

Raport stiintific sintetic

privind implementarea proiectului in perioada 2011 –2014

1. Cresterea plantelor in camp de microunde; determinarea metodelor optime de extractie a compusilor bioactivi urmariti

1.1.Pregatirea sistemului pentru iradierea cu microunde a plantelor considerate pentru studiu

In vederea studierii efectelor iradierii cu microunde asupra plantelor aromate au fost selectate urmatoarele plante: telina (*Apium graveolens*), patrunjel (*Petroselinum crispum*) si marar (*Anethum graveolens*). In cadrul acestei etape s-au cumparat seminte ale acestor plante, firma Kotany, si au fost semanate in pamant. La trei saptamani dupa semanare, vasele cu plantele rasarite au fost introduse in patru incinte anechoice identice, doua de referinta, iar doua in care actioneaza microundele pe doua domenii: **a) GSM**, utilizand un generator in domeniul 860 – 910 MHz, putere totala de iesire 30 dBm (1000 mWatt) (**M1**); **b) WLAN** (wireless internet connection), utilizand un router generator 802.11 g, cu frecventa de operare in domeniul 2.4 – 2.49 GHz , cu canalul principal de operare la 2.42 GHz, putere totala de iesire 18 dBm ($10^{1.8}$ mWatt) (**M2**) (Fig. 1).

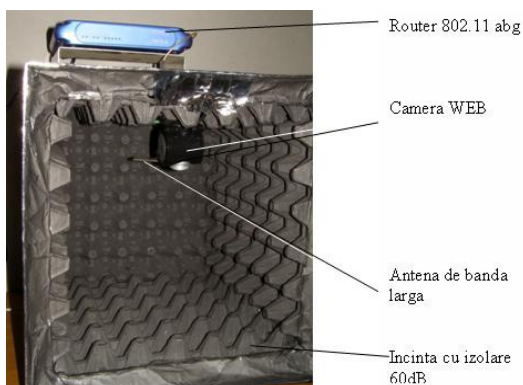


Fig. 1. Incinta de tratament in camp de microunde

Incintele cubice au dimensiuni $37 \times 37 \times 37 \text{cm}^3$, cu pereti captusiti cu structuri piramidale de inaltime de 4 cm, au fost amplasate in aceleasi conditii de temperatura/umiditate si inchise complet. Incintele prezinta o izolare de radiofrecventa intre interior si exterior de 60dB. Temperatura si umiditatea intre incintele de referinta si cele pentru iradiere au fost inregistrate permanent si s-a observat o buna corelare intre acestea; cresterea temperaturii determina scaderea umiditatii cu acelasi procent in ambele incinte, astfel conditiile de crestere fiind aproape identice.

In aceste incinte plantele vor fi mentinute timp de 3 saptamani urmand a fi analizate in etapele ulterioare.

1.2. Selectarea metodelor de extractie a compusilor bioactivi analizati din plantele aromate considerate pentru studiu

1.2.1. Obtinerea si caracterizarea extractelor de vitamina C obtinute din plantele referinta, utilizand metode noi de extractie si diferiti solventi

In cadrul acestei activitati s-a urmarit extractia vitaminei C prin 3 metode: mojarare / centrifugare (M), ultrasonare (UAE) si extractie in camp de microunde (MAE), utilizand ca solvent extractie apa si diferite solutii apoase, de concentratie 8%, ale urmatoarelor acizi: acid tricloroacetic (TCA), acid metafosforic (MPA), acid acetic (AC).

1. *Mojarare/centrifugare.* O cantitate de 1 g planta verde se cantareste si se mojaraza la temperatura de 20°C intr-un mojar cu pistil, folosind aproximativ 1 g nisip si 5 mL solvent (solutie apoasa de acid 8 %), pana la obtinerea unei paste omogene subtiri. Apoi, pasta solida se transfera intr-o eprubeta si se centrifugheaza (8000 rpm) la 20°C timp de 5 minute, iar extractul limpede obtinut se decanteaza. Se clateste mojarul cu inca 5 mL solvent, care se transfera din nou in eprubeta de centrifugare peste amestecul solid initial obtinut dupa decantare si se repeta procesul de centrifugare timp de 5 minute. Cele doua extracte obtinute se transfera intr-un balon cotat de 10 mL si se ajusteaza volumul (se aduce la semn cu solutie de acid 8%). Extractele se pastreaza in sticle de culoare inchisa si se stocheaza la temperatura de 4°C.

2. *Ultrasonare.* Materialul vegetal maruntit se extrage la temperatura de 20°C cu 5 mL solvent (solutie apoasa de acid 8 %) folosind o baie de ultrasonare. Se utilizeaza 1 g material vegetal care se extrage cu 5 mL solvent timp de 30 minute, extractul se decanteaza, si apoi materialul vegetal ramas se extrage a doua oara prin ultrasonare, cu inca 5 mL solvent timp de 30 minute. Timpul total de extractie prin ultrasonare este 1 h. Se ajusteaza volumul final obtinut prin combinarea celor doua extracte la 10 mL.

3. *Extractie in camp de microunde.* Materialul vegetal maruntit se utilizeaza pentru extractia vitaminei C la temperatura de 30°C cu 10 mL solvent, in camp de microunde continuu, utilizand un sistem Monowave 300, Anton Paar. Pentru atingerea temperaturii de 30°C este necesar 1 minut, iar racirea sistemului, la temperatura camerei se realizeaza tot intr-un minut. In timpul procesului de iradiere probele au fost agitate cu o viteza de 250 rpm. Campul de microunde este aplicat timp de 4 minute, iar extractul limpede obtinut se filtreaza. Se ajusteaza volumul final obtinut prin combinarea celor doua extracte la 10 mL, folosindu-se un balon cotat.

Extractele astfel obtinute au fost analizate prin HPLC-MS si electrochimic.

1.2.2. Obtinerea si caracterizarea extractelor de uleiuri esentiale din plantele referinta, utilizand diferite metode noi de extractie si diferiti solventi

In cadrul acestor activitati de stabilire a metodei de extractie s-a lucrat cu plante de referinta. Pentru extractia uleiurilor volatile s-au utilizat plante uscate. Dupa macinarea frunzelor uscate, portii de pulbere de cate 0,5 g au fost supuse extractiei cu diferiti solventi, prin diferite tehnici. Urmatorii solventi si amestecuri de solventi au fost utilizati pentru extractia uleiurilor eterice: E1 - dietil eter - etanol (1:1, v/v); E2 - etanol; E3 – hexan; E4 - dietil eter; E5 - dietil eter - hexan (1:1, v/v).

Tehnicle de extractie utilizate au fost: macerare, extractie prin ultrasonare cu solvent si extractie cu solvent, in camp de microunde de putere. Fiecare procedeu de extractie a fost optimizat tinandu-se cont de principalii factori (timp, temperatura etc). Toate extractiile au fost realizate la 30°C.

Macerarea (M) s-a realizat in 14 zile, cu 4 ml solvent de extractie (E1 – E6). Macerarea a fost urmata de filtrare si spalarea reziduului de planta, volumul final fiind 4 ml.

Extractia prin ultrasonare cu solvent (UAE) a decurs in doua etape, utilizand o baie ultrasonica Transsonic T 310 la 35kHz si putere instalata de 95W. Dupa 30 min de ultrasonare in 4 ml solvent, extractul a fost separat. In final, proba a fost filtrata si reziduul spalat. Extractele au fost reunite, iar volumul final a fost 4 ml.

