

UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI", CLUJ-NAPOCA  
FACULTATEA DE CHIMIE ȘI INGINERIE CHIMICĂ

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**INVESTIGAȚII PRIVIND EFECTUL MICROUNDELOR  
ASUPRA CONSTITUENȚILOR BIOACTIVI DIN UNELE  
PLANTE AROMATICE APARTINÂND FAMILIEI APIACEAE**

**Conducător științific**

Prof. Dr. Constantin Măruțoiu

**Doctorand**

Manuela Cristina Stan

Cluj-Napoca

-2014-

## CUPRINS

<b>LISTA DE ABREVIERI</b>	4
<b>INTRODUCERE</b>	6
<b>CONTRIBUȚII PERSONALE</b>	8
<b>DATE DE LITERATURĂ</b>	
<b>CAPITOLUL 1. COMPUȘI BIOACTIVI DE ORIGINE VEGETALĂ</b>	9
<b>1.1. Compuși bioactivi cu aplicații industriale și terapeutice</b>	9
<i>1.1.1. Pigmenții flavonoidici</i>	10
<i>1.1.2. Uleiurile volatile</i>	14
<i>1.1.3. Taninurile</i>	16
<i>1.1.4. Vitaminele</i>	17
<b>CAPITOLUL 2. CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND PLANTELE STUDIATE DIN FAMILIA APIACEAE</b>	19
<b>2.1. Caracteristici și utilizări ale plantelor considerate pentru studiu</b>	19
<b>2.2. Compuși bioactivi prezenți în <i>Petroselinum crispum</i>, <i>Anethum graveolens</i> și <i>Apium graveolens</i></b>	20
<b>2.3. Metode de extracție și analiză a compușilor bioactivi din plante</b>	21
<b>2.3.1. Metode de extracție a compușilor bioactivi</b>	21
<i>2.3.1.1. Macerarea</i>	22
<i>2.3.1.2. Extracția Soxhlet</i>	22
<i>2.3.1.3. Extracția cu solvent asistată de ultrasunete</i>	23
<i>2.3.1.4. Extracția cu solvent asistată de microunde</i>	23
<i>2.3.1.5. Extracția cu fluide în stare supercritică</i>	26
<i>2.3.1.6. Extracția accelerată cu solvent</i>	28
<b>2.3.2. Metode de analiză a compușilor bioactivi</b>	29
<i>2.3.2.1. Analiza extractelor de plante prin metode cromatografice</i>	29
<i>2.3.2.2. Analiza extractelor de plante prin metoda spectrofotometriei UV-Vis</i>	31
<b>2.3.3. Metode de extracție și analiză a compușilor bioactivi din <i>Petroselinum crispum</i>, <i>Anethum graveolens</i> și <i>Apium graveolens</i></b>	32
<b>CAPITOLUL 3. INFLUENȚA FACTORILOR DE STRES ASUPRA PLANTELOR</b>	34
<b>3.1. Factori de stres și efectele acestora asupra plantelor</b>	34

3.1.1. <i>Tipuri de factori de stres</i>	34
3.1.2. <i>Stresul oxidativ și antioxidanții</i>	36
3.1.3. <i>Metode pentru evidențierea caracterului antioxidant al compușilor bioactivi</i>	37
3.2. <b>Influența radiațiilor electromagnetice asupra plantelor</b>	40
<b>PARTE EXPERIMENTALĂ</b>	
<b>CAPITOLUL 4. SELECTAREA METODEI EFICIENTE DE EXTRAȚIE A ULEIURILOR VOLATILE DIN PLANTELE STUDIAȚE</b>	43
4.1. <b>Metode de extracție</b>	43
4.2. <b>Determinarea uleiurilor volatile din plantele studiate prin metode cromatografice</b>	47
4.2.1. <i>Determinarea uleiurilor volatile din plantele studiate prin cromatografia de gaze cu detector de ionizare în flacără</i>	47
4.2.2. <i>Determinarea uleiurilor volatile din plantele studiate prin cromatografia de gaze cuplată cu spectrometria de masă</i>	49
4.2.3. <i>Determinarea uleiurilor volatile din plantele studiate prin cromatografia pe strat subțire</i>	52
<b>CAPITOLUL 5. SELECTAREA METODEI EFICIENTE DE EXTRAȚIE A ACIDULUI L-ASCORBIC DIN PLANTELE STUDIAȚE APARTINÂND FAMILIEI APIACEAE</b>	59
5.1. <b>Metode de extracție</b>	59
5.2. <b>Determinarea acidului L-ascorbic prin cromatografia de lichide de înaltă performanță</b>	61
<b>CAPITOLUL 6. SELECTAREA METODEI EFICIENTE DE EXTRAȚIE A FLAVONOIDELOR DIN PLANTELE STUDIAȚE</b>	66
6.1. <b>Extracția și identificarea unor flavonoide din extracte de <i>Petroselinum crispum</i></b>	66
6.1.1. <i>Analiza spectrofotometrică</i>	67
6.1.2. <i>Analiza prin cromatografia de lichide de înaltă performanță</i>	68
<b>CAPITOLUL 7. INFLUENȚA MICROUNDELOR ASUPRA UNOR COMPUȘI BIOACTIVI DIN PLANTELE APARTINÂND FAMILIEI APIACEAE STUDIAȚE</b>	70
7.1. <b>Creșterea plantelor selectate pentru studiu în câmp de microunde</b>	70
7.2. <b>Determinarea uleiurilor volatile din plantele condimentare supuse iradierii cu microunde</b>	73

7.2.1. <i>Determinarea uleiurilor volatile prin cromatografia de gaze cuplată cu spectrometria de masă</i>	74
7.2.2. <i>Determinarea uleiurilor volatile din plantele studiate prin cromatografia pe strat subțire</i>	77
7.2.3. <i>Determinarea uleiurilor volatile prin cromatografia de lichide de înaltă performanță</i>	80
7.3. <b>Analiza emisiilor de compuși organici volatili generate de plante ca urmare a efectului microundelor</b>	82
7.4. <b>Analiza cantitativă a acidului L-ascorbic</b>	86
7.4.1. <i>Analiza prin cromatografia de lichide de înaltă performanță</i>	86
7.4.2. <i>Analiza prin metode electrochimice</i>	89
7.5. <b>Determinarea influenței microundelor asupra compușilor polifenolici din plantele supuse iradierii</b>	90
7.5.1. <i>Analiza cantitativă spectrofotometrică a flavonoidelor</i>	91
7.5.2. <i>Analiza cantitativă spectrofotometrică a compușilor polifenolici totali</i>	94
7.5.3. <i>Determinarea caracterului antioxidant al extractelor din plantele iradiate și neiradiate prin metoda DPPH</i>	96
7.6. <b>Determinarea cantității de radicali liberi din plante prin rezonanța electronică de spin</b>	99
7.7. <b>Analiza ultrastructurală și morfologică a plantelor condimentare studiate</b>	104
7.8. <b>Determinarea compoziției izotopice a carbonului din plantele analizate</b>	113
<b>CONCLUZII</b>	117
<b>BIBLIOGRAFIE</b>	120
<b>LISTA DE LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE ELABORATE</b>	136
A. <b>Lucrări publicate pe tematica abordată</b>	136
B. <b>Lucrări publicate în rezumat la conferințe și simpozioane internaționale pe tematica abordată</b>	137
C. <b>Alte lucrări (articole și comunicări la conferințe și simpozioane naționale și internaționale)</b>	140
<b>ARTICOLELE PUBLIFICATE PE TEMATICA TEZEI</b>	

## LISTA DE ABREVIERI

AA	acid ascorbic
AC	acid acetic
DHAA	acid dehidroascorbic
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EPR	spectroscopia de rezonanță electronică paramagnetică (electron paramagnetic resonance)
FID	detector cu ionizare în flacără
GAE	echivalenți de acid galic (gallic acid equivalents)
GC	cromatografie de gaze
GLV	volatile din frunze verzi (green leaf volatiles)
GSM	telefonie mobilă (Global System for Mobile Communication)
HPLC	cromatografie de lichide de înaltă performanță (high performance liquid chromatography)
LOD	limita de detecție (limit of detection)
LOQ	limita de cuantificare (limit of quantification)
M	macerare
M1	plante iradiate cu microunde de frecvență GSM
M2	plante iradiate cu microunde de frecvență WLAN
MAE	extracție în câmp de (asistată) de microunde (microwave-assisted extraction)
MM1	plante de mărar iradiate cu microunde de frecvență GSM
MPA	acid metafosforic
MS	spectrometru de masă
PDA, DAD	detector tip șir de fotodiode (photodiode array detector)
PM1	plante de pătrunjel iradiate cu microunde de frecvență GSM
PM2	plante de pătrunjel iradiate cu microunde de frecvență WLAN
QE	echivalenți de quercetin (quercetin equivalents)
R	plante de referință, neiradiate (sau C, control)
RES	rezonanță electronică de spin
TLC	cromatografie pe strat subțire (thin-layer chromatography)

TM1	plante de țelină iradiate cu microunde de frecvență GSM
TM2	plante de țelină iradiate cu microunde de frecvență WLAN
Trolox	acid 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-carboxilic
WLAN	wireless internet connection (Wireless Local Area Network)
UAE	extracție asistată de ultrasunete (ultrasound-assisted extraction)
UV-VIS	ultraviolet-vizibil
VOC	compuși organici volatili (volatile organic compounds)
TEM	microscopie electronică de transmisie (transmission electron microscopy)
TCA	acid tricloroacetic

**Cuvinte cheie:** constituenți bioactivi, Apiaceae, microunde, extracție, cromatografie, spectroscopie UV-VIS, analiză ultrastructurală.

## INTRODUCERE

Datorită multiplelor proprietăți, plantele prezintă un interes deosebit pentru hrana omului, astfel fiind important de cunoscut compoziția lor chimică, precum și modul în care aceasta este influențată de factorii externi cum ar fi clima sau poluarea tehnologică generată de om.

Ca urmare, în ultimii ani, un număr mare de activități de cercetare au fost demarate în ceea ce privește influența factorilor de stres asupra mediului, atât asupra plantelor cultivate de către om, cât și a celor crescute în mod natural. S-a constatat că în plante au loc modificări în compoziție, atât din punct de vedere biologic, cât și chimic [2-6]. Între factorii de stres care acționează asupra plantelor, cu puternic impact asupra economiei mondiale, se numără temperatura (frigul, căldura), deficitul de apă, ozonul, salinitatea, deficiența minerală și toxicitatea solului, radiațiile electromagnetice etc.

În prezent, utilizarea pe scară largă a telefoanelor mobile și a dispozitivelor wireless a devenit din ce în ce mai necesară și ”obligatorie”, toate acestea generând un nivel ridicat de radiații electromagnetice. Astfel, a apărut un nou tip de stres, și anume, câmpul electromagnetic, în special în domeniul de microunde (1-100 GHz) [7, 8]. Ca urmare a acestui tip de stres, au fost efectuate o serie de experimente cu privire la efectele câmpului electromagnetic asupra creșterii și dezvoltării plantelor [7-9, 12].

În consecință, acumularea de noi date și dovezi experimentale cu privire la influența microundelor asupra proceselor metabolice desfășurate în plante și, implicit, asupra calității nutritive a plantelor, reprezintă un domeniu de o reală importanță și interes pentru cercetarea științifică.

## CONTRIBUȚII PERSONALE

În cadrul tezei de doctorat intitulată “Investigații privind efectul microundelor asupra constituenților bioactivi din unele plante aromatice aparținând familiei Apiaceae” s-a avut ca obiectiv principal determinarea efectului microundelor de frecvență egală cu cea a telefoniei mobile (GSM) și wireless (WLAN) asupra constituenților chimici bioactivi din trei plante condimentare aparținând familiei Apiaceae. Plantele selectate: pătrunjel (*Petroselinum crispum*), mărar (*Anethum graveolens*) și țelină (*Apium graveolens*), sunt frecvent utilizate datorită multiplelor proprietăți medicinale și culinare.

