

EXTRACTE VEGETALE CU APLICAȚII ÎN AGRICULTURĂ ȘI INDUSTRIA ALIMENTARĂ

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător de doctorat

Prof.Dr.Habil.Ing. Daniela ȘUTEU

Doctorand

Ing. Gabriel Mihăiță DARABAN

IAȘI, 2024

Formularul PO.CSUD.01-F9

UNIVERSITATEA TEHNICĂ “GHEORGHE ASACHI” DIN IAȘI
R E C T O R A T U L

Către

Vă facem cunoscut că, în ziua de 08.07.2024 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:

**“EXTRACTE VEGETALE CU APLICAȚII ÎN AGRICULTURĂ ȘI
INDUSTRIA ALIMENTARĂ”**

elaborate de domnul **DARABAN GABRIEL MIHĂIȚĂ** în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

- | | |
|---|------------------------|
| 1. Prof. univ. dr. ing. Măluțan Teodor | președinte |
| Universitatea Tehnica Gheorghe Asachi din Iași | |
| 2. Prof.univ. dr. habil. ing. Șuteu Daniela | conducător de doctorat |
| Universitatea Tehnica Gheorghe Asachi din Iași | |
| 3. Prof. univ. dr. chim. Trincă Lucia-Carmen | referent oficial |
| Universitatea pentru Științele Vieții „Ion Ionescu de la Brad” din Iași | |
| 4. Conf. univ. dr. habil. Rusu Lăcrămioara | referent oficial |
| Universitatea „Vasile Alecsandri” din Bacău | |
| 5. Conf. univ. dr. ing. Blaga Alexandra-Cristina | referent oficial |
| Universitatea Tehnica Gheorghe Asachi din Iași | |

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

RECTOR,
Prof. univ. dr. ing. Dan Cașcaval

Secretar universitate,
Ing. Cristina Nagîț

MULȚUMIRI

Realizarea acestei teze de doctorat mi-a oferit prilejul de a-mi testa limitele în domeniul științific prin provocările și realizările pe care le-am experimentat, pe parcursul elaborării sale, cu sprijinul mentorilor care mi-au îndrumat pașii spre succes și cărora le sunt profund recunoscător.

Doresc să exprim respectul și recunoștința conducătorului științific, doamna Prof.univ. dr. habil. ing. Daniela Șuteu pentru fundamentarea științifică, sprijinul și îndrumarea în elaborarea acestei teze care, prin înalt grad profesional și dăruire, a contribuit la formarea mea și la finalizarea acestei lucrări.

Deosebită grațitudine datorez membrilor comisiei de îndrumare: Conf. univ. dr. habil. Lăcrămioara Rusu, Conf. univ. dr. ing. Carmen Zaharia și Șef lucrări dr. Marinela Bădeanu, pentru sfaturile științifice valoroase oferite pe parcursul elaborării tezei de doctorat, dar și pentru bunăvoința, sprijinul și amabilitatea cu care au contribuit când am avut nevoie de expertiză și îndrumare.

Mulțumesc distinșilor referenți din Comisia de evaluare și susținere a tezei de doctorat: Prof. univ. dr. ing. Teodor Măluțan, Prof. univ. dr. chim. Lucia-Carmen Trincă, Conf. univ. dr. habil. Lăcrămioara Rusu și Conf. univ. dr. ing. Alexandra Blaga, pentru răbdarea cu care au analizat lucrarea de față, precum și pentru sugestiile formulate.

Aș dori să-mi exprim recunoștința domnișoarei Șef lucrări dr. ing. Raluca-Maria Hlihor, domnului Șef lucrări dr. ing. Adrian Cătălin Puițel și doamnei Șef lucrări dr. ing. Ramona Elena Tătaru-Farmus, pentru îndrumarea științifică, profesionalismul și sprijinul moral acordat.

În cele din urmă, dar nu în ultimul rând, doresc să le mulțumesc membrilor familiei pentru sprijinul, răbdarea și înțelegerea acordată pe parcursul acestei perioade.

Dedic această teză de doctorat fiului meu, Luca, cu toată dragostea!

CUPRINS

INTRODUCERE.....	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIUL UTILIZĂRII EXTRACTELOR VEGETALE ÎN AGRICULTURĂ ȘI INDUSTRIA ALIMENTARĂ.....	7
CAPITOLUL 1. Pesticide vs. biopesticide: stadiul actual al cercetărilor, caracteristici generale, impact și aplicații pentru controlul dăunătorilor și protecția mediului înconjurător.....	8
1.1. Rolul pesticidelor de sinteză în protecția dăunătorilor și impactul asupra mediului înconjurător.....	8
1.1.1. Scurt istoric, definire și utilizare.....	8
1.1.2. Impactul pesticidelor asupra mediului înconjurător și sănătății umane.....	12
1.2. Biopesticide: alternativă la pesticidele de sinteză și integrarea acestora în agricultura sustenabilă.....	16
1.2.1. Scurt istoric.....	16
1.2.2. Definirea biopesticidelor.....	17
1.2.3. Potențialul biopesticidelor și aplicabilitatea lor.....	18
1.3. Clasificarea, proprietățile fizico-chimice și modul de acțiune al biopesticidelor.....	20
1.3.1. Pesticide microbiene.....	21
1.3.1.1. Bacterii.....	23
1.3.1.2. Fungi.....	24
1.3.1.3. Virusuri.....	25
1.3.1.4. Protozoare.....	26
1.3.2. Pesticide biochimice.....	26
1.3.2.1. Pesticide botanice.....	26
1.3.2.2. Regulatori de creștere ai insectelor (IGR).....	28
1.3.2.3. Regulatori de creștere ai plantelor (PGR).....	28
1.3.2.4. Minerale.....	29
1.3.2.5. Semiochimicale.....	30

1.3.3. Pesticide macrobiene.....	31
1.3.4. Protectori încorporați în plante (PIPs).....	34
1.4. Provocări în adoptarea biopesticidelor.....	35
1.4.1. Managementul Integrat al Dăunătorilor.....	35
1.4.2. Avantaje și dezavantaje ale utilizării biopesticidelor.....	36
1.4.3. Înregistrarea produselor naturale ca agenți de protecție a culturilor.....	38
1.5. Concluzii.....	39
Bibliografie.....	42
 CAPITOLUL 2. Extracte vegetale: aplicații în agricultură și industria alimentară.....	 53
2.1. Metode de extracție solid-lichid.....	53
2.1.1. Stabilirea solvenților de extracție.....	54
2.1.2. Metode convenționale de extracție solid-lichid.....	57
2.1.2.1. Macerarea.....	57
2.1.2.2. Digestia.....	57
2.1.2.3. Decocția.....	57
2.1.2.4. Infuzia și percolarea.....	58
2.1.2.5. Extracția Soxhlet.....	58
2.1.3. Metode moderne de extracție solid-lichid	59
2.1.3.1. Extracția accelerată cu solvent (ASE).....	59
2.1.3.2. Extracția asistată de microunde (MAE).....	59
2.1.3.3. Extracția asistată de ultrasunete (UAE).....	61
2.1.3.4. Extracția cu fluide supercritice (SFE).....	62
2.1.3.5. Extracția asistată de enzime (EAE).....	63
2.1.3.6. Extracția cu apă caldă sub presiune (PHWE).....	64
2.2. Caracterizarea calitativă și cantitativă a extractelor vegetale.....	65
2.3. Extracte vegetale: noua generație de compuși cu acțiune biopesticidă.....	79
2.4. Aplicații ale extractelor vegetale în industria alimentară.....	96
2.5. Concluzii.....	104
Bibliografie.....	106

CONTRIBUȚII PERSONALE.....	119
CAPITOLUL 3. Materiale și metode utilizate.....	120
3.1. Scopul și importanța cercetării.....	120
3.2. Speciile de plante din flora spontană utilizate în studiile experimentale: amplasament și identificare.....	121
3.2.1. Descrierea amplasamentului pentru selecția materialului vegetal.....	121
3.2.2. Selecția și identificarea speciilor de plante.....	122
3.2.2.1. Ciuboțica cucului (<i>Primula veris</i> L.).....	126
3.2.2.2. Oregano/Sovârf (<i>Origanum vulgare</i> L.).....	127
3.2.2.3. Pelin (<i>Artemisia absinthium</i> L.).....	128
3.2.2.4. Coadă șoricelului (<i>Achillea millefolium</i> L.).....	129
3.3. Dăunători considerați în studiul experimental: colectare și descriere.....	129
3.3.1. Gândacul din Colorado (<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say).....	129
3.3.1.1. Scurt istoric privind evoluția speciei.....	129
3.3.1.2. Evoluția larvară și rezistența la pesticide.....	130
3.3.2. Gărgărița fasolei (<i>Acanthoscelides obtectus</i> Say).....	133
3.3.2.1. Scurt istoric privind evoluția speciei.....	133
3.3.2.2. Descriere și evoluție larvară.....	134
3.4. Reactivii și aparatura utilizate în studiile experimentale.....	136
3.5. Metode de extracție utilizate în studiile experimentale.....	137
3.5.1. Pregătirea materialului vegetal pentru extracție.....	137
3.5.2. Obținerea extractelor vegetale prin macerare.....	138
3.5.3. Obținerea extractelor vegetale prin refluxare în extractorul Soxhlet.....	138
3.5.4. Obținerea extractelor vegetale prin extracție asistată de ultrasunete.....	140
3.5.5. Obținerea extractelor vegetale prin combinarea metodelor extracție asistată de ultrasunete și macerare.....	141
3.6. Evaluarea activității antioxidante a extractelor vegetale.....	141
3.6.1. Determinarea conținutului total de polifenoli din extractele vegetale.....	141
3.6.2. Determinarea conținutului total de flavonoide din extractele vegetale.....	141
3.7. Caracterizarea fizico-chimică a extractelor vegetale.....	142
3.7.1. Caracterizarea senzorială a extractelor vegetale.....	142
3.7.2. Determinarea conținutului de apă specific speciilor de plante studiate	142
3.7.3. Determinarea vâscozității extractelor vegetale obținute.....	142
3.7.4. Determinarea grupărilor funcționale ale compușilor din extractele vegetale	

cu ajutorul metodelor spectrofotometrice UV-VIS și FTIR.....	143
3.8. Evaluarea activității bioinsecticide a extractelor vegetale.....	143
3.8.1. Evaluarea activității bioinsecticide a extractelor vegetale asupra dăunătorilor din specia <i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say.....	143
3.8.2. Evaluarea activității bioinsecticide a extractelor vegetale asupra dăunătorilor din specia <i>Acanthoscelides obtectus</i> Say.....	144
3.9. Modelarea analitică a gradului de supraviețuire a dăunătorilor de cultură și depozit în condițiile tratamentelor cu biopesticide.....	145
3.10. Concluzii.....	147
Bibliografie.....	148
 CAPITOLUL 4. Evaluarea și caracterizarea extractelor vegetale obținute din flora spontană autohtonă prin metode de extracție clasice și moderne.....	
4.1. Scopul și importanța cercetării.....	151
4.2. Studiul factorilor care influențează procesul de extracție din plante, din flora spontană autohtonă prin diferite metode de extracție.....	154
4.2.1. Influența raportului solid/lichid (S/L) asupra gradului de extracție.....	154
4.2.1.1. Influența raportului S/L asupra gradului de extracție în cazul macerării.....	154
4.2.1.2. Influența raportului S/L asupra gradului de extracție în cazul refluxării în instalația Soxhlet.....	155
4.2.1.3. Influența raportului S/L asupra gradului de extracție în cazul extracției asistată de ultrasunete.....	156
4.2.1.4. Influența raportului S/L asupra gradului de extracție în cazul metodei combinate: extracție asistată de ultrasunete și macerare.....	160
4.2.2. Influența timpului de extracție asupra gradului de extracție.....	161
4.2.2.1. Influența timpului de extracție asupra gradului de extracție în cazul refluxării în instalația Soxhlet.....	161
4.2.2.2. Influența timpului de extracție asupra gradului de extracție în cazul extracției asistată de ultrasunete.....	163
4.2.2.3. Influența timpului de extracție asupra gradului de extracție în cazul metodei combinate extracției asistată de ultrasunete și macerare....	166
4.2.3. Influența concentrației solventului asupra gradului de extracție.....	167
4.2.3.1. Influența concentrației solventului asupra gradului de extracție în cazul macerării.....	167

4.2.3.2. Influența concentrației solventului asupra gradului de extracție în cazul refluxării în instalația Soxhlet.....	168
4.2.3.3. Influența concentrației solventului asupra gradului de extracție în cazul extracției asistată de ultrasunete.....	169
4.2.3.4. Influența concentrației solventului asupra gradului de extracție în cazul metodei combinate: extracției asistată de ultrasunete și macerare.....	170
4.3. Conținutul total de polifenoli din extractele vegetale obținute prin diferite metode de extracție în funcție de factorii de influență.....	171
4.3.1. Influența raportului solid/lichid (S/L) asupra conținutului total de polifenoli.....	171
4.3.1.1. Influența raportului S/L asupra conținutului total de polifenoli în cazul extractelor obținute prin macerare	171
4.3.1.2. Influența raportului S/L asupra conținutului total de polifenoli din extractele obținute prin refluxare în instalația Soxhlet	172
4.3.1.3. Influența raportului S/L asupra conținutului total de polifenoli în cazul în cazul extractelor obținute prin extracție asistată de ultrasunete.....	173
4.3.1.4. Influența raportului S/L asupra conținutului total de polifenoli în cazul extractelor obținute prin extracție asistată de ultrasunete combinată cu macerare.....	177
4.3.2. Influența timpului de extracție asupra conținutului total de polifenoli.....	178
4.3.2.1. Influența timpului de extracție asupra conținutului total de polifenoli din extractele obținute prin refluxare în instalația Soxhlet	178
4.3.2.2. Influența timpului de extracție asupra conținutului total de polifenoli din extractele obținute prin extracție asistată de ultrasunete ...	179
4.3.2.3. Influența timpului de extracție asupra conținutului total de polifenoli din extractele obținute prin metoda combinată: extracție asistată de ultrasunete - macerare	183
4.4. Conținutul total de flavonoide din extractele vegetale obținute prin diferite metode de extracție în funcție de factorii de influență.....	184
4.4.1. Influența raportului solid/lichid (S/L) asupra conținutului total de flavonoide.....	184
4.4.1.1. Influența raportului S/L asupra conținutului total de flavonoide din extractele obținute prin macerare	184
4.4.1.2. Influența raportului S/L asupra conținutului total de flavonoide din extractele obținute prin refluxare în instalația Soxhlet	185

4.4.1.3. Influența raportului S/L asupra conținutului total de flavonoide din extractele obținute prin extracție asistată de ultrasunete	187
4.4.1.4. Influența raportului S/L asupra conținutului total de flavonoide din extractele obținute prin metoda combinată: extracție asistată de ultrasunete – macerare.....	191
4.4.2. Influența timpului de extracție asupra conținutului total de flavonoide.....	193
4.4.2.1. Influența timpului de extracție asupra conținutului total de flavonoide din extractele obținute prin refluxare în instalația Soxhlet	193
4.4.2.2. Influența timpului de extracție asupra conținutului total de flavonoide din extractele obținute prin extracție asistată de ultrasunete	194
4.4.2.3. Influența timpului de extracție asupra conținutului total de flavonoide din extractele obținute prin metoda combinată: extracției asistată de ultrasunete - macerare	199
4.5. Caracterizarea fizico-chimică a extractelor vegetale obținute prin diferite metode de extracție.....	200
4.5.1. Caracterizarea extractelor vegetale prin analiză senzorială.....	200
4.5.2. Determinarea vâscozității extractelor vegetale obținute.....	201
4.5.3. Caracterizarea fizico-chimică cu ajutorul metodelor UV-VIS și FTIR a extractelor vegetale și a materialului solid utilizat și rezultat.....	201
4.5.3.1. Analiza și caracterizarea spectrelor UV-VIS.....	201
4.5.3.2. Analiza și caracterizarea spectrelor FTIR.....	207
4.6. Concluzii.....	219
Bibliografie.....	223
CAPITOLUL 5. Evaluarea activității bioinsecticide a extractelor vegetale obținute din flora spontană autohtonă asupra dăunătorilor de cultură și depozit.....	226
5.1. Scopul și importanța cercetării.....	226
5.2. Evaluarea activității bioinsecticide a extractelor obținute prin macerare.....	228
5.2.1. Studii preliminare privind evaluarea activității bioinsecticide a extractelor obținute prin macerare asupra dăunătorilor de cultură.....	228
5.2.2. Studii preliminare privind evaluarea activității bioinsecticide a extractelor obținute prin macerare asupra dăunătorilor de depozit.....	236
5.3. Evaluarea activității bioinsecticide a extractelor obținute prin refluxare în instalația Soxhlet.....	241

5.3.1. Evaluarea activității bioinsecticide a extractelor obținute prin refluxare în instalația Soxhlet asupra dăunătorilor de cultură.....	241
5.3.2. Evaluarea activității bioinsecticide a extractelor obținute prin refluxare în instalația Soxhlet asupra dăunătorilor de depozit.....	247
5.4. Evaluarea activității bioinsecticide a extractelor obținute prin extracție asistată de ultrasunete.....	249
5.4.1. Evaluarea activității bioinsecticide a extractelor obținute prin extracție asistată de ultrasunete asupra dăunătorilor de cultură.....	249
5.4.2. Evaluarea activității bioinsecticide a extractelor obținute prin extracție asistată de ultrasunete asupra dăunătorilor de depozit.....	252
5.5. Evaluarea activității bioinsecticide a extractelor obținute în urma metodei combinate: extracție asistată de ultrasunete și macerare.....	256
5.5.1. Evaluarea activității bioinsecticide a extractelor obținute prin metoda combinată: extracție asistată de ultrasunete și macerare asupra dăunătorilor de cultură.....	256
5.5.2. Evaluarea activității bioinsecticide a extractelor obținute prin metoda combinată: extracție asistată de ultrasunete și macerare asupra dăunătorilor de depozit.....	259
5.6. Modelarea analitică a gradului de supraviețuire a dăunătorilor de cultură și depozit în condițiile tratamentelor cu biopesticide.....	263
5.6.1. Modelarea analitică a gradului de supraviețuire a dăunătorilor după aplicarea tratamentelor pe bază de extracte obținute prin metoda macerării.....	264
5.6.1.1. Modelarea analitică a gradului de supraviețuire a dăunătorilor de cultură după aplicarea tratamentelor pe bază de extracte obținute prin metoda macerării.....	266
5.6.1.2. Modelarea analitică a gradului de supraviețuire a dăunătorilor de depozit după aplicarea tratamentelor pe bază de extracte obținute prin metoda macerării.....	266
5.6.2. Modelarea analitică a gradului de supraviețuire a dăunătorilor după aplicarea tratamentelor pe bază de extracte obținute prin refluxare în instalația Soxhlet.....	268
5.6.2.1. Modelarea analitică a gradului de supraviețuire a dăunătorilor de cultură după aplicarea tratamentelor pe bază de extracte obținute prin refluxare în instalația Soxhlet.....	268

5.6.2.2. Modelarea analitică a gradului de supraviețuire a dăunătorilor de depozit după aplicarea tratamentelor cu extracte obținute prin refluxare în instalația Soxhlet.....	271
5.6.3. Modelarea analitică a gradului de supraviețuire a dăunătorilor după aplicarea tratamentelor pe bază de extracte obținute prin extracție asistată de ultrasunete.....	273
5.6.3.1. Modelarea analitică a gradului de supraviețuire a dăunătorilor de cultură după aplicarea tratamentelor pe bază de extracte obținute prin extracție asistată de ultrasunete.....	273
5.6.3.2. Modelarea analitică a gradului de supraviețuire a dăunătorilor de depozit după aplicarea tratamentelor pe bază de extracte obținute prin extracție asistată de ultrasunete.....	276
5.6.4. Modelarea analitică a gradului de supraviețuire a dăunătorilor după aplicarea tratamentelor pe bază de extracte obținute prin metoda combinată: extracție asistată de ultrasunete și macerare.....	278
5.6.4.1. Modelarea analitică a gradului de supraviețuire a dăunătorilor de cultură după aplicarea tratamentelor pe bază de extracte obținute prin metoda combinată: extracție asistată de ultrasunete și macerare.....	278
5.6.4.2. Modelarea analitică a gradului de supraviețuire a dăunătorilor de depozit după aplicarea tratamentelor pe bază de extracte obținute prin metoda combinată: extracție asistată de ultrasunete și macerare.....	282
5.7. Concluzii.....	285
Bibliografie.....	293
 ANEXA 1. ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ.....	 303
ANEXA 2. LISTA FIGURILOR.....	307
ANEXA 3. LISTA TABELELOR.....	317

Notă: În rezumatul tezei de doctorat se prezintă într-o formă succintă introducerea, materialele și metodele de cercetare și o parte din rezultatele originale obținute, concluziile generale și bibliografia selectivă. La redactarea rezumatului s-au păstrat notațiile și numerotarea pentru capitolele, paragrafele, figurile și tabelele utilizate în cadrul tezei de doctorat.

INTRODUCERE

Din cele mai vechi timpuri preocuparea privind cultivarea, întreținerea culturilor și stocarea produselor cerealiere și, în consecință, grija pentru sănătatea umană și a mediului înconjurător, au reprezentat preocupări cotidiene. Mijloacele prin care se realiza acest proces erau limitate, dar naturale, creând contextul utilizării plantelor din flora spontană pentru menținerea sănătății, dar și pentru combaterea dăunătorilor de cultură și depozit.

Se estimează că pe planeta Pământ ar exista aproximativ 250.000 - 500.000 de specii de plante (Dekebo, 2019), dintre acestea 1-10% fiind folosite ca hrană și medicament de către oameni și alte ființe vii (Almodaifer et al., 2017). Potrivit Uniunii Internaționale pentru Conservarea Naturii și Fondului Mondial pentru Natură, există între 50.000 și 80.000 de specii de plante cu flori folosite în scopuri medicinale în întreaga lume. Dintre acestea, aproximativ 15.000 de specii sunt amenințate cu dispariția din cauza recoltării excesive și a distrugerii habitatului, iar 20 % din resursele sălbatice au fost deja aproape epuizate din cauza creșterii populației umane și a consumului de plante (Chen et al., 2016). Conform estimărilor, flora României atinge 3795 de specii și subspecii de plante superioare, dintre care 3136 sunt specii de plante din flora spontană (Șandru, 2021).

Teritoriul României, oferă un număr relativ mare de specii de plante cunoscute la nivel mondial, multe dintre acestea având pe lângă aplicabilitate în tratamentele medicale și potențial insecticid, ceea ce deschide noi oportunități pentru potențialul tratament biopesticid. Compușii naturali din plante (de exemplu, extractele vegetale) au fost utilizați ca pesticide naturale (biopesticide) încă din cele mai vechi timpuri (Daraban et al., 2021b, 2021a; Suteu et al., 2020).

Speciile plantelor din flora spontană considerate în cadrul tezei de doctorat cu titlul „Extracte vegetale cu aplicații în agricultură și industrie alimentară” au fost alese după patru considerente: (1) primul principiu a fost perioada de apariție a speciilor perene care apar înaintea culturilor pe care urmează să le protejeze; (2) un alt principiu a fost disponibilitatea acestora din abundență în anumite zone și faptul că fiind specii autohtone nu cauzează un dezechilibru ecosistemului; (3) cel de-al treilea criteriu a fost acela conform căruia compoziția chimică a acestor plante nu afectează culturile sau produsele agricole care urmează a fi păstrate; și (4) cel de-al patru-lea principiu a fost punerea în valoare a unor specii din flora spontană autohtonă cu potențial insecticid neevindențiat în literatură.

Se cunoaște interesul actual de substituie al pesticidelor de sinteză cu metode alternative ce se bazează pe ținerea sub control a dăunătorilor de cultură

și depozit (așa cum sunt cei din speciile *Leptinotarsa decemlineata* Say - gândacul din Colorado - și *Acanthoscelides obtectus* Say - gărgărița fasolei). În acest sens, specii de plante din flora spontană autohtonă care nu au fost studiate în profunzime sau care necesită studii complexe privind modul de acțiune în vederea combaterii dăunătorilor, dar care sunt totuși cunoscute pentru caracteristicile lor medicinale (*Origanum vulgare* L., *Primula veris* L., *Artemisia absinthium* L., *Achillea millefolium* L.), au fost evaluate în cadrul studiilor din prezenta teză de doctorat. Aceste specii de plante pot fi utilizate ca un element constituent în conceptul de agricultură durabilă, prin potențialul insecticid pe care îl prezintă.

Literatura de specialitate prezintă studii ce au în vedere compoziția chimică a multor specii de plantele din flora spontană, atenția fiind totuși canalizată către efectele medicinale, ignorându-se potențialul insecticid. Din punct de vedere economic utilizarea plantelor din flora spontană reprezintă o soluție avantajoasă, deoarece nu necesită cultivare sau întreținere, ci doar recoltare și procesare pentru obținerea de extracte pulverizabile.

Figura 1 propune o evaluare a numărului de articole (a) comparativ cu procentul de articole din numărul total de articole (b) din literatura de specialitate ce identifică articolele științifice care raportează termenul „biopesticide” în raport cu cele care evidențiază termenii „bioinsecticide”; „insecticide botanice”; „bioinsecticide”; „extracte din plante” în perioada 2012-2022. Baza de date PubMed® a fost aleasă pentru a selecta publicațiile bibliografice care acoperă obiectivele acestei teze de doctorat. Articolele care au fost considerate adecvate, au fost incluse pe baza titlului și a rezumatului, iar dacă nu îndeplineau toate criteriile de eligibilitate, a fost examinat textul integral pentru o evaluare suplimentară.

Având în vedere baza de date analizată în perioada 2012-2022, pentru termenul „biopesticide” au fost analizate un număr total de 24.676 de articole științifice, dintre care 4321 au fost identificate ca fiind relevante, pentru termenul „bioinsecticide” au fost analizate un număr total de 522 de articole științifice, dintre care 474 au fost identificate ca fiind relevante, pentru termenul „insecticide botanice” au fost analizate un număr total de 793 de articole științifice, dintre care 545 au fost identificate ca fiind relevante, iar pentru termenii „bioinsecticide”; „extracte din plante” au fost analizate un număr total de 54 de articole științifice, dintre care 49 au fost identificate ca fiind relevante.

Având în vedere toate cuvintele-cheie indicate, este evident că termenul „biopesticide” a reprezentat cel mai mare număr de articole identificate. De exemplu, în acest caz, se pare că anul 2021 excelează în acest sens cu 600 de articole științifice, urmat de anul 2022, când au fost înregistrate un total de 574 de articole științifice. Numărul de articole științifice a crescut treptat începând cu anul 2012, chiar dacă au fost înregistrate unele fluctuații scăzute, anul 2013

înregistrând cel mai mic număr de articole, respectiv 232. Celelalte cuvinte-cheie indicate arată că numărul de articole științifice este de cel puțin 10 ori mai mic decât cel al termenului „biopesticid”, deși chiar și în aceste cazuri se înregistrează o creștere a numărului de publicații de interes (Figura 1a). Pe de altă parte, dacă considerăm procentul de articole științifice publicate în această perioadă, raportat la numărul total de articole legate de un anumit termen, observăm că cel mai mare procent este identificat pentru termenii „bioinsecticide”; „extracte din plante”, 20,41% în 2022, cu o creștere de 14,29% față de 2012, chiar dacă numărul acestora este foarte mic (Figura 1b) (Daraban et al., 2023).

