.2.2.2. Extracția cu microunde**

În ultimii ani, câteva tehnici de extracție pentru probe solide mai rapide și mai automatizate au înlocuit extracția tradițională Soxhlet printre care: ultrasonică (UE), cu fluid supercritic, cu microunde, accelerată cu solvent și în pat fluidizat.

Extracția cu microunde este o tehnică simplă care poate fi completă în câteva minute.

Energia microundelor este aplicată probei care este suspendată în solvent, fie într-un recipient închis, fie într-o celulă deschisă, ultimul sistem fiind cel mai utilizat[63]. Aplicabilitatea acestei metode se datorează avantajelor pe care le prezintă:

- Reduce considerabil consumul de solvent, mărește pătrunderea în probă și simplifică procedura de extracție;
- Realizarea unei încălziri rapide, timpul de extracție, fiind evaluate la aproximativ o pătrime din cea necesară încălziri neconvenționale;
- Calitatea produsului este îmbunătățită din punct de vedere al menținerii proprietăților fizice și chimice, datorită timpului scurt de extracție (5-9 secunde).

Extracția care utilizează un cuptor cu microunde în prezență de solvenți este o metodă foarte rapidă care folosește cantități mici de material vegetal și solvent și în final compoziția extractului este apropiată de cea reală.

Compușii fenolici din semințe de struguri au fost extrași prin metoda de extracție cu microunde, utilizând următoarele condiții de lucru: putere 300-1500 W și timp de extracție 20-200 secunde [64].

Utilizarea energiei microundelor permite încălzirea rapidă a amestecului cu solvent, accelerând viteza încălzirii și în consecință reducând timpul de extracție necesar.

Eficiența extracției cu microunde poate fi explicată prin interacțiunea dintre analiticul țintă și matrice, care este slăbită de temperatura ridicată și de energia microundelor.

Extracția asistată cu microunde poate oferi o performanță bună necesitând o cantitate mică de solvent organic și un timp scurt de extracție, dar necesită o etapă suplimentară pentru separarea extrașilor din proba solidă și o investiție pentru echipament relativ ridicată.

Utilizarea solvenților polari, poate fi un obstacol al acestei metode, deoarece sunt co-extrași compuși matriciali polari, care ar putea interveni pe parcursul următorilor pași analitici.

### **1.2.2.3. Extracția cu ultrasunete**

Ultrasunetele sunt unde elastice care au frecvența cuprinsă între 16kHz și 1000kHz, fiind considerate unde plane.

Datorită frecvențelor mari, ele nu se mai supun legilor mecanicii clasice, necesitând aplicarea legilor mecanicii cuantice.

Din 1970 au început să fie folosite pentru uscarea unor produse, iar după 1990 au început o serie de cercetări pentru folosirea în diferite operații din industria alimentară [65].

Ultrasunetele sunt privite cu tot mai mult interes pentru posibilitatea folosirii lor în industria alimentară [66]. Operația de extracție este influențată de ultrasunete prin intensificarea transferului de substanță.

Aceasta depinde de mai mulți factori, legați atât de natura produsului tratat, cât și de natura undelor acustice:

- Temperatura influențează toate procesele de transfer de masă prin materiale poroase.
- Intensitatea acustică

Pentru ca ultrasunetele să aibă efect în transferul de substanță este necesar ca acestea să aibă o anumită intensitate, numită intensitate prag.

Prin creșterea în continuare a intensității se intensifică și procesul de transfer de substanță.

S-a stabilit că intensitatea prag este 130-145 dB.

Creșterea intensității are efect favorabil până la atingerea unui efect maxim, după care creșterea în continuare a intensității are efect negativ datorită cavitației foarte puternice care blochează transferul de substanță.

Frecvența ultrasunetelor influențează transferul de masă în câmp ultrasonor în mod diferit, în funcție de materialul supus tratamentului și în funcție de operația care se execută.

În procesul de extracție este indicat să se lucreze la frecvențe mai mari. S-a încercat lucrul la frecvențe între 20kHz și 1Mhz.

- Transferul de substanță.

Transferul de substanță în câmp ultrasonor este influențat și de proprietățile mediului (vâscozitate, porozitate) și de modul de aplicare a câmpului ultrasonor.

S-a constatat că un câmp ultrasonor cu acțiune pulsatorie (intermitent) are un efect mai puternic decât un câmp ultrasonor cu acțiune continuă.

În operația de extracție, parametrii ultrasunetelor se aleg astfel încât să se producă cavitația acustică.

Aceasta are ca efect în industria alimentară dezagregarea pereților celulelor vegetale sau animale și dispersarea conținutului celular în mediul de extracție.

- Cavitație acustică

La propagarea în lichide a ultrasunetelor de mare intensitate apare un fenomen fizic complex, numit cavitație acustică, care se manifestă prin ruperea unor porțiuni de lichid cu formarea unor bule vide sau umplute cu vapori din lichidul respectiv.

În zonele de depresiune, presiunea este negativă și considerând propagarea ultrasunetelor într-un mediu lichid, în acele zone se formează bule de aer sau vapori ai lichidului, numite cavități, presiunea în interiorul cărora este legată de forțele de coeziune ale lichidului.

Bule mult mai mici pot exista în majoritatea lichidelor și în absența ultrasunetelor.

Întru-cât lichidele nu sunt pure, există întotdeauna incluziuni sub forma vaporilor sau gazelor dizolvate în lichidele respective.

În timpul propagării ultrasunetelor, în zonele de depresiune aceste bule minuscule se dilată brusc.

În semiperioada următoare, când în locul respectiv are loc o compresie puternică, presiunea devine pozitivă, ceea ce conduce la distrugerea cavităților din zonă.

În timpul dispariției cavităților, pereții acestora sunt supuși la presiuni enorme, de ordinul miilor de atmosfere [67].

### **I.3. Identificarea substanțelor cu efect antioxidant**

#### **I.3.1. Metode spectroscopice de cercetare**

##### **I.3.1.1. Spectroscopia electronică (UV-VIZ)**

Spectroscopia electronică reprezintă o metodă complexă pentru identificarea și cercetarea antioxidantilor naturali, caracterizându-se prin picuri informative cu extincții mari.

Studiul spectrelor electronice prezintă o importanță deosebită pentru explicarea structurii electronice, calculul nivelelor electronice de energie precum și atribuirea tranzițiilor dintre acestea.



În soluții slab acide, acidul ascorbic are un maxim de absorbție la 254nm, iar în soluții alcaline la 265nm, care sunt o dovadă a celor două grupări enolice din pozițiile 2, 3. Spectrele caracteristice antocianilor conțin două benzi:

- banda I, caracteristică tuturor flavonoidelor în domeniul UV la  $\lambda=220-280\text{nm}$ ;
- banda II, proprie nucleului de fenilbenzopiriliu în domeniul VIZ la  $\lambda=450-550\text{nm}$ .

Pentru antociani, în calitate de dizolvant standard se folosește metanolul, acidulat cu acid clorhidric 0,01-1,00%.

Pentru tocoferoli, benzile de absorbție cele mai caracteristice sunt situate la 292, 297, 300nm.

Spectrul ultraviolet al flavonoidelor în metanol prezintă benzi caracteristice care depind de sistemul de conjugare al inelelor aromatice [68].

Flavonele și flavonolii absorb de regulă în regiunea 240-400nm.

Se observă ca o caracteristică în această regiune, prezența a două benzi, denumite în mod curent Banda I (300-390 nm) asociată absorbției date de radicalul cianomil (ciclul B) al structuri flavonoidice și Banda II (240-280 nm) asociată absorbției dată de radicalul benzoil (ciclul A).

Benzile caracteristice de absorbție ale flavonoidelor în spectrul ultraviolet vizibil sunt redată în tabelul 4.

Tabel 4. Benzile caracteristice de absorbție ale flavonoidelor în spectrul UV-VIZ [69]

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

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

Alte flavonoide, cum sunt flavanonele, izoflavonele și flavonolii prezintă o deplasare batocromică a benzii II. Auronele, calconele și antocianidinele deasemenea prezintă o deplasare batocromică a benzii I [68].

Tabel 5. Absorbția specifică în UV a unor flavonoide în soluție metanolică și în prezență de reactivi specifici [17]

Denumirea compusului	Reactivi specifici			
	MeOH	CH <sub>3</sub> ONa	AlCl <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> COONa
0	1	2	3	4
Kamferol	253;266;294; 322;367	278;316 416	260;268;303 350;424	274;303;387
Luteolina	242;253;267; 291;349	266;329 401	247;300 328;426	269;326;384
Quercetina	255;269 301;370	247;321	272;304;333 458	257;274 329;390
Rutina	259;266 299;359	272;327 410	275;303 433	271;325;393



0	1	2	3	4
Miricetina	254;272 301;374	262;285 322;423	271;316 450	269;335

Numeroase cercetări atestă că spectroscopia UV este una dintre metodele cel mai frecvent utilizate pentru identificarea structuri flavonoidelor din materiale vegetale.

Derivații fenolici prezintă în domeniul UV două benzi de absorbție caracteristice: prima mai intensă, la 210–220 nm și a doua cu coeficient de extincție mai mic, la 260-280 nm. Intensitatea și poziția maximelor de absorbție se modifică însă semnificativ la creșterea pH-lui mediului.

Introducerea diferiților substituenți în poziția para produce modificări sensibile în spectrele UV, în concordanță cu efectele electronice ale acestora.

Maximile de absorbție în domeniul UV-VIZ ale unor caratenoide în solvenți organici sunt redate la paragraful I.1.5.4.

În lumină ultravioletă, maximul de absorbție pentru  $\alpha$ -tocoferol este de 292 nm, pentru  $\beta$ -tocoferol la 287 nm, pentru  $\gamma$ -tocoferol la 298 nm.

Carotenoidele îngreunează în mare parte dozarea tocoferolilor pe baza spectrelor de absorbție, fapt pentru care vor trebui îndepărtate din materialul de cercetat.

Pentru a înlătura eventualele interferări ale tocoferolilor cu cele ale carotenoidelor, sterolilor, vitaminelor K, în mod practic se produce oxidarea tocoferolilor cu  $\text{AgNO}_3$  în soluție de alcool metilic, cu formarea unei chinone ce are maximul de absorbție la 265nm, cu coeficient de extincție de 4 ori mai mare decât tocoferolul din care s-a obținut [1].

### I.3.1.2. Spectroscopia de vibrație (IR)

Spectrul de absorbție în IR este un spectru de benzi care se datorează unor tranziții între stări energetice de vibrație ale atomilor sau grupelor de atomi constituenți ai moleculelor, peste care se suprapun tranziții între stări energetice de rotație.

Cercetărilor spectrelor antioxidanților naturali în domeniul IR le sunt consacrate foarte puține lucrări.

În primul rând există o tendință generală, nu întotdeauna motivată, de a nu avea încredere în această metodă.

În al doilea rând, suprapunerea multor benzi asemănătoare în spectrele antioxidanților naturali de bază, în general glucozide, complică considerabil interpretarea lor.

De obicei fiecare element structural prezintă o „frecvență cheie” specifică de absorbție însoțită de absorbții secundare datorate multiplelor posibilități de rotație, vibrație și deformare.

Din valoarea unei frecvențe cheie în spectru se pot identifica grupările funcționale din molecula organică, se pot trage concluzii asupra naturii substituenților și legăturilor din imediata vecinătate a grupării, a elementului structural respectiv.

Banda la  $1640\text{cm}^{-1}$  este caracteristică tuturor antocianilor și corespunde vibrațiilor legăturii duble a oxigenului oxonic. Deoarece sunt colorați, antociani dau spectre în vizibil, dar mai caracteristice pentru identificare și stabilirea structurii sunt cele în infraroșu.

Pelargonidina: 1693, 1595, 1572, 1518, 1437, 1405, 1006, 930, 847, 839, 817, 735, 682  $\text{cm}^{-1}$ .

Cianidina: 1630, 1605, 1572, 1511, 1440, 1402, 1020, 930, 904, 870, 839, 820, 809, 785, 727, 708, 678  $\text{cm}^{-1}$ .

Peonidina: 1630, 1577, 1490, 1460, 1030, 1015, 930, 875, 845, 830, 735, 713, 680  $\text{cm}^{-1}$ .

Delfinidina: 1630, 1585, 1573, 1510, 1442, 1036, 926, 860, 848, 816, 782, 720, 712  $\text{cm}^{-1}$ .

Petunidina: 1630, 1585, 1575, 1500, 1450, 1445, 1090, 1080, 1042, 958, 893, 858, 845, 830, 785, 715  $\text{cm}^{-1}$ .

Malvidina: 1628, 1580, 1565, 1525, 1485, 1459, 1450, 1395, 1110, 1045, 935, 885, 855, 845, 820, 790, 740, 715  $\text{cm}^{-1}$  [70].

În ce privesc antocianozidele ele posedă spectre de absorbție în IR în benzi de vibrații de valență mult mai restrânse decât antocianidolii. Astfel:

Cianidol-3-glucozida: 1630, 1580, 1565, 1515, 1480, 1440, 1280, 1240, 1200, 1160, 1128, 1080, 1048, 1015  $\text{cm}^{-1}$ .

Cianidol-3,5-diglucozida: 1625, 1606, 1570, 1430, 1274, 1195, 1128, 1100, 1065, 995  $\text{cm}^{-1}$ .

Cianidin-3-fosforozid-5-glucozida: 1280, 1236, 1195, 1068, 1015  $\text{cm}^{-1}$  [71].

În stabilirea caracteristicilor spectrale în IR ale flavonoidelor un rol important îl are gruparea carbonil. În tabelul 6 sunt prezentate valorile absorbției în  $\text{cm}^{-1}$  pentru câteva flavone și flavonoli.

Tabel 6. Valorile absorbției în IR pentru gruparea carbonil [72]

Denumirea compusului flavonoidic	$\nu_{\text{-CH=O}}$ [ $\text{cm}^{-1}$ ]
Apigenina	1655
Diosmetina	1658
Luteolina	1650
Patuletina	1640
Quercetina	1662
Morina	1662
Rhamnazina	1665
Galangina	1653
Vogonina	1658
Robinetina	1610
Kamferol	1667

Studiul spectrelor IR ale derivaților fenolici a adus contribuții importante la elucidarea structurii spațiale a fenolilor precum și la aprecierea capacității lor de a forma legături de hidrogen.

În derivații orto-substituiți, banda de absorbție a grupei OH, deplasată spre frecvențe mai mari în comparație cu fenolul nesubstituit.

După cum rezultă din tabelul 7 frecvența de vibrație a grupei OH depinde de volumul substituenților orto.

Tabel 7. Frecvența de vibrație a grupeii OH în alchil fenoli [73]

Combi-nația	$\nu_{OH}$ [cm <sup>-1</sup> ]	Combi-nația	$\nu_{OH}$ [cm <sup>-1</sup> ]
Fenol	3612	p-Crezol	3617
2, 6-di-metil fenol	3622	2, 4, 6-tri-metil-crezol	3626
2, 6-di-etil fenol	3623	4-metil-2, 6-di-izopropil-crezol	3628
2, 6-di-i-propil fenol	3623	4-metil-2, 6-di-izobutil-crezol	3650
2, 6-di-t-metil fenol	3651	4-metil-2, 6-di-izoamil-crezol	3642,5
2, 6-di-t-amil-fenol	3646		

Creșterea lungimi lanțurilor alchil la atomul de carbon terțiar din substituții orto determină scăderea frecvenței de vibrație, fapt explicat prin scăderea împiedicării sterice în urma distrugerii simetriei sferice a substituentului datorită numărului mare de conformații posibile.

Spectroscopia IR poate să furnizeze informații prețioase despre existența legăturilor de hidrogen inter- și intramoleculare, care se manifestă în spectru prin banda lată de absorbție în regiunea 2100-2300 cm<sup>-1</sup> [74].

### I.3.1.3. Rezonanța magnetică nucleară (RMN)

Spectroscopia RMN prezintă avantaje față de alte metode de analiză structurală. Astfel, comparativ cu spectrele UV-VIS, spectrele RMN furnizează mai multe informații structurale.

Față de IR, spectrele sunt mai ușor de interpretat. Dintre dezavantaje se poate aminti sensibilitatea redusă, astfel că nu poate fi folosită la analiza de urme.

Spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară este cea mai puternică metodă pentru determinarea structurii chimice a substanțelor [75].

Extracțele de cercetat se dizolvă într-un solvent deuterat, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, CD<sub>3</sub> COCD<sub>3</sub>, CDCl<sub>3</sub> la care se adaugă tetra-metil-silan (TMS) ca standard intern, se introduce într-o eprubetă care se rotește între polii unui electromagnet puternic.

Proba este iradiată cu unde electromagnetice radio, iar un detector măsoară absorbția. Înregistrarea spectrelor la frecvență mai mare de 400Mhz permite de a identifica cu precizie natura și aranjarea reciprocă a componentelor.

În cazul flavonoidelor grupările metoxi, atașate la inelul B, se manifestă în spectrul H-RMN cu un singlet puternic în regiunea 4.00 pdm și permit stabilirea naturii agliconului. Două dublete la 6.20±0.03 pdm și la 7.31±0.05 pdm, cu constantele de interacțiune fină  $f = 16\text{Hz}$ , corespund, respectiv, atomilor de hidrogen  $\alpha$  și  $\beta$  pe lângă legătura dublă din restul acidului cinamic [76].

Flavonele se recunosc după semnalul dd și 5,4 (H-2, J=13 și 2-3Hz), 3,1 (H-3 trans, J=13 și 2-3Hz) și 2,8 (H-3 cis, J=17 și 2-3Hz).

Izoflavonele se pot recunoaște în spectrul 1H-RMN după semnalele: 4,1 (H-2a, dd, J=5 și 8Hz), 4,5 (H-2b, dd, J=5 și 18Hz) și 4,6 (H-3, dd, J=8 și 12Hz)[76].

### I.3.1.4. Spectrometria de masă (SM)

Este o metodă folosită pentru determinarea maselor molare ale substanțelor din extracțele de cercetat și furnizează informații esențiale despre structura intermediarilor, care se obțin la degradare. Spectrometria de masă se bazează pe

ionizarea atomilor sau moleculelor extractelor de cercetat, fragmentarea moleculelor, accelerarea ionilor, separarea lor în funcție de raportul masă/sarcină ( $m/z$ ), înregistrarea acestora și interpretarea spectrelor obținute sau compararea lor cu spectrele din bazele de date [77].

Metoda SM se utilizează paralel cu RMN, UV-VIS sau HPCL; uneori este necesară aplicarea concomitentă a tuturor acestor metode [78].

Această metodă face posibilă detectarea intermediarilor cu durata de viață scurtă, care de obicei „se pierd” în timpul trecerii probelor de la un aparat la altul, ceea ce permite stabilirea mecanismelor proceselor, inițiate de radicalii liberi [79].

Izoflavonele se caracterizează de asemenea printr-un ion molecular intens ( $M-1$ ,  $m/z = 121$  u.m. ), care este și pic de bază în spectrul izoflavonelor și 7-metoxiizoflavonelor [80].

Agliconii flavonoidelor prezintă fragmente caracteristice în spectrul de masă.

În general, agliconii flavonoidelor cu o grupare metoxi prezintă fragmentul  $[M-Me]^+$ , care este în mod special intens la flavonoidele 6- și 8-metoxilate [81].

Transpoziții se produc și în clasa izoprenoidelor. Astfel mentona are picul de bază la  $m/z$  112. Apar însă și picuri intense și la  $m/z$  69 și  $m/z$  97 prin cele două moduri de scindare  $\alpha$  a inelului ciclohexanonic.

Acizii alifatici dau ioni moleculari puțin intenși și s-a constatat o tendință semnificativă de protonare. Acizii aromatici au picul molecular intens. Fragmentele caracteristice ale acizilor carboxilici sunt  $M-17$  ( $M-OH$ ) și  $M-45$  ( $M-COOH$ ).

La acizii alifatici superiori cu catenă liniară de patru sau mai mulți atomi de carbon apare un fragment caracteristic la  $m/z$  60.

La acizii aromatici un ion important este cationul benzoil care elimină în continuare monoxid de carbon. Acizii benzoici substituiți în poziția meta- și para-datorită posibilității unor transpoziții între carboxil și gruparea mai apropiată din izomerul orto-

Acizii benzoici substituiți în poziția orto- au un fragment caracteristic la  $m/z$  120 [82].

Esterii alifatici și lactonele dau un pic molecular slab, ei prezintă tendință de protonare (picul  $M+1$  este vizibil).

Esterii aromatici indică un pic molecular intens. Unele din fragmentările esterilor decurg cu transpoziție, eliminându-se alchenă fie din catena alcoolului fie din cea a acidului [77].

### **I.3.2. Metode cromatografice de identificare**

#### **I.3.2.1. Cromatografia pe hârtie**

În cromatografia pe hârtie, procesul de sorbție este în primul rând de repartitie între o fază mobilă organică sau un amestec apă-solvent organic și o fază staționară constituită din apă, care este prezentă întotdeauna în structura fibroasă și poroasă a hârtiei.

Hârtia propriu-zisă acționează ca un suport solid pentru faza staționară.

Cromatografia pe hârtie este una din cele mai vechi metode utilizate pentru cercetarea antioxidanților naturali [83].

Acidul ascorbic se poate obține în stare pură prin cromatografierea extractelor din diferite surse naturale, pe hârtie de filtru impregnată cu soluție de acid oxalic 2% și eluare dublă, prima cu n-butanol și acid oxalic, iar a doua eluare cu fenol, urmată de dozarea eluantului cu reactiv Tillmaes [11].

Cromatografia pe hârtie impregnată cu carbonat de zinc ( $ZnCO_3$ ) eluată cu ciclohexan și identificare a zonelor cu clorură ferică și  $\alpha, \alpha'$ -dipiridil în etanol, dă rezultate bune pentru alfa și beta tocoferoli.

Dacă se folosește hârtia impregnată cu carbonat de zinc, apoi pe aceeași hârtie se impregnează și ulei de parafină, folosind ca eluent ciclohexan ( $C_6H_{12}$ ), iar pentru colorarea tocoferolilor se folosește clorură ferică în amestec cu  $\alpha, \alpha'$ -dipiridil în etanol, se pot separa și doza toți cei 7 tocoferoli cunoscuți [84].

Pentru identificarea flavonoidelor prin cromatografie pe hârtie, cel mai des se utilizează hârtia Whatmann.

Pentru identificarea flavonoidelor: quercetină, kamferol, izoquercetină din extractele metanolice, cel mai utilizat sistem de solvenți este n-butanol:acid acetic:apă 20:5:25.

Deoarece acest sistem de solvenți deși realizează o separare foarte bună, necesită timp de eluare între 10 și 40 de ore s-a încercat utilizarea unui sistem mult mai avantajos și anume, metanol:apa:acid acetic (4:6:0,25 v/v/v), cu ajutorul căreia s-a încercat identificarea quercetinei, rutinei [85].

### 1.3.2.2. Cromatografia în strat subțire

În cromatografia pe strat subțire, faza staționară este de obicei un solid polar, ca de exemplu silicagelul sau alumina care acoperă o placă subțire de sticlă, material plastic sau aluminiu.

În acest caz procesul de separare este bazat în primul rând pe adsorbție.

Faza staționară: silicagel (Merck).

Faze mobile, aplicate în diverse proporții, la analiza flavonoidelor:

benzen:metanol:acid acetic = 45:8:4 pentru identificarea quercetinei și kamferolului

[86]; acid formic:apă: metanol = 1:9:20, pentru identificarea kamferolului [87];

toluen: acid acetic = 40:20 pentru identificarea quercetinei [88].

În cazul identificării taninurilor se folosesc ca fază mobilă tipul de solvenți butanol: acid acetic: apă = 4:1:5.

Pentru compuși fenolici se folosește ca fază mobilă sistemul de solvenți toluen: acetat de etil: acid formic: apă = 4:4:1:5.

### 1.3.2.3. Cromatografia pe coloană (lichid-solid) [82].

În acest tip de cromatografie procesul predominant de sorbție al solutului este adsorbția. Separarea componentelor amestecului de analizat se datorează diferențelor în polaritatea acestora.

Cu cât o moleculă este mai polară, cu atât va fi mai puternic reținută pe o suprafață polară.

Ordinea aproximativă a creșterii adsorbției este: parafine<olefine<eteri<esteri<cetone și aldehide<amine<alcooli și fenoli<acizi.

În timpul procesului de separare apare o competiție între molecula solutului și cele ale fazei mobile pentru centrul activ de adsorbție al fazei staționare.

Moleculele solutului sunt continuu adsorbite și desorbite, pe măsură ce faza mobilă trece prin sistemul cromatografic. Compușii cu polaritate mică vor petrece mai mult timp în faza mobilă decât în faza staționară, comparativ cu cei mai puternic polari.

În consecință componentii unui amestec sunt eluați în ordinea creșterii polarității. Drept fază staționară se folosesc mai ales silicagelul și alumina.

Silicagelul poate fi preparat cu un domeniu larg de activitate.

Faze mobile:

Puterea de eluție a unui solvent este determinată de polaritatea sa, cea a fazei staționare și de natura componentelor probei.

O serie de solvenți aranjați în ordine crescândă a puterii de eluție se numesc serie eluotropă.

Exemplu: n-hexan–ciclohexan–tetracloretan–etanol–acetonitril– metanol. În practică, se realizează separări mai bune cu faza mobilă cu polaritatea cea mai redusă posibil.

#### **I.3.2.4. Cromatografia de gaze**

Cromatografia de gaze, numită astfel deoarece faza mobilă este un gaz, este reprezentată de cromatografia gaz-lichid (CGL) și cromatografia gaz-solid (CGS).

În cazul cromatografiei gaz-lichid faza staționară este formată dintr-un lichid cu punct de fierbere ridicat, iar procesul de sorbție este în primul rând de adsorbție.

Probele de analizat trebuie să fie volatile și termic stabile la temperatura de cercetat [89].

Compușii cu mai mult de două grupe hidroxilice și trei grupe metoxi nu se eluează în timp util pe coloană.

Creșterea temperaturii aduce unele avantaje, dar crește paralel pericolul de descompunere a compușilor injectați și scade ”viața coloanei” care este solicitată la temperaturi ridicate (p.f. ale flavonoidelor se situează în jur de 200°C) [90].

Astfel pentru a identifica esterii trimetil flavonoidelor s-a folosit o coloană de polimeri silicomai SE-30, pentru identificarea antocianidelor.

Flavonoidele quercetina, hesperitina, kamferolul, naringenina, vagonina și baicaleina s-au identificat pe mai multe tipuri de coloane: 0,5%OV-1, OV-17, OV-25, 2% OV-210 și 0,5% OV-225 [91].

Hidroxi- și metoxi–flavonoidele s-au analizat asociind cromatografia gaz-lichid cu spectroscopia FTIR.

Prin intermediul acestei tehnici s-au realizat corelări între datele spectrale IR și timpii de retenție, pe baza cărora s-au cules informații privind natura substituenților [92], sau s-au putut face predicții asupra timpului de retenție [93].

Asocierea cromatografiei de gaze cu spectroscopia de masă a permis detecția 5-metoxiflavonelor în extractele vegetale [94], dar și cuantificarea activității antiradicalice a unor extracte vegetale și analiza compușilor fenolici din matrici solide [95].

#### **I.3.2.5. Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC)**

Din punct de vedere practic, cromatografia de lichide de înaltă performanță diferă de cea clasică prin următoarele caracteristici:

- utilizarea de noi faze staționare sau suporturi având o mare omogenitate a mărimii și formei particulelor;
- utilizarea unor materiale cu diametrul mic al particulelor ;
- utilizarea unor noi procedee de împachetare (umplere) a coloanei;
- reducerea la minim a volumelor moarte din sistemul de separare al cromatografului;
- utilizarea unor detectori de mare sensibilitate, cu celule de măsură având volumul foarte mic.



Identificarea antioxidantilor naturali prin HPLC din extractele farmaceutice și vegetale s-a realizat utilizând diverse faze mobile și staționare, și anume:

Rutina, quercetina, eupafolina și hispidulina s-au identificat utilizând coloană C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 $\mu$ m), faza A: metanol adus la pH 3 cu H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; B: metanol:apă=1:1; C: metanol:apă=7:3, debit 1mL/min detecție UV la 339 nm [96]; quercetina, kamferolul și miricetina din tomate au fost dozate prin HPLC, folosindu-se o coloană Hypersil-ODS (250 mm x 4,6mm, 5 $\mu$ m), fază mobilă 25:75 (V/V), acetonitril pH 2,4 cu tampon fosfat (25% în 0,025 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) debit: 1,2mL/min; detecție UV 266 nm [97];

Compuși fenolici neutri ( (+) catechnia, (-) epicatechnia), flavan-3-ol- polimeri și flavonol glicozidele (isoquercetina, hiperina, quercetrina, avicularina și rutina) din sucul de mere au fost separați și cuantificați prin HPLC cu fază inversă (RP-HPLC) cu coloană C<sub>18</sub> utilizând ca solvent apă acidulată (pH = 2,8) - metanol. Domeniul UV de detecție a fost între 260-350nm pentru flavonoli [98].

Compoziția chimică a fructelor de Visenea mocanera a fost analizată prin TLC și HPLC pentru a stabili compoziția lor în compuși fenolici.

Analiza compușilor fenolici cu masa moleculară mică și a 3-flavonolilor s-a realizat utilizând coloana C<sub>18</sub> (300 x 3,9 mm). Solvenții de eluare au fost: A: acid acetic 2% și B: metanol:acid acetic:apă (30:2:68, V/V/V), iar detecția a fost simultană la 280 și 340nm.

Analiza agliconilor flavonolilor s-a realizat cu coloană C<sub>18</sub> (150 x 3,9mm); solvenți:apă/metanol/acid acetic (57,5:37,5:5, V/V/V), debit de 0,7mL/minut, detecție UV la 360 și 254 nm, sau amestec de solvenți: tetrahidrofuran:apă:acid acetic (50:47,5:2,5 V/V/V).

Pentru analiza antocianilor s-a folosit același tip de coloană dar amestec de solvent diferit și anume: acid acetic:apă (10:90, V/V) (A) și acid acetic:metanol:apă (10:45:45,V/V/V), (B) ; debit de 1 mL/min și detecție 546 nm (VIZ) și 313 nm (UV). Gradientul a fost liniar, de la 25 la 80% solvent B pentru 30 minute și în următoarele 10 minute, 80% solvent B [99].

Pentru analiza acidului ascorbic din extractele de ardei s-a utilizat un cromatograf SHIMADZU LC-10A cu coloana Shodex Atahipa K NH2P-504E, 250 x 4,6mm la 40°C.

Faza mobilă: apă acidifiată (0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)(solvent A) și acetonitril (solvent B) 25:75 în procente.

Ritmul de curgere a fost de 1mL/minut și detecție UV la 254 nm [100].

Analiza carotenoidelor din extractele acetonice de ardei.

Se folosește același tip de cromatograf ca și la analiza acidului ascorbic.

Faza mobilă: solvent A: acetonitril:apă = 9:1; solvent B: acetat de etil.

Pentru separare s-au utilizat gradienti de elecție: 0% B la 0 minute; 50% B la 20 minute; 50% B la 35 minute.

Ritmul de curgere a fost 1 mL/minut, detecția se face în UV, spectrul UV înregistrat cu dispozitiv detector fotodiodă SHIMADZU SPP-M10 [101].

Metoda RP-HPLC cu detecție spectrofotometrică UV a fost folosită pentru determinarea majorității componentilor din frunze de Schisandra chinesis Baill.

Flavonolii (quercetina, kamferol) și acidul cinamic au fost separați în 12 minute utilizând fază mobilă: acetonitril – soluție apoasă 0,05% de acid ortofosforic (40:60 V/V) și coloană de sticlă Separon SGX C<sub>18</sub>, 150 x 3 mm, 5 $\mu$ m. Debitul a fost de 0,5 mL/min., iar analiza a fost monitorizată la 260 nm [102].

MPLC ( Medium pressure liquid chromatography) este o metodă nouă pentru izolarea compușilor naturali.

S-au separat prin această metodă șase compuși fenolici (acid galic, catechină, rutina, naringenina, quercetina și izoramnetina), în următoarele condiții de lucru: coloană Lichro Cart 250-4, Hypersil ODS (250 nm x 40 nm, 7μm), presiune 14 bar, faza mobilă acetonitril și acid formic 1% ; debit 1 mL/min. [103].

#### **I.4. Activitatea antioxidantilor naturali ( alimentari )**

##### **I.4.1.Aspecte generale**

Există, la ora actuală probe atât experimentale cât și epidemiologice care indică că, pe lângă mecanismele de apărare ale organismului, starea nutrițională joacă un rol esențial în apărarea antiradical.

De aceea, o suplimentare moderată și bine controlată în micronutrienți poate diminua frecvența de apariție a anumitor boli legate de agresiunea oxidantă [104,105].

Autooxidarea lipidelor prin reacția în lanț a radicalilor liberi nu numai că scade valoarea nutritivă a alimentelor și deteriorează aroma și gustul, dar mai poate cauza și diferite boli, cum ar fi arteroscleroza, ischemie, inflamare, carcinogeneza și îmbătrânire [106].

În industria alimentară adăugarea antioxidantilor naturali a fost una din metodele eficiente de a întârzia oxidarea grăsimilor din alimente.

Marea eficiență a antioxidantilor constă în sinergismul acțiunii lor, în însumarea acțiunii lor combinate, fiecare funcționând după mecanisme diferite și la nivele variate ale lanțului evoluției radicalilor liberi în organism.

Există la ora actuală, probe atât experimentale cât și epidemiologice care indică faptul că pe lângă mecanismele de apărare ale organismului, rația alimentară joacă un rol important în apărarea antiradical.

Măsurarea individuală a antioxidantilor prin separare, nu permite cunoașterea cu certitudine a activității antioxidante totale a unui produs datorită efectelor sinergetice care pot să se stabilească între compușii prezenți în acesta.

Efectul protector al antioxidantilor naturali prezintă o importanță deosebită în profilaxie și, în consecință, o alimentație bogată în compuși cu acțiune antiradical și antioxidantă reprezintă o cale eficientă în prevenirea și tratarea unor boli cardiovasculare larg răspândite [107].

##### **I.4.2. Activitatea antioxidantă și antiradical**

S-a constatat că toate clasele de antociani sunt antioxidanți puternici, îmbunătățind calitatea și valoarea produsului alimentar [108].

Proprietățile antioxidante și antiradicalice oferă antocianilor rolul de fitoconservanți, atât în stare pură, cât și în compoziții complexe [109].

Activitatea vitaminei C se datorează echilibrului dintre forma redusă, acidul ascorbic (care la pH-ul sângelui de 7,35-7,45, există sub formă de monoanion) și formele sale oxidate, acidul mono-dehidroascorbic și acidul dehidroascorbic.



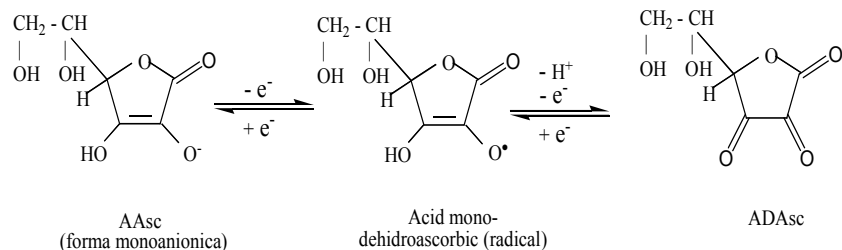
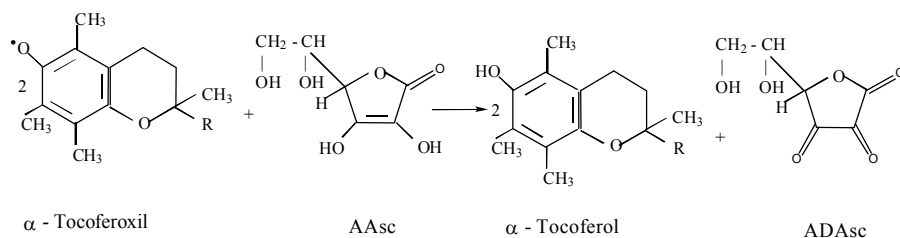


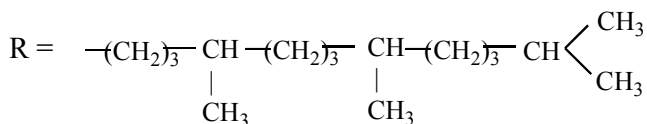
Figura 10. Formulele de structură ale sistemului redox acid ascorbic – monodehidro- și dehidro-ascorbic[5]

Acțiunea antioxidantă a acidului ascorbic [5] constă în:

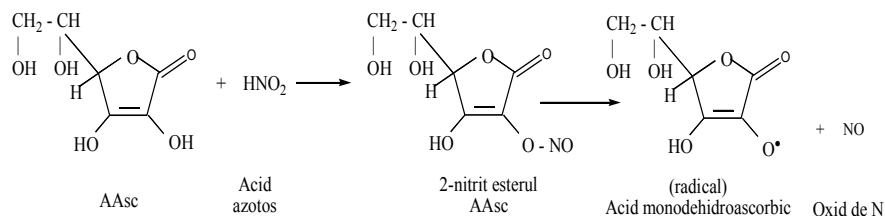
- îndepărtează  $\text{O}_2^{\cdot-}$  și  $\text{HO}_2^{\cdot}$ ;
- îndepărtează radicalii peroxidici  $\text{ROO}^{\cdot}$  solubili în apă;
- îndepărtează radicalii peroxidici ai grupelor  $-\text{SH}$  și  $-\text{SO}$ ;
- previne și repară daunele atacului radicalic prin  $\text{HO}^{\cdot}$  asupra acidului uric;
- inactivează nitrozaminele cancerigene;
- îndepărtează acidul hipocloros și efectul său asupra enzimei numită mieloperoxidază;
- inhibă peroxidarea lipidică de către amestecul hemoglobină sau mioglobină –  $\text{H}_2\text{O}_2$  și previne ruperea hemului dependentă de peroxizi, cu eliberarea ionilor de fier;
- în soluție apoasă este neutralizator al oxigenului singlet ( $\text{O}_2^{\cdot}$ ) ;
- regenerează  $\alpha$ -tocoferolul din radicali de  $\alpha$ -tocoferoxil în membrane și lipoproteine conform reacției:



R – radicalul fitil



- îndepărtează radicalii de nitroxid conform reacției



- îndepărtează radicalii HO<sup>•</sup>;
- protejează lipidele plasmatică față de peroxidarea indusă de neutrofilii activați;
- protejează față de speciile oxidate prezente în fumul de țigară;
- este un protector puternic față de ozon (O<sub>3</sub>) și NO<sub>2</sub><sup>•</sup> din fluidele corpului uman, în special al fluidelor mucoaselor plămânilor.

Carotenoizii conțin lanțuri lungi, formate din 22 sau mai mulți atomi de carbon, în care legăturile covalente simple dintre atomii de carbon alternează cu legăturile duble, ceea ce le conferă proprietățile unor sisteme de electroni extinse, capabile de absorbi și inactiva speciile reactive de oxigen sau alți radicali liberi [5].

Numeroși autori au cercetat activitatea antioxidantă a flavonelor și s-au făcut multe încercări în stabilirea legăturii dintre structura flavonoidelor și activitatea de eliminare a radicalilor.

În general, această activitate depinde de structura moleculară și de modelul de substituție al grupărilor OH, de exemplu: prin disponibilitatea hidrogenului fenolic și prin posibilitatea de stabilizare a radicalilor fenoxil rezultați prin încercuirea cu hidrogen sau prin delocalizarea cu electron extins.

Conform unor studii recente, la flavonoide prezența unei structuri o-dihidroxi în nucleul B conferă un grad mai ridicat de stabilitate radicalilor fenoxil prin participarea la delocalizarea unui electron, fiind o caracteristică importantă pentru potențialul antiradical.

Interesant este faptul că prezența unei legături duble între C2 și C3 în nucleul C nu pare a fi necesar în activitățile antiradicale.

Puternica acțiune antiradicală a flavonelor toxifolina și fustina pare a fi legată de modelul favorabil de substituție 3-, 4-, - dihidroxid din nucleul B. Flavonele cu cel mai slab potențial de eliminare a radicalilor nu au gruparea hidroxil la C3 și hidroxid 3-, 4-, din nucleul B.

Flavonolul galangin, căruia îi lipsește substituția de OH din nucleul B, a demonstrat o activitate intensă, probabil datorită combinației legaturii duble C2–C3 cu 3–OH.

În figura 11 este prezentat un mecanism ipotetic de reacție pentru activitatea de eliminare a radicalului de către galangin.

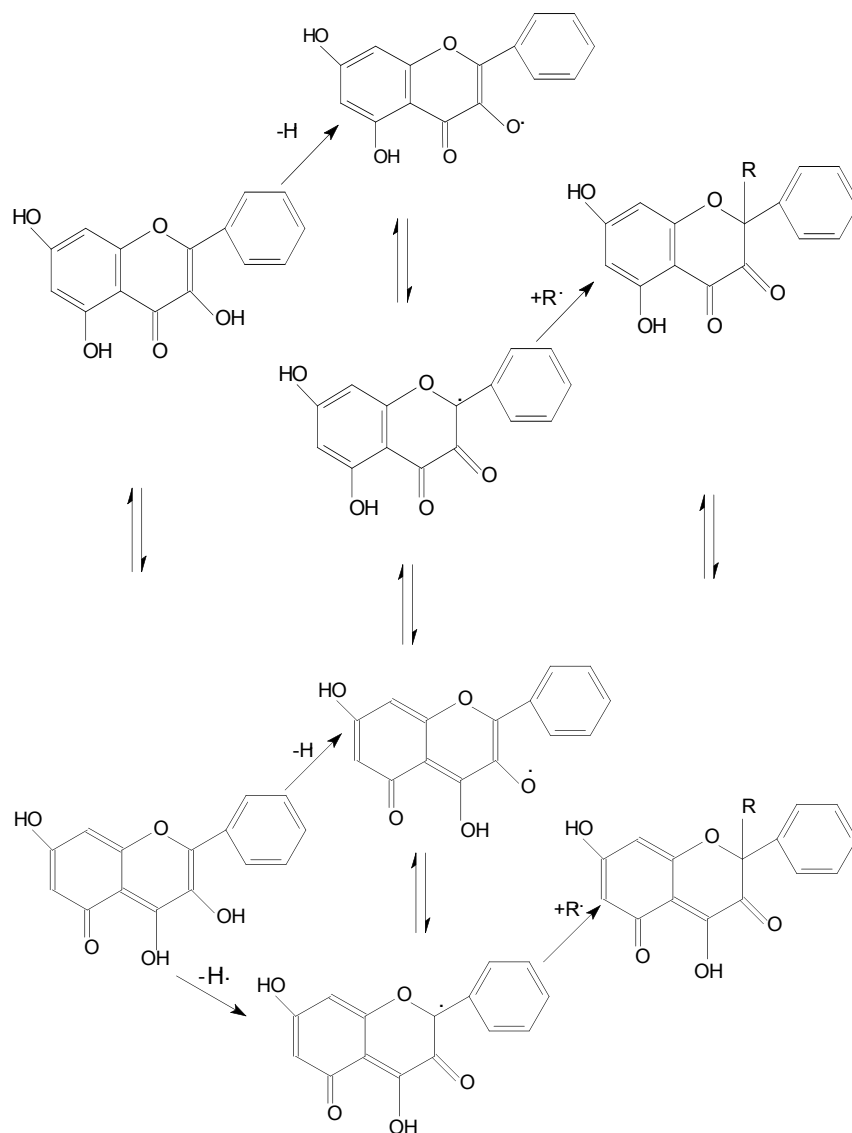


Figura 11. Mecanismul activității antiradical a galanginului [110]

Acest mecanism ilustrează un posibil mod de acțiune a flavonelor fără substituția 3, 4,-di-OH.

Astfel se pare că structura o-dihidroxid (catechol) din nucleu B nu este întotdeauna o condiție în vederea obținerii unei activități intense de eliminare a radicalului liber a flavonoidelor.

S-a constatat că gruparea hidroxil la C3 contribuie semnificativ la puternica activitate a radicalului.

Legătura dublă C2-C3, combinată cu un 4-cetogrup care este responsabil de localizarea electronului din nucleul B, continuă să identifice capacitatea de eliminare a radicalilor, iar saturația legăturii duble dintre C2-C3 se consideră a fi cauza pierderii potențialului de activitate.

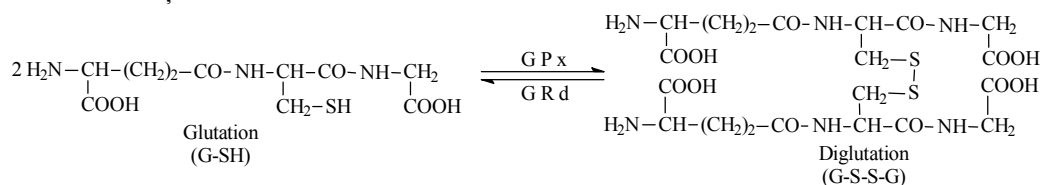
Acțiunea de eliminare a radicalilor este sporită de prezența grupărilor 3-OH și 5-OH în combinație cu o funcție 4-carbonil și de legătura dublă C2-C3 [110].

Rezultatele obținute arată că eliminarea radicalilor liberi de către flavonoide depinde în mare măsură de modelul particular de substituție al grupărilor libere hidroxil (OH) de pe scheletul flavonoid.

Efectele antioxidante cele mai puternice le prezintă: quercetina, dihidroquercetina, urmate de rutină, diosmetină, ramnetină, fisetină, luteolină miricetină, kamferol, (-) epicatechină și izoflavonele: daidzeina, genisteina și prunetina [32, 104].

Concentrația cea mai mică, la care un compus flavonoidic este antioxidant este de ordinul  $10^{-6}$  M pentru compușii cu activitate radicală sau  $10^{-3}$  M pentru compușii cu activitate ridicată sau  $10^{-3}$  M pentru compușii cu activitate medie [111].

Funcția antioxidantă a glutatationului se datorează sistemului său redox în care forma redusă (GSH) poate fi oxidată cu ușurință la forma sa oxidată (G-S-S-G) conform reacției reversibile.



GPx – glutation peroxidaza

GRd – glutation reductaza

Păstrarea echilibrului între forma redusă și forma oxidată (2G-SH; G-S-S-G) este deosebit de importantă pentru menținerea funcției sale biologice.

O micșorare a raportului G-SH/G-S-S-G determină trecerea enzimelor cu grupe tiolice (Enz-SH) active, în enzime inactive (Enz-S-S-Enz).

Raportul G-SH/G-S-S-G influențează toate sistemele redox celulare precum și reacțiile chimice dependente. În literatură se cunosc glutation peroxidaze dependente sau independente de seleniu.

Seleniu este necesar producerii glutation peroxidazei (GPx) care regenerează glutationul și îndepărtează compușii toxici, cu structură radicalică și rezultați prin oxidarea acizilor grași polinesaturați și mono-nesaturați, cât și pentru sinteza tioredoxinreductazei, care regenerează acidul ascorbic. Compușii cu seleniu au un efect sinergetic asupra vitaminei C, ceea ce înseamnă că împreună au un efect mai puternic decât luați individual.

În timp ce formele dependente de seleniu descompun atât apa oxigenată cât și hidroperoxizi organici, formele lipsite de seleniu, conținând doar legături -SH își limitează activitatea doar față de apa oxigenată (pe care o descompun în apă și oxigen).

Rolul glutationului redus față de enzimele tiolice se manifestă prin intensificarea acțiunii acestora, pe seama formării NADPH din NADP<sup>+</sup>, în decursul degradării glucozei [112].

Eficacitatea antioxidantă a fenolului nesubstituit sau a fenolilor care conțin substituenții voluminoși în poziția orto față de -OH este redusă, aceștia ne-prezentând nici un interes din punct de vedere practic. Pentru ca un fenol să posede activitate antioxidantă semnificativă este necesar ca gruparea -OH să fie ecranată de cel puțin o grupare cu volum mare cum ar fi t-butil, ciclohexil și benzil.

Prezența unor substituenți electrono-acceptori ca nitro-, carboxi-, carbonil-, halogen, în molecula fenolilor substituții micșorează eficacitatea lor.

S-au stabilit corelații între energia stării aromatice a fenolilor și eficacitatea antioxidantă și între valoarea potențialului de oxidare și eficacitate, dar utilitatea lor practică este destul de redusă [113].

Capacitatea antioxidantă a tocoferolilor variază invers proporțional cu activitatea vitaminică. Astfel în timp ce alfa – tocoferolul este un antioxidant slab, gama-tocoferolul este un antioxidant puternic.

Dintre cei șapte tocoferoli posibili, alfa, gama și beta-tocoferolii sunt cei mai antioxidanți, protejând în această ordine oxidarea lipidelor, a proteinelor și a acizilor nucleici.

Activitatea antioxidantă a tocoferolilor este dependentă de gruparea hidroxilică de la C6, grupare care trebuie să fie liberă.

Dintre antioxidanții sinergetici ai tocoferolilor fac parte vitamina C și acidul citric, care servesc ca sursă de hidrogen, contribuind la regenerarea tocoferolilor.

Tocoferolii prezintă o mare eficiență în protecția vitaminelor A și a carotenoidelor de degradări oxidative.

Măsurarea individuală a antioxidanților menționați, prin separare, nu permite cunoașterea cu certitudine a capacității antioxidante totale a unui extract vegetal datorită efectelor sinergetice care pot să se stabilească între compușii prezenți în produs.

În schimb măsurarea capacității antioxidante totale ajută la înțelegerea proprietăților funcționale ale alimentelor [114].

### **I.5. Aplicații ale antioxidanților naturali**

Degradarea oxidativă a uleiurilor vegetale și a grăsimilor animale conduce la formarea unor compuși carbonilici cu gust și miros neplăcut, fenomen cunoscut sub numele de râncezire.

De aceea, în tot mai numeroase cazuri, grăsimile alimentare și produsele alimentare conținând grăsimi sunt stabilizate cu antioxidanți.

Desigur ca antioxidanți preferați sunt cei naturali [115], iar dintre aceștia cei compatibili biologic cu organismul uman ocupă locul principal.

Astfel pentru sistemele uleioase se pot utiliza tocoferoli ( $\alpha$  – tocoferolul) iar pentru sisteme apoase sau emulsii acidul ascorbic sau sărurile acidului ascorbic [116]. Tocoferolii sunt stabilizatori de elecție pentru uleiuri vegetale și alte grăsimi [117].

Foarte eficiente sunt și esterii acizilor grași cu acid ascorbic [118]. Deoarece prețul unor astfel de produși este destul de ridicat, de multe ori se preferă utilizarea antioxidanților fenolici.

În cosmetică antioxidanții sunt utilizați pentru stabilizarea cremelor și emulsiilor conținând substanțe grase [119].

S-a constatat, de asemenea, că alfa-tocoferolul și ascorbații inhibă formarea nitro-aminelor cancerigene în produsele cosmetice [120].

Unele medicamente conținând ca substanțe active produse ușor oxidabile, sunt stabilizate cu antioxidanți.

De exemplu, soluțiile de ergosterol ( provitamina D2 ) și de dehidrocolesterol ( provitamina D3 ) devin stabile la lumină și aer prin adăugare de 0,02–0,05 % 2,6 di-t-butil-4-metilfenol și acid ascorbic [121].

Se mai stabilizează cu antioxidanți supozitoarele cu indometacin; prostaglandinele și numeroase alte preparate farmaceutice [122].

## I.6. Acțiunea biologică a antioxidanților

Oxigenul, pe lângă efectul benefic care l-a avut în evoluție, poate avea și un efect negativ la nivelul celular.

Formele active ale oxigenului și peroxizii se produc în organism în cantități mai mari decât necesare pentru aceste procese, excesul lor putând produce daune organismului care merg până la degradarea celulară [123].

Tocoferolii localizați în mitocondrii au un rol important în procesul de respirație, în special în cuplarea oxidărilor celulare cu procesul de fosforilare, astfel încât energia care rezultă din procesele de oxidare să fie captată și înmagazinată în compuși macroergici, preponderent în ADP și ATP.

Tocoferolii intervin în metabolismul aminoacizilor, acizilor grași nesaturați, a hidraților de carbon, acizilor nucleici și a altor substanțe.

Tocoferolii au capacitatea de a proteja sistemul mitocondrial, sediul reacțiilor ce au loc în procesul de respirație, de degradări oxidative ireversibile de către peroxizi lipidici și alți oxidanți puternici [11].

Acidul ascorbic are un rol fundamental în formarea și menținerea integrității matricei intercelulare.

Cellulele din țesuturi sunt incluse într-o substanță fundamentală vâscoasă (matricea intercelulară), formată predominant din glicoproteide, mucopoliglucide, glucozamine.

Această substanță vâscoasă, izolează celulele de mediul ambiant, prin care trec substanțele care intră și ies din celule.

Prin polimerizare și depolimerizare, masa vâscoasă influențează activitatea celulelor vii și invers.

Moleculele din masa vâscoasă (glicoprotide, proteogluani, glucozaminogluani etc.) se unesc și formează fibre tridimensionale de colagen, care reprezintă un adevărat mediu intern.

În compoziția acestor fibre se găsește acid hialuronic, condroitină, condroitin-sulfați. Depolimerizarea matricei necesită activitatea unor glucozidaze, proteaze, colagenaze care sunt controlate de vitamina C.

În carența de vitamină C scade formarea colagenului, transformarea prolinei în hidroxiprolină și formarea protocolagenului (peptidă), care prin procese de hidroxilare și polimerizare se transformă în colagen [11]. Alți antioxidanți biologici sunt hemoproteinele și mici antioxidanți enzimatici ca: superoxid-dismutaza (SOD), catalaza, glutationperoxidaza (GPx), glutationreductaza (GRed).

Acest rol important al antioxidanților permite utilizarea lor în terapia a numeroase boli, inclusiv inhibarea unor neoplasme și întârzierea bătrâneții [124].

**I.7. Date botanice despre plantele din genul Angiospermatophyta și Spermatophyta alese pentru obținerea extractelor cu efect antioxidant[125-129].**


**I.7.1. *Alchemilla vulgaris***

<b>Denumire</b>	
Denumire științifică: <b><i>ALCHEMILLA VULGARIS</i> L. emend. Frohner</b>	
Denumire populară: <b>Crețișoară</b>	
Sinonime științifice: <b>A. acutiloba Opiz, A. vulgaris L. subsp. acutangula (Buser) Palitz</b>	
Alte denumiri populare: <i>brumărie, creșărel, fâină de in, pălașcă, pleașcă, umbra muntelui, umbrarul doamnei</i>	
<b>Încadrare taxonomică</b>	
Regnul: <i>Plantae</i>	
Încrengătura: <i>Spermatophyta</i>	
Subîncrengătura: <i>Magnoliophytina</i>	
Clasa: <i>Magnoliopsida</i>	
Subclasa: <i>Rosidae</i>	
Ordinul: <i>Rosales</i>	
Familia: <i>Rosaceae</i>	
Subfamilia: <i>Rosoideae</i>	
<b>Caractere morfologice</b>	
Plantă erbacee, perenă, cu rizom brun; tulpina dreaptă sau culcată la pământ, de 20-50 cm înălțime; frunzele bazale dispuse în rozetă, lung pețiolate, palmat-lobate (9-11 lobi triunghiulari), frunzele tulpinale mai mici; florile mici, până la 3 mm diametru, galben-verzui; înflorirea: iunie-august; fructul este o achenă.	
<b>Ecologie și răspândire</b>	
Prin pășuni, fânețe, coaste abrupte, stâncării, mai rar la margini de pădure, în tufișuri, din etajul montan până în cel alpin; specie mezofită către mezohigrofită.	
<b>Organe utilizate</b>	
În scop medicinal se utilizează rădăcinile și frunzele acestei plante.	

<b>Compoziția chimică</b>
Organele aeriene conțin: cantități mici de glucide, lignine, acizi grași (acid palmitic și acid stearic, acid oleic), fenoli, fitosteroli, taninuri (6–8%) care prin hidroliză produc acid elagic și acid luteic, saponine, vitamine (rutină, acid nicotinic), pigmenți flavonoidici (luteolină, proantocianidine) și substanțe minerale. Rizomii acestei specii conțin: glucoză, fructoză, zaharoză, lipide (4,2 %), steroli ( $\beta$ -sitosterol), quercetină, acid galic, rutină, pirogalol, vitamina C, catechină, kamferol, compușii fenolici, și triterpene (alisol).
<b>Acțiune farmacologică</b>
Extractele obținute din frunzele acestei specii au acțiune astringentă, hemostatică, diuretică, depurativă, antidiareică și antihemoroidală.
<b>Importanța</b>
Medicinală
<b>Utilizare</b>
Decoctul din rădăcini se folosește pentru oprirea sângerării în caz de rănire iar ceaiul preparat din frunze reduce pierderile excesive de sânge în timpul menstruației. Medicină, umană, populară: <ul style="list-style-type: none"> <li>- uz intern - părțile aeriene ale plantei se folosesc pentru stimularea poftei de mâncare;</li> <li>- uz extern - tratarea laringitelor, stomatitelor și cicatrizarea rănilor;</li> </ul> Medicină veterinară <ul style="list-style-type: none"> <li>- uz intern - tratarea enteritelor, afecțiunilor renale.</li> </ul>




### I.7.2. *Allium ursinum*

Denumire	
Denumire științifică: <b><i>ALLIUM URSINUM</i></b>	
Denumire populară: <b>Leurdă</b>	
Alte denumiri populare: ai ciorâsc, ai de pădure, ai sălbatic, ainiți, afin, afin de iunie, leoardă, ceapa vrăjitoarelor.	
<b>Încadrare taxonomică</b>	
Regnul: <i>Plantae</i>	
Încrângătura: <i>Angiospermatophyta</i>	
Clasa: <i>Monocotyledonatae</i>	
Subclasa: <i>Liliidae</i>	
Ordinul: <i>Liliales</i>	
Familia: <i>Liliaceae</i>	
Subfamilia: <i>Allioideae</i>	
Genul: <i>Allium</i>	
<b>Caractere morfologice</b>	
Plantă de talie medie-mică, cu frunze cărnoase, de un verde puternic, cu flori mici și albe. Tulpinile și frunzele sale au un gust și miros puternic de usturoi, cu care de altfel este rudă din punct de vedere botanic.	
<b>Ecologie și răspândire</b>	
Leurda crește numai în pădurile din Europa Centrală, iar până în prezent nu a putut fi aclimatizată în nici o altă regiune. De asemenea nu a putut fi cultivată, fiind o specie eminentemente sălbatică, prezentă în pădurile de stejar, frasin sau fag. Crește pe câmpii bogate în humus și umede, în păduri de foioase și alpine.	
<b>Organe utilizate</b>	
În scop medicinal se utilizează frunzele și bulbiile acestei plante.	

<b>Compoziția chimică</b>
Uleiuri esențiale care conțin combinații sulfurate (sulfură de alil ), levuloză, vitamina C și complexul B, săruri minerale, flavonoide, substanțe antibiotice, oligoelemente, quercetină, acid galic, rutină, pirogalol, catechină, kamferol, compușii fenolici, antocianidine, taninuri.
<b>Acțiune farmacologică</b>
Antiseptic intestinal, bacteriostatic și bactericid; tonic, stimulent general și al organelor digestive; reglează metabolismul lipidelor și glucidelor; hipotensor, reechilibrant glandular; depurativ și diuretic; antiartritic; vermifug; febrifug; preventiv al cancerului etc.
<b>Importanța</b>
Medicinală
<b>Utilizare</b>
Sucul de leurdă ca și terciul sunt utilizate pentru tratare și vindecarea: negilor, rănilor deschise, eczemelor, tenurilor etc. Infuzia de leurdă este recomandată în tratamentul diabeticilor, cardiacilor și celor care au colesterolul ridicat. Tinctura de leurdă se administrează în cure de trei luni de zile pentru a trata trombozele și pentru combaterea inflamațiilor venelor și varicelor.


### I.7.3. *Acorus calamus*

<b>Denumire</b>	
Denumire științifică: <b>ACORUS CALAMUS L.</b>	
Denumire populară: <b>Obligeană</b>	
Sinonime științifice: <b>Acorus calamus L., var. americanus WULFF - americană (diploidă) ;</b>	
Alte denumiri populare: <i>Albigeană, Buciumaș, Calamar, Calamuz, Călin, Calm, Calmenă, Calmeșă, Calmusă, Calmuz, Călmează, Colm, Crin de apă, Paporotnec, Papură roșie, Speribană, speribană tărcată, Spetează, Spetează pestriță, Spetează tărcată, Spetejoară, Spiribană, Tartarachi, Trestie mirositoare</i>	
<b>Încadrare taxonomică</b>	
Regnul: <i>Plantae</i>	
Încrângătura: <i>Spermatophyta</i>	
Subîncrângătura: <i>Magnoliophytina</i>	
Clasa: <i>Liliopsida</i>	
Subclasa: <i>Arecidae</i>	
Ordinul: <i>Arales</i>	
Familia: <i>Acoraceae</i>	
<b>Caractere morfologice</b>	
Plantă perenă; rizom orizontal, gros, cărnos, lung până la un metru; tulpina erectă, 4-muchiata, de 60-120 cm; frunze liniare, de circa 2 cm lățime și peste 60 cm lungime; flori verzui sau verzui-gălbui, mici, grupate în spadice erect-patent de 5-10 cm lungime; înflorirea mai-iulie; fructul bacă roșie, alungită.	
<b>Ecologie și răspândire</b>	
Specie higrofită, subtermofită, introdusă în cultură și naturalizată; sporadică în zona pădurilor de stejar-subetajul gorunului și în Delta, pe malul apelor, mlaștini, stufărișuri.	
<b>Organe utilizate</b>	
Partea plantei cu importanță practică o reprezintă rizomii, care se recoltează în lunile septembrie–octombrie și care conțin uleiuri volatile cu compuși aromatici fenilpropanici.	

<b>Compoziția chimică</b>
<p>Diferă în funcție de chemotip (grad de poliploidie) și de organul plantei. Rizomi: uleiuri volatile (9 %) acumulate în celulele secretoare dispersate în parenchimul cortical, taninuri (3 – 4 %), heterozide amare (acorină = 0,6–1%), amidon, dextrine, mucilagii, colină, rezine, chinone (2,5-dimetoxichinonă).</p> <p>Uleiul volatil: <math>\beta</math>-azaronă=cis-izoazarona (constituent dominant), <math>\alpha</math>- și <math>\gamma</math>-azaronă, <math>\beta</math>-gurjune, acoronă (gust amar), ZZ-deca-4,7-dien-al.</p> <p>În funcție de chemovariatate constituentul dominant poate fi în cantitate de 80–96% în varietatea indiană, tetraploidă (unde este însoțită de cis-izoeugenol metileter) și de până la 13 % în varietatea europeană. Derivați monoterpenici: camfen, p-cimen (hidrocarburi), linalol, <math>\alpha</math>-terpinelol (alcooli), ZZ-deca-4,7-dien-al (aldehidă-imprimă miros). Derivați sescviterpenici: <math>\alpha</math>-selinen, <math>\beta</math>-gurjunen, <math>\delta</math>-cadinen, calamenen (hidrocarburi), <math>\alpha</math>-cadinol, calamendiol (alcool); șiobunone = shiobunone (artefacte provenite din acoragermacrona inițială - termolabilă și antrenabilă cu vapori de apă), acorenonă și calamenonă. (cetone), acoronă și izoacoronă (dicetone cu structură spiranică, volatile, amare).</p> <p>În concentrații de sub 1 % au fost identificați următorii componenți: <math>\alpha</math>-humulen, <math>\beta</math>-acoradien, metil izoeugenol, (E)-anetol, <math>\gamma</math>-gurjunen, 2, 6-di-epi-shiobunonă, limonen, elemol, (Z)-<math>\beta</math>-ocimen, <math>\alpha</math>-pinen, cedrol.</p> <p>În organele aeriene: acid ascorbic, mucilagii, rezine, saponine, tanin, sitosterol, acid oxalic, acid palmitic. Pigmenții din organele aeriene sunt reprezentați de: calcone. Uleiul volatil extras din organele aeriene conține: <math>\beta</math>-curcumen, acoragermacronă, <math>\alpha</math>-humulen, <math>\alpha</math>-terpinen, <math>\gamma</math>-terpinen, <math>\alpha</math>-terpineol, <math>\alpha</math>-ylangen, borneol, curcumen, borneol, <math>\gamma</math>-azaronă, <math>\gamma</math>-terpinen, izocalamendiol, metil-cavicol, metil-eugenol, mircen, ocimen, selinen și trans-anetol, calamusenonă, troponă, acoragermacronă, acorenonol, acid acoric, calconă, calamendiol, calamenonă, izocalamendiol, izocalamusenonă.</p>
<b>Acțiune farmacologică</b>
<p>Stomachică și carminativă (tonic-amar), antibacteriană, insecticidă, fungicidă–rizomii; antispasmodică=antispastică, antiinflamatoare (gastro-entero-renal), sedativă SNC (prin cis-izoazarona), antibacteriană, fungicidă, insecticidă, antiagregant-plachetară, revulsivă=vasodilatatoare–uleiul volatil. În aplicații externe–efect hiperemiant.</p>
<b>Importanța</b>
Medicinală
<b>Utilizare</b>
<p>Afecțiuni ORL (tonsilite = amigdalite, sinuzite), respiratorii (bronșite catarale – uleiuri volatile cu șiobunone), gastrointestinale (anorexie, gastrite, ulcere hipoacide, insuficiențe digestive hepatobiliare, enterocolite spastice, dispepsie – ulei cu azarone), reno-urinare (congestii renale după intoxicații, cistite – ulei cu azaronă), locomotorii (reumatism, gută), neurologice (nevralgii), dermice (micoze).</p> <p>Alte utilizări:</p> <p>Uleiurile volatile se utilizează și în industria parfumurilor, pentru aromatizarea lichiorurilor și a tutunului, precum și ca insecticid.</p> <p>În industrie se folosesc rizomii pentru fabricarea lichiorurilor, a unor parfumuri, medicamente (Ulcerotrat), apă de gură și paste de dinți.</p> <p>În medicină veterinară se folosește pentru tratarea anorexiei și ca stimulent gastric.</p>

<b>Toxicitate</b>
Datorită cetonelelor uleiurile volatile sunt neurotoxice și abortive.
<b>Contraindicații</b>
Sugari, copii, femei gravide, bolnavi de epilepsie.
<b>Precauții și reacții adverse</b>
Se va evita folosirea de lungă durată a uleiului volatil cu azaronă=cis-izoazonă (sortul indian conține 80 %), deoarece sunt posibile efecte mutagene și carcinogene (tumori duodenale observate pe șobolani tratați cu obligeană indiană, neclarificate suficient la om, tumori hepatice dezvoltate la șoareci), alterări cromozomiale. Din aceste motive FDA (Food Drugs Administration) a interzis prepararea și comercializarea produselor pe bază de obligeană în SUA. Ele sunt autorizate în Europa (limita maximă tolerată în beta-azonă este de 0,1 mg/kg de băutură alcoolică și de 1 mg/kg pentru aromatizarea biscuiților aperitiv).

#### I.7.4. *Solidago virga aurea*

Denumire	
Denumire științifică: <b>SOLIDAGO VIRGA AUREA L.</b>	
Denumire populară: <b>Splinuță</b>	
Sinonime științifice: -	
Alte denumiri populare: <i>Floare boierească, Floare buiacă, Mănunchi, Smeoaică, Splinariță, Vargă de aur</i>	
<b>Încadrare taxonomică</b>	
Regnul: <i>Plantae</i>	
Încrângătura: <i>Spermatophyta</i>	
Subîncrângătura: <i>Magnoliophytina</i>	
Clasa: <i>Magnoliopsida</i>	
Subclasa: <i>Asteridae</i>	
Ordinul: <i>Asterales</i>	
Familia: <i>Asteraceae (Compositae)</i>	
<b>Caractere morfologice</b>	
Plantă perenă, de 1m înălțime; frunzele lat-lanceolate, serate; flori galben-aurii dispuse în antodii pedunculat de 7-10mm lungime; înflorirea iulie-septembrie; fructul achenă cu papus de circa 5 mm.	
<b>Ecologie și răspândire</b>	
Specie mezofită, frecventă în zona pădurilor de stejar-etajul subalpin, margini de pădure, pajiști, tufărișuri.	
<b>Organe utilizate</b>	
În scop medicinal se utilizează planta cu flori. Dintre compușii activi se menționează glicozizii flavonici și acizii fenolici (acid cafeic, acid clorogenic).	
<b>Compoziția chimică</b>	
Principalii componenți identificați în această plantă sunt: uleiurile volatile, taninurile catechinice, saponinele și pigmentii flavonoizi (rutină, quercetină, quercetrină, kamferol-ramnozid, astragalina), esteri acetilenici (matricariaester). Lactone: solidagolactonă, Saponine: virgaureasaponin I și II, virgaureagenin, Diterpene: clerodan, virgaureozid A, leicocarpozid, Triterpene: bayogenin, Florile conțin următoarele substanțe: acid cafeic, acid clorogenic, acid hidroxicinamic, acid	

quinic, cianidin-3-glucozilglucozid și izoquercetină.
<b>Acțiune farmacologică</b>
<p>Extracțele obținute din frunze și flori au acțiune antihelmintică, antiinflamatoare, antiseptică, diuretică, febrifugă și stimulantă.</p> <p>Leicocarpozidul este diuretic, antiinflamator și analgezic.</p> <p>Virgaureasaponina E are acțiune imunostimulatoare și antitumorală.</p>
<b>Importanța</b>
Medicinală, tinctorială
<b>Utilizare</b>
<p>Se utilizează sub formă de tratamente interne în caz de infecții urinare, gripă, boli ale pielii și gastro - enterite.</p> <p>Extracțele cu etanol și metanol din planta <i>Solidago virga aurea</i> cât și din calus au manifestat activitate antimicrobiană. Extractul în apă-etanol are proprietăți antioxidante. Glicozidele monodesmozidice ca și cele bidesmozidice ale acidului poligalacic exercită efect fungicid.</p> <p>Medicină umană, populară: uz extern - cicatrizarea rănilor, atenuarea durerilor în nevralgii dentare.</p>

### I.7.5. *Agrimonia eupatoria*

Denumire	
Denumire științifică: <b>AGRIMONIA EUPATORIA L.</b>	
Denumire populară: <b>turiță mare</b>	
Sinonime științifice:	
Alte denumiri populare: <i>aspirșoară, boitoreană, buruiiană de friguri, canipoală, coada racului, cornățel, dumbravnică, gălbănare de germe, lipici, mățuță, scai mărunt, sora fragilor, turicioară</i>	
<b>Încadrare taxonomică</b>	
Regnul: <i>Plantae</i>	
Încrângătura: <i>Spermatophyta</i>	
Subîncrângătura: <i>Magnoliophytina</i>	
Clasa: <i>Magnoliopsida</i>	
Subclasa: <i>Rosidae</i>	
Ordinul: <i>Rosales</i>	
Familia: <i>Rosaceae</i>	
Subfamilia: <i>Rosoideae</i>	
<b>Caractere morfologice</b>	
Plantă perenă, rizom scurt, ± târâtor, simplu sau ramificat. Tulpina înaltă de (10) 30-100 cm, obtuz costată sau rotundă, ramificată spre vârf, moale păroasă, ± glanduloasă. Frunze toate tupinale, cu 5-9 foliole mari, sesile, eliptice până ovate sau rombice, ± rotunjite la bază, pe margini 6-13-incizi dințate pe fiecare parte, pe față închis verzi, dispers alipit păroase, pe dos deschis verzi, cenușiu pubescent până la tomentoase, cu ± glande sesile. Flori scurt pedicelate, petale galbene, obovate sau obcordate. Fructe nucule, cu receptacul la maturitate aplecat. Înflorire VI-VIII.	



<b>Ecologie și răspândire</b>
Sporadică din zona de stepă până în etajul fagului, margini și rariști de pădure, tufișuri, locuri ruderaie pe soluri afânate; specie mezofită-xeromezofită, heliofilă către heliosciadofilă.
<b>Organe utilizate</b>
Organele plantei utilizate în scop medicinal sunt florile și frunzele recoltate în lunile iunie – august.
<b>Compoziția chimică</b>
Principalii componenți chimici identificați în frunze sunt: uleiurile volatile, tanin (5–8%), taninuri hidrolizabile (agrimonin, agrimoniină, oenoteină B), catechine (2,6%), cumarine, $\alpha$ -pirone (agrimonolid), gome, vitamine (tiamină), triterpene (1,5%), acizi grași (acid palmitic, acid stearic) și triterpene (acid ursolic-0,6%). Frunzele conțin pigmenți flavonoizi: apigenin-glucozid, luteolin-glucozid, quercitrină, izoquercetin, izoquercitrin, quercetin-glucozid. Pe ambele suprafețe ale frunzelor, dar mai ales pe cea inferioară, se găsesc peri secretori scuri, cu glanda uni sau pluricelulară. Scoarța de pe tulpinile acestei plante conține: poliglucide, flobafene, diterpene (acetilamarolid, allantoină, amarolid, quassiin, shinjulactonă A) și saponine.
<b>Acțiune farmacologică</b>
Extractele obținute din această plantă au efect astringent, colagog, diuretic-depurativ cu eliminare masivă de urați, hepatic, tonic-amar și vulnerar.
<b>Importanța</b>
Medicinală
<b>Utilizare</b>
Extractele se utilizează în tratarea icterului și a afecțiunilor hepatice, pentru tratarea diareii și a hemoroizilor. În rădăcinile acestei specii s-a identificat trei derivați ai catechinei care au activitate antibacterială.

