

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ



**CERCETĂRI FIZICO – CHIMICE ASUPRA SPECIEI
Sambucus ebulus L.**

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător de doctorat,
Prof. Univ. Dr. STELIAN RADU

Student doctorand,
LIVIU CHIRIGIU

Craiova
2014

CUPRINS

CUPRINS

ABREVIERI

INTRODUCERE

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL 1. CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND SPECIA *Sambucus ebulus* L.

1.1. Încadrare sistematică

1.2. Distribuția speciei *Sambucus ebulus* L.

1.3. Chemosistematică

1.4. Potențialul fitoterapeutic

1.4.1. Activitatea antiinflamatoare

1.4.2. Activitatea antioxidantă

1.4.3. Activitatea anti-*Helicobacter pylori*

1.4.4. Activitatea citotoxică și antiangiogenică

CAPITOLUL 2. METODE DE EXTRACȚIE ȘI DE ANALIZĂ A COMPUȘILOR CHIMICI CONȚINUȚI DE SPECIA *Sambucus ebulus* L.

2.1. Metode de extracție

2.1.1. Metoda Soxhlet

2.1.2. Extracția cu microunde

2.1.3. Extracția asistată cu ultrasunete

2.2. Metode de identificare și separare a metaboliților secundari

2.2.1. Gaz-cromatografia cuplată cu spectrometria de masă

2.2.2. Cromatografia de lichide de înaltă performanță cuplată

2.2.3. Spectrometria de absorbție atomică

CONTRIBUȚII ORIGINALE

CAPITOLUL 3. IDENTIFICAREA ȘI CARACTERIZAREA PRELIMINARĂ A SPECIEI

3.1. Caracteristici macroscopice

3.2. Caracteristici microscopice

3.3. Caracteristici microscopice ale pulberilor provenind de la produsele vegetale

3.4. Determinarea umidității, substanței uscate și rezidului la calcinare pentru specia *Sambucus ebulus*

3.5. Extracția Soxhlet

3.6. Analiza prin spectroscopia IR cu transformată Fourier (FT-IR)

3.6.1. Materiale și metode folosite

3.6.2. Rezultate și discuții

3.7. Analiza cationilor metalici conținuți de specia *Sambucus ebulus* L. prin SAA

3.7.1. Mineralizarea probelor

3.7.2. Materiale și metode

3.7.3. Rezultate și discuții

CAPITOLUL 4. INVESTIGAȚII FITOCHIMICE ASUPRA SPECIEI *Sambucus ebulus* L. PRIN GC-MS ȘI HPLC / HPLC -MS

4.1. Analiza prin gaz-cromatografie cuplată cu spectrometria de masă a compușilor conținuți în extractele de *Sambucus ebulus* L.

4.1.1. Pregătirea probelor

4.1.2. Aparatură și condiții de lucru

4.1.3. Rezultate și discuții

4.2. Analiza unor clase de metaboliți secundari din *Sambucus ebulus* prin HPLC și HPLC-MS

4.2.1. Analiza brassicasterolului, campesterolului și stigmasterolului

4.2.1.1. Pregătirea probelor

4.2.2. Separarea antocianilor

4.2.3. Separarea α și β -amirinului

CAPITOLUL 5. EVALUAREA ACTIVITĂȚII BIOLOGICE A UNOR EXTRACTE DIN *Sambucus ebulus* L.

5.1. Evaluarea activității antioxidante

5.1.1. Pregătirea probelor

5.1.2. Materiale și metode

5.1.2.1. Conținutul total de compuși fenolici

5.1.2.2. Conținutul total de flavonoide

5.1.2.3. Determinarea permanganometrică a conținutului în substanțe organice oxidabile din specia *Sambucus ebulus* L.

5.1.2.4. Studii de voltametrie ciclică

5.1.2.5. Determinarea capacității chelatante a extractelor

5.1.3. Rezultate și discuții

- 5.1.3.1. Conținutul total de compuși fenolici și flavonoide
- 5.1.2.2. Determinarea permanganometrică a conținutului în substanțe organice oxidabile din specia *Sambucus ebulus* L.
- 5.1.2.3. Studii de voltametrie ciclică
- 5.1.2.4. Determinarea capacității chelatante a extractelor
- 5.2. Evaluarea fitotoxicității
- 5.2.1. Pregătirea probelor
- 5.2.2. Materiale și metode
- 5.2.3. Rezultate și discuții
- 6. DETERMINAREA PIGMENȚILOR CLOROFILIEI, A CAROTENULUI, A AZOTULUI, A PROTEINEI, A FOSFORULUI, A POTASIULUI ȘI A SUBSTANȚEI USCATE DIN SPECIA *Sambucus ebulus* L.
- 6.1. Aparatura folosită și metode de determinare
- 6.2. Ponderea diferiților factori în variația compoziției chimice a plantei
- 6.3. Mineralizarea materialului vegetal
- 6.3.1. Mineralizare cu acid sulfuric (Metoda Kjendal)
- 6.4. Determinarea carotenului și a pigmentilor clorofilieni
- 6.5. Determinarea proteinei brute. Azotul total.
- 6.6. Determinarea fosforului
- 6.7. Determinarea K
- 7. CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE DE CERCETARE
- BIBLIOGRAFIE
- LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE