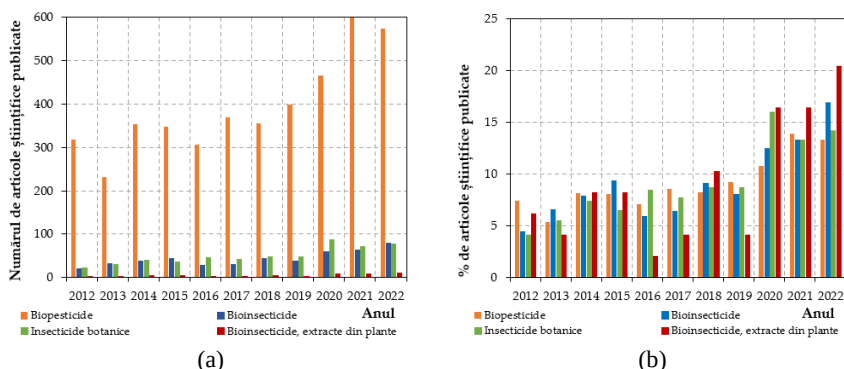


Figura 1. Evoluția numărului de articole publicate în literatura de specialitate (a) și a procentului acestora din numărul total de articole (b) care raportează date privind aplicarea biopesticidelor față de cele care raportează date privind aplicarea bioinsecticidelor/insecticidelor botanice/bioinsecticidelor, a extractelor din plante în perioada 2012-2022 (Daraban et al., 2023)

Toate aceste considerente pun în evidență actualitatea și necesitatea studiilor cu privire la substituirea pesticidelor de sinteză cu o alternativă modernă și prietenoasă cu mediul înconjurător precum biopesticidele pe bază de extracte vegetale, latura insecticidă a plantelor din flora spontană a arealului geografic din zona Moldovei și Bucovinei, folosite de obicei în tratamente medicale, nefiind aprofundată în studiile efectuate în România, caracterul de noutate și inovare fiind astfel unul accentuat.

Având în vedere toate aceste considerente a fost formulat *Obiectivul Principal* al prezentei teze de doctorat și au fost stabilite *obiectivele specifice*. Astfel, teza de doctorat cu titlul „*Extracte vegetale cu aplicații în agricultură și industria alimentară*” are ca **Obiectiv Principal** studiul caracterului biopesticid al unor extracte vegetale din flora spontană autohtonă, obținute prin metode de

extracție prietenoase cu mediul înconjurător, pentru combaterea dăunătorilor de cultură și depozit, în scopul substituirii pesticidelor de sinteză cu efecte secundare nedorite asupra mediului înconjurător și sănătății umane.

Pentru atingerea obiectivului principal al tezei de doctorat, au fost trasate o serie de **obiective specifice** care să structureze pas cu pas etape ale temei de cercetare:

- analiza critică a stadiului actual al cercetărilor privind rolul și impactul *pesticidelor de sinteză* și al *biopesticidelor* în controlul dăunătorilor de cultură și depozit și protecția mediului înconjurător;
- identificarea și selectarea unor metode de extracție care să păstreze un echilibru între calitatea produsului, eficiența procesului, costurile de producție și protecția mediului;
- selectarea unor specii de plante din flora spontană autohtonă cu proprietăți antioxidante, al căror potențial bioinsecticid nu a fost studiat în detaliu;
- caracterizarea extractelor vegetale obținute din plantele din flora spontană prin metode analitice fizico-chimice cunoscute, utilizate pentru a evalua diverși indicatori de calitate, precum și trasarea și interpretarea rezultatelor prin spectrometrie UV-Vis și spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR);
- determinarea activității bioinsecticide a extractelor vegetale obținute (prin identificarea gradului de mortalitate (%), a numărului de ouă depuse și a manifestărilor neuroleptice) pentru dăunătorii de cultură și depozit din speciile *Leptinotarsa decemlineata* Say (gândacul din Colorado) și respectiv, *Acanthoscelides obtectus* Say (gărgărița fasolei);
- studiu comparativ privind eficiența extractelor vegetale brute din flora spontană autohtonă (reprezentate de speciile *Origanum vulgare* L., *Primula veris* L., *Artemisia absinthium* L., *Achillea millefolium* L.) în scopul combaterii dăunătorilor de cultură (*Leptinotarsa decemlineata* Say) și de depozit (*Acanthoscelides obtectus* Say);
- identificarea unui model analitic pentru validarea rezultatelor experimentale prin aplicarea ecuației cinetice de ordinul I în scopul determinării evoluției gradului de supraviețuire (%) a populației de dăunători din speciile *Leptinotarsa decemlineata* Say (gândacul din Colorado) și *Acanthoscelides obtectus* Say (gărgărița fasolei), dar și a timpului letal, LT₅₀, utilizând extractele vegetale obținute și utilizate ca produs biopesticid.

Pentru a finaliza cu succes obiectivele propuse, teza de doctorat a fost structurată în două părți principale formate din 5 capitole, urmate de concluzii

generale și anexe. Teza de doctorat conține **318** pagini, **93** de figuri, **24** de tabele, peste **400** referințe bibliografice și **3** anexe.

Partea întâi cuprinde un **Studiu de Literatură** exhaustiv referitor la extractele vegetale și aplicabilitatea lor în agricultură (ca biopesticide) și industria alimentară. Aceasta cuprinde **2 capitole** care creionează o vedere de ansamblu asupra informațiilor din literatura de specialitate cu privire la prezența și impactul pesticidelor de sinteză în mediul înconjurător și riscurile pentru sănătatea umană, comparativ cu potențiale aplicații și impacturi pozitive ale biopesticidelor în protecția culturilor agricole prin managementul integrat al dăunătorilor. Ulterior, am făcut o trecere în revistă a metodelor de extracție, cu accent pe metodele prietenoase cu mediul și se conturează cele mai relevante utilizări ale extractelor vegetale în agricultură și industria alimentară.

Partea a doua a tezei de doctorat se axează pe **Contribuțiile Personale** și este structurată în **3 capitole** care cuprind rezultatele studiilor referitoare la utilizarea extractelor unor specii de plante din flora spontană autohtonă (reprezentate în principal de speciile *Origanum vulgare* L., *Primula veris* L., *Artemisia absinthium* L., *Achillea millefolium* L.) în scopul combaterii dăunătorilor de cultură (*Leptinotarsa decemlineata* Say) și de depozit (*Acanthoscelides obtectus* Say). Sunt astfel prezentate studii referitoare la metodele de extracție a speciilor de plante utilizate, respectiv macerare, extracția prin refluxare în aparatul Soxhlet, extracția asistată de ultrasunete și o variantă combinată între macerare cu extracția asistată de ultrasunete, prin varierea parametrilor de extracție precum: temperatura, timpul de extracție și raportul solid /lichid (S/L). Într-o etapă următoare, studiile au vizat, varierea modului de administrare a tratamentelor cu extracte vegetale, fiind utilizată administrarea directă prin pulverizare pe hrană și administrarea indirectă, controlată, pe un disc celulozic în scopul combaterii dăunătorilor. Modelarea analitică prin analiza gradului de supraviețuire (%) în timp a permis identificarea timpului letal, LT_{50} , necesar pentru o mortalitate a 50% din indivizii vizați, ținând cont de tratamentele utilizate.

Activitatea de cercetare desfășurată pentru a permite elaborarea tezei de doctorat a început la data de 1 octombrie 2017 în cadrul Universității Tehnice „Gheorghe Asachi” din Iași, Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului „Cristofor Simionescu”, studiile experimentale fiind realizate în cadrul Departamentului de Inginerie Organică, Biochimică și Alimentară.

Activitățile de diseminare a rezultatelor cercetărilor obținute pe parcursul studiilor de doctorat (Anexa 1), sunt concretizate în: **1** carte de specialitate în care doctorandul este coautor, **5** articole publicate în jurnale cotate ISI (cu un factor de impact cumulat de **15,037**) din care la **3** doctorandul este autor principal, **2** articole publicate în jurnale cotate ISI Proceedings, din care la **1** doctorandul este autor principal, **5** articole publicate în reviste BDI la care

doctorandul este autor principal, 20 lucrări prezentate la manifestări științifice naționale și internaționale sub formă de poster sau comunicare orală. Acestea asigură condițiile impuse pentru susținerea publică a tezei de doctorat.

Pornind de la rezultatele studiilor elaborate în teza de doctorat intitulată „*Extrakte vegetale cu aplicații în agricultură și industria alimentară*” se pot pune bazele unei metode de exploatare a florei spontane românești dedicată micilor fermieri care adoptă principiile culturilor ecologice.

CAPITOLUL 1.

Pesticide vs. biopesticide: stadiul actual al cercetărilor, caracteristici generale, impact și aplicații pentru controlul dăunătorilor și protecția mediului înconjurător

1.1. Rolul pesticidelor de sinteză în protecția dăunătorilor și impactul asupra mediului înconjurător și sănătății umane

1.1.1. Scurt istoric, definire și utilizare

Controlul dăunătorilor este o practică veche, fiind utilizat din cele mai vechi timpuri. Sumerienii foloseau compuși de sulf pentru a controla insectele și acarienii în urmă cu 4500 de ani. Piretrul, un compus derivat din florile uscate de *Chrysanthemum cinerariaefolium*, a fost aplicat ca insecticid de peste 2000 de ani. Sarea sau apa de mare au fost folosite pentru a controla buruienile.

Substanțele anorganice, cum ar fi cloratul de sodiu și acidul sulfuric, sau substanțele chimice organice derivate din surse naturale au fost utilizate pe scară largă în combaterea dăunătorilor până în anii 1940 (Bernardes et al., 2015). În consecință, anii '40 au fost martorii unei creșteri accentuate a pesticidelor de sinteză, cum ar fi DDT, aldrin, dieldrin, endrin, paration și 2,4-D. În anii 1950, aplicarea pesticidelor în agricultură era considerată avantajoasă și nu existau preocupări cu privire la riscurile potențiale ale acestor substanțe chimice pentru mediu și sănătatea umană (Gyawali, 2018).

Pesticidele sunt denumite cu termeni diferiți, în funcție de destinație, cum ar fi *erbicide, insecticide, fungicide, rodenticide, moluscocide și nematocide* (Hlihor et al., 2018). Gruparea pesticidelor se poate baza, de asemenea, pe structura lor chimică: *organofosforice, carbamați, organoclorurate, piretrine și piretroizi, acizi benzoici, triazine, derivați fenoxiacetici, derivați dipiridilici, derivați glicinici și ditiocarbamați* (Figura 1.1) (Bortoli și Coumoul, 2018).

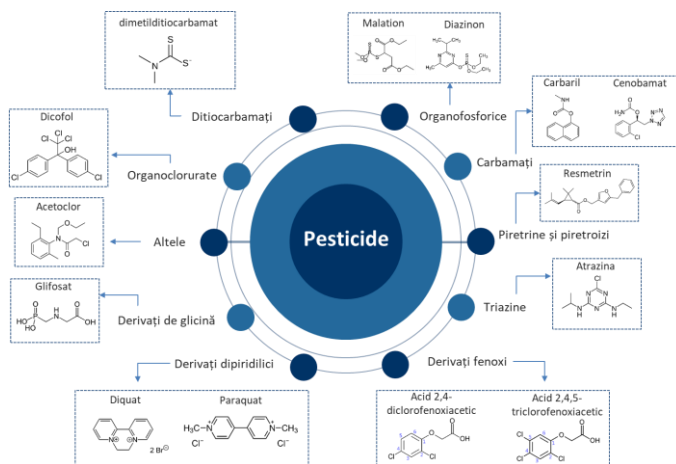


Figura 1.1. Reprezentarea schematică a principalelor clase de pesticide și a structurilor chimice ale unor reprezentanți aferenți (Daraban et al., 2023)

1.2. Biopesticide: alternative la pesticidele de sinteză și integrarea acestora în agricultura sustenabilă

1.2.1. Scurt istoric

Practica utilizării în agricultură a extractelor din plante, sau a insecticidelor botanice, așa cum sunt cunoscute în ziua de azi, datează de cel puțin două milenii în China antică, Egipt, Grecia și India. Chiar și în Europa și în America de Nord, utilizarea pesticidelor botanice datează de peste 150 de ani, până la descoperirea principalelor clase de insecticide chimice de sinteză (de exemplu, organoclorurate, organofosfați, carbamați și piretroide) la mijlocul anilor 1930-1950, acestea substituind pesticidele botanice (Isman, 2006; Gonzalez-Coloma et al., 2020).

Încă din antichitate, egiptenii și indienii obișnuiau să amestece cerealele depozitate cu cenușă de la arderea materialelor lemnoase, pentru a controla dăunătorii. Romanii foloseau *Veratrum album* ca rodenticid, în timp ce chinezii sunt recunoscuți pentru descoperirea proprietăților insecticide ale speciei *Derris*, iar piretrul a fost folosit ca insecticid în Persia și China (Mathew, 2016). Există rapoarte despre utilizarea piretrului (*Tanacetum cinerariaefolium*, Asteraceae) încă din anul 400 î.Hr. în Imperiul Roman.

Primul insecticid botanic pur utilizat ca atare datează din secolul al XVII-lea, când s-a demonstrat că nicotina obținută din frunzele de tutun era letală pentru gândacii prunilor (Gonzalez-Coloma et al., 2020). Trebuie remarcat

faptul că utilizarea semințelor de Neem și a extractului de tutun pentru protecția cerealelor a fost practică încă de acum 300 de ani atât în India, cât și în Europa (Mathew, 2016).

Unul dintre primele biopesticide înregistrate în cadrul US EPA a fost acidul giberelic, în anul 1962. Acidul giberelic este un hormon vegetal care a fost izolat pentru prima dată în 1938 din culturi de *Gibberella fujikuroi* (Sawada) și *Fusarium moniliforme*, agenții cauzali pentru boala Bakanae la orez. Se cunosc mai mult de 60 de gibereline; cu toate acestea, doar trei, acidul giberelic (GA3), giberelinele (un amestec de GA4 și GA7) și giberelatul de potasiu, sunt înregistrate ca biopesticide în Statele Unite (EPA, 1995). De-a lungul timpului, produsele biopesticide s-au dovedit a fi extrem de eficiente fiind capabile să reducă apetitul insectelor, sunt repelente și protectoare, au fost utilizate ca hormoni de perturbare a creșterii, având și alte efecte biocide.

1.2.2. Definirea biopesticidelor

În ultimele trei decenii, au fost depuse numeroase eforturi pentru a reduce expunerea și riscul asupra sănătății umane generat de pesticide, în special de cel cauzat de insecticide. Există o cerere ridicată pentru insecticide selective și sigure care cruță prădătorii naturali și organismele nevizate. Unele pesticide convenționale au fost înlocuite cu altele mai noi, bio-raționale așa cum mai sunt denumite biopesticidele sau pesticide cu „risc scăzut sau redus” (Horowitz și Ishaaya, 2004; Ishaaya și Horowitz, 2009; Egwu et al., 2019).

Termenul de biopesticid vizează numeroase aspecte ale controlului dăunătorilor și include organismele microbiene, macrobiene, pesticide derivate din plante (denumite produse botanice), feromoni ai insectelor aplicați pentru întreruperea împerecherii, dar și genele utilizate pentru transformarea culturilor în unele rezistente la atacurile insectelor, fungilor și virusurilor sau pentru a le face tolerante la aplicarea de erbicide (Dimetry, 2014; Manda et al., 2020). 2.2.2. Procedura experimentală în regim discontinuu

1.2.3. Potențialul biopesticidelor și aplicabilitatea lor

Avantajele utilizării pesticidelor naturale pentru plante sunt reprezentate de gama lor de ținte specifice, un mod de acțiune lent, o persistență mai scurtă, niveluri scăzute de reziduuri și o utilizare sigură comparativ cu pesticidele convenționale sau de sinteză (Oguh et al., 2019).

Aceste atribute sunt avantajoase atât pentru consumatori, cât și pentru mediul înconjurător, însă trebuie să se acorde o atenție strictă timpului și modului de aplicare, precum și măsurilor de precauție care trebuie respectate cu strictețe. Asta nu înseamnă că nu conțin substanțe chimice, ci doar că acestea sunt derivate din surse botanice, animale și minerale. Ele trebuie totuși folosite cu atenție, deoarece substanțele chimice prezente în produsele biopesticide se

descompun mai repede decât cele din surse comerciale, fiind însă considerate mai puțin dăunătoare decât acestea (El-Wakeil et al., 2006).

1.3. Clasificarea, proprietățile fizico-chimice și modul de acțiune al biopesticidelor

Principalele categorii de biopesticide includ mai multe formulări diferite din cauza variației lor în ceea ce privește solubilitatea compusului activ, capacitatea de a controla dăunătorul, ușurinței de manipulare și transport. Plantele sunt capabile să sintetizeze o gamă completă de varietăți structurale care prezintă o gamă aproape la fel de completă de activități biologice insecticide (Sarwar, 2015).

Biopesticidele reprezintă un grup distinct, diferit în mod inerent de pesticidele convenționale, fiind compuse din trei categorii majore:

- agenți biochimici de combatere a dăunătorilor sau pesticide biochimice (de exemplu, pesticide botanice, uleiuri esențiale, feromoni, hormoni, regulatori naturali de creștere ai plantelor, enzime, minerale, etc.),
- agenți microbieni de combatere a dăunătorilor sau pesticide microbiologice (de exemplu, microorganisme),
- agenți macrobiologici de combatere a dăunătorilor sau pesticide macrobiologice (de ex. insecte benefice, parazitoizi, nematode entomopatogene) (Holmes et al., 2018; Šunjka și Mechora, 2022).

US EPA indentifică Protectorii Încorporați în Plante (PIPs) ca fiind a treia categorie de biopesticide. Acestea reprezintă substanțe pesticide produse de plante și de materialul genetic necesar pentru ca planta să producă substanța respectivă (EPA, 2022). PIPs pot rezulta din manipulări transgenice și netransgenice, precum editarea directă a genomului și pe tratamentul semințelor (Olson, 2015). La nivel global, există o neconcordanță în înțelegerea termenului de biopesticid, definit de US EPA, de aceea Asociația Internațională a Producătorilor de Biocontrol (IBMA) și Organizația Internațională pentru Control Biologic promovează utilizarea termenului de agenți de biocontrol (BCA) în loc de biopesticid. IBMA clasifică agenții de biocontrol în patru grupe: (1) agenți macrobieni, (2) agenți microbieni, (3) produse naturale și (4) agenți semiochimici (agenți de modificare a comportamentului insectelor) (Aneja et al., 2016; Kaushal și Prasad, 2021).

Prin urmare, biopesticidele au o clasificare complexă, strategiile din Managementul Integrat al Dăunătorilor (IPM) incluzând o combinație de produse de sinteză și biologice de protecție a culturilor pentru a obține sinergii de acțiune și o utilizare globală mai redusă. Există mai multe surse de unde pot proveni biopesticidele, fiecare dintre acestea având un rol specific sau general în funcție de o serie de factori și de tipul dăunătorilor pentru care este administrat. Sursele generale din care provin în funcție de regn sunt: animal, vegetal, mineral și

microbian. Fiecare dintre aceste clase principale se subclasifică la rândul lor în subclase de compuși cu efect pesticid funcție de o serie de factori. O imagine cuprinzătoare a modului în care s-ar putea clasifica biopesticidele, este reprezentată în Figura 1.5.

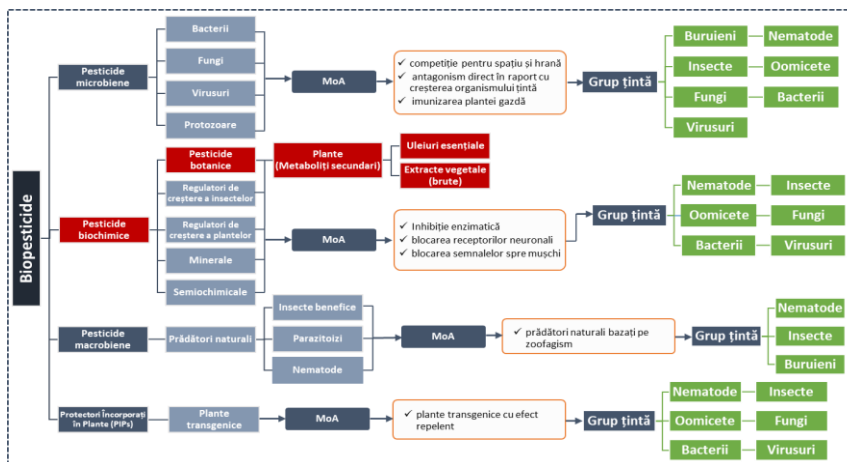


Figura 1.5. Reprezentarea principalelor categorii de biopesticide, a interacțiunilor cu diferite tipuri de dăunători și modul acestora de acțiune (MoA-mod de acțiune) (Daraban et al., 2023)

1.4.2. Avantaje și dezavantaje ale utilizării biopesticidelor

În ciuda disponibilității dovezilor de eficacitate a biopesticidelor împotriva unei game largi de dăunători specifici culturilor, acestea nu sunt încă bine reprezentate pe piața pesticidelor (Kekuda et al., 2016). De exemplu, comercializarea pesticidelor botanice depinde de disponibilitatea plantelor în cantități mari, plante care ar trebui să fie ușor de cultivat. Plantele sunt fie cultivate pentru alte utilizări, cum ar fi cele alimentare, medicinale, ornamentale, fie cresc în mod natural în păduri și pe alte terenuri necultivate.

Cultivarea plantelor necesare pentru producția de biopesticide ar necesita suprafețe mari, ceea ce ar putea reprezenta o concurență potențială cu producția de alimente pe terenurile agricole cu o suprafață mare de cultură. În plus, unele dintre plantele care sunt surse de biopesticide sunt folosite ca hrană și, prin urmare, fermierii ar opta să investească în întreprinderi mai profitabile, punând astfel în pericol securitatea alimentară (Parajuli et al., 2022).

În consecință, disponibilitatea terenurilor arabile pentru producția volumelor necesare de pesticide botanice ar fi un factor limitativ major. De

asemenea, instalațiile de depozitare și prelucrare a cantităților voluminoase de material vegetal necesare pentru producerea pesticidelor botanice ar necesita investiții pe scară largă în depozite și utilaje.

Pesticidele botanice se confruntă, de asemenea, cu o concurență puternică din partea pesticidelor sintetice, care sunt ușor de fabricat și de formulat, au un termen de valabilitate lung, sunt ușor de aplicat și dispun de instalații de producție bine stabilite. Formularea pesticidelor botanice este destul de dificilă, deoarece o plantă ar putea avea mai mulți compuși activi care diferă în ceea ce privește proprietățile chimice (Lengai et al., 2020). Acest atribut ar putea fi totuși explorat prin combinarea mai multor plante cu compuși înrudiți a căror sinergie este eficientă împotriva dăunătorilor (Stevenson et al., 2017).

În ciuda toxicității reduse sau inexistente pe care o prezintă plantele, procedurile de reglementare a utilizării lor în agricultură nu sunt diferite de cele ale produselor de sinteză, în special în țările în curs de dezvoltare (Lengai et al., 2020). Procesul de înregistrare este costisitor și are o serie de bariere, făcând astfel ca biopesticidele să fie oarecum indisponibile pe piață.

CAPITOLUL 2.

Extrakte vegetale: aplicații în agricultură și industria alimentară

2.1. Metode de extracție solid-lichid

Cea mai importantă etapă în prelucrarea materiilor prime vegetale este reprezentată de extracția și izolarea compușilor țintă. Calitatea unui extract și eficiența unei proceduri sunt influențate de mai mulți factori: materialul vegetal și pregătirea probei înainte de extracție, tipul de solvent, tehnica de extracție, condițiile fizico-chimice, etc. (Tzanova et al., 2020). Extracția reprezintă un procedeu de bază pentru separarea și recuperarea compușilor bioactivi din plante.

Aceasta convertește matricea reală într-o probă corespunzătoare pentru procedura analitică subsecventă (Belwal et al., 2018). Pregătirea corectă a materialului pentru extracție este la fel de importantă ca și alegerea metodei de extracție. Această etapă ar trebui să prevină degradarea compușilor bioactivi, precum și dezvoltarea unor fungi și bacterii (Krakowska-Sieprawska et al., 2022). Extracția produselor naturale se desfășoară ținând cont de următoarele etape: (1) solventul pătrunde în matricea solidă; (2) solutul se dizolvă în solvenți; (3) solutul este difuzat din matricea solidă; (4) solutul extras este colectat (Zhang et al., 2018).

Metodele de extracție constau în extracția convențională pe bază de solvenți și în extracția modernă, considerată mai robustă și ecologică (Bitwell et

al., 2023). În mod obișnuit, extracțiile solid-lichid se realizează folosind ca solvenți extractanți lichide organice și/sau anorganice și amestecuri ale acestora în contact cu o matrice solidă insolubilă (de exemplu, metoda Soxhlet) sau folosind sisteme secvențiale la presiune atmosferică care necesită proceduri lungi, cum ar fi macerarea sau percolarea.

Tehnicile avansate utilizează diferite metode de extracție, cum ar fi microundele, ultrasunetele, fluidele supercritice, enzimele, lichidele sub presiune, câmpul electric etc. Multe cercetări au menționat posibilitatea combinării tehnicilor de extracție ca fiind o tehnică promițătoare pentru obținerea rapidă și eficientă a extractelor dorite (Belwal et al., 2018; Wen et al., 2020).

Procedeele de extracție solid-lichid, atât cele convenționale, cât și cele moderne, se bazează pe două principii fundamentale: difuzia și/sau osmoza. Deși extracția solid-lichid reprezintă o tehnică care este cunoscută de mult timp și care este încă utilizată pe scară largă, există încă multe aspecte neelucidate care trebuie investigate în profunzime pentru ca mecanismele acestora să poată fi complet înțelese (Naviglio et al., 2019). În principal, procesul de extracție are următoarele obiective: (a) extragerea compușilor bioactivi vizați din probe complexe de plante, (b) creșterea selectivității metodelor analitice, (c) creșterea sensibilității biotestelor prin creșterea concentrației compușilor vizați, (d) transformarea compușilor bioactivi într-o formă mai adecvată pentru detectare și separare și (e) furnizarea unei metode reproductibile și robuste, independentă de variațiile matricei probei (Patra et al., 2022).

Figura 2.1 propune o schemă a celor mai uzuale metode de extracție solid-lichid, urmând ca o parte dintre acestea să fie descrise în amănunt în subcapitolele următoare.

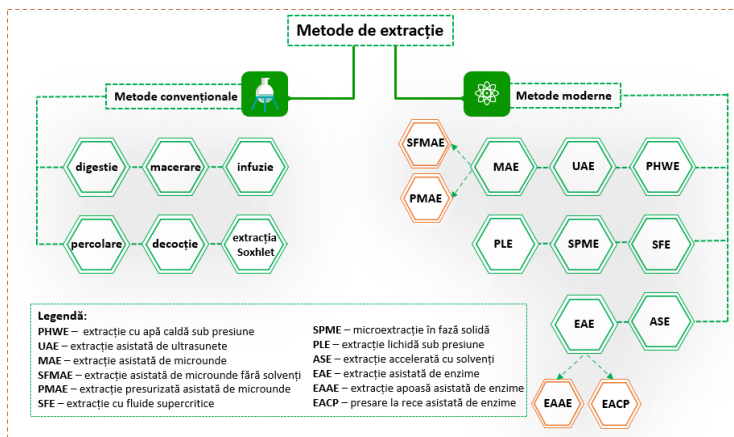


Figura 2.1. Clasificarea celor mai uzuale metode de extracție solid-lichid

2.1.1. Stabilirea solvenților de extracție

Înainte de identificarea metodelor de extracție solid-lichid este importantă prezentarea solvenților de extracție, deoarece aceștia sunt deosebit de importanți în extracția anumitor compuși. În primul rând, solventul se alege în funcție de tipul plantei și de părțile componente ale acestora supuse procesului de extracție (rădăcină, tulpină, frunză, petale, inflorescențe, etc.), iar în al doilea rând, acesta se alege în funcție de natura compușilor vizați prezenți în plantă și care sunt doriți a fi extrași (Ormeno et al., 2011; Abubakar și Haque, 2020; Chaves et al., 2020). În general, solvenții polari, cum ar fi apa, metanolul și etanolul, sunt utilizați în extracția compușilor polari, în timp ce solvenții nepolari, așa cum sunt hexanul și diclorometanul, sunt utilizați în extracția compușilor nepolari (Abubakar și Haque, 2020).

Apa este una dintre substanțele utilizate cu succes ca reactiv de extracție, dar și în amestec cu alți solvenți organici, fiind folosită la extracție datorită polarității sale ridicate și a miscibilității cu solventul organic (Abubakar și Haque, 2020). În Tabelul 2.1 sunt prezentate valorile polarității unor substanțe frecvent utilizate în procesele de extracție datorită plajei largi a polarității lor (Poojar et al., 2017).