Extractia cu solvent in camp de microunde de putere (MAE) s-a realizat utilizand un aparat construit in cadrul INCDTIM Cluj-Napoca. Cu acest aparat se pot controla: timpul de operare, temperatura si coeficientul de umplere. Proba (0,5 g planta uscata si macinata) impreuna cu solventul de extractie (4 ml) s-a introdus in celula de extractie. Luand in considerare specificitatea materialului (planta) au fost selectati urmatorii parametri de lucru: timp de actiune 1 min, coeficient de umplere 40% la o putere de 900W. Depinzand de capacitatea de absorbtie a solventului, timpul total de extractie este mai lung decat 1 min

deoarece celula trebuie sa se raceasca pentru a nu depasi 30°C. Cea mai lunga durata a extractiei s-a inregistrat in cazul amestecului eter etilic + etanol, dar nu a depasit 30 min. Deoarece temperatura de operare a fost mica, sistemele de solventi utilizate nu au fiert, extractia putand fi condusa astfel la presiune atmosferica. Probele astfel obtinute au fost filtrate si spalate, volumul final fiind de 4 ml.

Stabilirea conditiilor optime de extractie (solvent de extractie si metoda) s-a realizat pe plante referinta, iar cea mai buna metoda va fi aplicata plantelor iradiate cu microunde, pe parcursul etapelor ulterioare. Calitatea extractelor a fost determinata prin metode cromatografice (TLC, GC-FID).

Toate determinarile au fost efectuate folosind probe in triplicat.

1.2.3. Selectarea metodei de extractie a vitaminei C, respectiv a uleiurilor esentiale, din plantele aromate studiate

Probele obtinute prin procedeele descrise mai sus au fost comparate in scopul selectarii metodei optime de extractie a vitaminei C, respectiv a uleiurilor esentiale.

Selectarea metodei de extractie a vitaminei C s-a realizat utilizand atat metoda cromatografica (HPLC), cat si metoda electrochimica, rezultatele obtinute prin cele doua metode fiind in concordanta.

In urma analizelor efectuate s-a constatat ca MPA 8% prezinta cele mai bune proprietati de extractie, utilizand ultrasonarea ca metoda de extractie.

Analiza uleiurilor esentiale s-a realizat prin analiza GC-FID, utilizand un gaz cromatograf Shimadzu 2010 cu detectie prin ionizare in flacara (GC-FID). Coloana capilara folosita a fost de tipul AT-5 (30m), iar analizele s-au efectuat in heliu, la un debit de 4 ml/min. Inregistrarea cromatogramelor s-a inceput la 50°C timp de 2 min, incalzirea continuandu-se cu o viteza de 8°C/min pana la 250°C unde s-a mentinut 15 min. Temperatura de injectare a fost de 250°C. Pentru stabilirea celei mai bune metode de extractie a uleiurilor esentiale, au fost suprapuse cromatogramele obtinute si comparate dimensiunile picurilor (Fig. 2).

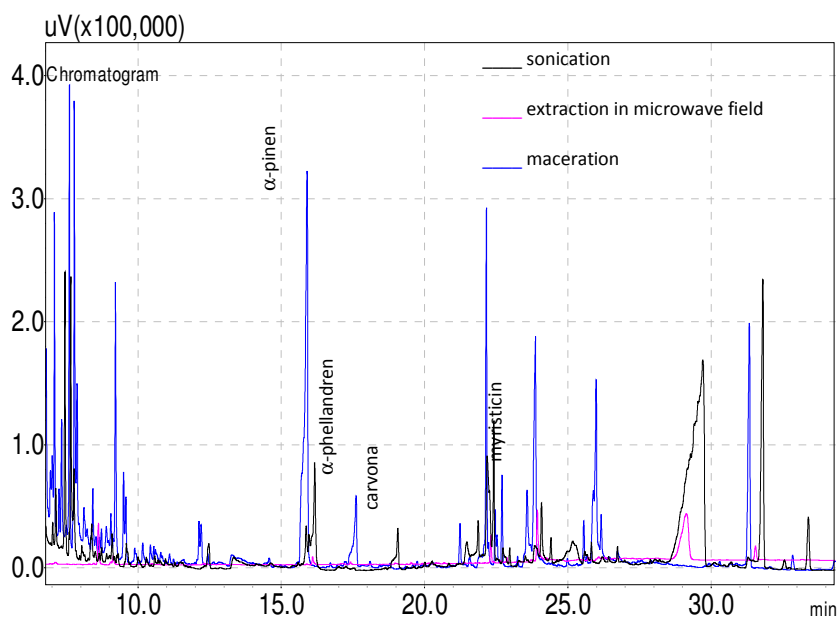


Fig. 2. Cromatogramele extractelor de marar obtinute cu amestecul de solventi E1 prin cele trei tehnici de extractie utilizate

Pe baza cromatogramelor inregistrate s-a observat ca macerarea este cea mai buna metoda de extractie a uleiurilor esentiale, urmata de ultrasonare. Cel mai bun solvent pentru extractie s-a dovedit amestecul eter etilic : etanol (1 : 1, v/v), urmat de hexan.

2. Investigarea efectului microundelor asupra continutului de vitamina C din plantele studiate

2.1. Monitorizarea variatiei cantitatii de vitamina C in plantele iradiate comparative cu plantele de referinta

Plantele luate in studiu (patrunjel, telina si marar), au fost crescute in conditiile descrise la punctul 1.1.1, dupa care au fost recoltate frunzele, obtinute extractele si analizate atat prin metoda HPLC cat si prin metoda electrochimica.

In scopul determinarii vitaminei C s-a utilizat o solutie apoasa de acid acetic 8% pentru extractia acesteia din telina, patrunjel si marar. Se utilizeaza 1 g material vegetal care se extrage prin ultrasonare cu 5 mL solvent timp de 30 minute. Extractul se decanteaza, si apoi materialul vegetal ramas se extrage a doua oara prin ultrasonare, cu inca 5 mL solvent timp de 30 minute. Timpul total de extractie prin ultrasonare este 1 h, iar temperatura de 20°C. Se ajusteaza volumul final obtinut prin combinarea celor doua extracte la 10 mL.

Metoda HPLC Pentru analiza extractelor de vitamina C din plantele studiate, utilizand metoda HPLC, s-a lucrat pe un sistem HPLC Shimadzu 2010 si s-a folosit ca si faza stationara o coloana tip Alltima, C18, 3 μ , 100 x 3 mm. Elutia s-a realizat cu gradient, utilizand o faza mobila alcatuita din: tampon fosfat 15mM la pH = 2,7 (A) si metanol (B), cu un debit de 0,4 ml/min. Gradientul a fost realizat astfel: min 0: 10%B, min 5: 20% B, min 10: 10% B. Temperatura coloanei a fost de 30°C.

Comparand cantitatea de vitamina C determinata in patrunjel, marar si telina s-a constatat ca, in cazul plantelor de referinta, patrunjelul contine cea mai mare cantitate de vitamina C (264 mg AA/100 g planta cruda), urmat de marar cu 121 mg AA/100 g planta cruda si telina cu 103 mg AA/100 g planta cruda (Fig. 3).

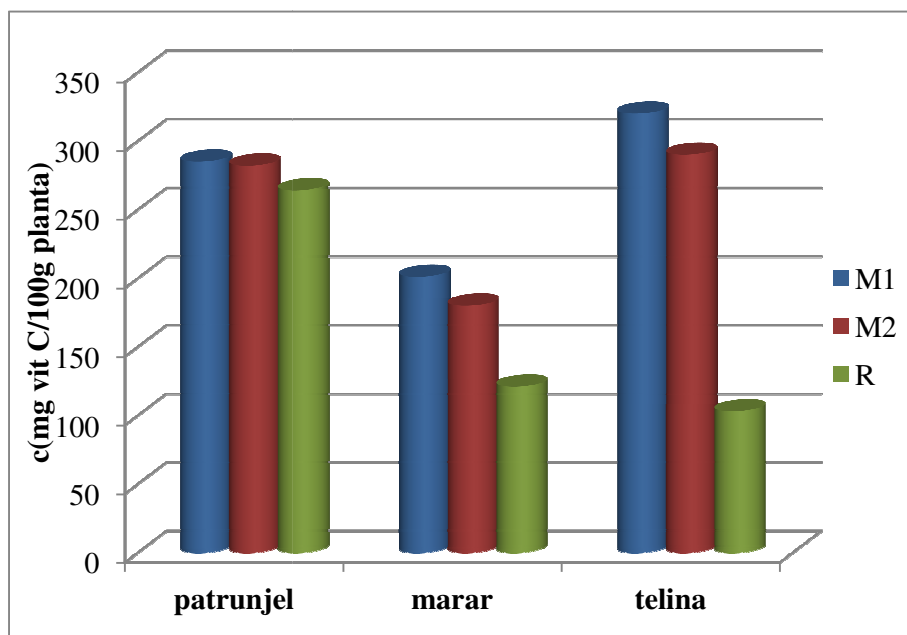


Fig. 3 Continutul de vitamina C determinat prin HPLC in plantele studiate, crescute in diferite conditii