Cuvinte cheie: *Sambucus ebulus* L., GC, HPLC, MS.

CAPITOLUL 1. CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND SPECIA *Sambucus ebulus* L.

1.1. Încadrare sistematică

Inițial genul *Sambucus ebulus* a aparținut familiei botanice *Caprifoliaceae*¹, însă, după îndelungi dezbateri taxonomice, atât genul *Sambucus* cât și alte câteva genuri (*Viburnum*) au fost mutate în familia *Adoxaceae* de către Vernon, în 1987². Această familie botanică aparține ordinului *Dipsacales*, clasa *Magnoliopsida* subclasa *Asteridae*. Din genul *Sambucus* fac parte aproximativ 30 de specii, dintre care cele mai cunoscute sunt: *Sambucus nigra*, *Sambucus racemosa*, *Sambucus palmensis*, *Sambucus canadensis* și *Sambucus ebulus*.

1.2. Distribuția speciei *Sambucus ebulus* L.

Sambucus ebulus, similar speciei *Sambucus nigra*, este o specie larg răspândită, atât în Europa Centrală și de Sud cât și în Asia, Nordul Africii și Statele Unite ale Americii.

1.4. Potențialul fitoterapeutic

Apar menționări în literatura de specialitate cu privire la utilizarea frunzelor, florilor și fructelor ca expectorant, diuretic sau purgativ, în diverse afecțiuni inflamatorii precum: artrita reumatoidă, febră, edem pulmonar, arsuri, sau diverse răni deschise, au acțiune bacteriostatică și diuretică.

¹ Iaroșenko P D (1962). *Geobotanica*, Ed. Academiei R.P.R., București.

² Vernon H (1987). *Flowering plants of the World*. Andromeda Oxford LTD, Heywood.

CAPITOLUL 2. METODE DE EXTRAȚIE ȘI DE ANALIZĂ A COMPUȘILOR CHIMICI CONȚINUȚI DE SPECIA *Sambucus ebulus* L.

Printre cele mai cunoscute metode de extracție se numără: metoda Soxhlet, extracția cu microunde, extracția cu ultrasunete, macerarea, hidrodistilarea³, turboextracția, vibroextracția etc.

Dintre tehnicile de identificare și dozare a compușilor conținuți în extractele obținute amintim: gaz cromatografia cuplată cu spectrometria de masă, (GC-MS), cromatografia în strat subțire (TLC), cromatogra de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă (HPLC-MS), spectrometria de absorbție atomică (AAS), spectrometria în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR).

CONTRIBUȚII ORIGINALE

CAPITOLUL 3. IDENTIFICAREA ȘI CARACTERIZAREA PRELIMINARĂ A SPECIEI

3.1. Caracteristici macroscopice

În această primă etapă a cercetării au fost descrise caracteristicile morfologice și organoleptice ale organelor vegetale, s-a apreciat aspectul (interior, exterior) și particularitățile caracteristice, dimensiunile, culoarea, mirosul.

3.2. Caracteristici microscopice

Prin caracterizarea microscopică s-a urmărit evidențierea elementelor structurale diferențiale ale organelor vegetative provenind de la specia *Sambucus ebulus*. S-a lucrat pe un microscop Bel Photonics model BIO3 cu camera video Bel Photonics Model BVM-100 și soft Bel Microlmage Analyzer.

3.4. Determinarea umidității, substanței uscate și rezidului la calcinare pentru specia *Sambucus ebulus* L.

Tabel 1. Umiditatea și cenușa brută pentru specia *Sambucus ebulus* L.

