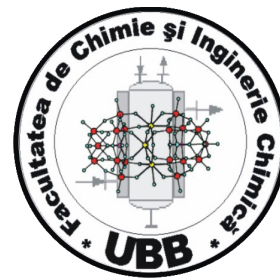




Universitatea Babeş Bolyai
Facultatea de Chimie și
Inginerie Chimică



Ileana Maria SIMION

Teză de doctorat

**Caracterizarea și amprentarea extractelor din
plante medicinale (suplimente alimentare) de pe
teritoriul României**

Rezumat

Conducător științific
Prof. Emerit Costel SÂRBU

CUPRINS

(corespunzător tezei de doctorat)

Introducere

CAPITOLUL I – UNIVERSUL PLANTELOR MEDICINALE	7
1.1. Flora României și plantele medicinale	7
1.2. Compoziția plantelor medicinale	10
1.3. Efectele terapeutice ale plantelor medicinale	12
CAPITOLUL II – METODE DE ANALIZĂ FOLOSITE PENTRU CARACTERIZAREA ȘI CLASIFICAREA PLANTELOR MEDICINALE	13
2.1. Metode spectroscopice	13
2.1.1. Tranziții între nivelele energetice în spectroscopie	14
2.1.3. Spectroscopia UV-Viz	15
2.1.4. Alte metode spectroscopice	16
2.2. Metode cromatografice	19
2.2.1. Cromatografia pe strat subțire (Thin layer chromatography-TLC)	19
2.2.2. Cromatografia de lichide de înaltă performanță (High Performance Liquid Chromatography-HPLC)	21
2.2.3. Alte metode cromatografice	22
2.3. Alte metode	24
CAPITOLUL III – METODE DE DETERMINARE A CAPACITĂȚII ANTIOXIDANTE	25
3.1. Metode bazate pe transfer de hidrogen	26
3.2. Metode bazate pe transfer de electroni	26
3.3. Metode de determinare a activității antioxidante	27
3.3.1. Metoda ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)	28
3.3.2. Metoda TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter)	29
3.3.3. Metoda TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)	29
3.3.4. Metoda DPPH (2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)	29
3.3.5. Metoda CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity)	30
3.3.6. Metoda ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-acid sulfonic))	30
3.3.7. Metoda Folin-Ciocalteu	31
3.3.8. Metoda FRAP (Ferric Reduction Antioxidant Power)	31
3.3.9. Metoda TOSC (Total Oxidant Scavenging Capacity)	32

3.3.10. Chemiluminescența (Chemiluminescence - CL).....	32
3.3.11. Fotochemiluminescența (Photochemiluminescence - PCL)	33
3.3.12. Metoda de Decolorare Croton/ β - caroten (Croton/ β - carotene bleaching)	33
3.3.13. Lipoproteine de densitate mică (Low Density – Lipoprotein - LDL).....	33
3.3.14. Metoda CHROMAC (Chromium Reducing Antioxidant Capacity).....	34
3.3.15. Capacitatea pro-oxidantă.....	34
3.3.16. Metoda de determinare a capacității antioxidante cu apă oxigenată (Peroxide Scavenging).....	34
3.3.17. Metoda CERAC (Ceric Ion Reducing Antioxidant Capacity).....	35
3.3.18. Metoda HAPEX (Inhibition of Haemoglobin Ascorbate Peroxidase Activity).....	35
3.3.19. Metoda bazată pe inhibarea peroxidării induse de lipozomi (Lipozomi Peroxidation).....	36
3.3.20. Metoda cu oxid de azot (Nitric Oxide Scavenging Activity-NO).....	36
3.3.21. Metoda cu superoxid (Superoxide Radical Scavenging Activity-SORS).....	36
CAPITOLUL IV – METODELE CHEMOMETRICE.....	38
4.1. Introducere–analiza multivariată a datelor	38
4.2. Preprocesarea datelor	39
4.2.1. Standardizarea	40
4.2.2. Normalizarea	41
4.2.2.1. Normalizarea Min-Max.....	41
4.2.2.2. Normalizarea z-score	41
4.2.2.3. Scalarea zecimală	41
4.2.3. Derivatizarea	41
4.3. Analiza componentelor principale	42
4.4. Analiza clusterilor	44
4.5. Analiza liniar discriminantă	46
4.6. Metode fuzzy.....	48
4.7. Obiectivele tezei de doctorat	51
CAPITOLUL V – REZULTATE ORIGINALE.....	52
5.1. Plantele medicinale studiate	52
5.2. Clasificarea extractelor de plante medicinale în funcție de încrengătură.....	59
5.2.1. Spectrometria UV-Viz.....	60
5.2.1.1. Materiale și metode	60
5.2.1.2. Rezultate și discuții	63
5.2.2. Cromatografia pe strat subțire (Thin Layer Chromatography - TLC)	71
5.2.2.1. Materiale și metode	71

5.2.2.2. Rezultate și discuții	80
5.3. Clasificarea plantelor medicinale în funcție de efectele terapeutice	84
5.3.1. Spectrometria UV-Viz.....	85
5.3.1.1. Materiale și metode	85
5.3.1.2. Rezultate și discuții	86
5.3.2. Cromatografia pe strat subțire	89
5.3.2.1. Materiale și metode	89
5.3.2.1. Rezultate și discuții	890
5.4. Clasificarea plantelor medicinale în funcție de activitatea antioxidantă.....	99
5.4.1. Cromatografia pe strat subțire (Thin Layer Chromatography - TLC)	100
5.4.1.1. Materiale și metode	100
5.4.1.2. Rezultate și discuții	101
5.4.2. Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC).....	106
5.4.2.1. Materiale și metode	106
5.4.2.2. Rezultate și discuții	110
CAPITOLUL VI – CONCLUZII.....	141
BIBLIOGRAFIE	145
Anexa 4. Lista publicațiilor originale și participarea la conferințe internaționale	157
Anexa 2. Lista abrevierilor.....	158

Cuvinte cheie: plante medicinale, cromatografie, analiza imaginii, metode chemometrice, capacitate antioxidantă, efecte terapeutice, încrângătură, preprocesarea datelor, specrometrie

Introducere

Natura a fost întotdeauna implicată în viața umană, oferind mijloacele necesare pentru a trăi o viață sănătoasă și fără griji, prin prezența resurselor naturale, cum ar fi fructele, legumele sau chiar plantele. Medicina alternativă, folosește produsele oferite de natură (plante) pentru a preveni sau chiar a vindeca diferite boli.

Plantele medicinale sunt utilizate ca metode de tratare datorită faptului că sunt ieftine, mai puțin toxice și lipsite de efecte secundare în comparație cu medicamentele sintetizate chimic. Efectul terapeutic al fiecărei plante este datorat compușilor bioactivi produși ca urmare a metabolismului secundar. Datorită așa-numiților metaboliți secundari reprezentați de alcaloizi, steroli, terpene, flavonoide, taninuri, glicozide, rășini, uleiuri volatile etc., medicina alternativă a început să joace un rol important în tratamentul bolilor din întreaga lume, mai ales pentru că în multe țări subdezvoltate sistemul medical este încă inexistent.

Având în vedere cele menționate mai sus, Organizația Mondială a Sănătății (WHO) a elaborat un plan strategic pentru promovarea medicinei alternative prin publicarea a patru volume care conțin 118 monografii privind plantele medicinale.

Obiectivul tezei intitulată „Caracterizarea și amprentarea extractelor din plante medicinale (suplimentelor alimentare) de pe teritoriul României” este utilizarea diferitelor metode chemometrice pe datele obținute prin diverse metode analitice (UV-Viz, cromatografia pe strat subțire, HPLC). Probele analizate (42) sunt disponibile comercial (extracte hidroalcoolice din plante medicinale), scopul principal al acestui studiu fiind caracterizarea și clasificarea acelor plante medicinale.

Teza este structurată în șase capitole, primele patru capitole conțin informații introductive despre plante și flora românească, precum și informații despre metodele chimometrice și analitice utilizate în acest studiu. Capitolul cinci și șase prezintă rezultatele experimentale și concluziile studiului.

Rezultatele acestei cercetări își propun să aducă o contribuție la dezvoltarea studiului plantelor medicinale prin utilizarea diferitelor metode analitice și încurajarea populației de a alege o alternativă mai sănătoasă în ceea ce privește alimentația.

Capitolul I – Universul plantelor medicinale

1.1. Flora României și plantele medicinale

Organizația mondială a sănătății (World Health Organization – WHO) definește plantele medicinale ca fiind acele plante ce conțin compuși care pot fi folosiți în scop terapeutic sau plante care sintetizează metaboliți folosiți în scopul obținerii de medicamente ¹. Plantele se împart în două mari categorii: condimente și ierburi. Ierburile reprezintă partea verde proaspătă din plantă în timp ce condimentele reprezintă florile, fructele, semințele, bulbii sau rădăcinile, părțile din plantă care produc „arome” mult mai puternice spre deosebire de ierburi ².

Date istorice referitoare la folosirea ierburilor și a condimentelor sunt menționate încă din anul 1550 înainte de Hristos. În prezent, folosirea ierburilor și a condimentelor, într-un singur cuvânt a plantelor, este condiționată de respectarea unor reglementări stabilite de către instituții autorizate cum sunt WHO sau Administrația alimentelor și a medicamentelor (Food and Drug Administration – FDA).

Conform unui studiu realizat de Maarten și James în anul 2016, era cunoscut și acceptat un număr de 374000 de specii de plante dintre care aproximativ 308312 sunt plante superioare, iar 295383 plante cu flori.

Pe teritoriul României, se cunosc peste 3600 de specii de plante, număr care reprezintă aproximativ 30% din întreaga floră a Europei ¹⁰. În urma unui studiu realizat de către Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale (MADR), în anul 2002, au fost înregistrate 29 de specii de plante omologate la care se adaugă 24 de specii preluate din flora spontană și 10 aclimatizate la condițiile de mediu de pe teritoriul țării noastre. Deși de-a lungul perioadei 1980-1990 România se clasa printre primele cinci țări exportatoare de plante medicinale, în prezent acest sector este slab exploatat ¹¹. În ultimii ani, lucrurile au îmbunătățit multe cercetări făcute în zona plantelor medicinale ^{5,6}.

2.1 Compoziția plantelor medicinale

Compușii bioactivi sunt ingrediente funcționale care apar în natură, fac parte din lanțul alimentar și pot contribui la îmbunătățirea calității produselor alimentare ¹³. Dintre proprietățile benefice specifice, amintim activitatea antioxidantă, inhibarea enzimelor, inhibarea activității

receptorilor și inhibarea expresiei genetice. Compușii bioactivi se găsesc în fructe, legume sau plante medicinale ¹⁴.