2.1.1. Determinarea cantitativa a vitaminei C din plantele iradiate si neiradiate, prin metode electrochimice

Experimentele electrochimice de cronoamperometrie s-au efectuat cu o combină potențiostatică asistată de calculator (Autolab- PGSTAT 302N, EcoChemie, Utrecht, Olanda). Cronoamperometria presupune studiul variației răspunsului de curent al sistemului cu timpul, în control potențiostatic.

Pentru măsurătorile de cronoamperometrie s-a utilizat o celulă electrochimică echipată cu trei electrozi: contraelectrodul din plăcuță sau fir de platină, electrodul de referință Ag/AgCl/KCl_{sat} și electrodul de lucru din pasta de cărbune CPE. Electrolițul suport de pH= 6.8 este 0.1M tampon fosfat agitat cu 500 rpm, iar potențialul aplicat este de +600 mV vs Ag/AgCl/ KCl_{sat}.

S-au calculat concentrațiile de acid ascorbic din probele obținute prin extracție din plantele studiate iradiate și neiradiate prin interpolarea semnalului obținut (curent) pe porțiunea liniară a curbei de calibrare (Fig. 4).

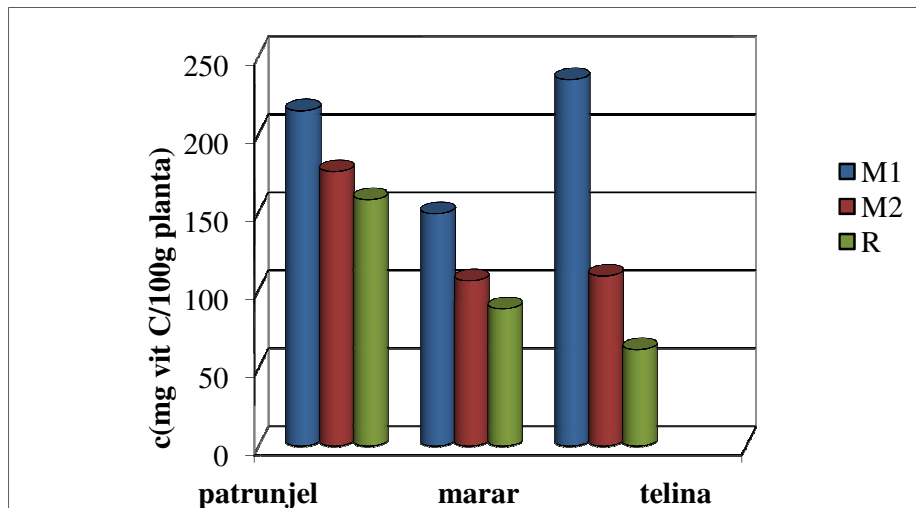


Fig. 4 Continutul de vitamina C determinat electrochimic in plantele studiate, crescute in diferite conditii

2.1.2. Compararea rezultatelor obtinute prin aceste doua metode. Compararea rezultatelor obtinute pentru plante iradiate si de referinta

Intre rezultatele obtinute prin metoda HPLC si prin metoda electrochimica este o stransa corelare, variatia continutului in vitamina C urmand aceleasi tendinte, cu deosebirea ca, in cazul metodei cromatografice, cantitatea de vitamina C a fost mai mare decat cea determinata electrochimic. Acest fapt se poate datora efectului de matrice care apare in determinarile electrochimice datorita solutiei de acid acetic utilizata pentru obtinerea extractelor.

Prin ambele metode de analiza utilizate s-a constatat ca in cazul plantelor crescute in camp de microunde a crescut cantitatea de vitamina C. Cea mai mare cantitate de vitamina C a fost obtinuta in cazul iradierii cu un generator ce lucreaza in domeniul GSM, fiind urmata de cantitatea de vitamina C gasita in plantele crescute in camp de microunde cu frecventa de operare in domeniul WLAN (Fig. 5).

In urma determinarilor efectuate s-a constatat ca in cazul telinei iradiata cu microunde de tip GSM a crescut cel mai mult cantitatea de vitamina C (211% fata de referinta). Acest lucru ar putea fi pus pe seama faptului ca suprafata frunzelor este cea mai mare dintre plantele studiate, astfel ca poate absorbi cea mai mare cantitate de radiatie electromagnetica. Cantitatea de vitamina C a crescut cel mai putin in patrunjelul iradiat cu microunde de frecventa WLAN (8% fata de referinta).

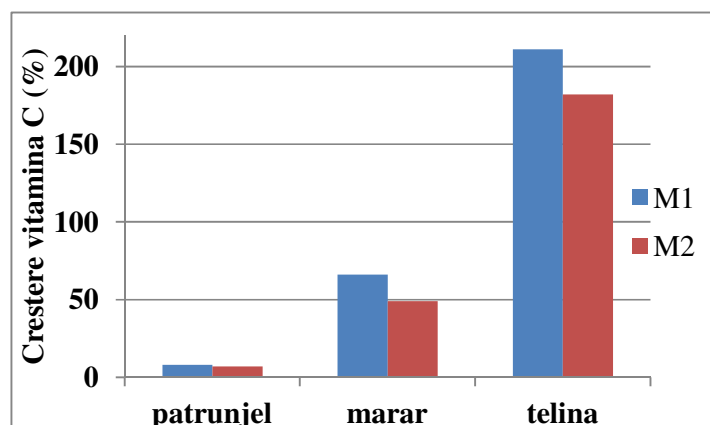


Fig. 5 Cresterea cantitatii de vitamina C in plantele iradiate fata de cele de referinta

2.1.3. Analize ultrastructurale si morfologice pe plantele studiate

Investigațiile s-au efectuat la un microscop electronic de transmisie de tip TEM, Jeol 1010, dotat cu CCD Camera. Analiza s-a efectuat asupra probelor din plantele luate în studiu, procesate corespunzător, prin fixare în glutaraldehidă și acid osmic, infiltrate și incluse într-o rășină epoxidică de tip Epon 812, secționare cu cuțit de diamant la un ultramicrotom de tip Leica UC6, secțiuni care au fost contrastate cu atomi de U și Pb (soluții de acetat de uraniu și de citrat de plumb). Toate procedurile au fost efectuate în acord cu tehnicile și metodologiile clasice utilizate pentru analize de microscopie electronic de transmisie.

Materialul biologic experimental a fost constituit din plante de pătrunjel, țelină și mărar, crescute în paralel în două încăperi diferite, plantele de referință, netratate și plantele supuse iradierii. Iradierea s-a efectuat pe loturi separate, fie cu microunde echivalente instalațiilor GSM, fie cu microunde de tip wireless. Pentru analiză au fost recoltate frunzele plantelor.

Loturile experimentale

- R – frunze de referință din plante de pătrunjel crescute în camera având aceleași condiții de mediu (PR).
- M1 – plante iradiate cu microunde de tip GSM (PM1);
- M2 – plante iradiate cu microunde de tip wireless (PM2).

Același model experimental a fost aplicat și pentru țelină (TR și TM1, TM2) și mărar (MR și MM1).