Nr. crt.	Proba de <i>Sambucus ebulus</i> L.	Masa inițială (g)	Masa după uscare (g)	Umiditate (%)	Reziduu calcinare	Cenușă brută (%)
1.	Rădăcini	1,4216	1,2987	8,645	0,0989	6,956
2.	Tulpini	2,1261	1,9463	8,456	0,0860	4,044
3.	Flori	1,4758	1,3555	8,8749	0,1240	8,402
4.	Fructe	2,9378	2,5349	13,7143	0,0931	3,169
5.	Frunze	3.3317	3,0672	8.6235	0,2536	7,612

Reacții fitochimice preliminare

Pentru identificarea principalelor clase de principii active conținute de această specie, s-au folosit extractele obținute prin metoda Soxhlet. Pentru identificări au fost folosite metodele prescrise de Farmacopeea română ed. X.

³ Peres VF, Saffi J, Melecchi MI, Abad FC, Assis Jacques R, Martinez M, Conceic E, Caramao EB(2006). Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth, Journal of Chromatography A, 1105:115–118.

Tabel 2. Analiza fitochimică a extractelor eterice ale speciei *Sambucus ebulus* L.

Reacție identificare	Principii active	Rădăcină	Frunză	Fruct	Tulpină
Reacția Carr-Price	carotenoide	+	+	+	-
Metoda NeoClevenger	uleiuri volatile	+	+	+	-
Reacția Liebermann-Burchard	steroli	+	+	+	+
Hidroliză	acizi grași	+	+	+	+
Reacția cianidolului	agliconi flavonici	+	+	+	-
Reactivi Mayer, Bertrand, Ehrlich	alcaloizi baze	+	+	+	-
Reacția Borntranger	emodoli	+	+	+	-
+ principii active prezente;		- principii active absente.			

Tabel 3. Analiza fitochimică a extractelor alcoolice ale speciei *Sambucus ebulus* L.

Reacție identificare	Principii active	Rădăcină	Frunză	Fruct	Tulpină
Reacția cu FeCl ₃	taninuri catehice	+	+	+	-
Reacția Fehling	polifenoli	+	-	-	-
Spumifiere, Reacția Liebermann-Burchard	saponozide	+	+	+	-
Ninhidrină	aminoacizi	+	-	+	-
Colorație în mediu acid	antocianozide	+	+	+	-
Reacția Shibata	flavonozide	+	-	-	-
+ principii active prezente;		- principii active absente.			

3.6. Analiza prin spectroscopia IR cu transformată Fourier

Pentru înregistrarea spectrelor reziduurilor etanolice și eterice a fost utilizat un aparat FT-IR NICOLET, în domeniul 4.000 – 400 cm⁻¹, cu pastilare cu bromură de potasiu. Controlul aparatului și achiziția datelor s-a realizat cu ajutorul softului Omnic Spectra. Spectrele au fost trasate după prealabila pastilare cu bromură de potasiu astfel: reziduu uscat a fost mojarat cu bromură de potasiu de puritate spectrală.

Tabel 4. Principalele frecvențe IR (cm⁻¹) obținute pentru pulberile fitofarmaceutice

Proba / Frecvențe caracteristice în IR (cm ⁻¹)					Atribuire
Rădăcină	Frunză	Fruct	Tulpină	Părți aeriene	
3.386	3.435	-	-	3.385	Vibrații întindere O-H și N-H (aminoacizi, amine, amide)
-	-	3.008	-	3.008	$\nu_{C-H(asim)}$ (lipide, acizi grași) ⁴
2.924	2.925	2.926	2.929	2.926	Vibrații asimetrice de alungire -CH ₃ , -CH ₂ - (acizi carboxilici)
2.853	2.854	2.854	2.854	2.857	$\nu_{(sim)}$ grupe -CH ₃
1.733	1.735	1.745	1.735	1.733	Vibrații întindere -C=O (esteri)
1.462	1.462	1.460	-	1.457	$\nu_{C-H(îndoire)}$ (a grupării -CH ₂ proteine)
1.378	1.377	1.377	-	1.376	Vibrații de deformare (C-H)
1.260	1.247	1.241	1.247	1.249	$\nu_{C-O}, \nu_{O-H def}$ (polifenoli)
1.172	1.171	1.166	1.171	1.170	$\nu_{C-O-C, incl}$
1.093	1.094	1.098	1.094	1.072	$\nu_{C-H(deformare)}, \nu_{C-O}, \nu_{C-C(întindere)}$ – carbohidrați
1.023	-	1.032	-	1.045	ν_{C-O} (întindere) polizaharide
801	802	723	-	801	ν_{C-H} (îndoire în afara planului)
-	-	-	-	552	Vibrații gruparea fosfat

⁴ Schulz H., Baranska M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy*, 43: 13-25, 2007.