Tabelul 2.1. Reprezentarea polarității celor mai frecvent utilizați compuși
(Poojar et al., 2017)

<i>Nr. crt.</i>	<i>Solvenți</i>	<i>Polaritate</i>	<i>Nr. crt.</i>	<i>Solvenți</i>	<i>Polaritate</i>
1	n-Hexan	0,009	7	Acetonă	0,355
2	Eter de petrol	0,117	8	n-Butanol	0,586
3	Eter dietilic	0,117	9	Etanol	0,654
4	Acetat de etil	0,228	10	Metanol	0,762
5	Cloroform	0,259	11	Apă	1,000
6	Diclorometan	0,309			

Analizând gradul de polaritate al compușilor din Tabelul 2.1, atunci când se dorește obținerea unui grad de extracție cât mai mare, se poate deduce conform polarității acestora importanța combinării unui compus cu polaritate redusă, a unuia cu polaritate medie și a apei, pentru a acoperi o plajă cât mai mare a compușilor prezenți în materialul vegetal (Selvamuthukumaran și Shi, 2017; Jha și Sit, 2022).

În ultimii ani s-au realizat progrese considerabile cu privire la eficientizarea extracțiilor din plante, nu doar prin optimizarea parametrilor de extracție ai unei metode, ci și prin dezvoltarea de noi metode și combinarea mai multor principii de extracție (Lacina et al., 2012; Petigny et al., 2013; Vinatoru et al., 2017; Zhang et al., 2018; Suteu et al., 2020; Uwineza and Waśkiewicz, 2020;

Daraban et al., 2021a) care integrează factorii, de la alegerea solvenților de extracție prezentați în Tabelul 2.2. De asemenea, unele metode moderne sunt în continuă dezvoltare, fiind adaptate din ce în ce mai bine cerințelor actuale și extracției compușilor vizati. Literatura de specialitate prezintă cazuri de combinare a uneia sau mai multor metode convenționale cu una sau mai multe metode moderne de extracție (Belwal et al., 2018; Wen et al., 2020).

2.2. Caracterizarea calitativă și cantitativă a extractelor vegetale

Extracția compușilor bioactivi din plante și estimarea calitativă și cantitativă a acestora este importantă pentru investigarea de noi compuși care să fie valorificați în mod direct în cadrul industriilor farmaceutică, alimentară și agrochimică (Ingle et al., 2017). Compoziția chimică a unui produs vegetal se determină prin analiză chimică calitativă, folosind diferiți solvenți pentru extracție. În primul rând, metodele de extracție trebuie selectate și optimizate împreună cu tehnicile analitice corespunzătoare, inclusiv solvenții utilizați, sursele și proprietățile compusului în sine (Y. Zhang et al., 2022). Datorită faptului că extractele de plante apar de obicei ca o combinație de diferite tipuri de compuși bioactivi sau fitochimici cu polarități diferite, separarea lor rămâne o mare provocare pentru procesul de identificare și caracterizare a compușilor bioactivi (Sasidharan et al., 2011).

2.3. Extractele vegetale: noua generație de compuși cu acțiune biopesticidă

Producele botanice pot reprezenta o sursă cuprinzătoare de ingrediente active pentru dezvoltarea de insecticide și acaricide eficiente în combaterea dăunătorilor culturilor agricole. Uleiurile esențiale și extractele (brute) din plante sunt considerate a fi insecticide cu o gamă extinsă de acțiuni în funcție de caracteristicile fiziologice ale speciilor de insecte, precum și de tipul de plantă: pot acționa ca repelenți, atractanți sau inhibitori ai procesului de hrănire sau ai respirației, pot împiedica identificarea plantelor gazdă, pot inhiba ovipoziția și pot reduce apariția adulților prin efecte ovicide și larvice (Kumar et al., 2021).

Acestea sunt produsele botanice cele mai frecvent utilizate ca biopesticide (Acheuk et al., 2022). Dintre extractele din plante propuse pentru combaterea dăunătorilor, uleiurile esențiale au fost considerate ingrediente active promițătoare pentru formulările insecticidelor, datorită disponibilității lor la nivel mondial și costului relativ scăzut, precum și datorită caracterului presupus sigur pentru sănătatea umană și pentru mediu (Giunti et al., 2022).

Acțiunea uleiurilor esențiale și a extractelor din plante se bazează pe moleculele sintetizate de plante ca parte a mecanismului lor intrinsec de apărare împotriva agenților patogeni microbieni și a dăunătorilor. Pentru a obține uleiuri

esențiale, se folosește frecvent distilarea cu aburi, dar acestea pot fi obținute din plante și prin fermentație, extracție cu solvenți. Pe de altă parte, extractele din plante se obțin de obicei din material vegetal uscat, în principal printr-o metodă de extracție solid/lichid folosind solvenți apoși, organici sau amestecuri ale acestora, de exemplu acetonă, etanol, hexan sau metanol (Acheuk et al., 2022).

2.4. Aplicații ale extractelor vegetale în industria alimentară

Alimentele proaspete, cum ar fi fructele de mare, carnea și produsele horticole, au o durată de depozitare limitată și sunt asociate cu apariția unor focare de boli de origine alimentară cauzate de microorganisme patogene (Martínez-Graciá et al., 2015). Creșterea bacteriilor, drojdiilor și a mușcăiului în diferite produse alimentare are ca rezultat produse reziduale și este costisitoare, fiind de multe ori dăunătoare sănătății umane prin producerea de toxine (Rukayadi et al., 2013). Cei mai comuni agenți conservanți clasici sunt acizii organici slabi, de exemplu acidul acetic, acidul lactic, acidul benzoic și acidul sorbic. Aceste molecule inhibă dezvoltarea atât a celulelor bacteriene, cât și a celor fungice, iar acidul sorbic se pare că inhibă și germinarea și dezvoltarea sporilor bacterieni (Rasooli, 2007). Deși conservanții sintetici previn dezvoltarea microbiană, siguranța lor este pusă la îndoială de un segment tot mai mare de consumatori (Rukayadi et al., 2013). Astfel, utilizarea produselor antimicrobiene naturale/conservanților naturali prezintă un interes major în societatea actuală pentru consumatori, în principal datorită creșterii gradului de conștientizare a riscurilor asociate cu utilizarea aditivilor și conservanților de natură sintetică din industria alimentară (Hintz et al., 2015; Quinto et al., 2019).

Compușii naturali prezenți în extractele derivate din plante, microorganisme, animale și alge (Figura 2.2) câștigă teren în prezent, deși în mare parte sunt încă slab aplicați. Utilizarea lor ca înlocuitori ai aditivilor sintetici în diferite aplicații, poate deschide noi frontiere în ceea ce privește siguranța și conservarea calității alimentelor, deoarece sunt considerate ca fiind sigure și fără riscuri pentru sănătatea consumatorilor (El-Saber Batiha et al., 2021). Datorită originii lor naturale, acestea sunt candidați excelenți pentru a înlocui moleculele de sinteză, care sunt în general considerate a avea efecte toxicologice și cancerigene (Nikmaram et al., 2018). Industria alimentară a depus eforturi mari pentru a reduce pierderile post-recoltare prin utilizarea de conservanți naturali care pot înlocui pesticidele de sinteză, din ce în ce mai mult respinse, atât de consumatori, cât și de fermieri (Mesías et al., 2021).

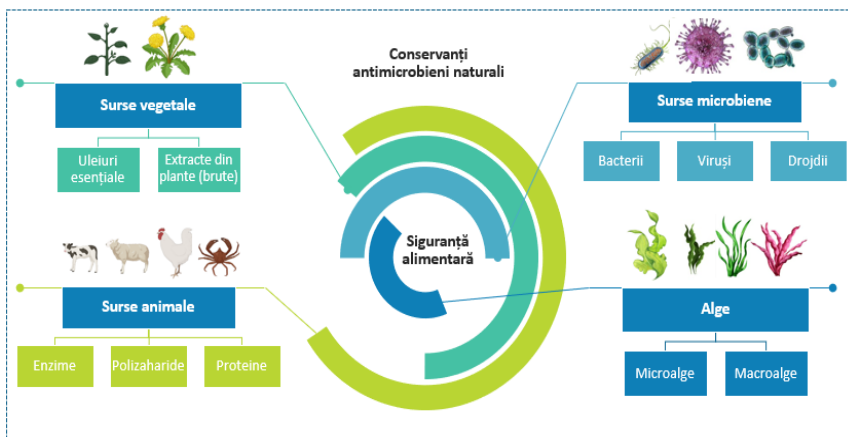


Figura 2.2. Surse de conservanți antimicrobieni naturali utilizați ca aditivi în industria alimentară (adaptat după Bangar et al., 2021; Quinto et al., 2019)

CAPITOLUL 3.

Materiale și metode utilizate

3.1. Scopul și importanța cercetării

Arealul geografic al României oferă o gamă largă de specii de plante care cresc din abundență pe pășunile și zonele neexploatate din punct de vedere agricol. O parte dintre aceste specii de plante au fost utilizate de sute de ani, de către alchimiștii din vechime, pentru tratarea anumitor boli, dar și pentru combaterea unor dăunători, deoarece au fost limitați de resursele acelor perioade. Conform literaturii de specialitate, aproximativ 20.000 de specii de plante cunoscute la nivel mondial sunt folosite în scopuri medicale, dintre care aproximativ 300 sunt utilizate pe scară largă. În literatură sunt menționate aproximativ 1.000 de specii de plante utilizate ca biopesticide, dintre care unele pot fi folosite cu rezultate promițătoare pentru combaterea dăunătorilor de cultură și depozit (Daraban et al., 2021). Aceste considerente ne oferă posibilitatea de a testa o serie de specii de plante din flora spontană autohtonă din România pentru a pune în evidență potențialul lor pesticid sau repelent, nu doar efectele lor medicinale. Scopul acestui capitol este de a prezenta materialele și metodele utilizate în studiile experimentale pentru obținerea și caracterizarea extractelor vegetale în scopul combaterii dăunătorilor de cultură și depozit, protocoale experimentale aplicate pentru îndeplinirea obiectivelor tezei de doctorat. Astfel, în acest capitol sunt identificate și descrise următoarele aspecte:

- selecția și identificarea speciilor de plante din flora spontană utilizate în studiile experimentale;
- descrierea amplasamentului de pe care s-a realizat selecția materialului vegetal necesar extracțiilor de plante utilizate în scop bioinsecticid;
- identificarea dăunătorilor de cultură și depozit considerați în studiile experimentale;
- descrierea reactivilor și a echipamentelor utilizate;
- selecția și descrierea celor mai adecvate metode de extracție a speciilor de plante utilizate în studiile experimentale;
- evaluarea activității antioxidante a extractelor vegetale prin: determinarea conținutului total de polifenoli și flavonoide;
- caracterizarea fizico-chimică a extractelor vegetale prin: caracterizare senzorială, determinare a umidității și a vâscozității, precum și a compoziției chimice și a grupărilor funcționale cu ajutorul tehnicilor UV-VIS și FTIR;
- evaluarea activității bioinsecticide a extractelor vegetale asupra dăunătorilor de cultură și depozit;
- modelarea analitică a rezultatelor experimentale prin analiza gradului de supraviețuire în scopul stabilirii timpului letal, LT_{50} , pentru o mortalitate a 50% din indivizii vizați.

3.2.2. Selecția și identificarea speciilor de plante

Speciile de plante considerate în teza de doctorat au fost selectate în funcție de o serie de principii care sunt prezentate în Figura 3.2.

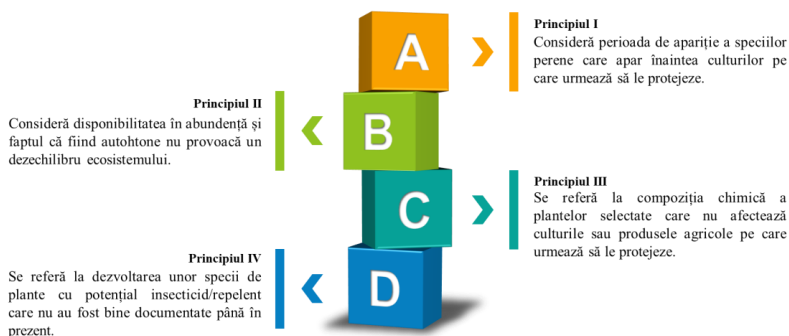


Figura 3.2. Prezentarea principiilor de care s-a ținut cont la selecția speciilor de plante din flora autohtonă, cu scopul obținerii de biopesticide

Din punct de vedere economic, utilizarea plantelor din flora spontană este o soluție avantajoasă, deoarece nu necesită cultivare sau întreținere, ci doar recoltare și prelucrare pentru obținerea de extracte vegetale pulverizabile. Pentru selectarea și obținerea tratamentului de administrare în vederea combaterii dăunătorilor, în cadrul studiilor experimentale din teza de doctorat am ținut cont de o serie de factori, așa cum sunt identificați în Figura 3.3.



Figura 3.3. Factorii principali de care se ține cont la obținerea extractelor din plante până la testarea pe dăunători

Pentru selecția plantelor utilizate în studiile preliminare ce vizează efectul biopesticid primordial m-am axat inițial pe următoarele specii: *Primula veris* L., *Urtica dioica* L., *Allium sativum* L., *Equisetum arvense* L., *Pimpinella anisum* L., *Salvia officinalis* L., *Matricaria chamomilla* L., *Calendula officinalis* L., *Achillea millefolium* L., *Rumex patientia* L., *Hypericum perforatum* L., *Origanum vulgare* L., *Ocimum basilicum* L., *Artemisia absinthium* L. și *Satureja hortensis* L.

Există trei motive esențiale pentru care s-au ales aceste specii de plante în scopul identificării potențialului biopesticid al acestora:

- i. în primul rând s-a dorit investigarea efectului biopesticid al unor plante din flora spontană autohtonă, deoarece acestea sunt aclimatizate și adaptate acestui areal geografic, neproducând astfel un eventual dezechilibru în ecosistemul autohton specific zonei, cum s-ar putea întâmpla în cazul importării unor specii noi de plante din alte zone, chiar dacă au efecte biopesticide.
- ii. un alt raționament a fost diversitatea florei spontane autohtone cu efecte consacrate asupra sănătății umane prin realizarea diverselor

extracte și tincturi sau ceaiuri, care nu au fost evaluate din perspectiva ținerii sub control a unor dăunători.

- iii. un element important de luat în calcul este reprezentat și de diversitatea pășunilor și a zonelor în care cresc aceste specii de plante și care se află într-un număr extins în țara noastră, înmulțindu-se mai ales după perioada comunistă când terenurile nu au mai fost exploatate la fel de intens din cauza parcelării terenurilor și restituirii către populație. Prin urmare, biomasa necesară producerii tratamentelor necesare pentru a ține sub control dăunătorii specifici culturilor micilor fermieri le satisface necesitățile.

Majoritatea plantelor considerate în studiile experimentale preliminare sunt specifice florei spontane, totuși unele sunt și specii cultivate în scopuri culinare pe lângă gospodării și în grădini, motivul utilizării acestora fiind testarea efectelor biopesticide și compararea acestora cu efectele speciilor din flora spontană asupra dăunătorilor evaluați.

Înainte de realizarea extractelor vegetale propriu-zise în scopul utilizării ca produse biopesticide, plantele din flora spontană au fost uscate într-un spațiu aerisit și protejat de lumina directă a soarelui. După colectare și uscare, plantele uscate au fost măcinate cu ajutorul unei mori de laborator (MRC laboratory-instruments 300cc). Studiile preliminare realizate în scopul identificării speciilor de plante din flora spontană autohtonă utilizate în combaterea dăunătorilor de cultură și depozit au urmărit ierarhizarea potențialului acestora.

Astfel, au fost evidențiate patru specii de plante care s-au remarcat prin potențialul lor de combatere a dăunătorilor de cultură și depozit, ciuboțica cucului (*Primula veris* L.), oregano/sovârf (*Origanum vulgare* L.), pelin (*Artemisia absinthium* L.) și coada șoricelului (*Achillea millefolium* L.).

3.3. Dăunători considerați în studiul experimental: colectare și descriere

3.3.1. Gândacul din Colorado (*Leptinotarsa decemlineata* Say)

3.3.1.1. Scurt istoric privind evoluția speciei

Gândacul din Colorado (Colorado potato beetle, CPB - *Leptinotarsa decemlineata* Say) este o insectă din ordinul Coleoptera, din familia Chrysomelidae, ce cuprinde mai mult de 40 de specii în America de Nord și de Sud, inclusiv cel puțin 10 specii care se găsesc la nord de Mexic. Cea mai notabilă dintre aceste specii este gândacul cartofului din Colorado, *Leptinotarsa decemlineata* Say, binecunoscut ca fiind cel mai grav dăunător al cartofilor, precum și al altor plante solanacee (Richard et al., 2009).

Din punct de vedere istoric, gândacul cartofului din Colorado a fost descoperit pentru prima dată de Thomas Nuttall în 1811, fiind descris în 1824 de Thomas Say, pe baza unor specimene colectate în Munții Stâncoși de pe *Solanum*

rostratum (Richard et al., 2009). Acest gândac a fost identificat pentru prima dată ca dăunător în 1859 în vestul Statelor Unite, după ce s-a extins de la planta sa gazdă nativă, nopțișoara cu coarne (*Solanum rostratum* - Solanaceae), o buruiiană invazivă, la cartof (*Solanum tuberosum* L.). *L. decemlineata* Say, este principalul dăunător care a determinat dezvoltarea industriei pesticidelor, atunci când Paris Green a aplicat pentru prima dată acetoarsenit de cupru(II) în Statele Unite în 1864 (Schoville et al., 2018). Insecta a început să se răspândească rapid spre est, ajungând pe coasta Atlantică în 1874. Evoluția numelui de gândacul cartofului din Colorado este interesantă, întrucât se estimează că acest gândac este nativ din centrul Mexicului și nu din Colorado. A avut o serie de denumiri între 1863 și 1867, printre care „spearman cu zece dungi”; „gândacul cartofului cu zece linii”; „gândacul cartofului” și „gândacul nou al cartofului”. Denumirea Colorado a fost asociată cu această insectă atunci când în anul 1865, Walsh a declarat că doi dintre colegii săi au văzut un număr mare de insecte pe teritoriul Colorado, hrănindu-se cu *Solanum rostratum*. Acest lucru l-a convins că insecta este originară din Colorado. În anul 1967, Riley a fost cel care a folosit pentru prima dată combinația „gândacul cartofului din Colorado” (Richard et al., 2009). În prezent, *L. decemlineata* Say este o insectă recunoscută pe scară largă pentru capacitatea sa de a evolua rapid spre rezistență la insecticide și la o gamă largă de stres abiotic și biotic, dar și pentru expansiunea sa globală pe o suprafață de 16 milioane de km², ajungând să acopere America de Nord, Europa și Asia (Schoville et al., 2018; Balaško et al., 2020).

3.3.1.2. Evoluția larvară și rezistența la pesticide

Gândacul din Colorado (*L. decemlineata* Say) are o serie de cicluri începând de la ou până la depunerea noilor ponte reprezentate în Figura 3.4.

Capacitatea insectelor dăunătoare de a se adapta la insecticide amenință securitatea alimentară și dezvoltarea unor practici agricole durabile, în special atunci când rata de evoluție a acestora depășește dezvoltarea de noi strategii de control. CPB a demonstrat capacitatea de a evolua rapid ca răspuns la o gamă largă de presiuni de mediu, inclusiv la sistemul de apărare al plantei-gazdă și la variațiile climatice. Chiar dacă utilizarea insecticidelor a dus la o reducere drastică a populațiilor de CPB, a rezultat dezvoltarea rezistenței la substanțele active, în anumite cazuri chiar din primul an de utilizare (Pélissier et al., 2022). În prezent, CPB a dezvoltat rezistență la 56 de compuși diferiți (regăsiți în Figura 3.5) care aparțin principalelor clase de insecticide (Mota-Sanchez și Wise, 2023). Astfel, Figura 3.5 evidențiază evoluția CPB la diferiți compuși în timp.

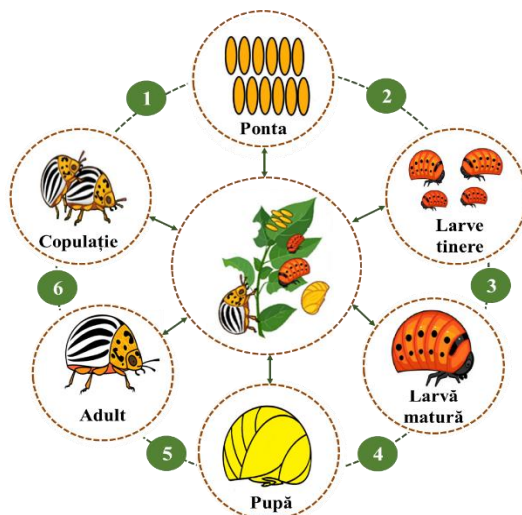


Figura 3.4. Reprezentarea schematică al unui ciclu complet din evoluția larvară a dăunătorului din specia *L. decemlineata* Say

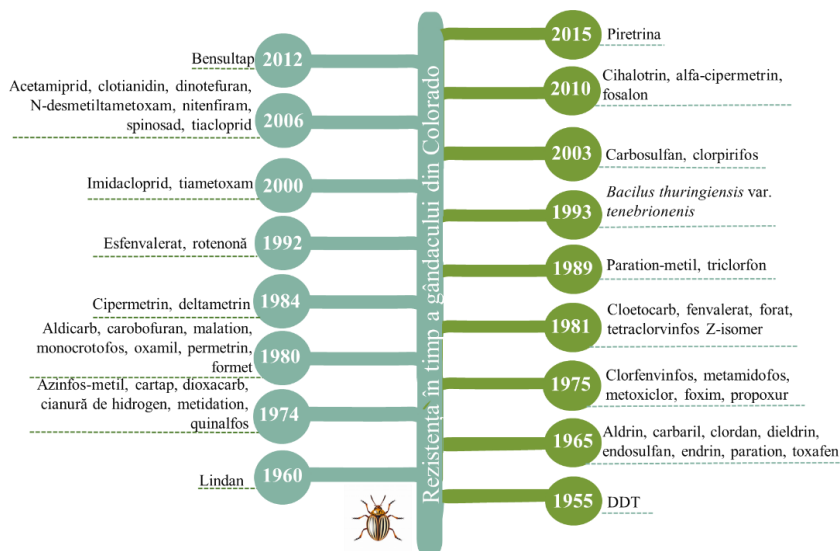


Figura 3.5. Evoluția rezistenței la produsele pesticide în timp a gândacului din Colorado

3.3.2. Gărgărița fasolei (*Acanthoscelides obtectus* Say)

3.3.2.1. Scurt istoric privind evoluția speciei

Acanthoscelides obsoletus sau *Acanthoscelides obtectus* (Say, 1831), gărgărița fasolei, este o specie de gândac bruchid (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchine). Specia a fost descrisă pentru prima dată în 1831 de Thomas Say (Say, 1831). Gărgărița fasolei se hrănește în primul rând cu semințele de fasole comună, dar are și alte surse de hrană precum semințele de mazăre, de viță-de-vie sau alte plante leguminoase. S-a raportat, de asemenea, că se dezvoltă pe semințele câtorva neleguminoase, cum ar fi porumbul și hrișca. Larvele se hrănesc cu semințe, iar adulții se hrănesc cu polen. Această specie este originară din regiunile muntoase din nordul Americii de Sud, fiind introdusă din greșeală în America Centrală, apoi în întreaga lume prin intermediul transporturilor de cereale (Alvarez et al., 2005).

Naturalistul american Thomas Say a descris specia de gărgăriță a fasolei sub numele de *Bruchus obtectus* în 1831 (Say, 1831), fiind mutată ulterior în genul *Acanthoscelides* (Bottimer, 1968). Într-o publicație din 1870, John Lawrence LeConte a numit-o din greșeală *Bruchus obsoletus*, ceea ce a determinat mai mulți autori de mai târziu să o numească sub acest nume care, de fapt, aparținea unei alte specii și, ca urmare, referințele la *A. obtectus* în publicațiile de la sfârșitul anilor 1800 și începutul anilor 1900 au folosit adesea numele incorect *Bruchus obsoletus* (Bridwell, 1942).

Prin urmare, numele științific preferat conform PlantwisePlus Knowledge Bank este *Acanthoscelides obtectus* Say (PlantwisePlus Knowledge Bank, 2024).

3.3.2.2. Descriere și evoluție larvară

Gărgărițele de fasole sunt gândaci mici, cu dimensiuni cuprinse între 2 și 5 mm, de culoare de la maro deschis până la maro închis, cu pete longitudinale pe elitre, care au o margine posterioară roșie. Elitrele nu acoperă extremitatea abdominală. Picioarele sunt de culoare roșu-gălbui, iar antena de culoare maro-roșie. Capul este aplecat în față și nu are botul lung, caracteristic gărgărițelor adevărate (AgroAtlas, 2023).

Corpul gândacului este ovoid, ușor convex, de culoare maro deschis sau închis, cu peri galben-verzui aurii și pete longitudinale pe partea de sus, cu peri gri deschis pe partea de jos. Elitrele scurte de culoare maro închis nu acoperă extremitatea abdominală. Iernarea gărgăriței fasolei are loc în stadiile de gândac sau de larvă (pot ierna și în alte stadii), de obicei în depozite. În partea sudică a ariei speciei, iernarea poate fi observată în reziduurile vegetale (AgroAtlas, 2023).

Insecta apare la temperatura de 12,5 °C, dar este inactivă la temperaturi sub 16 °C. Insectele migrează în câmpuri la 20 °C. La început, se hrănesc cu mazărice, păducel, lupin, lucernă și alte culturi leguminoase; apoi trec la fasole boabe, fasole, soia, linte. Acest dăunător migrează, de asemenea, în câmpurile de

cereale. În câteva zile de la copulație, femelele depun ouăle în sau pe păștile aflate la maturitate, pe grupuri (5-20), străpungând suturile păștilor sau rumegând găuri. Fecunditatea unei femele ajunge la 200 de ouă (AgroAtlas, 2023).

Ouăle sunt de culoare albă lăptoasă. Larvele sunt albe cu un cap galben în timpul primului lor stadiu și albe cu un cap maroniu începând cu al doilea stadiu (AgroAtlas 2023). Ouăle se dezvoltă pe parcursul a 30-45 de zile. Larvele pătrund în boabe, mâncând complet conținutul. Într-un singur bob se pot dezvolta mai multe larve (până la 28). Perioada larvară durează 3-3,5 săptămâni. Puparea are loc, de asemenea, în boabe (9-29 zile). Ciclul de viață al unei generații durează 100-110 zile.

Dăunătorul ajunge în depozit împreună cu cerealele, unde se dezvoltă până când scad temperaturile atmosferice. *A. obtectus* Say are o longevitate de aproximativ 28 de zile la 30 °C, la o umiditate relativă de 70%. De asemenea, femelele nu se hrănesc și trăiesc în jur de 14 zile, astfel încât prima generație de insecte servește drept sursă de infestare ulterioară (Kljajić et al., 2022; AgroAtlas, 2023).

Larvele de primul stadiu al acestor specii străpung direct peretele oului și partea adiacentă a plantei. În conformitate cu comportamentul lor de ovipoziție, unele specii de bruchide atacă fasolea fie exclusiv în câmp, fie în depozit, în timp ce altele atacă fasolea atât în câmp, cât și în depozit. Larvele speciei *A. obtectus* Say pătrund în semințe în timp ce se află în câmp, iar prima generație de adulți de gărgărițe apare după recoltare în depozite. Infestarea în câmp observată a fost foarte scăzută, dar consistentă.

Figura 3.6 identifică evoluția larvară a speciei *A. obtectus* Say. Stadiile de viață imature bine ascunse ale *A. obtectus* Say fac dificilă, dacă nu imposibilă, prezicerea nivelului infestării în timpul recoltării. Larvele din primul stadiu fac o gaură de intrare greu vizibilă și se dezvoltă în interiorul semințelor. Cu puțin timp înainte de apariție, o „fereastră” circulară caracteristică devine vizibilă în exterior.