Pentru analiza ultrastructurală a frunzelor recoltate de la toate plantele loturilor experimentale, s-a avut în vedere a se investiga componentele principale ale limbii foliare, respectiv: epidermul superior acoperit de cuticulă, parenchimul palisadic unde în celulele sale sunt prezente cele mai multe cloroplaste, țesutul mezofilic aflat în mijlocul limbii foliare, unde sunt cantonate vasele liberiene și cele lemnoase, țesutul lacunar cu celule dispuse rarefiat și având puține cloroplaste, și epidermul inferior.

Dintre componentele celulare s-au urmărit în principal organele fotosintetizante, respectiv cloroplastele, organele furnizoare de energie, respectiv mitocondriile și nucleul ca și coordonator al metabolismului celular.

Analiza imaginilor obținute din frunzele plantelor iradiate cu frecvență și putere GSM, comparativ cu imaginile loturilor de referință, prezintă următoarele caracteristici ultrastructurale:

- Epiderma superioară este nemodificată;
- Celulele parenchimului palisadic și al celulelor din mezofil, au pereții celulari (celulozici), ușor ondulați (Fig. 6b), comparativ cu cei de la loturile de referință, unde aceștia erau rectilini (neondulați), (Fig.

6a), ceea ce semnifică o ușoară alterare a dispunerii spațiale a celulelor în cadrul limbului foliar și respectiv o ușoară scădere a turgescenței limbului foliar.

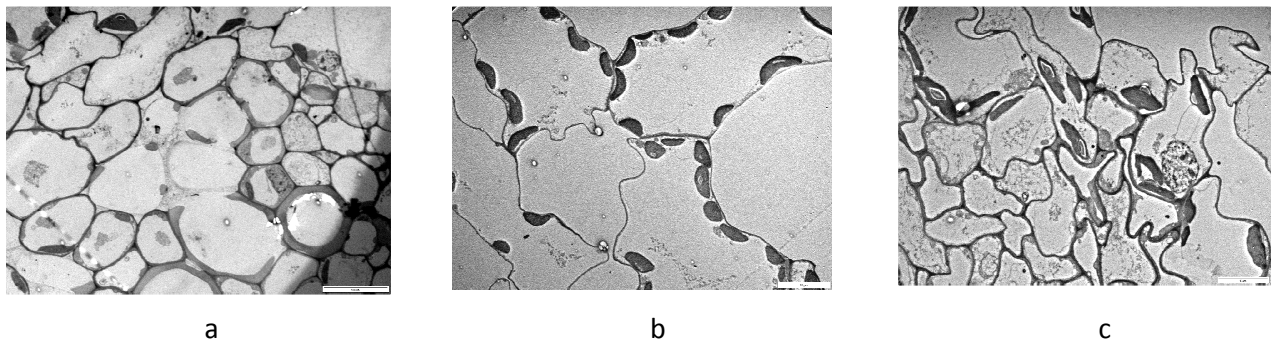


Fig. 6 Imaginea peretilor celulari pentru: a) PR; b) PM1; c) PM2

- Cloroplastele și-au păstrat ultrastructura și dispunerea normală în celule, dar prezența grăuncioarelor de amidon este mai evidentă, ceea ce sugerează o ușoară intensificare a sintezei acestuia.

- Mitocondriile au matricea electrodensificată și cristele mitocondriale ușor rarefiate, ceea ce sugerează o ușoară scădere a activității lor metabolice.

- Nucleii majorității celulelor au structura normală, dar cu o prezență mai mare de heterocromatină, sau cu conturul prezentând ondulații. În unele cazuri apar și nuclei cu structura alterată.

În concluzie undele GSM cu intensitatea utilizată în experiment, induc relativ ușoare modificări în ultrastructura frunzei de pătrunjel, evidențiate la nivelul pereților celulari, a mitocondriilor, a unor cloroplaste și în special asupra nucleilor unor celule, fără să influențeze în mod semnificativ activitățile metabolice generale ale frunzei. Probabil că prin acțiunea pe o durată mai îndelungată sau la intensități mai mari, efectele negative incipiente observate mai sus, vor putea fi potențate și vor putea induce alterări mai mari.

Analiza imaginilor obținute pe lotul iradiat cu microunde de intensitate și putere WLAN subliniază faptul că efectele negative incipiente prezentate la lotul M1, acum apar intensificate și cu alterări evidente, după cum urmează:

- Epidermul învelitor, atât cel superior, cât și cel inferior, s-a subțiat și a devenit neregulat;

- Celulele parenchimului palisadic, din cauza ondulării pereților celulari și-a pierdut aranjamentul caracteristic de celule cilindrice strâns alipite și cu pereți rectilini. Celulele mezofilului au și ele pereții ondulați, ceea ce semnifică pierderea turgescenței celulelor, ce va conduce la ofilirea frunzelor.

- Cloroplastele sunt în număr mai mic, majoritatea nu mai au forma clasică de corn și toate posedă câte un grăuncior de amidon, ceea ce sugerează acumularea de rezerve energetice ca protecție împotriva stresului provocat de microunde wireless de frecvență înaltă.

- Mitocondriile au matricea și cristele rarefiate, prezintă semne de alterare.

- Nucleii au structură aparent normală, dar cu heterocromatină mai multă ca la normal, și contur ușor neregulat. La unele celule nucleii au structura alterată, fără evidențierea distinctă în cariolimfa a eucromatinei și heterocromatinei.

Rezultate similare au fost obținute în cazul tuturor plantelor luate în studiu.

3. Investigarea efectului microundelor asupra uleiurilor volatile prezente in plantele condimentare studiate

3.1. Urmărirea compoziției in uleiuri esențiale și a modificărilor morfologice, din plantele iradiate comparativ cu plantele de referință

3.1.1. Cultivarea și creșterea unui nou lot de plante

3.1.2. Obținerea extractelor de uleiuri volatile din plantele iradiate și de referință

În cadrul acestei etape, noi loturi de patrunjel, telina și marar au fost crescute atât în condiții clasice, de referință, cât și în câmp de microunde, după cum s-a descris în rapoartele anterioare. La trei săptămâni după semănare, vasele cu plantele rasarite au fost introduse în patru încăperi anecoice identice, două de referință (**R**), iar două în care acționează microundele pe două domenii: 1) GSM, utilizând un generator în domeniul 860 – 910 MHz, putere totală de ieșire 30 dBm (1000 mWatt) (**M1**) 2) WLAN (wireless internet connection), utilizând un router generator 802.11 g, cu frecvența de operare în domeniul 2.4 – 2.49 GHz, cu canalul principal de operare la 2.42 GHz, putere totală de ieșire 18 dBm ($10^{1.8}$ mWatt) (**M2**). În aceste încăperi plantele au fost păstrate timp de 3 săptămâni, după care au fost recoltate frunzele, obținute extractele și analizate atât prin metoda HPLC cât și prin metoda electrochimică.

În prima etapă s-a stabilit care este cea mai eficientă metodă de extracție a uleiurilor volatile din plantele luate în studiu. Astfel, pentru extracția uleiurilor volatile atât din plantele iradiate cât și din cele neiradiate s-a utilizat metoda extracției prin ultrasonare, utilizând amestec de dietil eter : *n*-hexan (1:1, v/v) ca solvent de extracție. Extracția prin ultrasonare cu solvent (UAE) a decurs în două etape, utilizând o baie ultrasonică Transsonic T 310 la 35kHz și putere instalată de 95W. După 30 min de ultrasonare a 0,5g plantă în 4 ml solvent, extractul a fost separat. În final, proba a fost filtrată și reziduul spălat. Extractele au fost reunite, iar volumul final a fost 4 ml.