3.7. Analiza cationilor metalici conținuți de specia *Sambucus ebulus* L. prin spectrometrie de absorbție atomică

Analizele au fost efectuate prin SAA cu flacără și cuptor de grafit pe un aparat AA240FS DUO Varian și prin SAA cu cuptor grafit, pe un spectrometru de absorbție atomică novAA 400G – Analytik Jena cu autosampler MPE60 și soft WinAAS 3.17.0.

Tabel 5. Determinarea prin spectrometrie de absorbție atomică a cationilor metalici din specia *Sambucus ebulus* L prin metoda 1

Denumire probă	Ca (μg/g)	Fe (μg/g)	Mn (μg/g)	Mg (μg/g)	Zn (μg/g)	Pb (μg/g)	Cr (μg/g)	Ni (μg/g)
Fructe	3196,9	97,1	16,4	1698,6	20,7	1,4	0,35	2,5
Tulpini	2921,8	9,9	5,5	2127,14	6,2	0,78	0,15	1,32
Frunze	9539,6	148	49,93	5469	23,12	0,76	1,37	0,99
Rădăcini	2805,1	200,25	37,1	1841,22	19,46	0,7	4,15	7,146

Tabel 6. Determinarea prin spectrometrie de absorbție atomică a cationilor metalici din specia *Sambucus ebulus* L prin metoda 2

	Cu (μg/g)	Pb (μg/g)	Zn (μg/g)
Fructe verzi	6,895	1,021	33,1
Fructe negre	4,962	0,728	27,9
Frunze	1,923	0,876	47,5
Rădăcini	6,310	1,952	26,5
Tulpini	7,374	2,980	35,6

Tabel 7. Determinarea prin spectrometrie de absorbție atomică a cationilor metalici din specia *Sambucus ebulus* L prin metoda 3

Nr. crt.	Produs	Concentrația (μg/g)					
		Cd	Cu	Cr	Zn	Pb	Fe
1.	Fructe	*	2.34	9.85	45.92	9.21	113.40
2.	Frunze	0.32	5.16	10.27	36.58	12.63	99.29
3.	Tulpini	*	2.16	*	16.58	*	*

CAPITOLUL 4. INVESTIGAȚII FITOCHIMICE ASUPRA SPECIEI *Sambucus ebulus* PRIN GC-MS ȘI HPLC/HPLC-MS

4.1. Analiza prin GC-MS a compușilor din *Sambucus ebulus* L.

S-a lucrat pe un gaz cromatograf Hewlett Packard 6890 cu detector spectrometru de masa 5973, coloana: DB1 30 m x 0,25 mm x 1 μm, T_{injector.}: 290°C, debit gaz purtator (He) = 0,8 mL/min, rație splitare = 188 : 1, Temp. sursă MS = 230°C, Quadropol MS = 150°C, Interfața MS = 300°C. Atribuirea spectrelor de masă s-a realizat folosind baza de date Nist05 Library. Din totalul compușilor găsiți în frunze, au fost identificați cu o probabilitate ridicată un număr de 19 compuși în extractul eteric (9 cu probabilitate foarte mare) și 51 de compuși în extractul alcoolic (29 cu probabilitate foarte mare) reprezentând 87 % din totalul componentelor⁵. Cei mai mulți compuși au fost identificați în fructele speciei, 51 de compuși în extractul eteric și 32 de compuși în cel alcoolic.

⁵ Chirigiu L., Chirigiu R. G., Tircomnicu V., Bubulica M. V (2011). GC-MS analysis of chemical composition of *Sambucus Ebulus* leaves, Chemistry of natural compounds, 47 (1): 126 – 127, UDC 547.913

4.2. Analiza unor clase de metaboliți secundari din *Sambucus ebulus* prin HPLC și HPLC-MS

4.2.1. Analiza brassicasterolului, campesterolului și stigmasterolului

Determinarea conținutului fitosterolic din *Sambucus ebulus* s-a realizat prin:

- **cromatografie HPLC** (Ultimate 3000 Dionex, detector UVD-3000, C18 Acclaim 120 DIONEX cu lungimea de 250 mm, diametrul 4 mm, pompă LPG-3400A). Faza mobilă folosită metanol : acetonitril : i-propanol : apă acidulată (0,05 % acid trifloracetic) = 75 : 5 : 10 : 10. Temperatura coloanei 21°C, debitul 0,5 mL/min, lungimea de unda 230 nm.

- **cromatografie LC-MS** Agilent (1200 Series cu detector MS 6120 Quadrupole și autosampler). Condiții cromatografice: detectia temperatura coloanei 40°C, debit 0,6 mL/min, volumul injectat 5 µL, timp 35 minute, faza mobilă folosită acetonitril : isopropanol = 80 : 20 (%). Detectia s-a efectuat în MSD scan. S-a preferat determinarea simultană a celor trei fitosteroli, având în vedere faptul că aceștia au un efect cumulativ deosebit, însă separat nu prezintă aceleași proprietăți.