### I.7.6. *Viscum album*

Denumire	
Denumire științifică: <i>VISCUM ALBUM L.</i>	
Denumire populară: <b>Vâsc</b>	
Sinonime științifice:	
Alte denumiri populare: <i>Vâsc, Vâsc de păr, Vâsc de brad</i>	
<b>Încadrare taxonomică</b>	
Regnul: <i>Plantae</i>	
Încrângătura: <i>Spermatophyta</i>	
Subîncrângătura: <i>Magnoliophytina</i>	
Clasa: <i>Magnoliopsida</i>	
Subclasa:	
Ordinul: <i>Santalales</i>	
Familia: <i>Loranthaceae</i>	
<b>Caractere morfologice</b>	
Arbust mic, semiparazit pe ramuri, erect sau pendul cu haustori puternici; tulpina ramificată, scurtă, glabră, galben-cenușie sau galben-verzuie cu internodii îngroșate la bază; frunze simple, opuse, galben-verzui, groase, pielose, alungit-ovate, liniare sau lanceolate, cu marginea întregă, persistente; flori mici, dioice; fructul – bacă albă-gălbuie.	
<b>Ecologie și răspândire</b>	
Specie întâlnită pe arbori foioși din clasa Magnoliopsida ( <i>Populus</i> , <i>Salix</i> , <i>Carpinus</i> , <i>Betula</i> , <i>Alnus</i> , <i>Fagus</i> , <i>Quercus</i> , <i>Ulmus</i> , <i>Pyrus</i> , <i>Malus</i> , <i>Sorbus</i> , <i>Cerasus</i> , <i>Prunus</i> , <i>Robinia</i> , <i>Acer</i> , <i>Aesculus</i> , <i>Rhamnus</i> , <i>Tilia</i> , <i>Fraxinus</i> ).	
<b>Organe utilizate</b>	
Se utilizează rămurelele cu frunze, recoltate înainte de formarea fructelor.	
<b>Compoziția chimică</b>	
Frunzele de vâsc conțin ca principiu activ glicozizi ai hidrochinonei așa cum este arbutozida și derivații acesteia: pirozida, cafeoil-2-arbutozida, vacciniina etc. În frunze s-au mai identificat: glucide, hidrochinonă, saponozide sterolice (acid ursolic), glicozizi fenolici (arbutină). Acizi fenolici: acid galic, acid chinic, acid cafeic și glucozizi fenolici: 2-O-cafeoil-	

arbutină.  
Catechine: epicatechină, galocatechine.  
Pigmenți: izoquercitrină, hiperozidă, beta-caroten, quercetină, avicularină.  
Principalii componenți identificați în țesuturile acestei plante sunt: proteine (11,9 %), lipide (2,3%), aminoacizi, rezine, saponine, terpen, alcaloizi, glicozizi și glicoproteine (lectine), acid gentisic (acid 2,5-dihidroxibenzen, lignine (syrinagresinol).  
Acizi fenolici: acid cafeic, siringic, vanilic, sinapic, ferulic shikimic, protocatehic.  
Amine: colină, acetilcolină, histamină, tiramină.  
Pigmenți: quercetol, quercetin-3-arabinozid, quercetin 3-ramnozid, luteină, alfa-caroten și xantofilă.  
Triterpene: acid betulinic, betulină, alfa- și beta-amirină.  
Derivați lignanici: siringină, siringozidă, sirinarezinol, siringarezinol-mono-O-glucozid, siringenin-4'-O-glucozid, viscină, viscotoxină, și eleuterozidă.  
Rezinele conțin: alcool cerilic, lupeol, acid oleanolic și beta-amirină.

### **Acțiune farmacologică**

Extractele au proprietăți antispasmodice, diuretice, narcotice, tonice, citostatice și hipotensive de lungă durată, determinată de o vasodilatație.

### **Importanța**

Medicinală

### **Utilizare**

Extractele sunt utilizate pentru tratarea arteriosclerozei, hipertensiunii, leucorei, menopauzei, albuminuriei și a edemelor. Prezența viscotoxinei conferă extractelor și o acțiune anticancerigenă.


Se folosesc sub formă de macerate la rece și infuzii.

Extractul în metanol din *Viscum album*, crescut într-un lămâi și recoltat vara, are un potențial antioxidant ridicat, demonstrat prin efectul inhibitor pe care îl manifestă asupra lipid-peroxidazei.

Alte utilizări:

Medicina umană (populară): frunzele - ceai pentru astm, tuberculoză, emfizem pulmonar; în amestec cu alte specii—contra hipertensiunii; frunzele, fructele – în băi de tratare a reumatismului.

### I.7.7. *Veronica officinalis*

Denumire	
Denumire științifică: <b>VERONICA OFFICINALIS</b>	
Denumire populară: <b>Ventricică</b>	
Alte denumiri populare: <i>buruiană de perit, buruiană de cel perit, mătrice, ventricea, vindrilică, leacul tuturor relelor.</i>	
<b>Încadrare taxonomică</b>	
Regnul: <i>Plantae</i>	
Încrângătura: <i>Angiospermatophyta</i>	
Clasa: <i>Dicotyledonatae</i>	
Subclasa: <i>Asteridae</i>	
Ordinul: <i>Scrophulariales</i>	
Familia: <i>Scrophulariaceae</i>	
Genul: <i>Nicotiana</i>	
<b>Caractere morfologice</b>	
Plantă cu tulpină păroasă, care se târăște pe pământ, frunze mici zimțate, cu un luciu argintiu, care se termină în spice ce stau în sus având flori de la albastru deschis până la violet. Frunzele cad ușor la atingere. Ea atinge înălțimi de 20-30 cm și are frunze ovale cu zimți mici pe margini.	
<b>Ecologie și răspândire</b>	
Prin păduri, pe locuri defrișate, lângă mărăcinișuri, tufișuri, garduri și șanțuri, pe drumuri și în liziere.	
<b>Organe utilizate</b>	
În scop medicinal se utilizează partea aeriană a acestei plante.	
<b>Compoziția chimică</b>	
Glicozide de tip aucubinic, saponozide, uleiuri eterice, vitamina C, flavonoide, acid vanilic, quercetină, acid galic, rutină, pirogalol, catechină, kamferol, compușii fenolici, antocianidine, taninuri.	
<b>Acțiune farmacologică</b>	
Stomahic, hipocolesterolmiant, colagog, astringent, hemostatic, diuretic-depurativ, cicatrizant.	

<b>Importanța</b>
Medicinală
<b>Utilizare</b>
Sucul proaspăt extras din plantă atunci când ea înflorește este indicat în vindecarea eczemelor, al afecțiunilor pielii și reprezintă un depurator al sângelui. Ceaiul de ventricică tratează: răceli, bronșite, laringite, faringite, amigdalite, răgușeală, afecțiuni ale ficatului, reumatism, afecțiuni de stomac, micșorarea colesterolului și a glicemiei din sânge.

## PARTEA A-II-A. CONTRIBUȚII PROPRII

### II.1. Specificații plante uscate din genul Angiospermatophyta și Spermatophyta

Înainte de a fi puse la uscat, plantele au fost selectate și condiționate, înlăturându-se impuritățile și părțile din plantă care nu sunt utile, părțile din plantă brunificate sau îngălbenite, mucegăite, atacate de dăunători, precum și corpurile organice și minerale, astfel încât, după această operațiune de selectare și condiționare, plantele să rămână curate.

În tabelul 8 sunt date specificațiile pentru plantele din genul Angiospermatophyta și Spermatophyta – sursa Fares S. A. Orăștie.

Tabel 8. Specificații plante uscate - Fares. S. A. Orăștie

Denumire plantă/latină specie	Caracteristici morfologice	Impurități [%]	Corpuri străine [%]	Pierdere prin uscare [%]	Identificare	Dozare [%]
0	1	2	3	4	5	6
Frunze de vâsc/ <i>Viscum album l.</i>	Ramuri tinere cu diametru de max. 5mm, acoperite cu frunze invers ovate, dispuse opus, piloase, cu marginile întregi de culoare verde intens, cu miros slab amar, acrișor.	- ramuri cu diametru >5mm, max. 1 - frunze și ramuri brunificate, max. 2 - fructificații, max. 3	- organice, max. 0,5 - minerale, max. 0,5	- max. 14	- flavone și acizi polifenolcarboxilici	substanțe solubile, min. 15
Iarbă de crețșoară/ <i>Alchemilla vulgaris l.</i>	Tulpini cu frunze palmatolombate, dispuse în rozetă, lung pețiolate cu 7-9 lobi dințați pe margini de culoare albastru-verzuie	- părți deco-lorate/ligni-ficate, max. 5	- organice, max. 1 - minerale, max. 1	- max. 13	-	taninuri, min. 6
Iarbă de splinuță/ <i>Solidago virga aurea l.</i>	Părțile aeriene înflorate, cu frunze dispuse alterne de culoare verde dințate pe margini, cu inflorescențe având ramurile îndreptate în sus; flori de culoare galbene cu aspect albicios din cauza perilor caliciului, fără miros cu gust slab astringent	- plante brunificate/decolorate, max. 3	- organice, max. 1 - minerale, max. 1	- max. 13	-	-
Iarbă de turița mare/ <i>Agrimonia eupatoria l.</i>	Tulpini de maxim 4mm diametru, cu frunze de culoare verde, flori de culoare galbenă și fructe mature verzi; întreaga plantă este acoperită cu peri; miros slab caracteristic, gust amărui, astringent.	- tulpini cu diametru >4mm, max. 3 - fructificații îngălbenite (mature), max. 5 - plante brunificate/decolorate, max. 1	- organice, max. 1 - minerale, max. 1	- max. 13	-	taninuri, min. 2

0	1	2	3	4	5	6
Iarbă de ventrilică/ <i>Veronica officinalis l.</i>	Plante ierbacee, perenă cu tulpină lungă de 2-45cm, culcată la pământ, având vârfurile sau chiar jumătatea superioară a tulpinii îndreptată în sus (fără rădăcini); frunze înguste cu pețiol scurt, cu marginile serat-dințate. Florile albastre-deschis, liliachii, albe-roz, rar albe.	- plante decolorate/ brunificate, max. 5	- organice, max. 1 - minerale, max. 1	- max. 13	-	-
Rădăcină de obligeană/ <i>Acorus calamus l.</i>	Rizomi nedecișiți, de culoare brună-deschisă la exterior și albă-roz cu nuanțe gălbui la interior, lungi de max. 10-15cm, pe partea inferioară prezintă urmele rădăcinilor de forma unor inele, iar pe partea superioară cicatrice triunghiulare, urmele tulpinilor de anii trecuți; miros plăcut, aromat, gust aromat, amar.	- rizomi cu diametru <1cm nu se admit - resturi de tulpini și rădăcini, max. 5 - rizomi brunificați la interior, max. 5	- organice, max. 1 - minerale, max. 2	- max. 14	- uleiul volatil, prin cromatografie în stat subțire.	-

Leurda nu este produs comercial Fares S.A. Orăștie.

## II.2. Obținerea extractelor vegetale cu efect antioxidant

### II.2.1. Aspecte generale

Plantele uscate din genul Angiospermatophyta și Spermatophyta care au fost cercetate sunt achiziționate de la Fares S.A. Orăștie, Tricolorul S.A. Cluj-Napoca și S.C. STEF-MAR S.R.L.-Vâlcea.

Parametrii operaționali, respectiv gradul de mărunțire al plantelor, raportul plantă/solvent, tipul de extracție și timpul de extracție au fost identici, singura diferență a fost tipul de solvent și materialul vegetal utilizat.

Obținerea extractelor vegetale apoase (macerate) și alcoolice (tincturi) s-a realizat prin procedeul clasic: extracție solid-lichid la temperatura camerei la timpi diferiți.

La prepararea soluțiilor extractive se folosesc diferite tipuri de solvenți, de diferite concentrații, în diferite amestecuri. În scopul realizării unei extracții optime, solventul trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- să fie chimic pur, netoxic, neinflamabil;
- să fie omogen (în cazul amestecurilor de solvenți) ;
- să aibă capacitate mare de îmbibare a materialului vegetal, pentru a favoriza fenomenele de osmoză-difuziune, precum și capacitate mare de dizolvare și de extracție a principiilor active;
- să nu fie coroziv, să fie stabil, neutru, recuperabil și ușor de îndepărtat prin evaporare;

- să aibă o temperatură de fierbere cât mai scăzută și o căldură de vaporizare cât mai mică, pentru a se consuma o cantitate mică de căldură la recuperare;

Alegerea solventului și a concentrației acestuia se realizează ținând seama de substanțele care urmează a fi extrase, precum și de substanțele inerte care nu trebuie antrenate în soluție.

Extractele apoase din produsele vegetale cercetate s-au realizat în apă bidistilată.

Apa este un solvent polar foarte activ, îndeosebi față de majoritatea substanțelor anorganice și o serie de compuși ca: zaharuri, acizi, alcooli, fenoli, esteri, amine și săruri de alcaolizi. În general, extracția cu apă este inferioară extracției cu alcool de diferite concentrații.

Soluțiile extractive apoase sunt instabile și din această cauză au fost analizate imediat după preparare.

Tincturile sunt preparate lichide, sub formă de soluții alcoolice, obținute prin extracția produselor vegetale.

Spre deosebire de extractele apoase, extractele alcoolice au o concentrație mare de principii active, fiind mult mai stabile în timp. Pentru obținerea extractelor alcoolice, produsele vegetale trebuie să fie uscate, iar mărunțirea se face la fel ca și pentru extractele apoase.

În vederea realizării extractelor alcoolice am utilizat alcool metilic și etilic, cu o mare capacitate de extracție, în diferite concentrații: 96%, 80% și 60% (v/v).

În scopul extracției și a altor principii dar și pentru evidențierea complexității compoziției materialelor vegetale studiate, s-au efectuat și extracte diclorometanice.

Conținutul de principii active din extractele vegetale a fost determinat prin metode spectrofotometrice, iar pentru unele extracte prin cromatografia de lichide de înaltă performanță.

Extracția principiilor active din materialul vegetal nu se efectuează după o metodă standardizată, ne-existând nici un solvent comun, cei mai compatibili solvenți pentru extracția principiilor active sunt alcoolul etilic, apa, metanolul, acetona și diclorometanul.

## II.2.2. Extracte apoase

Macerarea la rece cu ajutorul apei constă în tratarea materialului vegetal cu cantitatea de apă prescrisă, folosind apă proaspăt fiartă și răcită.

Materialul vegetal uscat mărunțit în prealabil a fost supus extracției statice (macerare) cu apă timp de 48 ore la temperatura de 17°C în raport molar, material vegetal: solvent = 1:10, folosind același solvent, timp și temperatură, dar material vegetal diferit [130].

Soluția extractivă a fost filtrată prin patru straturi de tifon, reziduul s-a spălat cu apă proaspăt fiartă și răcită și s-a completat până la volumul de 10 mL.

Rezultatele obținute arată că folosirea unui timp de extracție de 48 de ore și o temperatură de 17°C asigură o separare practic totală a principiilor active din materialul vegetal cercetat. Principiile active extrase au fost dozate prin cromatografie de lichide de înaltă performanță.



Tabel 9. Condițiile experimentale pentru obținerea extractelor apoase

Material vegetal Denumire plantă/Specie	Solvent de extracție	Timp de extracție [ore]	Temperatura de extracție [ °C ]	Principiile active extrase [ mg/mL ]
Crețișoară ( <i>Alchemilla vulgaris</i> )	Apa	48	17	0.1492 Quercetină
Leurdă ( <i>Allium ursinum</i> )	Apa	48	17	0.0507 Kamferol
Obligeană ( <i>Acorus calamus</i> )	Apa	48	17	0.0020 Quercetină
Splinuță ( <i>Solidago virga aurea</i> )	Apa	48	17	0.1755 Quercetină
Turița Mare ( <i>Agrimonia eupatoria</i> )	Apa	48	17	0.0104 Kamferol
Ventrilică ( <i>Veronica officinalis</i> )	Apa	48	17	0.0209 Kamferol
Vâscul ( <i>Viscum album</i> )	Apa	48	17	0.0079 Rutină

### II.2.3. Extracte diclormetanice

Materialul vegetal uscat mărunțit în prealabil a fost supus extracției statice (macerare) timp de 70 de ore la temperatura camerei, fiind păstrat la întuneric, în raport material vegetal: diclormetan 1:10.

Maceratele diclormetanice obținute au fost filtrate prin membrane filtrante, după care au fost analizate calitativ.

Metoda de extracție aplicată a fost unitară, parametrii operaționali respectiv gradul de mărunțire al plantei, solventul utilizat, raportul plantă/solvent, temperatura de extracție și tipul de extracție, au fost identici, singura diferență fiind determinată de materialul vegetal cercetat.

### II.2.4. Extracte hidroalcoolice

#### II.2.4.1. Obținerea extractelor prin extracție statică

Tincturile sub aspectul modului de administrare, prezintă unele avantaje față de soluțiile extractive apoase prin aceea că extracția în mediul hidroalcoolic este completă, conservabilitatea de lungă durată, iar administrarea sub formă de picături mai simplă. Materialul vegetal uscat mărunțit în prealabil a fost supus extracției statice (macerare) cu alcool (metanol, etanol) timp de 10 zile la temperatura camerei, fiind păstrat la întuneric, în raport material vegetal: alcool 5:50 [130].

În vederea stabilirii condițiilor optime de obținere a unor extracte vegetale cu conținut cât mai ridicat în principii active s-a lucrat în diferite condiții de extracție.

Soluțiile extractive obținute au fost filtrate prin patru straturi de tifon, reziduuul s-a spălat cu solvent (metanol, etanol) și s-a completat până la volumul de 50 mL.

Tincturile obținute au fost stocate la temperaturi diferite, la întuneric (pentru a se evita degradarea substanțelor instabile la lumină).

Datele experimentale privind extracția simplă la timpi diferiți a substanțelor cu efect antioxidant din materialul vegetal cercetat sunt prezentate în tabelele 10-14. Principiile active extrase au fost dozate prin cromatografie de lichide de înaltă performanță.

Tabel 10. Condițiile experimentale pentru obținerea extractelor metanolice 96 %

Denumire plantă/Specie	Solvent de extracție	Timp de extracție [zile]	Temperatura de extracție [ °C ]	Principiile active extrase [ mg/mL ]
Crețișoară ( <i>Alchemilla vulgaris</i> )	Alcool metilic 96%	10	20-22	0.0132 Quercetină
Leurdă ( <i>Allium ursinum</i> )	Alcool metilic 96%	10	20-22	0.0029 Kamferol
Obligeană ( <i>Acorus calamus</i> )	Alcool metilic 96%	10	20-22	0.0055 Acid galic
Splinuță ( <i>Solidago virga aurea</i> )	Alcool metilic 96%	10	20-22	0.0143 Miricetină
Turița Mare ( <i>Agrimonia eupatoria</i> )	Alcool metilic 96%	10	20-22	0.0038 Quercetină
Ventricică ( <i>Veronica officinalis</i> )	Alcool metilic 96%	10	20-22	0.0011 Acid galic
Vâscul ( <i>Viscum album</i> )	Alcool metilic 96%	10	20-22	0.0066 Rutină

Tabel 11. Condițiile experimentale pentru obținerea extractelor metanolice 80 %

Material vegetal Denumire plantă/Specie	Solvent de extracție	Timp de extracție [zile]	Temperatura de extracție [ °C ]	Principiile active extrase [ mg/mL ]
Crețișoară ( <i>Alchemilla vulgaris</i> )	Alcool metilic 80%	10	20-22	0.0033 Quercetină
Leurdă ( <i>Allium ursinum</i> )	Alcool metilic 80%	10	20-22	0.0019 Kamferol
Obligeană ( <i>Acorus calamus</i> )	Alcool metilic 80%	10	20-22	0.0020 Acid galic
Splinuță ( <i>Solidago virga aurea</i> )	Alcool metilic 80%	10	20-22	0.0099 Miricetină
Turița Mare ( <i>Agrimonia eupatoria</i> )	Alcool metilic 80%	10	20-22	0.0010 Quercetină
Ventricică ( <i>Veronica officinalis</i> )	Alcool metilic 80%	10	20-22	0.0184 Acid galic
Vâscul ( <i>Viscum album</i> )	Alcool metilic 80%	10	20-22	0.0024 Quercetină

Tabel 12. Condițiile experimentale pentru obținerea extractelor etanolice 96 %

Material vegetal Denumire plantă/Specie	Solvent de extracție	Timp de extracție [zile]	Temperatura de extracție [ °C ]	Principiile active extrase [ mg/mL ]
Crețișoară ( <i>Alchemilla vulgaris</i> )	Alcool etic 96%	10	20-22	0.1386 Rutină
Leurdă ( <i>Allium ursinum</i> )	Alcool etic 96%	10	20-22	0.0020 Kamferol
Obligeană ( <i>Acorus calamus</i> )	Alcool etic 96%	10	20-22	0.0132 Rutină
Splinuță ( <i>Solidago virga aurea</i> )	Alcool etic 96%	10	20-22	0.0382 Quercetină
Turița Mare ( <i>Agrimonia eupatoria</i> )	Alcool etic 96%	10	20-22	0.0182 Acid galic
Ventricică ( <i>Veronica officinalis</i> )	Alcool etic 96%	10	20-22	0.0637 Rutină
Vâscul ( <i>Viscum album</i> )	Alcool etic 96%	10	20-22	0.0044 Acid galic

Tabel 13. Condițiile experimentale pentru obținerea extractelor metanolice folosind  
timp de extracție diferiți

Material vegetal Denumire plantă/Specie	Solvent de extracție	Timp de extracție [ore]	Temperatura de extracție [ °C ]	Principiile active extrase [ mg/mL ]
Crețișoară ( <i>Alchemilla vulgaris</i> )	Alcool metilic 96%	120	4	0.0672 Quercetină
Leurdă ( <i>Allium ursinum</i> )	Alcool metilic 96%	120	4	0.0148 Kamferol
Obligeană ( <i>Acorus calamus</i> )	Alcool metilic 96%	120	4	0.0729 Acid galic
Splinuță ( <i>Solidago virga aurea</i> )	Alcool metilic 96%	100	4	0.0432 Miricetină
Turița Mare ( <i>Agrimonia eupatoria</i> )	Alcool metilic 96%	100	4	0.0127 Quercetină
Ventricică ( <i>Veronica officinalis</i> )	Alcool metilic 96%	100	4	0.0096 Quercetină
Vâscul ( <i>Viscum album</i> )	Alcool metilic 96%	100	4	0.0327 Rutină

Tabel 14. Condițiile experimentale pentru obținerea extractelor etanolice folosind timpi de extracție diferiți

Material vegetal Denumire plantă/Specie	Solvent de extracție	Timp de extracție [ore]	Temperatura de extracție [ °C ]	Principiile active extrase [ mg/mL ]
Crețisoară ( <i>Alchemilla vulgaris</i> )	Alcool etic 96%	120	4	0.0125 Quercetină
Leurdă ( <i>Allium ursinum</i> )	Alcool etic 96%	120	4	0.0142 Kamferol
Obligeană ( <i>Acorus calamus</i> )	Alcool etic 96%	120	4	0.0219 Acid galic
Splinuță ( <i>Solidago virga aurea</i> )	Alcool etic 96%	100	4	0.0296 Miricetină
Turița Mare ( <i>Agrimonia eupatoria</i> )	Alcool etic 96%	100	4	0.0058 Quercetina
Ventricică ( <i>Veronica officinalis</i> )	Alcool etic 96%	100	4	0.0045 Quercetină
Vâscul ( <i>Viscum album</i> )	Alcool etic 96%	100	4	0.0047 Kamferol

În cazul extractelor hidroalcoolice din genul Angiospermatophyta și Spermatophyta, randamentele cele mai bune se obțin folosind alcoolul metilic 96%, iar condițiile optime pentru extracție sunt temperatura de lucru de 4 °C și timpul de extracție de 100-120 ore.

Ca urmare a rezultatelor obținute s-a putut evidenția faptul că alcoolul metilic 96% este solvenul cu randamentul cel mai bun dintre cei doi alcooli pentru extragerea principiilor active.

#### II.2.4.2. Obținerea extractelor prin metoda Soxhlet

Procedeul Soxhlet se bazează pe principul unei extracții periodice continue.

Obținerea extractelor hidroalcoolice din speciile vegetale precizate mai sus, s-a realizat prin metoda extracției solid-lichid, într-o instalație Soxhlet, conform procedurii descris în [130].

Metoda de extracție aplicată a fost unitară, parametrii operaționali, respectiv gradul de mărunțire al plantei, solvenul utilizat, raportul plantă/solvent, temperatura de extracție și tipul de extracție au fost identici, singura diferență fiind determinată de materialul vegetal cercetat.

S-au obținut extracte hidroalcoolice cu aspect limpede având culoare specifică între galben-verde. Principiile active extrase au fost dozate prin cromatografie de lichide de înaltă performanță.

- E<sub>1</sub> – extract metanolic de *Alchemilla vulgaris* - crețișoară;  
 E<sub>2</sub> – extract metanolic de *Allium ursinum* - leurdă;  
 E<sub>3</sub> – extract metanolic de *Acorus calamus* - obligeană;  
 E<sub>4</sub> – extract metanolic de *Solidago virga aurea* - splinuță;  
 E<sub>5</sub> – extract metanolic de *Agrimonia eupatoria* - turița mare;  
 E<sub>6</sub> – extract metanolic de *Veronica officinalis* - ventrilică;  
 E<sub>7</sub> – extract metanolic de *Viscum album* - vâsc;

Tabel 15. Conținutul de quercetină, rutină și kamferol al extractelor hidrometanolice de plante din genul Angiospermatophyta și Spermatophyta

EXTRACT VEGETAL	FLAVONOIDE		
	Kamferol [mg/mL]	Quercetină [mg/mL]	Rutină [mg/mL]
E <sub>1</sub> (96%)	1.9x10 <sup>-3</sup>	13.2x10 <sup>-3</sup>	4.4x10 <sup>-2</sup>
E <sub>1</sub> (80%)	1.2x10 <sup>-3</sup>	3.3x10 <sup>-3</sup>	3.2x10 <sup>-2</sup>
E <sub>2</sub> (96%)	2.9x10 <sup>-3</sup>	1.0x10 <sup>-3</sup>	6.8x10 <sup>-2</sup>
E <sub>2</sub> (80%)	1.9x10 <sup>-3</sup>	1.3x10 <sup>-3</sup>	3.8x10 <sup>-2</sup>
E <sub>3</sub> (96%)	—	1.7x10 <sup>-3</sup>	—
E <sub>3</sub> (80%)	—	1.4x10 <sup>-3</sup>	—
E <sub>4</sub> (96%)	1.9x10 <sup>-3</sup>	7.1x10 <sup>-2</sup>	9.5x10 <sup>-2</sup>
E <sub>4</sub> (80%)	1.3x10 <sup>-3</sup>	4.6x10 <sup>-3</sup>	6.6x10 <sup>-2</sup>
E <sub>5</sub> (96%)	2.7x10 <sup>-3</sup>	3.8x10 <sup>-3</sup>	2.2x10 <sup>-2</sup>
E <sub>5</sub> (80%)	2.2x10 <sup>-3</sup>	1.0x10 <sup>-3</sup>	—
E <sub>6</sub> (96%)	2.2x10 <sup>-3</sup>	1.5x10 <sup>-3</sup>	4.7x10 <sup>-3</sup>
E <sub>6</sub> (80%)	—	5.0x10 <sup>-3</sup>	6.6x10 <sup>-3</sup>
E <sub>7</sub> (96%)	2.4x10 <sup>-3</sup>	2.4x10 <sup>-3</sup>	—
E <sub>7</sub> (80%)	—	—	—

E<sub>1</sub> (96%) ,....., E<sub>7</sub> (96%) – extracte metanolice (metanol 96%) ;  
 E<sub>1</sub> (80%) ,....., E<sub>7</sub> (80%) – extracte metanolice (metanol 80%) ;

Conform rezultatelor obținute, se poate constata și o influență a compoziției amestecului de extracție (raportul metanol:apă) asupra conținutului în flavonoide ale sistemelor hidroalcoolice analizate.

Creșterea procentului de metanol de la 80% la 96% a determinat în toate cazurile o îmbunătățire a procesului de extracție a flavonoidelor din materialul vegetal.

Un comportament asemănător a fost întâlnit și în cazul în care sistemul hidroalcoolic de extracție a conținut etanol și apă.

În ceea ce privește rutina, se poate constata că față de celelalte două flavonoide ea se găsește, în extractele hidrometanolice în care a putut fi identificată, în cantitatea cea mai mare.

Cea mai răspândită flavonoidă a fost însă quercetina, identificată în toate extractele indiferent de conținutul de alcool, cu excepția celui de vâsc metanol 80%, care nu a conținut nici una dintre cele trei flavonoide urmărite.

Kamferolul nu a fost găsit în extractele de *Acorus calamus* și în cel de *Veronica officinalis* metanol 80% iar rutina în cele de *Agrimonia eupatoria*, *Acorus calamus* metanol 80% și *Viscum album* metanol 96%.

Cu toate că datele din tabelul 15 sugerează o dependență între conținutul în flavonoide al extractelor și compoziția sistemelor hidroalcoolice folosite respectiv natura materialului vegetal din care provin, totuși aceste valori nu trebuie să fie considerate ca absolute, întrucât conținutul în flavonoide al plantelor poate fi influențat de mai mulți factori cum ar fi: clima, solul, perioada de recoltare, temperatura de extracție, timpul de depozitare a materialului vegetal etc.

Rezultatele experimentale obținute din analiza cromatografică au fost într-o bună concordanță cu cele obținute folosind **metoda etalonului extern** de regăsire a unor cantități cunoscute de flavonoide pure.

#### II.2.4.3. Obținerea extractelor în condiții dinamice

Extracția în condiții dinamice permite de a obține extractul concentrat, prin adăugarea repetată a porțiunilor mici de extractant, evitând operații suplimentare de decantare și de filtrare.

Procedeul original de extracție elaborat este asemănător cu procedeele industriale de extracție continuă (în contracurent), spre deosebire de procedeul clasic de laborator, când extracția se efectuează în condiții statice sau cvasi dinamice.

Extracția materiei prime s-a realizat în pâlnii de separare (200 mL), fixate vertical, prevăzute cu robinete fine de reglare a vitezei de scurgere.

Orificiul de scurgere a pâlniei se acoperă cu un tampon din 4 straturi de tifon, care va reține materia primă în pâlnie și va asigura filtrarea rapidă și eficientă a extractelor.

În pâlnie s-a introdus materialul vegetal, nu mai mult de  $\frac{3}{4}$  din volumul ei. După scurgerea liberă a filtratului, reziduul se macerează cu porțiuni mici de solvent de extracție (12 ore).

După macerare, materialul vegetal se presează cu un piston din furtun de silicon, iar extractul se scurge în recipient.

Materialul vegetal se afânează și se macerează cu noi porțiuni de extract.

Se efectuează 5 tranșe de extracție. Extractantul poate fi adăugat și în mod continuu, reglând viteza de scurgere a extractului cu robinetul pâlniei.

Rezultatele experimentale privind extracția în condiții dinamice sunt prezentate în tabelul 16.

Tabel 16. Condițiile experimentale pentru obținerea extractelor în condiții dinamice

Material vegetal Denumire plantă/Specie	Solvent de extracție	Timp de extracție [ore]	Temperatura de extracție [ °C ]	Principiile active extrase [ mg/mL ]
Crețișoară ( <i>Alchemilla vulgaris</i> )	Alcool etic 96%	12	20-22	0.0215 Quercetină
Leurdă ( <i>Allium ursinum</i> )	Alcool etic 96%	12	20-22	0.0197 Kamferol
Obligeană ( <i>Acorus calamus</i> )	Alcool etic 96%	12	20-22	0.0089 Acid galic
Splinuță ( <i>Solidago virga aurea</i> )	Alcool etic 96%	12	20-22	0.0720 Miricetină
Turița Mare ( <i>Agrimonia eupatoria</i> )	Alcool etic 96%	12	20-22	0.0135 Kamferol
Ventricică ( <i>Veronica officinalis</i> )	Alcool etic 96%	12	20-22	0.0302 Quercetină
Vâscul ( <i>Viscum album</i> )	Alcool etic 96%	12	20-22	0.0214 Acid galic

#### II.2.4.4. Obținerea extractelor prin extracție cu ultrasunete

Materialul vegetal uscat mărunțit în prealabil a fost supus extracției la baia cu ultrasunete, cu alcool etilic timp de 10 minute la temperatură de 20 °C în raport molar, material vegetal:solvent = 1:10, folosind solvent de concentrație diferită (etanol 96% și 60%), același timp și temperatură, dar material vegetal diferit.

Soluțiile extractive au fost filtrate prin membrane filtrante.

S-au obținut extracte hidroalcoolice cu aspect limpede având culoare specifică.

Tabel 17. Condițiile experimentale pentru obținerea extractelor cu ultrasunete, solvent etanol 96%

Material vegetal Denumire plantă/Specie	Solvent de extracție	Timp de extracție [minute]	Temperatura de extracție [ °C ]	Principiile active extrase [ mg/mL ]
Crețișoară ( <i>Alchemilla vulgaris</i> )	Alcool etic 96%	10	20	0.0045 Quercetină
Leurdă ( <i>Allium ursinum</i> )	Alcool etic 96%	10	20	0.0024 Kamferol
Obligeană ( <i>Acorus calamus</i> )	Alcool etic 96%	10	20	0.0014 Quercetină
Splinuță ( <i>Solidago virga aurea</i> )	Alcool etic 96%	10	20	0.0055 Acid galic

Tabelul 18. Condițiile experimentale pentru obținerea extractelor cu ultrasunete, solvent etanol 60%

Material vegetal Denumire plantă/Specie	Solvent de extracție	Timp de extracție [minute]	Temperatura de extracție [ °C ]	Principiile active extrase [ mg/mL ]
Crețișoară ( <i>Alchemilla vulgaris</i> )	Alcool etic 60%	10	20	0.0080 Kamferol
Leurdă ( <i>Allium ursinum</i> )	Alcool etic 60%	10	20	0.0043 Acid galic
Obligeană ( <i>Acorus calamus</i> )	Alcool etic 60%	10	20	0.0018 Quercetină
Splinuță ( <i>Solidago virga aurea</i> )	Alcool etic 60%	10	20	0.0186 Acid galic

Rezultatele obținute confirmă faptul că extractele obținute prin extracție la baia cu ultrasunete au un conținut mai ridicat în principii active dacă se utilizează ca solvent alcool etilic 60%.

Conținutul mai ridicat în principii active a extractelor obținute la baia cu ultrasunete față de cele obținute prin macerare folosind același solvent, poate fi explicat prin intensificarea transferului de substanță, datorită extracției în câmp ultrasonor.

### II.3. Identificarea calitativă și cantitativă a principiilor active din materiile prime vegetale din clasa Monocotiledonate și Dicotiledonate [17, 131-133].

Pentru identificarea calitativă a principiilor active din materiile prime din genul Angiospermatophyta și Spermatophyta s-au efectuat extracții cu solvenți de polaritate diferită (diclormetan, metanol, apă), concentrație diferită și timp de extracție diferit.

Extractele vegetale au fost obținute conform paragrafului II.2.2., II.2.3. și II.2.4.

Extractele astfel obținute au fost utilizate pentru analiza calitativă și cantitativă.

În figura 12 este redată analiza chimică a principiilor active prezente în materialul vegetal cercetat.

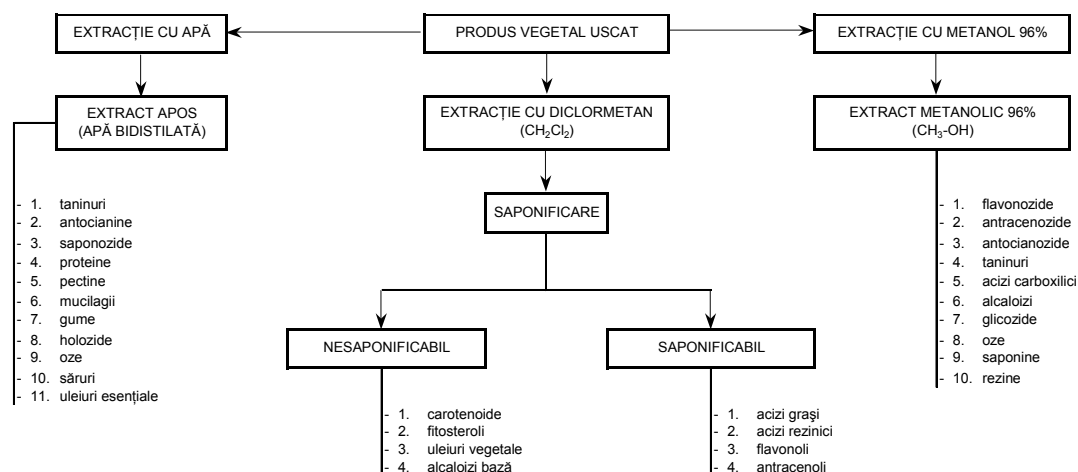


Figura 12. Reprezentarea schematică a analizei chimice calitative



### II.3.1. Extractul diclormetanic

Extractul diclormetanic obținut conform paragrafului II.2.3. se concentrează la sec prin distilare la presiunea normală.

Reziduul este apoi supus saponificării pe baia de apă la reflux, timp de 3 ore, cu 20mL soluție de NaOH 20%.

După terminarea saponificării, conținutul balonului este răcit și apoi transferat într-o pâlnie de separare, unde este diluat cu 30mL apă distilată și apoi extras în porțiuni cu dietil-eter până la epuizarea soluției apoase alcaline.

În soluția eterică trec alcaloizii bază și izoprenoidele (nesaponificabile).

În faza apoasă rămân sărurile de sodiu ale acizilor grași superiori (palmitat de sodiu, stearat de sodiu), acizilor rezinici, acizilor triterpenici, antranolilor și flavonolilor (saponificabil).

Faza eterică care conține nesaponificabilul se spală de câteva ori cu apă distilată într-o pâlnie de separare pentru înlăturarea resturilor de substanțe hidrosolubile și se usucă pe sulfat de sodiu anhidru. Se concentrează apoi până la un volum de 50mL.

Soluția apoasă alcalină este acidulată cu acid clorhidric concentrat până la pH = 3-4.

Acizii grași superiori, acizii rezinici, acizii triterpenici, flavonolii, antracenolii sunt astfel eliberați din sărurile lor de sodiu și sunt extrași cu dietil-eter până la epuizarea fazei apoase.

Soluțiile eterice reunite se spală de 3 ori cu apă purificată (3x30mL) în pâlnia de separare, se usucă pe sulfat de sodiu anhidru.

#### II.3.1.1. Frațiunea nesaponificabilă

În fracțiunea nesaponificabilă se efectuează următoarele reacții de identificare:

##### II.3.1.1.1. Identificarea uleiurilor volatile

3mL extract eteric se evaporă la sec în prezența aerului, la întuneric, la temperatura camerei, timp de 72 ore.

Reziduurile rămase pentru toate cele șapte extracte cercetate au un miros aromatic, uleiurile volatile sunt prezente.

Se pare că mirosul mai intens pentru extractele de *Alchemilla vulgaris*, *Allium ursinum*, *Acorus calamus* și *Solidago virga aurea*, indică prezența unor cantități mai mari de uleiuri volatile.

##### II.3.1.1.2. Identificarea alcaloizilor de bază

5mL extract eteric se evaporă la sec. Reziduul se tratează la cald cu 5ml soluție de acid sulfuric 2%.

Amestecul conținând totalul alcaloidic sub formă de sulfat, se filtrează și apoi se pune câte 1mL în două eprubete, una servind drept martor. În prima eprubetă se adaugă 1mL de reactiv Bertrand.

Apariția unor precipitate de culoare galbenă, de notă prezența alcaloizilor.

### II.3.1.1.3. Identificarea carotenoidelor

3mL extract eteric sunt evaporati la sec, în prezența aerului, timp de 72 ore, la temperatura camerei și la întuneric.

Reziduul rezultat se dizolvă cu 2mL soluție de cloroform 80%. Din soluția rezultată 1mL se tratează cu 1mL soluție de azotat de uranil 1% (proaspăt preparată în anhidridă acetică).

S-a observat în cele șapte eprubete corespunzătoare celor șapte extracte vegetale cercetate apariția unei colorații verde-fugace, culoare ce indică prezența carotenoidelor. Colorația a fost stabilizată prin adăugarea de xanthidrol.

### II.3.1.1.4. Identificarea substanțelor triterpenice

3mL extract eteric se evaporă la sec, iar reziduul rezultat se dizolvă în 3mL soluție anhidridă acetică 98%.

Amestecul astfel obținut s-a tratat într-o eprubetă perfect uscată și curată cu 2mL soluție de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96%, cu o pipetă, pe peretele eprubetei.

La zona de contact dintre cele două faze se formează un inel de culoare brun-roșiatică, în timp ce stratul superior se colorează în verde.

Reacția este pozitivă pentru triterpenele tetraciclice (fitosteroli) (reacția Liebermann-Burchardt).

Modul de lucru a fost identic pentru plantele vegetale studiate, singura diferență fiind dată de materialul vegetal.

În tabelul 19 sunt redate principalele reacții de identificare a compușilor prezenți în fracțiunea nesaponificabilă.

Tabel 19. Reacții de identificare a compușilor din fracțiunea nesaponificabilă

Plantă cercetată/ Reactiv	<i>Alchemilla vulgaris</i>	<i>Allium ursinum</i>	<i>Acorus calamus</i>	<i>Solidago virga aurea</i>	<i>Agrimonia eupatoria</i>	<i>Viscum album</i>	<i>Veronica officinalis</i>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + reactiv Bertrand	pp. galben deschis	pp. galben - verzui	pp. galben	pp. galben intens	pp. alb- gălbui	pp. galben - verzui	pp. galben
Azotat de uranil 1%	colorație verde	colorație verde	colorație gălbui - verzui	colorație brun - verzui	colorație verde	colorație verde - gălbui	colorație verde
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 96% (2mL)	colorație verde	colorație verde	colorație verde - gălbui	colorație verde	colorație verde	colorație galben - verzui	colorație verde închis

pp. -precipitat

Toate cele șapte extracte conțin uleiuri volatile, hidrocarburi de origine vegetală (izoprenoide), lucru confirmat de abundența și intensitatea colorațiilor rezultate la analiza calitativă a extractelor cercetate.

### II.3.1.2. Frațiunea saponificabilă

#### II.3.1.2.1. Identificarea acizilor grași

1mL soluție eterică din fiecare extract vegetal este pus pe o hârtie de filtru (20x15 cm).

După evaporarea eterului, pe hârtia de filtru s-a observat prezența unei urme de grăsime, lucru care indică prezența acizilor grași.

#### II.3.1.2.2. Identificarea antracenolilor

3mL extract eteric se agită, în eprubetă, cu 3mL soluție de NaOH 10%. Decolorarea stratului eteric (superior) inițial colorat în galben și colorarea în roșu a stratului apos (inferior) indică prezența antracenolilor (emodolilor) (reacția Bornträger).

În tabelul 20 sunt redate substanțele din fracțiunea saponificabilă.

Tabel 20. Reacții de identificare a compușilor din fracțiunea saponificabilă

Plantă cercetată /Reactiv	<i>Alchemilla vulgaris</i>	<i>Allium ursinum</i>	<i>Acorus calamus</i>	<i>Solidago virga aurea</i>	<i>Agrimonia eupatoria</i>	<i>Viscum album</i>	<i>Veronica officinalis</i>
(C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>n</sub>	urme de grăsime	acizi grași	acizi grași	acizi grași	acizi grași	acizi grași	acizi grași
3mL. sol. NaOH 10%	colorație galbenă	colorație gălbuie	colorație alb – gălbuie	colorație galbenă	colorație galbenă	colorație galben șters	colorație alb – gălbuie

Cele șapte extracte eterice conțin compuși analizați din fracțiunea saponificabilă (acizi grași, flavonoli, antracenoli, acizi rezinici) lucru confirmat de intensitatea culorilor apărute.

Intensitatea culorilor determină aprecierea extractelor și din punct de vedere cantitativ se poate afirma că cu cât culoarea este mai intensă, compusul analizat este în cantitate mai mare.

Intensitățile culorilor diferă de la o plantă la alta, ca urmare a părții vegetale cercetate și a compoziției chimice diferite.

### II.3.2. Extractul metanolic

#### II.3.2.1. Identificarea glucidelor reducătoare

- Reacția Fehling

Glucidele reducătoare sunt oxidate la acid aldonic de combinațiile cuprice.

Fehling I: 7g CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O se dizolvă în 100mL apă.

Fehling II: 35g de tartrat dublu de sodiu și potasiu (sare Seignete) și 26g KOH (sau 10,4g NaOH) se dizolvă în 100mL apă.

1mL reactiv Fehling I se adaugă peste 1mL reactiv Fehling II, se diluează la 4mL cu apă distilată, se adaugă 1mL extract metanolic din fiecare produs vegetal cercetat și se fierbe.

S-a observat formarea unui precipitat roșu cărămiziu pe fundul eprubetei pentru șase din cele șapte extracte cercetate, ceea ce indică prezența glucidelor reducătoare, cu excepția vâscului unde nu s-a format precipitat roșu cărămiziu.

- **Reacția Tollens**

Sărurile de argint sunt reduse de glucidele reducătoare la argint metalic.

Într-o eprubetă curată și uscată se introduc 1mL soluție Tollens I și respectiv Tollens II, se adaugă 2-3 picături amoniac concentrat până la solubilizarea precipitatului.

Apoi se introduc 1mL extract metanolic din fiecare plantă cercetată. La slabă încălzire, uneori chiar la rece, s-a observat apariția unei oglinzi de argint.

Calitatea oglinzii depinde de gradul de diluare a soluției și de gradul de curățenie al pereților eprubetei.

Reactivul Tollens I: 2,5g AgNO<sub>3</sub> se dizolvă în 250 mL apă.

Reactivul Tollens II: 2,5g NaOH se dizolvă în 250 mL apă.

Tabel 21. Reacții de identificare ale glucidelor reducătoare

Plantă cercetată/ Reactiv	<i>Alchemilla vulgaris</i>	<i>Allium ursinum</i>	<i>Acorus calamus</i>	<i>Solidago virga aurea</i>	<i>Agrimonia eupatoria</i>	<i>Veronica officinalis</i>	<i>Viscum album</i>
1mL Fehling I + 1mL Fehling II	pp. roșu cărămiziu	pp. roșu brun	pp. roșu brun	pp. roșu cărămiziu	pp. roșu cărămiziu	pp. roșu cărămiziu	-
1mL soluție de [Ag(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] OH	oglinză de argint	oglinză de argint	oglinză de argint	oglinză de argint	oglinză de argint	oglinză de argint	-

pp. -precipitat.

În toate cele șase eprubete s-a observat apariția oglinzii de argint la slabă încălzire, cu excepția extractului de *Viscum album*.

În cazul extractului de *Solidago virga aurea* precipitatul roșu cărămiziu a fost mult mai intens ceea ce indică o pondere mai mare a glucidelor reducătoare în acest extract.

### II.3.2.2. Identificarea antocianozidelor

Extractul metanolic este supus hidrolizei.

Pentru efectuarea hidrolizei, 25 mL extract metanolic se refluxează cu 15 mL soluție apoasă de acid clorhidric 1% timp de 30 minute.

După refluxare, amestecul de reacție se răcește și apoi se extrage cu eter etilic până la epuizarea fazei apoase acide. Fazele eterice reunite se anhidriază pe sulfatul de sodiu anhidru și se concentrează până la un volum de 15 mL.

În cazul extractelor de *Alchemilla vulgaris*, *Allium ursinum*, *Acorus calamus*, *Solidago virga aurea*, *Agrimonia eupatoria*, *Veronica officinalis*, *Viscum album*, s-a observat colorarea în roșu a soluției apoase acide ceea ce indică prezența antocianozidelor.

Pentru certitudine 1 mL soluție apoasă acidă s-a tratat cu 1 mL soluție de hidroxid de sodiu 0.1n.

S-a constatat că colorația roșie virează la violet (mediu neutru) și apoi în verde (mediu bazic), dependent de cantitatea de hidroxid de sodiu adăugată.

În cazul extractelor de *Acorus calamus* și *Viscum album* aceste colorații sunt mai puțin prezente.

### II.3.3. Extractul apos

#### II.3.3.1. Identificare aminoacizilor și proteinelor

- Reacția cu ninhidrină

1 mL soluție apoasă de extract vegetal se încălzește cu 5 picături de ninhidrină soluție 0.1%. Apare o colorație violet-albastră în cazul extractului de *Acorus calamus* și *Viscum album*.

- Reacția biuretelui.

Cu sulfatul de cupru (II), în mediu alcalin, proteinele dau complecși interni de culoare albastru și violet, analog biuretelui ( $\text{HN}(\text{CO}-\text{NH}_2)_2$ ), datorită prezenței legături peptidice  $-\text{CO}-\text{NH}-$ .

Într-o eprubetă s-a introdus 1 mL soluție apoasă de extract vegetal cu 1 mL de soluție de hidroxid de sodiu 20% și apoi 3 picături de soluție de sulfat de cupru (II) 2%.

Modul de lucru a fost identic pentru toate cele șapte extracte vegetale cercetate.

S-a observat după agitare apariția unor complecși de culoare albastră în cazul extractului de *Acorus calamus* și *Viscum album*.

#### II.3.3.2. Identificarea glucidelor reducătoare

Pentru identificarea glucidelor reducătoare în extractul apos s-a procedat ca la paragraful II.3.2.1.

#### II.3.3.3. Identificarea sărurilor alcaloizilor

5 mL de extract metanolic s-a evaporat la sec, pe baia de apă. Rezidul vegetal se dizolvă, la cald, cu 10 mL soluție apoasă 2% de acid sulfuric.

Soluția, conținând totalul alcaloidic sub formă de sulfat, se filtrează, iar filtratul se tratează cu o soluție apoasă de hidroxid de amoniu 25% până la  $\text{pH}=9-10$ , pentru eliberarea alcaloizilor bază.

Amestecul alcalin a fost adus într-o pâlnie de separare și se extrage cu cloroform (3x10 mL). Fazele organice reunite se usucă pe sulfat de sodiu anhidru și se distilă la sec.

Rezidul rezultat se dizolvă la cald, cu 10 mL soluție apoasă de acid sulfuric 2% pentru transformarea alcaloizilor bază în sărurile corespunzătoare.

Soluția apoasă acidă se filtrează, iar în filtrat sărurile alcaloizilor s-au identificat prin reacțiile specificate la paragraful II.3.1.1.2.

În toate cele șapte extracte s-a observat apariția unor precipitate galbene cea ce indică prezența alcaloizilor săruri.

În scopul verificării compoziției chimice a produselor vegetale luate în studiu s-a apelat la analiza chimică calitativă globală, care a presupus extracția, separarea și identificarea diferitelor clase de principii active.

Extracția și separarea s-au realizat prin agitare sau refluxare succesivă a produsului vegetal mărunțit cu cantități mici de solvenți de polarități diferite, în ordinea crescătoare a polarității (diclormetan, alcool, apă).

Identificarea principiilor active s-a realizat prin reacții specifice executate în soluțiile extractive ca atare sau prelucrate.

S-au evidențiat următoarele grupe de principii active: ulei volatil în rădăcină și partea aeriană; alcaloizi în flori, ramuri tinere și muguri; carotenoide în flori, ramuri tinere, muguri și fructe; oze reducătoare în toate produsele vegetale cercetate cu excepția extractului de *Viscum album*, substanțe triterpenice în rădăcină și partea aeriană, acizi grași și antocianozide în toate părțile vegetale a plantelor cercetate, aminoacizi și proteine în extractul de *Acorus calamus* și *Viscum album*.

Rezultatele sunt redată în tabelul 22.

Tabel 22. Rezultatele analizei chimice calitative pe părțile vegetale a plantelor studiate

Principiul activ	Rezultatul determinării						
	<i>Alchemilla vulgaris</i> partea aeriană	<i>Allium ursinum</i> frunze	<i>Acorus calamus</i> partea aeriană	<i>Solidago virga aurea</i> partea aeriană	<i>Agrimonia eupatoria</i> partea aeriană	<i>Veronica officinalis</i> partea aeriană	<i>Viscum album</i> frunze cu rămurile
Uleiuri volatile	+	+	+	+	+	+	+
Alcaloizi	+	+	+	+	+	+	+
Carotenoide	+	+	+	+	+	+	+
Substanțe triterpenice	+	+	+	+	+	+	+
Acizi grași	+	+	+	+	+	+	+
Antracenoli	+	+	+	+	+	+	+
Oze reducătoare	+	+	+	+	+	+	-
Antocianozide	+	+	+	+	+	+	+
Aminoacizi	-	-	+	-	-	-	+
Proteine	-	-	+	-	-	-	+
Alcaloizi săruri	+	+	+	+	+	+	+

+ prezent, - absent

#### II.3.4. Acidul ascorbic ( Vitamina C )

Acidul ascorbic are un rol foarte important în organism întrucât are un pronunțat potențial antioxidant. Omul are posibilitatea să consume o mare varietate de produse și în acest sens și-a dezvoltat un echipament enzimatic divers.

În același timp, el a devenit, mai mult decât celelalte animale, dependent de aportul de substanțe nutritive din mediu; el este singurul mamifer, alături de maimuță și cobai, care nu poate sintetiza acidul ascorbic, iar față de celelalte vitamine este mai dependent decât orice alt animal [134, 135].

Multitudinea proceselor fiziologice și biochimice, în care, direct, sau indirect, intervine acidul ascorbic, face ca rolul acestui compus biologic activ să fie esențial pentru funcționarea organismului [4,5].

Analiza calitativă și cantitativă a acidului ascorbic a fost realizată pe material vegetal uscat, achiziționat de la Fares S.A. Orăștie și S.C. STEF-MAR S.R.L.-Vâlcea.

Materialul vegetal cercetat a fost: *Alchemilla vulgaris*—crețișoara; *Allium ursinum*-leurdă; *Acorus calamus*-obligeană; *Solidago virga aurea*-splinuță; *Agrimonia eupatoria*-turița mare; *Veronica officinalis*-ventrilică; *Viscum album*-vâsc, din anul 2006.

#### II.3.4.1.Reacții de identificare [1, 59, 136, 137].

Reacțiile de identificare au fost realizate pe extracte obținute astfel:

1g produs vegetal uscat a fost supus extracției cu 10ml soluție de alcool metilic 96 %, timp de 10 zile, la temperatura camerei, la întuneric, agitând de 3-4 ori/zi [130].

Soluțiile extractive au fost filtrate prin patru straturi de tifon, filtratele fiind utilizate pentru identificarea acidului ascorbic.

Metoda de extracție aplicată a fost unitară, parametrii operaționali, solventul utilizat, raportul plantă/solvent, temperatura de extracție și tipul de extracție au fost identici, singura diferență fiind determinată de materialul vegetal cercetat.

Reacții generale pentru acidul ascorbic

Aceste reacții se bazează pe caracterul reducător al vitaminei C.

a) Reacția cu soluție de  $\text{FeCl}_3$  1%.

La 1mL soluție de extract vegetal s-a adăugat 0,2mL soluție de  $\text{FeCl}_3$  1%; s-a constatat formarea unei colorații violet.

b) Reacția cu soluție de  $\text{FeSO}_4$  10%.

La 1mL soluție de extract vegetal s-a adăugat 0,5mL soluție de  $\text{FeSO}_4$  10%; s-a observat formarea unei colorații albastru-violetă.

c) Reacția cu soluție de  $\text{TiCl}_4$  10%

La 1mL soluție de extract vegetal s-a adăugat 0,5mL soluție de  $\text{TiCl}_4$  10%; s-a observat formarea unei colorații roșie.

d) Reacția cu soluție de fosfomolibdotungstat 1%.

La 1mL soluție de extract vegetal s-a adăugat 0,2mL soluție de fosfomolibdotungstat 1%; s-a constatat formarea unei colorații violet.

Reacții specifice vitaminei C

a) Reacția cu soluție de  $\text{HNO}_3$  10%.

La 1mL soluție de extract vegetal, s-a adăugat 0,2 mL soluție de  $\text{HNO}_3$  10%; s-a constatat formarea unui precipitat cenușiu.

b) Reacția cu soluție de nitroprusiat de sodiu 2%.

La 1mL soluție de extract vegetal, s-a adăugat 0,2mL soluție de nitroprusiat de sodiu 2%; s-a observat formarea unei colorații verde galben.

c) Reacția cu soluție de nitroprusiat de sodiu 1% și soluție de  $(\text{CH}_3\text{-COO})_2\text{Pb}$  30%.

La 1mL soluție de extract vegetal, s-a adăugat 0,2mL soluție de nitroprusiat de sodiu 1% și 0,5mL soluție  $(\text{CH}_3\text{-COO})_2\text{Pb}$  30%; s-a observat formarea unei colorații albastru-verde care trece apoi în brun.

d) Reacția cu soluție de  $\text{KIO}_3$  0,004 N

1g din material vegetal uscat se introduce într-un mojar care conține 5mL soluție de  $\text{HCl}$  2%. Se mojarează bine, după care conținutul mojarului se trece într-un balon cotat de 100mL și se aduce la semn cu apă distilată.

Din extractul obținut se iau 1mL, se adaugă 3mL apă distilată, 1mL soluție de  $\text{KI}$  1%, 3-4 picături de soluție de amidon 1%, după omogenizare se pipetează soluție de  $\text{KIO}_3$  0,004 N; s-a constatat apariția unei colorații albastre.



În tabelul 23 sunt prezentate rezultatele reacțiilor de identificare pentru material vegetal uscat din anul 2006 și anume: *Alchemilla vulgaris*-crețișoară (partea aeriană), *Allium ursinum*-leurdă (frunzele), *Acorus calamus*-obligeană (rădăcina), *Solidago virga aurea*-splinuță (partea aeriană), *Agrimonia eupatoria*-turița mare (partea aeriană), *Viscum album*-vâsc (frunzele cu rămurile), *Veronica officinalis*-ventrilică (partea aeriană).

Tabel 23. Reacții de identificare a acidului ascorbic (vitaminei C) [1, 136]

Reacția de identificare (reactiv utilizat)	<i>Alchemilla vulgaris</i>	<i>Allium ursinum</i>	<i>Acorus calamus</i>	<i>Solidago virga aurea</i>	<i>Agrimonia eupatoria</i>	<i>Viscum album</i>	<i>Veronica officinalis</i>
Soluție de FeCl <sub>3</sub> 1%	colorație verzuie	colorație violetă	colorație violet deschis	colorație violet intens	colorație violet intens	colorație albastru violet	colorație violetă
Soluție de FeSO <sub>4</sub> 10 %	colorație albastră violet intensă	colorație verzuie	colorație gălbuie	colorație albastră violet intensă	colorație albastră violet intensă	colorație galbenă	colorație verde
Soluție de TiCl <sub>4</sub> 10%	colorație roșie intensă	colorație roșie	colorație roșie intensă	colorație roșie	colorație roșie verzui	colorație roșie brună	colorație roșie
Soluție de HNO <sub>3</sub> 10%	precipitat cenușiu	pp. brun	pp. brun	pp. cenușiu	pp. cenușiu	pp. brun	pp. verzui
Soluție de fosfomolibdotungstat 1%	colorație violetă intensă	colorație violetă	colorație violetă deschis	colorație violetă intensă	colorație violetă	colorație violetă	colorație violetă brună
Soluție de nitropuisat de sodiu 2%	colorație verde gălbuie intens	colorație verde deschis	colorație gălbuie	colorație galben portocaliu	colorație verde galben intens	colorație verde galben deschis	colorație verde galben
Soluție de nitropuisat de sodiu 1 % + soluție de (CH <sub>3</sub> - COO) <sub>2</sub> Pb 30%	colorație brună	colorație verde brun	colorație gălbui deschis	colorație brună	colorație brună	colorație verde brun	colorație verde brun
Soluție de HCl 2% + soluție de KI 1% + picături de soluție amidon 1 % + soluție de KIO <sub>3</sub> 0,004 N.	colorație albastră	colorație albastră	colorație albastră	colorație albastră	colorație albastră	colorație albastră	colorație albastră

pp. -precipitat.

Prin reacțiile de culoare s-a dedus următoarele:

- toate cele șapte extracte analizate au ca principiu activ vitamina C;
- extractele din *Alchemilla vulgaris*, *Allium ursinum* și *Solidago virga aurea* conțin cea mai mare cantitate de vitamina C dedusă din abundența precipitatelor formate și de intensitatea colorațiilor, comparativ cu celelalte extracte cercetate, rezultate confirmate și din determinarea cantitativă a acidului ascorbic prin metoda electrochimică.



## II.3.4.2. Metode de determinare cantitativă a acidului ascorbic

### II.3.4.2.1. Metoda Electrochimică

#### 1. Principiul metodei

Electrochimia cuprinde trei părți importante: potențiomtria, coulometria și voltametria.

Potențiomtria măsoară potențialul unei soluții supuse diferitelor regimuri de curent [138].

Coulometria implică conversia cantitativă a unui analit prin intermediul transferului de electroni.

Încărcarea totală sau curentul ca funcții de timp sunt monitorizate în experimentele coulometrice cu scopul de a cuantifica cantitatea de analit convertit.

Voltametria presupune măsurarea curentului la un electrod funcție de potențialul aplicat [139].

Clasificarea rațională a metodelor de analiză electrochimice are la bază doi parametri:

- modul de transport al materiei în soluție-convecție, difuzie, migrație;
- natura și forma excitației (semnalul de intrare) care determină natura și forma semnalului de ieșire, precum și aspectele teoretice și experimentale ale metodei [140].

Celulele electrochimice folosesc trei tipuri de electrozi: electrodul de lucru, electrodul de referință și electrodul auxiliar. Speciile electroactive reacționează la suprafața electrodului de lucru.

Acești electrozi trebuie să îndeplinească o serie de caracteristici: răspuns optim și reproductibil, să nu interfereze în reacție la o anumită valoare a potențialului, conductivitate electrică mare, stabilitate mecanică și chimică, preț redus, ușurință de procurare, toxicitate scăzută și stabilitate în timp.

Electrodul din carbon sticlos este format dintr-un material solid izotrop compus din microfibre organizate într-o manieră complexă.

Ele alcătuiesc o structură înalt reticulară de carbon pur, cu densitate și puritate mare, având porozitate mică.

Este un electrod cu excelente proprietăți mecanice și electrice, care poate furniza mărimi reproductibile.

În cazul electrozilor de referință, cel mai frecvent utilizați sunt electrodul saturat de calomel și electrodul Ag/AgCl. Firul de platină este cel mai utilizat electrod auxiliar.

Electrodul auxiliar și cel de referință sunt conectați la un potențiostat în timp ce electrodul de lucru este conectat la convectorul de tensiune. Acesta convertește curentul măsurat, ce trece prin electrodul de lucru, în tensiunea care este înregistrată.

Sistemul începe să funcționeze la un potențial la care nu are loc nici o reacție redox. La o anumită valoare a pH-ului, speciile electroactive încep să se descarce [141].

În timpul procesului acidul ascorbic donează electronii electrodului de lucru, prin intermediul căruia în voltagramă această oxidare anodică se va prezenta sub forma unui pic.

Ecuția reacției ce are loc la electrodul de lucru este redată în figura 13.



Electrolitul folosit a fost soluție tampon de CH<sub>3</sub>-COONa pH = 4, respectiv extractele vegetale hidroalcoolice.

### 3. Rezultate:

Metoda adițiilor standard este utilizată pentru determinarea cantității de acid ascorbic din extractele vegetale cercetate.

Relația analitică de bază este:

$$I_{aa} = k \cdot C_{aa}$$

unde:

$I_{aa}$  – curentul de oxidare;

$C_{aa}$  – concentrația de acid ascorbic;

$k$  – constanta care depinde de tipul de electrozi, numărul de electroni și capacitatea de dizolvare a acidului ascorbic.

Deoarece valoarea constantei  $k$  nu este cunoscută în cazul analizei extractelor (deoarece depinde de compoziția soluției), se utilizează metoda adițiilor standard care presupune adaosul unei cantități cunoscute de standard, având concentrația  $C_s$ , apoi se determină curentul  $I_{a2}$ , creșterea valorii curentului  $I_{a2}$  poate fi raportată cantității de standard introdus:

$$I_{a2} = k \cdot C_{a2} = k \cdot (C_{aa} V_0 + C_s \Delta V) / (V_0 + \Delta V)$$

unde:

$V_0$  – volumul inițial al soluției de analizat;

$V$  – volumul de acid ascorbic adăugat.

Soluția tampon 0.02 M, de CH<sub>3</sub>-COONa pH = 4 limitează pierderile de acid ascorbic la mai puțin de 5%.

Din relațiile de mai sus se poate determina parametrul urmărit ( $C_{aa}$  - concentrația de acid ascorbic).

$$C_{aa} = I_{aa} \cdot C_s \cdot \Delta V / I_{a2} \cdot (V_0 + \Delta V) - I_{aa} \cdot V_0$$

În tabelul 24 sunt redate rezultatele determinărilor efectuate prin metoda electrochimică.

Tabel 24. Conținutul în acid ascorbic din extractele vegetale studiate

Extract vegetal	$V_0$ [mL]	$V$ [mL]	$C_s$ [%]	$I_{aa}$	$I_{a2}$	$C_{aa}$ [mg/mL]	$C_{aa}$ [mg/100g material vegetal uscat ]
<i>Alchemilla vulgaris</i>	10	1	1	9.50	19.01	0.083317	83.31726133
<i>Allium ursinum</i>	10	1	1	8.55	20.82	0.059574	59.5735786
<i>Acorus calamus</i>	10	1	1	5.844	23.22	0.029668	29.6679866
<i>Solidago virga aurea</i>	10	1	1	15.29	22.03	0.170972	170.9717097
<i>Agrimonia eupatoria</i>	10	1	1	4.10	18.18	0.025781	25.78149569
<i>Veronica officinalis</i>	10	1	1	4.34	19.67	0.02512	25.11999075
<i>Viscum album</i>	10	1	1	3.15	23.05	0.014181	14.18085202

Extractul metanolic de *Solidago virga aurea* prezintă cantitatea cea mai mare de acid ascorbic, urmat de cel de *Alchemilla vulgaris*, *Allium ursinum*.

În schimb extractele de *Acorus calamus*, *Agrimonia eupatoria* și *Veronica officinalis* au valori apropiate, iar extractul de *Viscum album* are conținutul cel mai scăzut în acid ascorbic.

Rezultatele obținute confirmă faptul că aceste plante medicinale (phanerogame) constituie o sursă importantă de acid ascorbic.

#### II.3.4.2.2. Metoda 2,6-diclorfenol-indofenol [146].

##### 1. Principiul metodei

Metoda se bazează pe acțiunea reducătoare a acidului ascorbic asupra 2,6-diclorfenol indofenol, în mediu acid, când acidul ascorbic trece în acid dehidroascorbic, iar substanța oxidată – colorată în forma sa redusă – incoloră.

##### 2. Aciditatea mediului de reacție

- în acest scop s-a folosit acid oxalic de concentrație 2 %.
- se impune din mai multe motive: se evită pierderea prin oxidare la aer a acidului ascorbic din produse, crește viteza de reacție dintre colorant și acidul ascorbic, se înlătură în mai mare măsură acțiunea reducătoare a unor substanțe străine din produsul de analizat, virajul de culoare apare mai clar.

Ca reactiv și indicator se folosește sarea de sodiu a 2,6-diclorfenol indofenol de culoare albastră care în mediu acid trece de la albastru la roz.

##### 3. Materiale și reactivi:

- soluție de acid oxalic 2% (Roth) ;
- nisip de cuarț pur (lipsit de fier) calcinat sau vată de sticlă;
- hârtie de filtru;
- biurete (10, 20, 25 mL) ;
- cilindri gradați (20, 25 mL) ;
- mojar, pahare Berzelius și Erlenmayer, pipete;
- soluție de 2,6-diclorfenol indofenol n/1000 (Roth);
- metanol (Merck).

##### 4. Modul de lucru:

Extractele metanolice (96%) de *Alchemilla vulgaris* (partea aeriană), *Allium ursinum* (frunze), *Acorus calamus* (rădăcina), *Solidago virga aurea* (partea aeriană), *Agrimonia eupatoria* (partea aeriană), *Veronica officinalis* (partea aeriană) și *Viscum album* (frunze cu rămurele) au fost obținute astfel:

5g extract vegetal fin mărunțit a fost supus extracției cu 50mL soluție de metanol 96%, timp de 10 zile, la temperatura camerei, agitând de 3-4 ori/zi, păstrându-se la întuneric. Soluțiile extractive au fost filtrate prin 4 straturi de tifon.

Extractele astfel obținute au fost folosite fără a fi diluate.

Într-un vas Erlenmayer se pipetează o cantitate de 5mL produs (extract vegetal) și 5mL soluție de acid oxalic 2%.

Se titrează cu 2,6-diclorfenol indofenol 0,001N până la colorația roz persistentă timp de 0,5-1 minut.

Pentru exactitatea rezultatelor se repetă determinarea și se face media determinărilor.

Conținutul în vitamina C se află cu formula:

$$\text{Acid ascorbic (mg/mL extract vegetal)} = t \cdot n \cdot (V - V_1) \cdot 100 / V \cdot V_t$$

unde:

- t – titrul soluției de 2,6-diclorfenol indofenol;
- n – numărul de ml de 2,6-diclorfenol indofenol folosiți la titrare;
- V – volumul de produs luat în analiză;
- V<sub>1</sub> – volumul de acid oxalic 2% adăugat, în mL;
- V<sub>t</sub> – volumul total al soluției titrate, în mL;

Tabel 25. Conținutul de acid ascorbic în extractele plantelor din genul Angiospermatophyta și Spermatophyta

Extract vegetal	Acid ascorbic	
	[mg/mL extract vegetal]	[mg/100g material vegetal uscat ]
<i>Alchemilla vulgaris</i>	0.082017	82.017
<i>Allium ursinum</i>	0.058214	58.214
<i>Acorus calamus</i>	0.023746	23.746
<i>Solidago virga aurea</i>	0.170414	170.414
<i>Agrimonia eupatoria</i>	0.024742	24.742
<i>Veronica officinalis</i>	0.025023	25.023
<i>Viscum album</i>	0.013622	13.622

Rezultatele obținute prin metoda 2,6-diclorfenol–indofenol sunt într-o bună concordanță cu cele obținute prin metoda electrochimică cu excepția extractului de *Acorus calamus*. Această diferență care apare în cazul extractului de *Acorus calamus* poate fi atribuită materialului vegetal recoltat la intervale de timp diferite. Conținutul de acid ascorbic în extractele vegetale cercetate determinat prin cele două metode este redat în tabelul 26.

Tabel 26. Conținutul de acid ascorbic în extractele vegetale cercetate determinat prin cele două metode

Extract vegetal	Metoda electrochimică	Metoda 2,6-diclorfenol-indofenol
	Acid ascorbic [mg/100g mat. vegetal]	Acid ascorbic [mg/100g mat. vegetal]
<i>Alchemilla vulgaris</i>	83.317	82.017
<i>Allium ursinum</i>	59.573	58.214
<i>Acorus calamus</i>	29.667	23.746
<i>Solidago virga aurea</i>	170.971	170.414
<i>Agrimonia eupatoria</i>	25.781	24.742
<i>Veronica officinalis</i>	25.119	25.023
<i>Viscum album</i>	14.180	13.622

Prin folosirea celor două metode s-au evidențiat următoarele aspecte:

- rezultatele obținute indică prezența în toate cele șapte extracte vegetale a unui conținut ridicat de acid ascorbic;

- metoda electrochimică este o metodă mult mai exactă față de metoda 2,6-diclorfenol-indofenol, necesitând folosirea standardului de acid ascorbic (Roth) ;
- plantele din genul Angiospermatophyta și Spermatophyta constituie o sursă naturală de acid ascorbic.

Rezultatele obținute prin metoda 2,6-diclorfenol-indofenol au constiuit obiectul a două lucrări științifice [147, 148].

### II.3.5. Antocianidine

#### Aspecte generale

Antocianidinele sunt coloranți naturali, prezenți în fructe și legume.

Antocianidinele au proprietăți antioxidante și antitumorale.

Un factor important în formarea culorii îl reprezintă structura antocianidinelor.

Astfel, odată cu creșterea numărului grupărilor hidroxilice din moleculă are loc închiderea culorii albastre, în timp ce substituirea cu grupări metoxi are drept rezultat intensificarea culorii roșii.

#### II.3.5.1. Analiza calitativă a antocianidinelor

Analiza compușilor antocianidinici prezenți în extractele cercetate cum ar fi: *Alchemilla vulgaris*-crețișoară, *Allium ursinum*-leurdă, *Acorus calamus*-obligeană, *Solidago virga aurea*-splinuță, *Agrimonia eupatoria*-turița mare, *Viscum album*-vâsc și *Veronica officinalis*-ventrilică a fost realizată și prin cromatografie în strat subțire.

Obținerea extractelor hidroalcoolice din speciile vegetale precizate mai sus, s-a realizat prin metoda extracției solid-lichid, într-o instalație Soxhlet, conform procedurii descris în II.2.4.2.

S-a lucrat identic ca și la extractele obținute la paragraful II.2.4.2.

S-au obținut extracte hidroalcoolice cu aspect limpede având culoare specifică, de la galben la verde închis.

E1 – extract metanolic de *Alchemilla vulgaris* - crețișoară;

E2 – extract metanolic de *Allium ursinum* - leurdă;

E3 – extract metanolic de *Acorus calamus* - obligeană;

E4 – extract metanolic de *Solidago virga aurea* - splinuță;

E5 – extract metanolic de *Agrimonia eupatoria* - turița mare;

E6 – extract metanolic de *Veronica officinalis* - ventrilică;

E7 – extract metanolic de *Viscum album* - vâsc;

Metoda: 30mL din soluția extractului vegetal au fost refluxați pe baia de apă cu 30mL soluție de acid clorhidric 10N, timp de 30 minute.

Masa de reacție s-a extras de două ori cu câte 15mL soluție de acetat de etil. Extractele s-au reunit, iar soluția acidă rămasă după epuizarea acetatului de etil s-a tratat de două ori cu 15mL soluție de butanol.

Extractele au fost apoi reunite și supuse analizei pentru identificarea antocianidinelor.

Analiza cromatografică a extractelor cercetate s-a realizat pe hârtie cromatografică, iar ca fază mobilă, sistemul de solvenți Partridge:n-butanol:acid acetic: apă = 4:1:5.

Hârțiile cromatografice au fost uscate la temperatura camerei, la întuneric și apoi examinate la lumina zilei, după care s-a făcut dezvoltarea cu acid acetic glacial 60%.

Cianidina este prezentă în toate extractele hidroalcoolice cercetate sub forma unui spot de culoare roșie la valoarea  $R_f = 0,42$ , aceiași valoare cu  $R_f$ -ul al matorului de cianidină conform literaturii de specialitate [149].

### II.3.5.2. Analiza cantitativă a antocianidelor

Metodele de cercetare sunt metode spectrofotometrice în care determinarea procentului total de antocianidine se realizează prin analiza soluției la lungimi de undă caracteristice antocianidelor (490-550nm), alegerea lungimii fiind dependentă de solventul utilizat (ex. etanol,  $\lambda = 530$  nm).