În cazul plantelor medicinale, în interiorul celulelor plantelor au loc diferite procese în urma cărora rezultă două tipuri de metaboliți: primari și secundari. Metaboliții primari sunt produși în urma procesului de fotosinteză și sunt responsabili de creșterea și metabolismul plantelor. Pe de altă parte, metaboliții secundari sunt produși ai metaboliților primari, care nu au rol în procesele metabolice ale plantelor. Aceștia mai sunt cunoscuți și sub denumirea de principii active/compuși bioactivi, și, printre altele, sunt responsabili de efectele benefice resimțite de către organismele vi. Principalele clase de compuși care se găsesc în plantele medicinale sunt fenoli, glucide, terpene, uleiuri volatile etc ^{9,10}.

1.2. Efectele terapeutice ale plantelor medicinale

Farmacognozia este știința care se ocupă cu studiul produselor derivate din plante medicinale și a otrăvurilor și cuprinde analiza tuturor tipurilor de plante medicinale inclusiv amestecurile complexe, folosite sub formă brută sau ca extracte (fitoterapie), compuși puri (morfină), și alimente cu efecte benefice asupra sănătății (nutraceutice). Plantele medicinale sunt considerate punctul bază al medicinei tradiționale alternative. Fitoterapia este știința care presupune folosirea plantelor în tratarea și ameliorarea diferitelor boli. Etnobotanica și etnofarmacologia sunt domenii care studiază exclusiv cunoștințele dobândite de către băștinași legate de folosirea plantelor medicinale și potențialele efecte benefice pe care le au, dar și toxicitatea asociată riscului folosirii acestora drept „medicamente”. În etnofarmacologie, un aspect important este îmbunătățirea preparatelor obținute din ierburi medicinale. De aceea, este esențială cunoașterea compușilor bioactivi din aceste plante și efectele lor terapeutice ¹⁸.

În funcție de compoziția chimică (compuși bioactivi), plantele medicinale prezintă efecte terapeutice diverse, de la plante medicinale folosite pentru tratarea bolilor neurodegenerative (Alzheimer), de exemplu ²¹, până la tratarea diferitor afecțiuni ale pielii (arsuri) ²². De aceea pentru a promova și informa populația cu privire la părțile de plantă utilizate, modul de administrare și folosire, astăzi un număr mare de cărți/enciclopedii, care descriu aceste aspecte sunt disponibile publicului larg (Ghidul plantelor medicinale de la A la Z, Dicționarul plantelor medicinale, Plante medicinale și aromatice, etc) ^{20,23,24}.

Capitolul II – Metode de analiză folosite pentru caracterizarea și clasificarea plantelor medicinale

2.1. Metode spectroscopice

Spectroscopia se ocupă cu obținerea, măsurarea și interpretarea spectrelor rezultate în urma interacțiunii radiației electromagnetice cu materia. Sunt disponibile numeroase metode spectroscopice dedicate rezolvării unei game largi de probleme analitice. Aceste metode diferă între ele în funcție de speciile analizate (spectroscopia atomică sau moleculară), tipul de interacțiune al radiației cu materia (absorbție, emisie sau difracție) și, nu în ultimul rând, în funcție de regiunea spectrului electromagnetic folosit în analiză. Metodele spectroscopice sunt deosebit de informative, putând fi folosite atât pentru determinări cantitative, cât și calitative. Spectroscopia bazată pe absorbția sau emisia radiației în domeniile ultraviolet (UV), vizibil (Viz), infraroșu (IR) și radio (rezonanța magnetică nucleară – RMN) este printre cele mai folosite metode în laboratoarele dedicate analizei plantelor și preparatelor din plante/suplimente ²⁵⁻²⁸.

2.2. Metode cromatografice

Cromatografia este un termen general aplicat unei mari varietăți de tehnici de separare bazate pe repartiția sau distribuția repetată a analitului (solut) între o fază mobilă și o fază fixă sau staționară. Interacțiunea relativă a unui solut cu aceste două faze este descrisă de coeficientul de partiție (K) sau de distribuție (D) (raportul dintre concentrația solutului în faza staționară și concentrația solutului în faza mobilă). Faza mobilă poate fi fie un gaz (GC), fie un lichid (LC) sau un fluid supercritic (SFC). Faza staționară poate fi un solid sau, de obicei, un lichid ²⁵⁻²⁹.

Metodele cromatografice cele mai utilizate pentru a analiza plantele medicinale sunt cromatografia pe strat subțire- TLC cromatografia de lichide de înaltă performanță - HPLC și cromatografia de gaze – GC ¹⁷⁻²¹.

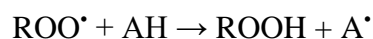
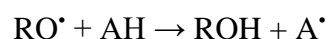
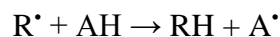
Capitolul III – Metode de determinare a capacității antioxidante

Speciile reactive de oxigen (Reactive Oxygen Species - ROS), cum ar fi anionul superoxid ($O_2^{\cdot-}$), radicalul hidroxil ($\cdot OH$), radicalul peroxil (ROO^{\cdot}), radicali alcoxilici (RO^{\cdot}), apa oxigenată (H_2O_2) și oxigenul ($O_2^1\Delta g$) pot ataca macromoleculele biologice, dând naștere la modificări structurale ale proteinelor, lipidelor și ADN-ului, îmbătrânirea celulelor, boli provocate de stresul oxidativ (de exemplu, boli cardiovasculare și neurodegenerative), precum și cancer. Antioxidanții elimină sau sting ROS și speciile reactive de azot (Reactive Nitrogen Species - RNS), produse în urma respirației, inclusiv radicalii liberi ⁴⁷⁻⁵⁰.

Termenii de „activitate antioxidantă” și „capacitate antioxidantă” au semnificații diferite: activitatea antioxidantă se referă la cinetica reacției dintre un antioxidant și prooxidant, în timp ce capacitatea antioxidantă măsoară eficiența de conversie termodinamică a unei reacții dintre un oxidant cu un antioxidant. Măsurarea capacității antioxidante a lichidelor alimentare și biologice (de exemplu, ser uman) se realizează pentru compararea semnificativă a conținutului de antioxidanți din produsele alimentare și pentru diagnosticul și tratamentul bolilor asociate stresului oxidativ. ROS poate duce la oxidarea lanțurilor laterale ale aminoacizilor, formarea legăturilor încrucișate dintre proteine și oxidarea peptidelor. Atunci când diferiți antioxidanți lucrează împreună se asigură o protecție mai mare împotriva atacului ROS/RNS decât în cazul prezenței unui singur compus antioxidant (ceea ce face ca măsurarea capacității antioxidante totale să fie și mai importantă) ⁴⁷.

Un antioxidant poate fi definit ca „orice substanță care, atunci când este prezentă în concentrații relativ mici, în comparație cu cele ale substratului oxidabil, întârzie sau inhibă semnificativ oxidarea substratului”. Compușii antioxidanți acționează în corpul uman în două etape diferite: în primă fază previn leziunile oxidative prin blocarea apariției radicalilor liberi, după care se poziționează ca scut, protejând celulele sănătoase rămase. Antioxidanții au fost împărțiți în două clase: antioxidanți primari și antioxidanți secundari ^{47,51-53}.

Mecanismul antioxidanților primari decurge conform reacțiilor de mai jos:

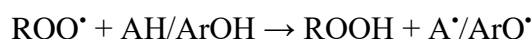


În ceea ce privește antioxidanții secundari (preventivi), aceștia întârzie viteza de oxidare. Diversitatea chimică a antioxidanților (abundența relativă a glicozidelor și izomerilor acestora) face dificilă separarea și cuantificarea acestora din alimentele/matricile biologice unde acțiunea lor combinată poate fi mai relevantă. Prin urmare, este de dorit să se măsoare nivelul activității antioxidante totale direct din extractele de plante și fluidele biologice. Metodele antioxidante pot fi clasificate în funcție de tipul de reacție în două grupe ⁴⁷:

- Metode bazate pe transfer de hidrogen (hydrogen atom transfer – HAT)
- Metode bazate pe transfer de electroni (electron transfer – ET)

3.1. Metode bazate pe transfer de hidrogen

Metodele bazate pe mecanismul HAT măsoară capacitatea unui antioxidant de a stinge radicalii liberi (în general, radicalii peroxil considerați mai relevanți din punct de vedere biologic) prin donarea unui atom de hidrogen. Mecanismele HAT prin care atomul de hidrogen (H) al unui fenol (Ar – OH) este transferat la un radical ROO[•] este descris prin reacția de mai jos:



unde radicalul ariloxi (ArO[•]) format în urma reacției dintre fenolul antioxidant cu radicalul peroxil este stabilizat prin rezonanță. Antioxidanții fenolici eficienți trebuie să reacționeze mai repede decât biomoleculele cu radicalii liberi pentru a-i proteja pe aceștia din urmă de oxidare. Întrucât în metodele antioxidante bazate pe HAT, atât proba cât și antioxidanții reacționează cu ROO[•], activitatea antioxidantă poate fi determinată prin măsurarea curbei de reducere a semnalului analitic al probei în absența și prezența antioxidanților, integrând zona de sub curbă și determinând diferența dintre acestea.

Metodele de determinare a capacității antioxidante care se desfășoară după un mecanism HAT includ metoda ORAC (oxygen radical absorbance capacity), TRAP (total radical trapping antioxidant) și croton și β- carotene bleaching ^{47,54-56}.

3.2. Metode bazate pe transfer de electroni

În majoritatea analizelor bazate pe transfer de electroni, acțiunea antioxidantă este simulată cu o probă care are o capacitate redox potrivită, și anume, antioxidanții reacționează cu o probă fluorescentă sau colorată (agent oxidant) în locul radicalilor peroxilici. Testele spectrofotometrice bazate pe transfer de electroni măsoară capacitatea unui antioxidant de a reduce un oxidant, acesta schimbându-și culoarea atunci când este redus. Gradul de schimbare a culorii (fie o creștere sau o scădere a absorbției probei la o lungime de undă dată) este corelat cu concentrația de antioxidanți

din probă. Metodele ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-acid sulfonic)), TEAC (trolox-equivalent antioxidant capacity) și DPPH (2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) sunt analize de decolorare, în timp ce în metoda Folin-Ciocalteu de determinare a conținutului total de fenoli, FRAP (ferric reduction antioxidant power) și CUPRAC (cupric reduction antioxidant capacity), există o creștere a absorbanței la o lungime de undă specificată, în urma reacției antioxidantului cu reactivul cromogen (adică, în ultimele două metode, valențele inferioare ale fierului și cuprului, și anume Fe (II) și Cu (I), formează complexe de transfer de sarcină cu liganzii corespunzători).

