

**UNIVERSITATEA TEHNICĂ  
"GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI**

**ȘCOALA DOCTORALĂ**

**FACULTATEA DE INGINERIE CHIMICĂ ȘI  
PROTECȚIA MEDIULUI  
"CRISTOFOR SIMIONESCU"**



**CONTRIBUȚII LA DEZVOLTAREA UNUI SISTEM INTEGRAT  
PENTRU VALORIFICAREA UNOR BIORESURSE  
(VEGETALE / ARBUȘTI) ÎN DOMENIUL FITOFARMACEUTIC**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Doctorand: bioing. Oana Teodora CIUPERCĂ (căs. APREUTESEI)**

**Conducător de doctorat: Prof. univ. dr. habil. ing. Irina VOLF**

IAȘI, 2023

**UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI**  
**R E C T O R A T U L**

Către

---

---

Vă facem cunoscut că, în ziua de 24 iulie 2023 la ora 11 în Sala de Consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului "Cristofor Simionescu", va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

**"CONTRIBUȚII LA DEZVOLTAREA UNUI SISTEM INTEGRAT PENTRU  
VALORIFICAREA UNOR BIORESURSE (VEGETALE/ARBUȘTI) ÎN DOMENIUL  
FITOFARMACEUTIC"**

elaborate de doamna **CIUPERCĂ (căs. APREUTESEI) OANA TEODORA** în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

- 1. Prof.univ.dr.ing. Măluțan Teodor** președinte  
Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași
- 2. Prof.univ.dr.habil.ing. Volf Irina** conducător de doctorat  
Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași
- 3. Prof.univ.dr.farm. Miron Anca** referent oficial  
Universitatea de Medicină și Farmacie "Grigore T. Popa" din Iași
- 4. Dr.ing. CS I Ionescu Elena** referent oficial  
Centrul de Cercetare și Prelucrare a Plantelor Medicinale PLANTAVOREL S.A. Piatra Neamț
- 5. Prof.univ.emerit dr.ing. Gavrilescu Maria** referent oficial  
Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași

Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.

**RECTOR,**

Prof. univ. dr. ing. DAN CAȘCAVAL

**Secretar universitate,**

Ing. Cristina Nagiț

## MULȚUMIRI

Cuvinte de mulțumire, aleasă prețuire și întreaga mea recunoștință se îndreaptă către doamna **Prof. univ. dr. habil. ing. Irina Volf**, coordonator al acestei lucrări, pentru răbdarea, sfaturile și încrederea acordată. Vă mulțumesc, doamna profesor, pentru tot sprijinul și îndrumarea oferite pe parcursul anilor de studiu.

Adresez cuvinte de mulțumire comisiei de îndrumare, **CS I dr. ing. Carmen Elena Țebrencu**, **Conf. univ. dr. ing. Liliana Lazăr** și **Prof. univ. emerit dr. ing. Valentin I. Popa**, pentru implicarea și recomandările oferite pe parcursul elaborării tezei de doctorat care au condus la îmbunătățirea rezultatelor și a lucrării. Îmi exprim întreaga recunoștință și adresez mulțumiri pentru sprijinul și contribuția semnificativă la formarea mea ca specialist în industria fitofarmaceutică doamnei Director General CCPPM Plantavorel S.A./referent oficial **CS I dr. ing. Elena Ionescu**. Aduc mulțumiri distinșilor referenți **Prof. univ. dr. farm. Anca Miron** și **Prof. univ. emerit dr. ing. Maria Gavrilescu** pentru onoarea de a face parte din comisia de susținere publică și de a recenza această teză.

Această teză de doctorat nu ar fi fost completă fără ajutorul **dr. biolog Gabriela Vochița** și **dr. biolog Elvira Gille**, cărora țin să le mulțumesc pentru ajutorul și sfaturile științifice prețioase acordate, adresându-le pe această cale recunoștința mea. De asemenea, doresc să adresez cuvinte de mulțumire **Conf. dr. ing. Bogdan Chiriță** și **dr. ing. Marius Secula** pentru sprijinul acordat.

Mulțumesc familiei mele pentru dragostea, educația, răbdarea, sprijinul moral și material și încurajările oferite pe parcursul acestor ani.

Iași, iulie 2023

## CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	<b>1</b>
<b>PARTEA I: STUDIU DE LITERATURĂ</b>	<b>7</b>
<b>Capitolul 1. Posibilități de valorificare a biomasei ca sursă de taninuri catehice</b>	<b>7</b>
1.1 Importanța taninurilor catehice din biomasă	7
1.2 Proprietățile fizico-chimice ale taninurilor catehice	9
1.3 Potențialul biologic al taninurilor catehice	10
1.4 Surse naturale de taninuri catehice	12
1.5 Tehnici de extracție a taninurilor catehice din biomasă	18
1.5.1 Tehnici convenționale de extracție	18
1.5.2 Tehnici neconvenționale de extracție	21
1.5.2.1 Extracția asistată de microunde (MAE)	22
1.5.2.2 Extracția asistată de ultrasunete (UAE)	22
1.5.2.3 Extracția cu fluide supercritice (SFE)	25
1.6 Posibilități de investigare a mecanismului și cineticii de extracție a compușilor fitochimici din biomasă	26
1.6.1 Modelarea cinetică a procesului de extracție solid lichid	26
1.6.2 Cinetică procesului de extracție asistată de microunde (MAE) a compușilor polifenolici din biomasă	32
1.6.3 Modele matematice pentru descrierea cineticii de extracție solid-lichid în extracția asistată de microunde (MAE)	34
1.7 Metode de identificare și dozare a taninurilor catehice din biomasă	40
1.7.1 Metode spectrofotometrice	40
1.7.2 Metode cromatografice	41
1.8 Metode de evaluare a potențialului biologic al taninurilor catehice	43
1.8.1 Metode de evaluare a activității antioxidante	43
1.8.2 Metode de evaluare a activității antimicrobiene	44
1.9 Metode de evaluare a potențialului biologic pe model vegetal și animal	45
1.10 Posibilități de valorificare a biomasei prin obținerea de bioproduse și subproduse	47
1.11 Concluzii	48
<b>PARTEA A II-A: STUDII EXPERIMENTALE – CONTRIBUȚII ORIGINALE</b>	<b>49</b>
<b>Capitolul 2. Metodologie experimentală</b>	<b>49</b>
2.1 Model experimental de valorificare sustenabilă a speciilor de arbuști <i>Rosa canina</i> L., <i>Hippophae rhamnoides</i> L. și <i>Prunus spinosa</i> L. ca surse de compuși bioactivi	49
2.1.1 Algoritm de lucru privind elaborarea modelului funcțional	49
2.1.2 Diagrama studiilor experimentale	51
2.2 Materiale și metode de evaluare analitică	54
2.2.1 Metode aplicate pentru caracterizarea generală a biomasei	54
2.3 Metode aplicate pentru caracterizarea fitochimică extensivă a biomasei	56
2.3.1 Teste specifice de identificare a compușilor de interes	56
2.3.2 Metode cromatografice și spectrofotometrice de analiză calitativă și cantitativă a taninurilor catehice	57
2.3.2.1 Identificarea cromatografică HPTLC a acizilor polifenolcarboxilici și a flavonoidelor	57
2.3.2.2 Identificarea cromatografică HPTLC a taninurilor	58

2.3.2.3	Analiza spectrofotometrică FT-IR	59
2.3.2.4	Analiza calitativă și cantitativă prin spectrofotometrie UV-VIS	59
2.4	Materiale și metode experimentale de obținere de extracte vegetale cu conținut controlat în taninuri catehice	62
2.4.1	Metode convenționale aplicate pentru extracția taninurilor catehice	62
2.4.1.1	Modul de lucru	62
2.4.1.2	Modelarea cinetică a procesului de extracție a taninurilor catehice	64
2.4.2	Metode neconvenționale aplicate pentru extracția taninurilor catehice	64
2.4.2.1	Modul de lucru	64
2.4.2.2	Modelarea cinetică a procesului de extracție a taninurilor catehice	68
2.4.2.3	Modelarea și optimizarea procesului de extracție a taninurilor catehice	68
<b>Capitolul 3.</b>	<b>Evaluarea potențialului chimic al unor bioresurse în scopul identificării unei surse de biomasă pentru extracția taninurilor catehice</b>	<b>69</b>
3.1	Recoltarea, procesarea, conservarea și depozitarea biomasei	69
3.2	Caracterizarea biomasei (ramuri de măceș, cătină și porumbar) utilizată în cercetarea experimentală	71
3.2.1	Caracterizarea botanică a speciilor vegetale utilizate ca sursă de biomasă	71
3.2.1.1	Măceș ( <i>Rosa canina</i> L.)	71
3.2.1.2	Cătină ( <i>Hippophae rhamnoides</i> L.)	72
3.2.1.3	Porumbar ( <i>Prunus spinosa</i> L.)	72
3.2.2	Caracterizarea generală - Analiza fizico-chimică globală	73
3.2.3	Caracterizarea fitochimica extensivă	75
3.2.3.1	Identificarea compușilor activi de interes - studiul fitochimic calitativ	75
3.2.3.2	Caracterizarea cromatografică a biomasei	79
3.2.3.3	Analiza spectrofotometrică FT-IR a biomasei	85
3.2.3.4	Analiza calitativă și cantitativă a biomasei prin spectrofotometrie UV-VIS a biomasei	87
3.3	Concluzii	89
<b>Capitolul 4.</b>	<b>Studiul procesului de extracție a taninurilor catehice</b>	<b>91</b>
4.1	Studii cinetice privind procesul de extracție a taninurilor catehice din biomasă (ramuri de măceș, cătină și porumbar) utilizând tehnici convenționale	91
4.1.1	Studiu privind extracția taninurilor catehice prin metode convenționale din cele trei tipuri de biomasă (ramuri de maceș, cătină și porumbar) – evaluare comparativă	91
4.1.2	Studiul cinetic al procesului de extracție a taninurilor catehice din măceș	96
4.1.3	Studiul cinetic al procesului de extracție a taninurilor catehice din cătină	100
4.1.4	Studiul cinetic al procesului de extracție a taninurilor catehice din porumbar	105
4.2	Studiul procesului de extracție a taninurilor catehice din biomasă (ramuri de porumbar) utilizând tehnici de conversie neconvenționale: extracția asistată de microunde – MAE	110
4.2.1	Determinarea gradului de mărunțire a biomasei de porumbar în vederea aplicării procesului de extracție MAE	110
4.2.2	Influența gradului de mărunțire a produsului vegetal	113
4.2.3	Influența concentrației solventului (experiment monofactorial 1- EM1)	114
4.2.4	Influența raportului solid / lichid (experiment monofactorial 2- EM2)	115
4.2.5	Influența timpului de extracție (experiment monofactorial 3- EM3)	116
4.2.6	Influența puterii de iradiere a microundelor (experiment monofactorial 4- EM4)	118
4.2.7	Modelarea cinetică a procesului de extracție	119
4.2.8	Modelarea și optimizarea procesului de extracție asistată de microunde a taninurilor	124

catehice din ramuri de porumbar	
4.2.8.1 Evaluarea calitativă și cantitativă prin HPTLC/densitometrie a extractelor de porumbar obținute prin MAE în matricea de experimentare	124
4.2.8.2 Modelarea și optimizarea procesului de extracție asistată de microunde a taninurilor catehice din ramuri de porumbar	141
4.3 Concluzii	154
<b>Capitolul 5. Evaluarea potențialului biologic al extractului de porumbar cu conținutul cel mai ridicat în taninuri catehice</b>	<b>155</b>
5.1 Evaluarea citotoxicității prin metoda fitobiologică – <i>in vivo</i> (model vegetal) pe <i>Triticum aestivum</i> L. (grâu)	155
5.2 Evaluarea activității antioxidante	160
5.2.1 Determinarea capacității antiradicalice cu utilizarea radicalului DPPH	160
5.2.2 Determinarea capacității de scavenger față de radicalul cation ABTS	166
5.2.3 Determinarea activității antioxidante prin HPTLC-DPPH	170
5.3 Determinarea activității antimicrobiene prin autobiografie	173
5.4 Studiul efectelor citotoxic și citogenetic pe celule HeLa (MTT)	175
5.5 Concluzii	186
<b>Capitolul 6. Evaluarea fitochimică a biomasei reziduale de ramuri de porumbar în vederea valorificării avansate</b>	<b>187</b>
6.1 Caracterizarea fitochimica calitativă	187
6.2 Caracterizarea calitativă prin spectrofotometrie FT-IR	188
6.3 Caracterizarea calitativă/semicantitativă prin cromatografie în strat subțire (HPTLC)	189
6.4 Evaluarea cantitativă prin spectrofotometrie UV-VIS	198
6.5 Evaluarea compoziției chimice generale a biomasei reziduale	199
6.6 Concluzii	199
<b>Capitolul 7. Conversia biomasei reziduale prin piroliză lentă</b>	<b>200</b>
7.1 Valorificarea biomasei reziduale prin piroliză lentă	200
7.2 Caracterizarea biocarbunelui prin spectrofotometrie FT-IR	201
7.3 Analiza suprafeței specifice a biocarbunelui prin metoda BET	202
7.4 Aplicații potențiale ale biocarbunelui obținut	203
7.5 Concluzii	204
<b>CONCLUZII FINALE</b>	<b>205</b>
<b>CONTRIBUȚII ORIGINALE</b>	<b>211</b>
<b>BIBLIOGRAFIE</b>	<b>213</b>
<b>ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ</b>	<b>241</b>
<b>ANEXE</b>	<b>244</b>
Lista tabelor	244
Lista figurilor	246
Lista abrevierilor	251

*În rezumatul tezei de doctorat se prezintă cele mai reprezentative rezultate obținute în urma cercetărilor experimentale proprii, concluziile generale și bibliografie selectivă. La redactarea rezumatului s-au păstrat aceleași notații pentru capitole, paragrafe, tabele, figuri și ecuații ca în textul tezei de doctorat*

## INTRODUCERE

În ultimii ani, se acordă o atenție deosebită proceselor de valorificare complexă a resurselor de biomasă, studiile fiind îndreptate către proiectarea și implementarea unor procese inovatoare, care să respecte politicile europene bazate pe principiile de prevenirea și controlul integrat al poluării precum și pe conceptele de dezvoltare durabilă, cu asigurarea sustenabilității. Cercetările în acest domeniu sunt justificate de necesitatea valorificării complexe a materiilor prime vegetale rezultate ca deșeuri și subproduse precum și de creșterea accentuată a cererii pentru produse naturale obținute prin procedee mai puțin costisitoare și nepoluante.

Pentru a fi durabilă, utilizarea biomasei va depinde în mare măsură de implementarea cu succes a conceptului de „green chemistry – chimie verde” care presupune utilizarea eficientă a resurselor, inclusiv a deșeurilor, evitarea folosirii de reactivi și solvenți toxici sau periculoși în procesele utilizate, opțiunea pentru procese de conversie neconvenționale cu impact minim asupra mediului (Sheldon, 2011; Da Silva et al., 2022).

Pentru îndeplinirea acestor deziderate se impune adoptarea unor tehnologii în conformitate cu procesele de „biorafinare”. Biorafinarea presupune aplicarea sau dezvoltarea de noi metode pentru fracționarea biomasei în substanțe extractibile și constituenți principali și valorificarea ulterioară a acestora în diferite categorii de bioproduse și/sau energie. Transformările ce pot fi aplicate sunt în acord cu principiile chimiei verzi și sunt în funcție de natura materiei prime și de compoziția acesteia, fiind posibilă obținerea unui spectru larg de produse și energie.

În contextul actual, una dintre marile provocări ale societății noastre este de a găsi modalități sustenabile de a obține bioproduse din bioresurse mai puțin cunoscute sau insuficient exploatare. Din acest punct de vedere, materiile prime de proveniență agricolă și forestieră au o compoziție chimică care permite utilizarea lor pentru obținerea de extracte vegetale, compuși chimici, fibre, sau biocombustibili.

Cea mai importantă etapă în obținerea de produse din biomasă este procesul de extracție care are ca scop separarea calitativă și cantitativă a compușilor de interes. Aceasta este influențată de mai mulți factori, cum ar fi: procesul ales, solvenții utilizați, timpul și temperatura de extracție etc. Metoda de extracție este selectată în funcție de natura matricei produsului vegetal și de compușii bioactivi care urmează a fi extrași. După selecția metodei de extracție, următoarea etapă este aceea de a optimiza procesul prin selectarea parametrilor optimi, urmărindu-se obținerea unei cantități cât mai ridicate de compus bioactiv cu un consum redus de energie și solvent. Pentru obținerea compușilor bioactivi din biomasă se apelează fie la procese clasice de extracție, fie la procese neconvenționale. Tehnicile de extracție clasice au dezavantajul că pot lăsa urme de solvent sau pot provoca degradarea

termică a compușilor bioactivi, în timp ce, procedeele neconvenționale de extracție oferă o alternativă ecologică de obținere a compușilor cu valoare adăugată din biomasă. Cercetările din ultimul timp au urmărit implementarea unor tehnologii care să crească eficiența proceselor de extracție prin aplicarea unor procedee de intensificare, cum ar fi: ultrasunetele, microundele sau folosirea fluidelor supercritice. Utilizarea acestor tehnici prezintă importante avantaje și anume: sunt nepoluante, au un consum redus de energie și materii prime, au randamente ridicate de extracție a diferiților compuși cu activitate biologică din diverse bioresurse (Herrero et al., 2005; Baiano și del Nobile, 2015; Janicka et al., 2022). Studiul amănunțit a acestor procese presupune stabilirea cineticii de extracție, care oferă informații complete referitoare la factorii care influențează procesul și la mecanismul cinetic după care se desfășoară acesta.

În ultimii ani, din cauza numărului sporit al factorilor de risc care afectează sănătatea într-un mediu constant poluat, s-a constatat creșterea interesului pentru bioproduse în special pentru cele cu acțiune antioxidantă, cu conținut ridicat în compuși polifenolici, utilizate ca suport nutrițional și fiziologic (Yang și Wu, 2002; Rudrapal et al., 2022). În acest domeniu au fost raportate numeroase cercetări prin care se urmărește, atât stabilirea unor noi surse de substanțe cu efect antioxidant, cât și determinarea mecanismelor antioxidante complicate și implicarea lor în metabolismul macroorganismelor, inclusiv a celui uman (Peng et al., 2014; Li et al., 2015; Shahidi și Hossain, 2023). Realizările în aceste direcții stau la baza argumentării consumului alimentar și non-alimentar al substanțelor cu efect antioxidant și antiradicalic. Capacitatea antioxidantă de a bloca radicalii liberi (în special cei care conțin oxigen și azot) conduce la protecția celulelor și a structurilor celulare împotriva efectelor dăunătoare ale acestora. De aceea, eforturile cercetătorilor sunt concentrate asupra problemelor de extracție, identificare și utilizarea antioxidantilor naturali, studierii rolului lor în reducerea riscului dezvoltării diverselor patologii și dezvoltării de metodologii în scopul evaluării acțiunii lor. Sunt bine cunoscute efectele extractelor și ale preparatelor pe bază de flavonoizi, utilizate în calitate de nutraceutice cu efect antioxidant pronunțat (Deng et al., 2012; Deng et al., 2013; Sharafan et al., 2023).