Tabel 16. Caracteristici cromatogr. pentru brassicasterol, campesterol și stigmasterol

Standard	Formulă moleculară	Timp de retenție (min)	Ion [M-H ₂ O+H] ⁺
Brassicasterol	C ₂₈ H ₄₆ O	3.73	470
Campesterol	C ₂₈ H ₄₈ O	4.28	383
Stigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	4.49	395

Tabelul 17. Caracteristici cromatografice rezultate la determinarea sterolilor

Proba	Fitosterol	t _R (min)	Arie pic (mAu·min)	Inaltime (mAu)	Concentrația (mg/100 g)
<i>S. ebulus</i> flori	Brassicasterol	3,59	174,09	886,88	29,222
	Campesterol	4,18	965,29	2691,67	136,310
<i>S. ebulus</i> frunze	Brassicasterol	3,63	73,98	394,13	12,418
	Stigmasterol	4,46	163,05	952,64	132,748
<i>S. ebulus</i> tulpini	Campesterol	4,21	755,37	2787,99	109,411
<i>S. ebulus</i> rădăcini	Campesterol	4,20	674,08	2771,32	95,118
<i>S. ebulus</i> fructe	Brassicasterol	3,31	221,80	478,27	37,230
	Campesterol	4,19	568,67	2699,82	80,244

Prezența în cantități destul de ridicate a brassicasterolului și campesterolului în toate organele vegetative ale speciei explică activitățile antiinflamatorii și antireumatice ale acesteia⁶. Campesterolul se găsește într-o cantitate mai mare decât brassicasterolul un fapt mai rar întâlnit în lumea vegetală. Cele mai bogate în campesterol sunt florile (136 mg %) urmate de tulpini (109,411 mg/100 g)⁷.

4.2.2. Separarea antocianilor

Pentru cei trei compuși de referință utilizați s-au obținut următorii timpi de retenție: delfinidină – 6.28 minute, pentunidină – 6.89 minute și pentru cianidin 3,5-diglicozidă – 7.35 minute.

⁶ Gabay O, Sanchez C, Salvat C, Chevy F, Breton M, Nourissat G, Wolf C, Jacques C, Berenbaum F (2010). Osteoarthritis Cartilage, 18:106.

⁷ Bubulică M.V., Chirigiu L., Popescu M., Simionescu A., Anoaica G., Popescu A (2012). *Analysis of sterol compounds from Sambucus ebulus*, Chemistry of natural compounds. 48(3):520-521.

Tabelul 18. Caracteristici cromatografice rezultate la determinarea antocianilor

Proba	Antociani	t _R (min)	Arie pic (mAu·min)	Inaltime (mAu)
<i>S. ebulus</i> flori	Delfinidin + pentoze	5,89	196,43	609,99
	Petunidin + pentoze	6,67	749,98	2596,46
	Cianidin 3,5-diglucozide	7,22	213,17	1025,88
<i>S. ebulus</i> frunze	Delfinidin + pentoze	5,89	133,14	434,31
	Petunidin + pentoze	6,76	727,31	2387,9
	Cianidin 3,5-diglucozide	7,29	814,56	2354,67
<i>S. ebulus</i> tulpini	Petunidină + pentoze	6,69	928,48	2578,0
<i>S. ebulus</i> rădăcini	Petunidină + pentoze	6,61	1003,86	2832,31
<i>S. ebulus</i> fructe	Delfinidin + pentoze	5,72	111,12	230,88
	Petunidină + pentoze	6,67	678,53	2688,87

Antocianii prezenți în această specie sunt ușor hidrosolubili, sunt potenți inhibitori ai radicalilor liberi având astfel o activitate antioxidantă extrem de crescută și explicând astfel proprietățile antiinflamatorii și imunostimulente ale bozului.

În mod surprinzător, cea mai mare cantitate de antociani a fost găsită în rădăcini, însă din punct de vedere numeric, cei mai mulți compuși se găsesc în frunze și fructe, și având în vedere că în cromatografia de lichide de înaltă performanță aria picului caracteristic separat este direct proporțională cu concentrația acestui compus din extract, se poate afirma că și în aceste două organe vegetative (fructe și frunze), se găsesc cantități însemnate de cianidină și petunidină. Tulpinile speciei conțin numai petunidină + pentoze, într-un procent destul de ridicat.

4.2.3. Separarea α și β -amirinului

Caracteristicile cromatografice pentru cele 5 probe sunt redate în tabelul 19.

