

UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ CLUJ-NAPOCA
ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE AGRICOLE INGINEREȘTI

CLUJ-NAPOCA, 2018

TEZĂ DE DOCTORAT

Monitorizarea trasabilității unor compuși bioactivi de interes pe stadii de dezvoltare morfologică a fructelor de soc și evaluarea unui preparat fitoterapic cu efect nefroprotector

Doctorand **Georgiana Smaranda Petruț**

Conducător de doctorat **Prof. univ. dr. Sevastița Muste**



PhD THESIS

Monitoring the traceability of bioactive compounds of interest on stages of morphological development of the elderberry and the evaluation of a phytotherapeutic product with a nephroprotective effect

PhD student **Georgiana Smaranda Petruț**

Scientific coordinator **Prof. univ. dr. Sevastița Muste**



LISTA DE PUBLICAȚII

Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. PETRUȚ GEORGIANA SMARANDA, SEVASTIȚA MUSTE, CRINA MUREȘAN, ADRIANA PĂUCEAN, ANDRUȚA MUREȘAN, MELINDA NAGY, 2017, Chemical profiles and antioxidant activity of black elder (*Sambucus Nigra L.*) - A Review, *Bulletin UASVM Food Science and Technology*, vol 74, nr 1, ISSN-L 2344-2344
2. PETRUȚ GEORGIANA SMARANDA, SEVASTIȚA MUSTE, CRINA MUREȘAN, ANDRUȚA ELENA MUREȘAN, ROMINA VLAIC, SIMONA CHIȘ, ALINA STURZA, ANAMARIA POP, 2017, Flavour compounds of (*Lavandula Angustifolia L.*) to use in food preservation, *Hop and Medicinal Plants, Cluj Napoca, Romania*, vol 25, nr. 1-2, ISSN 2360-0179 print, ISSN 2360-0187 electronic.
3. PETRUȚ GEORGIANA SMARANDA, SEVASTIȚA MUSTE, 2015, Târgu Lăpuș Region Mineral Waters Characterization, *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca: Food Science and Technology*, vol. 72, nr. 2, pag. 299-300.
4. POP ANAMARIA, GEORGIANA S. PETRUT*, SEVASTIȚA MUSTE, ADRIANA PĂUCEAN, LIANA C. SALANTĂ, ANCA FĂRCĂȘ, SIMONA MAN, 2017, Herbs and spices as important source of antioxidant and phenolic content in black radish dressing, *Hop and Medicinal Plants, Year XXV, Nr. 1-2, ISSN 2360-0179 print, ISSN 2360-0187 electronic*, pag.87-93.
5. POP ANAMARIA, GEORGIANA S. PETRUT*, SEVASTIȚA MUSTE, ADRIANA PĂUCEAN, CRINA MUREȘAN, LIANA C. SALANTĂ, SIMONA MAN, 2016, Addition of plant materials rich in phenolic compounds in wheat bread in terms of functional food aspects, *Hop and Medicinal Plants, Year XXIV, vol. 24, nr. 1-2, ISSN 2360 – 0179 print, ISSN 2360 – 0187 electronic*.
6. KOUASSI-KOFFI JEAN DIDIER, ALINA STURZA, ADRIANA PĂUCEAN, SIMONA MAN, ELENA ANDRUȚA MUREȘAN, GEORGIANA S. PETRUȚ, V. MUREȘAN*, SEVASTIȚA MUSTE, 2018, Effect of Glucose Oxidase Addition on the Textural Characteristics of Wheat-Maize Dough and Bread, *Food Science and Technology, Print version ISSN 0101-2061, On-line version ISSN 1678-457X, Accepted, In press (Factor de impact = 1.084)*
7. MUREȘAN ANDRUȚA ELENA, ROMINA ALINA VLAIC, V. MUREȘAN*, GEORGIANA S. PETRUT, SIMONA CHIȘ, SEVASTIȚA MUSTE, 2017, Development and characterization of a biologically active white sauce based on horseradish, onion, parsley and parsnip, *Hop and Medicinal Plants, Cluj-Napoca, Romania, Year XXV, Nr. 1-2, ISSN 2360-0179 print, ISSN 2360-0187 electronic*.
8. MUREȘAN ANDRUȚA ELENA, SEVASTIȚA MUSTE, GEORGIANA S. PETRUȚ, ROMINA A. VLAIC, SIMONA MAN, V. MUREȘAN, 2016, New uses of hawthorn fruits in tonic wines technology, *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca: Food Science and Technology*, vol. 73, nr. 2, 2016, pag. 117-122(6)

9. MELINDA NAGY, SONIA SOCACI, MARIA TOFANĂ, ELENA SUZANA BIRIS-DORHOI, D. ȚIBULCĂ, GEORGIANA S. PETRUȚ, CLAUDIA LIANA SALANȚĂ, 2017, Chemical composition and bioactive compounds of some wild edible mushrooms, *Bulletin UASVM Food Science and Technology*, vol 74, nr 1, ISSN-L 2344-2344.
10. CHIȘ MARIA-SIMONA, SEVASTIȚA MUSTE, ADRIANA PĂUCEAN, SIMONA MAN, ALINA STURZA, GEORGIANA S. PETRUȚ, ANDRUȚA MUREȘAN, 2017, A comprehensive review about antimicrobial effects of herb and oil oregano (*Origanum Vulgare Ssp. Hirtum*), *Hop and Medicinal Plants, Cluj-Napoca, Romania*, vol 25, nr. 1-2, ISSN 2360 – 0187 electronic
11. VLAIC ROMINA ALINA, CRINA MUREȘAN, SEVASTIȚA MUSTE, V. MUREȘAN, GEORGIANA S. PETRUȚ, ANDRUȚA ELENA MUREȘAN*, 2016, A comprehensive review about therapeutic qualities of essential oil lemon balm (*Melissa Officinalis L.*), *Hop and Medicinal Plants, Year XXIV*, vol. 24, nr. 1-2.
12. VLAIC ROMINA ALINA, SEVASTIȚA MUSTE, CRINA MUREȘAN, V. MUREȘAN, GEORGIANA S. PETRUT, ANDRUȚA MUREȘAN, 2017, Technology for obtaining fresh goji fruits liqueur with almond milk, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, vol. 23, nr. 1, pag. 40-45.

Cerere de brevet de invenție

1. MUREȘAN CRINA, VLAIC ROMINA, SUHAROSCHI RAMONA, ROTAR ANCUTĂ, ȚIBULCĂ DORIN, V. MUREȘAN, GEORGIANA S. PETRUȚ, Preparate din carne fortificate cu tescovină și fructe de soc, CBI: A/01094 din data de 18.12.2017.

Participări la conferințe (selecție):

- i. PETRUȚ GEORGIANA SMARANDA, CRINA MUREȘAN, SEVASTIȚA MUSTE, ROMINA VLAIC, ANAMARIA POP, ANDRUȚA E. MUREȘAN, 2018, Quality and safety bioactive compounds from fruits of black elder, *9th CASEE Conference "Research Based Education at Life Science Universities In The Danube Region Towards Asustainable Future"*, 6-9 JUNE, University of Agronomic Sciences and Veterinary Medicine, București, Romania. (poster).
- ii. PETRUȚ GEORGIANA SMARANDA , ANAMARIA POP*, SEVASTIȚA MUSTE, CRINA MUREȘAN, ADRIANA PĂUCEAN, SIMONA MAN, ROMINA VLAIC, 2017, Chemical Composition And Bioactive Compounds Of Sweet Potatoes Products, *The 16th International Symposium "Prospects For The 3rd Millennium Agriculture"*, 28th – 30th September Cluj-Napoca, Romania, USAMVCN. (poster)
- iii. PETRUȚ GEORGIANA SMARANDA, ANAMARIA POP, SEVASTIȚA MUSTE, CRINA MUREȘAN, ADRIANA PĂUCEAN, ANDRUȚA E. MUREȘAN, ROMINA VLAIC, 2017, Development of functional ginger preserve, *The 16th International Symposium "Prospects for the 3rd Millennium Agriculture"*, 28th – 30th September Cluj-Napoca, Romania, USAMVCN. (poster)
- iv. PETRUȚ GEORGIANA SMARANDA, SEVASTITA MUSTE, CRINA MUREȘAN, MELINDA NAGY, ALINA STURZA, 2016, (HACCP) System in a still water bottling station (unit), *7th CASEE Conference „The Role of Life Sciences in Europe's 2020 Strategy”* 22th – 24th Mai, 2016, Timsoara. (poster)