3.1.3. Determinarea calitativă și cantitativă a uleiurilor esențiale din extractele obținute, prin tehnicile de analiză GC și HPLC

Extractele au fost analizate prin **GC-MS**, cât și prin HPLC. Analizele GC-MS au fost realizate cu ajutorul unui cromatograf Shimadzu QP2010 Plus cuplat cu spectrometru de masă cu cuadrupol. Condițiile de analiză au fost următoarele: temperatura injectorului: 215°C, temperatura inițială a cuptorului de 40°C a fost păstrată timp de 1 minut, urmată de încălzire cu 5°C min⁻¹ până la 200°C, unde s-a păstrat timp de 1 min. Încălzirea a continuat apoi cu o viteză de 10°C min⁻¹ până la 220°C și a fost menținută aici timp de 5 min. Heliul a fost utilizat ca și gaz purtător, cu un debit constant de 1 mL min⁻¹. Spectrometrul de masă cu impact de electroni a fost utilizat la 70 eV, în domeniul de scanare *m/z* 30 – 400, temperatura interfetei de transfer a fost setată la 240°C și temperatura sursei de ioni la 150°C.

Pe baza cromatogramelor înregistrate s-au detectat 10 compuși în *Petroselinum crispum*, 11 compuși în *Anethum graveolens* și 7 compuși în *Apium graveolens*, monoterpenele constituind componentul principal al uleiurilor esențiale. Pe lângă acestea, câteva benzenoide sunt, de asemenea, componente dominante ale uleiului: apiol în patrunjel, miristicin și dillapiol în marar. Compușii volatili principali din telina au fost: 3-hexen-1-ol, mircen, α -ocimen, γ -terpinen (Fig. 7).

În studiul realizat, s-a constatat că, în general, conținutul de uleiuri volatile a crescut în plantele iradiate cu microunde de frecvență GSM, în timp ce efectul microundelor cu frecvență WLAN- a fost mai puțin clar, variind de la pozitiv sau negativ pentru diferite componente și specii (Fig. 7). Comparând cele trei specii de plante luate în studiu, cele mai puternice efecte s-au observat în cazul uleiurilor volatile din *Anethum graveolens*.

Pentru compușii individuali din *P. Crispum*, iradierea cu microunde de tip GSM a produs o creștere statistică a conținutului în 3-hexen-1-ol, mircen, α -felandren, β -felandren, miristicin și apiol. Comparativ cu

referinta, continutul in apiol a crescut de mai mult de sapte ori. Microundele cu frecventa WLAN au condus, in aceasta planta, la cresterea continutului de α -pinen, β -felandren, miristicin si apiol (Fig. 7a).

In *Anethum graveolens* iradiat cu microunde GSM, a fost observata o crestere a continutului de: β -pinen, α -felandren si dillapiol (Fig. 7b). Totusi, microundele cu frecventa WLAN au provocat o scadere a continului in α -felandren, miristicin si dillapiole, cea mai mare scadere observandu-se pentru miristicin (aproximativ 18% din continutul in plantele de referinta, Fig. 7b).

In *Apium graveolens*, ambele tipuri de microunde au condus la cresterea continutului in 3-hexen-1-ol (Fig. 7c). Iradierea cu microunde WLAN a condus la reducerea cantitatii de mircen (19%) si de α -ocimen (21%) (Fig. 7c).

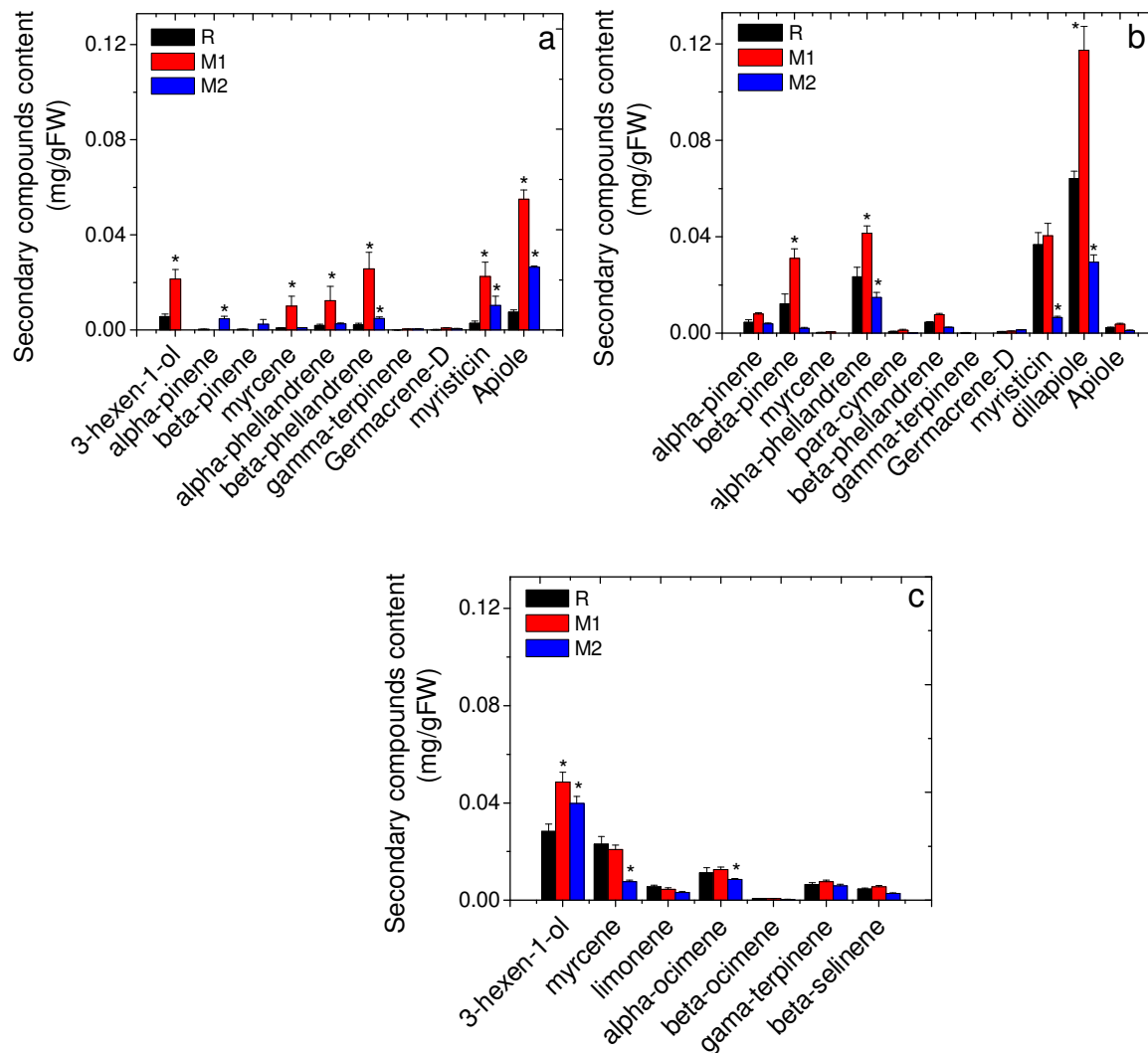


Fig. 7. Modificarea continutului de terpene (mg g^{-1} FW) in frunzele de *Petroselinum crispum* (a), *Anethum graveolens subsp. hortorum* (b) si *Apium graveolens* (c) ca raspuns la iradierea cu microunde in domeniul GSM si WLAN.