Din cauza lipsei unui nivel evaluabil de infestare, fermierii și comercianții nu sunt capabili să reacționeze în timp util, femelele crează o gaură de intrare greu vizibilă, permițând astfel dezvoltarea noilor generații nestingherite în interiorul semințelor. (Schemale, 2001).

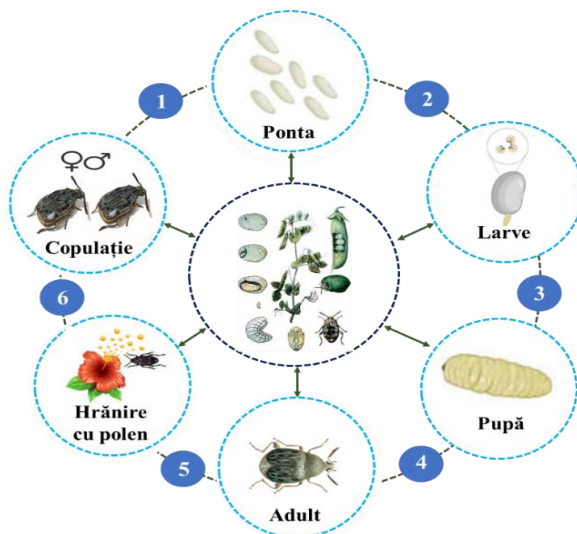


Figura 3.6. Reprezentarea schematică al unui ciclu complet din evoluția larvară a dăunătorului din specia *A. obtectus* Say

3.5. Metode de extracție utilizate în studiile experimentale

3.5.1. Pregătirea materialului vegetal pentru extracție

Origanum vulgare L. a fost recoltat la începutul verii (iulie), dimineața devreme, datorită concentrației ridicate de uleiuri esențiale. *Achillea millefolium* L. a fost recoltată la înflorire, în timpul verii (iulie), la prânz, în plin soare. *Artemisia absinthium* L. a fost recoltată vara (august), în plină înflorire. În cazul speciei *Primula veris* L., plantele au fost recoltate primăvara (mai), în plin stadiu de înflorire. Plantele întregi (tulpini, flori și frunze) au fost uscate prin așezarea lor într-un strat de aproximativ 2 cm pe o foaie de hârtie într-o cameră umbrită, lipsită de umiditate și bine ventilată, timp de 2 luni. Înainte de extracția propriu-zisă, pregătirea materialului biologic presupune o serie de etape (Daraban et al., 2022):

- (1) uscarea materialului vegetal s-a realizat la rece, în curent de aer, iar cu cât gradul de uscare este mai avansat cu atât materialul vegetal este mai ușor de pregătit pentru etapele viitoare;
- (2) după uscare urmează mărunțirea, procedeu care facilitează absorbția compușilor extractibili în solvent și măresc randamentul de extracție indiferent de metoda utilizată. Pentru a crește randamentul de extracție a polifenolilor se va urmări selectarea părților vegetative superioare ale

plantelor, care în majoritatea cazurilor au un conținut ridicat comparativ cu tulpinile și/sau rădăcinile. Un alt mod pentru creșterea extractabilității polifenolilor îl reprezintă creșterea raportului solvent/plantă, un conținut superior de solvent ducând de obicei la un grad superior de extracție, dar nu trebuie neglijat costul solventului și impactul asupra mediului.

3.5.2. Obținerea extractelor vegetale prin macerare

Macerarea (M) reprezintă o metodă tradițională, fiind printre primele metode de extracție a compușilor din plante utilizată practic și folosește diverși solvenți sau amestecuri ale acestora. Utilizarea plantelor aromatice și a condimentelor pentru diverse scopuri a fost practică încă din antichitate, macerarea în vin a acestora fiind o practică obișnuită.

Deși egiptenii și grecii descoperiseră tehnologia distilării pentru a produce diferite tipuri de distilate, abia între anii 1050 și 1150, odată cu evoluția tehnologiei de distilare, alcoolul etilic a fost izolat din băuturile fermentate. Acest lucru a permis utilizarea acestuia ca solvent. În secolul al XIV-lea, alcoolul etilic, cu bunele sale caracteristici de solvent, a devenit unul dintre cei mai importanți agenți de extracție a substanțelor volatile și a altor compuși din plantele aromatice (Tonutti și Liddle, 2010). Macerarea este considerată de unii autori ca fiind o procedură convențională de extracție.

În procesul macerării, proba integră sau mărunțită de plante este plasată într-un vas închis cu solvent, care ulterior se lasă la temperatura camerei pentru o perioadă de cel puțin trei zile cu agitare frecventă. Vasul închis este utilizat astfel încât să se poată preveni evaporarea solventului de extracție și să nu poată apărea variații între diferitele loturi ale aceleiași plante. Sistemul este static, cu excepția agitării intermitente, iar difuzia moleculară este considerată a fi procesul principal care se desfășoară foarte lent. Agitarea intermitentă poate ajuta la difuzie și poate asigura, de asemenea, dispersia soluției concentrate care se acumulează în jurul suprafeței particulelor, aducând astfel solvent proaspăt în contact cu suprafața particulelor (Manousi et al., 2019). În cadrul tezei de doctorat, eficiența procesului de extracție prin macerare ($\eta_M \%$) a fost determinată conform Ec. (3.1):

$$\eta_M \% = \left(\frac{V_1 * M_r}{V_2} * 100 \right) / M_s$$

(3.1)

unde: M_r – este masa reziduului adus la sec (g),

V_1 – este volumul de extract obținut (mL),

V_2 – volumul de extras introdus în etuvă pentru uscarea la sec (mL),

M_s – este masa fazei solide (plantă) supusă macerării (g).

3.5.3. Obținerea extractelor vegetale prin refluxare în extractorul Soxhlet

Extracția Soxhlet (HAE) este o tehnică convențională care a fost propusă mai întâi de Franz Ritter von Soxhlet în 1879 pentru extragerea lipidelor. Astăzi, utilizarea sa nu se limitează la compuși lipidici, ci este de asemenea utilizată pe scară largă pentru extragerea compușilor activi din diferite surse vegetale (Manousi et al., 2019).

În această tehnică, materialul vegetal mărunțit este plasat într-un suport poros din hârtie de filtru sau celuloză, cunoscut sub numele de cartuș. Acesta este introdus în corpul central detașabil al instalației Soxhlet confecționat din sticlă și prevăzut cu două capete rodiate la extremități pentru o etanșare cât mai bună. După ce cartușul cu probă a fost introdus în corpul central al aparatului Soxhlet, acesta se poziționează în gura unui balon colector din sticlă, care se fixează ferm și sigur în suportul plitei de încălzire. De remarcat faptul că înaintea fixării celor două corpuri din sticlă, se introduce solventul în balonul colector.

După fixarea celor două elemente, următoarea etapă este aceea de a fixa refrigerentul și se va conecta la apă ca lichid de răcire. Odată instalația montată s-a pornit sursa de încălzire și s-a reglat temperatura, astfel încât să fie mai mică decât temperatura la care solventul se evaporă.

Formula de calcul care a stat la baza determinării gradului de extracție prin extracție în instalația Soxhlet ($\eta_{\text{Soxhlet}} \%$) este reprezentată de Ec. (3.2):

$$\eta_{\text{Soxhlet}} \% = \left(\frac{V_e \cdot M_r}{V_d} \cdot 100 \right) / M_{sc} \quad (3.2)$$

unde: M_r – este masa reziduului obținut la sec (g),

V_e – este volumul extractului (mL),

V_d – este volumul probei de extract supus în etuvă (mL),

M_{sc} – este masa fazei solide (plantă) introdusă în cartuș (g).

Pentru determinarea conținutului total de substanțe extrase în etanol (de concentrații 50%, 70% și respectiv, 96%), s-a cântărit un volum prestabilit de extract (5 mL) care s-a introdus în creuzete de porțelan (calcinate în prealabil). Creuzetele cu extractul vegetal au fost plasate în etuvă la temperatura de maxim 60 °C pentru un timp de minim 4 ore, până la evaporarea la sec. A urmat apoi răcirea în exicator, minim 30 minute, după care probele au fost recântărite. Masa reziduului obținut raportată la masa volumului de extract a permis calcularea cantității de substanțe extrase exprimate procentual (%).

3.5.4. Obținerea extractelor vegetale prin extracție asistată de ultrasunete

Extracția asistată de ultrasunete (UAE) este o metodă modernă care se remarcă printr-un grad de extracție superior în majoritatea cazurilor conform literaturii de specialitate, dar și studiilor experimentale realizate în teza de doctorat. În această tehnică, materialul vegetal este mărunțit și introdus în flacoane cotate din material plastic sau sticlă, prevăzute cu un dop. În studiile experimentale din teza de doctorat s-au utilizat trei valori ale raportului solid/lichid (1/10, 1/15 și respectiv, 1/20), timp de extracție (10, 15 și respectiv, 30 de minute) și temperatură (30, 45 și 60 °C). Evaluarea gradului de extracție și a conținutului de compuși fenolici și flavonoide s-a realizat ca și în cazul metodelor prezentate anterior, urmărindu-se caracteristicile optime pentru fiecare variație a parametrilor pentru fiecare specie considerată.

Astfel s-au putut identifica atât raportul S/L, timpul de extracție, cât și temperatura optimă pentru valorile factorilor variabili urmăriți. Aceste analize au urmărit în principal determinarea conținutului total de substanțe extrase, conținutul total de polifenoli și flavonoide din extractele vegetale.

Pentru determinarea conținutului total de substanțe extrase în etanol (de concentrații 50%, 70% și respectiv, 96%), s-a cântărit un volum prestabilit de extract (5 mL) care s-a introdus în creuzete de porțelan (calcate în prealabil). Creuzetele cu extractul vegetal au fost introduse în etuvă la temperatura de 60 °C pentru un timp de minim 4 ore, până la evaporarea la sec. A urmat apoi răcirea în exicator, minim 30 minute, după care s-au recântărit. Masa reziduului obținut raportată la masa volumului de extract a permis calcularea cantității de substanțe extrase exprimate procentual ($\eta_{UAE} \%$) conform Ec. (3.3):

$$\eta_{UAE} \% = \frac{m_{\text{reziduu}} \cdot V_{\text{extract}}}{n_{\text{extract}} \cdot m_{\text{eșantion solid}}} \cdot 100 \quad (3.3)$$

unde: m_{reziduu} – reprezintă masa reziduului obținută după evaporarea la sec, (g),

V_{extract} – este de extract obținut, (mL),

n_{extract} – este volumul de extract supus evaporării la sec, (mL),

$m_{\text{eșantion solid}}$ – este masa plantei introdusă în procesul de extracție lichid-solid (g).

3.5.5. Obținerea extractelor vegetale prin combinarea metodelor extracție asistată de ultrasunete și macerare

Studiile experimentale din cadrul tezei de doctorat au vizat și o metodă combinată (UAE+M) dintre extracția asistată de ultrasunete (UAE) și macerare (M), prezentate anterior în subcapitolele 3.5.2. (M) și 3.5.4 (UAE). Prin combinarea celor două metode s-a dorit obținerea unui randament superior atât

din punct de vedere al gradului de extracție, cât și pentru conținutul total de polifenoli și flavonoide, rezultatele fiind prezentate în capitolele următoare.

3.6. Evaluarea activității antioxidante a extractelor vegetale

3.6.1. Determinarea conținutului total de polifenoli din extractele vegetale

Determinarea conținutului total de polifenoli s-a bazat pe metoda spectrofotometrică Singleton cu reactiv Folin-Ciocalteu (Daraban et al., 2022). Protocolul metodei: la 0,5 mL de extract vegetal (*Origanum vulgare* L., *Achillea millefolium* L., *Artemisia absinthium* L. și *Primula veris* L.) au fost adăugați 10 mL apă distilată. După agitare energică, s-au adăugat 0,5 mL reactiv Folin-Ciocalteu. S-a agitat din nou și s-a lăsat în repaos 5 minute, după care s-au adăugat 8 mL de Na_2CO_3 de concentrație 7,5%. S-au lăsat probele la întuneric timp de 2 ore, după care s-a măsurat absorbanta (A) la 765 nm față de proba martor reprezentată de apă distilată tratată în același mod ca probele cu extract. Conținutul de polifenoli a fost determinat pe baza curbei de calibrare, trasată folosind acidul galic (modelul reprezentativ selectat datorită stabilității și purității sale), utilizat ca standard de referință. Rezultatele sunt exprimate în μg echivalenți de acid galic (GAE) la 1 g de probă (substanță uscată, s.u.), $\mu\text{g}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.u.}}$. Concentrația de polifenoli din extract s-a calculat utilizând ecuația drepte de regresie liniară a curbei de calibrare (Ec. 3.4):

$$Cx = (A(765\text{nm}) + 0,0831)/2,1169 \quad (3.4)$$

unde: A – este absorbanta probei la lungimea de undă de 765nm.

3.6.2. Determinarea conținutului total de flavonoide din extractele vegetale

Determinarea conținutului total de flavonoide a fost realizată prin utilizarea unei metode spectrofotometrice, bazată pe complexarea flavonoidelor cu clorură de aluminiu (Ghinea et al., 2021). O soluție apoasă de AlCl_3 de concentrație 2% (2 mL) a fost amestecată cu proba reprezentată de extractele vegetale de *Origanum vulgare* L., *Achillea millefolium* L., *Artemisia absinthium* L. și *Primula veris* L. (2 mL) în prezența metanolului.

Absorbanta a fost obținută după 15 min de incubare la temperatura camerei, la întuneric, prin citire la 415 nm față de o probă martor reprezentată de 2 mL metanol + 2 mL AlCl_3 2%. Standardul de referință utilizat pentru determinarea flavonoidelor a fost quercetina, iar rezultatele sunt date în mg echivalenți de quercetină la 1 g de probă (substanță uscată, s.u.) ($\text{mg}_{\text{QE}}/\text{g}_{\text{s.u.}}$). Valorile experimentale au fost calculate utilizând ecuația de regresie liniară a curbei de calibrare (Ec. 3.5):

$$C_x = (A(415\text{nm}) - 0,037) / 0,0003 \quad (3.5)$$

unde: A – este valoarea absorbanței măsurată la lungimea de unda 415 nm.

3.7. Caracterizarea fizico-chimică a extractelor vegetale

3.7.1. Caracterizarea senzorială a extractelor vegetale

Metoda senzorială (organoleptică) implică analiza cu ajutorul organelor de simț a unor caracteristici a extractelor obținute precum: culoarea, mirosul și consistența.

3.7.2. Determinarea conținutului de apă specific speciilor de plante studiate

Umiditatea s-a măsurat pentru planta uscată înainte de extracție. Materialul vegetal uscat reprezentat de speciile de plante *Origanum vulgare* L., *Achillea millefolium* L., *Artemisia absinthium* L. și *Primula veris* L. a fost mărunțit avansat, sub forma unei pulberi fine, utilizându-se o mașină de mărunțit. Ulterior s-au cântărit 1,5 g de probă care a fost plasată pe un disc din aluminiu cu diametru de 10 cm. Proba a fost distribuită uniform pe toată suprafața discului. În aprox. 15-20 minute, balanța termostatică cu sistem de măsurare a conținutului de apă, a afișat valorile corespunzătoare conținutului de apă specific extractelor vegetale obținute.

Tabelul 3.2 prezintă valorile umidității speciilor de plante exprimată procentual (%). Valorile obținute evidențiază specia *A. absinthium* L. ca având cea mai ridică umiditate (8,21%), urmată de *P. veris* L. (7,89%), *A. millefolium* L. (7,54%) și respectiv, *O. vulgare* L. (7,44%).

Tabelul 3.2. Conținutul de apă evaporat specific plantelor exprimat procentual (%)

Nr. Crt.	Specia	Masa inițială (g)	Masa finală (g)	Conținut de apă evaporată (%)
1	<i>A. absinthium</i> L.	1,5019	1,3786	8,21
2	<i>A. millefolium</i> L.	1,4929	1,3804	7,54
3	<i>O. vulgare</i> L.	1,4765	1,3666	7,44
4	<i>P. veris</i> L.	1,5077	1,3886	7,89

3.7.3. Determinarea vâscozității extractelor vegetale obținute

Vâscozitatea extractelor vegetale din speciile *Origanum vulgare* L., *Achillea millefolium* L., *Artemisia absinthium* L. și *Primula veris* L. s-a determinat cu un tub Ubbelohde cu capilar. Calibrarea vâscozimetrului s-a bazat pe valorile apei și pe metodele standard acceptate de Societatea Americană pentru Testare și Materiale (ASTM). Pentru fiecare determinare temperatura a fost controlată cu precizie $\pm 0,1$ K, utilizând vâscozimetrul Viscosimetre

Thermostat 655. S-a utilizat un cronometru cu precizia de $\pm 0,05$ pentru a măsura timpul de reflux pentru lichid. Timpul de reflux pentru fiecare probă a fost măsurat de 5 ori. Precizia determinărilor se apreciază a fi $\pm 1,00\%$.

Protocol experimental pentru determinarea vâscozității

Se utilizează recipiente de sticlă, cu volumul de 300 cm^3 și închise etanș cu dopuri. Se omogenizează conținutul sticlei. Ulterior, proba se introduce pe la partea superioară a tubului. Se cronometrează timpul necesar curgerii unui volum V de lichid prin capilar. Pentru fiecare test se notează temperatura la care s-a realizat. Se compară rezultatele obținute cu cele ale lichidului de referință: apa și etanol. Pentru calcul, se aplică o relație dedusă din legea Poiseuille (Ec. 3.7).

$$\frac{\eta_1}{t_1} = \frac{\eta_0}{t_0} \quad (3.7)$$

unde: η_0 - este vâscozitatea apei, mPa s; η_1 - vâscozitatea amestecului, mPa s; t_0 - timpul de curgere a apei prin capilar, s; t_1 - timpul de curgere prin capilar a soluției, s.

3.7.4. Determinarea grupărilor funcționale ale compușilor din extractele vegetale cu ajutorul metodelor spectrofotometrice UV-VIS și FTIR

Pentru înregistrarea spectrelor probelor de extracte vegetale în intervalul $200\text{--}800\text{ nm}$ s-a utilizat spectrofotometrul UV-VIS, model Jasco V-550. Extractele etanolicе de plante au fost de asemenea analizate cu ajutorul spectrometriei în infraroșu (FTIR) folosind un spectrometru FT-IR Thermo Scientific Nicolet 6700. Probele au fost scanate în intervalul de absorbție de 4000 și 600 cm^{-1} . Analiza a fost repetată de două ori pentru confirmarea spectrului.

3.8. Evaluarea activității bioinsecticide a extractelor vegetale

3.8.1. Evaluarea activității bioinsecticide a extractelor vegetale asupra dăunătorilor din specia *Leptinotarsa decemlineata* Say

Colectarea indivizilor din specia *L. decemlineata* Say s-a realizat de pe parcele unde nu s-a administrat niciun tratament chimic în ultimii 5 ani, pentru a se exclude o eventuală rezistență la tratamente provenită de la generațiile anterioare. Nici în cazul hranei nu s-au administrat tratamente de niciun fel.

Toți indivizii au fost puși în cuști de creștere prevăzute cu orificii de ventilare, administrându-se hrană reprezentată de lăstare proaspete de cartof (*Solanum tuberosum* L.).

Toate variantele experimentale au fost însoțite de o probă martor, studiile experimentale fiind realizate în triplicat. În fiecare cușcă de creștere, la toate variantele experimentale, numărul indivizilor a fost identic, 10 adulți și respectiv 10 larve. Indivizii incluși în studiile experimentale au fost incluși în cuștile de creștere cu 24 h înaintea administrării tratamentelor pentru ca aceștia să se adapteze noilor condiții.

În cadrul acestei etape din studiul experimental au fost variați 6 parametri:

- volumul cuștilor de creștere în care au stat adulții și larvele (A + L - adulți, larve): 0,5 L, 5 L și respectiv 10 L;
- metoda de obținere a tratamentului administrat: M, HAE, UAE și UAE+M;
- specia plantei din care s-a obținut tratamentul: *Origanum vulgare* L., *Achillea millefolium* L., *Artemisia absinthium* L. și *Primula veris* L.;
- modul de administrare al tratamentelor: pulverizare direct pe hrană (*pulverizare directă*) și pulverizare prin eliberare controlată (*pulverizare indirectă* pe un disc de celuloză);
- concentrația tratamentului administrat: extract brut, 100% și extract diluat, 60%;
- stadiul indivizilor: adulți și/sau larve.

$$\% \text{ gradul de mortalitate} = \frac{N_m}{N_0} \times 100$$

Ec. (3.8)

unde: N_m – este numărul de indivizi morți; N_0 – este numărul de indivizi incluși inițial în experiment.

3.8.2. Evaluarea activității bioinsecticide a extractelor vegetale asupra dăunătorilor din specia *Acanthoscelides obtectus* Say

Pentru a evita orice fel de interferențe legate de rezistența la anumite substanțe sau anumiți factori care ar putea influența indivizii investigați, s-a asigurat ca generația supusă analizelor din specia *A. obtectus* Say să fie născută în cuștile de creștere prevăzute cu orificii pentru ventilație. În acest sens patele depuse de femele în masa biologică reprezentată de fasole albă (*Phaseolus vulgaris* L.) s-au menținut la o temperatură cu aproximativ 10 °C mai mare decât temperatura mediului ambiant pe perioada sezonului rece și la temperatura mediului ambiant în timpul sezonului cald. Scopul acestei proceduri a fost simularea cât mai fidelă a condițiilor ambientale specifice României. După părăsirea locului în care s-au hrănit indivizii până la maturitate și deplasarea pe

pereții cuștii de creștere, s-au selectat câte 20 de indivizi care au manifestat dorința de a zbura. Aceștia au fost transferați în cuști de creștere cu volum de 1 L pregătite cu câte 50 boabe de fasole. Au fost administrate tratamente cu extracte de plante din flora spontană, ca și în cazul speciei *L. decemlineata* Say, concentrațiile tratamentului administrat fiind, extract brut, 100% și extract diluat, 5%.

Administrarea tratamentelor s-a realizat în două moduri:

- prin *pulverizare directă* pe suprafața boabelor de fasole;
- prin *pulverizare indirectă*, prin administrarea tratamentelor pe un disc suspendat în mijlocul cuștii de creștere, dintr-un material celulozic cu proprietatea de eliberare controlată.

Frecvența administrărilor și monitorizarea efectelor tratamentelor în diferite concentrații și în formule diferite a fost similară protocolului de lucru aferent speciei *L. decemlineata* Say identificat în subcapitolul 3.8.1. Astfel, administrarea și monitorizarea indivizilor din specia *A. obtectus* Say s-a efectuat în timp de la 2h la 168h. Gradul de mortalitate (%) a fost calculat prin utilizarea Ec. (3.8), prezentată anterior.

3.9. Modelarea analitică a gradului de supraviețuire a dăunătorilor de cultură și depozit în condițiile tratamentelor cu biopesticide

Răspunsul cinetic cu privire la supraviețuirea dăunătorilor din speciile *L. decemlineata* Say și *A. obtectus* Say tratate cu ajutorul produselor bioinsecticide din extracte vegetale pe bază de *O. vulgare* L., *A. millefolium* L., *A. absinthium* L. și *P. veris* L., extrase prin metodele considerate în teza de doctorat, poate fi descris prin utilizarea unui model cinetic de ordin I, folosind gradul de supraviețuire al speciilor considerate în studiu în funcție de timpul de expunere pentru fiecare metodă de aplicare a tratamentelor (pulverizare directă sau pulverizare indirectă).

Ecuția cinetică de ordinul I a fost folosită în literatura de specialitate pentru predicția timpului letal (LT) necesar mortalității unor populații de indivizi așa cum sunt cei din speciile *Rhyzopertha dominica* (F.): CRDZ, CRD37 și *Tribolium confusum* Jacq. du Val: CTC065, CTC066 (Desmarchelier, 1978), *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) (Wang et al., 2002), *Sitophilus oryzae* (Yan et al., 2014).

Ecuția generală pentru modelul cinetic este reprezentată de Ec. (3.9):

$$\frac{dN/N_0}{dt} = -k(N/N_0)^{1-n} \quad (3.9)$$

Integrarea Ec. (3.9) poate fi convertită la diferite ordine de reacție (ordinul 0, 1, 1,5 și 2) după cum urmează, considerând forma logaritmică. Astfel, în formă logaritmică, ecuația cinetică de ordinul I, este reprezentată de Ec. (3.10), *în formă liniară*:

$$\ln(N/N_0) = -kt + c \quad (3.10)$$

unde: N și N_0 – sunt numărul de indivizi care au supraviețuit tratamentelor și, respectiv, numărul inițial de indivizi incluși în studiile experimentale;
 k – este constanta de viteză;
 t – este timpul de expunere (h);
 c – este constantă;
 n – este ordinea cinetică a reacției (în această situație $n = 1$).

În literatura de specialitate, de cele mai multe ori ecuația cinetică de ordin I este aplicată pentru a determina timpul de înjumătățire ($t_{1/2}$) al pesticidelor aplicate în diferite tratamente în controlul dăunătorilor (Fantke și Juraske, 2013). În studiul de față, modelul a fost adaptat reacției cinetice de ordinul I pentru a estima timpul necesar pentru o mortalitate a 50% din indivizii supuși studiului experimental prin calcularea timpului letal/lethal time (LT_{50}) corespunzător Ec. (3.11).

$$LT_{50} = \ln(2) / k \quad (3.11)$$

Astfel, ecuația cinetică de ordinul I a fost adaptată conform Ec. (3.12) (*forma neliniară*):

$$\text{Gradul de supraviețuire}(t) = \text{Gradul de supraviețuire}_0 \times \exp(-k \times t) \quad (3.12)$$

unde: gradul de supraviețuire *Gradul de supraviețuire* $_0$ – este gradul de supraviețuire (%) la timpul t_0 / inițial; t – este timpul de monitorizare al indivizilor / timpul de expunere la tratamente (h).

Prin rearanjarea Eq. (3.12) se calculează constanta k (Ec. 3.13) din care rezultă LT_{50} conform Ec. (3.11):

$$k = \frac{\ln[\text{Gradul de supraviețuire}_0] - \ln[\text{Gradul de supraviețuire}(t)]}{t} \quad (3.13)$$

Rezultatele modelării au fost calculate din ecuația de regresie cinetică și comparate prin identificarea coeficienților de corelație pentru fiecare tip de tratament aplicat (pulverizare directă sau pulverizare indirectă). Constantele k și c au fost obținute din ecuația de regresie.

Pentru a lua în considerare evoluția gradului de supraviețuire (%) al indivizilor înainte și după aplicarea tratamentelor cu biopesticide, am comparat valorile gradului de supraviețuire modelate cu ajutorul ecuației cinetice de ordinul I cu cele măsurate la 2h, 8h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h și 168h după aplicare. Acuratețea modelului a fost testată prin intermediul coeficientului de corelație (R^2).

Informațiile prezentate în cadrul acestui capitol sunt importante atât pentru o înțelegere mai profundă a obiectivelor propuse în teza de doctorat, cât și pentru o claritate înaltă a etapelor de implementare a protocolului de lucru, metode și proceduri. De asemenea, cunoașterea temeinică a speciilor de plante și a dăunătorilor de cultură și depozit vizați este foarte importantă pentru analizele ulterioare.

Descrierea detaliată a procedurilor, tehnicilor și metodelor, de la recoltarea speciilor de plante selecționate (pentru obținerea tratamentelor ulterioare), până la pregătirea pulberilor de plante în vederea extracției și selecționarea unor metode de extracție optime, oferă predictibilitate și ușurință în atingerea obiectivelor propuse.

CAPITOLUL 4.