Testele bazate pe transfer de electroni stabilesc, în general, un timp fix pentru reacția redox în cauză și măsoară conversia termodinamică (oxidare) în perioada respectivă. Testele bazate pe ET includ ABTS/TEAC, DPPH (deși primele două metode sunt considerate ca metode mixte bazate pe mecanisme HAT/ET de către unii cercetători), metoda Folin – Ciocalteu (FCR), FRAP și CUPRAC folosind diferiți reactivi redox cromogeni cu potențiale standard diferite ^{47,54-56}.

Capitolul IV – Metode chemometrice

4.1. Introducere–analiza multivariată a datelor

Potrivit definiției formulate de către Massart, chemometria este: „the chemical discipline that uses mathematical, statistical, and other methods employing formal logic (a) to design or select optimal measurement procedures and experiments, and (b) to provide maximum relevant chemical information by analyzing chemical data”²⁶.

Analiza multidimensională a datelor presupune folosirea tabelelor de date (numere) și vizualizarea informației pe care acestea o conțin. Rolul tabelelor de date este foarte important, fiind cele mai potrivite mijloace folosirea în ceea ce privește comunicarea, procesarea și păstrarea informației. Într-un tabel există un anumit mesaj care poate fi comentat și respectiv susținut cu ajutorul graficelor. Tabelul de date este constituit dintr-un set de numere distribuite sub formă de linii orizontale și coloane verticale. Tabelele pot fi simbolizate prin intermediul grupului de litere XLC, fiecare dintre litere reprezentând liniile (L) respectiv coloanele (C). De obicei, în cazul tabelelor liniile sunt reprezentate de către obiectele sau subiecții (indivizii) studiați, iar coloanele reprezintă valorile experimentale sau observațiile diferitelor caracteristici (proprietăți, atribute, însușiri) specifice obiectelor (subiecților). Între valorile experimentale și observații există o diferență semnificativă. Valorile experimentale, rezultate în urma proceselor de măsurare efectuate în laboratoarele de fizică și chimie, sunt asociate cu un grad ridicat de precizie și exactitate. Observațiile, sunt lipsite de acest grad înalt de precizie și exactitate, și sunt în cel mai bun caz ordonate, cum se întâmplă adesea în examinările psihologice.

Un tabel XLC poate fi reprezentat cu ajutorul axelor de coordonate, fiecărui element-coloană îi corespunde o axă de coordonate în spațiul datelor. Astfel, fiecare element-linie (LN) este identificat ca un punct pe o asemenea axă, poziția fiecărui astfel de punct este determinată de valoarea numerică corespunzătoare coloanei respective din tabelul de date. Toate axele de coordonate obținute astfel, sunt ortogonale între ele, împreună definind un sistem de coordonate cu originea în 0. Un sistem de axe de coordonate bidimensional se obține atunci când numărul de coloane este egal cu doi, atunci când CN este egal cu trei avem spațiul tridimensional, iar spațiul multidimensional apare în cazul în care CN este mai mare decât trei (reprezentarea grafică a acestui spațiu este imposibilă).

În algebră, un tabel alcătuit din numere dispuse sub formă de linii orizontale și coloane verticale poartă numele de matrice. Liniile unei matrice sunt compuse dintr-un set de numere aranjate într-o anumită ordine (vector-linie). Coloanele matricei poartă numele de vector-coloană. Scalarul reprezintă o valoare numerică individuală. Mărimile scalare, vectorii și matricele se pot

reprezentă geometric. În cazul în care vorbim de scalar acesta este lipsit de informație dimensională, un vector poate fi considerat fie un element-linie fie un element coloană dintr-o matrice, iar o matrice se poate construi prin suprapunerea mai multor vectori-linie.

În statistică, atunci când ne referim la cuvântul caracteristică sau atribut (variabilă), înseamnă că este vorba de o proprietate pe care un anumit obiect fie o posedă sau nu. Variabila este de trei tipuri (numerică, nominală și ordinară și respectiv variabilă binară), fiind o mărime care poate lua orice valoare numerică dintr-un anumit domeniu de definiție ⁸².

Cele mai utilizate metode chemometrice pentru analiza datelor obținute prin diverse procedee analitice sunt: analiza componentelor principale (PCA), analiza clusterilor (CA) și analiza liniară discriminantă. Datorită obținerii unui număr mare de variabile în urma analizei probelor complexe, cum sunt extractele de plante medicinale, tehnicile de preprocesare (sau reducere a datelor) au devenit tehnici esențiale pentru reducerea numărului de date. Alegerea metodei optime de preprocesare, este greu de realizat datorită numeroaselor metode disponibile cum sunt: corecția liniei de bază, netezirea și alinierea. Nevoia de procesare a datelor apare din cauza a trei motive principale: datele generate de metodele de analiză pot fi incomplete (lipsa unor valori), setul de date este afectat de zgomot (poate conține erori sau puncte extreme) și nu în ultimul rând setul de date poate fi inconsistent, conținând discrepanțe în denumiri sau coduri.

Capitolul V – Rezultate originale

5.1. Plantele medicinale studiate

Primul subcapitol al capitolului cinci descrie în detaliu plantele medicinale folosite în acest studiu. Probele analizate provin de la un magazin naturist local, sunt extrase hidroalcoolice obținute din 42 de plante medicinale încadrate în trei mari încregături (*Spermatophyta*, *Magnoliophyta* și *Pteridophyta* – Tabel 5.1.). Dintre acestea, 41 provin de la producătorul S.C. Dacia Plant S.R.L., Brașov, România și o probă de la Fares Orăștie, Hunedoara, România. Plantele sunt caracteristice florei române, iar procedeul fabricării lor este specificat pe prospectul care însoțește produsul. În procesul de macerare al extractelor s-au folosit diferite rapoarte etanol:apă (35-85% etanol v/v). Distribuția dintre partea vegetală uscată (părți aeriene, frunze, flori, bulbi, semințe, fructe, germeni și rădăcini sau amestecuri în funcție de specia de plantă) și solvent a fost 1/(2–10) g/mL.

Tabel 5.1. Numele, denumirea științifică și încregătura plantelor medicinale studiate.

Nr.	Nume	Denumire științifică	Încregătură
1	Coadă calului	<i>Equisetum arvense</i>	Pteridophyta
2	Pedicuță	<i>Lycopodium clavatum</i>	Pteridophyta
3	Pufulița cu flori mici	<i>Epilobium parviflorum</i>	Magnoliophyta
4	Muguri de plop	<i>Plopus nigra</i>	Magnoliophyta
5	Roiniță	<i>Melissa officinalis</i>	Magnoliophyta
6	Rostopască	<i>Chelidonium majus</i>	Magnoliophyta
7	Sânziană	<i>Galium verum</i>	Magnoliophyta
8	Echinacea	<i>Echinacea purpurea</i>	Magnoliophyta
9	Armurariu	<i>Silybum marianum</i>	Magnoliophyta
10	Ghimbir	<i>Zingiber officinale</i>	Magnoliophyta
11	Brânca ursului	<i>Heracleum sphondylium</i>	Magnoliophyta
12	Leurdă	<i>Allium ursinum</i>	Magnoliophyta
13	Afin	<i>Vaccinium myrtillus</i>	Spermatophyta
14	Merișor	<i>Vaccinium vitis-idaea</i>	Spermatophyta
15	Rosmarin	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Spermatophyta

16	Crețișoară	<i>Alchemilla vulgaris</i>	Spermatophyta
17	Salvie	<i>Salvia officinalis</i>	Spermatophyta
18	Mesteacăn	<i>Betula pendula</i>	Spermatophyta
19	Sunătoare	<i>Hypericum perforatum</i>	Spermatophyta
20	Păducel	<i>Crataegus monogyna</i>	Spermatophyta
21	Cimbrisor	<i>Thymus serpyllum</i>	Spermatophyta
22	Brusture	<i>Arctium lappa</i>	Spermatophyta
23	Ienupăr	<i>Juniperus communis</i>	Spermatophyta
24	Coadă șoricelului	<i>Achillea millefolium</i>	Spermatophyta
25	Ghimpe	<i>Xanthium spinosum</i>	Spermatophyta
26	Lavandă	<i>Lavandula augustifolia</i>	Spermatophyta
27	Anghinare	<i>Cynara scolymus</i>	Spermatophyta
28	Lemn dulce	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Spermatophyta
29	Gețiană	<i>Gentiana asclepiadea</i>	Spermatophyta
30	Tătăneasă	<i>Symphytum officinale</i>	Spermatophyta
31	Urzica	<i>Urtica dioica</i>	Spermatophyta
32	Trei frați pătați	<i>Viola tricolor</i>	Spermatophyta
33	Talpa găștii	<i>Leonurus cardiaca</i>	Spermatophyta
34	Valeriană	<i>Valeriana officinalis</i>	Spermatophyta
35	Traista ciobanului	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Spermatophyta
36	Mărar	<i>Anethum graveolens</i>	Spermatophyta
37	Usturoi	<i>Allium sativum</i>	Spermatophyta
38	Vâsc	<i>Viscum album</i>	Spermatophyta
39	Fructe de soc	<i>Sambucus nigra</i>	Spermatophyta
40	Ardei iute	<i>Capsicum annuum</i>	Spermatophyta
41	Obligeană	<i>Acorus calamus</i>	Spermatophyta
42	Țelină	<i>Apium graveolens</i>	Spermatophyta

5.2. Clasificarea extractelor de plante medicinale în funcție de încrengătură

Potrivit Florei Medicinale a României și <http://www.plante-medicinale.ro/pm/specii.php> plantele descrise la punctul 5.1. aparțin încrengăturilor *Spermatophyta*, *Magnoliophyta* și *Ptreridophyta* ^{19, 101-104}.

Încrengătura *Spermatophyta* include plantele lemnoase și erbacee, originea lor fiind teoretic derivată din încrengătura *Pteridophyta*. În funcție de faptul că sămânța este sau nu închisă în fruct se creează două noi subcategorii denumite *Gymnospermae* și *Angiospermae*¹⁰⁵.

Încrengătura *Pteridophyta* conține primele plante la care se pot distinge organe și țesuturi, cu trăsături precum lipsa florilor și înmulțirea prin spori, care sunt, în principal, ferigile¹⁰. Importanța plantelor care fac parte din această categorie este data de prezența acidului salicilic.

