



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



ȘCOALA DOCTORALĂ

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

**CERCETĂRI PRIVIND EXTRAȚIA ȘI CARACTERIZAREA
METABOLIȚILOR DIN BIOMASĂ VEGETALĂ**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Doctorand: Chim. Georgiana MARDARE (căs. BĂLUȘESCU)

Conducător de doctorat: Prof. univ. dr. Ing. Teodor MĂLUȚAN

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 **28.09.2023**, la ora **11:00** în Sala de Consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului „Cristofor Simionescu” , va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

“CERCETĂRI PRIVIND EXTRAȚIA ȘI CARACTERIZAREA METABOLIȚILOR DIN BIOMASĂ VEGETALĂ”

elaborate de doamna **chim. MARDARE Georgiana (căs. Bălușescu)** în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

- | | |
|--|------------------------|
| 1. Prof. univ. dr. ing. HURDUC Nicolae
<i>Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași</i> | președinte |
| 2. Prof. univ. dr. ing. MĂLUȚAN Teodor
<i>Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași</i> | conducător de doctorat |
| 3. Prof. univ. dr. BULGARIU Dumitru
<i>Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași</i> | referent oficial |
| 4. Dr. ing. CIOLACU Diana Elena, CSII
<i>Institutul de Chimie Macromoleculară „P. Poni” din Iași</i> | referent oficial |
| 5. Prof. univ. dr. habil. ing. VOLF Irina
<i>Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași</i> | referent oficial |

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 NAGÎȚ

Mulțumiri

Acum, la finalul stagiului de doctorat, mă simt profund marcată de sentimente de fericire și împlinire care provin din mulțumirea profesională și personală a studiilor duse la bun sfârșit. Pe această cale, doresc să le mulțumesc tuturor acelor oameni deosebiți care, prin înalt grad profesional și dăruire, mi-au oferit consultanță științifică și care și-au rupt din timpul lor liber pentru a-mi oferi sprijin și ajutor.

Cuvinte de mulțumire, aleasă prețuire și întreaga mea recunoștință se îndreaptă către domnul Prof. dr. ing. Teodor MĂLUȚAN, coordonator al acestei teze, pentru sprijinul, răbdarea, generozitatea, sfaturile și înțelegera deplină acordate pe tot parcursul întregului stagi de doctorat. Vă mulțumesc, Domnule Profesor pentru că ați avut încredere în mine! Vă mulțumesc pentru îndrumarea științifică și pentru faptul că mi-ați oferit un model de perseverență și profesionalism în orice moment al cercetării științifice și al elaborării tezei de doctorat.

Membrilor comisiei de îndrumare, Prof. dr. ing. Ioan MĂMĂLIGĂ, Conf. dr. ing. Liliana LAZĂR, Șef. lucrări dr. ing. Florin CIOLACU, adresez cuvinte de mulțumire pentru timpul prețios acordat, pentru sfaturile științifice valoroase, cât și pentru îndrumarea competentă și permanentă pe tot parcursul programului de pregătire pentru elaborarea și realizarea acestei teze de doctorat.

Mulțumesc distinșilor referenți oficiali, Prof. dr. habil. ing. Irina VOLF - Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași, Prof. dr. habil. Dumitru BULGARIU - Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași, CSII Dr. Diana Elena CIOLACU - Institutul de Chimie Macromoleculară „P. Poni” din Iași, și pentru onoarea de a face parte din comisia de susținere publică și de a recenza această teză.

În mod deosebit, îmi exprim întreaga mea recunoștință, profund respect și alese mulțumiri domnișoarei Conf. dr. ing. Liliana LAZĂR pentru sprijinul permanent, ajutorul, îndrumarea, sfaturile și ideile oferite cu generozitate și profesionalism, încrederea totală și răbdarea acordate, contribuind astfel la formarea mea personală și profesională și, nu în ultimul rând, pentru noblețea sufletească care o caracterizează.

Mulțumesc, de asemenea, Societății Comerciale CHIMCOMPLEX S.A. Borzești pentru suportul financiar oferit prin acordarea Bursei de Cercetare – Chimcomplex.

De asemenea doresc să aduc cuvinte de mulțumire doamnei Dr. ing. Adina CUSTURA și domnului Șef lucrări dr. ing. Adrian-Cătălin PUIȚEL pentru cunoștințele împărtășite, sprijin, încurajări și apreciere. Mulțumesc prietenilor și în mod special Prof. univ. dr. Nicoleta-Elena HEGHEȘ pentru că a fost alături de mine.

Cu deosebită recunoștință și dragoste, dedic această teză soțului meu, Constantin, căruia doresc să-i mulțumesc pentru dragostea, răbdarea și încurajările oferite pe parcursul acestor ani. Această teză este dedicată, de asemenea, familiei, în special părinților mei, mamei mele Mariana și tatălui meu Dragomir (RIP) cărora țin să le mulțumesc pentru iubirea necondiționată, educația, sprijinul moral și material și răbdarea de care au dat dovadă în formarea mea ca om.

Iulie, 2023

C U P R I N S

Listă de abrevieri	3
INTRODUCERE	5
Partea I. STUDIU DE LITERATURĂ	
Capitolul 1. Metaboliți din biomasă vegetală cu potențial farmacologic	15
1.1. Istoricul, definirea și clasificarea metaboliților	15
1.2. Tipuri de metaboliți secundari din biomasă vegetală	16
1.3. Concluzii	21
Capitolul 2. Tehnici de extracție și metode de caracterizare a metaboliților din biomasă vegetală	23
2.1. Aspecte generale privind extracția metaboliților din biomasă	23
2.2. Extracția convențională	25
2.2.1. Macerarea	26
2.2.2. Infuzia, percolarea, decoctia	27
2.2.3. Extracția Soxhlet	29
2.2.4. Hidrodistilarea	30
2.3. Extracția neconvențională	31
2.3.1. Extracția asistată de ultrasunete	31
2.3.2. Extracția asistată de microunde	38
2.3.3. Extracția cu fluide supercritice	39
2.3.4. Extracția cu solvent sub presiune	41
2.4. Metode de caracterizare a metaboliților secundari	43
2.4.1. Analiza spectrofotometrică UV-VIS	44
2.4.2. Analiza spectroscopică	45
2.4.2.1. Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier	46
2.4.2.2. Spectroscopia de fluorescență	48
2.4.3. Analiza cromatografică	50
2.5. Concluzii	55
Partea a II-a. CONTRIBUȚII PERSONALE PRIVIND EXTRACȚIA ȘI CARACTERIZAREA SCOPOLAMINEI DIN <i>DATURA INNOXIA</i>	
Capitolul 3. Oportunitatea și obiectivele temei	57
Capitolul 4. Protocolul experimental	73
4.1. Biomasă vegetală – <i>Datura innoxia</i>	73
4.1.1. Colectarea plantei și pregătirea organelor vegetative	73
4.1.2. Uscarea și determinarea umidității materialului vegetal	75
4.1.3. Măcinarea și stocarea materialului vegetal	78
4.2. Metoda de lucru pentru obținerea extractelor	79
4.2.1. Extracția convențională Soxhlet	79
4.2.2. Extracția neconvențională UAE	81

4.3. Aparatură și echipamente pentru caracterizarea extractelor	82
4.3.1. Cromatograf de gaze	82
4.3.2. Spectrofotometru UV-VIS	83
4.3.3. Spectrometru FTIR	83
4.3.4. Spectrofotometru de fluorescență	83
4.4. Substanțe și reactivi	84
4.5. Prelucrare statistică și interpretarea datelor experimentale	84
Capitolul 5. Standardizarea metodelor de analiză în vederea caracterizării extractelor din <i>Datura innoxia</i>	85
5.1. Curba de calibrare pentru analiza UV-VIS	86
5.2. Curba de calibrare pentru analiza prin spectroscopia de fluorescență	88
5.3. Curba de calibrare pentru analiza GC-FID	89
Capitolul 6. Caracterizarea extractelor și analiza scopolaminei obținute din <i>Datura innoxia</i> prin tehnica Soxhlet	91
6.1. Strategia cercetării	91
6.2. Analiza extractelor obținute	91
6.2.1. Analiză UV-VIS	91
6.2.2. Analiză spectroscopică de fluorescență	100
6.2.3. Analiză FTIR	106
6.2.4. Analiză GC-FID	114
6.3. Concluzii parțiale	120
Capitolul 7. Caracterizarea extractelor și analiza scopolaminei obținute din <i>Datura innoxia</i> prin tehnica UAE	121
7.1. Strategia cercetării	121
7.2. Analiza extractelor obținute	122
7.2.1. Analiză UV-VIS	122
7.2.2. Analiză spectroscopică de fluorescență	128
7.2.3. Analiză FTIR	133
7.2.4. Analiză GC-FID	140
7.3 Concluzii parțiale	144
Capitolul 8. Analiza comparativă a tehnicilor de extracție și a metodelor de analiză a scopolaminei din <i>Datura innoxia</i>	145
Concluzii generale	159
Contribuții originale	163
Activitatea științifică	164
BIBLIOGRAFIE	167

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

Biomasa vegetală reprezintă o resursă neprețuită pentru natură, utilă în viața de zi cu zi ca sursă de alimente, aditivi alimentari, parfumuri, produse farmaceutice, coloranți sau direct utilizată în medicină. Această utilizare a plantelor are o lungă istorie în întreaga lume, și, de-a lungul secolelor, omenirea a dezvoltat metode din ce în ce mai performante pentru prepararea unor astfel de materiale vegetale. În zilele noastre există o renaștere a interesului pentru remediile naturale, în parte din cauza unor deziluzii față de medicina modernă și a medicamentelor, care, fie nu funcționează în totalitate, fie sunt însoțite de efecte secundare nedorite. Remediile naturale au avantajul că au trecut dovedă timpului. Pe de altă parte, unele medicamente sintetice, chiar dacă sunt folosite de peste 100 de ani, ar putea avea nevoie de mai mult timp pentru a se dovedi absolut inofensive (Vinatoru, 2001).

O parte din aceste plante pot fi considerate specii de plante invazive care sunt răspândite în întreaga lume, introduse intenționat sau neintenționat într-un mediu nou, fără un control strict și, care pot înlocui sau afecta în mod negativ speciile de plante native și pot fi distructive pentru biodiversitate și ecosistem (Lyimo și colab., 2009; Aravindhyan și Rajendran 2014; Maema și colab., 2016; Dar și Reshi, 2017; Chavre și Patil, 2023).

În ciuda faptului că unele specii de plante invazive sunt toxice atât pentru oameni, cât și pentru animale, este interesant că foarte puține studii le asociază cu efecte pozitive, care ar putea include o gamă largă de utilizări potențiale, în alimentație și medicamente, precum cele anticancer, antidiabetic, antimicrobian, antituberculozice sau alte utilizări din punct de vedere farmacologic (Chavre și Patil, 2023), precum și utilizări ca materii prime în industrie și meșteșuguri (materiale de construcție, stâlpi, căpriori, lemn de foc și sănii) (Kobisi și Seleteng-Kose, 2019; Shah și Makhambera, 2019).

Compușii fitochimici izolați din extractele de plante pot fi utilizați ca o sursă excelentă în fitoterapie. În plante, acești compuși fitochimici pot fi împărțiți în metaboliți primari și secundari: metaboliții primari, cum ar fi proteinele, uleiurile și polizaharidele, contribuie la dezvoltarea și creșterea plantelor; metaboliții secundari, cum ar fi alcaloizii, compușii fenolici, terpenele dau capacitatea plantei de a se adapta cu succes la mediu. Deoarece diferiți compuși bioactivi prezintă caracteristici biologice diferite, ei au un potențial valoros de aplicare în multe domenii, în special cel farmaceutic. De exemplu, polifenolii sunt adesea utilizați ca aditivi naturali în alimentele funcționale datorită capacității lor puternice antioxidante. Cu toate acestea, izolarea necesară și complexă (extracție, separare, purificare etc.) a acestor substanțe chimice înainte de utilizare poate duce la denaturarea și degradarea lor. Dintre aceste etape care conduc spre izolare și caracterizare, extracția are cea mai mare influență asupra integrității structurii compușilor bioactivi și a devenit un subiect de cercetare activ (Xiang și colab., 2022).

Identificarea și separarea unor noi metaboliți secundari din biomasa vegetală implică screening-ul fitochimic calitativ și cantitativ al extractelor pentru identificarea unor noi compuși de

interes. „Drumul” care duce de la biomasa vegetală la compusul țintă este de lungă durată, implică muncă și include mai mulți pași care urmează următorul traseu: *colectarea biomasei vegetale* → *autentificare* → *curățare* → *uscarea și depozitare* → *selectarea solvenților* → *proceduri de extracție* (Pawliszyn, 2012; Pânzariu și colab., 2014; Naima și colab., 2015; Abdel-Aal și colab., 2015; Lazar și colab., 2016; Zeng și colab., 2016; Ciuperca și colab., 2019; Pătrăuțanu și colab., 2020) → *analiza extractelor* (Ji și colab., 2014; Sramska și colab., 2017; Pătrăuțanu și colab., 2020) → *elucidarea structurii* (Hostettmann și colab., 2001; Berkov, S., Zayed, 2004; Jakabova și colab., 2012) → *fitocomplex / compuși țintă* (Hostettmann și colab., 2001; Tiwari, 2015; Kumar, 2016; Bagewadi și colab., 2019; Mardare (Balusescu) și colab., 2020).

Luând în considerare informațiile prezentate anterior, în prezenta teză de doctorat intitulată **CERCETĂRI PRIVIND EXTRACȚIA ȘI CARACTERIZAREA METABOLIȚILOR DIN BIOMASĂ VEGETALĂ** s-a stabilit ca **obiectiv general** investigarea extracției unor metaboliti secundari, în special scopolamina, din biomasă vegetală reprezentată de toate organele plantei *Datura innoxia* (frunze, flori, fructe, tulpină și rădăcină), utilizând două tehnici diferite de extracție (extracție convențională Soxhlet și extracția neconvențională UAE) și doi solvenți diferiți (etanol, 1-butanol), urmată de caracterizarea extractelor obținute folosind patru metode de analiză calitativă și/sau cantitativă a scopolaminei (analiză spectrofotometrică UV-VIS, analiza spectroscopică de fluorescență, analiza FTIR și analiza gaz-cromatografică cu detector de ionizare în flacără – GC-FID).

Pentru realizarea obiectivului principal, teza de doctorat este structurată în două părți și 8 capitole, în concordanță cu următoarele **obiective specifice**:

1. Caracterizarea plantei *Datura innoxia*, în scopul diferențierii între potențialele scopuri în care poate fi utilizată;
2. Identificarea alcaloidului scopolamină prezent în părțile constituente ale plantei *Datura innoxia* în acord cu o serie de informații din literatura de specialitate;
3. Extracția alcaloidului scopolamină din organele vegetative ale plantei *Datura innoxia* utilizând tehnici de extracție convenționale și neconvenționale, Soxhlet, respectiv asistată de ultrasunete;
4. Profilul cromatografic și analiza cantitativă a scopolaminei din extractele de biomasă vegetală provenită din planta *Datura innoxia*;
5. Determinarea concentrației de scopolamină în matricile extractelor de *Datura innoxia* prin utilizarea tehnicilor de analiză precum spectrofotometrie UV-VIS, dar și amprentarea spectrofotometrică pentru fiecare organ vegetativ în parte;
6. Amprentarea spectroscopică a extractelor pentru fiecare organ vegetativ al plantei *Datura innoxia* (frunze, flori, semințe, tulpină și rădăcină) utilizând FTIR;
7. Determinarea cantitativă a alcaloidului scopolamină din biomasă vegetală de *Datura innoxia* prin spectroscopia de fluorescență;
8. Analiza comparativă a tehnicilor de extracție și a metodelor de caracterizare utilizate privind conținutul de scopolamină din organele vegetative ale plantei *Datura innoxia*.

Pentru acest demers științific, în prima parte a tezei – STUDIUL DE LITERATURĂ, în capitolul 1 – **Metaboliți din biomasă vegetală cu potențial farmacologic**, se realizează un studiu

de literatură în ceea ce privește stadiul actual al cercetării în vederea identificării celor mai recente și relevante informații publicate în literatura de specialitate privind metaboliții din biomasă vegetală. Sunt abordate aspecte legate de: 1) istoricul, definirea și clasificarea metaboliților, precum și tipurile de metaboliți secundari care fac parte din categoria compușilor bioactivi cu potențial farmacologic. Eficiența extracției metabolitilor din biomasa vegetală impune o atenție deosebită pentru efectuarea etapelor legate de calitatea biomasei vegetale, (colectarea și autentificarea plantelor), și a celor referitoare la pregătirea și condiționarea probelor (uscarea, măcinarea, omogenizarea și stocarea).

Capitolul 2 – **Tehnici de extracție și metode de caracterizare a metaboliților din biomasă vegetală** prezintă studiul literaturii și se realizează cu scopul alegerii tehnicilor de extracție și a metodelor de caracterizare a metaboliților astfel încât să fie îndeplinite și aspectele practice și științifice, dar și cele care implică costuri de operare a instalațiilor și aparatelor, respectiv costurile reactivilor și consumabilelor. Astfel, într-o primă etapă se realizează descrierea principalelor aspecte ale tehnicilor convenționale de extracție aplicate uzual în laboratoare sau industrial (precum: macerare, infuzie, percolare, decoctie, extracția Soxhlet, hidrodistilare) și cele ale tehnicilor neconvenționale – UAE, MASE, SFE, PLE). Ulterior sunt descrise metodele de caracterizare a metaboliților extrași bazate prin analiza UV-VIS, spectroscopie de fluorescență, analiză FTIR și analiză gaz-cromaografică (GC-FID).

În partea a II-a a tezei – **CONTRIBUȚII PERSONALE PRIVIND EXTRACȚIA ȘI CARACTERIZAREA SCOPOLAMINEI DIN *DATURA INNOXIA*** sunt prezentate pe parcursul următoarelor șase capitole studiile proprii bazate pe investigații experimentale, prelucrarea și interpretarea rezultatelor, cu detalii în ceea ce privește metodologia utilizată pentru realizarea extracției și caracterizării alcaloidului tropanic scopolamină din toate organele vegetative ale plantei *Datura innoxia* (frunze, flori, semințe, tulpină, rădăcină). Capitolul 3 prezintă **oportunitatea și obiectivele temei** având în vedere potențialul farmaceutic al scopolaminei care poate fi extrasă din planta *Datura innoxia*.

Capitolul 4 – **Protocolul experimental** cuprinde modul de prelevare și condiționare a biomasei vegetale pentru extracția și analiza cantitativă a alcaloidului tropanic scopolamină. Au fost urmăriti pașii premergători procedurilor de extracție, precum colectarea plantei *Datura innoxia*, uscarea, determinarea umidității, măcinarea și omogenizarea probelor și stocarea probelor. Tot în partea experimentală s-a urmărit extracția compușilor de interes din materialele vegetale. Studiile experimentale proprii au urmărit extracția și analiza cantitativă a alcaloidului scopolamină din organele vegetative ale plantei *Datura innoxia* utilizând tehnica extracție Soxhlet și cea asistată de ultrasunete folosind doi solvenți diferiți etanol și 1-butanol. Analiza calitativă și cantitativă a extractelor în vederea determinării conținutului de scopolamină s-a realizat utilizând metodele de caracterizare, spectrofotometria UV-VIS, spectroscopia de fluorescență, spectroscopia FTIR și cromatografia de gaze (GC-FID). În acest context, capitolul 5 – **Standardizarea metodelor de caracterizare și analiză a extractelor** cuprinde rezultatele experimentale pentru obținerea curbelor de calibrare ale aparatelor utilizate pentru caracterizarea extractelor prin spectrofotometria UV-VIS, spectroscopia de fluorescență, FTIR și cromatografia de gaze (GC-FID), folosind hioscina ca substanță standard pentru cuantificarea scopolaminei.

În capitolul 6 – **Caracterizarea extractelor și analiza scopolaminei obținute din *Datura innoxia* prin tehnica Soxhlet** și în capitolul 7 - **Caracterizarea extractelor și analiza scopolaminei obținute din *Datura innoxia* prin tehnica UAE**, sunt prezentate rezultatele experimentale, prelucrarea și interpretarea acestora, având în vedere, pe de o parte, extractele obținute din organele vegetative ale plantei și influența solvenților utilizați asupra conținutului de scopolamină și, pe de altă parte, metodele de caracterizare calitativă și cantitativă a extractelor. În acest sens, a fost realizat profilul cromatografic și analiza cantitativă a scopolaminei din extractele de biomasă vegetală provenită din organele vegetative ale plantei *Datura innoxia* și au fost abordate din punct de vedere fitochimic caracteristicile de amprentare spectroscopică pentru părțile constituente (frunze, flori, semințe, tulpină, rădăcină). Datele și informațiile obținute pe parcursul investigațiilor experimentale au reliefat detalii legate de compoziția chimică la nivel calitativ și concentrația de scopolamină în extractele obținute, folosind metodele de caracterizare UV-VIS, spectroscopie de fluorescență, FTIR și GC-FID. Capitolul 8 – **Analiza comparativă a tehnicilor de extracție și a metodelor de analiză a scopolaminei din *Datura innoxia*** urmărește studiul comparativ a conținutului de scopolamină în extractele obținute din toate organele vegetative ale plantei *Datura innoxia* în funcție de metoda de extracție și de influența factorilor specifici, respectiv în funcție de metoda utilizată pentru caracterizarea extractelor pentru a alege calea cea mai facilă și mai elocventă pentru procesul de extracție și caracterizarea extractelor obținute.

Teza de doctorat se încheie cu o serie de **concluzii generale** evidențiate în urma studiului de literatură și a cercetărilor experimentale proprii, **contribuțiile originale** și **activitatea științifică**, precum și **bibliografia** (269 referințe bibliografice) care a fost studiată, utilizată și apelată în text. Tema studiată este de actualitate, lucru confirmat de faptul că, majoritatea referințelor bibliografice (145) sunt din ultimii 10 ani (cca. 60 %), iar dintre acestea aproximativ jumătate sunt din ultimii 5 ani.

Rezultatele obținute în cadrul acestei teze de doctorat au fost parțial diseminate pe parcursul întregului stagiul doctoral și s-au concretizat în 2 lucrări științifice publicate în reviste cotate ISI (FIC = 4,5), o lucrare științifică publicată în reviste indexate BDI, 2 lucrări științifice publicate în volumele conferințelor, precum și 8 comunicări și postere la conferințe naționale și internaționale.