Principalul element de noutate al tezei constă în creșterea plantelor de pătrunjel, mărar și țelină în camp de microunde de putere mică, în incinte anechoice identice, și urmărirea variației cantității de compuși bioactivi în plantele iradiate comparativ cu plantele control (de referință, crescute în același tip de incinte, dar în absența câmpului de microunde).

În vederea realizării acestui obiectiv s-au efectuat studii privind stabilirea metodelor eficiente de extracție a compușilor investigați (acid ascorbic, uleiuri volatile, compuși polifenolici), metode care s-au utilizat ulterior pentru extracția acestor compuși din plantele iradiate și cele neiradiate.

În categoria elementelor de noutate ale tezei se încadrează și stabilirea diferențelor apărute în cazul emisiilor de compuși organici volatili eliberați de plantele iradiate față de cele control, precum și analizele ultrastructurale și morfologice realizate pe frunzele plantelor studiate.

În urma investigațiilor efectuate, s-a constatat creșterea conținutului în uleiuri volatile, acid ascorbic și compuși polifenolici din plantele iradiate cu microunde de frecvență GSM, în timp ce efectul microundelor de frecvență WLAN s-a dovedit a fi variabil, în funcție de planta analizată.

Analizele ultrastructurale și morfologice au condus la concluzia că iradierea cu microunde de frecvență WLAN afectează mai puternic plantele comparativ cu microundele de frecvență GSM.

Studiile efectuate sunt importante întrucât, până în prezent, literatura de specialitate nu prezintă suficiente date și concluzii clare în legătură cu efectele microundelor asupra lumii vii. Cunoașterea influenței microundelor de putere mică și frecvențe diferite asupra compușilor chimici biologic activi din plante reprezintă un pas important în acest domeniu.

## **PARTE EXPERIMENTALĂ**

### **CAPITOLUL 4**

#### **SELECTAREA METODEI EFICIENTE DE EXTRACȚIE A ULEIURILOR VOLATILE DIN PLANTELE STUDIATE**

##### **4.1. Metode de extracție**

Pătrunjelul (*Petroselinum crispum*), mărarul (*Anethum graveolens*) și țelina (*Apium graveolens*), plante aromatice aparținând familiei Apiaceae (Umbeliferae), sunt printre cele mai



populare plante utilizate în bucătăria românească, datorită conținutului bogat în uleiuri volatile și alți compuși bioactivi.

Uleiurile esențiale sunt amestecuri naturale foarte complexe constituite din molecule produse prin diferite căi ale metabolismului secundar, conținând în mod caracteristic terpenoide, benzenoide și uneori compuși alifatici [52]. S-a arătat că atât compoziția cât și conținutul uleiurilor esențiale depind de speciile de plante și de condițiile de mediu [161, 165, 209].

**Extracția uleiurilor volatile din *Petroselinum crispum*, *Anethum graveolens* și *Apium graveolens*.** Pentru extracția uleiurilor volatile din plantele condimentare studiate, s-a utilizat 1 g material vegetal proaspăt (frunze) care s-a supus extracției prin diferite tehnici, utilizând diferite sisteme de solvenți [211], și anume: E1 – etanol - dietil eter (1:1, v/v), E2 – etanol, E3 – *n*-hexan, E4 – dietil eter, E5 – dietil eter - *n*-hexan (1:1, v/v). Toate extracțiile s-au efectuat în triplicat, temperatura de extracție fiind 30°C. Extractele de plante s-au obținut prin trei procedee de extracție: macerare, extracție asistată de ultrasunete (UAE) și extracție asistată de microunde (MAE).

Stabilirea condițiilor eficiente de extracție (solvent de extracție și metodă) s-a realizat pe plante de referință, iar cea mai bună metodă a fost aplicată în cazul plantelor iradiate cu microunde. Analiza extractelor s-a efectuat prin metode cromatografice (TLC, GC-FID, GC-MS).

## **4.2. Determinarea uleiurilor volatile din plantele studiate prin metode cromatografice**

### **4.2.1. Determinarea uleiurilor volatile din plantele studiate prin cromatografia de gaze cu detector de ionizare în flacără (GC-FID)**

Analizele s-au efectuat utilizând un gaz cromatograf Shimadzu GC-2010 cu detector de ionizare în flacără (GC-FID), având o coloană capilară de tip AT-5 cu lungimea de 30 m. Ca și gaz purtător s-a utilizat heliu, având debitul constant de 4 mL/min. Temperatura cuptorului a fost programată astfel: 2 min la 50°C, urmată apoi de încălzire cu 8°C/min până la 250°C unde s-a menținut 15 min. Temperatura de injectare a fost 250°C, iar volumul injectat de 1 μL [211].

Pentru stabilirea celei mai eficiente metode de extracție a uleiurilor volatile, au fost comparate cromatogramele înregistrate și ariile picurilor. Din suprapunerea cromatogramelor s-a determinat că cea mai eficientă metodă de extracție în cazul uleiurilor volatile a fost macerarea, urmată de ultrasonare, amestecul de extracție cel mai eficient fiind E5 (dietil eter: *n*-hexan, 1:1, v/v), urmat de E3 (*n*-hexan).

#### 4.2.2. Determinarea uleiurilor volatile din plantele studiate prin cromatografia de gaze cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS)

Pentru acest tip de analiză cromatografică s-a utilizat un sistem alcătuit dintr-un cromatograf de gaze cuplat cu spectrometru de masă, Shimadzu GCMS-QP2010 Plus (Kyoto, Japonia), echipat cu o coloană tip DB-5-MS Agilent Technologies (30 m, diametru 0,25 mm, film 0,25 mm).

Temperatura inițială a cuptorului a fost de 40°C, unde s-a menținut 1 min, încălzirea a avut loc în două trepte: mai întâi cu 5°C/min până la 200°C, unde s-a menținut 1 min, iar apoi cu 10°C/min până la 220°C, unde s-a menținut 5 min. Ca și gaz purtător s-a utilizat heliu (puritate 99,9999%, Elmer Messer Gaas AS, Tallinn, Estonia), având debitul constant 1 mL/min. Temperatura de injectare a fost de 215°C, iar volumul injectat de 1 μL. Spectrometrul de masă operează prin ionizare prin impact electronic (EI) la 70 eV, în domeniul de masă  $m/z$  30 – 400, temperatura liniei de transfer a fost de 240°C, iar temperatura sursei de ioni de 150°C [211].

Compușii volatili au fost identificați prin compararea spectrelor de masă ale compușilor individuali utilizând o librărie de spectre, și respectiv, prin compararea timpilor de retenție ai compușilor de identificat cu cei ai unor compuși standard (Tabelul 1) [211].

**Tabel 1.** Compușii volatili majoritari identificați în extractele de pătrunjel, mărar și țelină.

Component	R.T. (min)	Arie (%)		
		Pătrunjel	Mărar	Țelină
$\alpha$ -Felandren	10,21	0,73	14,68	-
$\beta$ -Felandren	10,94	15,47	-	-
1,3,8- <i>p</i> -mentatriena	13,45	12,17	0,21	-
Dill eter	15,62	-	8,39	-
Miristicin	24,52	14,87	2,86	0,08
Elemicină	25,29	-	5,06	-
Apiol	28,22	16,91	0,83	-
Fenoxiacetat de alil	29,27	-	-	53,58
Ciclotetracosan	34,47	8,35	-	-
( <i>E</i> )-5-Eicosen	38,61	8,29	-	1,62

Compușii majoritari identificați în extractele de pătrunjel au fost  $\beta$ -felandren (15,47%), 1,3,8-*p*-mentatrienă (12,17%), miristicin (14,87%) și apiol (16,91%). Extractele de

mărar conțin ca și constituent majoritar  $\alpha$ -felandren (14,68%), iar cele de țelină, esterul fenoxiacetat de alil (53,58%).

#### **4.2.3. Determinarea uleiurilor volatile din plantele studiate prin cromatografia pe strat subțire (TLC)**

Analizele s-au efectuat pe plăci HPTLC – silicagel 60, plăci de sticlă 10 x 10 cm, grosime strat 0,2 mm (Merck, Darmstadt, Germania). Extractele și soluțiile standard au fost aplicate sub formă de benzi de lungime 1,2 cm, la distanțe de 1,5 cm de marginea de jos și 1 cm de marginile laterale, utilizând un aplicator semiautomat Linomat V (CAMAG, Elveția) și o seringă de 500  $\mu$ L. Volumul de extract aplicat pe fiecare bandă a fost de 200  $\mu$ L. Plăcile au fost dezvoltate pe o distanță de 8 cm într-o cameră cromatografică presaturată, timp de 10 min. Sistemul eter de petrol – diclormetan (30:70, v/v) s-a utilizat ca și fază mobilă. După pulverizare cu o soluție de vanilină/acid sulfuric conc. și încălzire la 120°C timp de 4-5 min, plăcile cromatografice au fost analizate la 600 nm cu un fotodensitometru (scanner III TLC CAMAG, Elveția) pentru a înregistra ariile picurilor corespunzătoare compușilor de identificat. Soluția de vanilină/acid sulfuric utilizată pentru vizualizare s-a preparat prin adăugarea de acid sulfuric concentrat (2,5 mL) unei soluții obținute prin dizolvarea de vanilină (15 g) în etanol (250 mL).

**Tabel 2.** Factorii de retenție ai compușilor identificați în pătrunjel, mărar și țelină prin TLC.

<b>Component</b>	<b>R<sub>F</sub></b>
$\alpha$ -Felandren	0,23
$\beta$ -Pinen	0,42
Miristicin	0,72

Determinarea compușilor  $\alpha$ -felandren și  $\beta$ -pinen din extractele de mărar (*Anethum graveolens*) obținute cu sistemele de solvenți E1-E5 a fost realizată prin metoda HPTLC. Pentru validarea metodei au fost determinați următorii parametri: selectivitate, linearitate, limite de detecție și cuantificare, precizie și acuratețe. Cantitățile de compuși volatili din extracte au fost calculate pe baza curbelor de calibrare, obținute prin aplicarea unui volum de 10  $\mu$ L din soluțiile stoc ale unor compuși standard ( $\alpha$ -felandren și  $\beta$ -pinen) [213].

## CAPITOLUL 5

### SELECTAREA METODEI EFICIENTE DE EXTRAȚIE A ACIDULUI L-ASCORBIC DIN PLANTELE STUDIATE APARTINÂND FAMILIEI APIACEAE

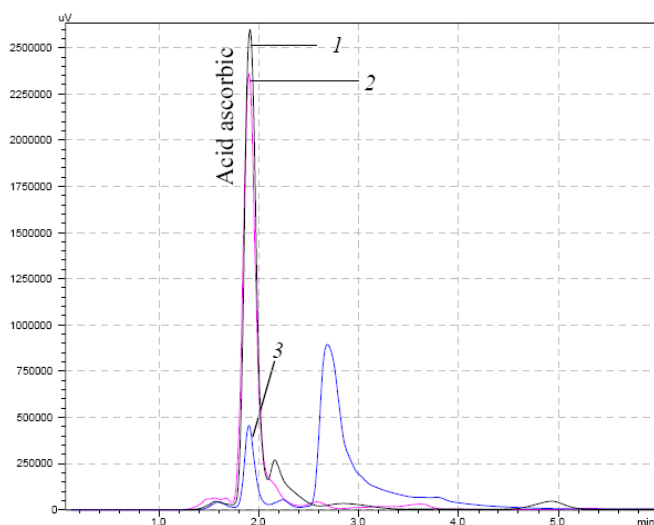
Vitamina C (acid L-ascorbic, acid ascorbic sau L-ascorbat, AA) este un antioxidant foarte eficient și un compus esențial pentru organismul uman, fiind suplimentată din fructe și legume.

#### 5.1. Metode de extracție

În cadrul acestei activități, s-a realizat extracția acidului ascorbic prin trei metode: mojarare umedă urmată de centrifugare (1), ultrasonare (2) și extracție în câmp de microunde (3), utilizând ca solvenți de extracție diferite soluții apoase, de concentrație 8%, ale următorilor acizi: acid tricloroacetic (TCA), acid metafosforic (MPA) și acid acetic (AC).