Analiza extractelor de uleiuri volatile prin metoda HPLC a utilizat un cromatograf Shimadzu cu detector DAD si coloana LiChrosorb RP-18 ($5\mu\text{m}$, 25×0.4 cm) termostata la 25°C . Elutia a avut loc cu gradient, folosind ca solventi apa ultrapura (A) si acetonitril (B), dupa cum urmeaza: 0 - 1 min cu 100% B, cantitatea de acetonitril scazand pana la 25% in minutul 15. and then the eluent B decreased in 15 min to

25%. Debitul fazei mobile a fost de 1 mL min^{-1} . Prin aceasta metoda au fost identificati miristicinul (201 nm) si linaloolul (197nm). Pentru cei doi compusi au fost trasate curbele de calibrare si s-au determinat limitele de detectie si de determinare. Coeficientii de corelare au avut valori foarte apropiate de 1 (0,9993 pentru miristicin si 0,9991 pentru linalool), liniaritatea dreptelor fiind foarte buna. Calculandu-se limitele de determinare si de detectie s-a constatat ca pentru miristicin limita de detectie (LOD) este $32.68 \mu\text{g mL}^{-1}$, iar limita de determinare (LOQ) este $64.57 \mu\text{g mL}^{-1}$. Pentru linalool LOD a fost $6.33 \mu\text{g mL}^{-1}$ si LOQ a fost $12.50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

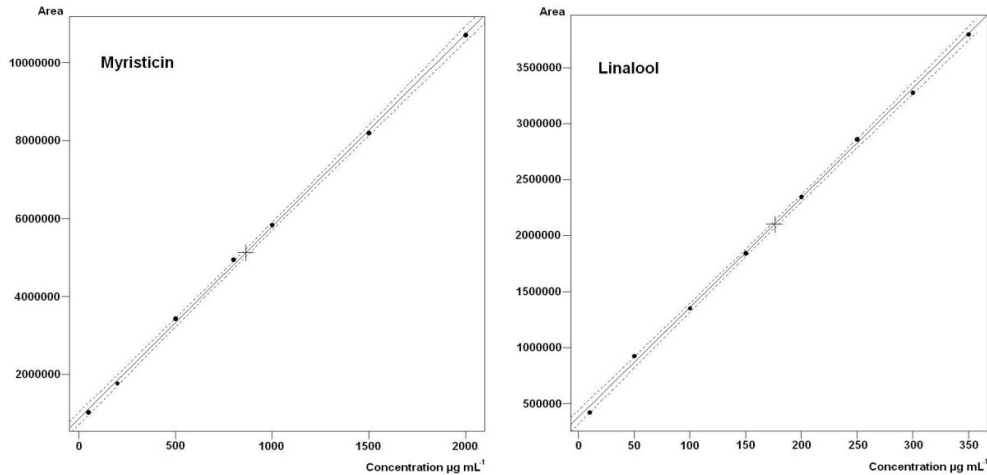


Fig. 8. Curbele de calibrare ale miristicinului si linaloolului

Prezenta miristicinului a fost pusa in evidenta doar in marar si patrunjel, cantitatea de miristicin crescand in mararul iradiat fata de cel de referinta. In cazul patrunjelului s-a observat o scadere a cantitatii de miristicin cu 26% in plantele iradiate cu microunde de tip GSM si cu 52% in plantele iradiate cu WLAN fata de cele de referinta (Fig. 9).

Utilizand aceeasi metoda HPLC, in toate cele trei plante s-a determinat linaloolul si miristicinul (Fig. 9). Cantitatea de linalool determinata in plantele studiate a fost mai mare decat cea de miristicin, iar in marar si telina a inregistrat o scadere usoara dupa iradierea cu microunde (pana la 6%). Intre plantele iradiate cu microunde de tip GSM si cele cu microunde de tip WLAN nu au aparut diferente (Fig. 9).

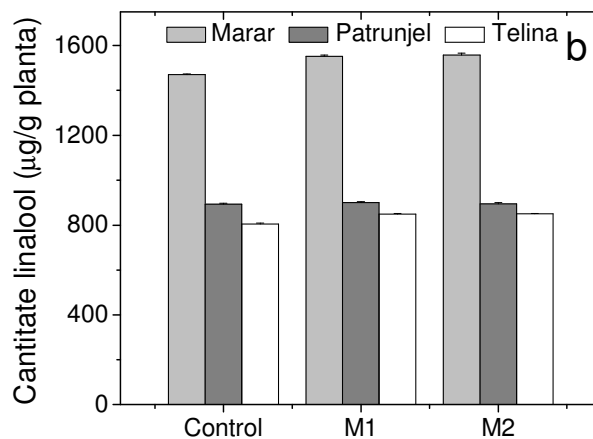


Fig. 9. Continutul de miristicin (a) si linalool (b) ($\mu\text{g/g FW}$) in plantele aromate studiate iradiate cu microunde de frecventa GSM (M1) si WLAN (M2)

3.1.4. Analize ultrastructurale si morfologice aplicate unui nou lot de plante studiate si compararea rezultatelor obtinute

Rezultatele obtinute in cadrul ultimei etape au fost in buna concordanta cu cele prezentate in raportul stiintific anterior. Analizele ultrastructurale si morfologice au sugerat ca iradierea cu microunde de frecventa WLAN conduce la stresarea mai puternica a plantelor, fata de microundele cu frecventa GSM., dar efectul WLAN asupra uleiurilor volatile a fost unul inhibitor. Astfel, a fost un compromis intre caracteristicile anatomice si cele chimice, *Apium graveolens*, cea mai responsiva specie din punct de vedere anatomic, fiind cea mai putin responsiva din punct de vedere al uleiurilor volatile. Datele obtinute pe baza analizei ultrastructurale sunt prezentate in tabelul 1.

Tabel 1. Analiza ultrastructurala a frunzelor plantelor studiate.

Conditii de crestere	Grosimea peretelui celular (μm)	Lungimea cloroplastei (μm)	Area cloroplastei (μm^2)	Lungimea mitocondriei (μm)	Raportul dintre area grauntelui de amidon si aria cloroplastei (%)
<i>Petroselinum crispum</i>					
Control	0.300 \pm 0.07	6.78 \pm 0.12	13.31 \pm 0.22	1.00 \pm 0.27	8.93 \pm 0.13
GSM	0.250 \pm 0.06	6.76 \pm 0.28	8.491 \pm 0.06	0.90 \pm 0.13	9.99 \pm 0.12
WLAN	0.200 \pm 0.05	6.50 \pm 0.16	7.807 \pm 0.11	0.70 \pm 0.05	6.01 \pm 0.08
<i>Anethum graveolens</i>					
Control	0.187 \pm 0.01	5.90 \pm 0.13	8.43 \pm 0.23	1.68 \pm 0.13	5.21 \pm 0.13
GSM	0.175 \pm 0.01	5.20 \pm 0.17	8.08 \pm 0.29	1.00 \pm 0.25	8.13 \pm 0.08
WLAN	0.175 \pm 0.01	4.85 \pm 0.31	7.04 \pm 0.22	0.80 \pm 0.10	0
<i>Apium graveolens</i>					
Control	0.160 \pm 0.01	5.80 \pm 0.20	7.68 \pm 0.14	1.57 \pm 0.08	5.34 \pm 0.28
GSM	0.156 \pm 0.01	4.33 \pm 0.26	7.06 \pm 0.35	0.55 \pm 0.13	0
WLAN	0.136 \pm 0.01	3.33 \pm 0.26	6.68 \pm 0.14	0.25 \pm 0.13	0

\pm SE pentru 6 masuratori succesive

4. Investigarea efectului microundelor asupra compusilor organici volatili (BVOC) capturati in urma respiratiei plantelor studiate; identificarea modificarilor chimice aparute in plantele stresate

4.1. Urmărirea modificarilor compozitiei in compusi organici volatili (BVOC) din plantele stresate in camp de microunde de diferite frecvente si puteri

4.2. Monitorizarea modificarilor aparute in BVOC din plantele iradiate in comparatie cu plantele de referinta

Analiza probelor de compusi organici volatili (VOC), captați din respirația plantelor, s-a realizat utilizand un sistem de schimb de gaze portabil GFS-3000 (Waltz GmbH, Effeltrich, Germania). Sistemul are o cuva (camera) cu mediu controlat avand o fereastră cu aria de 8 cm², prin care mai multe frunze au fost prinse in cuva astfel incat sa umple intreaga fereastră a acesteia. Un volum de aer de 4 L care iese din cuva a fost captat intr-un cartus din otel inoxidabil multistrat (8,88 × 0,65 cm, Supelco, Bellefonte, PA, USA) umplut cu adsorbanti Carbopack (C 20/40 mesh, C 40/60 mesh, si X 20/40 mesh). Aerul camerei a fost prelevat la un debit de 200 mL/min timp de 20 min utilizand o pompa 1003-SKC (SKC Inc., Houston, TX, USA) cu debit constant la temperatura camerei. Probe de aer de fond au fost luate inainte si dupa masuratori folosind acelasi sistem, fara frunze inchise in cuva.