Pentru determinarea cantitativă s-a folosit tehnica indicată de Markakis bazată pe cunoașterea absorbantei molare specifice antocianidelor la 530nm [149].

Metoda: 1g pulbere de produs vegetal a fost extras la rece (4°C) timp de 18h, cu 50ml amestec alcool etilic:acid clorhidric 1,5N (85:15).

Parametrii operaționali, respectiv gradul de mărunțire al plantei, solventul utilizat, raportul plantă/solvent, temperatura de extracție au fost identici, singura diferență fiind determinată de materialul vegetal cercetat.

Extractele obținute au fost păstrate la rece, și s-a citit absorbanta la lungimea de undă de 530 nm.

Extractele obținute au fost analizate cu ajutorul unui Spectrofotometru UV-VIS Pharmacia LKB-Ultrospec III (Germania).

Valorile absorbanțelor corespunzătoare extractelor vegetale cercetate sunt prezentate în tabelul 27.

Tabel 27. Valorile absorbanțelor extractelor hidroalcoolice cercetate la  $\lambda = 530$  nm

Extract vegetal	<i>Alchemilla vulgaris</i>	<i>Allium ursinum</i>	<i>Acorus calamus</i>	<i>Solidago virga aurea</i>	<i>Agrimonia eupatoria</i>	<i>Veronica officinalis</i>	<i>Viscum album</i>
Absorbanța	0,332	0,306	0,090	0,016	0,151	0,290	0,065

Calculul concentrației totale de antocianidine se face cu formula.

$$\text{Antocianidine (mg/mL)} = A_p \cdot d / 98.2 \cdot m,$$

unde:

$A_p$  - absorbanta soluției la 530 nm;

$d$  - factorul de diluție;

98.2 - valoarea absorbantei soluției 1% cianidină în solvent alcool etilic: acid clorhidric, măsurat într-o cuvă de 1cm, la 530nm;

$m$  - cantitatea de material vegetal luată pentru analiză, în g.



Conținutul în antocianidine a extractelor vegetale cercetate este redat în tabelul 28.

Tabel 28. Conținutul total de antocianidine a extractelor vegetale

Extract vegetal	Antocianidine [mg/100g material vegetal]
<i>Alchemilla vulgaris</i>	16.904
<i>Allium ursinum</i>	15.580
<i>Acorus calamus</i>	4.582
<i>Solidago virga aurea</i>	0.814
<i>Agrimonia eupatoria</i>	7.688
<i>Veronica officinalis</i>	14.765
<i>Viscum album</i>	3.309

Conținutul de antocianidine din extractele hidroalcoolice cercetate descresc astfel:

*Alchemilla vulgaris*-crețișoară > *Allium ursinum*-leurdă > *Veronica officinalis*-ventrilică > *Agrimonia eupatoria*-turița mare > *Acorus calamus* – obligeană > *Viscum album* - vâsc > *Solidago virga aurea* - splinuță.

Extractul de *Solidago virga aurea* are conținutul cel mai scăzut de antocianidine, în timp ce extractul de *Alchemilla vulgaris* are conținutul cel mai ridicat, lucru confirmat și de intensitatea colorațiilor extractelor cercetate.

Rezultatele obținute au constiuit obiectul a două lucrări științifice [150,151]

### II.3.6. Flavonoide

Flavonoidele sau pigmenții flavonoidici sunt compuși fenolici în molecula cărora se afla heterociclii condensați, benzopiranul sau benzofuranul, în care heteroatomul este oxigenul. La acest dicitlu se condensează un alt nucleu benzenic [152].

Dintre pigmenții flavonoidici mai cunoscuți sunt derivații care au la origine: flavanul, flavena, flavanona, flavona, calcona, aurna. Formulele structurale ale acestor nuclee de origine au fost prezentate în figura 6.

Nucleele de origine ale flavonoidelor prin reacții de hidroxilare, metoxilare, hidrogenare, eliminare, generează marea diversitate de pigmenți flavonoidici [152].

Analiza calitativă și cantitativă a flavonoidelor a fost realizată pe material vegetal uscat: *Alchemilla vulgaris*-crețișoară, *Allium ursinum*-leurdă, *Acorus calamus*-obligeană, *Solidago virga aurea*-splinuță, *Agrimonia eupatoria*-turița mare, *Viscum album*-vâsc și *Veronica officinalis*-ventrilică; sursa Fares S.A. Orăștie, Tricolorul S.A. Cluj-Napoca și S.C. STEF-MAR S.R.L.-Vâlcea, din anul 2006.

#### II.3.6.1. Reacții de identificare

Reacțiile de identificare au fost realizate pe extracte vegetale hidroalcoolice obținute astfel: 5 g produs vegetal fin mărunțit a fost supus extracției statice (macerare) în 50 mL soluție alcool etilic 96%, timp de 10 zile, agitând de 3/4 ori pe zi, la temperatura camerei (20-23°C) [130].

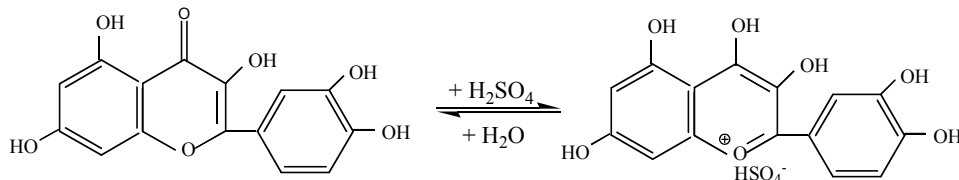
Soluția a fost filtrată, filtratul obținut fiind utilizat pentru reacțiile de culoare și precipitare.



- Reacții generale pentru flavonoide [17,152-153].

a) Reacția cu soluție  $\text{H}_2\text{SO}_4$  96%

La 1 mL soluție de extract vegetal s-au adăugat 2 picături de soluție  $\text{H}_2\text{SO}_4$  96%; se formează o sare de flaviliu; prin diluare cu apă, precipită flavona neschimbată, datorită hidrolizei sării de flaviliu.



b) Reacția cu soluție de  $\text{NH}_4\text{OH}$  80%

La 1 mL soluție de extract vegetal s-a adăugat 0,5 mL soluție de  $\text{NH}_4\text{OH}$  80%; s-a format un precipitat galben.

c) Reacția cu soluție de  $\text{KOH}$  70%

La 1 mL soluție de extract vegetal s-a adăugat 0,5 mL soluție de  $\text{KOH}$  70%; s-a format un precipitat galben.

d) Reacția cu soluție de  $\text{AlCl}_3$  5%

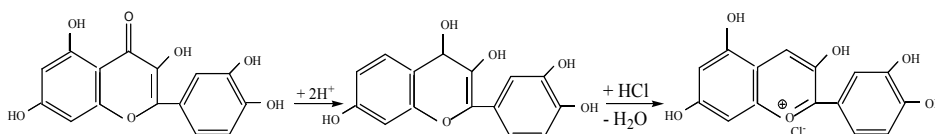
La 1 mL soluție extract vegetal s-a adăugat 1 mL soluție de  $\text{AlCl}_3$  5%; s-a format o colorație galbenă, fluorescentă în UV caracteristică, ce permite dozarea flavonelor și utilizarea lor drept revelatori în cromatografie.

e) Reacția cu soluție de  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$  10%

La 1 mL soluție de extract vegetal s-a adăugat 0,5 mL soluție de  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$  10%; s-a observat formarea unui precipitat galben.

f) Reacția cu soluție de  $\text{C}_6\text{H}_5\text{-N=N-N-C}_6\text{H}_5$  (diazaminobenzenul) 5%. La 1 mL soluție de extract vegetal s-a adăugat 0,2 mL soluție de  $\text{C}_6\text{H}_5\text{-N=N-NH-C}_6\text{H}_5$  5%; s-a observat formarea unei colorații galbene.

g) Reacția de hidrogenare a flavonelor:



La 5 mL soluție de extract vegetal s-a adăugat 0,5 g  $\text{Zn}$  metallic pulbere; după depunerea pulberii de zinc s-a adăugat 1,5 mL alcool amilic.

Pigmentul, în contact cu zincul se colorează în galben-portocaliu. Se adaugă 0,5 mL soluție  $\text{HCl}$  96% prin prelingere pe peretele eprubetei. Soluția s-a colorat în roșu violet.

În tabelul 29 sunt prezentate rezultatele reacțiilor de identificare pentru materialul vegetal uscat, colectat în anul 2006 și anume: *Alchemilla vulgaris*-crețioasă, *Allium ursinum*-leurdă, *Acorus calamus*-obligeană, *Solidago virga aurea*-splinuță, *Agrimonia eupatoria*-turița mare, *Viscum album*-vâsc și *Veronica officinalis*-ventrilică.

Tabel 29. Reacții de identificare

Reacții de identificare (Reactiv utilizat)	Extrakte vegetale hidroalcoolice						
	Partea aeriană <i>Alchemilla vulgaris</i>	Frunze <i>Allium ursinum</i>	Rădăcină <i>Acorus calamus</i>	Partea aeriană <i>Agrimonia eupatoria</i>	Partea aeriană <i>Solidago virga aurea</i>	Partea aeriană <i>Veronica officinalis</i>	Frunze cu rămurile <i>Viscum album</i>
Soluție H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 96%	pp. verde	pp. verde închis	pp. roșu	pp. brun	pp. brun	pp. verde brun	pp. verde închis
Soluție de NH <sub>4</sub> OH 80%	pp. galben brun	pp. brun maroniu	pp. galben	pp. galben portocaliu	pp. galben brun	pp. galben	pp. verde
Soluție de KOH 70%	pp. galben brun	pp. brun maroniu	pp. galben	pp. galben portocaliu	pp. galben brun	pp. galben	pp. verde
Soluție de AlCl <sub>3</sub> 5%	pp. galben verzui	pp. galben verzui	pp. alb gălbui	pp. galben intens	pp. galben verzui	pp. galben	pp. galben verzui
Soluție de (CH <sub>3</sub> -COO) <sub>2</sub> Pb 10%	pp. galben verzui	pp. galben verzui	pp. galben deschis	pp. galben intens	pp. galben verzui	pp. galben închis	pp. verde deschis spre galben
Soluție de C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -N=N-NH-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> 5%	Colorație galbenă	Colorație galbenă verzuie	Colorație galbenă	Colorație galbenă intensă	Colorație galbenă	Colorație galbenă	Colorație galbenă deschisă
0.5 g Zn + 1.5 mL alcool amilic + 0.5 mL soluție HCl 96%	Colorație roșie violetă	Colorație roșie	Colorație roșie intensă	Colorație roșie violetă	Colorație roșie	Colorație roșie	Colorație roșie deschisă

pp.-precipitat

### II.3.6.2. Determinarea conținutului total de flavonoide

S-a determinat conținutul total de flavonoide pentru materialul vegetal recoltat în anul 2006.

Pentru analiza cantitativă s-a folosit metoda spectrofotometrică în care determinarea procentului total de flavonoide se realizează prin spectrofotometrarea soluțiilor la lungimi de undă caracteristice (510 nm), alegerea lungimi fiind dependentă de solventul utilizat.

- Reactivi și aparatură:

- soluție standard de quercetină 0,05 mol/L(Merck);
- apă bidistilată ;
- soluție NaOH 1 M;
- soluție AlCl<sub>3</sub> 10% ;
- soluție NaNO<sub>2</sub> 5%;
- spectrofotometru Uvikon 930.

Metoda:

0.33 mL soluție extract vegetal + 2.13 mL H<sub>2</sub>O bidistilată + 0.1 mL soluție NaNO<sub>2</sub> 5%. După 5 minute s-au adăugat 0.1 mL soluție AlCl<sub>3</sub> 10%. În minutul 6 s-au adăugat 0.67 mL soluție NaOH 1 M, și s-a completat cu 0.8 mL apă bidistilată.

Soluția a fost amestecată și omogenizată și s-a citit absorbanta la 510 nm. În paralel s-a citit absorbanta soluției standard la concentrații diferite ( 0.00059; 0.00177; 0.00533;0.01663;0.03; 0.04; 0.05 mol/L) la 510 nm. Probele au fost analizate în duplicat.

În tabelul 30 este redat valoarea absorbantelor ce corespunde extractelor vegetale studiate la lungimea de undă de 510 nm.

Tabel 30. Valorile absorbantei extractelor alcoolice vegetale analizate

Extrakte alcoolice vegetale	Absorbanța	λ (nm)
<i>Alchemilla vulgaris</i>	2.0498	510
<i>Allium ursinum</i>	1.7656	510
<i>Acorus calamus</i>	2.3701	510
<i>Solidago virga aurea</i>	3.0867	510
<i>Agrimonia eupatoria</i>	2.7946	510
<i>Veronica officinalis</i>	1.9566	510
<i>Viscum album</i>	2.499	510
Amestec	2.387	510

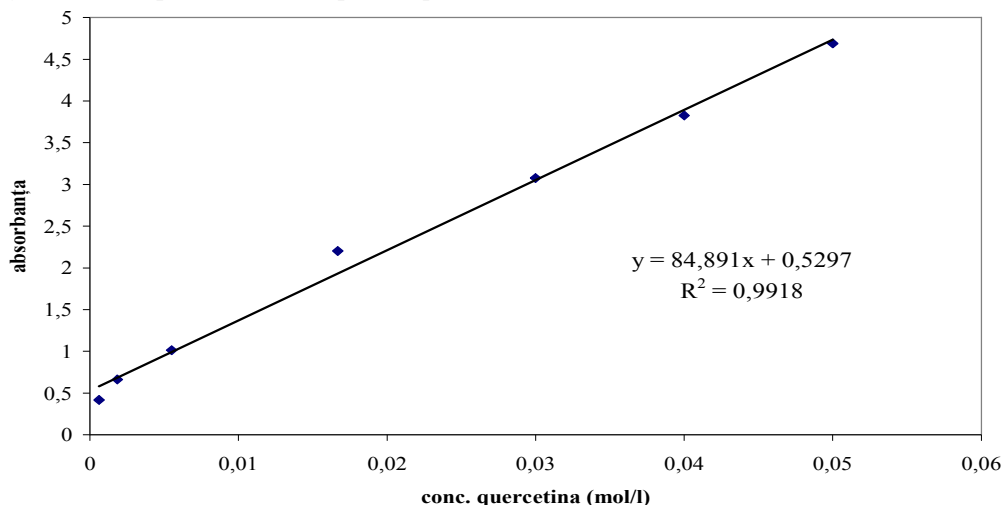
Tabel 31. Valorile absorbantei la diferite concentrații ale quercetinei la lungimea de undă de 510 nm

Concentrația în quercetină [mol/L]	Absorbanța	λ (nm)
0.05	4.689	510
0.04	3.874	510
0.03	3.008	510
0.0166	2.254	510
0.00533	1.176	510
0.00177	0.662	510
0.000592	0.416	510

Calculul concentrației totale de flavonoide se face cu ajutorul dreptei de etalonare pentru quercetină.

Ecuția corespunzătoare și dreapta de etalonare pentru quercetină sunt prezentate în figura 15.

Figura 15. Dreapta de etalonare pentru quercetină, la 510 nm.



În ecuația din figura 15 „y” reprezintă absorbanta iar „x” reprezintă concentrația de quercetină (mol/L). Pe baza acestei ecuații, conținutul total de flavonoide din fiecare tinctură poate fi exprimat ca și concentrație echivalentă de quercetină, dacă se cunoaște valoarea absorbantei corespunzătoare, cu ajutorul formulei:

$$x = (y - 0,5297) / 84,891$$

Rezultatele obținute sunt redată în tabelul 32.

Tabel 32. Conținutul total de flavonoide exprimat ca și concentrație echivalentă de quercetină din tincturile de plante din genul Angiospermatophyta și Spermatophyta

Tinctura	Concentrația [mol/L · 10 <sup>-2</sup> ]
<i>Alchemilla vulgaris</i>	1.793
<i>Allium ursinum</i>	1.456
<i>Acorus calamus</i>	2.167
<i>Solidago virga aurea</i>	3.012
<i>Agrimonia eupatoria</i>	2.665
<i>Veronica officinalis</i>	1.683
<i>Viscum album</i>	2.317
Amestec	2.185

Pe baza acestor rezultate se poate observa că extractul de *Solidago virga aurea* are concentrația cea mai mare în flavonoide (3.012 · 10<sup>-2</sup> mol/L), urmată de tinctura de *Agrimonia eupatoria* (2.665 · 10<sup>-2</sup> mol/L), și cea de *Viscum album* (2.317 · 10<sup>-2</sup> mol/L).

Tinctura de *Allium ursinum*, *Acorus calamus* și cea de *Veronica officinalis* au conținutul cel mai scăzut de flavonoide lucru care este confirmat și de activitatea antioxidantă a acestor tincturi de plante.

Cu toate acestea nu s-a putut face o corelație satisfăcătoare între conținutul de flavonoide și activitatea antioxidantă a extractelor cercetate ceea ce indică faptul că flavonoidele nu sunt singurele responsabile de activitatea antioxidantă a extractelor.

Rezultatele obținute au constituit obiectul unei lucrări științifice [154].

### II.3.6.3. Determinarea cantitativă a quercetinei, kamferolului, rutinei și miricetinei din extractele metanolice, etanolice și apoase

În vederea determinării conținutului de quercetină, kamferol, miricetină și rutină prin cromatografie de lichide de înaltă performanță s-au trasat dreptele de calibrare; pe baza acestor dreptele s-au determinat cantitativ standardele enumerate mai sus din extracte metanolice, etanolice și apoase a plantelor investigate.

Material vegetal: *Alchemilla vulgaris* - crețișoară, *Allium ursinum* - leurdă, *Acorus calamus* - obligeană, *Solidago virga aurea* - splinuță, *Agrimonia eupatoria* - turița mare, *Viscum album* - vâsc și *Veronica officinalis* - ventricică – sursă Fares

S. A. Orășie, Tricolorul S.A. Cluj-Napoca și S.C. STEF-MAR S.R.L.-Vâlcea.

Obținerea extractelor:

Extractele cercetate au fost obținute conform paragrafelor II.2.2., II.2.4.1 și II.2.4.3.

S-au obținut extracte hidroalcoolice și apoase cu aspect limpede având culoare specifică.

Soluțiile standard de flavonoide:

Compusul standard (0.15mg/mL) cântărit la balanța analitică cu precizie de 0,00001 g a fost transferat într-un balon cotat de 10mL și dizolvat cu solvent (metanol, etanol) (Merck), obținându-se soluția stoc.

Prin diluții succesive, din soluțiile standard s-au obținut soluții de concentrații diferite (0.15–0.0075 mg/mL) pe baza cărora s-au construit dreptele de calibrare.

S-au determinat ecuațiile de regresie și coeficienții de corelare, corespunzătoare dreptelor de calibrare. Valorile coeficienților de corelare au fost între 0.9992-0.9999.

Dreptele de calibrare determinate prin cromatografie de lichide de înaltă performanță pentru quercetină (0.15mg/L), kamferol (0.15mg/mL), miricetina (0.15mg/mL) și rutina (0.15 mg/mL) sunt prezentate în anexa 2 (figurile 2.1-2.3,2.5).

Standardele utilizate pentru trasarea dreptelor de calibrare au avut următorul grad de puritate:

- Quercetină, reactiv Roth ( $\geq 98.5\%$ )
- Miricetină, reactiv Roth ( $\geq 98\%$ )
- Rutină, reactiv Roth ( $\geq 97\%$ )
- Kamferol, reactiv Roth (99.9%)

Analiza UV a soluțiilor de standarde:

Pentru a determina lungimile de undă la care absorbția standardelor este maximă s-a efectuat analiza UV.

În tabelele 33, 34 sunt prezentate benzile caracteristice în domeniul UV ale standardelor analizate.

Tabel 33. Benzile caracteristice în domeniul UV ale quercetinei și rutinei

Standard	$\lambda$ [nm]	Absorbanța	$\lambda$ detecție HPLC [nm]
Rutina	207; 209; 257; 378	2.442 ;2.330 ; 1.395; 1.155	280
Quercetină	208,1; 269 ; 295	2.225; 0.242; 0.494	360

Tabel 34. Benzile caracteristice în domeniul UV ale kamferolului și miricetinei

Standard	$\lambda$ [nm]	Absorbanța	$\lambda$ detecție HPLC [nm]
Kamferol	207;268;295;364	1.814; 0.418; 0.413; 0.299	360
Miricetină	205.1; 209.9; 297	0.858; 0.846; 0.405	300

#### Aparatura și modul de lucru

Cromatograful utilizat a fost tipul HPLC Varian Pro Star model 240, fiind compus dintr-o pompă ternară, injector automat, termostat fixat la temperatura camerei și detector UV-VIS (UV-VIS VARIAN MODEL 345).

Separarea cromatografică s-a realizat pe o coloană cromatografică de tipul Omnispher 5-C18, 150 x 4,6 mm pentru kamferol, quercetină și miricetină, iar pentru rutină o coloană cromatografică tipul Inertsil 5-C18, 250 x 4,6 mm.

Faza mobilă a constat din amestec de acetonitril: tampon fosfat pH = 2,5, în raport volumetric 40:60, pentru kamferol și quercetină, pentru rutină, metanol: tampon fosfat în raport volumetric 45:55 iar pentru miricetină metanol:tampon fosfat în raport volumetric 50:50.

Detecția s-a realizat la 360 nm pentru kamferol și quercetină, pentru rutină la 280 nm iar pentru miricetină la 300 nm.

Pentru aceste valori ale lungimii de undă s-au trasat spectrele UV pentru cele patru standarde. Debitul fazei mobile a fost 1mL/minut.

Volumul de injectare a fost de 5 $\mu$ L.

Pentru trasarea dreptelor de calibrare s-au utilizat următoarele concentrații de standard specificate în tabelul 35.

Tabel 35. Concentrațiile de kamferol, quercetină, miricetină și rutină

Standard/ Concentrație	Kamferol [mg/mL]	Quercetină [mg/mL]	Rutină [mg/mL]	Miricetină [mg/mL]
C <sub>1</sub>	0,1500	0,1500	0,1500	0,1500
C <sub>2</sub>	0,0750	0,0800	0,0750	0,0750
C <sub>3</sub>	0,0400	0,0375	0,0375	0,0375
C <sub>4</sub>	0,0187	0,0187	0,0187	0,0187
C <sub>5</sub>	0,0150	0,0150	0,0150	0,0150
C <sub>6</sub>	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100
C <sub>7</sub>	0,0075	0,0075	0,0075	0,0075

#### Rezultate obținute

Dreptele de calibrare (a-d - pentru metanol; e-h - pentru etanol) au avut următorii coeficienți de corelare și următoarele ecuații:

- |                                 |   |
|---------------------------------|---|
| a) $r^2 = 0,9998$ – kamferol;   | $y = 2,7411 \cdot 10^7 x - 5,1313 \cdot 10^4$ . |
| b) $r^2 = 0,9992$ – quercetină; | $y = 7,8902 \cdot 10^6 x - 6,7742 \cdot 10^4$ . |
| c) $r^2 = 0,9998$ – rutină;     | $y = 2,5049 \cdot 10^7 x - 6,4412 \cdot 10^4$ . |
| d) $r^2 = 0,9998$ – miricetină; | $y = 8,4418 \cdot 10^6 x - 1,5277 \cdot 10^4$ . |
| e) $r^2 = 0,9999$ – kamferol;   | $y = 2,7071 \cdot 10^7 x + 6,3479 \cdot 10^4$ . |

f)  $r^2 = 0,9996$  – quercetină;  
 g)  $r^2 = 0,9999$  – rutină;  
 h)  $r^2 = 0,9999$  – miricetină;

$y = 1,6526 \cdot 10^7 x + 3,3352 \cdot 10^4$ .  
 $y = 1,1594 \cdot 10^7 x + 7,0156 \cdot 10^3$ .  
 $y = 2,3552 \cdot 10^7 x + 5,1750 \cdot 10^4$ .

Timpii de retenție și concentrațiile flavonoidelor din extractele metanolice, etanolice și apoase cercetate sunt prezentate în tabelele 36-41.

Tabel 36. Timpii de retenție și concentrațiile flavonoidelor în extractele etanolice 96 %

Denumire plantă/Specie	Compusul analizat	Timp de retenție $t_r$ [min. ]	mg flavonoid/mL extract vegetal
Crețișoară ( <i>Alchemilla vulgaris</i> )	quercetină	2,351	0,0020
	rutină	1,147	0,1386
	kamferol	4,289	0,0019
	miricetină	-	-
Leurdă ( <i>Allium ursinum</i> )	quercetină	2,228	0,0015
	rutină	1,086	0,5434
	kamferol	4,215	0,0020
	miricetină	-	-
Obligeană ( <i>Acorus calamus</i> )	quercetină	2,788	0,0012
	rutină	1,144	0,0132
	kamferol	4,170	0,0020
	miricetină	-	-
Splinuță ( <i>Solidago virga aurea</i> )	quercetină	2,110	0,0382
	rutină	1,149	1,2344
	kamferol	4,390	0,0287
	miricetină	10,762	0,0010
Turița Mare ( <i>Agrimonia eupatoria</i> )	quercetină	2,380	0,0017
	rutină	1,188	0,4090
	kamferol	4,362	0,0040
	miricetină	-	-
Vâscul ( <i>Viscum album</i> )	quercetină	2,118	0,0026
	rutină	1,130	0,1449
	kamferol	4,295	0,0021
	miricetină	-	-
Ventricică ( <i>Veronica officinalis</i> )	quercetină	2,221	0,0010
	rutină	1,158	0,0637
	kamferol	4,104	0,0020
	miricetină	-	-

Tabel 37. Timpii de retenție și concentrațiile flavonoidelor în extractele metanolice 80 %

Denumire plantă/Specie	Compusul analizat	Timp de retenție $t_r$ [min. ]	mg flavonoid/mL extract vegetal
Crețișoară ( <i>Alchemilla vulgaris</i> )	quercetină	3,009	0,0033
	rutină	7,166	0,0044
	kamferol	4,017	0,0010
	miricetină	-	-
Leurdă ( <i>Allium ursinum</i> )	quercetină	2,832	0,0013
	rutină	7,400	0,0068
	kamferol	4,188	0,0019
	miricetină	-	-
Obligeană ( <i>Acorus calamus</i> )	quercetină	2,844	0,0014
	rutină	-	-
	kamferol	-	-
	miricetină	3,741	0,0010
Splinuță ( <i>Solidago virga aurea</i> )	quercetină	2,880	0,0046
	rutină	7,094	0,0947
	kamferol	4,457	0,0098
	miricetină	3,955	0,0099
Turița Mare ( <i>Agrimonia eupatoria</i> )	quercetină	3,006	0,0010
	rutină	7,315	0,0615
	kamferol	4,024	0,0015
	miricetină	-	-
Ventricică ( <i>Veronica officinalis</i> )	quercetină	2,846	0,0050
	rutină	7,081	0,0047
	kamferol	4,207	0,0022
	miricetină	-	-
Vâscul ( <i>Viscum album</i> )	quercetină	3,014	0,0024
	rutină	-	-
	kamferol	4,149	0,0024
	miricetină	3,736	*

\* -urme



Tabel 38. Timpii de retenție și concentrațiile flavonoidelor în extractele metanolice 96 %

Denumire plantă/Specie	Compusul analizat	Timp de retenție $t_r$ [min. ]	mg flavonoid/mL extract vegetal
Crețișoară ( <i>Alchemilla vulgaris</i> )	quercetină	2,943	0,0132
	rutină	7,494	0,0015
	kamferol	4,191	0,0019
	miricetină	-	-
Leurdă ( <i>Allium ursinum</i> )	quercetină	3,044	0,0010
	rutină	7,309	0,0020
	kamferol	4,357	0,0029
	miricetină	4,133	0,0015
Obligeană ( <i>Acorus calamus</i> )	quercetină	2,824	0,0017
	rutină	-	-
	kamferol	-	-
	miricetină	3,723	0,0025
Splinuță ( <i>Solidago virga aurea</i> )	quercetină	2,950	0,0702
	rutină	7,419	0,0143
	kamferol	4,375	0,0190
	miricetină	3,975	0,0143
Turița Mare ( <i>Agrimonia eupatoria</i> )	quercetină	2,950	0,0038
	rutină	7,305	0,0217
	kamferol	4,373	0,0027
	miricetină	-	-
Ventricică ( <i>Veronica officinalis</i> )	quercetină	3,105	0,0015
	rutină	-	-
	kamferol	4,153	*
	miricetină	-	-
Vâscul ( <i>Viscum album</i> )	quercetină	3,155	*
	rutină	7,171	0,0066
	kamferol	4,049	*
	miricetină	-	-

\* - urme

Tabel 39. Timpii de retenție și concentrațiile flavonoidelor în extractele etanolice 60 % obținute la baie cu ultrasunete

Denumire plantă/Specie	Compusul analizat	Timp de retenție $t_r$ [min. ]	mg flavonoid/mL extract vegetal
Crețișoară ( <i>Alchemilla vulgaris</i> )	quercetină	2,910	0,1171
	rutină	-	-
	kamferol	4,274	0,0080
	miricetină	-	-
Leurdă ( <i>Allium ursinum</i> )	quercetină	2,898	0,0020
	rutină	-	-
	kamferol	4,263	0,0034
	miricetină	-	-
Obligeană ( <i>Acorus calamus</i> )	quercetină	3,129	0,0018
	rutină	-	-
	kamferol	4,065	0,0019
	miricetină	-	-
Splinuță ( <i>Solidago virga aurea</i> )	quercetină	2,885	0,1421
	rutină	7,376	0,1717
	kamferol	4,246	0,0256
	miricetină	3,952	0,0052
Turița Mare ( <i>Agrimonia eupatoria</i> )	quercetină	2,917	0,0045
	rutină	-	-
	kamferol	4,154	0,0040
	miricetină	-	-
Ventricică ( <i>Veronica officinalis</i> )	quercetină	2,892	0,0161
	rutină	-	-
	kamferol	4,217	0,0056
	miricetină	-	-
Vâscul ( <i>Viscum album</i> )	quercetină	3,125	0,0030
	rutină	7,518	0,0010
	kamferol	4,078	0,0020
	miricetină	-	-

Tabelul 40. Timpii de retenție și concentrațiile flavonoidelor în extractele etanolice 96 % ultrasonate timp de 10 minute

Denumire plantă/Specie	Compusul analizat	Timp de retenție $t_r$ [min. ]	mg flavonoid/mL extract vegetal
Crețișoară ( <i>Alchemilla vulgaris</i> )	quercetină	2,884	0,0045
	rutină	-	-
	kamferol	4,244	0,0025
	miricetină	-	-
Leurdă ( <i>Allium ursinum</i> )	quercetină	2,908	0,0018
	rutină	7,161	*
	kamferol	4,275	0,0024
	miricetină	-	-
Obligeană ( <i>Acorus calamus</i> )	quercetină	3,129	0,0014
	rutină	-	-
	kamferol	4,438	*
	miricetină	-	-
Splinuță ( <i>Solidago virga-aurea</i> )	quercetină	2,908	0,0991
	rutină	7,707	0,0072
	kamferol	4,269	0,0185
	miricetină	3,987	0,0015
Turița Mare ( <i>Agrimonia eupatoria</i> )	quercetină	2,889	0,0039
	rutină	7,192	*
	kamferol	4,247	0,0015
	miricetină	-	-
Ventricică ( <i>Veronica officinalis</i> )	quercetină	2,908	0,0020
	rutină	-	-
	kamferol	4,431	0,0041
	miricetină	-	-
Vâscul ( <i>Viscum album</i> )	quercetină	2,901	0,0015
	rutină	-	-
	kamferol	-	-
	miricetină	-	-

\*-urme

Tabel 41. Timpii de retenție și concentrațiile flavonoidelor în extractele apoase

Denumire plantă/Specie	Compusul analizat	Timp de retenție $t_r$ [min. ]	mg flavonoid/mL extract vegetal
Crețișoară ( <i>Alchemilla vulgaris</i> )	quercetină	2,898	0,1492
	rutină	-	-
	kamferol	4,235	0,0059
Leurdă ( <i>Allium ursinum</i> )	quercetină	2,870	0,0013
	rutină	7,446	0,0238
	kamferol	4,209	0,0507
Obligeană ( <i>Acorus calamus</i> )	quercetină	2,856	0,0020
	rutină	-	-
	kamferol	4,438	*
Splinuță ( <i>Solidago virga aurea</i> )	quercetină	2,868	0,1755
	rutină	7,183	0,0034
	kamferol	4,203	0,0119
Turița Mare ( <i>Agrimonia eupatoria</i> )	quercetină	2,873	0,1170
	rutină	-	-
	kamferol	4,200	0,0104
Ventricică ( <i>Veronica officinalis</i> )	quercetină	3,162	0,0018
	rutină	-	-
	kamferol	4,058	0,0209
Vâscul ( <i>Viscum album</i> )	quercetină	2,873	0,0021
	rutină	7,518	0,0079
	kamferol	4,203	0,0020

\*-urme

Din rezultatele prezentate în tabelele de mai sus (36-41) se poate constata existența unei diferențe în conținutul de flavonoide al extractelor studiate.

Această diferență este dată nu numai de compoziție chimică diferită a plantelor analizate, tipul părții vegetale (frunze, ramuri, partea aeriană, rădăcină) din care s-au obținut extractele ci și de tipul de solvent.

Pentru a pune în evidență variația conținutului de flavonoide din părțile vegetale a plantelor studiate, s-a făcut media aritmetică a rezultatelor obținute pentru quercetină, rutină și kamferol prezente în extractul apos, metanolic și etanolic. Variațiile conținutului de quercetină, rutină și kamferol sunt redată în figurile 16-18.

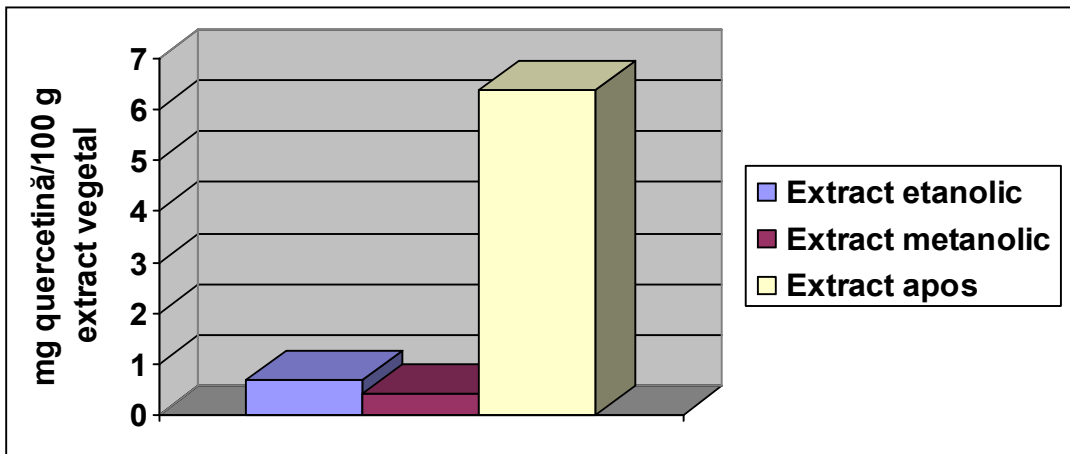


Figura 16. Variația conținutului de quercetină pentru extractele apoase, metanolice și etanolice

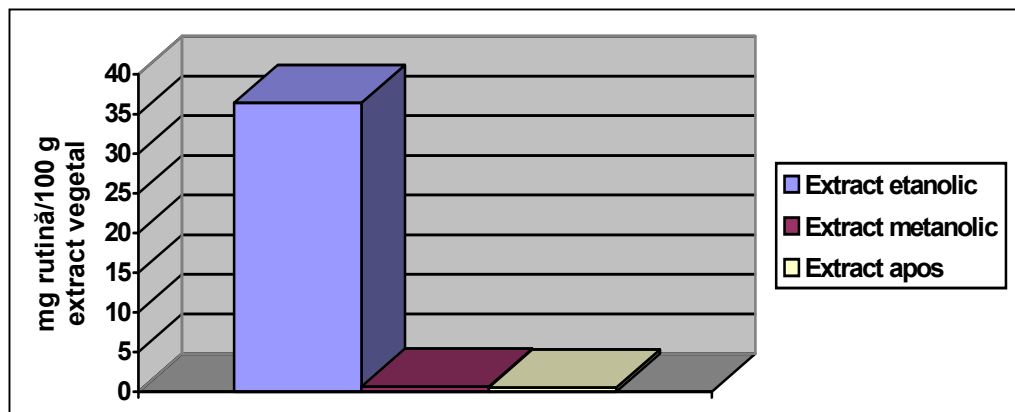


Figura 17. Variația conținutului de rutină pentru extractele apoase, metanolice și etanolice

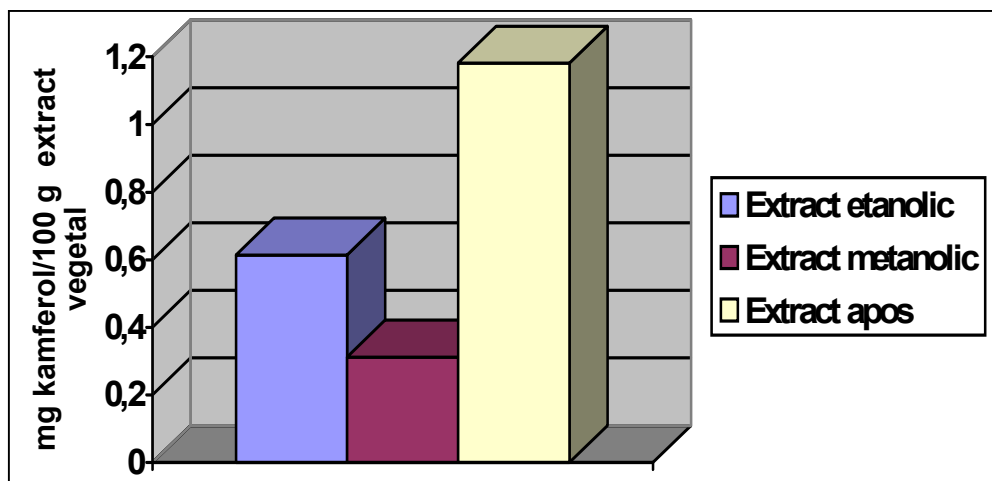


Figura 18. Variația conținutului de kamferol pentru extractele apoase, metanolice și etanolice

Cea mai răspândită flavonoidă a fost însă quercetina, identificată în toate extractele indiferent de concentrația de alcool folosit pentru extracție.

Kamferolul nu a fost găsit în extractele de *Acorus calamus* iar rutina în cele de *Acorus calamus* și *Veronica officinalis*.

Din figurile de mai sus se observă că extractele apoase au conținutul cel mai ridicat în quercetină și kamferol, în schimb extractul etanolic are conținutul cel mai ridicat în rutină.

Extractele metanolice au conținutul cel mai scăzut în quercetină, rutină și kamferol.

Extractele de *Solidago virga aurea* au conținutul cel mai ridicat de flavonoide, urmată de *Allium ursinum*, *Alchemilla vulgaris*, iar extractele de *Acorus calamus* și *Viscum album* au conținutul cel mai mic de flavonoide.

Metoda de analiză utilizată (HPLC) s-a dovedit a fi precisă și selectivă pentru identificarea și cuantificarea quercetinei, kamferolului, miricetinei și rutinei prezente în materialul vegetal.

Miricetina are ponderea cea mai mare în extractul de *Solidago virga aurea* indiferent de tipul de solvent, în schimb în celelalte extracte vegetale nu a fost determinată.

Extractele etanolice au conținutul cel mai ridicat în flavonoidele cercetate, ceea ce se explică prin solubilitatea mai mare a compușilor de interes în etanol decât în metanol și apă.

Deși conținutul în flavonoide a extractului de *Allium ursinum* este mai mare în comparație cu a extractului de *Viscum album*, extractul de *Viscum album* are o activitate antioxidantă mai mare, lucru care poate fi explicat prin conținutul ridicat de antioxidanți prezenți [125,129].

În literatura de specialitate se discută mult despre mecanismele activității antioxidante ale flavonoidelor. Până acum, mecanismele și cerințele structurale nu au fost pe deplin înțelese, lucru confirmat și de rezultatele obținute.

Rezultatele experimentale obținute din analiza cromatografică au fost într-o bună concordanță cu cele obținute folosind **metoda etalonului extern** de regăsire a unor cantități cunoscute de flavonoide pure.

S-a încercat găsirea unei corelații între conținutul de quercetină, miricetină, rutină, kamferol și activitatea antioxidantă a celor șapte extracte cercetate, dar rezultatele obținute nu sunt satisfăcătoare, ceea ce înseamnă că quercetina, miricetina, rutina și kamferolul nu sunt singurele responsabile de activitatea antioxidantă.

Conform rezultatelor obținute, extractul de *Solidago virga aurea* este planta medicinală reprezentativă din speciile de plante cercetate, lucru confirmat și de alte analize efectuate [148,150]. O parte din rezultatele obținute au constituit obiectul unor lucrări științifice [154,155].

### II.3.7. Taninuri

Taninurile sau substanțele tanante, constituie o clasă de compuși organici cu structură heterogenă de tip polifenolic.

Noțiunea de “tanin” a fost preluată din tehnologie. Compușii din această clasă sunt utilizați predilect în industria pielăriei, având proprietatea de a transforma pielea crudă în piele tăbăcită [156, 157].

Există două subclase de taninuri, ce au la bază criteriile structurale și proprietăți chimice:

- galotaninuri (taninuri hidrolizabile) ;
- catechinotaninuri (taninuri condensate).

La originea acestora se află acidul galic, respectiv catechinic (figura 19), compuși cu structura polifenolică.

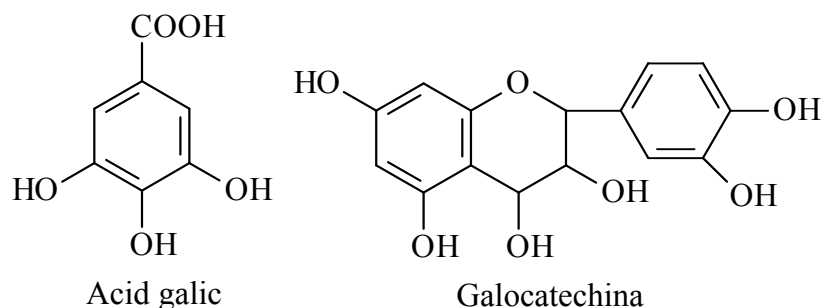


Figura 19. Structura principalilor compuși prezenți în diverse tipuri de taninuri

Galotaninurile, cunoscute și sub numele generic de “taninuri hidrolizabile” sunt esteri naturali ai glucozei cu acidul galic și/sau al unor derivați ai acestuia, cum ar fi: acidul m-galic, acidul elagic [158, 159].

Catechintaninurile, numite și catechintaninuri sau taninuri condensate sunt compuși macromoleculari rezultați prin policondensarea mai multor molecule de catechină.

Tabel 42. Subclase de taninuri

Galotaninuri	Taninul turcesc R=1:5	Taninul chinezesc R=1:9	Acidul chebulinic	Acidul chebulgic	Taninul de hamameli
Catechintaninuri	Quebrachotaninul	Taninul de salcâm	Taninul de stejar	Taninul de tip flabofenă	

R-raportul molar rest glucoză: rest acid galic.

Analiza calitativă și cantitativă a fost efectuată pe material vegetal uscat (cretișoara, leurdă, obligeană, splinuță, turița mare, vâsc și ventrilică) din anul 2007.

### II.3.7.1. Reacții de culoare și precipitare

Material vegetal: *Alchemilla vulgaris*-cretișoară, *Allium ursinum*-leurdă, *Acorus calamus*-obligeană, *Solidago virga aurea*-splinuță, *Agrimonia eupatoria*-turița mare, *Viscum album*-vâsc și *Veronica officinalis*-ventrilică—sursă Fares S.A. Orășie, Tricolorul S.A. Cluj-Napoca și S.C. STEF-MAR S.R.L.-Vâlcea.

Obținerea extractelor:

Obținerea extractelor hidroalcoolice din speciile vegetale precizate mai sus, s-a realizat conform paragrafului II.2.4.2.

- Reacții generale pentru taninuri [17].

a) Reacția cu soluție de gelatină 1%

La 1 mL soluție extract s-au adăugat 2-3 picături de soluție de gelatină 1%; se formează un precipitat care este solubil în exces de reactiv.

b) Reacția cu  $(\text{CH}_3\text{-COO})_2\text{Pb}$  10%.

La 1 mL soluție extract hidroalcoolic s-au adăugat 0,5 mL soluție  $(\text{CH}_3\text{-COO})_2\text{Pb}$  10%; se formează un precipitat galben.

c) Reacția cu FeCl<sub>3</sub> 1%

La 1 mL soluție extract hidroalcoolic s-au adăugat 0,5 mL soluție de FeCl<sub>3</sub> 1%; se formează o combinație complexă de culoare albastru-violet.

- Reacții caracteristice pentru catechinotaninuri

a) Reacția cu soluție de vanilină clorhidrică 1%

La 1 mL soluție extract hidroalcoolic s-au adăugat 0,5 mL soluție vanilină clorhidrică 1%; s-a format o combinație complexă de culoare roșie.

b) Reacția cu apa de brom

La 1 mL soluție extract hidroalcoolic s-au adăugat 2 mL apă de brom în mediu acid; s-a observat formarea unui precipitat galben.

În tabelul 43 sunt prezentate rezultatele reacțiilor de identificare pentru materialul vegetal uscat, colectat în anul 2007 și anume: *Alchemilla vulgaris*-crețișoară, *Allium ursinum*-leurdă, *Acorus calamus*-obligeană, *Solidago virga aurea*-splinuță, *Agrimonia eupatoria*-turița mare, *Viscum album*-vâsc și *Veronica officinalis*-ventrilică.

Tabel 43. Reacții de identificare a taninurilor

Reactiv utilizat	Extracte vegetale						
	<i>Alchemilla vulgaris</i>	<i>Allium ursinum</i>	<i>Acorus calamus</i>	<i>Solidago virga aurea</i>	<i>Agrimonia eupatoria</i>	<i>Viscum album</i>	<i>Veronica officinalis</i>
Soluție de gelatină 1%	pp. alb gălbui	pp. alb gălbui	pp. alb gălbui	pp. alb gălbui	pp. alb gălbui	pp. alb gălbui	pp. alb gălbui
Soluție (CH <sub>3</sub> -COO) <sub>2</sub> Pb 10%	pp. galben-verziu	pp. galben-verziu	pp. galben-verziu	pp. galben-brun	pp. galben-verziu	pp. galben-brun	pp. galben-brun
Soluție vanilină clorhidrică	colorație roșie	colorație roșie	colorație roșie	colorație roșie	colorație roșie-galbenă	colorație roșie	colorație roșie-portocalie
Soluție FeCl <sub>3</sub> 1%	pp. verde-albastru	pp. verde-albastru	pp. verde-albastru	pp. verde-albastru	pp. verde-închis	pp. verde-albastru	pp. verde-închis
Apă de brom	pp. galben	pp. galben	pp. galben	pp. galben	pp. galben	pp. galben	pp. galben

pp. - precipitat

În urma reacțiilor de culoare s-a dovedit faptul că toate extractele vegetale analizate conțin taninuri.

Extractul de *Alchemilla vulgaris* conține cea mai mare cantitate de taninuri totale evidențiată de abundența precipitatelor formate și de intensitatea colorațiilor comparativ cu celelalte extracte.

Reacțiile de identificare pentru taninuri din produsele vegetale au arătat faptul că acestea sunt mixte: hidrolizabile și condensate, în cazul tuturor probelor.

Taninurile din extractul de *Alchemilla vulgaris* (crețișoară) sunt în concentrații mai mari iar concentrația cea mai mică fiind în extractul de *Veronica officinalis* (ventrilică) lucru confirmat de diferența de intensitatea a culorii precipitatelor formate.



## Identificarea cromatografică a taninurilor

Extracțele vegetale hidroalcoolice s-au analizat prin cromatografia în strat subțire.

În vederea identificării cromatografice a taninurilor din extracte, s-a folosit plăcuțe de celuloză (Merck), iar pentru a obține o mai bună separare a componentelor s-a utilizat sistemul de solvenți butanol:acid acetic:apă = 4:1:5.

Soluție etalon, s-a folosit soluția hidroalcoolică de pirogalol de puritate 98%(standard Roth).

În toate extractele analizate a apărut spotul de culoare violetă ce corespunde pirogalolului.

Acesta spot are un  $R_f = 0.76$ , același ca cel al standardului de pirogalol.

Intensitatea mult mai mare a spotului extractului de *Alchemilla vulgaris* arată că acesta conține cea mai mare cantitate de pirogalol comparativ cu celelalte extracte, confirmată prin determinările cantitative.

### II.3.7.2. Determinarea cantitativă a taninurilor la rece cu soluție de $KMnO_4$ 0.01N.

Metoda constă în titrarea la rece cu  $KMnO_4$  a substanțelor tanante și a altor substanțe oxidabile din extractele vegetale studiate [158,159].

Titrarea se face față de o soluție convențională, în prezența indigoului carmin folosit ca și indicator de oxido-reducere.

Reactivi:

$KMnO_4$ , soluție 0,01N proaspăt preparată dintr-o soluție de  $KMnO_4$  0,01N cu factor cunoscut; sulfat de amoniu (Merck); acetonă (Merck); soluție alcoolică tartrică, ce conține 10% în volume alcool etilic absolut și 5 g/L acid tartric neutralizat cu KOH 1N (pentru prepararea acesteia, într-un balon cotat de 1000 mL s-au introdus 100 mL alcool etilic absolut, 5 g acid tartric și 33 mL KOH 1N și s-a adus la semn cu apă distilată); soluție de indigo carmin 0,15 g/L proaspăt preparată (pentru prepararea acesteia, într-un balon cotat de 1000 mL se măsoară 50 mL soluție indigo carmin 3 g/L, 50 mL soluție  $H_2SO_4$  33,33 în procente de volum și s-a completat la semn cu apă distilată).

Valoarea determinării este influențată de prospețimea soluției, caracterizată printr-o culoare albastră, vie.

Nu se vor utiliza soluții vechi de culoare albastră gălbuie sau albastru murdar.

#### Mod de lucru

Pentru obținerea substanțelor tanante cu grad mare de puritate, extractul a fost saturat cu sulfat de amoniu.

Precipitatul format a fost separat prin filtrare și supus uscării prin evaporare.

Materialul brut uscat a fost purificat prin refluxare cu acetonă. Rezidul de distilare a fost tratat cu eter și supus din nou uscării.

Pentru determinarea cantitativă a substanțelor tanante materialul uscat a fost dizolvat în apă rece.

Într-un vas de 100 ml se pipetează 10 mL soluție de indigo carmin 0,15g/L și 0,4 mL din soluția de analizat (extract hidroalcoolic).

Se titrează cu soluție  $KMnO_4$  0,01 N până la dispariția colorației albastră și apariția colorației galbene. Se notează cu  $V_1$  numărul de mL soluție  $KMnO_4$  0,01 N utilizați la titrare.

Proba titrată se păstrează pentru a putea compara colorația obținută cu colorația de la proba următoare.

Într-un alt vas de 100 mL se adaugă 10 mL soluție de indigo carmin 0,15 g/L și 0,4 mL soluție alcoolică tartrică și se titrează cu soluție de KMnO<sub>4</sub> 0,01 N până la colorație identică cu colorația probei anterior titrată. Se notează cu V<sub>2</sub> numărul de mL soluție KMnO<sub>4</sub> 0,01 N utilizați la această titrare. Determinările s-au efectuat în duplicat.

Rezultate și discuții.

Indicele de KMnO<sub>4</sub> se calculează cu formula:

$$I_{\text{KMnO}_4} = 5 \cdot (V_1 - V_2) \text{ mL KMnO}_4 \text{ 0,01 N}$$

Indicele de KMnO<sub>4</sub> poate fi exprimat sub formă de taninuri, știind că la 1 g tanin corespunde o valoare a indicelui egală cu 25 mL KMnO<sub>4</sub> 0,01N.

Rezultatele sunt redată în tabelul 44. Reproducibilitatea a fost bună.

Tabel 44. Conținutul în taninuri a extractelor vegetale

Extract vegetal	Conținutul în taninuri [ g/100 g material vegetal]
<i>Alchemilla vulgaris</i>	8.05
<i>Allium ursinum</i>	1.60
<i>Acorus calamus</i>	1.70
<i>Solidago virga aurea</i>	5.40
<i>Agrimonia eupatoria</i>	6.50
<i>Viscum album</i>	2.60
<i>Veronica officinalis</i>	0.10

Extracțele hidroalcoolice de *Alchemilla vulgaris*, *Agrimonia eupatoria* *Solidago virga aurea* au valorile cele mai mari, în schimb, extractul de *Veronica officinalis* are conținutul în substanțe tanante cel mai scăzut.

Rezultatele obținute arată că conținutul de substanțe tanante scade în ordine *Alchemilla vulgaris* > *Agrimonia eupatoria* > *Solidago virga aurea* > *Viscum album* > *Acorus calamus* > *Allium ursinum* > *Veronica officinalis*.

Din tabelul 44 se poate observa valorile cele mai mari în taninuri în extracțele la care s-a cercetat partea aeriană a plantei.

În schimb dacă s-a făcut dozarea taninurilor din rădăcină (obligană), conținutul a fost mult mai scăzut.

Se poate afirma deci că variația conținutului în taninuri este dată de partea vegetală a plantei studiate.

Rezultatele obținute au constituit obiectul a două lucrări științifice [160, 161].

### II.3.7.3. Determinarea cantitativă a acidului galic prin cromatografie de lichide de înaltă performanță ( HPLC )

Acidul galic cu denumirea științifică de acid 3,4,5 - trihidroxibenzoic, se găsește în stare liberă în coaja de stejar, gogoșile de ristic de pe frunzele de stejar, frunze, rădăcini și partea aeriană ale plantelor, etc.

Din punct de vedere fiziologic, acidul galic este considerat factor de protecție al plantelor împotriva infecțiilor bacteriene (precipită microorganismele), antioxidant (puternic reducător), transportor de hidrogen (participă la sisteme redox celulare).

Cromatografia de lichide de înaltă performanță a fost utilizată pentru determinarea compușilor fenolici, acidul galic fiind unul din compușii fenolici cel mai întâlnit în extractele vegetale.

Materialul vegetal utilizat a fost:

*Alchemilla vulgaris*-crețișoară, *Allium ursinum*-leurdă, *Acorus calamus*-obligeană, *Solidago virga aurea*-splinuță, *Agrimonia eupatoria*-turița mare, *Viscum album*-vâsc și *Veronica officinalis*-ventrilică.

Extractele au fost obținute conform paragrafelor II.2.2. și II.2.4.

Reactivi

metanol p.a. (Merck); etanol 96%(Merck); acid fosforic de puritate cromatografică (Merck); acid galic (puritate 99%) (Roth).

Aparatura și modul de lucru

Cromatograful utilizat a fost tipul HPLC Varian Pro Star model 240, fiind compus dintr-o pompă ternară, injector automat, termostat fixat la temperatura camerei și detector UV-VIS (UV-VIS VARIAN MODEL 345).

Separarea cromatografică s-a realizat pe o coloană cromatografică de tipul Inertsil 5C8-3, 250 x 4,6 mm.

Faza mobilă a constat din amestec de metanol:tampon fosfat în raport volumetric 45:55. Detecția s-a realizat la 215 nm.

Debitul fazei mobile a fost 1mL/minut. Volumul de injectare a fost de 5μL. Pentru trasarea drepte de etalonare s-au utilizat următoarele concentrații de standard specificate în tabelul 45.

Tabel 45. Concentrațiile de acid galic

Standard/ Concentrație	Aria pic [u.a]	Acid galic [mg/mL]
C <sub>1</sub>	1733333	0.15000
C <sub>2</sub>	850000	0.07500
C <sub>3</sub>	416666	0.03750
C <sub>4</sub>	208333	0.01875
C <sub>5</sub>	166666	0.01500
C <sub>6</sub>	111000	0.01000
C <sub>7</sub>	83333	0.00750

Rezultate obținute

Ecuția corespunzătoare drepte de etalonare pentru acidul galic a fost:

$$y = 1,0674 \cdot 10^7 x - 1,0401 \cdot 10^4$$

Dreapta de etalonare a avut coeficientul de corelare:

- $r^2 = 0,9998$

Cromatogramele corespunzătoare celor șapte extracte sunt redată în anexa 3.

Timpii de retenție și concentrațiile de acid galic pentru extractele metanolice, etanolice sunt prezentate în tabelele 46 - 50.

Tabel 46. Timpii de retenție și conținutul de acid galic al extractelor hidroalcoolice (metanol 96% )

Extract vegetal	Timp de retenție $t_r$ [min]	Conținutul în acid galic [mg/mL]
<i>Alchemilla vulgaris</i>	4.327	0.0104
<i>Allium ursinum</i>	4.479	0.0576
<i>Acorus calamus</i>	4.290	0.0055
<i>Solidago virga aurea</i>	4.502	*
<i>Agrimonia eupatoria</i>	-	-
<i>Viscum album</i>	-	-
<i>Veronica officinalis</i>	4.564	0.0011

\* - urme

Tabel 47. Timpii de retenție și conținutul de acid galic al extractelor hidroalcoolice (metanol 80% )

Extract vegetal	Timp de retenție $t_r$ [min]	Conținutul în acid galic [mg/mL]
<i>Alchemilla vulgaris</i>	4.335	0.0092
<i>Allium ursinum</i>	4.467	0.0065
<i>Acorus calamus</i>	4.317	0.0020
<i>Solidago virga aurea</i>	4.500	0.0052
<i>Agrimonia eupatoria</i>	-	-
<i>Viscum album</i>	-	-
<i>Veronica officinalis</i>	4.322	0.0184

Tabel 48. Timpii de retenție și conținutul de acid galic al extractelor hidroalcoolice (etanol 96% )

Extract vegetal	Timp de retenție $t_r$ [min]	Conținutul în acid galic [mg/mL]
<i>Alchemilla vulgaris</i>	4.327	0.0044
<i>Allium ursinum</i>	4.415	0.0076
<i>Acorus calamus</i>	4.276	0.0010
<i>Solidago virga aurea</i>	4.528	0.0045
<i>Agrimonia eupatoria</i>	4.312	0.0182
<i>Viscum album</i>	4.186	0.0044
<i>Veronica officinalis</i>	-	-

Tabel 49. Timpii de retenție și conținutul de acid galic al extractelor hidroalcoolice (etanol 96% ) obținute la baia cu ultrasunete

Extract vegetal	Timp de retenție $t_r$ [min]	Conținutul în acid galic [mg/mL]
<i>Alchemilla vulgaris</i>	4.407	0.0020
<i>Allium ursinum</i>	4.455	0.0066
<i>Acorus calamus</i>	4.215	0.0015
<i>Solidago virga aurea</i>	4.479	0.0055
<i>Agrimonia eupatoria</i>	4.327	0.0125
<i>Viscum album</i>	4.285	0.0050
<i>Veronica officinalis</i>	-	-

Rezultatele obținute arată că extractele obținute la baia cu ultrasunete folosind ca solvent etanol 60% au conținutul cel mai ridicat în acid galic. Acest lucru poate fi explicat prin faptul că în câmp ultrasonor are loc intensificarea transferului de substanță în solvent.

Tabel 50. Timpii de retenție și conținutul de acid galic al extractelor hidroalcoolice (etanol 60% ) obținute la baia cu ultrasunete

Extract vegetal	Timp de retenție $t_r$ [min]	Conținutul în acid galic [mg/mL]
<i>Alchemilla vulgaris</i>	4.407	0.0070
<i>Allium ursinum</i>	4.435	0.0043
<i>Acorus calamus</i>	4.294	0.0029
<i>Solidago virga aurea</i>	4.326	0.0186
<i>Agrimonia eupatoria</i>	4.315	0.0123
<i>Viscum album</i>	4.287	0.0096
<i>Veronica officinalis</i>	-	-

Sub aspectul cantitativ, conținutul de acid galic a fost determinat pentru materialul vegetal din anul 2006. Pentru a pune în evidență variația conținutului de acid galic din extractele studiate s-a făcut media aritmetică a rezultatelor prezentate în tabelele anterioare.

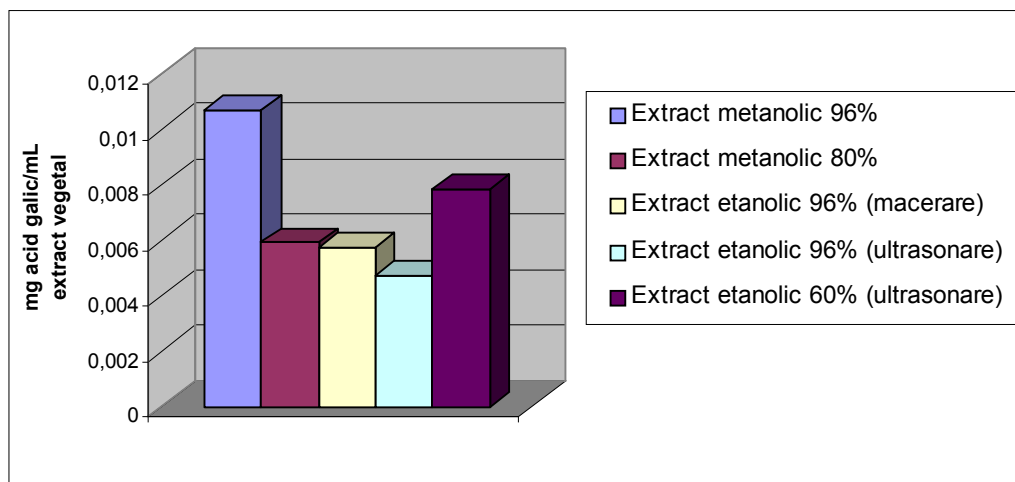


Figura 20. Variația conținutului de acid galic în extractele vegetale cercetate.

Extractele de *Allium ursinum* au conținutul cel mai ridicat de acid galic în toate cele cinci tipuri de extracte.

Se poate constata o influență a compoziției amestecului de extracție (raport metanol:apă) asupra conținutului în acid galic al extractelor vegetale hidroalcoolice studiate.

Scăderea procentului de metanol de la 96% la 80% a determinat o creștere semnificativă în cazul extractului de *Veronica officinalis* a acidului galic de la 0,0011 mg/mL la 0,0184 mg/mL.

Un comportament asemănător a fost întâlnit și în cazul în care solventul a fost etanol. Rezultatele obținute indică faptul că cantitatea de acid galic exprimată ca mg/mL extract vegetal variază astfel:

- 0,0011-0,0576 mg/mL pentru extractul metanolic 96%;
- 0,0020-0,0184 mg/mL pentru extractul metanolic 80%;
- 0,0010-0,0182 mg/mL pentru extractul etanolic 96%;
- 0,0020-0,0125 mg/mL pentru extractul etanolic 96% obținut la baia cu ultrasunete;
- 0,0029-0,0186 mg/mL pentru extractul etanolic 60% obținut la baia cu ultrasunete.

O parte din rezultatele obținute au constituit obiectul unei lucrări științifice [162].

### II.3.8. Compuși polifenolici

Pentru ca un fenol să posede o activitate antioxidantă semnificativă este necesar ca gruparea hidroxil să fie ecranată de cel puțin o grupare cu volum mare cum ar fi t-butil, ciclohexil, benzil,  $\alpha$ -metilbenzil [163].

Fenolii ecranati formează prin reacția cu radicali peroxi, aroxili stabili, puși în evidență prin spectre de rezonanță paramagnetică nucleară, sau chiar izolați în atmosferă inertă.

În cazul fenolilor conținând heteroatomi O,N,S, la substituții din poziția 4 sau 2, se observă că atomi de oxigen influențează negativ activitatea antioxidantă, atunci când aceștia se găsesc în substituții din poziția 4, în timp ce prezența lor la substituții din poziția 2 are un efect favorabil.

În cazul atomilor de azot, situația este inversă. Atomii de sulf au în ambele cazuri efect favorabil [163].

Pirocateholul și derivații săi alchilați sunt antioxidanți eficace în timp ce derivații 2-alcoxifenolilor prezintă o activitate antioxidantă redusă.

De altfel din numeroase studii privind activitatea antioxidantă a fenolilor s-a constatat că cel mai puternic efect antioxidant s-a observat în cazul 2,6-di-terț-butilhidrochinonei [163].

Micșorarea activității antioxidante, ca urmare a implicării hidroxilului într-o legătură de hidrogen, poate fi explicată dacă ținem seama și de faptul că activitatea antioxidantă depinde și de reactivitatea fenolilor față de radicali peroxi.

Polifenolii din extractele vegetale cercetate au fost identificați prin cromatografie în strat subțire, respectiv au fost dozați cantitativ [164].

### II.3.8.1. Identificarea calitativă a compușilor polifenolici

Identificarea calitativă a compușilor polifenolici s-a realizat prin cromatografie în strat subțire a extractelor etanolice 96% ; 1 g pulbere de material vegetal uscat fin mărunțit aparținând plantelor cercetate a fost supus extracției cu 9 mL alcool etilic 96%, pe baia de apă până la temperatura de fierbere a solventului, după care s-a întrerupt fierberea și s-a răcit soluția.

Extractele astfel obținute au fost filtrate și s-au adus la un volum de 10 mL cu același solvent.

În paralel s-a supus cromatografierii și standardul de pirocatechină ( grad de puritate 99% ) (Roth).

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

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

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

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

### II.3.8.2. Determinarea conținutului de polifenoli totali [130, 165].

#### 1. Principiul metodei

Determinarea conținutului de polifenoli totali din surse vegetale prin măsurarea densității optice a unui extract primar care prin complexare cu reactivul Folin-Ciocalteu absoarbe în domeniul VIZ la lungimea de undă  $\lambda = 750$  nm.

#### 2. Reactivi și materiale

Reactivi:

Etanol, puritate analitică (40 %)

Reactiv Folin-Ciocalteu 0,1 N)

Carbonat de sodiu (sol.7,5% ) (Merck)

Apă distilată

Acid galic - standard ( grad de puritate 99% ) (Roth).

Obținerea extractelor hidroalcolice s-a realizat conform paragrafului II.2.4.1.

### 3. Aparatura utilizată

Balanța analitică Kern cu precizie de patru zecimale;

Baie de ultrasonare TPC-25 ;

Spectrofotometru multidetecție Biotek, domeniul de măsurare UV-VIZ 190-800 nm.

### 4. Trasarea curbei de calibrare

Cantitatea totală de polifenoli se exprimă în raport cu o curbă de calibrare a acidului galic.

Pentru prepararea standardului se cântăresc cu exactitate, la balanța analitică, 25 mg acid galic și se introduc într-un balon cotat de 25 mL.

Se adaugă 15 mL etanol 40% și se sonichează până la dizolvare completă, rezultând o soluție de concentrație 1mg/mL. Soluția se completează cu solvent până la 25 mL.

Aceasta reprezintă soluția standard de concentrație 1 mg/mL din care se prepară 5 diluții de lucru: 1mg/100mL; 0,5mg/100 mL; 0,25mg/100 mL; 0,125 mg/100mL și 0,0625 mg/100mL.

Se ia 1mL soluție standard și se introduce într-un balon cotat de 100 mL, se adaugă 60-70 mL apă distilată, se agită, apoi se adaugă 5 mL reactiv Folin-Ciocalteu și se omogenizează.

După 1 minut și înainte de 8 minute se adaugă 15 mL soluție carbonat de sodiu 7,5%. Se notează acest moment ca fiind momentul "0" și se omogenizează din nou.

Se aduce totul la volum de 100 mL cu apă distilată. Se obține astfel diluția soluției standard de 1 mg/100 mL. După 2 ore se citește absorbanta la  $\lambda = 750$  nm față de martor (blank). Martorul se prepară în același mod, înlocuind 1 mL soluție standard cu 1 mL etanol 40 %.

Pentru celelalte 4 diluții se procedează la fel, volumul de soluție standard fiind 0,5 mL, 0,25 mL, 0,125 mL și 0,0625 mL.

Pentru trasarea curbei de calibrare se reprezintă grafic absorbantele citite în funcție de concentrația de acid galic.

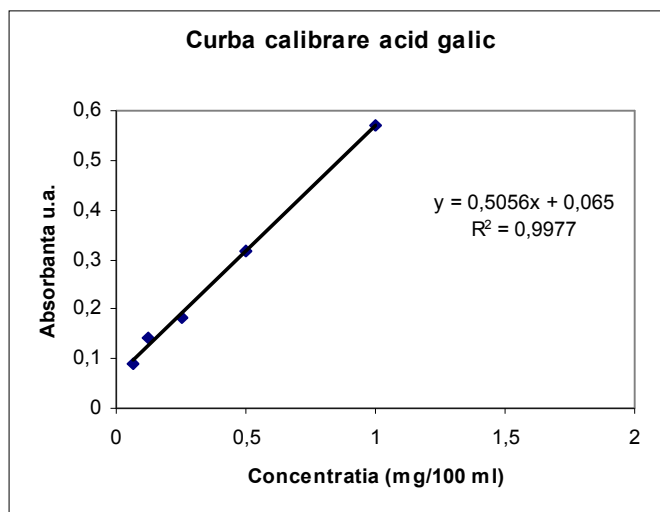


Figura 21. Curba de calibrare a acidului galic



#### 5. Determinarea polifenolilor totali din probe vegetale.

Extractele alcoolice s-au filtrat prin hârtie de filtru calitativă.

Din filtratul obținut se ia 1 mL, se introduce într-un balon cotat de 100 mL, se adaugă 60-70 mL apă distilată, se agită. Se adaugă 5 mL reactiv Folin-Ciocalteu și se omogenizează.

După 1 minut și înainte de 8 minute se adaugă 15 mL soluție carbonat de sodiu 7,5%.

Se notează acest moment ca fiind momentul "0" și se omogenizează din nou.

Se aduce totul la un volum de 100 mL cu apă distilată.

După 2 ore se citește absorbanta probelor la  $\lambda = 750$  nm față de martor (blank).

Din ecuația curbei de calibrare se calculează cantitatea de polifenoli totali (exprimată în mg/mL extract vegetal).

Rezultatele obținute pentru cele șapte extracte vegetale sunt prezentate în tabelul 51.

Tabel 51. Conținutul de polifenoli totali din extractele vegetale etanolice cercetate

Extract vegetal	<i>Alchemilla vulgaris</i>	<i>Allium ursinum</i>	<i>Acorus calamus</i>	<i>Solidago virga aurea</i>	<i>Agrimonia eupatoria</i>	<i>Veronica officinalis</i>	<i>Viscum album</i>
Absorbanța extract	0.573	0.331	0.240	0.536	0.541	0.300	0.365
Absorbanța extract - Absorbanța martor	0.523	0.281	0.190	0.486	0.491	0.250	0.315
Cantitate polifenoli [mg/mL]	0.905	0.427	0.247	0.833	0.842	0.365	0.493

Rezultatele analizei cantitative indică faptul că un conținut ridicat de polifenoli prezintă extractele de *Alchemilla vulgaris*, *Agrimonia eupatoria* și *Solidago virga aurea*, în schimb extractul obținut din rădăcina de *Acorus calamus* are conținutul cel mai scăzut de polifenolii.

Conținutul ridicat în compuși fenolici a extractului de *Alchemilla vulgaris* și *Solidago virga aurea*, coroborat cu celelalte rezultate obținute [147,150] arată ca cele două plante sunt reprezentative în comparație cu celelalte plante investigate din punct de vedere a principiilor active pe care le conțin.

Rezultatele obținute constituie obiectul unei lucrări științifice [166].

#### II.4. Analiza unor compuși naturali din extractele vegetale cercetate prin spectrometrie de masă

Din cauza lipsei coloanelor de separare necesare cromatografiei de lichide de înaltă performanță pentru determinarea cantitativă a acidului ascorbic, pirogalolului și catechinei, un studiu mai detaliat asupra compoziției extractelor hidroalcoolice a plantelor bogate în compuși fenolici prin spectrometrie de masă devine necesar.

Spectrometria de masă permite efectuarea unei analize calitative (compoziția și structura moleculei) și a unei analize semicantitative, prin măsurarea intensității semnalului cu ajutorul spectrelor de masă.

Față de alte tehnici analitice, principalul avantaj al spectrometriei de masă îl constituie marea specificitate și sensibilitate.

Specificitatea rezultă din faptul că sunt foarte puține specii ionice care au același  $m/z$  și din fragmentările caracteristice.

Fragmentele rezultate permit determinarea structurii și a masei moleculare. Sensibilitatea ridicată este oglindită de cantitatea de probă necesară pentru o analiză completă și care poate scădea până la nivel sub pico molar [77,82].

În perioada postgenomică, spectrometria de masă s-a dezvoltat în mod continuu, dovedindu-se una dintre cele mai puternice tehnici de analiză utilizate în vederea elucidării structurii moleculelor obținute din eșantioane biologice. Potențialul acestei metode în bioanaliza structurală de mare sensibilitate a crescut semnificativ o dată cu introducerea ionizării prin electrospray (ESI) și a ionizării prin desorbție cu laser de pe o matrice (MALDI), precum și prin posibilitatea stabilirii secvenței speciilor ionice complexe cu ajutorul unor tehnici eficiente de disociere bazate pe fragmentare multiplă ( $MS^n$ ). Tehnica ultramodernă nano ESI  $MS^n$ , atât în varianta cu ionizare pozitivă cât și negativă, și-a dovedit utilitatea în determinarea secvenței unităților constituente ale biomoleculelor, pornind de la cantități minime de material biologic.

Ionizarea prin electrospray este o tehnică de ionizare la presiune atmosferică și temperatură ambiantă, pentru care principiul de formare a ionilor în fază gazoasă este foarte diferit de cel cu ionizare prin impact electronic (EI), ionizare chimică (CI), ionizare chimică la presiune atmosferică (APCI) sau prin bombardament cu atomi rapizi (FAB). Diferența majoră dintre ESI și tehnicile de ionizare enumerate mai sus constă în faptul că în ESI proba este dizolvată într-o soluție cu solvenți polari și eventual cu adaos de electroliți în concentrație scăzută ( $10^{-5}$ - $10^{-3}$  mol/L) și se pulverizează la presiune atmosferică printr-un tub capilar menținut la un potențial ridicat.