Partea I: STUDIU DE LITERATURĂ

Capitolul 1

METABOLIȚI DIN BIOMASĂ VEGETALĂ CU POTENȚIAL FARMACOLOGIC

Metaboliții din biomasa vegetală sunt compuși chimici produși de plante care manifestă efecte farmacologice sau toxicologice asupra omului și animalelor. Metaboliții sintetizați în mod natural sunt alcaloizii, terpenoidele și compușii fenolici. Recent, acești compuși cunoscuți și ca entități chimice noi (NCE) au fost utilizați ca precursori de medicamente sau modele pentru formele

sintetice, iar potențialul lor pentru aplicații farmacologice a fost investigat pe scară largă (Mardare (Balusescu) și Malutan, 2019).

1.2. Tipuri de metaboliți secundari din biomasa vegetală

Toate plantele produc metaboliți secundari (alcaloizi, terpeni, compuși fenolici, etc) și, de obicei, acestea pot stoca mai mulți compuși majori, din diferite clase structurale și prin căi biochimice, care sunt de obicei însoțite de zeci de componente minore. Este reprezentativ în a găsi un amestec complex, care diferă de la o componentă la alta a plantei, uneori, între plante individuale și în mod obișnuit între specii (Wink, 2011; Lattanzio, 2013). În cadrul unei singure specii de plante pot fi produși între 5000 și 20000 de metaboliți primari și secundari individuali, cei mai mulți dintre ei în cantități infime, care sunt omiși în analizele fitochimice (Steinmann și Ganzera, 2011; Wink, 2011).

Medicina tradițională și produsele din plante se bazează pe utilizarea resurselor vegetale ce conțin mai degrabă sute de compuși neidentificați, în cantități mici, decât un singur compus sau o combinație simplă a mai multor compuși. De obicei, principiile active responsabile de acțiunea farmacologică sunt necunoscute. Compușii activi, inclusiv compușii la scară macro și micro, sunt adesea considerați a fi responsabili pentru efectele terapeutice (Amudha și Rani, 2014), și, prin urmare, analiza chimică a acestora este recomandată pentru controlul calității întrucât s-a dovedit că mulți compuși naturali prezintă activitate biologică iar izolarea și analiza chimică a acestora sunt efectuate prin tehnici cromatografice (Ciesla și Waksmundzka-Hajnos, 2009).

Compușii bioactivi din plante sunt clasificați în funcție de diferite criterii. O abordare poate fi bazată pe funcțiile clinice, pe baza efectelor lor farmacologice sau toxicologice, cu rezultate care ar avea relevanță pentru clinicieni, farmaciști sau toxicologi. O abordare bazată pe efectele biologice este complicată de faptul că rezultatul clinic nu ar putea fi conectat exclusiv la compuși chimici similari. Uneori chiar și compuși chimici cu structuri foarte diferite pot produce efecte clinice similare. O clasificare din punct de vedere botanic, bazată pe familii și genuri de plante care produc compuși bioactivi, ar putea fi relevantă, după cum adeseori specii de plante înrudite pot produce compuși secundari similari.

Capitolul 2

TEHNICI DE EXTRACȚIE ȘI METODE DE CARACTERIZARE A METABOLIȚILOR DIN BIOMASA VEGETALĂ

Interesul de a identifica cât mai mulți metaboliți secundari din plante a creat necesitatea aplicării unei metode de extracție economică, rapidă, eficientă și prietenoasă din punct de vedere ecologic. Cheia pentru o extracție eficientă a metaboliților din plantele medicinale este alegerea unei metode de extracție adecvate. Eșecul în acest sens ar putea duce la pierderea sau distrugerea compușilor țintă în timpul etapei de preparare (Mardare – Bălușescu și colab., 2019, 2021). Investigarea extractelor în vederea caracterizării și cuantificării metaboliților cu potențial pentru

diverse domenii, cum ar fi cel farmaceutic, presupune pe de o parte utilizarea metodelor de caracterizare avansată care trebuie să ofere o bună selectivitate, sensibilitate și informații structurale asupra compusului fitochimic de interes și, pe de altă parte, trebuie să prezinte exactitate și reproductibilitate.

2.5. Concluzii

Investigarea biomasei vegetale privind identificarea și caracterizarea metaboliților începe cu procedurile de extracție, care reprezintă etapa importantă în separarea compușilor activi cu potențial fitofarmaceutic. Studiul plantelor medicinale presupune în prealabil pregătirea probelor de material vegetal pentru a conserva biomoleculele din plante înainte de extracție. Probele de plante precum frunze, flori, fructe, semințe, tulpini, rădăcini pot fi prelevate din material vegetal proaspăt sau uscat (Azwanida, 2015).

Este foarte importantă selectarea unei tehnici de extracție optime și investigarea calitativă și cantitativă a compoziției chimice a extractelor prin tehnici de caracterizare avansată, dar și potențialul lor farmacologic datorită efectului benefic sau dăunător pentru ființele vii. Selectarea tehnicii de extracție influențează calitativ și cantitativ compoziția extractelor rezultate. În baza celor prezentate anterior, ***pentru studiile experimentale proprii se va alege metoda convențională de extracție Soxhlet și metoda neconvențională de extracție asistată de ultrasunete***

Studiul literaturii de specialitate a condus la următoarele concluzii referitoare la alegerea metodelor de caracterizare în baza cărora se vor alege ca metode de investigare a extractelor în studiile proprii prezentate în partea a II-a a prezentei tezei:

- ***Spectrofotometria UV-VIS*** oferă o tehnică simplă, cu costuri scăzute și ușor de utilizat pentru identificarea și cuantificarea principalilor compuși fitochimici, oferă o diferențiere dintre compușii fitochimici lipofili și hidrofilii, în raport cu polaritatea solventului de extracție (Zavoi și colab., 2011).
- Cererea crescută de rezolvare a problemelor complexe ale biochimiei plantelor necesită o abordare multidisciplinară, în care ***spectroscopia în infraroșu*** poate juca un rol proeminent (Schulz și Baranska, 2007). FTIR reprezintă o investigație rapidă și nedistructivă, ușor de utilizat pentru amprentarea extractelor din plante sau a pulberilor. Utilizarea ATR a dezvoltat măsurători rapide FTIR ale lichidelor precum uleiurile și extractele de plante, permițând identificarea și cuantificarea biomarkerilor valoroși ai plantelor (Zavoi și colab., 2011).
- ***Spectroscopia de fluorescență*** oferă o tehnică simplă, rapidă și ușor de utilizat pentru identificarea și cuantificarea principalilor compuși fitochimici. Această tehnică de analiză este considerată a fi de 100 - 1000 de ori mai sensibilă decât alte tehnici spectrofotometrice (Mardare – Bălușescu și colab., 2021 și 2022 a).
- Din cadrul metodelor cromatografice, ***cromatografia de gaze cu detector de ionizare în flacără*** este una dintre cele mai utilizate metode de investigare și analiză a compușilor bioactivi (Al-Rubaye și colab., 2017).

Partea a II-a: CONTRIBUȚII PERSONALE PRIVIND EXTRACȚIA ȘI CARACTERIZAREA SCOPOLAMINEI DIN *DATURA INNOXIA*

Capitolul 3 OPORTUNITATEA ȘI OBIECTIVELE TEMEI

Interesul pentru extracția, separarea și analiza compușilor bioactivi din biomasă vegetală este tot mai mare, ca urmare a proprietăților biologice valoroase prezentate de acești compuși, fiind o mare sursă naturală de antioxidanți și produse bio, cum ar fi aditivi alimentari, produse cosmetice și produse farmaceutice (medicamente și suplimente) (Lazăr și colab, 2016).

Studiile actuale sunt îndreptate spre găsirea unor strategii de a genera compuși bioactivi prin modificarea chimică a componentelor inactivi prezenți în extracte prin tehnici de extracție și metode de caracterizare cu selectivitate și reproductibilitate bună. Acest proces se concentrează pe transformarea grupelor de substanțe chimice care se regăsesc foarte frecvent în produsele naturale în grupurile de substanțe chimice care sunt rareori produse de metabolismul secundar. Extractele realizate prin inginerie chimică pot deveni o sursă alternativă de compuși chimici pentru a alimenta procesul de descoperire de entități chimice noi cu activități biomoleculare interesante (Mandal și Mandal, 2015).

Una dintre cele mai reprezentative clase de metaboliți secundari este reprezentată de alcaloizi. Alcaloizii tropanici (> 200), reprezintă clasa de metaboliți secundari care este prezentă în mod natural în mai multe specii de plante, în principal în specii de plante din familia Solanaceae (genul *Datura*) și sunt adesea utilizați în medicină ca diferite remedii (Georgiev și colab., 2013). Unul dintre principalii alcaloizi tropanici întâlniți în speciile de plante *Datura* este scopolamina, denumită și hioscină (Mardare (Balusescu) și colab., 2020).

Scopolamina (esterul 9-metil-3-oxa-9-azatriciclo non-7-il al acidului α -(hidroximetil) benzen acetic, este un alcaloid tropanic nepolar de belladonna și formula sa structurală este o amină terțiară L-(2)-scopolamină. Aceasta se găsește pe scară largă în plantele din familia Solanaceae. Structura de bază a alcaloizilor tropanici este prezentată în figura 3.1.a în timp ce în figura 3.1.b este prezentată structura chimică a scopolaminei.

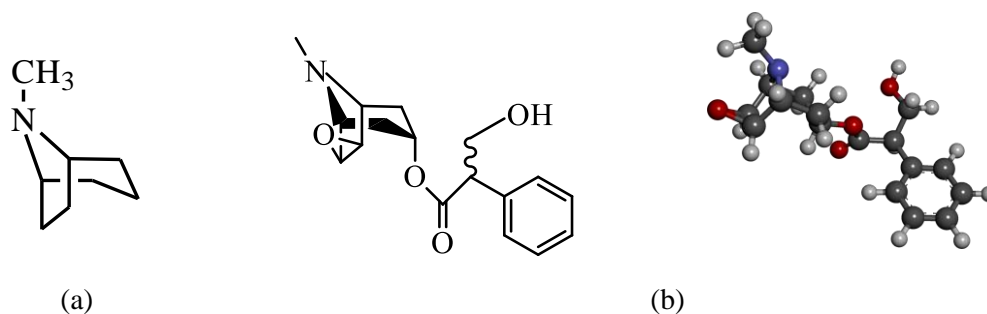


Figura 3.1. Structurile chimice de bază: a – alcaloizi tropanici, b – scopolamină.

Acest alcaloid este utilizat în principal în industria farmaceutică în tratamentul astmului, sialoreei, erupțiilor cutanate, răcelilor, tulburărilor nervoase, bolii neuro-sedative Parkinson și răului de mișcare. Acest alcaloid tropanic este un agent antimuscarinic, antispasmodic, anticolinergic, antispastic, antiastmatic, antimicrobian și utilizat ca analgezic, narcotic, sedativ, precum și pentru tratamentul în urma procedurilor chirurgicale. Datorită cererii foarte mari pe piața farmaceutică este nevoie de invenții, de noi decoperiri în ceea ce privește metode de extracție și investigare cantitativă și calitativă pentru obținerea scopolaminei. Conform statisticilor preliminare, cererea pentru scopolamină este de 10 ori mai mare decât pentru atropină (Pengpeng și colab., 2018; Li și colab., 2018; Mardare – Balusescu și colab., 2022 a). În prezent, scopolamina este în general extrasă din plante care fac parte din familia Solanaceae (Ping și colab., 2017; Chuanxiang și colab., 2018). Se cunoaște faptul că scopolamina este un alcaloid cu proprietăți toxice, care, prin ingerarea unei concentrații mari poate duce la deces.

În natură, scopolamina se găsește în biomasa vegetală a speciile de plante *Datura* (*Datura metel* și *Datura innoxia*) care aparțin familiei Solanaceae. Speciile *Datura*, plante indigene din America și Asia, fac parte din familia de plante *Solanaceae* și sunt răspândite în Europa mai ales ca plante medicinale și ornamentale.

Fiind un compus important pentru medicină, este foarte important să se descopere tehnologii în care se utilizează un volum mic de solvent, grad de recuperare și puritate ridicat, adecvate pentru materii prime cu un conținut redus, și nu în ultimul rând capacitate mare de manipulare a probelor.

Planta inclusă în prezenta teză, din punct de vedere al descrierii taxonomice, a fost caracterizată ca făcând parte din ordinul Solanales, familia Solanaceae, genul *Datura*, specia *D. Innoxia* (figura 3.3). Este cunoscută în România sub denumirea improprie de „trompeta îngerilor” și este răspândită în întreaga lume în zone cu climă caldă (figura 3.4) (Mardare - Balusescu și colab., 2022 a, b).



Figura 3.3. *Datura innoxia* fotografiată în România (28.12.2018)

într-o grădină privată cultivată în scop ornamental.



Figura 3.4. Distribuția plantei *Datura innoxia* pe harta mondială (CAB International, 2022).

Datura innoxia, în aria de răspândire nativă (America Centrală), crește în pădurile și tufișurile uscate deschise, iar în aria de distribuție secundară (America de Nord și de Sud, Europa,

Africa, Asia de Sud, Australia) crește în grădini private ca plante ornamentale, pe terenurile cultivate, pe marginile drumurilor, în zonele publice, pe terenurile cu deșeuri, frecvent în apropierea apei sau în zone cu drenaj împiedicat, în locurile ruderaie (Tamiru, 2017; Sennikov și Lazkov, 2022) dar cele mai vulnerabile zone prevăzute la invazia plantelor sunt drumurile asfaltate, căile ferate, marginile barajelor, albiile râurilor și terenurile agricole (Ali și colab., 2022; Henderson, 2022).

Datura innoxia a fost clasificată de diverși lucrători drept cea mai nocivă specie invazivă de plante (Srivastava, și colab., 2014), concurează agresiv cu plantele și culturile native, formând arborete monospecifice dense, provoacă întârziere în creșterea răsadurilor plantelor native și este toxică pentru oameni (proprietăți halucinogene) și animale (Ayuba și colab., 2011; Chan, 2017; Witt și colab., 2018; Chavre și Patil, 2023). Întreaga plantă este toxică, iar consumul oricărei părți a plantei *Datura* poate duce la un efect anticolinergic sever care poate provoca toxicitate (Sharm și colab., 2021). Din literatura de specialitate, este bine cunoscut faptul că această plantă conține anumiți alcaloizi tropanici, activi biologic, cum ar fi scopolamina și hiosciamina, care sunt cei mai cunoscuți alcaloizi (Nandakumar și colab., 2017; Cinelli și Jones, 2021).

Cu toate acestea, această specie ar putea fi benefică pentru economia regiunii și ar avea ramificații pentru piețele plantelor medicinale, deoarece se poate adapta la diferiți gradienti de mediu (Ali și colab., 2022). Specia aceasta este recunoscută pentru importanța sa ca sursă de medicamente în medicină și pentru proprietățile farmacologice (Ayuba și colab., 2011; Chan, 2017).

Un aspect important în ceea ce privește izolarea compușilor bioactivi din bioamasa vegetală îl reprezintă alegerea tehnicii de extracție și optimizarea parametrilor de lucru (Christen și colab., 2013). Pentru a obține o eficiență maximă la extracție, au fost evaluați mai mulți parametri începând cu protocoalele de extracție aplicate biomasei provenită de la planta *Datura innoxia* (frunze, flori, semințe, tulpină și rădăcină), precum:

1. **selectarea tehnicilor de extracție: convenționale - Extracția Soxhlet, neconvenționale – Extracția asistată de ultrasunete,**
2. **polaritatea solvenților,**
3. **caracterizarea compusului bioactiv,**
4. **condițiile tehnicilor de analiză (UV-VIS, fluorescență, FTIR și GC-FID).**
5. în final se apreciază faptul că, rezultatele obținute vor contribui la o mai bună înțelegere și cunoaștere a metodelor de caracterizare a metabolitului principal extras în sistem solid – lichid, prin tehnici diferite, folosind biomasă vegetală formată din toate organele vegetative ale speciei *Datura innoxia* din România.

Capitolul 4

PROTOCOLUL EXPERIMENTAL

În cadrul protocolului experimental vor fi prezentate aspecte legate de colectarea, prelucrarea și caracterizarea biomasei vegetale de *Datura innoxia* și se vor pune în evidență toate aspectele în ceea ce privește condițiile de operare care vor conduce la un grad mărit de încredere privind rezultatele obținute și prezentate.

4.2. Metoda de lucru pentru obținerea extractelor

4.2.1. Extracția convențională Soxhlet

Realizarea extracției Soxhlet presupune parcurgerea următoarelor etapelor de lucru (Standard-Specific Interst Group Tappi, 2007; Ciolacu și colab., 2010; Mardare – Balusescu și colab., 2020): biomasa vegetală uscată sub formă de pulbere provenită din planta *Datura innoxia* a fost supusă procesului de extracție solid – solid cu etanol și 1-butanol utilizând o instalație experimentală (extractor Soxhlet). Extractul a fost supus evaporării utilizând un rotaevaporator pentru etanol și o baie de nisip termostată pentru 1-butanol, obținându-se o masă vâscoasă semi solidă. Ulterior, extractele semi solide au fost transferate în flacoane cotate și aduse până la semn cu solventul de extracție. Flacoanele cotate au fost depozitate la o temperatură de 3 °C. Ulterior fiecare extract a fost utilizat pentru caracterizarea spectrofotometrică UV-VIS, spectroscopia de fluorescență, FTIR și GC-FID.

4.2.2. Extracția neconvențională UAE

Realizarea extracției UAE presupune parcurgerea următoarelor etape de lucru: biomasa vegetală uscată sub formă de pulbere (frunze, flori, semințe, tulpină și rădăcină) provenită din planta *Datura innoxia* a fost cântărită la o balanță analitică Masa de probă cântărită a fost introdusă într-un microtub cu capac peste care s-a adăugat solvent (etanol și 1-butanol). După ce solventul a fost adăugat, probele (frunze, flori, semințe, tulpină, rădăcină) au fost lăsate la macerat. După procesul de macerare probele au fost supuse procesului de extracție asistată de ultrasunete folosind o instalație experimentală (baie de ultrasunete). După extracție probele au fost centrifugate, urmată de etapa de transfer a supernatantului, extract introdus într-un microtub cu capac după ce a fost în prealabil filtrat. Atât extractele generate cât și reziduurile obținute în urma prelucrării materialului vegetal au fost păstrate la frigider până la finalizarea analizelor tuturor probelor.

4.3. Aparatură și echipamente pentru caracterizarea extractelor

4.3.1. Cromatograf de gaze cu detector de ionizare în flacără

Analiza alcaloidului scopolamină a extractelor din frunze, flori, semințe, tulpină și rădăcină din *Datura innoxia* a fost studiată folosind tehnica cromatografiei de gaze (GC-FID). Analizele au fost efectuate prin injecție manuală utilizând sistemul cromatograf de gaze GC model 5890 SERIES II.

Pentru analiza probelor condițiile optimizate de lucru ale echipamentului au fost: 1) azot ca fază mobilă provenit de la generatorul de hidrogen (HG 2200) + generator azot – aer (ANG 2381) model CLAIND; 2) coloană capilară de tip SPB-1 Supelco (30 m lungime, 0,32 mm diametru intern și 0,25 μm grosimea filmului de lichid din interiorul coloanei) ca fază staționară; 3) 280 °C temperatura de operare a injectorului și 250 °C temperatura de operare a detectorului ; 4) 10 μL volumul injectat în condiții de splitless de 1:100; 5) gradient de temperatură având ca etape: 100 °C timp de 1 min, rampă cu 15 °C / min până la 180 °C (constant 5 min), urmat de rampă cu 5 °C / min până la 300 °C (constant 20 min).

4.3.2. Spectrofotometru UV-VIS

Toate spectrele de absorbție au fost înregistrate utilizând un spectrofotometru UV-VIS model V-550 (JASCO, Japonia). Absorbanta și lungimea de undă a picurilor înregistrate pentru extractele etanolice și 1-butanolice obținute din organele vegetative ale plantei *Datura innoxia* au fost determinate printr-o scanare a lungimii de undă între 190 și 900 nm la temperatura camerei. Au fost efectuate patru determinări pentru fiecare probă.

4.3.3. Spectrometru FTIR

Analiza spectroscopică FTIR-ATR a fost utilizată pentru a determina grupele funcționale prezente în biomasă vegetală uscată în stare lichidă din planta *Datura innoxia*. Spectrele au fost colectate folosind un spectrometru DIGILAB-FTS 2000 cu un accesoriu de prelevare ATR cu placă orizontală care permite aplicarea directă a probelor lichide. Pentru eșantionarea lichidului pe partea superioară a plăcii s-a folosit o placă cu cristal de selenură de zinc (ZnSe) la 45 °. Datele au fost colectate în modulul de absorbantă, iar lungimea de undă a variat între 4000 și 400 cm^{-1} . A fost utilizată o rezoluție spectrală de 4 cm^{-1} . Pe baza valorii picurilor din regiunea IR și în comparație cu cea raportată anterior, detectarea a fost efectuată.

4.3.4. Spectrofotometru de fluorescență

Spectrele de fluorescență pentru extractele de biomasă uscată din planta *Datura innoxia* au fost înregistrate cu ajutorul spectrofotometrului de fluorescență PERKIN-ELMER LS 50B și determinate în modul de prescanare. Pentru măsurarea spectrului de excitație, lungimea de undă a fost fixată la 280 nm, iar lungimea de undă pentru emisie a fost de la 200 (fante fixate la 5 nm) la 700 nm (fante fixate la 10 nm). Numărul de acumulări a spectrelor a fost 3 și viteza de scanare, 500 (nm/mm). Pentru determinarea cantitativă a scopolaminei a fost preparată o soluție stoc de hioscină (800 mg/L) în etanol. Spectrele de fluorescență ale soluției standard intermediare de hioscină au fost înregistrate în aceleași condiții.

4.4. Substanțe și reactivi

Substanța pură de hioscină (scopolamină) ($\geq 99\%$) a fost achiziționată de la Sigma Aldrich, iar etanol (HPLC analytical grade), solventul utilizat pentru calibrare a fost achiziționat de la Sigma Aldrich (Darmstadt, Germania). Solvenții etanol (96 %) și 1-butanol (99,6 %), utilizați pentru a ajuta procesul de extracție Soxhlet și de ultrasonare, au fost achiziționați de la Chemical Company, România. Selectarea solventului a fost efectuată în funcție de proprietățile lor (polaritate, punct de

fierbere, constantă dielectrică și densitate). În tabelul 4.1 sunt prezentate proprietățile fizice ale acestor solvenți (Reichardt, 2003).