CUPRINS

INTRODUCERE.....	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	17
1. ÎNCADRAREA SISTEMATICĂ A GENULUI <i>SAMBUCUS L.</i>	19
1.1 Taxonomie și habitat.....	19
1.2 Considerații generale privind producția de soc	19
1.3 Descrierea speciilor luate în studiu din genul <i>Sambucus L.</i>	21
1.3.1 <i>Sambucus nigra L.</i>	21
1.3.2 <i>Sambucus nigra Haschberg</i>	21
2. SOCUL-INGREDIENT FUNCȚIONAL ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ ȘI FARMACEUTICĂ	22
2.1 Caracterizarea chimică și valoarea nutrițională a socalui	22
2.2.1 Potențialul antioxidant.....	23
2.1.2 Compuși biologic activi comparativ cu compuși nocivi din soc	28
2.1.3 Trasabilitatea compușilor bioactivi din florile și fructele de soc pe durata dezvoltării morfologice și în timpul păstrării.....	30
2.2 Aplicațiile socalui în medicină.....	32
2.2.1 Biodisponibilitatea principiilor active	37
3. IMPLICAREA COMPUȘILOR CONTINUȚI ÎN FLORILE DE SOC ÎN TRATAMENTUL INSUFICIENȚEI RENALE.....	39
3.1 Insuficiența renală –preambul	39
3.2 Candidați în terapia patologiei renale: flavonoidele.....	40
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4. IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVE GENERALE.....	47
4.1 Taxoni pentru studiu.....	48
4.2 Model experimental.....	48
5. MATERIAL ȘI METODĂ	51
5.1 Metode experimentale utilizate în determinarea claselor de compuși biochimici din diferite genotipuri de soc	51
5.1.1 Indici fizico-chimici.....	51
5.1.1 Determinarea umidității	51
5.1.1.2 Determinarea și cuantificarea substanțelor minerale totale	51
5.1.1.3 Cuantificarea mineralelor prin spectroscopie de absorbție atomică.....	51
5.1.2 Indici ai proprietăților antioxidante	53
5.1.2.1 Protocol de obținere a extractelor metanolice	53
5.1.2.2 Determinarea conținutului total de polifenoli	54
5.1.2.3 Determinarea și cuantificarea conținutului total de flavonoide.....	54
5.1.2.4 Determinarea capacitatei antioxidantă	55
5.1.2.5 Determinarea pigmentelor clorofilieni	55
5.1.2.6 Determinarea vitaminei C	55
5.1.3 Evidențierea trasabilității unor compuși de interes prin tehnici cromatografice	56
5.1.3.1 Determinarea acizilor organici	56
5.1.3.2 Determinarea zaharurilor	56
5.1.3.3 Determinarea compușilor de aromă	57
5.1.3.4 Determinarea spectrelor FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectrometer) pentru probele de soc analizate	58
5.2 Metode experimentale utilizate în evaluarea unui compus fitoterapic cu efect nefroprotector și antioxidant.....	58

5.2.1 Protocol de obținere a compusului fitoterapeutic în vederea administrației "in vivo"	58
5.2.1.1 Colectarea și prelucrarea inflorescențelor de soc	58
5.2.1.2 Determinarea cantitativă a compușilor fenolici din florile de soc	59
5.2.1.3 Model experimental privind obținerea compusului fitoterapeutic din flori de soc (<i>Sambucus nigra L.</i>)	59
5.2.2 Testarea eficienței principiilor active din extractul de flori de soc în insuficiența renală indușă experimental pe model animal	62
5.2.2.1 Modele animale	62
5.2.2.2 Etica experimentelor și recoltarea probelor biologice	62
5.2.2.3 Determinări biochimice	63
5.2.3.1 Determinarea concentrațiilor plasmatice de creatinină și uree	63
5.2.3.2 Determinarea concentrației indiceului NAG urinar	63
5.2.3.3 Evaluarea stresului oxidativ	64
5.2.3.4 Examen histopatologic	66
6. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	67
6.1 Evaluarea trasabilității claselor de compuși biochimici pe parcursul dezvoltării florilor și fructelor plantei, la diferite genotipuri de soc	67
6.1.1 Evaluarea indicilor fizico-chimici	67
6.1.1.1 Variația umidității diferitelor genotipuri de soc pe parcursul dezvoltării fructelor	67
6.1.1.2 Identificarea și cuantificarea substanțelor minerale la diferitele genotipuri de soc pe parcursul dezvoltării fructelor	68
6.2.1. Evaluarea indicilor proprietăților antioxidantane	71
6.2.1.1 Variația conținutului de polifenoli totali	71
6.2.1.2 Variația conținutului de flavonoide totale	72
6.2.1.3 Variația capacitatei antioxidantane	74
6.2.1.4 Identificarea și cuantificarea pigmentilor clorofilieni	74
6.2.1.5 Identificarea și cuantificarea vitaminei C	75
6.3.1 Evaluarea trasabilității unor compuși de interes prin tehnici cromatografice	76
6.3.1.1 Identificarea și cuantificarea acizilor organici	76
6.3.1.2 Identificarea și cuantificarea zaharurilor	78
6.3.1.3 Identificarea și cuantificarea flavonoidelor	80
6.3.1.4 Identificarea și cuantificarea compușilor de aromă	86
6.4.1 Amprenta IR a extractelor metanolice	93
6.5.1 Analiza biostatistică de tip Principal Component Analysis	98
6.6.1 Discuții privind corelațiile unor compuși biochimici relevanți pentru matricea vegetală studiată	101
6.6.1.1 Variația conținutului de zaharuri din probele de soc dependente de clorofila totală	101
6.6.1.2 Variația conținutului de zaharuri în funcție de cyanidin-3-glucoside și rutin din probele de soc	102
6.6.1.3 Variația conținutului de fier din probele de soc dependente de flavonoidele totale	103
6.6.1.4 Variația conținutului de vitamina C în funcție de flavonoidele totale din probele de soc	104
6.2 Evaluarea eficienței testării unui compus fitoterapeutic în insuficiența renală indușă experimental pe model animal	105
6.2.1 Evaluarea cantitativă a compușilor fenolici din inflorescențele de <i>S. nigra L.</i>	105
6.2.2 Evaluarea indicilor biochimici urmăriți la şobolani	107
6.2.2.1 Determinarea concentrațiilor de creatinină și uree la animalele cu IR indușă experimental și tratate cu extract fitoterapeutic din flori de soc	107
6.2.2.2 Modificări biochimice întâlnite în concentrația indiceului NAG urinar la animalele cu IR indușă experimental și tratate cu extract fitoterapeutic din flori de soc;	108

6.2.3 Evaluarea stresului oxidativ în urma administrării compusului fitoterapeutic la animalele cu IR indusă experimental și tratate cu extract fitoterapeutic din flori de soc;	109
6.2.4 Rezultatele examenului histopatologic al ţesutului renal și a markerilor de suferință renală	115
7. CONCLUZII GENERALE.....	117
7.1 Originalitatea și elementele inovative ale tezei.....	121
BIBLIOGRAFIE.....	123

CONTENT

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE.....	18
1. SYSTEMATIC CLASSIFICATION OF <i>SAMBUCUS L.</i> GENUS.....	19
1.1 Taxonomy and habitat.....	19
1.2 general considerations on common elder production.....	19
1.3 Description of species studied in the genus <i>Sambucus l.</i>.....	21
1.3.1 <i>Sambucus nigra L.</i>.....	21
1.3.2 <i>Sambucus nigra Haschberg.</i>.....	21
2. COMMON ELDER - FUNCTIONAL INGREDIENT IN THE FOOD AND PHARMACEUTICAL INDUSTRY	22
2.1 Chemical characterization and nutritional evaluation of elderberry	22
2.2.1. Antioxidant potential.....	23
2.1.2 Biologically active compounds compared to noxious compounds in elder	28
2.1.3 Traceability of bioactive compounds from elderflowers and elderberry during morphological development and during storage	30
2.2 Applications of elder in medicine	32
2.2.1 Bioavailability of active principles.....	37
3. INVOLVEMENT OF THE COMPOUNDS CONTAINED IN THE ELDERFLOWERS IN THE TREATMENT OF RENAL INSUFFICIENCY.....	39
3.1 Renal impairment - preamble.....	39
3.2 Candidates for renal pathology: flavonoids.....	40
4. HYPOTHESES AND GENERAL OBJECTIVES	47
4.1 Study taxons.....	48
4.2 Experimental model	48
5. MATERIAL AND METHOD	51
5.1 Experimental methods used in the determination of classes of biochemical compounds from different elder genotypes.....	51
5.1.1 Physico-chemical evaluation.....	51
5.1.1.1 Moisture determination.....	51
5.1.1.2 Determination and quantification of total mineral substances	51
5.1.1.3 Determination of mineral content by atomic absorption spectroscopy	51
5.1.2 Indications of antioxidant properties.....	53
5.1.2.1 Protocol of obtaining methanolic extracts.....	53
5.1.2.2 Determination of total polyphenols.....	54
5.1.2.3 Determination and quantification of total flavonoid content.....	54
5.1.2.4 Determination of radical scavenging capacity	55
5.1.2.5 Determination of chlorophyll pigments.....	55
5.1.2.6 Determination of vitamin C	55
5.1.3 Highlighting traceability of compounds of interest through chromatographic techniques	56
5.1.3.1 Determination of organic acids	56
5.1.3.2 Determination of sugars	56
5.1.3.3 Determination of volatile compounds	57
5.1.3.4 Fourier Transform Infrared Spectrometer of elderberry samples	58
5.2 Experimental methods used to evaluate a phytotherapeutic compound with a nephroprotective and antioxidant effect.....	58
5.2.1 Protocol for obtaining the phytotherapeutic compound for "in vivo" administration	58
5.2.1.1 Collection and processing of elder inflorescences	58
5.2.1.2 Quantitative determination	59
5.2.1.3 Experimental model for obtaining the phyto-therapeutic compound from elderflowers (<i>Sambucus nigra L.</i>)	59