Din această electropulverizare rezultă picături încărcate electric din care, ulterior, solventul se evaporă obținându-se ioni pseudomoleculari atât în tehnica ionilor pozitivi ( $[M+nH^+]^{n+}$ ,  $[M+nNa]^{n+}$  etc.) cât și în cea a ionilor negativi ( $[M-nH^+]^{n-}$ ,  $[M+nCl]^{n-}$  etc.) în fază gazoasă.

În contrast cu ionizările prin EI, CI sau FAB, unde ionii multipli încărcăți se observă foarte rar, unul din avantajele majore al acestui tip de ionizare îl reprezintă facilitatea obținerii ionilor multipli încărcăți în fază gazoasă.

O consecință importantă a acestui fapt o reprezintă reducerea raportului  $m/z$  al ionilor, ceea ce permite înregistrarea spectrului de masă al moleculelor mari precum cele de peptide, proteine, oligonucleotide, compuși organometalici, polimeri, medicamente anticancer, pesticide, fosfopeptide etc.

ESI este o tehnică de ușoară ionizare (soft ionization method) care, la parametri normali de funcționare, produce slabă fragmentare în-source astfel încât ionii pseudomoleculari sunt vizibili în spectrul ESI-MS ceea ce permite determinarea cu ușurință a masei moleculare.

ESI prezintă o sensibilitate foarte ridicată, ideală pentru analiza moleculelor nevolatile și fragile polare și ionice sau chiar neionice dar în solvent corespunzător (acid pentru donarea protonului sau bazic pentru formare de anioni) cu care în prezent se investighează un foarte mare număr de specii atât organice, cum sunt cele enumerate mai sus, cât și compuși anorganici, complecși anorganici, ioni coordinativi de metal în molecule organice ș.a.

În ultimii ani, performanțele ESI s-au îmbunătățit prin cuplarea ei cu tehnici de separare precum electroforeza capilară (CE) și cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC-high performance liquid chromatography) dar și cu analizoare care

permit analiza cu rezoluție ridicată a biomoleculilor de masă mare și generarea spectrului de fragmentare precum cel quadropolar hibrid cu timp de zbor (QTOF), cu rezonanță ciclotronică (FTICR) sau quadropolar ion trap (QIT) și quadropolar ion trap de mare capacitate (HCT) precum spectrometrul utilizat în partea experimentală descrisă mai jos.

Miniaturizarea și robotizarea aparaturii de analiză, suscită un interes mereu prezent în chimie, biochimie și analizele structurale iar recent în analizele clinice și biomedicină. În prezent o largă varietate de configurații ale spectrometrelor de masă sunt interfațate cu micro și nanosisteme integrate sau cu dispozitive ce permit fie infuzia de probă robotizată, fie combinarea introducerii robotizate a probei cu ionizarea pe chip. Potențialul acestor sisteme moderne largesc considerabil aria aplicabilității spectrometriei de masă în științele vieții.

Introducerea în analize biochimice de rutină a sistemelor miniaturizate de infuzie a probei în spectrometrul de masă este justificată de o serie de avantaje tehnice, analitice și economice, cum ar fi:

- (1) simplificarea strategiilor chimice și biochimice laborioase, necesare în cercetarea curentă;
- (2) identificarea la scară nanoanalitică a biomoleculilor;
- (3) eliminarea procedurilor de optimizare consumatoare de timp;
- (4) creșterea sensibilității prin reducerea drastică a consumului de probă și reactiv și prin minimizarea pierderilor de probe biologice;
- (5) reproductibilitatea avansată a măsurătorilor;
- (6) descoperirea potențială a structurilor noi, de tip biomarker, relevante din punct de vedere biologic, datorită eficienței sporite de ionizare;
- (7) raport semnal/zgomot avantajos;
- (8) fragmentare redusă în interiorul sursei, permițând astfel creșterea semnificativă a preciziei în identificarea analiților necunoscuți din eșantioane biologice;
- (9) flexibilitate și arie extinsă de aplicabilitate;
- (10) reducerea prețului de cost al analizei și al fabricării “chipurilor”;
- (11) realizarea experimentelor la scară largă, incluzând un număr mare de probe datorită minimizării intervenției factorului uman;
- (12) eliminarea posibilităților de contaminare;
- (13) flexibilitate în privința actualizării configurației și analizelor;
- (14) infrastructură necesară minimă pentru funcționare optimă;
- (15) reducerea dimensiunii sursei de ioni, facilitând astfel manipularea și transferul eficient al ionilor și posibilitatea poziționării precise în direcția orificiului de intrare în spectrometrul de masă.

Cele mai multe dintre dispozitivele pe bază de chipuri utilizate în analizele prin spectrometrie de masă moderne sunt cele fabricate din sticlă sau siliciu, utilizând o gamă largă de tehnici și metode consacrate ale industriei semiconductorilor, inclusiv fotolitografia și profilarea în profunzime cu ioni reactivi. Aceste dispozitive, precum robotul cu infuzie automată de tip NanoMate utilizat în această lucrare (figura 22) combină infuzia automată a probelor cu ionizarea de maximă eficiență prin chip, bucurându-se de o largă aplicabilitate în analiza amestecurilor complexe.

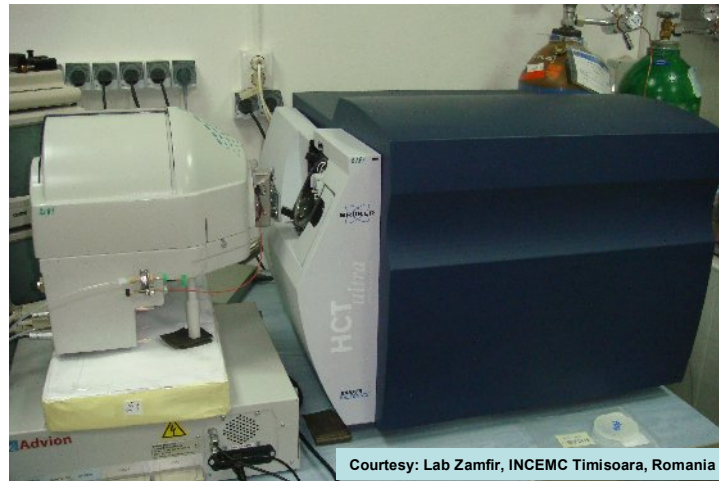


Figura 22. Robot NanoMate cu infuzie automată prin chip-electrospray în cuplaj cu spectrometrul de masă HCT MS

#### Partea experimentală

Material vegetal: *Alchemilla vulgaris*-crețișoară, *Allium ursinum*-leurdă, *Acorus calamus*-obligeană, *Solidago virga aurea*-splinuță, *Agrimonia eupatoria*-turița mare, *Viscum album*-vâsc și *Veronica officinalis*-ventricică–sursă Fares S.A. Orășie și S.C. STEF-MAR S.R.L.-Vâlcea.

Standardele analizate au fost:

- acid ascorbic – reactiv Roth, grad de puritate minim 98,5%;
- acid galic - reactiv Roth, grad de puritate minim 98%;
- quercetină - reactiv Roth, grad de puritate minim 98%;
- catechină - reactiv Roth, grad de puritate 100%;
- pirogalol - reactiv Roth, grad de puritate minim 98%;
- kamferol - reactiv Roth, grad de puritate minim 99%;
- rutină - reactiv Roth, grad de puritate minim 98%;

#### Obținerea extractelor

Extractele din materialul vegetal cercetat au fost obținute conform paragrafului II.2.4.1.

Extractul vegetal obținut a fost centrifugat la o centrifugă Hermle 2 200A [BxHxT (cm) ; 28x26x37, G = 13kg] cu 5000 rot. /min timp de 30 minute.

S-a obținut un extract hidroalcoolic cu aspect limpede de culoare galben-verde.

Reactivi: alcool metilic-Merck; apă bidistilată p.a.

În vederea caracterizării spectrale a extractelor hidroalcoolice vegetale cercetate au fost utilizate următoarele aparate:

- Spectrometru de Masă cu Capcană Ionică de Mare Capacitate și Sursă ETD, tip HCT Ultra, prevăzut cu surse de ioni ESI micro, nano și infuzie prin seringă-pompă; prevăzut cu capcană ionică de mare capacitate pentru stocarea ionilor, sursa ETD (disociere prin transfer de electroni) și sursa CID (disociere indusă prin ciocniri) și interfață cu calculator care permite

prelucrarea datelor prin utilizarea programelor Esquire Control, Data Analysis și HY Star versiunea 2005.

- Robot de infuzie Automată Nanomate 100 – este un dispozitiv complet automatizat care permite pe de o parte alegerea automată a probelor după o setare prealabilă, precum și infuzarea lor în spectrometrul de masă prin chip-electrospray.

Cuplarea HCT ultra cu acest tip de robot prezintă avantaje multiple cum ar fi:

- debit de probă foarte mic (zeci de nL/min.);
- timp de infuzie foarte mare ceea ce presupune implicit un timp de achiziție mare, deci spectre mai bune;
- posibilitatea de a obține mai multe spectre consecutiv, fără o manipulare suplimentară;
- posibilitatea de a executa infuzia în absența operatorului printr-o setare prealabilă.

Analizele de spectrometrie de masă s-au efectuat pe un spectrometru cu analizor de tip capcană ionică de mare capacitate (high capacity ion trap, HCT MS, Bruker Daltonics, Bremen, Germania) „in-house” cuplat cu un robot cu infuzie automată a probelor prin chip-electrospray (NanoMate™, Advion BioSciences, Norfolk, UK).

Instrumentul HCT MS a fost manipulat și controlat prin intermediul software-ului Esquire Control 6.1.512, iar datele experimentale au fost procesate prin portalul Data Analysis 3.4.179.

Robotul NanoMate a fost dirijat prin intermediul software-ului ChipSoft 7.1.1 rulând sub Windows XP.

#### Mod de lucru

1 μl extract vegetal studiat s-a dizolvat în 1000 μl MeOH (HPLC grade, Merck, Darmstadt, Germany).

Toate spectrele de masă au fost înregistrate în tehnica ionilor negativi în domeniul 50–1000  $m/z$ , cu o viteză de scanare de 8000  $m/z$  pe secundă. Procesul de ESI a fost inițiat prin aplicarea unui potențial de -1.4 kV la o tensiune a contraelectrodului HCT de -50 V. Azotul, cu un debit de 0.5L/min. și temperatura de 250°C a fost utilizat pentru desolvatare și ca gaz nebulizator la o presiune de 2 p. s. i.

Spectrometria de masă în stagii multiple ( $MS^n$ ) a fost realizată prin disocieri induse prin ciocnire (CID) în tehnica de selectare neautomată a ionului precursor, folosind He ultrapur ca și gaz de ciocnire. Ionul precursor a fost selectat printr-un filtru de mase de 2u.

Fragmentarea până la  $MS^4$  a fost realizată folosind o amplitudine a fragmentării de 1 V cu o pantă de creștere de la 30 la 200 % în intervalul de 40ms pentru fiecare spectru.

#### Rezultate și discuții:

Pentru identificarea acidului ascorbic, acidului galic, pirogalolului, quercetinei, kamferolului, catechinei, rutinei și a altor compuși naturali cu potențial antioxidant, se folosește spectrometria de masă folosind un spectrometru de masă cu analizor cu capcană ionică cu capacitate ridicată.

În tabelul 52 sunt prezentate rezultatele obținute prin analiza de spectrometrie de masă a standardelor investigate.

Tabel 52. Spectrul tabelar al standardelor

Standarde	Formula moleculară	Grad de puritate [ % ]	[M-H] <sup>-</sup>
Acidul ascorbic	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	98,5	175, 004
Acidul galic	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	98	168, 990
Pirogalolul	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	98	125, 113
Quercetina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	98	301, 088
Rutina	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	98	463, 184
Kamferol	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	99	285, 084
Catechina	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	100	289, 096

Masa moleculară exactă a compușilor de interes (acid ascorbic, acid galic, pirogalol, catechină, quercetină, kamferol, rutină) din extractele vegetale studiate (metanol 80%, timp de extracție 10 zile la temperatura camerei) s-a determinat folosind ionizarea prin electrospray a probelor.

Cunoscând masele moleculare cu trei zecimale se pot stabili formulele moleculare, fără a se face analiza elementară a compusului organic, utilizând în acest sens tabele cu mase moleculare exacte ale substanțelor [167].

Prin înregistrarea spectrului de masă caracteristic fiecărui extract vegetal analizat s-au obținut mai multe picuri de intensități diferite. Ioni moleculari de interes au fost izolați și fragmentați succesiv, fragmentele derivate fiind comparate cu spectrele de masă ale standardelor înregistrate în aceleași condiții.

În figura 23 este prezentat spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS pe intervale  $m/z$  înregistrat pentru extractul de *Alchemilla vulgaris* (extract metanolic 80 %, timp de extracție 10 zile la temperatura camerei). Spectrele din figura 23 sunt prelucrate prin compresie pe orizontală față de spectrele originale din figurile 4.1-4.3 (anexa 4).

Prin înregistrarea spectrului de masă al extractului de *Alchemilla vulgaris* s-au obținut picuri de intensități diferite. Acestea au fost analizate și identificate continuu prin spectrometrie de masă.

Din spectrele date în figura 23 se observă prezența în extractul de *Alchemilla vulgaris* mai intens a două picuri ce pot fi atribuite quercetinei ( $m/z = 301$ ), respectiv rutinei ( $m/z = 463$ ) și un pic cu intensitate mai mică ce poate fi atribuit kamferolului ( $m/z = 285$ ), flavonoide identificate și prin analiza HPLC a extractelor (tabel 37).

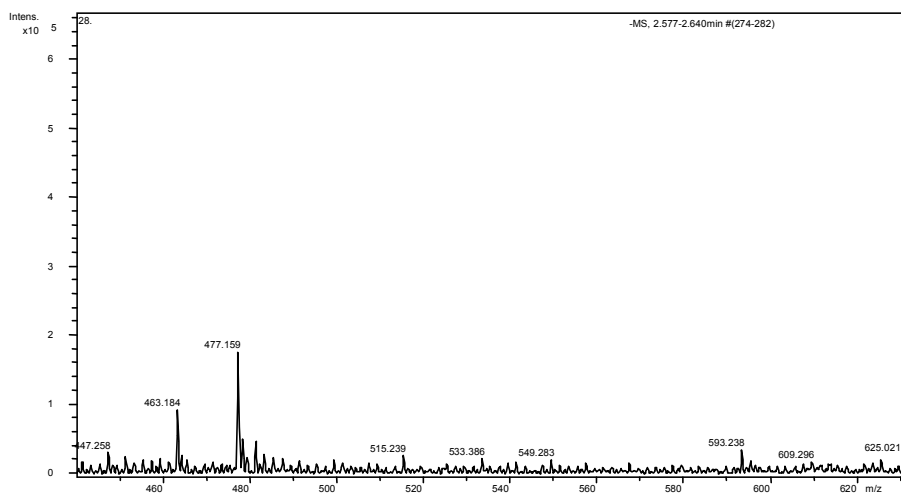
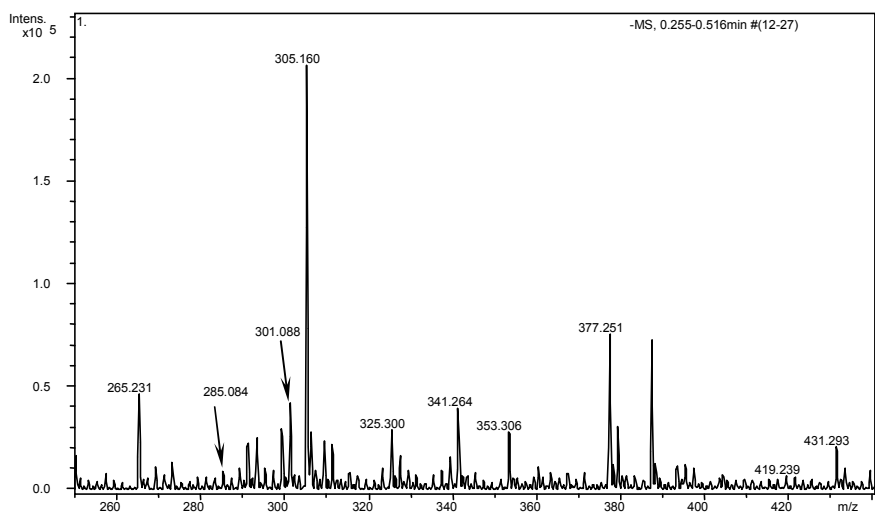
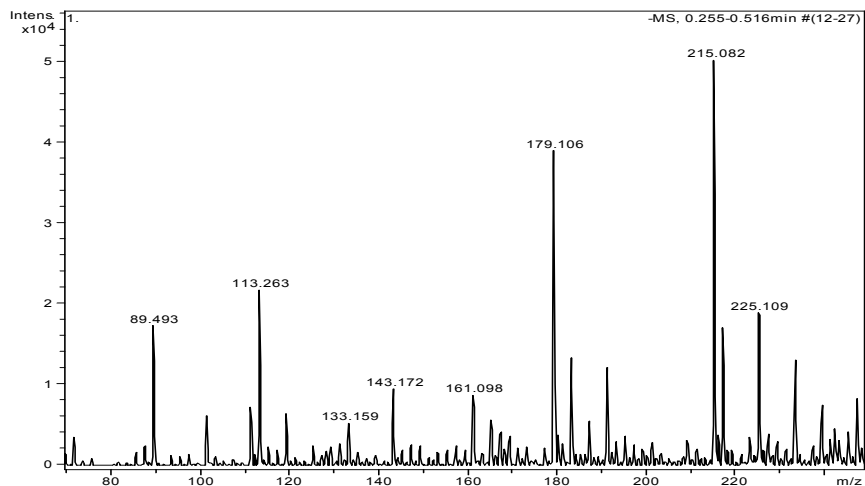


Figura 23. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS al extractului de *Alchemilla vulgaris*

Pentru identificarea unor compuși naturali (acid galic, pirogalol, quercetină, catechină, rutină, etc.) din extractele vegetale cercetate, s-a recurs la izolarea ionului molecular corespunzător, fragmentarea acestuia, urmată apoi de izolări și fragmentări



successive ale ionilor, fragmente derivate prezente în spectrele MS/MS, în vederea comparării cu spectrele de masă de fragmentare ale standardelor înregistrate în aceleași condiții.

Flavonoidele substituie cu grupări OH (de exemplu quercetina, rutina, kamferolul, etc.) pot avea pierderi de masă  $\Delta m/z = 18$  (apă) (figura 26) și  $\Delta m/z = 28$  (CO).

De asemenea în timpul fragmentării 3,7-di-O-hexozida quercetinei și rutinei se observă ca un proces comun scindarea hexozei din legătura glicozidică  $\Delta m/z = 162$ .

Urmărind fragmentarea (-)MS<sup>2</sup> a ionului molecular de la  $m/z = 625$  (figura 24) din extractul de *Alchemilla vulgaris* se poate demonstra că acesta poate fi derivat de quercetină și rutină.

Astfel, ionul fragment de la  $m/z = 463$  din extractul de *Alchemilla vulgaris* poate fi atribuit quercetin 3-hexozei, ce se obține prin fragmentarea MS<sup>2</sup> a ionului molecular cu  $m/z = 625$  prin pierdere de 162 unități de masă (hexoză dehidratată).

Se observă creșterea în intensitate a picului de la  $m/z = 463$  prezent și în spectrul inițial (figura 23), fapt atribuit procesului de fragmentare a 3,7-di-O-hexozida quercetinei prezentat în figura 26.

Picul de la  $m/z = 301$  din extractul de *Alchemilla vulgaris* poate fi atribuit ionului molecular al quercetinei, pic identic cu cel al standardului de quercetină (figura 25).

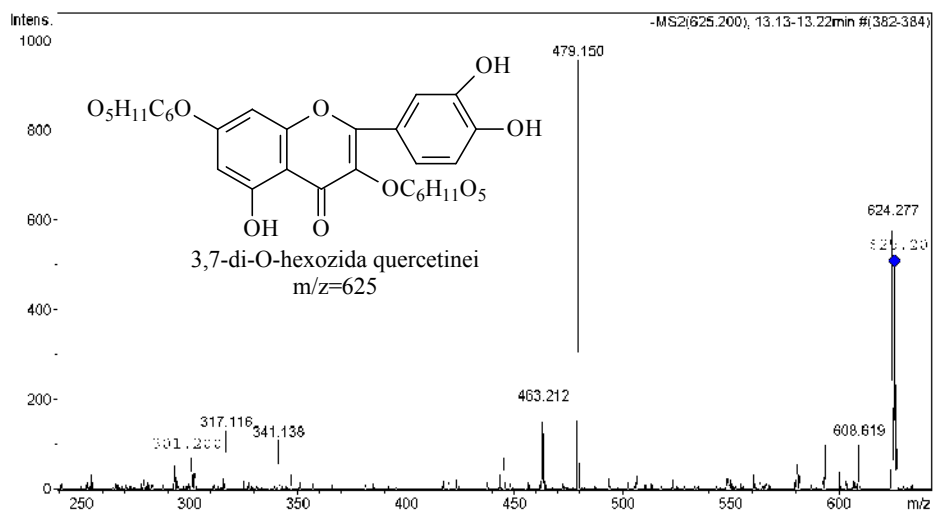


Figura 24. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS<sup>2</sup> a ionului precursor de la  $m/z = 625$  din extractul de *Alchemilla vulgaris*

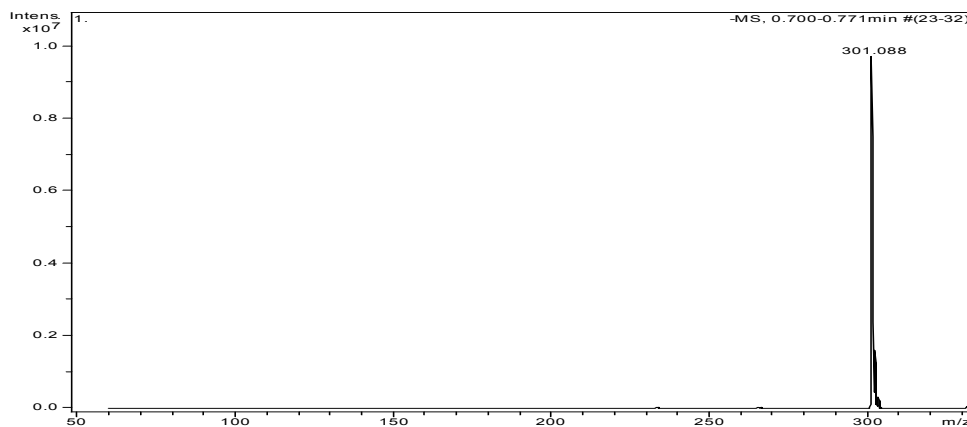


Figura 25. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS al standardului de quercetină



Atribuirea ionilor în spectrul din figura 24 e prezentată în figura 26 :

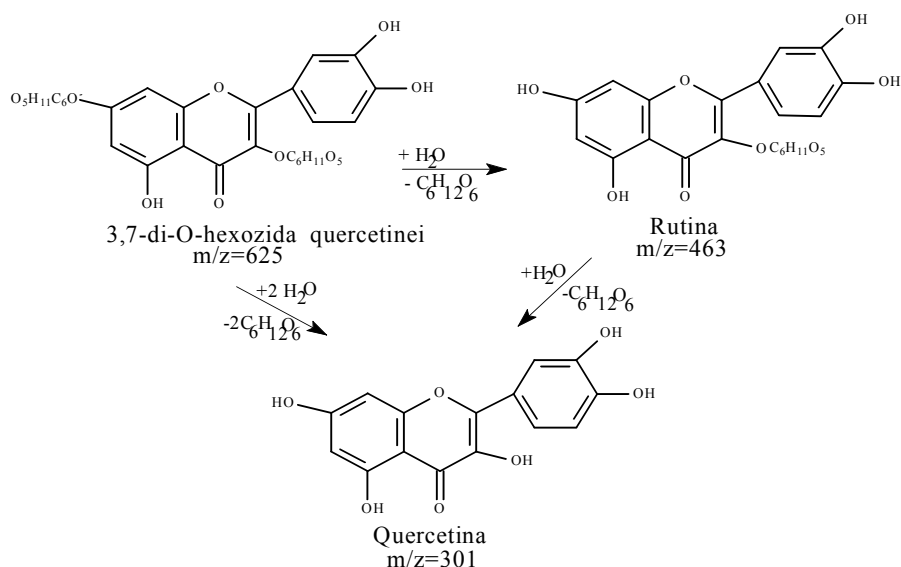


Figura 26. Atribuirea picurilor de masă

Ionul aferent pirogalolului apare ca fragment al ionului molecular de la  $m/z = 169$  din extractul de *Alchemilla vulgaris* și este pus în evidență în spectrul (-)MS<sup>2</sup> al acestuia (figura 27).

Structura corespunzătoare ionului molecular cu  $m/z = 169$  din extractul de *Alchemilla vulgaris* poate fi atribuită acidului galic (figura 27), pic identic cu cel al standardului de acid galic (figura 28).

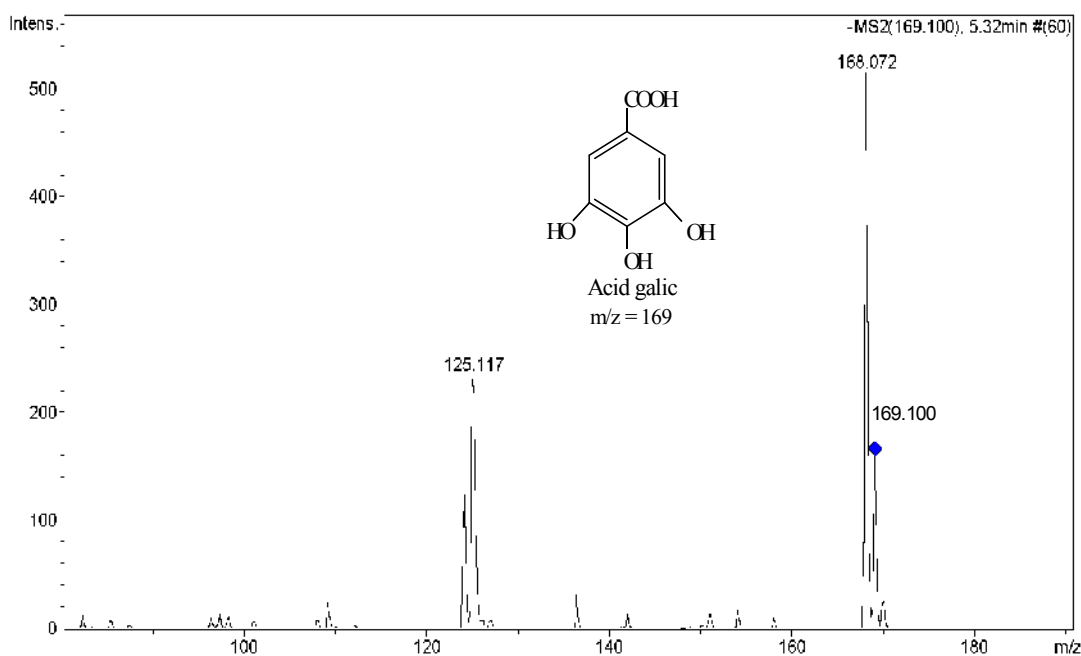


Figura 27. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS<sup>2</sup> a ionului precursor de la  $m/z = 169$  din extractul de *Alchemilla vulgaris*

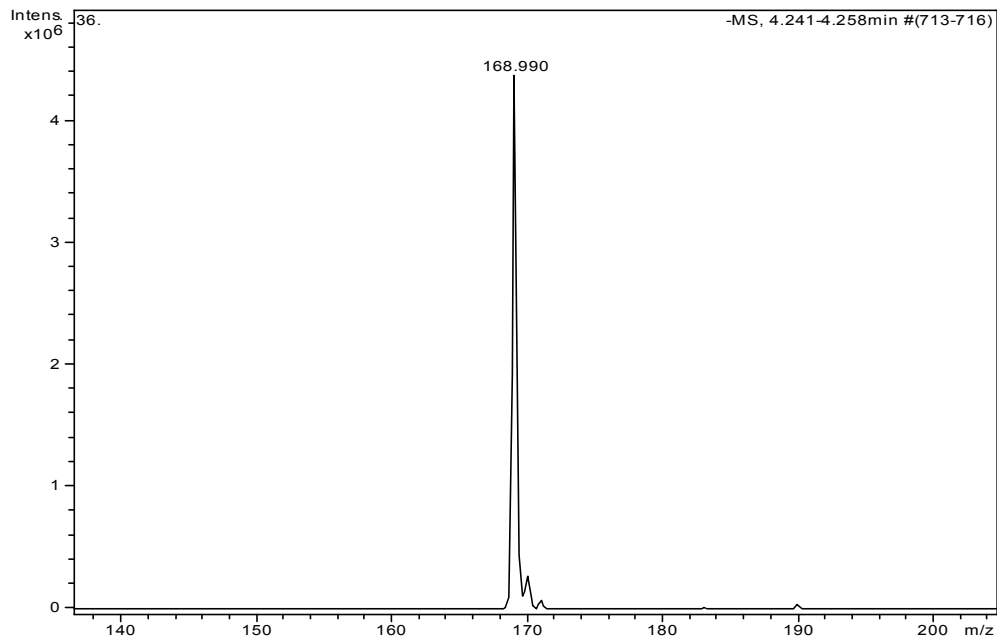


Figura 28. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS al standardului de acid galic

Astfel, ionul de fragmentare de la  $m/z = 125$  din extractul de *Alchemilla vulgaris* poate fi atribuit pirogalolului, ce se obține prin fragmentarea (-)MS<sup>2</sup> a ionului molecular precursor având  $m/z = 169$  din același extract vegetal prin pierdere de 44 unități de masă (dioxidul de carbon).

În figura 29 este redat picul molecular al soluției standard de pirogalol.

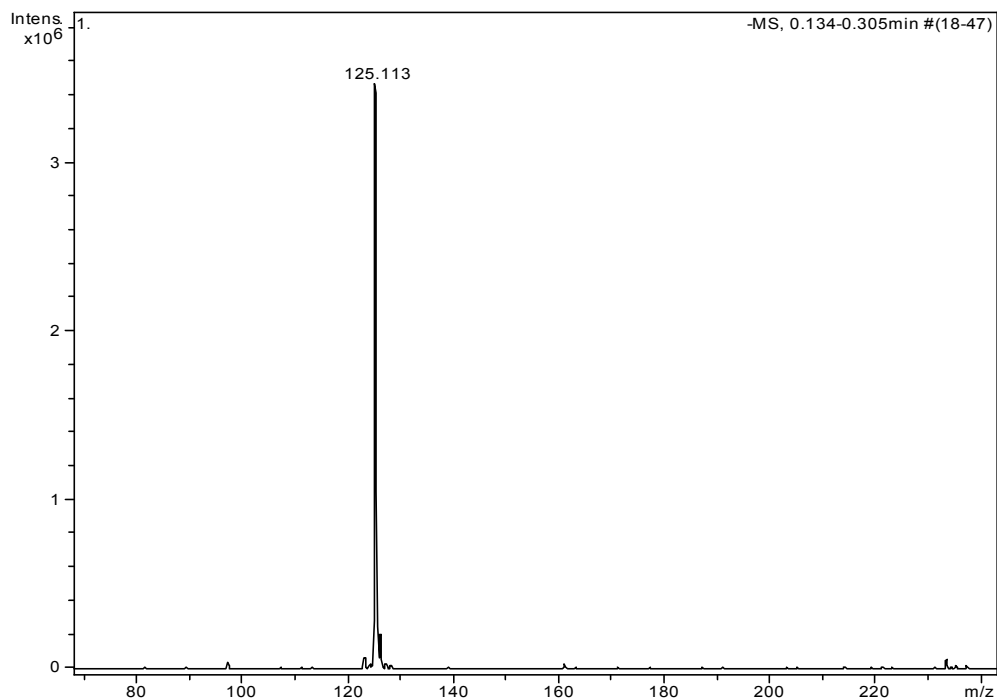
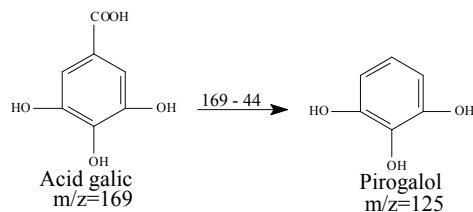


Figura 29. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS al standardului de pirogalol

Atribuirea ionilor fragment în spectrul (-)MS<sup>2</sup> (m/z=169) :



Din spectrul de masă (-)Al MS<sup>n</sup> (figura 30) al ionului molecular de la m/z = 289 din extractul de *Alchemilla vulgaris* ce poate fi atribuit catechinei se remarcă prezența genisteinei prin ionul său de la m/z = 271.

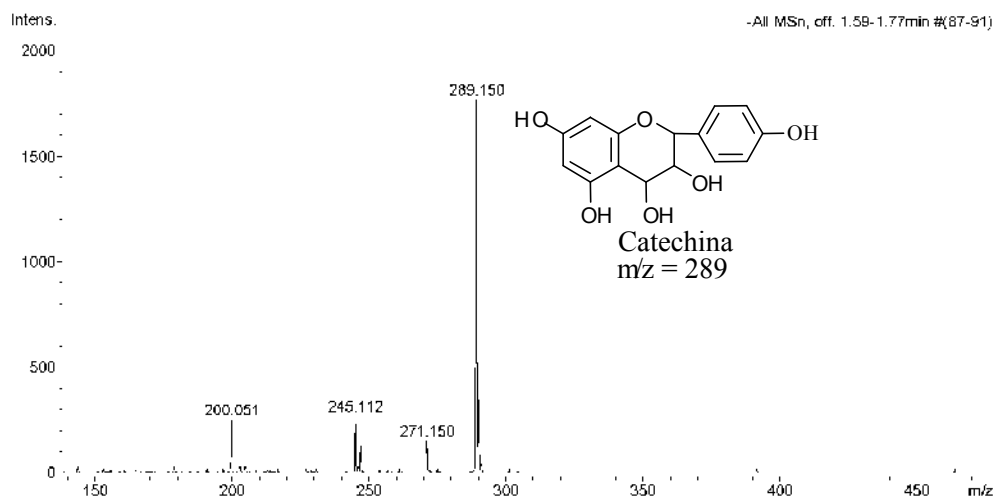


Figura 30. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT Al MS<sup>n</sup> al ionului precursor de la m/z = 289 din extractul de *Alchemilla vulgaris*

Ionul molecular cu m/z = 289 din spectrul de masă al extractului de *Alchemilla vulgaris* este identic cu ionul molecular al soluției standard de catechină analizată (figura 31).

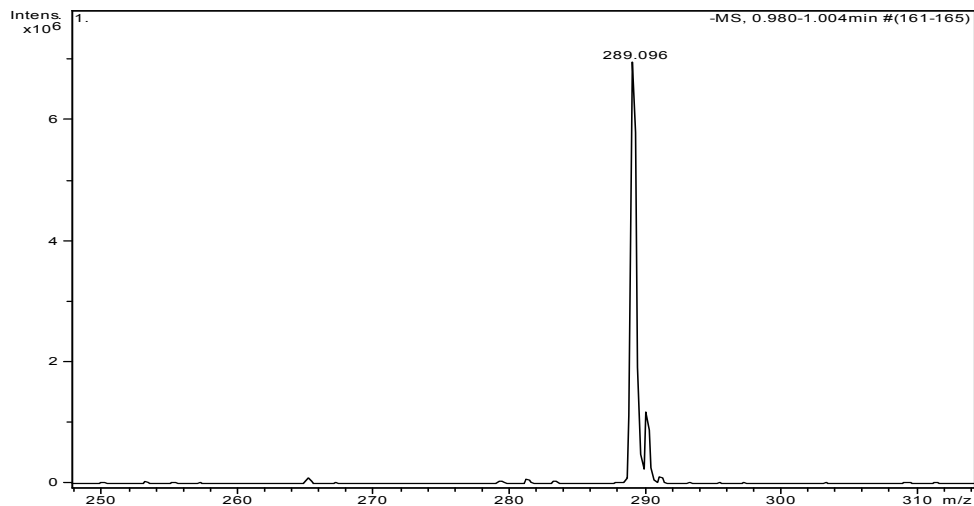
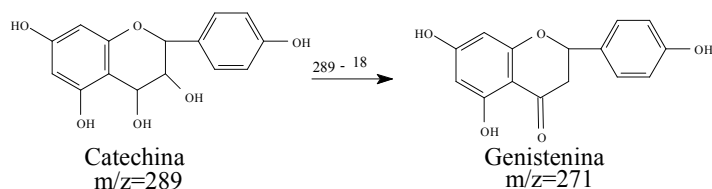


Figura 31. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS al standardului de catechină.

Atribuirea ionilor în spectrul (-)chip-ESI HCT Al MSn ( $m/z = 289$ ) :



În spectrul (-)MS<sup>2</sup> corespunzător fragmentării ionului molecular de la  $m/z = 463$  (figura 32) din extractul de *Alchemilla vulgaris*, fragmentul semnificativ apare la  $m/z = 301$ , masă ce corespunde quercetinei. În același spectru picul de fragmentare de la  $m/z = 271$  din extractul de *Alchemilla vulgaris* poate fi atribuit de asemenea genisteninei.

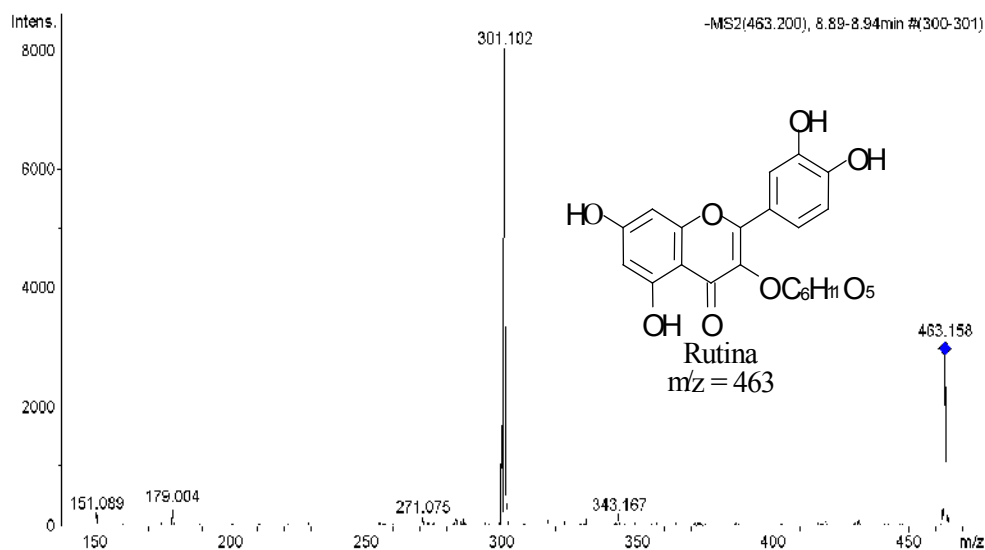
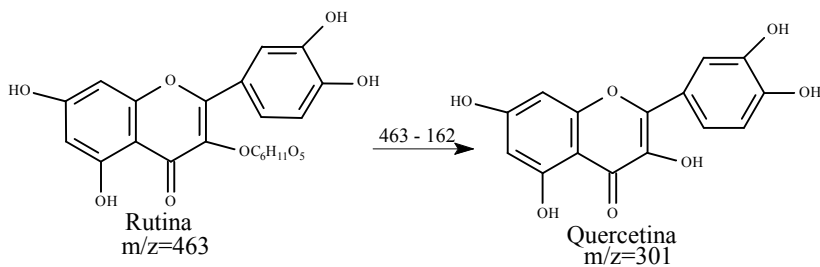


Figura 32. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS<sup>2</sup> a ionului molecular  $m/z = 463$  din extractul de *Alchemilla vulgaris*

Atribuirea ionilor în spectrul (-) chip-ESI HCT MS<sup>2</sup> ( $m/z = 463$ ) :



Nu există două substanțe care să aibă exact aceeași masă moleculară, datorită maselor fracționare pe care le posedă elementele organogene [82]. Compușii antioxidanți și compușii organici prezenți în extractul vegetal studiat variază, variația fiind dată de ponderea picului molecular, lucru pe care îl putem observa din spectrele de masă.

Spectrul tabelar al substanțelor identificate în extractul metanolic 80% de *Alchemilla vulgaris* este redat în tabelul 53.

Tabel 53. Spectrul tabelar al substanțelor prezente în extractul de *Alchemilla vulgaris*

Substanța	m/z
Pirogalol	125.113
Acid galic	168.990
Acid ascorbic	175.004
Genistenina	271.112
Kamferol	285.064
Catechină	289.096
Quercetina	301.088
Rutina	463.184
Quercetin 3,7-diglucid	625.201

Pe baza maselor moleculare calculate cu trei zecimale corespunzătoare unor substanțe organice și a picurilor moleculare obținute în urma secvențieri (-MS<sup>2</sup>, -MS<sup>3</sup>), s-au determinat standardele analizate și în extractele vegetale de *Allium ursinum*, *Acorus calamus*, *Solidago virga aurea*, *Agrimonia eupatoria*, *Veronica officinalis* și *Viscum album*.

Cele șapte standarde identificate în extractele hidroalcoolice cercetate, au avut aceleași picuri de bază. Spectrele de masă obținute după fragmentare sunt identice cu spectrele de masă ale standardelor.

Spectrele de masă ce corespund extractelor vegetale studiate sunt prezentate în anexa 4 (figurile 4.1- 4.18).

Studiul comparativ al spectrelor de masă privind standardele analizate și spectrele de masă caracteristice extractelor vegetale cercetate confirmă prezența compușilor naturali analizați.

Spectrele de masă obținute pentru extractele hidroalcoolice analizate arată că compoziția chimică a acestor extracte este foarte complexă.

Prezența celor șapte compuși cu potențial antioxidant în extractele vegetale studiate confirmă caracterul antioxidant și antiradicalic al extractelor de *Alchemilla vulgaris*, *Allium ursinum*, *Acorus calamus*, *Solidago virga aurea*, *Agrimonia eupatoria*, *Veronica officinalis* și *Viscum album*.

## II.5. Metode de analiză fizico–chimice a activității antioxidante și antiradical a extractelor vegetale cercetate

Prezența principiilor active în țesuturile plantelor face dificilă măsurarea separată a fiecărui component antioxidant.

În acest scop au fost dezvoltate în ultimii ani câteva metode de calcul pentru activitatea antioxidantă totală a mostrelor biologice.

De asemenea, au fost testate diferite medii de extracție pentru asigurarea extracției maxime a antioxidanților din probe (de cele mai multe ori extractele alcoolice s-au dovedit a fi mai eficiente decât extractele apoase) [168].

Diversele metode existente și aplicate în vederea determinării activității antioxidante sunt utilizate în vederea monitorizării și comparării activității antioxidante a produselor vegetale.

Metodele care utilizează specii de generatori de radicali liberi au avantajele că sunt rapide, ușoare, simple și nu necesită echipamente speciale.

Aceste metode sunt des folosite pentru testarea capacității compușilor de a acționa ca și inhibitori de radicali liberi sau ca donatori de hidrogen [114].

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

Măsurarea individuală a antioxidanților, prin separare, nu permite cunoașterea cu certitudine a capacității antioxidante totale a unui produs datorită efectelor sinergice care pot să se stabilească între compuși prezenți în acesta [169].

Activitatea antioxidantă este exprimată prin 3 metode:

- Metoda spectrofotometrică cu DPPH(1,1-difenil,2-picrilhidrazil ).
- Metoda permanganometrică.
- Metoda chemiluminometrică utilizând luminol.

Rezultatele cercetărilor întreprinse au fost raportate la activitatea antioxidantă a acidului ascorbic, acidului galic, quercetinei, rutinei și kamferolului care sunt considerate standarde de referință.

### II.5.1. Metoda spectrofotometrică cu DPPH

Interacțiunea dintre radicalii liberi și sistemele biologice este foarte complexă, dar, de obicei, nefavorabilă pentru acestea din urmă.

Inhibarea acestui fenomen poate preveni boli iar cunoașterea mecanismului de funcționare poate fi folositoare din punct de vedere clinic.

Ca metodă de determinare a acțiunii antiradical a extractelor analizate s-a utilizat metoda DPPH, o metodă rapidă și simplă care utilizează radicalul liber stabil DPPH(1,1-difenil-2 picrilhidrazil).

Acest radical este des folosit pentru testarea capacității compușilor de a acționa ca și inhibitori de radicali liberi sau ca donor de hidrogen, precum și pentru evaluarea activității antioxidante.

Metoda DPPH poate fi utilizată pentru probe solide sau lichide și nu este specifică pentru un anumit component, dar se aplică pentru capacitatea antioxidantă totală a probelor [114].

Principiul metodei:

Principiul acestei metode analitice este măsurarea activității antiradical a extractelor vegetale față de radicalul liber DPPH.

Structura radicalului și reducerea acestuia de către antioxidant sunt prezentate în figura 33.

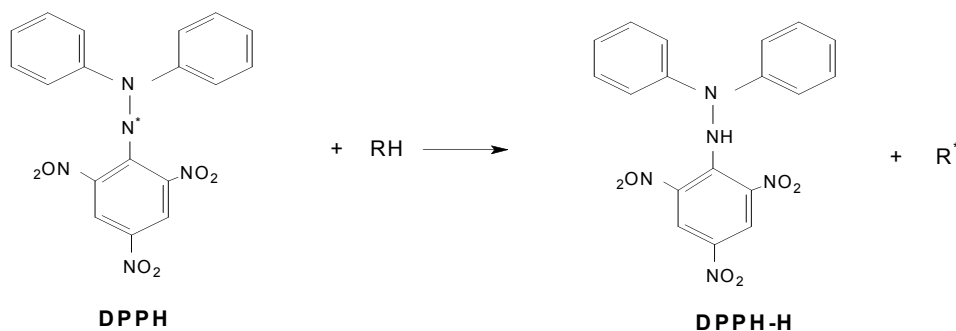


Figura 33. Structura radicalului DPPH [114]

Radicalul liber DPPH<sup>\*</sup> are absorbție maximă puternică la 517 nm, soluția fiind de culoare albastră - violet.

Culoarea se modifică până la galben când electronul nepereche captează un proton de la antioxidant, formându-se astfel forma redusă DPPH-H.

Rezultatul decolorării este stoichiometric cu respectarea numărului de electroni captați [170].

Obținerea extractelor:

Extractele vegetale s-au obținut conform paragrafului II.2.4.2.

Metoda de lucru:

Determinarea activității antiradical a extractelor vegetale studiate s-a efectuat folosind metoda propusă de Brand-Williams [171], aplicată cu mici modificări, și anume: 0,1mL extract sunt adăugați la 2,9 mL soluție DPPH<sup>\*</sup> (10<sup>-4</sup>mol/L) citirea valorilor care urmăresc scăderea absorbției realizându-se la lungimea de undă de 517 nm. În paralel se efectuează și o probă martor.

Calculul activității antiradical s-a efectuat folosind valorile absorbției extractelor la minutul 10 cu excepția extractelor de *Allium ursinum*, *Acorus calamus*, care nu au consumat radicalul 1,1-difenil-2-picrilhidrazil în cele zece minute.

Pentru fiecare extract s-au efectuat câte cinci determinări, în calcul luându-se media acestora.

Determinarea spectrofotometrică s-a realizat cu ajutorul unui Spectrofotometru UV-VIS Pharmacia LKB-Ultrospec III (Uppsala, Sweden) prevăzut cu o interfață Axxion Chromatography pentru determinarea activității antiradical.

Rezultatele cercetării sunt prezentate în tabelul 54 iar reprezentarea grafică a variației absorbției în funcție de timp este redată în figura 34.

Citirea absorbanțelor s-a realizat din două în două secunde, în tabelul 54 fiind precizate valorile absorbanțelor din minut în minut.

Tabel 54. Valorile absorbanțelor pentru extractele metanolice cercetate

Timp [min]	<i>Alchemilla vulgaris</i>	<i>Allium ursinum</i>	<i>Acorus calamus</i>	<i>Solidago virga aurea</i>	<i>Agrimonia eupatoria</i>	<i>Veronica officinalis</i>	<i>Viscum album</i>
0	1.2098	1.429	1.559	1.363	1.364	1.385	1.378
1	0.2775	1.187	1.292	0.115	0.216	0.189	0.201
2	0.2720	1.117	1.239	0.115	0.210	0.175	0.144
3	0.2665	1.070	1.210	0.115	0.207	0.174	0.140
4	0.2645	1.033	1.187	0.115	0.204	0.174	0.138
5	0.2625	1.002	1.170	0.115	0.203	0.173	0.136
6	0.2610	0.977	1.156	0.115	0.202	0.173	0.135
7	0.2595	0.954	1.143	0.115	0.199	0.172	0.134
8	0.2570	0.934	1.133	0.115	0.198	0.172	0.134
9	0.2555	0.914	1.123	0.115	0.197	0.171	0.133
10	0.2545	0.899	1.118	0.115	0.196	0.171	0.132

Activitatea antiradical a materialului vegetal analizat se exprimă ca și procent al descreșterii DPPH-ului [172].

$$\% \text{ Inhibiție} = \frac{A_0 - A_{10}}{A_0} * 100$$

unde:

$A_0$  – absorbanta extractului la  $t = 0$  min;

$t$  – timpul;

$A_{10}$  – absorbanta extractului la  $t = 10$  min.

Comparativ s-a determinat activitatea antiradical pentru standard, câte 0,1 mL soluție de acid ascorbic, acid galic, quercetină și rutină (1 mg/mL) au fost adăugați la 2,9 mL soluție de DPPH 20 mg/L și s-a urmărit continuu spectrofotometric variația absorbantei la 517 nm timp de 10 minute la temperatura camerei.

Valorile absorbanțelor pentru standardele cercetate sunt redată în tabelul 55 iar reprezentarea grafică a variației absorbantei în funcție de timp este redată în figura 35.

Tabel 55. Valorile absorbanțelor pentru standardele de acid ascorbic, acid galic, quercetină și rutină

Timp [min]	Acid ascorbic [1 mg/mL]	Acid galic [1 mg/mL]	Quercetină [1 mg/mL]	Rutină [1 mg/mL]
0	0.85714	0.85713	0.85701	0.80715
1	0.58271	0.05619	0.37767	0.55135
5	0.56934	0.054413	0.20541	0.52175
10	0.56492	0.05361	0.15013	0.50863



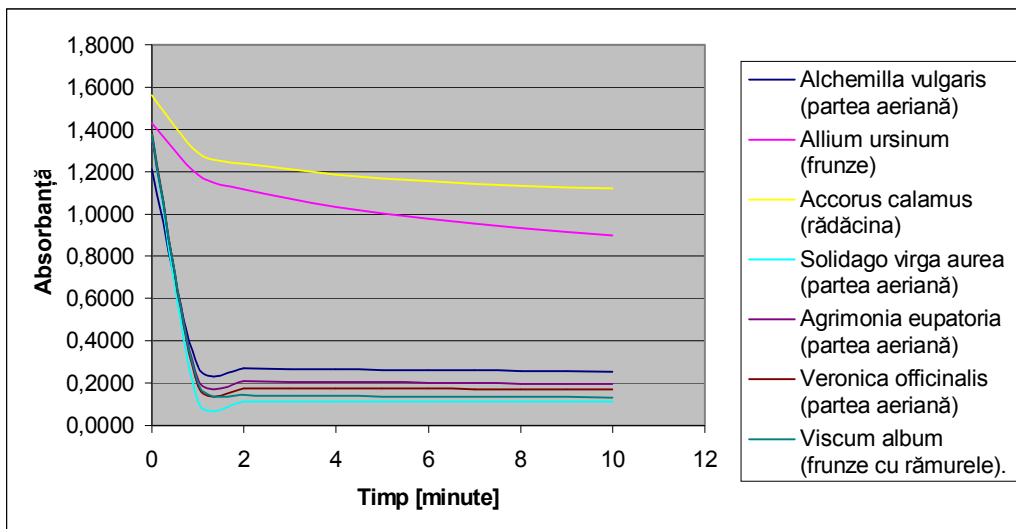


Figura 34. Activitatea antioxidantă a extractelor cercetate

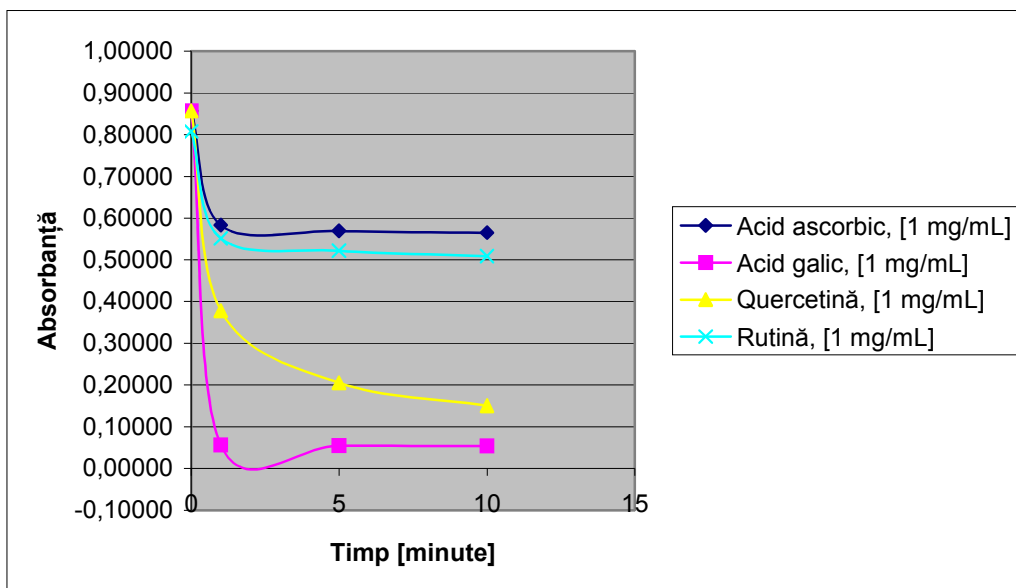


Figura 35. Activitatea antioxidantă a standardelor de acid ascorbic, acid galic, quercetină și rutină

## Rezultate și discuții

Rezultatele obținute privind inhibiția DPPH-ului pentru materialul vegetal uscat cercetat sunt precizate în tabelul 56, iar cele pentru standardele de acid ascorbic, acid galic, quercetină și rutină în tabelul 57.

Din reprezentarea grafică a absorbantăi în funcție de timp se observă că extractul vegetal de *Solidago virga aurea* consumă radicalul liber DPPH· (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) în 1'20"; *Alchemilla vulgaris*, *Agrimonia eupatoria*, *Veronica officinalis* și *Viscum album* consumă radicalul în aproximativ două minute.

Extractul de *Allium ursinum* și *Acorus calamus* nu consumă radicalul în decursul celor 10 minute fixate inițial.

Activitatea antioxidantă și antiradical a celor șapte extracte metanolice cercetate este diferită, diferență dată de compoziția chimică complexă a fiecărei plante.

Tabel 56. Inhibiția DPPH pentru extractele metanolice cercetate

Extract vegetal	<i>Alchemilla vulgaris</i>	<i>Allium ursinum</i>	<i>Acorus calamus</i>	<i>Solidago virga aurea</i>	<i>Agrimonia eupatoria</i>	<i>Veronica officinalis</i>	<i>Viscum album</i>
Inhibiția DPPH [%]	78.96	37.08	28.28	91.56	85.63	87.65	90.42

Tabel 57. Inhibiția DPPH pentru standarde

Standarde [1 mg/mL]	Acid ascorbic	Acid galic	Quercetină	Rutină
Inhibiția DPPH [%]	34.09	93.74	82.48	36.98

Acțiunea antiradical a extractelor metanolice variază astfel:

*Solidago virga aurea*>*Viscum album*>*Veronica officinalis*>*Agrimonia eupatoria*>*Alchemilla vulgaris*>*Allium ursinum*>*Acorus calamus*

Activitatea antioxidantă a standardelor variază aparent astfel:

Acid galic> quercetină> rutină> acid ascorbic

Eficiența ca antioxidant a acidului galic (93.74%) și a quercetinei (82.48%) reiese atât din valorile acțiunii antiradical calculate cât și din faptul ca soluția de DPPH (20 mg/L) s-a decolorat de la mov la galben pal după 2 minute.

Extractele metanolice, în general, prezintă activitate antiradical mai mare decât extractele etanolice. Aceste șapte plante phanerograme au fost studiate datorită conținutului acestora în compuși fenolici, acid ascorbic, flavonoide, compuși care posedă proprietăți antioxidante și antiradical.

În concluzie, se poate afirma că, cea mai mare activitate antioxidantă prezintă extractul de *Solidago virga aurea* și *Viscum album*, activitate antioxidantă apropiată de cea a soluției standardului de acid galic; extractul de *Alchemilla vulgaris* apropiată de cea a soluției standardului de quercetină, extractul de *Allium ursinum* aproape identică cu cea a soluției standardului de rutină iar extractul de *Acorus calamus* apropiată de activitatea antioxidantă a soluției standardului de acid ascorbic.

Extractele de *Solidago virga aurea* și *Viscum album*, posedă o inhibiție aproape completă. Rezultatele obținute constituie obiectul unei lucrări științifice [173]. O încercare de corelare între conținutul în quercetină, kamferol, miricetină, acid ascorbic, compuși polifenolici, acid galic a extractelor cercetate și activitatea antioxidantă duce la următoarele concluzii:

-acidul galic (tabel 46) este prezent în cantitate mai mare în extractul metanolic 96% de *Allium ursinum*, dar inhibiția DPPH pentru acest extract este mică (tabel 56), deci activitatea antiradical este dată de ponderea compușilor cu efect antioxidant prezenți în extractul de *Allium ursinum* nu doar de acidul galic;

-conținutul cel mai ridicat în quercetină, miricetină, rutină, kamferol (tabel 38), acid ascorbic (tabelele 24-25) din extractul metanolic 96% de *Solidago virga aurea* justifică activitatea antioxidantă cea mai mare (tabel 56) a acestui extract în seria plantelor studiate.

Datele obținute constituie un pas necesar către studiile în profunzime pe spectrul multiplilor reprezentanți ale claselor de antioxidanți naturali, reprezentanți care au capacitatea să inhibe radicalii liberi responsabili de apariția bolilor cronice (cancer, ateroscleroză, cataractă, etc).

## II.5.2. Metoda permanganometrică

Determinarea activității antioxidante se bazează pe reacția de oxidare a substanțelor organice cu caracter reducător, aflate în extractele de plante, de către permanganat de potasiu, în urma căreia se produce decolorarea soluției de permanganat.

Capacitatea antioxidantă este invers proporțională cu timpul de decolorare a soluției de permanganat de o anumită concentrație [174].

Materialul vegetal utilizat a fost:

*Alchemilla vulgaris*-crețișoară, *Allium ursinum*-leurdă, *Acorus calamus*-obligeană, *Solidago virga aurea*-splinuță, *Agrimonia eupatoria*-turița mare, *Viscum album*-vâsc și *Veronica officinalis* – ventrilică -sursa Fares S.A. Orăștie și S.C. STEF-MAR S.R.L.-Vâlcea. Ca substanță etalon s-a utilizat acidul ascorbic (Roth )(98.5%).

Obținerea extractelor apoase:

5 g material vegetal uscat fin mărunțit a fost supus extracției statice cu 50 mL apă fiartă și răcită, timp de 36 ore la 4°C.

Soluțiile extractive au fost filtrate, reziduu rămas a fost spălat cu apă fiartă și răcită și s-a completat până la 50 mL. Condițiile de extracție au fost identice pentru plantele studiate, diferența fiind dată de materialul vegetal.

Maceratele obținute au fost păstrate la temperatura de 4°C până în momentul efectuării analizei.

Principiul metodei

Metoda constă în determinarea vitezei de decolorare a unei soluții de permanganat de potasiu 0,1N în mediu acid, în care s-a adăugat extract vegetal, utilizând ca soluție etalon un antioxidant cunoscut și anume o soluție de acid ascorbic 1% [174].

Materiale și metodă

Reactivii necesari analizei sunt:

- soluție H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20%;
- soluție KMnO<sub>4</sub> 0.1N;
- apă distilată;
- acid ascorbic puritate 98.5%( Roth ).

Modul de lucru:

2mL din extractul vegetal se introduc într-o eprubetă de 25mL, se adaugă 1mL soluție H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% și 0,04mL (2 picături) dintr-o soluție de KMnO<sub>4</sub> 0,1N urmărindu-se timpul în care se decolorează soluția violetă de KMnO<sub>4</sub> 0.1N.

Pentru referință pentru capacitatea antioxidantă s-a efectuat o soluție etalon de acid ascorbic, acesta din urmă fiind un antioxidant recunoscut. S-a pornit de la o soluție de acid ascorbic 1%, măsurându-se timpul de decolorare pentru diferite diluții ale acestuia.

Această metodă permite o caracterizare calitativă a produselor de protecție cu conținuturi diverse de antioxidanți, folosindu-se pentru analiză volume diferite de extracte vegetale. Activitatea antioxidantă a standardului de acid ascorbic și a extractelor vegetale cercetate este prezentată în tabelul 58, respectiv tabelul 59.

Tabel 58. Activitatea antioxidantă pentru diferite diluții ale soluției etalon de acid ascorbic 1%

Diluția soluției de acid ascorbic 1% (v/v)	Volumul soluției adăugate (ml)	Timpul de decolorare la 20°C (s)
Diluție 1:4	2	360
	3	3
	5	Instantaneu
Diluție 1:5	2	300
	3	25
	5	2
Diluție 1:6	2	410
	3	219
	5	5

Tabel 59. Activitatea antioxidantă a extractelor vegetale apoase

Extractul vegetal	Volumul de extract vegetal adăugat (ml)	Timp de decolorare la 20°C (s)
Crețșoară ( <i>Alchemilla vulgaris</i> )	1	110
	2	28
	3	6
	5	3
Leurdă ( <i>Allium ursinum</i> )	1	142
	2	87
	3	48
	5	10
Obligeană ( <i>Acorus calamus</i> )	1	165
	2	115
	3	57
	5	18
Splinuță ( <i>Solidago virga aurea</i> )	1	93
	2	21
	3	2
	5	instantaneu
Turița mare ( <i>Agrimonia eupatoria</i> )	1	105
	2	47
	3	21
	5	3
Ventricică ( <i>Veronica officinalis</i> )	1	134
	2	63
	3	39
	5	6
Vâscul ( <i>Viscum album</i> )	1	113
	2	57
	3	33
	5	5

Dintre extractele apoase studiate se evidențiază *Solidago virga aurea* și *Alchemilla vulgaris*, în timp ce la restul extractelor vegetale apoase timpii de decolorare au valori apropiate cu excepția extractului de *Acorus calamus* și *Allium ursinum*.

Analizând rezultatele obținute se observă că timpul de decolorare cel mai scurt, adică capacitatea antioxidantă cea mai mare o prezintă maceratele obținute din partea aeriană a extractului de *Solidago virga aurea* și *Alchemillei vulgaris*. Maceratul de *Acorus calamus* are potențialul antioxidant cel mai mic, lucru ce poate fi explicat prin conținutul scăzut de principii active a părți vegetale studiate (rădăcina).

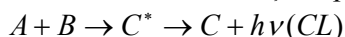
În cazul extractelor cercetate rezultatele cele mai concludente s-au obținut folosindu-se pentru analiză 3 mL extract apos, iar capacitatea antioxidantă a acestor extracte este comparabilă cu soluția de acid ascorbic 1% diluție 1:5.

### II.5.3. Metoda chemiluminometrică utilizând luminol

Pentru determinarea capacității antioxidante totale a extractelor studiate, ca tehnică de investigare s-a utilizat chemiluminometria.

Chemiluminescența (CL) este un fenomen fizico-chimic natural sau provocat, în care absorbția energiei produsă pe cale chimică determină formarea unor molecule excitate care apoi emit fotoni.

Reacțiile producătoare de chemiluminescență se pot schematiza astfel:



în care două substanțe A și B reacționează pentru a forma un produs în stare excitată  $C^*$  ca apoi acesta să treacă în același produs în stare neexcitată C, energia chimică fiind eliberată ca și chemiluminescență, cu energia  $h\nu$ .

În majoritatea reacțiilor implicate în acest fenomen, intermediarul  $C^*$  este oxigenul în stare singlet sau reactantul B este un peroxid  $ROO^*$ , în special  $HOO^*$ .

Chemiluminescența se poate produce în faza gazoasă, cât și în fazele lichidă și solidă. Cea mai studiată și cu aplicațiile cele mai largi este cea în faza lichidă [175].

Apariția unor emisii chemiluminescente în timpul unor reacții chimice este cunoscută de mult timp și este strâns legată de formarea unor radicali liberi intermediari.

Influența pH-ului asupra reacției chemiluminescente ( $LH_2-H_2O_2$ ), în tampon Tris-HCl a fost studiată în intervalul de pH = 7–9.

S-a constatat o dependență a intensității semnalului chemiluminescent de pH, randamentul optim al CL obținut pentru pH = 8,6, fiind caracteristic evoluției în timp a concentrației intermediarului în stare excitată, care determină eliberarea radiației luminoase.

Cu creșterea pH-ului are loc activarea sistemului generator, dovadă creșterea vitezei de reacție a acestuia (figura 36) atingând maximum la pH  $\cong$  8,6 [176].

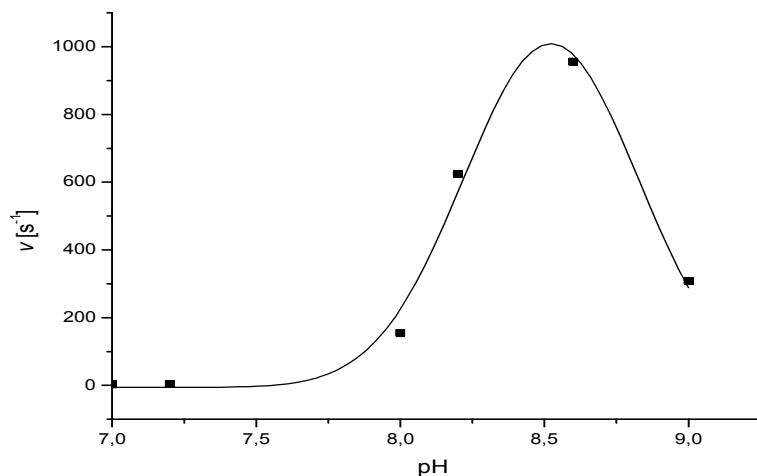


Figura 36. Variația vitezei inițiale de reacție cu pH-ul mediului

Luminolul este o ftalhidrazidă ciclică care, în mediu alcalin și în prezența peroxidului de hidrogen reacționează exoterm transformându-se în aminoftalat dianion în stare excitată (figura 37) [177].

Utilizând sistemul generator de chemiluminiscentă format din luminol (LH<sub>2</sub>) și peroxid de hidrogen în mediu bazic se evidențiază o scădere a intensității emisiei chemiluminescente, dar nu epuizarea totală a fenomenului fapt ce indică existența încă cel puțin a unui mecanism paralel care să utilizeze alte specii de radicali liberi ai oxigenului.

Aplicație pe Studiul Extractelor Hidroalcoolice de *Alchemilla vulgaris*, *Allium ursinum*, *Acorus calamus*, *Solidago virga aurea*, *Agrimonia eupatoria*, *Veronica officinalis* și *Viscum album*.

Metodă:

Chemiluminiscenta luminolului implică reacția acestuia cu peroxidul de hidrogen în mediu bazic ducând la emisia unei lumini albastre cu lungime de undă maximă în jurul a 420 nm [178]. Reacția luminescentă este prezentată în figura 37.

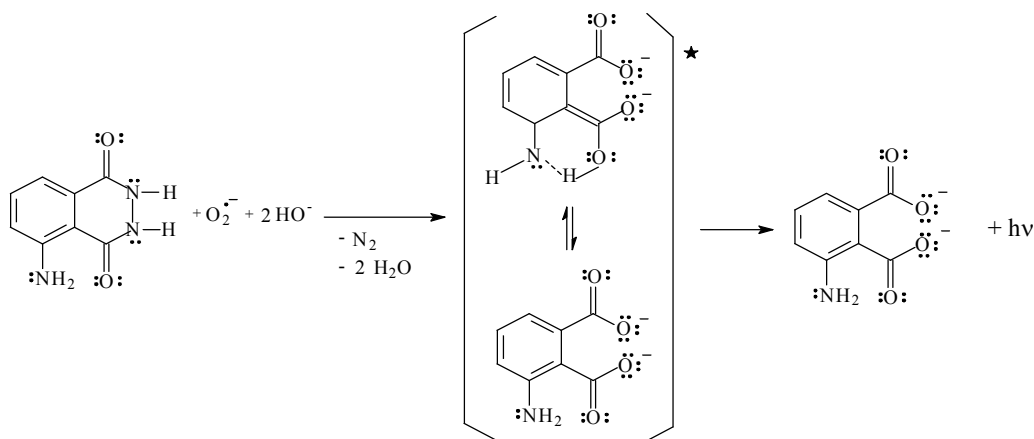


Figura 37. Reacția luminolului cu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Reacția este catalizată de anumiți ioni metalici cum ar fi Cu (II) [179].

Adaosul unei substanțe cu potențial antioxidant are ca efect reducerea intensității semnalului luminos; cu cât activitatea antioxidantă este mai accentuată, cu atât semnalul luminos este mai scăzut.

#### Partea experimentală

S-au luat în lucru materii prime vegetale din speciile de plante: *Alchemilla vulgaris*–crețișoară (partea aeriană), *Allium ursinum*–leurdă (frunze), *Acorus calamus*–obligeană (rădăcină), *Solidago virga aurea*–splinuță (partea aeriană), *Agrimonia eupatoria*–turița mare (partea aeriană), *Viscum album*–vâsc (frunze cu rămurele) și *Veronica officinalis*–ventrilică (partea aeriană).

Reactivi: luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazină-1,4-dionă) – Merck; peroxid de hidrogen (30%) – Merck; sulfat de cupru (II) p.a., hidroxid de sodiu p.a., carbonat de sodiu p.a. și bicarbonat de sodiu p.a. - Reactivul București; metanol p.a, metanol pentru HPLC și acid fosforic pentru HPLC–Merck; standarde de quercetină ( $\geq 99\%$ ), rutină ( $\geq 99,2\%$ ) și kamferol ( $\geq 99\%$ ) - Roth. Concentrațiile de lucru au fost după cum urmează: luminol  $2 \times 10^{-3}$  M în soluție de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ( $5 \times 10^{-2}$  M)/ $\text{NaHCO}_3$  (0.3M); soluție de sulfat de cupru  $4.79 \times 10^{-3}$  M; soluție de peroxid de hidrogen  $8.82 \times 10^{-3}$  M (proaspăt preparat) și soluție de hidroxid de sodiu  $10^{-2}$  M.

Extracțele hidroalcoolice au fost obținute conform paragrafului II.2.4.2.

#### Mod de lucru

Pentru determinările chemiluminometrice s-a folosit un spectrofotometru tip SPEKOL 10 (Carl Zeiss. Jena) (echipat cu cuve de cuarț de 30 mL) cuplat la o placă de achiziție Axxi-crom 727 (interfață Axxion Chromatography, INC).

Placa de achiziție adaptată spectrofotometrului a convertit semnalul spectrofotometric în mV, a stocat toate valorile obținute iar rezultatele au fost afișate sub formă unor perechi (timp-semnal). Datele achiziționate au putut fi exportate în programul Microsoft Excel pentru calcule ulterioare.

Adițional a fost utilizat pentru calcule și programul Microcal Origin 4.1.

Un amestec format din 5 mL soluție de hidroxid de sodiu, 1 mL soluție de cupru (II) și 3 mL soluție luminol a fost introdus în cuva de cuarț și supus agitării (amestec A).

Separat, 5 mL de soluție de peroxid de hidrogen au fost amestecați cu 5 mL de apă distilată după care s-au adăugat 0.1 mL de extract alcoolic din plante (în metanol 98%) obținându-se astfel amestecul B.

După 1 minut de la prepararea amestecului B acesta a fost injectat cu o seringă peste amestecul A și s-a înregistrat semnalul obținut la 420 nm, cu lampa stinsă, timp de aproximativ 5 minute.

Utilizând același mod de lucru s-a determinat și activitatea antioxidantă pentru soluțiile metanolice ale standardelor de rutină, quercetină și kamferol (0.15 mg/mL).

La câteva secunde după injectare s-a observat emisia unui semnal luminos corespunzând unui semnal de aproximativ 170 mV, datorat probabil speciilor de oxigen reactive (ROS) deja prezente în soluția de peroxid de hidrogen care reacționează cu luminolul.

Acest semnal luminos descrește rapid în primul minut de la combinarea celor două amestecuri, ajungând la un anumit palier la sfârșitul reacției conform figurii 38.

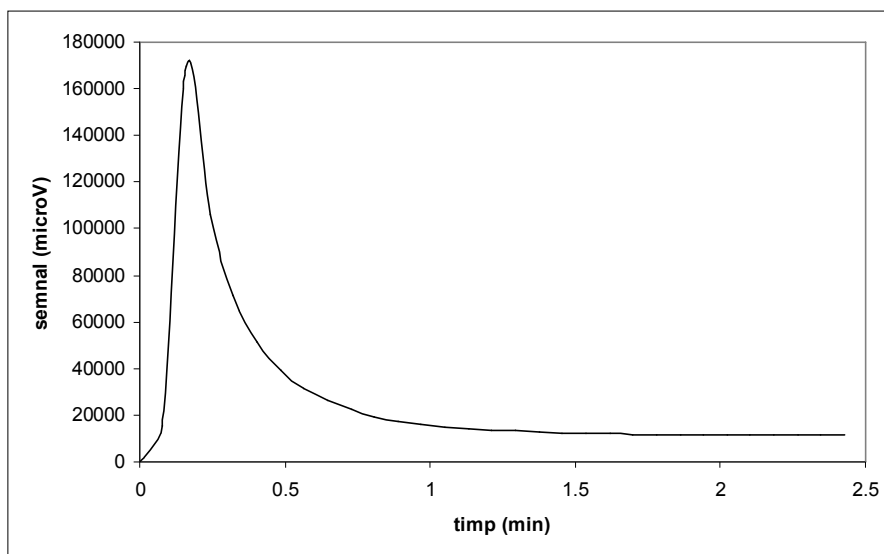


Figura 38. Variația în timp a semnalului spectrofotometric pentru reacția luminolului cu peroxidul de hidrogen (media a șase experimente)

#### Rezultate obținute

Am reușit îmbunătățirea performanțelor metodei descrisă de Novas și colab., și anume creșterea intensității luminii emise, ceea ce a permis urmărirea spectrofotometrică a reacției, prin simpla mărire a bazicității mediului prin adaos de hidroxid de sodiu 0,01 M.