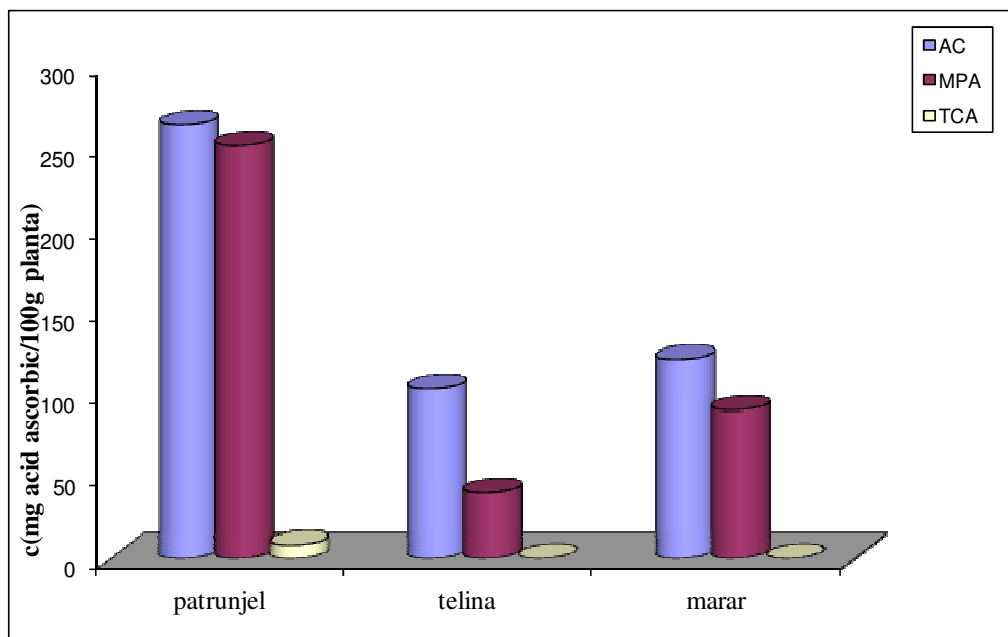
#### 5.2. Determinarea acidului L-ascorbic prin cromatografia de lichide de înaltă performanță

**Metoda HPLC.** Pentru analiza acidului L-ascorbic din extractele de plante studiate, prin metoda HPLC, s-a utilizat un sistem HPLC Shimadzu 2010, echipat cu detector cu șir de fotodiode (PDA), și o coloană tip Grace Alltima C18, 3 μm, 100 x 3 mm. Eluția s-a realizat cu gradient, utilizând o fază mobilă alcătuită din: tampon fosfat 15 mM la pH 2,7 (A) și metanol (B), cu un debit de 0,4 mL/min. Gradientul a fost realizat astfel: min 0: 10% B, min 5: 20% B, min 10: 10% B. Temperatura coloanei a fost de 30°C, iar volumul injectat a fost de 20 μL. Lungimea de undă UV pentru detecția acidului L-ascorbic a fost 243 nm, iar timpul de retenție determinat 1,85 min [221]. Pe baza rezultatelor experimentale, s-a determinat că metoda cea mai eficientă de extracție a acidului ascorbic a fost ultrasonarea, acidul acetic 8% fiind cel mai eficient extractant (Figura 26).



**Figura 26.** Cromatogramele unor extracte de *Petroselinum crispum* obținute prin metoda de extracție UAE folosind soluții apoase de acizi de concentrație 8%. (1). AC ; (2). MPA; (3). TCA.

Pe baza datelor experimentale și a ecuației drepte de calibrare, s-au determinat cantitățile de acid ascorbic (Figura 28) din cele trei plante condimentare studiate: pătrunjel (264 mg AA/100 g plantă verde), mărar (121 mg AA/100 g plantă verde) și țelină (103 mg AA/100 g plantă verde) [221].



**Figura 28.** Conținutul de acid L-ascorbic determinat din extractele de pătrunjel, țelină și mărar obținute prin metoda de extracție UAE cu acid acetic (AC), acid metafosforic (MPA) și acid tricloroacetic (TCA), de concentrație 8%.

## CAPITOLUL 6

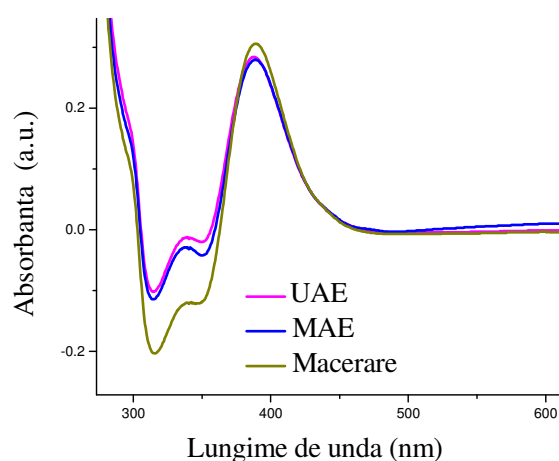
### SELECTAREA METODEI EFICIENTE DE EXTRACȚIE A FLAVONOIDELOR DIN PLANTELE STUDIATE

#### 6.1. Extracția și identificarea unor flavonoide din extracte de *Petroselinum crispum*

Pentru studiul privind extracția unor flavonoide din pătrunjel s-a folosit material vegetal de proveniență comercială. Extractele de pătrunjel s-au obținut prin trei procedee de extracție: macerare, extracție cu solvent asistată de ultrasunete și extracție cu solvent în câmp de microunde. Pentru extracție s-au utilizat amestecuri etanol-apă (v/v) în diferite proporții (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60). 0,5 g plantă (frunze), fin pulverizată, s-au extras cu 20 mL de solvent. După filtrare și spălare, volumul final al extractelor s-a ajustat la 25 mL cu același

amestec folosit pentru extracție. Toate extracțiile s-au efectuat la temperatura de 35°C. Determinarea conținutului de flavonoide din extractele de pătrunjel s-a efectuat prin metoda colorimetrică cu clorură de aluminiu [122].

Conform datelor spectrofotometrice, cea mai mare cantitate de flavonoide s-a determinat pentru extractele obținute prin macerare cu amestecul etanol-apă (50:50, v/v) [229], urmată de ultrasonare cu amestecul etanol-apă (60:40, v/v), și extracție în câmp de microunde cu amestecul etanol-apă (40:60, v/v). Absorbanța maximă pentru extractele hidroalcoolice s-a obținut la lungimea de undă de  $390 \pm 2$  nm (Figura 29). Pentru a reduce timpul de extracție, se va efectua extracția compușilor flavonoidici din plantele iradiate prin metoda ultrasonării (UAE).



**Figura 29.** Determinarea cantității totale de flavonoide din extracte de pătrunjel obținute prin cele trei metode de extracție.

### **6.1.2. Analiza prin cromatografia de lichide de înaltă performanță**

Identificarea unor compuși flavonoidici din extractele de pătrunjel s-a realizat prin analiză HPLC cu un sistem HPLC Shimadzu 2010 echipat cu doi detectori: spectrometru de masă (MS) și detector cu șir de diode (PDA). S-a utilizat o coloană de tip RP-Alltima (C18) (100 mm x 3 mm, diametru interior 3  $\mu$ m). Faza mobilă folosită pentru eluție a fost constituită din acetonitril (A) și apă distilată - acid formic (99,9:0,1, v/v) (B) [126]. Gradientul a fost realizat astfel: min 0: 5% A, min 30: 42% A, min 35: 5 % A. Debitul utilizat a fost de 0,43 mL/min, iar detecția s-a realizat la lungimea de undă de 220 nm. Prin compararea timpilor de retenție cu cei ai unor soluții etalon de flavonoide (100  $\mu$ g/mL) și pe baza datelor de spectrometrie de masă, în extractele de pătrunjel au fost identificați compuși flavonoidici de tipul flavone (apigenin și luteolin) și flavonoli (quercetin și kaempferol) [229].

## CAPITOLUL 7

### INFLUENȚA MICROUNDTELOR ASUPRA UNOR COMPUȘI BIOACTIVI DIN PLANTELE APARTINÂND FAMILIEI APIACEAE STUDIATE

#### 7.1. Creșterea plantelor selectate pentru studiu în câmp de microunde

Plantele considerate pentru studiu (pătrunjel, țelină și mărar), au fost crescute atât în condiții clasice, de referință, cât și în câmp de microunde. S-au utilizat semințe de plante procurate de la firma Agrosel (România): pătrunjel de frunze (*Petroselinum crispum*, Plain leaved 2), mărar (*Anethum graveolens ssp. hortorum*, Common) și țelină de frunze (*Apium graveolens*, Pascal Giant). Un număr egal de semințe au fost plantate în vase identice, de același volum (150 mL), umplute cu cantități egale de sol pentru grădinarit de proveniență comercială.

La trei săptămâni după semănare, vasele cu plantele răsărite au fost introduse în trei incinte anechoice identice, cu dimensiunile  $37 \times 37 \times 37 \text{ cm}^3$  și având pereții căptușiți cu structuri piramidale de înălțime 4 cm, acestea fiind amplasate în aceleași condiții de temperatură și umiditate, și închise complet [231]. Incintele închise s-au menținut în aceleași condiții: intensitate luminoasă ( $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), temperatură ( $25^\circ\text{C}$ ), concentrație  $\text{CO}_2$  ( $385 \pm 20 \text{ ppmv}$ ) și umiditate (65%), acestea prezentând o izolare de radiofrecvență între interior și exterior de 60 dB (3 kHz – 300 GHz). În una din camere s-au introdus plantele control (camera de referință R), iar în celelalte două camere s-au introdus plantele urmând a fi supuse iradierii cu microunde (Figura 33).

Iradieră s-a realizat cu microunde acționând pe două domenii:

1) GSM (telefonie mobilă) utilizând un generator în patru benzi de tip AP5200 modificat, cu frecvența în domeniul 860 – 910 MHz, putere totală de ieșire 29 dBm (1000 mWatt) (plantele **M1**);

2) WLAN (wireless internet connection), utilizând un router 802.11 g/2.4 GHz de tip D-LINK (China), cu frecvența de operare în domeniul 2,412 – 2,48 GHz, cu canalul principal de operare la 2,42 GHz, putere totală de ieșire 19 dBm ( $10^{1.8}$  mWatt) (plantele **M2**).

Densitatea de putere la baza camerelor de iradiere a fost măsurată cu un analizor de spectru tip SPECTRAN HF 4060, AARONIA AG (Germania). În aceste incinte plantele au fost păstrate timp de 3 săptămâni și au fost udate periodic cu volume egale de apă (10 mL per vas). După 3 săptămâni plantele au fost scoase din camere, au fost recoltate frunzele, după care au fost obținute și analizate extractele.