5.2.2 Testing the effectiveness of active principles in elderflower extract in renal insufficiency experimentally induced on animal model	62
5.2.2.1 Animal models.....	62
5.2.2.2 Ethics of experiments and sampling of biological samples	62
5.2.3 Biochemical Analysis.....	63
5.2.3.1 Determination of plasma creatinine and urea concentrations	63
5.2.3.2 Determination of Urinary NAG index concentration.....	63
5.2.3.3 Evaluation of oxidative stress	64
5.2.3.4 Histopathological evaluation:	66
6. RESULTS AND DISCUSSIONS.....	67
6.1 Highlighting traceability of biochemical compounds during plant growth at different genotypes elder.....	67
6.1.1 Evaluation of physico-chemical indices	67
6.1.1.1 Variation of humidity of different genotypes of elder during fruit development	67
6.1.1.2 Identification and quantification of mineral substances of different genotypes of elder during fruit development	68
6.2.1 Evaluation of antioxidant properties indices.....	71
6.2.1.1 Variation in total polyphenol content.....	71
6.2.1.2 Variation in total flavonoids content	72
6.2.1.3 Variation of antioxidant activity	74
6.2.1.4 Identification and quantification of chlorophyll pigments.....	74
6.2.1.5 Identification and quantification of vitamin C	75
6.3.1. Evaluation of the traceability of some compounds of interest by chromatographic techniques.....	76
6.3.1.1 Identification and quantification of organic acids.....	76
6.3.1.2. Identification and quantification of sugars	78
6.3.1.3 Identification and quantification of flavonoids	80
6.3.1.4 Identification and quantification of volatile compounds	86
6.4.1 IR spectra of methanolic extracts.....	93
6.5.1 Biostatistic analysis type of Principal Component Analysis	98
6.6.1 Discussions on correlations of relevant biochemical compounds for the studied plant matrix.....	101
6.6.1.1 Variation in the total sugar content of total chlorophyll elder samples.....	101
6.6.1.2 Variation of sugar content by cyanidine-3-glucoside and rutin from elder samples	102
6.6.1.3 Changes in iron content from total flavonoid-dependent elder samples	103
6.6.1.4 Variation in the vitamin C content of total flavonoid-dependent elder samples	104
6.6.2 Evaluation of the effectiveness of testing a phytotherapeutic compound in renal insufficiency experimentally induced in the animal model.....	105
6.6.2.1 Quantitative evaluation of phenolic compounds from S. Nigra L inflorescences	105
6.6.2.2 Evaluation of biochemical indices in rats	107
6.6.2.2.1 Determination of creatinine and urea plasma concentrations in experimentally induced RI animals treated with phytopathological extract from elderflowers;	107
6.6.2.2.2 Biochemical changes encountered in urinary NAG concentration in animals with experimentally induced RI and treated with phytopathological extract from elderflowers;	108
6.6.2.3 Evaluation of oxidative stress following phytotherapeutic compound administration in animals with experimentally induced RI and treated with phytopathological extract from elderflowers;	109
6.6.2.4 Results of histopathological examination of renal tissue and markers of renal impairment	115
7. OVERALL CONCLUSIONS.....	117
7.1 Original elements of the thesis	121
REFERENCES.....	123

INTRODUCERE

INTRODUCTION

Traiectul vegetativ, privit în plenitudinea lui fitosferă, amplifică ideea că aparentă simplitate a materialului organic, dispare atunci când ea oferă remedii veridice, care amintesc, mai apoi de mâna justă a proniei divine.

Studiu de față se axează pe un segment din tumultul biomasei vegetale, reprezentat de soc (*Sambucus L.*), regăsit încă de-a lungul preistoriei cu efecte terapeutice demonstrabile, în toate componentele lui morfologice (muguri, flori, fructe, polen, frunze, scoarță, rădăcini).

Frumusețea albului pe care o deține arbustul în luna mai-iunie, anticipatează proporțiile ridicate de compuși biologic activi din fructele mature, ce apar în septembrie-octombrie, iar conversia profilului biochimic al acestei deveniri începând de la mugurele floral și până la fructul copt, constituie unul din obiectivele prezentei teze.

În ultimii ani se acordă o importanță sporită extractelor de plante pentru care există speranță că la un dozaj corect se pot obține efecte benefice fără reacții adverse. Întrucât de la arbustul de soc se utilizează atât mugurele, inflorescențele, fructele, polenul sau semințele, rămâne întrebarea care dintre acestea poate fi sursa cea mai bună de compuși antioxidanti.

Socul este una dintre plantele la care s-a demonstrat capacitatea "the healing properties" datorată, în cea mai mare măsură, de prezența compușilor fenolici de unde reiese o activitate antioxidantă ridicată, cu eliminare de radicali liberi și contracararea stresului oxidativ (GOLLUCKE, 2013). Stresul oxidativ este implicat în majoritatea bolilor cronice la populația umană. Boala renală cronică are și ea printre mecanismele de producere stresul oxidativ. Corelarea aspectelor biochimice, de modifierilor naturali ai răspunsului biologic cu cele clinice, hematologice și histopatologice, din perspectiva potențialului bioactiv a socului, în tratamentul insuficienței renale constituie background-ul prezentei cercetări.

Biodisponibilitatea principiilor active din soc, se explică potrivit Asociației europene a producătorilor de plante medicinale, că florile și fructele de *Sambucus nigra L.* sunt regăsite în topul celor mai recoltate plante medicinale cu destinația producției de ceai și fitofarmaceutice, pentru export (European Association of Growers Herb (Europam), 2010).

Lucrarea de față este structurată în două părți, corespunzătoare studiului de literatură în domeniul abordat pe parcursul a trei capitole și cea de a doua parte, extinsă pe patru capitole redă forma de cercetări proprii, metode de lucru, rezultate și concluzii în cauză.

Este cunoscut faptul că atunci cand Viața îți scoate oameni deosebiți în cale,
întâmplările ei comportă o bucurie aparte.

Autoarea își exprimă gratitudinea față de conducătorul științific, D-na prof. univ. dr. Sevastița Muste, unde cuvântul Mulțumesc vine să confirme întreaga susținere intelectuală și morală acordată nesfârșit. Fiecare moment, fiecare clipă a ultimilor ani, poartă acest nume drag, care alături de un real profesionalism, conferă prin investirea în partea tainică a omului, valențe notorii peste timp.