Tabelul 4.1. Solvenți organici și constantele fizice ale acestora (Reichardt, 2003)

Solvent	Formula chimică	Punct de fierbere, t_{bp} (° C)	Constanta dielectrică, ϵ_r	Densitate (g/cm ³)
1-Butanol (99.6 %)	C ₄ H ₈ OH	117,7	17,51	0,81
Etanol (96 %)	C ₂ H ₅ OH	78,3	24,55	0,81

4.5. Prelucrarea statistică a datelor experimentale

Parametrii deviației standard (SD) au fost calculați folosind formula (Ali și Bhaskar, 2016):

$$\sigma = \sqrt{\sum \frac{(x_i - x)^2}{N}} \quad (4.6)$$

în care: x_i – valoarea fiecărui punct de date, x – media punctelor, N - numărul de puncte de date.

Capitolul 5

STANDARDIZAREA METODELOR DE ANALIZĂ ÎN VEDEREA CARACTERIZĂRII EXTRACTELOR DIN *DATURA INNOXIA*

În urma unei analize calitative realizate prin anumite tehnici de analiză (cromatografice, spectroscopice) pot fi obținute informații referitoare la identificarea constituenților fitochimici prin generarea unor amprente care pot evidenția un număr mare de compuși fitochimici din extracte de biomasă vegetală obținute din diferite metode de extracție care pot fi atât convenționale cât și neconvenționale (Liang și colab., 2009; Mardare – Balusescu și colab., 2022 a, b).

În funcție de tehnica de analiză și aparatura utilizată, detectorul emite un semnal care este amplificat și înregistrat sub forma unei cromatograme sau spectru care se interpretează din punct de vedere calitativ prin identificarea componentelor și cantitativ prin determinarea lor (Sanz, 2009; Houck și Siegel, 2010). Rezultatele evaluării liniarității metodei pentru nivelurile de concentrație sunt prezentate în tabelul 5.3. Valoarea coeficientului de corelație apropiată de unitate este acceptabilă pentru a demonstra regresia liniară.

Tabelul 5.3. Rezumatul parametrilor curbelor de calibrare pentru hioscină în funcție de metoda de caracterizare

Standard Hioscină	UV-VIS	Spectroscopie de fluorescență	GC-FID
Regresia liniară	$y = 0,031x + 0,047$	$y = 14,136x + 29,863$	$y = 0,015x - 0,343$
N	7	4	5
Coeficient de corelație liniară (r^2)	0,993	0,919	0,999
Abaterea deviației standard a pantei (σ)	0,004	6,904	0,931

* $y = ax + b$, unde x este concentrația compusului, y = absorbanta (UV-VIS), intensitatea (spectroscopie de fluorescență și aria picului (GC-FID)

Capitolul 6

CARACTERIZAREA EXTRACTELOR ȘI ANALIZA SCOPOLAMINEI OBTINUTE DIN *DATURA INNOXIA* PRIN TEHNICA SOXHLET

6.2. Analiza extractelor obținute

6.2.1. Analiza UV-VIS

Analiza UV-VIS are drept scop influența solvenților chimici asupra capacității de separare a alcaloizilor tropanici folosind ca metodă convențională de extracție extracția Soxhlet pentru a investiga conținutul de scopolamină (compusul de interes) din biomasa uscată *Datura innoxia* din România în stadiul de maturitate. Scopolamina care a fost identificată pe baza întregului profil de amprentă spectrofotometrică a biomasei uscate de *Datura innoxia*.

Pentru extractele din frunze și flori ale plantei *Datura innoxia* a fost reprezentat întregul profil al spectrelor de absorbție UV-VIS după deconvoluție în extractele de etanol și 1-butanol (figurile 6.2 și 6.3). Din aceste spectre UV-VIS ale extractelor mai sus menționate, pe lângă alcaloidul scopolamină se mai pot observa și alți fitocompuși, precum compușii fenolici și polifenoli (flavonoide, taninuri) (tabelul 6.1).

Tabelul 6.1. Valorile picurilor obținute prin analiza UV–VIS pentru extractele de etanol și 1-butanol din biomasa uscată de *Datura innoxia* (folosind tehnica Soxhlet)

<i>Datura innoxia</i>	Frunze				Flori				
	Etanol		1-Butanol		Etanol		1-Butanol		
	Nr.	λ	Abs	λ	Abs	λ	Abs	λ	Abs
	1*	205	0,222	214	0,560	205	0,363	214	0,661
	2	219	0,075	286	0,039	224	0,144	283	0,094
	3	285	0,009	322	0,031	287	0,037	317	0,086
	4	411	0,007	486	0,107	329	0,026	418	0,004
	5	667	0,005	508	0,005			668	0,004
	6			539	0,005				
	7			610	0,005				
	8			667	0,065				

* Valorile picurilor pentru scopolamină (λ , nm).

- banda de absorbție între 203 și 216 nm, atribuită prezenței scopolaminei (biomasă de frunze și flori);
- banda de absorbție între 219 nm și 224 nm, atribuită compușilor fenolici (biomasă de frunze și flori);
- banda de absorbție între 278 și 289 nm, atribuită prezenței taninurilor (biomasă de frunze și flori);
- banda de absorbție în intervalul 315–400 nm, atribuită prezenței flavonoidelor (biomasă de frunze și flori);
- banda de absorbție în intervalul 400-539 nm, atribuită prezenței carotenoidelor și feofitinei (biomasă de frunze și flori);
- banda de absorbție între 665 și 668 nm, atribuită prezenței clorofilei (biomasă de frunze și flori).

Mai mult decât atât, în figurile 6.2 și 6.3 este reprezentată compoziția procentuală (%) raportată la aria totală a picurilor din spectru. Rezultatele, din punct de vedere calitativ au relevat prezența a patru clase de metaboliți secundari: alcalozi (scopolamină), terpeni (saponine), compuși fenolici (taninuri și flavonoide), pigmenți (carotenoide și clorofilă).

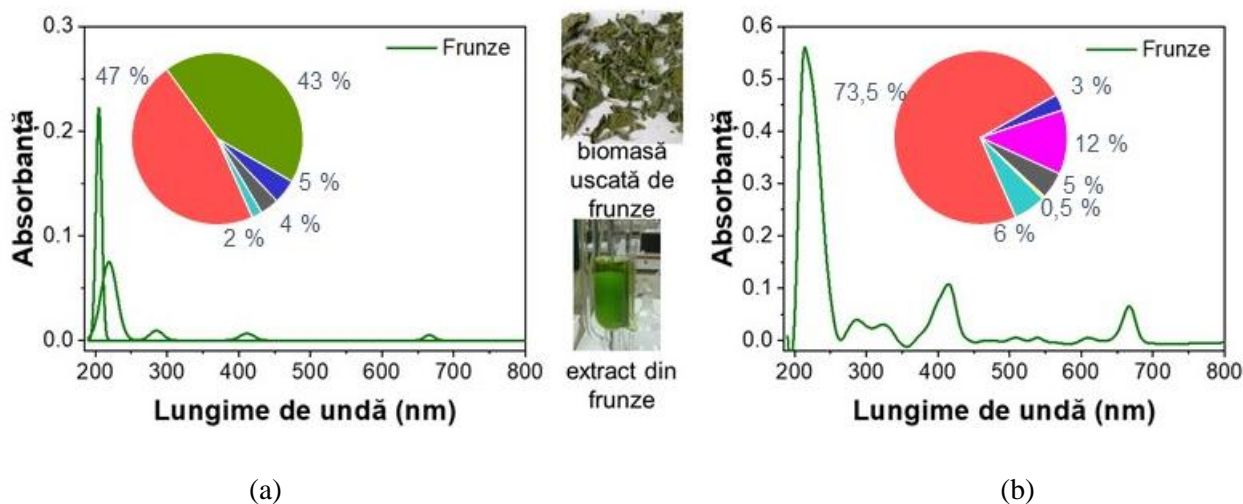


Figura 6.2. Spectrele de absorbție UV-VIS după deconvoluție din matricea extractelor și compoziția procentuală (%) în etanol (a) și 1-butanol (b) din **FRUNZE** de *Datura innoxia*.

■ Scopolamină (%) ■ Compuși fenolici (%) ■ Taninuri (%) ■ Flavonoide (%)
 ■ Carotenoide (%) ■ Saponine (%) ■ Clorofila (%)

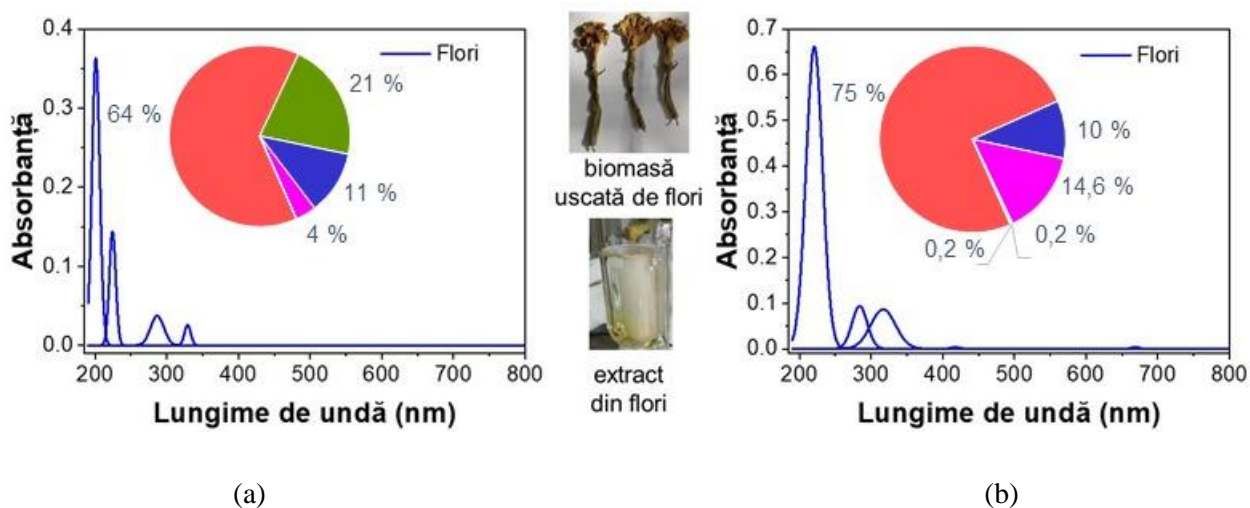


Figura 6.3. Spectrele de absorbție UV-VIS după deconvoluție din matricea extractelor și compoziția procentuală (%) în etanol (a) și 1-butanol (b) din **FLORI** de *Datura innoxia*.

■ Scopolamină (%) ■ Compuși fenolici (%) ■ Taninuri (%) ■ Flavonoide (%) ■ Carotenoide (%) ■ Clorofila (%)

Scopolamina a fost identificată în toate organele vegetative ale plantei din *Datura innoxia*. În figura 6.7 este reprezentată concentrația de scopolamină exprimată în mg/kg DW, în matricile extractelor din biomasa vegetală de *Datura innoxia* în cei doi solvenți organici (absorbanțele sunt

însoțite de $2 \times$ deviația standard a măsurătorilor ($n = 4$) și interval de încredere de 95 %).

În ceea ce privește distribuția cantității de scopolamină în diferite părți ale plantei *Datura innoxia* cu cel mai mare conținut de scopolamină în frunze, flori și semințe atât în etanol cât și în 1-butanol, putem afirma faptul că rezultatele prezentate în figura 6.7 sunt în acord cu cele raportate de Alexander și colab., (2008) care raportează pentru conținutul de scopolamină în frunze ($120 - 770 \mu\text{g g}^{-1}$ masă uscată) și semințe ($29 - 710 \mu\text{g g}^{-1}$ masă uscată).

Ținând cont de aceste informații, analiza calitativă (compuși fitochimici) și analiza cantitativă (scopolamină) prin utilizarea tehnicii UV-VIS este importantă pentru importanța cunoașterii compoziției chimice a plantei *Datura innoxia* din România.

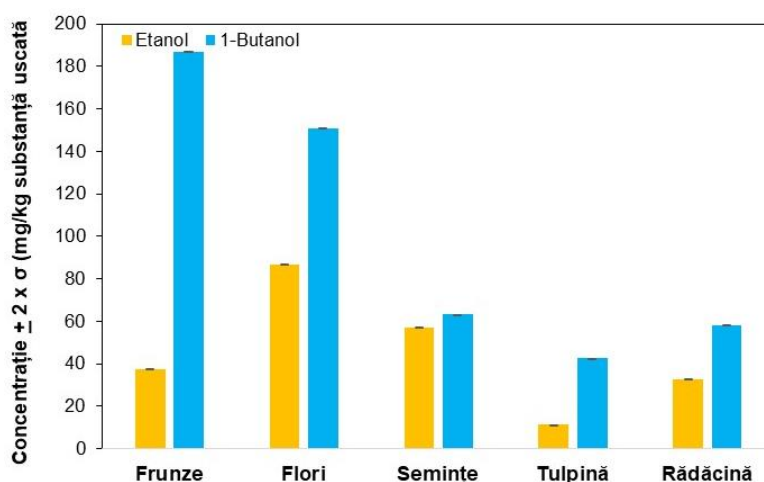


Figura 6.7. Concentrația de scopolamină exprimată în mg/kg masă uscată obținută în extractele de etanol și 1-butanol din biomasa vegetală de *Datura innoxia* folosind extracția Soxhlet și metoda de caracterizare UV-VIS (Mardare (Balusescu) și colab., 2022 b).

6.2.2. Analiza spectroscopică de fluorescență

Rezultatele experimentale ce vor fi prezentate arată capacitatea de a analiza alcaloizii tropanici printr-o metodă rapidă și ușoară bazată pe spectroscopie de fluorescență. Au fost efectuate înregistrări ale spectrelor de fluorescență pentru frunze, flori, semințe, tulpină și rădăcină din biomasa uscată de *Datura innoxia* în etanol și 1-butanol la lungimea de undă de excitație $\lambda_{em} = 280$ nm. După deconvoluție și identificarea benzilor care formează spectrele, s-a făcut o normalizare a intensităților în raport cu banda de scopolamină cu $\lambda_{em} = 345$ nm luat ca standard de referință.

Figura 6.8 și figura 6.9 prezintă spectrele de emisie fluorescentă ale scopolaminei în extractele de etanol și, respectiv, extractele de 1-butanol, din biomasa de *Datura innoxia* (frunze, flori, semințe, tulpină și rădăcină) și soluția standard primar pentru hioscină. În ambele cazuri, picurile sunt observate aproape de $\lambda_{em} = 345$ nm. Este evident că spectrele de fluorescență arată o dependență puternică de natura solventului. În comparație cu etanol, intensitatea fluorescenței este îmbunătățită semnificativ în 1-butanol (Begum și colab., 2009).

Pentru deconvoluția spectrelor, se vor selecta, de exemplu, extractele din matricea de semințe (etanol și 1-butanol) pentru a identifica cele mai bune picuri gaussiene pentru potrivirea datelor experimentale. Figura 6.10 și figura 6.11 valorile medii ale spectrelor de emisie din etanol

(figura 6.10) și 1-butanol (figura 6.11) folosind excitația suprafeței exterioare la 280 nm cu potrivire folosind metoda de eliminare Gaussiană.

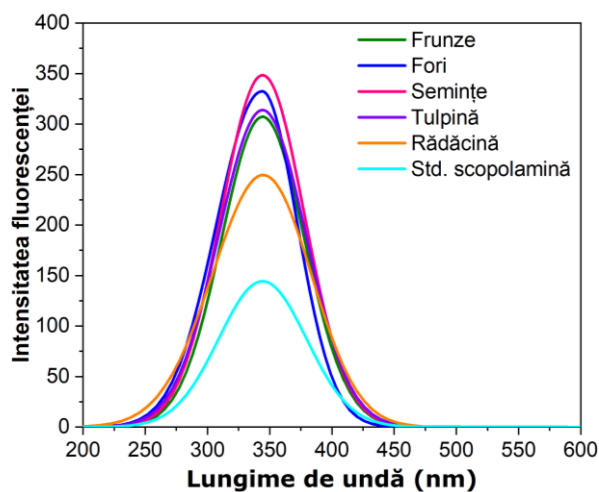


Figura 6.8. Spectrele de fluorescență specifice scopolaminei din biomasa de *Datura innoxia* în etanol (extracția Soxhlet).

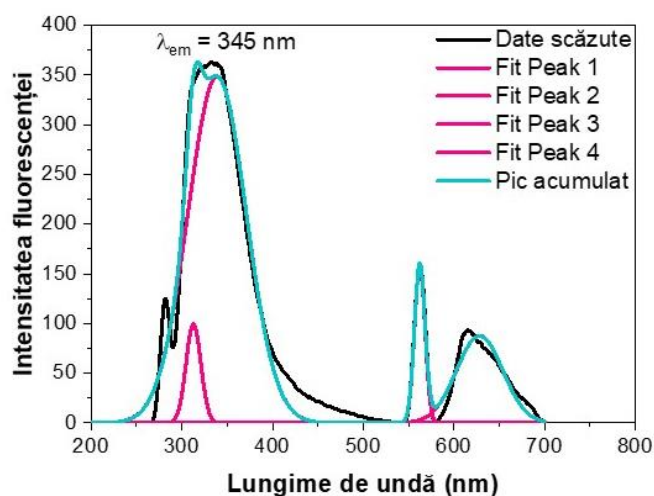


Figura 6.10. Deconvoluția spectrelor de fluorescență din matricile extractelor în etanol din semințe de *Datura innoxia* (extracția Soxhlet).

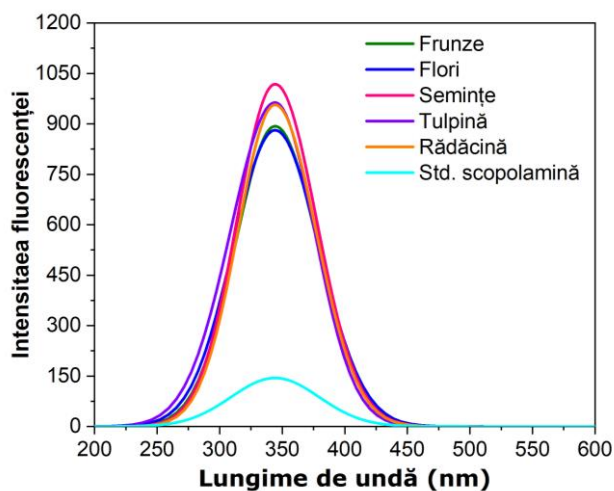


Figura 6.9. Spectrele de fluorescență specifice scopolaminei din biomasa de *Datura innoxia* în 1-butanol (extracția Soxhlet).

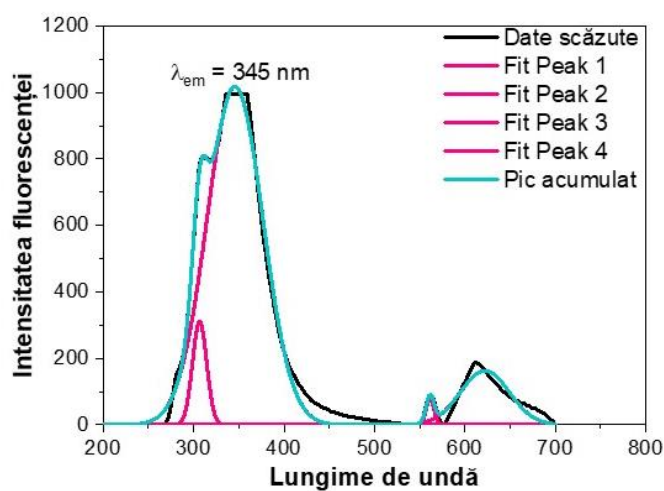


Figura 6.11. Deconvoluția spectrelor de fluorescență din matricile extractelor în 1-butanol din semințe de *Datura innoxia* (extracția Soxhlet).

În figura 6.12 și figura 6.13 sunt prezentate spectrele de fluorescență după deconvoluție din extractele de flori și semințe dar și compoziția procentuală (%) raportată la aria totală a picurilor din spectru în etanol (figura 6.12) și 1-butanol (figura 6.13) din biomasa provenită din planta *Datura innoxia*: flori, semințe. Se poate observa o foarte bună corelație în aproape toate câmpurile spectrale. Scopolamina a fost indentificată în toate maticile extractelor, atât în etanol (figura 6.12) cât și în 1-butanol (figura 6.13) la $\lambda_{em} = 345$ nm. Apariția picului la $\lambda_{em} = 308$ nm este atribuit derivaților de tocoli (precum tocoferoli și tocotrienoli), compuși obținuți prin oxidarea acizilor grași

și carotenoidelor (Ali și colab., 2018; Tarhan, 2020) apărut în extractele de flori și semințe în etanol (figura 6.12) și în toate matricile extractelor de 1-butanol (figura 6.13).

Deasemenea, se mai poate observa apariția picului la $\lambda_{em} = 620$ nm care poate fi atribuit compusului feofitin și derivaților de clorofilă (Arslan și colab., 2019). Acest pic apare în toate extractele din organele vegetative ale plantei (etanol și 1-butanol) (figura 6.12 și figura 6.13). Această corelație poate să apară ca urmare a modificării concentrațiilor compușilor bioactivi din matricea probei care prezintă fluorescență și care sunt menționați mai sus (Tarhan, 2020).