**Figura 33.** Plante de țelină introduse în camera anechoică pentru iradiere cu microunde de frecvență GSM.

## **7.2. Determinarea uleiurilor volatile din plantele condimentare supuse iradierii cu microunde**

### **7.2.1. Determinarea uleiurilor volatile prin cromatografia de gaze cuplată cu spectrometria de masă**

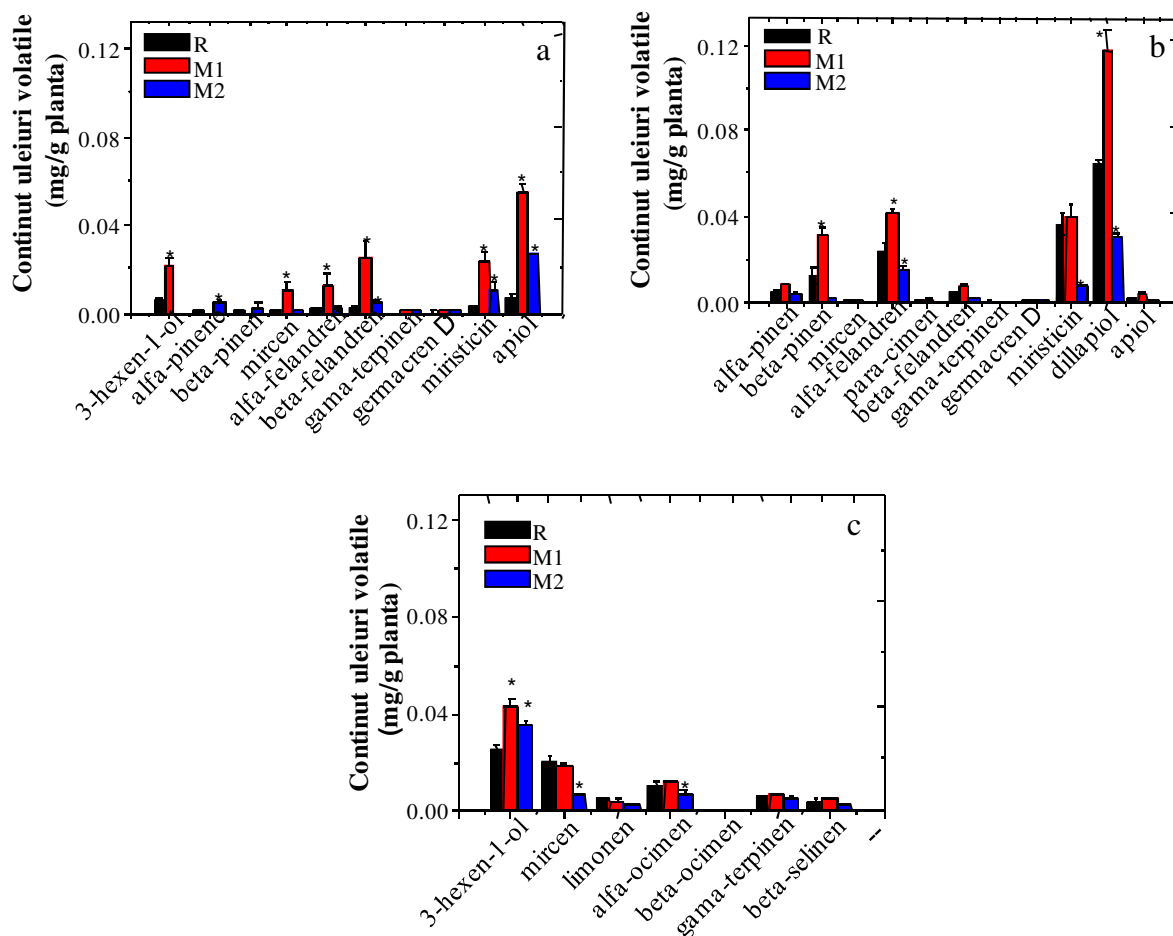
Atât pentru analiza uleiurilor volatile, cât și a compușilor organici volatili (VOC-uri) emiși de plante în condiții de stres, s-a utilizat un sistem GC-MS alcătuit dintr-un cromatograf de gaze Shimadzu QP2010 Plus cuplat cu spectrometru de masă cuadrupolar (Kyoto, Japonia).

Pentru analiza uleiurilor volatile s-a utilizat metoda prezentată anterior în capitolul 4 (secțiunea 4.2.2). Uleiurile volatile și compușii organici volatili emiși de plante s-au identificat prin compararea spectrelor de masă ale compușilor individuali cu spectrele de masă ale unor compuși standard de puritate înaltă (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), utilizând o librărie de spectre, iar determinările cantitative s-au efectuat pe baza curbelor de calibrare corespunzătoare compușilor identificați.

În urma studiilor efectuate s-a constatat că uleiurile esențiale ale plantelor condimentare studiate au o compoziție complexă: au fost identificați 10 compuși în *Petroselinum crispum*, 11 compuși în *Anethum graveolens* și 7 compuși în *Apium graveolens*. În toate cele trei specii, monoterpenele constituie componentii majoritari (Figura 36), fiind identificate și cantități semnificative de compuși benzenoidici specifici: apiol în *Petroselinum crispum*, și miristicin și



dillapiol în *Anethum graveolens* (Figura 36). Compușii volatili majoritari identificați în *Apium graveolens* au fost 3-hexen-1-ol, mircen,  $\alpha$ -ocimen și  $\gamma$ -terpinen (Figura 36).



**Figura 36.** Modificarea conținutului de terpene (mg/g, plantă verde) în frunzele de *Petroselinum crispum* (a), *Anethum graveolens subsp. hortorum* (b) și *Apium graveolens* (c) ca răspuns la iradierea cu microunde GSM și WLAN. Fiecare punct reprezintă media ( $\pm$ SE, eroarea standard) a trei măsurători pentru fiecare plantă. \*diferențe statistice semnificative între plantele iradiate și plantele control ( $P < 0,05$ ).

În cazul studiului nostru, iradierea cu microunde de frecvență GSM a dus, în general, la creșterea conținutului de uleiuri volatile din cele trei plante (Figura 36), în timp ce efectul microundelor de frecvență WLAN a fost mai puțin clar, conținutul acestora variind în cazul diferitor compuși și specii de plante analizate (Figura 36). Dintre cele trei specii de plante studiate, cel mai puternic efect al microundelor asupra conținutului în uleiuri volatile s-a observat în cazul plantelor de mărar, *Anethum graveolens* (Figura 36b). În cazul plantelor de țelină, *Apium*

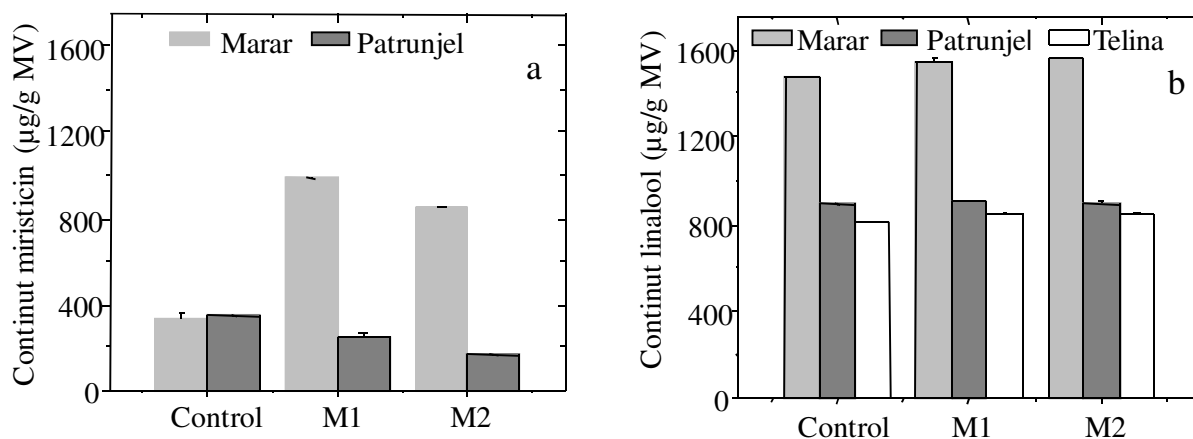
*graveolens*, microundele au afectat cel mai puțin “chimia frunzei”, plantele de țelină fiind cele mai tolerante la acțiunea microundelor.

### 7.2.2. Determinarea uleiurilor volatile din plantele studiate prin cromatografia pe strat subțire

S-a efectuat un studiu pentru cuantificarea compușilor linalool și miristicin din extractele de pătrunjel, mărar și țelină obținute din plantele iradiate cu microunde și neiradiate, pe baza ecuațiilor dreptelor de calibrare ale celor doi compuși [232].

### 7.2.3. Determinarea uleiurilor volatile prin cromatografia de lichide de înaltă performanță

Cantitățile de miristicin și linalool din plantele iradiate și neiradiate s-au determinat și prin analiză HPLC. Analizele s-au efectuat utilizând un cromatograf de lichide HPLC Shimadzu cu detector șir de diode (DAD). Separarea cromatografică a uleiurilor volatile s-a realizat pe o coloană LiChrosorb RP-18 (5 μm, 25 x 0,4 cm, Merck, Germania) termostată la 25°C cu gradient de eluție, având faza mobilă constituită din apă ultrapură (A) și acetonitril (B). Gradientul a fost realizat astfel: 0 - 1 min cu 100% B, cantitatea de acetonitril scăzând până la 25% în minutul 15. Volumul injectat a fost de 5 μL, iar debitul a fost stabilit la 1 mL/min. Picurile cromatografice corespunzătoare compușilor studiați prezintă absorbții maxime la 197 nm pentru linalool și 201 nm pentru miristicin. Pe baza ecuațiilor dreptelor de calibrare corespunzătoare s-au calculat cantitățile celor doi compuși analizați (Figura 40).



**Figura 40.** Cantitățile de miristicin (a) și linalool (b) (μg/g masă verde, MV) în plantele aromatice (mărar – *Anethum graveolens*, pătrunjel – *Petroselinum crispum*, și țelină – *Apium graveolens*) ca urmare a iradierii cu microunde de frecvență GSM (plantele M1) și microunde de frecvență WLAN (plantele M2).

### 7.3. Analiza emisiilor de compuși organici volatili generate de plante ca urmare a efectului microundelor

Eșantionarea probelor de compuși organici volatili (VOC), captați din respirația plantelor, s-a realizat utilizând un sistem de schimb de gaze portabil GFS-3000 (Waltz GmbH, Effeltrich, Germania). Pentru fiecare plantă analizată, compușii organici volatili au fost colectați într-un cartuș din oțel inoxidabil multistrat ( $8,88 \times 0,65$  cm, Supelco, Bellefonte, PA, USA) umplut cu adsorbantă Carboxen. Probe blank de aer din încăperea au fost luate înainte și după efectuarea măsurătorilor la un debit de 200 mL/min timp de 20 min utilizând o pompă 1003-SKC cu debit constant (SKC Inc., Houston, TX, USA) la temperatura camerei.

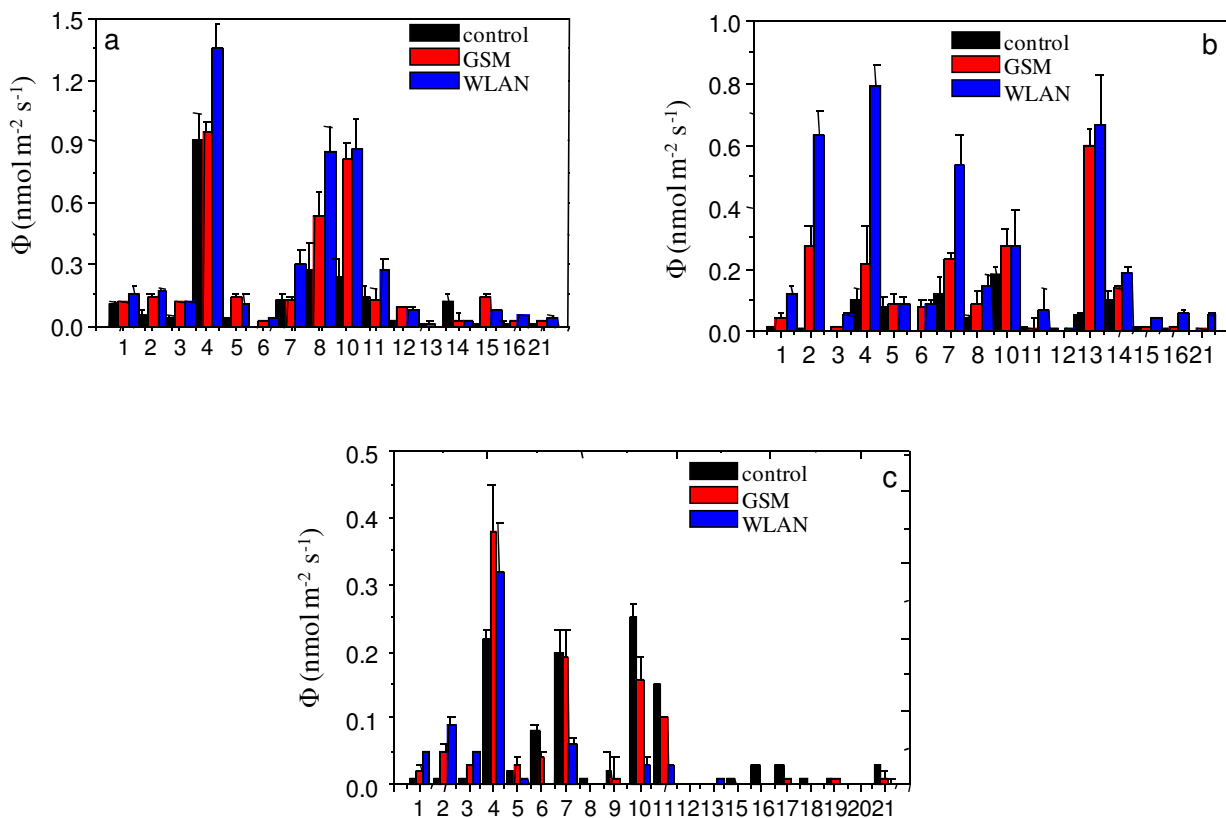
În scopul analizei compușilor organici volatili a fost utilizat un sistem termodesorber automat Shimadzu TD20 (Kyoto, Japonia) conectat la un gaz cromatograf cu MS-Shimadzu QP2010 Plus (Kyoto, Japonia). Analiza compușilor organici volatili emiși de către plantele analizate s-a efectuat după protocolul descris de Copolovici și colaboratorii [144]. Cantitățile de compuși organici volatili eliberați de plantele control și plantele iradiate cu microunde (pătrunjel, mărar și țelină), se exprimă ca  $\Phi$  ( $\text{nmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), reprezentând numărul de nmoli de substanțe volatile emise pe o suprafață de  $1 \text{ m}^2$  (aria frunzei) în interval de 1 secundă (s).

