

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

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA MICROUNDELOR
ASUPRA COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN *SATUREJA
HORTENSIS L. ȘI OCIMUM BASILICUM L.***

Conducător științific

Prof. Dr. Constantin Măruțoiu

Doctorand

Ildikó Broș (căs. Lung)

Cluj-Napoca

-2012-

CUPRINS

LISTA DE ABREVIERI	4
INTRODUCERE	5
CONTRIBUȚII PERSONALE	7
CAPITOLUL 1. CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND PLANTELE STUDIATE DIN FAMILIA <i>LAMIACEAE</i>	8
1.1. Descrierea familiei <i>Lamiaceae</i>	8
1.2. <i>Satureja hortensis L.</i>	9
1.2.1. Caracterizare generală	10
1.2.1. Acțiune și întrebuițări	11
1.3. <i>Ocimum basilicum L.</i>	12
1.3.1. Caracterizare generală	13
1.3.2. Acțiune și întrebuițări	14
CAPITOLUL 2. COMPUȘI BIOACTIVI DE INTERES FARMACOLOGIC	16
2.1. Pigmenții porfirinici	16
2.2. Flavonoidele	18
2.3. Carotenoidele	21
2.4. Uleiurile volatile	22
2.5. Taninurile	23
CAPITOLUL 3. METODE DE EXTRACȚIE ȘI ANALIZĂ A COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN PLANTE	26
3.1. Metode de extracție a compușilor bioactivi	26
3.1.1. Macerarea	27
3.1.2. Refluxarea	27
3.1.3. Extracția Soxhlet	28
3.1.4. Extracția cu fluide supercritice	28
3.1.5. Extracția asistată de ultrasunete	30
3.1.6. Extracția asistată de microunde	30
3.2. Metode de analiză a compușilor bioactivi	31
3.2.1. Metode cromatografice de analiză a compușilor bioactivi	32
3.2.1.1. Cromatografia pe strat subțire	33

3.2.1.2. Cromatografia de lichide	35
3.2.1.3. Cromatografia de gaze	39
3.2.2. Analiza compușilor bioactivi prin spectrofotometria UV-VIS	41
PARTE EXPERIMENTALĂ	
CAPITOLUL 4. ALEGEREA METODEI EFICIENTE DE EXTRAȚIE A UNOR COMPUȘI BIOACTIVI DIN <i>SATUREJA HORTENSIS L. ȘI OCIMUM BASILICUM L.</i>	
4.1. Determinarea metodei eficiente de extracție a uleiurilor volatile din plantele studiate	43
4.1.1. Extracția uleiurilor volatile	44
4.1.2. Analiza calitativă a uleiurilor volatile	49
4.1.2.1. Analiza prin cromatografie pe strat subțire	49
4.1.2.2. Analiza prin cromatografia de gaze cu detector de ionizare în flacără	52
4.1.3. Analiza cantitativă a uleiurilor volatile	55
4.1.3.1. Analiza prin cromatografie pe strat subțire	55
4.2. Determinarea metodei eficiente de extracție a compușilor polifenolici din plantele studiate	57
4.2.1. Extracția compușilor polifenolici	59
4.2.2. Analiza calitativă a compușilor polifenolici	60
4.2.2.1. Analiza prin cromatografie pe strat subțire	60
4.2.2.2. Analiza prin cromatografia de lichide de înaltă performanță	62
4.2.3. Analiza cantitativă a compușilor polifenolici	69
4.2.3.1. Analiza spectrofotometrică	69
4.2.3.1.1. Analiza spectrofotometrică a flavonoidelor totale	69
4.2.3.1.2. Analiza spectrofotometrică a acizilor polifenolcarboxilici	72
4.2.3.2. Analiza prin cromatografie pe strat subțire	75
4.2.3.3. Analiza prin cromatografia de lichide de înaltă performanță	77
CAPITOLUL 5. INFLUENȚA MICROUNDDELOR ASUPRA UNOR COMPUȘI BIOACTIVI DIN <i>SATUREJA HORTENSIS L. ȘI OCIMUM BASILICUM L.</i>	
5.1. Creșterea plantelor luate în studiu în câmp de microunde	85
5.2. Determinarea pigmentilor asimilatori	90
5.2.1. Determinarea pigmentilor clorofilieni	90
5.2.2. Determinarea pigmentilor carotenoidici	92

5.3. Determinarea influenței microundelor asupra uleiurilor volatile din plantele supuse iradierii	97
5.3.1. Analiza calitativă a uleiurilor volatile	97
5.3.1.1. Analiza prin cromatografie pe strat subțire	97
5.3.1.2. Analiza prin cromatografia de gaze cuplată cu spectrometria de masă	99
5.3.2. Analiza cantitativă a uleiurilor volatile	102
5.3.2.1. Analiza prin cromatografia de gaze cu detector de ionizare în flacără	102
5.3.2.2. Analiza prin cromatografia de gaze cuplată cu spectrometria de masă	109
5.4. Determinarea influenței microundelor asupra compușilor polifenolici din plantele supuse iradierii	113
5.4.1. Analiza calitativă a compușilor polifenolici	113
5.4.2. Analiza cantitativă a compușilor polifenolici	116
5.4.2.1. Analiza spectrofotometrică	116
5.4.2.1.1. Analiza spectrofotometrică a flavonoidelor totale	116
5.4.2.1.2. Analiza spectrofotometrică al acizilor polifenolcarboxilici	117
5.4.2.2. Analiza prin cromatografia de lichide de înaltă performanță	118
5.5. Studii privind modificarea caracterului antioxidant în timpul iradierii plantelor cu microunde	119
5.5.1. Prepararea probei	119
5.5.2. Determinarea caracterului antioxidant al plantelor iradiate și neiradiate	120
5.5.2.1. Metoda DPPH	120
5.5.2.2. Metoda ORAC	122
5.5.2.3. Metoda TROLOX	124
CONCLUZII	127
BIBLIOGRAFIE	129
LISTA DE LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE ELABORATE	139
A. Lucrări publicate pe tematica abordată	139
B. Alte lucrări (publicate în extenso)	140
C. Lucrări publicate în rezumat la conferințe, simpozioane naționale și internaționale	141
D. Brevete	146
ARTICOLELE PUBLIFICATE PE TEMATICA TEZEI	

Cuvinte cheie: compuși bioactivi, cromatografie, spectroscopie UV-VIS, extracție, microunde.

LISTA DE ABREVIERI

AAPH	diclorhidrat de 2,2-azobis (2-amidinopropan)
ABTS	acid 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfonic)
AUC	aria de sub curbă (area under curve)
BI	busuioc iradiat
BR	busuioc neiradiat (de referință)
CI	cimbru iradiat
CR	cimbru neiradiat (de referință)
DPPH	capacitatea de îndepărtare a acestui radical (2,2-diphenyl-1-picryl hidrazyl radical scavenging)
FID	detector cu ionizare în flacără
GC	cromatografia de gaze
HPLC	cromatografie de lichide de înaltă performanță (high performance liquid chromatography)
IM	incinta cu microunde (de iradiere)
IR	incinta de referință
M	macerare
MAE	extracție în câmp de (asistată de) microunde (microwave-assisted extraction)
MS	spectrometrul de masă
NTS	difenilboriloxietilamină
ORAC	metoda de analiză bazată pe capacitatea de a reacționa cu oxigenul (oxygen radical absorbance capacity assay) a unor specii radicalice
PDA	photodiode array detector
PEG	polietilenglicol
TEAC	echivalenți trolox (trolox equivalent antioxidant capacity assay)
TLC	cromatografie pe strat subțire (thin-layer chromatography)
Trolox	acid 6 – hidroxi-2,5,7,8- tetrametil croman- 2-carboxilic
UAE	extracție asistată de ultrasunete (ultrasound-assisted extraction)
UV	ultraviolet
VIS	vizibil

INTRODUCERE

Progresele înregistrate în domeniul biologiei moleculare și al manipulărilor genetice oferă perspective promițătoare pentru intensificarea biosintezei unor compuși secundari, acționând la nivelul genelor reglatoare. Cu toate că există adesea diferențe relevante în ce privește sinteza și acumularea metaboliților secundari în diferite țesuturi sau în faze diferite ale dezvoltării plantei, genomul fiecărei celule conține informația necesară pentru a declanșa întregul potențial al metabolismului secundar caracteristic speciei.

Studii recente [1-3] indică faptul că prezența radiațiilor de microunde are efecte asupra sistemelor vii, chiar la nivele de putere sub limitele normativelor.

CONTRIBUȚII PERSONALE

În cadrul tezei de doctorat intitulată “Cercetări privind influența microundelor asupra compușilor bioactivi din *Satureja hortensis* L. și *Ocimum basilicum* L.” s-a avut ca scop principal determinarea efectului microundelor asupra compușilor bioactivi prezenți în cele două plante aromatice luate în studiu.

1. Principalul element de noutate al acestei teze constă în creșterea cimbrului și busuiocului în câmp de microunde de putere mică, în incinte anechoice identice și urmărirea variației cantității de compuși bioactivi în plantele iradiate comparativ cu cele de referință (crescute în același tip de incinte, dar fără câmp de microunde).
2. În acest sens s-a realizat un studiu privind stabilirea metodei optime de extracție a uleiurilor volatile și compușilor polifenolici (flavonoide și acizi polifenolcarboxilici), metodă care ulterior a fost utilizată la extracția acestor compuși din plante iradiate cu microunde și plante de referință. Stabilirea metodei optime de extracție a fost necesară, datorită cantităților mici de compuși bioactivi care se găsesc în plantele iradiate cu microunde și în plantele de referință, acestea având doar cinci săptămâni de la răsărire. În studiul efectuat a fost introdusă o metodă nouă de extracție – extracția în câmp de microunde aplicat în pulsuri într-o instalație de microunde concepută în cadrul INCDTIM, Cluj-Napoca.
3. Metodele de analiză clasice, utilizate pentru compușii bioactivi au fost aplicate extractelor obținute atât din plante iradiate, cât și de referință.

4. Elementele de noutate, cu importanță practică ridicată, constau în determinarea influenței microundelor asupra următoarelor clase de compuși bioactivi din plantele studiate: pigmenți asimilatori, uleiuri volatile și compuși polifenolici, literatura de specialitate ne reprezentând, la ora actuală, concluzii clare în ceea ce privește influența microundelor asupra compușilor bioactivi din plantele crescute în câmp de microunde de putere mică.
5. De asemenea, modificarea caracterului antioxidant al plantelor iradiate, comparativ cu cele neiradiate, reprezintă un element de noutate al tezei.
6. În urma investigațiilor efectuate s-a ajuns la concluzia că în plantele iradiate cantitatea de uleiuri volatile și compuși polifenolici crește, pe când cantitatea de pigmenți asimilatori scade față de plantele de referință.