Încrengătura *Magnoliophyta* reunește în aceeași categorie cele mai evolute plante, caracterizate de sămânța închisă în fruct și o aranjare complexă a petalelor. Acestea sunt grupate în două subdiviziuni: monocotiledonate și dicotiledonate¹⁰.

5.2.1. Spectrometria UV-Viz

În acest subcapitol spectrele UV-Vis împreună cu primele patru derivate și metode chemometrice au fost folosite pentru a clasifica probele în funcție de încrengatură. Rezultatele obținute folosind analiza clusterilor duce la o clasificare slabă a probelor în funcție de încrengatură, cele mai bune rezultate fiind obținute pentru prima derivată. Cea de-a doua metodă folosită, PCA a demonstrat de asemenea o clasificare slabă a probelor, și de această dată derivata întâi aducând cele mai bune rezultate. În ceea ce privește cea de-a treia metodă PCA-LDA, se obține o clasificare bună a probelor în cele trei încrengături, și de această dată cele mai bune rezultate fiind obținute pentru prima derivată (Figura 5.1.). Mai mult, este necesar de menționat faptul că preprocesarea datelor (normalizare sau scalare) nu duce la îmbunătățirea rezultatelor.

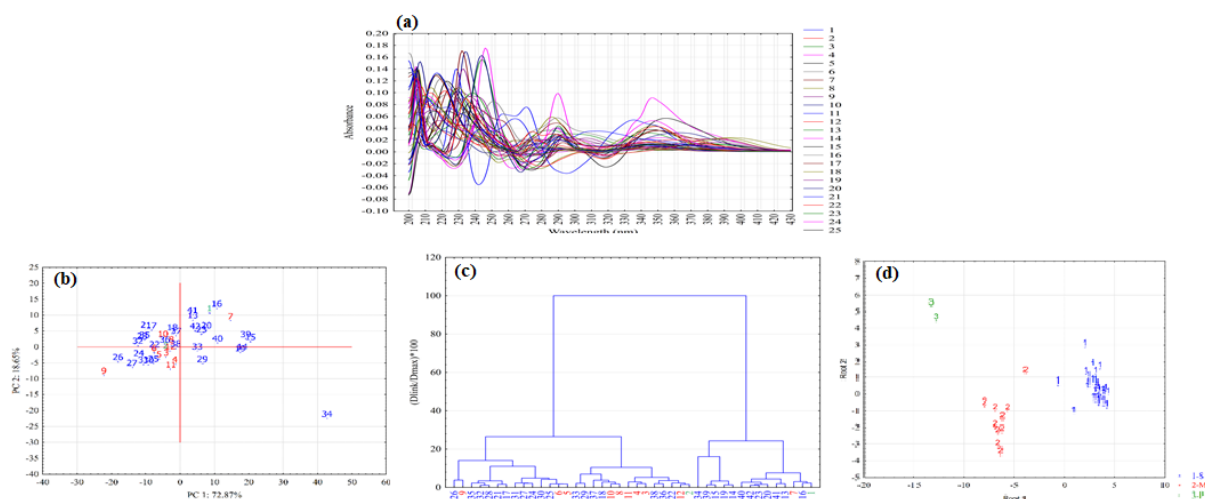


Figura 5.1. (a) Spectrele UV-Viz (b) dendograma, (c) reprezentarea grafică PC1-PC2 și (d) reprezentarea grafică Rădăcina1-Rădăcina2, a datelor obținute pentru cele 42 de plante medicinale pentru derivata întâi.

5.2.2. Cromatografia pe strat subțire

Imaginile plăcilor cromatografice (HPTLC Silica gel 60 și HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄) utilizate în acest studiu au fost obținute la două lungimi de undă 254 și 365 nm. Datele astfel obținute au fost procesate mai departe folosind programul TLC Analyzer.

Evaluarea plăcilor sub lumină UV a scos în evidență spoturi închise, fluorescență albastru/verzuie (254 nm) și spoturi deschise la culoare pe un fond albastru (365 nm), evidențiind diferite clase de compuși prezente în probele analizate. În cazul investigării canalelor de culoare aferente imaginilor (obținute la 365 nm), clasele au fost identificate ca și spoturi închise la culoare pe un fond colorat. Diferite cromatograme (legate de numărul de compuși vizualizați/probă) au fost observate în funcție de culoarea selectată (canal roșu, verde, albastru sau gri). De asemenea, amprente de pe canalele roșu și verde sunt similare scoțând în relief aceleași clase de compuși, în timp ce canalele gri și albastru aduc informații suplimentare. Astfel, amprente de pe canalul gri evidențiază mai bine anumiți compuși iar pe canalul albastru lipsesc unii compuși pentru probe ca 17-trei frați pătați, 18-pufulița cu flori mici, 22-crețișoară, 25-merișor, 34-salvie, 36-traista ciobanului (Figura 5.2.). Ca o observație generală bazată pe rezultatele obținute în urma folosirii canalelor, cel roșu reliefează clasele de compuși cu fluorescență galben/portocalie (365 nm), în timp ce canalul albastru evidențiază compușii cu fluorescență albastră (365 nm).

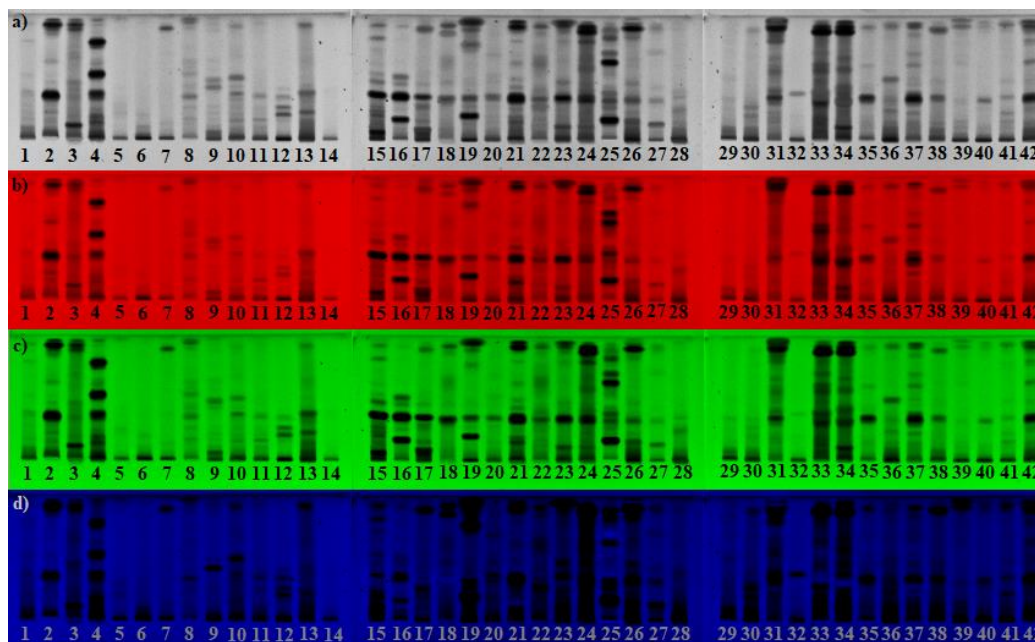


Figura 5.2. Imaginea plăcii cromatografice HPTLC silica gel 60 F₂₅₄ pulverizată cu soluție NTS (0.02%) în metanol: (a) canal gri; (b) canal roșu; (c) canal verde; (d) canal albastru pentru plantele medicinale investigate.

Toate modelele PCA rezultate după proiectarea 2D și 3D a scorurilor corespunzătoare diferitor combinații între componentele principale, au evidențiat o separare slabă și mai mult sau mai puțin similară a probelor, în funcție de încrengătură.

Metoda PCA-LDA a dus la obținerea celor mai bune rezultate, probele fiind astfel clasificate în funcție de încrengătură, cele mai bune rezultate fiind obținute pentru HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄ canal gri (Figura 5.3).

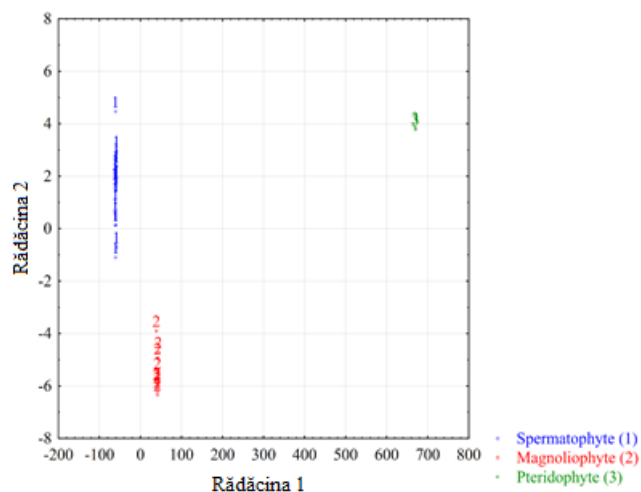


Figura 5.3. Reprezentarea grafică Rădăcina1-Rădăcina a scorurilor canonice: HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄, canal gri, 254 nm.

5.3. Clasificarea plantelor medicinale în funcție de efectele terapeutice

Majoritatea plantelor medicinale cunoscute se găsesc în Monografiile Organizației Mondiale a Sănătății (WHO) clasificate în funcție de diferitele efecte terapeutice ³ pe care le manifestă. Acestea sunt folosite în tratarea și ameliorarea diferitelor boli precum cele ale sistemului nervos ^{112,113}, digestiv ^{114,115}, sau boli dermatologice ^{116,117}.

5.3.1. Spectrometria UV-Vis

Rezultatele obținute în urma analizei PCA duc la o separare a probelor în funcție de efectele terapeutice. Reprezentarea grafică a primelor cinci PC-uri ilustrează o bună separare a probelor în funcție de acest parametru, probele numărul 26 și 31 corespunzătoare lemnulul dulce și mesteacănului apar ca puncte extreme. Aceasta separare se datorează faptului că cele două probe au o compoziție bogată în glicirizină și salicină. În ceea ce privește metodele fuzzy PCA probele au fost separate în 4 grupe principale, excepție în acest caz face mesteacănul. Metoda F₀PCA duc

la obținerea de rezultate similare cu F₁PCA principalele diferențe fiind date de direcția FoPC2. Mesteacanul este și în acest caz punct extrem (Figura 5.4).