Datele experimentale obținute reflectă faptul că emisiile observate reprezintă un amestec de emisii de stocare constând din compuși prezenți în uleiurile esențiale și emisii “de novo”. Amestecul de substanțe volatile este foarte complex, și în cazul tuturor celor trei specii de plante, plantele nestresate emit de asemenea monoterpene și substanțe benzenoide prezente în uleiurile esențiale, iar în anumite cazuri chiar și compuși care în mod obișnuit nu se regăsesc în compoziția uleiurilor esențiale (Figura 41). Numărul de compuși detectați în emisii a fost mai mare decât în cazul uleiurilor volatile, observându-se compuși volatili “de novo” emiși în condiții de stres (Figura 41). În emisiile de *Petroselinum crispum* s-au detectat 16 compuși, 16 compuși în *Anethum graveolens* și 20 compuși în *Apium graveolens*.

În cazul studiului nostru, toate plantele iradiate cu microunde au emis compuși volatili (*E*)-2-hexenal, (*Z*)-3-hexenol, 1-hexanol, în timp ce în cazul plantelor control, emisiile GLV (“green leaf volatiles”) au avut nivele foarte scăzute, la limitele de detecție ale dispozitivului utilizat (Figura 41). În general, în toate speciile de plante studiate, emisiile GLV au fost mai semnificative în cazul iradierii cu microunde de frecvență WLAN comparativ cu microundele de frecvență GSM (Figura 41,  $P < 0,001$  în toate cazurile).

Aceste rezultate sugerează o stare de stres mai pronunțată în cazul iradierii cu microunde WLAN, rezultate care sunt în acord cu modificările mai semnificative în anatomia frunzelor induse de microundele de frecvență WLAN (subcapitolul 7.7., Tabelul 13).

Cantitatea totală de compuși volatili emiși de către plantele de pătrușel (*Petroselinum crispum*) și mărar (*Anethum graveolens*) iradiate a fost de 5 ori mai mare decât în plantele de țelină (*Apium graveolens*). Așa cum s-a observat și în cazul uleiurilor volatile din această plantă (Figura 36), *Apium graveolens* a fost mai puțin sensibilă la acțiunea microundelor decât *Petroselinum crispum* și *Anethum graveolens*.



**Figura 41.** Modificarea emisiilor de compuși organici volatili ( $\text{nmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) din frunzele de *Petroselinum crispum* (a), *Anethum graveolens subsp. hortorum* (b) și *Apium graveolens* (c) ca răspuns la iradierea cu microunde în bandă wireless router (WLAN) și telefonie mobilă (GSM). Fiecare număr corespunde unui compus organic volatil specific: **1.** 1-hexanol; **2.** (Z)-3-hexen-1-ol; **3.** (E)-2-hexenal; **4.**  $\alpha$ -pinen; **5.** camfen; **6.**  $\beta$ -mircen; **7.**  $\beta$ -pinen; **8.**  $\alpha$ -felandren; **9.**  $\Delta$ -3-carenă; **10.** D-limonen; **11.** para-cimen; **12.**  $\beta$ -felandren; **13.** (E)- $\beta$ -ocimen; **14.** 1,8-cineol; **15.** acetat de izobornil; **16.** longiciclenă; **17.** oxid de cariofilenă; **18.**  $\alpha$ -selinen; **19.** (Z)- $\beta$ -farnesen; **20.**  $\alpha$ -cariofilenă; **21.** geranilacetona.

În ceea ce privește monoterpenele detectate în emisiile celor trei plante studiate ( $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen, camfen, limonen,  $\Delta$ -3-carenă, *para*-cimen,  $\beta$ -felandren, (*E*)- $\beta$ -ocimen, eucaliptol și acetat de bornil) s-au constatat următoarele:

- În *Petroselinum crispum*, emisiile de  $\alpha$ -pinen,  $\alpha$ -felandren și limonen au fost dominante și au crescut ca urmare a iradierii cu microunde, în special în cazul iradierii cu microunde de frecvență WLAN (Figura 41a).

- Emisiile de monoterpene din *Anethum graveolens* au fost dominate de  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen, și limonen, iar aceste emisii au crescut în urma iradierii cu microunde (Figura 41b).

- În *Apium graveolens*, emisiile au fost aproape de 4 ori mai scăzute decât în celelalte două specii de plante și au fost dominate de  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen și limonen (Figura 41c).

Dintre monoterpenele emise de plante, induse de starea de stres [237, 240], s-a observat că emisiile de (*E*)- $\beta$ -ocimen și 1,8-cineol au fost puternic mărite ca urmare a iradierii cu microunde în plantele de *Anethum graveolens* (Figura 41b).

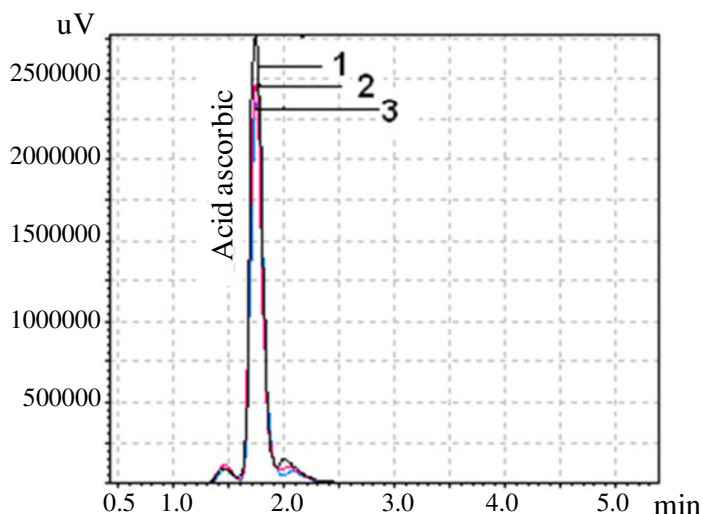
În plus, atât *Petroselinum crispum*, cât și *Anethum graveolens*, au emis în cantități mici longiciclenă (o sesquiterpenă emisă de plante în condiții induse de stres), sub influența radiațiilor de frecvență WLAN.

#### **7.4. Analiza cantitativă a acidului L-ascorbic**

##### **7.4.1. Analiza prin cromatografia de lichide de înaltă performanță**

Acidul ascorbic s-a determinat cantitativ prin metoda standardului extern utilizând procedura descrisă în capitolul 5 (secțiunea 5.2). Conform acestui studiu anterior, acidul L-ascorbic s-a detectat la lungimea de undă de 243 nm, iar timpul de retenție determinat a fost 1,85 min [221]. Pentru a obține curba de calibrare s-au preparat soluții standard de lucru de concentrații 0,3 – 1  $\mu\text{g/mL}$  din soluția stoc, prin diluții succesive cu apă ultrapură. Au fost calculate limita de detecție (0,2  $\mu\text{g/mL}$ ) și limita de cuantificare (0,22  $\mu\text{g/mL}$ ). Ecuația de regresie s-a exprimat astfel:  $y = 6 \times 10^7 x - 9 \times 10^6$  (unde x-concentrația, y-aria), cu un coeficient de corelare  $R^2$  de 0,9986.

Prin suprapunerea cromatogramelor HPLC ale extractelor (picurile corespunzătoare acidului L-ascorbic) înregistrate pentru plantele control și plantele iradiate cu microunde s-a observat o creștere a conținutului de acid ascorbic în plantele crescute în câmp de microunde (Figura 42).



**Figura 42.** Cromatogramele extractelor de țelină obținute prin metoda de analiză HPLC. Plante iradiate cu microunde de frecvență: GSM (1) și WLAN (2). Plante neiradiate, control (3).

S-au efectuat determinările cantitative de acid ascorbic din plantele iradiate și plantele control cu scopul de a efectua un studiu comparativ și a stabili variațiile procentuale (%) ale cantităților de acid ascorbic din aceste plante [241]. Cantitățile de acid ascorbic per 100 g plantă verde s-au determinat atât pentru plantele iradiate cu microunde (M1, M2), cât și pentru plantele control și sunt prezentate în Tabelul 10.

**Tabel 10.** Cantitățile de acid ascorbic (AA) determinate prin metoda HPLC și creșterile procentuale (+%) calculate în raport cu plantele control.

Lot de plante	Conținutul de acid ascorbic (mg AA/100 g plantă) ± RSD (%)		
	Pătrunjel	Mărar	Țelină
M1 <sup>a</sup>	285 ± 0,78 (+8%)	201 ± 0,63 (+66%)	320 ± 0,56 (+211%)
M2 <sup>b</sup>	282 ± 0,50 (+6,8%)	180 ± 0,95 (+49%)	290 ± 1,03 (+181%)
R <sup>c</sup>	264 ± 1,32	121 ± 1,41	103 ± 1,51

<sup>a</sup> plante iradiate cu microunde de frecvență GSM; <sup>b</sup> plante iradiate cu microunde de frecvență WLAN; <sup>c</sup> plante control.

În cazul plantelor control, evaluarea comparativă a rezultatelor experimentale a evidențiat faptul că pătrunjelul conține cea mai mare cantitate de acid ascorbic. În plantele iradiate cu microunde cea mai mare creștere a cantității de L-acid ascorbic s-a determinat în cazul celor

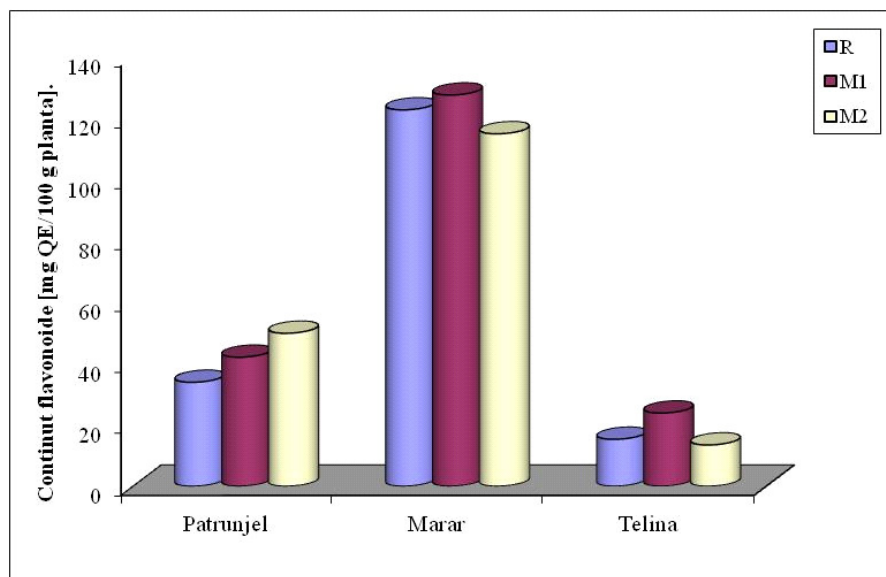
iradiate cu microunde de frecvență GSM (Tabelul 10). Cea mai mare cantitate de acid ascorbic s-a determinat în plantele de țelină (*Apium graveolens*) iradiate cu microunde de tip GSM, în aceste plante cantitatea de acid L-ascorbic crescând de 3,1 ori după trei săptămâni de tratament cu microunde de tip GSM (creștere procentuală de 211%). Cea mai scăzută creștere procentuală a cantității de acid ascorbic s-a determinat în frunzele de pătrunjel aflate sub influența microundelor de frecvență WLAN (6,8 %).