In scopul analizei compusilor organici volatili a fost utilizat un cartus de desorbție automat Shimadzu TD20 (Kyoto, Japonia) si un sistem GC-MS alcatuit dintr-un cromatograf de gaze Shimadzu QP2010 Plus cuplat cu spectrometru de masa cuadrupolar (Kyoto, Japonia).

Pentru analiza compusilor organici volatili emisi temperatura inițiala a cuptorului s-a stabilit la 40°C, unde s-a menținut 1 min, iar incalzirea a avut loc in doua trepte: mai intai cu 5°C/min pana la 200°C, unde s-a menținut 1 min, iar apoi cu 10°C/min pana la 220°C, unde s-a menținut 5 min. Ca gaz purtator s-a utilizat heliu (puritate 99,9999 %, Elmer Messer Gaas AS, Tallinn, Estonia), avand debitul constant 1 mL/min. Temperatura de injectare a fost 215°C, iar volumul injectat 1 μL. Spectrometrul de masa opereaza prin ionizare prin impact electronic (EI) la 70 eV, in domeniul de masa m/z 30 – 400, temperatura liniei de transfer a fost de 240°C, iar temperatura sursei de ioni de 150°C.

Uleiurile volatile si compusii organici volatili emisi de plante s-au determinat prin compararea spectrelor de masa ale compusilor individuali cu spectrele de masa ale unor compusi standard de puritate inalta (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) si folosind o librarie de spectre.

Cantitațiile de compusi organici volatili eliberați de plantele control si plantele iradiate cu microunde (patrunjel, marar si țelina), se exprima ca Φ (nmol/m² s) si anume numarul de nmoli de substanța volatilă emisa pe o suprafața de 1 m² de planta in interval de 1 secunda (s).

Datele experimentale obținute reflecta faptul ca emisiile observate reprezinta un amestec de emisii de stocare constand din compusii prezenți in uleiurile esențiale si emisii "de novo". Amestecul de substanțe volatile este foarte complex, si in cazul tuturor celor trei specii de plante, plantele nestresate emit de asemenea monoterpene si substanțe benzenoide prezente in uleiurile esențiale, iar in anumite cazuri chiar compusi care in mod obisnuit nu se regasesc in compoziția uleiurilor esențiale (Figura 10). Numarul de compusi detectați in emisii a fost mai mare decat in uleiurile esențiale, observandu-se compusi volatili "de novo" emisi in condiții de stres (Figura 10). In emisiile de *Petroselinum crispum* s-au detectat 16 compusi, in *Anethum graveolens* 16 compusi si 20 compusi in *Apium graveolens*.

In urma tratamentului cu microunde de tip GSM s-a observat o crestere a emisiei de monoterpene (Figura 10), in cazul *Petroselinum crispum* si *Anethum graveolens* iradiate. In aceste specii, emisiile au fost mai pronuntate in urma tratamentului cu microunde WLAN, care s-au dovedit a avea un efect inhibitor asupra continutului acestor terpenoide, de exemplu α -pinen si β -felandren (Figura 10).

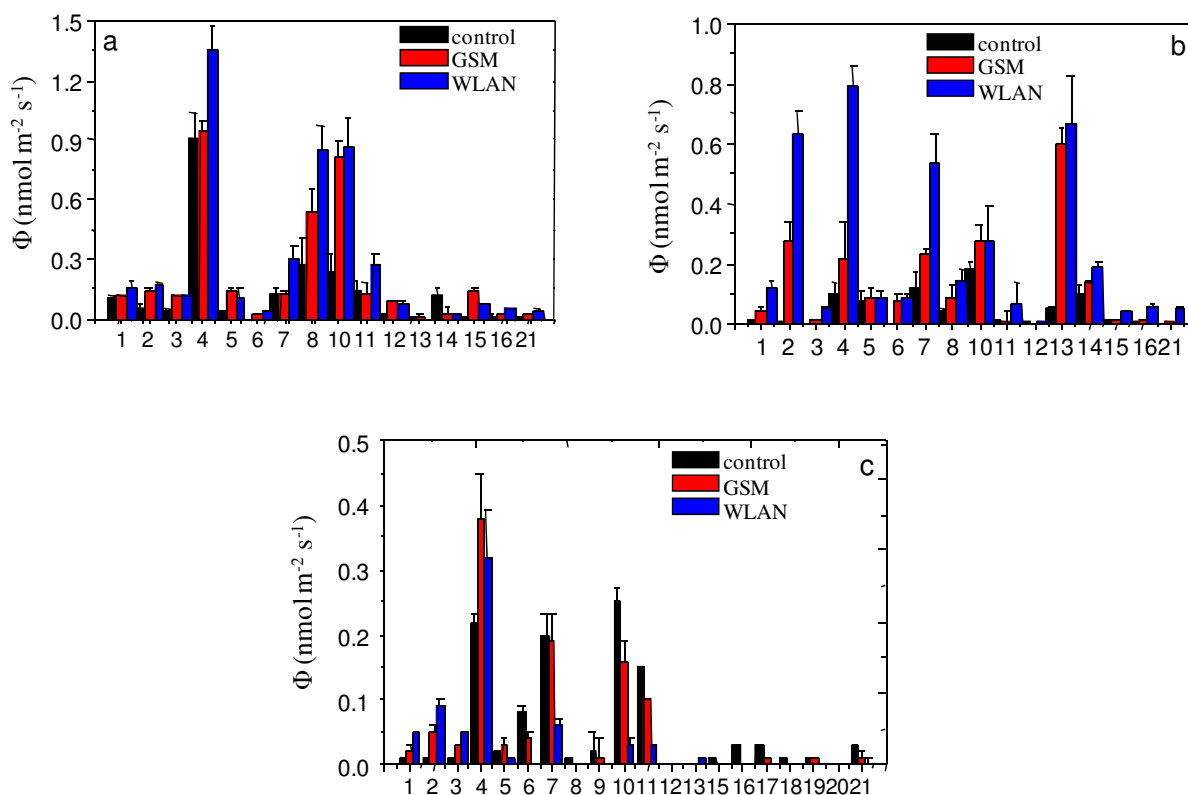


Figura 10. Modificarea emisiilor de compusi organici volatili ($\text{nmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) din frunzele de *Petroselinum crispum* (a), *Anethum graveolens* subsp. hortorum (b) și *Apium graveolens* (c) ca răspuns la iradierea cu microunde în banda wireless router (WLAN) și telefonie mobilă (GSM). Fiecare număr corespunde unui compus organic volatil specific: **1.** 1-hexanol; **2.** (Z)-3-hexen-1-ol; **3.** (E)-2-hexenal; **4.** α -pinen; **5.** camfen; **6.** β -mircen; **7.** β -pinen; **8.** α -felandren; **9.** Δ -3-carena; **10.** D-limonen; **11.** para-cimen; **12.** β -felandren; **13.** (E)- β -ocimen; **14.** 1,8-cineol; **15.** acetat de izobornil; **16.** longiciclina; **17.** oxid de cariofilena; **18.** α -selinen; **19.** (Z)- β -farnesen; **20.** α -cariofilena; **21.** geranilacetona.

Dintre emisiile “de novo”, compuşii volatili din frunzele verzi (“green leaf volatiles”, GLV), numiţi și volatile ale lipoxigenazei (LOX volatiles), sunt eliberaţi de către plante ca răspuns la diferite tipuri de stres. Aceşti compuşii sunt formaţi în urma metabolismului oxilipin prin degradarea acizilor graşi liberi oxidecanoici cu formare de hidroxiperoxizi, proces catalizat de liaze, și de obicei constau dintr-un amestec de aldehide și cetone C6.