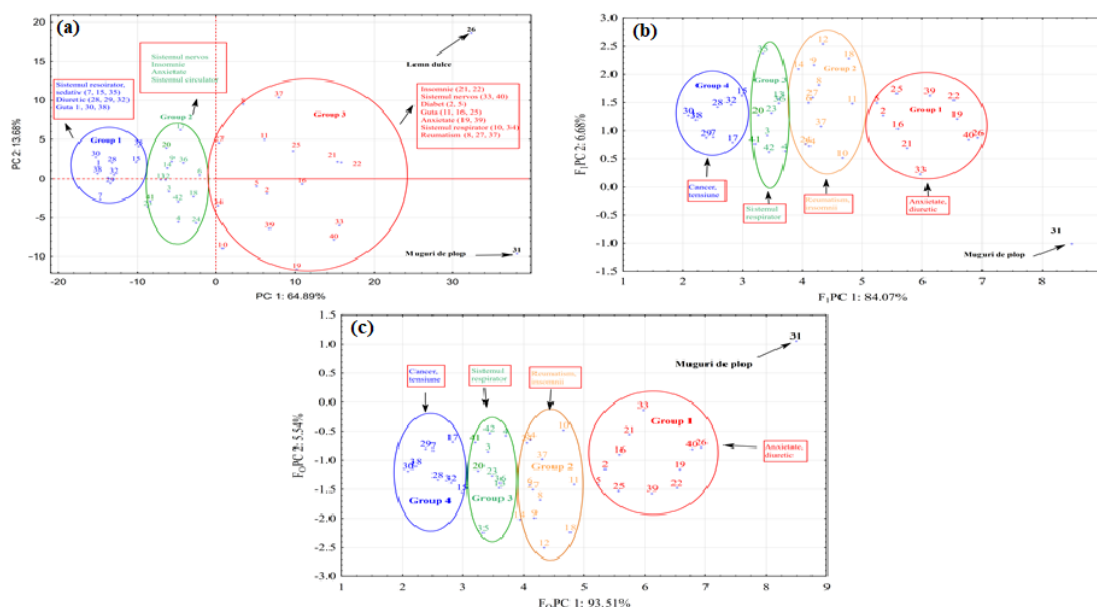


Figura 5.4. Reprezentarea grafică (a) PC1-PC2, (b) F₁PC1-F₁PC2 (c) FoPC1-FoPC2 pentru cele 42 de plante medicinale investigate

5.3.2 Cromatografia pe strat subțire

Rezultatele analizei chemometrice au demonstrat o separare bună a probelor în funcție de efectele terapeutice pentru imaginile plăcilor cromatografice obținute la 254 nm, de aceea rezultate obținute la această lungime de undă vor fi prezentate în continuare. Analiza clusterilor a dus la o clasificare bună a probelor în patru grupuri date de efectele terapeutice. În cazul analizei PCA se obține o clasificare bună a probelor în cele patru clase pe toate canalele cele mai bune rezultate au fost obținute pentru plăcile HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄ canal albastru. Metoda PCA-LDA a dus la o clasificare bună a probeor în funcție de efectele terapeutice pentru plăcile HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄ canal albastru și gri (Figura 5.5).

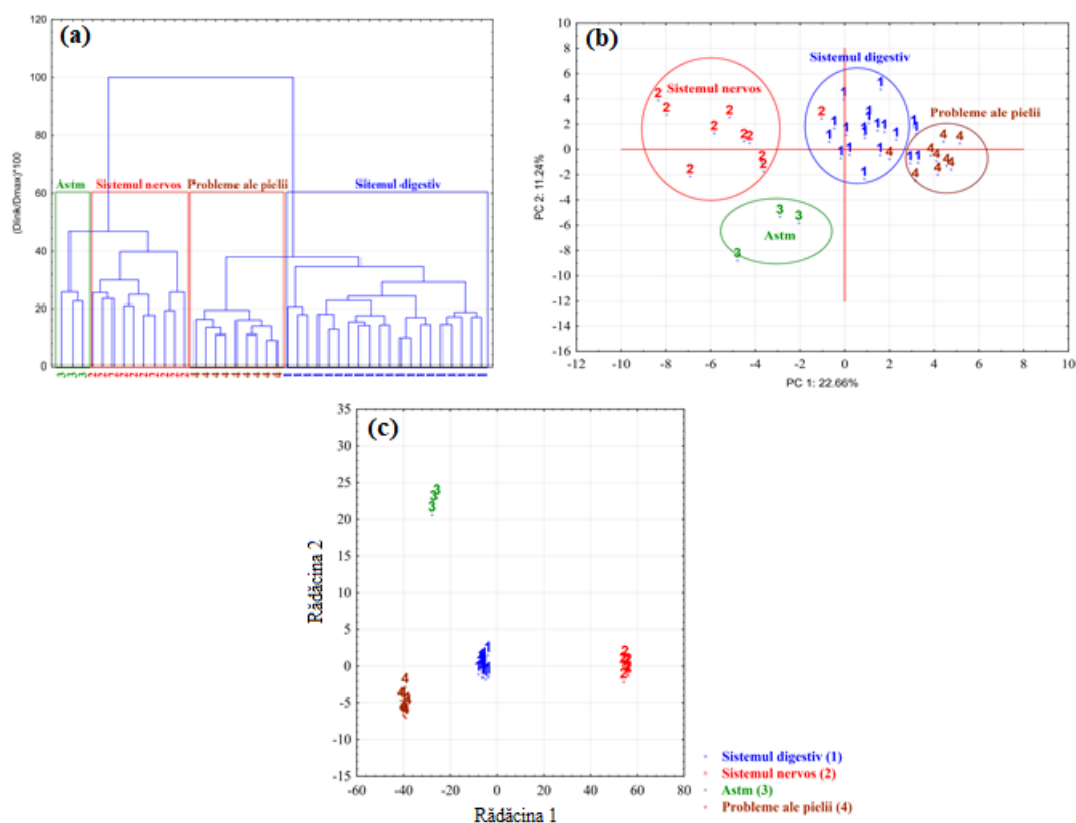


Figura 5.5. (a) Dendrograma, (b) reprezentarea grafică PC1-PC2, (c) reprezentarea grafică Rădăcina-Rădăcina a datelor obținute pentru cele 42 de plante medicinale

5.4. Clasificarea plantelor medicinale în funcție de activitatea antioxidantă

Antioxidanții sunt substanțe care, prezenți în cantități mici, comparabile cu cea a substratului oxidabil, întârzie semnificativ sau inhibă oxidarea acestuia^{137,138}. Interacțiunea dintre radicalii liberi și antioxidanți este considerată un factor important asociat cu inițierea și progresul diferitelor boli și menținerea unui nivel de sănătate optim^{139,140}. Dacă generarea de radicali liberi excede limitele efectelor protectoare ale antioxidanților, apare stresul oxidativ care prezintă efecte negative asupra organismului, precum îmbătrânirea, bolile cardiovasculare, cancer, tulburări neurodegenerative și alte afecțiuni cronice¹³⁹⁻¹⁴². Cei mai cunoscuți antioxidanți se regăsesc în fructe, legume, ceaiuri, vin și condimente.

5.4.1. Cromatografia pe strat subțire

Prezența compușilor antioxidanți (benzi de culoare albă pe un fond violet) cu reactivitate scăzută sau ridicată, raportată la DPPH•, a fost ușor observată în urma unei investigații amănunțite a imaginii plăcilor cromatografice obținute la 10, 20 și 30 de minute după imersarea lor în soluția de DPPH• (Figura 5.6).

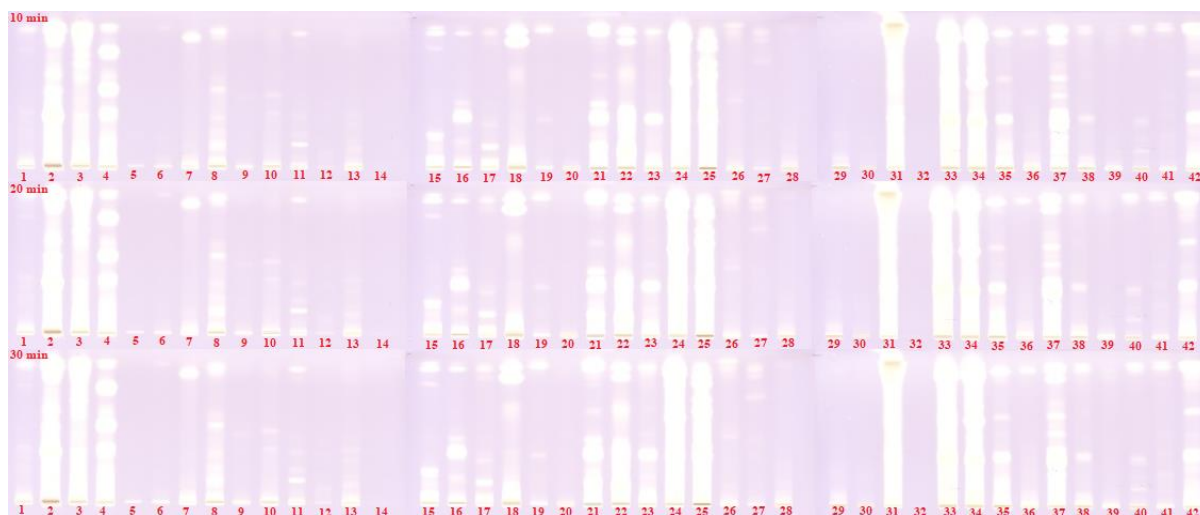


Figura 5.6. Cromatogramele HPTLC ale extractelor hidroalcoolice obținute după reacția cu soluția de DPPH• (0.02% în etanol) pentru HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄ (10, 20 și 30 min). Faza mobilă folosită în procesul de separare: acetat de etil: toluen: acid formic: apă (30:1.5:4:3, v/v/v):
(a) detecție la $\lambda = 365$ nm; (b) detecție la $\lambda = 254$ nm.

Modelele obținute în urma reprezentării grafice a scorurilor PC1-PC2, duc la obținerea de rezultate similare pentru ambele tipuri de plăci. Probele sunt separate în două grupuri distincte, unul mare (mai dispersat) care include probe cu activitate antioxidantă mare/medie și un al doilea (mai compact scoruri negative) conținând probe cu activitate mică/medie. Analiza clusterilor a dus la o separare a probelor în funcție de activitatea antioxidantă. În analiza LDA pentru plăcile HPTLC Silica gel F₂₅₄ se obține o clasificare corectă de 100% în funcție de activitatea antioxidantă în timp ce în cazul plăcilor HPTLC Silica gel 60 pentru aceeași metodă se obțin rezultate semnificativ diferite grupurile fiind mai compacte și parțial separate (Figura 5.7.)