În contextul prezentat, tema propusă în teza de doctorat cu titlul **Contribuții la dezvoltarea unui sistem integrat pentru valorificarea unor bioresurse (vegetale / arbuști) în domeniul fitofarmaceutic**, a vizat cu preponderență identificarea de noi bioresurse, larg disponibile, cu o compoziție chimică valoroasă, care să justifice studii aprofundate pentru valorificarea sustenabilă a acestora, cu obținerea de bioproduse cu valoare adăugată mare și cu multiple aplicații în domenii diferite. Astfel, s-a urmărit realizarea unui studiu aprofundat asupra posibilităților de valorificare complexă a unor specii vegetale (ramuri ale arbuștilor de *Rosa canină* L. / măceș, *Hippophae rhamnoides* L. / cătină și *Prunus spinosa* L. / porumbar) care sunt accesibile în cantități însemnate în România și care sunt încă insuficient studiate atât din punct de vedere al compușilor cu potențial



bioactiv, cât și a posibilităților de valorificare avansată. Viziunea acestui demers a fost ca toate tehnicile de conversie propuse și studiate să fie concentrate spre obținerea de bioproduse cu valoare adăugată și nu de forme de bioenergie și, mai mai mult decât atât, să respecte conceptul de economie circulară cu generarea de zero deșeuri.

**Obiectivul general** al tezei a fost dezvoltarea **unui model funcțional de valorificare sustenabilă** a unor noi bioresurse vegetale (arbuști de măceș / *Rosa canina* L., cătină / *Hippophae rhamnoides* L., porumbar / *Prunus spinosa* L.) în scopul obținerii a două tipuri importante de **bioproduse: extracte vegetale cu conținut ridicat de taninuri catehice** (obținute în etapa de **biorafinare primară** ce include tehnici de extracție convenționale și neconvenționale) și a unui **material micro/nanostructurat bogat în carbon** (biocărbune rezultat prin conversia termochimică a biomasei epuizate după extracție și separare în etapa de **biorafinare secundară**).

Principalele premize și rezultate în valorificarea sustenabilă a unor specii de arbuști ca surse de compuși bioactivi sunt: bioprospectarea prin explorarea biodiversității pentru noi resurse biologice (specii de arbuști), dezvoltarea unui model de conversie prin utilizarea de procedee „verzi”/prietenoase mediului, aplicate în etapa primară cât și în cea secundară de biorafinare, evidențierea avantajelor generării de noi bioproduse, dar și diminuarea sau evitarea degradării ecosistemului sau poluării mediului.

Importanța cercetărilor în acest sens este justificată, pe de o parte, de necesitatea valorificării complexe a unor specii vegetale din flora spontană de la care, până în prezent, se folosesc doar fructele ca sursă de compuși bioactivi, iar pe de altă parte, de creșterea accentuată a cererii pentru produsele naturale obținute din surse vegetale.

Cercetările au fost justificate de următoarele aspecte:

- capacitatea biomasi de regenerare anuală, cu generarea unor cantități semnificative de materii prime, din flora spontană sau cultivată, prin utilizarea cărora să nu fie afectate ecosistemele și biodiversitatea;
- identificarea unor noi surse de compuși bioactivi reprezentate de elemente morfologice (ramuri de un an) a speciilor de măceș, cătină și porumbar, mai puțin cercetate, care reprezintă o sursă importantă de taninuri catehice, flavonoide, polizaharide cu potențial antioxidant, antiviral, hipocolesterolemiant, antineoplazic;
- posibilitatea de valorificare sustenabilă a acestor bioresurse pentru generarea de noi bioproduse utilizând procedee de biorafinare primară ce includ tehnici de extracție și separare, precum și procese termochimice de conversie în etapa de biorafinare secundară;
- existența în literatura de specialitate doar a puține studii de extracție a compușilor bioactivi din ramurile lignificate ale unor specii de arbuști, datele privind extracția taninurilor catehice din ramurile lignificate de cătină, măceș și porumbar și evaluarea cineticii de extracție sunt aproape

inexistente;

- posibilitatea de realizare a unei caracterizări complexe a extractelor selective obținute din ramuri de măceș, cătină și porumbar cu conținut ridicat în taninuri catehice prin aplicarea unor tehnici avansate de analiză calitativă și cantitativă (spectrofotometria UV-VIS, spectrofotometria FT-IR, cromatografia în strat subțire HPTLC ) precum și de evaluare a potențialului antioxidant, a acțiunii antimicrobiene și antitumorale a extractelor îmbogățite în taninuri catehice;

- posibilitatea de obținere a unui material natural poros, bogat în carbon (biocărbune), caracterizarea și identificarea direcțiilor de aplicare ale acestuia.

Pentru realizarea obiectivului general, s-au prevăzut o serie **de obiective specifice**, care au fost îndeplinite în partea a doua a tezei în care sunt prezentate contribuțiile personale. Acestea sunt:

1. Realizarea unui studiu comprehensiv de literatură care evidențiază posibilitățile de valorificare a biomasei ca sursă de taninuri catehice.
2. Selectarea și caracterizarea biomasei utilizată în studiu.
3. Studiul conversiei primare a biomasei prin utilizarea unor tehnici de extracție selectivă (convenționale și avansate) pentru obținerea de extracte cu conținut ridicat în taninuri catehice: studii cinetice, modelare cinetică, optimizarea procesului.
4. Evaluarea extractelor vegetale rezultate din conversia primară a biomasei prin punerea în evidență a compușilor de interes, a potențialului biologic și demonstrarea efectelor specifice.
5. Evaluarea fitochimică a biomasei reziduale din prima etapă de conversie, prin determinarea gradului de epuizare în compuși polifenolici (taninuri catehice) și propunerea de soluții sustenabile pentru conversia secundară a acesteia.

Teza de doctorat cu titlul **Contribuții la dezvoltarea unui sistem integrat pentru valorificarea unor bioresurse (vegetale / arbuști) în domeniul fitofarmaceutic** a fost structurată în două părți și șapte capitole. Teza se încheie cu o serie de concluzii generale și evidențierea contribuțiilor originale, bibliografia și activitatea științifică derulată în perioada de pregătire prin doctorat.

Prima parte a tezei – **Studiu de literatură** conține **capitolul 1 – Posibilități de valorificare a biomasei ca sursă de taninuri catehice** – în care s-a analizat stadiul actual al cercetărilor privind importanța taninurilor catehice din biomasă, a posibilităților de extracție a acestora precum și de demonstrare a potențialului lor biologic activ. Astfel, s-a avut în vedere evidențierea proprietăților chimice și biologice ale taninurilor catehice, identificarea de surse de taninuri catehice și posibilități de extracție a acestora prin tehnici convenționale și neconvenționale. De asemenea, s-au analizat metodele de identificare și dozare a taninurilor catehice din biomasă și de determinare a potențialului lor biologic (antioxidant, antibacterian, antitumoral etc.).

A doua parte a tezei conține șase capitole în care se prezintă **studiile experimentale (contribuții originale)** prin care s-au dus la îndeplinire obiectivele specifice propuse.

În **capitolul 2 – Metodologie experimentală** – este prezentată în formă detaliată metodologia utilizată pentru realizarea cercetărilor experimentale. S-au avut în vedere următoarele:

- Materialele și metodele de evaluare analitică;
- Materialele utilizate pentru caracterizarea fitochimică extensivă a biomasei;
- Materialele și metodele experimentale de conversie a biomasei în extracte vegetale cu conținut ridicat în taninuri catehice precum și cele de conversie termochimică pentru biomasa epuizată rezultată ca deșeu după etapa de extracție.

În **capitolul 3 – Evaluarea potențialului chimic al unor bioresurse în scopul identificării unei surse de biomasă pentru extracția taninurilor catehice** – sunt prezentate rezultatele cercetărilor experimentale realizate care se referă:

- Aspecte privind recoltarea, pretratarea, conservarea și depozitarea biomasei.
- Caracterizarea biomasei utilizate în cercetarea experimentală din punct de vedere botanic, fizico-chimic și fitochimic cu evidențierea corelațiilor dintre potențialul chimic și posibilitățile de valorificare.

În **capitolul 4 – Studiul procesului de extracție a taninurilor catehice** – sunt prezentate rezultatele obținute în urma studiilor cinetice privind procesul de extracție a taninurilor catehice din biomasă. Astfel, s-a urmărit:

- Realizarea studiilor cinetice privind procesele de extracție a taninurilor catehice prin metode convenționale și neconvenționale (MAE) precum și evidențierea influenței principalilor parametri de extracție.
- Evaluarea calitativă și cantitativă a extractelor obținute prin extracție asistată de microunde.
- Modelarea și optimizarea statistică a procesului de extracție asistată de microunde a taninurilor catehice din biomasă.

**Capitolul 5 – Evaluarea potențialului biologic a extractului de porumbar cu conținutul cel mai ridicat în taninuri catehice** – urmărește posibilitățile de aplicabilitate a extractului de porumbar prin demonstrarea potențialului biologic al acestuia. Astfel s-au utilizat teste specifice:

- pentru evaluarea citotoxicității extractului prin metoda fitobiologică pe model vegetal;
- evaluarea activității antioxidante și antimicrobiene;
- studiul efectelor citotoxic și citogenetic pe celule HeLa (acțiunea antitumorală).

În **capitolul 6 – Evaluarea fitochimică a biomasei reziduale de ramuri de porumbar în vederea valorificării avansate** – este prezentată caracterizarea fizico-chimică a biomasei reziduale de porumbar din punct de vedere calitativ și cantitativ prin metode spectrofotometrice, cromatografice și densitometrice, urmărindu-se evidențierea gradului de epuizare a acesteia ca urmare a aplicării

procesului de biorafinare primară. Acest material considerat acum, în activitățile industriale, un deșeu de proces, este privit în acest demers științific ca o materie primă care poate fi utilizată pentru obținerea de noi bioproduse cu un spectru larg de utilizare.

**Capitolul 7 – Conversia biomasei reziduale prin piroliză lentă** – evidențiază posibilitățile de valorificare a biomasei reziduale prin piroliză lentă, cu obținerea de biocărbunelui, caracterizarea acestui material bogat în carbon prin metode specifice (spectrofotometrie FT-IR, analiza suprafeței specifice și a volumului și a tipurilor de pori prin metoda BET) precum și identificarea aplicațiilor potențiale ale biocărbunelui obținut.

Prin prisma conceptelor generale în care se încadrează tematica abordată (economie circulară, biorafinare, controlul integrat al poluării, valorificarea sustenabilă a resurselor) studiul realizat este încadrat în domeniul prioritar de cercetare - mediu. Metodele și tehnicile utilizate în studiu se circumscriu însă mai multor domenii precum fitochimie, inginerie chimică, biologie, farmacie, analiză statistică, etc.

Teza include și formularea de concluzii și recomandări privind noi direcții de utilizare a bioproduselor obținute în diferite domenii ce vizează industria farmaceutică, chimică, agricultura, biologie, protecția mediului etc.

Datele obținute de-a lungul activității de pregătire prin doctorat au fost parțial diseminate și s-au concretizat **în 5 lucrări publicate în reviste cotate ISI și 1 în curs de publicare, 5 lucrări publicate în reviste indexate în baze de date internaționale**, precum și **6 participări (comunicare/poster) la diverse manifestări științifice naționale și internaționale**. Activitatea științifică este detaliată începând cu pagina 213 a tezei de doctorat.

**PARTEA a II-a**  
**STUDII EXPERIMENTALE – CONTRIBUȚII ORIGINALE**  
**Capitolul 2**  
**METODOLOGIE EXPERIMENTALĂ**

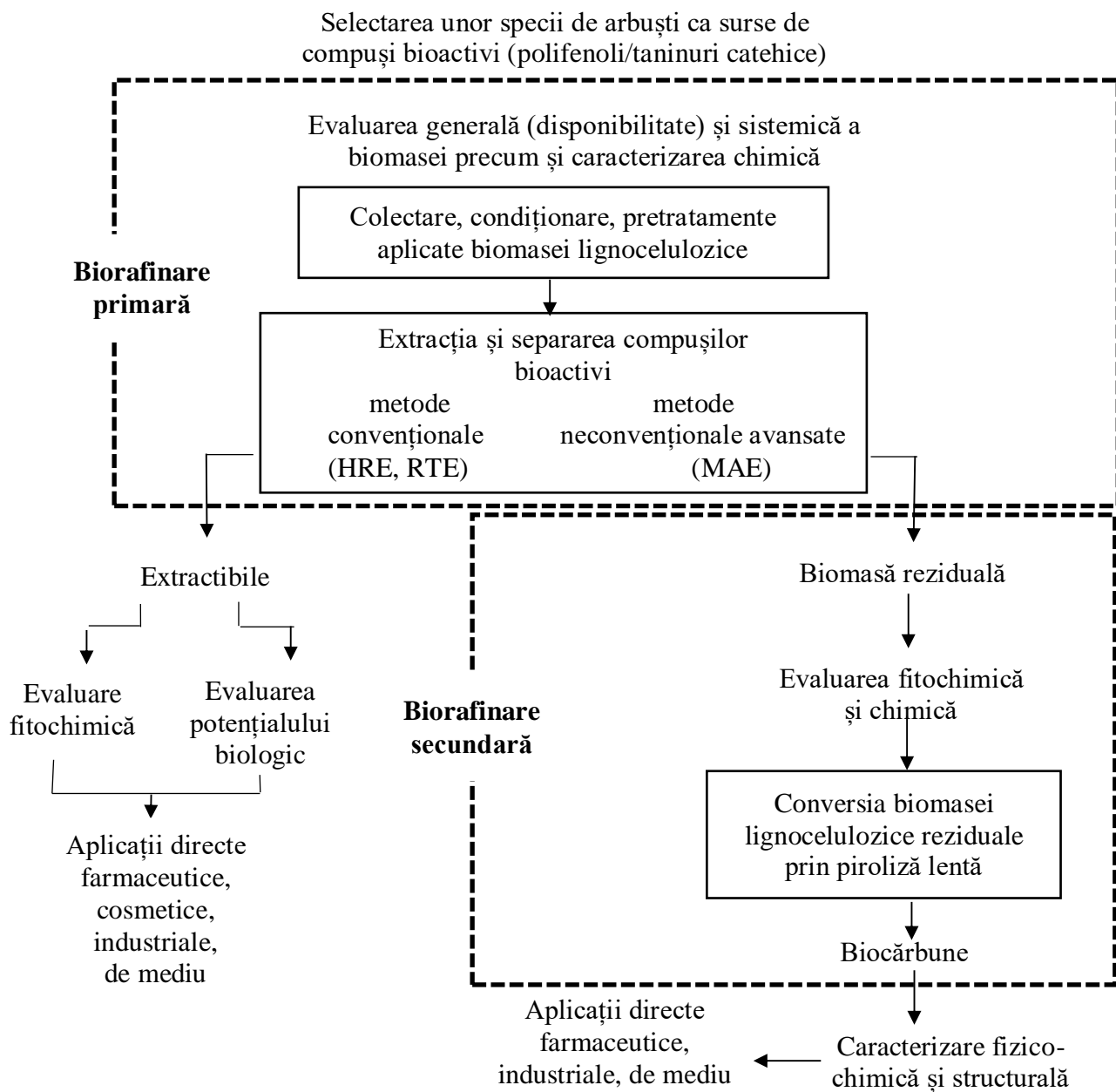
**2.1 Model funcțional de valorificare sustenabilă a speciilor de arbuști *Rosa canina* L.,  
*Hippophae rhamnoides* L. și *Prunus spinosa* L. ca surse de compuși bioactivi**

2.1.1 Algoritmul de lucru privind elaborarea modelului funcțional

Elaborarea unui **model funcțional de valorificare sustenabilă** a speciilor de arbuști de măceș, cătină și porumbar, ca surse de biomasă, a avut la bază aplicarea unui proces de biorafinare ce include tehnici de extracție convenționale și neconvenționale ca modalitate de obținere de extracte vegetale cu conținut ridicat în fitoconstituenți de interes precum și procese termochimice de conversie a biomasei epuizate după extracție și separare.

Modelul funcțional de valorificare sustenabilă presupune următoarele stadii care stau la baza algoritmului de lucru (Figura 2.1):

1. **Selectarea unor specii de arbuști ca surse de compuși bioactivi (polifenoli/taninuri catehice) în vederea obținerii de beneficii.**
2. **Evaluarea generală și sistemică a biomasei** – cu scopul evidențierii principalilor compuși bioactivi cu potențial biologic.
3. **Conversia primară a biomasei** – presupune utilizarea unor tehnici de extracție selectivă (extracție asistată de microunde), prietenoase cu mediul, care sunt nepoluante, reduc consumul de energie și de materii prime și oferă randamente mari de extracție a compușilor bioactivi din biomasă.
4. **Evaluarea extractelor vegetale rezultate din conversia primară a biomasei prin punerea în evidență a compușilor bioactivi și prin aplicarea unor metode specifice de determinare a potențialului biologic și demonstrarea efectelor specifice:**
  - 4.a. Evaluarea fitochimică,
  - 4.b. Evaluarea potențialului biologic.
5. **Evaluarea biomasei reziduale și conversia secundară a acesteia prin aplicarea unei tehnici de conversie termochimică și anume piroliza.**



**Figura 2.1** Model funcțional de valorificare sustenabilă a unor specii de arbuști ca surse de compuși bioactivi

### Capitolul 3

## EVALUAREA POTENȚIALULUI CHIMIC AL UNOR BIORESURSE ÎN SCOPUL IDENTIFICĂRII UNEI SURSE DE BIOMASĂ PENTRU EXTRAȚIA TANINURILOR CATEHICE

În căutarea de noi candidați pentru obținerea de compuși bioactivi (taninuri catehice) din bioresurse (vegetale/arbuști) prin aplicarea de tehnici de conversie prietenoase cu mediul s-au identificat speciile de arbuști *Rosa canina* L - măceș., *Hippophae rhamnoides* L. - cătină și *Prunus spinosa* L. - porumbar, cunoscute pentru utilizarea fructelor și mai puțin pentru utilizarea altor părți vegetale. Datele de literatură indică faptul ca ramurile acestor specii pot reprezenta noi surse de taninuri catehice, de aceea este necesară efectuarea de studii experimentale care sa dovedească potențialul chimic al acestor bioresurse.

### 3.1 Recoltarea, pre-tratarea, conservarea și depozitarea biomasei

Recoltarea biomasei, respectiv ramurile lignificate de la cele trei specii vegetale (Tabelul 3.1), s-a efectuat în sezonul de vegetație 2016 (luna octombrie), din flora spontană, de pe valea Siretului, județul Bacău, România, iar conservarea și depozitarea acesteia s-a realizat în formă de condiționare uscată conform Farmacopeii Europene 6.0., cap. 2.8.2.

### 3.2 Caracterizarea biomasei (ramuri de măceș, cătină, porumbar) utilizată în cercetarea experimentală

#### 3.2.1 Caracterizarea botanică a speciilor vegetale utilizate ca sursă de biomasă în cercetarea experimentală

##### 3.2.1.1 Măceș (*Rosa canina* L.)

Încadrare sistemică: regnul *Plantae*, încregătura *Magnoliophyta*, clasa *Magnoliopsida*, ordinul *Rosales*, familia *Rosaceae*, genul *Rosa*, specia *Rosa canina*.

##### 3.2.1.2 Cătină (*Hippophae rhamnoides* L.)

Încadrare sistemică: regnul *Plantae*, încregătura *Magnoliophyta*, clasa *Magnoliopsida*, ordinul *Rosales*, familia *Elaeagnaceae*, genul *Hippophae*, specia *Hippophae rhamnoides*.

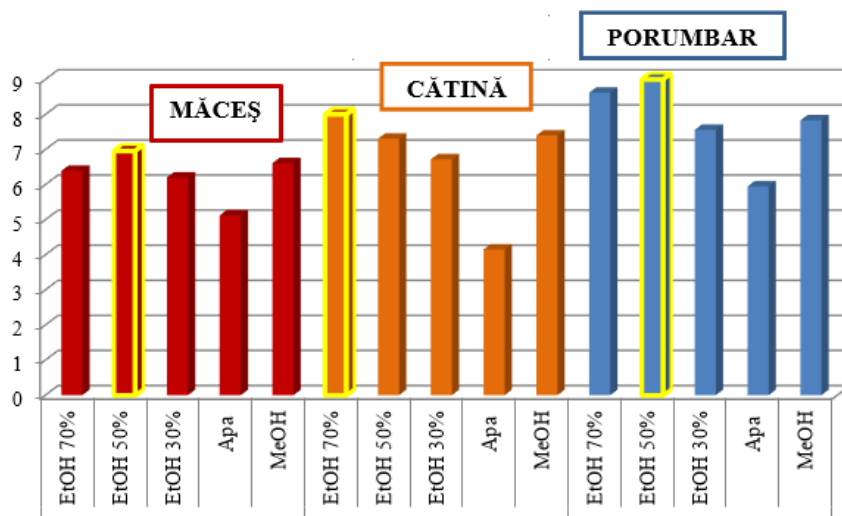
##### 3.2.1.3 Porumbar (*Prunus spinosa* L.)