### 7.5. Determinarea influenței microundelor asupra compușilor polifenolici din plantele supuse iradierii

Compușii flavonoidici și polifenolici totali, s-au extras prin ultrasonarea materialului vegetal (plante iradiate cu microunde și plante control) cu sistemul de solvenți etanol-apă (60:40, v/v), care s-a dovedit cel mai eficient sistem de extracție (secțiunea 6.1.1).

#### 7.5.1. Analiza cantitativă spectrofotometrică a flavonoidelor

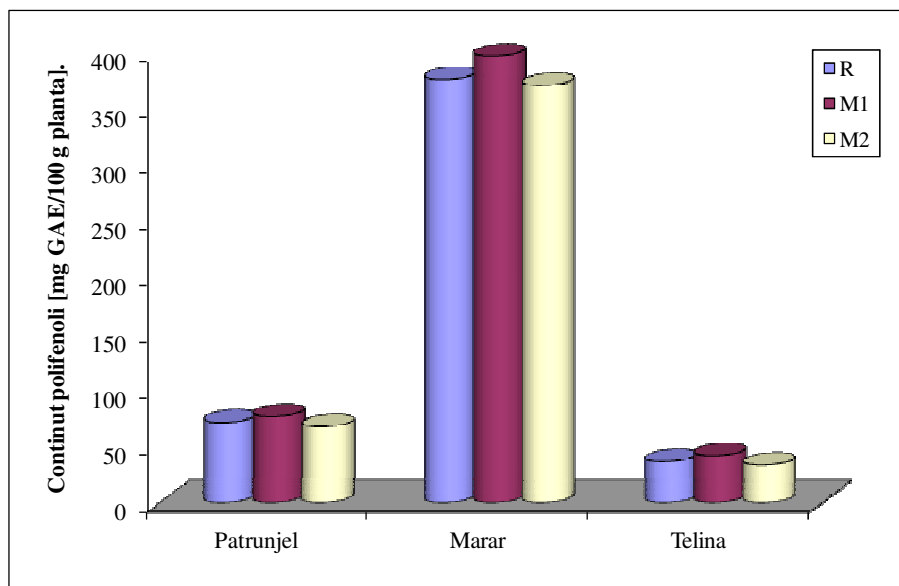
Conținutul de flavonoide totale s-a evaluat prin metoda colorimetrică cu clorură de aluminiu [122]. În Figura 46 s-a reprezentat conținutul în flavonoide, calculat pe baza curbei de etalonare, din extractele hidroalcoolice de pătrunjel, mărar și țelină.



**Figura 46.** Diagrama comparativă a cantității totale de flavonoide (exprimat ca și echivalenți de quercetin QE, adică mg QE/100 g plantă verde) din extractele de pătrunjel, mărar și țelină obținute prin ultrasonare cu sistemul de solvenți etanol:apă = 60:40 (v/v). R-plante control; M1-plante iradiate cu microunde de frecvență GSM; M2-plante iradiate cu microunde de frecvență WLAN.

### 7.5.2. Analiza cantitativă spectrofotometrică a compușilor polifenolici totali

Conținutul de polifenoli totali s-a determinat prin metoda Folin-Ciocalteu după protocolul prezentat de Ivanova și colaboratorii [246]. În Figura 48 s-a reprezentat conținutul în polifenoli totali (exprimat ca și echivalenți de acid galic, adică mg GAE/100 g plantă verde), calculat pe baza curbei de etalonare, din extractele hidroalcoolice de pătrunjel, mărar și țelină.



**Figura 48.** Diagrama comparativă a cantității totale de polifenoli (exprimat ca și echivalenți de acid galic, adică mg GAE/100 g plantă verde) din extractele de pătrunjel, mărar și țelină obținute prin ultrasonare cu etanol:apă = 60:40 (v/v). R-plante control; M1-plante iradiate cu microunde de frecvență GSM; M2-plante iradiate cu microunde de frecvență WLAN.

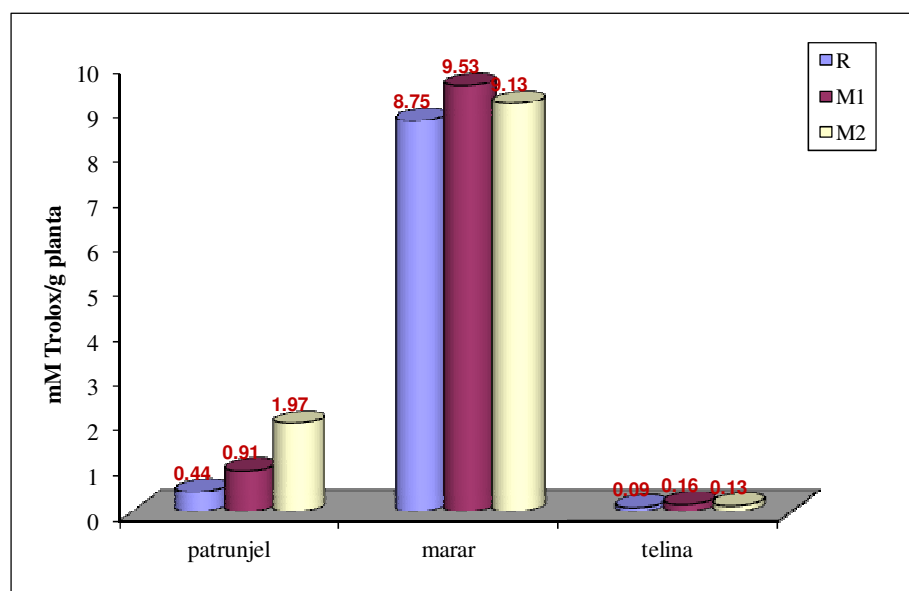
Nu s-au observat diferențe semnificative între cantitățile de compuși polifenolici totali din plantele crescute sub influența microundelor comparativ cu plantele control.

### 7.5.3. Determinarea caracterului antioxidant al extractelor din plantele iradiate și neiradiate prin metoda DPPH

Pentru determinarea caracterului antioxidant al extractelor de pătrunjel, mărar și țelină (plante iradiate cu microunde și plante control) s-a utilizat metoda propusă de Garcia și colaboratorii [248].

În urma rezultatelor experimentale acumulate prin metoda DPPH s-a constatat că extractele hidroalcoolice obținute din plantele iradiate cu microunde au o activitate antioxidantă mai pronunțată decât extractele din plante control (Figura 51).





**Figura 51.** Activitatea antioxidantă a extractelor hidroalcoolice de pătrunjel, mărar și țelină analizate prin metoda DPPH. R-plante control; M1-plante iradiate cu microunde de frecvență GSM; M2-plante iradiate cu microunde de frecvență WLAN.

### 7.7. Analiza ultrastructurală și morfologică a plantelor condimentare studiate

Scopul acestui studiu îl reprezintă analiza efectelor iradierii cu microunde GSM și WLAN la nivelul frunzelor plantelor de pătrunjel, țelină și mărar.

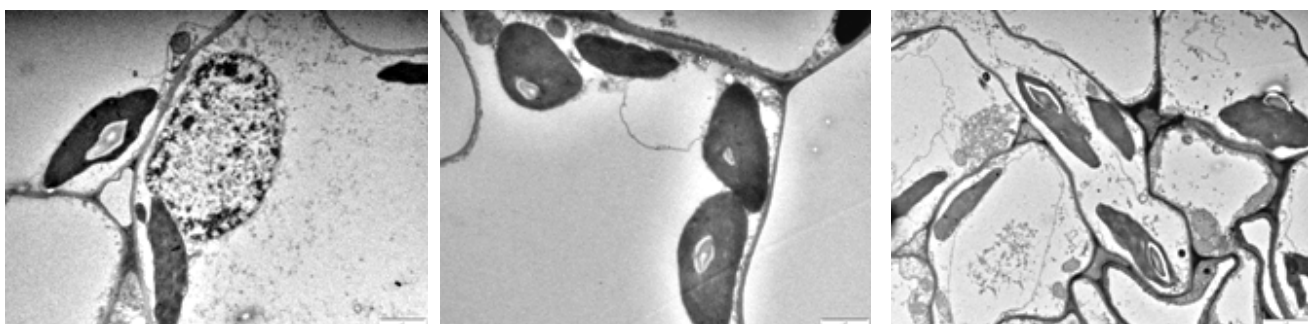
Investigațiile s-au efectuat cu un microscop electronic de transmisie de tip 120 kV TEM model JEM 1010 (Jeol USA Inc., Peabody, MA, USA), dotat cu CCD Camera. Analiza s-a efectuat asupra probelor din plantele luate în studiu, procesate corespunzător, prin fixare în glutaraldehidă și acid osmic, infiltrate și incluse într-o rășină epoxidică de tip Epon 812, secționate (100 nm) cu cuțit de diamant la un ultramicrotom de tip Leica UC6, secțiuni care au fost contrastate cu atomi de U și Pb (soluții de acetat de uraniu și de citrat de plumb). Toate procedurile au fost efectuate în acord cu tehnicile și metodologiile clasice utilizate pentru analize de microscopie electronică de transmisie.

În cazul pătrunjelului, loturile experimentale constau din: R – plante control crescute în camera de referință având aceleași condiții de mediu (PR); M1 – plante iradiate cu microunde de tip GSM (PM1); M2 – plante iradiate cu microunde de tip wireless (PM2). Același model experimental a fost aplicat și pentru țelină (TR și TM1, TM2) și mărar (MR și MM1). Pentru analiza ultrastructurală a frunzelor recoltate de la toate plantele din toate loturile experimentale,

s-a avut în vedere investigarea componentele principale ale limbului foliar, respectiv epidermul superior acoperit de cuticulă, parenchimul palisadic (în celulele sale sunt prezente cele mai multe cloroplaste), țesutul mezofilic aflat în mijlocul limbului foliar, unde sunt cantonate vasele liberiene și cele lemnoase, țesutul lacunar cu celule dispuse rarefiat și având puține cloroplaste, și epidermul inferior [256, 258, 259]. Dintre componentele celulare s-au urmărit în principal organele fotosintetizante, respectiv cloroplastele, organele furnizoare de energie, respectiv mitocondriile, și nucleul ca și coordonator al metabolismului celular.

Analiza imaginilor obținute din frunzele plantelor de pătrunjel iradiate cu frecvență și putere GSM, comparativ cu imaginile loturilor de referință, prezintă următoarele caracteristici ultrastructurale:

- Cloroplastele și-au păstrat ultrastructura și dispunerea normală în celule, (Figura 55a, 55b), dar prezența grăuncioarelor de amidon este mai evidentă, ceea ce sugerează o ușoară intensificare a sintezei acestuia.