Prin obiectivele, studiile și concluziile sale, lucrarea de față se aliniază tendințelor mondiale în domeniu.

PARTE EXPERIMENTALĂ

CAPITOLUL 4

ALEGEREA METODEI EFICIENTE DE EXTRACȚIE A UNOR COMPUȘI BIOACTIVI DIN *SATUREJA HORTENSIS L. ȘI OCIMUM BASILICUM L.*

4.1. Determinarea metodei eficiente de extracție a uleiurilor volatile din plantele studiate

Busuiocul (*Ocimum basilicum L.*) și cimbrul de grădină (*Satureja hortensis L.*), plante aromatice, mult folosite în alimentație datorită aromei distinctive puternice, au un conținut ridicat în uleiuri volatile.

4.1.1. Extractia uleiurilor volatile

Următorii solvenți și amestecuri de solvenți au fost utilizați pentru extracția uleiurilor volatile: E1 – hexan, E2 – eter etilic, E3 – etanol, E4 – hexan - eter etilic (1:1, v/v), E5 – eter etilic - etanol (1:1, v/v), E6 – hexan - eter etilic - etanol (1:1:1, v/v).

Tehnicile de extracție utilizate au fost: macerarea, extracția asistată de ultrasunete și extracția asistată de microunde.

4.1.2. Analiza calitativă a uleiurilor volatile

Calitatea extractelor a fost determinată prin metode cromatografice (TLC, GC-FID).

4.1.2.1. Analiza prin cromatografie pe strat subțire

Au fost supuse analizei extractele de busuioc și cimbru obținute cu sistemul E6: hexan – eter etilic – etanol (1:1:1, v/v), prin cele trei tehnici: macerare, ultrasonare și microunde. Analizele TLC s-au realizat pe plăci HPTLC Sil G F₂₅₄. Înainte de utilizare, plăcile au fost condiționate cu metanol și uscate la 110°C timp de 3 ore. Probele au fost aplicate cu un aplicator semiautomat Linomat 5, sub formă de benzi de 5 mm. Volumele aplicate au fost 20 μL pentru extractele de plante și 7 μL pentru standarde. Sistemul toluen - acetat de etil (93:7, v/v) a fost utilizat ca și fază mobilă. Vizualizarea plăcilor s-a realizat prin pulverizare cu anisaldehydă și încălzire timp de 3 min la 110°C, când benzile se colorează în roșu – albastrui. Plăcile astfel obținute au fost analizate la 365 nm, dar și în vizibil [187].

Din cromatogramele obținute pentru cimbru, respectiv busuioc, prin toate cele trei metode de extracție nu se observă nici o diferență din punct de vedere calitativ, ceea ce indică faptul că prin nici o metodă nu se degradează uleiurile volatile.

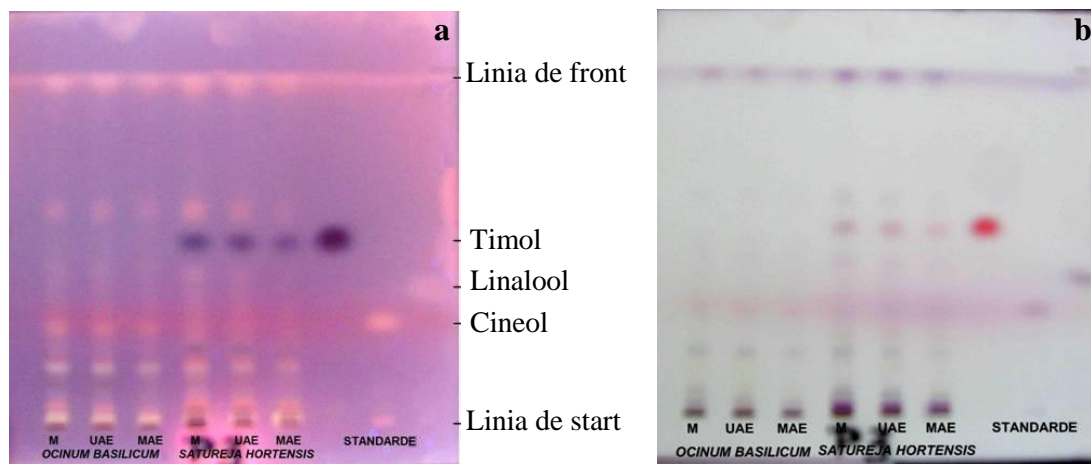


Figura 15. Identificarea cineolului, linaloolului și timolului din extractele de *Ocimum basilicum* L. și *Satureja hortensis* L. Faza staționară: HPTLC Sil G F₂₅₄. Faza mobilă: toluen - acetat de etil (93:7, v/v). Vizualizare: anisaldehydă la în 365 nm (a) și în vizibil (b).

4.1.2.2. Analiza prin cromatografia de gaze cu detector de ionizare în flacără

Analiza GC-FID s-a realizat cu un gaz cromatograf Shimadzu GC-2010 cu ionizare în flacără. Compușii au fost separați pe o coloană de metil silicon OV-17 (2 m). Temperatura cuptorului a fost programată astfel: 2 min la 80°C, 4°C/min pentru încălzire pe intervalul 80 – 200°C, 1 min la 200°C și apoi 20°C/min până la 260°C unde s-a menținut 35 min. Temperatura detectorului și injectorului a fost de 240°C, respectiv 260°C. Ca și gaz purtător s-a utilizat heliu, cu un debit de 15 mL/min, iar volumul injectat a fost de 2 μL [187-189].

Pe baza rezultatelor obținute prin GC-FID s-au ales condițiile eficiente de extracție a uleiurilor volatile din cimbru și busuioc: ultrasonarea în hexan - eter etilic (1:1, v/v) pentru cimbru și extracția în câmp de microunde în eter etilic - etanol (1:1, v/v) pentru busuioc.

4.2. Determinarea metodei eficiente de extracție a compușilor polifenolici din plantele studiate

Extractul polifenolic obținut poate fi analizat atât global - nespecific, prin determinarea polifenolilor totali cât și specific.

4.2.1. Extractia compușilor polifenolici

De fiecare dată au fost supuse extracției câte 0,5 g pulbere vegetală utilizând câte 40 mL amestec hidroalcoolic de extracție de diferite concentrații (tabel 2). Înainte de refluxare, ultrasonare și extracție în câmp de microunde, pulberea vegetală a fost lăsată timp de 30 minute la macerare.

Tabel 2. Compoziția sistemelor de extracție utilizate: amestec etanol - apă (v/v)

ES1	ES2	ES3	ES4	ES5	ES6	ES7
100:0	90:10	80:20	70:30	60:40	50:50	40:60

Tehnicile de extracție utilizate:

- Macerarea s-a realizat în 14 zile, la temperatura de 30°C.
- Refluxarea a avut loc la temperaturi mai mari de 70°C, timp de 30 minute.
- Extracția asistată de ultrasunete, utilizând o baie ultrasonică Elmasonic s-a realizat la temperatura de 70°C, timp de 30 minute.

d) Extracția asistată de microunde s-a realizat în instalația pentru procesare dinamică a substanței în câmp de microunde de putere [186]. Extracția s-a realizat la o putere de 900 W, la o temperatură fixată la 70°C și la presiune atmosferică, cu un coeficient de umplere 40%, timp de 2 minute. Timpul total de extracție a fost mai lung decât timpul de acțiune a microundelor, deoarece sistemul a avut nevoie de un timp suplimentar de răcire.

4.2.2. Analiza calitativă a compușilor polifenolici

4.2.2.1. Analiza prin cromatografie pe strat subtire

Identificarea compușilor polifenolici s-a realizat pentru extractele de *Satureja hortensis L.* obținute prin macerare, refluxare și extracție în câmp de microunde de putere [205].

Din extractele preparate (ES3-ES7) s-au aplicat cu ajutorul unei microsiringi Hamilton câte 10 μL pe placa cromatografică (10 X 10 cm HPTLC) cu silicagel. Atât extractele, cât și standardele au fost aplicate sub formă de bandă de 0,7 cm la 1,5 cm distanță de marginea inferioară și laterală a plăcii. Ca fază mobilă s-a folosit sistemul: n-hexan - acetat de etil - acid formic (30:20:1,5 v/v). Pentru identificare s-au folosit soluții metanolice de luteolin (1 mg/mL) și acid rozmarinic (0,7 mg/mL). Plăcile au fost dezvoltate pe o distanță de 8 cm în camere cromatografice, saturate în prealabil timp de 15 minute. Vizualizarea plăcilor s-a realizat după pulverizarea plăcilor cu NTS/PEG 400 (difenilboriloxietilamină /polietilenglicol 400) la 365 nm.

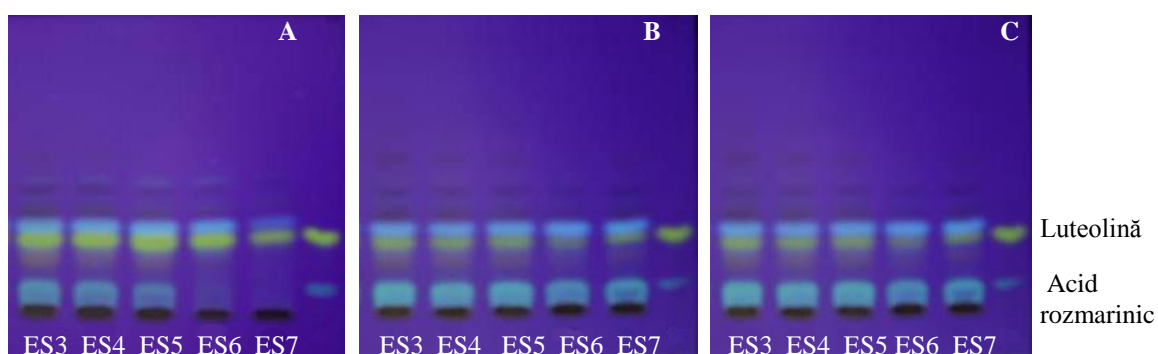


Figura 23. Cromatograma extractelor de *Satureja hortensis L.* (ES3-ES7): A-macerare, B-refluxare, C-extracție în câmp de microunde, alături de soluțiile standard. Faza staționară: TLC Sil G.

Faza mobilă: n-hexan - acetat de etil - acid formic (30:20:1,5 v/v).

Vizualizare: NTS/PEG 400 la 365 nm.