Evaluarea și caracterizarea extractelor vegetale obținute din flora spontană autohtonă prin metode de extracție clasice și moderne

4.1. Scopul și importanța cercetării

Având în vedere tendințele la nivel mondial privind managementul resurselor și eficientizarea proceselor de producție pentru obținerea unui preț cât mai redus, este imperios necesar să se realizeze studii comparative între metodele clasice/convenționale și moderne de extracție, ținând cont de identificarea parametrilor optimi ai procesului de extracție. În acest sens, în prezenta teză de doctorat, atât în cadrul metodelor clasice cât și a celor moderne de extracție, s-a urmărit influența variației următorilor parametri: raportul solid/lichid (S/L), timpul de extracție, concentrația solventului de extracție și temperatura.

Metodele de extracție clasice studiate în cadrul tezei de doctorat au fost reprezentate de macerare (M) și extracție prin refluxare în instalația Soxhlet (heat

assisted extraction, HAE), iar dintre metodele moderne de extracție am ales extracția asistată de ultrasunete (ultrasound assisted extraction, UAE). Aceste metode au fost selectate ținând cont de costurile de achiziție, întreținere și exploatare relativ reduse comparativ cu alte metode, dar și pentru performanțele competitive în ceea ce privește gradul de extracție conform literaturii de specialitate. Este de menționat faptul că pentru aplicarea metodelor considerate în teza de doctorat nu este necesar personal înalt calificat sau consumabile costisitoare, ceea ce face ca aceste metode să fie dezirabile și din punct de vedere economic. Pentru o eficiență crescută a gradului de extracție am considerat oportună combinarea a două metode, metoda macerării și UAE, ceea ce a condus la un randament sporit de extracție considerând optimizarea din punct de vedere experimental a raportului S/L, a timpului de extracție, a concentrației solventului și a temperaturii. După optimizarea din punct de vedere experimental a gradului de extracție și a extracției compușilor reprezentați de polifenoli și flavonoide, pentru fiecare metodă, în funcție de variabilele studiate, în acest capitol sunt prezentate cele mai semnificative rezultate obținute la identificarea unor grupări funcționale/compuși care pot fi evidențiate ca responsabile pentru efectele biopesticide manifestate în urma administrării tratamentelor asupra dăunătorilor considerați. Pentru identificarea acestora am utilizat spectroscopia în domeniul ultraviolet vizibil (UV-VIS) și spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR).

În consecință, extracția compușilor activi din plante necesită aplicarea unor metode și tehnici de extracție adecvate care să conducă la extracte și fracții bogate în ingrediente bioactive. Procedurile de extracție și optimizarea variabilelor de extracție joacă, prin urmare, un rol critic în ceea ce privește obținerea unui grad de extracție ridicat, caracterul compoziției fitochimice, etc. (Suteu et al., 2020; Fongang Fotsing et al., 2022). Obiectivul unui proces de extracție ar trebui să fie, bineînțeles, obținerea unui randament maxim de extracție și compuși bioactivi de cea mai înaltă calitate (prin concentrația de compuși țintă și puterea antioxidantă a extractelor) (Spigno et al., 2007; Suteu et al., 2020).

Pentru selecția plantelor utilizate, în studiile preliminare (*Primula veris* L., *Urtica dioica* L., *Allium sativum* L., *Equisetum arvense* L., *Pimpinella anisum* L., *Salvia officinalis* L., *Matricaria chamomilla* L., *Calendula officinalis* L., *Achillea millefolium* L., *Rumex patientia* L., *Hypericum perforatum* L., *Origanum vulgare* L., *Ocimum basilicum* L., *Satureja hortensis* L. și *Artemisia absinthium* L.) a fost vizată doar influența activității bioinsecticide pentru dăunătorii vizați, factori precum gradul de extracție sau extracția compușilor țintă nefiind incluși în obiectivele inițiale. În urma selecției extractelor ce pot fi utilizate cu eficiență sporită ca tratamente în combaterea dăunătorilor de cultură și depozit (capitolul 5), au rămas doar 4 specii de plante: *Origanum vulgare* L.,

Achillea millefolium L., *Artemisia absinthium* L. și *Primula veris* L. pentru care ulterior vor fi definiți și identificați toți factorii de influență asupra proceselor de extracție.

Astfel, în acest capitol al tezei de doctorat mi-am propus obținerea și descrierea rezultatelor științifice realizate ținând cont de următoarele obiective:

- identificarea performanței metodelor clasice și moderne de extracție prin analiza gradului de extracție al speciilor de plante din flora spontană autohtonă selectate (*Origanum vulgare* L., *Achillea millefolium* L., *Artemisia absinthium* L. și *Primula veris* L.);
- identificarea parametrilor optimi de extracție care influențează procesul de extracție (gradul de extracție, conținutul de polifenoli și flavonoide) al plantelor din flora spontană autohtonă prin diferite metode de extracție: raportul S/L, timpul de extracție, concentrația solventului și temperatura;
- caracterizarea fizico-chimică a extractelor vegetale obținute din speciile de plante selectate din flora spontană autohtonă (*Origanum vulgare* L., *Achillea millefolium* L., *Artemisia absinthium* L. și *Primula veris* L.) și identificarea grupărilor funcționale prin UV-VIS și FTIR.

Printre cei mai importanți factori care influențează gradul de extracție, precum și extracția unor compuși țintă (de ex. polifenoli, flavonoide) din speciile de plante din flora spontană autohtonă, considerați în cadrul acestui capitol, au fost:

- *raportul S/L*: - metoda macerării: 1/5, 1/10, 1/15, 1/20;
- metodele HAE, UAE, UAE+M: 1/10, 1/15, 1/20;
- *timpul de extracție*: - metoda macerării: 9 zile;
- metoda HAE: 45 min, 60 min și 120 min;
- metoda UAE: 10 min, 15 min și 30 min;
- metoda UAE+M: 10 min+9 zile, 15 min+9 zile și 30 min+9 zile;
- *concentrația solventului*: 50%, 70% și 96%;
- *temperatura*: - metoda macerării: 22±2 °C;
- metoda UAE: 35 °C, 45 °C și 60 °C;
- metoda combinată UAE+M: UAE: 45 °C sau 60 °C, M: 22±2 °C.

Raportul solid-lichid (S/L) este un factor important care poate influența gradul de extracție, dar și calitatea compușilor extrași din plante. Acest raport se referă la cantitatea de material solid (plante) în raport cu cantitatea de solvent folosit pentru extracție (Ryu et al., 2020). În general, la un raport solid-lichid mai mare se realizează o extracție mai eficientă a compușilor fenolici din plante, dar poate fi costisitor și poate determina diluarea compușilor fenolici extrași. Pe de altă parte, un raport solid-lichid mai mic poate duce la o extracție mai puțin

eficientă a compușilor fenolici din plante, dar poate fi mai economic și permite obținerea unei concentrații mai mari a compușilor fenolici extrași (Fongang Fotsing et al., 2022). Efectul raportului solid/solvent a fost investigat în literatura de specialitate, concluzionându-se faptul că, cu cât raportul este mai mare, cu atât cantitatea totală de substanțe active obținute este mai mare, indiferent de solventul utilizat, conform principiilor de transfer de masă (Spigno et al., 2007).

În general, *timpul de extracție* poate avea un impact asupra randamentului și calității compușilor fenolici extrași din plante. Eficiența extracției se apreciază odată cu creșterea duratei de extracție într-un anumit interval de timp. Creșterea timpului nu va afecta extracția după ce se atinge punctul de echilibru al solutului în interiorul și exteriorul materialului solid (Zhang et al., 2018).

Randamentul de extracție este puternic influențat de *solventul* utilizat, din cauza polarității diferite și a potențialului antioxidant diferit al compușilor extrași. Prin urmare, solventul organic de polaritate mai mare este mai eficient în recuperarea cantitativă a compușilor fenolici. Solvenții nepolari și metanolul au fost raportați în multe studii ca fiind buni solvenți pentru extracția de compuși fenolici din plante. Cu toate acestea, utilizarea metanolului poate duce la niveluri inacceptabile de reziduuri toxice în extractele finale. Astfel, etanolul și apa sunt cei mai răspândiți solvenți din motive de siguranță și pentru abundența lor (Elboughdiri, 2018; Daraban et al., 2022).

Efectul *temperaturii* asupra gradului de extracție al plantelor depinde direct de temperatură, dar doar până la o anumită valoare. O temperatură de extracție ridicată determină, în general, o creștere a solubilității (Antony și Farid, 2022). Acest lucru poate fi demonstrat prin faptul că o temperatură mai ridicată generează o reducere a interacțiunilor intermoleculare în cadrul solventului, ceea ce duce la o mișcare moleculară mai mare și la o solubilitate mai mare a compușilor țintă în solventul de extracție. Creșterea temperaturii poate provoca, de asemenea, distrugerea matricei celulare, ceea ce duce la o mai mare disponibilitate a componentelor pentru extracție. În plus, la niveluri de temperatură mai ridicate, vâscozitatea solventului scade, crescând solubilitatea și, prin urmare, crește și eficiența extracției. Dar, în unele cazuri, s-a observat că eficiența extracției se apreciază odată cu creșterea temperaturii până la un anumit nivel de temperatură și apoi gradul de extracție începe să scadă odată cu creșterea ulterioară a nivelului de temperatură. Acest lucru diferă, de asemenea, în funcție de tipul de compuși țintă care urmează să fie extrași, întrucât temperatura de degradare pentru fiecare compus în parte poate fi diferită (Che Sulaiman et al., 2017; Pham et al., 2019; Zaidiyah et al., 2021; Nishad, 2022).

Ținând cont de cele enumerate anterior, pe parcursul acestui capitol vor fi prezentate cele mai importante rezultate și concluziile caracteristice impactului pe care l-au avut acești parametri asupra gradului de extracție, conținutului total

de polifenoli (TPC) și conținutului total de flavonoide (TFC), variați în funcție de metoda de extracție, dar și identificarea celor mai reprezentative grupări ce influențează procesul de extracție prin analizele UV-VIS și FTIR.

4.2. Studiul factorilor care influențează procesul de extracție din plante, din flora spontană autohtonă prin diferite metode de extracție

4.2.1. Influența raportului solid/lichid (S/L) asupra gradului de extracție

4.2.1.4. Influența raportului S/L asupra gradului de extracție în cazul metodei combinate: extracție asistată de ultrasunete și macerare

Figura 4.6 evidențiază influența raportului S/L asupra gradului de extracție realizat prin metoda combinată: UAE+M, la 60 °C și timp de 30 min pentru metoda UAE și respectiv 22±2 °C și timp de 9 zile în cazul metodei macerării. Acești parametri (temperatura și respectiv, timpul), precum și combinarea celor două metode de extracție (UAE și M), au fost considerați datorită valorilor gradului de extracție net superioare metodelor individuale, dar și a parametrilor studiați; aceste aspecte au condus la un grad de extracție de cel puțin 2 ori mai ridicat față de valoarea acestuia în urma utilizării celei mai eficiente metode (UAE), în mod individual.

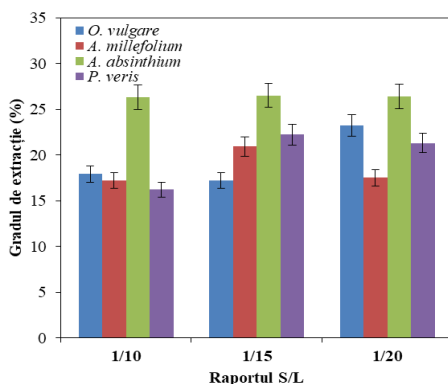


Figura 4.6. Influența raportului S/L asupra gradului de extracție în cazul metodei de extracție combinate UAE+M realizată în condiții de: UAE: 60 °C și 30 min + M: 22±2 °C și 9 zile (eroare standard de 5%)

Analizând rezultatele obținute în Figura 4.6, se poate observa faptul că nu există diferențe semnificative între cele trei rapoarte S/L, însă tendința gradului de extracție este de creștere de la raportul S/L de 1/10 către raportul S/L

de 1/20. Astfel, pentru gradul de extracție în funcție de rapoartele S/L ordinea este de: $1/20 > 1/15 > 1/10$. În ceea ce privește speciile de plante studiate, *A. absinthium* L. se evidențiază ca având valoarea cea mai ridicată a gradului de extracție, începând de la raportul S/L 1/10 (când se înregistrează o valoare a acestuia de ~25%) și finalizând cu raportul S/L 1/20 (când se atinge un maxim al gradului de extracție de peste 30%). *A. millefolium* L. și *O. vulgare* L. prezintă randamente asemănătoare, în timp ce *P. veris* L. înregistrează cele mai mici valori ale gradului de extracție, tendință întâlnită și în cazul rezultatelor prezentate în figurile anterioare. Prin urmare, se menține și în cadrul metodei UAE+M tendința în ceea ce privește gradul de extracție identificat conform speciilor de plante studiate, respectiv *A. absinthium* L. > *O. vulgare* L. > *A. millefolium* L. > *P. veris* L.

4.2.2. Influența timpului de extracție asupra gradului de extracție

4.2.2.3. Influența timpului de extracție asupra gradului de extracție în cazul metodei combinate : extracție asistată de ultrasunete și macerare

Influența timpului de extracție asupra gradului de extracție în cazul metodei combinate (extracție asistată de ultrasunete și macerare) (UAE +M) este prezentată în Figura 4.11.

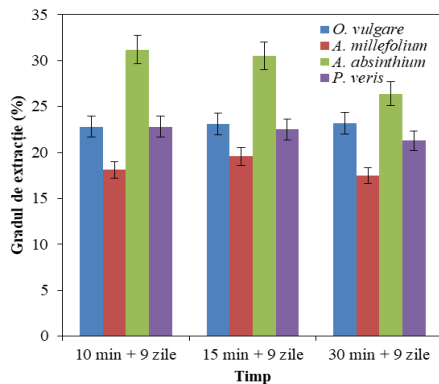


Figura 4.11. Influența timpului de extracție asupra gradului de extracție în cazul metodei de extracție combinate UAE +M realizată la raportul S/L de 1/20 (UAE: 60 °C și 10 min, 15 min, 30 min, M: 22±2 °C și 9 zile; eroare standard de 5%)

4.2.3. Influența concentrației solventului asupra gradului de extracție

4.2.3.4. Influența concentrației solventului asupra gradului de extracție în cazul metodei combinate: extracție asistată de ultrasunete și macerare

În Figura 4.15 sunt prezentate rezultatele obținute privind influența concentrației solventului asupra gradului de extracție prin metoda combinată UAE+M, ținând cont de condițiile optime obținute din punct de vedere experimental pentru parametri de extracție, respectiv, raportul S/L de 1/15, temperatura, UAE: 60 °C, M: 22±2 °C și timpul de extracție: UAE: 30 min, M: 9 zile.

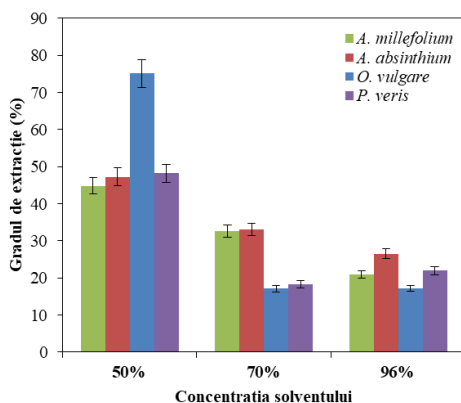


Figura 4.15. Influența concentrației solventului asupra gradului de extracție în cazul metodei combinate prin UAE+M (parametri de extracție: raport S/L de 1/15; temperatura, UAE: 60 °C, M: 22±2 °C; timp de extracție, UAE: 30 min, M: 9 zile; eroare standard de 5%) (Daraban et al., 2021a)

4.3. Conținutul total de polifenoli din extractele vegetale obținute prin diferite metode de extracție, în funcție de factorii de influență

4.3.1. Influența raportului solid/lichid (S/L) asupra conținutului total de polifenoli

4.3.1.4. Influența raportului S/L asupra conținutului total de polifenoli în cazul extractelor obținute prin extracție asistată de ultrasunete combinată cu macerare

Rezultatele extracției compușilor polifenolici prin metoda combinată UAE+M la cele trei rapoarte S/L de 1/10, 1/15 și respectiv 1/20 sunt prezentate în Figura 4.21. Odată cu combinarea metodelor, valorile TPC scad cu creșterea raportului S/L de la 1/10 la 1/20. Comparativ cu metoda UAE (Figura 4.20), valorile TPC au crescut, depășind (20 μg_{GAE}/g_{s.u.}) pentru speciile *P. veris* L. și *O. vulgare* L. ajungând la (~15 μg_{GAE}/g_{s.u.}) pentru *A. absinthium* L. și *A. millefolium* L., la raportul S/L de 1/10. Se poate spune că macerarea care a urmat extracției asistată de ultrasunete a avut un efect benefic asupra conținutului de polifenoli.

Valorile compușilor polifenolici extrași prin metoda UAE+M urmează astfel ordinea: pentru speciile de plante, *P. veris* L. > *O. vulgare* L. > *A. absinthium* L. > *A. millefolium* L.; pentru raportul S/L: S/L 1/10 > S/L 1/15 > S/L 1/20.

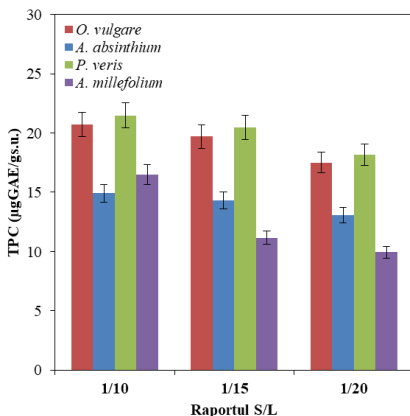


Figura 4.21. Influența raportului S/L asupra conținutului total de polifenoli (TPC) din extractele obținute prin extracție cu etanol de concentrație 96% prin metoda UAE+M (parametri de extracție: temperatura, UAE: 45 °C, M: 22±2 °C; timp de extracție, UAE: 30 min, M: 9 zile; eroare standard de 5%)

4.3.2. Influența timpului de extracție asupra conținutului total de polifenoli

4.3.2.3. Influența timpului de extracție asupra conținutului total de polifenoli din extractele obținute prin metoda combinată: extracție asistată de ultrasunete - macerare

Influența timpului de extracție asupra conținutului total de polifenoli (TPC) din extractele obținute prin extracție cu etanol de concentrație 96% prin metoda UAE+M este reprezentată în Figura 4.26. Odată cu creșterea timpului de extracție, se observă o creștere a valorilor TPC pentru toate speciile de plante. Cele mai semnificative rezultate sunt obținute în cazul speciilor *O. vulgare* L. și *P. veris* L., când odată cu creșterea timpului de extracție de la 10 min la 30 min, cresc valorile TPC de la (~14 µgGAE/g.s.u.) la (~22 µgGAE/g.s.u.) și respectiv, de la (~15 µgGAE/g.s.u.) la (~23 µgGAE/g.s.u.). Speciile *A. millefolium* L. și *A. absinthium* L. nu prezintă diferențe semnificative odată cu creșterea timpului de contact, totuși cele mai ridicate valori ale TPC sunt obținute tot la 30 min și pentru aceste specii, (~14 µgGAE/g.s.u.) și respectiv (~15 µgGAE/g.s.u.).

Am realizat astfel o ierarhizare a valorilor TPC din extractele obținute prin metoda UAE+M la 45 °C în funcție de influența timpului de extracție astfel:

30 min + 9 zile > 15 min + 9 zile > 10 min + 9 zile. În ceea ce privește valorile TPC în funcție de speciile de plante, ordinea este: *P. veris* L. > *O. vulgare* L. > *A. absinthium* L. > *A. millefolium* L.

Datele obținute sugerează astfel importanța timpului de extracție în obținerea unor concentrații ridicate de polifenoli din speciile studiate. Acest parametru este confirmat și în literatura de specialitate pentru specia *Ocimum basilicum* L. (Da Silva Moura et al., 2020). Carpentieri și colab. (2021) au evidențiat de asemenea o tendință de creștere a gradului de extracție al polifenolilor odată cu creșterea timpului de extracție până la 360 min pentru speciile *O. vulgare* L. și *Thymus serpyllum* L.

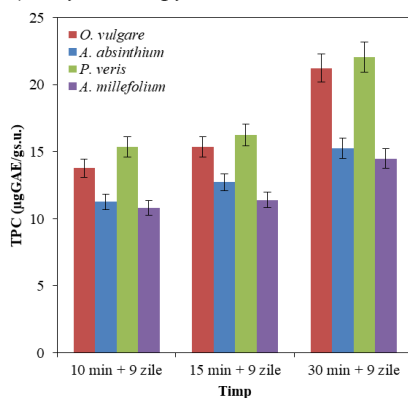


Figura 4.26. Influența timpului de extracție asupra conținutului total de polifenoli (TPC) din extractele obținute prin extracție cu etanol de concentrație 96% prin metoda UAE+M (parametri de extracție: raport SL de 1/10, temperatura, UAE: 45 °C, M: 22±2 °C; timp de extracție, UAE: 10, 15, 30 min, M: 9 zile eroare standard de 5%)

4.4. Conținutul total de flavonoide din extractele vegetale obținute prin diferite metode de extracție, în funcție de factorii de influență

4.4.1. Influența raportului solid/lichid (S/L) asupra conținutului total de flavonoide

4.4.1.4. Influența raportului S/L asupra conținutului total de flavonoide din extractele obținute prin metoda combinată: extracție asistată de ultrasunete - macerare

Figura 4.32 prezintă rezultatele studiului referitor la efectele raportului S/L asupra conținutului total de flavonoide (TFC) din extractele obținute prin metoda UAE+M considerând parametrii optimi de extracție temperatura, UAE:

45 °C, M: 22±2 °C, dar și timpul de extracție, UAE: 10 min, M: 9 zile (10 min+9 zile).

Metoda combinată, UAE+M, prezintă diferențe semnificative ale valorilor TFC, comparativ cu metodele de extracție utilizate anterior. Astfel, valorile TFC identificate la raportul S/L 1/10 prezintă rezultate optime pentru toate cele 4 specii de plante (~50-75 mg_{QE}/g_{s.u.}). Odată cu creșterea raportului S/L de la 1/10 spre 1/20, valorile TFC extrase scad semnificativ cu cel puțin 50% (~25-30 mg_{QE}/g_{s.u.}). Astfel, valorile optime ale TFC extrase prin metoda UAE+M în ordinea speciilor plantelor urmează tiparul *O. vulgare* L. > *P. veris* L. > *A. millefolium* L. > *A. absinthium* L., ordinea pentru rapoartele S/L fiind: **S/L 1/10 > S/L 1/15 > S/L 1/20**.

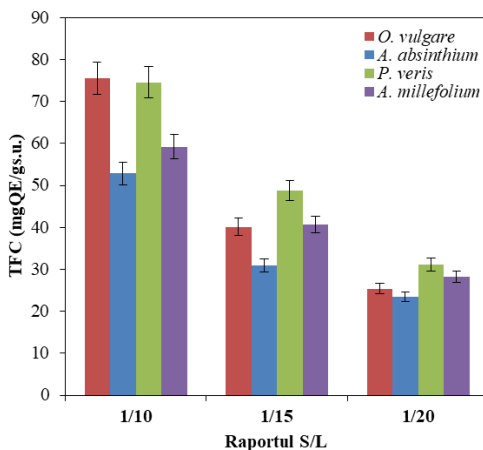


Figura 4.32. Influența raportului S/L asupra conținutului total de flavonoide (TFC) din extractele obținute prin metoda UAE+M (parametri de extracție: temperatura, UAE: 45 °C, M: 22±2 °C; timp de extracție, UAE: 10 min, M: 9 zile; etanol de concentrație 96%; eroare standard de 5%)

4.4.2. Influența timpului de extracție asupra conținutului total de flavonoide

4.4.2.3. Influența timpului de extracție asupra conținutului total de flavonoide din extractele obținute prin metoda combinată: extracției asistată de ultrasunete - macerare

Influența timpului de extracție asupra conținutului total de flavonoide (TFC) din extractele obținute prin extracție cu etanol de concentrație 96% prin metoda UAE+M la temperatura optimă de extracție de 45 °C pentru metoda UAE și 22±2 °C pentru metoda M, precum și un raport S/L de 1/10, este evidențiată în Figura 4.37. Se observă faptul că odată cu creșterea timpului de contact de la 10 min + 9 zile la 30 min + 9 zile, valorile TFC scad cu mai mult de

70%. Metoda combinată, UAE+M, se dovedește a fi optimă cu privire la valorile TFC comparativ cu celelalte metode investigate în teza de doctorat. Cele mai semnificative rezultate sunt obținute la un timp de extracție de 10 min + 9 zile, pentru speciile *O. vulgare* L. și *P. veris* L., (~75 mg_{QE}/g_{s.u.}), fiind urmate de *A. millefolium* L. și *A. absinthium* L., cu valori de (~60 mg_{QE}/g_{s.u.}) și respectiv, (~55 mg_{QE}/g_{s.u.}).

Ținând cont de rezultatele ilustrate în Figura 4.37, valorile optime ale TFC din extractele obținute prin metoda UAE+M în ordinea speciilor de plante urmează tiparul *O. vulgare* L. > *P. veris* L. > *A. millefolium* L. > *A. absinthium* L., ordinea pentru timpul de extracție fiind, **10 min + 9 zile** > **15 min + 9 zile** > **30 min + 9 zile**.

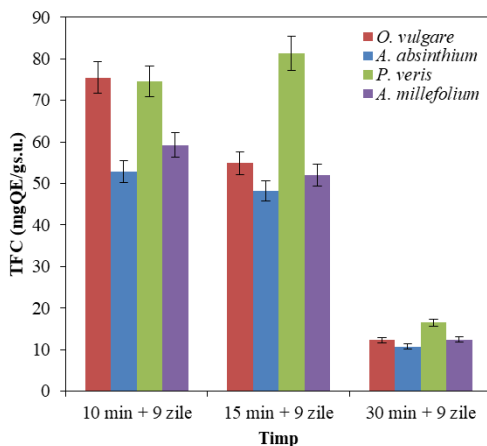


Figura 4.37. Influența timpului de extracție asupra conținutului total de flavonoide (TFC) din extractele obținute prin extracție cu etanol de concentrație 96% prin metoda UAE+M (parametri de extracție: temperatura, UAE: 45 °C, M: 22±2 °C; raport S/L 1/10; eroare standard de 5%)

4.5. Caracterizarea fizico-chimică a extractelor vegetale obținute prin diferite metode de extracție

4.5.1. Caracterizarea extractelor vegetale prin analiză senzorială

Analiza senzorială implică analiza cu ajutorul organelor de simț a unor proprietăți specifice extractelor obținute. Analiza vizuală a presupus aprecierea culorii extractelor la lumină naturală. Analiza olfactivă a extractelor a constatat în identificarea mirosurilor extractelor studiate.

Extractele alcoolice obținute au prezentat mirosuri specifice plantelor de la care provin, iar culorile au variat de la verde briliant la verde oliv (Figura

4.38). Culoarea și consistența fazelor lichide depind de organele vegetative ale plantelor introduse în procesul de extracție. De exemplu, pentru *Origanum vulgare* L. (sovârf) culoarea extractului este verde brillant, după separarea fazelor, sub incidența luminii policromatice naturale acesta are o opacitate redusă, aproape transparentă. Mirosul este plăcut parfumat și intens, specific materialului vegetal din care provine. Gustul este intens, parfumat dar înțepător din cauza concentrației solventului utilizat la extracție (alcool etilic 96%). Densitatea este mai mică decât a apei.