Încadrare sistemică: regnul *Plantae*, încregătura *Angiosperme*, ordinul *Rosales*, familia *Rosaceae*, genul *Prunus*, specia *Prunus spinosa*.

#### 3.2.2 Caracterizare generală – Analiza fizico-chimică globală

În urma analizei fizico-chimice globale s-au obținut date preliminare privind stabilirea condițiilor de extracție și a solvenților care ar putea facilita extracția compusilor bioactivi de interes

din biomasa analizată. S-a constatat că solvenții care asigură obținerea celui mai mare procent de substanțe extractibile și de reziduu sunt solvenții hidroalcoolici 50 %v/v și 70 %v/v.

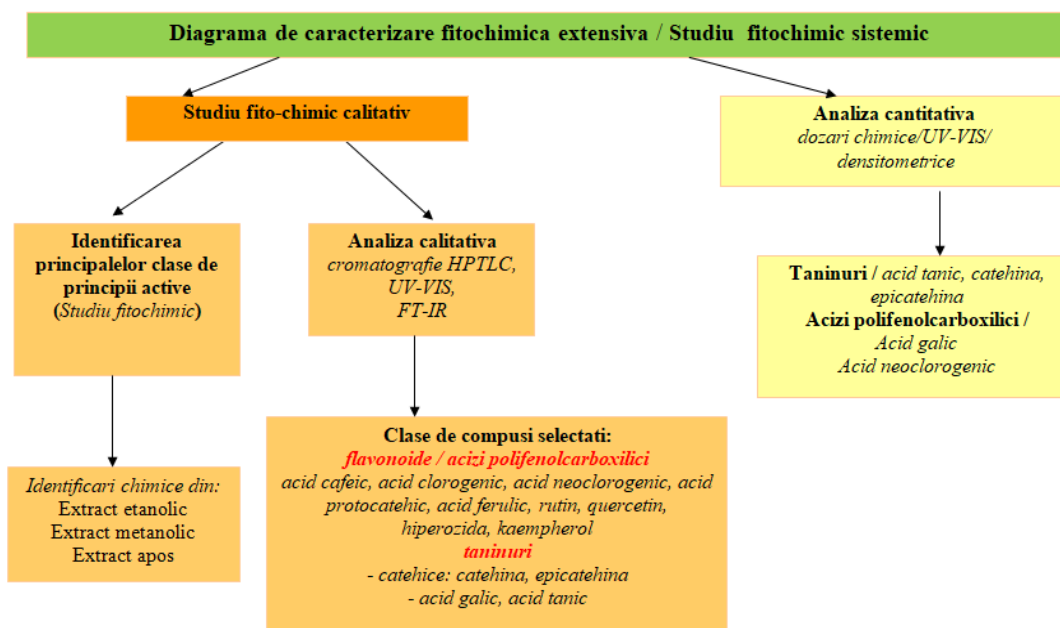


**Figura 3.1** Variația conținutului în substanțelor extractibile (%) în funcție de solvenul de extracție  
 Legendă: EtOH 70, 50, 30- etanol 70, 50, 30 % v/v; MeOH - metanol

### 3.2.3 Caracterizare fitochimică extensivă

#### 3.2.3.1 Identificarea compușilor activi de interes - studiul fitochimic calitativ

Screeningul fitochimic sistemic pentru speciile vegetale selectate (măceș, cătină și porumbar) s-a realizat prin analize fitochimice calitative și cantitative, în acord cu Farmacopeea Română, ed. a X-a și cu Farmacopeea Europeană, ed. 6 și metode instrumentale (spectrometrie FT-IR, spectrofotometrie UV-VIS și cromatografie HPTLC).



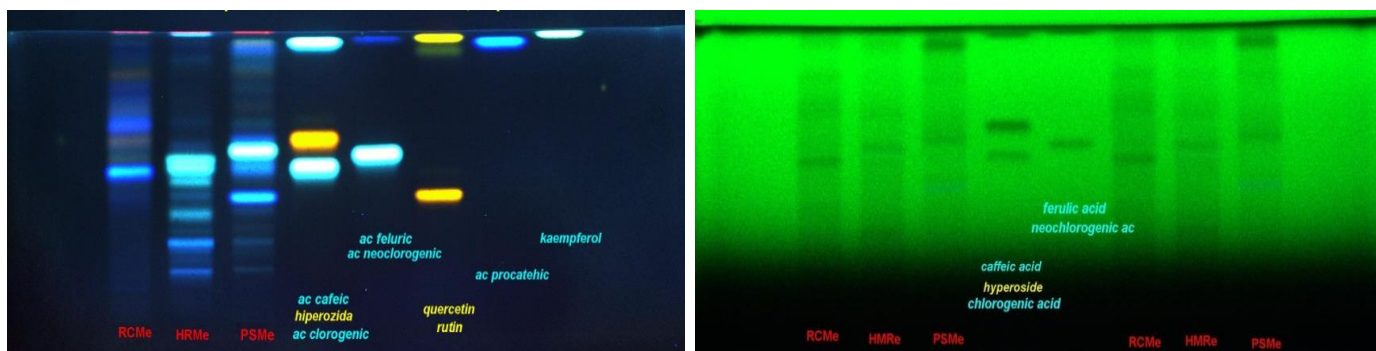
**Figura 3.2** Diagrama de caracterizare fitochimică extensivă a biomasei



### 3.2.3.2 Caracterizarea cromatografică a biomasei

#### ✓ Identificare cromatografică HPTLC a flavonoidelor și a acizilor polifenolcarboxilici

Studiul fitochimic calitativ efectuat prin cromatografie în strat subțire a evidențiat faptul că biomasa (ramurile lemnoase) aparținând celor trei specii vegetale măceș, cătină și porumbar au un conținut variat de substanțe polifenolice (flavonoide și acizi polifenolcarboxilici) (Figura 3.3).



a) 366 nm după derivatizare

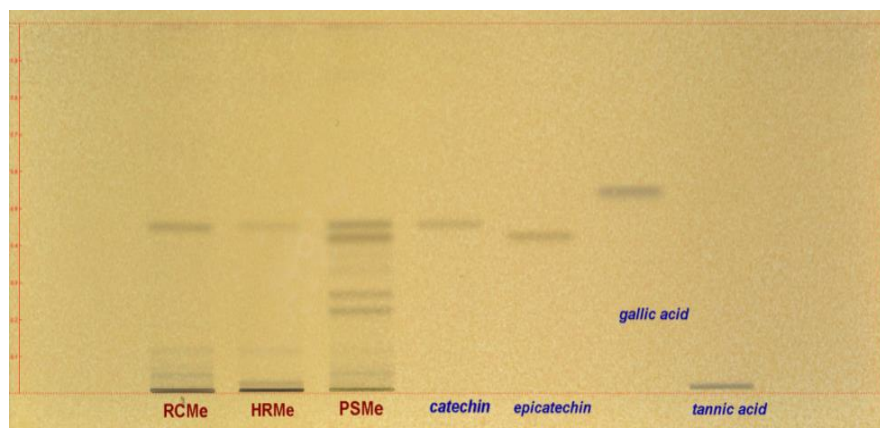
b) 254 nm după dezvoltare

**Figura 3.3 (a-b)** Cromatogramele de identificare a compușilor flavonoidici și a acizilor polifenolcarboxilici în extractele de măceș - RSM, cătină – HRMe, porumbar – PSMe

Pentru aprofundarea analitică a compoziției din punct de vedere al conținutului în polifenoli s-a realizat și dozarea densitometrică a compusului atribuit substanței de referință: **acid neochlorogenic** (0,12 % g/g biomasă) în extractul de porumbar.

#### ✓ Identificarea cromatografică HPTLC a taninurilor

Analiza cromatografică HPTLC a avut în vedere identificarea taninurilor din biomasa de măceș, cătină și porumbar. Imaginile HPTLC (Figura 3.4) au indicat separarea substanțelor de referință și a constituenților din biomasă analizată la diferite valori ale  $R_f$  (Tabelul 3.9): **catehina** în măceș, cătină și porumbar și **epicatehina** în porumbar.



**Figura 3.4** Cromatograma de identificare a taninurilor în extractele de măceș - RSM, cătină – HRMe, porumbar – PSMe – în vizibil, după derivatizare

Determinarea cantitativă prin densitometrie s-a efectuat pentru **catehină** în extractele de măceș (0,15 %), cătină (0,1 %) și porumbar (0,25 %) și a **epicatehină** doar în extractul de porumbar (0,22 %).

### 3.2.3.3 Analiza spectrofotometrică FT-IR a biomasei

Analiza calitativă efectuată utilizând spectrometria FT-IR a avut drept scop evidențierea grupărilor funcționale care se regăsesc în structura chimică a compușilor bioactivi de interes.

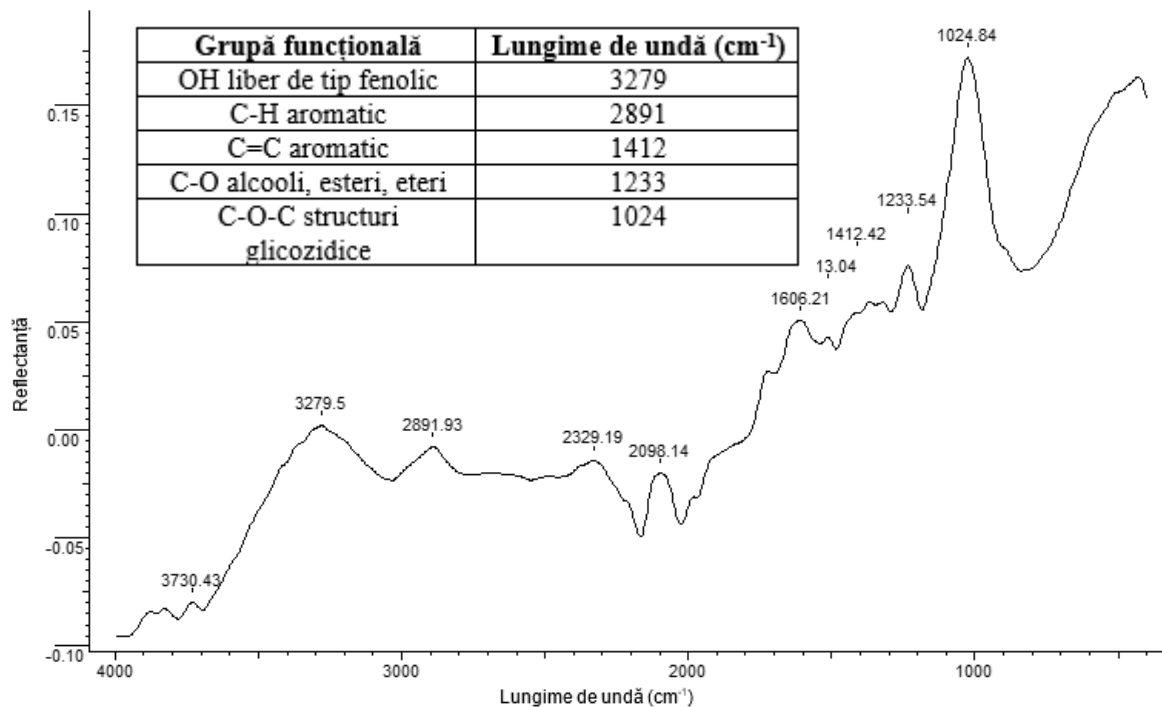


Figura 3.5 Spectrul FT-IR al pulberii de măceș

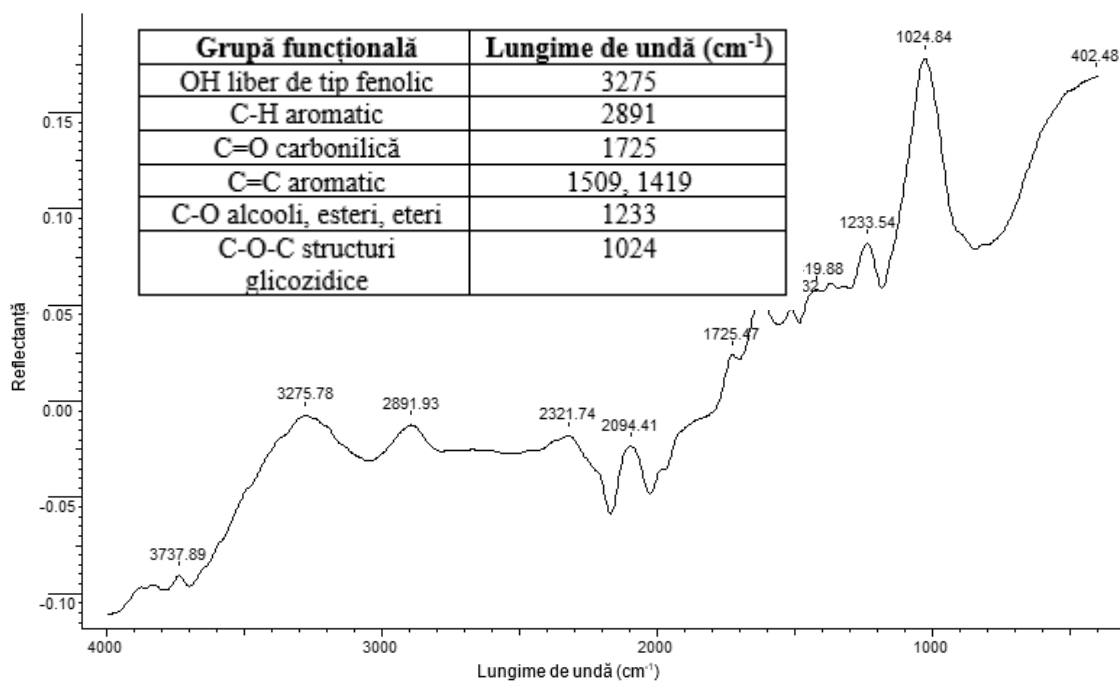
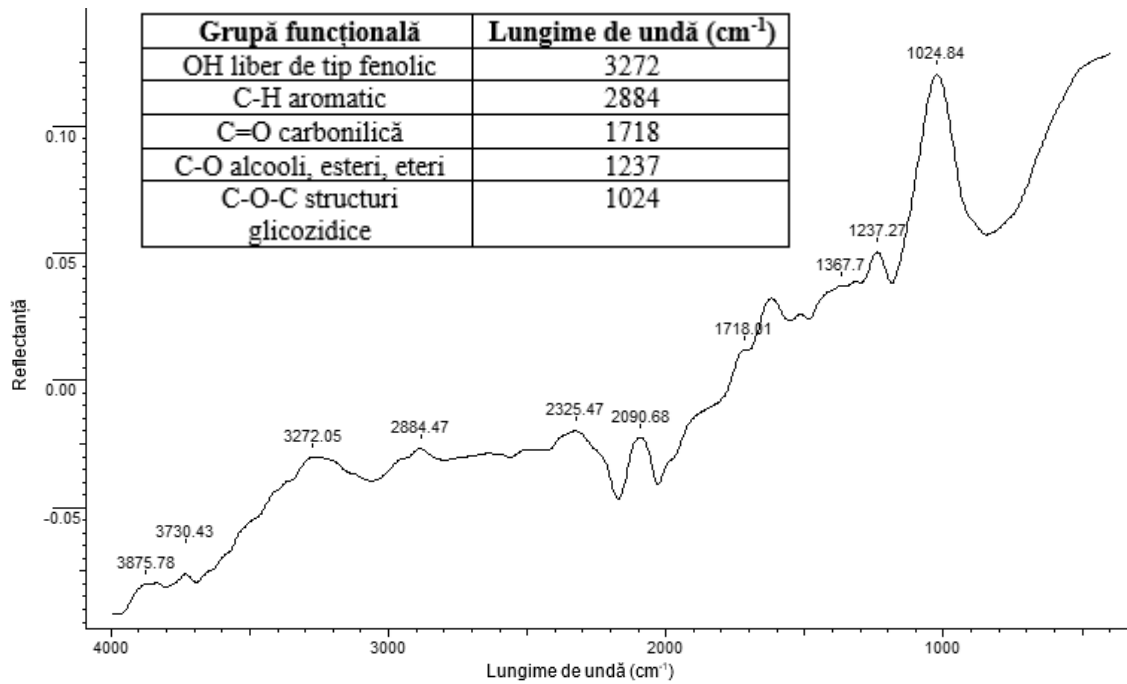


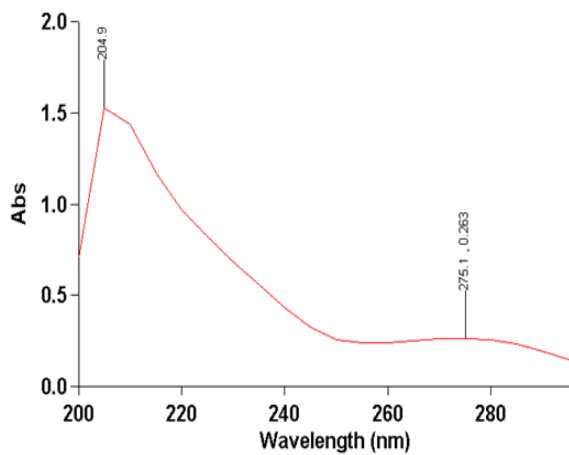
Figura 3.6 Spectrul FT-IR al pulberii de cătină



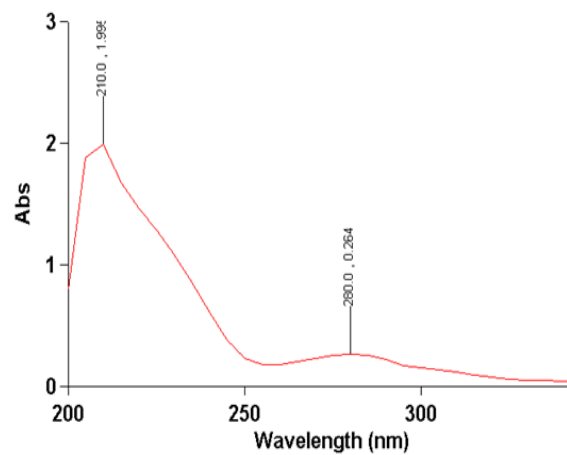
**Figura 3.7** Spectrul FT-IR al pulberii de porumbar

### 3.2.3.4 Analiza calitativă și cantitativă prin spectrofotometrie UV-VIS a biomasei

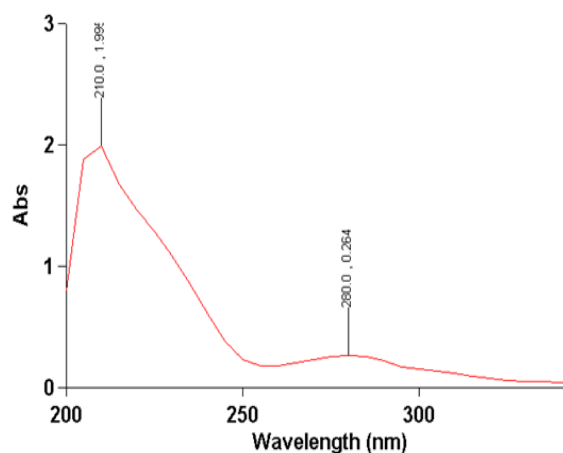
Taninurile catehice se detectează în intervalul 200 – 300 nm. S-a urmărit identificarea absorbțiilor specifice ale compușilor bioactivi de interes la lungimi de undă cuprinse între 200 – 700 nm, s-au măsurat intensitățile de absorbție cu spectrofotometrul UV-VIS CARY 50 folosindu-se extracte metanolice obținute din biomasă.



a) măceș



b) cătină



c) porumbar

**Figura 3.8 (a-c)** Analiza calitativă UV VIS a biomasei

## Capitolul 4

### STUDIUL PROCESULUI DE EXTRAȚIE A TANINURILOR CATEHICE

Evaluarea chimică și fitochimică a deșeurilor lignocelulozice reprezentate de ramurile de măceș, cătină și porumbar a scos în evidență profilul compozițional bogat în taninuri catehice (catehină și epicatehină) fapt pentru care se impune valorificarea acestor specii prin aplicarea unor procese de biorafinare primară (extracții convenționale/intensive – extracția asistată de microunde) urmărindu-se obținerea de bioproduse de tipul extractelor cu aplicații în industria farmaceutică, alimentară și nu numai.