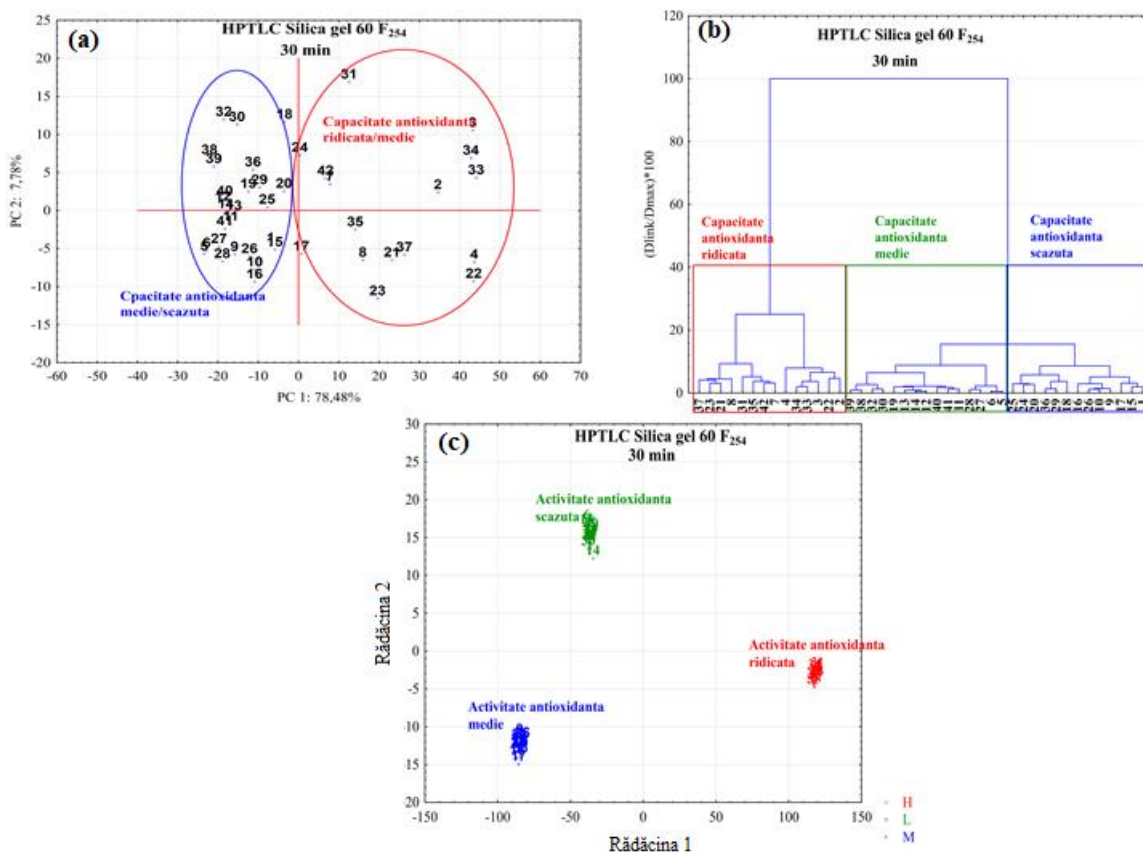


Figura 5.7. Reprezentarea grafică (a) PC1-PC2, (b) dendrograma și (c) reprezentarea grafică Rădăcina1-Rădăcina2 pentru rezultatele obținute pentru plăcile HPTLC Silicagel 60 F₂₅₄.

5.4.2. Cromatografia de lichide de înaltă performanță

Rezultatele obținute cu metoda analizei orizontale a clusterilor folosind mediile c-fuzzy la diferite lungimi de undă (242, 260, 280, 320, 340, 380 nm) a dus la o clasificare a probelor în funcție de activitatea antioxidantă.

Partițiile obținute la 242 nm și 280 nm sunt clasificate în funcție de activitatea antioxidantă a extractelor de plante, însă apar câteva excepții. Probele 21 (4,93%) și 22 (4,46%), corespunzătoare extractelor de *Glycyrriza glara* și *Gentiana asclepiadea*, sunt atribuite grupului cu activitate antioxidantă moderată în cazul datelor asociate lungimii de undă de 242 nm, iar probele 14 (12,86%), 16 (10,13%), 18 (9,44%), respectiv 20 (7,42%) aferente *Caelidonium majus*, *Juniperus communis*, *Xantium spinosum* și *Cynara scolymus* se încadrează la activitate antioxidantă mică în ambele cazuri (242 și 280 nm).

Totuși referitor la DOM-urile probelor atribuite primei partiții (A1) din grupul cu activitate antioxidantă moderată (ordinul de mărime 10^{-4}) și partiției trei (A3) de la grupul marcat cu activitate ridicată diferențele sunt aproape insesizabile.

Partițiile obținute cu FDHC, folosind aceleași date cromatografice (fără preprocesare). Acest algoritm fuzzy pare să aducă rezultate mai bune oferind două clase în majoritatea cazurilor. Astfel, prima include extracte de plante cu activitate antioxidantă ridicată și moderată iar a doua conține probe de plante cu activitate antioxidantă scăzută. Atribuirea probelor 21, 22 și 14, 16, 18 și 20 este aceeași.

Gruparea obținută în acest fel pentru probe și variabile (intensitatea semnalului cromatografic) folosind matricea de date corespunzătoare lungimii de undă de 242 nm. Gruparea probelor în două clase la primul nivel de partiție este similar cu cel obținut anterior, cu FDHC, în toate cazurile (242, 260, 280, 320, 340 și 380 nm). Noutatea constă în obținerea partițiilor intervalului de timp de retenție cromatografic și asocierea cu diferite extracte de plante. Regiunea principală (grupul de amprente cromatografice) a tuturor intervalelor de timp de retenție cromatografică (0,000-30,000 min) asociată clasei de probe cu activitate antioxidantă ridicată și moderată (A1) inclusiv probele 21 și 22 respectiv probe cu activitate antioxidantă scăzută (1-9, 10-20, 21, 22) este 7,83-13,35 min, și alte subintervale de timp de retenție mai restrânse. Din contră, regiunile cele mai reprezentative ale timpului de retenție, pentru grupul de plante cu activitate antioxidantă scăzută (A2), incluzând probele 13, 14, 16, 18 și 20 cu activitate antioxidantă moderată (13, 14, 16, 18, 20, 23-42), sunt 3,185-7,478 min, 16,732-24,138 min și 26,691-30,003 min, precum și alte subintervale mai mult sau mai puțin restrânse. Considerând faptul că variabilele și probele sunt atribuite partiției fuzzy în funcție de valoarea cea mai mare a DOM-urilor (defuzificare), este deasemenea posibil, construirea de noi amprente bazate pe DOM-uri. Acestea sunt relevante în ceea ce privește asemănările/deosebiriile probelor, pentru că indică atât poziția cât și gradul de asociere al picurilor cromatografice pentru diferitele clase de probe individuale.

Cu toate acestea, surprinzător, reprezentarea grafică a probelor folosind primele două componente corespunzătoare datelor obținute la 242 nm indică o separare bună a probelor în funcție de activitatea antioxidantă. Aceste date sunt în concordanță cu rezultatele obținute în urma aplicării metodei de analiza clusterilor fuzzy. În plus, toate rezultatele obținute după folosirea PCA susțin ideea folosirii scorurilor ortogonale și curățate de zgomot aferente primelor 41 de PC-uri, în clasificarea HCA și LDA a extractelor (Figura 5.8.).

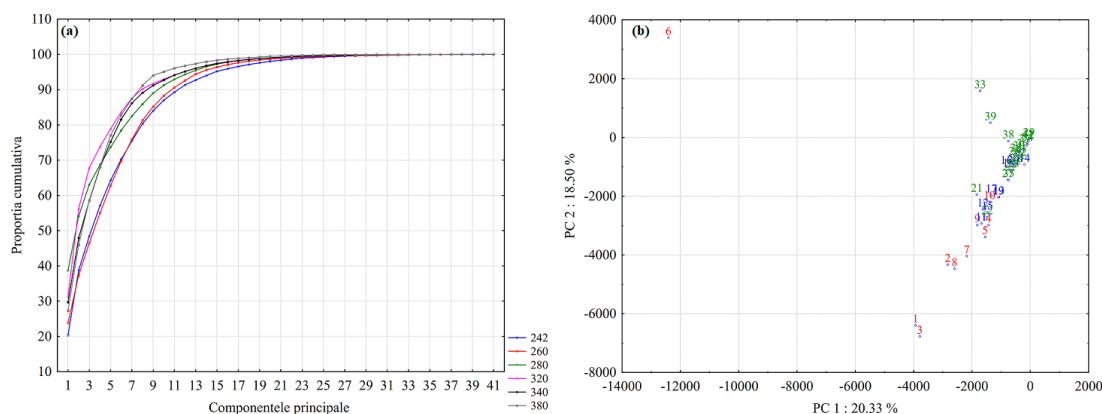


Figura 5.8. (a) Profilul proporțiilor cumulative și (b) reprezentarea grafică PC1-PC2.

Dendrograma furnizată de analiza clusterilor folosind tehnica Ward ca metodă de legare și distanța Manhattan ca măsură a similarității, pentru datele asociate celor 41 de PC-uri (242 nm), evidențiază grupuri de extracte bine definite, similare cu cele obținute aplicând metodele de analiză a clustrilor fuzzy și PCA (Figura 5.9.).

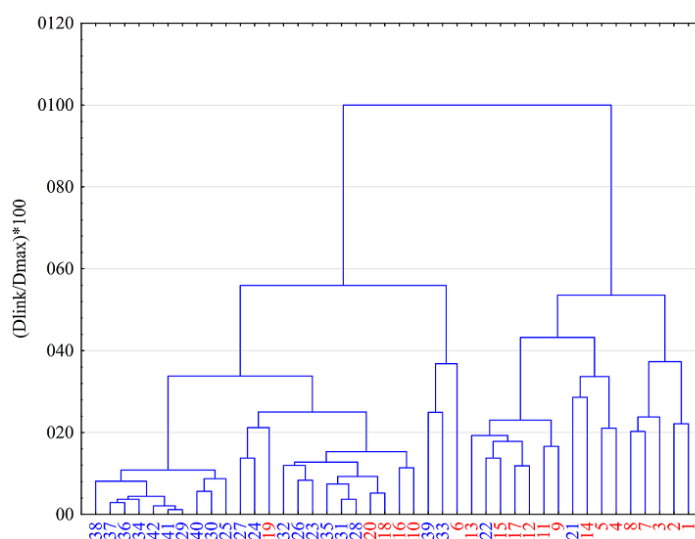


Figura 5.9. Dendrograma corespunzătoare extractelor de plante medicinale.