4.2.2.2. Analiza prin cromatografie de lichide de înaltă performanță

La analiza calitativă a compușilor polifenolici s-au utilizat extractele de cimbru și busuioc obținute prin refluxare cu sistemul etanol – apă (70:30, v/v). Analiza cromatografică s-a realizat cu un sistem Shimadzu, alcătuit dintr-o pompă binară, degazor, autosampler, termostat setat la temperatura de 30°C, detector PDA și MS. Separarea s-a realizat pe o coloană RP-18 cu o fază mobilă de acetonitril și apă (cu acid formic 1%). Eluția începe cu un gradient liniar pornind cu acetonitril 5% până la acetonitril 42% în 5 minute, urmată de o eluție cu un gradient liniar cu acetonitril până la 35% în 25 minute. Debitul fazei mobile a fost de 0,43 mL/min, iar volumul de injecție de 10 μL.

În urma analizei calitative a extractului de *Satureja hortensis* L., prin compararea timpilor de retenție și lungimea de undă maximă a substanțelor etalon cu timpii de retenție și lungimea de undă maximă a compușilor din probe și după masa lor moleculară s-au identificat următorii compuși: acid cafeic, acid rozmarinic, luteolina, naringenin și apigenina.

În urma analizei calitative a extractelor de *Ocimum basilicum* L., prin compararea timpilor de retenție, a lungimilor de undă corespunzătoare maximelor substanțelor etalon cu cele ale compușilor din probe și după masa lor moleculară s-au identificat următorii compuși: acid cafeic, acid rozmarinic.

4.2.3. Analiza cantitativă a compușilor polifenolici

Analiza cantitativă a compușilor polifenolici s-a realizat prin două metode de analiză: spectrofotometrice și cromatografice.

4.2.3.1. Analiza spectrofotometrică

4.2.3.1.1. Analiza spectrofotometrică a flavonoidelor totale

Conținutul total de flavonoide s-a determinat spectrofotometric în urma reacției cu reactivul AlCl₃ [206].

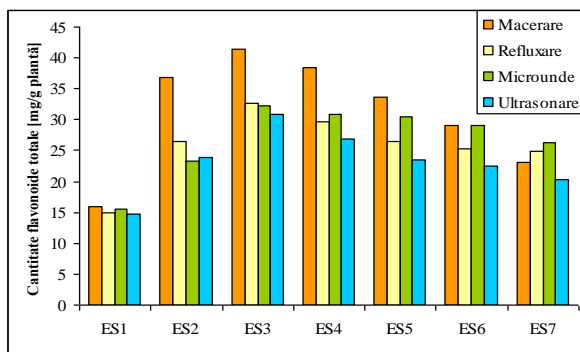


Figura 30. Diagrama comparativă a cantității totale de flavonoide în funcție de solventul folosit și tehnica de extracție utilizată pentru *Satureja hortensis L.*

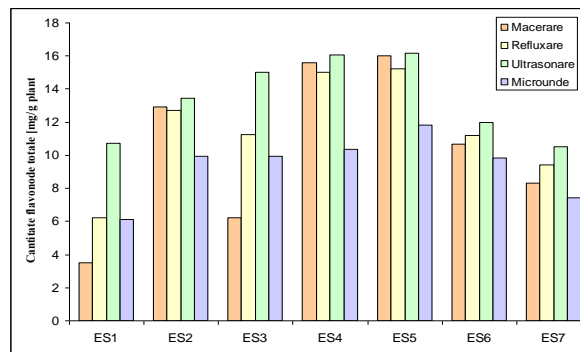


Figura 31. Diagrama comparativă a cantității totale de flavonoide în funcție de solventul folosit și tehnica de extracție utilizată pentru *Ocimum basilicum L.*

Pentru extracția flavonoidelor din *Satureja horetnsis L.*, extracția prin ultrasonare, folosind amestecul de solvenți EtOH-H₂O (80:20, v/v), în timp ce pentru extracția flavonoidelor din *Ocimum basilicum L.*, extracția prin ultrasonare, folosind amestecul de solvenți EtOH-H₂O (60:40, v/v), se arată a fi cea mai bună metodă din punct de vedere al cantității de compus extras și a timpului necesar pentru extracție.

4.2.3.1.2. Analiza spectrofotometrică a acizilor polifenolcarboxilici

Conținutul total de acizi polifenolcarboxilici (de tip acid cafeic) s-a determinat spectrofotometric în urma reacției cu reactivul Arnow [207].

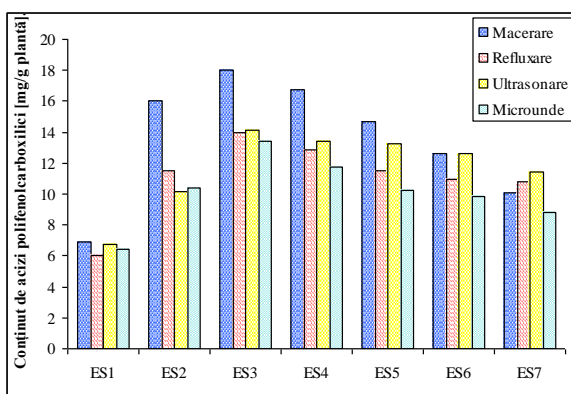


Figura 33. Cantitatea de acizi polifenolcarboxilici extrași din *Satureja hortensis L.* prin diferite tehnici utilizând diferite sisteme de extracție.

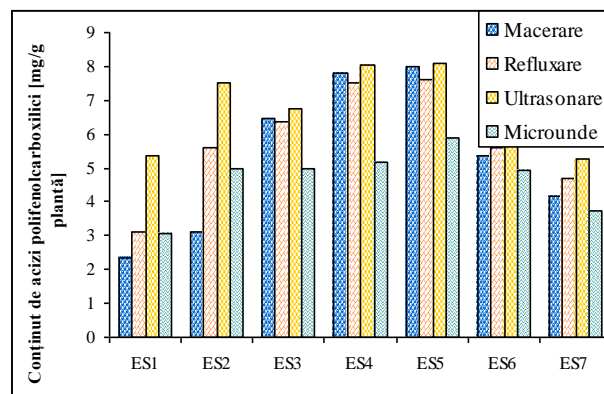


Figura 34. Cantitatea de acizi polifenolcarboxilici extrași din *Satureja hortensis L.* prin diferite tehnici utilizând diferite sisteme de extracție.

Cantitatea de acizi polifenolcarboxilici extrași atât din *Satureja hortensis* L., cât și din *Ocimum basilicum* L. diferă de tehnica de extracție utilizată și de sistemul de extracție utilizat. Astfel, acizii polifenolcarboxilici din cimbru se extrag mai bine cu sistemul de extracție ES3, în timp ce din busuioc sistemul ES5 este cel mai eficient. Ca tehnică de extracție cea mai bună este macerarea, urmată de ultrasonare, refluxare și microunde.

4.2.3.2. Analiza prin cromatografie pe strat subțire

Din ecuația dreptelor de calibrare ale acidului rozmarinic și a luteolinei s-au calculat concentrațiile acestora în extractele de *Satureja hortensis* L., iar rezultatele obținute sunt comparate în diagrama prezentată în figurile 37 și 38.

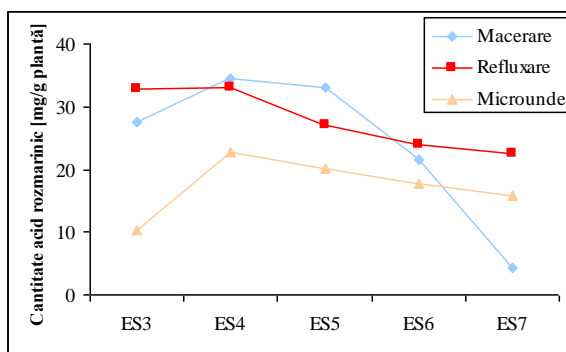


Figura 37. Diagrama comparativă a conținutului de acid rozmarinic în extractele studiate.

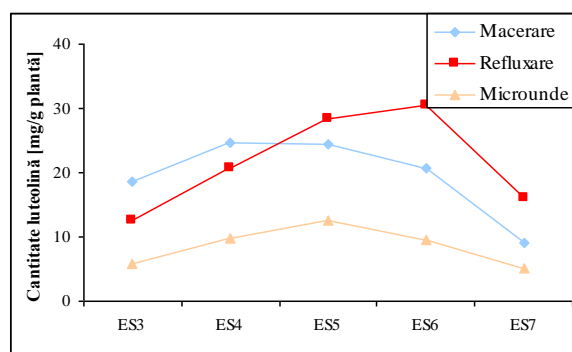


Figura 38. Diagrama comparativă a conținutului de luteolin în extractele studiate.

Comparând tehnicile de extracție, se poate observa că cea mai mare cantitate de luteolină și acid rozmarinic se extrage prin refluxare, urmată de macerare.

4.2.3.3. Analiza prin cromatografie de lichide de înaltă performanță

Rezultatele obținute în urma analizei cantitative sunt reprezentate în graficele de mai jos.

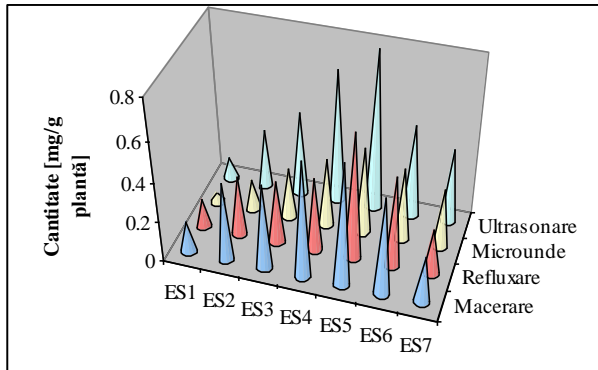


Figura 44. Cantitatea de acid cafeic extrasă din *Satureja hortensis* L.

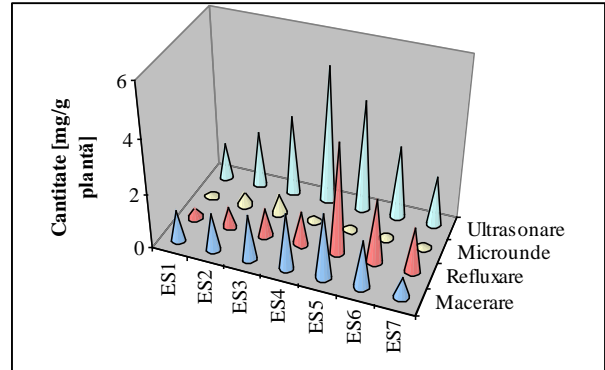


Figura 45. Cantitatea de acid rozmarinic extrasă din *Satureja hortensis* L.