Tabel 19. Caracteristici cromatografice obținute pentru α și β amirin

Proba	Compus	t _R (min)	Arie pic (mAu·min)	Inaltime (mAu)
<i>Sambucus ebulus</i> flori	α - amirin	3,25	228,21	1409,07
	β - amirin	4,23	51,03	229,99
<i>Sambucus ebulus</i> frunze	α - amirin	3,33	77,15	330,73
	β - amirin	4,4	181,23	956,08
<i>Sambucus ebulus</i> tulpini	β - amirin	4,00	630,59	2827,83
<i>Sambucus ebulus</i> rădăcini	β - amirin	4,07	624,99	2840,44
<i>Sambucus ebulus</i> fructe	α - amirin	3,42	52,69	248,86
	β - amirin	4,07	531,22	2786,11

Este de remarcat faptul că amestecul racemic al celor doi izomeri dă proprietățile respective. Așa cum se observă din tabelul 19, în flori, frunze și fructe se găsesc cei doi izomeri, în timp ce în rădăcini și tulpini este întâlnit numai izomerul β .

CAPITOLUL 5. EVALUAREA ACTIVITĂȚII BIOLOGICE A UNOR EXTRACTE DIN *Sambucus ebulus* L.

Din extractele obținute s-au luat 200 μ L peste care s-au adăugat 2,5 mL reactiv Folin – Ciocâlțeu diluat 1 : 10. După 4 minute s-au adăugat câte 2 mL carbonat de sodiu (75 g/L) în fiecare probă, apoi au fost lăsate timp de 2 ore la temperatura 23°C⁸.

Absorbanța a fost măsurată la 765 nm.

⁸ Borneo R, Leon AE, Aguire A, Ribotta P, Cantero JJ (2009). Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Cordoba (Argentina) and their in vitro testing in a model food system. *Food Chemistry*, 112: 664-670.

5.1.2.2. Conținutul total de flavonoide

S-a realizat cu soluție clorură de aluminiu 10 % (metoda Roy et al., 2010⁹), ulterior se evaluează maximul de absorbție al colorației obținute, raportat la curba de etalonare. Conținutul total în flavonoide se exprimă în mg/g (echivalenți quercetină).

Cel mai mare conținut polifenolic îl au fructele de *Sambucus ebulus*, urmate de flori și frunze. Pentru fructe, s-a realizat și evaluarea extractului obținut din drupele crude, mai ales ținând cont de utilizarea acestora în etnomedicină sub această formă.

Tabel 20. Conținutul total de compuși fenolici și flavonoide și activitatea antioxidantă a extractelor testate

Nr. crt	Proba	Total compuși fenolici (mg GAE/g)		Conținut total de flavonoide (mg QE/g)	
		m.p.*	m.u.**	m.p.*	m.u.**
1.	<i>Sambucus ebulus</i> L. flori	-	41,8 ± 0,98	3,75 ± 2,31	19,06 ± 1,06
2.	<i>Sambucus ebulus</i> L. rădăcini	-	32,06 ± 0,56	-	20,07 ± 1,23
3.	<i>Sambucus ebulus</i> L. fructe	9,25 ± 1,08	43,28 ± 0,71	3,96 ± 1,84	22,71 ± 0,61
4.	<i>Sambucus ebulus</i> L. frunze	-	35,73 ± 1,26	-	13,55 ± 1,36
5.	<i>Sambucus ebulus</i> L. tulpini	-	30,21 ± 0,74	2,52 ± 1,20	13,54 ± 0,78

* material vegetal proaspăt. ** material vegetal uscat. media ± DS (n = 3).

5.1.2.3. Determinarea permanganometrică a conținutului în substanțe organice oxidabile din specia *Sambucus ebulus* L.

S-a efectuat prin titrare permanganometrică în mediu de acid sulfuric 4 N. S-au determinat volumele de soluție de permanganat utilizate.

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 21.

Tabelul 21. Determinarea permanganometrică a conținutului în substanțe oxidabile din specia *Sambucus ebulus* L.

	m _{probă} (g)	V _{H₂SO₄} (mL)	V _{H₂O} (mL)	V _{KMnO₄ 0,1 N} (mL)
Tulpini				
Fructe negre	10,00	20,00	60,00	118,5
Frunze	10,00	20,00	60,00	89,5

5.1.2.4. Studii de voltametrie ciclică

Voltamogramele ciclice pentru determinarea activității antioxidante a extractelor s-au realizat cu ajutorul unui potențostat model PGZ-402 Universal Pulse Dinamic EIS Voltammetry, produs de Radiometer Copenhagen, în 2007 echipat cu soft Volta Master 4. Studiile de voltametrie ciclică s-au făcut în intervalul – 200 ÷ 1.000 mV, la temperatura ambiantă cu o viteză de polarizare de 100 mV/s.