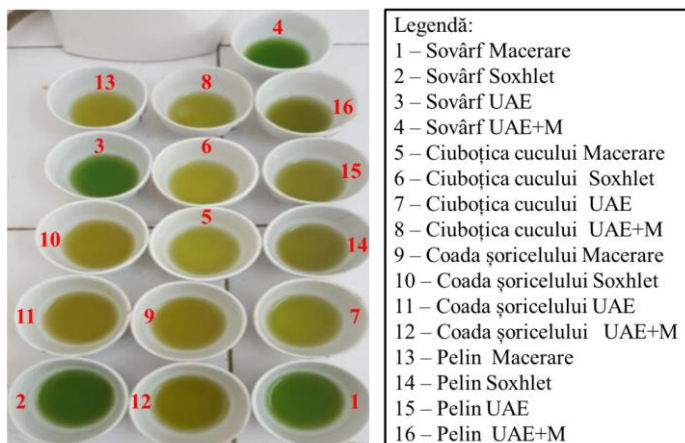


Figura 4.38. Reprezentarea ilustrativă a unor extracte vegetale obținute prin metodele de extracție: macerare, HAE în extractorul Soxhlet, UAE și metoda combinată UAE+M

4.5.2. Determinarea vâscozității extractelor vegetale obținute

Soluțiile obținute prin extracție cu solvent în instalația Soxhlet au fost utilizate pentru determinarea vâscozității acestora, rezultatele fiind evidențiate în Tabelul 4.1. Intervalul de variație al vâscozității pentru extractele plantelor studiate a fost de 1,3434-1,5969 mPa.s la 25 °C și de 0,6638-0,7095 mPa.s la 60 °C. Informațiile deja cunoscute despre comportamentul de variație a vâscozității în funcție de temperatură sunt confirmate, ceea ce înseamnă că vâscozitatea absolută a extractelor plantelor preparate scade odată cu creșterea temperaturii.

4.5.3. Caracterizarea fizico-chimică cu ajutorul metodelor UV-VIS și FTIR a extractelor vegetale și a materialului solid utilizat și rezultat

4.5.3.1. Analiza și caracterizarea spectrelor UV-VIS

Analiza spectrelor UV-VIS ale extractelor alcoolice de plante obținute prin extracție HAE (pentru speciile *P. veris* L., *A. millefolium* L., *A. absinthium*

L., *O. vulgare* L.), UAE și UAE+M (pentru speciile *A. absinthium* L., *O. vulgare* L.) este realizată pe baza Figurilor 4.38 - 4.40 și a Tabelului 4.2.

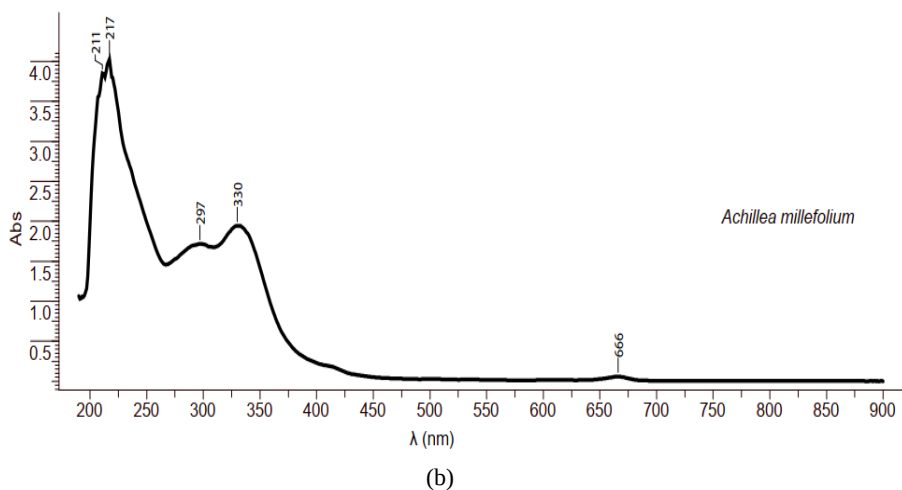
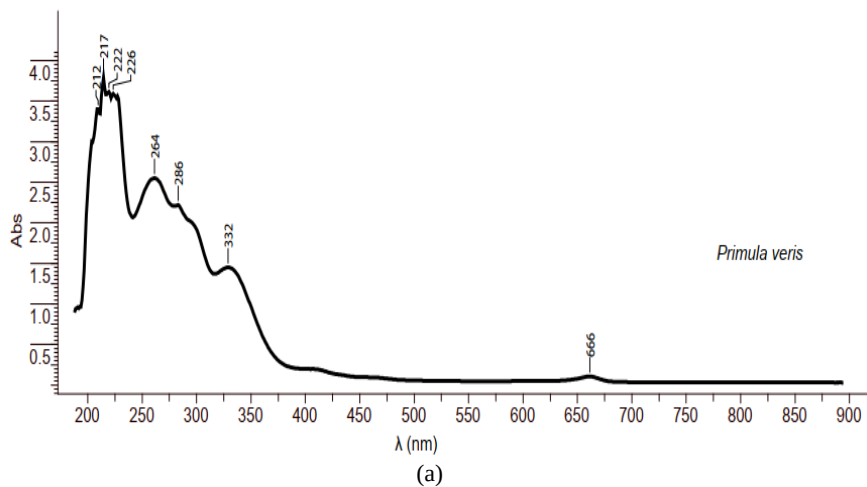
Extracțele de *A. absinthium* L. și *O. vulgare* L. obținute prin metodele UAE și UAE+M s-au evidențiat ca având un caracter puternic biopesticid asupra dăunătorilor vizați în cadrul tezei de doctorat. Este de remarcat faptul că analiza spectrelor arată că nu există diferențe semnificative odată cu schimbarea metodei de extracție. Totuși analiza acestora poate oferi o serie de informații preliminare legate de natura compușilor extrași, de exemplu, compuși cu legături duble în intervalul 220-240 nm sau cu legături triple la lungimile de undă 260-280 nm. În conformitate cu analizele cantitative anterioare, se poate sublinia că o caracteristică generală a acestor extracțe vegetale este reprezentată de evidențierea unui conținut ridicat de polifenoli și flavonoide (responsabile în principal de acțiunea bioinsecticidă), dar mai ales de flavonoide în câteva cazuri. Literatura științifică subliniază faptul că în spectrele UV-VIS tipice ale flavonoidelor (220-600 nm) se evidențiază două vârfuri maxime: unul în intervalul 220-280 nm (caracteristic benzii II care presupune comportamente pe inelul A) și altul în intervalul 330-550 nm (propriu benzii I care demonstrează substituția pe inelul B) (Spiridon et al., 2011; Daraban et al., 2021b).

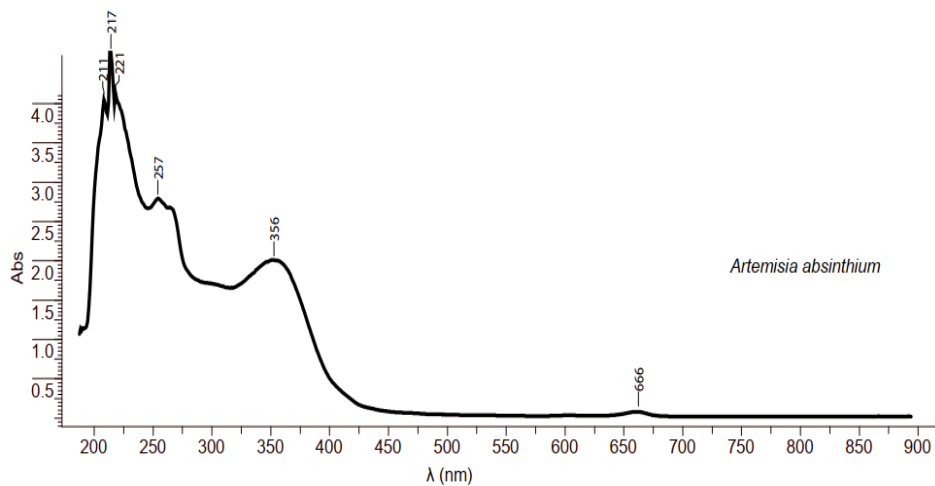
Împreună cu flavonoidele există și cantități considerabile de alte tipuri de acizi fenolici (Tabelul 4.2) și de asemenea, resturi de clorofilă (666 nm). Extracțele vegetale se caracterizează prin prezența unor compuși comuni, dar și a câtorva compuși specifici, de ex. la 356 nm la *A. absinthium* L. datorită acizilor fenolici sau flavonoidelor; la 297 nm pentru *A. millefolium* L. datorită trienilor sau flavonoizilor; la 288 nm la *O. vulgare* L. datorită trienilor sau flavanoneilor, sau la 226, 264, 286 nm pentru *P. veris* L., datorită dieneilor sau/și flavonoidelor care pot justifica comportamente diferite în acțiunea lor antiinsecticidă (Daraban et al., 2021b).

Tabelul 4.2. Caracteristicile UV-VIS ale extracțelor vegetale obținute prin refluxare în instalația Soxhlet (Daraban et al., 2021b)

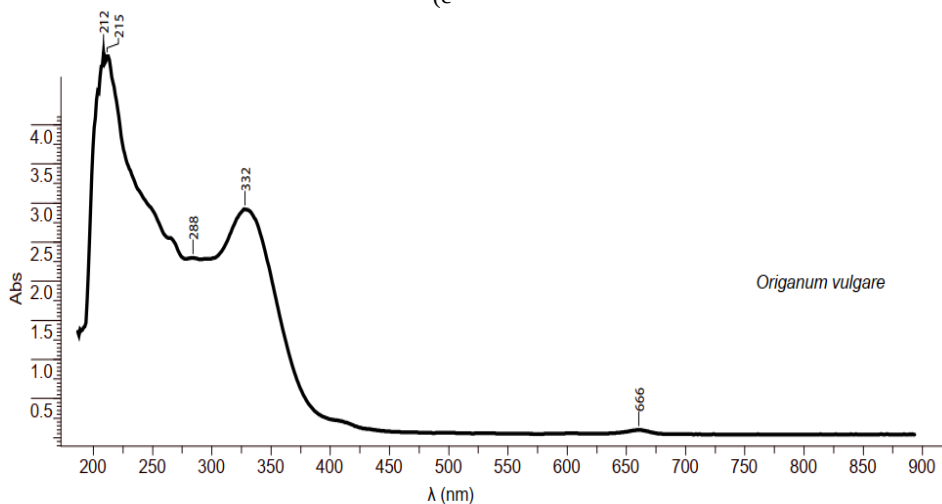
<i>Specia</i>	<i>Lungimea de undă, λ_{max}</i>	<i>Compuși posibili</i>
<i>Primula veris</i> L.	212, 217, 222, 226, 264, 286, 332, 666	acid ursolic (210 nm); acid rosmarinic (218 nm, 330 nm); acid ferulic (214 nm, 325 nm); acid clorogenic (218 nm, 325 nm); acid p-coumaric (224 nm, 309 nm); catehine (210 nm, 278 nm, 280 nm); luteolină (265 nm, 330 nm); flavanone (285 nm, 320-330 nm); quercetină (256 nm, 354 nm); kaempferol (256 nm, 265 nm, 272
<i>Achillea millefolium</i> L.	211, 217, 297, 330, 666	
<i>Artemisia absinthium</i> L.	211, 217, 221, 257, 366, 666	
<i>Origanum vulgare</i> L.	212, 215, 288, 332, 666	

nm, 354 nm)





(c)



(d)

Figura 4.39. Spectrele UV-VIS ale unor extracte vegetale obținute prin refluxare în instalația Soxhlet: (a) *P. veris* L., (b) *A. millefolium* L., (c) *A. absinthium* L., (d) *O. vulgare* L. (Daraban et al., 2021b)

4.5.3.2. Analiza și caracterizarea spectrelor FTIR

Spectrele FTIR pentru materialul solid, obținute înainte și după extracția prin refluxare în instalația Soxhlet sunt ilustrate în Figurile 4.42 - 4.45, iar caracteristicile acestora sunt evidențiate în Tabelele 4.3 - 4.6.

Pentru spectrele FTIR ale reziduurilor obținute prin evaporarea la sec a extractelor alcoolice din plante, se remarcă o serie de vârfuri de absorbție caracteristice pentru vibrațiile de extincție (~ 3360 - 3400 cm^{-1}) sau vibrațiile de deformare ($\sim 1420\text{ cm}^{-1}$; $\sim 1375\text{ cm}^{-1}$) ale grupărilor OH alcoolice sau fenolice, vibrațiile legăturii CH asociate grupărilor metilenice sau etilenice ($\sim 2930\text{ cm}^{-1}$; $\sim 2850\text{ cm}^{-1}$), vibrații ale legăturii C=O prezentate în grupările alifatică și aromatice aldehydice ($\sim 1635\text{ cm}^{-1}$; $\sim 1735\text{ cm}^{-1}$), vibrații ale inelului aromatic ($\sim 1635\text{ cm}^{-1}$; 1516 cm^{-1}); vibrații de extincție ale legăturilor C-O din compuși fenolici și alcoolici ($\sim 1250\text{ cm}^{-1}$; $\sim 1160\text{ cm}^{-1}$; $\sim 1100\text{ cm}^{-1}$). Astfel, prezența diferitelor grupări fenolice și alcoolice este validată ca reprezentând principalele grupări constitutive ale flavonoidelor și polifenolilor totali responsabili de acțiunea antibacteriană a extractelor din plante preparate (Daraban et al., 2021b).

Analiza FTIR a reziduului solid după evaporare la sec a extractelor de *A. absinthium* L., *A. millefolium* L. și *P. veris* L. indică vârfuri distincte corespunzătoare vibrațiilor legăturii C=O și C-H în grupările alifatică și aromatice aldehydă/cetonă (~ 1734 , $\sim 1635\text{ cm}^{-1}$ pentru *A. absinthium* L., sau ~ 1734 , $\sim 1624\text{ cm}^{-1}$ pentru *A. millefolium* L., sau ~ 1735 , ~ 1624 pentru *P. veris* L.) (posibilă consecvență de transformări oxidative în timpul și după extracția cu refluxare cu etanol) (Daraban et al., 2021b).

Analiza spectrelor FTIR pentru probele de pulbere din plante, înainte și după extracția alcoolică în instalația Soxhlet, evidențiază câteva mici diferențe, în principal datorită cantității ridicate de celuloză și lignină care estompează orice altă componentă cu o concentrație mai mică (sau în urme). De asemenea, pentru *P. veris* L. (Figura 4.42, Tabelul 4.3) apare un vârf de absorbție suplimentar la 3012 cm^{-1} care poate corespunde vibrațiilor de extincție ale grupărilor alcoolice sau fenolice. Vibrațiile de extincție ale legăturilor C-O din compuși fenolici și alcoolici sunt abundente la *O. vulgare* L. ($\sim 1282\text{ cm}^{-1}$; $\sim 1161\text{ cm}^{-1}$; $\sim 1072\text{ cm}^{-1}$) (Figura 4.45, Tabelul 4.6), în legătură cu doar două vârfuri la *A. absinthium* L. ($\sim 1247\text{ cm}^{-1}$ și $\sim 1056\text{ cm}^{-1}$) (Figura 4.44, Tabelul 4.5), *P. veris* L. ($\sim 1255\text{ cm}^{-1}$ și 1068 cm^{-1}) (Figura 4.42, Tabelul 4.3), și *A. millefolium* L. ($\sim 1255\text{ cm}^{-1}$ și 1059 cm^{-1}) (Figura 4.43, Tabelul 4.4) (consecință a extracției alcoolice și, de asemenea, a prezenței polifenolilor și flavonoidelor).

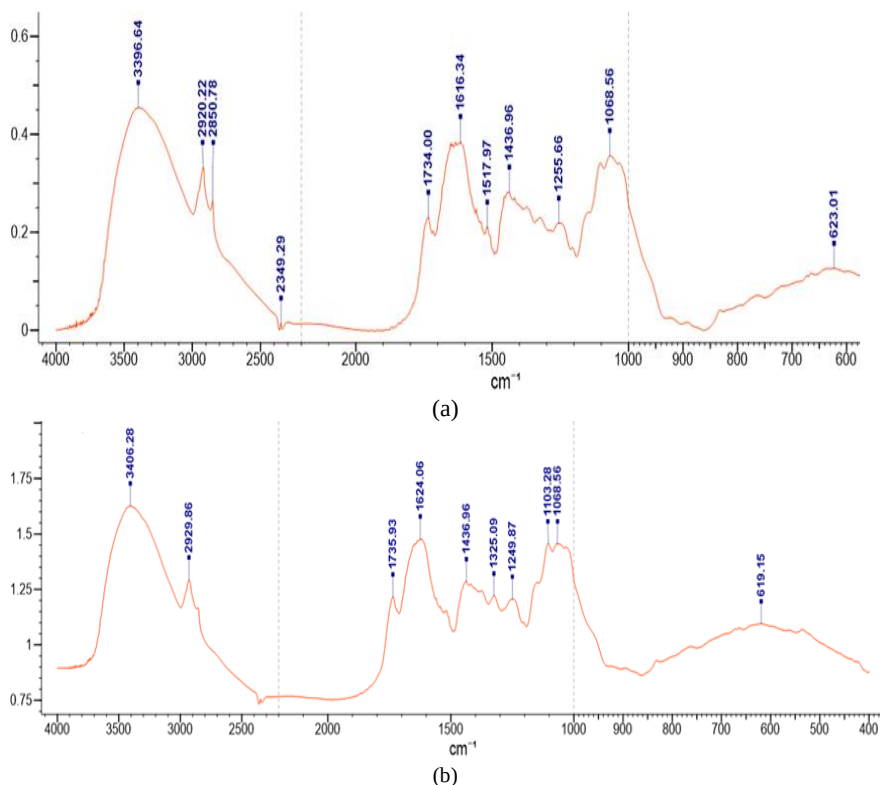


Figura 4.42. Spectrul FTIR realizat pe pulberea de *P. veris* L. (a) înainte extracției și (b) după extracția prin refluxare în instalația Soxhlet

CAPITOLUL 5.

Evaluarea activității bioinsecticide a extractelor vegetale obținute din flora spontană autohtonă asupra dăunătorilor de cultură și depozit

Tot mai multe cercetări din ultimii ani se concentrează pe utilizarea plantelor pentru combaterea unei palete foarte generoase de dăunători, care aduc prejudicii serioase culturilor din întreaga lume. Consultând bazele de date privind literatura științifică la nivel internațional (de ex. baza de date Pubmed; a se vedea Capitolul 1), am putut observa faptul că cercetările vizează substituirea totală sau parțială a tratamentelor cu pesticide de sinteză care prezintă multiple neajunsuri pentru mediul înconjurător și pentru sănătatea umană.

Aceste cercetări sunt într-o continuă creștere de la an la an, tendință care evidențiază importanța conștientizării de către comunitate a efectelor negative ale tratamentelor cu substanțe de sinteză asupra mediului înconjurător în ansamblul lui (apă, aer, sol) și asupra culturilor tratate, care de cele mai multe ori absorb cantități variate de compuși chimici de sinteză ce ajung prin ingerare în organismul animal și/sau uman.

Deoarece în natură există o permanentă competiție pentru resursele de hrană de la cel mai mic microorganism până la cel mai mare animal, dăunătorii culturilor de cartofi și fasole produc anual daune însemnate. Ținând cont de condițiile climatice din România și de tendințele gastronomice ale populației acestei țări, culturile de cartofi și fasole sunt produse și consumate în cantități apreciabile, prin urmare este imperios necesar ca acestea să îndeplinească standardele de siguranță alimentară.

În acest context, ținerea sub control a dăunătorilor speciei *Leptinotarsa decemlineata* Say specifici culturilor de cartofi (*Solanum tuberosum* L.), respectiv *Acanthoscelides obtectus* Say, specifici culturilor de fasole (*Phaseolus vulgaris* L.), utilizând tratamente prietenoase cu mediul înconjurător reprezintă un deziderat pertinent. Astfel, scopul tezei de doctorat a fost de a formula o serie de tratamente pentru dăunătorii de cultură și depozit, obținute prin utilizarea extractelor vegetale pe bază de solvenți de extracție prietenoși cu mediul înconjurător și agreeți inclusiv de către industria alimentară, care nu aduc un aport de compuși de sinteză pe culturi sau sol și care au efecte pozitive în ținerea sub control a dăunătorilor vizați. În acest sens, utilizarea etanolului ca solvent de extracție, utilizarea speciilor de plante specifice florei spontane autohtone și utilizarea unor metode de obținere a extractelor, care prezintă o serie de avantaje prezentate în Capitolul 4, reprezintă instrumentele necesare formulării tratamentelor aplicate pentru a ține sub control dăunătorii vizați.

Pentru evaluarea potențialului insecticid, vermifug și larvicid al unor tratamente cu extracte obținute din speciile florei spontane autohtone s-a elaborat un protocol de lucru dinamic, care a fost îmbunătățit pe parcurs, în funcție de rezultatele obținute pe parcursul experimentelor derulate în perioada de pregătire a tezei de doctorat. Prin urmare, au fost utilizate patru metode de obținere a extractelor utilizate pentru pregătirea tratamentelor administrate pentru a ține sub control dăunătorii din speciile *L. decemlineata* Say și *A. obtectus* Say, și anume: **metoda macerării (M)**, **extracție prin refluxare în instalația Soxhlet (HAE)**, **extracție asistată de ultrasunete (UAE)** și o **metodă combinată între UAE și macerare (UAE+M)**, metode evaluate ca performanță în Capitolul 4 (prin: raportul S/L, timpul de extracție și temperatura, conținut de polifenoli și flavonoide).

De asemenea, în prima etapă a protocolului experimental, am testat 15 specii de plante autohtone pentru evaluarea efectelor biopesticide asupra

dăunătorilor de cultură și depozit. Ulterior, funcție de acțiunea acestora, am realizat o selecție a speciilor de plante cu potențial în ținerea sub control a dăunătorilor vizați, continuând testarea doar cu patru specii selectate, printre care și *A. absinthium* L. (specie neinclusă în studiile inițiale). Această specie a fost selectată după evaluarea preliminară a extractelor celor 14 specii asupra dăunătorilor vizați, ținând cont de studiile din literatura de specialitate. Cercetările au indicat un potențial biopesticid considerabil asupra unei game variate de dăunători a speciei *A. absinthium* L., prin urmare mi-am dorit să evaluez efectul biopesticid al acestei specii asupra dăunătorilor de depozit și cultură vizați în teza de doctorat. Astfel, tratamentele asupra dăunătorilor au considerat extracte obținute din **15 specii de plante** (a se vedea identificarea acestora în Capitolul 3).

Toate variantele experimentale au fost însoțite de probe martor.

În cadrul acestui capitol, *pentru evaluarea acțiunii bioinsecticide a tratamentelor* cu extracte obținute din speciile florei spontane autohtone s-au investigat următorii *parametri*:

- *gradul de mortalitate (%) a adulților și/sau a larvelor;*
- *numărul de ouă depuse;*
- *manifestările neuroleptice.*

Testele au presupus utilizarea a două *metode de administrare a tratamentelor*:

- *metoda directă de administrare*, prin pulverizarea extractelor pe bază de plante din speciile florei spontane autohtone pe suprafața hranei (de ex. lăstari de cartof, boabe de fasole) aflată în cuștile de creștere/în afara cuștilor de creștere;
- *metoda indirectă de administrare*, prin pulverizarea extractelor pe bază de plante din speciile florei spontane autohtone pe suprafața unui disc din material celulozic aflat suspendat în mijlocul cuștii de creștere.

Protocolul de lucru pentru această etapă, descris în detaliu în subcapitolul 3.8 a fost particularizat în funcție de condițiile exacte de lucru în timp real și îmbunătățit în funcție de experiența de lucru obținută în desfășurarea experimentelor practice.

Gradul de mortalitate (% , calculat conform relației 3.8), manifestările neuroleptice și numărul de ouă depuse s-au monitorizat la intervale de timp cuprinse între 2 h și 168 h, timpul fiind adaptat fiecărui dăunător, dar și fiecărei metode de obținere a tratamentelor (conform protocolului descris în subcapitolul 3.5). Experimentele practice s-au desfășurat în condiții de laborator, la temperatura camerei, dăunătorii fiind inițial plasați, pentru un timp de 24 h, în cuștile de creștere pentru adaptarea la noul mediu, înainte de administrarea tratamentelor pe bază de extracte din plante.

5.3. Evaluarea activității bioinsecticide a extractelor obținute prin refluxare în instalația Soxhlet

5.3.1. Evaluarea activității bioinsecticide a extractelor obținute prin refluxare în instalația Soxhlet asupra dăunătorilor de cultură

În cadrul acestui studiu am testat eficiența extractelor brute obținute prin refluxare în instalația Soxhlet (HAE) folosind un număr de 14 specii din flora spontană. S-a realizat o ierarhizare a speciilor cu potențial insecticid și/sau repelent în controlul dăunătorilor din specia *L. decemlineata* Say. Activitatea bioinsecticidă a extractelor din plante selectate a avut în vedere gradul de mortalitate (%) a adulților și a larvelor speciei *L. decemlineata* Say, după diferite tratamente este reprezentată în (Figura 5.8).

Figura 5.8 indică faptul că cele mai mari grade de mortalitate a dăunătorilor s-au obținut folosind pulverizarea extractului brut rezultat prin metoda HAE. În cazul adulților din specia *L. decemlineata* Say, tratamentul pe bază de extracte din specia *P. veris* L. s-a evidențiat cu un grad de mortalitate după 168 h de 80%, urmat de tratamentul cu extracte din specia *S. officinalis* L. cu 40%, în timp ce tratamentele pe bază de extracte din speciile *O. vulgare* L., *A. millefolium* L., *O. basilicum* L. și *P. anisum* L. au înregistrat un grad de mortalitate de 30%. Valori ale gradului de mortalitate scăzute au fost înregistrate în cazul tratamentelor pe bază de extracte din speciile: *H. perforatum* L., *S. hortensis* L., *U. dioica* L., *E. arvense* L. (20%), *R. patientia* L. și *A. sativum* L. (10%). Pe de altă parte, singura specie care nu a prezentat efect insecticid/larvicid a fost *M. chamomilla* L., nefiind înregistrate decese. Proba martor a înregistrat un grad de mortalitate de 10% în cazul adulților.

Cel mai ridicat grad de mortalitate a larvelor a fost obținut în urma tratamentelor pe bază de extracte din specia *P. veris* L., 90%, urmat de tratamentele pe bază de extracte din speciile *O. vulgare* L. și *A. sativum* L. cu 50%, tratamentele pe bază de extracte din specia *A. millefolium* L. cu 45%, tratamentele pe bază de extracte din speciile *P. anisum* L. și *H. perforatum* L. cu 40%, tratamentele pe bază de extracte din speciile *O. basilicum* L., *L. dioica* L. și *S. hortensis* L. cu 30%, tratamentele pe bază de extracte din speciile *S. officinalis* și *E. arvense* L. cu 20% și tratamentele pe bază de extracte din speciile *C. officinalis* L. și *R. patientia* L. cu 10%. Chiar dacă indivizii nu au decedat într-un interval scurt de timp de la administrarea tratamentelor, mortalitatea fiind sub 80-90%, totuși tratamentele administrate și-au atins scopul de protecție a plantelor, deoarece în peste 80% din cazuri lipsa apetitului a lipsit, inhibând astfel dezvoltarea, moartea survenind în timp prin lipsa hrănirii. Având în vedere rezultatele obținute, pot afirma că extractele din speciile *P. veris* L., *O. vulgare* L. și *A. millefolium* L. au prezentat potențial pentru ținerea sub control a dăunătorilor din specia *L. decemlineata* Say.

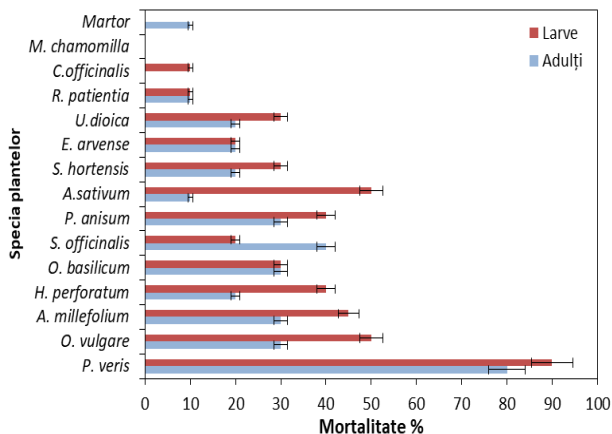


Figura 5.8. Gradul de mortalitate a adulților și larvelor din specia *L. decemlineata* Say, folosind tratamente administrate prin pulverizare directă cu extracte obținute prin metoda HAE (condiții experimentale: cuști de creștere cu capacitatea de 0,5 L; timp de monitorizare a tratamentelor - 168 h; o singură administrare a tratamentelor; concentrație extract - 100%; eroarea standard a datelor experimentale < 5%) (Daraban et al., 2021)

5.3.2. Evaluarea activității bioinsecticide a extractelor obținute prin refluxare în instalația Soxhlet asupra dăunătorilor de depozit

Figura 5.11 indică rezultatele gradului de mortalitate al adulților din specia *A. obtectus* Say, folosind tratamente pe bază de extracte obținute prin metoda HAE și ținând cont de cele două moduri de administrare a tratamentelor, pulverizare directă și respectiv, pulverizare indirectă.