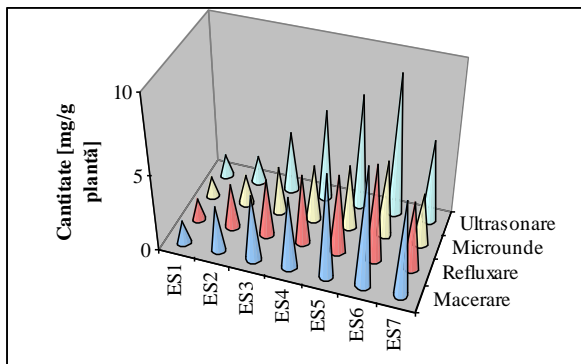


Figura 46. Cantitatea de luteolină extrasă din *Satureja hortensis* L.

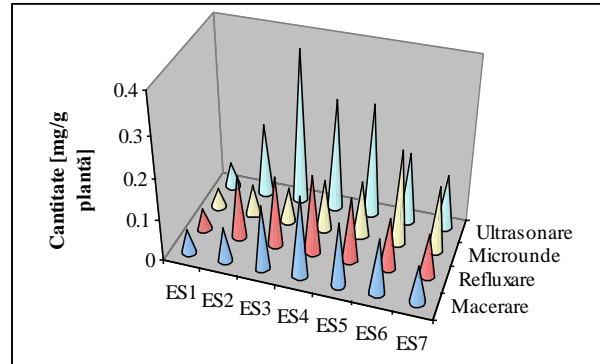


Figura 47. Cantitatea de naringenină extrasă din *Satureja hortensis* L.

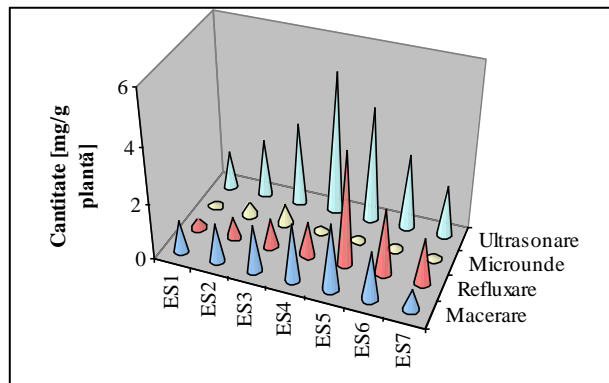


Figura 48. Cantitatea de apigenină extrasă din *Satureja hortensis* L.

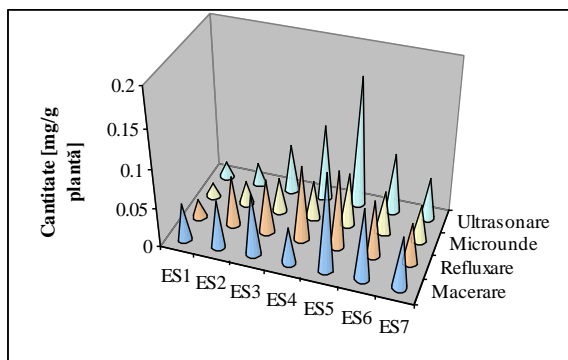


Figura 49. Cantitatea de acid cafeic extrasă din *Ocimum basilicum L.*

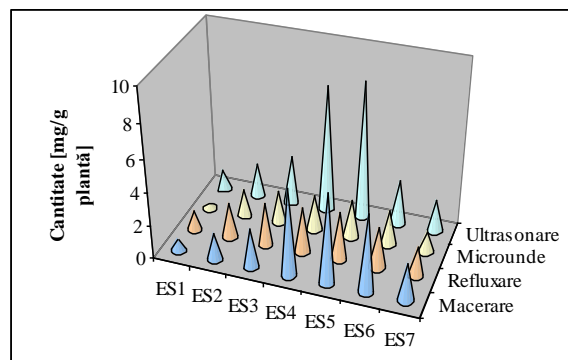


Figura 50. Cantitatea de acid rozmarinic extrasă din *Ocimum basilicum L.*

Compoziția acestor extracte, nu variază din punct de vedere calitativ cu tehnica de extracție utilizată. Cantitatea extrasă, depinde de solventul de extracție folosit și de tipul de compus polifenolic extras, precum și de tehnica de extracție folosită.

CAPITOLUL 5

INFLUENȚA MICROUNDTELOR ASUPRA UNOR COMPUȘI BIOACTIVI DIN *SATUREJA HORTENSIS L. ȘI OCIMUM BASILICUM L.*

5.1. Creșterea plantelor luate în studiu în câmp de microunde

Plantele luate în studiu au fost crescute în laborator, din semințe provenite de la firma ARO. La trei săptămâni după semănare, vasele cu plantele răsărite au fost introduse în două incinte anechoice identice [209], una de referință și una în care acționează câmpul de microunde (figura 51). Acest lot a fost numerotat 1. Alt lot de plante (numai busuioc) a fost introdus în incinte, pentru iradiere, la 20 săptămâni după semănare (alt stadiu de dezvoltare) - lotul 2.

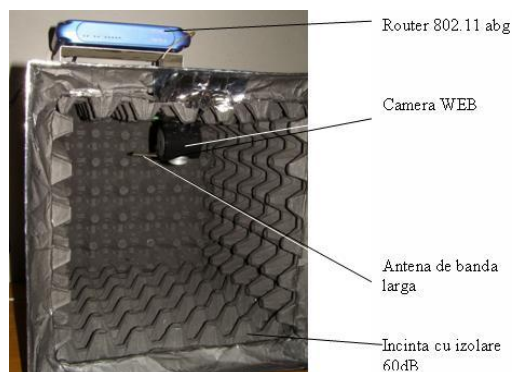


Figura 51. Instalație pentru stimularea dezvoltării plantelor prin aplicarea unui câmp electromagnetic de mică putere.

În prima incintă de referință (IR) s-a amplasat proba martor, iar în cea de-a doua (IM) proba iradiată cu microunde la frecvența de 2.45 GHz și putere de 14 dBm, radiație provenită dintr-un router wireless, prin intermediul unei antene special concepute. Iradierea s-a efectuat pe o perioadă de două săptămâni, de fiecare dată, după care plantele au fost scoase din incinte și crescute în cameră.

5.2. Determinarea pigmentilor asimilatori

Determinarea clorofilelor și a carotenoidelor din plantele de referință și din cele supuse iradierii s-a efectuat doar pe busuioc, deoarece cimbrul a fost mai sensibil la prezența câmpului de microunde și mai multe plante au murit fie în camerele de iradiat, fie după ce au fost scoase din ele.

Probele de plante (1 gram) au fost omogenizate cu ajutorul unui Ultraturrax în prezența a 20 mL 90% acetonă în apă și apoi lăsate timp de două ore sub agitare. Se repetă extracția cu încă 10 mL 90% acetonă în apă până la decolorarea materialului vegetal. Probele se filtrează și se înregistrează spectrul în VIS cu ajutorul unui spectrofotometru UV-VIS de tip Jasco V-530.

5.2.1. Determinarea pigmentilor clorofilieni

Calculul concentrației pigmentilor clorofilieni se face prin citirea absorbțiilor la lungimile de undă 663, 648 și 470 nm, după următoarele formule:

$$\text{clorofila a (mg/g țesut proaspăt)} = (11,75 \times A_{663} - 2,35 \times A_{645}) \times 50 / 500$$

$$\text{clorofila b (mg/g țesut proaspăt)} = (18,61 \times A_{645} - 3,96 \times A_{663}) \times 50 / 500$$

Conținutul în clorofilă a și b din probele analizate este prezentat în graficul de mai jos.

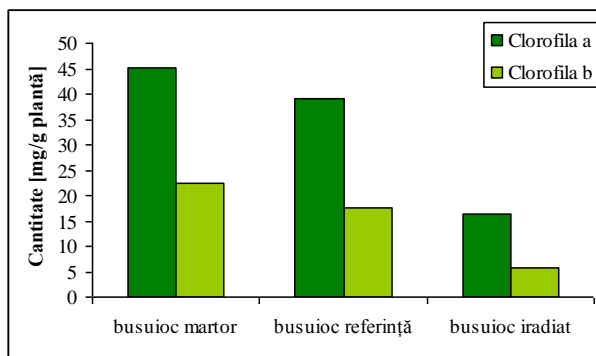


Figura 58. Conținutul în clorofila a și clorofila b din plantele analizate.

Conținutul în clorofilele a și b este mai mare pentru planta martor luată din natură, decât restul probelor analizate, iar conținutul în clorofila a este întotdeauna mai mare decât cel în clorofila b. De asemenea, conținutul în clorofilele a și b din plantele supuse microundelor a fost mai mic decât cele din plantele de referință.

5.2.2. Determinarea pigmentilor carotenoidici

Pigmenții carotenoidici au fost analizați prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC). Sistemul HPLC a constat din pompe LC20 AT Shimadzu și detector Shimadzu PDA. S-a utilizat o coloană YMC C30 (25 cm x 4.6 mm, diametrul particulelor 5 μm). Faza mobilă a constat din două amestecuri de solvenți: A – metanol/metil-tert-butil-eter/apă (81:15:4, v/v) și B – format din aceeași componenți în raport de 6:90:4 (v/v). S-a folosit un gradient liniar de la 1% B la 100% B în 90 min. Identificarea carotenoidelor s-a bazat pe comparația cu timpii de retenție ai standardelor și pe spectrele de absorbție.

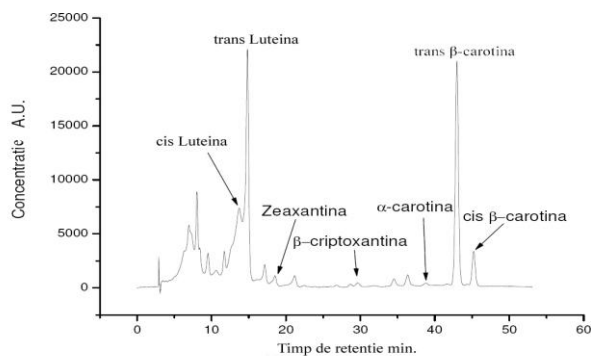


Figura 60. Cromatograma HPLC pentru carotenoidele din extractul acetonc de busuioc neiradiat.

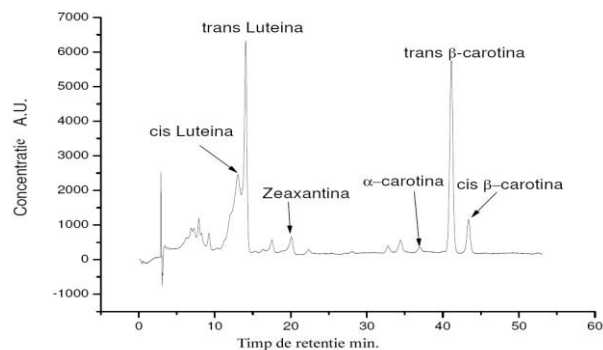


Figura 61. Cromatograma HPLC pentru carotenoidele din extractul acetonc de busuioc supus în prealabil la microunde.