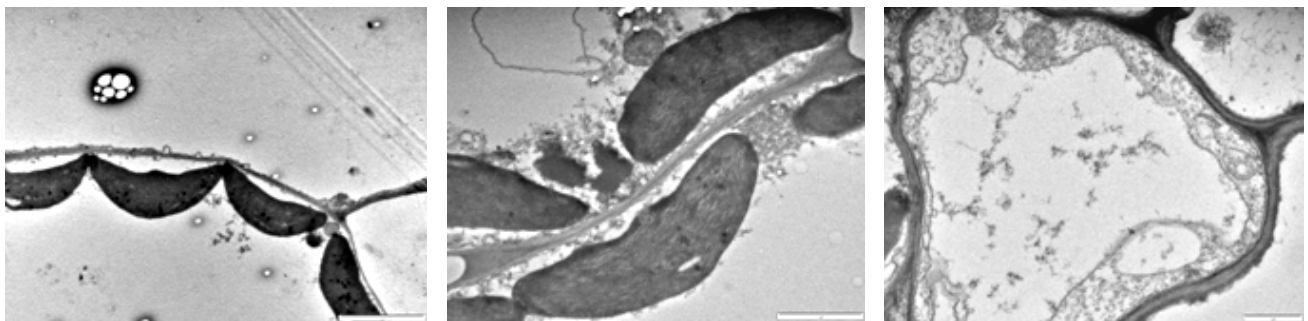
a

b

c

**Figura 55.** Imaginea cloroplastelor pentru: a) PR; b) PM1; c) PM2.

- Mitocondriile au matricea electrodensificată și cristele mitocondriale ușor rarefiate (Figura 56a, 56b), ceea ce sugerează o ușoară scădere a activității lor metabolice.

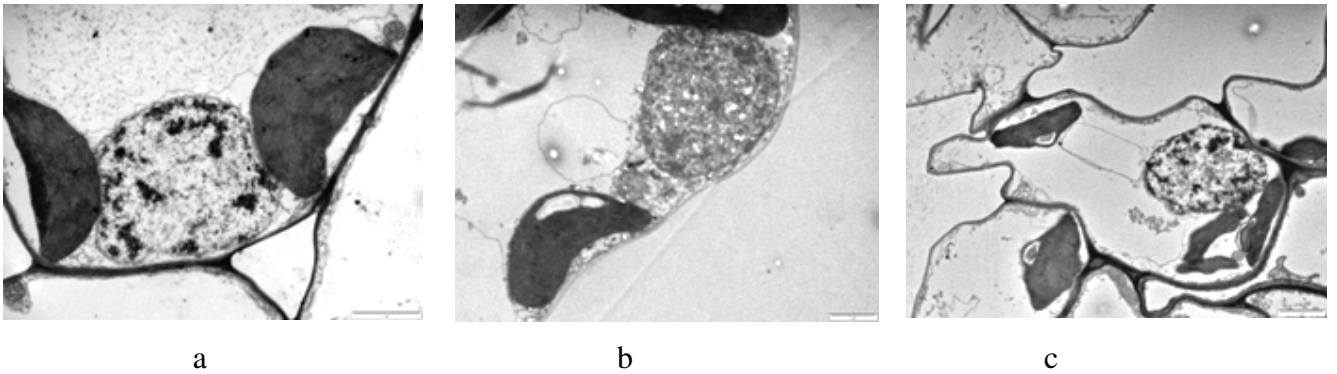


a

b

c

**Figura 56.** Imaginea mitocondriilor pentru: a) PR; b) PM1; c) PM2.



**Figura 57.** Imaginea nucleului celulelor pentru: a) PR; b) PM1; c) PM2.

Microundele GSM cu intensitatea utilizată în experiment, induc relativ ușoare modificări în ultrastructura frunzei de pătrunjel, evidențiate la nivelul pereților celulari, a mitocondriilor, a unor cloroplaste și în special asupra nucleilor unor celule, fără să influențeze în mod semnificativ activitățile metabolice generale ale frunzei.

Analiza imaginilor obținute pe lotul de pătrunjel iradiat cu microunde de intensitate și putere WLAN subliniază faptul că efectele negative incipiente prezentate la lotul M1, apar intensificate și cu alterări evidente. Astfel:

- Cloroplastele sunt în număr mai mic, majoritatea nu mai au forma clasică de corn și toate posedă câte un grăuncior de amidon (Figura 55c), ceea ce sugerează acumularea de rezerve energetice ca protecție împotriva stresului provocat de microundele wireless de frecvență înaltă.
- Mitocondriile au matricea și cristele rarefiate, prezintă semne de alterare (Figura 56c).
- Nucleii au structură aparent normală, dar cu heterocromatină mai multă ca la normal, și contur ușor neregulat. La unele celule nucleii au structura alterată, fără evidențierea distinctă în cariolimfă a eucromatinei și heterocromatinei (Figura 57c).

În concluzie, comparând efectele acțiunii celor două tipuri de microunde asupra ultrastructurii celulelor frunzelor plantelor luate în studiu, se poate afirma faptul că microundele wireless (WLAN) utilizate în experiment induc modificări negative semnificativ mai mari decât cele constatate în cazul aplicării microundelor GSM. *Apium graveolens* (țelina) s-a dovedit a fi cea mai rezistentă (tolerantă) specie la microunde, din punct de vedere anatomic, pe când *Anethum graveolens* (mărarul) a fost cea mai afectată din acest punct de vedere (Tabelul 13).

**Tabel 13.** Analiza ultrastructurală a frunzelor plantelor studiate.

Condiții de creștere	Grosimea peretelui celular (μm)	Lungimea cloroplastei (μm)	Aria cloroplastei (μm <sup>2</sup> )	Lungimea mitocondriei (μm)	Raportul dintre aria grăuntelui de amidon și aria cloroplastei (%)
<i>Petroselinum crispum</i>					
Control	0,300 ± 0,07	6,78 ± 0,12	13,31 ± 0,22	1,00 ± 0,27	8,93 ± 0,13
GSM	0,250 ± 0,06	6,76 ± 0,28	8,491 ± 0,06	0,90 ± 0,13	9,99 ± 0,12
WLAN	0,200 ± 0,05	6,50 ± 0,16	7,807 ± 0,11	0,70 ± 0,05	6,01 ± 0,08
<i>Apium graveolens</i>					
Control	0,187 ± 0,01	5,90 ± 0,13	8,43 ± 0,23	1,68 ± 0,13	5,21 ± 0,13
GSM	0,175 ± 0,01	5,20 ± 0,17	8,08 ± 0,29	1,00 ± 0,25	8,13 ± 0,08
WLAN	0,175 ± 0,01	4,85 ± 0,31	7,04 ± 0,22	0,80 ± 0,10	0
<i>Anethum graveolens</i>					
Control	0,160 ± 0,01	5,80 ± 0,20	7,68 ± 0,14	1,57 ± 0,08	5,34 ± 0,28
GSM	0,156 ± 0,01	4,33 ± 0,26	7,06 ± 0,35	0,55 ± 0,13	0
WLAN	0,136 ± 0,01	3,33 ± 0,26	6,68 ± 0,14	0,25 ± 0,13	0

±SE pentru șase măsurători succesive.

## CONCLUZII

Teza de doctorat a avut ca obiectiv principal determinarea efectului microundelor în bandă de frecvență GSM (telefonie mobilă) și respectiv, WLAN (wireless), asupra compușilor bioactivi din compoziția a trei plante aromatice aparținând familiei Apiaceae: *Petroselinum crispum* (pătrunjel), *Anethum graveolens* (mărar) și *Apium graveolens* (țelină).

În urma studiilor efectuate s-au constatat următoarele:

- În funcție de solventul și tehnica de extracție utilizată se extrag diferite clase de compuși bioactivi, în diferite cantități.
- Cea mai eficientă metodă pentru extracția uleiurilor volatile din pătrunjel, mărar și țelină s-a determinat a fi ultrasonarea cu sistemul de solvenți *n*-hexan – dietil eter (1:1, v/v).
- Extracția eficientă a acidului L-ascorbic s-a realizat prin ultrasonare cu soluție apoasă de acid acetic 8%.
- În cazul plantelor luate în studiu, ultrasonarea cu sistemul de solvenți alcool etilic – apă (60:40, v/v) s-a utilizat pentru extracția compușilor polifenolici, dovedindu-se cea mai eficientă.
- S-a stabilit că modificarea condițiilor de creștere a plantelor prin introducerea acestora în câmp de microunde cu diferite intensități (GSM și wireless) a influențat atât dezvoltarea plantelor, cât și conținutul de compuși biologic activi investigați.
- Pe baza analizelor HPLC, s-a constatat că cea mai mare creștere a cantității de *acid L-ascorbic*, s-a înregistrat în cazul țelinei iradiate cu microunde de tip GSM (211%), iar cea mai mică creștere a cantității aceluiași compus s-a înregistrat în cazul pătrunjelului iradiat cu microunde de tip WLAN (6,8%).
- Analiza *uleiurilor volatile*, efectuată prin GC-MS, a evidențiat că, conținutul acestora a crescut în plantele iradiate cu microunde de frecvență GSM, în timp ce efectul microundelor cu frecvență WLAN a fost variabil, în funcție de planta analizată. Cele mai puternice efecte ale microundelor s-au observat în cazul uleiurilor volatile din mărar.
- Cantitatea totală de *compuși organici volatili* (capturați din respirația plantelor) eliberați de către pătrunjel și mărar ca urmare a acțiunii microundelor, a fost considerabil mai mare decât în țelină, deoarece așa cum s-a observat și în cazul uleiurilor volatile din această plantă, țelina a fost mai puțin sensibilă la acțiunea microundelor decât pătrunjelul și mărarul.

Toate cele trei specii de plante iradiate cu microunde au eliberat compuși volatili (*E*)-2-hexenal, (*Z*)-3-hexenol, 1-hexanol, în timp ce în cazul plantelor control emisiile de compuși organici volatili au avut nivele foarte scăzute. S-a constatat că în plantele de mărar emisiile de (*E*)- $\beta$ -ocimen și 1,8-cineol au fost puternic mărite ca urmare a iradierii cu microunde; atât plantele de pătrunjel, cât și cele de mărar, au emis sub influența radiațiilor de frecvență WLAN cantități mici de longiciclenă (o sesquiterpenă emisă de plante în condiții induse de stres).

- Cantitatea de *compuși polifenolici totali*, determinată spectrofotometric, nu a înregistrat variații semnificative în plantele iradiate față de cele neiradiate.

- În urma analizei prin metoda DPPH, s-a determinat că extractele hidroalcoolice obținute din plantele iradiate au o activitate antioxidantă mai ridicată decât extractele hidroalcoolice din plante de referință.

- Studiile RES au evidențiat scăderea cantității de radicali liberi în plantele iradiate cu microunde GSM și WLAN comparativ cu plantele control, la trei săptămâni după iradiere.

- *Analiza ultrastructurală* (TEM) a frunzelor recoltate de la plantele loturilor experimentale a avut în vedere investigarea componentelor principale ale limbului foliar (epidermul superior, parenchimul palisadic, țesutul mezofilic, țesutul lacunar, epidermul inferior), iar dintre componentele celulare în principal organele fotosintetizante (cloroplastele), organele furnizoare de energie (mitocondriile) și coordonatorul metabolismului celular (nucleul). Comparând efectele acțiunii celor două tipuri de microunde asupra ultrastructurii celulelor frunzelor plantelor luate în studiu, s-a concluzionat că microundele WLAN induc modificări negative semnificativ mai mari decât cele constatate în cazul aplicării microundelor GSM. Țelina s-a dovedit a fi cea mai rezistentă specie din punct de vedere anatomic la acțiunea microundelor, pe când mărarul a fost cea mai afectată specie din acest punct de vedere.

- Analizele de determinare a compoziției izotopice a carbonului ( $\delta^{13}\text{C}$ ) au evidențiat creșterea compoziției izotopice în țelină la iradierea GSM, pe când în plantele de pătrunjel nu s-au înregistrat modificări semnificative ale compoziției izotopice comparativ cu plantele control.

- În cazul studiilor efectuate, cel mai mare efect asupra dezvoltării plantelor l-a avut radiația electromagnetică de tip wireless.

- Cantitatea de acid L-ascorbic, și respectiv de uleiuri volatile, a fost cea mai afectată în urma acțiunii microundelor.