Extractele testate la pH = 7,1 au avut cea mai bună activitate antioxidantă, fapt deosebit de important dacă se are în vedere obținerea unor forme farmaceutice care să aibă o activitate antioxidantă crescută.

5.1.2.5. Determinarea capacității chelatante a extractelor

Determinarea capacității chelatante a extractelor s-a realizat după metoda Dinis și colaboratorii cu câteva ajustări. Absorbanta s-a măsurat la 562 nm folosind Na₂EDTA ca martor pozitiv. Extractele vegetale au rolul de agenți de complexare care perturbă formarea complexului Fe-Ferozină, când intensitatea colorației scade.

⁹ Nayan R, Rajibul AL, Ismail S, Deepa K, Tirthankar G, Naznin AB (2011). *A detailed study on the antioxidant activity of the stem bark of Dalbergia sissoo Roxb., an Indian medicinal plant.* Food Chem. 126: 1115-1121.

5.2. Evaluarea fitotoxicității

Fitotoxicitatea extractelor din diverse plante a fost corelată ulterior cu proprietăți citotoxice ale acestora, și chiar cu activitatea anticanceroasă. Cea mai utilizată plantă în scopul testării fitotoxicității o constituie grâul (*Triticum vulgare*, soiul Dropia, Gramineae). În tabelul 22 sunt prezentate rezultatele obținute în urma testului *Triticum*.

Tabel 22. Elongația radiculară a cariopselor germinate pe durata celor cinci zile

Nr. crt.	Tip de extract	Concentrația	Elongația radicelei principale (cm)					% inhibiție
			Ziua 1	Ziua 2	Ziua 3	Ziua 4	Ziua 5	
1.	Sambucus ebulus frunze (Se₁) (extract apos)	2.0 %	0.75	0.80	0.80	0.80	0.93	92.38
2.		1.0 %	0.80	0.95	0.95	0.95	1.12	90.82
3.		0.5 %	0.74	1.13	1.52	1.74	2.13	82.54
4.		0.25 %	1.01	1.62	2.38	2.38	3.22	73.61
5.	Sambucus ebulus fructe (Se₂) (extract apos)	2.0 %	1.00	2.26	4.54	4.71	6.59	45.98
6.		1.0 %	0.98	2.20	3.90	4.32	5.00	59.02
7.		0.5 %	1.05	2.52	5.27	6.37	6.82	44.098
8.		0.25 %	0.82	2.66	5.92	6.11	8.80	27.87
9.	Sambucus ebulus rădăcini (Se₃) (extract apos)	2.0 %	0.74	1.12	1.46	1.43	3.48	71.47
10.		1.0 %	0.73	1.47	3.81	3.78	3.77	69.09
11.		0.5 %	1.21	1.47	3.78	4.10	8.30	31.96
12.		0.25 %	1.24	1.88	4.02	4.72	11.23	7.95
13.	Sambucus ebulus tulpini (Se₄) (extract apos)	2.0 %	0.77	1.16	1.22	1.40	5.62	52.29
14.		1.0 %	1.00	1.40	3.30	3.46	7.70	36.88
15.		0.5 %	1.10	1.74	3.62	4.81	7.26	40.49
16.		0.25 %	0.97	2.19	5.23	6.42	9.84	19.34
17.	Martor (M₁)	-	1.23	2.03	3.47	5.72	12.2	-

Există un efect mitoinhibitor specific la concentrațiile mai ridicate. Un efect citotoxic a fost observat la extractul de 2 % din frunzele și rădăcinile speciei (nuclei cu 1 – 2 nucleoli hipertrofiați). La concentrații mici, 0,5 – 1 %, pentru aceleași extracte a fost constatat un efect moderat mito-depresiv, în timp ce la cea mai mică concentrație investigată s-a constatat un efect de stimulare a diviziunii celulare.

6. DETERMINAREA PIGMENȚILOR CLOROFILIENI, A CAROTENULUI, A AZOTULUI, A PROTEINEI, A FOSFORULUI, A POTASIULUI ȘI A SUBSTANȚEI USCATE DIN SPECIA *Sambucus ebulus* L.

Substanța proaspătă din planta se mojarează foarte bine, peste care se pune alcool etilic. A doua zi se filtrează și se aduce la semn tot cu alcool. Se fac citirile la spectrometru, iar rezultatele se introduc în formula de calcul.

Tabelul 23. Conținutul în caroten și pigmenți clorofilieni al speciei *S. ebulus* L.