Se poate observa că pigmenții carotenoidici majoritari în probele studiate sunt β -carotina și luteina, iar ca pigmenți minoritari zeaxantina și β -criptoxantina .

Extractul obținut a fost trecut în eter etilic, iar conținutul total de carotenoide a fost determinat spectrofotometric după relația de mai jos [210]:

$$X \text{ (mg carotenoide)} = (A \times V \times 1000) / (2500 \times l \times 100)$$

în care: A = absorbția probei citită la $\lambda_{\max} = 450 \text{ nm}$; V = volumul probei (mL); 2500 = coeficient de absorbție molar (E1%) pentru carotenoide; l = 1 cm – lungimea cuvei spectrofotometrului (drumul optic).

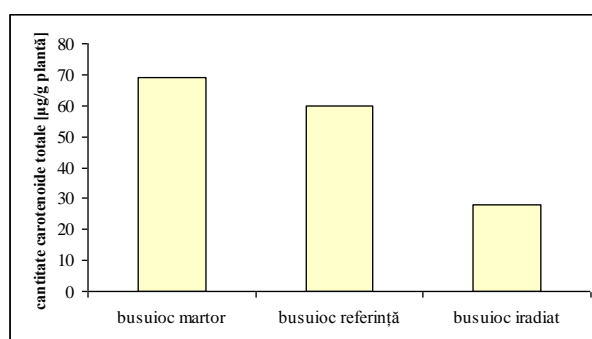


Figura 64. Conținutul în carotenoide totale din plantele analizate.

Se poate observa din graficul de mai sus că valorile obținute pentru carotenoidele totale în extractul obținut din planta martor luată din natură este mai mare decât la celelalte probe analizate. De asemenea, conținutul total de carotenoide din plantele supuse microundelor a fost mai mic decât cele din plantele de referință.

5.3. Determinarea influenței microundelor asupra uleiurilor volatile din plantele supuse iradierii

Materialul vegetal obținut a fost prelucrat conform protocolului stabilit în capitolul 4, utilizând metodele de extracție eficiente pentru uleiurile volatile.

5.3.1. Analiza calitativă a uleiurilor volatile

Analiza uleiurilor volatile din plantele supuse iradierii cu microunde și din plantele de referință s-a realizat prin cromatografie pe strat subțire și cromatografie de gaze cuplată cu spectrometria de masă.

5.3.1.1. Analiza prin cromatografie pe strat subțire

Analiza cromatografică a fost realizată conform punctului 4.1.2.1., utilizând plăci HPTLC Sil G F₂₅₄, amestecul toluen – acetat de etil (93:7, v/v) ca fază mobilă, pulverizare cu anisaldehydă și inspectare în domeniul VIS și UV la 365 nm.

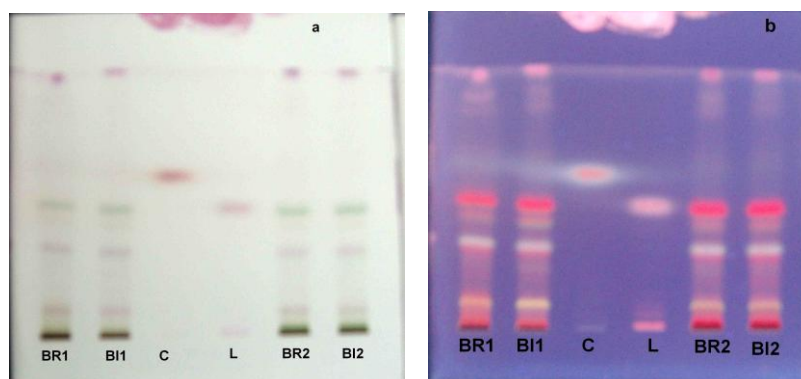


Figura 65. Cromatogramele extractelor de busuioc, alături de etaloane: C – cineol, L – linalool.

Faza staționară: HPTLC Sil G F₂₅₄. Faza mobilă: toluen – acetat de etil (93:7, v/v).

Vizualizare: anisaldehydă în vizibil (a) și la 365 nm (b).

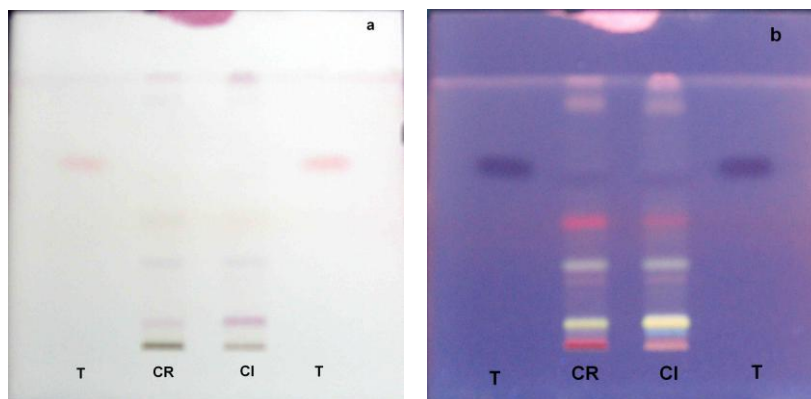


Figura 66. Cromatogramele extractelor de cimbru, alături de etaloane: C – cineol, L – linalool.

Faza staționară: HPTLC Sil G F₂₅₄. Faza mobilă: toluen – acetat de etil (93:7, v/v).

Vizualizare: anisaldehydă în vizibil (a) și la 365 nm (b).

La o studiere mai atentă a amprentelor cromatografice se observă că:

- nu apar modificări în amprenta cromatografică, fiind prezenți aceiași compuși bioactivi, adică iradierea cu microunde nu a dus la apariția de noi compuși;
- se observă modificări ale concentrației compușilor bioactivi în plantele radiate față de cele neiradiate.

5.3.1.2. Analiza prin cromatografie de gaze cuplată cu spectrometria de masă

Analiza GC-MS a extractelor obținute s-a realizat utilizând un sistem cuplat GC-MS, Thermo Electron Corporation, Trace Ultra / Polaris Q, pornindu-se de la o temperatură de 60°C, încălzind în 2 trepte: mai întâi cu 10°C/min până la 120°C, iar apoi cu 4°C până la 300°C. Temperatura de injectare a fost de 250°C, iar volumul injectat 2 μL. Coloana capilară utilizată a fost DB5, 30 m.

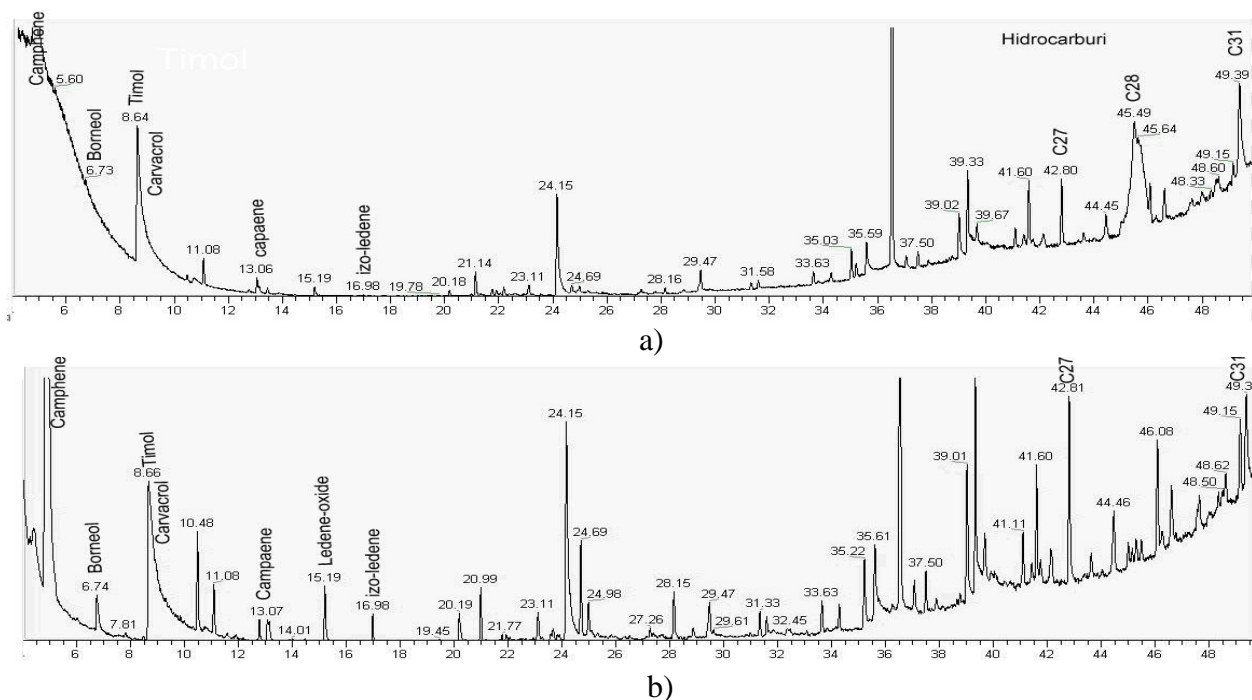


Figura 67. Cromatogramele GC-MS ale extractelor de cimbru: a) planta de referință;
b) planta iradiată cu microunde.

Din cromatograme se observă că extractele de cimbru conțin o cantitate mare de timol și carvacrol. Cimbrul de referință și cel iradiat conțin aceiași compuși majoritari, dar în cantități mai mari în cel iradiat (mai mult camphen, borneol, timol, carvacrol, leden-oxid etc).