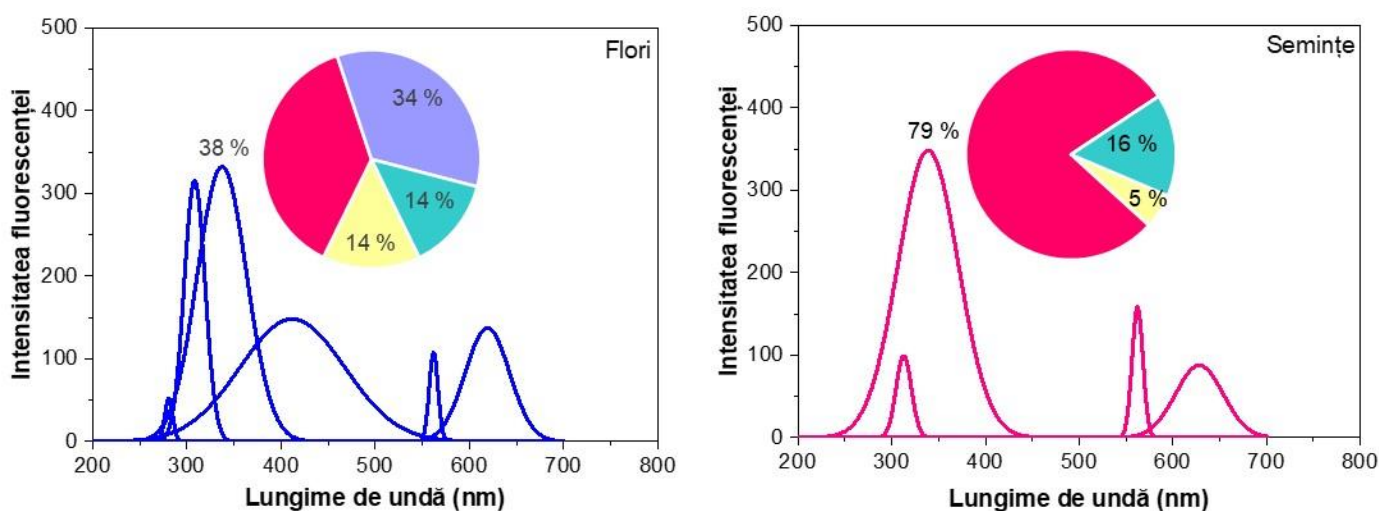


Figura 6.12. Spectrele de fluorescență după deconvoluție din matricile extractelor în etanol din biomasă provenită din planta *Datura innoxia* (extracție Soxhlet).

■ Derivați de tocoli ■ Scopolamină ■ Neidentificat ■ Derivați de clorofilă
 $\lambda_{em} = 308$ nm $\lambda_{em} = 345$ nm $\lambda_{em} = 414$ nm $\lambda_{em} = 620$ nm

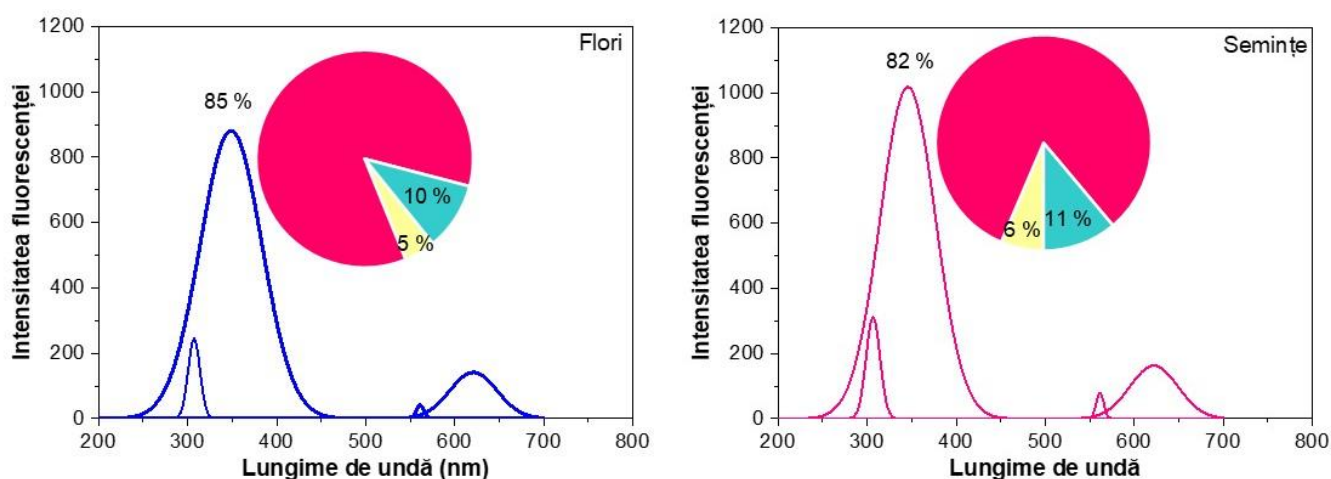


Figura 6.13. Spectrele de fluorescență după deconvoluție din matricile extractelor în 1-butanol din biomasă provenită din planta *Datura innoxia* (extracție Soxhlet).

■ Derivați de tocoli ■ Scopolamină ■ Derivați de clorofilă
 $\lambda_{em} = 308$ nm $\lambda_{em} = 345$ nm $\lambda_{em} = 620$ nm

În figura 6.14 este prezentată concentrația de scopolamină din extractele de biomasa vegetală din *Datura innoxia* (etanol, 1-butanol) folosind metoda convențională, tehnica de extracție Soxhlet. Se poate observa că cel mai mare conținut de scopolamină a fost găsit în frunze ($434,9 \pm 11,9$ mg/kg greutate uscată) extrase în 1-butanol. Eroare este dată ca $\pm 2 \times$ deviația standard pentru 4 replicare, interval de încredere de 95 %.

Luând în considerare cele prezentate anterior, o metodă de analiză sensibilă, rapidă și ușoară, precum detecția prin fluorescență a fost prezentată pentru determinarea cantității de scopolamină în extractele de etanol și 1-butanol din biomasa uscată de *Datura innoxia*. Comparativ cu metodele raportate, detecția și analiza cantitativă dezvoltate în raport cu compusul a fost mai mică. Acest lucru confirmă o sensibilitate mai bună a metodei, ceea ce o poate face să fie aplicabilă pentru analize chimice de rutină (Yisak și colab., 2018).

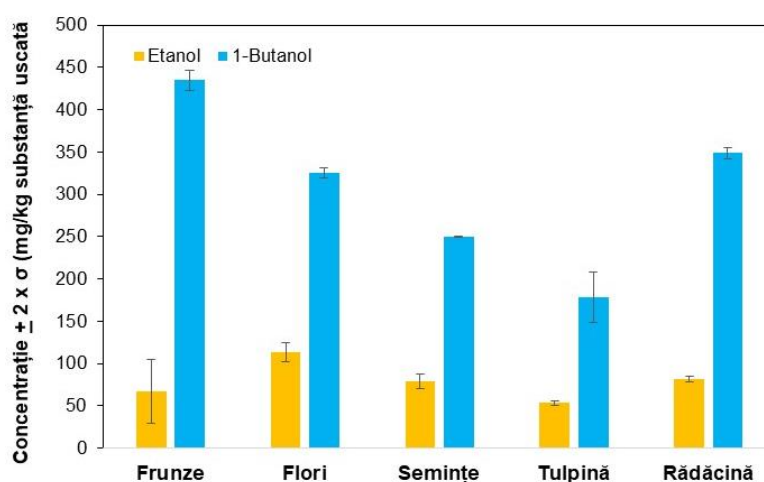


Figura 6.14. Concentrația de scopolamină exprimată în mg/kg masă uscată obținută în extractele de etanol și 1-butanol din biomasa vegetală de *Datura innoxia* folosind extracția Soxhlet și metoda de caracterizare prin spectroscopie de fluorescență.

6.2.3. Analiză FTIR

Pentru a arăta prezența diferitelor grupe funcționale și a compușilor chimici, precum metabolii primari și secundari, au fost înregistrate spectrele IR ale extractelor etanolice și 1-butanolice din biomasa vegetală de *Datura innoxia*. Rezultatele grupelor funcționale și compoziția chimică detectată prin FTIR sunt prezentate în tabelul 6.2, iar spectrele sunt ilustrate în figurile 6.17 și 6.19. Din spectrele FTIR s-au observat variații ale picurilor în toate extractele. Identificarea grupurilor funcționale s-a bazat pe picurile atribuite mișcărilor vibrațiilor de întindere și îndoire.

În extractele din etanol și 1-butanol de biomasa uscată de *Datura innoxia* (semințe și rădăcină), picurile caracteristice zonei de amprentă IR sunt în mare parte în intervalul $1800 - 600$ cm^{-1} (figurile 6.17 și 6.19).

Spectrele au fost analizate și pot fi extrase caracteristici structurale, cum ar fi picul la 1707 cm^{-1} corespunzător grupului de acizi grași, cum ar fi acidul oleic (Kowalski și colab., 2018). Intensitatea picurilor la 1659 cm^{-1} corespunde benzii I a grupării amidice (gruparea carbonil) și benzii II grupării amidice (întinderea νCN + curbarea δNH) identificate în glicoproteine, care nu

corespunde extractului din rădăcină. (Zavoi și colab., 2011; Topală și colab., 2017).

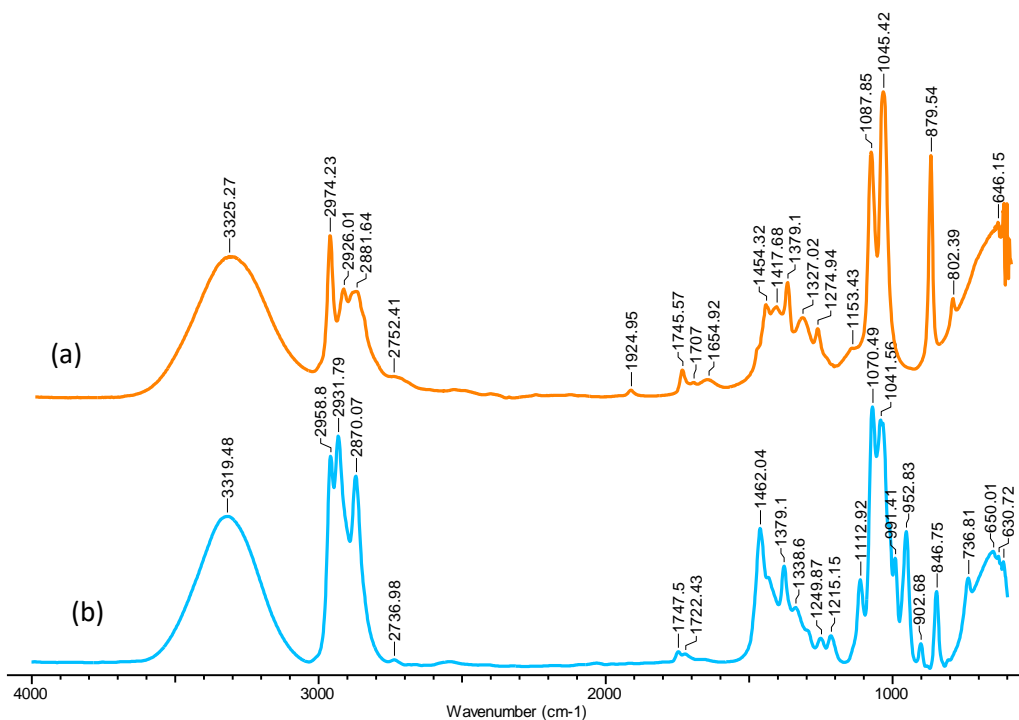


Figura 6.17. Spectrul FTIR al extractelor rezultate din **SEMINȚE** de *Datura innoxia* în funcție de solventul utilizat: (a) etanol și (b) 1-butanol.

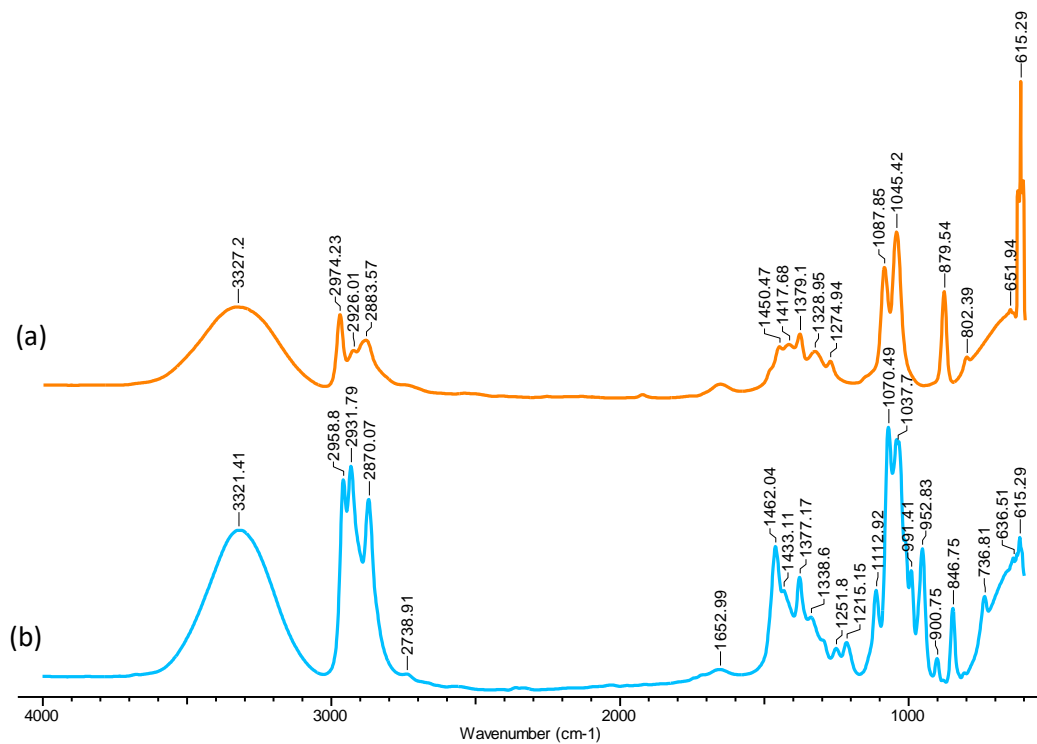


Figura 6.19. Spectrul FTIR al extractelor rezultate din **RĂDĂCINĂ** de *Datura innoxia* în funcție de solventul utilizat: (a) etanol și (b) 1-butanol.

Tabelul 6.2. Grupele funcționale și compușii chimici caracterizați prin FTIR pentru extractele de etanol și 1-butanol din biomasa vegetală de *Datura innoxia*.

Grupe funcționale	Interval lungimi de undă (cm ⁻¹)	Semințe		Rădăcină	
		Etanol	1-Butanol	Etanol	1-Butanol
Grupa acidului gras - acid oleic	1700-1715	X		–	–
Aldehidele unui acid gras	1656		X		
Lignina	~ 1325	X		X	
Terpene	< 1000	X	X	X	X
Alcaloizi tropanici (scopolamină)	847 și 880	X	X	X	X

Un alt pic caracteristic în regiunea 1325 cm⁻¹ este corespunzător ligninei, care se găsește doar în extractele de etanol (figurile 6.17 și 19) (Szymanska-Chargot și Zdunek, 2013). Picul la 1070 cm⁻¹ este atribuit vibrațiilor de întindere ale C–O și vibrației de deformare C–OH (Li și colab., 2013). Vibrațiile de îndoire pentru C–H (900 – 650 cm⁻¹) sunt caracteristice substituției inelului aromatic (Babiker și colab., 2017) și corespund terpenelor (Zavoi și colab., 2011) care sunt identificate în toate extractele uscate din biomasă plantei *Datura innoxia* (figurile 6.15÷6.19). Picurile cuprinse între 652 – 685 cm⁻¹ corespund benzii de absorbție pentru alchene (Li și colab., 2013). În concluzie există multă complexitate și diversitate a metabolitelor primari și secundari, așa cum se arată în figurile 6.15÷6.19. Intervalul final al lungimilor de undă (< 1000 cm⁻¹) corespunde vibrațiilor de întindere C–H de la terpene și izoprenoide. Vibrațiile de întindere pentru C–H (900 – 650 cm⁻¹) sunt specifice substituției la inelul aromatic (Zavoi și colab., 2011; Babiker și colab., 2017; Patle și colab., 2020).

Luând în considerare această complexitate și diversitate, cei mai importanți metaboliți secundari din *Datura innoxia* sunt alcaloizii tropanici Pentru scopolamină, spectrul FTIR-ATR este caracterizat prin picuri de absorbție la 880 cm⁻¹ în etanol și 847 cm⁻¹ în 1-butanol, care corespunde inelului epoxid, eter. Aceste benzi de absorbție reprezintă amprenta pentru identificarea scopolaminei în toate organele vegetative din planta *Datura innoxia* (doar pentru scopolamină figura 6.20) (Naumann și colab., 2014). Pe baza acestor informații se poate observa din figura 6.20 că scopolamina a fost identificată în toate organele vegetative ale extractelor uscate din biomasă de *Datura innoxia* (frunze, flori, semințe, tulpină și rădăcină).

6.2.4. Analiza GC-FID

În această teză, alcaloizii tropanici, în special scopolamina din biomasă vegetală provenită de la planta *Datura innoxia* din România, a fost extrasă succesiv (extracția Soxhlet) utilizând doi solvenți organici cu polaritate diferită. Scopolamina din extractele obținute a fost detrimată cantitativ prin GC-FID și a fost identificată în toate organele vegetative. Pe baza acestor informații, în figura 6.22 și figura 6.23 sunt reprezentate cromatogramele GC-FID din matricile extractelor în etanol pentru frunze și semințe în etanol (figura 6.22), respectiv flori și rădăcină în extractele de 1-butanol (figura 6.23) din biomasă provenită din planta *Datura innoxia*.

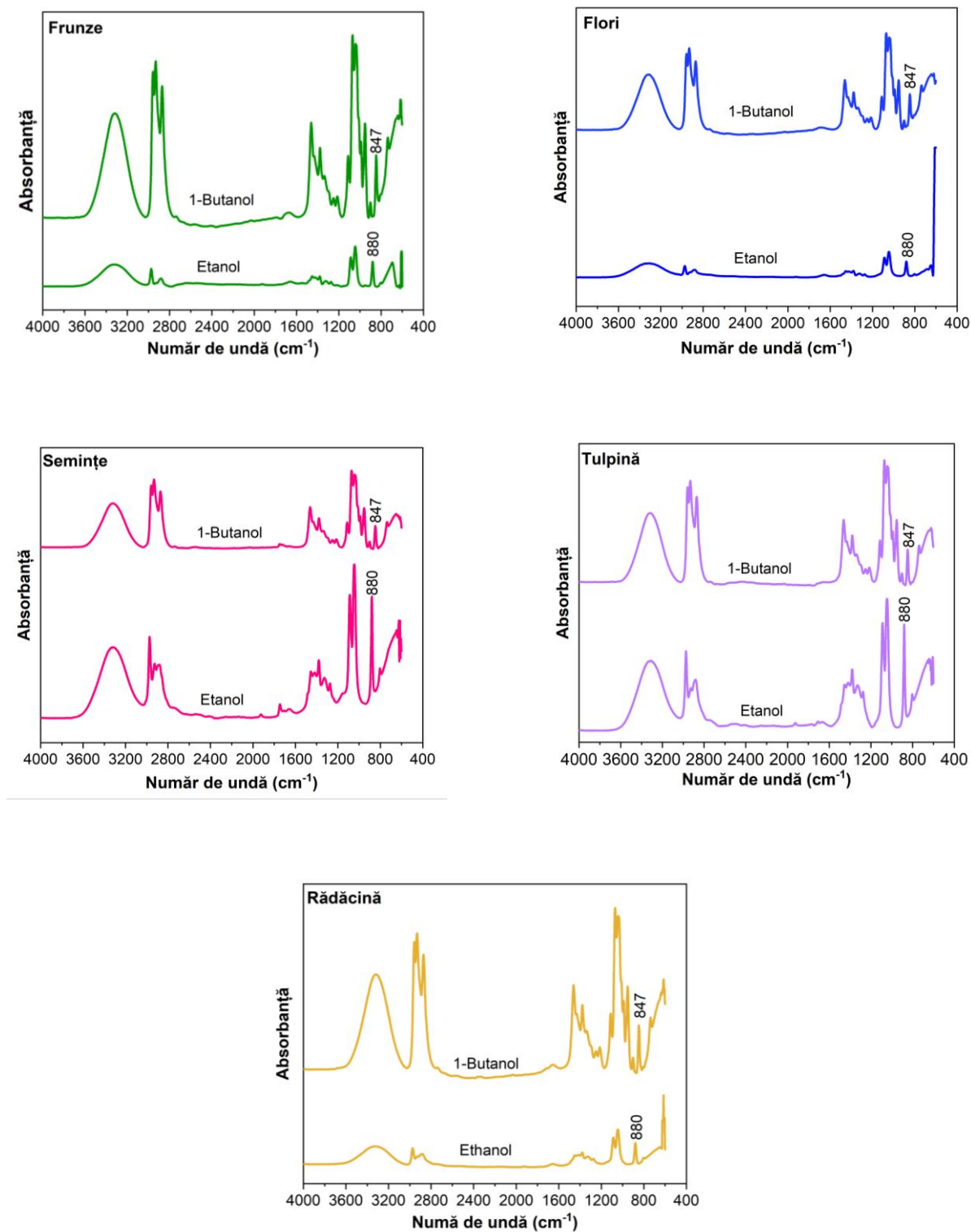


Figura 6.20, Spectrul FTIR cu amprentă unică pentru scopolamină din extractele de biomasă uscată din *Datura innoxia* în etanol și 1-butanol pentru frunze, flori, semințe, tulpină și rădăcină (extracția Soxhlet).

Din punct de vedere a investigațiilor cantitative, scopolamina a fost identificată în toate organele vegetative ale plantei *Datura innoxia*, la concentrații variind între $58,90 \pm 0,04$ și $802,58 \pm 0,52$ mg/kg pentru extractele din etanol și între $63,64 \pm 0,03$ și $1294,61 \pm 0,97$ mg/kg pentru extractele din 1-butanol. Rezultatele obținute sunt în concordanță cu gradul de lipofilitate a scopolaminei, și, deci, se obține o eficiență mare la extracție utilizând un solvent mai puțin polar, în cazul nostru 1-butanol (Mardare (Balusescu) și Malutan, 2020; Mandal și colab., 2015; Eich, 2008).

Din punct de vedere comparativ, sunt evidențe clare că eficiența la extracție pentru scopolamină în 1-butanol este superioară față de etanol.