Atunci când se folosește un luminometru pentru determinările de chemiluminiscentă, practica uzuală constă în analiza semnalului luminos emis, la o anumită perioadă de timp de la inițierea reacției. Novas și colab. au comparat activitățile antioxidante pe baza intensităților semnalelor luminoase la 6 secunde după amestecare.

Dar acel moment este posibil să nu corespundă maximului intensității semnalului.

Procedeul propus, care utilizează un spectrofotometru, permite urmărirea procesului de la început până la sfârșit. Folosind standarde de antioxidanții naturali cu grad de puritate minim 98%, putem compara activitatea antioxidantă a extractelor vegetale pe baza intensității semnalelor luminoase cu cea a standardelor.

Pentru fiecare extract vegetal și standard s-au efectuat câte patru determinări, iar pentru calculele s-au folosit mediile valorilor înregistrate.

Rezultatele obținute au fost reproductibile atât pentru extracte cât și pentru standarde, fapt care este indicat de semnalele spectrofotometrice pentru reacția luminolului cu apa oxigenată în absența/prezența extractelor vegetale sau a standardelor studiate.

Aceste înregistrări în timp a semnalului spectrofotometric corespunzător unor extracte și standarde studiate sunt date în figurile 39-44. S-au efectuat câte patru determinări pentru fiecare extract vegetal (Seriile 1-4)



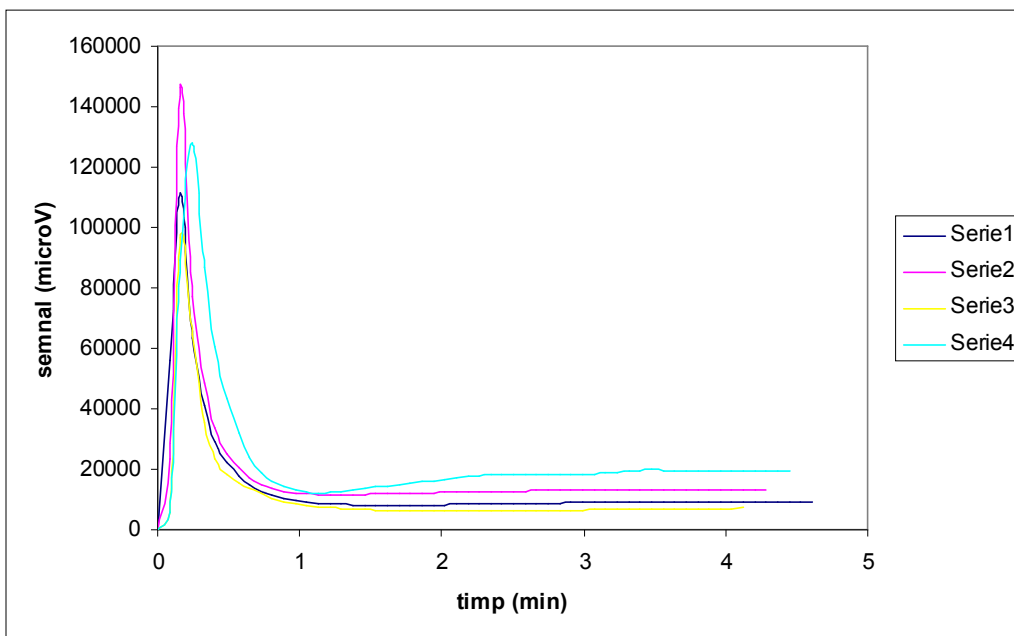


Figura 39. Variația în timp a semnalului spectrofotometric corespunzător cineticii reacției luminolului cu apa oxigenată în prezența tincturii de *Veronica officinalis*

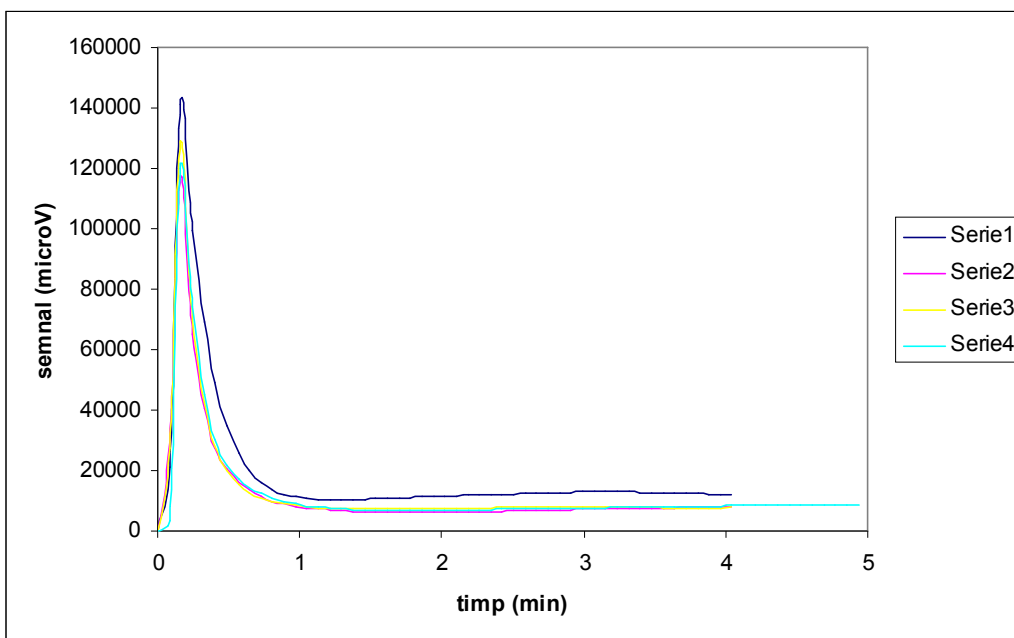


Figura 40. Variația în timp a semnalului spectrofotometric corespunzător cineticii reacției luminolului cu apa oxigenată în prezența tincturii de *Agrimonia eupatoria*

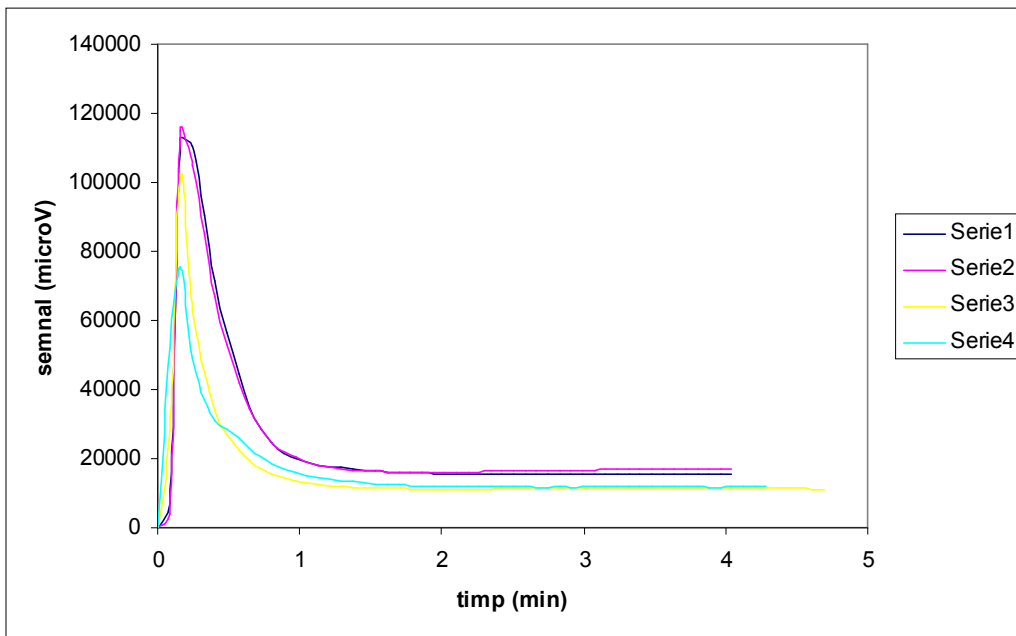


Figura 41. Variația în timp a semnalului spectrofotometric corespunzător cineticii reacției luminolului cu apa oxigenată în prezența tincturii de *Solidago virga aurea*

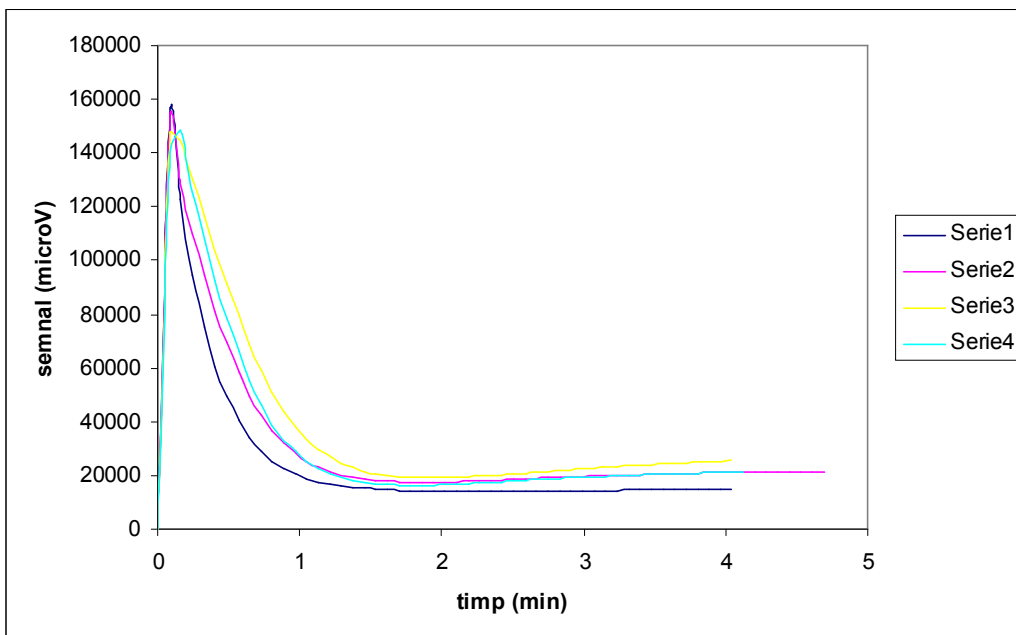


Figura 42. Variația în timp a semnalului spectrofotometric corespunzător cineticii reacției luminolului cu apa oxigenată în prezența tincturii de *Allium ursinum*

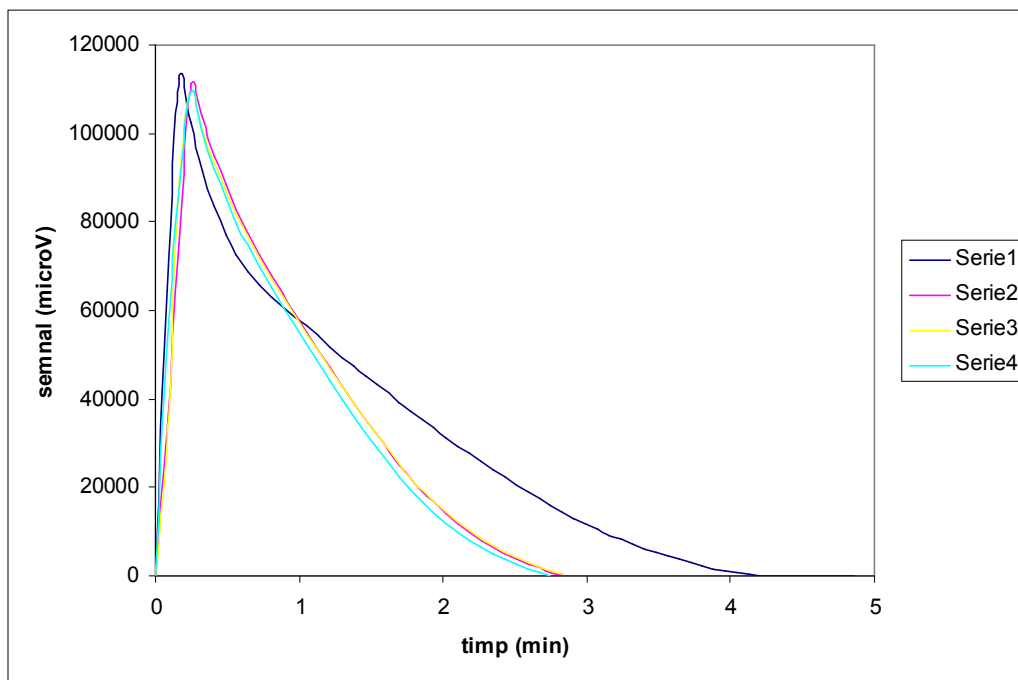


Figura 43. Variația în timp a semnalului spectrofotometric corespunzător cineticii reacției luminolului cu apa oxigenată în prezența standardului de kamferol

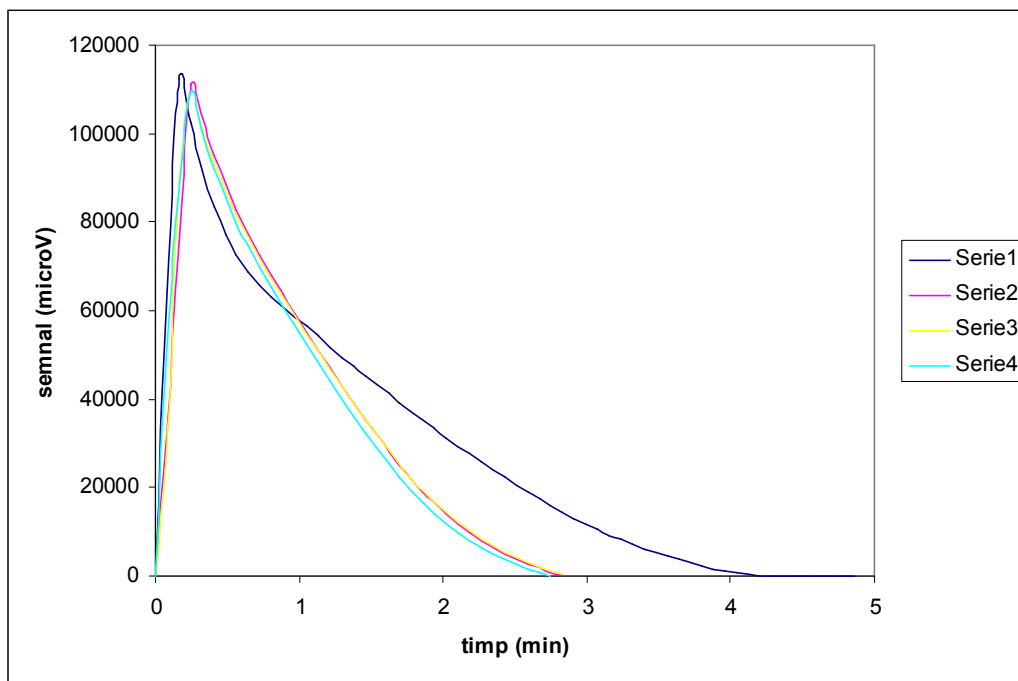


Figura 44. Variația în timp a semnalului spectrofotometric corespunzător cineticii reacției luminolului cu apa oxigenată în prezența standardului de rutină

Din figurile 39-44 se observă că, în primul minut, scăderea intensității semnalului luminos pentru toate extractele vegetale cercetate este semnificativă, semnalul înregistrat ajunge la un minim (platou) corespunzător sfârșitului reacției.

În schimb, pentru standardele studiate scăderea intensității semnalului luminos este semnificativă în primele două minute, pentru ca apoi să fie mai lentă.

În scopul evaluării activității antioxidante a extractelor analizate s-a comparat media intensităților maxime ale semnalelor înregistrate în fiecare caz, rezultatele obținute fiind prezentate în figura 45, alături de cele aferente standardelor (kamferol, quercetină și rutină, 0.15 mg/mL în metanol).

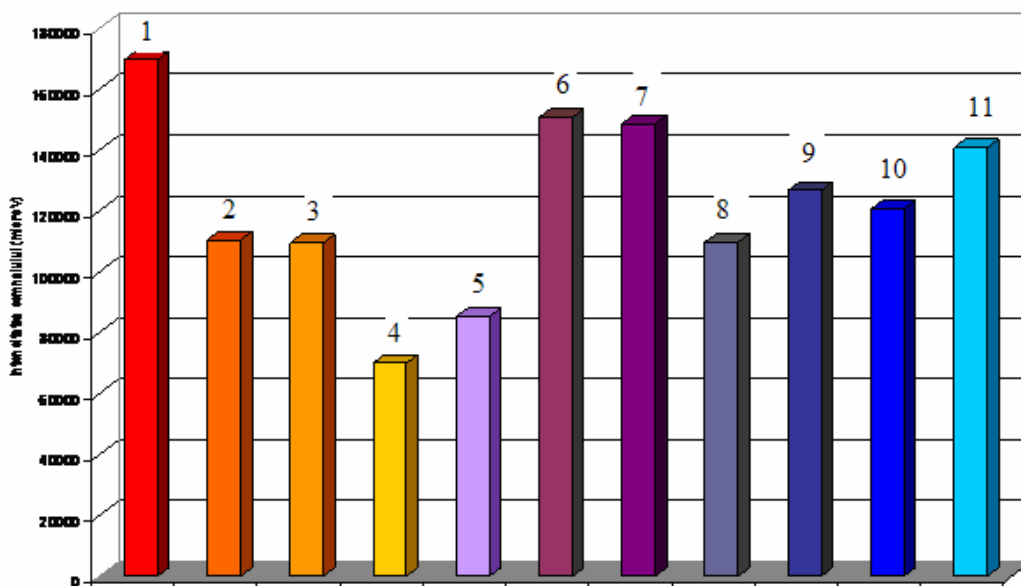


Figura 45. Compararea intensității semnalelor chemiluminescente pentru :  
 1- probă martor; 2- soluție metanolică de kamferol; 3- soluție metanolică de quercetină; 4- soluție metanolică de rutină; 5-extract metanolic 98% de *Alchemilla vulgaris*; 6-extract metanolic 98% de *Allium ursinum*; 7-extract metanolic 98% de *Acorus calamus*; 8-extract metanolic 98% de *Solidago virga-aurea*; 9-extract metanolic 98% de *Agrimonia eupatoria*; 10-extract metanolic 98% de *Veronica officinalis*; 11-extract metanolic 98% de *Viscum album*;

Pentru determinările cantitative, procentul de inhibiție (I%) a fost stabilit cu relația

$$I = 100 - \frac{I_{max}^{proba}}{I_{max}^{referinta}} \cdot 100$$

unde:

- $I_{max}^{referinta}$  - media intensităților maxime ale semnalului corespunzător reacției dintre luminol și soluția de peroxid de hidrogen;
- $I_{max}^{proba}$  - media intensităților maxime ale semnalului corespunzător reacției dintre luminol și soluția de peroxid de hidrogen după adăugarea soluției de antioxidant.

Valorile calculate pentru activitatea antioxidantă totală a fiecărui extract vegetal, comparate cu activitatea antioxidantă a quercetinei, kamferolului și rutinei sunt reprezentate în tabelele 60, 61.

Tabel 60. Procentul de inhibiție pentru extracte hidrometanolice plante din genul Angiospermatophyta și Spermatophyta

Extract vegetal	<i>Alchemilla vulgaris</i>	<i>Allium ursinum</i>	<i>Acorus calamus</i>	<i>Solidago virga aurea</i>	<i>Agrimonia eupatoria</i>	<i>Veronica officinalis</i>	<i>Viscum album</i>
I [%]	49.75	11.17	12.34	35.32	25.31	28.90	17.02

Tabel 61. Procentul de inhibiție pentru kamferol, quercetină, rutină

Standarde [0.15 mg/mL]	Kamferol	Quercetină	Rutină
I [%]	34.86	35.42	58.72

În cazul extractelor vegetale studiate se observă că toate extractele prezintă activitate antioxidantă inferioară rutinei.

Extractul de *Alchemilla vulgaris* are o activitate antioxidantă mai mare decât cea a soluției standardului de kamferol și quercetină, dar mai mică decât a rutinei.

Extractul de *Solidago virga aurea* are activitate antioxidantă comparabilă cu cea a soluției de quercetină și kamferol.

Extractul de *Veronica officinalis* și *Agrimonia eupatoria* au activități antioxidante apropiate dar mai mici decât a standardelor cercetate.

Extractele de *Viscum album*, *Acorus calamus* și *Allium ursinum* prezintă procentul de inhibiție cel mai mic, ceea ce arată un conținut scăzut de compuși antioxidanți (taninuri, acid ascorbic, flavone, compuși fenolici, antocianidine, etc.) responsabili de activitatea antioxidantă.

Valorile ridicate ale activității antioxidante totale ale extractelor de *Alchemilla vulgaris*, *Solidago virga aurea*, pot fi atribuite și prezenței unor structuri de tip flavonoidic (quercetină, miricetină, kamferol și rutină), în cantități mai mari.

Concluziile care se desprind în urma aplicării tehnicii chemiluminescente pe extractele vegetale studiate pentru determinarea activității antioxidante totale sunt:

- toate extractele analizate, prezintă activitate antioxidantă diferită, diferența fiind dată de conținutul în compuși cu potențial antioxidant a fiecărei plante cercetate;
- rezultatele obținute prin chemiluminescență demonstrează că activitatea antioxidantă a extractelor vegetale se poate atribui, în principal, compușilor flavonoidici prezenți în materialele studiate, dar și altor compuși cu efect antioxidant (taninuri catehice, vitamine, complexe care conțin rutozid, compuși ce conțin grupări tiolice, etc). Rezultatele obținute constituie obiectul unei lucrări științifice [155].

## II.6. Studiul activității antimicrobiene a extractelor vegetale hidroalcoolice cercetate

Activitatea antimicrobiană, determinată prin metoda difuziei în agar cu discuri impregnate (metoda difuzimetrică), a fost testată pe patru specii bacteriene *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Proteus vulgaris* ATCC 49132, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 și *Escherichia coli* ATCC 25922.

Partea experimentală

Reactivi: mediu de cultivare (tryptic soy agar și Müller-Hinton agar) au fost achiziționate de la Merck (Germania). Discurile de hârtie de filtru impregnate cu substanțe antibacteriene (antibiotice) au fost achiziționate de la HiMedia Laboratoires (India), Bioanalyse Ltd. (Turcia) și Abtek Biologicals Ltd. (UK) ( Tabelul 62).

Standardul McFarland pentru turbiditate a fost achiziționat de la BioMérieux (Marcy l'Étoile, Franța).

Obținerea extractelor hidroalcoolice:

Obținerea extractelor hidroalcoolice din speciile vegetale cercetate, s-a realizat prin metoda extracției solid-lichid, într-o instalație Soxhlet, conform procedurii descris în [130].

S-a lucrat identic ca și la extractele obținute la paragraful II.2.4.2.

S-au obținut extracte hidroalcoolice cu aspect limpede având culoare specifică, de la galben la verde închis.

E1-extract metanolic de *Alchemilla vulgaris* - crețișoară;

E2-extract metanolic de *Allium ursinum* - leurdă;

E3-extract metanolic de *Acorus calamus* - obligeană;

E4-extract metanolic de *Solidago virga-aurea* - splinuță;

E5-extract metanolic de *Agrimonia eupatoria* - turița mare;

E6-extract metanolic de *Veronica officinalis* - ventrilică;

E7-extract metanolic de *Viscum album* - vâsc;

Tabel 62. Substanțele antimicrobiene etalon

Substanța antimicrobiană	Concentrația	Producător
Cefotaximă	30 µg / disc	Abtek Biologicals LTD (UK)
Gentamicină	10 µg / disc	Abtek Biologicals LTD (UK)
Vancomicină	30 µg / disc	HiMedia Laboratoires (India)
Ciprofloxacină	5 µg / disc	HiMedia Laboratoires (India)
Kanamicină	30 µg / disc	HiMedia Laboratoires (India)
Cefuroxim	30 µg / disc	Abtek Biologicals LTD (UK)
Norfloxacină	10 µg / disc	Abtek Biologicals LTD (UK)
Acid nalidixic	30 µg / disc	HiMedia Laboratoires (India)
Ampicilină / sulbactam	10/10 µg / disc	HiMedia Laboratoires (India)
Piperacilină/tazobactam	100 / 10 µg / disc	HiMedia Laboratoires (India)

Principiul metodei turbidimetrice McFarland de determinare a numărului de celule microbiene dintr-un mL inocul:

Tabel 63. Metoda McFarland

McFarland Standard No.	0.5	1	2	3	4
1. 0% Barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
1. 0% Sulphuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
Approx. cell density (1X10 <sup>8</sup> ml)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0
% Transmittance* (600 nm)	74.3	55.6	35.6	26.4	21.5
Absorbance* (600 nm)	0.132	0.257	0.451	0.582	0.669

Microorganismele testate: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Proteus vulgaris* ATCC 49132, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 și *Escherichia coli* ATCC 25922 au fost achiziționate de la Microbiologics (USA).

Înainte de analiză tulpinile bacteriene au fost cultivate pe tryptic soy agar, în condiții aerobe, timp de 24 h la 37°C.

Activitatea antibacteriană a fost estimată prin metoda Kirby-Bauer [180].

Pe scurt, inoculi de celule bacteriene au fost suspendați în ser fiziologic steril până când densitatea suspensiei testate a egalat turbiditatea standardului, echivalent unei concentrații de 1.5×10<sup>8</sup>/mL (McFarland Standard, BioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Cutiile Petri (d=9cm) cu agar Müller-Hinton (pH=7.3) pentru speciile bacteriene au fost inoculate cu 1 mL de suspensie microbiană.

Suspensia a fost răspândită pe întreaga suprafață cu ajutorul unei seringi sterile de 1 mL.

După 5 minute excesul de fluid a fost îndepărtat cu ajutorul unei pipete sterile.

Apoi suprafața mediului din cutiile Petri a fost lăsată să se usuce la temperatura camerei, timp de maxim 20 de minute.

Discurile de hârtie de filtru sterile, impregnate cu 10 μL mixtură nediluată au fost aplicate aseptice pe suprafața fiecărei cutii, într-o poziție centrală.

Pentru aceasta au fost utilizate pensete sterile. Fiecare disc a fost ușor presat pentru a asigura un contact bun cu suprafața mediului.

Discuri de control impregnate cu substanțe antimicrobiene au fost de asemenea plasate în cutiile Petri inoculate, la distanțe potrivite.

Cefoxitina, gentamicina, vancomicina, ciprofloxacina, kanamicina, ampicilină + sulbactam, piperacilină + tazobactam, cefuroxim, norfloxacină și acid nalidixic au fost utilizate ca substanțe de referință antibacteriene. Cutiile Petri inoculate au fost incubate timp de 24 de ore la 37°C.

Zonele de inhibiție au fost exprimate ca diametrul (mm) zonelor libere din jurul discurilor. Rezultatele au fost exprimate ca media a trei analize independente și sunt prezentate în tabelul 64.

Rezultate obținute

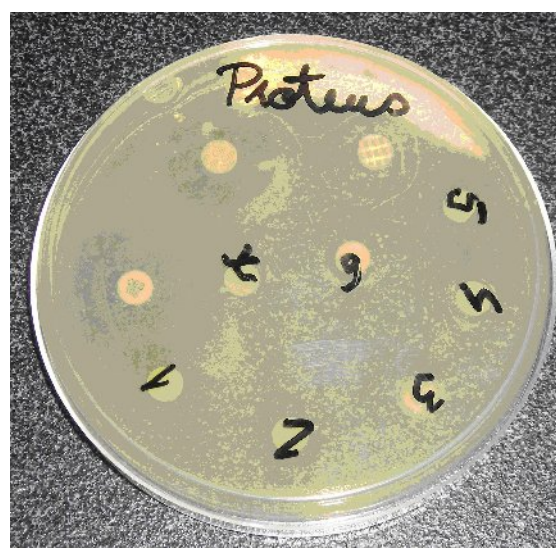
Tabel 64. Zonele de inhibiție

Microorganisme de referință	Zonele de inhibiție (mm)			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Extract 1	16	-	15	6
Extract 2	12	-	11	-
Extract 3	7	-	6	6
Extract 4	11	-	12	6
Extract 5	7	-	6	-
Extract 6	6	10	7	-
Extract 7	6	-	10	6
Cefoxitină	22	ND	ND	ND
Gentamicină	21	ND	ND	ND
Vancomicină	18	ND	ND	ND
Ciprofloxacină	ND	20	ND	ND
Kanamicină	ND	7	ND	ND
Amicacină	ND	ND	ND	16
Cefuroxim	ND	ND	22	ND
Norfloxacină	ND	ND	-	ND
Acid nalidixic	ND	ND	6	ND
Ampicilină + sulbactam	ND	ND	ND	-
Piperacilină + tazobactam	ND	ND	ND	11

ND – nedeterminat



a)



b)



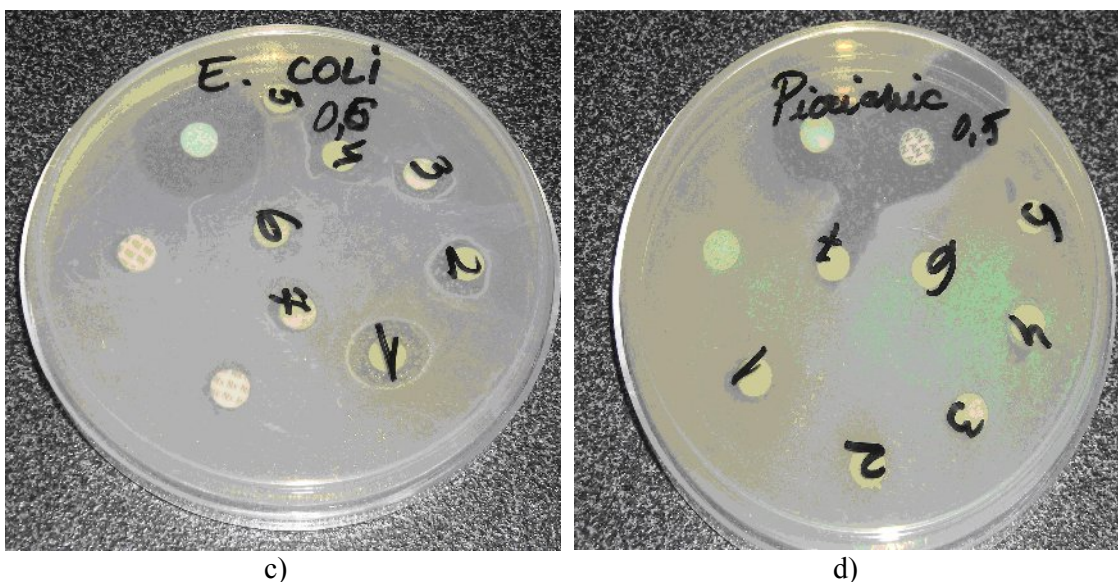


Figura 46. Antibiograme: a) *Staphylococcus aureus* ; b) *Proteus vulgaris*; c) *Escherichia coli*; d) *Pseudomonas aeruginosa*

Cele mai largi zone de inhibiție au fost în cazul extractelor de *Alchemilla vulgaris*, *Allium ursinum* și *Solidago virga aurea* pentru *Staphylococcus aureus* și *Pseudomonas aeruginosa*.

Zone de inhibiție mai mici au fost înregistrate pentru extractele studiate în cazul testării contra *Proteus vulgaris*.

Rezultatele sugerează că activitatea antibacteriană exprimată împotriva microorganismelor bacteriene Gram-pozitive patogene este apropiată de cea a substanțelor antibacteriene de referință pentru *Staphylococcus aureus*, și mai puțin semnificativă pentru *Proteus vulgaris*.

Activitatea antibacteriană împotriva *Escherichia coli*, o bacterie Gram-negativă, a fost de asemenea comparabilă cu activitatea antibacteriană exercitată de substanțele de referință; însă mai puțin semnificativă pentru *Pseudomonas aeruginosa*. Rezultatele obținute au constiuit obiectul unei lucrări științifice [181].

## II.7. Aplicații ale extractelor vegetale cercetate

### II.7.1. Influența extractului de *Solidago virga aurea* și a mixturi antioxidante asupra stabilității termice a uleiului de măsline extra virgin prin analiza termică diferențială (TG/DG/DTA)

#### Aspecte generale:

Uleiurile și grăsimile se găsesc în natură în țesutul plantelor, concentrându-se în semințe, pulpă sau în sămbure, tuberculi și germeni.

Măslinul (*Olea europaea*) este un arbore înalt de 10-20 m, face parte din familia oleaceelor, intens cultivat în regiunile mediteraneene în partea de sud a Rusiei, în Crimeea și în alte zone cu climă caldă. Arborele preferă solurile calcaroase și călduroase neavând rezistență la frig.

Fructul – măslina este o drupă cărnoasă, de culoare verde-oliv până la negru, în funcție de sortiment.

Măslinile sunt fructe cu conținut ridicat de lipide (20-35%), proteine și glucide. Compoziția chimică a măslinelor este prezentată în tabelul 65.

Tabel 65. Compoziția chimică a măslinelor [182]

Substanțe	Pulpă [%]	Miez [%]	Coajă [%]
Apă	22-28	6-7	4-5
Lipide	40-60	15-16	5-8
Substanțe proteice	6-7	13-15	14-16
Celuloză	9-10	64-66	70-72
Cenușă	2-3	2-3	4-5

Uleiul de măslină provine doar de la măslinile verzi. Aroma, culoarea și consistența variază, ca și în cazul vinurilor fine, datorită diferitelor soiuri de măslină, locațiilor și climei.

Uleiul se obține prin procesare, urmată de extracție și conține cantități mari de acid oleic și linoleic.

Compoziția în acizi grași și trigliceride din uleiul de măslină este redată în tabelul 66.

Tabel 66. Compoziția în acizi grași și trigliceride din uleiul de măslină extra virgin [182, 183]

Compuși	Simbolizarea acizilor grași	Masa [%]
Acid palmitic	C 16:0	3.40
Acid stearic	C 18:0	0.30
Acid oleic	C 18:1	14.50
Acid linoleic	C 18:2	3.60
Acid linolenic	C 18:3	urme
Gliceril tristearat	C 18:0	0.5-5
Gliceril trioleat	C 18:1	55-83
Gliceril trilinoleat	C 18:2	3.5-21
Gliceril trilinolenat	C 18:3	0.0-0.9

Uleiul de măslină extra virgin provine din prima presare a măslinelor. Are o aciditate nu mai mare de 0,8% și este considerat a avea un gust superior.

Uleiurile vegetale comestibile sunt foarte apreciate din punct de vedere culinar ca urmare a rolului pe care acestea le au în alimentație.

Împreună cu proteinele și carbohidrații, uleiurile vegetale formează substanțe alimentare fundamentale care au un rol foarte important în asigurarea surselor de energie din dietă alimentară[184].

Uleiurile vegetale se degradează când sunt procesate neadecvat, iar reacția principală de degradare este oxidarea.

Oxidarea uleiurilor are loc printr-un mecanism de radical liber, caracterizat inițial prin emiterea unui miros dulceag și neplăcut, care progresiv devine mai înțepător, până atinge mirosul caracteristic de ranced, având loc descompunerea hidroperoxidilor și peroxidilor în acizi cu molecule mici și aldehide [183].

Pentru a dezvolta în cercetările ulterioare un model cinetic a proceselor de „îmbătrânire” care afectează uleiul de măsline extra virgin, inițial a fost studiată influența adaosului de extract de *Solidago virga aurea* folosind volume diferite de extract vegetal.

Mai mult în această lucrare a fost studiată stabilitatea termică a uleiului de măsline extra virgin cu adaos de butilhidroxitoluen (BHT) și **mixtură antioxidantă**.

În mod curent metodele termoanalitice cum ar fi calorimetria diferențială de scanare (DSC) și termogravimetria/ termogravimetria derivativă (TG/DTG) primesc o atenție considerabilă.

Curbele TG/DTG pot fi folosite pentru a estima calitatea uleiurilor comestibile prin determinarea parametrilor cinetici [184] și perioada de inducție oxidativă.

Pe de altă parte, întrucât descompunerea termică oxidativă implică reacții exoterme și endoterme, este posibilă estimarea energiei implicate în procese prin tehnici de tipul DTA și DSC.

De multe ori aceste metode sunt mai avantajoase decât cele convenționale, deoarece sunt mai precise și necesită cantități mai mici de substanțe, iar rezultatele sunt obținute mai rapid [185].

Parte experimentală:

Material vegetal: *Alchemilla vulgaris* – crețșoară, *Allium ursinum* – leurdă, *Acorus calamus* – obligeană, *Solidago virga aurea* – splinuță, *Agrimonia eupatoria* – turița mare, *Viscum album* – vâsc și *Veronica officinalis* – ventrilică - sursa Fares S.A. Orăștie, Tricolorul S.A. Cluj-Napoca și S.C. STEF-MAR S.R.L.-Vâlcea.

Obținerea extractelor:

Materialul vegetal uscat mărunțit în prealabil a fost supus extracției statice (macerare) cu alcool etilic 96% timp de 10 zile la temperatura camerei, păstrat la întuneric, în raport molar material vegetal : alcool 1:10 [130].

Metoda de extracție aplicată a fost unitară, parametrii operaționali respectiv gradul de mărunțire al plantei, solventul utilizat, raportul plantă/solvent, temperatura de extracție și tipul de extracție au fost identici, singura diferență fiind determinată de materialul vegetal. Ulterior maceratele obținute din cele șapte plante cercetate au fost supuse unei operații de distilare la presiune normală în scopul eliminării alcoolului etilic. **Mixtura** a fost obținută prin amestecarea a șapte volume egale de extract vegetal.

Materiale și reactivi: gliceril tristearat (Sigma Aldrich); butilhidroxitoluen (BHT)– grad de puritate 99% (Sigma Aldrich); alcool etilic 96% (Merck).

Uleiul de măsline extravirgin a fost achiziționat de la fabricanți de ulei de măsline, fiind ambalat în recipiente de sticlă sigilate.

Mod de lucru:

Probele supuse analizei termice au fost obținute prin adaosul de extracte vegetale peste uleiul de măsline extra virgin și omogenizarea acestora în baia cu ultrasunete timp de cinci minute.

În toate analizele termice efectuate au fost utilizate între 13,5-35,5mg probă, iar intervalul de temperatură de la 36-800°C.

Curbele ne-izoterme TG/DTG au fost obținute cu ajutorul aparatului Netzsch STA 409 PC, în aer (30mL/min), folosind creuzete de alumina și o viteză de încălzire de 5°C/min.

Programul utilizat pentru interpretarea rezultatelor a fost Netzch Proteus– Thermal Analysis.

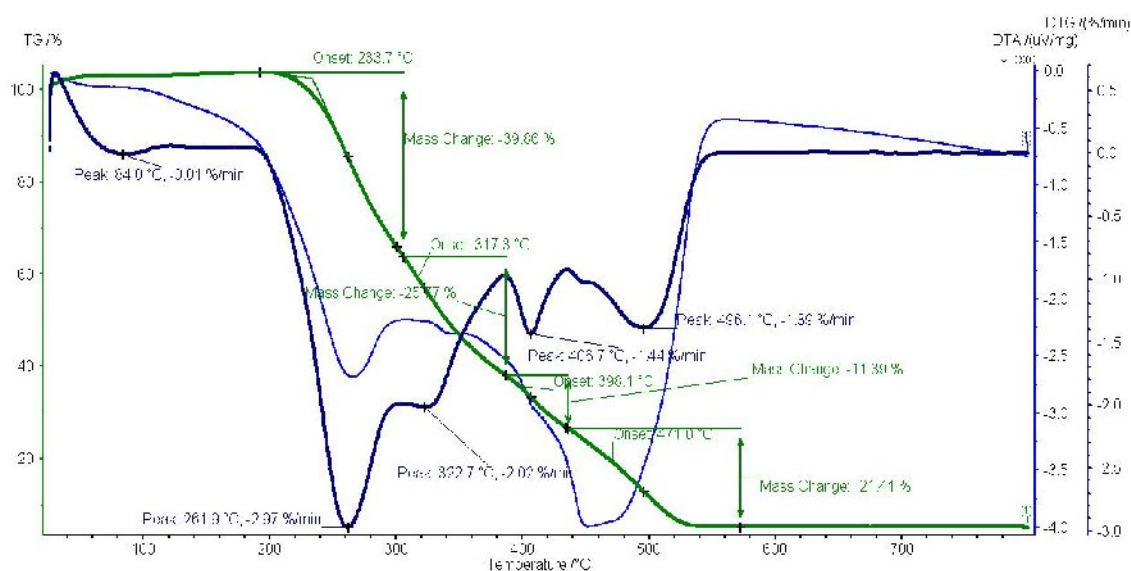


Figura 47. Curbele TG/DTG/DTA pentru uleiul de măsline extra virgin

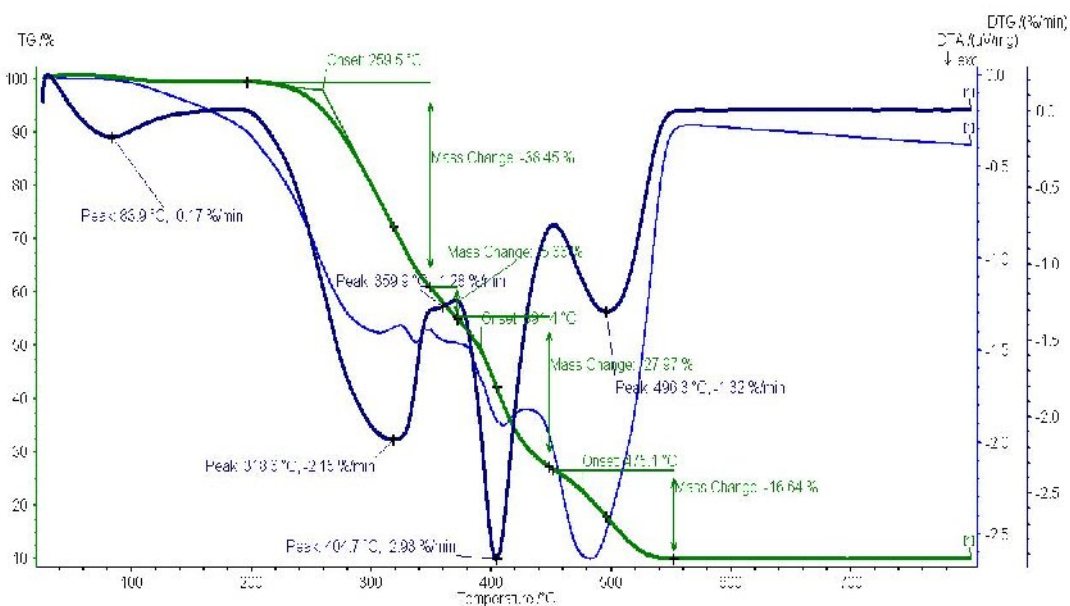


Figura 48. Curbele TG/DTG/DTA pentru uleiul de măsline extra virgin cu adaos de extract de *Solidago virga aurea* 0,5 mL /0,5 kg grăsime



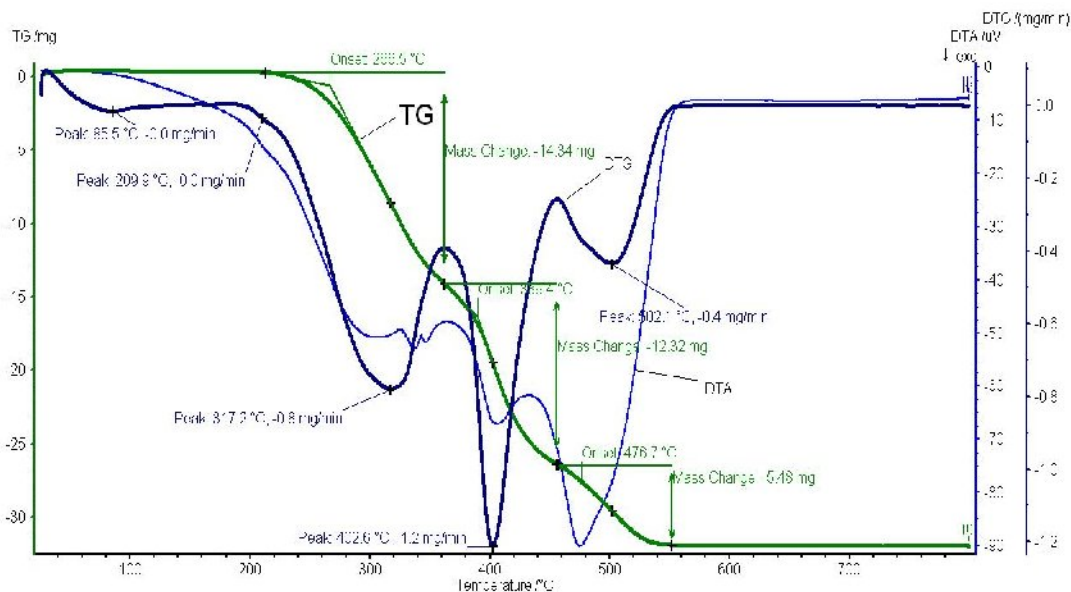


Figura 49. Curbele TG/DTG/DTA pentru uleiul de măsline extra virgin cu adaos de extract de *Solidago virga aurea* 1 mL/0,5 kg grăsime

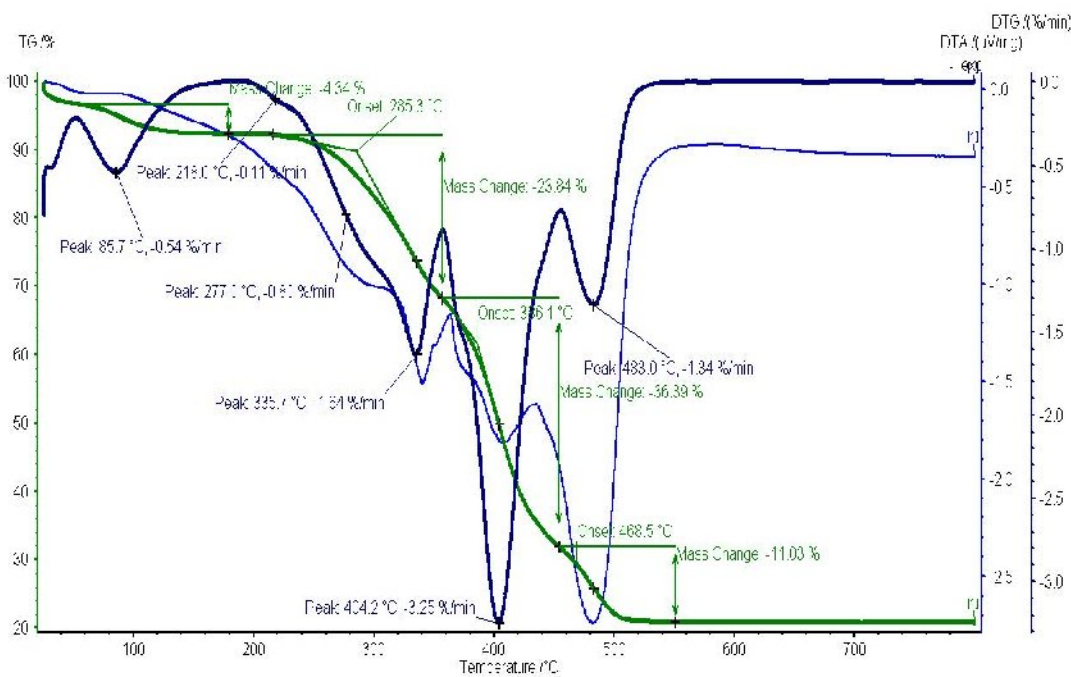


Figura 50. Curbele TG/DTG/DTA pentru uleiul de măsline extra virgin cu adaos de extract de *Solidago virga aurea* 3 mL/0,5 kg grăsime.

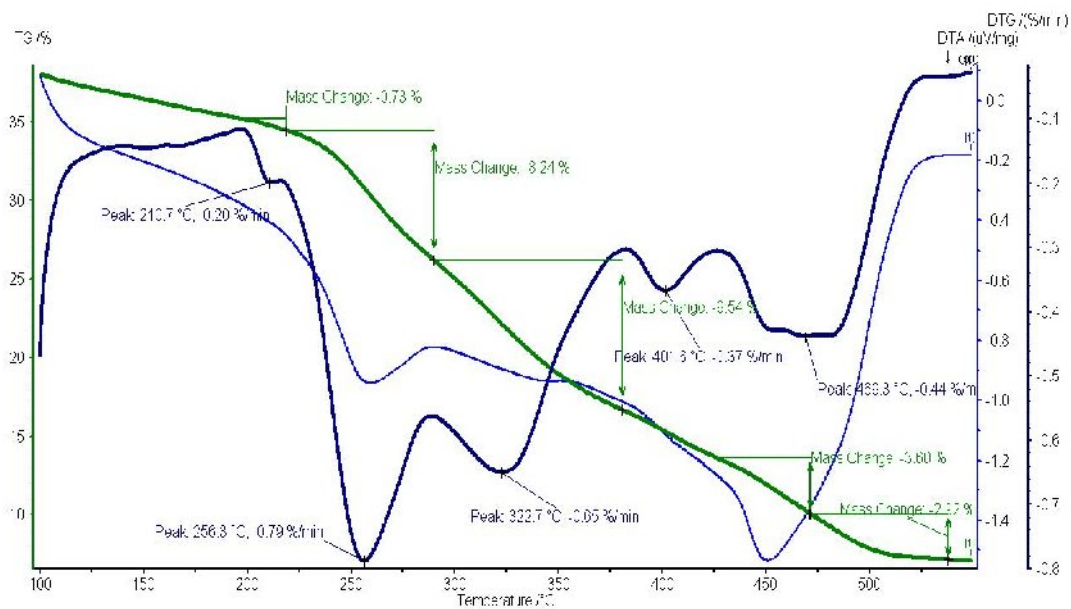


Figura 51. Curbele TG/DTG/DTA pentru uleiul de măsline extra virgin cu adaos de extract de *Solidago virga aurea* 5 mL/0,5 kg grăsime.

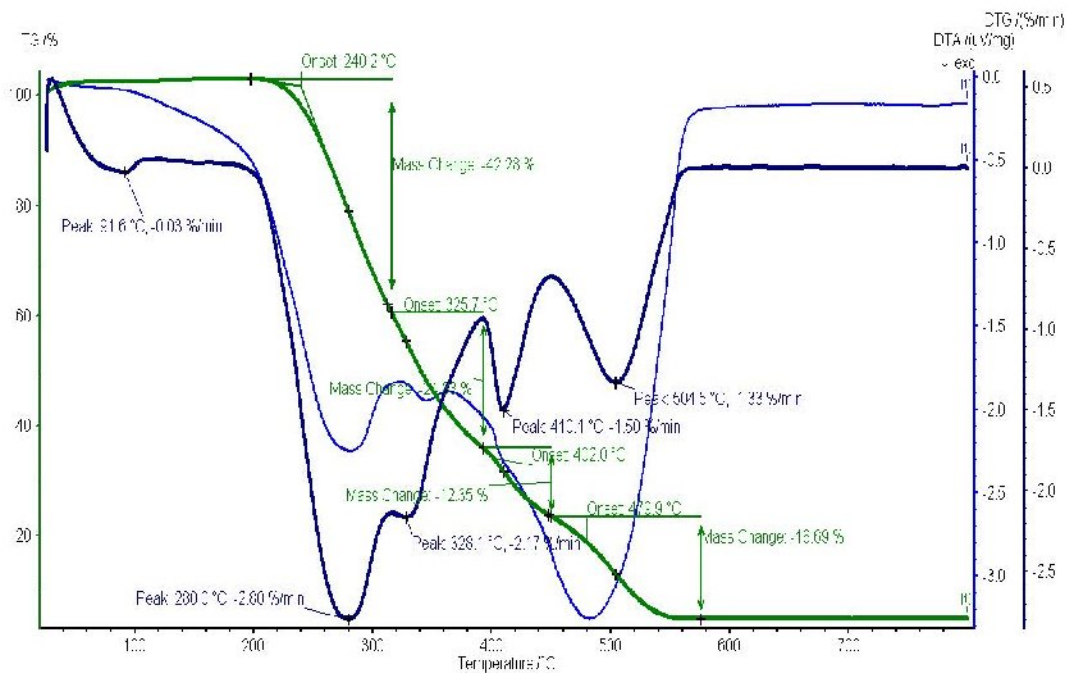


Figura 52. Curbele TG/DTG/DTA pentru uleiul de măsline extra virgin cu adaos de Butilhidroxitoluen (BHT) 0,59g/0,5 kg grăsime

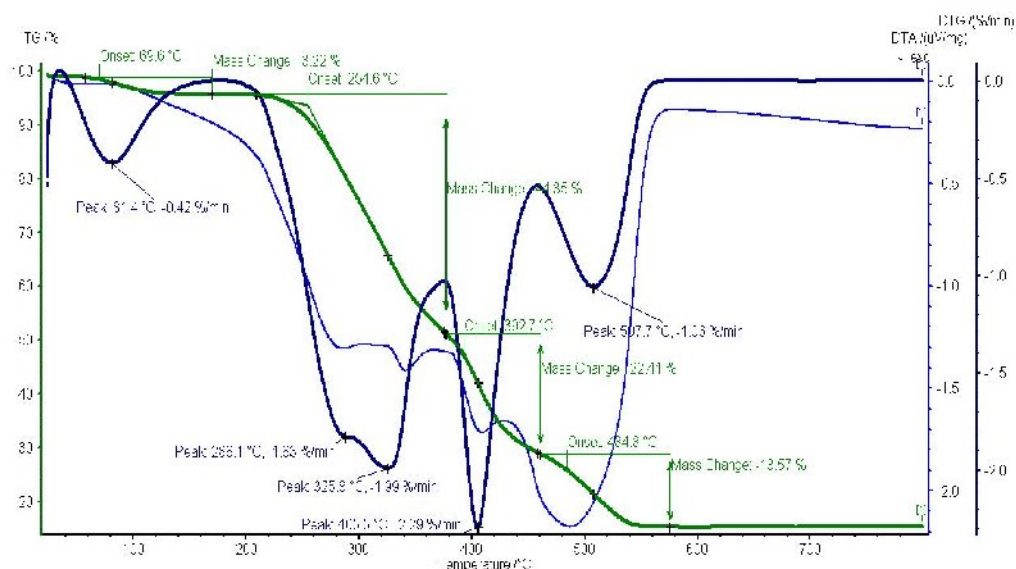


Figura 53. Curbele TG/DTG/DTA pentru uleiul de măsline extra virgin cu adaos de mixtură antioxidantă 3 mL/0,5 kg grăsime

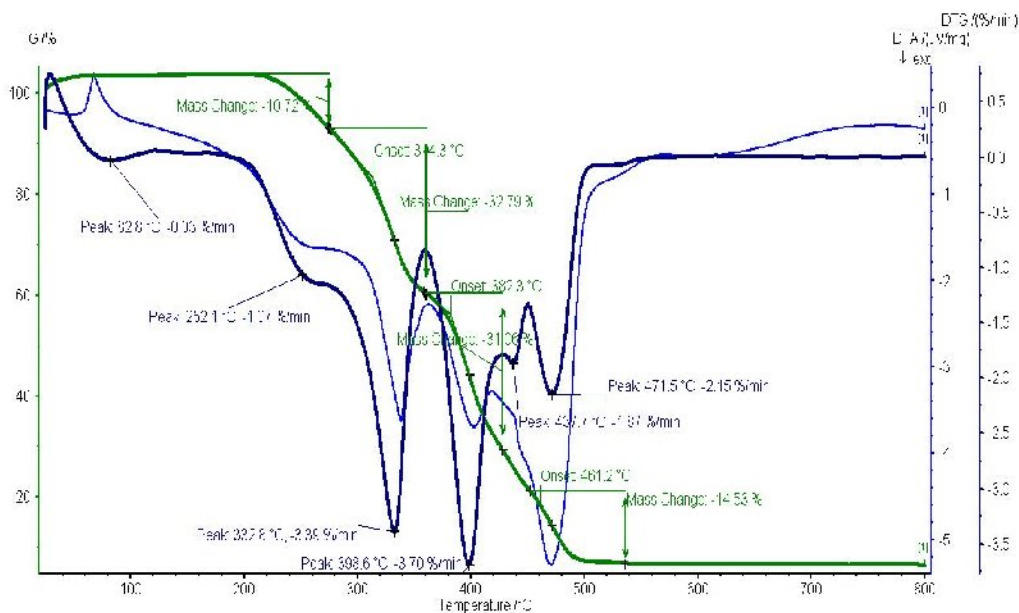


Figura 54. Curbele TG/DTG/DTA pentru trigliceril stearat

Comportamentul termic:

Comportamentul termic al uleiului de măsline extra-virgin comercial este prezent în figura 47.

Profilul curbelor TG/DTG pune în evidență trei etape de descompunere pentru uleiul de măsline extra virgin.

Începutul degradării oxidative este caracterizat de acțiunea oxigenului singlet ( $O_2^1$ ) asupra acizilor grași mononesaturați cu formare de peroxizi.

Această comportare este în general identificabilă prin creșterea masei inițiale a probelor. În cazul uleiului de măsline extra virgin, aceasta a fost de aproximativ 2,5%.

În legătură cu etapele de descompunere termică, prima etapă (180-370°C) corespunde conform curbelor DTG la două procese suprapuse ale pierderii de masă și a fost atribuită descompunerii trigliceridelor saturate și nesaturate.

Această etapă, în cazul uleiului de măsline extra virgin a început la  $T_{\text{inițiere}} (T_{\text{onset}}) = 233,7^{\circ}\text{C}$  cu vârful picului DTG la  $261,9^{\circ}\text{C}$ , temperaturi ce corespund primului proces; iar  $T_{\text{inițiere}} = 317,3^{\circ}\text{C}$  cu vârful picului DTG la  $322,7^{\circ}\text{C}$  ce corespunde celui de al doilea proces.

La aproximativ  $370^{\circ}\text{C}$  probabil că are loc o combustie rapidă a componentelor volatile, urmată de o oxidare a reziduurilor carbonooase [186].

În timpul încălzirii trigliceridelor, care reprezintă de la 96% la 98% din uleiul de măsline extra virgin, se descompun cu formarea unor compuși de tipul dimerilor, trimerilor și a unor molecule cu masă moleculară mică relativ volatile în condițiile de lucru și astfel prin îndepărtarea lor apar pierderile de masă.

- Prima etapă este cea mai importantă pentru stabilitatea termică a uleiului de măsline extra virgin deoarece este etapa în care începe descompunerea acizilor grași nesaturați.

- A doua etapă de descompunere a uleiului de măsline extra virgin are loc la  $T_{\text{inițiere}} = 398,1^{\circ}\text{C}$  și cu vârf la  $406,7^{\circ}\text{C}$ . Conform datelor din literatură [187,188] această etapă ar corespunde descompunerii acizilor grași mononesaturați cum ar fi acidul oleic.

În timpul acestei reacții, legăturile duble sunt rupte ducând la formarea unor hidroperoxizi în pozițiile 8, 9, 10 și 11, care sunt în mod constant îndepărtați de către vaporii generați în timpul încălzirii.

- A treia etapă de descompunere termică are loc la  $T_{\text{inițiere}} = 471,0^{\circ}\text{C}$  și un vârf la  $496,1^{\circ}\text{C}$  și corespunde descompunerii termice a acizilor grași saturați, cum ar fi acidul palmitic.

Din păcate, în literatură sunt prezente diferite ipoteze cu privire la etapa a doua și a treia etapă de descompunere termică, dar într-o anumită măsură și pentru prima etapă de descompunere care include degradarea oxidativă a trigliceridelor saturate și nesaturate, fenomen care are loc în intervalul 180 și  $370^{\circ}\text{C}$ .

În acest scop am efectuat analiza termică a gliceril tristearatului (C18:0).

Curbele TG/DTG a gliceril tristearatului (C18:0) redată în figura 54 arată o singură etapă de descompunere la  $T_{\text{inițiere}} = 314,3^{\circ}\text{C}$  și un vârf la  $332,8^{\circ}\text{C}$  în intervalul de temperatură 180 și  $370^{\circ}\text{C}$ ; cea de a doua etapă are loc la  $T_{\text{inițiere}} = 382,3^{\circ}\text{C}$  și un vârf de  $398,6^{\circ}\text{C}$ ; cea de a treia etapă de descompunere la  $T_{\text{inițiere}} = 461,2^{\circ}\text{C}$  și un vârf la  $471,5^{\circ}\text{C}$ .

Se poate observa că ultimele două etape de descompunere sunt similare cu cele ale uleiului de măsline.

În cazul gliceril tristearatului a fost înregistrat doar un pic în intervalul de 180 și  $370^{\circ}\text{C}$ , ceea ce confirmă că în acest interval are loc descompunerea trigliceridelor saturate.

Ca urmare a rezultatelor obținute prin analiza cinetică de Vecchio [183], primul pic care apare la temperaturi joase și prezintă energii de activare mici este probabil datorat descompunerii legăturii saturate din trigliceride și corespunde primei etape de descompunere, iar degradarea gliceril trilinoleatului (C18:2) și gliceril trilinolenatului (C18:3) corespund celei de a doua etape de degradare a uleiului de măsline extra virgin.



Prima etapă de descompunere este cea mai importantă pentru stabilitatea termică a grăsimilor de natură vegetală sau animală.

Pe baza temperaturii de începere a descompunerii termice se poate compara stabilitatea uleiului de măsline extra virgin precum și eficiența eventualelor adaosuri de antioxidanți naturali sau sintetici.

Curbele DTA corespunzătoare uleiului, cu și fără adaos de extract de *Solidago virga aurea*, mixtură antioxidantă, butilhidroxitoluen (BHT), din figurile 48-53 evidențiază câte trei etape endoterme .

În tabelul 67 este prezentat comportamentul termic al uleiului de măsline extra virgin

Tabel 67 Comportamentul termic al uleiului de măsline extra virgin la analiza termică diferențială.

Proba cercetată	Etapă de descompunere a uleiului de măsline extra virgin					
	Etapa I		Etapa II		Etapa III	
	T <sub>inițiere</sub> (T <sub>onset</sub> ) [°C]	Pierdere de masă [%]	T <sub>inițiere</sub> (T <sub>onset</sub> ) [°C]	Pierdere de masă [%]	T <sub>inițiere</sub> (T <sub>onset</sub> ) [°C]	Pierdere de masă [%]
Ulei de măsline extra virgin	233,7	65,63	398,1	11,39	471	21,41
Ulei de măsline extra virgin cu adaos de extract de <i>Solidago virga aurea</i> 0,5 mL /0,5 kg grăsime	259,5	44,11	391,4	27,97	475,1	16,64
Ulei de măsline extra virgin cu adaos de extract de <i>Solidago virga aurea</i> 1 mL /0,5 kg grăsime	266,5	37,24	389,4	32	476,7	14,23
Ulei de măsline extra virgin cu adaos de extract de <i>Solidago virga aurea</i> 3 mL /0,5 kg grăsime	285,3	28,18	386,1	36,39	468,5	11,03
Ulei de măsline extra virgin cu adaos de <i>mixtură antioxidantă</i> 3 mL /0,5 kg grăsime	254,6	47,57	392,7	22,41	484,8	13,57
Ulei de măsline extra virgin cu adaos de <i>butilhidroxitoluen</i> (BHT) 0,59g/0,5 kg grăsime	240,2	67,21	402	12,35	479,9	18,69

Prima etapă de descompunere termică are temperaturile deplasate spre valori mai mari în cazul uleiului de măsline cu adaos de extract de *Solidago virga aurea*, mixtură antioxidantă sau butilhidroxitoluen (BHT).

În cazul extractului de *Solidago virga aurea*, rezultatele obținute au fost reproductibile în cazul utilizării unui anumit volum de extract.

Adaosul a 5mL extract de *Solidago virga aurea*/0,5kg ulei de măsline extra virgin a deplasat pentru prima etapă vârful de la 261,9°C la 256,3°C, după cum se poate observa în figura 51.

Adaosul a 3mL de extract de *Solidago virga aurea*/0,5kg ulei de măsline extra virgin a deplasat T<sub>inițiere</sub> pentru prima etapă de la 233,7°C la 285,3°C, după cum se poate observa în figura 50.

Adaosul a 1mL extract de *Solidago virga aurea*/0,5kg ulei de măsline extra virgin a deplasat semnificativ T<sub>inițiere</sub> pentru prima etapă de la 233,7°C la 266,5°C, după cum se poate observa în figura 49.

Adaosul a 0,5mL de extract de *Solidago virga aurea*/0,5kg ulei de măsline extra virgin a deplasat  $T_{\text{inițiere}}$  pentru prima etapă de la 233,7°C la 259,5°C, după cum se poate observa în figura 48.

Rezultatele obținute în cazul extractului de *Solidago virga aurea* arată că utilizarea unui volum de 3mL/0,5 kg ulei de măsline extra virgin asigură stabilitatea termică cea mai bună pentru grăsimea studiată.

Cu cât cantitatea de extract a scăzut,  $T_{\text{inițiere}}$  a fost deplasată la valori mai mici, iar la adaosul unui volum mai mare de 3mL de extract de *Solidago virga aurea*, descompunerea uleiului de măsline extra-virgin decurge la temperaturi mai joase decât  $T_{\text{inițiere}} = 233,7^{\circ}\text{C}$  pentru prima etapă de descompunere.

Adaosul a 0,59g butilhidroxitoluen/0,5 kg ulei de măsline extra virgin a deplasat  $T_{\text{inițiere}}$  pentru prima etapă de la 233,7°C la 240,2°C, după cum se poate observa în figura 52.

Adaosul a 3mL mixtură antioxidantă/0,5 kg grăsime a deplasat  $T_{\text{inițiere}}$  pentru prima etapă de la 233, 7°C la 254, 6°C, după cum se poate observa în figura 53.

Butilhidroxitoluenul(BHT) deși este în cantitate mai mare asigură o stabilitate termică uleiului de măsline mai mică decât mixtura antioxidantă cercetată. Din rezultatele obținute rezultă că efectul de stabilitate termică asigurat de extractul de *Solidago virga aurea* adăugat conferă o stabilitate termică uleiului de măsline extra virgin de cel puțin 50 °C pentru prima etapă de descompunere, după care odată formați compuși de scindare a legături C-C sau C-O, toate probele se comportă identic.

Prin această metodă s-a găsit că extractul de *Solidago virga aurea* și mixtura antioxidantă naturală propuse în acest studiu determină o îmbunătățire semnificativă a stabilității la tratament termic al uleiului de măsline extra virgin, fiind mai eficiente decât butilhidroxitoluenul (BHT) când cantitățile sunt aproximativ egale.

O parte din rezultatele obținute constituie obiectul unei lucrări științifice [189].

## CONCLUZII

Literatura de specialitate nu oferă o gamă prea variată de informații cu privire la compoziția chimică extrem de complexă a extractelor de plante din speciile *Alchemilla vulgaris*, *Allium ursinum*, *Acorus calamus*, *Solidago virga aurea*, *Agrimonia eupatoria*, *Veronica officinalis*, *Viscum album*, cu toate că proprietățile lor terapeutice sunt bine cunoscute.

De aceea, un studiu mai detaliat asupra compoziției chimice a plantelor din genul Angiospermatophyta și Spermatophyta bogate în compuși fenolici și a potențialului antioxidant al acestora devine necesar.

Stadiul actual al cunoașterii în domeniu prezentat în prima parte s-a referit la compușii naturali cu potențial antioxidant capabili să prevină oxidarea nedorită a produselor alimentare cu conținut ridicat în acizi grași polinesaturați, mononesaturați (acidul oleic) și saturați (acid palmitic, acid stearic).

Pe baza celor prezentate în prima parte a tezei cu privire la necesitatea antioxidantilor naturali atât în industria alimentară cât și în industria farmaceutică și cosmetică, în teză am realizat un studiu detaliat al principiilor active din extractele vegetale de *Alchemilla vulgaris* (crețișoară), *Allium ursinum* (leurdă), *Acorus calamus* (obligeană), *Solidago virga aurea* (splinuță), *Agrimonia eupatoria* (turița mare), *Veronica officinalis* (ventrlică), *Viscum album* (vâsc).

Rezultatele finale sunt următoarele :

1. s-au obținut extracte apoase, hidroalcoolice și diclormetanice prin mai multe metode de extracție, extracție statică cu soluții etanolice respectiv metanolice de concentrație 80% și 96 % realizată la timpi și temperaturi diferite, extracție dinamică, extracție Soxhlet, extracție la ultrasunete cu etanol 96% și 60% și macerare cu apă respectiv alcool etilic. Prin extracție statică timp de 120 ore, la temperatura de 4°C, conținutul de compuși antioxidanți, în special flavonoide a fost mult mai ridicat;
2. principiile active din materiile prime vegetale din clasa Monocotiledonate și Dicotiledonate au fost puse în evidență prin mai multe metode, cromatografice, cromatografia pe hârtie, cromatografia în strat subțire, cromatografia de lichide de înaltă performanță, respectiv spectroscopice, spectroscopia UV-VIS, spectrometria de masă;
3. acidul ascorbic a fost determinat calitativ prin reacții de culoare, iar cantitativ prin două metode, metoda 2,6-diclorfenol indofenol și metoda electrochimică. Rezultatele obținute prin cele două metode sunt în concordanță;
4. conținutul de antocianidine totale și compuși polifenolici totali au fost determinate cantitativ prin două metode, metoda spectrofotometrică respectiv prin metoda Folin Ciocâlteu;
5. conținutul total de flavonoide a fost determinat prin metoda spectrofotometrică. Extractul vegetal de *Solidago virga aurea* a avut conținutul cel mai ridicat de flavonoide ( $3.012 \cdot 10^{-2}$  mol/L) ;

6. flavonoidele (quercetină, miricetină, kamferol, rutină) au fost determinate cantitativ prin cromatografie de lichide de înaltă performanță. Metoda de analiză utilizată a fost precisă și selectivă pentru identificare și cuantificarea quercetinei, miricetinei, rutinei și kamferolului prezente în materialul vegetal;
7. determinarea cantitativă a taninurilor și acidului galic a fost realizată prin două metode, prin titrare la rece cu soluție de  $\text{KMnO}_4$  0.01N, în prezența indigoului carmin folosit ca indicator de oxido-reducere respectiv prin cromatografie de lichide de înaltă performanță. Conținutul în taninuri a fost mai ridicat în extractele hidroalcoolice de *Alchemilla vulgaris*, *Agrimonia eupatoria*, *Solidago virga-aurea*. Extractul de *Allium ursinum* a avut cel mai mare conținut de acid galic;
8. s-a analizat extractul de *Alchemilla vulgaris* prin spectrometrie de masă, picurile moleculare din spectrul caracteristic extractului vegetal au fost comparate cu picurile moleculare a unor soluții de standarde, flavonoide de tipul quercetină, miricetină, kamferol, rutină, catechină; compuși fenolici de tipul pirogalol, acid galic ( $C=0.15$  mg/mL). Standardele au fost identificate în extractul metanolic cercetat, având aceleași picuri moleculare;
9. s-a determinat activitatea antioxidantă a tuturor extractelor vegetale obținute prin trei metode, metoda spectrofotometrică cu 1,1-difenil,2-picrilhidrazil (DPPH), metoda permanganometrică și metoda chemiluminometrică cu luminol. Prin metoda ce utilizează radicalii liberi de tip DPPH s-au înregistrat valori mai mari ale procentului de inhibiție decât valorile determinate prin metoda chemiluminometrică ce utilizează luminol. Rezultatele obținute prin aplicarea celor trei metode, arată că extractele vegetale analizate sunt buni inhibitori de radicali liberi de tip 1,1-difenil,2-picrilhidrazil;
10. prin analiza activității antimicrobiene a celor șapte extracte vegetale s-a stabilit că cele mai largi zone de inhibiție au fost în cazul extractelor de *Alchemilla vulgaris*, *Allium ursinum* și *Solidago virga-aurea*, pentru *Staphylococcus aureus* și *Pseudomonas aeruginosa*. Zone de inhibiție mai mici au fost înregistrate pentru extractele studiate în cazul testării față de *Proteus vulgaris*. Activitatea antibacteriană împotriva *Escherichia coli*, o bacterie gram-negativă, a fost de asemenea comparabilă cu activitatea antibacteriană exercitată de substanțele de referință; însă mai puțin semnificativă în cazul *Pseudomonas aeruginosa*;
11. s-a determinat influența activității antioxidante a extractului de *Solidago virga aurea* și a mixturi obținute asupra stabilității termice a uleiului de măsline extra virgin prin analiză termică diferențială (TG/DG/DTA). S-a demonstrat că principiile active extrase din partea aeriană de *Solidago virga aurea* au activitate antioxidantă adăugate ca atare în uleiul de măsline extra virgin, activitate mai mare decât cea a t-butil-hidroxitoluenului (BHT) dacă cantitățile utilizate sunt egale.

Rezultatele cercetărilor experimentale care au stat la baza elaborării acestei teze au constiuit obiectul următoarelor lucrări:

- 1 lucrare ISI publicată în Food Science and Technology Research, Japonia, **15**(1), 95-98 (2009).
- 1 lucrare ISI publicată în Revista de chimie ,**60**(11), 1129-1134 (2009).
- 1 lucrare ISI publicată în Oxidations Communications, Bulgaria, **32**(4), 924-929 (2009).
- 1 lucrare ISI acceptată în Central European Journal of Chemistry (Spinger Verlag), Germania, 2009.
- 6 lucrări publicate în Analele Universității din Craiova, X(XLVI)/**2005**; XII(XLVIII)/**2007**; XIII(XLIX)/**2008**; XIV(XLX)/**2009**, ISSN 1435-1275
- 2 lucrări publicate în Research People and Actual Tasks on Multidisciplinary Sciences, Lozenec, Bulgaria, **2009** , ISSN 1313-7735
- 1 lucrare publicată în Biotechnologies–Present and Perspectives, Simpozion International, Suceava , **2007**, ISSN 1842-4597
- 1 lucrare publicată în Scientific and Technical Bulletin, Arad, Year XIII, vol.12, **2007**, ISSN 1582-1021
- 1 lucrare publicată în Analele Universității din Oradea, vol.VIII, **2009**, ISSN 1583-4301

Ms. No. CEJC-D-09-00206R1

Qualitative and quantitative analysis of gallic acid in *Alchemilla vulgaris*, *Allium ursinum*, *Acorus calamus* and *Solidago virga-aurea* by chip - electrospray ionization mass spectrometry and high performance liquid chromatography  
Central European Journal of Chemistry

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in Central European Journal of Chemistry.