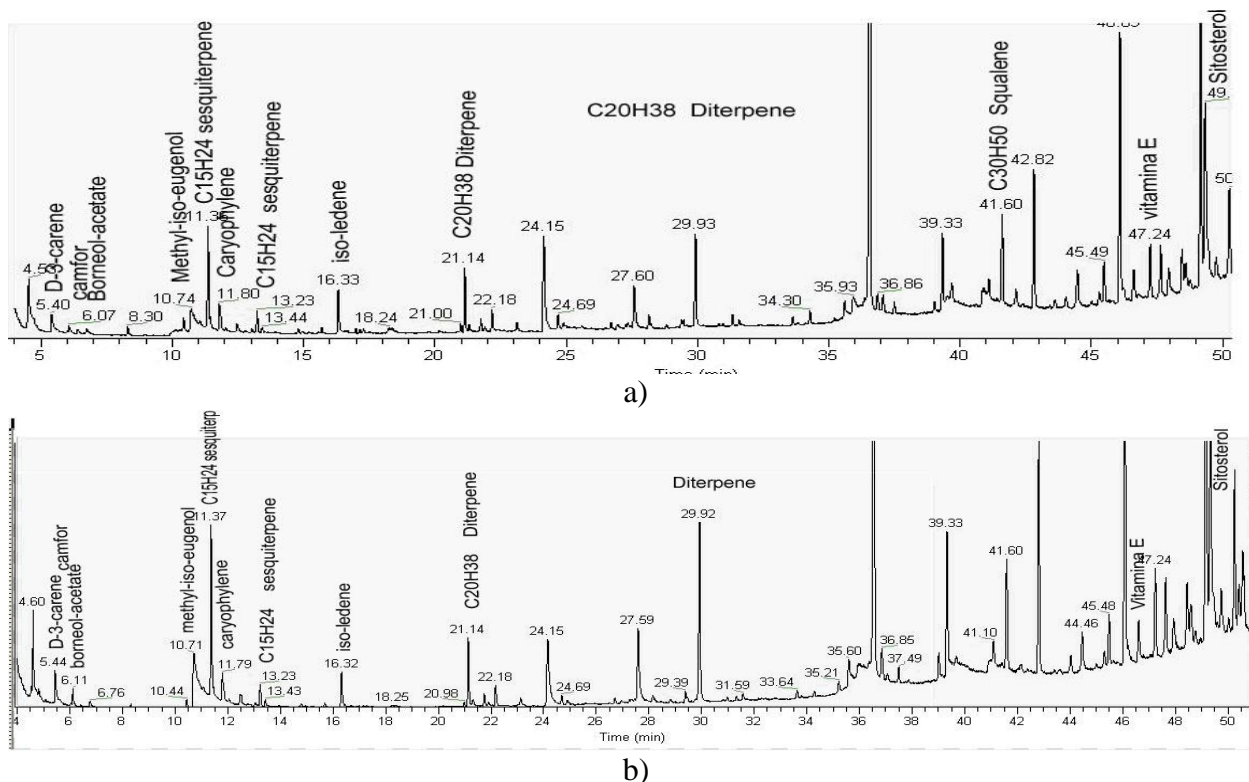


Figura 68. Cromatogramele GC-MS ale extractelor de busuioc: a) planta referință;
b) planta iradiată cu microunde.

În cazul busuiocului iradiat s-a găsit un conținut mare de terpene, sesquiterpene și diterpene, pe lângă hidrocarburi și alți compuși. La fel ca și în cazul cimbrului, planta iradiată e mai bogată în compuși bioactivi, rezultat observat și prin celelalte tehnici de analiză utilizate.

5.3.2. Analiza cantitativă a uleiurilor volatile

Determinarea cantitativă a uleiurilor volatile s-a realizat prin două metode, una bazată pe trasarea curbelor de calibrare și determinarea concentrațiilor din ecuațiile dreptelor, iar a doua, bazată pe determinarea procentului din fiecare ulei volatil aflat în compoziție.

5.3.2.1. Analiza prin cromatografie de gaze cu detector de ionizare în flacără

Utilizând curbele de calibrare înregistrate, s-a determinat și compoziția în ulei volatil $\mu\text{g/g}$ plantă pentru câteva uleiuri volatile.

Pentru cromatogramele înregistrate s-a realizat integrarea tuturor picurilor, suma ariilor reprezentând 100%. Pe baza ariilor determinate prin integrare s-a stabilit procentul cu care contribuie compușii identificați la compoziția extractelor obținute.

Din cromatogramele înregistrate, atât prin GC-FID, cât și prin GC-MS s-a constatat că: compoziția chimică a extractelor din plantele iradiate cu microunde și neiradiate este aceeași, dar cantitatea de uleiuri volatile diferă. Aceasta diferă și în funcție de stadiul de dezvoltare al plantei.

În cazul busuiocului:

- componenții majori sunt: metil-iso-eugenol, eugenol, limonen, linalool, metil p-metoxicinamat, iso-ledena;
- busuiocul iradiat conține o cantitate mult mai mare de metil-iso-eugenol (de 6,7 ori mai mare) și eugenol (aproape dublu) decât cel neiradiat;
- busuiocul din lotul 2 conține borneol, care în lotul 1 este în urme.

În cazul cimbrului:

- componentul majoritar este timolul, însoțit de o cantitate foarte mică de carvacrol;
- ambele tipuri de extracte conțin cariophyllene în cantitate aproximativ egală;
- în cimbrul iradiat crește foarte mult cantitatea de triciclene (de 6 ori).

5.4. Determinarea influenței microundelor asupra compușilor polifenolici din plantele supuse iradierii

Pentru caracterizarea plantelor iradiate și neiradiate cu microunde compușii polifenolici au fost extrași cu metoda de extracție stabilită anterior. În acest sens 0,5 g de plantă iradiată și neiradiată au fost extrase în 40 mL amestec etanol – apă (80:20, v/v), în cazul *Saturejei hortensis* L., respectiv în 40 mL amestec etanol – apă (60:40, v/v), în cazul *Ocimum basilicum* L. prin ultrasonare timp de 30 minute. Rezultatele obținute la plantele supuse tratamentelor cu microunde au fost analizate și interpretate comparativ cu datele înregistrate la plantele de referință, cultivate în condiții similare fără însă a fi supuse iradierii.

5.4.1. Analiza calitativă a compușilor polifenolici

Cromatogramele obținute pentru extractele din planta iradiată și neiradiată sunt prezentate în figurile 76 și 77.

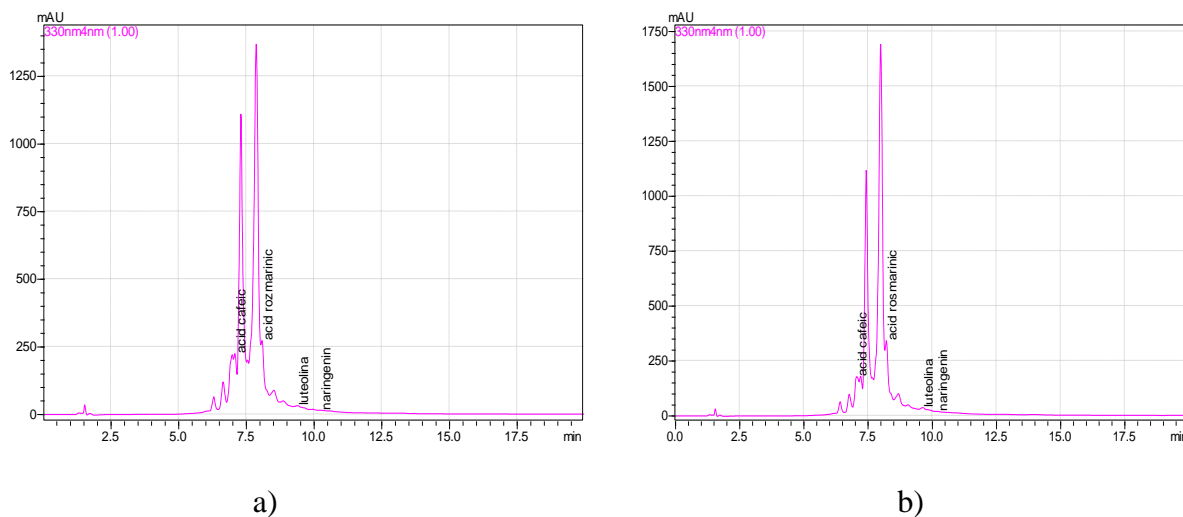


Figura 76. Cromatogramele extractelor de *Satureja hortensis* L.: a) neiradiat, b) iradiat obținute prin ultrasonare cu amestec EtOH – H₂O (80:20, v/v).

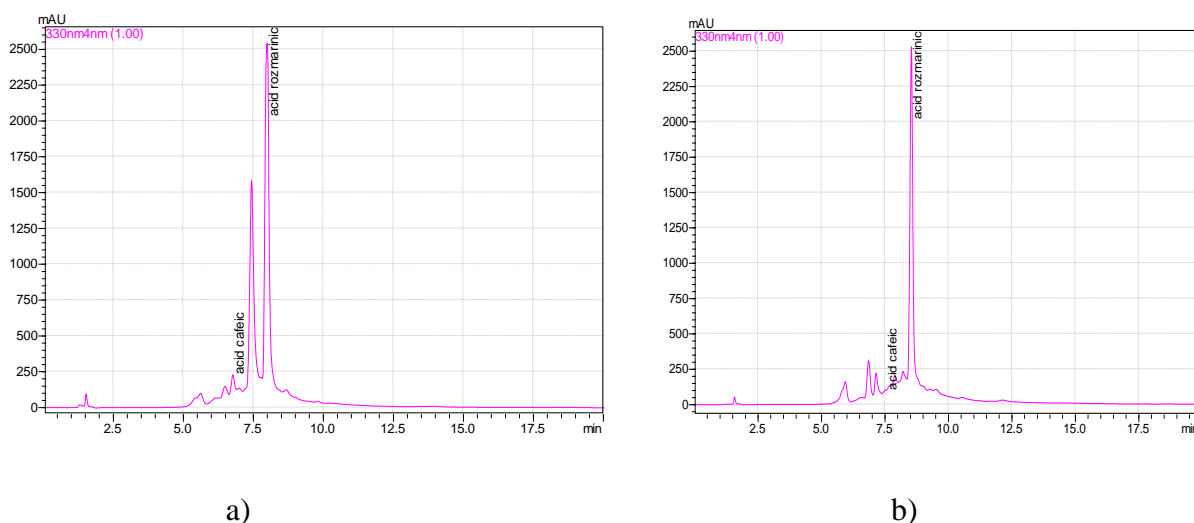


Figura 77. Cromatogramele extractelor de *Ocimum basilicum* L.: a) neiradiat, b) iradiat obținute prin ultrasonare cu amestec EtOH – H₂O (60:40, v/v).

În urma analizei calitative s-au identificat acidul cafeic și rozmarinic atât în extractele de cimbru, cât și în extractele de busuioc. Pe lângă acești compuși în extractele de cimbru s-au identificat luteolina și naringeninul.

5.4.2. Analiza cantitativă a compușilor polifenolici

Analiza cantitativă a compușilor polifenolici s-a realizat prin două metode de analiză: spectrofotometrie și cromatografie de lichide de înaltă performanță.