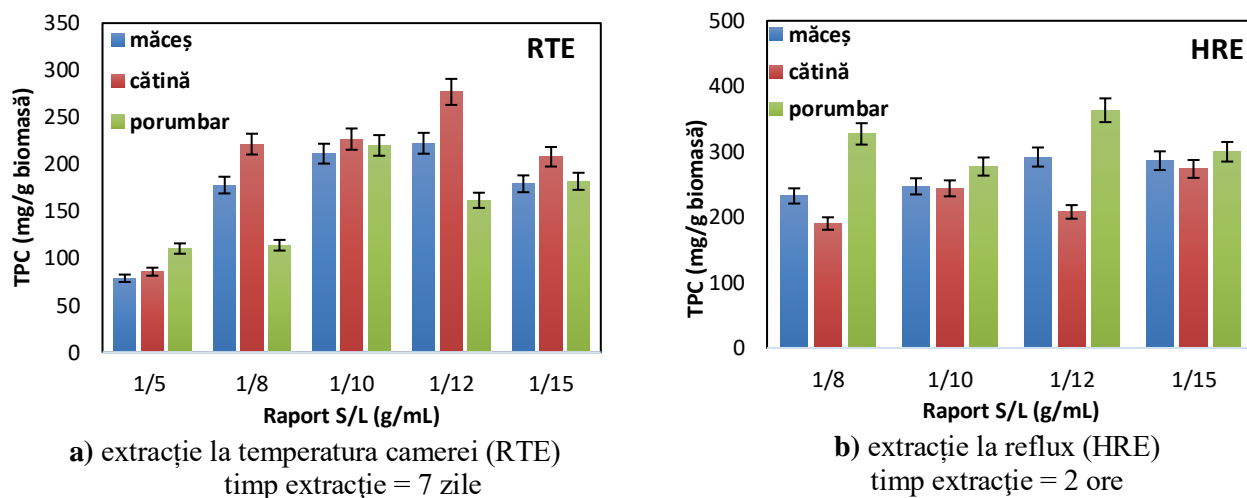
#### 4.1 Studii cinetice privind procesul de extracție a taninurilor catehice din biomasă (ramuri de măceș, cătină și porumbar) utilizând tehnici convenționale

##### 4.1.1 Studiu privind extracția taninurilor catehice prin metode convenționale din cele trei tipuri de biomasă (ramuri de măceș, cătină și porumbar) - evaluare comparativă

S-a avut în vedere studiul proceselor de extracție prin metodele convenționale **extracție la reflux (HRE)** și **extracție la temperatura camerei (RTE)** a compușilor polifenolici (markerul de control fiind conținutul total polifenolic exprimat în catehină – TPC, mg/g biomasă) din cele trei surse de biomasă (ramuri de măceș, cătină și porumbar).

Evaluarea comparativă a rezultatelor TPC obținute în cele mai bune condiții pentru extractele obținute din cele trei surse de biomasă, prin aplicarea procedeeleor de extracție convenționale este prezentată în Tabelul 4.1 și a evidențiat faptul că extractul obținut din porumbar are cele mai ridicate

valori ale TPC, fapt pentru care această specie a fost selectată pentru studii ulterioare de extracție prin aplicarea unor tehnici neconvenționale de tipul extracției asistate de microunde.



**Figura 4.2** (a-b) Influența raportului S/L asupra extracției TPC din ramuri măceș, cătină și porumbar utilizând metodele de extracție convenționale (5 g, raport S/L 1/10 g/mL).

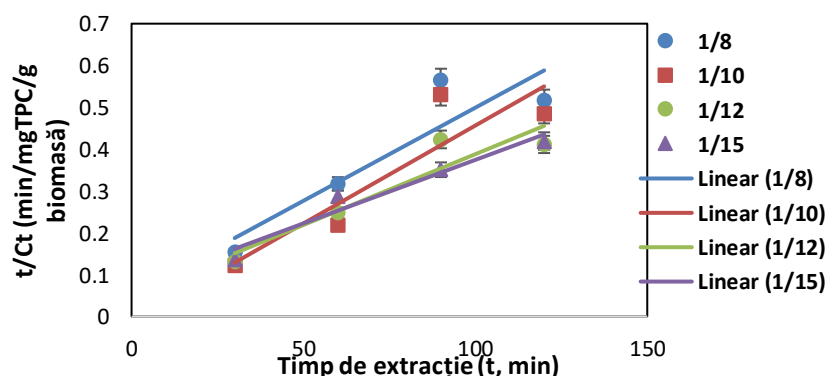
**Tabelul 4.1** Evaluarea comparativă a rezultatelor TPC obținute în cele mai bune condiții pentru cele trei surse de biomasă supuse metodei convenționale HRE

Specia vegetală/TPC	Măceș	Cătină	Porumbar
Cea mai mare valoare a TPC (mg/g biomasă) determinată experimental	273,17	264,28	343,21
Condiții	EtOH 50 %v/v S/L 1:10 60 min	EtOH 70 %v/v S/L 1:10, 90 min	EtOH 50 %v/v S/L 1:10 90 min

#### 4.1.2 Studiul cinetic al procesului de extracție a taninurilor catehice din ramuri de măceș

##### ✓ Modelarea cinetică

Pentru modelarea cinetică a procesului de extracție a TPC din ramurile de măceș utilizând metoda HRE, modelul reacției de ordin doi a arătat o bună concordanță între datele experimentale obținute și cele calculate folosind coeficienții cinetici specifici. Validarea acestui model cu datele experimentale a fost demonstrată de valori ridicate ale coeficienților de regresie ( $R^2 > 0.9146$ ).

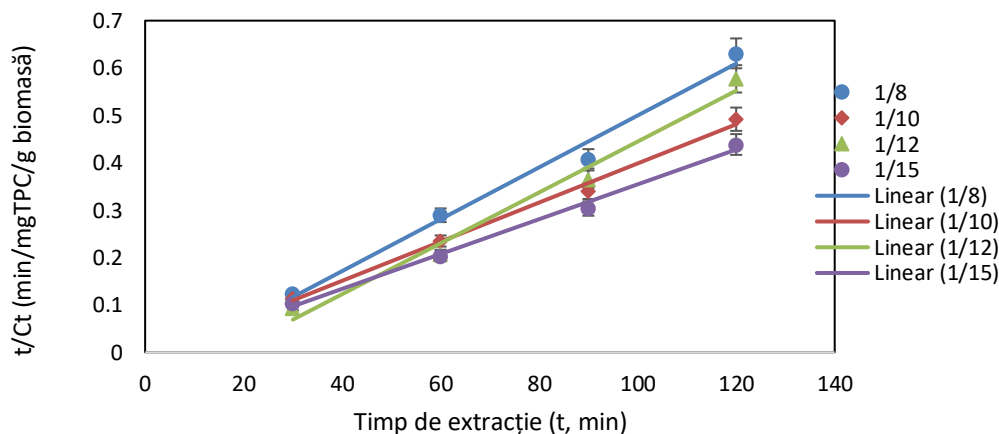


**Figura 4.7** Forma liniarizată a modelului cinetic de ordin doi pentru extracția TPC din ramurile de măceș la diferite rapoarte S/L utilizând HRE (5 g, 50 %v/v EtOH)

#### 4.1.3 Studiul cinetic al procesului de extracție a taninurilor catehice din ramuri de cătină

##### ✓ Modelarea cinetică

Dintre modelele cinetice existente în literatură, pentru datele experimentale obținute în studiul cinetic al procesului de extracție a TPC din ramuri de cătină utilizând metoda HRE, doar modelul specific reacției de ordin doi a dovedit o bună acoperire. Aplicarea modelului pentru toate datele experimentale este confirmată de valoarea coeficientului de regresie ( $R^2 > 0.980$ ).

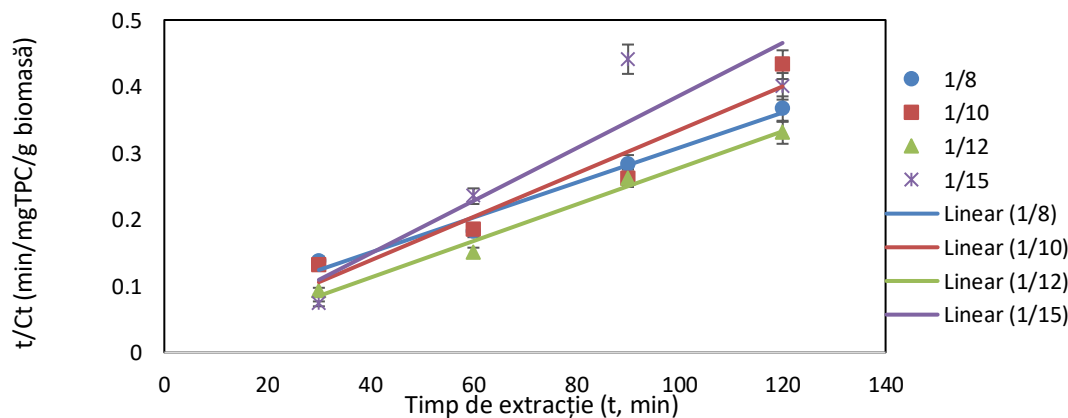


**Figura 4.13** Forma liniarizată a modelului cinetic de ordin doi al extracției TPC din ramurile de cătină pentru diferite rapoarte S/L utilizând HRE (5 g, 70 % v/v EtOH).

#### 4.1.4 Studiul cinetic al procesului de extracție a taninurilor catehice din ramuri de porumbar

##### ✓ Modelarea cinetică

Modelarea cineticii de extracție a TPC din ramuri de porumbar, utilizând HRE, a fost verificată pentru modelele Weber-Morris, legea lui Fick, modelul Page, modelul Peleg, modelul Weibull și modelul Elovich și reacție de ordinul doi. Dintre acestea, doar modelul de reacție de ordinul doi a permis calcularea parametrilor cinetici. O valoare a coeficientului de regresie ( $R^2$ ) mai mare de 0,830 confirmă aplicabilitatea modelului pentru toate datele experimentale.

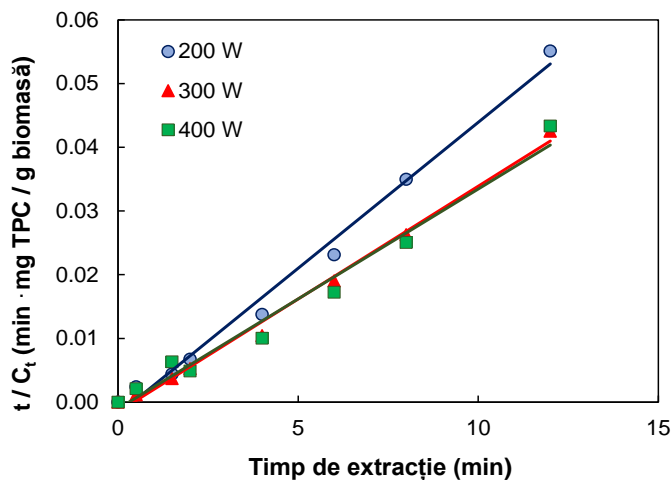


**Figura 4.19** Forma liniarizată a modelului cinetic de ordin doi al extracției TPC din ramurile de porumbar la diferite rapoarte S/L utilizând HRE (5 g, 50 % v/v EtOH).

## 4.2 Studiul procesului de extracție a taninurilor catehice din biomasă (ramuri de porumbar) utilizând tehnici de conversie neconvenționale: extracția asistată de microunde – MAE

### 4.2.7 Modelarea cinetică a procesului de extracție

Prin prelucrarea matematică a datelor experimentale în coordonatele specifice modelelor s-a evidențiat faptul că, pentru condițiile de lucru considerate în acest studiu, **cinetica procesului de extracție a polifenolilor asistată de microunde decurge după modelul cinetic de ordin doi.**



**Figura 4.31** Reprezentarea datelor experimentale în coordonatele specifice modelului cinetic de ordin doi.

### 4.2.8 Modelarea și optimizarea procesului de extracție asistată de microunde a taninurilor catehice din ramuri de porumbar

Optimizarea procesului de extracție a TPC din ramuri de porumbar presupune evaluarea celor mai importanți patru parametri implicați în proces ca variabile independente influente determinate în pre-experimentările monofactoriale, urmărindu-se obținerea valorii maxime a TPC în condiții de extracție asistată de microunde.

Pentru optimizarea procesului de extracție a fost necesară realizarea unui studiu de extracție efectuat **pe baza unui program factorial de experimentare utilizând parametrii de extracție la două nivele - maxim (+1) și minim (-1) – 2<sup>4</sup>.** S-au investigat următorii parametri independenți (Tabel 4.10): **concentrația solventului/A (%v/v); raportul solvent/material vegetal/B (mL/g); timpul de extracție/C (min); puterea microundelor /D (W).**

**Tabelul 4.10** Parametrii de extracție asistată de microunde (MAE) pentru un program de experimentare factorial la două nivele

Parametri variabili	Codificare	Nivel de variație	
		Minim (-1)	Maxim (+1)
Solvent de extracție (%v/v)	A	30	70
Raport lichid: solid (mL/g)	B	6:1	10:1
Timp de extracție (min)	C	2	5
Putere (W)	D	400	600

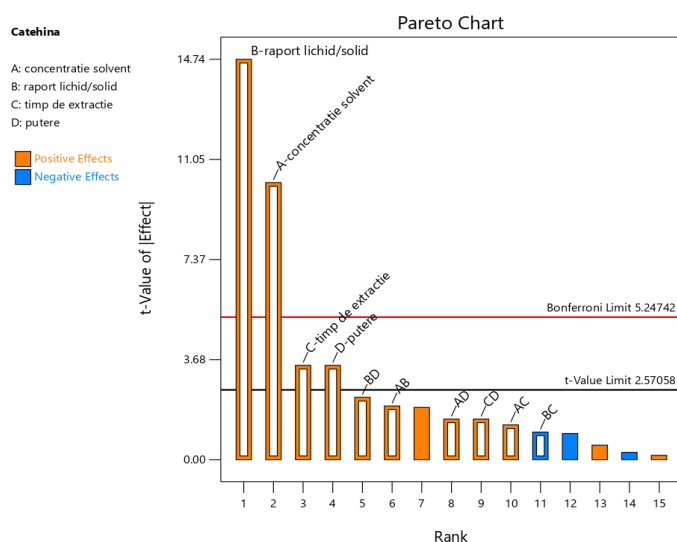
#### 4.2.8.2 Modelarea și optimizarea procesului de extracție asistată de microunde a taninurilor catehice din ramuri de porumbar

Modelarea și optimizarea procesului de extracție a taninurilor catehice din ramuri de porumbar a presupus evaluarea celor mai importanți patru parametri implicați în proces ca variabile independente determinate în pre-experimentările monofactoriale, pe baza valorilor obținute pentru catehină și epicatehină în condiții de extracție asistată de microunde.

Analiza statistică a răspunsurilor obținute (R1 – TPC catehină – mg/g, R2 – TPC epicatehină mg/g) (Tabelul 4.14), exprimate numeric s-a efectuat utilizând programul Design Expert 13 (versiunea 13, Stat-Ease Minneapolis, USA).

##### ✓ Analiza statistică a rezultatelor

Influența parametrilor variabili (concentrația solventului, raportul solid/lichid, timpul de extracție, puterea microundelor) implicați în procesul de extracție asistată de microunde a taninurilor catehice din ramuri de porumbar este prezentată în figura 4.47 (diagrama Pareto).



**Figura 4.47** Influența variabilelor asupra extracției. Diagrama Pareto

##### a) Analiza statistică a Răspunsului R1 – Catehină mg/g biomasă (densitometrie)

În urma analizei ANOVA au fost generate ecuațiile de regresie în funcție de factorii codați și în mărimi reale. În factorii codați, ecuația modelului poate fi scrisă sub forma următoare:

$$R1 = 2,44 + 0,2388 A + 0,345 B + 0,0813C + 0,0813D + 0,0537 BD \quad (11)$$

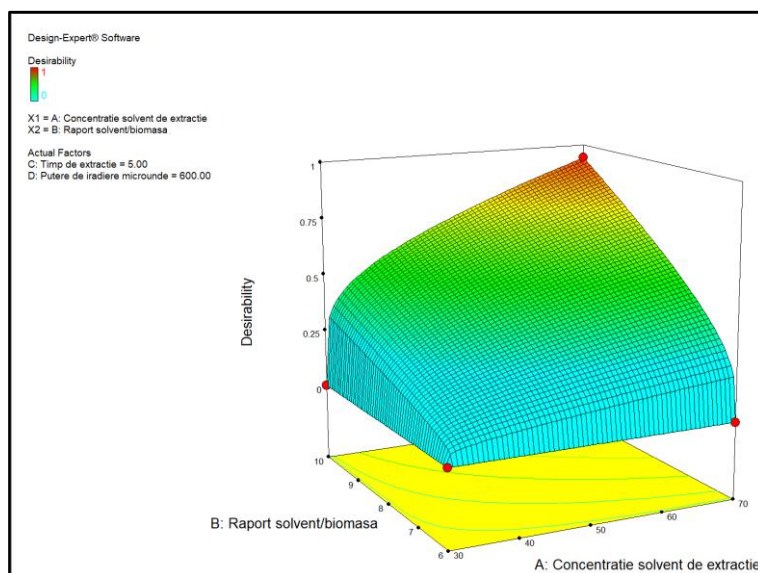
##### b) Analiza statistică a Răspunsului R2 – Epicatehină mg/g biomasă (densitometrie)

În factorii codificați, ecuația modelului poate fi scrisă sub forma următoare:

$$R2 = 2,41 + 0,3219 A + 0,4831 B + 0,0844 C - 0,1031 D + 0,1344 AB \quad (13)$$



Optimizarea permite identificarea valorii parametrilor care maximizează răspunsurile. În cazul de față (Figura 4.59) următorii parametri (concentrația solventului de extracție și raportul S/L) a dus la un nivel al dezirabilității de 0,941. Se poate concluziona că pentru obținerea unor valori maxime a concentrațiilor de catehină (3,4 mg/g biomasă) și epicatehină (3,45 mg/g biomasă) parametrii optimi sunt concentrația solventului de 70 %v/v, un raport S/L de 1/10, timp de extracție 5 minute și putere de iradiere a microundelor de 600 W.



**Figura 4.59** Suprafața dezirabilității în funcție de raportul solvent/biomasă și concentrației solventului de extracție - Condițiile limită impuse parametrilor de extracție și răspunsurilor estimate pe baza modelului

## Capitolul 5

### EVALUAREA POTENȚIALULUI BIOLOGIC A EXTRACTULUI DE PORUMBAR CU CONȚINUTUL CEL MAI RIDICAT ÎN TANINURI CATEHICE

În urma studiilor de extracție aplicate biomasei, în condiții de parametri optimi, s-a obținut un bioprodus – extract de porumbar cu conținutul cel mai ridicat în taninuri catehice, pentru care s-a evaluat potențialul biologic.