Combinarea metodei PCA cu LDA a condus la cea mai bună discriminare a probelor investigate, respectiv, în două clase. De asemenea, s-a luat în considerare și ideea existenței a trei clase date care sunt reprezentate în Tabelul 5.15. Valoarea minimă a clasificării corecte susține ipoteza clasificării extractelor de plante medicinale în două clase după criteriul activității antioxidante.

Capitolul VI – Concluzii

Prezenta cercetare a avut ca temă centrală caracterizarea și clasificarea plantelor medicinale caracteristice florei românești, în funcție de diferiți parametri/caracteristici, prin derularea multiplelor tipuri de analiză.

O primă încercare a fost folosirea spectrelor UV-Viz precum și a derivatelor acestora (derivatele de ordin întâi până la patru), pentru a demonstra impactului lor asupra clasificării extractelor după tipul de încrengătură. Metodele PCA pentru reducerea numărului de variabile și apoi LDA pentru clasificarea lor, au generat o discriminare ridicată a probelor în încrengătura din care fac parte. Derivata de ordin întâi a furnizat cele mai bune rezultate, confirmate și de validarea lasă una afară prin intermediul procentelor de clasificare corectă de 90,5%; 71,4%, respectiv 76,2%, atribuite datelor neprocesate, normalizate și standardizate. Este necesară menționarea faptului că procesarea datelor prin normalizare sau standardizare, sau folosirea diversilor parametrii Savitzky-Golay nu au favorizat îmbunătățirea rezultatelor.

Combinarea cromatografiei pe strat subțire cu metode chemometrice și de editare a imaginii a dus la obținerea unei clasificări a plantelor medicinale din punct de vedere al încrengăturii. S-a ajuns la concluzia că cele mai bune rezultate sunt obținute prin folosirea scorurilor PCA în analiza liniară discriminantă, unde canalul gri oferă o separare mai eficientă (plăcile HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄ vizualizate la 254 nm) cu un procent de clasificare corectă de 90,5%. Observațiile anterioare sunt susținute de validarea lasă una afară care confirmă eficacitatea canalului gri și a plăcilor, cu un procent de clasificare corectă de 83,3%.

Spectrele UV-Viz împreună cu datele obținute prin combinarea cromatografiei pe strat subțire cu metode de prelucrare a imaginii, au fost folosite pentru a clasifica plantele în funcție de un alt criteriu și anume efectul terapeutic principal.

Datele UV-Viz au demonstrat fezabilitatea studiilor chemometrice folosite asupra datelor spectroscopice pentru a putea înțelege relația dintre plantele medicinale și proprietățile lor curative. Metodele fuzzy robuste aplicate, oferă un aport suplimentar de informații, grupurile obținute sunt mult mai bine evidențiate și definite, în concordanță cu efectele terapeutice. Variația totală este descrisă de un număr mai mic de componente principale și o delimitare mai evidentă a acestora. Rezultatele obținute ar trebui să încurajeze folosirea metodelor fuzzy și în cazul altor tipuri de date.

Cromatografia pe strat subțire s-a dovedit a fi o metodă potrivită pentru clasificarea probelor de plante medicinale după efectul lor terapeutic. Contribuția PC-urilor la reținerea compușilor pe placa cromatografică, a fost pusă în evidență de profilul loadingsurilor PCA. PC1 are o contribuție ridicată asupra compușilor reținuți pe plăcile HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄, contrar a ceea ce se

regăseste pe HPTLC Silica gel 60, unde contribuția este redusă și uniformă, exceptând compuși reținuți aproape de front. În cadrul anizei LDA, substituirea variabilelor noi, lipsite de zgomot, cu scorurile PC, dublată de folosirea diferitelor canale de culoare, s-a dovedit a fi o tehnică eficientă de creștere a selectivității probelor în funcție de efectul terapeutic. Cel mai ridicat procent de clasificare corectă s-a înregistrat pentru plăcile HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄ canalul albastru (92,9%) (metodele PCA și FPCA) respectiv canalul roșu pe HPTLC Silica gel 60 (93,9% FPCA).

Clasificarea plantelor medicinale în funcție de activitatea antioxidantă a fost realizată prin folosirea metodelor cromatografice HPLC și a cromatografiei pe strat subțire.

Datele cromatografice obținute prin analiza HPLC-DAD, la diferite lungimi de undă (242, 260, 280, 320, 340, 380), împreună cu metodele de analiza clusterilor fuzzy și a metodelor clasice, s-au dovedit a fi potrivite în clasificarea plantelor în funcție de acest parametru. Cele mai bune rezultate au fost identificate, în cazul tuturor metodelor chemometrice, pentru lungimea de undă de 242 nm. Probele (care includ, relativ, aceiași compuși) au fost grupate în două clase (activitate antioxidantă ridicată, respectiv redusă), și respectiv trei clase (activitate antioxidantă ridicată/medie/redușă) bine delimitate, completate de câteva excepții: *Glycyrriza glabra*, *Gentiana asclepiadea*, *Caelidonium majus*, *Juniperus communis*, *Xantium spinosum* și *Cynara scolymus* cauzate de diferențele de concentrație.

Separarea în două clase menționată anterior este obținută în cazul metodelor nesupervizate PCA și HCA, a metodei supervizate PCA-LDA, rezultate care se suprapun cu cele obținute prin FDHC și FDHAC. Mai mult FDHAC oferă oportunitatea de a asocia fiecărei partiții fuzzy de probe, un set de caracteristici fuzzy folosind regiuni caracteristice ale amprentelor cromatografice sau peakuri specifice (markeri cromatografici și fuzzy).

Validarea încrucișată indică divizarea probelor în două clase cu un procent de clasificare corectă de 100%, comparativ cu 90,5% în cazul folosirii a trei clase. În plus, datele nu necesită preprocesare, iar normalizarea și autoscalarea nu favorizează îmbunătățirea rezultatelor. O altă concluzie importantă, o reprezintă faptul că variabilele inițiale (4501 variabile) pot fi înlocuite de scorurile corespunzătoare componentelor principale care însumează 100% din varianță (41 PC-uri), cu aceleași rezultate, dar minimizând viteza și durata analizei.

Folosirea HPTLC împreună cu metode chemometrice și de prelucrare a imaginii, a dus la caracterizarea și clasificarea plantelor în funcție de capacitatea antioxidantă, determinată prin imersarea plăcilor în soluția de radical liber DPPH•. Rezultatele aplicării metodei LDA asupra scorurilor asociate componentelor principale, demonstrează o separare completă a probelor (100%) în trei grupe compacte și confirmă clasificarea obținută prin analiza clusterilor, cele mai bune rezultate fiind obținute pentru plăcile HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄.

Stabilirea activității antioxidante a setului de probe a fost realizat, atât separat, prin folosirea metodei cu DPPH dar și prin compararea a 17 tehnici mai mult sau mai puțin cunoscute.

Prin derularea programului SRD-CRRN, și comparând cele 17 metode, s-a constatat faptul că cele mai bune rezultate sunt obținute pentru metodele: beta caroten, ABTS, FRAP, DPPH, CUPRAC, ORAC, CERAC.

Metoda cu DPPH se pretează și pentru alt tip de probe dintre care putem aminti analiza unui set de 32 de uleiuri vegetale, probele fiind clasificate cu succes în funcție de activitatea antioxidantă pe care o manifestă.

Pe lângă cele 17 metode folosite pentru determinarea capacității antioxidante a celor 42 de extracte de plante medicinale s-a folosit și metoda Micro TLC. Prin raportarea acesteia la celelalte două metode, respectiv imersarea plăcilor în DPPH respectiv ABTS (rezultate similare cu cele obținute în urma imersării plăcilor în DPPH) și metoda spectrofotometrică, rezultatele sunt identice: compușii cu activitate antioxidantă fiind evidențiați prin cele trei metode. Analiza Micro TLC presupune o serie de avantaje precum aparatura ieftină (nu este nevoie de un spectrofotometru), timpul redus de analiză și o cantitate mică de probă, fiind dedicată aplicării asupra probelor complexe.

Pentru a determina stabilitatea probelor, din cele 42 de extracte de plante medicinale a fost ales un set de cinci probe: afin, sânziene, lemn dulce, tătăneasă și respectiv urzică. Probele au fost păstrate într-un loc uscat, ferite de lumină la o temperatură de 21 °C. Conform rezultatelor obținute în urma cromatografiei pe strat subțire se poate observa că acestea au o compoziție bogată (afin - 2, sânziene - 21) în compuși bioactivi și respectiv scăzută (tătăneasă - 7, lemn dulce - 26, urzică - 30). Spectrele UV-Viz ale celor cinci probe au fost măsurate pe o perioadă de șase luni (timp de o lună spectrele au fost măsurate zilnic iar timp de patru luni spectrele au fost ridicate o dată pe săptămână. În urma acestei analize se poate constata faptul că spectrele UV-Viz nu au suferit modificări semnificative, micile diferențe care apar fiind datorate de modul de lucru.

Bibliografie

- (1) Commission on Social Determinants of Health. Closing the gap in a generation: health equity through action on the social determinants of health. World Health Organization, Geneva, 2008.
- (2) Embuscado, M. E. Handbook of Antioxidants for Food Preservation, Herbs and spices as antioxidants for food preservation, Shahidi, F. Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, 2015, Chapt. 11, 251–281.
- (3) Christenhusz, M. J. M.; Bing, J. W. The Number of Known Plant Species in the World and its Annual Increase *Phytotaxa*. **2017**, *3*, 201–261.
- (4) Alexan, M.; Bojor, O.; Craciun, F. Flora Medicinala a Romaniei. Vol. 1; CERES: București, 1988.
- (5) Rural development. A Romania of medicinal and aromatic herb products. In: Rural Romania. National Rural Development Network. **2015**, *15*, 8–22.
- (6) Amărioarei, A.; Jibotean, R.; Tușa, I.; Ițcuș, C.; Păun, M. Assessment of the Romanian Medicinal Plant Research – from European to National Level. *Analele Științifice ale Universității „Al. I. Cuza” Iași s. II a. Biologie vegetală*. **2016**, *62*, 5–17.
- (7) Melton, L.; Shahidi, F.; Varelis, P. Encyclopedia of Food Chemistry, Vol. 1; Elsevier: Edinburg, 2019.
- (8) Galanakis, C. M. Nutraceutical and Functional Food Components, Effects of Inovative Processing Techniques, 1st ed.; Elsevier: Edinburg, 2017.
- (9) Pleșa, M.; Ilie, G. Plante Medicinale si Aromatice Itreprimdera Poligrafică: Cluj-Napoca, 1975.
- (10) Ramawat, K. G. Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine Springer: Heidelberg, 2009; 15–29.
- (11) Heinrich, M.; Barnes, J.; Gibbons, S.; Williamson, E. M. Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy, 2nd ed.; Elsevier: London, 2012; 49–58.
- (12) Behl, C.; Moosmann, B. Antioxidant Neuroprotection in Alzheimer’s Disease as Preventive and Therapeutic Approach *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *33*, 182–191.
- (13) Erhenhi, A. H.; Lemy, E. E.; Okunbor, R. A. Medicinal Plant Used for the Treatment of Skin Diseases in Edo State, Nigeria *J. Med. Plant. Herbal. Ther. Res.* **2016**, *4*, 25–29.
- (14) Poncet, A.; Vogl, C. R.; Weckerle, C. S. Folkbotanical Classification: Morphological, Ecological and Utilitarian Characterization of Plants in the Napf Region, Switzerland *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **2015**, *11*, DOI: 10.1186/1746-4269-11-13.
- (15) Fischer, E. Dictionarul plantelor medicinale, GEMMA PRES: București, 2005.