5.4.2.1. Analiza spectrofotometrică a compușilor polifenolici

Prin analiza spectrofotometrică s-a determinat conținutul total de flavonoide și de acizi polifenolcarboxilici (de tip acid cafeic).

5.4.2.1.1. Analiza spectrofotometrică a flavonoidelor totale

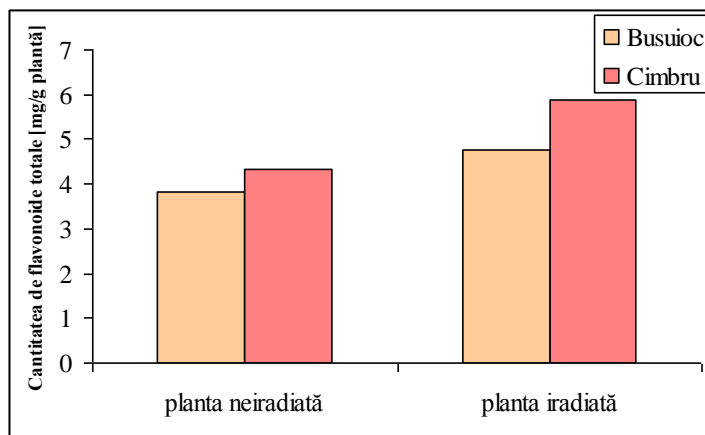


Figura 78. Diagrama comparativă a cantității totale de flavonoide.

Se observă că în plantele iradiate cantitatea de flavonoide este mai mare decât în plantele de referință.

5.4.2.1.2. Analiza spectrofotometrică a acizilor polifenolcarboxilici

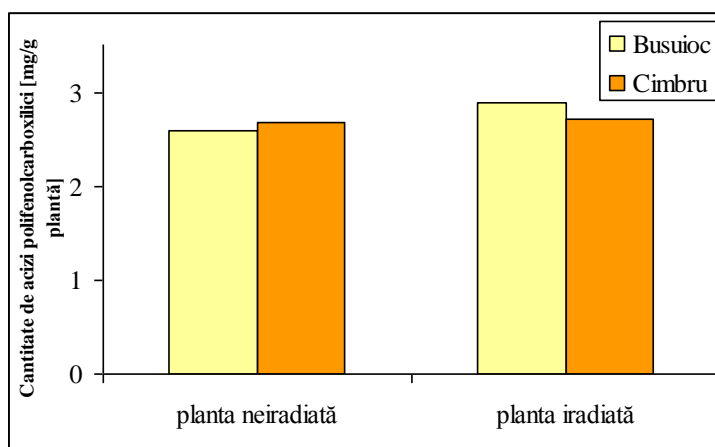


Figura 79. Diagrama comparativă a cantității de acizi polifenolcarboxilici de tip acid cafeic.

Cantitatea de acizi polifenolcarboxilici atât în cimbru, cât și în busuioc crește în plantele iradiate față de cele de referință.

5.4.2.2. Analiza prin cromatografie de lichide de înaltă performanță

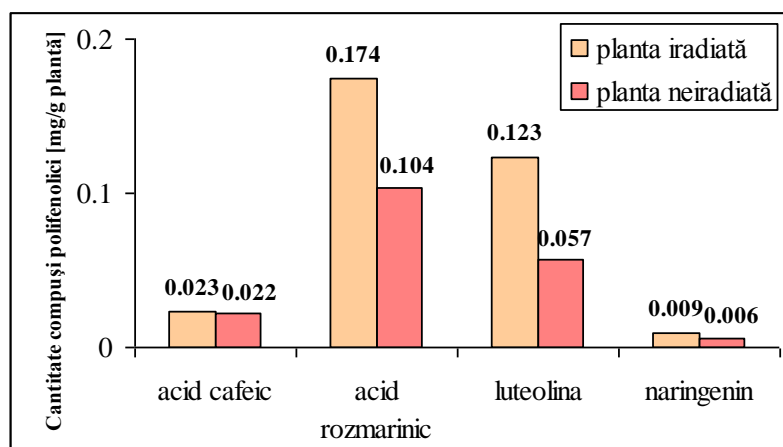


Figura 80. Diagrama comparativă a cantității de compuși polifenolcarboxilici din *Satureja hortensis* L.

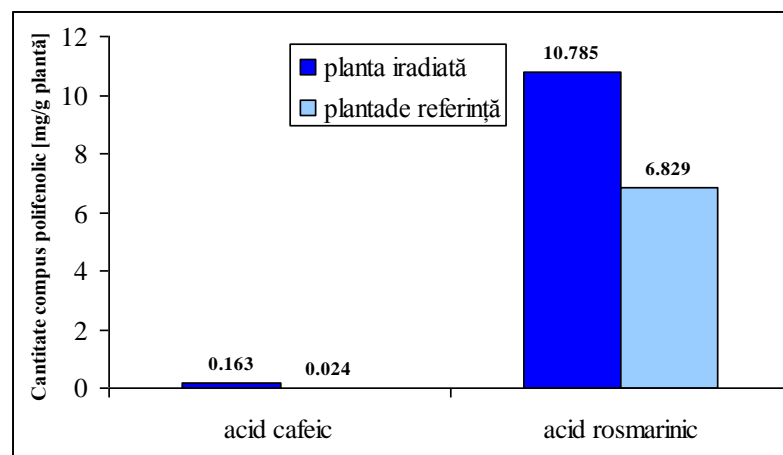


Figura 81. Diagrama comparativă a cantității de compuși polifenolcarboxilici din *Ocimum basilicum* L.

Compușii majoritari atât în cimbru, cât și în busuioc sunt acidul rozmarinic și acidul cafeic. De asemenea se poate observa că în plantele supuse iradierii cu microunde cantitatea de compuși polifenolici este mai mare decât în plantele de referință.

5.5. Studii privind modificarea caracterului antioxidant în timpul iradierii plantelor cu microunde

Determinarea caracterului antioxidant s-a efectuat doar pe busuioc, deoarece o mare parte din cimbru au murit înainte de a fi scoase din camere.

5.5.1. Prepararea probei

Pentru determinarea caracterului antioxidant al busuiocului s-au luat în studiu frunze proaspete iradiate și neiradiate, din aceeași cultură din care s-au determinat polifenolii.

Un gram de frunze proaspete s-a mojarat cu 1 g nisip cuarțos după care s-a adăugat 25 mL etanol 80%. Amestecul s-a agitat timp de 1 h la 4°C după care s-a centrifugat la 10000 rpm timp de 15 minute. Supernatantul s-a îndepărtat, iar pelteul s-a reluat cu 5 mL etanol 80%, s-a agitat timp de 15 minute și s-a centrifugat urmând aceeași procedură. Supernatantele s-au reunit în final. Fiecare probă s-a extras independent în triplicat, iar analizele s-au efectuat în aceeași zi.

5.5.2. Determinarea caracterului antioxidant al plantelor iradiate și neiradiate

5.5.2.1. Metoda DPPH

Metoda DPPH este des utilizată datorită stabilității, simplității și reproductibilității sale [213]. Activitatea antioxidantă determinată prin testul DPPH pentru busuiocul iradiat este diferită de aceea a busuiocului de referință care prezintă o activitate antioxidantă mai scăzută.

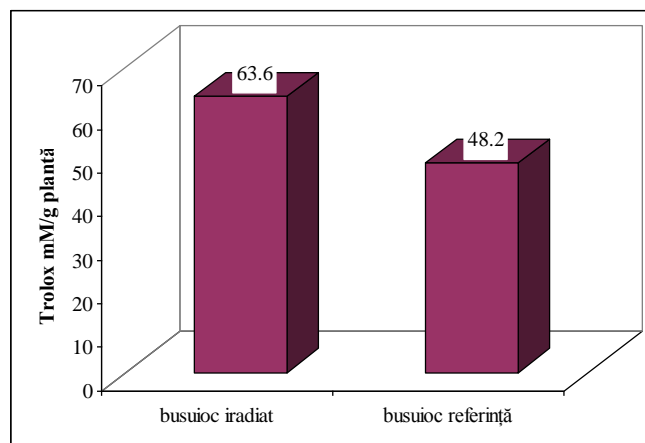


Figura 83. Activitatea antioxidantă al extractelor alcoolice analizate prin metoda DPPH.

5.5.2.2. Metoda ORAC

S-a utilizat metoda descrisă de Huang și colaboratorii [215]. Valorile ORAC au fost calculate așa cum sunt descrise de Cao și Prior [216].

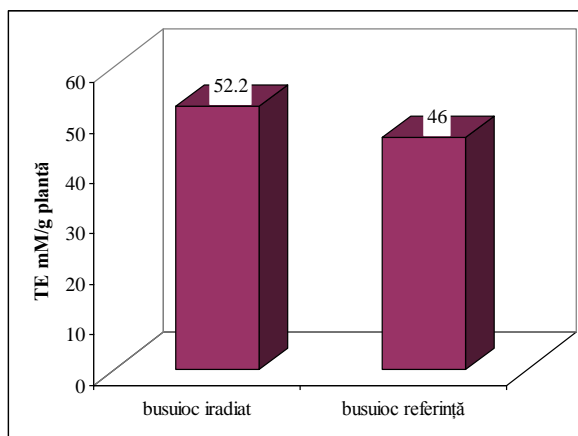


Figura 85. Activitatea antioxidantă a extractelor alcoolice analizate prin metoda ORAC.

Extractul de busuioc iradiat (52,2 mM TE/g plantă) prezintă o mai mare valoare ORAC în comparație cu extractul de busuioc referință (46 mM TE/g).

5.5.2.3. Metoda TROLOX

Pentru testul ABTS, protocolul urmează metoda propusă de Arnao [212].

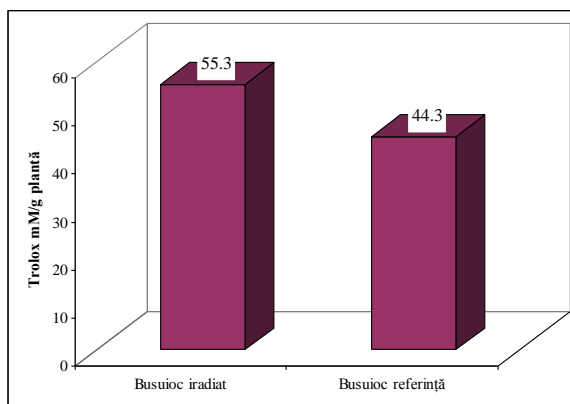


Figura 87. Activitatea antioxidantă a extractelor alcoolice analizate prin metoda TEAC.

Extractul de busuioc iradiat are o activitate antioxidantă semnificativ mai mare în comparație cu valoarea TEAC obținută pentru extractul de busuioc referință.