Aleg să mulțumesc d-nei Conf. dr. Crina Mureșan, pentru tot sprijinul acordat în finalizarea lucrării de față, consemnând că întreaga activitate de implicare poartă un nume "o lecție de viață a bucuriei". Totodată îmi exprim recunoștiința față de d-na Șef. lucr. dr. Rodica Ungur, (UMF Cluj), care cu desăvârșită dăruire și înaltă ținută profesională a făcut posibilă partea experimentală a cercetării II. Studiul clinic a fost întregit și prin ajutorul D-l dr. Răzvan Codrea și d-nei dr. Orsolya Sarpataki (FMV) cărora țin să le mulțumesc. Le adresez mulțumiri și recunoștință pentru competența și bunătatea de care au dat dovedă D-lui Șef. lucr. dr. Vlad Mureșan, Asist. dr. Andruța Mureșan, Asist. dr. Romina Vlaic, Șef. lucr. dr. Anamaria Pop, care încă de la debutul studiului, s-au implicat nemijlocit. De asemenea doresc să mulțumesc d-nei Asist. dr. Carmen Pop și Conf. dr. Sonia Socaci pentru tot sprijinul dăruit în realizarea cercetărilor. D-nei prof. univ. dr. Carmen Socaci, d-nei ing. Floricuța Ranga, ing. Fetea Florinela (USAMVCN), Dr. Mișa Filip (UBB-Raluca Ripan Institute for Research in Chemistry), Dr. Dorina Simedru (Research Institute for Analytical Instrumentation, ICIA Cluj-Napoca Subsidiary), le mulțumesc în sprijinul acordat la realizarea unor experimente propuse.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAŞTERII

1. Încadrarea sistematică a genului *Sambucus L.*

1. Systematic classification of *Sambucus L. genus*

1.1 Taxonomie și habitat

1.1 Taxonomy and habitat

Cu apartenența la familia *Adoxaceae*, genul *Sambucus L.* deține, în funcție de sistemul taxonomic, între 5-30 specii și 6-11 subspecii (MLYNARCZYK, 2018). Privită ca cea mai importantă specie din lume și cea mai frecvent întâlnită, *Sambucus nigra L.* are în structura sa trei subspecii: *S. nigra L. ssp. nigra*, *S. nigra L. ssp. Cerulea* și *S. nigra L. ssp. Canadensis* (ultimele două originare din America de Nord). Habitatul acestui gen, ocupă mare parte din Europa (excepție făcând Scandinavia și Rusia), Africa de Nord. În estul Europei, distribuția arbustului se termină la aproximativ 55°E (MLYNARCZYK, 2018).

1.2 Considerații generale privind producția de soc

1.2 General considerations on common elder production

Din ansamblul vegetal al arbustului de soc în producție prezintă relevanță florile și fructele, dar totodată sunt semnalate și alte părți vegetale (muguri de flori, pendunculi ai fructelor sau frunzelor), cu capacitate în valorificări superioare, potrivit specificității lor (CHRISTENSEN, 2008; SILVA, 2016). Colectată exclusiv din flora spontană, producția de soc, debutând cu anii 1980, începe să fie înființată în cultura experimentală, în țări precum SUA, Chile, Noua Zeelandă și sporadic în Europa (FINN, 2008). Dintre soiurile de soc, frecvent întâlnite în Europa Centrală enumerăm "Alleso", "Korsor", "Haschberg", "Samyl", "Sampo", iar pentru SUA hibrizii *S. nigra ssp. nigra* și *ssp. canadensis*. O clasare a țărilor cultivate de soc, conform lui MLYNARCZYK (2018), plasează Germania pe primul loc (1.758 tone/582 ha în 2015) urmată de Danemarca, Republica Cehă și Polonia.

În ceea ce privește factorii tehnologici în cultura de soc, acești arbuști sunt plantați pe rânduri unice, distanța dintre arbust pe rând fiind de 1,5-2,5 m, iar densitatea maximă fiind de 1200 arbuști/ha (CHARLEBOIS, 2010). La un interval de 3-4 ani, noua cultură oferă maxima de producție survenită, cu valori de 23 kg/arbust, cantități dependente de anumiți factori, însă comparativ cu cantitatea fructelor de soc recoltate din flora spontană (1,3 kg/arbust), producția este mult mai eficientă (KOLLANYI, 2005). Cimele florilor de soc, indiferent de destinația depozitării acestora, sunt recoltate când pe întreg cuprinsul culturii, inflorescențele sunt deschise, iar

îndepărtarea de peduncul survine ca operație de condiționare ulterioară (BYERS, 2014).

Admitând cerințe semnificative, vis-a-vis de soc, ale consumatorilor și producătorilor, hibridizarea (intra- și inter-varietală), oferă acest fapt, prin schimbări majore în morfologia și fiziologia arbustului de soc, în sensul de noi genotipuri cu caracteristici specifice (genotipuri fără semințe, creșterea numărului și a dimensiunii bacelor, precum și un colorit mai diversificat, rezistența bacelor la cădere și maturitate uniformă, longevitatea compușilor de aromă din floare) (MIKULIC-PETKOVSEK, 2016). Figurile 1.1 și 1.2 relevă importanța în dinamică acordată genului *Sambucus*.

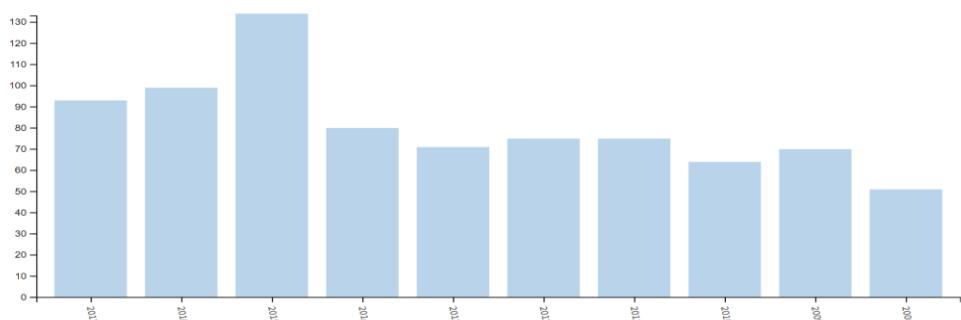


Fig. 1.1 Numărul de publicații/an unde apare "genul *Sambucus*", înregistrat de Web of Science, accesat în luna mai 2018

Fig.1.1 Number of publications / year where "*Sambucus* genus" appears, registered by Web of Science, accessed in May 2018



Fig.1.2 Top domenii publicații în care se regăsește "genul *Sambucus*" înregistrate de Web of Science, accesat în luna mai 2018

Fig.1.2 Top domains of publications that contain "*Sambucus* genus" registered by Web of Science, accessed in May 2018

1.3 Descrierea speciilor luate în studiu din genul *Sambucus L.*

1.3 Description of species studied in the genus *Sambucus L.*

1.3.1 *Sambucus nigra L.*

1.3.1 *Sambucus nigra L.*

Apartinând emisferei nordice *Sambucus nigra L.* este un arbust versatil prin excelență (reperul de creștere fiind luminișurile sau marginea pădurii, în special cele de foioase), prezent în regiunile temperate și subtropicale din Europa, Africa de Nord, Asia, și America de Nord. Valoarea sa comercială se datorează fructelor sale (*Sambuci fructus*), și florilor (*Sambuci flos*), ce prezintă o compoziție chimică valoroasă în compuși bioactivi (VEBERIC, 2009).

În ceea ce privește particularitățile biologice ale speciei *Sambucus nigra L.*, conform lui MUNTEAN (2007) reprezintă un: arbust tufos cu o creștere vegetativă de maxim 5-6 m înălțime; frunzele imparipenat compuse (maxim 7 foliole cu marginile serate); disponerea florile este în cime umbeliforme, cu corola albă, hermafrodite, de tip 5, gamopetală și alte 5 stamine având antere galbene, baza umbelei fiind constituită din 5 ramuri principale, care ulterior se ramifică bogat; fructele, ajunse la maturitate în august-septembrie, cu diametru de până la 6 mm, sunt bace cu 3 semințe negre și sferice (MUNTEAN, 2007).

Temperatura medie a lunii octombrie, reprezintă un factor determinant pentru germinația semințelor. O temperatură mai scăzută de 7,2°C duce la incapacitatea germinării semintelor de soc, temperatura medie optimă fiind în jurul valorii de 15°C. Preferențial siturile ocupate de *S. nigra L.* sunt soluri bogate în azot, fosfor și azot mineralizabil (ATKINSON, 2002).

1.3.2 *Sambucus nigra Haschberg*

1.3.2 *Sambucus nigra Haschberg*

Cultivarul "Haschberg" prezintă interes preponderent pentru fructele sale, pretabile industriei alimentare (în special sub formă de suc), datorită structurii chimice particulare față de alte cultivaruri, și anume concentrații ridicate de acizi organici analog cu concentrații scăzute de metaboliți secundari (VEBERIC, 2009).

Semnalat în cultură începând cu 1965, în Austria, din selecția speciilor de soc spontan, acest cultivar poate fi dirijat vegetativ fie cu aspect de arbust fie în copac (6-7 m înălțime). În ceea ce privește inflorescența, acesta este una plată (lățime 6-9 mm), bogată, cu flori hermafrodite de culoare gălbuiie, din care rezultă o cantitate mare de polen. "Haschberg" deține debutul de înflorire începutul lunii iunie iar sub aspectul polenizării e anemofil sau autogam. Bacele sunt dispuse compact pe inflorescență,

dimensiunea unei bace este de 6-7 mm, cu o culoare burgundă. Pulpa fructului este roșu închis, succulentă ce adăpostește trei semințe (MATĚJÍČEK, 2013). Maturitatea fructului începe în a doua jumătate a lunii septembrie iar fructul matur nu are tendință de desprindere decât foarte târziu, ceea ce reprezintă un avantaj. Concluzionând fructificarea cultivarului "Haschberg" este regulată, uniformă, echilibrată și relativ mare (MATĚJÍČEK, 2013; FEJER, 2015).