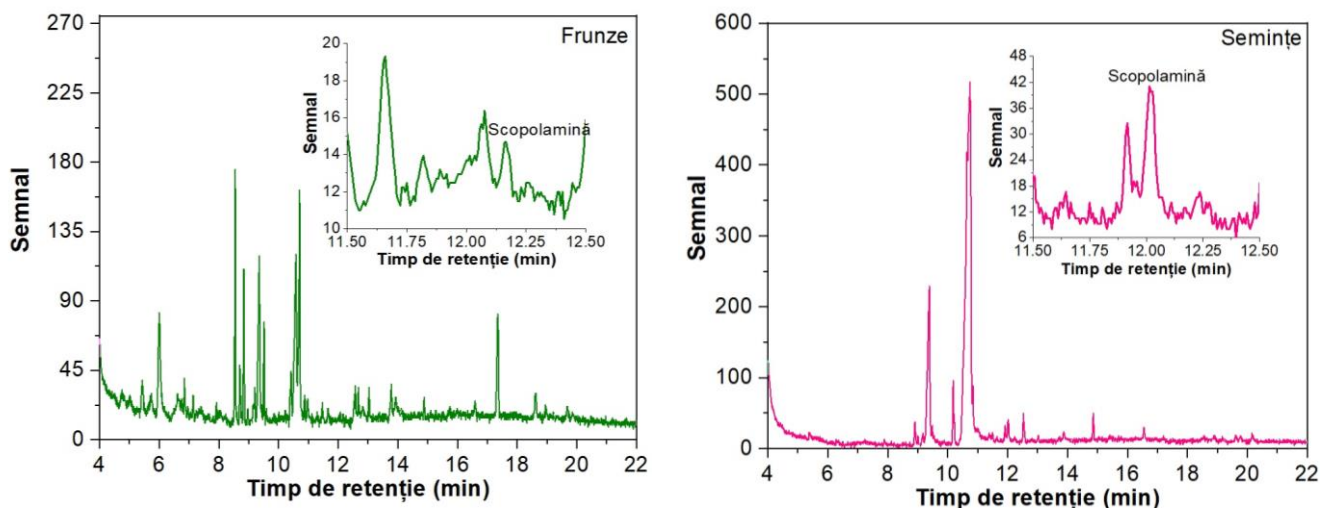


Figura 6.22. Cromatogramele GC-FID din matricile extractelor în etanol din biomasă provenită din planta *Datura innoxia*: frunze și semințe (extracție Soxhlet).

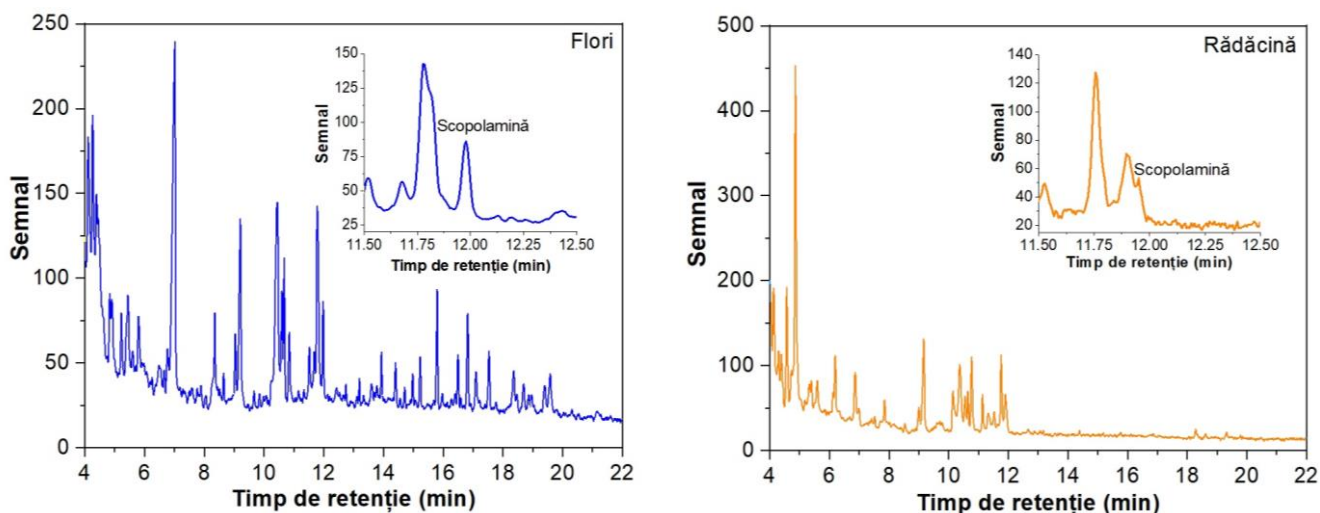


Figura 6.23. Cromatogramele GC-FID din matricile extractelor în 1-butanol din biomasă provenită din planta *Datura innoxia*: flori și rădăcină (extracție Soxhlet).

Figura 6.24 prezintă comparativ cantitatea de scopolamină determinată în extractele de biomasă vegetală provenită de la planta *Datura innoxia* (etanol, 1-butanol) utilizând tehnica de extracție convențională Soxhlet.

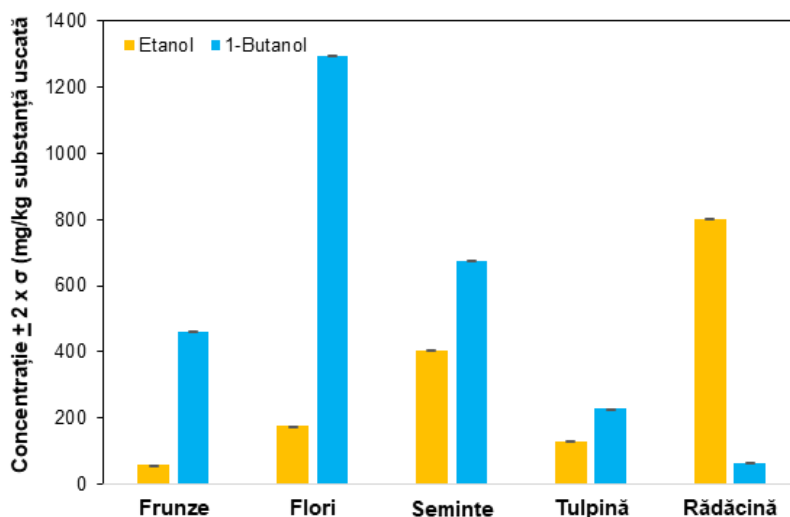


Figura 6.24. Concentrația de scopolamină exprimată în mg/kg masă uscată obținută în extractele de etanol și 1-butanol din biomasă vegetală de *Datura innoxia* folosind extracția Soxhlet și metoda de caracterizare GC-FID.

6.3. Concluzii parțiale

Luând în considerare rezultatele obținute în urma caracterizării extractelor și analiza scopolaminei obținute din *Datura innoxia* prin tehnica Soxhlet se constată următoarele aspecte:

- pe baza strategiei de cercetare propusă pentru investigarea extracției solid – lichid folosind tehnica Soxhlet și metodele de caracterizare a extractelor, în cadrul acestui capitol s-a urmărit identificarea metabolitelor din punct de vedere calitativ și cantitativ din toate organele vegetative ale plantei *Datura innoxia*, cu precădere a alcaloizilor tropanici;

- extracția Soxhlet s-a realizat utilizând doi solvenți, etanol și 1-butanol și s-a dovedit ca este o tehnică eficientă pentru separarea în sistem solid – lichid a scopolaminei cât și pentru alți metaboliți din biomasă vegetală de *Datura innoxia*;

- s-a obținut un conținut de scopolamină în toate extractele prin utilizarea celor doi solvenți, etanol și 1-butanol din biomasă uscată de *Datura innoxia* cu o eficacitate mai mare în extracție pentru 1-butanol;

- s-a determinat conținutul fitochimic prin UV-VIS, FL și FTIR;

- din punct de vedere al metodelor de caracterizare, GC-FID în comparație cu UV-VIS și spectroscopia de fluorescență pentru analiza cantitativă a scopolaminei s-a dovedit a fi cea mai performantă datorită selectivității, liniarității, preciziei și robusteții.

Capitolul 7

CARACTERIZAREA EXTRACTELOR ȘI ANALIZA SCOPOLAMINEI OBTINUTE DIN *DATURA INNOXIA* PRIN TEHNICA UAE

7.2. Analiza extractelor obținute

7.2.1. Analiza UV-VIS

În acest subcapitol din teză s-a pus în evidență determinarea cantitativă a scopolaminei din frunze, flori, semințe, tulpină și rădăcină de *Datura innoxia* utilizând UAE și tehnica de caracterizare UV-VIS care a condus la o caracterizare completă prin generarea unui conținut variat de compuși fitochimici. Pentru fiecare organ vegetativ al plantei *Datura innoxia* (semințe, tulpină) a fost reprezentat întregul profil de amprentare spectrofotometrică al spectrelor de absorbție UV-VIS după deconvoluție în extractele de etanol și 1-butanol (figurile 7.4 și 7.5).

Din aceste spectre UV-VIS ale extractelor mai sus menționate, pe lângă alcaloidul scopolamină care a fost identificat în toate organele vegetative ale plantei (figurile 7.4 și 7.5 și tabelul 7.1) se mai pot observa și picuri spectrofotometrice atribuite unor compuși fitochimici precum compuși fenolici, taninuri și clorofila. Și pentru UAE a fost reprezentată compoziția procentuală (%) raportată la aria totală a picurilor din spectru (figurile 7.4 și 7.5).

În ceea ce privește cantitatea de scopolamină cel mai mare conținut a fost în extractele de frunze pentru etanol și semințe pentru 1-butanol (Mardare (Balusescu) și colab., 2022 b).

Tabelul 7.1. Valorile picurilor obținute prin analiza UV–VIS pentru extractele de etanol și 1-butanol din biomasa uscată de *Datura innoxia* (folosind tehnica UAE).

<i>Datura innoxia</i>	Semințe				Tulpină			
	Etanol		1-Butanol		Etanol		1-Butanol	
Solvenți	λ	Abs	λ	Abs	λ	Abs	λ	Abs
Nr.								
1*	203	0,356	203	0,356	211	0,006	211	0,025
2	278	0,005	278	0,005	197	0,013	221	0,009
3							661	0,002

* Valorile picurilor pentru scopolamină (λ , nm).

- banda de absorbție între 202 și 218 nm, atribuită prezenței scopolaminei (biomasă de semințe și tulpină);
- banda de absorbție între 219 nm și 224 nm, atribuită compușilor fenolici (biomasă de tulpina);
- banda de absorbție între 278 și 289 nm, atribuită prezenței taninurilor (biomasă de semințe);
- banda de absorbție între 665 și 668 nm, atribuită prezenței clorofilei (biomasă de tulpină).

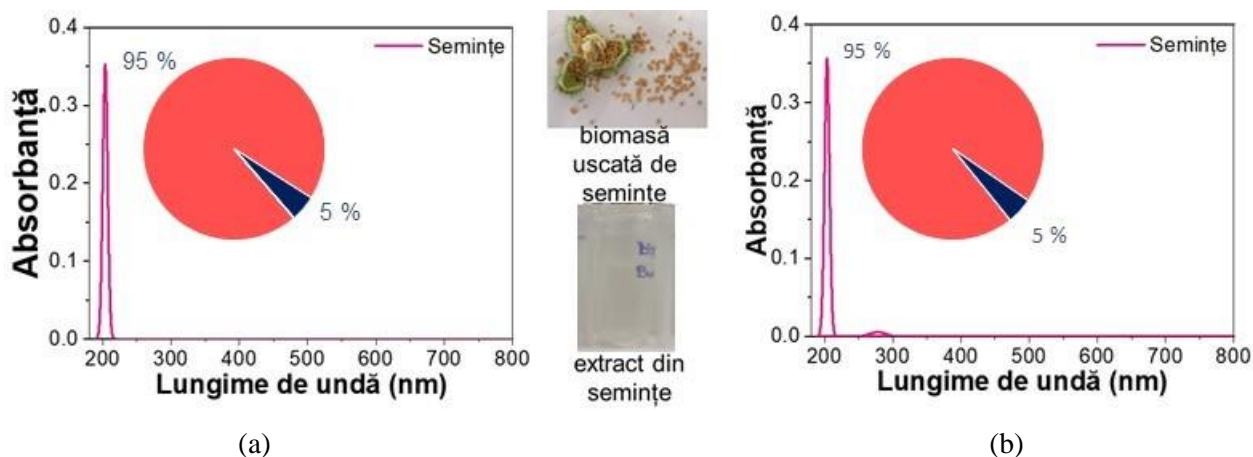


Figura 7.4. Spectrele de absorbție UV-VIS după deconvoluție din matricea extractelor în etanol (a) și 1-butanol (b) din **SEMINȚE** de *Datura innoxia* (extracție UAE).

■ Scopolamină (%) ■ Taninuri (%)

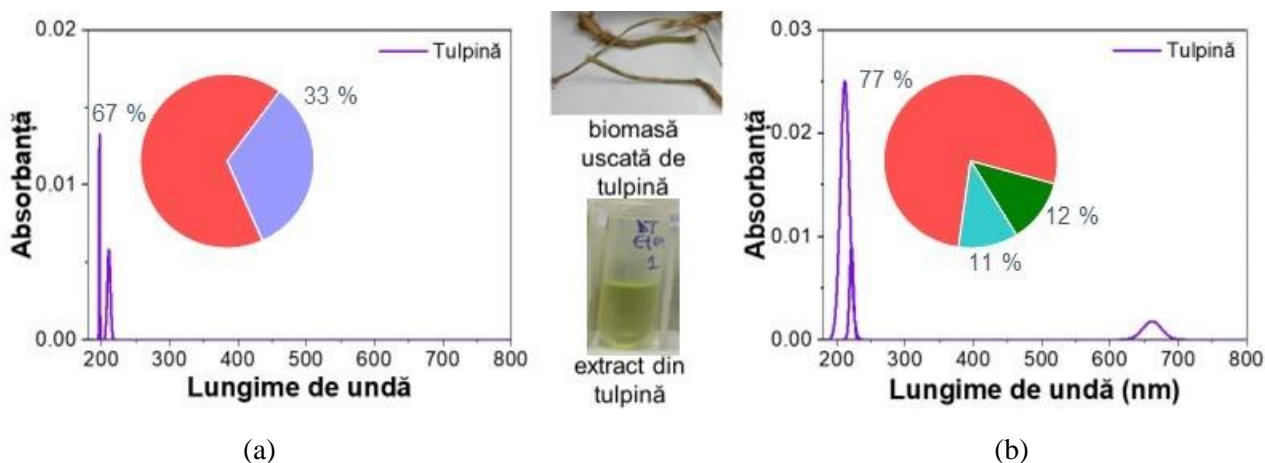


Figura 7.5. Spectrele de absorbție UV-VIS după deconvoluție din matricea extractelor în etanol (a) și 1-butanol (b) din **TULPINĂ** de *Datura innoxia* (extracție UAE).

■ Scopolamină (%) ■ Compuși fenolici (%) ■ Clorofila (%) ■ Neidentificat (%)

7.2.2. Analiza spectroscopică de fluorescență

În acest subcapitol din teză s-au prezentat rezultatele experimentale obținute prin caracterizarea completă a biomasei vegetale uscate de *Datura innoxia* (frunze, flori, semințe, tulpină și rădăcină) utilizând tehnica de extracție UAE (etanol și 1-butanol) și analiza spectroscopică de fluorescență. Totodată a fost determinată cantitatea de scopolamină din fiecare organ vegetativ prin analiza cantitativă.

Figura 7.8 și figura 7.9 prezintă spectrele de fluorescență ale scopolaminei în extractele de etanol (figura 7.8) și, respectiv, extractele de 1-butanol (figura 7.8), din biomasa de *Datura innoxia* (frunze, flori, semințe, tulpină și rădăcină) și soluția standard primar pentru hioscină în care picul specific pentru scopolamină este identificat la $\lambda_{em} = 345$ nm. De asemenea se mai poate observa o

dependență a fluorescenței funcție de natura solventului (1-butanol > etanol).

Pentru o caracterizare completă a spectrelor de fluorescență obținute s-a folosit procesul de deconvoluție, pentru a identifica cele mai bune picuri gaussiene pentru potrivirea datelor experimentale. În acest sens a fost selectat un exemplu pentru extractele din semințe (etanol și 1-butanol) a valorilor medii ale spectrelor de emisie din etanol prezentat în figura 7.10 și 1-butanol prezentat în figura 7.11.

Spectrele de fluorescență obținute în urma deconvoluției au fost caracterizate de picuri atribuite derivaților de tocoli (Ali și colab., 2018; Arslan și colab., 2019; Tarhan, 2020), scopolaminei și derivaților de clorofilă (Arslan și colab., 2019).

Compoziție procentuală (%) cea mai mare raportată la aria totală a picurilor din spectru, aceasta a fost determinată pentru scopolamină ceea ce este în acord cu afinitatea scopolaminei pentru solventul nepolar (lipofilicitatea compusului).

În ceea ce privește alcaloidul tropanic scopolamină, acesta a fost identificat în toate organele vegetative ale plantei, iar în urma analizei cantitative s-a determinat că cel mai mare conținut este în flori extrase în etanol și semințe.

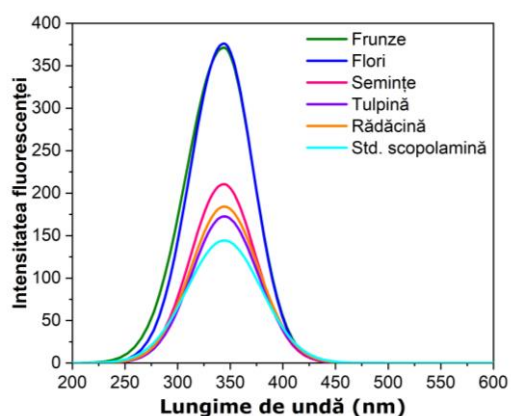


Figura 7.8. Spectrele de fluorescență specifice scopolaminei din biomasa de *Datura innoxia* (extracție UAE, etanol).

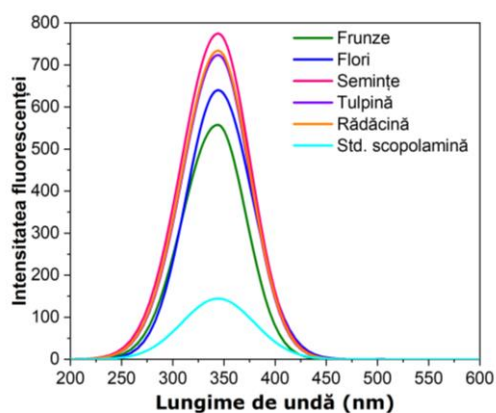


Figura 7.9. Spectrele de fluorescență specifice scopolaminei din biomasa de *Datura innoxia* (extracție UAE, 1-butanol).

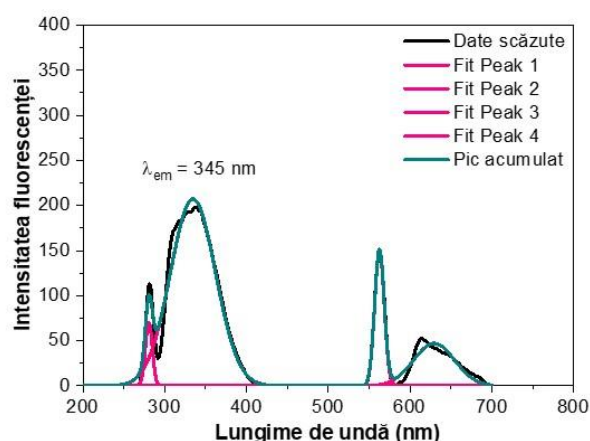


Figura 7.10. Deconvoluția spectrelor de fluorescență din matricile extractelor din semințe de *Datura innoxia* (extracție UAE, etanol).

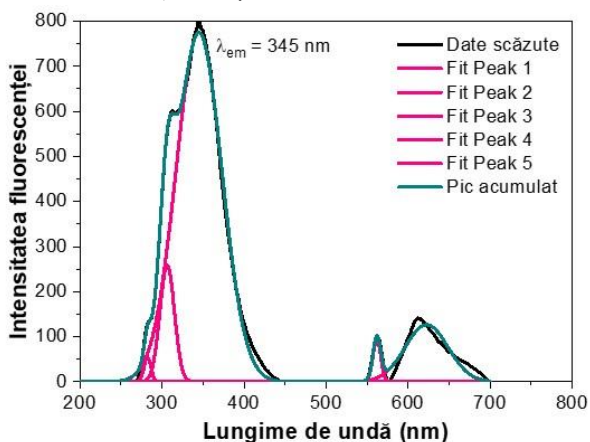


Figura 7.11. Deconvoluția spectrelor de fluorescență din matricile extractelor din semințe de *Datura innoxia* (extracție UAE, 1-butanol).

7.2.3. Analiza FTIR

Diferite părți din planta *Datura innoxia* au fost supuse caracterizării prin analiză FTIR cu scopul de a identifica compușii bioactivi din materialul vegetal (metaboliți primari și secundari). Rezultatele screening-ului privind acești compuși fitochimici au arătat că extractele de etanol și 1-butanol din biomasa vegetală sunt îmbogățite cu constituenți care fac parte atât din clasa metabolitelor primari (Schulz și Baranska, 2007), precum și din clasa metabolitelor secundari (Patle și colab., 2020). În acest context a fost descrisă posibilitatea de a determina distribuția alcaloidului scopolamină în planta *Datura innoxia*.

Pentru a arăta prezența diferitelor grupe funcționale și a compușilor chimici, precum metaboliții primari și secundari, spectrele FTIR au fost înregistrate, iar rezultatele sunt prezentate în tabelul 7.2, iar spectrele obținute pentru extractele din frunze și tulpină în figurile 7.1 și 7.18.

Tabelul 7.2. Grupele funcționale și compușii chimici caracterizați prin FTIR pentru extractele de etanol și 1-butanol din biomasa vegetală de *Datura innoxia*

Grupe funcționale	Interval lungimi de undă (cm ⁻¹)	Frunze		Tulpină	
		Etanol	1-Butanol	Etanol	1-Butanol
Alcool	1452	X	–	X	–
Celuloza, hemiceluloze, și lignina	~ 1379	X	X	X	X
Amine	1045 și 1042	X	X	X	X
Terpene	< 1000	X	X	X	X
Hexaterpena α -Bisabolol	~ 739	–	X	–	X
Alcaloizi tropanici (scopolamină)	847 și 880	X	X	X	X

Din spectrele FTIR s-au observat variații ale picurilor în toate extractele. Identificarea grupurilor funcționale s-a bazat pe picurile atribuite mișcărilor vibrațiilor de întindere și îndoire.