#### 5.1 Evaluarea citotoxicității prin metodă fitobiologică - în vivo (model vegetal) pe *Triticum aestivum* L. (grâu)

Evaluarea citotoxicității prin metoda fitobiologică s-a efectuat prin aplicarea următoarelor teste: (1) **testul de germinare** al cariopselor de grâu tratat; (2) **testul biometric de creștere** (în lungime) a epicotilului și hipocotilului de grâu la sfârșitul a 10 zile de la debutul experimentului; (3) **acumularea de biomasă** proaspătă și uscată la finalul celor 10 zile de experiment.

Pentru obținerea soluțiilor de testare s-au realizat diferite diluții (în apă distilată) din extractul hidroalcoolic de porumbar, după cum urmează: 0,5 mL %; 1,00 mL %; 1,5 mL %; 2,5 mL %. Pentru

varianta de control (martor) s-a folosit apa distilată.

Rezultatele testului fitobiologic indică o ușoară activitate inhibitorie a soluțiilor de testare asupra fenomenului de creștere a plantulelor de grâu care se intensifică cu creșterea concentrației compușilor polifenolici în extractele studiate (11-20% la rădăcini, 4-7% la tulpini).

## 5.2 Evaluarea activității antioxidante

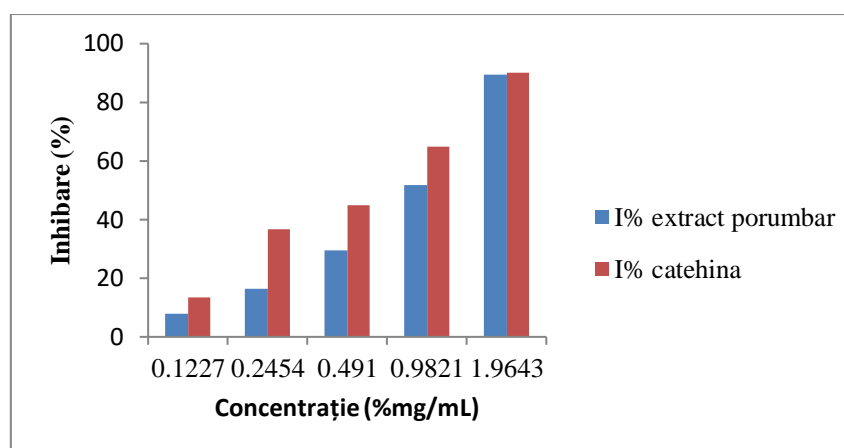
### 5.2.1 Determinarea capacității antiradicalice cu utilizarea radicalului DPPH

Evaluarea potențialului biologic a extractului de porumbar cu conținutul cel mai ridicat în taninuri catehice s-a efectuat prin aplicarea unor metode de determinare a activității antioxidante (determinarea capacității antiradicalice cu utilizarea radicalului DPPH, determinarea capacității de scavenger/blocare față de radicalul cation ABTS, determinarea activității antioxidante prin HPTLC-DPPH).

✓ **determinarea capacității antiradicalice cu utilizarea radicalului DPPH/ determinarea activității antioxidante prin HPTLC-DPPH:** se efectuează prin metoda decolorării radicalului stabil DPPH (2,2, difenil-picril-hidrazil), de către substanțe cu caracter antioxidant din compoziția extractelor vegetale.

✓ **determinarea capacității de scavenger față de radicalul cation ABTS:** se bazează pe neutralizarea radicalului ABTS de către antioxidanții naturali de tipul compușilor polifenolici din compoziția extractelor vegetale.

Activitatea antioxidantă a extractului de porumbar s-a analizat și în comparație cu aceea a standardului de catehină, astfel activitatea de captare față de radicalul DPPH a extractului, precum și a martorului, standard catehină, a variat dependent de concentrație. Activitatea de captare a radicalului DPPH pentru extractul de porumbar și standardului de catehin este prezentată în figura 5.11.



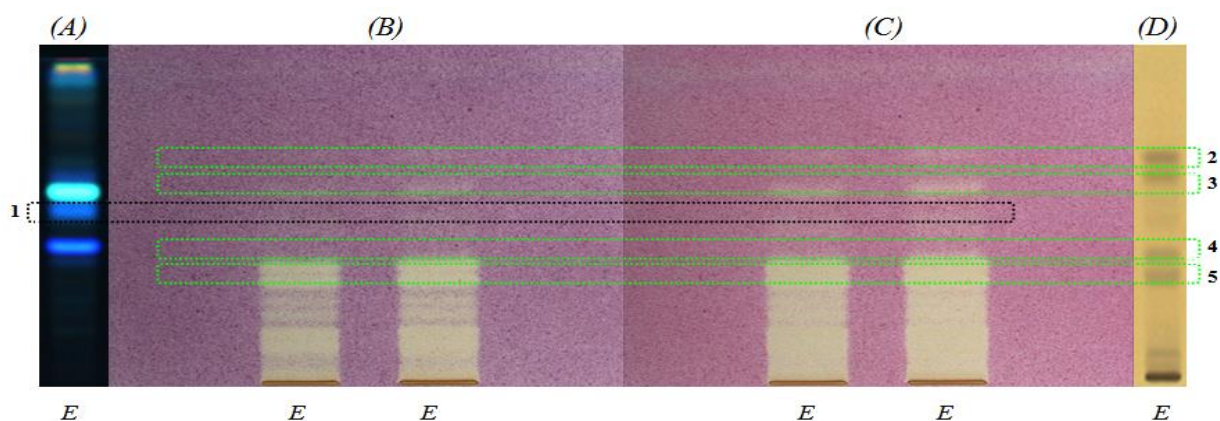
**Figura 5.11** Activitatea de captare a radicalului DPPH pentru extractul de porumbar și standardului de catehină

### 5.2.2 Determinarea capacității de scavenger față de radicalul cation ABTS

Catehina a fost mai activă în concentrație mai scăzută, având o valoare a  $IC_{50}$  considerabil mai mică decât a extractului de porumbar, indiferent de timpul de reacție. Se poate observa că activitatea extractului de porumbar cât și a catehinei față de radicalul cation ABTS scade odată cu creșterea timpului de reacție.

### 5.2.3 Determinarea activității antioxidante prin HPTLC-DPPH

Studiul efectului antioxidant al extractului de porumbar supus analizei, efectuat prin cromatografie în strat subțire a evidențiat faptul că acesta are un conținut variat de taninuri catehice care au capacitatea de a decolora benzile specifice acestor compuși, după stropirea cu reactivul DPPH. Imaginea HPTLC (Figura 5.14) a indicat separarea constituenților din probele de extract de porumbar analizate și s-au putut observa prezența unor benzi galbene de intensități diferite, ceea ce semnifică faptul că extractul prezintă acțiune antioxidantă.



**Figura 5.14** (A-D). Activitatea antioxidantă a extractului de porumbar determinată prin HPTLC-DPPH și corelația cu fitoconstituenții identificați în extract

Legendă: (A) cromatogramă de identificare a acizilor polifenolici, după derivatizare (stropire cu soluție metanolică de 1 % NP (difenilborat de  $\beta$ -etilamina) și soluție etanolică de 5 % PEG 400 (polietilenglicol 400)) la UV366nm.  
(B) Cromatograma de evidențiere a activității antioxidante după stropire cu soluție metanolică 0.2 % DPPH, la momentul 0.  
(C) Cromatogramă de evidențiere a activității antioxidante după stropire cu soluție metanolică 0.2 % DPPH, la momentul 24 ore.  
(D) Cromatogramă de identificare a taninurilor, după derivatizare (stropire cu soluție etanolică 5 % de clorură ferică) în vizibil  
1 – acid neoclorogenic; 2-catehină; 3-epicatehină; 4-epigallocatehină; 5-epigallocatehin galat  
E- extract de porumbar

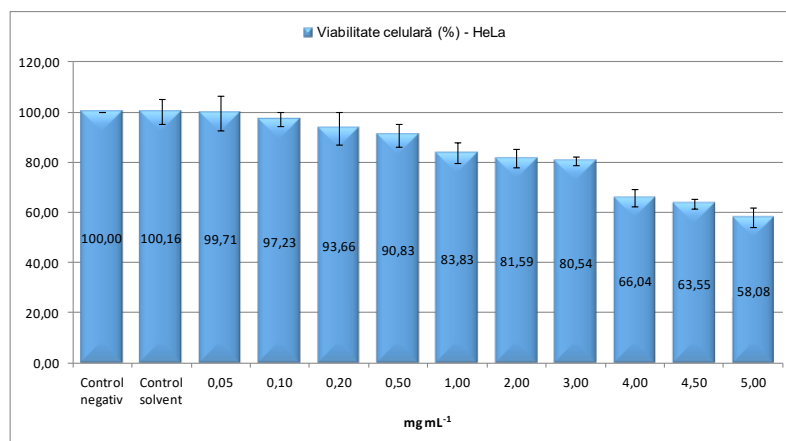
### 5.3 Determinarea activității antimicrobiene prin autobiografie

Metoda are la bază proprietatea extractelor vegetale aplicate pe o placă cromatografică de a difuza pe suprafața unui mediu solid (inoculat cu un germene specific).

Fitoconstituenții separați prin cromatografie de înaltă performanță în strat subțire au fost activi pe *Enterobacter cloacae* producând zone de inhibare a culturii bacteriene cu diametre cuprinse între 6,5 și 12 mm. Acest lucru indică faptul că extractul de porumbar are potențial antimicrobian.

## 5.4 Studiul efectelor citotoxice și citogenetice pe celule HeLa (MTT)

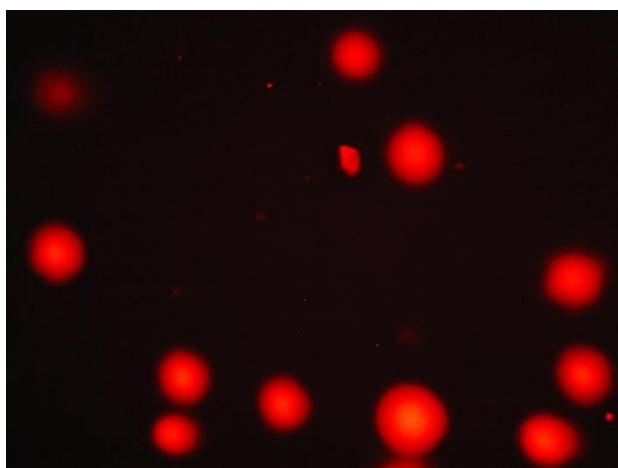
Extractele polifenolice de porumbar testate au prezentat o agresivitate letală ușoară asupra celulelor netransformate maligne (Vero) și diferențiată ca eficiență asupra celulelor neoplazice (HeLa), în funcție de doza de tratament *in vitro*, ea fiind moderată la dozele inferioare de 0,05-2,0 mg/mL și amplă la dozele superioare de 4,0 – 5,0 mg/mL.



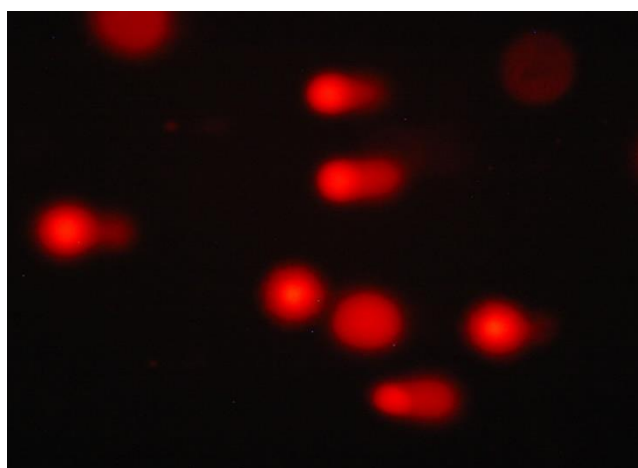
**Figura 5.17** Influența extractului alcoolic de porumbar asupra viabilității celulelor tumorale HeLa

- ✓ Impactului genotoxic al extractelor de porumbar obținute prin extracție asistată de microunde

Pentru evaluarea interacțiunii extractelor de porumbar cu materialul genetic, în scopul evaluării gradului de fragmentare a ADN-ului, s-a folosit testul Comet. Reducerea diferențiată a conținutului de ADN în cazul celor două linii celulare, mai accentuată în ceea ce privește linia celulară tumorală, indică un potențial efect de selectivitate a extractului utilizat.



**Figura 5.23** Celule HeLa – Martor (original, obiectiv 10x)



**Figura 5.24** Celule HeLa – tratament cu extract de porumbar (original, obiectiv 10x)

## Capitolul 6

### EVALUAREA FITOCHIMICĂ A BIOMASEI REZIDUALE DE RAMURI DE PORUMBAR ÎN VEDEREA VALORIFICĂRII AVANSATE

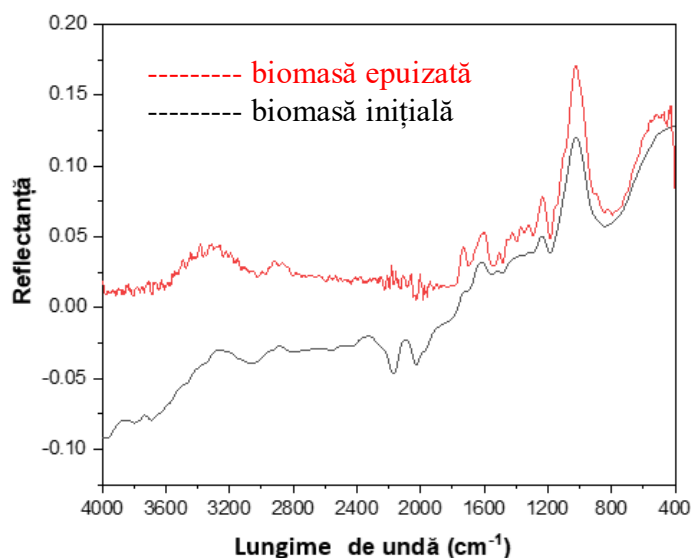
În urma studiilor de conversie primară au rezultat: un bioproduct – extract vegetal obținut în condiții optime din ramuri de porumbar prin aplicarea extracției asistate de microunde și o cantitate de biomasă reziduală cu potențial de valorificare avansată prin conversie secundară. În acest sens s-a impus evaluarea fitochimică a acesteia pentru determinarea gradului de epuizare în compuși bioactivi.

#### 6.1 Caracterizarea fitochimică calitativă

Rezultatele obținute în urma identificărilor fitochimice au evidențiat faptul că în biomasă epuizată de porumbar se mai regăsesc fitoconstituenți de tipul acizilor fenolici în concentrații foarte mici, ceea ce indică faptul că extracțiile în urma cărora a rezultat biomasa reziduală au fost eficiente.

#### 6.2 Caracterizarea calitativă prin spectrofotometrie FT-IR

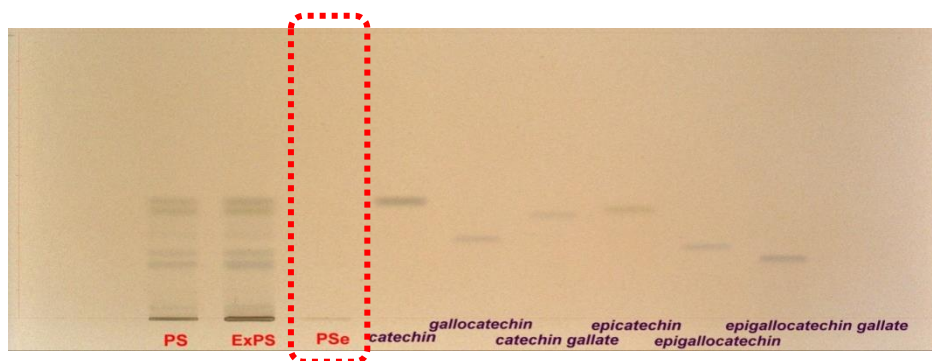
Evaluarea comparativă a spectrelor obținute pentru biomasa inițială și reziduală (Figura 6.1) evidențiază în intervalul de lungimi de undă cuprins între 400 – 2000  $\text{cm}^{-1}$  aceleași peakuri corespunzătoare vibrațiilor de întindere specifice grupărilor funcționale din compuși polifenolici, dar și constituenților principali celuloză și lignină (hidroxil (OH) liber de tip fenolic ( $3315 \text{ cm}^{-1}$ ), C-H aromatic ( $2918 \text{ cm}^{-1}$ ), C=O din esteri ( $1731 \text{ cm}^{-1}$ ), C=O din structuri cu grupări carbonilice libere de tip aldehydă, cetonă, carboxil ( $1602 \text{ cm}^{-1}$ ), C=C din nucleul aromatic ( $1421 \text{ cm}^{-1}$ ), C–O din structura alcoolilor, eterilor sau esterilor ( $1233 \text{ cm}^{-1}$ ), C–O–C din structuri glicozidice ( $1024 \text{ cm}^{-1}$ )), cei din urmă putând fi valorificați în continuare prin aplicarea unor procese de conversie într-o etapă de biorafinare secundară.



**Figura 6.1** Spectrul FT-IR obținut pentru biomasă epuizată/inițială de porumbar

### 6.3 Caracterizarea calitativă/semicantitativă prin cromatografie în strat subțire (HPTLC)

Evaluarea HPTLC a stabilit faptul că în compoziția biomasei reziduale nu mai există compuși bioactivi de interes întrucât nu s-a evidențiat profilul cromatografic.



b) vizibil, după derivatizare

**Figura 6.4 (a – c)** Cromatogramă HPTLC a extractelor de porumbar și substanțele de referință atribuite în probe – **taninuri catehice**

Legendă: PS – extract porumbar obținut din biomasă inițială; ExPS – cel mai bun extract de porumbar obținut prin extracție asistată de microunde; PSe - extract porumbar obținut din biomasă epuizată

### 6.5 Evaluarea compoziției chimice generale a biomasei reziduale

Datele obținute la evaluarea chimică a biomasei reziduale demonstrează că majoritatea compușilor chimici de interes au fost separați în etapa de biorafinare primară și că procedeul de extracție studiat – extracția asistată de microunde este foarte eficient. După separarea extractibilelor, componenții principali ai biomasei inițiale se găsesc încă în biomasa reziduală care prezintă concentrații de 36,2 % celuloză, 11,87 % lignină și 25,14 % hemiceluloze (Tabelul 6.9).

Pentru transformarea acestor componenți principali și propunerea unui model sustenabil de valorificare a unei bioresurse cu generarea a cât mai puține deșeuri se impune și parcurgerea unei etape de biorafinare secundară.

## Capitolul 7

### CONVERSIA BIOMASEI REZIDUALE PRIN PIROLIZĂ LENTĂ

Calea de conversie din etapa de biorafinare secundară trebuie aleasă în funcție de potențialul chimic al materiei prime ce intră în această etapă. Prin urmare, considerând proprietățile chimice ale biomasei epuizate și mai ales obiectivul de a obține bioproduse cu valoare adăugată și posibilități multiple de aplicație (farmaceutice, de mediu, industriale, agricole) am optat pentru **valorificarea biomasei reziduale** printr-un proces de **piroliză lentă**.

## 7.1 Valorificarea biomasei reziduale prin piroliză lentă

Procesul de piroliză aplicat biomasei reziduale de porumbar a fost realizat într-un reactor din oțel inoxidabil cu o lungime de 30 cm și un diametru de 10 cm, la temperatura de 450 °C , cu viteza de încălzire de 10°C/min și timpul de menținere a palierului constant de temperatură de 15 minute.

În urma procesului de piroliză rezultă trei fracții, gazoasă, lichidă și solidă iar în contextul acestui studiu a fost considerată doar fracția solidă cu denumirea generică de biocărbune. Acest material este supus caracterizării chimice, morfologice și structurale pentru stabilirea proprietăților pe baza cărora se vor defini posibilitățile de utilizare și aplicațiile viitoare.