2. Sosul-ingredient funcțional în industria alimentară și farmaceutică

2. Common elder - functional ingredient in the food and pharmaceutical industry

2.1 Caracterizarea chimică și valoarea nutrițională a sosului

2.1 Chemical characterization and nutritional evaluation of elderberry

Gradul de maturitate, condițiile de mediu (altitudinea), genotipul sunt doar câteva considerente ce disting distribuția compușilor chimici și implicit maxima nutrițională a materiei biologice (MUSTE, 2010).

În ceea ce privește prezența carbohidrațiilor în fructele de *S. nigra* L., pe lângă un conținut de zaharuri totale de maxim 11,50% (104,16 g/kg SU) și 2,8-8,55% zahăr reducător, sunt prezente și fibrele dietetice (de importanță majoră pectina, protopectina, celuloza) (MLYNARCZYK, 2018). Glucoza (33,32-50,23 g/kg FW) și fructoza (33,90-52,25 g/kg FW), apar ca principale zaharuri (VEBERIC, 2009), fapt pentru care, din perspectiva unei nutriții sănătoase, nivelul ridicat de fructoză semnalat în fructele de soc, implică un indice glicemic mult mai scăzut comparativ cu alte zaharuri analizate (ATKINSON, 2008). Sub aspect proteic, fructele (2,7-2,8%), florile (2,5%) și frunzele de soc (3,2%), au un conținut valoros, ce cuprinde șaisprezece aminoacizi (preponderent acidul aspartic, glutamic, alaninic), din care opt sunt aminoacizi esențiali. Conținutul lipidic al sosului este localizat în semințele fructelor sale (22,4% ulei), pudra acestora având o cantitate mai scăzută de 15,9% ulei (DULF, 2013). Profilul major al acizilor grași este unul de acizi polinesaturați, cu concentrații reprezentative pentru acidul α-linolenic (40,6 g/100 g ulei), linoleic (34,3 g/100 g ulei) și acidul oleic (13,7 g/100 g ulei) (FAZIO, 2013). Conținutul de acizi organici, promotori ai gustului, în fructele de soc se regăsesc la *S.nigra* L, din floara spontană a Sloveniei, cu valori de 20,07 g/kg/, în timp ce cultivarul *Haschberg*, din cultură, are valori mai scăzute (6,38 g/kg) (PETRUȚ, 2017). Cantitativ, predominant s-

Monitorizarea trasabilității unor compuși bioactivi de interes pe stadii de dezvoltare morfologică a fructelor de soc și evaluarea unui preparat fitoterapeutic cu efect nefroprotector

a identificat acidul citric, din structura acizilor organici ai fructelor (3,07-4,81 g/kg FW) și florilor de soc, urmat de acidul malic (0,96-1,31 g/kg FW), acidul shikimic (0,18-0,93 g/kg FW) și acidul fumaric (0,11-0,29 g/kg FW). Nivelul ridicat al acestor acizi, face pretabile atât florile cât și fructele în tehnologia produselor acidulate și a suplimentelor dietetice (MLYNARCZYK, 2018).

Valoric substanțele minerele sunt prezente în florile și fructele arbustului de soc. Raportat la masa fructului de soc, s-a identificat un procent de 0,90-1,56% substanțe minerale, din care Mg (395-739 mg/kg FW), K (2952-5494 mg/kg FW), Fe (12,4-84,5 mg/kg FW), P (734-1337 mg/kg FW), Zn (1,9-11,2 mg/kg FW), Ca (574-1527 mg/kg FW), Na (13-145 mg/kg FW), Mn (3,6-9,4 mg/kg FW), Cu (1,7-2,8 mg/kg FW) (RUPASINGHE, 2007; MLYNARCZYK, 2018). În fructele de soc, s-a semnalat și prezența metalelor grele (0,016-0,097 mg/kg Pb și 0,038-0,053 Cd) (MLYNARCZYK, 2018). Nota distinctă a acestui arbust este îndeosebi asociată cu compușii de aromă dezvoltăți de flori, însumând 58 de compuși. Atât florile cât și fructele dețin ulei volatil (0,01% în fructe) (KAACK, 2008). *S. nigra* L. răspunde afirmativ la conținutul vitaminic, fiind prezente vitamine din grupa A, B, tocoferolii și vitamina C (SIDOR, 2014). În ceea ce privește cantitatea vitaminei C din fructele de *S. nigra* L., cantitățile determinate în literatură, sunt diferite, afirmație justificată de varietate și areal geografic. Valorile raportate de AKBULUT (2009) sunt între 6-25 mg/100 g conținut de acid ascorbic în fructele de soc, sau 13-35 mg/100 g și 28-34 mg/100 g valori întâlnite la varietățile de soc din arealul sălbatic. Totodată, BOROWSKA (2000), confirmă o concentrație a vitaminei C ridicată la soiul "Samyl" (32,75-44,41 mg/100g) și cantități minime la fructele din zona spontană. Pentru varietățile din arealul cultivat, situația prezentată de AKBULUT (2009), indică în "Mammut" cel mai ridicat conținut, comparativ cu genotipul "Haschberg". Cantități de α-Tocopherol (bioactivitatea vitaminei E cea mai însemnată), au fost consemnate de FAZIO (2013), în pudra de semințe de soc (0,49 µg/g de ulei) și γ-tocoferolul (2,63 µg/g), cu activitate antioxidantă semnificativă (AKBULUT, 2009).

2.2.1 Potențialul antioxidant

2.2.1 Antioxidant potential

Din întreg ansamblul vegetal reprezentat de arbustul de soc, clasarea unităților vegetale dependent de capacitatea antioxidantă denotă în prim plan florile de soc, în detrimentul fructelor sau a frunzelor. Inhibarea radicalului DPPH, la probele de flori în solvent alcoolic (91,95-94,15 %), confirmă afirmația de mai sus, comparativ cu fructele de soc (50,25-67,69 %) și frunzele arbustului (16,76-48,52%) (MLYNARCZYK, 2018). Un alt considerent pentru valori semnificative a capacității antioxidantă în florile de soc este (T_{50}) timpul necesar pentru reducerea concentrației

inițiale DPPH cu 50%, de 23-75 s pentru flori și 91-133 s pentru fructe (KOLODZIEJ, 2012).

O altă notă distinctă în ceea ce privește primatul florilor de soc în efectul antioxidant scontat, elaborată de STOILOVA (2007) o reprezintă aceea că extractul de flori de soc, comparativ cu standardele rutin, BHT sau BHA, dețin proprietăți de inhibare radicalică net superioare (o concentrație mică de 10 µg/ml inhibă radicalul DPPH cu 97,70%, iar concentrațiile de 40; 20; 20 µg/ml a standardelor inhibă DPPH procentual cu 77,47; 82,40; 89,98%) (STOILOVA, 2007; MLYNARCZYK, 2018). De asemenea extractul florilor *S. Nigra* L. anticipatează degradarea deoxiribozei, prin eliminare de radicali hidroxil, cu rezultate, și în acest caz mult mai eficiente decât rutin și quercetin (concentrația necesară în a inactiva 50% radicali liberi după cum urmează 0,0122 µg/ml extract de flori de soc, 0,505 µg/ml rutin, 4,61 µg/ml quercetin (MLYNARCZYK, 2018).

Fructele de soc dispun de o activitate antioxidantă în plaja valorilor de 82,09-89,25%, raportat cu DPPH-ul. În dependență cu structura chimică individuală a fiecărui fruct în parte, proprietatea antioxidantă a fructelor de soc, este rezultatul prezenței compușilor fenolici (PLISZKA, 2005). Antocianii au un aport semnificativ în oscilarea valorii capacității antioxidantane, în sensul că creșterea concentrației de antociani determină creștere activității antioxidantă dar numai până la un anumit nivel, peste care acest parametru începe să scadă (PLISZKA, 2005).