Picul la 1452 cm⁻¹ este prezent în toate extractele din biomasa vegetală extrasă în etanol (figurile 7.15÷7.19a) și este caracteristic benzii de absorbție pentru alcoolii, C–OH atribuite mișcărilor vibrațiilor de îndoire (Li și colab., 2013; Patle și colab., 2020). Picul înregistrat la ~ 1379 cm⁻¹ care prezintă legătura C–H poate fi asociat cu celuloza, hemiceluloze, și lignina, pic găsit în toate extractele uscate din biomasa (etanol și 1-butanol) (figurile 7.15÷7.19) (Schulz și Baranska, 2007; Szymanska-Chargot și Zdunek, 2013; Xu și colab., 2013).

Picurile la 1045 cm⁻¹ (etanol) și 1042 cm⁻¹ (1-butanol) pot fi atribuite legăturii C–N caracteristice aminelor (Shahbaz și colab., 2022). Vibrațiile de îndoire pentru C–H (900 – 650 cm⁻¹) sunt caracteristice substituției inelului aromatic (Babiker și colab., 2017; Shahbaz și colab., 2022) și corespund terpenelor (Zavoi și colab., 2011; Schulz și Baranska, 2007) care sunt identificate în toate extractele uscate din biomasa plantei *Datura innoxia* (figurile 7.15÷7.19).

Un alt pic caracteristic este cel de la 739 cm⁻¹ care poate fi asociat cu hexaterpena caracteristică compusului chimic α -Bisabolol, identificată doar în extractele de 1-butanol. (Schulz și Baranska, M, 2007).

În ceea ce privește alcaloidul tropanic scopolamină o caracterizare completă a spectrului FTIR pentru standardul pur de hioscină (figura 6.19) este discutată în Capitolul 6.

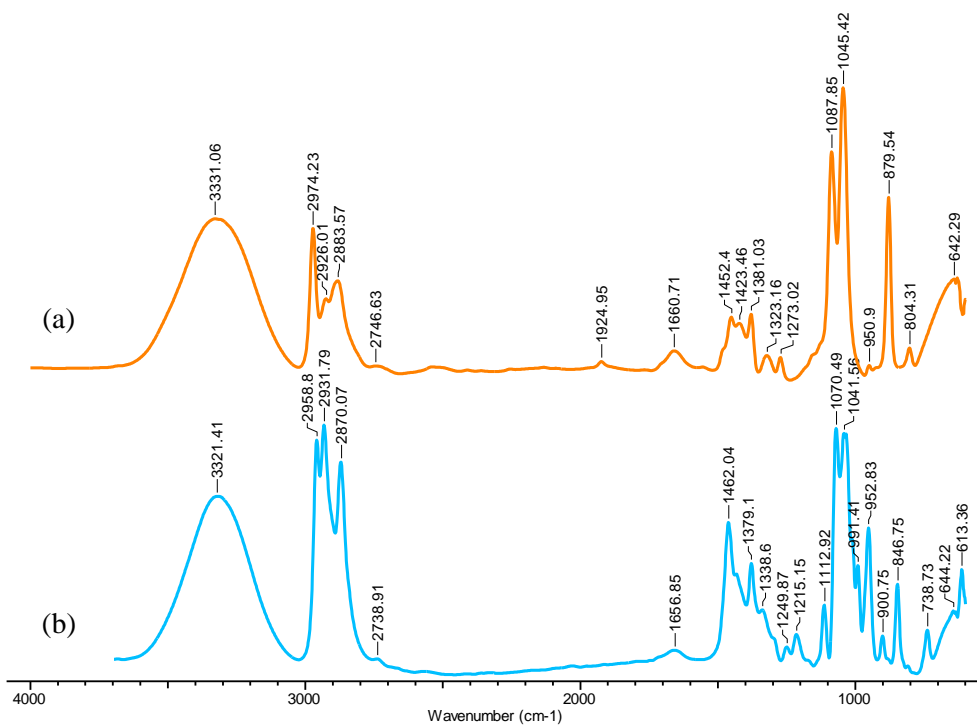


Figura 7.15. Spectrul FTIR al extractelor rezultate din **FRUNZE** de *Datura innoxia* în funcție de solventul utilizat: (a) etanol și (b) 1-butanol.

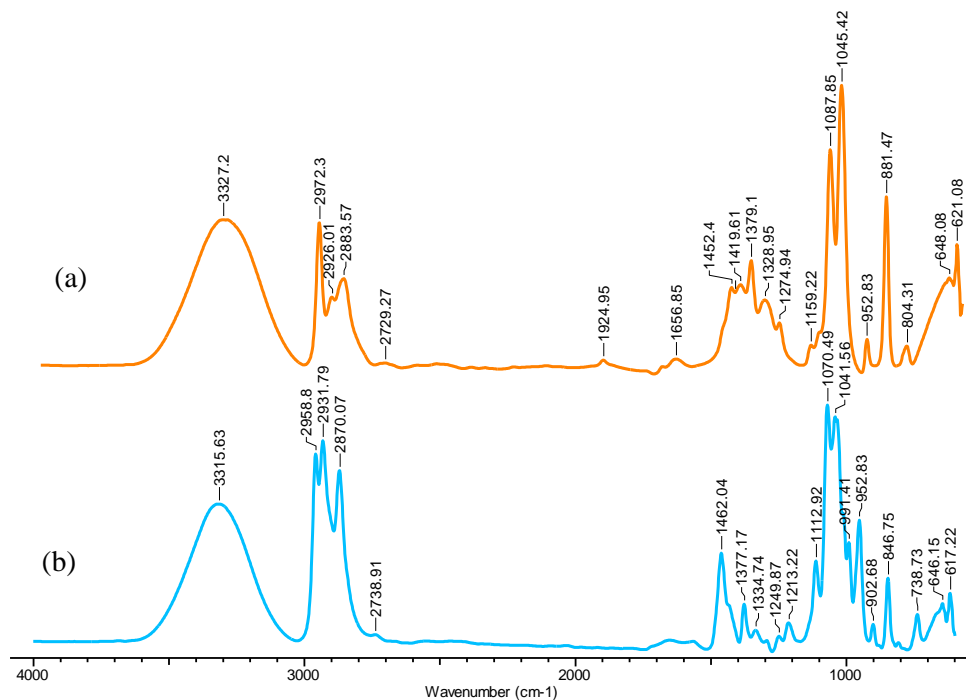


Figura 7.18. Spectrul FTIR al extractelor rezultate din **TULPINĂ** de *Datura innoxia* în funcție de solventul utilizat: (a) etanol și (b) 1-butanol.

Pentru extracția UAE remarcăm de asemenea faptul că scopolamina a fost identificată în toate organele vegetative al plantei *Datura innoxia* utilizând ca solvent etanol și 1-butanol, și,

pentru a aduce dovezi, în figura 7.20 sunt reprezentate spectrele FTIR cu amprentă unică pentru scopolamină din extractele de frunze, flori, semințe, tulpină și rădăcină.

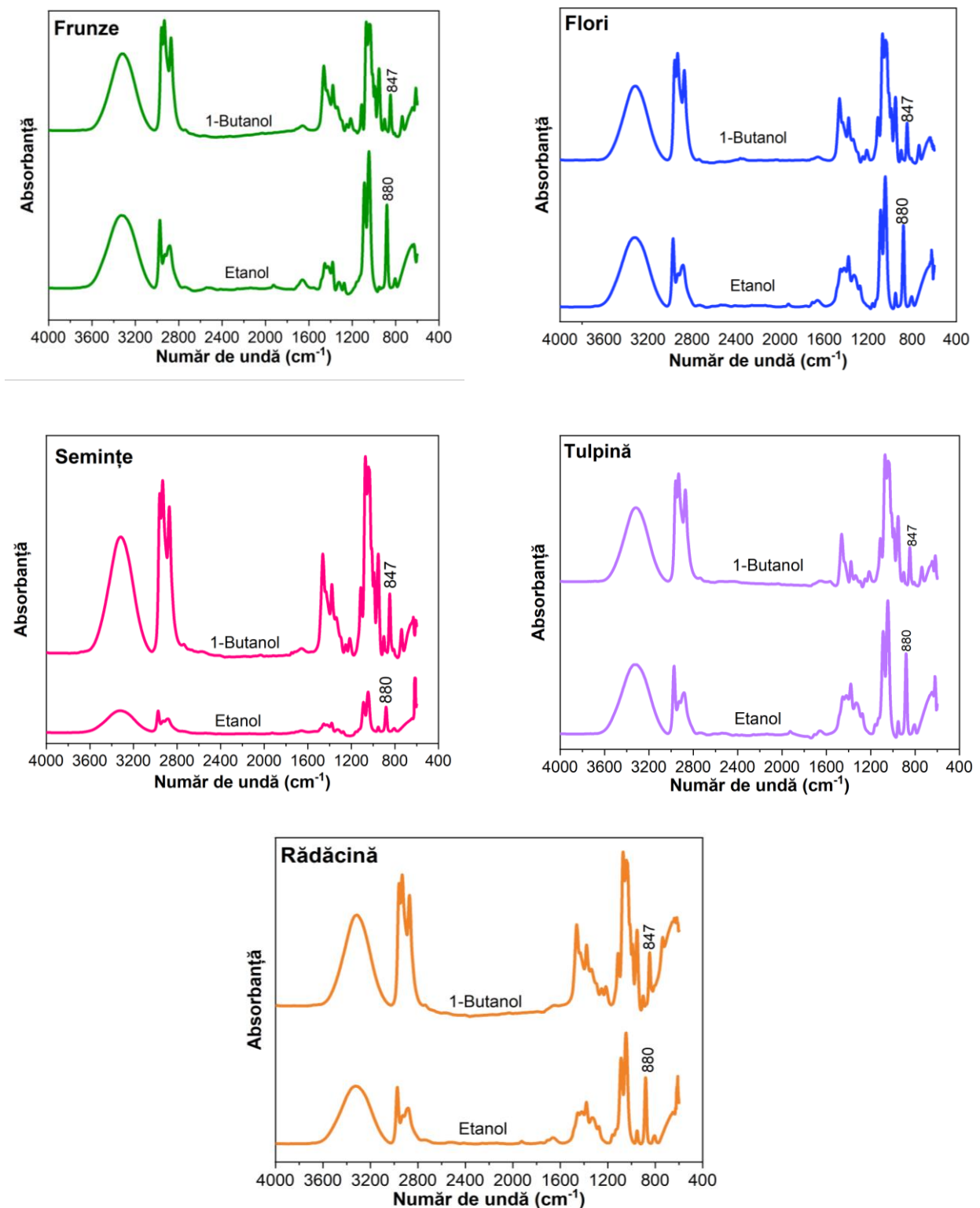


Figura 7.20, Spectrele FTIR cu amprentă unică pentru scopolamină din extractele de biomasă uscată din *Datura innoxia* în etanol și 1-butanol pentru frunze, flori, semințe, tulpină și rădăcină pentru extracția UAE.

7.2.4. Analiza GC-FID

În acest subcapitol se discută determinarea scopolaminei din punct de vedere cantitativ din biomasa vegetală de *Datura innoxia* (flori și semințe) utilizând ca tehnică de extracție UAE în etanol și 1-butanol, și analiză GC-FID ca metodă de caracterizare.

În baza acestor informații au fost realizate cromatogramele GC-FID din matricile extractelor care sunt prezentate în figura 7.21 pentru etanol, și respectiv 1-butanol în figura 7.22. Din aceste cromatograme se poate observa faptul că s-a realizat o bună separare cromatografică prin evidențierea picului cromatografic asociat scopolaminei.

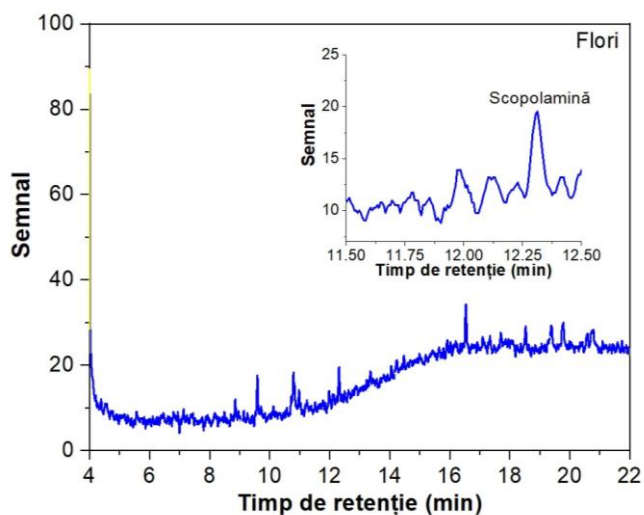


Figura 7.21. Cromatograma GC-FID din matricea extractelor în etanol din biomasă provenită din planta *Datura innoxia*: flori (UAE).

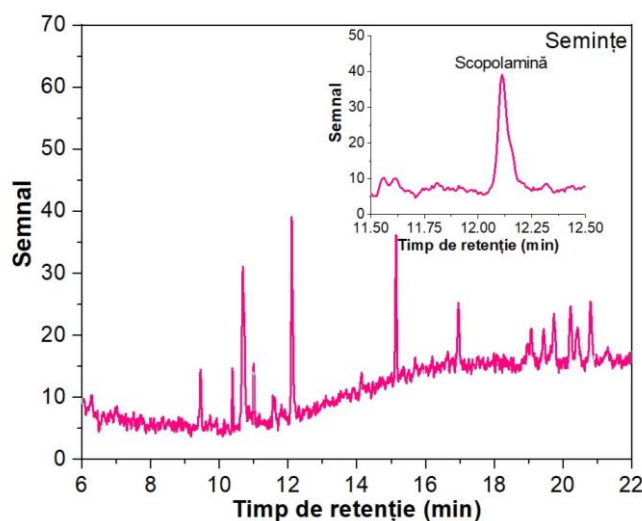


Figura 7.22. Cromatograma GC-FID din matricea extractelor în 1-butanol din biomasă provenită din planta *Datura innoxia*: semințe (UAE).

7.3. Concluzii parțiale

Rezultatele obținute în urma cercetărilor proprii prezentate în cadrul acestui capitol au condus următoarele concluzii parțiale:

- pe baza strategiei de cercetare propusă pentru investigarea extracției solid – lichid folosind tehnica asistată de ultrasunete și metodele de caracterizare a extractelor s-a urmărit identificarea metabolitelor din punct de vedere calitativ și cantitativ din toate organele vegetative ale plantei *Datura innoxia*, cu precădere alcaloizii tropanici;
- extracția UAE s-a realizat utilizând doi solvenți, etanol și 1-butanol;
- scopolamina a fost identificată în toate organele vegetative ale plantei *Datura innoxia*;
- s-a determinat cantitatea de scopolamină prin analiza cantitativă din extractele obținute folosind trei metode diferite de caracterizare: UV-VIS, spectroscopia de fluorescență și GC-FID.
- s-a realizat compoziție procentuală (%) raportată la aria totală a picurilor din spectrele de absorbție;
- s-a obținut o amprentare spectroscopică din toată biomasa de *Datura innoxia*;
- s-a stabilit că GC-FID în comparație cu UV-VIS și spectroscopia de fluorescență pentru analiza cantitativă a scopolaminei este cea mai performantă.

Capitolul 8

ANALIZA COMPARATIVĂ A TEHNICILOR DE EXTRACȚIE ȘI A METODELOR DE CARACTERIZARE UTILIZATE A SCOPOLAMINEI DIN *DATURA INNOXIA*

Speciile de plante, de exemplu *Datura innoxia* (România), produc metaboliți care pot fi extrași din frunze, flori, semințe, tulpină și rădăcină, precum substanțe chimice volatile, care sunt adesea hidrocarburi nesaturate, alcooli, aldehide, esteri, eteri, cetone, fenoli și terpeni dar și alcaloizi tropanici, de ex. scopolamina. Natura diversă a acestor compuși, cuplată cu variația interspecie și intraspecie (Kapadia și colab., 2022), prezintă ca rezultat un portofoliu mare de metaboliți identificați.

Pentru a beneficia de efectele benefice ale acestor metaboliți din punct de vedere economic, medical și social se impun tehnici de extracție convenționale, extracția Soxhlet și neconvenționale, UAE, urmate de caracterizarea prin tehnici spectroscopice, UV-VIS, fluorescență, FTIR și cromatografice, GC-FID. În zilele noastre, alegerea tehnicii care trebuie utilizată pentru a efectua extracția unui metabolit dorit dintr-o plantă specifică trebuie să fie rezultatul unui compromis între eficiența și reproductibilitatea extracției, ușurința procedurii, împreună cu considerente de cost, timp, siguranța și gradul de automatizare (Chemat și colab., 2017).

Luând în considerare aceste informații, în acest capitol este prezentată o analiză comparativă privind tehnicile de extracție și metodele de caracterizare a extractelor, având în vedere următoarele aspecte:

– **influența solvenților selectați**, etanol și 1-butanol asupra metodei de extracție privind conținutul total de scopolamină (în mg/kg substanță uscată) dar și a conținutului de metaboliți (calitativ) rezultat din biomasa vegetală de *Datura* și ulterior caracterizat prin metoda UV-VIS, spectroscopie de fluorescență și GC-FID și FTIR;

– **influența tehnicilor de extracție convenționale, Soxhlet, și respectiv neconvenționale UAE** și a solventului utilizat asupra conținutului total de scopolamină rezultat (în mg/kg substanță uscată) și a metaboliților identificați (calitativ) din *Datura innoxia* și caracterizarea prin metode spectroscopice, UV-VIS, fluorescență, FTIR și cromatografice, GC-FID;

– **analiza comparativă a rezultatelor obținute prin metodele de caracterizare** atât din punct de vedere cantitativ (UV-VIS, spectroscopie de fluorescență și GC-FID) cât și calitativ (FTIR) privind conținutul total de scopolamină și a metaboliților identificați în biomasa de *Datura innoxia*.

Solvenții utilizați pentru extracția prin extracția asistată de ultrasunete au condus la cele mai bune rezultate, în timp ce aceeași solvenți utilizați pentru extracția Soxhlet au condus la un conținut scăzut de scopolamină. Din datele rezultate s-a observat că valoarea concentrației de scopolamină în extractele rezultate din *Datura innoxia* variază de la un organ vegetativ la altul, ceea ce este în acord cu literatura de specialitate privind influența următorilor factori:

1) **Raportul solid – solvent** utilizat pentru extracția metabolitului de interes nu urmează un anumit model; este în funcție de organul vegetativ studiat, de polaritatea solventului, tehnica de extracție folosită și metoda de caracterizare a extractului.

2) **Tipul sau polaritatea și puritatea solventului** utilizat pentru procesul de extracție este

strâns legată de natura compușilor care urmează să fie extrași. Metaboliții din plante au o compoziție moleculară diferită, astfel încât sunt solubili în mod diferit în solvenți cu polaritate diferită, și care pot fi de natură lipofilă (Mardare – Balusescu și colab., 2020, 2022 a și b), hidrofilă și hidrofobă (Thiruchenduran și colab., 2017; Carreira-Casais și colab., 2021).

3) **Specia de plante**, raportul dintre locul de colectare / mediu, timpul de recoltare, maturitatea plantelor, factorii genetici și fiziologici pot conduce la identificarea și caracterizarea unui spectru larg de metaboliți, precum alcaloizi, terpenoide, compuși fenolici (Kapadia și colab., 2022).

4) **Factorii de mediu** sunt cruciali pentru biosinteza și fluctuațiile în metaboliții din plante. Sinteza și acumularea adecvată a metaboliților sunt strict controlate în mod spațial și temporal și influențate de mediul abiotic și biotic în schimbare. În general, stresul abiotic este responsabil pentru scăderea producției randamentului plantelor medicinale. În timpul creșterii și dezvoltării, plantele interacționează cu mediul înconjurător, unde vin în contact cu diferite componente abiotice precum apa, lumina, temperatura, solul și substanțele chimice. Factorii abiotici negativi, cum ar fi seceta sau inundațiile, lumina puternică și radiația UV (Li colab., 2020), temperatura și prezența solului sărac sau a substanțelor chimice toxice generează factori de stres, iar aceștia declanșează variații în biosinteza metaboliților (Verma și Shukla, 2015; Li colab., 2020).

Sensibilitatea și specificitatea metodelor de caracterizare pentru biomasa vegetală

Rezultatele experimentale au permis evidențierea clară a scopolaminei în organele vegetative ale plantei *Datura innoxia*, înregistrându-se următoarea distribuție:

Frunze > Flori > Rădăcină > Tulpină > Seminte

Extractele în 1-butanol prezintă comportamente și abundențe similare cu cele în etanol (trend descrescător odată cu înaintarea în stadiul identificat) ceea ce ar sugera distribuție/dinamică diferențiată a alcaloidului la nivelul diverselor organe vegetative ale plantei de interes.

Pentru *Datura innoxia* crescută în mediu pedoclimatic adaptată la condițiile solului din România cantitatea de scopolamina acumulată în urma caracterizării prin metoda GC-FID este mai mare, dar asta se poate datora factorilor care pot influența acumularea metaboliților în plante. De remarcat faptul că în extractul din etanol prin extracție UAE obținut din biomasa vegetală comparativ cu cel din 1-butanol s-a observat un comportament similar cu toate că eficiența la extracție a fost mult diminuată.

În cazul metodelor de caracterizare prin UV-VIS și spectroscopie de fluorescență s-a observat o abundență redusă a metaboliților identificați care se poate datora sensibilității și specificității metodei.

De asemenea cantitatea de scopolamină prin UAE comparativ cu Soxhlet a avut cea mai mare eficiență la extracția scopolaminei utilizând ca solvent 1-butanol iar cantitatea cea mai mare de scopolamină a fost obținută în extractele de seminte pentru UV-VIS și pentru spectroscopie de fluorescență, ceea ce este în acord cu literatura de specialitate în care se specifică faptul că în seminte nivelul maxim al concentrației de scopolamină este atins atunci când fructele ajung la maturitate (Plank și Wagner, 1985).