5.5. Evaluarea activității bioinsecticide a extractelor obținute în urma metodei combinate: extracție asistată de ultrasunete și macerare

5.5.1. Evaluarea activității bioinsecticide a extractelor obținute prin metoda combinată: extracție asistată de ultrasunete și macerare, asupra dăunătorilor de cultură

În Figura 5.15, mi-am propus să realizez reprezentarea grafică a gradului de mortalitate pentru adulți și larve, precum și evoluția numărului de ouă depuse de către indivizii din specia *L. decemlineata* Say, folosind tratamente pe bază de extracte din plante obținute prin metoda UAE+M, aplicate prin pulverizare directă.

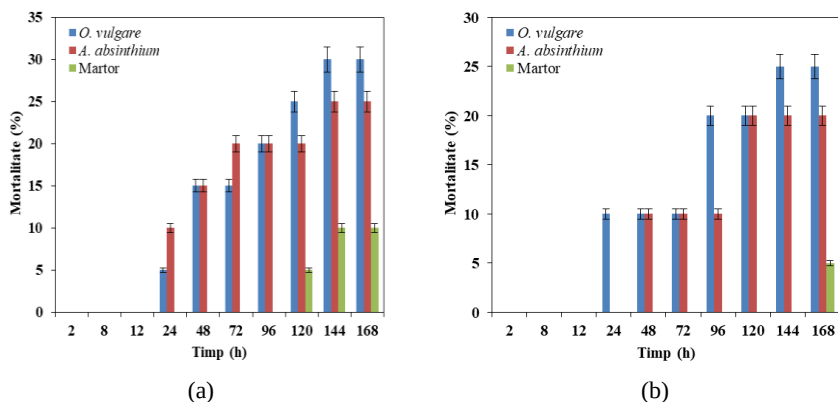
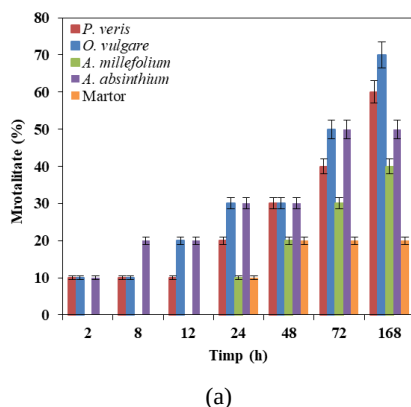


Figura 5.11. Gradul de mortalitate a adulților din specia *A. obtectus* Say după aplicarea tratamentelor pe bază de extracte obținute prin metoda HAE și două moduri de administrare a acestora: (a) pulverizare directă și (b) pulverizare indirectă (pulverizare directă - administrarea tratamentelor pe hrană înainte de introducerea acestuia în cușca de creștere; pulverizare indirectă - administrarea tratamentelor pe discul celulozic; volumul cuștii de creștere - 1 L; timp de monitorizare a tratamentelor - 168 h; o singură administrare a tratamentelor; concentrație extract - 100%; eroarea standard a datelor experimentale < 5%)



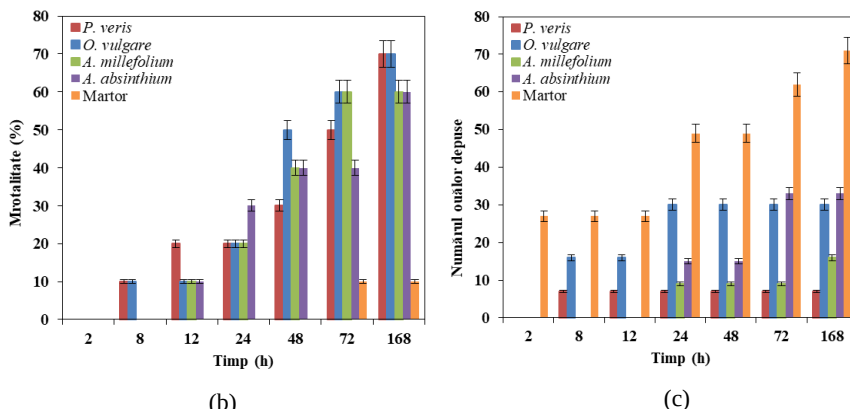


Figura 5.15. Variația gradului de mortalitate a adulților (a) și larvelor (b), precum și a numărului de ouă depuse (c) de către indivizii din specia *L. decemlineata* Say, în urma folosirii tratamentelor pe bază de extracte obținute prin metoda UAE+M și aplicate prin pulverizare directă (cuști de creștere cu capacitatea de 10 L; timp de monitorizare a tratamentelor - 168 h; o singură administrare a tratamentelor; concentrație extract - 100%; eroarea standard a datelor experimentale < 5%)

5.5.2. Evaluarea activității bioinsecticide a extractelor obținute prin metoda combinată: extracție asistată de ultrasunete și macerare, asupra dăunătorilor de depozit

Figura 5.16 evidențiază rezultatele obținute privind gradul de mortalitate a adulților din specia *A. obtectus* Say, folosind tratamente pe bază de extracte de *O. vulgare* L. și *A. absinthium* L. obținute prin metoda UAE+M și administrate în două moduri: pulverizare directă și indirectă.

Analizând datele din Figura 5.16 (a) s-a observat că tratamentul pe bază de extracte din specia *O. vulgare* L. prezintă un grad de mortalitate de 5% încă de la intervalul de 8 h, valoare care s-a menținut până la intervalul de 24 h, moment în valoarea gradului de mortalitate s-a dublat, ajungând la 10%. La acest interval, tratamentul pe bază de extracte din specia *A. absinthium* L. prezintă un grad de mortalitate de 5%, în timp ce în cazul probei martor nu înregistrează decese. În cazul intervalului de 72 h, tratamentul pe bază de extracte din specia *O. vulgare* L. atinge valoarea gradului de mortalitate de 25%, în timp ce cel pe bază de extracte din specia *A. absinthium* L. atinge un grad de mortalitate de 15%; se menționează faptul că în cazul acestui interval în proba martor s-a înregistrat un grad de mortalitate de 5%. Pentru intervalul de 96 h, tratamentul pe bază de extracte din specia *O. vulgare* L. atinge un grad de mortalitate de 35%, în timp ce tratamentul pe bază de extracte din specia *A. absinthium* L. prezintă un grad de mortalitate de 15%, iar în proba martor se menține o valoare a gradului

de mortalitate de 5%. Pentru intervalul de 120 h, tratamentul pe bază de extracte din cele două specii prezintă valori superioare intervalului anterior, atingând un grad de mortalitate de 45% în cazul speciei *O. vulgare* L. și respectiv, un grad de mortalitate de 40% în cazul speciei *A. absinthium* L., în timp ce valoarea gradului de mortalitate în cazul probei martor rămâne neschimbată (5%). În cazul intervalului de 144 h, tratamentul pe bază de extracte din specia *O. vulgare* L. a înregistrat o creștere a gradului de mortalitate, valoarea acestuia atingând 60%, iar tratamentul pe bază de extracte din specia *A. absinthium* L. a condus la un grad de mortalitate de 45%, în timp ce în proba martor s-a înregistrat un grad al mortalității de 10%. Ultimul interval monitorizat (168 h) evidențiază creșteri ale gradului de mortalitate în toate cazurile. Astfel, tratamentul pe bază de extracte din specia *O. vulgare* L. se evidențiază cu un grad de mortalitate de 70%, în timp ce în urma tratamentului pe bază de extracte din specia *A. absinthium* L. se atinge un procent de 55%, proba martor înregistrând un grad de mortalitate de 15%.

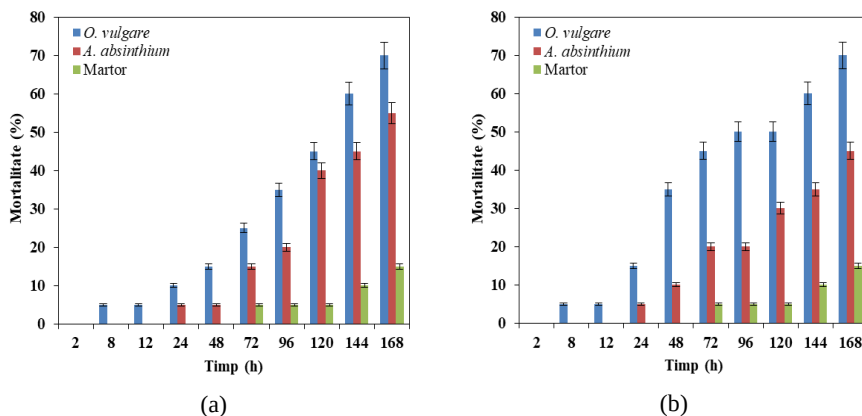


Figura 5.16. Gradul de mortalitate a adulților din specia *A. obtectus* Say, folosind tratamente pe bază de extracte obținute prin metoda UAE+M și administrate în două moduri: (a) pulverizare directă și (b) pulverizare indirectă (pulverizare directă - administrarea tratamentelor pe hrană înainte de introducerea acesteia în cușca de creștere; pulverizare indirectă - administrarea tratamentelor pe discul celulozic; volumul cuștii de creștere - 1 L, timp de administrare a tratamentelor - 168 h; o singură administrare a tratamentelor; concentrație extract - 100%; eroarea standard a datelor experimentale < 5%) (Daraban et al., 2020)

5.6. Modelarea analitică a gradului de supraviețuire a dăunătorilor de cultură și depozit în condițiile tratamentelor cu biopesticide

În acord cu literatura de specialitate, modelarea analitică, în acest caz, ia în considerare *gradul de supraviețuire* (indicat în Capitolul 3, subcapitolul 3.9), mărime care este în relație de inversă proporționalitate cu *gradul de mortalitate* (Ec. 3.8), calculat în experimentele efectuate.

Analiza *gradului de supraviețuire* include o mare varietate de metode de analiză a datelor privind timpul până la producerea unui anumit eveniment. Răspunsul este adesea denumit *timp de eșec*, *timp de supraviețuire* sau *timp de eveniment*. În acest tip de analiză, principalul obiectiv este estimarea ratei de supraviețuire a dăunătorilor urmată de identificarea timpului letal pentru 50% din indivizi, LT_{50} . Alte obiective ale analizei gradului de supraviețuire sunt estimarea timpului până la eveniment, compararea timpului până la eveniment între două sau mai multe grupuri și evaluarea relației dintre covariabile și timpul până la eveniment. Timpul de supraviețuire poate fi astfel definit ca fiind timpul până la apariția unui anumit eveniment. Evenimentul de interes poate fi dezvoltarea unei boli, răspunsul la tratament, recidiva sau decesul (Okello, 2013). Prin urmare, în cadrul acestui subcapitol pe lângă analiza gradului de supraviețuire, am propus și identificarea timpului necesar pentru un grad de mortalitate a 50% din populația adultă a dăunătorilor de cultură (*L. decemlineata* Say) și a dăunătorilor de depozit (*A. obtectus* Say) (LT_{50}), după aplicarea tratamentelor pe bază de extracte biopesticide obținute din speciile *O. vulgare* L., *A. absinthium* L., *A. millefolium* L. și *P. veris* L., prin metodele M, HAE, UAE și UAE+M.

5.6.1. Modelarea analitică a gradului de supraviețuire a dăunătorilor după aplicarea tratamentelor pe bază de extracte obținute prin metoda macerării

5.6.1.1. Modelarea analitică a gradului de supraviețuire a dăunătorilor de cultură după aplicarea tratamentelor pe bază de extracte obținute prin metoda macerării

În Figura 5.18 sunt prezentate rezultatele ce evidențiază gradul de supraviețuire (%) experimental și simulat a adulților și larvelor din specia *L. decemlineata* Say în timp (h) conform modelului cinetic de ordin I în urma tratamentelor pe bază de extracte din speciile *O. vulgare* L. (a), *P. veris* L. (b) și *A. millefolium* L. (c) (100%) obținute prin metoda macerării (M).

Așa cum se observă în Figura 5.18, cele mai reprezentative rezultate ale gradului de supraviețuire (%) după 168 h au fost obținute pentru larvele speciei *L. decemlineata* Say atunci când au fost aplicate tratamente pe bază de extracte de *P. veris* L. (0%), urmate de tratamentele pe bază de extracte de *O. vulgare* L. (50%) și respectiv, *A. millefolium* L. (55%). Gradul de supraviețuire (%) a scăzut

odată cu creșterea timpului de contact de la 2 h la 168 h, pentru adulți ajungând la 20% în cazul tratamentelor cu extracte din specia *P. veris* L. și la 70% în cazul tratamentelor cu extracte din speciile *O. vulgare* L. și *A. millefolium* L. Modelarea cinetică a permis identificarea ecuațiilor aferente scăderii gradului de supraviețuire în timp și a timpului letal necesar pentru un grad de mortalitate de 50% pentru adulții și larvele (LT_{50}) din specia *L. decemlineata* Say, după aplicarea tratamentelor pe baza extractelor biopesticide. Cele mai ridicate valori ale coeficientului de corelație, R^2 , au fost obținute pentru tratamentele aplicate adulților pe baza extractelor din speciile *O. vulgare* L. (0,9383) și *A. millefolium* L. (0,914).

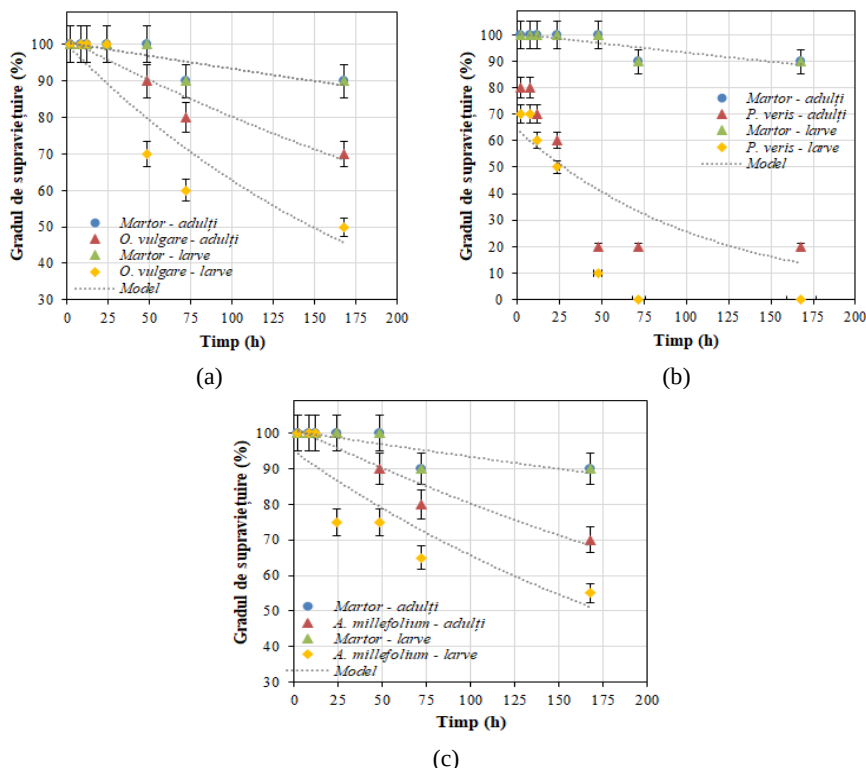
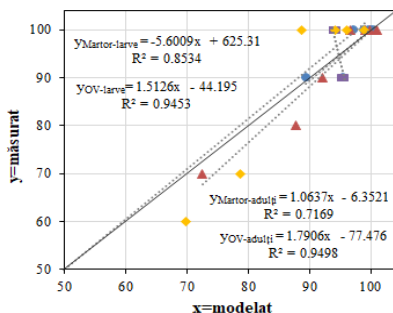


Figura 5.18. Gradul de supraviețuire (%) experimental și simulat conform modelului cinetic de ordin I în cazul adulților și larvelor din specia *L. decemlineata* Say în timp (h) în urma tratamentelor pe bază de extracte din speciile *O. vulgare* L. (a), *P. veris* L. (b) și *A. millefolium* L. (c) (100%) obținute prin metoda macerării (M) (eroarea standard a datelor experimentale < 5%)

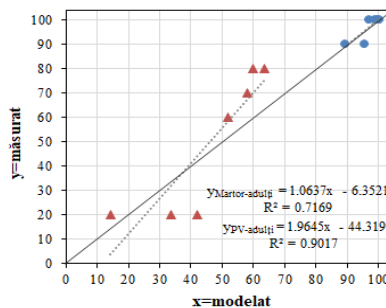
Aplicabilitatea modelului cinetic de ordin I a permis astfel identificarea LT_{50} pentru adulții din specia *L. decemlineata* Say ca fiind de 14,44 zile pentru ambele tratamente. Având în vedere faptul că valorile gradului de supraviețuire a larvelor în urma tratamentelor cu extracte din specia *P. veris* L. ajung la 0, modelul cinetic nu a putut fi aplicat pentru identificarea LT_{50} . Mai mult, valori < de 0,9 ale R^2 , sugerează identificarea LT_{50} prin aplicarea unor alte modele cinetice care ar putea corela mai bine datele experimentale cu cele simulate (Tabelul 5.1). Ținând cont de rezultatele obținute, s-a putut realiza validarea acestora, așa cum este identificat în Figura 5.19. Modelul cinetic de ordinul I a fost validat cu succes pentru tratamentele cu extracte din speciile *O. vulgare* L. (adulți și larve, $R^2 > 0.94$), *P. veris* L. (adulți, $R^2 > 0.90$) și *A. millefolium* L. (adulți și larve, $R^2 > 0.90$), obținute prin metoda macerării.

Tabelul 5.1. Ecuatiile modelului cinetic de ordin I și LT_{50} (zile) pentru adulții și larvele din specia *L. decemlineata* Say în urma tratamentelor pe bază de extracte din speciile *O. vulgare* L., *P. veris* L. și *A. millefolium* L. (100%) obținute prin metoda macerării (M)

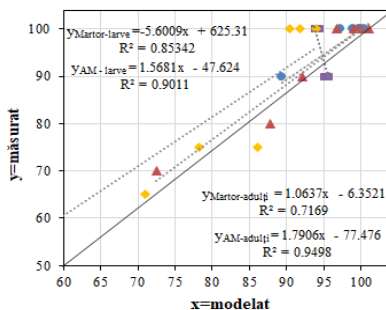
Proba	Modelul cinetic de ordin I	LT_{50} (zile)	R^2
Adulți			
Martor	$y = 100,53e^{-7E-04x}$	41,26	0,7172
<i>O. vulgare</i> L.	$y = 101,44e^{-0,002x}$	14,44	0,9383
<i>P. veris</i> L.	$y = 64,508e^{-0,009x}$	3,21	0,7812
<i>A. millefolium</i> L.	$y = 101,44e^{-0,002x}$	14,44	0,914
Larve			
Martor	$y = 100,53e^{-7E-04x}$	41,26	0,7172
<i>O. vulgare</i> L.	$y = 99,953e^{-0,005x}$	5,78	0,8691
<i>P. veris</i> L.	-	-	-
<i>A. millefolium</i> L.	$y = 94,777e^{-0,004x}$	7,22	0,807



(a)



(b)



(c)

Figura 5.19. Modelarea în raport cu măsurarea gradului de supraviețuire a adulților și larvelor din specia *L. decemlineata* Say în urma tratamentelor pe bază de extracte din speciile *O. vulgare* L. (a), *P. veris* L. (b) și *A. millefolium* L. (c) (100%) obținute prin metoda macerării (M), conform modelului cinetic de ordin I

CONCLUZII GENERALE

Ținând cont de politicile de protecție a mediului înconjurător și ale standardelor de siguranță alimentară la nivel mondial, sunt necesare o serie de schimbări în ceea ce privește ținerea sub control a dăunătorilor de cultură și depozit, prin substituirea parțială sau totală a tratamentelor de sinteză. După cum am prezentat în prima parte a tezei de doctorat, stadiul actual al cercetărilor în domeniu arată că majoritatea pesticidelor de sinteză prezintă o paletă variată de neajunsuri în combaterea dăunătorilor, dar mai ales un impact nefavorabil pe termen mediu și lung, atât asupra mediului înconjurător, cât și asupra sănătății umane. În acest sens, există în ultima decadă un interes crescut pentru această direcție de cercetare, prin utilizarea microorganismelor și a unor specii de plante cu potențial în acest sens.

Teza de doctorat a urmărit utilizarea extractelor din o serie de specii ale florei spontane a regiunii geografice de N-E a României, în vederea evaluării efectelor favorabile pentru ținerea sub control a dăunătorilor de cultură și depozit. Noutatea tezei de doctorat constă în obținerea prin metode de extracție cu solvenți prietenoși cu mediul înconjurător, de extracte din speciile florei spontane autohtone care pot fi utilizate ca tratamente mai ales de către fermierii ce utilizează principiile agriculturii durabile și ecologice. Astfel, prin evaluarea a 15 specii de plante luate în considerare în studiile preliminare, s-au remarcat 4 specii de plante care au prezentat potențial ridicat în ținerea sub control a dăunătorilor vizați. Odată cu selecția speciilor de plante cu potențial biopesticid, studiile s-au concentrat pe obținerea unor concentrații superioare de compuși cu

principii active cu potențial pesticid, prin optimizarea experimentală a metodelor de extracție și a parametrilor acestora.

Astfel, teza de doctorat intitulată „**Extrakte vegetale cu aplicații în agricultură și industria alimentară**” a avut ca **obiectiv principal** studiul caracterului biopesticid al unor extracte vegetale din flora spontană autohtonă, obținute prin metode de extracție prietenoase cu mediul înconjurător, pentru combaterea dăunătorilor de cultură și depozit, în scopul substituirii pesticidelor de sinteză cu efecte secundare nedorite asupra mediului înconjurător și sănătății umane. Pentru realizarea acestui obiectiv, s-au realizat în proporție de 100% următoarele **obiective specifice**:

- analiza critică a stadiului actual al cercetărilor privind rolul și impactul pesticidelor de sinteză și al biopesticidelor în controlul dăunătorilor de cultură și depozit și protecția mediului înconjurător;
- identificarea și selectarea unor metode de extracție care să păstreze un echilibru între calitatea produsului, eficiența procesului, costurile de producție și protecția mediului;
- selectarea unor specii de plante din flora spontană autohtonă cu proprietăți antioxidante, al căror potențial bioinsecticid nu a fost studiat în detaliu;
- caracterizarea extractelor vegetale obținute din plantele din flora spontană prin metode analitice fizico-chimice cunoscute, utilizate pentru a evalua diverși indicatori de calitate, precum și trasarea și interpretarea rezultatelor prin spectrometria UV-Vis și FTIR;
- determinarea activității bioinsecticide a extractelor vegetale obținute (prin identificarea gradului de mortalitate (%), a numărului de ouă depuse și a manifestărilor neuroleptice) pentru dăunătorii de cultură și depozit din speciile *L. decemlineata* Say (gândacul din Colorado) și respectiv, *A. obtectus* Say (gărgărița fasolei);
- studiu comparativ privind eficiența extractelor vegetale brute obținute din flora spontană autohtonă (reprezentate de speciile de plante *Origanum vulgare* L., *Primula veris* L., *Artemisia absinthium* L., *Achillea millefolium* L.) în scopul combaterii dăunătorilor de cultură (*L. decemlineata* Say) și de depozit (*A. obtectus* Say);
- modelarea analitică a rezultatelor experimentale prin aplicarea ecuației cinetice de ordinul I în scopul determinării evoluției gradului de supraviețuire (%) a populației de dăunători din speciile *L. decemlineata* Say (gândacul din Colorado) și *A. obtectus* Say (gărgărița fasolei), dar și a timpului letal, LT_{50} , utilizând extractele vegetale obținute și utilizate ca produs biopesticid.

Studiile realizate în teza de doctorat cu titlul „Extracte vegetale cu aplicații în agricultură și industria alimentară” aduc informații noi și originale cu privire la:

- evaluarea potențialului unor specii de plante din flora spontană autohtonă pentru ținerea sub control a unor dăunători de cultură și depozit;
- evaluarea unor metode de extracție prietenoase cu mediul în obținerea unor cantități superioare de principii active;
- evaluarea parametrilor de extracție pentru obținerea unor randamente superioare ale produsului biopesticid;
- evaluarea tratamentelor în laborator pentru ținerea sub control a speciilor *L. decemlineata* Say (gândacul din Colorado) și *A. obtectus* Say (gărgărița fasolei).

Pentru îndeplinirea obiectivelor identificate în proporție de 100%, teza de doctorat a fost structurată în două părți principale extinse pe 5 capitole.

Partea întâi a tezei de doctorat este constituită din 2 capitole ce vizează un amplu **Studiu de Literatură** referitor la extractele vegetale și aplicabilitatea lor în agricultură (ca biopesticide) și industria alimentară.

Partea a doua a tezei de doctorat este constituită din 3 capitole axate pe **Contribuțiile Personale originale** concentrate pe rezultate ce vizează identificarea unor metode de extracție eficiente și utilizarea extractelor unor specii de plante din flora spontană autohtonă optimizate din punct de vedere experimental în scopul combaterii dăunătorilor de cultură (*L. decemlineata* Say) și de depozit (*A. obtectus* Say).

Primul capitol al tezei de doctorat, *Pesticide vs. biopesticide: stadiul actual al cercetărilor, caracteristici generale, impact și aplicații pentru controlul dăunătorilor și protecția mediului înconjurător*, prezintă o imagine de ansamblu asupra pieței tratamentelor utilizate în vederea ținerii sub control a dăunătorilor mai sus amintiți. Utilizarea biopesticidelor este într-un trend ascendent în ultima decadă, ceea ce subliniază importanța substituirii pesticidelor sintetice, cu toate acestea, pesticidele rămân utilizate în cea mai mare proporție de către marii producători. Biopesticidele însă câștigă de la an la an cotă de piață, chiar dacă ritmul este unul redus. Cu toate acestea, printr-o încorporare în programele de management a dăunătorilor (IPM), acestea pot oferi beneficii cum ar fi gestionarea reziduurilor și a rezistenței dăunătorilor, dar și un risc scăzut pentru insectele benefice sau alte grupuri non-țintă. Pentru creșterea eficienței și a substituirii pesticidelor de sinteză cu biopesticide sunt necesare studii suplimentare pentru identificarea unor compuși mai performanți și mai stabili pentru a putea fi incluși în sistemele de management al dăunătorilor, putându-se astfel realiza substituirea în mod progresiv în funcție de eficiența aferentă.

Colaborarea dintre părțile interesate rămâne crucială și, prin urmare, este necesar ca cercetătorii în domeniul biopesticidelor să colaboreze îndeaproape cu industria, fermierii, factorii de decizie politică, guvernul și alte părți interesate relevante. Utilizarea sporită a produselor organice de combatere a dăunătorilor în cadrul strategiilor de combatere integrată a dăunătorilor va duce la o mai bună acceptabilitate a produselor agricole pe piețele de nișă, contribuind astfel la îmbunătățirea comerțului internațional, la siguranța alimentară, precum și la conservarea biodiversității, la protecția mediului și a sănătății umane.

Capitolul 2, *Extracte vegetale: aplicații în agricultură și industria alimentară*, completează studiile din literatura de specialitate evidențiate în Capitolul 1 prin: clasificarea celor mai uzuale metode de extracție solid-lichid în scopul extragerii compușilor bioactivi vizați din probe complexe de plante, caracterizarea complexă din punct de vedere calitativ și cantitativ a extractelor vegetale, considerate noua generație de compuși cu acțiune biopesticidă, dar și prin identificarea celor mai importante aplicații ale extractelor vegetale în industria alimentară. *Concluzia este că există un interes evident și în continuă creștere pentru extracția și izolarea produselor naturale și pentru aplicațiile lor valoroase, atât în agricultură, cât și în alimentație.*

Analiza critică a stadiului actual al cercetărilor conform primelor două capitole ale tezei de doctorat a pus bazele identificării obiectivului principal și a obiectivelor specifice prezentate anterior.