Luând în discuție valorile determinante de DUYMUŞ (2014), prin metoda TEAC (ABTS), pentru fructele de soc, proba extrasă în acetonă 70%, a avut un rezultat de 1,96 mM Trolox equiv./l, aproape similar cu valoarea acidului ascorbic (1,97 mM). Mai mult pentru standardul cianidin-3-glucozid, valoarea TEAC (1,87 mM), a fost aproape cu cea a extractului în apă (1,85 mM). Fructele de soc, prezintă și capabilitatea de inhibare a oxidării acidului linoleic. Rata de inhibare cea mai ridicată (58%) este totuși obținută în extractul etanic 70% (DUYMUŞ, 2014).

În vederea exemplificării unei testări a potențialului antioxidant *in vitro*, se poate afirma, pe baza rezultatelor lui OLEJNIK (2016), faptul că fructele de soc au capacitatea să protejeze celulele colonului (la o concentrație de 1 mg pulbere uscată liofilizată/ml), în efectul nociv a stresului oxidative. De altfel reducerea speciilor de oxigen, conduce, în cazul tulpinei de *Salmonella typhimurium*, la mutagenitate în procent de 26%.

O altă sursă de polifenoli a arbustului de soc, privită ca alternativă a prețului de cost, în detrimentul fructelor sau a florilor, conform lui SILVA (2016), o reprezintă pendunculul fructelor de soc. Profilul antocianilor prezenti în pendunculul socalui, este mai scăzut decât în fruct, dar totuși sunt prezente cantități însemnante de flavonoli și esteri ai acidului cinamic, ce determină o acțiune antioxidantă comparabilă cu a fructelor (figura 2.1).

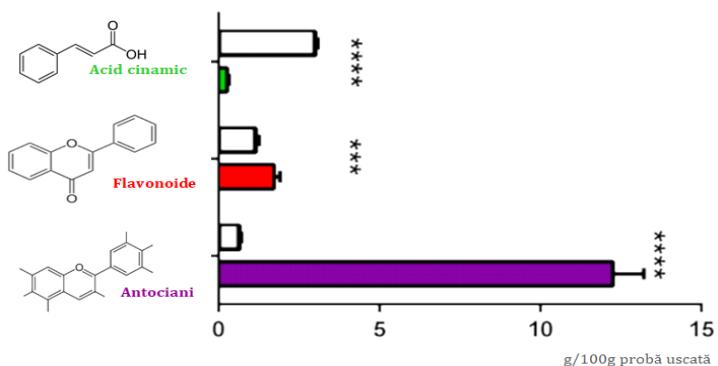


Fig. 2.1 Conținutul de acid cinamic, flavonoide și antociani existenți în pedunculul fructelor (bare albe) și în fructele de soc (bare colorate), utilizand ca solvent de extracție metanol acidifiat (HCl 1%); Diferențe semnificative prin testul t, test **, p < 0.01; ***p < 0.001. (grafic adaptat după SILVA, 2016).

Fig. 2.1 Cinnamic acid, flavonoid and anthocyanins content in fruit peduncles (white bars) and in elderberry (coloured bars) using acidified methanol (1% HCl) as the extraction solvent; Significant differences through test t, test **, p <0.01; *** p <0.001 (graph adapted after SILVA, 2016)

Un număr de 23 de compuși polifenolici au fost reperați în ambele probe, din care un total de treisprezece compuși sunt comuni matricelor analizate (cyanidin 3- glucoside, cyanidin 3,5 diglucoside, cyanidin 3-sambubioside-5-glucoside, și cyanidin 3-sambubioside)(SILVA, 2016).

Generarea de produse/suplimente asociate cu cantități ridicate de polifenoli, situează socul într-un ascendent de valorificare eshauſtivă, însă cu eventualitatea unor proceduri de extracție simple mizând pe o finalitate a extractelor bogate în polifenoli, cu activitate antioxidantă semnificativă (tabel 2.1).

Tabelul 2.1

Compuși polifenolici prezenți în fructele și florile de soc
The content of phenolic compounds in elderberry fruit and flowers.

Compuși Compound	Flori de soc <i>Elderflowers</i>	Fructe de soc <i>Elderberries</i>	Sursa Source
Total polyphenolics	1021.7 mg GAE/100 g FW, 3702–5333 mg CAE/100 g FW, 194 mg GAE/g dry extr	4917–8974 mg GAE/100 g DW extr, 2684–4480 mg CAE/100 g FW, 622–672 mg CE/100 g FW	112, 46,101, 171, 33
3-caffeoylelagic acid (neochlorogenic acid)	510.6 mg/kg FW, 0.8–2.4 mg/g DW	0.7–4.4 mg ChAE/100 g FW, 0.05–0.40 mg ChAE/g DW	93,132, 34
4-caffeoylelagic acid (cryptochlorogenic acid)	31.4 mg/kg FW, 0.6–1.5 mg/g DW	1.2–2.5 mg ChAE/100 g FW	112,13 2, 34
5-caffeoylelagic acid (chlorogenic acid)	10.1–20.7 mg/g DW	26.4–35.9 mg ChAE/100 g FW, 0.53–1.22 mg ChAE/g DW	112,93
5-caffeoylelagic acid 1	2779.3 mg/kg FW		132
5-caffeoylelagic acid 2	187.2 mg/kg FW		132
p-coumaric acid hexoside	28.9 mg/kg FW		132
3-p-coumaroylquinic acid	40.5 mg/kg FW, 0.4–1.9 mg/g DW		132,34
5-p-coumaroylquinic acid 1	80.9 mg/kg FW, 0.5–1.2 mg/g DW		132,34
3-feruloylquinic acid	717.3 mg/kg FW		132
5-feruloylquinic acid	370.6 mg/kg FW		132
1,5-Di-caffeoylelagic acid	8.0–13.9 mg/g DW		34
3,4-Di-caffeoylelagic acid	0.4–1.2 mg/g DW		34
3,5-Di-caffeoylelagic acid	0.5–3.2 mg/g DW		34
4,5-Di-caffeoylelagic acid	0.2–1.5 mg/g DW		34
Dicaffeoylelagic acid 1	217.4 mg/kg FW		132
p-Coumaroyl-caffeoylelagic acid 1	11.7 mg/kg FW		132
p-Coumaroyl-caffeoylelagic acid 2	10.6 mg/kg FW		132
Kaempferol dihexoside 1	40.2 mg/kg FW		132
Kaempferol dihexoside 2	33.5 mg/kg FW		132
Kaempferol triglycoside	44.3 mg/kg FW		132

Monitorizarea trasabilității unor compuși bioactivi de interes pe stadii de dezvoltare morfologică a fructelor de soc și evaluarea unui preparat fitoterapeutic cu efect nefroprotector

Kaempferol-3-rutinoside	646.9 mg/kg FW, 0.2–3.0 mg/g DW	0.7–1.2 mg rutin/100 g FW	112,13 2,34
Kaempferol-3-glucoside	3.5 mg/kg FW, 1.28–2.50 g/100 g extr	1.05–1.79 g/100 g extr	132,43
Kaempferol acetylhexoside	13.5 mg/kg FW		132
Quercetin		2.7–4.5 mg CGE/100 g FW, 29–60 mg/100 g FW	89
Quercetin hexoside			132
pentoside 1			132
Quercetin hexoside pentoside 2			132
Quercetin-3-rutinoside (rutin)	3265.1 mg/kg FW, 11.6–42.3 mg/g DW, 132.69–202.08 g/100 g extr	42.6–95.6 mg rutin/100 g FW, 6–14 mg rutin/g DW, 10.86–15.39 g/100 g extr, 35.59–52.02 mg CGE/100 g FW, 1.94–6.31 mg rutin/g DW	112,18 2,132,9 3,34,43
Quercetin-3-galactoside	10.3 mg/kg FW		132
Quercetin-3-glucoside (isoquercitrin)	20.2 mg/kg FW, 0.4–1.9 mg/g DW, 5.37–9.67 g/100 g extr	3.9–14.9 mg rutin/100 g FW, 1.79–3.01 g/100 g extr, 6.4–26.5 mg CGE/100 g FW, 0.11–1.08 mg rutin/g DW	112,13 2,93,43
Quercetin dihexoside	12.2 mg/kg FW		132
Quercetin acetylglucoside	94.8 mg/kg FW		132
Quercetin-3-6-acetylglucoside	0.9–2.8 mg/g DW		34
Isorhamnetin dihexoside	24.5 mg/kg FW		132
Isorhamnetin-3-rutinoside	888.0 mg/kg FW, 2.0–7.5 mg/g DW	0.3–2.2 mg rutin/100 g FW	112,13 2,34
Isorhamnetin-3-glucoside	61.6 mg/kg FW, 0.2–1.0 mg/g DW	0.1–0.3 mg rutin/100 g FW	112,13 2,34
Isorhamnetin pentoside	3.4 mg/kg FW		132
Isorhamnetin acetylhexoside	37.8 mg/kg FW		132
Catechin	6.8 mg/kg FW	10.7 mM/kg FW	132,15 8
Epicatechin	254.3 mg/kg FW	81.3 mM/kg FW	132,15 8
Procyanidin trimer	155.6 mg/kg FW		132
Naringenin	734.2 mg/kg FW		132
Total anthocyanins		170–343 mg CGE/100 g FW, 518–1028 mg CGE/100 g FW, 408.6–1066.6 mg CGE/100 g DW, 285–1326 mg CGE/100 g extr, 39–153 mg CGE/g DW, 664–1816 mg CGE/100 g FW, 8.33–101.40 mg CSE/g DW, 1.9–20.2 g CSE/kg FW 16.0–59.2 mg CGE/100 g FW, 14–47 mg CGE/100 g FW, 0.86–11.50 mg CSE/g DW, 19.52–53.49 mg CGE/100 g FW	182,46, 93,43,8 9
Cyanidin-3-sambubioside-5-glucosi		8.2–19.5 mg CGE/100 g FW, 0.12–5.22 mg CSE/g DW, 5–36 mg CGE/100 g FW, 7.41–23.29 mg CGE/100 g FW	112,93, 89
Cyanidin-3,5-diglucoside		122.2–269.1 mg CGE/100 g FW, 4.62–40.30 mg CSE/g DW, 269–656 mg CGE/100 g FW, 27.05–27.70 g/100 g extr, 15–59 mg CGE/g DW	112,18 2,43,89
Cyanidin-3-sambubioside			