It was accepted on 2009/12/16

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards

Masha Dorogova, Ph.D.  
Managing Editor

## BIBLIOGRAFIE

1. Neamțu G., Substanțe naturale biologice active, vol.I, Vitamine, Ed. R.A. București, 2001.
2. Simon J.A., Serum ascorbic acid cardiovascular disease prevalence in US adults, *Epidemiology*, **9** (3), 316-321 (1998).
3. Florea T., *Chimia Alimentelor*, vol. II, Ed. Academică, Galați, 2001.
4. Costin G.M., Segal, R., *Alimente funcționale, alimentele și sănătatea*, Ed. Academică, Galați, 1999.
5. Safta M., *Super-Antioxidanți naturali în alimentație și medicină, Secretul sănătății și longevității*, Ed. Sudura, Timișoara, 2002.
6. Winter G.H., *Minerals Supplements and Vitamins*, Fischer Books, Tucson, 2000.
7. Earl M., *Earl Mindell's Vitamin Bible*, Warner Books, New York, 1991.
8. Michael T.M., *Encyclopedia of Nutritional Supplements*, Prima Publ., Rocklin (CA), 1996.
9. Corrine T.N., *The Complete Book of Vitamin and Mineral Counts*, Dell Publ., New York, 1996.
10. Dincă N., **Condrat D.**, Grosu V., *Chimia Alimentelor, Caiet de lucrări practice*, Ed. Univ. „Aurel Vlaicu” Arad, 2007.
11. Gherghi A., Burzo I., Mărgineanu L., Deneș S., *Biochimia și fiziologia legumelor și fructelor*, Ed. Academiei Române, 2001.
12. Netzel M., Strass G., Bitsch I., Bitsch R., *Anthocyanins in human urine after digestion of Elderberry and Blackcurrant Juice*, *Vitamine und Zutatstoffe in der Ernerung von Mensch und Tier-Gera: Gebruder Frank KG*, **2**, 199-204 (1999).
13. Markakis P., *Anthocyanins as Food Colours*, Academic Press, New York, 1982.
14. Tărăbășanu-Mihailă C.N., Gorduza V., Radu F., Măzgăreanu M., *Coloranți organici de interes alimentar, cosmetic și farmaceutic*, Ed. Uni-Press, București, 1997.
15. Ghețiu M.M., *Chimia Organică*, Ed. Tehnica-Info, Chișinău, 1999.
16. Bodea C., *Tratat de Biochimie Vegetală*, vol.II, Ed. Academiei, București, 1965.
17. Ciulei I., Grigorescu E., Stănescu U., *Plante medicinale, fitochimie și fitoterapie*, vol. I, Ed. Medicală, București, 1993.
18. Yamaguchi M.A., Terahara N., Shizukuishi K.I., *Acetylated Anthocyanins in Zinnia Elegans Flowers*, *Phytochemistry*, **29** (4), 1269-1270 (1990).
19. Wollny T., Aiello L., Di Tommaso D., Bellavia V., Rotilio D., Donati M.B., de Gaetano G., Iacoviello L., *Modulation of haemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: A role for increased nitric oxide production*. *Brit. J. Pharmacol*, **127**(3), 747-55 (1999).
20. Vaya J., Aviram M., “*Nutritional Antioxidants: Mechanism of Action, Analyses of Activites and Medical Applications*”, *Curr. Med. Chem.-Imm., Endoc. and Metab. Agents*, **1**, 99-117 (2001).
21. Benito S., et al., *A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta*, *Brit. J. Pharmacol*, **135**, 910-6 (2002).

22. Martin S., Giannone G., Andriantsitohaina R., Martinez M.C., Delphinidin, an active compound of red wine, inhibits endothelial cell apoptosis via nitric oxide pathway and regulation of calcium homeostasis, *Brit. J. of Pharmacology*, **139**, 1095-1102 (2003).
23. Zhao C., Giusti M.M., Malik M., Moyer M.P., Magnuson B.A., Effects of commercial anthocyanin – rich extract on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 6122-6128 (2004).
24. Malik M., Zhao C., Schoene N., Guisti M.M., Moyer M.P., Magnuson B.A., Anthocyanin-rich extract from *Aronia melanocarpa* E induces a cell cycle block in colon cancer but not normal colonic cells, *Nutr. Cancer*, **46**, 186-196 (2003).
25. Hollman P.C.H., Katan M.B., Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man, *Biomed. Pharmacother*, **51**, 305-310 (1997).
26. Becker E.M., Nissen L.R., Skibsted L.H., Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects, *Eur. Food. Res. Technol.*, **219**, 561-571 (2004).
27. Berr C., Wancata J., Ritchie K., Prevalence of dementia in the elderly in Europe, *Eur Neuropsychopharmacol*, **15** (4), 463-71 (2005).
28. Stephens N., Antioxidant therapy for ischaemic heart disease, *Lancet*, **349**, 1710-1711 (1997).
29. Ness A.R., Powles J.W., Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review *Int. J. Epidemiol*, **26**, 1-13 (1997).
30. Franchel E.N., Kanner J., German J.B., Parks E., Kinsella J.E., Inhibition of oxidation of human low - density lipoprotein by phenolic substances in red wine, *Lancet*, **341**(8843), 454-457 (1993).
31. Albrecht R., Aspects nutritionnels de la protection anti radicalaire, *Méd. et Nutr.*, **30** (1), 19-24 (1994).
32. Cacig S., Posibilitatea utilizării extractelor vegetale ca ingrediente naturale pentru medicamente, cosmetice și alimente, Ed. Politehnica – Timișoara, 2007.
33. Noriko I., Sarah S., Motoichi K., Chung J.E., Uyama H., In this study, the antioxidant property of (+)-catechin-aldehyde, amplification of antioxidant activity of catechin by polycondensation with acetaldehyde, *Biomacromolecules*, **5** (1), 113-118 (2004).
34. Flavonoides: <http://www.docencia.udea.edu.co/Flavonoides.html>.
35. Kinsella J.E., Franchel E., German B., Kanner J., Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods, *Food. Techn.*, **47**, 85-89 (1993).
36. Schwenke D.C., Antioxidants and atherogenesis, *J. Nutr. Biochem.*, **9**, 424-445 (1998).
37. Steinberg D., Antioxidant Vitamins. *N. Engl. J. Med.*, **328**, 1444-1449 (1993).
38. Diaz M.N., Frei B., Vita J.A., Keaney F.R., Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N. Engl. J. Med.*, **337** (6), 408-416 (1997).
39. Frederick J.S., Whelan M., *Fad Free Nutrition*, Hounter House Inc., Publ. Group, Los Angeles, 1998.
40. Leonte M., Florea T., *Chimia Alimentelor*, vol. I, Ed. Pax Aura Mundi, Galați, 1999.
41. Tamaș V., Neamțu G., *Pigmenți carotenoidici și metaboliti*, Ed. Ceres, București, 1986.



42. Mandel C.H., Mosca L., Maimon E., Sievers J., Tsai A., Rock C.L., Dietary intake and plasma concentration of vitamin E, vitamin C and beta carotene in patients with coronary artery disease. *J. Am. Diet Assoc.*, **97** (6), 655-7 (1997).
43. Britton G., Goodwin T.W., Colonick S.P., Kaplan N.O., Biosynthesis of carotenoids, *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York , **18** (1), 93-98 (1971).
44. Chandler L.A., Schwartz S., Isomerization and losses of trans- $\beta$ -carotene in sweet potatoes as affected by processing treatments, *J. Agric.Food Chem*, **36**, (1988).
45. Stanley G., "The Tuft University Guide to Total Nutrition" Harper Perennial, New York, 1996.
46. Segal R., *Biochimia produselor alimentare*, Ed. Academică, Galați, 2006.
47. Michael T.M., "Encyclopedia of nutritional Supplements", Prima Publ., Rocklin (CA), 1996.
48. Lester P., Colman C., "The Antioxidant Miracle ", John Wiley & Sons , Inc., New York, 1999.
49. Alexan M., Bojor O., *Fructele și legumele, factori de terapie naturală*, Ed. Ceres, București, 1983.
50. Margen Ş. et al., *The Wellness Nutrition Counter*, Rebus Inc., New York, 1997.
51. Slower H.L., Tocopherols in food and fats, *Lipids*, **6**, 291 (1971).
52. Sies H., *Oxidative stress, oxidants and antioxidants*, Academy Press, New York, 1991.
53. Gârban Z., *Nutriție umană*, vol. I, Ed. Didactică și Pedagogică R.A., București, 2001.
54. Corrine T.N., *The Complete Book of Vitamin and Mineral Counts*, Dell. Publ., New York, 1996.
55. Sonberg L., *The Complete Nutrition Counter*, Berkley Books, New York, 1993.
56. Răşenescu I., *Operații și utilaje în industria alimentară*, vol. II, Ed. Tehnică, București, 1972.
57. Nedelcu N., Ionescu A., *Tehnologie și utilaj pentru industria uleiurilor și grăsimilor*, vol. I, Ed. Academica, Galați, 1993.
58. Singer M., *Tehnologia uleiurilor vegetale*, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1971.
59. Dincă N., **Condrat D.**, Grosu V., Bodescu A., *Chimie organică – Lucrări practice*, Ed. Universității "Aurel Vlaicu", Arad , 2008.
60. Brunetti L., Daghetta A., Fedeli E., Kikic I. & Zandarighi L., Deacidification of olive oils by supercritical carbon dioxide. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **66** (2), 209-217 (1989).
61. McHugh M., Krukoni V., *Supercritical Fluid Extraction, Principles and Practice*, Butterworths, London, 1986.
62. Rizvi S.S.H., Mulvaney S., *Extrusion Processing with Supercritical Fluids*, U.S. Patent – **5** , 120 - 559 (1992).
63. Andersen M.O., Marcham K.R., *Flavonoids: chemistry, biochemistry and application*, Taylor & Francis. Group. NW, Boca Raton, U.S.A., 2006.
64. Hong N.I., Yaylayan V.A., Raghavan G.S., Jocelyn Pare J.R., Belanger J.M.R., *Nat. Prod. Lett.*, **15** (3), 197-204 (2001).



65. Amarfi F.R., Procesare minimă atermică și termică în industria alimentară, Ed. Alma, Galați, 1996.
66. Dietrich K., Zenker M., Heinz V., Dong-Un L., Application and potential of ultrasonics in food processing – Trend in Food Scien. and Techn., **15** (5), 261-266 (2004).
67. Tudose C., Fizica ultrasunetelor; Aplicații în industria alimentară, Ed. Prometeu, Galați, 1995.
68. Flavonoides: <http://www.membres.lycos.fr/jjww/Flavonoides.html>.
69. Robards K., Antolovich M., Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids Analyst, **112**, 11-34 (1997).
70. Boniface R., Miskulin M., Robert A.M., Farkas L., Gabor M., Kallay F., The flavonoids and bioflavonoids, Akadematici Kiado, Budapest, 1986.
71. Timberlake C. F., Bridie P., The Flavonoids, 1986.
72. Harborne J.B., The Flavonoids: Advances in research since, Chapman and Hall, London, 1986.
73. Hinchliff A., Stinbank, Teor. Chim. Acta., **95**, 127–134 (1966).
74. Dumitrescu V., Analiză instrumentală, Ed. Univ. Politehnica, București, 1990.
75. Wang J., Analytical Electrochemistry, Vch Verlagsgesellschaft, 2000.
76. Barberan F., Ferreres F., Tetrahedron, **40** (22), (1984).
77. Oprean I., Spectrometria de masă a compușilor organici, Ed. Dacia, Cluj, 1974.
78. Cuyckens F., Claeys M., J. Mass. Spectrom., **39**, 1-15 (2004).
79. Mears J.A., Marby T.J., Phytochemistry, **11** (1), 411-412 (1972).
80. Morita N., Arisawa M., Flavonoids: chemistry and biochemistry, Heterocycles, **4** (2), 373-392 (1976).
81. Malis Z., Bucar F., Croatica Chemica Acta, **71**, 69-79 (1998).
82. Zamfir D.A., Dincă N., Analiză instrumentală, Ed. Univ. „Aurel Vlaicu”, Arad, 2007.
83. Willard H., Merrit L., Dean J., Instrumentals methods of analysis, D.Van Nostrand, New York, 1965.
84. Dumitru I.F. “Vitaminele, chimie, biochimie și fiziologie” Ed. Univ. București, 1970.
85. Bodalski T., Cisowschi N., Diss. Pharm. Pharmacol., **19** (1), 99-104 (1967).
86. Stahl G., Thin Layer Chromatography, Berlin, 374-377 (1956).
87. Khalili N., Hadizadeh F., Hosseinzadeh H., Khaur-Aldina R., J.of. Pharm. Research, 254-265 (2003).
88. Nikolova M., Berkov S., Ivancheva S., Acta Chromatographica, **14**, 110-114 (2004).
89. Ciucanu I., Cromatografia de gaze cu coloane capilare, Ed. Academiei, București, 1990.
90. Horvath E., Miuk I., Talanta, **42** (7), 979-982 (1995).
91. Bing Y., Analysis and Purification Methods in Combinatorial Chemistry, Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey, 2004.
92. Pavia D.L., Introduction to Organic Laboratory techniques : A Small-Scale Approach, Thomson Learning EMEA, 2005.
93. Iovu M., Nicolescu O.T., Chimie organică, Metode experimentale, Ed. Univ. “Carol Davila”, București, 2009.
94. Olszewska E., J. Chromatogr. A., **1041** (1), 11-18 (2004).
95. Krohalm I., Ruiz P.R., Porrás S.P., Hartonen K., Carabis-Martinez R., Riekkola M., J. Chromatogr. A, **1022**, 9-16 (2004).

96. Oloveira et al., *J. Braz. Chem. Soc.*, **12** (2), 243-246 (2001).
97. Tokusoglu O., Unal M.K., Yildirim Z., *Acta Chromatographica*, **13**, 196-207 (2003).
98. Suárez Vallés B., Santamariá Victorero J., Mangas Alonso J.J., Blanco Gomis D., *J. Agric. Food. Chem.*, **42**, 2732-2736 (1994).
99. Hernandez-Perez M., Hernandez T., Cordones-Gomez C., Estrrella I., Babasal R.M., *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3512-3515 (1996).
100. Loliger R.J., Scott B.C., Murcia A., Butler J., Halliwell B & Aurome O.I., *J. Food Chem. Toxic.*, **32**, 671-683 (1994).
101. Sladkovsky R., Solich P., Opletal L., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **24** (5-6), 1049-1054 (2001).
102. Crozier A., Jeuses E., Lean M.I., MsDonald M.S., *J. Chromatogr. A.*, **761**, 315-321 (1997).
103. Wennberg T., Pauka Y.P., Vuorela H., *Acta Chromatographica*, **53**, 240-245 (2001).
104. **Condrat D.**, – „Actions mechanisms of radicals and organisms defense mechanisms against them”, *Analele Universtății din Craiova*, **10**, 355–358 (2005).
105. Martinez F.S., Gallego G.J., Culebras J.M., Tunon M.J., *Nutr. Hosp.*, **17** (6), 271-278 (2002).
106. Yang B., Kotani A., Aral K., Kusu F., *Analytical Sciences*, **17**, 599-604 (2001).
107. Lee J., Koo N., Min D.B., *Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals*, *Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety*, **3**, 21-33 (2004).
108. Gill M.I., Baeberan T.F.A., Pierse H.B., Holcroft A.A., Kader J., *Agric. Food. Chem.*, **48**, 4581-4589 (2000).
109. Tomoya T., Proantocyanidin-Containing Composition., *J. Agric. Food Chem.*, **4**, 161-163 (2003).
110. Ou B., Huang D., Woodill H.M., Flanagan J.A., Deemer E.K., *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3122-3128 (2002).
111. Chiriac A., Albulescu M., *Seria Monografii de chimie, seria 25*, Ed. Universității de Vest, Timișoara, 1999.
112. Oeriu S., Oeriu I., *Grupările tiolice și rolul lor în biologie*, Ed. Academiei R.S.R., București, 1977.
113. Kumar V., Mathur G.N., *Pop. Plast. India*, **23**, 201-208 (1978).
114. Aruna P., *Antioxidant Activity*, Medalion Laboratories–Analytical Progress, **19** (2), 103-198 (2001).
115. **Condrat, D.**, – „Pharmacologic dynamics and therapeutic applications of natural antioxidants”, *Analele Universtății din Craiova*, **10**, 359–364 (2005).
116. Johnson F.C. et al., *CRC Crit. Rev., Food Sci. and Nutr.*, **11**, 217-225 (1979).
117. Nascimento M.A., Silva A.K., Franca L.C.B., Quignard E.L.J., Lopez J.A., Almeida M.G., *Turnera ulmifolia L. (Turneraceae): Preliminary study of its antioxidant activity*, *Bioresource Technology*, **97** (12), 1387-1391 (2006).
118. Bourgeois C.F., *Rev. Franc. Corps Gras.*, **28**, 353-365 (1981).
119. Charlet E., *Parfüm Kosmet.*, **67**, 730-731 (1986).
120. Dunnett P.C., Telling G.M., *J. Cosmet. Sci.*, 241 (1984).
121. Geras'kina S.S., Mukhina M.V., *Khim. Farm. Zh.*, **14** (3), 90-113 (1980).
122. Kawayuki T., Suzuki Z., *Patent Japonia* 60169430 (1985) ; cf. *Chem. Abstr.*, **93**, 210-269 (1980).

123. Gadenas E., Drug. Metab. Proc. Eur. Workshop, 9 – th. 1984 Pub. 1985; J. Chem. Abstr., **103**, 208-291 (1985).
124. Bors W., React. Sanerstoffspeyies Med., 161–168 (1987).
125. Popovici I., Moruzi C., Toma I., Atlas Botanic, Ed. Didactică și Pedagogică, R. A, București, 1992.
126. Enciclopedia Florei și Faunei din Romania, [www. Eukarya. ro](http://www.Eukarya.ro).
127. Pârvu C., „Universul plantelor. Mica Enciclopedie”, Ed. Enciclopedică, București, 2000.
128. Treben M., Sănătatea din farmacia Domnului, Ed. Hunga – Print, Budapesta, 1996.
129. [http://en.wikipedia.org. /wiki/hydrangea](http://en.wikipedia.org/wiki/hydrangea).
130. <sup>xxx</sup>, Farmacopeea Română, ediția a-X-a, Ed. medicală, București, 1993.
131. Ciulei I., Practical manuals on the industrial utilization of medicinal and aromatic plant. Methodology for analysis of vegetable drugs Unido, Romania, 1982.
132. El-Sakka M., Grigorescu E., Methodology of medical plants research, Ed. Tehnică, Chișinău, 1995.
133. Grigorescu E., Stănescu U., Ionescu A., Lucrări practice de farmacognozie. Ed. IMF, Iași, 1984.
134. Baicu I., Fiziologie animala, Ed. Didactică și Pedagogică., București, 1977.
135. Cannet C., Le rôle du contrôle alimentaire dans la nutrition, Med. Nutr., **28** (6), 305-309 (1998).
136. Neamțu G., Câmpeanu Gh., Socaciu C., Biochimie vegetală, Ed. Didactică și Pedagogică, București, 1993.
137. Trémolières J., Nutrition, Ed. Dunod, Paris, 1973.
138. <http://www.instruction.greenriver.edu/knutsen/chem150/vitaminaC.htm>
139. Kutnik M.A., Hawkess H.W., Sahans E.E., Omage S.T., An internal standard method for the unattended high–performance liquid chromatographic analysis of ascorbic acid in blood components, Anal. Biochem., **66**, 424-430 (1982).
140. Fagan D.T., Hu I.F., Kuwana T., Vacuum heat – treatment for activation of glassy carbon electrodes, Anal. Chem., **57**, 2759-2763 (1985).
141. Kulys J., D’Costa E.J., Printed electrochemical sensor for ascorbic acid determination, Anal. Chim.Acta, **243**, 173-178 (1991).
142. Kulys J., Drungiliene A., Electrocatalytic oxidation of ascorbic acid at chemically modified electrodes, Electroanalysis, **3**, 209-214 (1991).
143. Hu I.F., Kuwana T., Oxidative mechanism of ascorbic acid at glassy carbon electrodes, Anal. Chem., **58**, 3235-3239 (1986).
144. Dong S., Che G., Electrocatalysis at a microdisk electrode modified with a redox species, J. Electroanal. Chem., **309**, 103-114 (1991).
145. Petersson M., Electrocatalytic oxidation of ascorbic acid and voltammetric determination with a ferrocene-modified platinum electrode, Anal. Chim. Acta, **187**, 333-338 (1986).
146. <http://www.world-food.net/scientificjournal/2007/issue3/pdf/food/f34.pdf>
147. **Condrat D.**, Harja F., Lupea A.X., Determination of ascorbic acid through the 2,6–diclorophenol indophenol method from the Angiospermatophyta species, Analele Universității din Craiova, **13**, 357-360 (2008).

148. **Condrat D.**, Harja F., Lupea A.X., Determinarea acidului ascorbic prin metoda 2, 6-diclorfenol-indofenol din speciile *Alchemilla vulgaris*, *Allium ursinum*, *Acorus calamus*, *Solidago virga-aurea*, 2<sup>nd</sup> International Conference" Research People and Actual Tasks on Multidisciplinary Sciences "10 – 12 June , Lozenec, Bulgaria, 243-245 (2009).
149. Markakis, P., *Anthocyanins as Food Colors*, Academic Press, London, 1982.
150. **Condrat D.**, Harja F., Lupea A.X., Determination of the total content in anthocyanidins from the *Alchemilla vulgaris*, *Allium ursinum*, *Acorus calamus* and *Solidago virga aurea*, *Analele Universității din Craiova*, **13**, 361-364 (2008).
151. **Condrat D.**, Harja F., Lupea A.X., Determinarea conținutului total de antocianidine din speciile de *Agrimonia Eupatoria*, *Veronica officinalis*, *Viscum album*, 2<sup>nd</sup> International Conference" Research People and Actual Tasks on Multidisciplinary Sciences "10 – 12 June, Lozenec, Bulgaria, 246-248 (2009).
152. Bodea C., Farcășan V., Nicoară E., Slusanschi N., – *Tratat de Biochimie vegetală, Partea I, Fitochimie*, vol. I-III, Acad. R.S. România, București, 1964-1966.
153. Dincă N., **Condrat D.**, Grosu V., *Lucrări practice de chimia alimentelor*, Ed Universității Aurel Vlaicu, 2008.
154. **Condrat D.**, Szabo M.R., Crișan F., Lupea A.X., Antioxidant activity of some phanerogam plant extracts, *Food Science and Technology Research, Japonia*, **15** (1), 95-98 (2009).
155. **Condrat D.**, Crișan F., Szabo R.M., Chambre D., Lupea A.X., Flavonoide din specii de plante (*Angiospermatophyta*, *Spermatophyta* ) și activitatea lor antioxidantă, *Revista de chimie*, **60** (11), 1129-1134 (2009).
156. Harborne J.B., Turner L.B., *Plant Chemosystematics*, Academic Press, London, 1984.
157. Gârban Z., *Nutriție umană*, vol. I, Ed. Didactică și Pedagogică R.A. București, 2001.
158. Singleton V., Esau P., Phenolic substances in grapes and wine, and their significances, **341**, 231-245 (1969).
159. Ianculov I., Modoran D., *Caracterizarea polifenolilor existenți în unele specii vegetale*, *Cercetării științifice, Seria IV: Procese și Tehnologii Alimentare*, Ed. Agroprint – Timișora, 1997.
160. **Condrat D.**, Lupea A.X., Harja F., Qualitative and Quantitative Study Regarding the Content in Tannins of Hydro-Alcoholic Extracts from *Alchemilla vulgaris*, *Allium ursinum*, *Acorus calamus* and *Solidago virga aurea*, *Analele Universității din Craiova*, **12**, 275-278 (2007).
161. **Condrat D.**, Qualitative and Quantitative Study of Tanins from the Hydro-Alcoholic Extracts of *Agrimonia eupatoria*, *Viscum album* and *Veronica officinalis*, *Annals of the Suceava University-Food Engineering*, **4** (2), 80-83 (2007).
162. **Condrat D.**, Moșoarcă C., Zamfir D.A., Crișan F., Szabo M.R., Lupea A.X., Qualitative and quantitative analysis of gallic acid in *Alchemilla vulgaris*, *Allium ursinum*, *Acorus calamus* and *Solidago virga aurea* by mass spectrometry with chip – electrospray ionization and high performance liquid chromatography, *Central European Journal of Chemistry, Germania*, No. CEJC-D-09-00206R1 (2009).

163. Herdan J.M., Giurginca M., Meghe. A., *Antioxidanți*, Ed. Tehnică, București, 1995.
164. Hasler A., Stichler O., *J. Chromatogr.*, **508**, 236–240 (1990).
165. Ozen T., Ayan A.K., Cirak C., Kevseroglu I., *Chem. Nat. Compd.*, **41** (2), 232-233 (2005).
166. **Condrat D.**, Harja F., Lupea A.X., Analysis of the polyphenols from the Angiospermatophyta and Spermatophyta Plant Species, *Analele Universității din Oradea*, **8**, 1220-1225 (2009).
167. Beral E., Zapan M., *Chimie organică*, Edit. Tehnică, București, 1973.
168. Kaur C., Kapor H.C., Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables, *International Journal of Food Sciences and Technology*, **37**, 153-161 (2002).
169. Pineda A., Salucci M., Lázaro R., Maiani G., Ferro-Luzzi A., Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos, *Rev. Cubana Aliment*, **13** (2), 104-111 (1999).
170. Miliauskas G., Venskutonis P.R. van Beek T.A., Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts, *Food Chemistry*, **85** (2), 1123-1131 (2004).
171. Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., Lee C.Y., Cocoa has more phenolic phytochemicals and higher antioxidant capacity than teas and red wine, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 7292-7295 (2003).
172. Zhang D., Hamazu Y., Phenolic compounds, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant properties of green, red and yellow bell peppers, *Food Agric. Environ*, **1** (2), 22-27 (2003).
173. **Condrat D.**, Lupea A.X., - "Elimination activity of free radicals evaluation of ethanol extracts from phanerogram plants by DPPH method, *Scientific and Technical Bulletin, Arad*, **12**, 45-50 (2007).
174. Pârvulescu L., Estimarea calității sucurilor de fructe cu ajutorul analizatoarelor automate, Ed. Orizonturi Universitare, Timișoara, 2003.
175. Olinescu R., Greabu M., *Chemiluminescența și bioluminescența*, Ed. Tehnică, București, 1987.
176. Krasowska A., Rosiak D., Szkapiak K., Lukaszewicz M., Chemiluminescence detection of peroxy radicals and comparison of antioxidant activity of phenolic compounds, *Current Topics in Biophysics*, **24**, 89-95 (2000).
177. Gamble J., Grewal P.S., Gartside I.B., Vitamin C modifies the cardiovascular and microvascular responses to cigarette smoke inhalation in man. *Clin. Sci(Lond)*, **98**(4) 455-460 (2000).
178. Bustoc I., Salgado G., López C., The oxidation of luminol an experiment to maximize the efficiency of chemiluminescence from luminol, *Chem. Educator*, **6**, 1-3 (2001).
179. Novas M. N., Jmenez A. M., Asuero A.G., Determination of antioxidant activity of canary seed infusions by chemiluminescence, *J. of Anal. Chem.*, **59** (1), 75-76 (2002).
180. Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C., Turck M., Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method., *Amer. J. Clin. Pathol*, **45**, 493-496 (1966).

181. **Condrat D.**, Szabo M.R., Radu D., Lupea A.X., Plant species from the Angiospermatophyta and Spermatophyta genus with atiradical and antimicrobial activity, *Oxidations Communications, Bulgaria*, **32** (4), 924-929 (2009).
182. Dicu A.M., *Uleiuri și grăsimi vegetale*, Ed. Universității „Aurel Vlaicu”, Arad, 2007.
183. Vecchio S., Campanella L., Nuccilli A., Tomassetti M., Kinetic Study of thermal breakdown of triglycerides contained in extra – virgin olive oil, *J. of Thermal Analysis and Calorimetry*, **91** (1), 51-56 (2008).
184. Kirk and Othmer, *Encyclopedia of Chemical Technology: Fats and Fatty Acids*, 3<sup>rd</sup> Ed., Wiley and Sons, **9**, 808 (1980).
185. Gennaro L., Bocca A.P., Modesti D., Masella R., Cani E., Effect of biophenols on olive oil stability evaluated by thermogravimetric analysis, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4465-4469 (1998).
186. Santos J.C.O., Santos A.V., Souza A.G., Thermal Analysis in Quality Control of the Olive Oil Europ. *J. Pharm. Sci.*, **13** (1), 23-24 (2001).
187. Souza A.G., Santos I.C., Conceição M.M., Dantas S.M.C., Prasad S., A thermoanalytic and kinetic study of sunflower oil, *Brazilian J. of Chemical Engineering*, **21** (2), 263-273 (2004).
188. Dweck J., Sampaio C.M.S., *J. Therm. Anal. Cal.*, **75**, 835 (2004).
189. **Condrat D.**, Chambree D., Harja F., Lupea A.X., Analysis of the thermal stability for the extra virgin olive with or without added extract of *Solidago virga aurea*, *Analele Universității din Craiova*, **14**, 571-578 (2009).



## Anexe

Aparatura utilizată în determinările experimentale:

1. Determinarea acidului ascorbic prin metoda electrochimică a fost realizată cu un potențostat Voltalab 40 (PGZ 301) (Radiometer Analytical, Franța) controlat de un software electrochimic Voltmaster 4 (Versiunea 7.08).
2. Determinarea conținutului total de flavonoide s-a efectuat cu spectrofotometru Uvikon 930.
3. Determinarea conținutului total de taninuri, antocianidine s-a realizat cu ajutorul unui spectrofotometru UV-VIZ Pharmacia LKB Ultrospec III (Germania).
4. Pentru cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC), cromatograful utilizat a fost de tipul HPLC Varian Pro Star model 240, compus dintr-o pompă ternară, injector automat, termostat fixat la temperatura camerei și detector UV-VIZ Varian Model 345.
5. Determinarea compușilor polifenolici s-a efectuat cu:
  - Balanța analitică Kern;
  - Baie de ultrasonare TPC-25;
  - Spectrofotometru multidetecție Biotek, domeniul de măsurare UV-VIZ 190-800 nm.
6. Spectrele de masă caracteristice extractelor vegetale studiate au fost realizate cu Spectrometru de masă cu Capacitate Ionică și Sursă ETD, tip HCT ultra, prevăzut cu surse de ioni ESI micro, nano și infuzie seringă-pompă și interfață cu calculator care permite prelucrarea datelor prin utilizarea programelor Esquire Control, Data Analysis și HY Star versiunea 2005.
7. Analiza termică a uleiului de măsline extra virgin s-a efectuat cu ajutorul Aparatului Netzsch STA 409 PC.

Reactivi:

- 2,6-di-terț-butil-4-metilfenol (BHT), minim 99%, Sigma
- alcool metilic, 99,9 %, Merck
- alcool etilic, minim 96%, Merck
- diclormetan, Merck
- sulfat de sodiu anhidru, Merck
- acid clorhidric, minim 80%, Merck
- reactiv Bertrand, p. a.
- cloroform, minim 93%, Chimopar
- acid sulfuric, minim 96%, Merck
- reactiv Tollens, reactiv Fehling I, reactiv Fehling II, p. a.,
- hidroxid de aluminiu, Sigma
- quercetină, minim 98,5%, Roth
- miricetină, minim 98%, Roth
- rutină, minim 97%, Roth
- kamferol, minim 99,9%, Roth

- acid ascorbic, minim 98,5%, Roth
- acid galic, cianidină, delfinidină, minim 99%, Roth
- pirogalo, minim 98%, Roth
- DPPH, Merck
- 5-amino-2,3-dihidronaftalazin-1,4-diona, Merck
- catechină, minim 98,5 %, Roth
- cianidină, minim 98,5 %, Roth
- delfinidină, minim 99 %, Roth
- eter de petrol, p.a., Roth



## Anexa 1. Spectrele UV pentru standardele studiate.

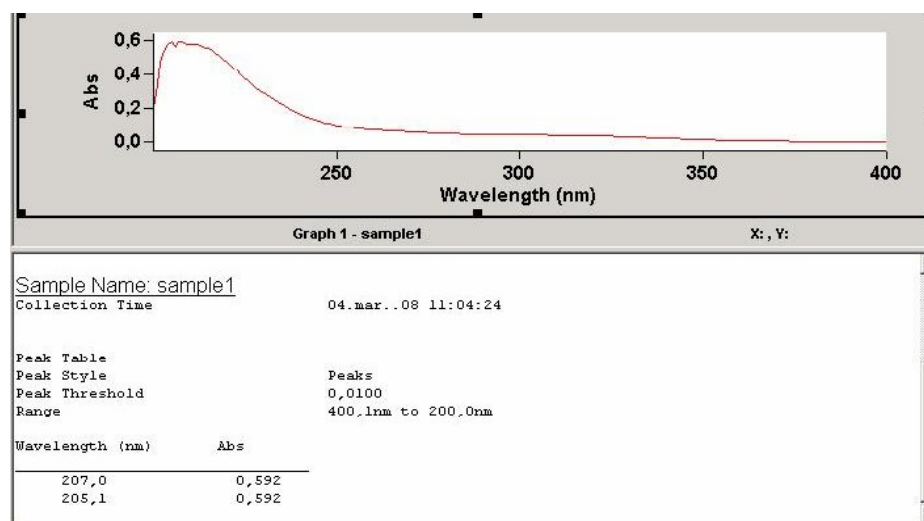


Figura 1.1. Spectrul UV - Acid galic

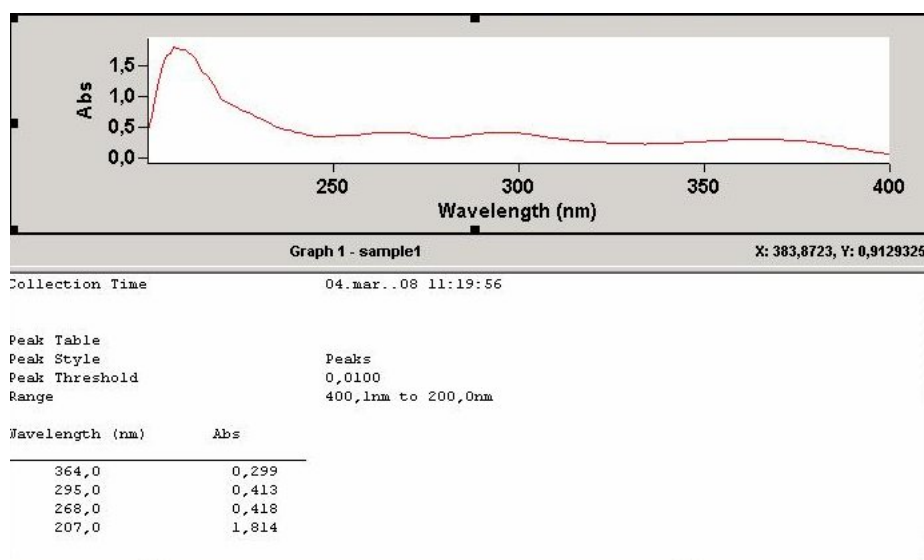


Figura 1.2. Spectrul UV - Kamferol

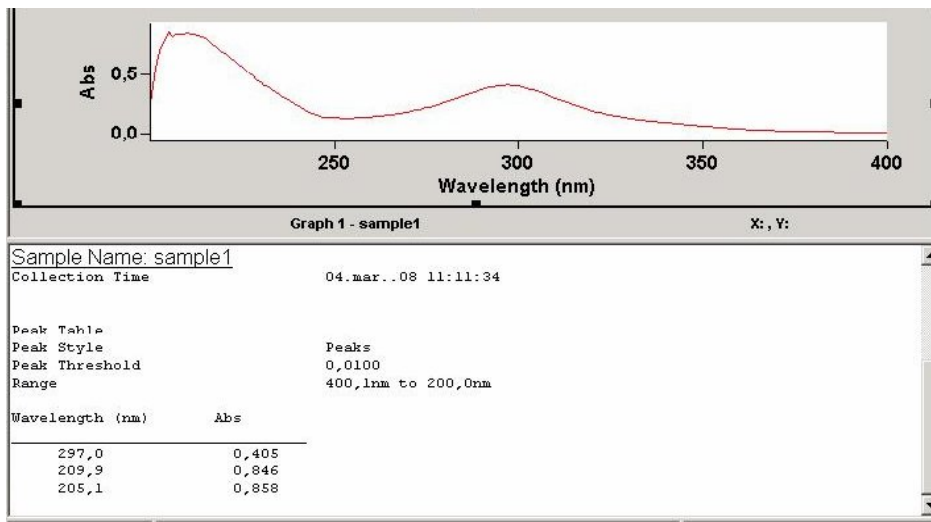


Figura 1.3. Spectrul UV - Miricetina

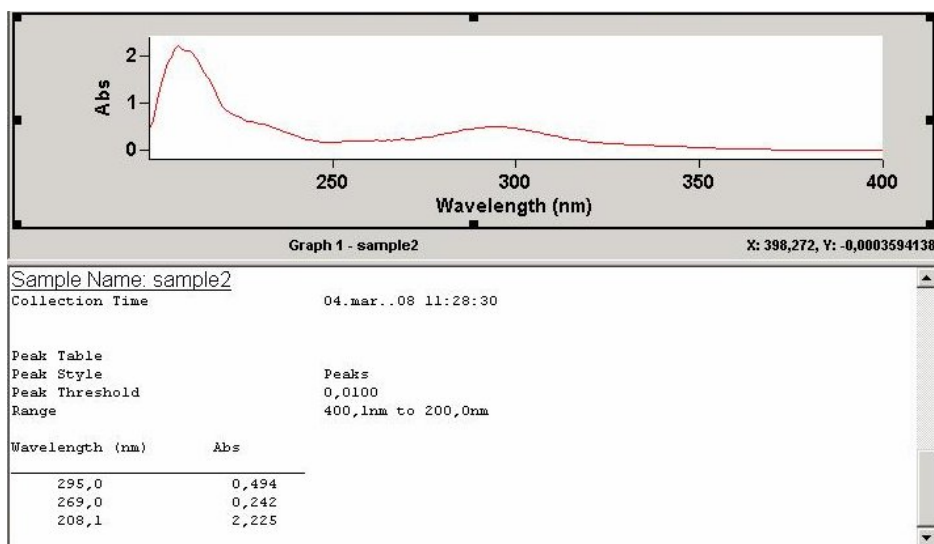


Figura 1.4. Spectrul UV - Rutina

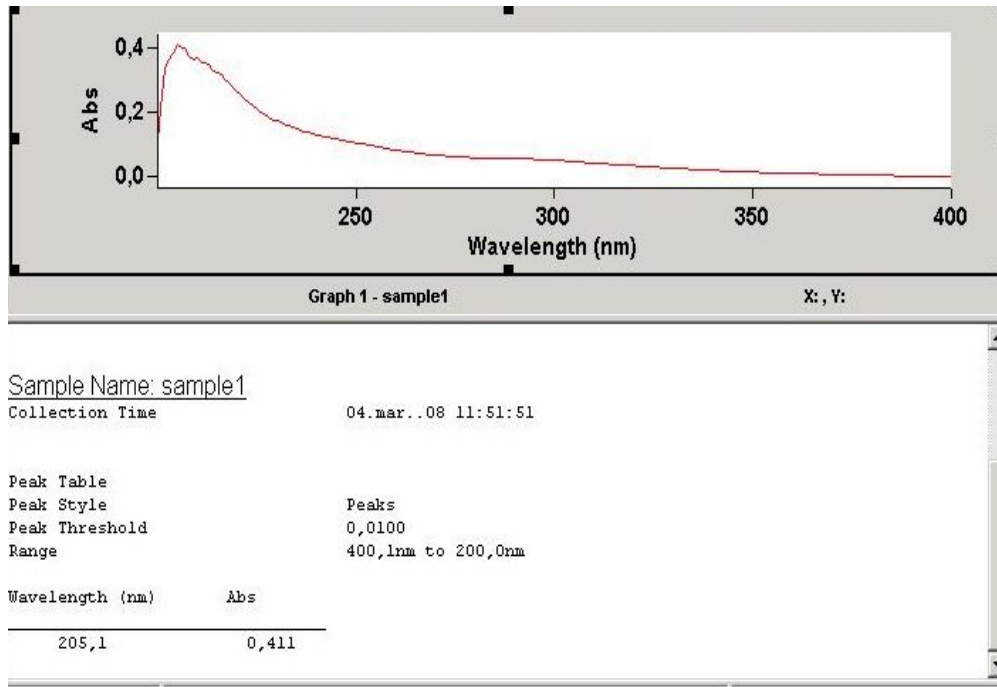


Figura 1.5. Spectrul UV– Pirogalol

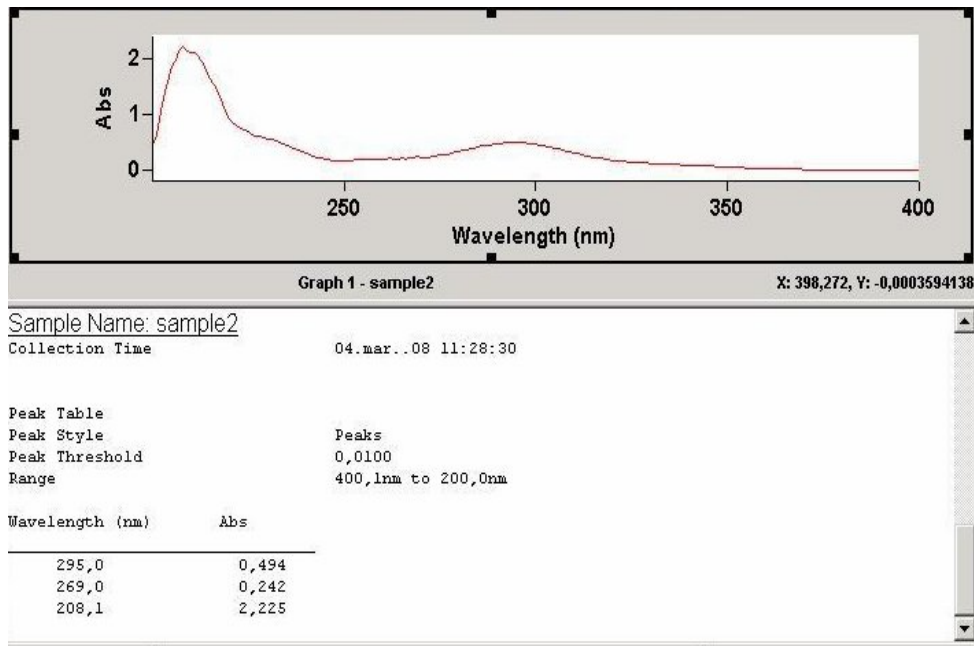


Figura 1.6. Spectrul UV–Quercetina

Anexa 2. Dreptele de calibrare pentru cele cinci standarde studiate.

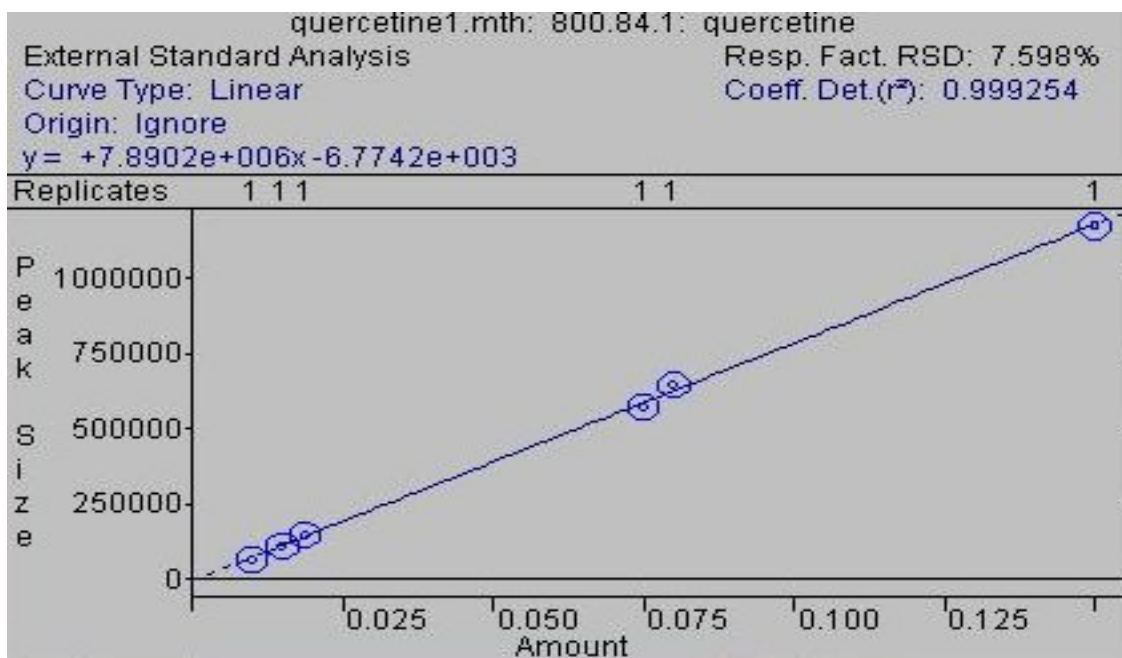


Figura 2.1. Dreapta de calibrare pentru quercetină

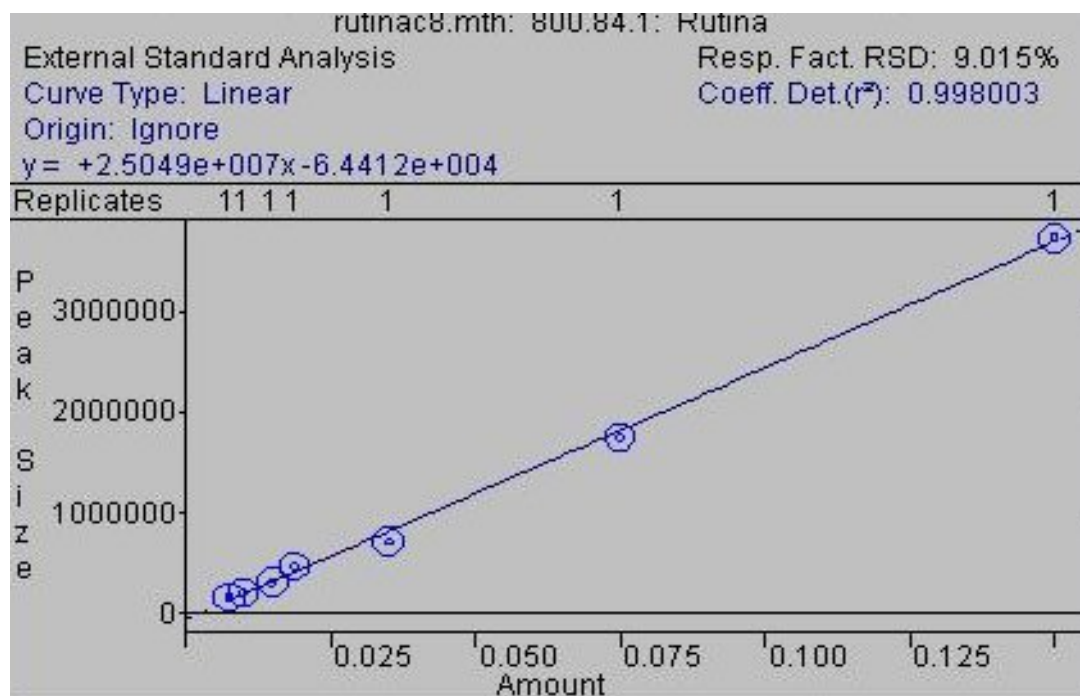


Figura 2.2. Dreapta de calibrare pentru rutină

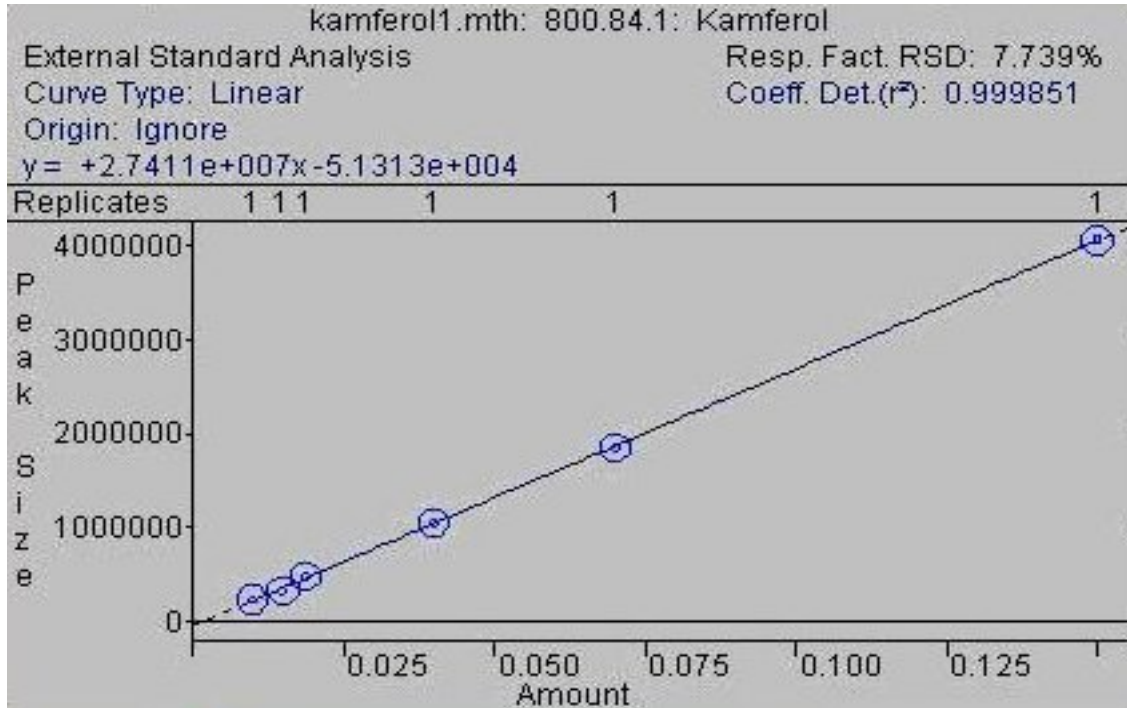


Figura 2.3.Dreapta de calibrare pentru kamferol

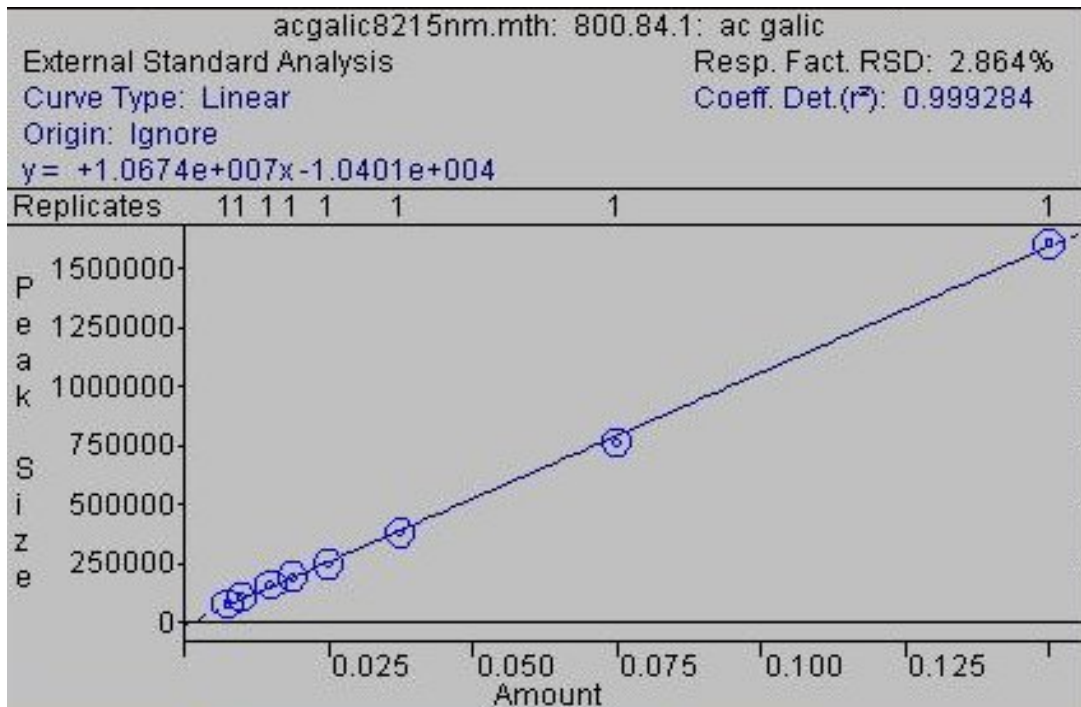


Figura 2.4.Dreapta de calibrare pentru acid galic

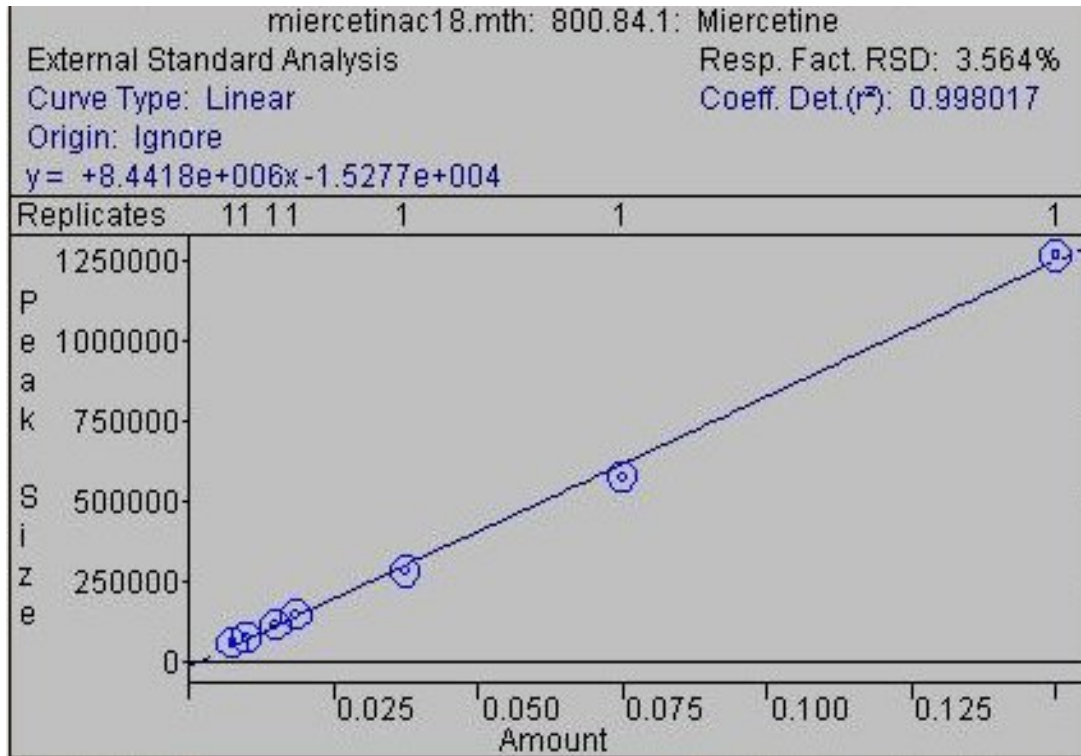


Figura 2.5.Dreapta de calibrare pentru miricetină

**Anexa 3. Cromatogramele HPLC ce corespund extractelor etanolice, metanolice, apoase de material vegetal pentru cele cinci standarde studiate.**

**a) Extracte etanolice 96%.**

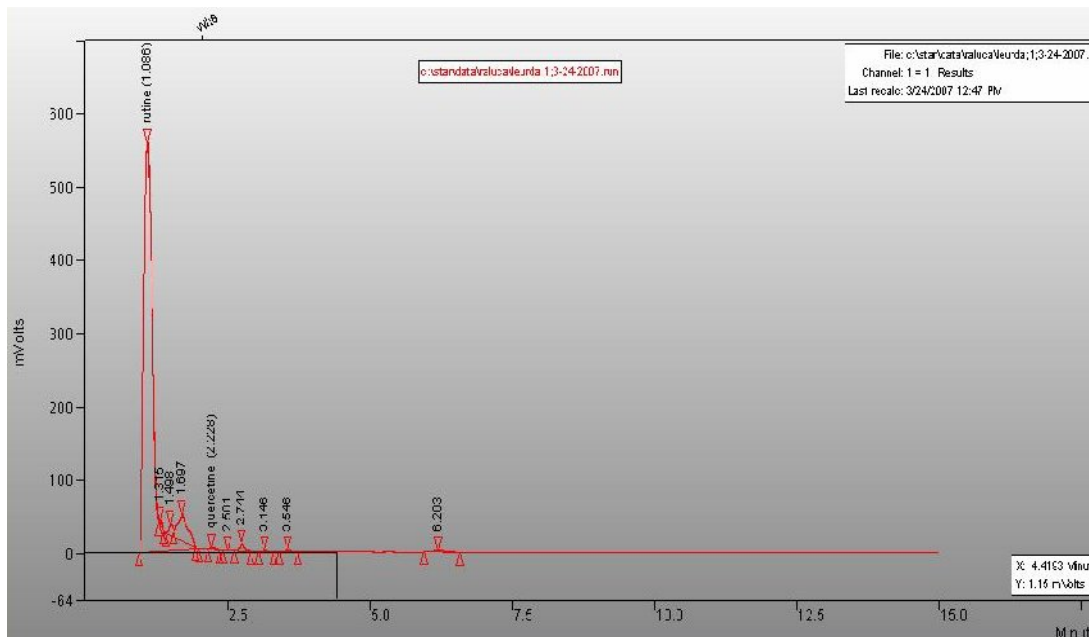


Figura 3.1. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic 96% de *Allium ursinum*

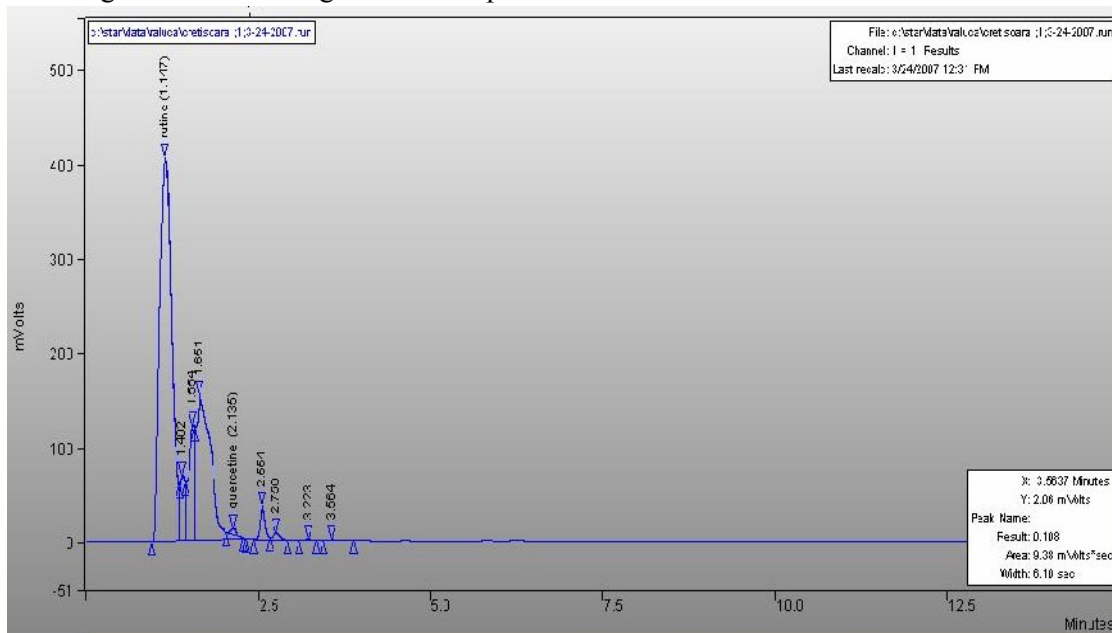


Figura 3.2. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic 96% de *Alchemilla vulgaris*



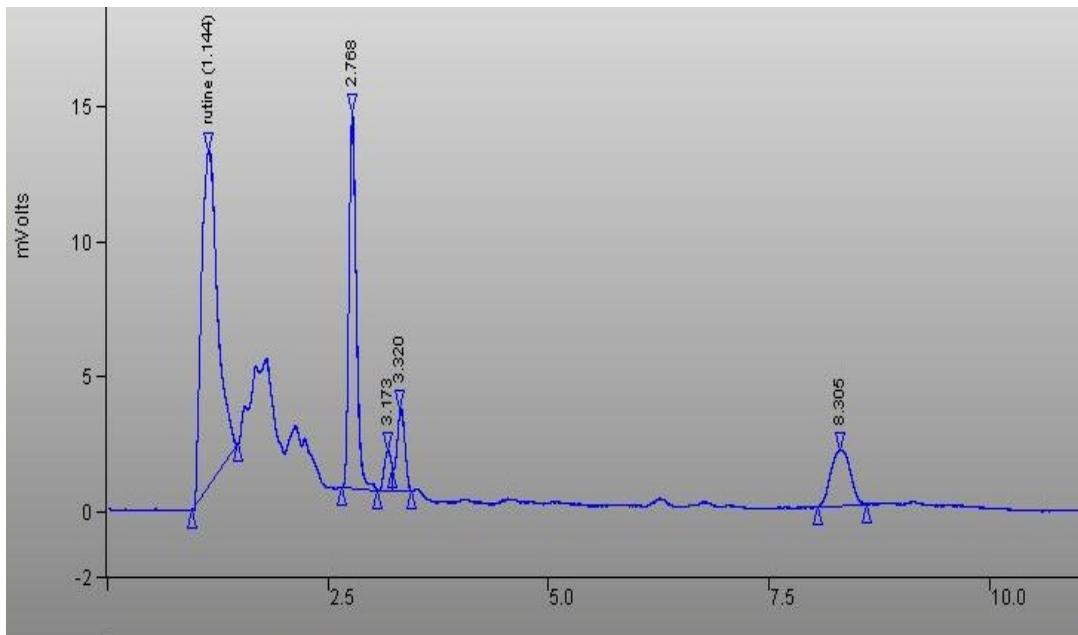


Figura 3.3. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic 96% de *Acorus calamus*

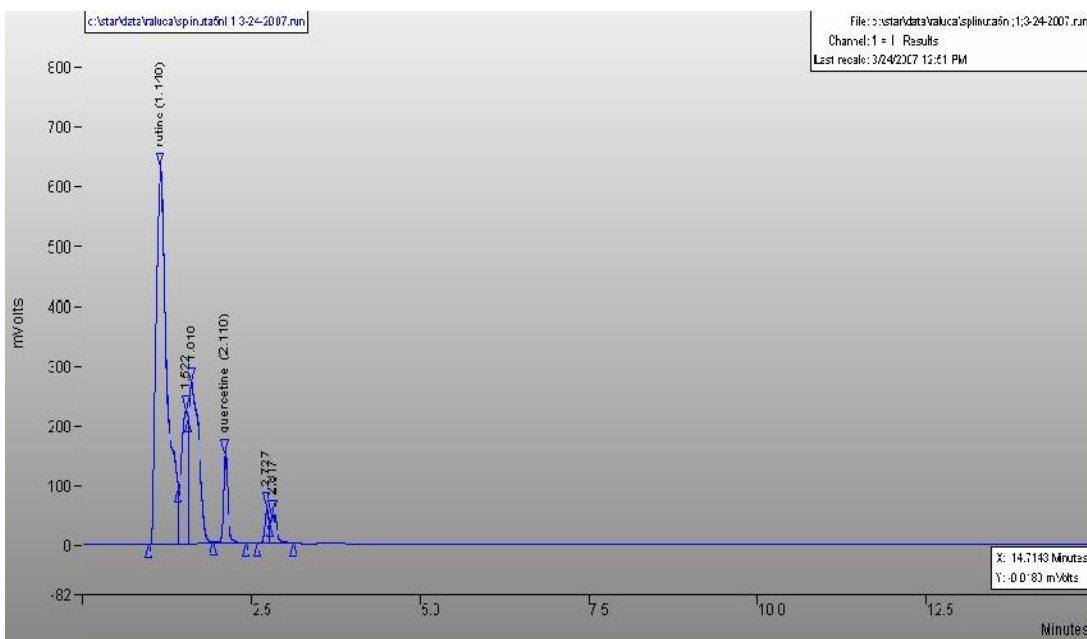


Figura 3.4. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic 96% de *Solidago virga aurea*



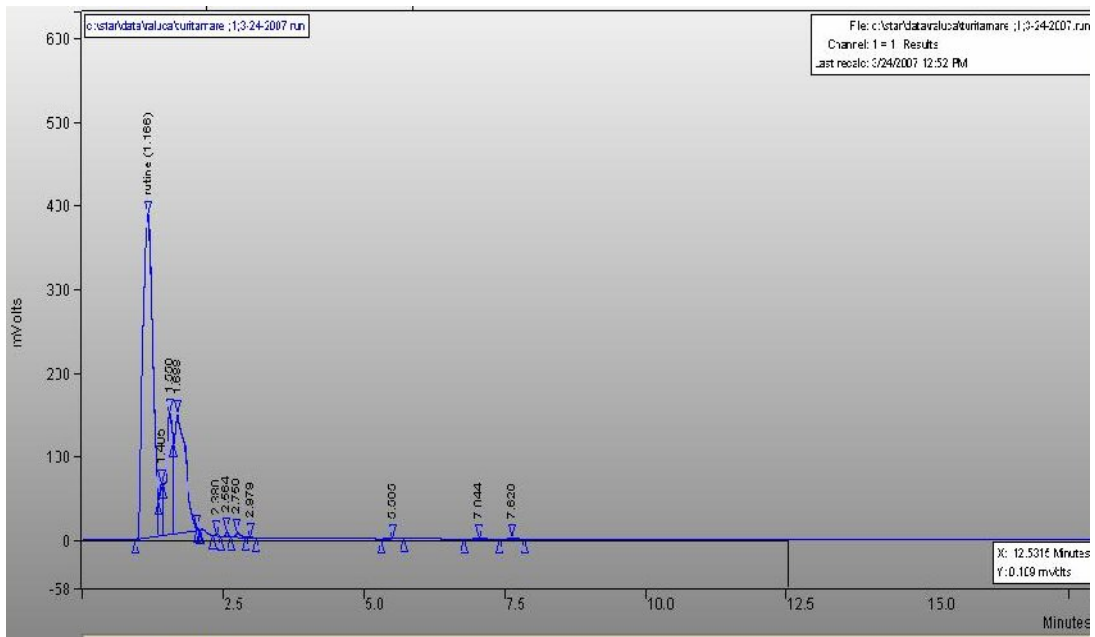


Figura 3.5. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic 96% de *Agrimonia eupatoria*

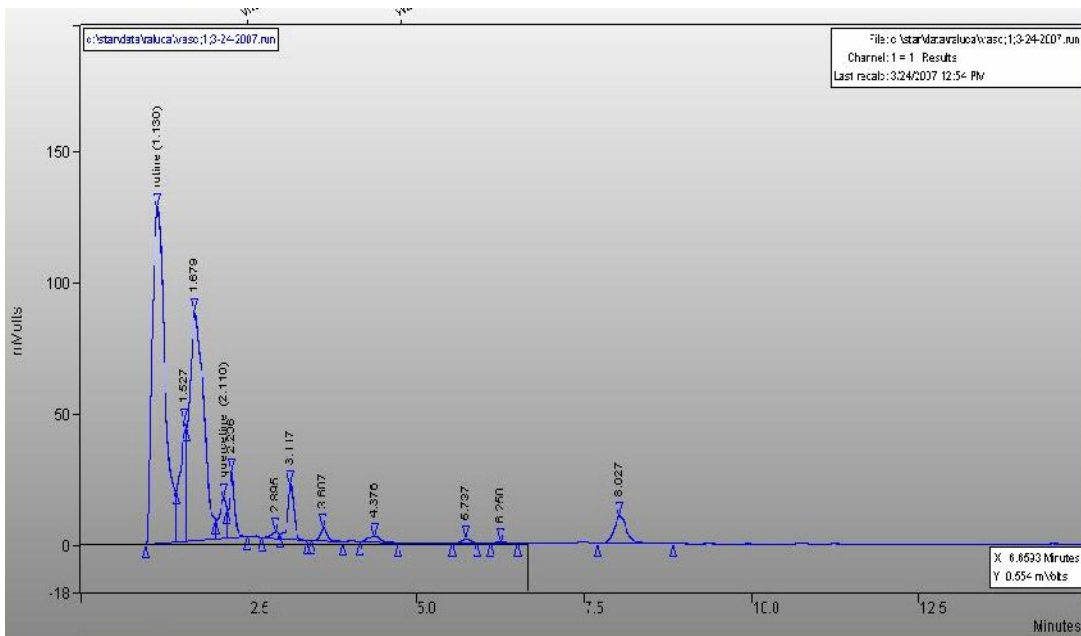


Figura 3.6. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic 96% de *Viscum album*

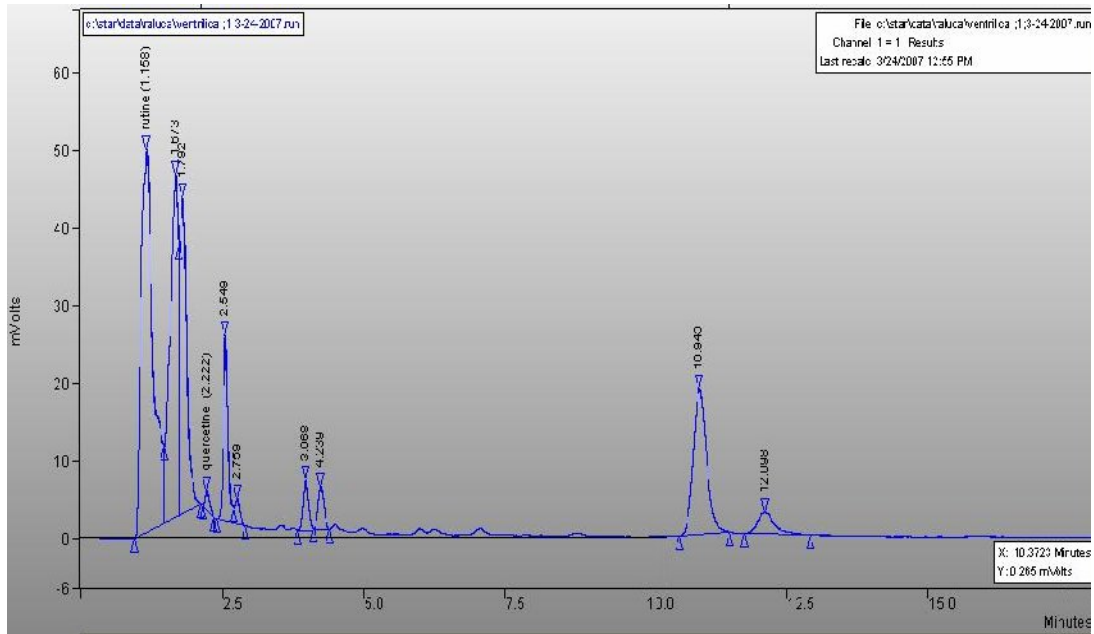


Figura 3.7. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic 96% de *Veronica officinalis*

**b) Extracte apoase.**

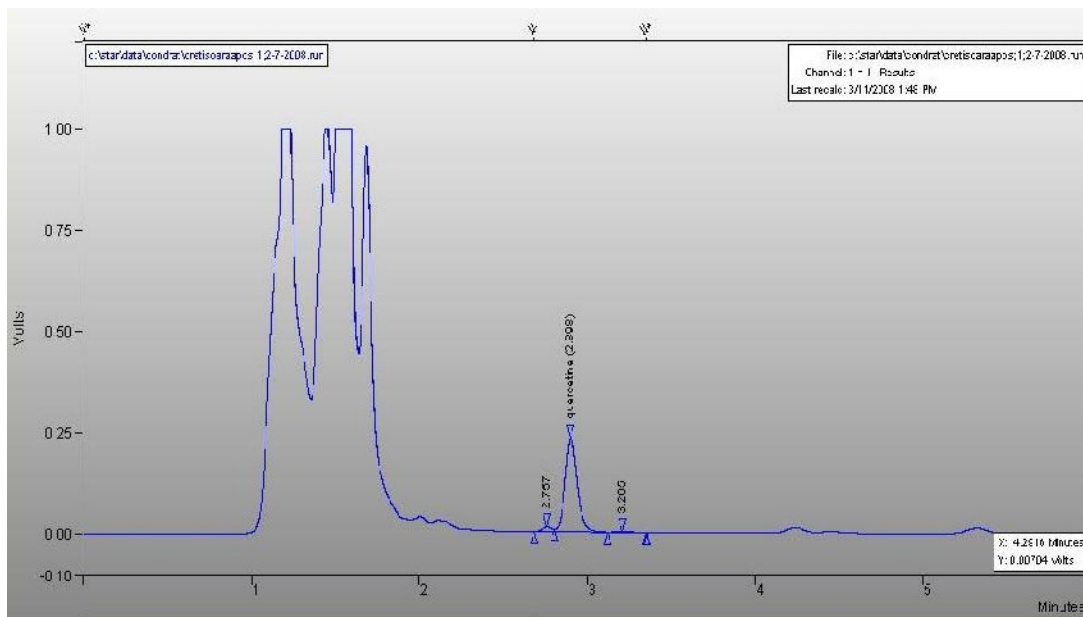


Figura 3.8. Cromatograma HPLC pentru extractul apos de *Alchemilla vulgaris* (quercetină)