Luând în considerare aspectele menționate prin compararea metodelor de caracterizare privind determinarea cantitativă a conținutului de scopolamină în biomasa vegetală, aceasta a variat

în ordinea: GC-FID > Fluorescență > UV-VIS

Pentru identificarea metaboliților din biomasa vegetală aceștia nu trebuie neapărat izolați înainte de analiză. Metoda de caracterizare FTIR face posibilă identificarea rapidă a metaboliților (analiză calitativă) din matrici complexe de biomasă vegetală prin detecția rapidă și determinarea grupelor funcționale prezente în structura chimică caracteristică picurilor din zona de amprentare spectroscopică (Salam și colab., 2019). Eficiența extracției UAE a fost superioară extracției Soxhlet în 1-butanol comparativ cu etanol, și totuși s-a observat un comportament similar cu toate că eficiența la extracție a fost diminuată, aceasta s-ar putea datora polarității solventului (polar sau nepolar) și naturii compusului (caracter lipofilic sau hidrofilic) (Thiruchenduran și colab., 2017; Carreira-Casais și colab., 2021).

Astfel se poate observa că esterii acizilor grași și gliceridele ($1730 - 1775 \text{ cm}^{-1}$), acidul oleic ($1700 - 1715 \text{ cm}^{-1}$), acidul uronic ($\sim 1701 \text{ cm}^{-1}$) au fost identificați numai prin UAE în etanol. De asemenea metoxifenolul eugenol (1249 și 1252 cm^{-1}) un metoxifenol care ar putea face parte din etapele inițiale de formare a ligninei pe cale de biosinteză, a fost identificat în toate organele plantei folosind extracția UAE, cu precădere în 1-butanol (Koeduka și colab., 2006). Un alt compus reprezentativ este lignina ($15 - 25 \%$) ($\sim 1379 \text{ cm}^{-1}$) care a fost identificată în toată biomasa atât prin UAE cât și prin Soxhlet etanol și 1-butanol și care constituie una dintre cele trei componente majore ale biomasei lignocelulozice, dintre care celelalte două componente constau din celuloză ($38 - 50 \%$) și hemiceluloze ($23 - 32 \%$) (Zakzeski și colab., 2010).

Lignina este un polimer amorf tridimensional format din structuri fenilpropan metoxilate. În pereții celulelor vegetale, lignina umple spațiile dintre celuloză și hemiceluloze și acționează ca o rășină care ține împreună matricea de lignoceluloză (Zakzeski și colab., 2010). În cazul terpenelor ($< 1000 \text{ cm}^{-1}$), se poate observa o eficiență la extracție cu precădere pentru UAE, în 1-butanol.

De exemplu, carvacol (810 cm^{-1}) o monoterpenoidă de tip fenol identificată doar în flori și semințe a avut eficiență la extracție în 1-butanol doar pentru UAE. Alte terpene, glicozidele ($\sim 991 \text{ cm}^{-1}$) au fost identificate numai în extractele de 1-butanol folosind atât extracția Soxhlet cât și UAE în toate organele plantei (Akowuah și colab., 2002), iar hexaterpena α -Bisabolol ($\sim 739 \text{ cm}^{-1}$) în 1-butanol pentru UAE și Soxhlet.

Și nu în ultimul rând, comparativ cu UV-VIS și spectroscopia de fluorescență, și metoda FTIR a pus în evidență din punct de vedere calitativ scopolamina (847 și 880 cm^{-1}) în toată biomasa vegetală de *Datura innoxia*.

Totodată, pentru UV-VIS și spectroscopia de fluorescență, prin calcularea compoziției procentuale (%) raportată la aria totală a picurilor din spectru se poate determina din punct de vedere calitativ conținutul de compuși fitochimici din biomasa uscată de *Datura innoxia*. Din punct de vedere comparativ privind cele două tehnici de extracție (UAE și Soxhlet), dar și a utilizării celor doi solvenți (etanol și 1-butanol), s-a observat o compoziție procentuală semnificativă a scopolaminei, urmată de derivații de clorofilă prezenți în toate extractele din frunze, flori, semințe, tulpină și rădăcină.

Pentru spectroscopia de fluorescență s-a observat prezența derivaților de tocoli, iar pentru UV-VIS prezența compușilor fenolici, carotenoidelor și saponinelor. Acest lucru se poate explica prin faptul că spectroscopia de fluorescență permite identificarea metaboliților care prezintă

fluorescență.

Dacă ne raportăm la influența solvenților se poate observa că atât pentru spectroscopia de fluorescență cât și pentru UV-VIS compoziția procentuală a variat de la un organ vegetativ la altul, fapt ce se poate datora influenței unor factori care au fost prezentați la începutul capitolului.

În concluzie, prin combinarea rezultatelor celor trei metode de caracterizare, FTIR, spectroscopie de fluorescență și UV-VIS, putem spune că s-a realizat o caracterizare completă a plantei *Datura innoxia* din punct de vedere calitativ privind conținutul de compuși fitochimici în toate organele vegetative (frunze, flori, semițe, tulpină și rădăcină).

În final putem afirma că eficiența la extracție pentru scopolamină prin metoda UAE este mai mare în comparație cu cea pentru extracția Soxhlet. Este nevoie de creșterea scalării tehnicii de extracție și aplicarea ei în industrie. De asemenea, din punct de vedere al cantității de scopolamină obținută prin metode spectroscopice și cromatografice se aduc dovezi clare că GC-FID a fost metoda care a condus la cel mai ridicat conținut în biomasa vegetală.

Din punct de vedere calitativ, rezultatele experimentale au confirmat prezența unor metaboliți importanți identificați și caracterizați prin metode spectroscopice, UV-VIS, fluorescență și FTIR care sunt utili atât în domeniul medicinei cât și alte domenii, cum ar fi alcaloizii de ex. scopolamina, tocoferolii și tocotrienolii, aminele, alcoolii, compușii fenolici, alcanii, acizii carboxilici, aldehydele, cetonele, sterolii, terpenele, compușii cu azot, de ex. celuloză, hemiceluloze. Prin urmare, este nevoie de investigații științifice suplimentare pentru intensificarea extracției prin metode neconvenționale.

Ținând cont de aceste informații, analiza calitativă și cantitativă (scopolamină) prin utilizarea metodelor de caracterizare este importantă pentru a aduce în atenția publicului importanța cunoașterii exacte a compoziției chimice foarte complexe a plantei *Datura innoxia*, având în vedere că deseori: (a) constituie o resursă importantă pentru extracția scopolaminei utilizate în scop medical, (b) este utilizată în scopul obținerii de medicamente care conțin cantități mari de scopolamină sau (c) intră în clasa de produse etnobotanice (plantă etnobotanică).

CONCLUZII GENERALE

Studiul fitochimic constituie un element important al problemelor științifice de rezolvat și, din punct de vedere teoretic, se va aprecia că rezultatele obținute la final vor contribui la creșterea nivelului de înțelegere și cunoaștere asupra biomasei vegetale provenită din planta *Datura innoxia*.

Din punct de vedere teoretic, teza și-a propus realizarea unui studiu de literatură în vederea identificării celor mai recente și relevante informații publicate în literatura de specialitate în privința tehnicilor de extracție, atât convenționale cât și neconvenționale a metaboliților din biomasa vegetală, în special a alcaloizilor. Pentru activitățile experimentale realizate sunt prezentate aspecte legate de etapele de colectare, prelucrare, extracție și analiză a probelor evidențiindu-se toate condițiile de operare care pot mări gradul de încredere în rezultatele obținute și prezentate.

Principalul obiectiv al acestei teze a fost investigarea biomasei vegetale provenită de la planta *Datura innoxia* (frunze, flori, fructe, tulpină și rădăcină) colectată din Ramnicu Sărat,

România prin caracterizarea din punct de vedere calitativ și cantitativ a metaboliților, în special a scopolaminei, utilizând tehnici de extracție atât convenționale (extracția Soxhlet) cât și neconvenționale (UAE) și ulterior prin caracterizarea prin UV-VIS, spectroscopie de fluorescență, FTIR și GC-FID. Pentru a aduce în atenția publicului avantajele acestor tehnici de extracție, pentru această teză au fost selectați doi solvenți, etanol și 1-butanol.

De asemenea, tot în cadrul contribuțiilor originale a fost realizată o analiză comparativă a conținutului de scopolamină, dar și a altor metaboliți privind cele două tehnici de extracție, Soxhlet (convențională) și UAE (neconvențională).

În urma studiului critic al literaturii de specialitate prezentat în prima parte a tezei, în primele două capitolele, se pot configura următoarele concluzii:

I.1. A fost realizat un studiu de literatură în ceea ce privește stadiul actual al cercetării în vederea identificării celor mai recente și relevante informații publicate în literatura de specialitate privind metaboliții din biomasă vegetală ca potențiale substanțe active din punct de vedere farmacologic.

I.2. S-au abordate aspecte legate de: a) istoricul și definirea compușilor bioactivi, precum și tipurile de metaboliți b) etapele premergătoare procedurilor extracției metaboliților din materialul biomasei vegetale precum cultivarea, colectarea, autentificarea plantelor, măcinarea, omogenizarea și stocarea.

I.3. Au fost descrise tehnici de extracție uzual aplicate în laboratoare și metode de caracterizare a compușilor bioactivi precum cele:

- Convenționale - macerare, infuzie, percolare, decoctie, extracția Soxhlet, hidrodistilare;
- Neconvenționale - UAE, MASE, SFE, PLE;
- caracterizare prin analiză UV-VIS, spectroscopie de fluorescență, FTIR și GC.

În partea a II-a au fost descrise contribuțiile personale, cu detalii în ceea ce privește metodologia utilizată pentru realizarea studiului experimental privind tehnica de extracție și metodele de caracterizare pentru alcaloidul tropanic scopolamină din toate organele vegetative ale plantei *Datura innoxia* (frunze, flori, semințe, tulpină, rădăcină). Rezultatele experimentale obținute în urma cercetărilor proprii permit trasarea următoarelor concluzii:

II.1. Pentru îndeplinirea obiectivelor specifice propuse este elaborat un protocol experimental care are în vedere modul de prelevare și preparare a biomasei vegetale din planta *Datura innoxia* pentru realizarea extracției prin două tehnici diferite (Soxhlet și UAE) și apoi analiza cantitativă și calitativă a alcaloidului tropanic scopolamină pentru extractele obținute din toate organele vegetative ale plantei și folosind doi solvenți diferiți (etanol și 1-butanol).

II.2. Au fost realizate etapele premergătoare procedurilor de extracție, precum colectarea biomasei vegetale provenită din planta *Datura innoxia*, uscarea, determinarea umidității, măcinarea și omogenizarea probelor și stocarea probelor.

II.3. S-au stabilit curbele de calibrare prin spectrofotometria UV-VIS, spectroscopia de fluorescență și GC-FID și s-au prezentat rezultatele analizei cantitative pentru standardul de hioscină (scopolamină).

II.4. A fost urmărită extracția și analiza cantitativă a alcaloidului scopolamină din organele vegetative ale plantei *Datura innoxia* utilizând metoda de extracție convențională – Soxhlet și

neconvențională – UAE, utilizând doi solvenți diferiți, etanol și 1-butanol.

II.5. S-a realizat analiza cantitativă a scopolaminei din extractele obținute folosind trei metode diferite de caracterizare: UV-VIS, spectroscopia de fluorescență și GC-FID.

Rezultatele experimentale obținute și interpretarea științifică privind investigarea tehnicilor de extracție și caracterizarea scopolaminei din *Datura innoxia* conduc la următoarele concluzii generale:

- (1) Planta *Datura innoxia* a fost selectată dintr-o zonă locală, România, iar pașii care au urmat traseul spre identificarea compusului de interes, scopolamina au fost aplicați.
- (2) Biomasa vegetală provenită din planta *Datura innoxia* a fost caracterizată, în scopul diferențierii între potențialele scopuri în care poate fi utilizată.
- (3) Alcaloidul scopolamină a fost identificat în părțile constituente (frunze, flori, semințe, tulpină și rădăcină) ale plantei *Datura innoxia* în acord cu o serie de informații din literatura de specialitate.
- (4) Scopolamina a fost extrasă din organele vegetative ale plantei *Datura innoxia* utilizând tehnici de extracție convenționale și neconvenționale, Soxhlet, respectiv UAE.
- (5) Au fost selectați doi solvenți, etanol și 1-butanol pentru a aduce în atenția publicului avantajele acestor tehnici de extracție.
- (6) S-au determinat prin analiză calitativă și cantitativă metaboliții din biomasă vegetală de *Datura innoxia*, în special scopolamina prin metode de caracterizare spectroscopice, UV-VIS, spectroscopie de fluorescență și FTIR.
- (7) A fost abordat din punct de vedere fitochimic caracteristicile de amprentare spectroscopică pentru părțile constituente (frunze, flori, semințe, tulpină, rădăcină) ale plantei *Datura innoxia*, iar datele și informațiile obținute pe parcursul investigațiilor experimentale au reliefat detalii legate de compoziția chimică la nivel calitativ.
- (8) A fost realizat profilul cromatografic și analiza cantitativă a scopolaminei din extractele de biomasă vegetală provenită din planta *Datura innoxia* prin GC-FID.
- (9) Scopolamina a fost identificată în toată biomasă vegetală (frunze, flori, semințe, tulpină și rădăcină), iar concentrația cea mai mare a fost găsită în extractele de 1-butanol prin utilizare UAE.
- (10) A fost realizată o analiză comparativă a conținutului de scopolamină prin UAE și extracție Soxhlet utilizând UV-VIS, spectroscopie de fluorescență, FTIR și GC-FID.
Din studiul comparativ privind eficiența acestor tehnici de extracție și a solvenților folosiți, etanol și 1-butanol asupra conținutului de scopolamină din biomasă de *Datura innoxia*, cât și a metodelor de caracterizare a extractelor (UV-VIS, fluorescență, FTIR și GC-FID) s-au putut constata următoarele:
- (11) Rezultatele obținute în urma analizei cantitative pentru scopolamină identificată în toată biomasă vegetală de *Datura innoxia* au arătat un conținut semnificativ mai mare în 1-butanol față de etanol.
- (12) Etanol și 1-butanol utilizați pentru extracția prin UAE au condus la cele mai bune rezultate, în timp ce aceeași solvenți utilizați pentru extracția Soxhlet au condus la un conținut scăzut de scopolamină.

- (13) Cantitatea cea mai mare de scopolamină a fost obținută cu precădere în rădăcină și frunze în 1-butanol pentru UAE.
- (14) Variabilitățile identificate pentru conținutul de scopolamină de la un organ vegetativ la altul indică o eventuală legătură între momentul în care, la nivelul rădăcinii, este amplificat procesul de biosinteză a alcalozilor tropanici.
- (15) Prin compararea metodelor de caracterizare din punct de vedere cantitativ a conținutului de scopolamină în biomasa vegetală, acesta a variat în ordinea GC-FID > fluorescență > UV-VIS.
- (16) Profilul complex al spectrelor IR a evidențiat picuri asociate unor metaboliți precum terpene, compuși fenolici, alcaloizi, carbohidrați, de ex. celuloză, hemiceluloze, alcani, esteri, cetone, metoxifenoli.

În final se apreciază că biomasa vegetală reprezentată de planta *Datura* prezintă multe oportunități de experimentare și piste noi pentru obținerea de noi metaboliți care au un potențial fitofarmaceutic însemnat.

CONTRIBUȚII ORIGINALE

În cadrul contribuțiilor originale, primul pas l-a constituit inițiativa unui studiu comparativ a unor tehnici de extracție și a metodelor de caracterizare prin abordarea din punct de vedere calitativ și cantitativ a caracteristicilor de amprentare spectroscopică și cromatografică pentru biomasa vegetală (frunze, flori, semințe, tulpină și rădăcină) ale plantei *Datura innoxia* din România. Datele și informațiile obținute pe parcursul investigațiilor experimentale au condus la informații importante la nivel calitativ și cantitativ prin identificarea și caracterizarea unor metaboliți (alcaloizi, terpene, compuși fenolici, tocoferoli și tocotrienoli, etc.) din biomasa vegetală ce au reliefat detalii extrem de interesante legate de compoziția chimică. S-a acordat o atenție deosebită asupra potențialului farmacologic al acestei plante ținând cont de faptul că în compoziția chimică de biomasă vegetală a fost pusă în evidență scopolamina – alcaloidul de interes cu implicații în acest sens.

Elementele de noutate din această teză sunt legate, în primul rând, de faptul că pentru prima dată s-a încercat un studiu comparativ a unor tehnici de extracție convențională, Soxhlet și neconvenționale, UAE prin utilizarea a doi solvenți, etanol și 1-butanol, și a unor metode de caracterizare prin analiză UV-VIS, spectroscopie de fluorescență, FTIR și GC-FID pentru o caracterizare completă a speciei *Datura innoxia*, în special pentru alcaloidul scopolamină, cultivată în condiții pedoclimatice specifice solului din România (arealul Municipiul Râmnicu Sărat). În această teză se va aprecia că rezultatele obținute în urma studiului fitochimic comparativ al extractelor obținute prin tehnicile de extracție selectate și metodele de caracterizare vor contribui la creșterea nivelului de înțelegere și cunoaștere asupra speciei *Datura innoxia* din România.

ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ

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

FIC = 4.5

1. Mardare (Balusescu) G., Lazar L., Malutan T., (2022), Potential application of invasive plant species *Datura innoxia* for the scopolamine extracts of the plant organs and analysis using UV-VIS spectrophotometry, *Forests*, **13**, 1555 (<https://doi.org/10.3390/f13101555>) – FI = 2,9
2. Mardare (Balusescu) G., Lazar L., Malutan T., (2022), Spectroscopic investigation and chemical fingerprint of *Datura innoxia* dry biomass, *Comptes Rendus Chimie*, **25**, 1–9 (DOI: [10.5802/crchim.169](https://doi.org/10.5802/crchim.169)) – FI = 1,6

Lucrări științifice publicate în reviste indexate în baze de date internaționale

1. Mardare (Balusescu) G., Malutan T., Lazar L., (2020), Determination of scopolamine by gas chromatography from different parts of the *Datura innoxia*, *Revista de Chimie*, **71**(7), 126–136.

Lucrări publicate în volumele conferințelor

1. Mardare (Balusescu) G., Lazar L., Malutan T., (2021), Ultrasound-assisted extraction of scopolamine from *Datura Innoxia* and quantitative analysis using gas chromatography, Proceedings of the 11th International Conference on Environmental Engineering and Management: Environmental Engineering for a Clean and Healthy Planet, 8 - 10 of September 2021, Muttentz, Switzerland, Editors: A.M. Buburuzan, B.M. Slușer, C. Teodosiu, ECOZONE Publishing House, Iasi, ISSN 2457-7049; ISSN-L 2457-7049 (pp. 69-70).
2. Mardare (Balusescu) G., Malutan T., (2019), Secondary metabolites from plants: The thin border between beneficent and harmful, Proceeding book of the 12th International RAIS Conference on Social Sciences and Humanities, Proceedings Book, ISBN 978-1-945298-22-6, Princenton, NJ, USA, 293–299, 2019.

Participări la conferințe naționale și internaționale

1. Georgiana Mardare (Balusescu), Liliana Lazar, Teodor Malutan, (2023), comparative approaches to quantitative analyses of secondary metabolites extracts from *Datura innoxia* biomass, International Göbeklitepe Scientific Studies Congress, ISARC, 29-30 Iulie 2023.
2. Georgiana Mardare (Balusescu), Liliana Lazar, Teodor Malutan, (2022), Comparative Analysis of Hyoscine in Different Extracts of *Datura innoxia*, Conferința Școlii Doctorale din cadrul Universității Tehnice "Gheorghe Asachi" din Iași, România, prezentare orală, 18-20 Mai 2022.
3. Georgiana Mardare (Balusescu), Liliana Lazar, Teodor Malutan, (2021), Ultrasound-assisted extraction of scopolamine from *Datura Innoxia* and quantitative analysis using gas chromatography, Conference on Environmental Engineering and Management, ICEEM 11, 08 - 10 Septembrie, 2021.
4. Georgiana Mardare (Balusescu), Liliana Lazar, Irina Volf, Teodor Malutan, (2021), Hyoscine extraction from *Datura innoxia* biomass and analysis by spectrophotometric and fluorescence methods, International Conference on Progress in Organic and Macromolecular Compounds 28th edition, MACROIasi 2021, Petru Poni Institute of Macromolecular Chemistry, Iasi, 7-9 October, 2021.
5. Georgiana Mardare (Balusescu), Teodor Malutan, (2021), An overview based on extraction

- techniques of bioactive compounds from vegetal biomass, Conferința Școlii Doctorale din cadrul Universității Tehnice "Gheorghe Asachi" din Iași, România, prezentare orală, 07-09 Mai 2021.
6. Georgiana Mardare (Balusescu), Liliana Lazar, Teodor Malutan, (2020), Spectroscopic investigation and chemical fingerprint of *Datura innoxia* dry biomass, *5th International Conference on Chemical Engineering, ICEE 2020*, "Gheorghe Asachi" Technical University of Iași, Romania Department of Environmental Engineering and Management Faculty of Chemical Engineering and Environmental Protection, Iasi, prezentare orală, 28-30 Octombrie, 2020.
 7. Nicoleta Elena Hegheș, Georgiana Mardare (Balusescu), (2019), "Addicted to Happiness". Consumption of New Substances with Psychoactive Properties, Conferința Internațională The European Human Culture. The Right to Happiness, Universitatea Creștină „Titu Maiorescu”, București, România, comunicare orală, 12 - 14 decembrie 2019.
 8. Nicoleta Elena Hegheș, Georgiana Mardare (Balusescu), (2019), Consumul de substanțe noi cu proprietăți psihoactive: fenomenul „Zombie”, Conferința națională cu participare internațională „Devianță și Criminalitate. Evoluție, Tendințe și Perspective” „DECRET”, Ediția ediția a V-a, Universitatea „George Bacovia” din Bacău, comunicare orală, 14 - 15 noiembrie 2019.
 9. Georgiana Mardare (Balusescu), Teodor Malutan, (2019), Fenomenul „Zombie” – A doua generație de noi substanțe psihoactive”, Conferința Națională de Criminalistică (ediție aniversară cu ocazia împlinirii a 20 de ani de la înființarea Laboratorului Interjudețean de Expertize Criminalistice Iași), Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași, România, prezentare orală, 07 - 08 decembrie 2019.
 10. Adrian Cătălin Puițel, Dan Gavrilăscu, Gabriel Dan Sudit, Mircea Nechita Teodor, Georgiana Mardare (Balusescu), (2019), Microwave assisted conversion of agri-wastes to value added products”, International Conference New Trends in Environmental and Materials Engineering, Galați, România, poster, 23 - 25 octombrie 2019.
 11. Georgiana Mardare (Balusescu), Valentina Iordan (Constantin), Teodor Malutan, (2019), Extraction techniques as preparative tools for the isolation of scopolamine from „*Datura innoxia* aerial parts”, *10th International Conference on Environmental Engineering and Management, ICEEM 10*, "Gheorghe Asachi" Technical University of Iași, Romania Department of Environmental Engineering and Management Faculty of Chemical Engineering and Environmental Protection, Iasi, prezentare orală, 18-21 September, 2019.
 12. Adrian Cătălin Puițel, Dan Gavrilăscu, Gabriel Dan Sudit, Mircea Nechita Teodor, Georgiana Bălușescu, "Corn stalks - raw material for fractionation to value added products", 21st Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, Constanța - Mamaia, România, poster, 04 - 07 septembrie 2019.
 13. Georgiana Mardare (Balusescu), Teodor Malutan, (2019), Modern extraction techniques and fingerprint analysis of bioactive compounds from plants biomass extracts, *Conferința Școlii Doctorale* din cadrul Universității Tehnice "Gheorghe Asachi" din Iași, România, prezentare orală, 22-23 Mai 2019.
 14. Georgiana Mardare (Balusescu), Teodor Malutan, Secondary metabolites from plants: The thin border between beneficent and harmful, *12th International RAIS Conference on Social Sciences and Humanities*, Princenton, NJ, USA, 3-4 April, 2019.