## 7.2 Caracterizarea biocarbunelui prin spectrofotometrie FT-IR

Analiza prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (Figura 7.2) a evidențiat benzi de absorbție corespunzătoare: vibrațiilor de întindere ale grupărilor C-H din structuri alifaticе (2969 cm<sup>-1</sup>, 2901 cm<sup>-1</sup>), C=C din nucleul aromatic (1583 cm<sup>-1</sup>, 1420 cm<sup>-1</sup>), C-O din structura alcoolilor (1251 cm<sup>-1</sup>).

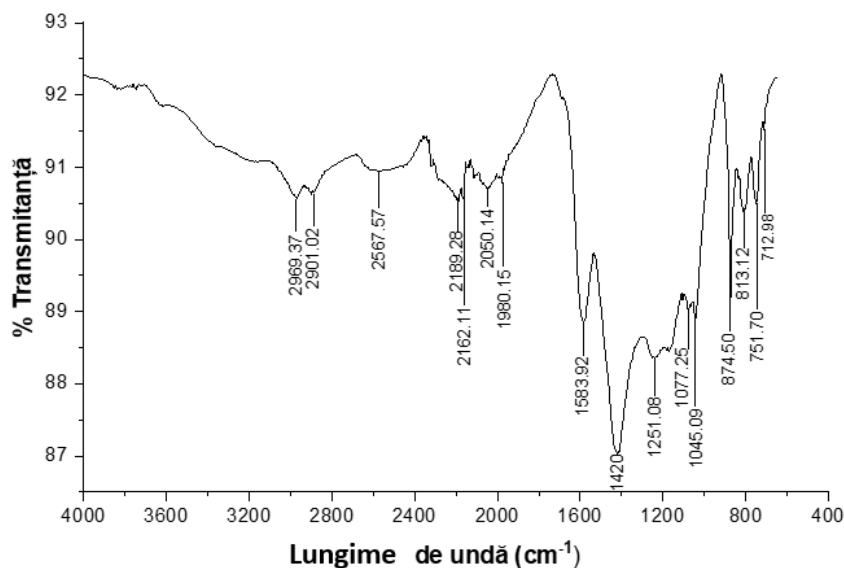


Figura 7.2 Spectrul FT-IR obținut pentru biocărbune

## 7.3 Analiză suprafeței specifice a biocarbunelui prin metoda BET

Rezultatele analizei au indicat o suprafață specifică redusă pentru proba de biocărbune ceea ce indică o activare slabă a fazei solide obținute. Datele prezentate în tabelele 7.1 și 7.2 evidențiază obținerea unui biocărbune cu o suprafață specifică de 66m<sup>2</sup>/g în structura căruia sunt prezenți mezopori (0,0919 cm<sup>3</sup>/g) dar și micropori (0,0020 cm<sup>3</sup>/g), precum și un conținut ridicat de carbon (71,03%). Aceste caracteristici de porozitate sunt în concordanță cu datele raportate în literatura de specialitate. Astfel, Fryda și Visser (2015) au demonstrat că biocărbunele obținut din ramuri de bambus printr-un proces de piroliză lentă la 400°C timp de 60 minute are o suprafață specifică de 4,0



m<sup>2</sup>/g, în timp ce cel obținut din lemn de stejar, în aceleași condiții de proces, a prezentat o suprafață specifică de 17,20 m<sup>2</sup>/g (Daza et al., 2012). Caracteristicile de porozitate relativ modeste ale biocărbunelui obținut în acest studiu pot fi însă îmbunătățite printr-un proces de activare.

#### 7.4 Aplicații potențiale ale biocărbunelui obținut

Biocărbunele rezultat din piroliza biomasei reziduale poate fi folosit în numeroase aplicații ce vizează mai multe domenii. Utilizarea acestui precursor de cărbune poate prezenta numeroase beneficii, având potențial în a contribui la sustenabilitatea economică a sistemelor emergente de generare de produse și energie din deșeuri de biomasă (Laird et al., 2009; Lehmann, 2007). Utilizarea biocărbunelui are o dinamică ascendentă nu doar pentru că reduce impactul negativ al deșeurilor de biomasă reziduală asupra mediului (Laird, 2008) ci și datorită proprietățile fizico-chimice, morfologice și structurale ale acestuia care guvernează aplicațiile acestui nou material. Aceste aplicații includ utilizarea ca adsorbant în procese de remediere a componentelor de mediu (Woolf et al., 2010), material suport pentru imobilizări microbiene cu utilizare în bioremedierea factorilor de mediu (apă, aer, sol), promotor/catalizator în procesul de digestie anaerobă (Pan et al., 2019), material de umplutură în formule de obținere a unor noi materiale de construcție (Wang et al., 2019), amendament pentru îmbunătățirea calității solurilor cu utilizare directă în agricultură și horticultură (Hu et al., 2021). Pe lângă aceste domenii se propune continuarea cercetărilor în vederea utilizării acestui produs ca precursor de cărbune activat în obținerea unor noi formulări farmaceutice sau alimentare după cum se sugerează deja în literatură (Abdollahi și Hosseini, 2014; Kah et al., 2017).

### CONCLUZII FINALE

Prin tema propusă, teza de doctorat intitulată ”**Contribuții la dezvoltarea unui sistem integrat pentru valorificarea unor bioresurse (vegetale / arbuști) în domeniul fitofarmaceutic**” a avut ca obiectiv fundamental dezvoltarea unui model funcțional de valorificare sustenabilă a unor noi bioresurse vegetale (arbuști de măceș / *Rosa canina* L., cătină / *Hippophae rhamnoides* L., porumbar / *Prunus spinosa* L.) în scopul obținerii de bioproduse prin utilizarea de metode de conversie sustenabile.

În elaborarea acestui model funcțional s-a pornit de la următoarele premize: bioprospectarea prin explorarea biodiversității pentru noi resurse biologice (specii de arbuști), conversia prin procedee ”verzi”/ prietenoase mediului, identificarea avantajelor asupra mediului prin evitarea degradării ecosistemului și valorificarea integrată a resurselor.

Ca procedee de conversie a biomasei vegetale în componenți cu valoare adăugată, s-au studiat



pentru etapa de biorafinare primară, atât metodele de extracție convenționale precum extracția la temperatura camerei și extracția la reflux, cât și metode de extracție avansate precum extracția asistată de microunde. Pentru etapa de biorafinare secundară s-a propus conversia biomasei reziduale prin piroliză lentă.

Cercetările experimentale efectuate pentru îndeplinirea obiectivelor tezei s-au îndreptat cu precădere asupra studiului proceselor de conversie propuse, dar și asupra aplicabilității bioproduselor obținute în diverse domenii.

Toate obiectivele specifice propuse au fost îndeplinite, fapt care a permis formularea unor concluzii prezentate sumativ, după cum urmează:

### **O1. Realizarea unui studiu comprehensiv care evidențiază posibilitățile de valorificare a biomasei ca sursă de taninuri catehice.**

✓ Din analiza literaturii de specialitate, a rezultat un studiu comprehensiv care evidențiază posibilitățile de valorificare a biomasei ca sursă de taninuri catehice. S-au punctat aspectele privind importanța taninurilor catehice din biomasă și potențialul biologic al acestora, metodele de identificare și cuantificare, procesele de biorafinare a biomasei etc. S-au evidențiat principalele beneficii ale taninurilor catehice: inhibitori ai peroxidării lipidelor, captatori de radicali liberi, inhibitori ai formării de ion superoxid, inhibitori ai replicării virale etc. Metodele spectrofotometrice (FT-IR, UV-Vis) și cromatografice (HPLC, HPTLC) sunt cele mai des utilizate pentru punerea în evidență din punct de vedere calitativ și cantitativ a taninurilor catehice. Principalele procese de conversie a biomasei se bazează pe tehnici convenționale (extracția la temperatura camerei, la reflux, Soxhlet etc.) sau avansate (asistate de microunde, de ultrasunete, cu fluide supercritice etc.) pentru etapa de biorafinare primară, precum și metode termochimice care au ca rezultat obținerea de fracții solide, lichide sau gazoase cu potențial de valorificare în multiple aplicații în domenii diferite: industrie, mediu, agricultură, farmacie etc. pentru etapa de biorafinare secundară.

### **O2. Selectarea și caracterizarea biomasei utilizată în studiul de conversie primară.**

✓ S-au identificat noi surse de biomasă pentru obținerea de taninuri catehice (catehină, epicatehină) în urma evaluării chimice și fitochimice a mai multor tipuri de bioresurse (ramuri de măceș, cătină și porumbar). Analiza fizico-chimică globală a speciilor de arbuști de măceș / *Rosa canina* L., cătină / *Hippophae rhamnoides* L., porumbar / *Prunus spinosa* L., respectiv ramurile acestora, a furnizat date preliminare privind umiditatea materialului vegetal, cantitatea de cenușă, solvenții care ar putea facilita separarea compușilor bioactivi de interes. S-a constatat că solvenții hidroalcoolici 50%v/v (pentru măceș și porumbar) și 70% v/v (pentru cătină) asigură obținerea celui mai mare procent de substanțe solubile și de reziduu. Caracterizarea prin cromatografie de înaltă performanță în strat subțire/densitometrie a evidențiat faptul că biomasa

de măceș, cătină și porumbar are un conținut variat de substanțe **polifenolice**: **acid clorogenic** în cele trei specii, **hiperozidă** în măceș, **kaempferol** în cătină, **acid neoclorogenic** (0,12% g/g biomasă), **acid cafeic** și **acid protocatehic** în porumbar. În urma analizei cromatografice a taninurilor în cele trei surse de biomasă s-au identificat **catehina**, în porumbar **epicatehina** și în cătină **acidul tanic**. Determinarea cantitativă prin densitometrie a **taninurilor catehice** în cele trei specii a arătat că porumbarul prezintă în compoziție cel mai ridicat conținut de catehină (0,25%/g/g biomasă) comparativ cu cel de măceș (0,15%/g/g biomasă) și cătină (0,1%/g/g biomasă), cât și epicatehina într-o concentrație de 0,22%/g/g biomasă, fiind sursa de biomasă cea mai atractivă din punct de vedere fitochimic.

✓ Analiza biomasei de măceș, cătină și porumbar prin spectroscopie FT-IR a evidențiat benzi intense corespunzătoare: vibrațiilor de întindere ale grupării hidroxil (OH) liber de tip fenolic, C-H aromatic, C=C din nucleul aromatic, C-O din structura alcoolilor, eterilor sau esterilor, C-O-C din structuri glicozidice. Prin analiză calitativă prin spectrofotometrie UV-VIS efectuată pe extracte metanolice obținute din biomasă, în funcție de absorbțiile specifice s-au identificat: în măceș și porumbar în domeniul 200-350 nm maxime de absorbție specifice compusului **rutin** la 205 nm și **catehinei** și **epicatehinei** la 275 nm, în timp ce în cătină **catehina** s-a identificat la un maxim de absorbție la 210 nm. Analiza cantitativă UV-Vis a arătat ca biomasa de ramuri de porumbar prezintă valoarea cea mai ridicată a conținutului polifenolic total exprimat în catehină ( $195,4 \pm 0,05$  mg/g biomasă).

✓ În urma caracterizării celor trei surse de biomasă s-a evidențiat faptul ca acestea prezintă un profil fitochimic bogat în taninuri catehice, în special catehină și epicatehină.

### **O3. Conversia primară a biomasei prin utilizarea unor tehnici de extracție selectivă (extracție la reflux, extracție la temperatura camerei, extracție asistată de microunde) și obținerea de extracte cu conținut ridicat în taninuri catehice.**

✓ S-au experimentat și s-au analizat comparativ diferite procese de extracție prin metode convenționale (extracție la temperatura camerei – RTE, extracție la reflux – HRE) din perspectiva conținutului în compuși biologic activi, punând accent pe taninurile catehice (TPC) din cele trei tipuri de biomasă luate în studiu. Pentru elucidarea mecanismului de extracție a TPC din ramurile de măceș, cătină și porumbar utilizând extracția la reflux a fost validat matematic modelul cinetic de ordinul 2, biomasa de porumbar prezentând cele mai mari valori ale concentrației la echilibru ( $C_e = 384,62$  mg/g pentru raport S/L 1/8 și 303,03 mg/g pentru raport S/L 1/10).

✓ S-a elaborat un protocol de extracție a compușilor bioactivi vizați din biomasa de porumbar în urma studiului exhaustiv al procesului de extracție asistată de microunde – MAE (studii cinetice, optimizarea parametrilor de proces, studiul comparativ cu metode

convenționale). Studiul cinetic a evidențiat că procesul de extracție asistată de microunde decurge după modelul cinetic de ordin 2. S-a calculat concentrația la echilibru și s-a constatat că cea mai mare valoare ( $C_e = 285,71 \text{ mg/g}$ ) s-a obținut la o valoare a puterii microundelor cuprinsă între 300W și 400W.

- ✓ Modelarea și optimizarea procesului de extracție asistată de microunde s-a făcut pentru biomasa de porumbar pentru a obține cea mai ridicată concentrație de catehină și epicatehină. Rezultatele obținute ca urmare a analizei celor 16 extracte rezultate din matricea de experimentare au fost determinate densitometric după separarea distinctă prin HPTLC. S-a identificat influența simultană a parametrilor (A - concentrația solventului; B - raport solid/lichid; C - timpul de extracție; D - puterea de iradiere) asupra extracției catehinei și epicatehinei din biomasa de porumbar. În urma analizei ANOVA s-au generat ecuațiile de regresie pentru fiecare compus bioactiv urmărit (Catehină ( $\text{mg/g}$ ) =  $2,44 + 0,2388 A + 0,3450 B + 0,0813C + 0,0813D + 0,0537 B$ , Epicatehină ( $\text{mg/g}$ ) =  $2,41 + 0,3219 A + 0,4831 B + 0,0844 C - 0,1031 D + 0,1344 AB$ ). Studiul a condus la generarea soluției optime (raport S/L 1/10, 5 minute, 600 W) care asigură obținerea concentrației maxime de catehină 3,4 mg/g și de epicatehină 3,45 mg /g.

#### **O4. Evaluarea extractelor vegetale rezultate din conversia primară a biomasei prin punerea în evidență a compușilor bioactivi și prin aplicarea unor metode specifice de determinare a potențialului biologic și demonstrarea efectelor specifice.**

- ✓ S-a evaluat și s-a evidențiat potențialul bioactiv (evaluarea citotoxicității pe model vegetal, acțiunea antioxidantă, antimicrobiană, antitumorală) pentru extractul de porumbar cu conținutul cel mai ridicat în taninuri catehice, obținut prin extracție asistată de microunde (MAE).
- ✓ Evaluarea citotoxicității prin metoda fitobiologică – in vivo (model vegetal) pe *Triticum aestivum* L. (grâu) a evidențiat faptul că tratamentele cu extractul de porumbar în diferite concentrații (1 – 2,5 mL%) au inhibat fenomenul de creștere a plantulelor de grâu, mai evident în cazul rădăcinii (11-20 %), decât în cazul tulpinii (4-7 %).
- ✓ Evaluarea potențialului biologic antioxidant pentru extractul de porumbar s-a efectuat prin aplicarea unor metode de determinare a activității antioxidante, antimicrobiene și antitumorale. Analiza capacității antioxidante prin aplicarea de metode spectrofotometrice UV-Vis a soluțiilor diluate de extract de porumbar cu utilizarea radicalilor DPPH (2,2, difenil-picril-hidrazil) și ABTS (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazolină- 6-acidului sulfonic) a scos în evidență că extractul de porumbar este activ la o valoare a  $IC_{50}$  de  $1,02 \pm 0,25 \text{ \%mg/mL}$ , respectiv  $1,0188 \pm 0,21 \text{ \%mg/mL}$ . Având în vedere valorile  $IC_{50}$ , extractul de porumbar a fost

mai activ în concentrație mai mare ca scavenger față de radicalul DPPH/ABTS comparativ cu concentrația martorului, soluția de standard de catehină ( $IC_{50} = 0,76 \pm 0,0$  % mg/mL, respectiv  $0,0424 \pm 0,10$  % mg/mL).

- ✓ Studiul efectului antioxidant al extractului de porumbar, efectuat prin cromatografie de înaltă performanță în strat subțire a evidențiat faptul că extractul din biomasa de porumbar are un conținut variat de compuși polifenolici, diferiți structural, sub forma unor benzi care au capacitatea de a se decolora după pulverizarea cu reactivul DPPH. Decolorarea benzilor a fost foarte intensă, ceea ce a indicat faptul că extractul prezintă acțiune antioxidantă.
- ✓ Pentru determinarea activității antimicrobiene prin autoautografie extractul obținut din ramuri de porumbar a fost inițial investigat prin HPTLC. Cromatoplaca obținută la identificarea acizilor polifenolici în extract au fost utilizate pentru a demonstra activitatea antimicrobiană a acestuia prin bioautografie – difuzie pe agar. Fitoconstituenții separați prin HPTLC din extractul de porumbar au fost activi pe *Enterobacter cloacae* producând zone de inhibare a culturii bacteriene cu diametre cuprinse între 6,5 și 12 mm. Acest lucru indică faptul că extractul de porumbar are potențial antimicrobian.
- ✓ Studiul efectelor citotoxice și citogenetice pe celule HeLa în vederea demonstrării acțiunii antitumorale. Studiile de cito- și genotoxicitate *in vitro* bazate pe metoda cu MTT (bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) și testul Comet, s-au realizat pe celule normale Vero și pe celule tumorale HeLa. S-a evidențiat faptul că extractul de porumbar are toxicitate redusă față de celulele sănătoase,  $IC_{50}$  pentru celulele Vero fiind 7,76 mg/mL. În cazul celulelor tumorale HeLa, sensibilitatea față de extractele de porumbar folosite a fost mai mare, doza  $IC_{50}$  fiind de 6,36 mg/mL. Impactul genotoxic al extractelor de porumbar este mai intens la celulele tumorale decât la cele normale; linia celulară tumorală a manifestat o sensibilitate crescută la fragmentarea ADN-ului ( $IC_{50} = 67,64 \pm 1,27$  % la nivelul capului cometei) fapt ce indică un potențial efect de selectivitate a extractelor testate și implicit o acțiune antitumorală asupra celulelor malignizate.

#### **O5. Evaluarea fitochimică a biomasei reziduale din specia vegetală selectată, prin determinarea gradului de epuizare în compuși polifenolici – taninuri catehice.**

- ✓ S-a evaluat fitochimic biomasa reziduală de ramuri de porumbar și s-a constatat că aceasta este aproape total epuizată de compuși bioactivi de interes (extractul obținut din biomasa reziduală nu prezintă profil cromatografic, valoarea TPC (catehină) în biomasa reziduală este de 10 ori mai mică decât cea obținută în biomasa inițială). Analiza spectrofotometrică FT-IR dar și determinarea proprietăților chimice ale biomasei reziduale au evidențiat benzi de absorbție specifice grupărilor funcționale din structura compușilor lignocelulozici precum și procente importante de celuloză (36,2 %), lignină (11,87 %) și

hemiceluloze (25,14 %), fapt pentru care s-a încercat valorificarea în etapa de biorafinare secundară.

#### **O6. Conversia secundară a biomasei epuizate, prin piroliză lentă pentru obținerea de biocărbune. Caracterizarea fizico-chimică și structurală a acestuia.**

✓ S-a efectuat conversia biomasei reziduale pentru obținerea de fracție solidă (biocărbune) prin piroliză lentă la 450°C, cu viteza de încălzire de 10°C/min și timpul de reacție de 15 min. În urma procesului de piroliză au rezultat trei fracții, gazoasă, lichidă și solidă iar în contextul acestui studiu a fost considerată doar fracția solidă cu denumirea generică de biocărbune. Acest material este supus caracterizării chimice, morfologice și structurale pentru stabilirea proprietăților pe baza cărora se vor defini posibilitățile de utilizare și aplicațiile viitoare.