- (16) Pleșa, M.; Ilie, G. *Plante Medicinale si Aromatice*, Itreprinderea Poligrafică: Cluj-Napoca, 1975.
- (17) Joshi, D. D. *Herbal Drugs and Fingerprints Evidence Based Herbal Drugs*, Springer: New Delhi, 2012.
- (18) Sun, D.-W. *Modern Techniques for Food Authentication*, Elsevier: New York, 2008.
- (19) Siddiqi, K. S.; Nollet, L. M. L. *Fingerprinting Techniques in Food Authentication and Traceability*, CRC Press: Boca Raton, 2019.
- (20) Nielsen, S.S. *Food Analysis*, 4th ed.; Springer: New York, 2010.
- (21) Jantschi, L.; Nașcu, I. H. *Chimie Analitică și Instrumentală*, Academic Press & Academic Direct: Cluj-Napoca, 2009.
- (22) Apak, R.; Gorinstein, S.; Böhm, V.; Schaich, K.M.; Özyürek, M.; Güçlü, K., *Methods of Measurements and Evaluation of Natural Antioxidant Capacity/Activity (IUPAC Technical Report) Pure. Appl. Chem.* **2013**, *85*, 957–998.
- (23) Gupta, D. S. *Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants*, CRC Press: Enfield, 2011.
- (24) Armstrong, D. *Methods in Molecular Biology - Advanced Protocols in Oxidative Stress I* Humana Press: New York, 2008.
- (25) Thambiraj, J.; Paulsamy, S. *In vitro antioxidant potential of methanol extract of the medicinal plant, Acacia caesia (L.) Willd. Asian Pac. J. Trop. Med.* **2012**, *2*, 732–736.
- (26) Thangaraj, P. *Pharmacological Assays of Plant-Based Natural Products*, Vol. 71; Springer: Cham, Elvetia, 2016.
- (27) Cespedes, L. C.; Sampietro, A. D.; Seigler, S. D.; Rai, M. *Natural Antioxidants and Biocides from Wild Medicinal Plants*, CABI International: New Delhi 2013.
- (28) Mancini, F. R.; Affret, A.; Dow, C.; Balkau, B.; Bonnet, F.; Boutron-Ruault, M. C.; Fagherazzi, G. *Dietary antioxidant capacity and risk of type 2 diabetes in the large prospective E3N-Epic cohort. Diabetologia.* **2018**, *61*, 308–316.
- (29) Zengin, G.; Sarikurku, C.; Aktumsek, A.; Ceylan, R. *Sideritis galatica* Bornm.: A source of multifunctional agents for the management of oxidative damage, Alzheimer's's and diabetes mellitus *J. Funct. Food*, **2014**, *11*, 538–547.
- (30) Mauro, N. P.; Barbara, S.; del Rio, C. D.; Salvatore, S.; Bianchi, M.; Brighenti, F. *Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays J. Nutr.*, **2003**, *133*, 2812–281.
- (31) Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Deming, S. N.; Michotte, Y.; Kaufman, L. *Chemometrics: A Textbook*, Elsevier: Amsterdam, 1988.

- (32) Horovitz, O.; Sârbu, C.; Pop, H.F. Clasificarea Rațională a Elementelor Chimice, Dacia: Cluj-Napoca, 2000; 82–115.
- (33) Bojor, O. *Ghidul Plantelor Medicinale si Aromatice de la A la Z* Fiat Lux: București, 2003; 11-52.
- (34) Collins, A. G.; Valentine, J. W. Defining phyla: evolutionary pathways to metazoan body plans *Evol. Dev.* **2001**, 3, 432–442.
- (35) Turland, N. J.; Wiersema, J. H.; Barrie, F. R.; Greuter, W.; Hawksworth, D. L.; Herendeen, P. S.; Knapp, S.; Kusber, W.-H.; Li, D.-Z.; Marhold, K.; May, T. W.; McNeill, J.; Monro, A. M.; Prado, J.; Price, M. J.; Smith, G. F. (eds.) 2018: *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Shenzhen Code) adopted by the Nineteenth International Botanical Congress Shenzhen, China, July 2017*. Regnum Vegetabile 159. Koeltz Botanical Books: Glashütten DOI: <https://doi.org/10.12705/Code.2018>
- (36) Singer, R. *Encyclopedia of Paleontology*, Springer: Chicago, 1999; 1196–1202.
- (37) Budd, G. E.; Jensen, S. A critical reappraisal of the fossil record of the bilaterian phyla *Biol. Rev.* **2000**, 75, 253–295.
- (38) Dupont, F.; Guignard, J. L. Spermatophytes ou Plantes a graines. Botanique Les Familles de Plantes **2015**, 16, 53–58.
- (39) WHO Monographs on Selected Medicinal Plants - Volume 1, 1999.
- (40) Singh, A. K.; Rai, S.N.; Maurya, A.; Mishra, G.; Awashti, R.; Shakya, A.; Chellappan, D.K.; Dua, K.; Vamanu, E.; Chaudhary, S.K.; Singh, M.P. Therapeutic Potential of Phytoconstituents in Management of Alzheimer’s Disease *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2021**, <https://doi.org/10.1155/2021/5578574>.
- (41) Ong, H.G.; Kim, Y.-D. Medicinal Plants for Gastrointestinal Diseases Among the Kuki-Chin Ethnolinguistic Groups Across Bangladesh, India and Myanmar: A Comparative and Network Analysis *Study J. Ethnopharmacol.* **2020**, 251, 112415
- (42) Liang, J.; Cui, L.; Li, J.; Guan, S.; Zhang, K.; Li, J. Aloe Vera: A Medicinal Plant used in Skin Wound Healing *Tissue Eng. Part B Rev.* **2020**, DOI: [10.1089/ten.TEB.2020.0236](https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2020.0236).
- (43) Rahman, K. Studies on Free Radicals, Antioxidants, and Co-Factors *Clin. Interv. Aging.* **2007**, 2, 219–236.
- (44) Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T. D.; Mazur, M.; Telser, J. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2007**, 39, 44–84.

Anexa 1. Lista publicațiilor originale și participarea la conferințe internaționale

Publicații elaborate în cadrul tezei de doctorat:

Simion Maria, Cobzac Simona Codrțuța, Casoni Dorina. Image analysis approaches to improve the thin layer chromatography-chemometric based investigations of natural extracts. *STUDIA UBB CHEMIA*, **2017**, *62*, 67–80. (FI: **0,447**; Q3; numărul de citări: **3**)

Simion Ileana Maria, Casoni Dorina, Sârbu Costel. Characterization and classification of medicinal plants according to their antioxidant profile estimated by thin layer chromatography assisted by chemometric expertise. *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.* **2018**, *41(6)*, 342–348. (FI: **1,312**; Q3; numărul de citări: **3**)

Simion Ileana Maria, Pop F. Horia, Sârbu Costel. Spectrophotometric characterization of Roumanian medicinal herbs assisted by robust chemometrics expertise. *Rev. Roum. Chim.* **2018**, *63(5-6)*, 489–496. (FI: **0,381**; Q4; numărul de citări: **0**)

Simion Ileana Maria, Casoni Dorina, Sârbu Costel. Classification of Romanian medicinal plant extracts according to the therapeutic effects using thin layer chromatography and robust chemometrics. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *163*, 137–143. (FI: **3,935**; Q1; numărul de citări: **7**)

Casoni Dorina, **Simion Ileana Maria**, Sârbu Costel. A comprehensive classification of edible oils according to their radical scavenging spectral profile evaluated by advanced chemometrics. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2019**, *213*, 204–209. (FI: **4,098**; Q1; numărul de citări: **8**)

Simion Ileana Maria, Sârbu Costel. The impact of the order of derivative spectra on the performance of pattern recognition methods. Classification of medicinal plants according to the phylum. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2019**, *219*, 91–95. (FI: **4,098**; Q1; numărul de citări: **2**)

Simion Ileana Maria, Moț C. Augustin, Sârbu Costel. Finding specific peaks (markers) using fuzzy divisive hierarchical associative-clustering based on the chromatographic profiles of medicinal plant extracts obtained at various detection wavelengths. *Anal. Methods.* **2020**, *12(25)*, 3260–3267. (FI: **2,896**; Q1; numărul de citări: **0**)

Simion Ileana Maria, Moț C. Augustin, Găceanu D. Radu, Pop F. Horia, Sârbu Costel. Characterization and Classification of Medicinal Plant Extracts According to Their Antioxidant

Activity Using High-Performance Liquid Chromatography and Multivariate Analysis. *STUDIA UBB CHEMIA*, 2020, 65, 71–82. (FI: 0,447; Q3; numărul de citări: 1)

Simion Ileana Maria, Casoni Dorina, Sârbu Costel. Multivariate color scale image analysis–Thin layer chromatography for comprehensive evaluation of complex samples fingerprint. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 2021, 1170, 122590. (FI: 3,205; Q1; numărul de citări: 1)

Prezentări la conferințe internaționale:

Maria Simion, Costel Sârbu, Taxonomy of plants in phylum using UV fingerprints and robust chemometrics, Global Conference on Plant Science and Molecular Biology” 11-13 septembrie, 2017, Valencia, Spania.

Maria Ileana Simion, Augustin Cătălin Moț, Costel Sârbu, Classification of medicinal plants according to their antioxidant capacity using chromatographic profiles and chemometrics, Global Conference on Plant Science and Molecular Biology” 20-22 septembrie, 2018, Roma, Italia.