Varianta	Pigmenți clorofilieni		
	Ca	Cb	K
Dăbuleni	10,614	4,721	3,961
Amărăști	10,214	4,659	3,890
Mârșani	10,427	4,718	3,943
Teasc	10,601	4,719	3,954

6.5. Determinarea proteinei brute. Azotul total.

Conținutul de azot total din material vegetal se determină prin mineralizare umedă, acidul sulfuric fiind larg folosit, în diferite variante ale metodei clasice Kjeldahl. Eliberarea azotului din materialul vegetal se poate realiza și prin combustie uscată – metoda Dumas, procedeu mai puțin folosit deoarece necesită o aparatură specială.

6.6. Determinarea fosforului

Se face spectrometric la lungimea de undă de 420 sau 470 nm. Citirea se face față de proba de referință – etalonul 0 care are o ușoară culoare gălbuie.

6.7. Determinarea potasiului

Pentru determinarea potasiu total din plante, materialul vegetal este mineralizat prin calcinare sau pe cale umedă cu amestec de acizi minerali concentrați. În soluția obținută dozarea potasiului se face prin fotometrie de emisie în flacără.

Tabelul 24. Rezultatele analizelor efectuate pe specia *Sambucus ebulus* L.

Varianta	Azot (%)	Proteina (%)	P ₂ O ₅ (%)	K ₂ O (%)	Substanța uscată (%)
Amărăști	3,01	19,3	1,90	1,59	28,50
Mârșani	3,06	19,4	1,92	1,60	28,53
Teasc	3,10	19,01	1,94	1,63	28,51

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Iaroşenko P D (1962). *Geobotanica*, Ed. Academiei R.P.R., Bucureşti
2. Vernon H (1987). Flowering plants of the World. Andromeda Oxford LTD, Heywood
3. Schulz H., Baranska M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy*, 43: 13-25, 2007
4. Gabay O, Sanchez C, Salvat C, Chevy F, Breton M, Nourissat G, Wolf C, Jacques C, Berenbaum F (2010). Osteoarthritis Cartilage, 18:106.
5. Bubulică M.V., **Chirigiu L.**, Popescu M., Simionescu A., Anoaica G., Popescu A (2012). *Analysis of sterol compounds from Sambucus ebulus*, Chemistry of natural compounds. 48(3):520-521.
6. Popa T., Bubulică M.V., **Chirigiu L.**, Mogosanu G. D., Popescu R., Popescu H., Researches upon the heavy metals content of *Sambucus nigra* L. (*Caprifoliaceae*), *Current Health Sciences Journal*, April–June, 2010, 36(2):111–114, ISSN 2067–0656.
7. **Chirigiu L.**, Popescu R., Bubulică M.V., Popescu A (2012). *Determination of chromium, cooper, iron, zinc, cadmium and lead by graphite furnace atomic absorption spectrometry in seven phytopharmaceutical products*, Revista de Chimie,: 63(9): 874-876.
8. **Chirigiu L.**, Chirigiu R. G., Tircomnicu V., Bubulica M. V (2011). *GC-MS analysis of chemical composition of Sambucus Ebulus leaves*, Chemistry of natural compounds, 47 (1): 126 – 127, UDC 547.913
9. **Chirigiu L.**, Bubulica M. V., Chirigiu R. G (2010). *GC-MS Analysis of Chemical Compounds from Stems of Sambucus Ebulus L.* Acta Medica Marisiensis, 56(6): 522-525.
70. Patel V.R., Patel P.R., Kajal S.S. Antioxidant Activity of Some Selected Medicinal Plants in Western Region of India, *Advances in Biological Research*, 4: 23-26, 2010.
10. Bubulica MV, **Chirigiu L.**, Grumezescu A.M., Popescu A., Simionescu A (2012). Screening of antioxidant potential of *Lonicera tatarica*, *Viburnum opulus* and *Sambucus ebulus* L. by multiple in vitro assays. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 6(3): 544-552
11. Rop O., Reznicek V., Vasilkova M., Jurikova T., Milcek J., Kramarova D. Antioxidant properties of European cranberrybush fruit (*Viburnum opulus* var. *edule*). *Molecules*, 15: 4467-4477, 2010
12. **Chirigiu L.**, Bubulică MV, Averis LME (2012). Assessment of the toxicity of some phytopharmaceutical products from *Caprifoliaceae* family by *Triticum* bioassay, *Analele Universităţii din Craiova Seria- Biologie, Horticultură, Tehnologia Prelucrării Produselor Agricole, Ingineria Mediului*, XVII (LIII): 583-587