✓ Analiza biocărbunelui prin spectroscopie FT-IR a evidențiat benzi de absorbție corespunzătoare vibrațiilor de întindere ale unor grupări funcționale de tip (OH) liber de tip fenolic, C-H aromatic, C=C din nucleul aromatic. Prin analiza de adsorbție a gazelor rezultate s-a constatat că ambele izoterme au bucle largi de histerezis care nu se închid nici în domeniul presiunilor relative joase, indicând o activare slabă a probei. Volumul de adsorbție este destul de mic, constituind 0.0939 cm<sup>3</sup>/g. S-a constatat prezența microporilor în probă, volumul acestora fiind de 0,0020 cm<sup>3</sup>/g. Prin scăderea volumului microporilor din volumul total s-a determinat volumul mezoporilor din probă, acesta fiind 0,0919 cm<sup>3</sup>/g. Rezultatele analizei structurale au indicat o suprafață specifică redusă pentru proba de biocărbune ceea ce indică o activare slabă a fazei solide obținute. Aceste caracteristici de porozitate sunt în concordanță cu intervalele de variație raportate în literatura de specialitate. Astfel, Fryda și Visser (2015) au demonstrat că biocărbunele obținut din ramuri de bambus printr-un proces de piroliză lentă la 400°C timp de 60 minute are o suprafață specifică de 4,0 m<sup>2</sup>/g, în timp ce cel obținut din lemn de stejar, în aceleași condiții de proces, a prezentat o suprafață specifică de 17,20 m<sup>2</sup>/g (Daza et al., 2012). Caracteristicile de porozitate relativ modeste ale biocărbunelui obținut în acest studiu pot fi însă îmbunătățite printr-un proces de activare.

#### **O7. Formularea de concluzii și recomandări privind noi direcții de utilizare a bioproduselor în diferite domenii ce vizează sectoare precum industria farmaceutică, protecția mediului, agricultura, industria chimică, etc.**

✓ S-a elaborat un model funcțional de valorificare sustenabilă a bioresurselor studiate prin propunerea unei scheme complete de biorafinare cu includerea a două etape de biorafinare primară și secundară și obținerea a două tipuri importante de bioproduse: un extract vegetal cu conținut ridicat de taninuri catehice cu potențial biologic și un material nou, bogat în carbon,

cu structură poroasă, ce poate fi activat sau funcționalizat în funcție de aplicațiile vizate.

✓ Rezultatele obținute atât în etapa de biorafinare primară, cât și în etapa de biorafinare secundară, prezentate în teza de doctorat, pot constitui baza pentru proiectarea, modelarea și optimizarea unor noi procese și tehnici de extracție a compușilor bioactivi de tipul taninurilor catehice din biomasă, și pentru conversia eficientă a biomasei reziduale prin piroliză lentă în fracție solidă. Bioprodusele rezultate în cele două etape (extracte vegetale cu conținut ridicat în taninuri catehice și biocărbune) au aplicabilitate în diferite domenii ce vizează sectoare precum industria farmaceutică, cosmetică, chimică prin utilizarea în procese de obținerea a unor preparate farmaceutice, de bioremediere a factorilor de mediu (apă, aer, sol), de îmbunătățire a calității solurilor etc.

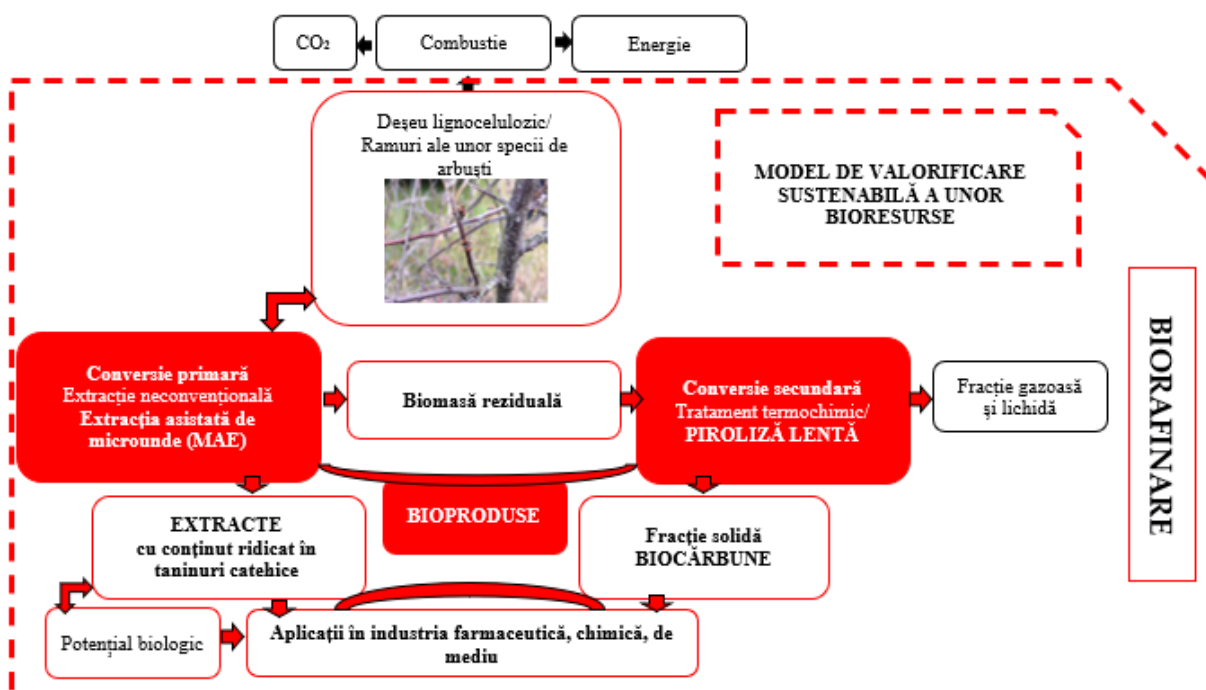
## CONTRIBUȚII ORIGINALE

Tema de cercetare abordată în cadrul tezei de doctorat, se înscrie în preocupările actuale pentru valorificarea compușilor utili obținuți din deșeuri lignocelulozice prin dezvoltarea unui sistem integrat pentru valorificarea unor bioresurse (vegetale/arbuști) în domeniul fitofarmaceutic. Cercetările experimentale care au contribuit la realizarea prezentei teze de doctorat, prezintă elemente de noutate față de stadiul actual al cunoașterii privind metodele de convesie primară și secundară a biomasei și posibilitățile de demonstrare a potențialului biologic al bioproduselor obținute prin biorafinare.

Contribuțiile originale ale fiecărei etape experimentale derulate în cadrul tezei de doctorat sunt:

1. Identificarea unor noi surse de biomasă pentru obținerea de taninuri catehice în urma evaluării chimice și fitochimice a mai multor tipuri de biomasă.
2. Prezentarea studiilor amănunțite asupra proceselor de extracție convenționale (extracție la reflux, extracție la temperatura camerei) și neconvenționale (extracție asistată de microunde) ale căror rezultate au permis optimizarea proceselor de extracție asistată de microunde, pentru creșterea eficienței dar și pentru o posibilă transpunere la nivel pilot sau industrial, prin raportare la parametrii cinetici specifici determinați;
3. Elaborarea unui protocol de extracție a compușilor bioactivi vizați în urma studiului exhaustiv al procesului de extracție asistată de microunde (studii cinetice, optimizarea parametrilor de proces, studiul comparativ cu metode convenționale).
4. Obținerea de date importante privind condițiile de operare a proceselor de extracție asistată de microunde, aplicate unor surse de biomasă insuficient valorificate, respectiv ramurile unor specii vegetale de tip arbuști cum ar fi specia *Prunus spinosa*;

5. Caracterizarea amănunțită a extractelor vegetale obținute în etapa de biorafinare primară, incluzând atât conținuturile totale de compuși polifenolici, flavonoidici și taninici de tip catehic separați prin tehnici specifice de identificare și cuantificare, cât și confirmarea potențialului biologic al acestora prin metode de determinare a acțiunii antioxidante, antimicrobiene și antitumorale;
6. Elaborarea unui model funcțional de valorificare sustenabilă a bioresurselor studiate prin propunerea unei scheme complete de biorafinare cu includerea a două etape de biorafinare primară și secundară și obținerea a două tipuri importante de bioproduse:
  - din prima etapă a rezultat un extract vegetal cu conținut ridicat de taninuri catehice
  - din a doua etapă s-a generat un material nou, bogat în carbon, cu structură poroasă, ce poate fi activat sau funcționalizat în funcție de aplicațiile vizate.



7. Propunerea de noi direcții de utilizare și aplicabilitate a bioproduselor rezultate în etapele de biorafinare primară și secundară.

Prin urmare se poate aprecia că teza de doctorat aduce contribuții fundamentale și aplicative în domeniul valorificării unor bioresurse (vegetale/arbuști) printr-un sistem integrat ce propune conversia secvențială a unui deșeu lignocelulozic în mai multe tipuri de bioproduse valoroase cu multiple aplicații în diverse domenii.

## ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ

### Lucrări științifice publicate în reviste cotate ISI (Web of Science cu factor de impact)

1. **Apreutesei (Ciupercă) O.T.**, Ionescu E., Secula M. S., Volf I. (2023) Microwave-assisted extraction of condensed tannins from branches of *Prunus spinosa* L.: Response surface modeling and optimization, Processes (lucrare acceptată spre publicare – Manuscript ID processes 2470180) (IF 3,5)
2. Turcov D., Barna A. S., **Apreutesei (Ciupercă) O. T.**, Trifan A., Puișel A. C., Șuteu D. (2022) Valorization of bioactive compounds from residual saffron biomass (*Crocus sativus* L.) to obtain high value added dermato-cosmetic products, BioResources 17(3), 4730-4744 doi: 10.15376/biores.17.3.4730-4744 (IF 1.747)
3. Răducanu A.E., Tihăuan B.M., Marinaș I.C., **Ciupercă O.T.**, Țebrencu C.E., Ionescu E., Onisei T. (2021) The Biological Effects of Novel Nutraceuticals with Curcuminoids and Other Plant-Derived Immunomodulators and Pre-Probiotics, Pharmaceutics, 13, 666. doi.org/10.3390/pharmaceutics13050666 (IF 5.4)
4. **Ciupercă O.T.**, Țebrencu C. E., Ionescu E., Iacob E., Volf I. (2019) Studies on polyphenols isolated from branches of *Prunus spinosa* L. species, Revista de chimie, 70, 8, 2897-2902, doi.org/10.37358/RC.19.8.7452 (IF 1.755)
5. Raclariu A.C., Țebrencu C.E., Ichim M.C., **Ciupercă O.T.**, Krag Brysting A., De Boer H. (2018) What's in the box? Authentication of Echinacea herbal products using DNA metabarcoding and HPTLC, Phytomedicine, 44, 32-38, doi: 10.1016/j.phymed.2018.03.058. (IF 6.656)

### Lucrări științifice publicate în reviste indexate în baze de date internaționale

1. Filote C., **Ciupercă O.T.**, Volf I. (2021) Qualitative Assesment of Polyphenols extracted from *Fucus spiralis* biomass through High-Performance Thin Layer Chromatography, Buletinul Institutului Politehnic, Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași, 67(71), 2, 39-49.
2. Pătrăuțanu O. A., **Ciupercă O. T.**, Popa V. I., Volf I. (2020) Contributions on Spruce Bark Polyphenols Identification Using Instrumental (UV-VIS Spectrometry), Qualitative (Thin Layer Chromatography) and Quantitative (HPTLC Densitometry), Revista de chimie, 71, 1, 39-45, doi.org/10.37358/RC.20.1.7808
3. **Ciupercă O.T.**, Țebrencu C. E., Lazăr L., Volf I. (2020) Kinetic Study on Solid-Liquid Extraction of Condensed Tannins from *Rosa Canina* Branches and Stems, Revista de Chimie, 71, 7, 153-161, doi: 10.37358/RC.20.7.8233



4. Țebrencu C. E., Ionescu E., **Ciupercă O. T.**, Crețu M. R., Chiriac M., Iacob E. (2018) Biochemical and HPTLC fingerprinting identification of the *Hypericum perforatum* L. - finished products, *Analele Academiei Oamenilor de Știință din România*, 3(2), 16-26.

5. **Ciupercă O. T.**, Țebrencu C. E., Volf I. (2017) Polyphenolic content evaluation in branches of *Rosa canina* L. and *Hippophae rhamnoides* L. species, *Buletinul Institutului Politehnic, Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași*, 63 (67), 1, 49-58.

#### **Lucrări științifice în curs de publicare în reviste cotate ISI (Web of Science cu factor de impact)**

6. **Apreutesei (Ciupercă) O.T.**, Țebrencu C. E., Vochița G., Gherghel D., Volf I. (2023) Condensed tannins composition, in vitro antioxidant activity, cytotoxic and genotoxic assay on *Prunus spinosa* L. catechin rich extract, *Antioxidants* (lucrare trimisă spre publicare).

7.

#### **Comunicări la conferințe naționale și internaționale**

1. **Ciupercă O. T.**, Țebrencu C. E., Volf I. (2017) Polyphenolic content evaluation in branches of *Rosa canina* L. and *Hippophae rhamnoides* L. species., Prima Conferință a Școlilor Doctorale ale Universității Tehnice „Gheorghe Asachi” din Iași, 29-30 mai, Iași, România (Prezentare orală)
2. **Ciupercă O. T.**, Țebrencu C. E., Volf I. (2017) Polyphenols investigation of branches of *Prunus spinosa* L. species, 20<sup>th</sup> Romanian International Conference of Chemistry and Chemical Engineering, 6-9 septembrie, Poiana Brașov, România (Poster),
3. **Ciupercă O. T.**, Crețu M. R., Țebrencu C. E., Ionescu E., Iacob E., Volf I. (2017) HPTLC Investigation of condensed tannins in branches of *Rosa canina* L, *Hippophae rhamnoides* L. and *Prunus spinosa* L. species., Book of Abstract of The 3<sup>rd</sup> International Conference on Natural Products Utilization: From Plants to Pharmacy Shelf, 18-21 octombrie, Bansko, Bulgaria (Poster)
4. **Ciupercă O. T.**, Țebrencu C. E., Iacob E., Scripcaru A., Ionescu E., Volf I. (2018) Evaluation of antimicrobial activity of *Prunus spinosa* L., Young Scientists’ Meeting on Advances in Phytochemical Analysis (Trends in Natural Products Research), Phytochemical Society of Europe (PSE), 2-5 iulie, Liverpool, Regatul Unit al Marii Britanii (Poster),
5. **Ciupercă O. T.**, Țebrencu C. E., Lazăr L., Volf I. (2018) Investigation on microwave assisted extraction process of some polyphenols from branches of *Prunus spinosa* L., 4<sup>th</sup> International Conference on Chemical Engineering – Innovative materials and processes for a sustainable development – ICCE 2018, 31 octombrie - 2 noiembrie, ”Gheorghe Asachi” Technical University of Iași, România (Poster),
6. **Ciupercă O. T.**, Țebrencu C. E., Lazăr L., Ionescu E., Volf I. (2018) Comparative evaluation of polyphenols in branches extracts of *Rosa canina*, *Hippophae rhamnoides* and *Prunus spinosa* sp.

using conventional extraction methods, 4<sup>th</sup> International Conference on Chemical Engineering – Innovative materials and processes for a sustainable development – ICCE2018, 31 octombrie - 2 noiembrie, "Gheorghe Asachi" Technical University of Iași, România (Poster)

### **Proiecte de cercetare derulate ca Responsabil de proiect**

1. PNCDI III P2-2.2-PED-2021-1185/645PED/2022 – Proiect experimental demonstrativ – Fitonutrienți pe bază de fitocomplecși îmbogățiți în estrogeni cu potențial de utilizare în managementul bolilor metabolice.
2. PNCDI III P2-2.2-PED-2019-3945 – Proiect experimental demonstrativ – Dezvoltarea de noi fito-produse cu potențial bioactiv ridicat utilizând complecși polifenolici din plante și subproduse vegetale.
3. Contract subsidiar tip D nr. 13/21.12.2018 – "Cercetări privind obținerea de suplimente alimentare multicomponent pe bază de plante medicinale, micronutrienți și alți ingrediente alimentare cu rol fiziologic și nutrițional" al Contracului de finanțare nr. 57 05.09.2016/, cu titlul "Valorificarea expertizei în cercetarea agro-alimentară prin transfer de cunoștințe către mediul privat în vederea obținerii de produse alimentare sigure și optimizate nutrițional – Expertal" - Competiție POC, Axa 1: CDI în sprijinul competitivității economice și dezvoltării afacerilor, Acțiunea 1.2.3 Parteneriate pentru transfer de cunoștințe - Cod SMIS 2014+ 105509.

### **Proiecte de cercetare derulate ca Expert Cheie**

1. PN-III-P2-2.1-PED-2021-1870/646PED/2022 – Ecotehnologie de obținere a unor fitoingredienți încapsulați în hidrogel pe bază de complecși bioactivi imobilizați în matrice de hidroxizi dubli lamelari.
2. PN-III-P2-2.1-PED-2016-1604-192PED/2017 – Advanced and emergent technologies to obtain vegetal extracts used in innovator food supplements.
3. PN-III-P2-2.1-PED-2016-1247-188PED/2017 – New safe phytoextracts from tree species in the Carpathians with potential to improve human and /or animal health.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Akhtar, I., Javad, S., Ansari, M., Ghaffar, N., & Tariq, A. (2020) Process optimization for microwave assisted extraction of *Foeniculum vulgare* Mill using response surface methodology. *Journal of King Saud University - Science*, 32(2), 1451-1458.
2. Alaydi, H., Zhu, X., Mondala, J. R. M., Tiwari, B. K., Kumari, B., Curtin, J. F., Downey, P., McKeon-Bennett, M., & Beletskaya, T. (2023) Valorisation of phytochemical from Sitka spruce (*Picea sitchensis*) needles: Impact of ultrasound/microwave-assisted extraction. *Food and Bioproducts Processing*, 139, 98-108.
3. Ameer, K., Shahbaz, H.M., Kwon, J.-H. (2017) Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review, *Compr. Rev. Food Science Food Safety*, 16.
4. Arora, D. S., & Mahajan, H. (2019) Major Phytoconstituents of *Prunus cerasoides* Responsible for Antimicrobial and Antibiofilm Potential Against Some Reference Strains of Pathogenic Bacteria and Clinical Isolates of MRSA. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 188(4), 1185–1204. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-02985-4>
5. Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., & Supuran, C. T. (2021) Natural products in drug discovery: Advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3), 200–216. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>
6. Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Omar, K.M., (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *Journal of Food Engineering*, 117, 426-436.
7. Backes, E., Leichtweis, M. G., Pereira, C., Carocho, M., Barreira, J. C. M., Kamal Genena, A., José Baraldi, I., Filomena Barreiro, M., Barros, L., & C.F.R. Ferreira, I. (2020) *Ficus carica* L. and *Prunus spinosa* L. extracts as new anthocyanin-based food colorants: A thorough study in confectionery products. *Food Chemistry*, 333, 127457.
8. Badawy, E., Vinatoru, M., Calinescu, I., Shams, K., Abel-Azim, N., Fahmi, A., Abdul-Rahman, M., Abd-Rabou, A., Hamed, A., Mahmoud, K., Mason, T., & Saleh, I. (2022) The use of ultrasound (UAE) and microwaves (MAE) to improve the extraction of pharmaceutically active materials from the fruit of the prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) [Preprint]. In Review.
9. Bansod, S. P., Parikh, J. K., & Sarangi, P. K. (2023) Pineapple peel waste valorization for extraction of bio-active compounds and protein: Microwave assisted method and Box Behnken design optimization. *Environmental Research*, 221, 115237.
10. Beszterda, M., & Frański, R. (2020) Detection of flavone C-glycosides in the extracts from the