Alte lucrări publicate în volumele conferințelor

1. Oana Horhoge, Georgiana Mardare (Balusescu), Criminalistic research of the forged documents, 16th International RAIS Conference on Social Sciences and Humanities, Proceedings Book, ISBN 978-1-945298-26-4, USA, 166–170, **2020**.
2. Nicoleta Elena Hegheș, Georgiana Mardare (Balusescu), Consumul de substanțe noi cu proprietăți psihoactive: fenomenul „Zombie”, Conferința națională cu participare internațională „Devianță și Criminalitate. Evoluție, Tendințe și Perspective” „DECRET”, Ediția ediția a V-a, Proceedings Book, ISSN 2559 – 4915, Bacău, România, 238–243, Bacău, România, **2019**.
3. Georgiana Mardare (Balusescu), Oana Horhoge, “Nano-Killers”. Aluminium toxicity in the human body, 15th International RAIS Conference on Social Sciences and Humanities, Proceedings Book, ISBN 978-1-945298-25-7, Johns Hopkins University, Montgomery County Campus, Rockville, MD, USA, 83–90, **2019**.
4. Georgiana Mardare (Balusescu), Nicoleta-Elena Heghes, Forensic examination of soil samples from the point of view of physico-chemical expertise, 14th International RAIS Conference on Social Sciences and Humanities, Proceedings Book, ISBN 978-1-945298-24-0, Princenton, NJ, USA, 95–99, **2019**.
5. Georgiana Mardare (Balusescu), Nicoleta-Elena Heghes, Authentic - False. Correlation between graphics and physico - chemical painting techniques expertise in artwork analysis, 13th International RAIS Conference on Social Sciences and Humanities, Proceedings Book, ISBN 978-1-945298-20-2, Johns Hopkins University, Montgomery County Campus, Rockville, MD, USA, 345–352, 2019.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Abdel-Aal, E.I., Haroon, A.M., Mofeed, J., (2015), Successive solvent extraction and GC–MS analysis, for the evaluation of the phytochemical constituents of the filamentous green alga *Spirogyra longata*, *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, **41**, 233-246.
- Alexander, J., Benford, D., Cockburn, A., Cravedi, J.P., Dogliotti, E., Di Domenico, A., Fernández-Cruz, M.L., Fürst, P., Fink-Gremmels, J., Galli, C.L., Grandjean, P., Gzyl, J., Heinemeyer, G., Johansson, N., Mutti, A., Schlatter, J., Rolaf van Leeuwen, Van Peteghem, C., Verger, P., (2008), Tropane alkaloids (from *Datura* sp.) as undesirable substances in animal feed, *The EFSA Journal*, **691**, 1–55.
- Ali, H., Saleem, M., Anser, M.R., Khan, S., Ullah, R., Bilal, M., Validation of fluorescence spectroscopy to detect adulteration of edible oil in extra virgin olive oil (EVOO) by applying chemometrics, (2018), *Applied Spectroscopy*, **72**, 1-21.
- Ali, K., Khan, N., Ullah, R., Gul, A., Khan, M.E.H., Jones, D.A., Ashraf, A., (2022), Spatial distribution and invasion potential of the naturalized Downy Thorn Apple (*Datura innoxia*): Evidence from classification and ordination, *Sustainability*, **14**, 10214.
- Ajungla L., Chavan S., Parale A., Ahire M.L., Nikam T.D., (2009), Production of hyoscyamine and scopolamine in shoot and root culture (liquid culture) of *Datura metel* L., *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, **10**, 145-152.
- Amudha, M., Rani, S., (2014), GC-MS Analysis of bioactive components of *Cordia retusa* (Boraginaceae), *Hygeia: Journal for Drugs and Medicines*, **6**, 12-19.

- Aravindhan, V., Rajendran, A., (2014), Diversity of invasive plant species in Boluvampatti forest Range, Southern Western Ghats, India, *Biodiversity Journal*, **5**, 377–386.
- Arslan, F.N., Akin, G., Elmas, Ş.N.K., Yilmaz, I., Janssen, H.G., Kenar, A., (2019), Rapid detection of authenticity and adulteration of cold pressed black cumin seed oil: A comparative study of ATR–FTIR spectroscopy and synchronous fluorescence with multivariate data analysis, *Food Control*, **98**, 323–332.
- Ayuba, V.O., Ojobe, T.O., Ayuba, S.A., (2011), Phytochemical and proximate composition of *Datura innoxia* leaf, seed, stem, pod and root, *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**, 2952–2955.
- Azwanida, N.N., (2015), A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation, *Medicinal & Aromatic Plants*, **4**, 1-6.
- Babiker, F., Jamal, P., Mirghani, M.E.S., Ansari, A.H., (2017), Characterization, purification and identification of some alkaloids in *Datura stramonium*, *International Food Research Journal*, **24**, 540-543.
- Bagewadi, Z. K., Muddapur, U. M., Madiwal, S. S., Mulla, S. I., Khan A., (2019), Biochemical and enzyme inhibitory attributes of methanolic leaf extract of *Datura innoxia* Mill., *Environmental Sustainability*, **2**, 75-84.
- Begum, N.A., Roy, N., Mandal, S., Basu, S., Mandal, D., (2009), Fluorescence spectroscopy of a naturally occurring carbazole alkaloid: murrayanine, *Journal of Luminescence*, **129**, 158-163.
- Berkov, S., Zayed, R., (2004), Comparison of tropane alkaloid spectra between *Datura innoxia* grown in Egypt and Bulgaria, *Zeitschrift für Naturforschung*, **59c**, 184-186.
- CAB International. Available online:
<https://www.cabi.org/isc/datasheet/18004#tosummaryOfInvasiveness> (28 July 2022).
- Carreira-Casais, A., Carpena, M., Pereira, A.G., Chamorro, F., Soria-Lopez, A., Perez, P.G., Otero, P., Cao, H., Xiao, J., Simal-Gandara, J., Prieto, M.A., (2021), Critical variables influencing the ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds—A review, *Chemistry Proceedings*, **5**, 50.
- Chuanxiang F., Ailing H., Kun X., Wencheng Z., (2018), Technology for Extraction and Separation of Scopolamine from Low Content *Datura Metel*, CN Patent, No., 108610339A.
- Chan, T.Y.K., (2017), Worldwide occurrence and investigation of contamination of herbal medicines by tropane alkaloids, *Toxins*, **9**, 284.
- Chavre, B.W., Patil R.K., (2023), Invasive plant species of Maharashtra state: a review, *Sustainability, Agri, Food and Environmental Research*, **11**, 1–8.
- Cinelli, M.A., Jones, A.D., (2021), Alkaloids of the Genus *Datura*: Review of a rich resource for natural product discovery, *Molecules*, **26**, 2629.
- Ciesla, L., Waksmundzka-Hajnos, M., (2009), Two-dimensional thin-layer chromatography in the analysis of secondary plant metabolites, *Journal of Chromatography A*, **1216**, 1035-1052.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.S., Abert-Vian, M., (2017), Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review, *Ultrasonics Sonochemistry*, **34**, 540–560.
- Christen, P., Bieri, S., Berkov, S., (2013), Methods of analysis: tropane alkaloids from plant origin in *Natural Products. Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, Ramawat, K.G., Mérillon, J.M., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Eds., 1016-1023.

- Ciolacu, D., Ciolacu, F., Popa, V.I., (2010), Amorphous Cellulose – Structure and Characterization, *Cellulose Chemistry and Technology*, **45**, 13-21.
- Ciuperca, O.T., Tebrencu, C., Ionescu, E., Iacob, E., Volf, I., (2019), Studies on polyphenols isolated from branches of *Prunus spinosa* L. Species, *Revista de Chimie*, **70**, 2897-2902.
- Dar, P.A., Reshi, Z.A., (2017), Invasive Alien Species (IAS): A less known environmental issue that needs urgent attention, *JK Knowledge Initiative*, **1**, 14.
- Eich, E., (2008), Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites. Biosynthesis, Chemotaxonomy, Biological and Economic Significance, Springer, 164.
- Georgiev, V., Marchev, A., Berkov, S., Pavlov, A., (2013), Plant in vitro systems as sources of tropane alkaloids, in *Natural Products. Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, Ramawat, K.G., Mérillon, J.M., Eds., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 174-180.
- Henderson, L., (2022), Invasive Alien Plants in South Africa, Publisher Novus Print, South Africa, pp. 62–319. Available online: https://wwfafrica.awsassets.panda.org/downloads/invasive_alien_plants_in_south_africa.pdf (accessed on 5 September 2022).
- Hostettmann, K., Wolfender, J.L., Terreaux, C., (2001), Modern screening techniques for plant extracts, *Pharmaceutical Biology*, **39**, 18-32.
- Houck, M.M., Siegel, J.A., (2010), Fundamentals of Forensic Science, Elsevier.
- Jakabova, S., Vincze, L., Farkas, A., Kilar, F., Boros, B., Felinger, A., (2012), Determination of tropane alkaloids atropine and scopolamine by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry in plant organs of *Datura* species, *Journal of Chromatography A*, **1232**, 295-301.
- Ji, H., Fannin, F., Klotz, J., Bush, L., (2014), Tall Fescue seed extraction and partial purification of ergot alkaloids, *Frontiers in Chemistry*, **2**, 1-7.
- Kapadia, P., Newell, A.S., Cunningham, J., Roberts, M.R., Hardy, J.G., (2022), Extraction of high-value chemicals from plants for technical and medical applications, *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, 10334.
- Kobisi, K., Seleteng-Kose, L., Moteetee, A., (2019), Invasive alien plants occurring in Lesotho: Their ethnobotany, potential risks, distribution and origin, *African Biodiversity & Conservation (Bothalia)*, **49**, 1–11.
- Kowalski, M., Kowalska, K., Wiszniowski, J., Turek-Szytow, J., (2018), Qualitative analysis of activated sludge using FT-IR technique, *Chemical Papers*, **72**, 2699-2706.
- Kumar, S., (2016), Analytical Techniques for Natural Product Research, CABI, Londra, 5 - 17.
- Lazar, L., Talmaciu, A.I., Volf, I., Popa, V.I., (2016), Kinetic modeling of the ultrasound-assisted extraction of polyphenols from *Picea abies* bark, *Ultrasonics Sonochemistry*, **32**, 191-197.
- Lattanzio, V., (2013), Phenolic compounds: introduction in *Natural Products. Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, Ramawat, K.G., Mérillon, J.M., Eds., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1546.
- Li M., Shan M., Guanlei W., Jiazhong Y., Zheng Z., (2018), Extracting Method for Hyoscyamine and Scopolamine in Prescription Preparation, CN Patent, No., 108997330A.
- Li, Y., Kong, D., Wu, H., (2013), Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC–MS and FTIR spectroscopy, *Industrial Crops and Products*, **41**, 269-278.
- Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M.R., Wu, H., (2020), The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants, *Plant Physiology and*

Biochemistry, **148**, 80-89.

- Liang, X., Jin, Y., Wang, Y., Jin, G., Fu, Q., Xiao, Y., (2009), Qualitative and quantitative analysis in quality control of traditional Chinese medicines, *Journal of Chromatography A*, **1216**, 2033–2044.
- Lyimo, J.G., Kangalawe, R.Y.M., Liwenga, E.T., (2009), Status, impact and management of invasive alien species in Tanzania, *Tanzania Journal of Forestry and Nature Conservation*, **79**, 1–15.
- Maema, L.P., Potgieter, M., Mahlo, S.M., (2016), Invasive alien plant species used for the treatment of various diseases in Limpopo province, south Africa, *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, **13**, 223–231.
- Mandal, S.C., Mandal, V., Das, A.K., (2015), Essentials of Botanical Extraction. Principles and Applications, Elsevier, pp.80-123.
- Mardare (Balusescu), G., Malutan, T., (2019), Secondary metabolites from plants: the thin border between beneficent and harmful, Proc. 12th Int. RAIS Conf. On Social Sciences & Humanities, Princeton, New Jersey, United States of America, 293-299.
- Mardare (Balusescu), G., Lazar, L., Volf, I., Malutan, T., Hyoscine extraction from *Datura innoxia* biomass and analysis by spectrophotometric and fluorescence methods, *International Conference on Progress in Organic and Macromolecular Compounds 28th edition, MACROIasi2021*, Petru Poni Institute of Macromolecular Chemistry, Iasi, prezentare orală, 7-9 October, 2021 (Book of abstract).
- Mardare (Balusescu), G., Malutan, T., Lazar, L., (2020), Determination of scopolamine by gas chromatography from different parts of the *Datura innoxia* biomass, *Revista de Chimie*, **71**, 126-136.
- Mardare (Balusescu) G., Lazar L., Malutan T., (2022 a), Spectroscopic investigation and chemical fingerprint of *Datura innoxia* dry biomass, *Comptes Rendus Chimie*, **25**, 227–235.
- Mardare (Balusescu) G., Lazar L., Malutan T., (2022 b), Potential Application of invasive plant species *Datura innoxia* for the scopolamine extracts of the plant organs and analysis using UV–VIS Spectrophotometry, *Forest*, **13**, 1555.
- Naima, R., Oumam, M., Hannache, H., Sesbou, A., Charrier, B., Pizzi, A., Charrier - El Bouhtoury, F., (2015), Comparison of the impact of different extraction methods on polyphenols yields and tannins extracted from Moroccan *Acacia mollissima* barks, *Industrial Crops and Products*, **70**, 245-252.
- Nandakumar, A., Vaganan, M.M., Sundararaju, P., Udayakumar, R., (2017), Phytochemical analysis and nematocidal activity of ethanolic leaf extracts of *Datura metel*, *Datura innoxia* and *Brugmansia suaveolens* against *Meloidogyne incognita*, *Asian Journal of Biology*, **2**, 1–11.
- Naumann, A., Kurtze, L., Krähmer, A., Hagels, H., Schulz, H., (2014), Discrimination of Solanaceae Taxa and Quantification of Scopolamine and Hyoscyamine by ATR-FTIR Spectroscopy, *Planta Medica*, **80**, 1315–1320.
- Patle, T.K., Shrivastava, K., Kurrey, R., Upadhyay, S., Jangde, R., Chauhan, R., (2020), Phytochemical screening and determination of phenolics and flavonoids in *Dillenia pentagyna* using UV–vis and FTIR spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **242**, 118717.
- Pawliszyn, J., (2012), Comprehensive Sampling and Sample Preparation Analytical Techniques for Scientists, Elsevier, Oxford, UK, 597–1826.

- Pătrăuțanu, O.A., Ciupercă, O.T., Popa, V., Volf, I., (2020), Contributions on Spruce bark polyphenols identification using instrumental (UV-VIS Spectrometry), qualitative (Thin Layer Chromatography) and quantitative (HPTLC Densitometry) methods, *Revista de Chimie*, **71**, 39-45.
- Pânzariu, A.E., Măluțan, T., Mangalagiu, I., (2014), The hydrolysis of cellulosic materials in ionic liquids, *BioResources*, **9**, 282-292.
- Pengpeng C., Tianyun C., Ailing H., Zeyu W., Kun X., Wencheng Z., (2018), Ultrasonic Cooperative Magnetic Field Enhanced Solvent Extraction and Liquid-Liquid Extraction Hyoscyne Separation Method, CN Patent, No., 109081838A.
- Ping L., Huipeng, S., Lifan T., Hong W., Xiao'ai Z., (2017), Identification Method of Datura Flower Medicinal Materials, CN Patent, No., 106770037A.
- Plank K.H., Wagner K.G., (1986), Determination of hyoscyamine and scopolamine in *Datura innoxia* plants by high performance liquid chromatography, *Zeitschrift für Naturforschung*, **41c**, 391-395.
- Salam, A., Lyles, J., Quave, C., (2019), Methods in the Extraction and Chemical Analysis of Medicinal Plants, in *Methods and Techniques in Ethnobiology and Ethnoecology*, Albuquerque, U.P., Paiva de Lucena, R.F., Cruz da Cunha, L.V.F., Alves, R.R.N., Eds., Humana Press.
- Sanz, J., (2009), Theoretical considerations in *Comprehensive Analytical Chemistry*, Barcelo, D., Ed., vol. 55, Elsevier.
- Shahbaz, F., Akhter, N., Shahid, M., Riaz, M., Anjum, F., Hussain, F., (2022), Ultrasound assisted extraction and characterization of bioactives from *Verbascum thapsus* Roots to evaluate their antioxidant and medicinal potential, *Dose-Response*, **20**, 1–14.
- Schulz, H., Baranska, M., (2007), Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy*, **43**, 13-25.
- Sennikov, A., Lazkov, G., (2022), The first checklist of alien vascular plants of Kyrgyzstan, with new records and critical evaluation of earlier data. Contribution 2, *British Dental Journal*, **10**, 80804.
- Shah, P., Makhambera, L., (2019), Impacts of plant invasive species on local farming communities around Mulanje Mountain Forest Reserve, Malawi, *Journal of Sustainability, Environment and Peace*, **1**, 68–75.
- Sharm, M., Dhaliwal, I., Rana, K., Delta, A.K., Kaushik, P., (2021), Phytochemistry, pharmacology, and toxicology of *Datura* species—A review, *Antioxidants*, **10**, 1291.
- Sramska, P., Maciejka, A., Topolewska, A., Stepnowski, P., Halinski, P.L., (2017), Isolation of atropine and scopolamine from plant material using liquid-liquid extraction and extrelut® columns, *Journal of Chromatography B*, **1043**, 202-208.
- Srivastava, S., Dvivedi, A., Shukla, R.P., (2014), Invasive alien species of terrestrial vegetation of North-Eastern Uttar Pradesh, *International Journal of Forestry Research*, 1–9.
- Standard-Specific Interst Group Tappi - T 204 cm-07, 2007 (1-4).
- Szymanska-Chargot, M., Zdunek, A., (2013), Use of FT-IR Spectra and PCA to the Bulk Characterization of Cell Wall Residues of Fruits and Vegetables Along a Fraction Process, *Food Biophysics*, **8**, 29–42.
- Tamiru, G., (2017), Invasive alien weed species distribution, impacts on agriculture, challenge and reaction in Ethiopia: A Review. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, **7**, 136–146.

- Tarhan, I., (2020), A comparative study of ATR-FTIR, UV–visible and fluorescence, spectroscopy combined with chemometrics for quantification of squalene in extra virgin olive oils, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **241**, 118714.
- Thiruchenduran, S., Maheswari, K.U., Prasad, T.N.V.K.V., Rajeswari, B., Suneetha, W.J., (2017), UV-Vis scanning coupled with PCA as an alternative method for phytochemical screening of natural products – *Costus Igneus* leaf metabolites, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, **6**, 411-416.
- Tiwari, B.K., (2015), Ultrasound: A clean, green extraction technology, *Trends in Analytical Chemistry*, **71**, 100–109.
- Topală, C.M., Tătaru, L.D, Ducu C., (2017), ATR-FTIR Spectra Fingerprinting of Medicinal Herbs Extracts Prepared Using Microwave Extraction, *Arabian Journal of Medicinal & Aromatic Plants*, **3**, 1-9.
- Verma, N., Shukla, S., (2015), Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites, *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, **2**, 105–113.
- Vinatoru, M., Mason, T.J., Calinescu, I., (2017), Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials, *Trends in Analytical Chemistry*, **97**, 159-178.
- Xiang, B., Zhou, X., Qin, D., Li, C., Xi, J., (2022), Infrared assisted extraction of bioactive compounds from plant materials: Current research and future prospect, *Food Chemistry*, **371**, 131192.
- Xu, F., Yu, J., Tesso, T., Dowell, F., Wang, D., (2013), Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review, *Applied Energy*, **104**, 801–809.
- Yisak, H., Redi-Abshiro, M., Chandravanshi, B.S., (2018), New fuorescence spectroscopic method for the simultaneous determination of alkaloids in aqueous extract of green cofee beans, *Chemistry Central Journal*, **12**, 59.
- Wink, M., (2011), Occurrence and function of natural products in plants, *Phytochemistry and Pharmacognosy in Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*, Eolss Publishers, Oxford.
- Witt, A., Beale, T., van Wilgen, B.W., (2018), An assessment of the distribution and potential ecological impacts of invasive alien plant species in eastern Africa, *Transactions of the Royal Society of South Africa*, **73**, 217–236.
- Zavoi, S., Fetea, F., Ranga, F., Pop, R.M., Baciuc, A., Socaciu, C., (2011), Comparative Fingerprint and Extraction Yield of Medicinal Herb Phenolics with Hepatoprotective Potential, as Determined by UV-Vis and FT-MIR Spectroscopy, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, **39**, 82-89.
- Zakzeski, J., Bruijninx, P.C.A., Jongerius, A.L., Weckhuysen, B.M., (2010), The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals, *Chemical reviews*, **110**, 2010.
- Zeng, Q.H., Zhao, J.B., Wang, J.J., Zhang, X.W., Jiang, J.G., (2016), Comparative extraction processes, volatile compounds analysis and antioxidant activities of essential oils from *Cirsium japonicum* Fisch. Ex DC and *Cirsium setosum* (Willd.) M.Bieb, *LWT - Food Science and Technology*, **68**, 595-605.