Concluzii

Teza de doctorat a avut ca obiectiv principal determinarea efectului microundelor asupra compușilor bioactivi prezenți în: *Satureja hortensis* L. (cimbrul de grădină) și *Ocimum basilicum* L. (busuiocul). În urma cercetărilor efectuate s-au constatat următoarele:

- Compoziția extractelor obținute prin macerare, refluxare, ultrasonare sau în câmp de microunde de putere nu variază din punct de vedere calitativ cu tehnica de extracție utilizată. Cantitatea extrasă, depinde de solventul de extracție folosit, de tipul de compus bioactiv extras și de tehnica de extracție utilizată.
- Condițiile eficiente de extracție a **uleiurilor volatile** din cimbru și busuioc, utilizând tehnicile GC-FID și TLC sunt: *ultrasonarea* în hexan - eter etilic (1:1, v/v) pentru cimbru și *extracție în câmp de microunde* în eter etilic - etanol (1:1, v/v) pentru busuioc. Aceste condiții au fost utilizate în continuare pentru analiza plantelor iradiate și neiradiate cu microunde.
- Metoda optimă de extracție a **compușilor polifenolici** (flavonoide și acizi polifenolcarboxilici) este ultrasonarea timp de 30 minute cu un amestec de etanol – apă (80:20, v/v) în cazul cimbrului și cu etanol – apă (60:40, v/v) în cazul busuiocului, metodă care a fost utilizată ulterior la extracția compușilor polifenolici din plantele iradiate și neiradiate cu microunde.
- Modificarea condițiilor de creștere a influențat atât dezvoltarea plantelor, cât și compoziția compușilor biologic activi urmăriți în acest studiu.
- În ceea ce privește dezvoltarea plantelor s-au observat următoarele: dezvoltare similară a plantelor iradiate comparativ cu cele neiradiate (referință) în primele două luni după iradiere; după două luni de la iradiere diferența dintre plantele iradiate și cele neiradiate a devenit vizibilă. Plantele iradiate s-au dezvoltat mai puternic, au fost mai verzi, au înflorit mai repede cu 3 săptămâni și au prezentat tendință de ramificare mult mai mare decât plantele referință.
- Conținutul în **clorofilele a și b**, precum și conținutul total de **carotenoide** din plantele supuse microundelor a fost mai mic decât cele din plantele de referință. Din cromatogramele obținute prin HPLC nu se observă modificări esențiale din punct de vedere calitativ, în extractul de busuioc iradiat, doar β -criptoxantina dispare sau e numai în urme.

- Analizând extractele de **uleiuri volatile** s-a constatat că timolul și carvacrolul sunt componenții majoritari ai cimbrului, iar în busuioc s-a găsit o cantitate mare de terpene, sesquiterpene și diterpene. Acest lucru a fost observat prin TLC, GC-FID și confirmat de GC-MS, existând o bună corelare între cele trei tehnici de analiză.
- Metoda TLC a stabilit amprenta cromatografică a cimbrului și busuiocului, atât iradiat cât și neiradiat și a condus la următoarele concluzii: în urma iradierii nu apar compuși bioactivi noi; în general, plantele iradiate au un conținut mai ridicat de compuși bioactivi; cantitatea de **uleiuri volatile** depinde de stadiul de maturizare al plantei (lotul 2 prezintă o amprentă mai intensă decât lotul 1), în cazul stadiilor incipiente de dezvoltare se recomandă urmărirea compușilor precursori uleiurilor volatile.
- GC-MS, ca și celelalte metode de analiză utilizate, a arătat că în plantele iradiate conținutul în compuși bioactivi este mai mare decât în cele de referință. Astfel, există o bună corelare între cele trei metode. În cimbru s-au găsit ca și componenți majoritari timolul și carvacrolul, iar în busuioc s-a găsit o cantitate mare de terpene, sesquiterpene și diterpene.
- Cantitatea de **uleiuri volatile** diferă și în funcție de stadiul de dezvoltare al plantei (busuioc).
- În planta iradiată cantitatea totală de **flavonoide și acizi polifenolcarboxilici** (de tip acid cafeic) determinată spectrofotometric este mai mare decât în planta de referință. Acest lucru a fost confirmat prin HPLC. Astfel, cantitatea de flavonoide, respectiv acizi polifenolcarboxilici în cimbrul iradiat este de 35,7%, respectiv 0,89% mai mare decât în cimbrul de referință, în timp ce în busuiocul iradiat este de 24,3%, respectiv 11,59% mai mare decât în busuiocul de referință.
- Prin HPLC cantitatea compușilor polifenolcarboxilici identificați (acid cafeic, acid rozmarinic, luteolina, naringenina și apigenina) în extractele obținute din cimbrul și busuiocul iradiat este mai mare decât în plantele de referință.
- Extractul obținut din busuioc iradiat are o activitate antioxidantă mai mare decât extractul din planta de referință, fapt dovedit prin cele trei metode de determinare utilizate: DPPH, TEAC, ORAC.
- S-a observat o strânsă legătură între variația caracterului antioxidant și conținutul de polifenoli din extractele plantelor studiate, ambele înregistrând o creștere în plantele iradiate cu microunde.

Bibliografie

1. L.M. Penafiel, T. Litovitz, D. Krause, A. Desta, J.M.L. Mullins, *Bioelectromag.*, 18, **1997**, 132-141.
2. T.A. Litovitz, L.M. Penafiel, J.M. Farrel, D. Krause, R.Meister, J.M. Mullins, *Bioelectromag.*, 18, **1997**, 422-430.
3. G.J. Hyland, *Eng. Sci. Educ. J.*, 7(6), **1998**, 261-269.
186. E. Surducan, V. Surducan, *Romanian Patent*, RO- 122063, **2008**.
187. M.L. Soran, C. Varodi, S.C. Cobzac, *I. Lung*, *J. Essent. Oil Bear. Pl.*, 14(6), **2011**, 699-707.
188. M.L. Soran, S.C. Cobzac, C. Varodi, *I. Lung*, E. Surducan, V. Surducan, *Studia UBB Chemia*, LV(3), **2010**, 31-38.
189. M.L. Soran, S.C. Cobzac, C. Varodi, *I. Lung*, E. Surducan, V. Surducan, *JPCS*, 182, **2009**, 012016.
205. I. Broș, M.L. Soran, R.D. Briciu, S.C. Cobzac, *J. Planar Chromatogr. – Mod. TLC*, 22(1), **2009**, 25-28.
206. *XXX Farmacopea Română X*, Ed. Medicală, București, **1993**.
207. *XXX Farmacopea Română IX*, Ed. Medicală, București, **1976**.
209. E. Surducan, V. Surducan, A. Halmagyi, *Romanian Patent*, RO 125068/28.02.**2012**.
210. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, ” *Carotenoids*”, *Volume 1A: Isolation and Analysis*, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, **1995**.
212. M. B. Arnao, A. Cano, J. F. Alcolea, M. Acosta, *Phytochem Anal.*, 12(2), **2001**, 138-143.
213. T. Katsube, H. Tabata, Y. Ohta, Y. Yamasaki, E. Anuurad, K. Shiwaku, Y. Yamane, *J. Agric. Food Chem.*, 52(8), **2004**, 2391-2396.
215. D. Huang, B. Ou, M. Hampsch-Woodill, J. A. Flanagan, R. L. Prior, *J. Agric. Food Chem.*, 50, **2002**, 4437-4444.
216. G. Cao, R. L. Prior, *Methods Enzymol.*, 299, **1999**, 50-62.

LISTA DE LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE ELABORATE

A. Lucrări publicate pe tematica abordată

1. Effect of microwave irradiation on polyphenolic compounds from *Satureja hortensis* L.
I. Lung, M.L. Soran, C. Tudoran, C. Măruțoiu
Central European Journal of Chemistry (acceptat spre publicare)
2. Essentials Oils Determination from *Satureja hortensis* L. by Chromatographic Techniques
M.L. Soran, C. Varodi, S.C. Cobzac, I. Lung
Journal of Essential Oil – Bearing Plants, 14(6), **2011**, 699-707.
3. HPTLC Analysis of Thymol in Extracts of *Satureja hortensis* L. Obtained by Different Techniques
M.L. Soran, I. Lung
Journal of Planar Chromatography – Mod. TLC, 23(5), **2010**, 320-322.
4. Extraction and chromatographic determination of essentials oils from *Ocimum basilicum* L. leaves
M.L. Soran, S.C. Cobzac, C. Varodi, I. Lung, E. Surducan, V. Surducan
Studia Universitatis “Babes-Bolyai”, Chemia, LV(3), **2010**, 31-38.
5. HPTLC Quantification of Some Flavonoids in Extracts of *Satureja hortensis* L. Obtained by Use of Different Techniques
I. Broș, M.L. Soran, R.D. Briciu, S.C. Cobzac
Journal of Planar Chromatography – Mod. TLC, 22(1), **2009**, 25-28.
6. The extraction and chromatographic determination of the essentials oils from *Ocimum basilicum* L. by different techniques
M.L. Soran, S.C. Cobzac, C. Varodi, I. Lung, E. Surducan, V. Surducan
Journal of Physics: Conference Series, 182, **2009**, 012016

C. Lucrări publicate în rezumat la conferințe, simpozioane naționale și internaționale (selectie)

1. Determination of phenolic compounds from *Ocimum basilicum L.* by different extraction methods
I. Lung, M.L. Soran, M. Stan, E. Surducan, C. Măruțoiu
Second International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences IC-ANMBES, 2012, 24 – 27 Mai, Brașov, România
2. Change the antioxidant character of basil by growth in microwave field
I. Lung, M.L. Soran, C. Matea, C. Bele
International Conference “Processes in Isotopes and Molecules” PIM, 2011 29 Septembrie – 01 Octombrie, Cluj-Napoca, România
3. Essentials Oils Determination from *Satureja Hortensis L.* By Chromatographic Techniques
I. Lung, M.L. Soran, S.C. Cobzac
34th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2009, 28 Iunie – 2 Iulie, Dresda, Germania
4. HPLC Analysis of flavonoids from *Satureja Hortensis L.*
I. Broș, M.L. Soran, C. Bele, E. Surducan, V. Surducan, C. Tudoran
4th meeting on CHEMISTRY AND LIFE, 2008, 9-11 Septembrie, Brno, Cehia
5. Different extraction techniques of flavonoid bioactive compounds from *Satureja hortensis L.* and HPTLC analysis
I. Broș, M.L. Soran, I. Spinu, S.C. Cobzac
International Symposium for High Performance Thin-Layer Chromatography, 2008, 11-13 Iunie, Helsinki, Finlanda