- bark of *Prunus avium* L. and *Prunus cerasus* L. *European Journal of Mass Spectrometry*, 26(5), 369–375. <https://doi.org/10.1177/1469066720963003>
11. Bitwell, C., Indra, S. S., Luke, C., & Kakoma, M. K. (2023) A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Scientific African*, 19, e01585. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01585>
  12. Bozhuyuk, M. R., Ercisli, S., Karatas, N., Ekiert, H., Elansary, H. O., & Szopa, A. (2021) Morphological and Biochemical Diversity in Fruits of Unsprayed *Rosa canina* and *Rosa dumalis* Ecotypes Found in Different Agroecological Conditions. *Sustainability*, 13(14),
  13. Bujor, O.C., Talmaciu L.A., Volf, I., Popa V.I. (2015) Biorefining as a possibility to recover aromatic compounds with biological properties, *TAPPI Journal* 4, 187-193.
  14. Carciochi, R. A., Sologubik, C. A., Fernández, M.B., Manrique, G.D., D'Alessandr, L. G. (2018) Extraction of Antioxidant Phenolic Compounds from Brewer's Spent Grain: Optimization and Kinetics Modeling, *Antioxidants* (Basel), 7(4): 45.
  15. Cavalloro, V., Martino, E., Linciano, P., & Collina, S. (2021) Microwave-Assisted Solid Extraction from Natural Matrices. In G. I. Churyumov (Ed.), *Microwave Heating—Electromagnetic Fields Causing Thermal and Non-Thermal Effects*. IntechOpen.
  16. Chan, C.H., Yusoff, R., Ngoh, G.-C., (2014a) Modeling and kinetics study of conventional and assisted batch solvent extraction, *Chemical Engineering Research and Design*, 92, 169-1186.
  17. Chen, A., Feng, X., Dorjsuren, B., Chimedtseren, C., Damda, T.-A., & Zhang, C. (2023) Traditional food, modern food and nutritional value of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): A review. *Journal of Future Foods*, 3(3), 191-205.
  18. Chupin, L., Maunu, S. L., Reynaud, S., Pizzi, A., Charrier, B., & Charrier-EL Bouhtoury, F. (2015) Microwave assisted extraction of maritime pine (*Pinus pinaster*) bark: Impact of particle size and characterization. *Industrial Crops and Products*, 65, 142-149.
  19. **Ciupercă, O.T.**, Țebrencu, C. E., Ionescu, E., Iacob, E., Volf I. (2019) Studies on polyphenols isolated from branches of *Prunus spinosa* L. Species. *Revista de chimie*, 70, no. 8, p. 2897-2902, <https://doi.org/10.37358/RC.19.8.7452>.
  20. **Ciupercă, O.T.**, Țebrencu, C. E., Lazăr, L., Volf I. (2020) Kinetic Study on Solid-Liquid Extraction of Condensed Tannins from *Rosa Canina* Branches and Stems. *Revista de Chimie*, 71, 7, 153-161. <https://doi.org/10.37358/RC.20.7.8233>.
  21. **Ciupercă, O.T.**, Țebrencu, C. E., Volf, I., (2017) Polyphenolic content evaluation in branches of *Rosa canina* L. and *Hippophae rhamnoides* L. species, *Bulletin of the Polytechnic Institute of Iași*, "Gheorghe Asachi" Technical University of Iași, section Chemistry and Chemical Engineering, 63 (67), 1, 49-59.

22. Da Silva, R. F., Carneiro, C. N., Do C. De Sousa, C. B., J. V. Gomez, F., Espino, M., Boiteux, J., De Los Á. Fernández, M., Silva, M. F., & De S. Dias, F. (2022) Sustainable extraction bioactive compounds procedures in medicinal plants based on the principles of green analytical chemistry: A review. *Microchemical Journal*, 175, 107184. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107184>
23. Das, S. K., Ghosh, G. K., & Avasthe, R. (2023) Biochar application for environmental management and toxic pollutant remediation. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13(1), 555-566.
24. Delmas, G.-H., Banoub, J. H., & Delmas, M. (2022) Lignocellulosic Biomass Refining: A Review Promoting a Method to Produce Sustainable Hydrogen, Fuels, and Products. *Waste and Biomass Valorization*, 13(5), 2477-2491.
25. Fraga-Corral, M., García-Oliveira, P., Pereira, A. G., Lourenço-Lopes, C., Jimenez-Lopez, C., Prieto, M. A., Simal-Gandara, J. (2020) Technological Application of Tannin-Based Extracts, *Molecules* 25, 614; doi: 10.3390/molecules25030614.
26. Ghițescu, R.E., Volf, I., Cărașu, C., Buhlmann AM., Gilca, I.A., Popa, V.I. (2015) Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce bark conversion, *Environmental Engineering and Management* 14, 615-623.
27. Hu, Q., Jung, J., Chen, D., Leong, K., Song, S., Li, F., Mohan, B. C., Yao, Z., Prabhakar, A. K., Lin, X. H., Lim, E. Y., Zhang, L., Souradeep, G., Ok, Y. S., Kua, H. W., Li, S. F. Y., Tan, H. T. W., Dai, Y., Tong, Y. W., Wang, C.-H. (2021) Biochar industry to circular economy. *Science of The Total Environment*, 757, 143820.
28. Janicka, P., Płotka-Wasyłka, J., Jatkowska, N., Chabowska, A., Fares, M. Y., Andruch, V., Kaykhaii, M., & Gębicki, J. (2022) Trends in the new generation of green solvents in extraction processes. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 37, 100670. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2022.100670>
29. Kah, M., Sigmund, G., Xiao, F., & Hofmann, T. (2017) Sorption of ionizable and ionic organic compounds to biochar, activated carbon and other carbonaceous materials. *Water Research*, 124, 673-692.
30. Malinowska, P., Olas, B. (2016) Sea buckthorn - valuable plant for health. *Kosmos* 2, 285-292.
31. Mandal, V., Tandey, R. (2016) A critical analysis of publication trends from 2005-2015 in microwave assisted extraction of botanicals: How far we have come and the road ahead. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 82, 100-110.
32. Marčetić, M., Samardžić, S., Ilić, T., Božić, D. D., & Vidović, B. (2022) Phenolic Composition, Antioxidant, Anti-Enzymatic, Antimicrobial and Prebiotic Properties of *Prunus spinosa* L. Fruits. *Foods*, 11(20), 3289.

33. Marchelak, A., Owczarek, A., Matczak, M., Pawlak, A., Kolodziejczyk-Czepas, J., Nowak, P., Olszewska, M.A. (2017) Bioactivity Potential of *Prunus spinosa* L. Flower Extracts: Phytochemical Profiling, Cellular Safety, Pro-inflammatory Enzymes Inhibition and Protective Effects Against Oxidative Stress In Vitro, *Frontiers in Pharmacology* 8: 680.
34. Ngwenya, N., & Mahlambi, P. (2023) Methods optimization and application: Solid phase extraction, ultrasonic extraction and Soxhlet extraction for the determination of antiretroviral drugs in river water, wastewater, sludge, soil and sediment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 230, 115358. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115358>
35. Nisca, A., Ștefănescu, R., Moldovan, C., Mocan, A., Mare, A. D., Ciurea, C. N., Man, A., Muntean, D.-L., & Tanase, C. (2022) Optimization of Microwave Assisted Extraction Conditions to Improve Phenolic Content and In Vitro Antioxidant and Anti-Microbial Activity in *Quercus cerris* Bark Extracts. *Plants*, 11(3), 240.
36. Olas B. (2016) Sea buckthorn as a source of important bioactive compounds in cardiovascular diseases, *Food and Chemica toxicology* 97, 199-204.
37. Ortega-Vidal, J., Cobo, A., Ortega-Morente, E., Gálvez, A., Martínez-Bailén, M., Salido, S., & Altarejos, J. (2022) Antimicrobial activity of phenolics isolated from the pruning wood residue of European plum (*Prunus domestica* L.). *Industrial Crops and Products*, 176, 114296. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114296>
38. Ouerghemmi, S., Sebei, H., Siracusa, L., Ruberto, G., Saija, A., Khebour Allouche, F., Dhaouadi, K., Cimino, F., & Cristani, M. (2020). LC-DAD-ESI-MS and HPLC-DAD phytochemical investigation and *in vitro* antioxidant assessment of *Rosa* sp. Stem pruning products from different northern areas in Tunisia. *Phytochemical Analysis*, 31(1), 98–111. <https://doi.org/10.1002/pca.2870>
39. Pals, M., Lauberte, L., Ponomarenko, J., Lauberts, M., & Arshanitsa, A. (2022) Microwave-Assisted Water Extraction of Aspen (*Populus tremula*) and Pine (*Pinus sylvestris* L.) Barks as a Tool for Their Valorization. *Plants*, 11(12), 1544.
40. Pan, J., Ma, J., Zhai, L., Luo, T., Mei, Z., & Liu, H. (2019) Achievements of biochar application for enhanced anaerobic digestion: A review. *Bioresource Technology*, 292, 122058.
41. Pan, X., G. Niu and H. Liu (2003) Microwave assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves, *Chemical Engineering Process*, 42, 129- 133.
42. Panzella, L., & Napolitano, A. (2022) Condensed Tannins, a Viable Solution To Meet the Need for Sustainable and Effective Multifunctionality in Food Packaging: Structure, Sources, and Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(3), 751–758. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c07229>
43. Pavlić, B., Kaplan, M., Zeković, Z., Canli, O., Jovičić, N., Bursać Kovačević, D., Bebek

- Markovinović, A., Putnik, P., & Bera, O. (2023) Kinetics of Microwave-Assisted Extraction Process Applied on Recovery of Peppermint Polyphenols: Experiments and Modeling. *Plants*, 12(6), 1391. <https://doi.org/10.3390/plants12061391>
44. Pătrăuțanu, O.A., **Ciupercă, O.T.**, Popa, V. I., Volf, I. (2020) Contributions on Spruce Bark Polyphenols Identification Using Instrumental (UV-VIS Spectrometry), Qualitative (Thin Layer Chromatography) and Quantitative (HPTLC Densitometry), *Revista de chimie*, 71, no. 1, p. 39-45.
  45. Pelegrín, C.J., Ramos, M., Jiménez, A., & Garrigós, M. C. (2022) Chemical Composition and Bioactive Antioxidants Obtained by Microwave-Assisted Extraction of *Cyperus esculentus* L. By-products: A Valorization Approach. *Frontiers in Nutrition*, 9, 944830.
  46. Pinacho, R., Cavero, R.Y., Astiasarán, I., Ansorena, D., Calvo, M.I. (2015) Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of in vitro digestion on their antioxidant capacity. *Journal of Functional Foods* 19: 49-62.
  47. Popa, V. I., & Volf, I. (Eds.) (2018) *Biomass as renewable raw material to obtain bioproducts of high-tech value*. Elsevier.
  48. Popa, V.I. (2013) Biorefining and the Pulp and Paper Industry, în *Pulp Production and Processing: From Papermaking to High-Tech Products*. Smithers Rapra Technology Ltd, U.K.
  49. Popa, V.I. (2016) Un model pentru valorificare a biomasei ca sursă de energie și produse chimice. *Celuloză și Hârtie*, vol. 65, nr.1.
  50. Prasad, B. R., Padhi, R. K., & Ghosh, G. (2022) A review on key pretreatment approaches for lignocellulosic biomass to produce biofuel and value-added products. *International Journal of Environmental Science and Technology*.
  51. Prasetyaningrum, A., Widayat, W., Jos, B., Ratnawati, R., Riyanto, T., Prinanda, G. R., Le Monde, B. U., & Susanto, E. E. (2022) Optimization of Sequential Microwave-Ultrasonic-Assisted Extraction of Flavonoid Compounds from *Moringa oleifera*. *Trends in Sciences*, 20(1), 6401.
  52. Raclariu A.C., Țebrencu C.E., Ichim M.C., **Ciupercă O.T.**, Krag Brysting A., De Boer H. (2018) What's in the box? Authentication of Echinacea herbal products using DNA metabarcoding and HPTLC, *Phytomedicine*, 44, 32-38, doi: 10.1016/j.phymed.2018.03.058.
  53. Răducanu A.E., Tihăuan B.M., Marinaș I.C., **Ciupercă O.T.**, Țebrencu C.E., Ionescu E., Onisei T. (2021) The Biological Effects of Novel Nutraceuticals with Curcuminoids and Other Plant-Derived Immunomodulators and Pre-Probiotics, *Pharmaceutics*, 13, 666. doi.org/10.3390/pharmaceutics13050666
  54. Ridlo, M., Kumalaningsih, S., & Pranowo, D. (2020) Process of microwave assisted extraction (MAE) for *Rhodomyrtus tomentosa* fruit and its bioactive compounds. *IOP Conference Series:*

*Earth and Environmental Science*, 475(1), 012038.

55. Rodrigues, R. C. L. B., Green Rodrigues, B., Vieira Canettieri, E., Acosta Martinez, E., Palladino, F., Wisniewski Jr, A., & Rodrigues Jr, D. (2022) Comprehensive approach of methods for microstructural analysis and analytical tools in lignocellulosic biomass assessment - A review. *Bioresource Technology*, 348, 126627.
56. Rudrapal, M., Khairnar, S. J., Khan, J., Dukhyil, A. B., Ansari, M. A., Alomary, M. N., Alshabirmi, F. M., Palai, S., Deb, P. K., & Devi, R. (2022) Dietary Polyphenols and Their Role in Oxidative Stress-Induced Human Diseases: Insights Into Protective Effects, Antioxidant Potentials and Mechanism(s) of Action. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 806470. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.806470>
57. Sadeghi, A., Hakimzadeh, V., Karimifar, B. (2017) Microwave assisted extraction of bioactive compounds from food: a review, *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, 7 (1): 19-27.
58. Samanta, R., & Ghosh, M. (2023) Optimization of Microwave-assisted Extraction Technique for Flavonoids and Phenolics from the Leaves of *Oroxylum indicum* (L.) Kurtz Using Taguchi L9 Orthogonal Design. *Pharmacognosy Magazine*, 19(1), 97-104.
59. Shahidi, F., & Hossain, A. (2023). Importance of Insoluble-Bound Phenolics to the Antioxidant Potential Is Dictated by Source Material. *Antioxidants*, 12(1), 203. <https://doi.org/10.3390/antiox12010203>
60. Sharafan, M., Malinowska, M. A., Ekiert, H., Kwaśniak, B., Sikora, E., & Szopa, A. (2023) *Vitis vinifera* (Vine Grape) as a Valuable Cosmetic Raw Material. *Pharmaceutics*, 15(5), 1372. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051372>
61. Sheldon, R., (2011) Utilisation of biomass for sustainable fuels and chemicals: Molecules, methods and metrics. *Catalysis Today*, 167 (1), 3-12.
62. Shen, N., Wang, T., Gan, Q., Liu, S., Wang, L., & Jin, B. (2022) Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 383, 132531. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132531>
63. Singh, H., Northup, B. K., Rice, C. W., & Prasad, P. V. V. (2022) Biochar applications influence soil physical and chemical properties, microbial diversity, and crop productivity: A meta-analysis. *Biochar*, 4(1), 8.
64. Sut, S., Maccari, E., Zengin, G., Ferrarese, I., Loschi, F., Faggian, M., Paolo, B., De Zordi, N., Dall'Acqua, S. (2022) "Smart Extraction Chain" with Green Solvents: Extraction of Bioactive Compounds from *Picea abies* Bark Waste for Pharmaceutical, Nutraceutical and Cosmetic Uses. *Molecules*, 27(19), 6719.
65. Sytar, O., Hemmerich, I., Zivcak, M., Rauh, C., & Brestic, M. (2018) Comparative analysis of



- bioactive phenolic compounds composition from 26 medicinal plants. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(4), 631–641. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.036>
66. Tălmăciu, A., Volf, I., Popa, I.V.(2015) A comparative analysis of the „green,, technique applied for polyphenols extraction from bioresources. *Chemistry and Biodiversity* 12, 1635-1651.
  67. Tălmăciu, A., Volf, I., Popa, I.V.(2015a) Supercritical fluids and ultrasound assisted extractions applied to spruce bark conversion, *Environmental Engineering and Management Journal*, Vol.14, No. 3, 615-623.
  68. Ticha, M. B., Slama, N., Dhouibi, N., Boudokhane, C., & Dhaouadi, H. (2022) Bark Residues Recovery of *Juglans Regia*. L For the Dyeing of Wool Fabrics: Development of Microwave-assisted Extraction and Dyeing Processes. *Journal of Natural Fibers*, 19(13), 5282-5296.
  69. Tomasi, I. T., Santos, S. C. R., Boaventura, R. A. R., & Botelho, C. M. S. (2023) Microwave-Assisted Extraction of Polyphenols from Eucalyptus Bark—A First Step for a Green Production of Tannin-Based Coagulants. *Water*, 15(2), 317.
  70. Tomczyk, A., Sokołowska, Z., & Boguta, P. (2020) Biochar physicochemical properties: Pyrolysis temperature and feedstock kind effects. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 19(1), 191-215.
  71. Tong, Z., He, W., Fan, X., & Guo, A. (2022) Biological Function of Plant Tannin and Its Application in Animal Health. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 803657. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.803657>
  72. Truong, D., Ta, N. T. A., Pham, T. V., Huynh, T. D., Do, Q. T. G., Dinh, N. C. G., Dang, C. D., Nguyen, T. K. C., & Bui, A. V. (2021) Effects of solvent—Solvent fractionation on the total terpenoid content and in vitro anti-inflammatory activity of *Serevenia buxifolia* bark extract. *Food Science & Nutrition*, 9(3), 1720–1735. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2149>
  73. Tsiaka, T., Lantzouraki, D. Z., Polychronaki, G., Sotiroudis, G., Kritsi, E., Sinanoglou, V. J., Kalogianni, D. P., & Zoumpoulakis, P. (2023) Optimization of Ultrasound- and Microwave-Assisted Extraction for the Determination of Phenolic Compounds in Peach Byproducts Using Experimental Design and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Molecules*, 28(2), 518.
  74. Turcov D., Barna A. S., **Apreutesei (Ciupercă) O. T.**, Trifan A., Puițel A. C., Șuteu D. (2022) Valorization of bioactive compounds from residual saffron biomass (*Crocus sativus* L.) to obtain high value added dermato-cosmetic products, *BioResources* 17(3), 4730-4744 doi: 10.15376/biores.17.3.4730-4744.
  75. Uzel, R. A. (2018) Microwave-Assisted Green Extraction Technology for Sustainable Food Processing. In *Emerging Microwave Technologies in Industrial, Agricultural, Medical and*

*Food Processing*; You, K. Y., Ed.; InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76140>.

76. Volf I, Popa V.I. (2018) Integrated Processing on Biomass Resources for Fine Chemical Obtaining: Polyphenols, in Biomass as renewable raw material to obtain bioproducts of high-tech value, Elsevier.
77. Volf, I. (2011) Produse si energie din resurse regenerabile. Seria Managementul mediului. Ed. ECOZONE, Iasi, 23-93.
78. Wang, L., Chen, L., Tsang, D. C. W., Kua, H. W., Yang, J., Ok, Y. S., Ding, S., Hou, D., & Poon, C. S. (2019) The roles of biochar as green admixture for sediment-based construction products. *Cement and Concrete Composites*, 104, 103348.
79. Wang, Y., Zhao, Y., Liu, X., Li, J., Zhang, J., & Liu, D. (2022) Chemical constituents and pharmacological activities of medicinal plants from Rosa genus. *Chinese Herbal Medicines*, 14(2), 187–209. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2022.01.005>
80. Wang, Z., Zhao, F., Wei, P., Chai, X., Hou, G., & Meng, Q. (2022) Phytochemistry, health benefits, and food applications of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): A comprehensive review. *Frontiers in Nutrition*, 9, 1036295.