	Georgiana Smaranda Petruț
Cyanidin-3-glucoside	21.41–25.18 g/100 g extr, 221.4–586.4 mg CGE/100 g FW, 14–78 mg CGE/g DW, 42.4–254.3 mg/100 g extr
Cyanidin-3-rutinoside	93,43,8 9 1.49–9.63 mg CGE/100 g FW, Tr

2.1.2 Compuși biologic activi comparativ cu compuși nocivi din soc

2.1.2 Biologically active compounds compared to noxious compounds in elder

Există un balans, rezultat din studiile recente pe soc, între aportul semnificativ de polifenoli conținuți, tabel 2.1, (MIKULIC-PETKOVSEK, 2015; VEBERIC, 2009; WU, 2004), glicozide cianogene (BROMLEY, 2005; SKIDMORE-ROTH, 2005) și lectine (STIRPE, 2004; TEJERO, 2015), unde raportul dintre ele, prezintă relevanță în stabilirea beneficiilor unui posibil consum.

În ceea ce privește conținutul de glicozide cianogene, compuși toxici de altfel, sunt contraindicați în alimentația omului, pe considerentul că în timpul digestiei, sunt hidrolizați rezultând cianură (BROMLEY, 2005; SIDOR, 2014). În arbustul de soc, acești compuși cu potențial toxic, sunt semnalati aproape în toate părțile morfologie (rădacini, tulpini, scoartă, frunze, flori și fructe în stadiul prim de dezvoltare) (SIDOR, 2014).

Ca și reprezentanți ai glicozidelor, sambunigrina, urmată de prunasin și zerin, sunt cele mai frecvente din componentele socalului și care se transformă în cianură de hidrogen (DELLAGRECA, 2000). Proporția sambunigrinei este diferențiată în morfologia socalului, cea mai scăzută proporție se regăsește în fructele de soc mature (0,08-0,77 µg/g FW), relativ însemnată în florile de soc (1,23-18,88 µg/g FW) și abundantă în frunze (27,68-209,61 µg/g FW) (MLYNARCZYK, 2018; ZAHMANOV, 2015). Facatorii de mediu (altitudinea), influențează acumularea sambunigrinei în fructele de soc, potrivit lui SENICA (2016). Regăsite la o altitudine de maxim 1077 m, fructele de soc mature expuse la alternanțe de temperatură (radiații puternice și temperaturi scăzute), au avut un conținut mare în sambunigrină comparativ cu cele regăsite la o altitudine mai redusă (858 m) (SENICA, 2016).

Cu toate acestea prin tratament termic, acești compuși cianogenici sunt degradați (WILLIAMSON, 2009; ONYEIKE, 2002). Această ipoteză verificată vine totuși în contradicție cu pledoaria pentru alimente neprocesate termic, varianta analogului aliment proaspăt totuși primând (CHOI, 2006). SENICA (2016), relevă faptul că tratamentul termic pe lângă eliberarea compușilor fenolici selectați, distrug pereții celulelor vegetale. Pe parcursul procesării probei vegetale, date fiind prezența structurilor chimice diferite din cuprinsul fenolilor, conținutul acestora diferă. Aplicând o temperatură ridicată, implicit creștere solubilității și a vitezei transferului de masă, se înregistrează astfel o scădere a vâscozității și a tensiunii superficiale din

solvent, fapt ce favorizează gradul de extracție. În contextul în care majoritatea compușilor fenolici sunt ușor hidrolizați și oxidați, temperatura ridicată cu menținerea unui timp de extracție lung favorizează şansele de oxidare, ceea ce semnifică un randament al compușilor fenolici în extract mai mic (DAI, 2010). SENICA (2016) constată că prin prelucrarea termică cea mai îndelungată, din cuprinsul studiului său, se declanșează o creștere a fenolilor specifici din probele analizate (de exemplu acidul 4-caffeooylquinic are o valoare de 10 ori mai mare față de martor). Justificarea degradării peretelui celular, nu reiese numai din obținerea nivelului net superior de compuși fenolici specifici probei, ci și pe considerentul inactivării enzimelor endogene oxidative. Astfel, paradoxal situația implică o pierdere de compuși antioxidenți însă se obține un efect suplimentar în procesarea termică, și anume formarea de noi compuși cu activitate antioxidantă în timpul expunerii probelor vegetale la căldură (SENICA, 2016). Figura 2.2 indică faptul că temperaturile înalte și un timp scurt de expunere, determină scăderea conținutului de glicozide cianogene (compuși toxici), într-un procent relevant (96%) în proba de lichior de fructe de soc SENICA (2016). O altă alternativă propusă de KIM (2003), ar fi expunerea probelor vegetale la temperaturi scăzute timp îndelungat, cu rezultate pozitive în extracția compușilor.

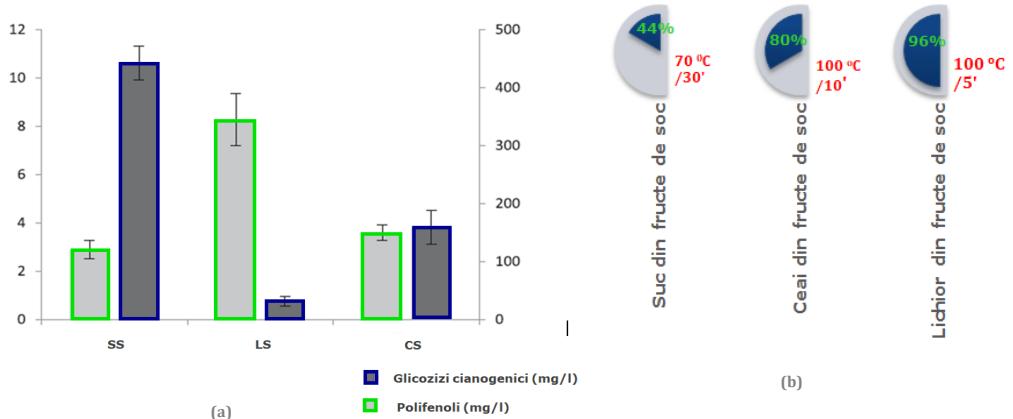


Fig.2.2(a) Conținutul de compuși fenolici și glicozide cianogene (mg/l) în diferite băuturi pe bază de soc (SS) Suc din fructe de soc; (CS) ceai din fructe de soc; (LS) lichior din fructe de soc; (b) % de scădere a glicozidelor cianogene, din probele SS, CS, LS, în funcție de tratamentul termic; (figură adaptată, sursa: SENICA, 2016);
 Fig.2.2 (a) Content of phenolic compounds and cyanogenic glycosides (mg/l) in various elder-based beverages (SS) elderberry juice; (CS) elderberry tea; (LS) elderberry liqueur; (b)% reduction of cyanogenic glycosides from SS, CS, LS samples, depending on thermal treatment; (adapted figure, source: SENICA, 2016);

Reacțiile adverse la ingestia părților vegetale din soc cu conținut de glicozide cianogene, în doze mari, conform lui JIMENEZ (2014), sunt tulburările gastrointestinale, următe de amețeli, greață și emează.