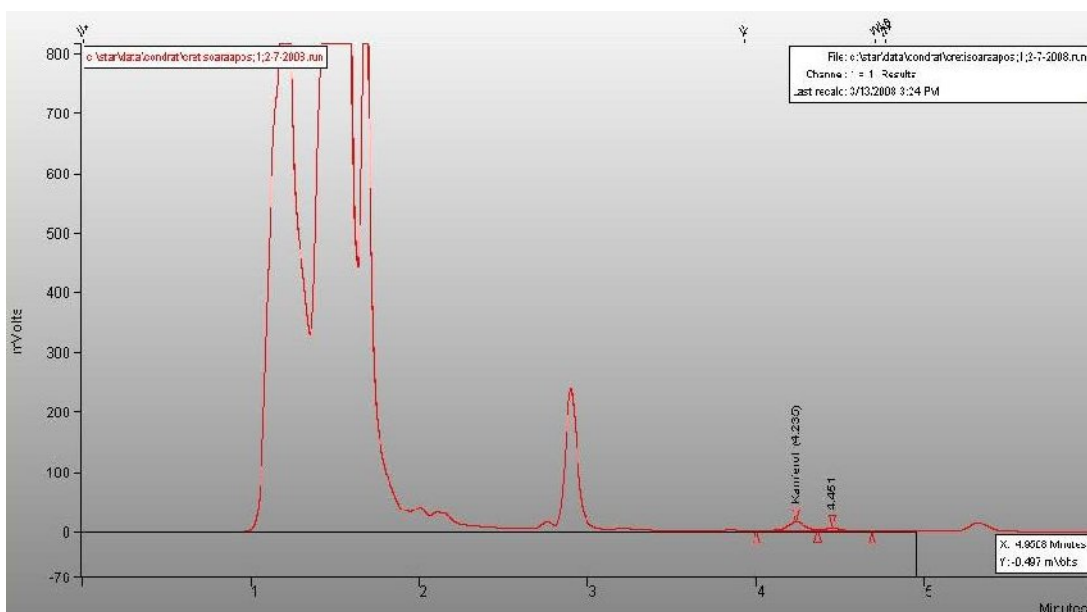


Figura 3.9. Cromatograma HPLC pentru extractul apos de *Alchemilla vulgaris* (kamferol)

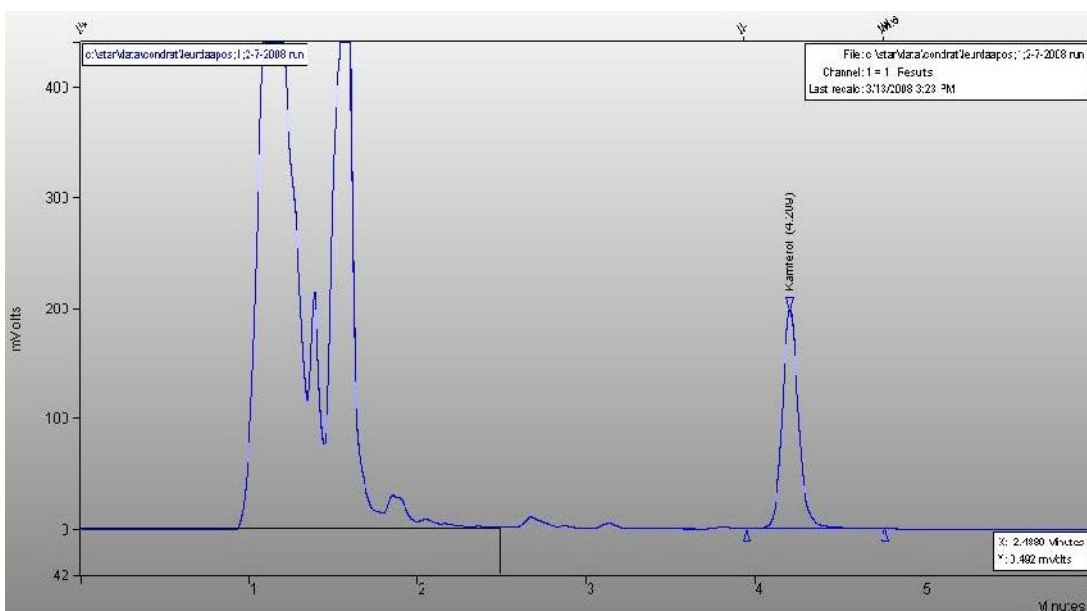


Figura 3.10. Cromatograma HPLC pentru extractul apos de *Allium ursinum* (kamferol)

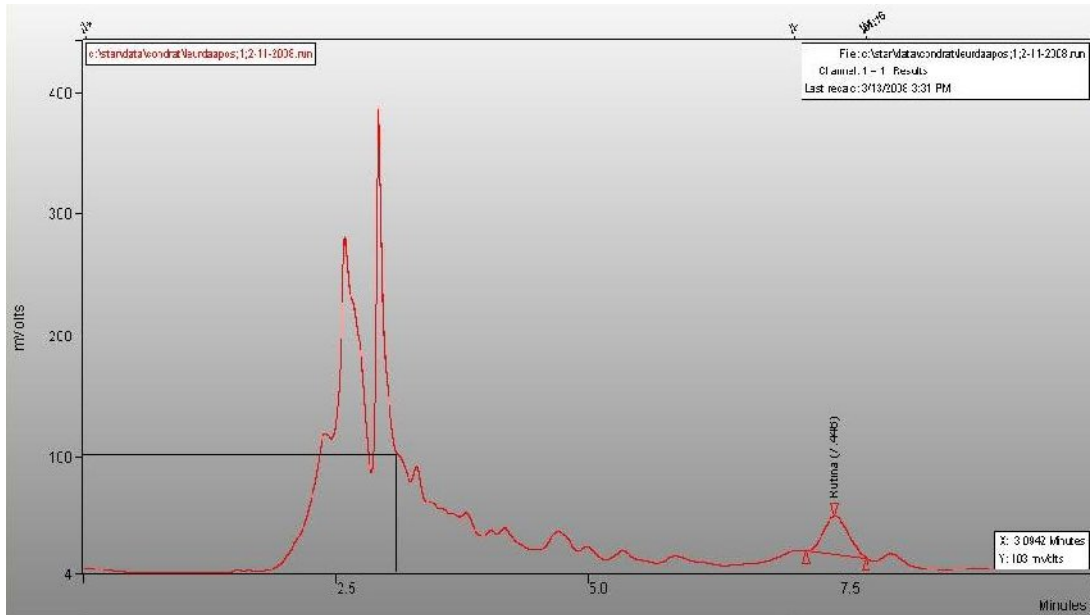


Figura 3.11. Cromatograma HPLC pentru extractul apos de *Allium ursinum* (rutină)

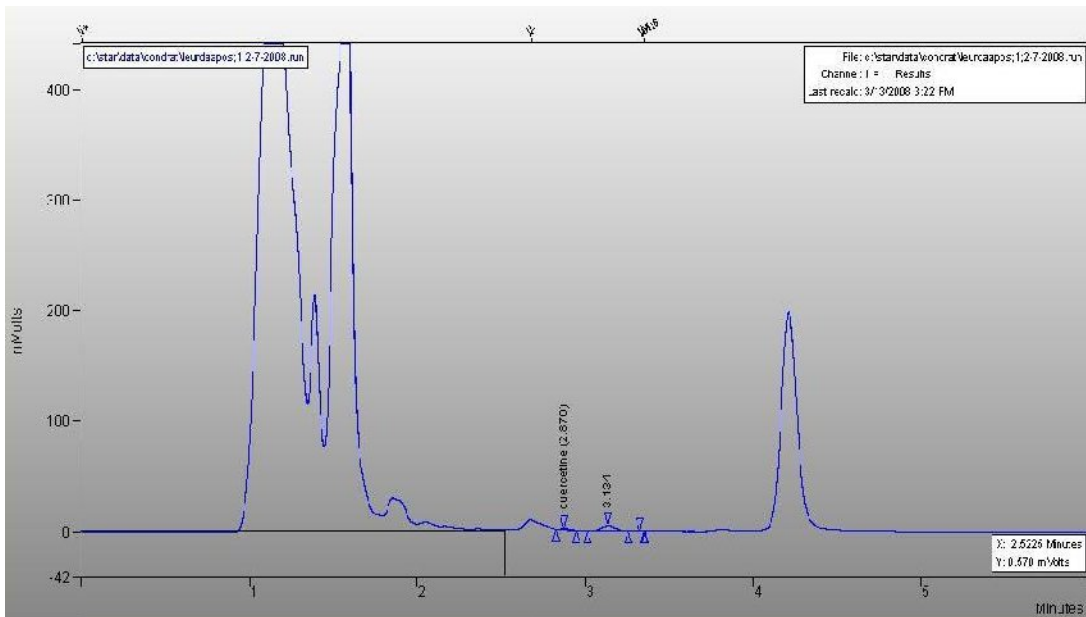


Figura 3.12. Cromatograma HPLC pentru extractul apos de *Allium ursinum* (quercetina)

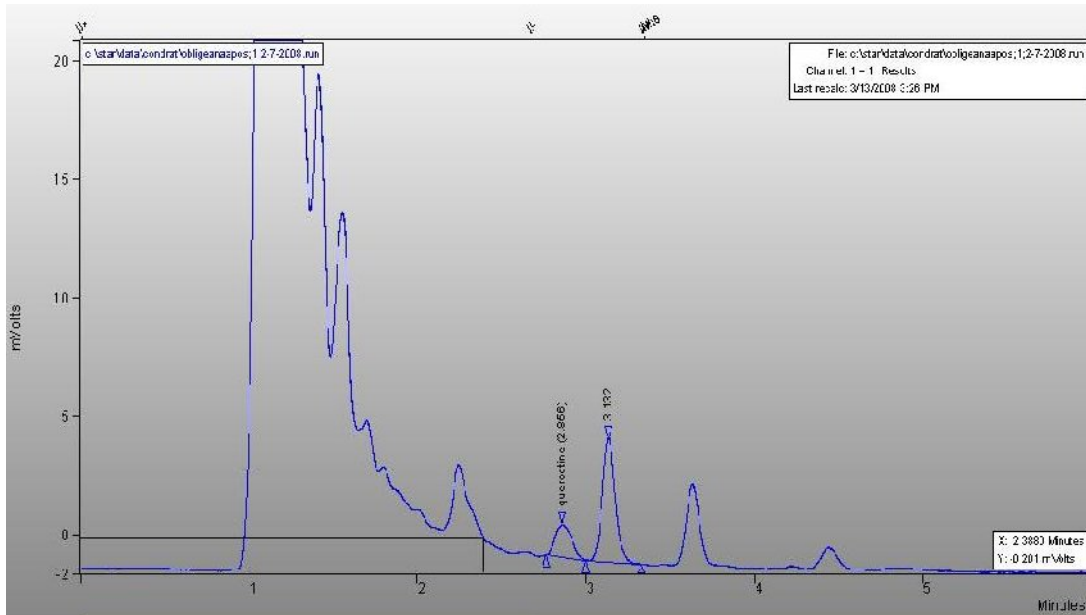


Figura 3.13. Cromatograma HPLC pentru extractul apos de *Acorus calamus*

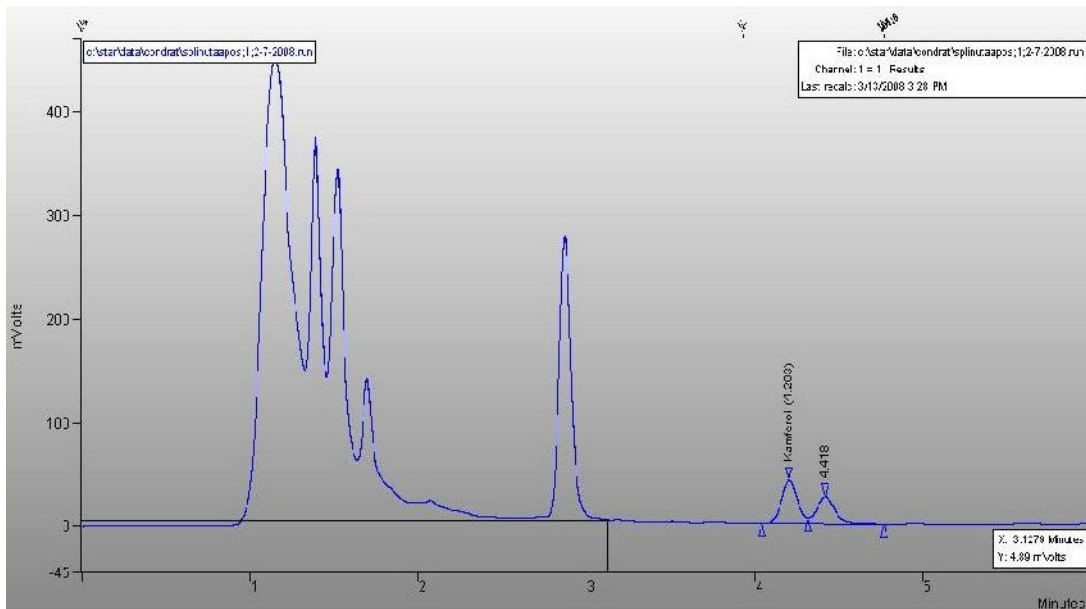


Figura 3.14. Cromatograma HPLC pentru extractul apos de *Solidago virga aurea* (kamferol)

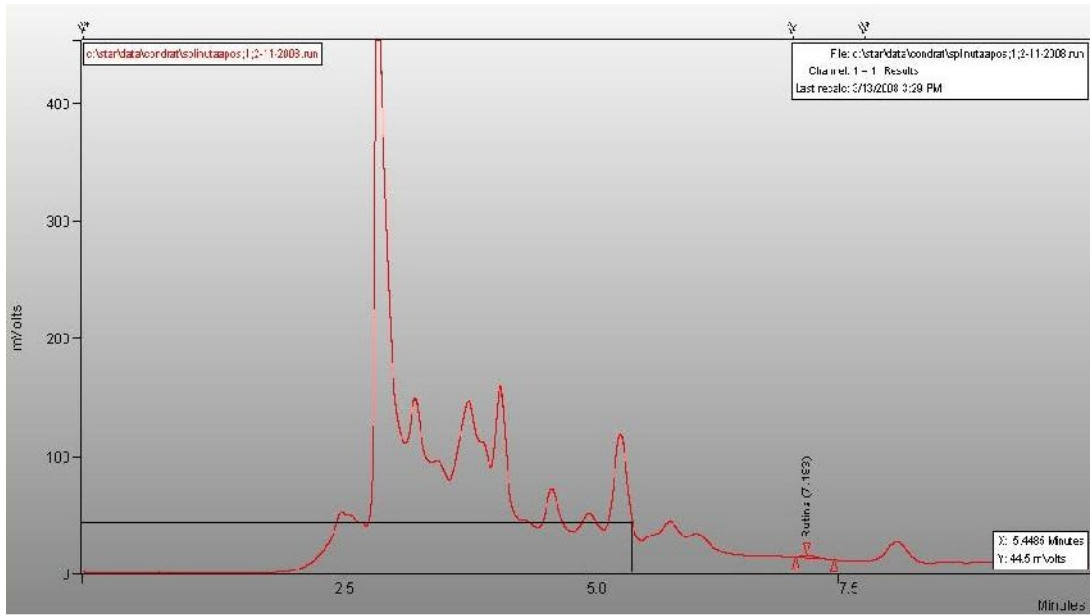


Figura 3.15. Cromatograma HPLC pentru extractul apos de *Solidago virga aurea* (rutină)

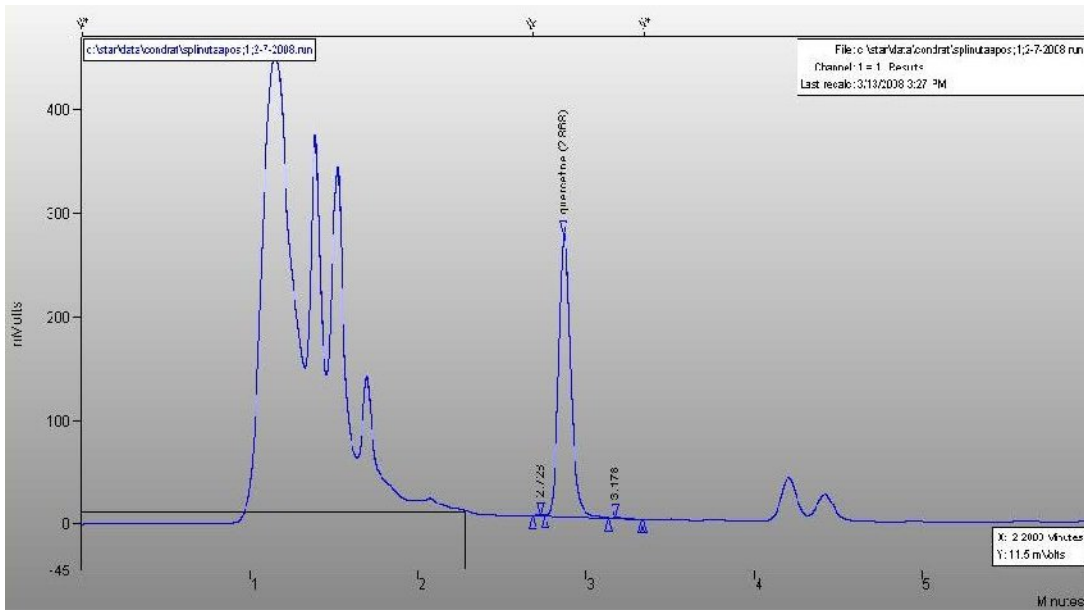


Figura 3.16. Cromatograma HPLC pentru extractul apos de *Solidago virga aurea* (quercetină)

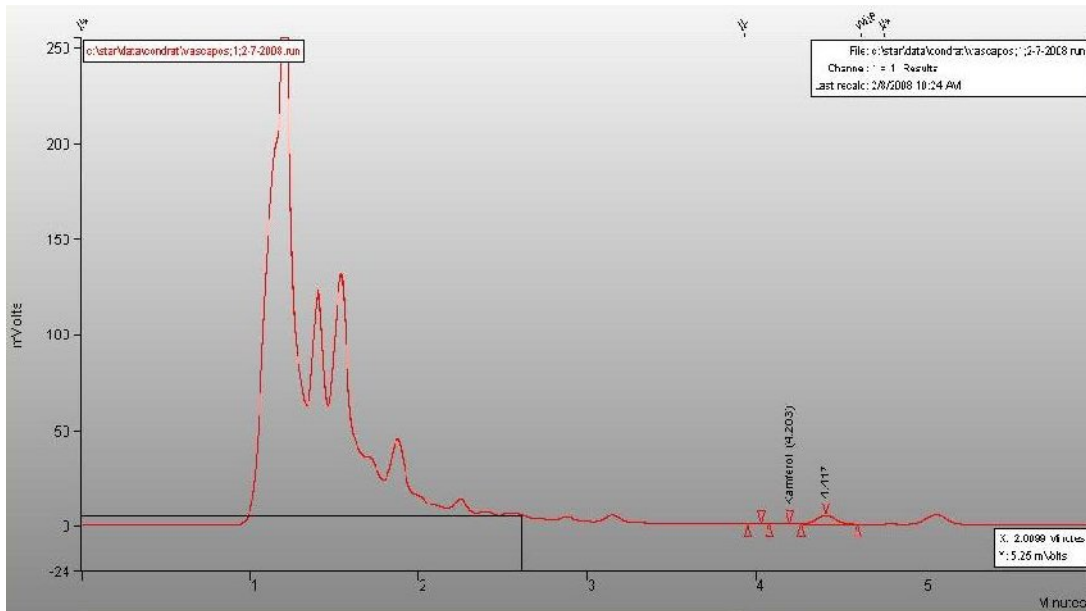


Figura 3.17. Cromatograma HPLC pentru extractul apos de *Viscum album* (kamferol)

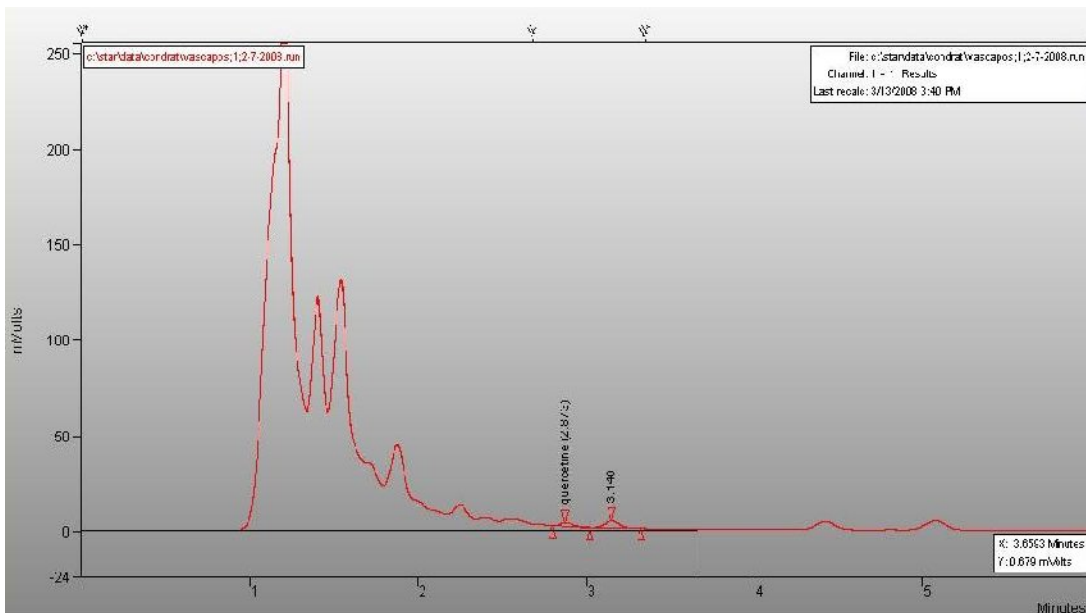


Figura 3.18. Cromatograma HPLC pentru extractul apos de *Viscum album* (quercetină)

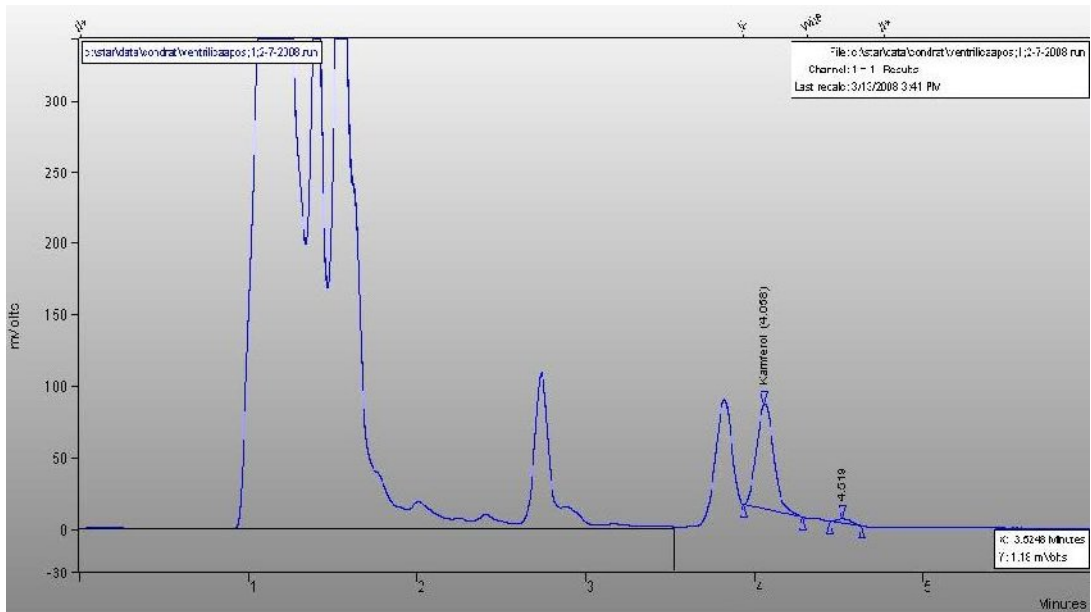


Figura 3.19. Cromatograma HPLC pentru extractul apos de *Veronica officinalis* (kamferol)

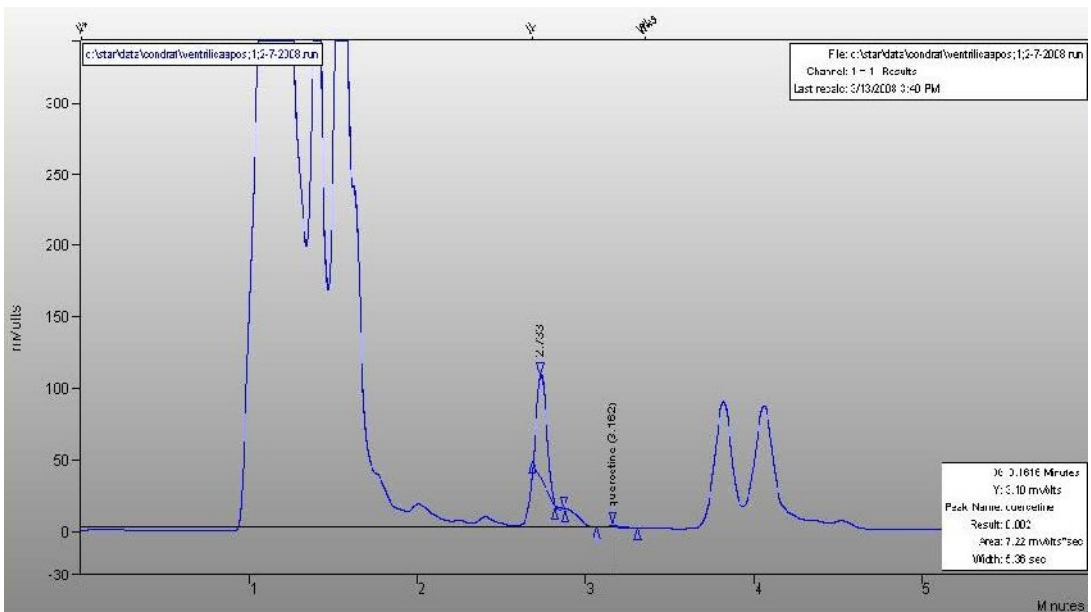


Figura 3.20. Cromatograma HPLC pentru extractul apos de *Veronica officinalis* (quercetină)



c) **Extracte metanolice 96% și 80%.**

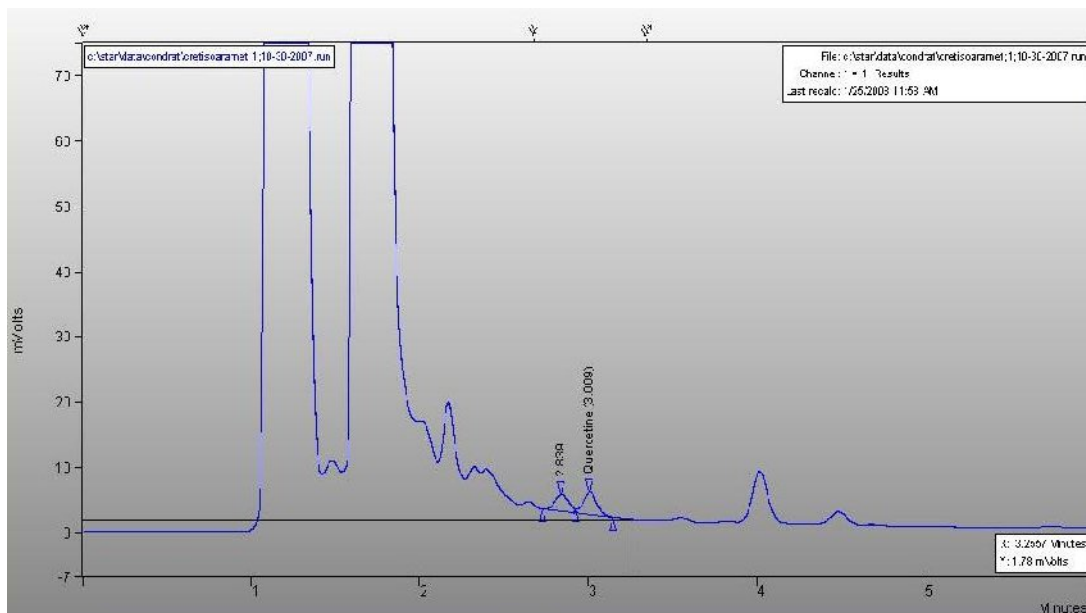


Figura 3.21. Cromatograma HPLC pentru extractul metanolic 96% de *Alchemilla vulgaris* (quercetină)

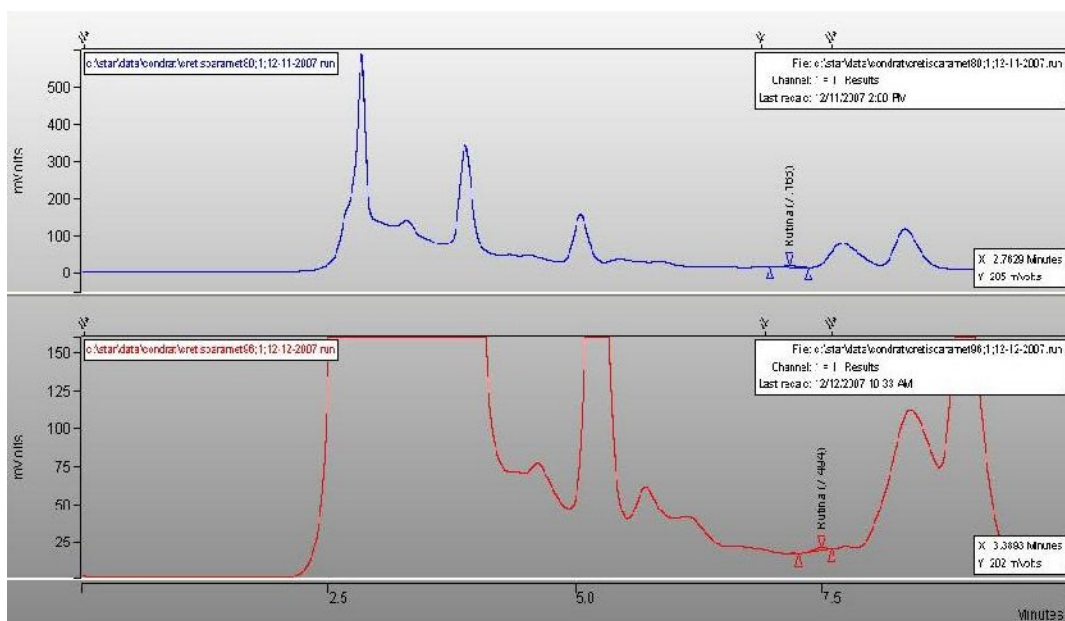


Figura 3.22. Cromatograma HPLC pentru extractul metanolic 96% și 80% de *Alchemilla vulgaris* (rutină)

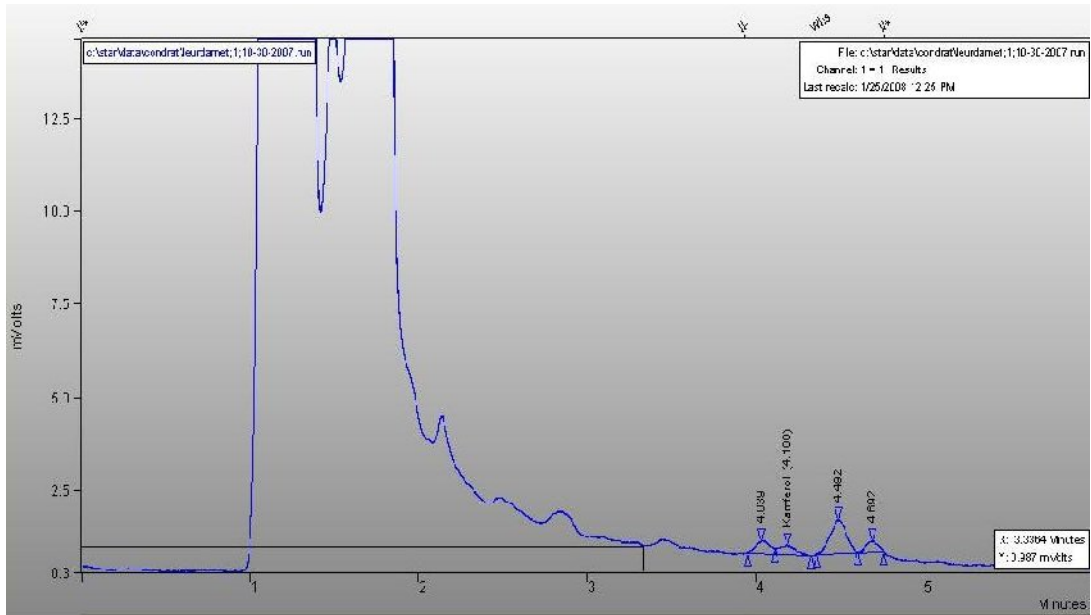


Figura 3.23. Cromatograma HPLC pentru extractul metanolic 96% de *Allium ursinum*

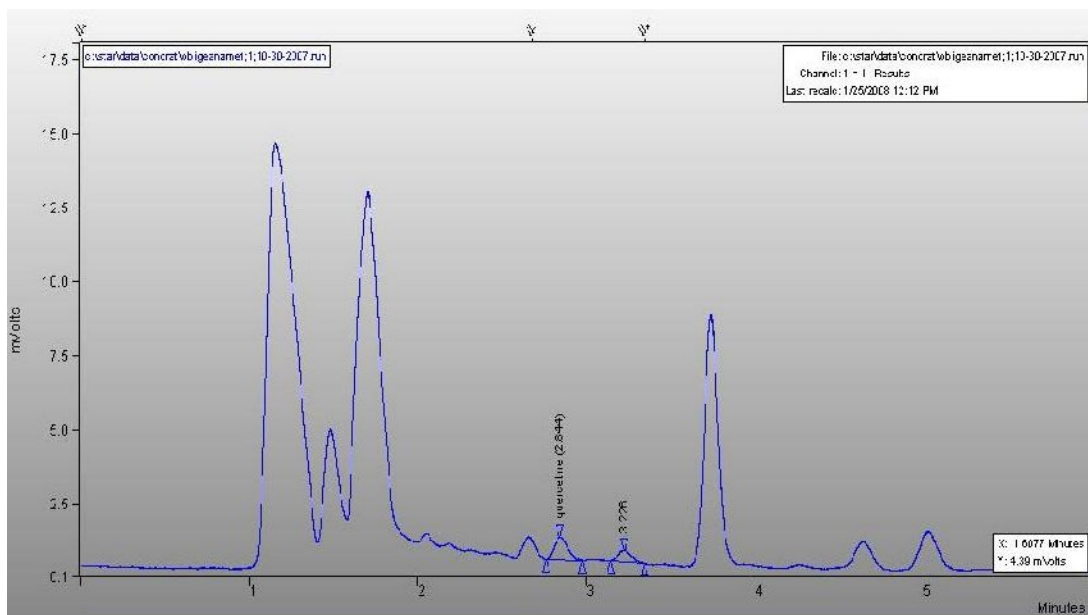


Figura 3.24. Cromatograma HPLC pentru extractul metanolic 96% de *Acorus calamus*

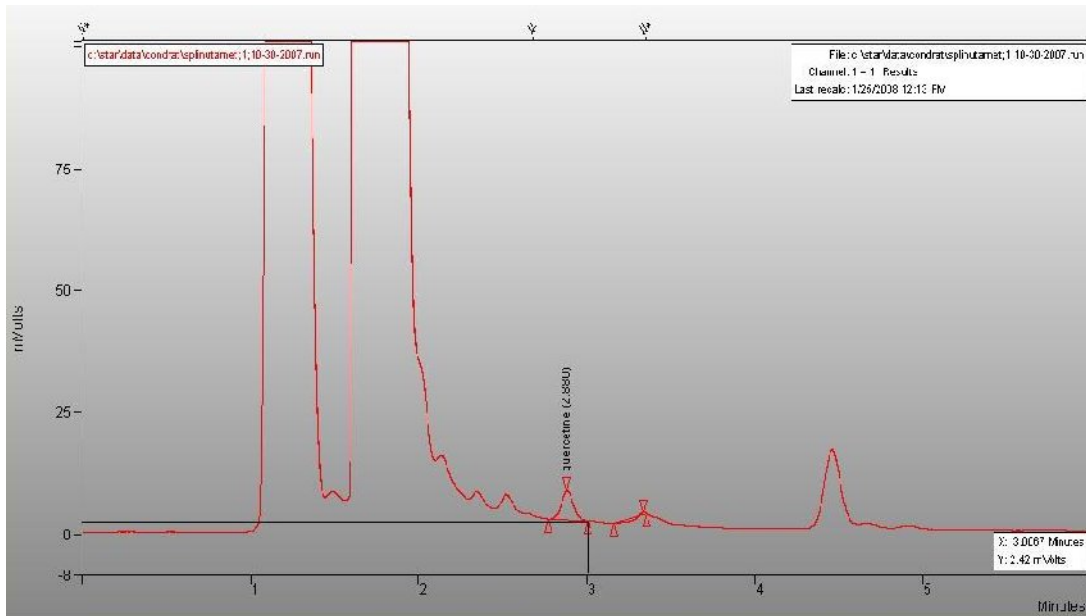


Figura 3.25. Cromatograma HPLC pentru extractul metanolic 96% de *Solidago virga aurea*

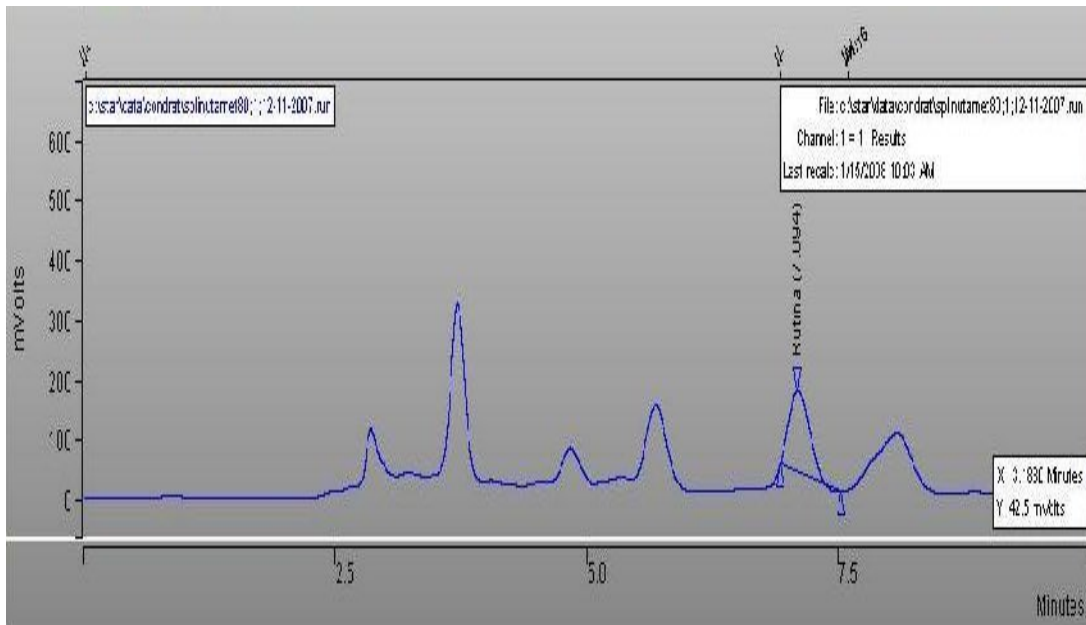


Figura 3.26. Cromatograma HPLC pentru extractul metanolic 80% de *Solidago virga aurea*

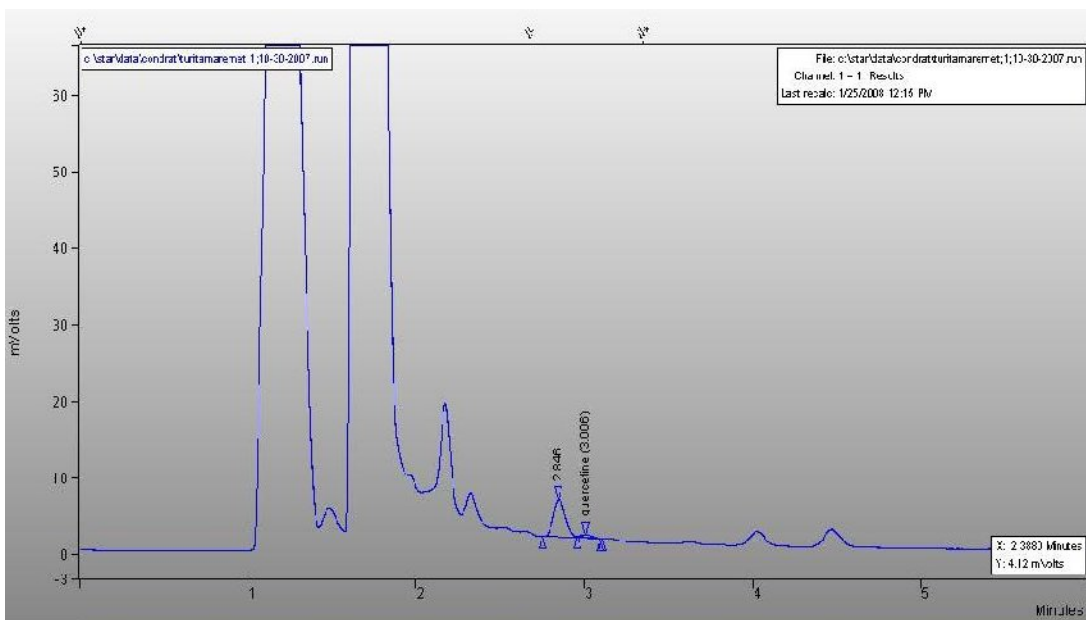


Figura 3.27. Cromatograma HPLC pentru extractul metanolic 96% de *Agrimonia eupatoria* (quercetină)

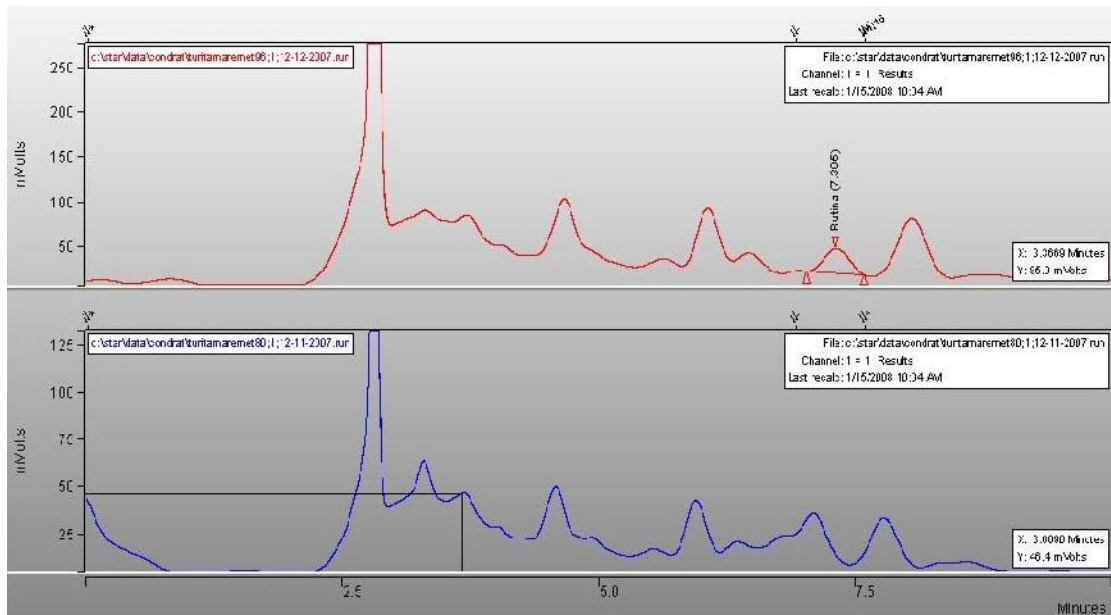


Figura 3.28. Cromatograma HPLC pentru extractul metanolic 96% și 80% de *Agrimonia eupatoria* (rutină)

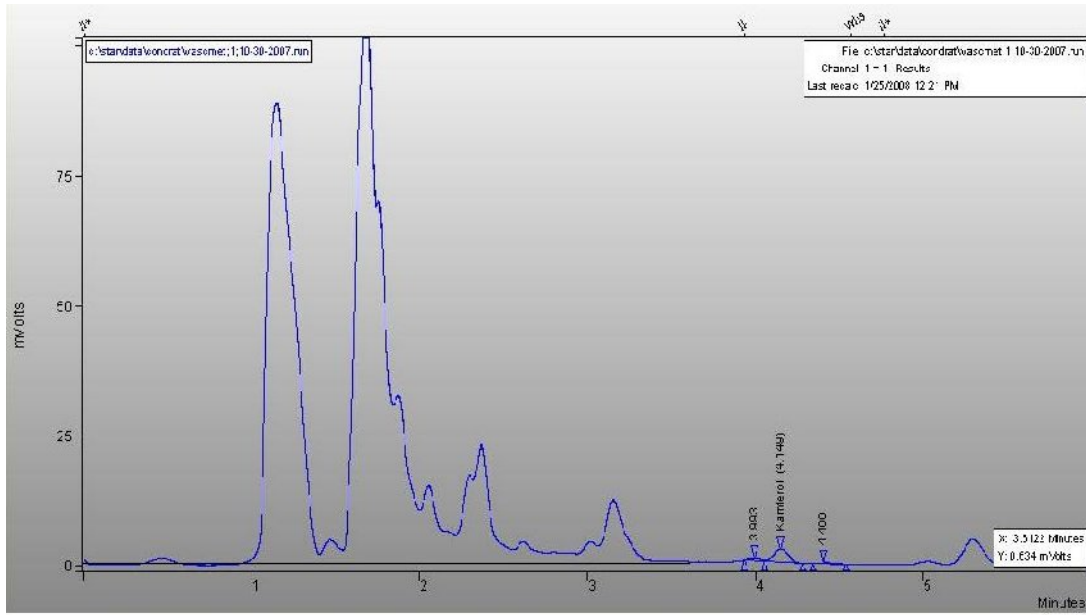


Figura 3.29. Cromatograma HPLC pentru extractul metanolic 96% de *Viscum album* (kamferol)

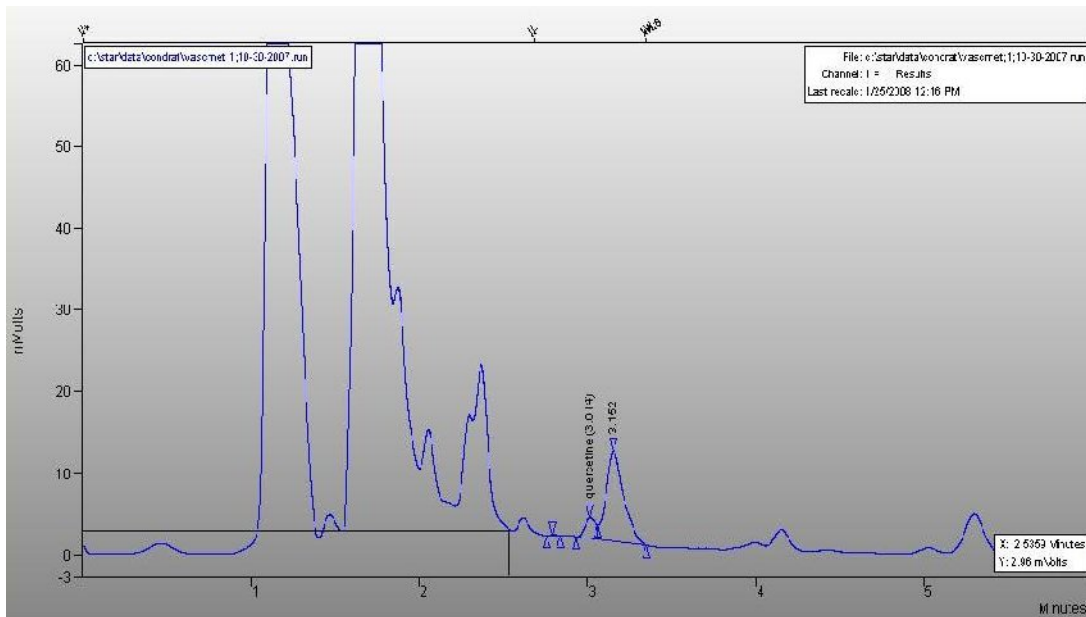


Figura 3.30. Cromatograma HPLC pentru extractul metanolic 96% de *Viscum album* (quercetină)

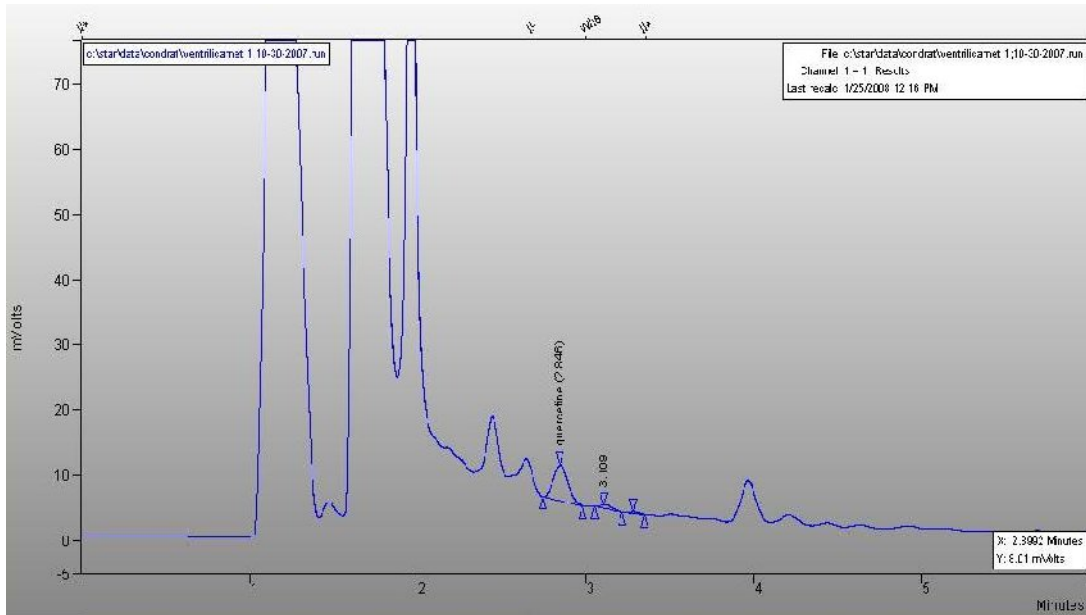


Figura 3.31. Cromatograma HPLC pentru extractul metanolic 96% de *Veronica officinalis* (quercetină)

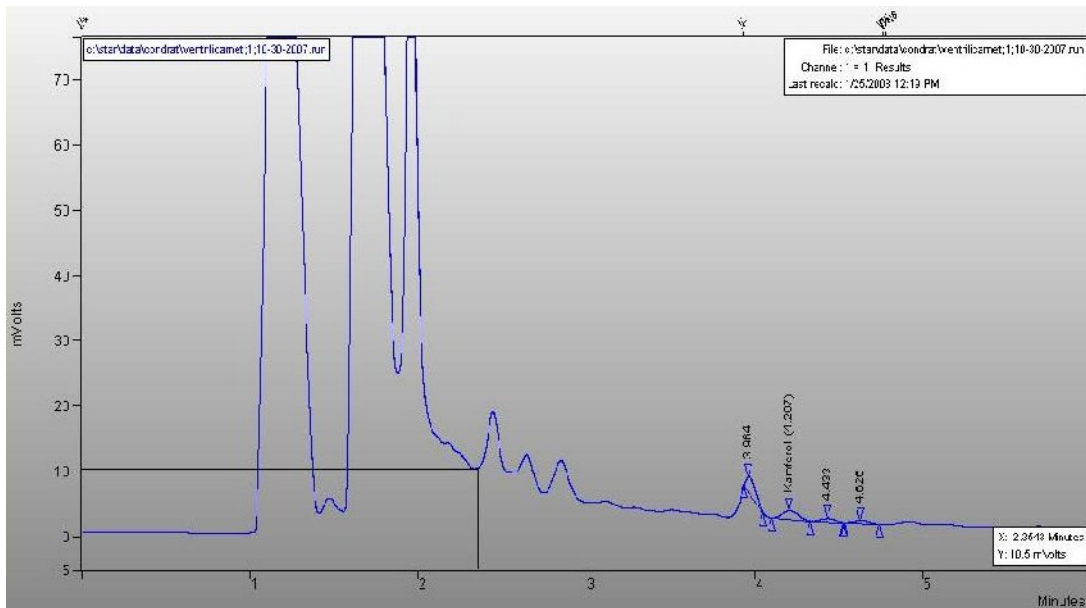


Figura 3.32. Cromatograma HPLC pentru extractul metanolic 96% de *Veronica officinalis* (kamferol)

d) Extracte etanolice (96% și 60%) obținute la baie cu ultrasunete.

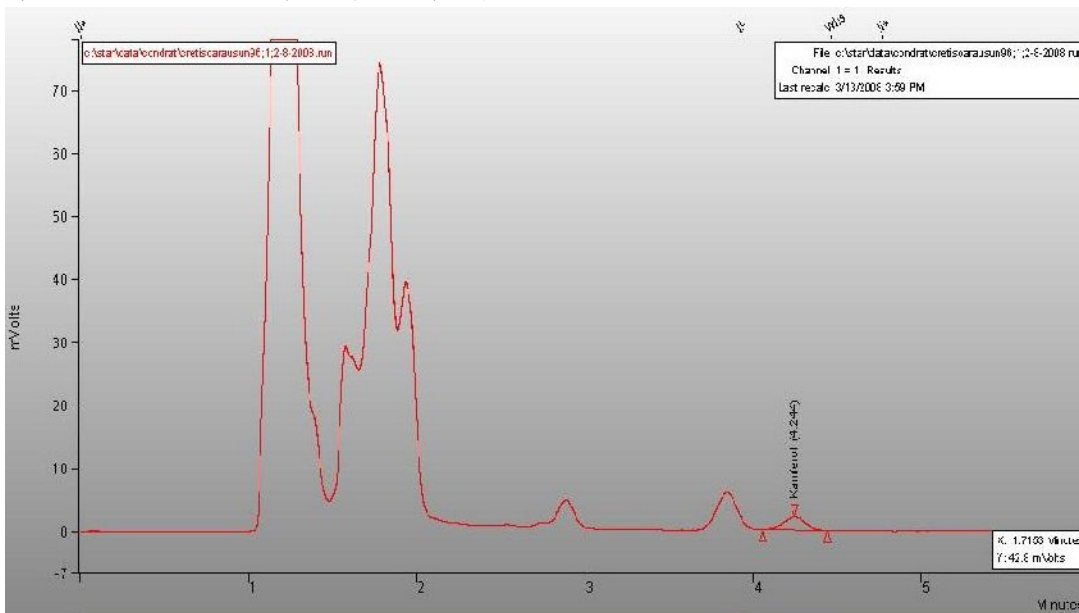


Figura 3.33. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic 96% de *Alchemilla vulgaris* (kamferol)

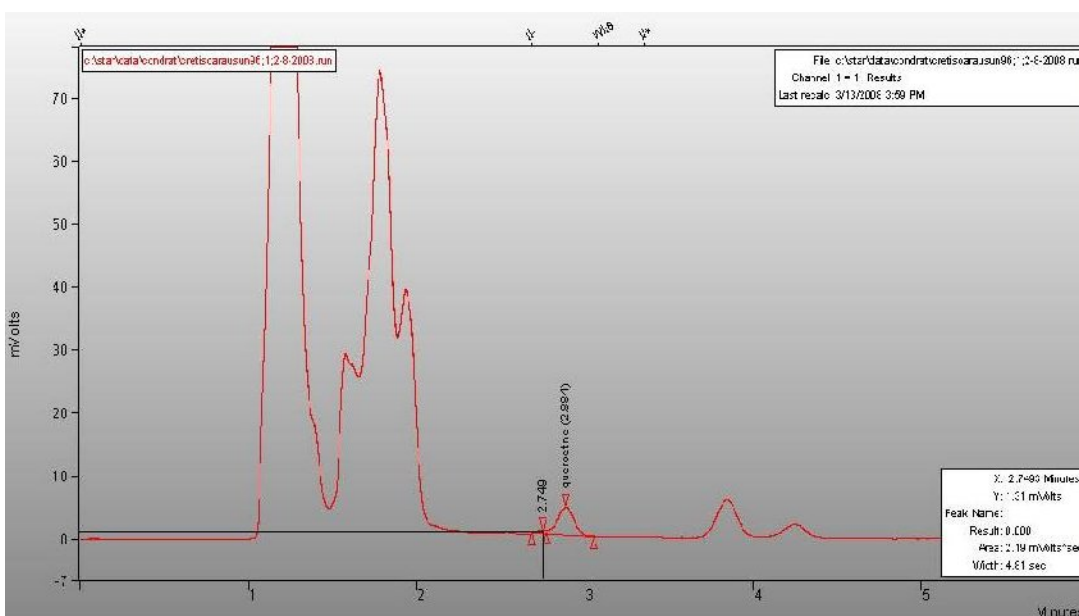


Figura 3.34. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic 96% de *Alchemilla vulgaris* (quercetină)



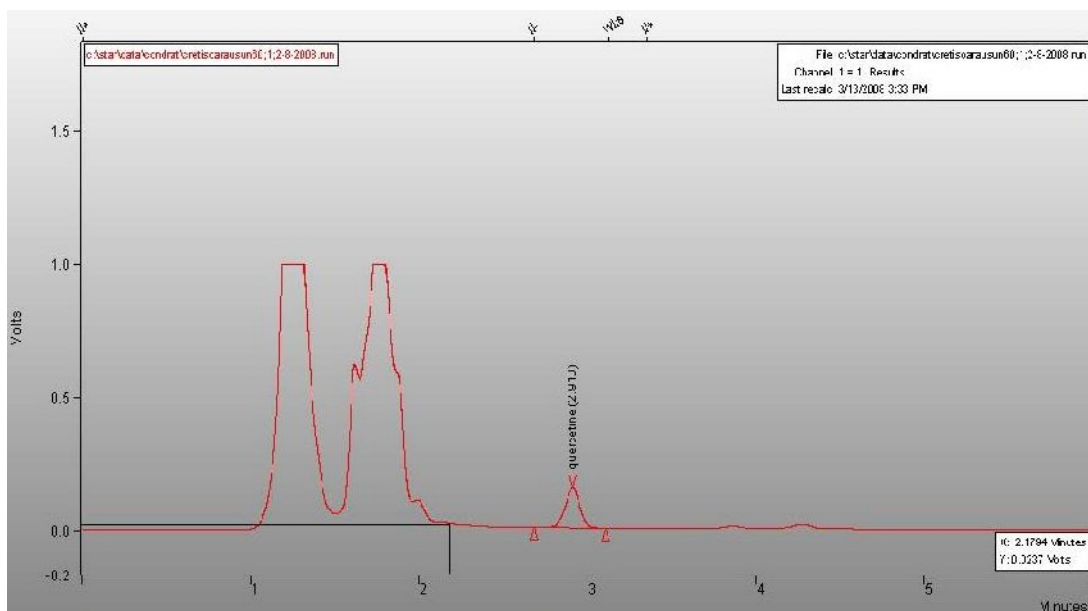


Figura 3.35. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic 60% de *Alchemilla vulgaris* (quercetină)

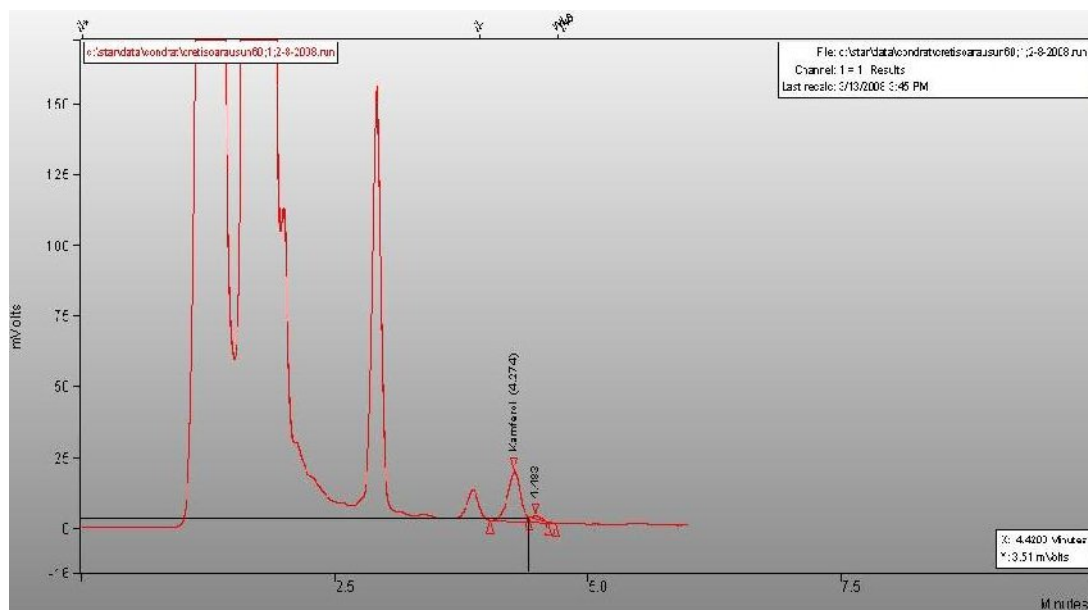


Figura 3.36. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic 60% de *Alchemilla vulgaris* (kamferol)



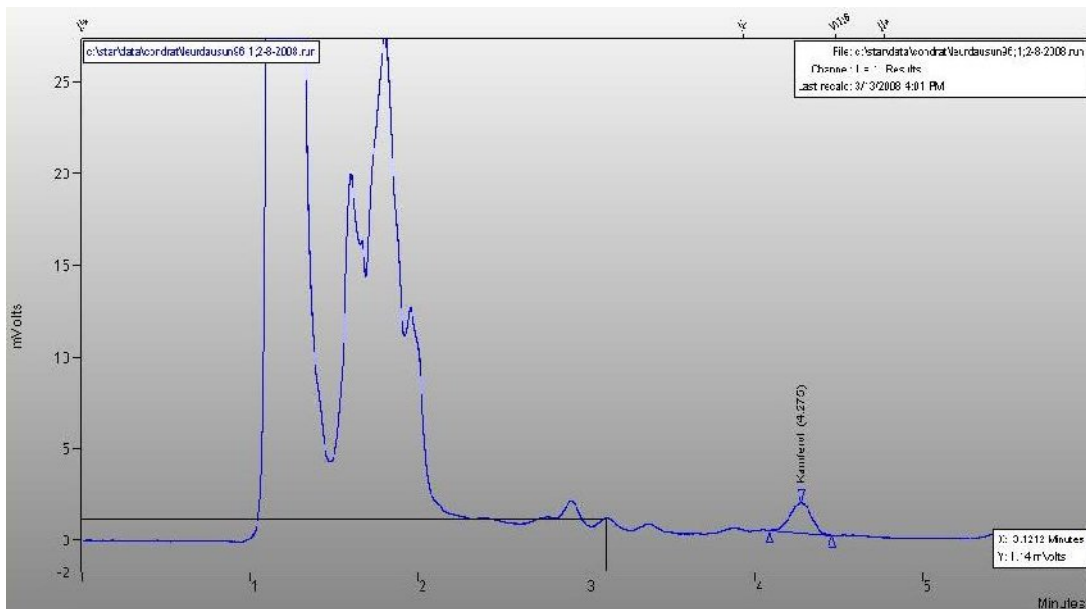


Figura 3.37. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic 96% de *Allium ursinum* (kamferol)

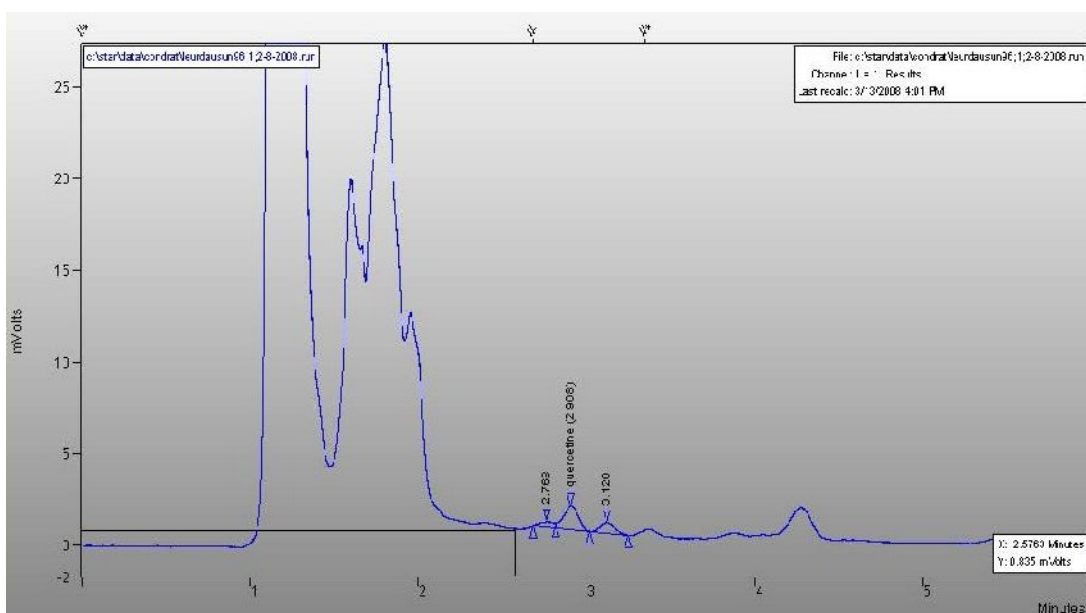


Figura 3.38. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic 96% de *Allium ursinum* (quercetină)

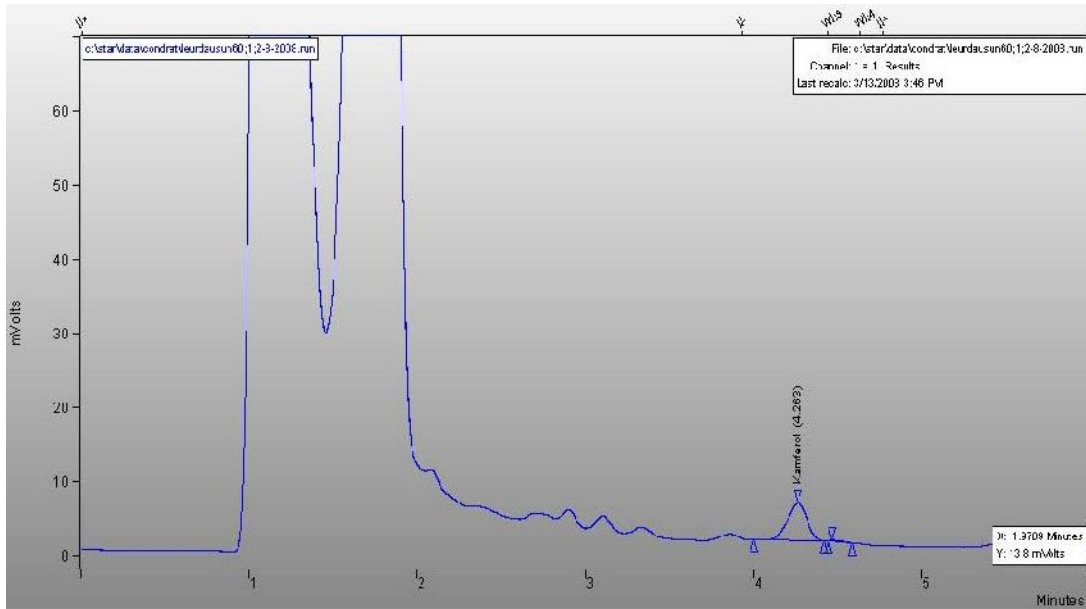


Figura 3.39. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic 60% de *Allium ursinum* (kamferol)

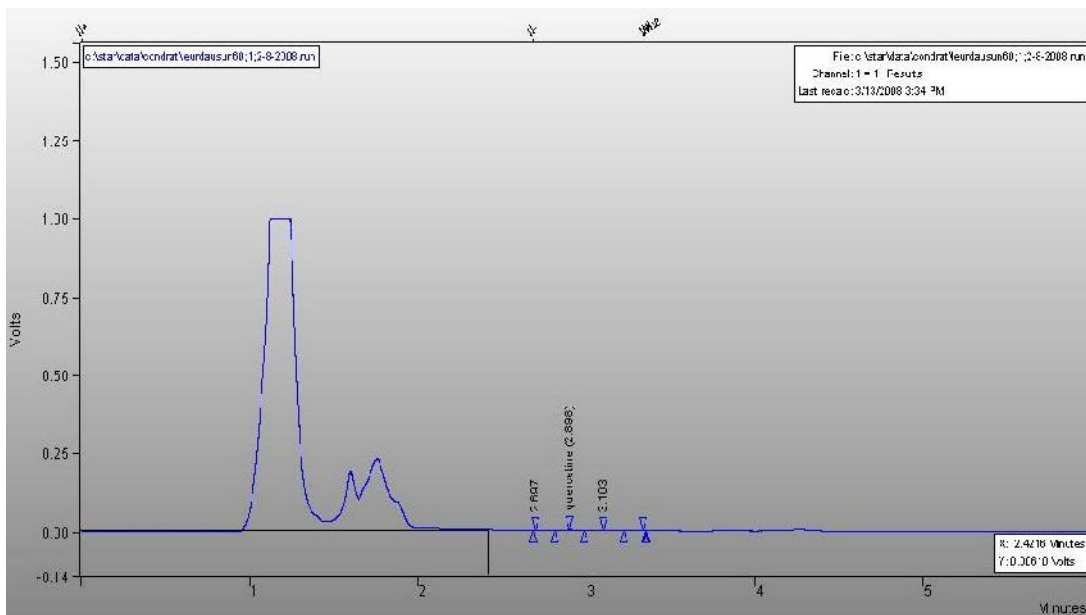


Figura 3.40. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic 60% de *Allium ursinum* (quercetină)

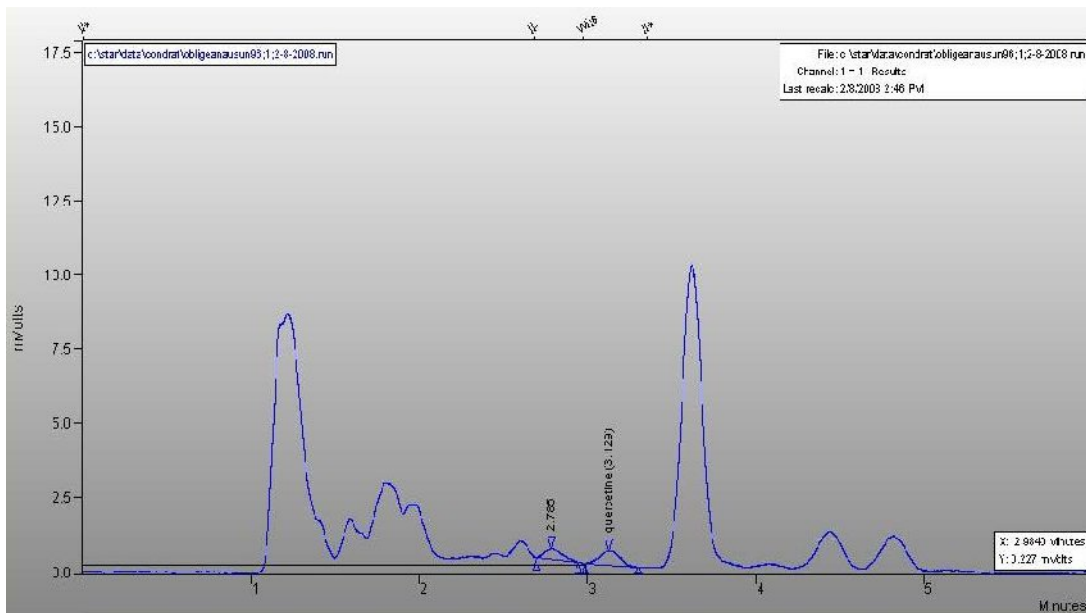


Figura 3.41. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic 96% de *Acorus calamus*(quercetină)

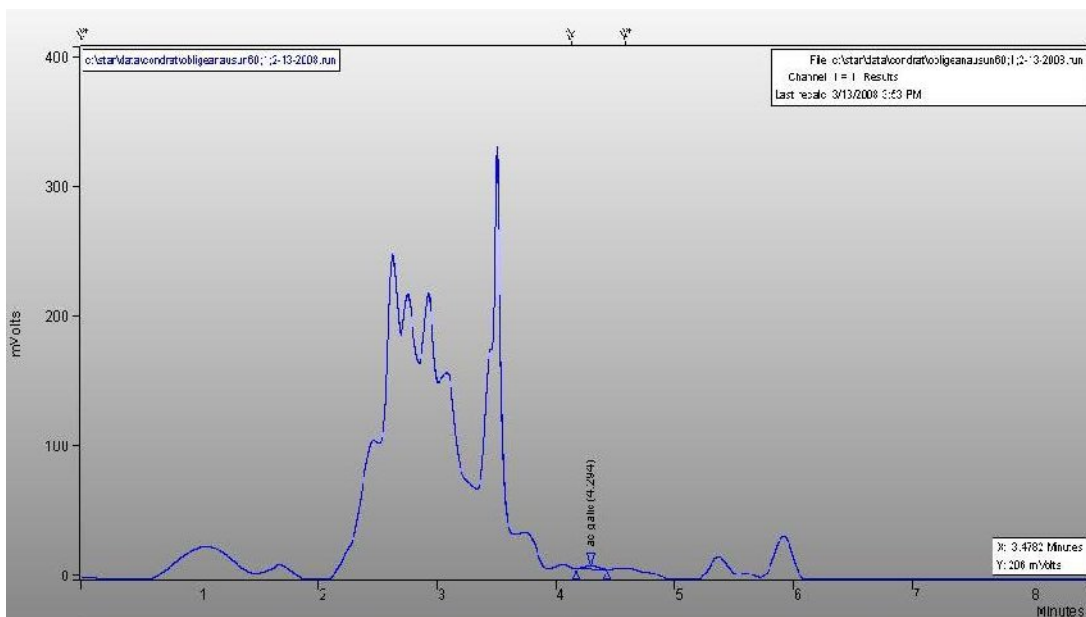


Figura 3.42. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic 60% de *Acorus calamus* (kamferol)