În cazul studiului nostru, toate plantele iradiate cu microunde au emis compuşii volatili (E)-2-hexenal, (Z)-3-hexenol, 1-hexanol, în timp ce în cazul plantelor control, emisiile GLV au avut nivele foarte scăzute, la limitele de detecție ale dispozitivului utilizat (Figura 10).

În general, în toate speciile de plante studiate, emisiile GLV au fost mai semnificative în cazul iradierii cu microunde de frecvență WLAN comparativ cu microundele de frecvență GSM (Figura 1, $P < 0,001$ în toate cazurile).

Aceste rezultate sugerează o stare de stres mai pronunțată în cazul iradierii cu microunde WLAN, rezultate care sunt în acord cu modificările mai semnificative în anatomia frunzelor induse de microundele de frecvență WLAN.

Emisii semnificative de compusi volatili provenind de la plante in condiții severe de stres au fost observate in cazul unor studii efectuate anterior datorita unor factori de stres precum: apa [5], ozon [6], atacul ierbivorelor si temperatura.

Emisiile de compusi organici volatili din *Petroselinum crispum* si *Anethum graveolens* au fost dominate de 1-hexanol (Figura 10), in timp ce in *Apium graveolens* componentul majoritar eliberat a fost (Z)-3-hexenol, un component important al uleiului esential din aceasta specie de planta (Figura 10). Cantitatea totala de compusi volatili emisi de catre plantele de patrunjel (*Petroselinum crispum*) si marar (*Anethum graveolens*) iradiate a fost de 5 ori mai mare decat in plantele de telina (*Apium graveolens*).

Monoterpenele detectate in emisii au fost α -pinen, β -pinen, camfen, limonen, 3-carena, para-cimen, β -felandren, (E)- β -ocimen, eucaliptol si acetat de bornil. In *Petroselinum crispum*, emisiile de α -pinen, β -pinen si β -felandren au fost dominante si au crescut ca urmare a iradierii cu microunde, in special in cazul iradierii cu microunde de frecventa WLAN (Figura 10a).

Efectele tratamentului cu microunde asupra emisiilor de monoterpene au fost similare in cazul plantelor de *Apium graveolens* si *Anethum graveolens*, dar componentii principali sunt diferiti (Figura 10b si Figura 10c). Emisiile de monoterpene din *Anethum graveolens* au fost dominate de α -pinen, α -felandren si limonen, iar aceste emisii au crescut in urma iradierii cu microunde (Figura 10b).

In *Apium graveolens*, emisiile au fost aproape de 4 ori mai scazute decat in celelalte doua specii de plante si au fost dominate de α -pinen, β -pinen si limonen (Figura 10c). Emisiile de terpene, in mod similar continutului de uleiuri volatile, au fost inhibitate in urma actiunii microundelor (Figura 10).

In general, aceste monoterpene emise sunt compusi caracteristici eliberati de plante si nu sunt specifici emisiilor induse in cazul starilor de stres. Totusi, gradul de eliberare al acestor monoterpene tipice este adesea marit in conditii de stres, sugerand faptul ca emisiile de constituire (datorate compusilor de stocare, depozitați) si cele cauzate de stres sunt adesea dificil de separat.

Dintre monoterpenele emise de plante, induse de starea de stres, s-a observat ca emisiile de (E)- β -ocimen si 1,8-cineol au fost puternic marite ca urmare a iradierii cu microunde in plantele de *Anethum graveolens* (Figura 10). In plus, atat *Petroselinum crispum*, cat si *Anethum graveolens*, au emis in cantitati mici longiciclena (o sesquiterpena emisa de plante in conditii induse de stres), sub influenta radiatiilor de frecventa WLAN.

4.3. Concluzii privind modificarile chimice si structurale aparute in plantele iradiate

Proiectul a avut ca obiectiv principal determinarea efectului microundelor in banda de frecvența GSM (telefonie mobila) si respectiv, WLAN (wireless), asupra uleiurilor volatile, vitaminei C si metabolitilor secundari din compoziția a trei plante condimentare aparținand familiei Apiaceae: *Petroselinum crispum* (patrunjel), *Anethum graveolens* (marar) si *Apium graveolens* (țelina).

In urma studiilor efectuate s-au constatat urmatoarele:

- In funcție de solventul si tehnica de extractie utilizata se extrag diferite clase de compusi bioactivi, in diferite cantitați;
- Cea mai eficienta metoda pentru extracția uleiurilor volatile din patrunjel, marar si țelina s-a determinat a fi ultrasonarea cu sistemul de solvenți n-hexan – dietil eter (1:1, v/v);
- Extracția eficienta a acidului L-ascorbic s-a realizat prin ultrasonare cu soluție apoasa de acid acetic 8%;

Aceste condiții experimentale s-au utilizat ulterior pentru analiza plantelor iradiate si neiradiate cu microunde.

- S-a stabilit ca modificarea condițiilor de creștere a plantelor prin introducerea acestora in camp de microunde cu diferite intensități (GSM si wireless) a influențat atat dezvoltarea plantelor, cat si conținutul de compusi biologic activi investigați.
- Pe baza analizelor HPLC, s-a constatat ca cea mai mare creștere a cantității de L-acid ascorbic, s-a inregistrat in cazul țelinei iradiate cu microunde de tip GSM (211%), iar cea mai mica creștere a cantității aceluiași compus s-a inregistrat in cazul patrunjelului iradiat cu microunde de tip WLAN (6,8%).
- Analiza uleiurilor volatile, efectuata prin GC-MS, a evidențiat ca, conținutul acestora a crescut in plantele iradiate cu microunde de frecvența GSM, in timp ce efectul microundelor cu frecvența WLAN a fost variabil, in funcție de planta analizata. Cele mai puternice efecte ale microundelor s-au observat in cazul uleiurilor volatile din marar.
- Cantitatea totala de compusi organici volatili (capturați din respirația plantelor) eliberați de catre patrunjel si marar ca urmare a acțiunii microundelor, a fost considerabil mai mare decat in telina, deoarece asa cum s-a observat si in cazul uleiurilor volatile din aceasta planta, țelina a fost mai puțin sensibila la actiunea microundelor decat patrunjelul si mararul.
- Toate cele trei specii de plante iradiate cu microunde au eliberat compusii volatili (E)-2-hexenal, (Z)-3-hexenol, 1-hexanol in cantitati ridicate, in timp ce in cazul plantelor control emisiile de compusi organici volatili au avut nivele foarte scazute. S-a constatat ca in plantele de marar emisiile de (E)- β -ocimen si 1,8-cineol au fost puternic marite ca urmare a iradierii cu microunde; atat plantele de patrunjel, cat si cele de marar, au emis sub influenta radiatiilor de frecvența WLAN cantitati mici de longiciclena (o sesquiterpena emisa de plante in conditii de stres).
- Analiza ultrastructurala (TEM) a frunzelor recoltate de la plantele loturilor experimentale a avut in vedere investigarea componentelor principale ale limbului foliar (epidermul superior, parenchimul palisadic, țesutul mezofilic, țesutul lacunar, epidermul inferior), iar dintre componentele celulare in principal organitele fotosintetizante (cloroplastele), organitele furnizoare de energie (mitocondriile) si coordonatorul metabolismului celular (nucleul). Comparand efectele acțiunii celor doua tipuri de microunde asupra ultrastructurii celulelor frunzelor plantelor luate in studiu, s-a concluzionat ca microundele WLAN induc modificari negative semnificativ mai mari decat cele constatate in cazul aplicarii microundelor GSM. Țelina s-a dovedit a fi cea mai rezistenta specie din punct de vedere anatomic la acțiunea microundelor, pe cand mararul a fost cea mai afectata specie din acest punct de vedere.