Capitolele 3 – 5 ale tezei de doctorat, evidențiază rezultatele personale originale obținute în urma programului experimental realizat conform obiectivelor specifice identificate în teza de doctorat. Prin urmare, **cercetările originale elaborate în cadrul programului experimental au condus la stabilirea celor mai importante concluzii ale prezentei teze de doctorat, astfel:**

- Cercetările moderne au condus la ***elaborarea și identificarea unor metode de extracție eficiente*** din punct de vedere al costurilor, dar și prietenoase cu mediul înconjurător, metode utilizate pentru o mai bună recuperare a compușilor bioactivi din sursele naturale într-un timp de procesare mai scurt (**Capitolul 3, *Materiale și metode utilizate***). Astfel, parametrii optimi de extracție din punct de vedere experimental care influențează procesul de extracție (prin gradul de extracție, conținutul de polifenoli și flavonoide) al plantelor din flora spontană autohtonă sunt: metoda de extracție, raportul S/L, timpul de extracție, concentrația solventului și temperatura. **Rezultatele studiilor experimentale din cadrul Capitolului 4 (*Evaluarea și caracterizarea extractelor vegetale*)**

obținute din flora spontană autohtonă prin metode de extracție clasice și moderne) **au pus în evidență următoarele concluzii:**

- ✓ tehnica de extracție cea mai potrivită depinde de matricile vegetale utilizate (*Origanum vulgare* L., *Achillea millefolium* L., *Artemisia absinthium* L. și *Primula veris* L.) și de tipul de compus extras (polifenoli, flavonoide), iar criteriile de selecție definite prin identificarea parametrilor optimi din punct de vedere experimental trebuie avute în vedere încă de la începutul procesului. În plus, combinarea metodelor de extracție a evidențiat avantaje pentru a depăși limitările unei metode individuale;
 - ✓ metoda combinată UAE+M utilizată în obținerea extractelor vegetale este o metodă prietenoasă cu mediul înconjurător, nu necesită personal calificat, este o metodă simplă și ușoară, nu necesită aparatură de laborator costisitoare, are un timp până la finalizarea extracției relativ scurt (de 9 zile, datorită combinării cu metoda macerării), are un randament sporit comparativ cu metoda de extracție cu solvent în extractorul Soxhlet și nu prezintă pericole în timpul exploatării aparaturii necesare extracției.
 - ✓ metoda combinată UAE+M și-a dovedit eficacitatea prin randamente superioare în cazul majorității parametrilor utilizați comparativ cu celelalte 3 metode de extracție studiate, respectiv macerare, HAE în instalația Soxhlet și UAE.
 - ✓ Considerând rezultatele obținute în teza de doctorat, pot afirma că metoda combinată HAE+M reprezintă metoda ideală atunci când se dorește obținerea unor randamente superioare în cazul extracției de polifenoli și flavonoide.
- Informațiile obținute în urma analizelor fizico-chimice elaborate prin analiză senzorială și determinarea vâscozității, precum și a grupărilor funcționale prin *tehnicile UV-VIS* și *FTIR*, confirmă și completează informațiile obținute în urma analizelor cantitative:
- ✓ spectroscopia UV-VIS a fost utilizată ca instrument pentru a obține informații preliminare despre compoziție, în ceea ce privește o serie de clase de compuși (de exemplu, fenoli) care pot fi prezenți în extractul de plante;
 - ✓ benzile caracteristice identificate prin spectroscopia FTIR sunt, de asemenea, un argument pentru prezența compușilor polifenolici și a flavonoidelor în extractele analizate.
- Pentru evaluarea potențialului insecticid, vermifug și larvicid al unor tratamente cu extracte obținute din speciile florei spontane autohtone s-

a elaborat un protocol de lucru dinamic, care a fost îmbunătățit în funcție de rezultatele obținute pe parcursul elaborării experimentelor din teza de doctorat. Prin urmare, au fost utilizate patru metode de obținere a tratamentelor administrate pentru a ține sub control dăunătorii din speciile *Leptinotarsa decemlineata* Say și *Acanthoscelides obtectus* Say, și anume: **metoda macerării (M)**, **extracție prin refluxare în instalația Soxhlet (HAE)**, **extracție asistată de ultrasunete (UAE)** și o **metodă combinată între macerare și UAE (UAE+M)**, ținând cont de parametrii optimizați pentru fiecare metodă de extracție, identificați din punct de vedere experimental și prezentați în Capitolul 4 (raportul S/L, timpul de extracție și temperatura). **Rezultatele studiilor experimentale din cadrul Capitolului 5 (Evaluarea activității bioinsecticide a extractelor vegetale obținute din flora spontană autohtonă asupra dăunătorilor de cultură și depozit) au pus în evidență următoarele concluzii:**

- ✓ studiile privind **mortalitatea adulților și larvelor din specia *L. decemlineata* Say** folosind metoda directă de administrare a tratamentelor prin pulverizare cu extracte din plante obținute prin **metoda macerării** au indicat faptul că cele mai bune rezultate privind mortalitatea adulților și larvelor au fost obținute folosind tratamente cu extracte din specia *Primula veris* L. (100%), indiferent de capacitatea cuștii de creștere în care s-au efectuat experimentele;
- ✓ studiile privind **mortalitatea adulților din specia *A. obtectus* Say** folosind metoda directă și respectiv metoda indirectă de administrare a tratamentelor prin pulverizare cu extracte din plante obținute prin **metoda macerării** au indicat faptul că tratamentele administrate prin metoda directă de pulverizare cu o parte dintre extracte au generat o mortalitate ridicată imediat după aplicare, altele inducând o mortalitate târzie, după mai mult de 5 zile de la aplicarea tratamentelor, inducând și numeroase manifestări neuroleptice; rezultatele obținute au indicat faptul că tratamentele cu extracte din specia *A. absinthium* L. au o eficiență superioară atât în ceea ce privește mortalitatea cât și manifestările neuroleptice atunci când sunt aplicate prin pulverizare directă, în timp ce tratamentele cu extracte din specia *O. vulgare* L. prezintă o eficiență similară indiferent de modul de administrare;
- ✓ obținerea extractelor prin tehnica de macerare, folosind solvenți acceptați de agricultură și industria alimentară precum alcoolul etilic, este o opțiune simplă și relativ ieftină și asigură

rezultate cu potențial de aplicare practică, mai ales când sunt incluse și alte principii ale agriculturii durabile. O serie de specii de plante din flora spontană pot fi eficiente în combaterea dăunătorilor și pot fi utilizate în controlul biologic al gândacului din Colorado, *L. decemlineata* Say, cât și a gărgăriței fasolei *A. obtectus* Say;

- ✓ analiza **activității bioinsecticide a extractelor obținute prin refluxare în instalația Soxhlet (HAE)** privind **mortalitatea adulților și larvelor dăunătorilor de cultură și depozit**, evidențiază că metoda HAE, deși este o metodă convențională nu necesită costuri de achiziție și utilizare ridicate și nici personal înalt calificat pentru exploatare;
- ✓ în cazul combaterii adulților speciei *A. obtectus* Say cu extracte obținute prin **metoda HAE**, s-a evidențiat faptul că extractele din specia *O. vulgare* L. au înregistrat un grad am mortalității indivizilor de 30% prin aplicarea tratamentelor cu pulverizare directă și de 25% prin pulverizare indirectă, iar extractele din specia *A. absinthium* L. au înregistrat prin aplicarea tratamentelor cu pulverizare directă o mortalitate de 25%, iar prin pulverizare indirectă o mortalitate de 20%;
- ✓ în cazul combaterii adulților și larvelor speciei *L. decemlineata* Say cu tratamente nediluate (concentrație 100%) obținute din speciile *A. millefolium* L., *O. vulgare* L., *P. veris* L. și *A. absinthium* L. prin **metoda HAE**, gradul mortalității atât pentru larve, cât și adulți a fost de 100% la finalul intervalului de monitorizare de 168 h, excepție făcând *A. absinthium* L., în cazul adulților cu un grad al mortalității de 50%.
- ✓ extractele din plante obținute prin metoda HAE au o activitate bioinsecticidă superioară de ținere sub control a dăunătorilor de cultură și depozit considerați în studiile experimentale, comparativ cu extractele din plante obținute prin metoda macerării, indiferent de condițiile considerate;
- ✓ prin analiza **activității bioinsecticide a extractelor obținute prin metoda UAE** privind **mortalitatea adulților și larvelor din specia *L. decemlineata* Say, precum și numărul de ouă depuse**, se pot concluziona următoarele:
 - în cazul mortalității adulților, cele mai eficiente tratamente au fost cele cu extracte din specia *O. vulgare* L., când se atinge o valoare a mortalității adulților de 60%, urmate de tratamentele cu extracte din speciile *A. absinthium* L., *P. veris* L. și respectiv, *A. millefolium* L.,

când se înregistrează valori ale mortalității de 50%, în proba martor atingându-se o mortalitate de 30% (după 168 h de monitorizare constantă);

- în cazul mortalității larvelor, cele mai eficiente tratamente au fost cele cu extracte din speciile *O. vulgare* L., *A. absinthium* L. și *A. millefolium* L., care înregistrează o mortalitate de 60%, urmate de tratamentele cu extracte din specia *P. veris* L. ce cauzează o mortalitate de 50%, în proba martor, mortalitatea larvelor atingând valoarea de 10%;

- atât în cazul adulților, cât și în cazul larvelor, manifestările neuroleptice și lipsa apetitului au apărut în urma tratamentelor cu extracte din plante, fapt ce confirmă posibilitatea ținerii sub control a acestor dăunători.

- ✓ evaluarea **activității bioinsecticide a extractelor obținute prin metoda UAE** privind mortalitatea adulților din specia *A. obtectus* Say și numărul de ouă depuse, conduce la concluzia că, indiferent de metoda de administrare a tratamentelor asupra dăunătorilor, tratamentul cu extracte din specia *O. vulgare* L. este mai eficient în inducerea sterilității și mortalizării comparativ cu tratamentul cu extracte din specia *A. absinthium* L. Totuși, putem menționa faptul că metoda indirectă de administrare a tratamentelor prin pulverizarea extractelor pe un disc celulozic cu o oarecare eliberare controlată a vaporilor tratamentelor administrate, este mai eficientă în inducerea sterilității comparativ cu metoda directă de administrare.
- ✓ evaluarea **activității bioinsecticide a extractelor obținute prin metoda combinată, UAE+M** privind mortalitatea adulților și larvelor din specia *L. decemlineata* Say și numărul de ouă depuse, evidențiază faptul că cea mai ridicată valoare a mortalității adulților din specia *L. decemlineata* Say după un timp de contact de 168 h, a fost obținută în urma tratamentului cu extracte din specia *O. vulgare* L. (70%), urmată de *P. veris* L. (60%), *A. absinthium* L. (50%) și *A. millefolium* L. (40%) iar numărul total de ouă depus după 168 h timp de contact urmează ordinea tratamentelor astfel: Martor (71 ouă) > *A. absinthium* L. (33 ouă) > *O. vulgare* L. (30 ouă) > *A. millefolium* L. (16 ouă) > *P. veris* L. (8 ouă);

- ✓ evaluarea **activității bioinsecticide a extractelor din plante obținute prin metoda combinată, UAE+M** privind **mortalitatea adulților din specia *A. obtectus* Say și numărul de ouă depuse**, identifică faptul că indiferent de metoda de administrare a tratamentelor asupra dăunătorilor din specia *A. obtectus* Say, extractele din specia *O. vulgare* L. sunt mai eficiente atât în cauzarea mortalității cât și în inducerea sterilității, comparativ cu extractele din specia *A. absinthium* L.; metoda indirectă de administrare a tratamentelor cu extracte din plante este mai eficientă în inducerea sterilității comparativ cu metoda directă de administrare;
- ✓ **tratamentele pe bază de extracte vegetale obținute prin metoda UAE+M au înregistrat cele mai ridicate valori ale mortalității adulților și larvelor speciei *L. decemlineata* Say** și au indus în majoritatea cazurilor lipsa totală a apetitului și o serie de manifestări neuroleptice, printre care și comă, dar și un număr scăzut al ouălor, comparativ cu proba martor;
- ✓ analiza **gradului de supraviețuire prin modelare analitică cu ajutorul ecuației cinetice de ordinul I** a evidențiat răspunsul cinetic cu privire la supraviețuirea/mortalitatea dăunătorilor din speciile *L. decemlineata* Say și *A. obtectus* Say tratate cu ajutorul produselor biopesticide din extracte vegetale pe bază de *O. vulgare* L., *A. millefolium* L., *A. absinthium* L. și *P. veris* L. Modelele analitice rezultate au prezis cu acuratețe timpul letal (LT₅₀) necesar mortalității a 50% din indivizi în condițiile experimentale impuse.

Rezultatele obținute în teza de doctorat cu titlul „*Extracte vegetale cu aplicații în agricultură și industria alimentară*” subliniază faptul că este necesară o eficientizare a obținerii unor tratamente pulverizabile cu un conținut superior de compuși activi cu efect bioinsecticid. Ținând cont de această direcție de cercetare, într-o primă etapă a studiului experimental, procesul de extracție a fost eficientizat pentru patru metode de extracție, **metoda macerării (M), extracție prin refluxare în instalația Soxhlet (HAE), extracție asistată de ultrasunete (UAE) și o metodă combinată între macerare și UAE (UAE+M)**. Ulterior, **extractele obținute din speciile de plante din flora spontană autohtonă precum *Origanum vulgare* L., *Primula veris* L., *Artemisia absinthium* L., *Achillea millefolium* L., specii de plante care până la prezenta teză de doctorat nu au fost studiate în profunzime în vederea combaterii și a ținerii sub control a dăunătorilor, au fost aplicate cu succes în combaterea**

dăunătorilor de cultură (*Leptinotarsa decemlineata* Say) și de depozit (*Acanthoscelides obtectus* Say).

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Abdollahdokht, D., Gao, Y., Faramarz, S., Poustforoosh, A., Abbasi, M., Asadikaram, G., Nematollahi, M.H., 2022. Conventional agrochemicals towards nano-biopesticides: an overview on recent advances. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 9, 1–19. <https://doi.org/10.1186/s40538-021-00281-0>
- Cappa, F., Baracchi, D., Cervo, R., 2022. Biopesticides and insect pollinators: Detrimental effects, outdated guidelines, and future directions. *Sci. Total Environ.* 837, 155714. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155714>
- Damalas, C.A., Koutroubas, S.D., 2016. Farmers' exposure to pesticides: Toxicity types and ways of prevention. *Toxics* 4, 1–10. <https://doi.org/10.3390/toxics4010001>
- Daraban, G., Marinela, B., Rusu, L., Daniela, S., 2018. Biopesticides - a new challenge in assuring food quality and sustainable agriculture. *Lucr. Științifice Ser. Hortic.* 61, 269–274.
- Daraban, G.M., Badeanu, M., Rusu, L., Zaharia, C., Suteu, D., 2020. Vegetal extract from spontaneous romanian flora with bioinsecticidal action. *Res. J. Agric. Sci.* 52, 183–188.
- Daraban, G. M., Zaharia, C., Rusu, L., Puitel, A.C., Badeanu, M., Suteu, D., 2021. Ultrasonic extraction for preparation of plant extracts with bioinsecticidal effects on pest from seed deposits. *Stud. Univ. Babes-Bolyai Chem.* 66, 309–324. <https://doi.org/10.24193/subbchem.2021.2.27>
- Daraban, G. M., Badeanu, M., Suteu, D., 2021a. Repellent and insecticide activities of plants extracts from spontaneous flora using conventional and innovative assisted extraction techniques. *Res. J. Agric. Sci.* 53, 85–92.
- Daraban, G. M., Zaharia, C., Suteu, D., Puitel, A., Tatatru-Farmus, R.E., Badeanu, M., 2021b. Preliminary evaluation of vegetal extract characteristics from spontaneous flora of Moldova area (Romania). *Rom. Biotechnol. Lett.* 26, 2594–2605. <https://doi.org/10.25083/rbl/26.3/2594.2605>
- Daraban, G.M., Zaharia, C., Badeanu, M., Suteu, D., 2022. Modern approaches in agriculture for environmental protection and the origin of product quality: the use of biopesticides, În: *Biotehnologii Moderne - Soluții pentru Provocările Lumii Contemporane*. Tipografia "Artpoligraf," Chișinău, Republica Moldova, p. 54. <https://doi.org/https://doi.org/10.52757/imb21.020>
- Elboughdiri, N., 2018. Effect of time, solvent-solid ratio, ethanol concentration and temperature on extraction yield of phenolic compounds from olive leaves. *Eng. Technol. Appl. Sci. Res.* 8, 2805–2808. <https://doi.org/10.48084/etasr.1983>
- Fongang Fotsing, Y.S., Bankeu Kezetas, J.J., Batiha, G.E.-S., Ali, I., Lenta, N.B., 2022. Extraction of Bioactive Compounds from Medicinal Plants and Herbs, În: *Natural Medicinal Plants*. p. 39.
- Jurinjak Tušek, A., Šamec, D., Šalić, A., 2022. Modern Techniques for flavonoid extraction—To optimize or not to optimize? *Appl. Sci.* 12.

ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ

1. Cărți (1)

1. Hlihor R.M., Simion I.M., Hagi Zaleschi L., Apostol M., Roșca M., **Daraban G. M.**, (2022), *Stresul indus de metalele grele asupra plantelor medicinale și caracterizarea riscurilor pentru sănătatea umană*, Editura Ion Ionescu de la Brad, pp. 160, ISBN 978-973-147-462-5.

2. Articole publicate în reviste de specialitate (12)

2.1. Articole publicate în reviste cotate ISI (5)

1. **Daraban G.M.**, Hlihor R.M., Suteu D., (2023), *Pesticides vs. biopesticides: from pest management to toxicity and impacts on the environment and human health*, Toxics, 11, 983. <https://doi.org/10.3390/toxics11120983> (FI = 4,6 / Q1)

2. Hlihor R.M., Roșca M., Hagi Zaleschi L., Simion I.M., **Daraban G.M.**, Stoleru V., (2022), *Medicinal plant growth in heavy metals contaminated soils: responses to metal stress and induced risks to human health*, Toxics, 10(9), 499. <https://doi.org/10.3390/toxics10090499> (FI = 4,6 / Q1)

3. **Daraban G.M.**, Rusu L., Dinica R.M., Rosca M., Badeanu M., Mihaila M.D.I., Suteu D., (2022), *Exploring the antioxidant and bioinsecticidal activity of spontaneous flora vegetal extracts for plant protection and prevention of soil contamination*, Separations, 9(9), 260. <https://doi.org/10.3390/separations9090260> (FI = 2,6 / Q3)

4. **Daraban G. M.**, Zaharia C., Rusu L., Puitel A.C., Badeanu M., Suteu D., (2021), *Ultrasonic extraction for preparation of plant extracts with bioinsecticidal effects on pest from seed deposits*, Studia Universitatis Babeș-Bolyai Chimia, LXVI, 2, 309-324. DOI:10.24193/subbchem.2021.2.27) (FI = 0,558 / Q4)

5. Suteu D., Rusu, L., Zaharia C., Badeanu M., **Daraban G.M.**, (2020), *Challenge of utilization vegetal extracts as natural plant protection products*, Applied Sciences, 10 (24), 8913. <https://doi.org/10.3390/app10248913> (FI = 2,679 / Q2)

2.2. Articole publicate în reviste incluse în BDI (5)

1. **Daraban G.M.**, Zaharia C., Suteu D., Puitel A., Tataru-Farmus R.E., Badeanu M., (2021), *Preliminary evaluation of the qualitative and semi-quantitative*

characteristics of vegetal extracts from spontaneous flora of Moldova area (Romania), Roumanian Biotechnology Letters, 26(3), 2594-2605.

2. **Daraban G.M.**, Badeanu M., Suteu D., (2021), *Repellent and insecticide activities of plants extracts from spontaneous flora using conventional and innovative assisted extraction techniques*, Research Journal of Agricultural Science, 53(3), 85-92.

3. **Daraban G.M.**, Badeanu M., Rusu L., Zaharia C., Suteu D., (2020), *Vegetal extract from spontaneous Romanian flora with bioinsecticidal action*, Research Journal of Agricultural Science, 52(4), 183-188.

4. **Daraban G.M.**, Badeanu M., Rusu L., Suteu D., (2018), *Researches on the biopesticides obtained by extraction with non-toxic solvents and the insecticide effect on deposit pests*, Bull. IPI, Iasi (Romania), 64 (68), (2), 33-41.

5. **Daraban G.M.**, Badeanu M., Rusu L., Suteu D., (2018), *Biopesticides a new challenge in assuring food quality and sustainable agriculture*, Lucrări Științifice, Seria Horticultură, USAMV – Iasi, 61(1), 269-274.

2.3. Articole publicate în volume ISI Proceedings (2)

1. **Daraban G.M.**, Hlihor R.M., Apostol M., Bădeanu M., Suteu D., (2021), *Secondary plant metabolites: sources of principles for use in agriculture, food industry and for human health safety*, 2021 International Conference on e-Health and Bioengineering (EHB), Iasi, Romania, 2021, pp. 1-4, doi: 10.1109/EHB52898.2021.9657618.

2. Apostol M., Hlihor R. M., **Daraban G.M.**, Zaleschi L. H., Simion I. M., (2021), *Heavy metal pollution in the environment and their effects to ornamental plants*, 2021 International Conference on e-Health and Bioengineering (EHB), Iasi, Romania, 2021, pp. 1-4, doi: 10.1109/EHB52898.2021.9657631.

3. Participări la conferințe naționale și internaționale (20)

3.1. Lucrări comunicate sub formă de prezentare orală (16)

1. **Daraban G.M.**, Hlihor R. M., Marinela B., Suteu D., (2022), *Use of secondary metabolites from plants belonging to the spontaneous flora of Romania with biopesticidal effects on crop and storage pests (Utilizarea metaboliților secundari din plantele florei României cu efecte pesticide asupra dăunătorilor de cultură și depozit)*, International Congress “LIFE SCIENCES TODAY FOR TOMORROW”, 20-21 Octombrie 2022, Iași, România.

2. **Daraban G.M.**, Suteu D., (2022), *Investigations on alternative environmentally friendly treatments obtained from spontaneous flora for crop and storage pests (Investigații privind tratamentele alternative ecologice*

obținute din flora spontană pentru dăunătorii de cultură și de depozit), UEB-2022 Conferința Internațională “Ecologia secolului XXI – Un singur pământ”, Secțiunea Științe naturale și Ecologie „Conservarea patrimoniului natural și cultural”, 7 aprilie 2022, București, România.

3. Daraban G.M., Badeanu M., Suteu D., (2022), Efficiency of plant extracts obtained from *Artemisia absinthium* against *Acanthoscelides obsoletus* pests, 18th International Conference of Young Scientists on Energy and Natural Sciences Issues, 24-27 mai 2022, CYSENI, Lituania.

4. Daraban G.M., Badeanu M., Suteu D., (2022), *Comparative study on the efficiency of spontaneous pesticides against deposit pests*, **5th International Conference of the Doctoral School, 18-20 mai 2022**, Iași, România.

5. Daraban G.M., Zaharia C., Bădeanu M., Șuteu D., (2021), *Vegetal extracts applied in agriculture (Extracțe vegetale cu aplicații în agricultură)*, **Conferința Scoli Doctorale, CSD-TUIASI, 19-21 mai 2021**, Iași, România, on-line.

6. Daraban G.M., Zaharia C., Bădeanu M., Suteu D., (2021), *Modern approaches in agriculture for environmental protection and the origin of product quality: the use of biopesticides*, Biotehnologii moderne - soluții pentru provocările lumii contemporane, 20-21 mai 2021, Chișinău, Republica Moldova, on-line.

7. Daraban G.M., Bădeanu M., Rusu L., Zaharia C., Suteu D., (2021), *Vegetal extract from spontaneous flora with bioinsecticidal action*, International Conference “EuroNanoForum 2021”, 5-6 mai 2021, Portugalia, on-line.

8. Tanasa A., Daraban G. M., Zaharia C., Suteu D., *Biovegetals' wastes used as biosorbent for removal of chemical pollutants from wastewater*, Life Sciences Today for Tomorrow- International Congress October 21-22, **2021**, USAMV, Iași

9. Daraban G.M., Dinică R., Bădeanu M., Rusu L., Suteu D., (2020), *New challenges in bio food products*, XIV International Conference of Food Physicists – ICFP 2020, 5-6 noiembrie 2020, Iași, România.

10. Daraban G.M., Bădeanu M., Rusu L., Suteu D., (2020), *Vegetal extract from spontaneous Romanian flora with bioinsecticidal effect used in the pests control during the seeds storage*, 5th International Conference on Chemical Engineering Innovative Materials and Processes for a Sustainable Development (ICCE 2020), 28-30 Octombrie 2020, Iași, România.

11. Daraban G.M., Zaharia C., Bădeanu M., Rusu L., Suteu D., (2020), *Studies on pest control using plants from native spontaneous flora*, International Congress Life Sciences Today for Tomorrow, USAMV Iași, 22-23 octombrie 2020, Iași, România.

12. Daraban G.M., Zaharia C., Tataru – Fărnuș R.E., Bădeanu M., Rusu L., Suteu D., (2019), *Vegetal extracts - challenge for plant / soil protection and food quality assurance*, The Vth edition of the International Conference New Trends in

Environmental and Materials Engineering, 23-25 octombrie 2019, Galați, România.

13. Daraban G.M., Zaharia C., Puîțel A., Suteu D., (2019), *Vegetal extracts from the spontaneous flora of Moldova: Origanum vulgare*, International Conference of Cosmetic and Flavorings, 3-7 iunie 2019 Iași, România.

14. Daraban G.M., Bădeanu M., Rusu L., Suteu D., (2019), Cercetări privind biopesticidele cu efect vermifug și insecticid obținute prin extracție cu solvenți netoxici, **Conferința Școlii Doctorale, CSD-TUIASI, 22-23 mai 2019**, Iași, România.

15. Daraban G.M., Bădeanu M., Rusu L., Suteu D., (2018), Biopesticides a new challenge in assuring food quality and sustainable agriculture, International Scientific Congress Engineering and Environmental Protection - Science, Quality, Diversity And Harmony” 18 - 19 octombrie 2018, Iași, România.

16. Daraban G.M., Bădeanu M., Rusu L., Suteu D., (2018), Researches on the biopesticides obtained by extraction with non-toxic solvents and the insecticide effect on deposit pests, **Conferința Școlii Doctorale – TUIASI, 23-24 mai 2018** Iași, România.

3.2. Lucrări comunicate sub formă de poster (4)

1. Daraban G.M., Bădeanu M., Suteu D., (2022), *Modeling the survival rate of Leptinotarsa decemlineata Say pests by the use of spontaneous flora extracts*, 6th International Conference on Chemical Engineering, 5-7 Octombrie 2022, Iași, România.

2. Daraban G.M., Bădeanu M., Rusu L., Zaharia C., Suteu D., (2020), Vegetal extract from spontaneous flora with bioinsecticidal action, USAMVB Timisoara ”Young People and Multidisciplinary Research in Applied Life Sciences”, 27 Noiembrie 2020, Timișoara, România.

3. Daraban G.M., Zaharia C., Puitel A., Bădeanu M., Șuteu D., (2019), *Preliminary evaluation of the characteristics of some vegetal extracts from spontaneous flora in Moldova area (Romania) with potential bioinsecticide activity*, International Conference "Achievements and Perspectives of Modern Chemistry", 9-11 Octombrie 2022, Chișinău, Moldova.

4. Daraban G.M., Rusu L., Zaharia C., Suteu D., (2019), *Comparative evaluation of conventional extraction techniques used to obtain crude extracts from spontaneous flora of Moldova with bioinsecticide activity*, International Conference of Applied Sciences, 22-24 mai 2019, Bacău, România.