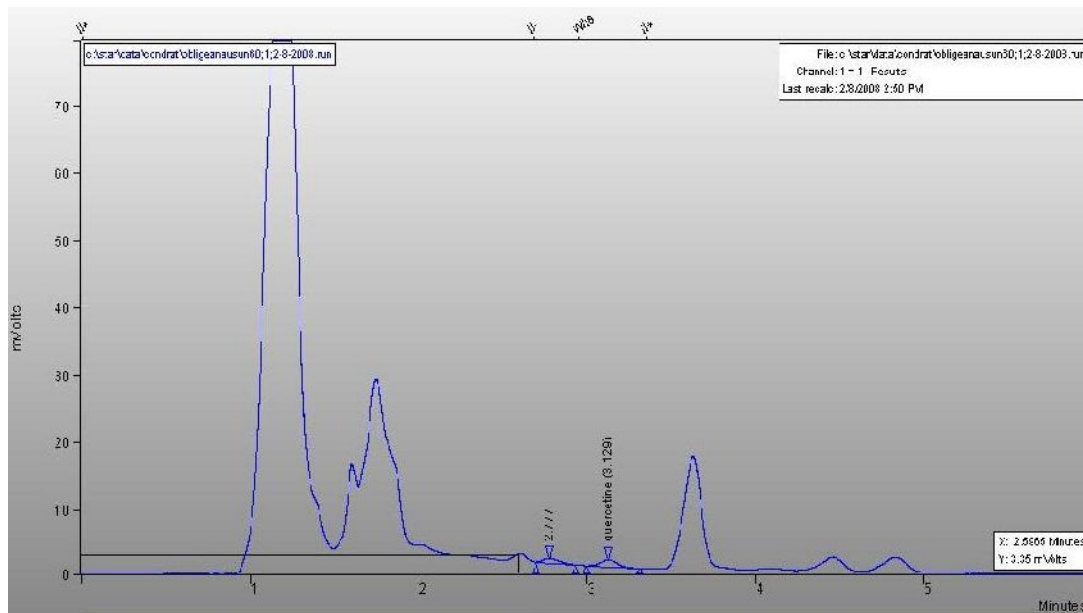


Figura 3.43. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic 60% de *Acorus calamus* (quercetină)

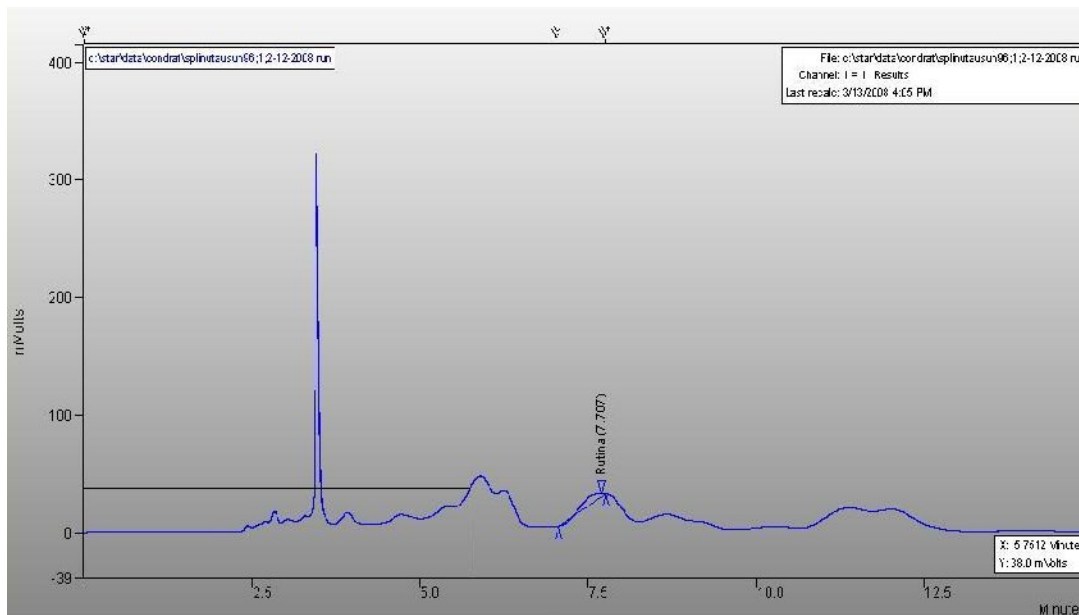


Figura 3.44. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic 96% de *Solidago virga aurea* (rutină)

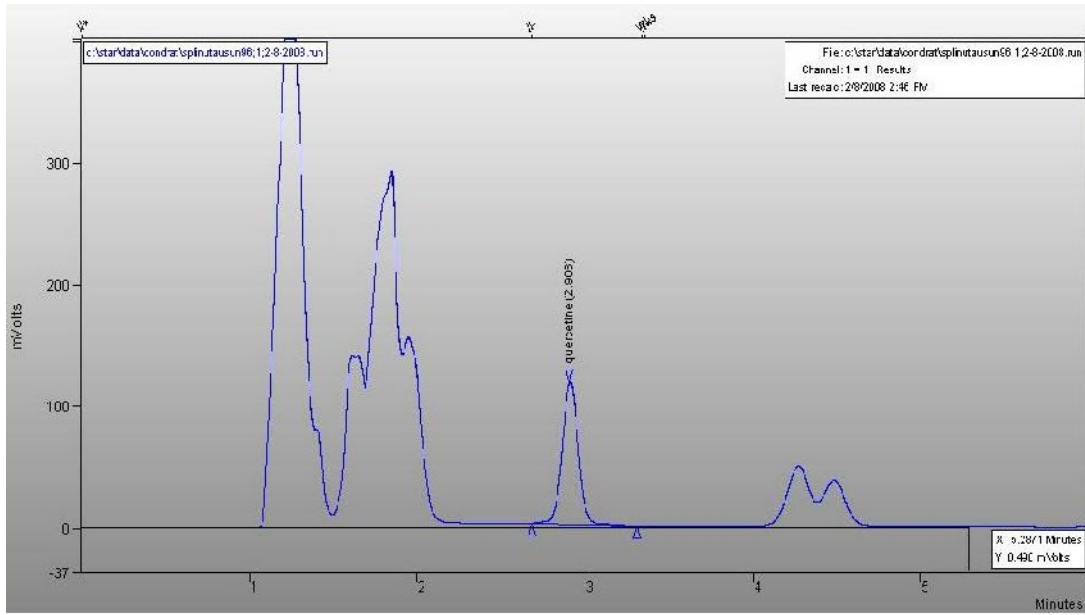


Figura 3.45. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic 96% de *Solidago virga aurea* (quercetină)

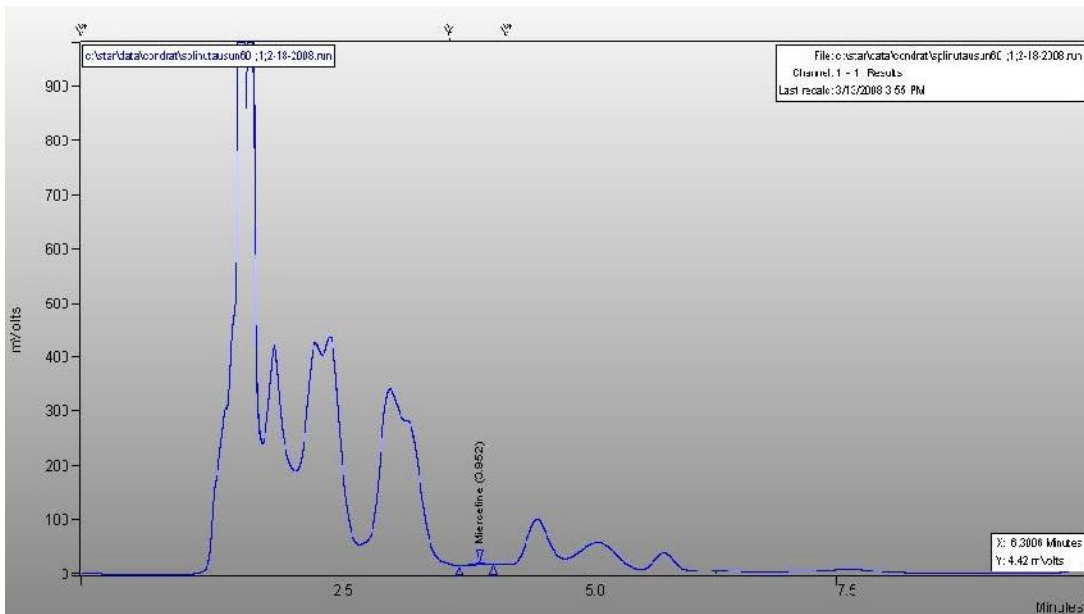


Figura 3.46. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic 60% de *Solidago virga aurea* (miricetină)

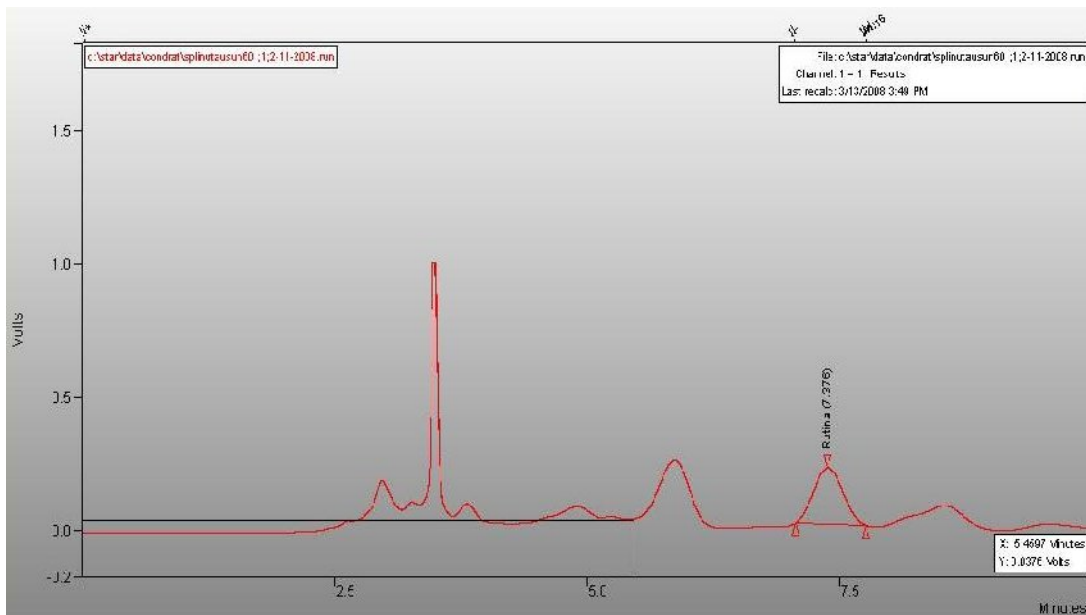


Figura 3.47. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic 60% de *Solidago virga aurea* (rutină)

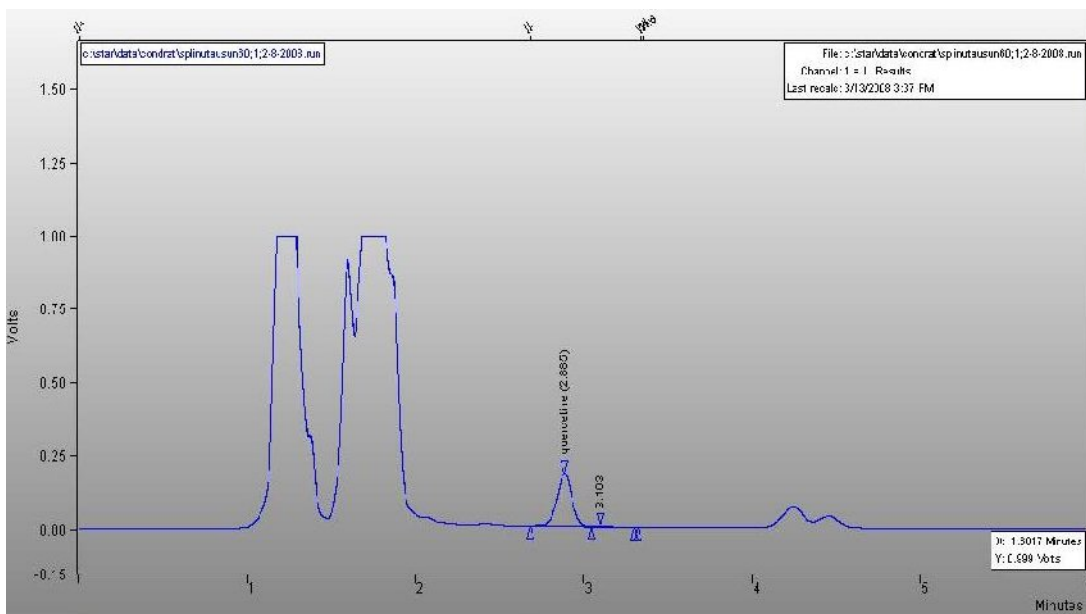


Figura 3.48. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic 60% de *Solidago virga aurea* (quercetină)

#### Anexa 4. Spectrele de masă a extractelor vegetale cercetate

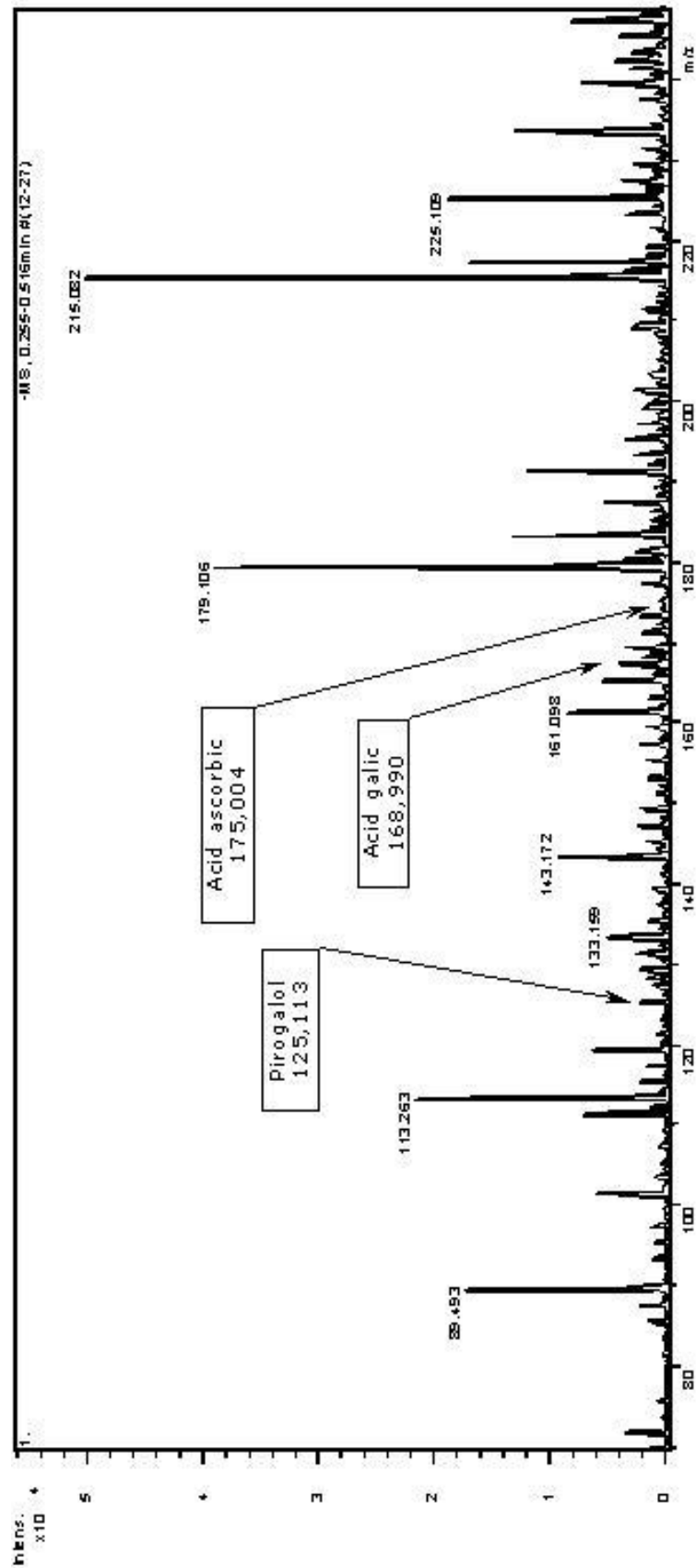


Figura 4.1. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS pentru *Alchemilla vulgaris* (m/z 70-245 )

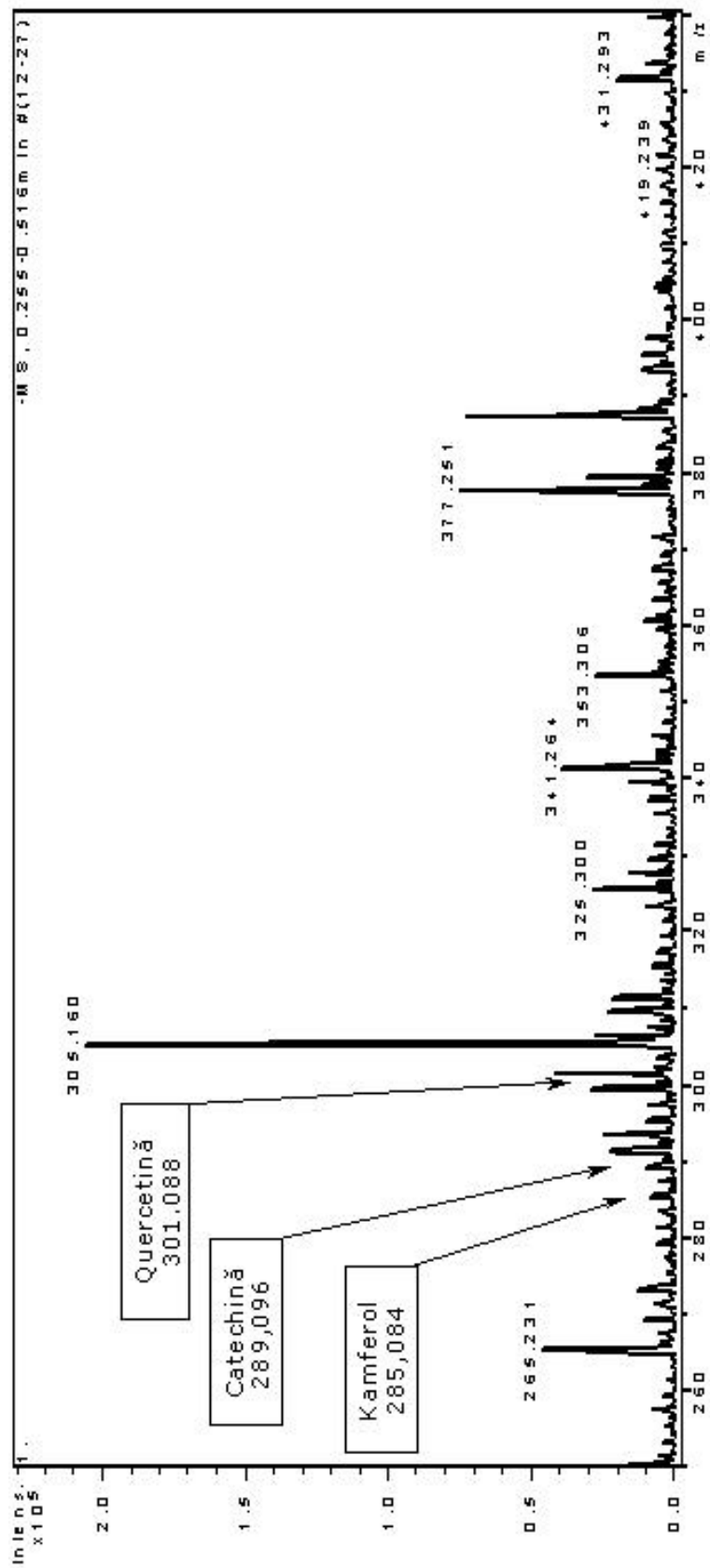


Figura 4.2. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS pentru *Alchemilla vulgaris* ( m/z 250-440)



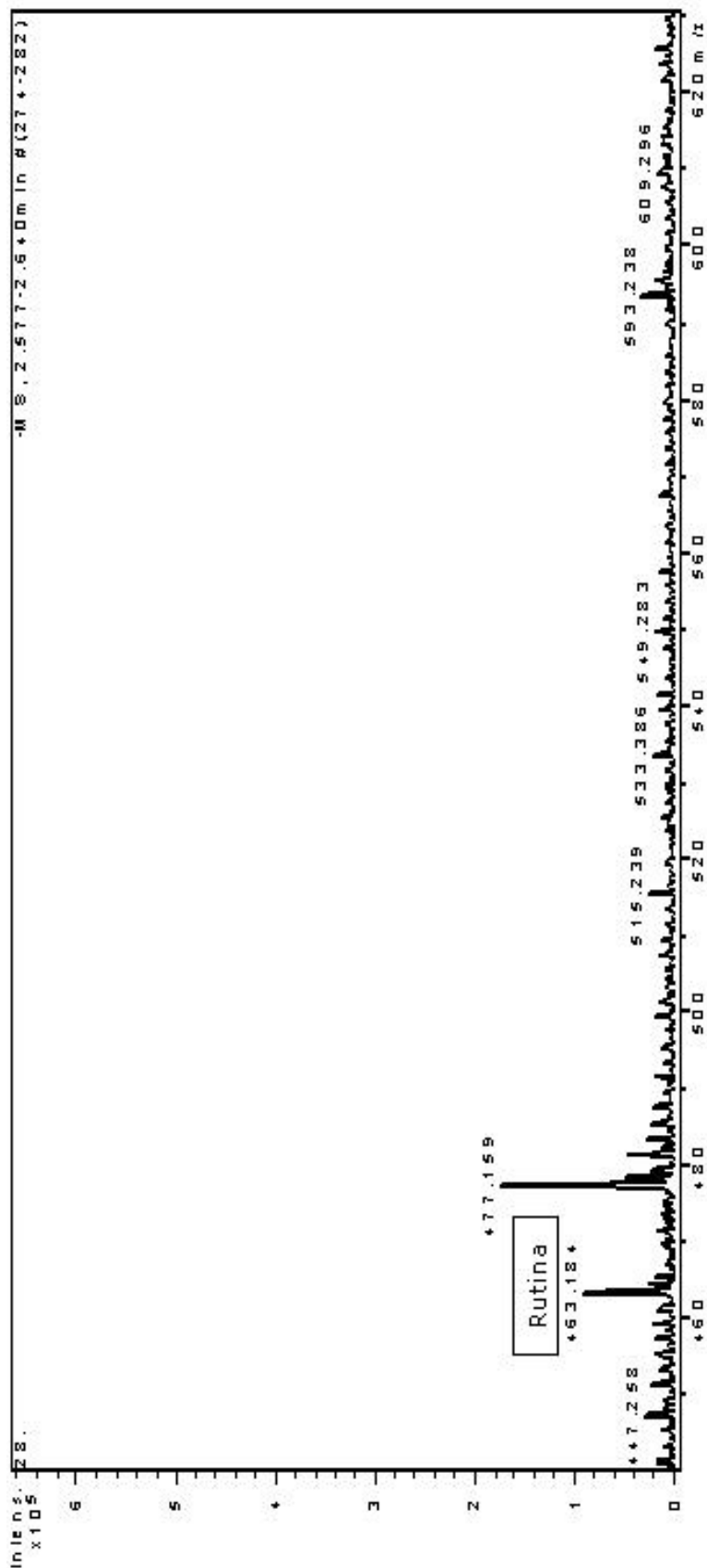


Figura 4.3. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS pentru *Alchemilla vulgaris* ( m/z 440-625 )

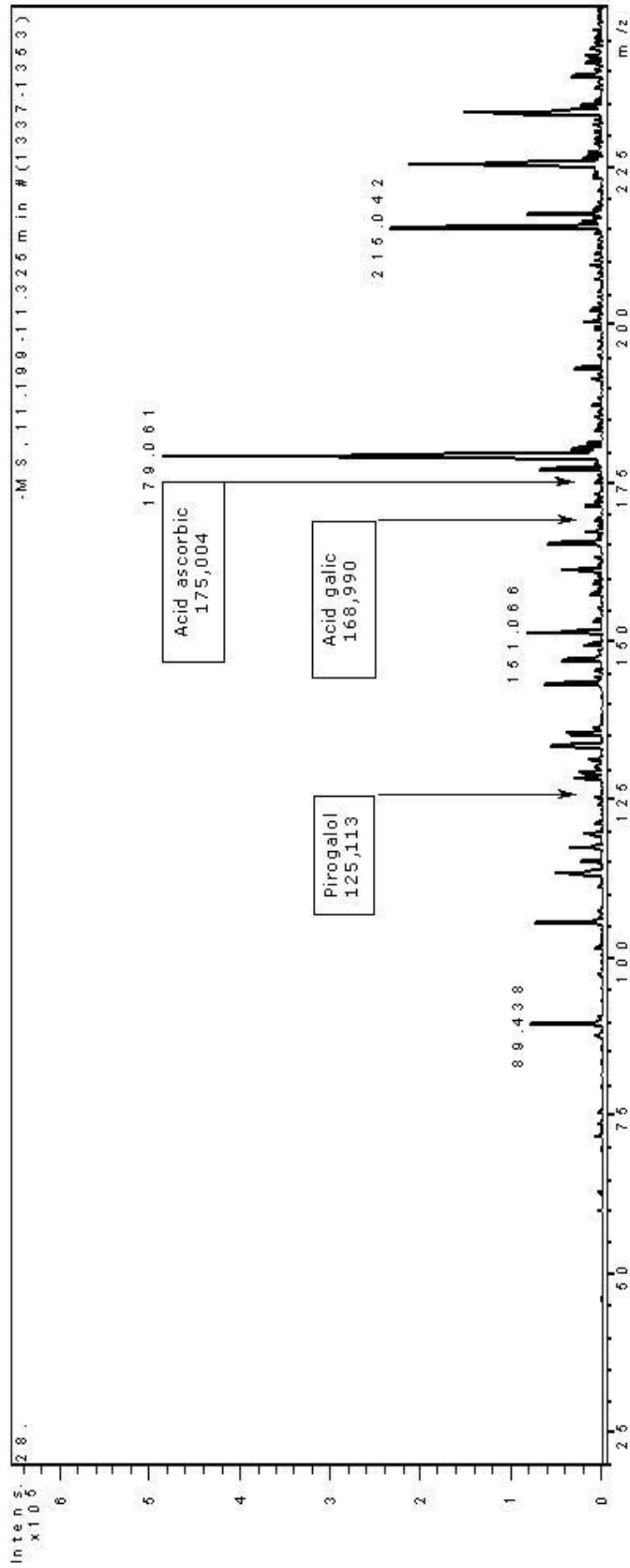


Figura 4.4. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS pentru *Allium ursinum* ( m/z 25- 245 )

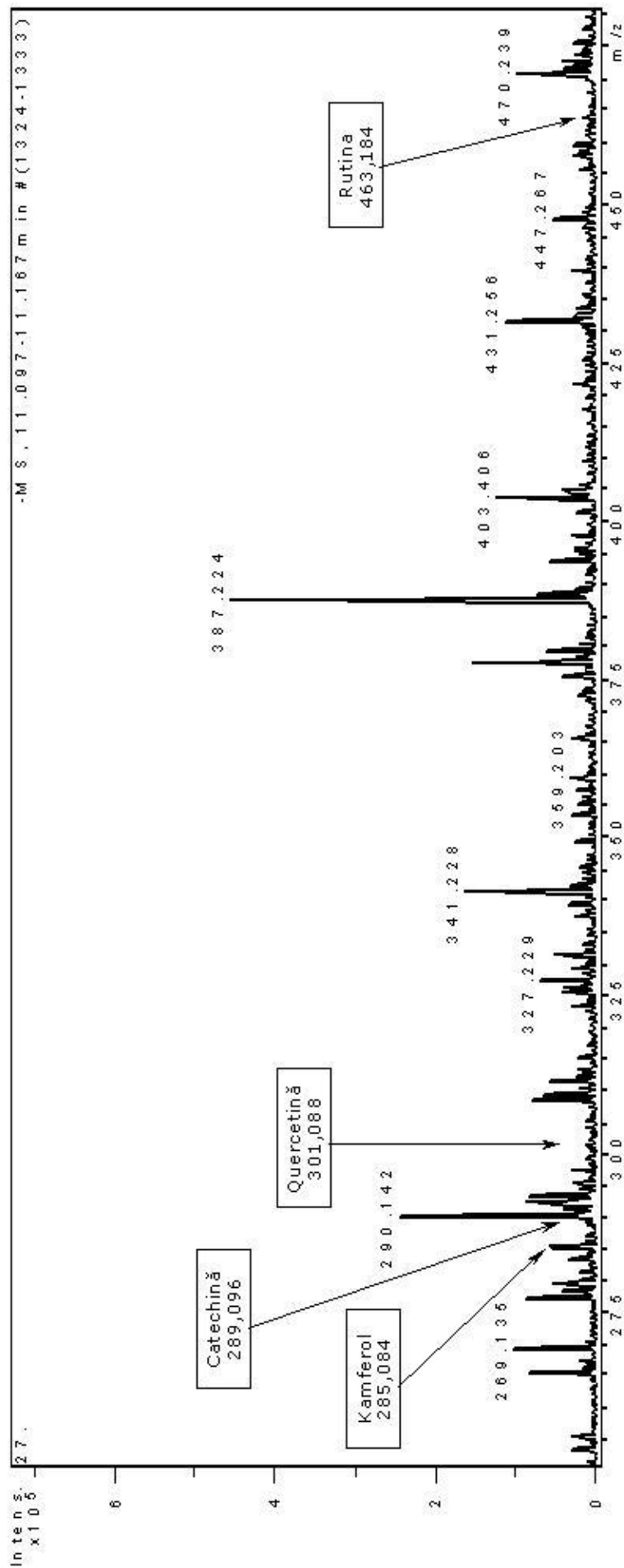


Figura 4.5. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS pentru *Allium ursinum* ( m/z 255- 475 )

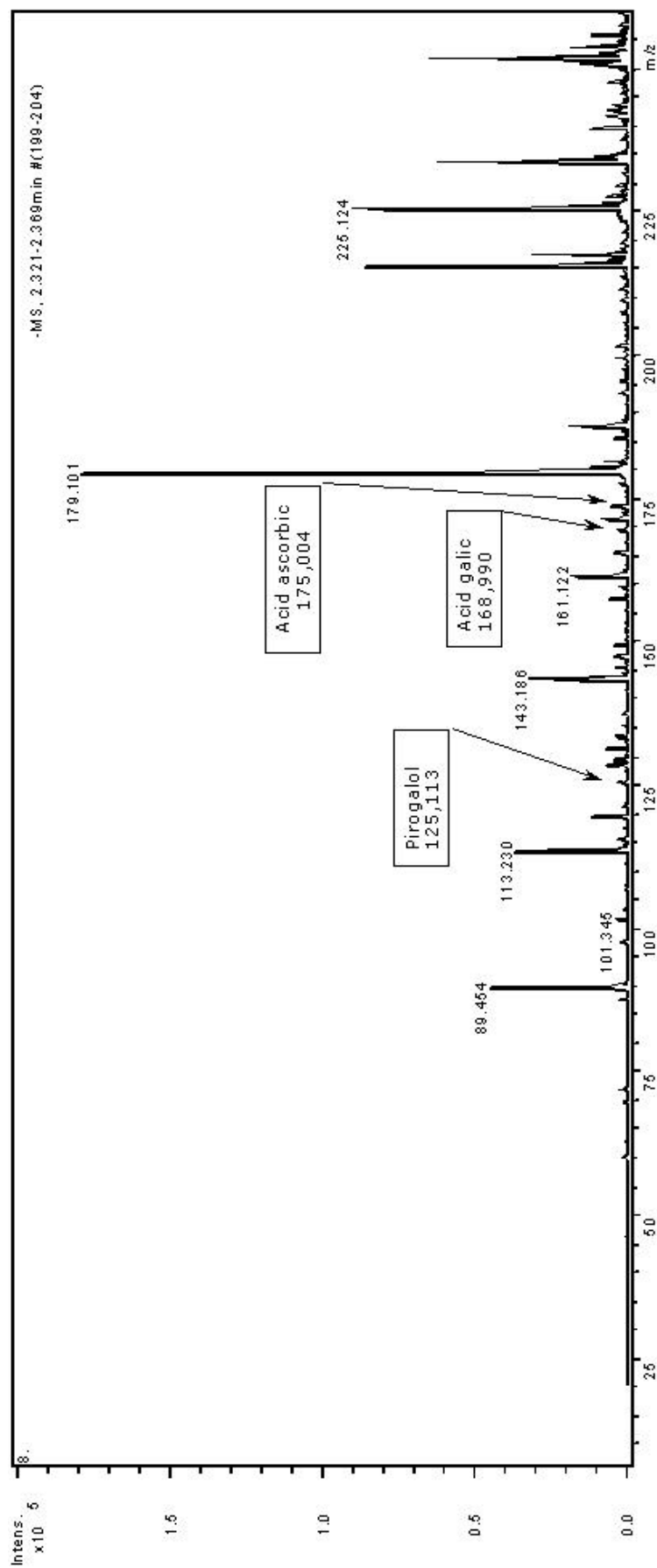


Figura 4.6. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS pentru *Acorus calamus* ( m/z 25- 250)

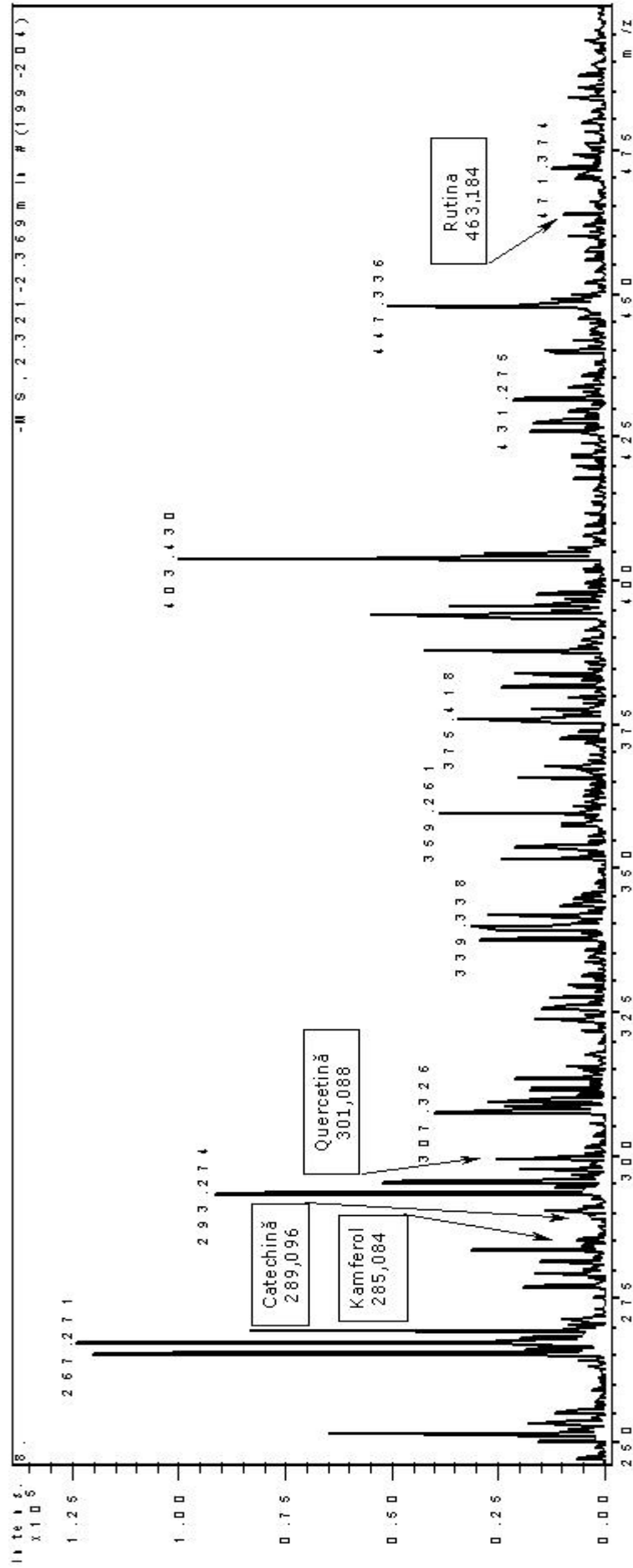


Figura 4.7. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS pentru *Acorus calamus* ( m/z 250- 490)

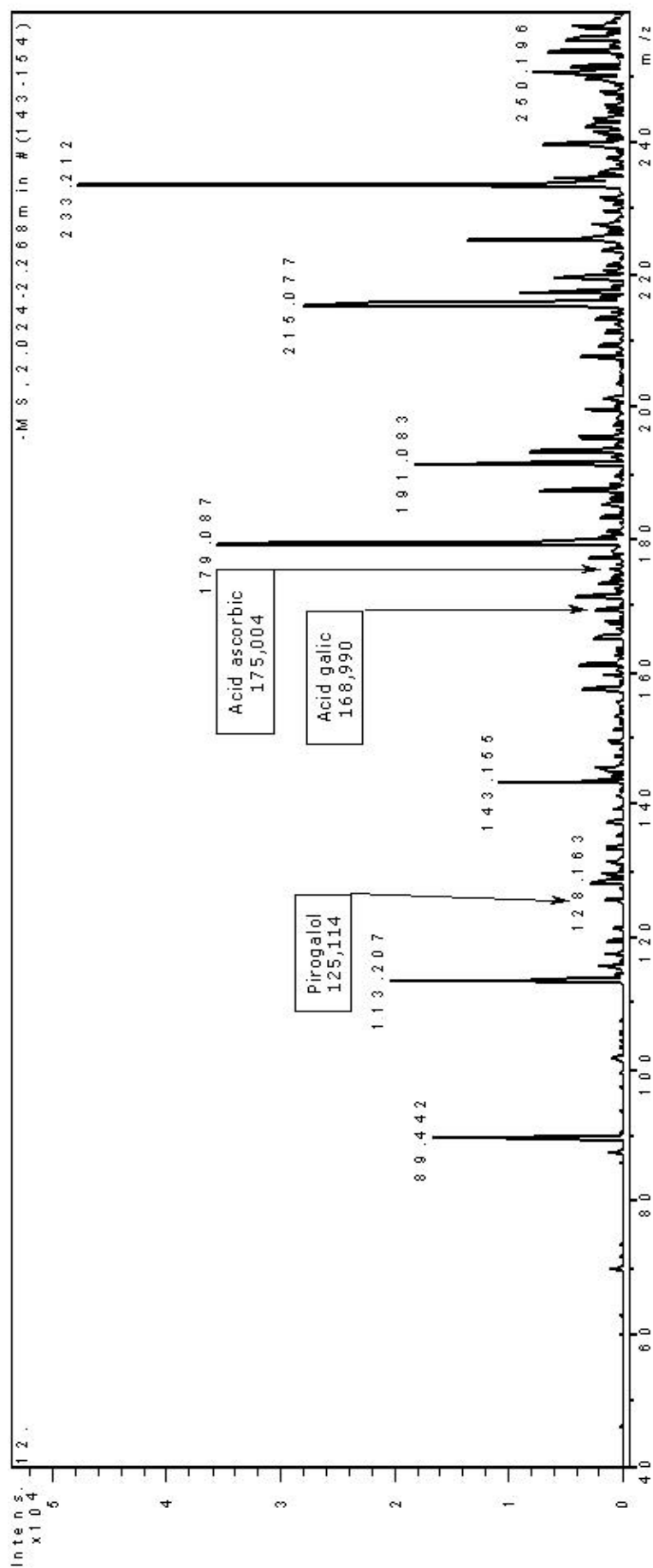


Figura 4.8. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS pentru *Solidago virga aurea* ( m/z 40 - 255)

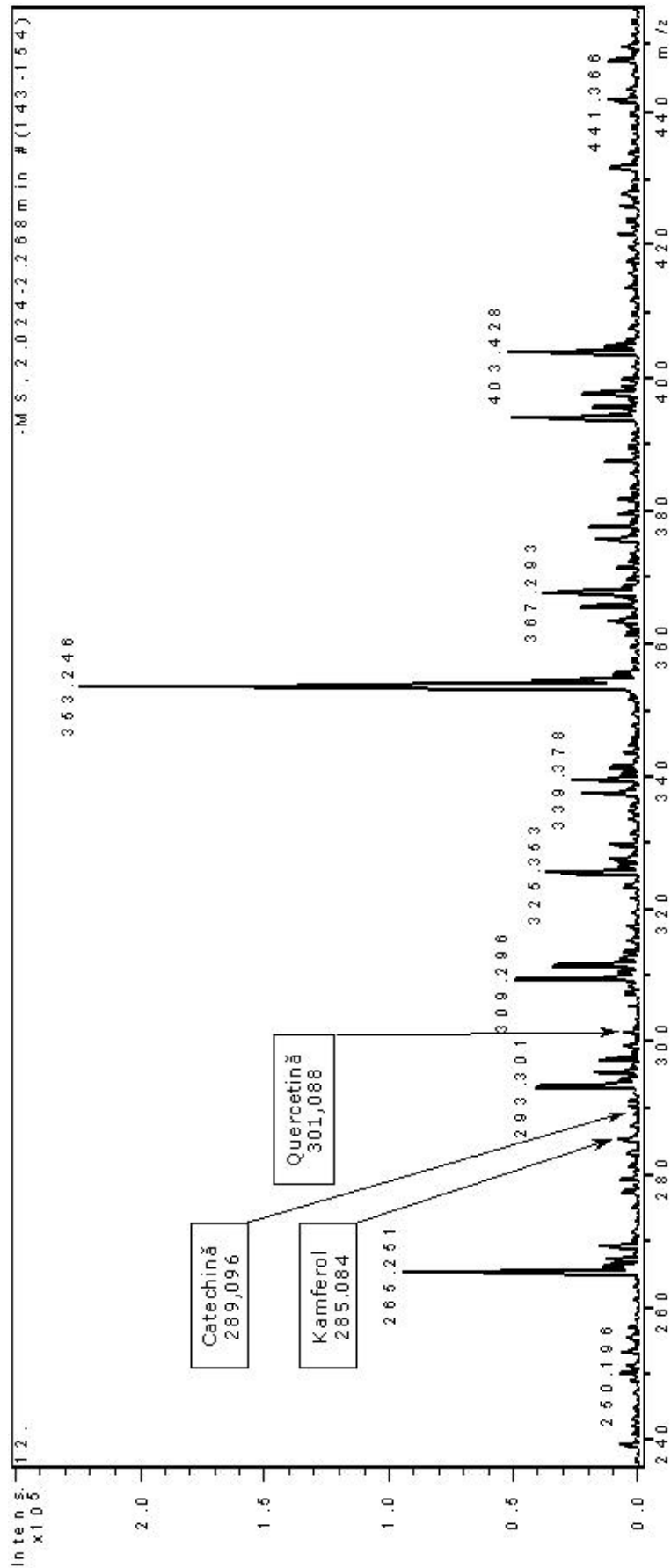


Figura 4.9. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS pentru *Solidago virga aurea* (  $m/z$  240- 450)

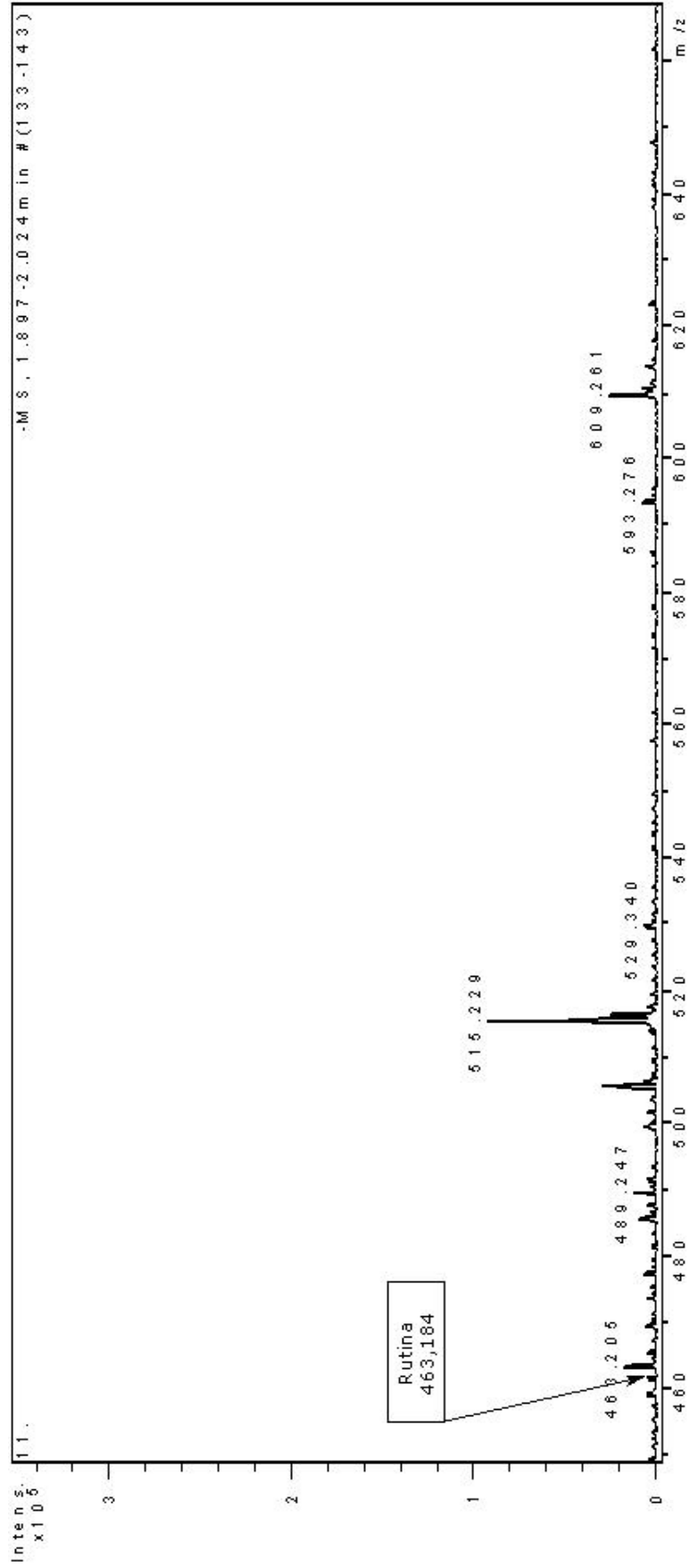


Figura 4.10. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS pentru *Solidago virga aurea* ( m/z 450- 660)



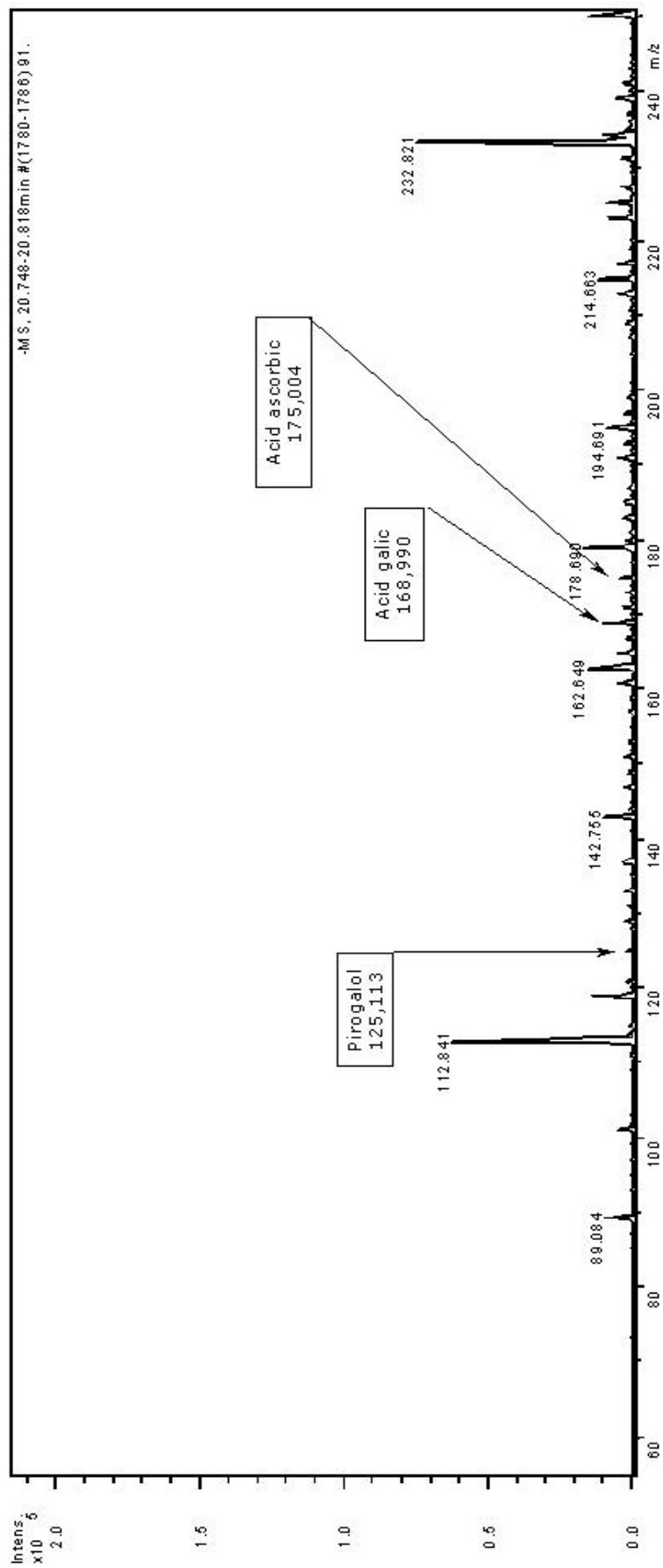


Figura 4.11. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS pentru *Agrimonia eupatoria* (m/z 60 - 250)

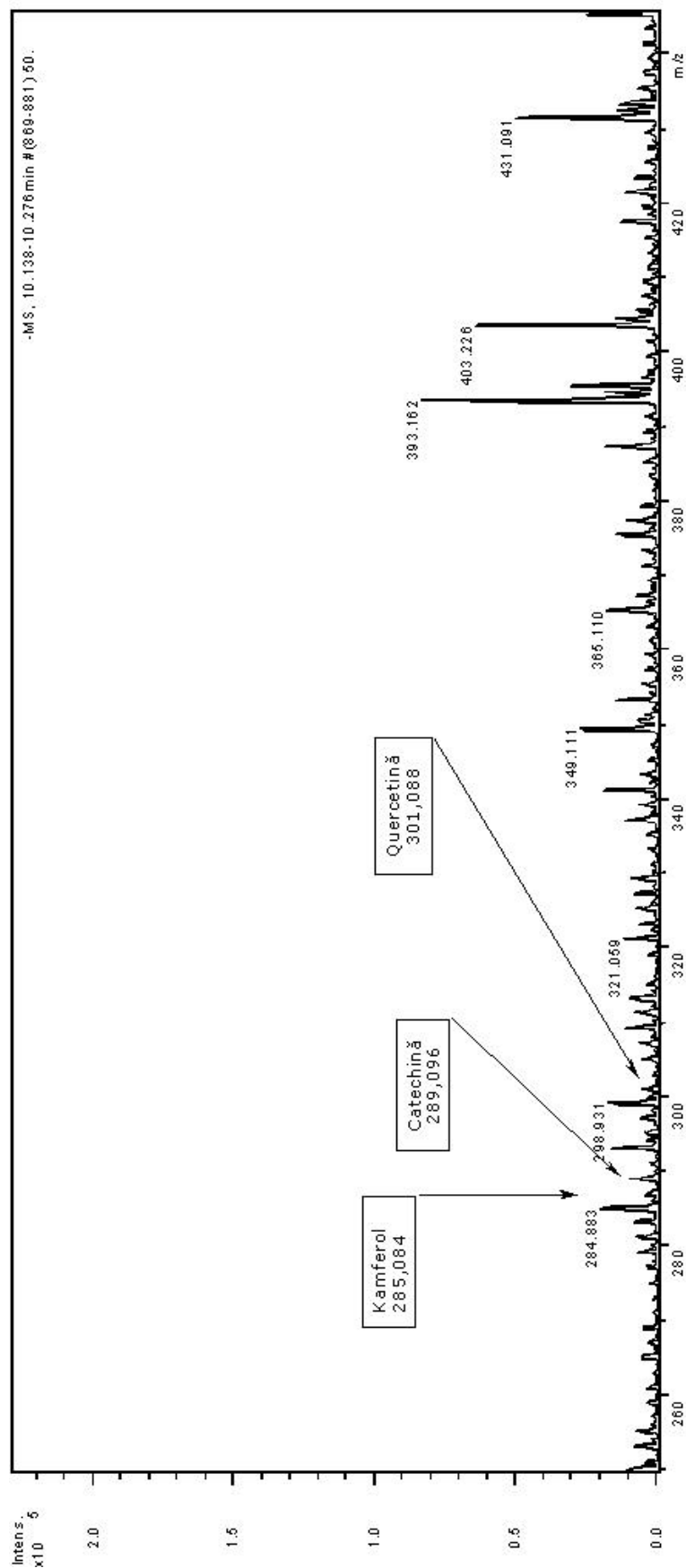


Figura 4.12. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS pentru *Agrimonia eupatoria* ( m/z 250- 440)

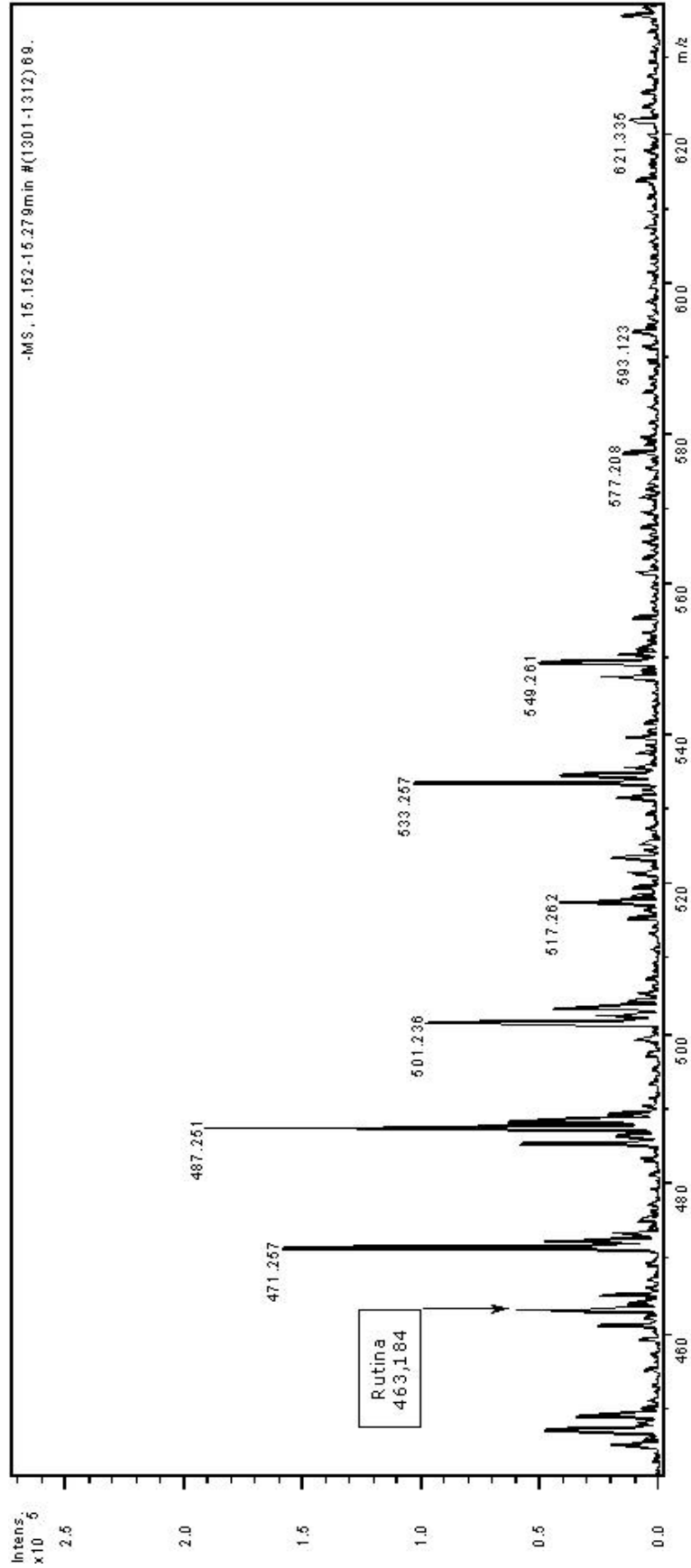


Figura 4.13. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS pentru *Agrimonia eupatoria* ( m/z 450 - 630)

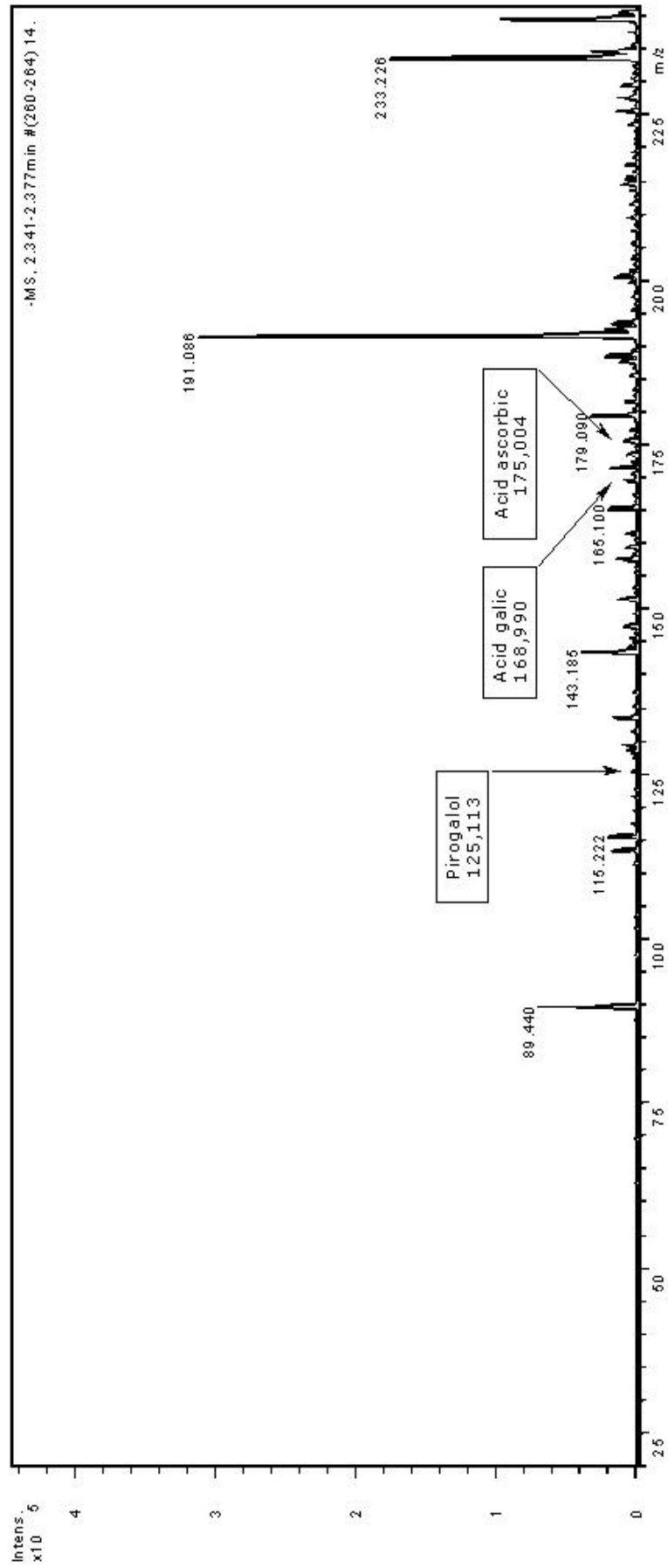


Figura 4.14. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS pentru *Viscum album* (m/z 25- 230)

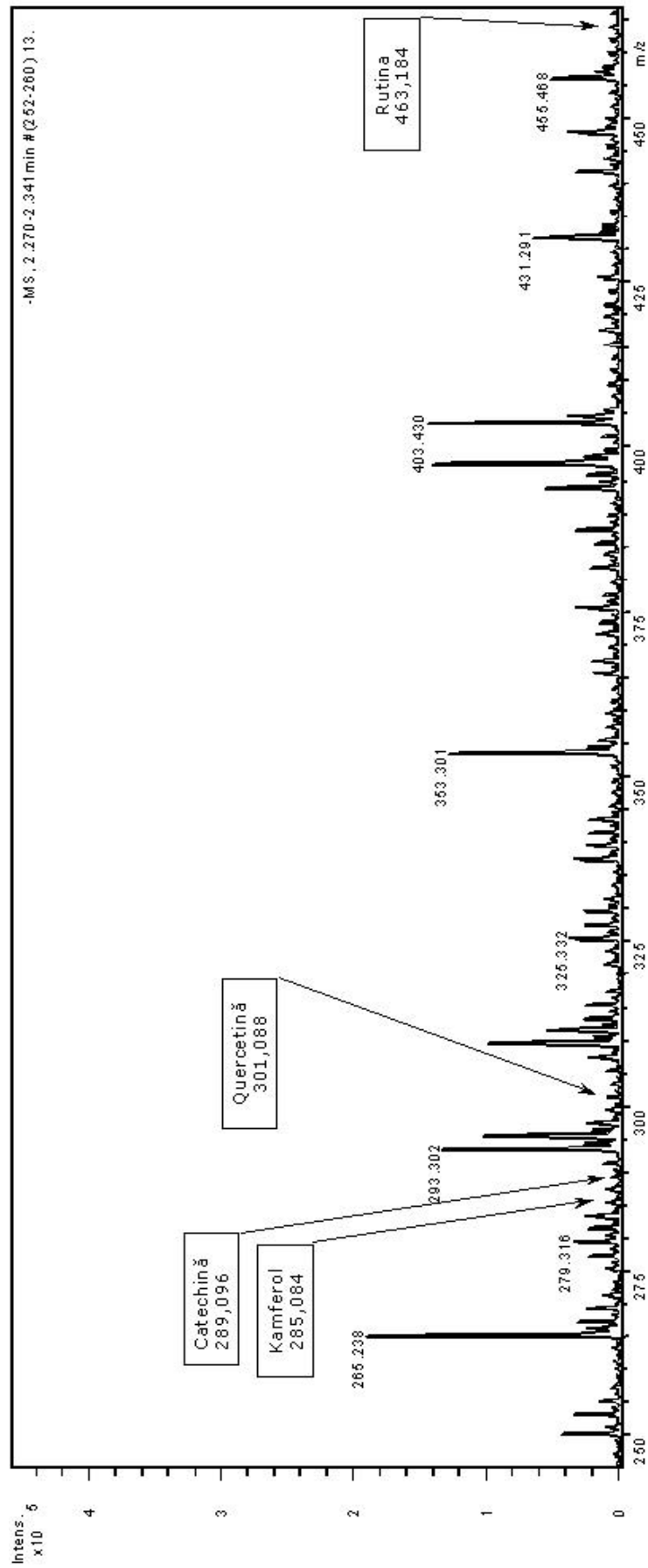


Figura 4.15. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS pentru *Viscum album* (m/z 250 – 465)

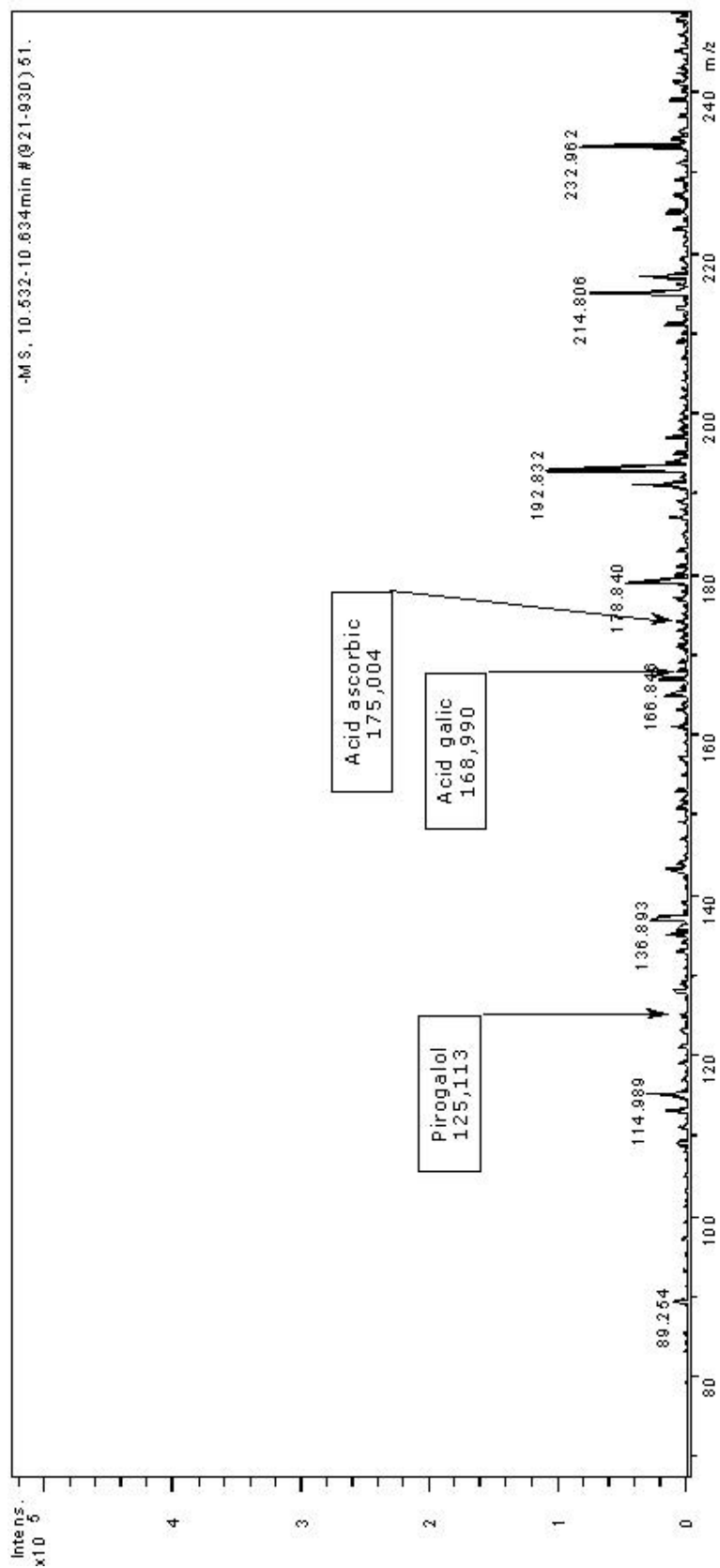


Figura 4.16. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS pentru *Veronica officinalis* ( m/z 70 - 250)

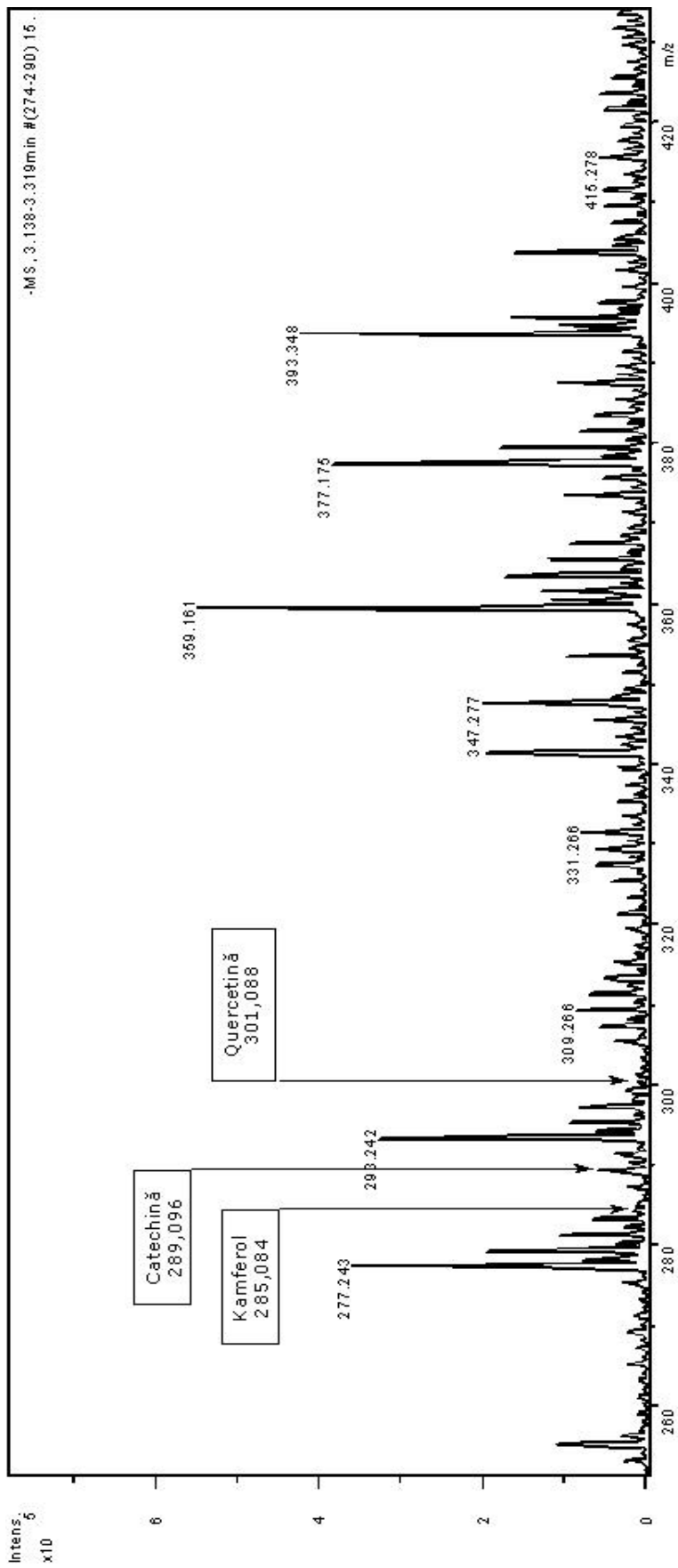


Figura 4.17. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS pentru *Veronica officinalis* ( m/z 255 - 430)

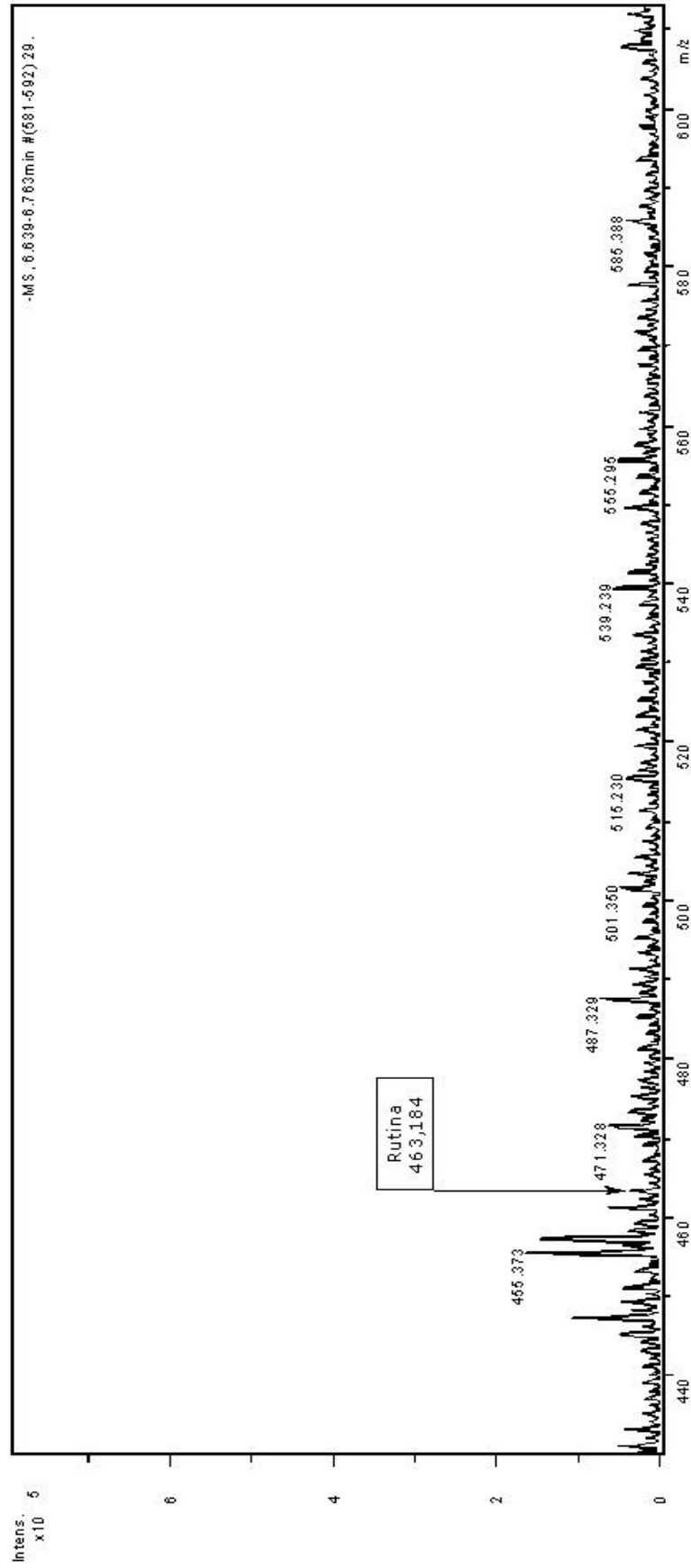


Figura 4.18. Spectrul de masă (-) chip-ESI HCT MS pentru *Veronica officinalis* ( m/z 440 - 610)