• Observațiile experimentale prezentate în cadrul acestei lucrări sugerează în mod colectiv că iradierea cu microunde constituie un factor de stres asupra plantelor, având ca efect generarea de emisii mărite de compuși organici volatili, modificări ale conținutului de compuși bioactivi și ale anatomiei plantelor.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

2. J.A. Bunce, *J. Exp. Bot.*, 42, **1991**, 853-859.
3. M.M. Caldwell, A.H. Teramura, M. Tevini, J.F. Bornman, L.O. Björn, G. Kulandaivelu, *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 24, **1995**, 166-173.
4. L. Copolovici, A. Kännaste, L. Pazouki, Ü. Niinemets, *J. Plant Physiol.*, 169, **2012**, 664-672.
5. E.H. Lee, *Chronobiol. Int.*, 8, **1991**, 93-102.
6. H. Šircelj, F. Batič, F. Štampar, *Phyton-Ann. Rei. Bot. A.*, 39, **1999**, 97-100.
7. A. Vashisth, S. Nagarajan, *Bioelectromagnetics*, 29, **2008**, 571-578.
8. A.C. Schuerger, J.T. Richards., *Int. J. Astrobiol.*, 5, **2006**, 151-169.
9. Y.P. Chen, *Photochem. Photobiol.*, 82, **2006**, 503-507.
12. A. Balmori Martínez, The effects of microwaves on the trees and other plants. **2003** (Valladolid: Spain). Available online at buergerwelle.de.
52. F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, *Food Chem. Toxicol.*, 46, **2008**, 446-475.
122. Farmacopeea Română, ed. a X-a, Ed. Medicală, București, **1993**.
126. D.L. Luthria, S. Mukhopadhyay, A.L. Kwansa, *J. Sci. Food Agric.*, 86, **2006**, 1350-1358.
144. L. Copolovici, A. Kännaste, Ü. Niinemets, *Studia Universitatis Babeș-Bolyai Chemia*, 54, **2009**, 329-339.
161. W.M. Langlille, K.S. MacLean, *Plant Soil*, 45, **1976**, 17-26.
165. D. Zabarar, R.N. Spooner-Hart, S.G. Wyllie, *Biochem. Syst. Ecol.*, 30, **2002**, 399-412.
209. W. Letchamo, A. Gosselin, *J. Hort. Sci.*, 71, **1996**, 123-134.

211. **M. Stan**, M.L. Soran, C. Varodi, I. Lung, L. Copolovici, C. Măruțoiu, *AIP Conf. Proc.*, 1565, **2013**, 75-78.
213. **M. Stan**, I. Lung, O. Opreș, M.L. Soran, *J. Planar Chromatogr.*, 27(1), **2014**, 33-37.
221. **M. Stan**, M.L. Soran, C. Marutoiu, “Extraction and HPLC determination of the ascorbic acid content of three indigenous spice plants”, *J. Anal. Chem.*, issue: “Analysis of pharmaceutical”, 69(10), **2014** (acceptat spre publicare).
229. **M. Stan**, M.L. Soran, C. Varodi, I. Lung, *AIP Conf. Proc.*, 1425, **2012**, 50-52.
231. E. Surducă, V. Surducă, A. Halmagyi, Romanian Patent RO-125068B1, **2012**.
232. **M. Stan**, O. Opreș, I. Lung, M.L. Soran, *J. Planar Chromatogr.*, 27(2), **2014**, 97-101.
237. Ü. Niinemets, R.K. Monson, A. Arneth, P. Ciccioli, J. Kesselmeier, U. Kuhn, S.M. Noe, J. Peñuelas, M. Staudt, *Biogeosciences*, 7, **2010**, 1809-1832.
240. M. Staudt, N. Bertin, *Plant Cell Environ.*, 21, **1998**, 385-395.
241. **M. Stan**, M.L. Soran, C. Varodi, I. Lung, *Studia Universitatis “Babes-Bolyai” Chemia*, LIX, 1, **2014**, 125-133.
246. V. Ivanova, M. Stefova, F. Chinnici, *J. Serb. Chem. Soc.*, 75, **2010**, 45-59.
248. E.J. Garcia, T.L.C. Oldoni, S.M. de Alencar, A. Reis, A.D. Loguercio, R.H.M. Grande, *Braz. Dent. J.*, 23, **2012**, 22-27.
256. M. Pavelka, J. Roth, Functional ultrastructure. Atlas of tissue biology and pathology. Springer, Wien – New York, **2005**.
258. C. Crăciun, A. Florea, N. Dragoș, A. Ardelean, Introduction to Cell and Molecular Biology, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, **2001**.
259. C. Crăciun, Citologie Generală, Ediția a 4-a, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, **2012**.



## LISTA DE LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE ELABORATE

### A. Lucrări publicate pe tematica abordată

1. Extraction and HPLC determination of the ascorbic acid content of three indigenous spice plants  
**M. Stan**, M.L. Soran, C. Măruțoiu  
*Journal of Analytical Chemistry*, issue: "Analysis of pharmaceutical", 69(10), **2014** (acceptat spre publicare).
2. Influence of microwave field on the ascorbic acid content in leaves of some common aromatic plants in Romania  
**M. Stan**, M.L. Soran, C. Varodi, I. Lung  
*Studia Universitatis "Babes-Bolyai" Chemia*, LIX, 1, **2014**, 125-133.
3. HPTLC quantification of some essential oils from *Anethum graveolens* extracts  
**M. Stan**, I. Lung, O. Opreș, M.L. Soran  
*Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 27(1), **2014**, 33-37.
4. HPTLC quantification of myristicin and linalool from leaf extracts of microwave-irradiated parsley, dill and celery  
**M. Stan**, O. Opreș, I. Lung, M.L. Soran  
*Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 27(2), **2014**, 97-101.
5. Extraction and identification of flavonoids from parsley extracts by HPLC analysis  
**M. Stan**, M.L. Soran, C. Varodi, I. Lung  
*AIP Conference Proceedings*, 1425, **2012**, 50-52.
6. Extraction and GC determination of volatile aroma compounds from extracts of three plant species of the Apiaceae family  
**M. Stan**, M.L. Soran, C. Varodi, I. Lung, L. Copolovici, C. Măruțoiu  
*AIP Conference Proceedings*, 1565, **2013**, 75-78.
7. Quantification of myristicin and linalool in some microwave-stressed aromatic plants using high performance liquid chromatography – diode array detection  
I. Lung, **M. Stan**, O. Opreș, M.L. Soran  
*Analytical Letters* (trimis spre publicare).

8. Influence of microwave frequency electromagnetic radiation on terpene emission and content in aromatic plants

M.L. Soran, **M. Stan**, Ü. Niinemets, L. Copolovici

*Journal of Plant Physiology* (acceptat spre publicare).

**B. Lucrări publicate în rezumat la conferințe și simpozioane internaționale pe tematica abordată**

1. Determination of dill essential oil composition using modern extraction techniques

**M. Stan**, M.L. Soran, C. Varodi, I. Lung

5-th Conference on Chemistry and Life, 14 - 16 septembrie, **2011**, Brno, Cehia.

2. Identification of flavonoids from parsley extracts by HPLC analysis

**M. Stan**, M.L. Soran, C. Varodi, I. Lung

8-th International Conference Processes in Isotopes and Molecules PIM-2011, 29 septembrie - 01 octombrie, **2011**, Cluj-Napoca, România.

3. Determination of vitamin C in parsley grown in the microwave field

M.L. Soran, **M. Stan**, C. Varodi, I. Lung, C. Tudoran, M.R.C. Trușcă

1<sup>st</sup> International Congress of Environmental Science and Technology

1<sup>st</sup> National Congress of the Argentinean Society of Environmental Sciences and Technologies, 28 mai - 01 iunie, **2012**, Mar del Plata, Argentina.

4. Chromatographic identification and determination of essential oils from some indigenous spice plants

**M. Stan**, I. Lung, M.L. Soran, C. Varodi, C. Măruțoiu

2<sup>nd</sup> International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences, "IC-ANMBES 2012", 24 - 27 mai, **2012**, Brașov, România.

5. Vitamin C from indigenous plants - extraction and electrochemical detection

C. Varodi, **M. Stan**, M.L. Soran, L.M. Mureșan

2<sup>nd</sup> International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences, "IC-ANMBES 2012", 24 - 27 mai, **2012**, Brașov, România.

6. GC-FID determination of essential oils from parsley extracts obtained by different extraction techniques

- I. Lung, M.L. Soran, **M. Stan**, C. Varodi  
2<sup>nd</sup> International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences, “IC-ANMBES 2012”, 24 - 27 mai, **2012**, Braşov, România.
7. HPLC determination of vitamin C from indigenous parsley extracts obtained by different extraction techniques  
M.L. Soran, **M. Stan**, I. Lung, M.R.C. Truşcă  
7-th Conference on Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems”, 1 - 7 iulie, **2012**, Ohrid, Macedonia.
8. Determination of essential oils from *Anethum graveolens* L. by thin layer chromatography  
**M. Stan**, I. Lung, M.L. Soran  
The First Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, MESMAP-2013, 17 - 20 aprilie, **2013**, Gazimagosa (Famagusta), Republica Turcă a Ciprului de Nord.
9. Determination of essential oils from three Romanian aromatic herbs using thin layer chromatography  
M.L. Soran, **M. Stan**, I. Lung  
The First Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, MESMAP-2013, 17 - 20 aprilie, **2013**, Gazimagosa (Famagusta), Republica Turcă a Ciprului de Nord.
10. Extraction and determination of essential oils from celery using modern techniques  
I. Lung, **M. Stan**, M.L. Soran  
The First Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, MESMAP-2013, 17 - 20 aprilie, **2013**, Gazimagosa (Famagusta), Republica Turcă a Ciprului de Nord.
11. The influence of microwave field on vitamin C from indigenous seasoning plants  
M.L. Soran, **M. Stan**, I. Lung, C. Varodi  
International Congress on Energy Efficiency and Energy Related Materials, 9 - 12 octombrie, **2013**, Kemer, Turcia.
12. Extraction and gas chromatographic determination of essential oils from three plant species of the Apiaceae family  
**M. Stan**, M.L. Soran, C. Varodi, I. Lung, L. Copolovici, C. Măruţoiu  
9-th International Conference “Processes in Isotopes and Molecules” PIM-2013, 25 - 27 septembrie, **2013**, Cluj-Napoca, România.

13. Quantification of ascorbic acid in parsley, dill and celery from Romania  
M.L. Soran, **M. Stan**, I. Lung, O. Opreș  
9-th International Conference “Processes in Isotopes and Molecules” PIM-2013, 25 - 27 septembrie, **2013**, Cluj-Napoca, România.
14. Separation and identification of volatile compounds from *Petroselinum crispum* L. by thin layer chromatography  
I. Lung, **M. Stan**, M.L. Soran, O. Opreș  
9-th International Conference “Processes in Isotopes and Molecules” PIM-2013, 25 - 27 septembrie, **2013**, Cluj-Napoca, România.
15. Myristicin and linalool content variation in microwave stressed aromatic plants  
I. Lung, M.L. Soran, **M. Stan**, O. Opreș  
XVI YUCORR, Meeting Point of the Science and Practice in the Fields of Corrosion, Materials and Environmental Protection, 23 - 26 iunie, **2014**, Tara Mountain, Serbia.
16. Effect of microwave field on total polyphenol and antioxidant activity of dill  
I. Lung, M.L. Soran, **M. Stan**  
XVI YUCORR, Meeting Point of the Science and Practice in the Fields of Corrosion, Materials and Environmental Protection, 23 - 26 iunie, **2014**, Tara Mountain, Serbia.
17. Microwave fields effect on the essential oils from some aromatic plants  
M.L. Soran, **M. Stan**, I. Lung, L. Copolovici, M.R.C. Trușcă  
XVI YUCORR, Meeting Point of the Science and Practice in the Fields of Corrosion, Materials and Environmental Protection, 23 - 26 iunie, **2014**, Tara Mountain, Serbia.
18. The influence of microwave fields on volatile organic compounds emissions of some common aromatic plants in Romania  
**M. Stan**, M.L. Soran, I. Lung, L. Copolovici  
XVI YUCORR, Meeting Point of the Science and Practice in the Fields of Corrosion, Materials and Environmental Protection, 23 - 26 iunie, **2014**, Tara Mountain, Serbia.