Pe lângă semnalarea compușilor toxică de mai sus, o altă clasă o reprezintă lectinele cu secvențe de aminoacizi ce leagă reversibil hidrații de carbon, având activitate N-glicozidazică, tipică proteinelor de inactivare a ribozomului de tip II. Acestea apar în fructele (nigrin f), semințe (nigrin s) și scoarța de copac (TEJERO, 2015). De altfel acest arbust mai conține alergenul Sam n1, responsabil de alergia tip 1, și unele peptide tryptice ce implică secvențe de aminoacizi și ribozomi de tip II regăsiți în *Sambucus* (FÖRSTER-WALDL, 2003; JIMÉNEZ, 2013). Cu toate acestea, JIMÉNEZ (2017), afirmă că o incubare în apă fierbinte timp de 10 minute, sensibilizează total lectinele la enzime hidrolitice (*in vitro*), reducând riscul alergenicității.

2.1.3 Trasabilitatea compușilor bioactivi din florile și fructele de soc pe durata dezvoltării morfologice și în timpul păstrării

2.1.3 Traceability of bioactive compounds from elderflowers and elderberry during morphological development and during storage

În ceea ce privește liniaritatea conținutului de compuși bioactivi din soc, acesta este determinant de varietate/cultivar, sezon, etapa de creștere și metoda de procesare (MLYNARCZYK, 2018).

Abundența antocianilor în fructele de soc, de unde și caracteristica violet - purpurie a fructului (SIDOR, 2014), este unanim recunoscută, pentru care derivatul cyanidin-3-glucoside ocupă ponderea cea mai însemnată (204.6–481.4 mg CGE/100 g fruct pentru *S. nigra* L.), urmată fiind de cyanidin 3- sambubioside (122.2–269.1 mg CGE/100 g fruct pentru *S. nigra* L.), (SIDOR, 2014; LEE, 2007).

Astfel admitem în cazul fructelor de soc, că această varianță este în dependență de: cultivar cu o marjă de trei ori mai mare a antocianilor conținuți între genotipuri (664 mg antociani totali/100 g fruct de soc genotip "Haschberg" în timp ce aportul compușilor în "Sampo" este de 1816 mg/100 g), (KAACK, 1997; KAACK, 1998), sezon (cantitatea de antociani, conform lui LEE (2007), este de două ori mai ridicată, în ani consecutivi, respectiv de 343 mg cyanidin-3-glucoside/100g fructe de soc "Korsor" în anul 2005 și 176 mg of cyanidin-3-glucoside/100g în 2004) (LEE, 2007), etapa de dezvoltare (procesul de dezvoltare a fructului este individualizat de apariția unui anume compus și modificarea proporțiilor; un exemplu în acest sens sunt antocianii cyanidin 3-glucoside și cyanidin 3- sambubioside, cantitatea lor crescând direct proporțional cu maturitatea fructelor) (KAACK, 2008), metoda de procesare (în vinul obținut din fructe de soc regăsim dintre antociani, preponderent C3G, în timp ce în sucul de fructe de soc predomină C3S) (BERMUDEZ-SOTO, 2004; SCHMITZER, 2010).

Sub aspectul procesării/depozitării fructelor de soc corelată cu stabilitatea compușilor bioactivi, remarcăm unele situații particulare. În cazul unei fermentații alcoolice a fructelor de soc, regăsim, comparativ cu mustul prim, o proporție ridicată de polifenoli precum cyanidin 3-glucoside, acid clorogenic, quercetin-3-rutinoside, quercetin-3-glucoside, kaempferol-3-rutinoside, cyanidin-3-sambubioside-5-glucoside, cyanidin-3,5-diglucoside, cyanidin-3-rutinoside doar cyanidin 3- sambubioside scade brusc (MLYNARCZYK, 2018). Studiile axate pe depozitarea vinului de soc afirmă variația invers proporțională a polifenolilor, și anume scăderea antocianilor odată cu creșterea acizilor fenolici și a flavonolilor (SCHMITZER, 2010), de unde și explicația capacitatei antioxidantă mai definită în must. Învechirea vinului, anulează până la un nivel de 21% polifenoli totali și de 94 % antocianii, după un interval de 3 ani, comparativ cu un vin Tânăr. Senzorial, tot în această etapă tehnologică, scăderea drastică a antocianilor virează schimbarea nuanțele roșiaticice ale vinului Tânăr la cele roșu-maro (SIDOR, 2014). Un alt caz central de date aceasta pe sucul obținut din fructe de soc, sub aspectul stabilității, invocă ca și element determinant metoda aplicată pentru obținerea sucului în strînsă legătură cu compușii bioactivi. Metoda tratamentului enzimatic aplicat unui suc de soc, va diminua proporția compușilor fenolici, în detrimentul sucurilor fără pectinoliză (KAACK, 2008). O simplă blanșare a fructelor proaspete schimbă proporția polifenolilor, determinând o scădere a lor, comparativ cu conținutul în creștere al antocianilor, fapt demonstrat de GALIC (2009). Operația finală de depozitare a sucului de soc, conform lui CASATI (2012), descrește (40%) conținutul polifenolilor după minim 30 de zile. Deasemenea s-a observat că un timp de păstrare îndelungat a unui suc, alături de creșterea temperaturii de păstrare și în condițiile unui pH ridicat, finalitatea cumulului de principii bioactive, nu va fi alta decât un suc cu conținut redus de antociani, de aici importanța timpul, temperaturii și a pH-ul în depozitare (WALKOWIAK-TOMCZAK, 2016).

Subprodusul rezultat din presare fructelor de soc (aproximativ 40% din greutatea inițială a fructelor proaspete), prezintă interes prin regăsirea antocianilor de importanță majoră și în cantități semnificative: rutin (14 mg/g DW), cianidin-3-glucozid (15-77 mg/g DW) și cianidin-3-sambubioside (14-62 mg/g DW) (ambele ocupă 90% din ponderea totalului de antociani), iar conținutul lor variază, în funcție de procesul de extracție, de la 41 la 153 mg/g/substanță uscată (SEABRA, 2010). BRONNUM-HANSEN (1985), regăsește un total al antocianilor de 76-98% în acest reziduu obținut, comparativ cu fructele proaspete de soc.

Luând în discuție și stabilitatea compușilor bioactivi din florile de soc pe durata păstrării acestora, trebuie să admitem, conform lui DAWIDOWICZ (2006), că valoarea compușilor fenolici, este net superioară în flori, comparativ cu frunzele/fructele aceluiași genotip. Vorbim la nivelul florii de soc, ca și compuși fenolici reprezentativi, în primul rând de acizii hidroxycinamici (în mod special acidul clorogenic), urmați fiind de clasa flavonolilor (reprezentativ fiind quercetin-3-

rutinozid (rutin), care ocupă un procent de 90% din totalul flavonoidelor din floare la majoritatea genotipurilor analizate, alături de isorhamnetin-3-rutinoside și de kaempferol-3-rutinoside (CHRISTENSEN, 2008; MIKULIC-PETKOVSEK, 2015).

Dintre elementele ce implică varianță în compoziția acestor compuși din florile de soc, pe durata unei depozitări, redăm condițiile de extracție alături de genotipul arbustului. În ceea ce privește condițiile de extracție pentru florile de soc, creșterea temperaturii de extracție este direct proporțională cu creșterea cantității de compuși flavonolici (la temperatura fierbere se obține o cantitate de 214.25 g/100g extract comparativ cu cantitatea obținută la temperatură de 20°C, 139.32g/100g extract „relativ mai mică) (DAWIDOWICZ, 2006). Genotipul implică următoarele rezultate în variație, prezentând situația celor mai reprezentativi polifenoli (acidul clorogenic și rutin), astfel: aportul adus, spre exemplu, de genotipul "Virum" în acid clorogenic este relativ mai mare (aproximativ 20,7 mg/g DW), în comparație cu genotipul "Sambu" (10,1 mg/g DW); conținutul de rutin, îl întâlnim mai abundent însemnând o valoare de 42,3 mg/g DW la genotipul "Samocco", pe cînd genotipul "Jaegerspris" vine cu doar 11,6 mg/g DW rutin (CHRISTENSEN, 2008). Produsul atât de comun obținut din florile de soc, și anume ceaiul, a prezentat o stabilitate relativă, sub aspectul acizilor fenolici și flavonolilor, pentru o depozitare de 21 săptămâni (KAACK, 2008).

Prezența glucozei, fructozei și a acidului ascorbic, modifică și ei constanta antocianilor din fructele și florile de soc, printr-o stabilitate relativ mai bună dată de glucoză, și semnificativ mai mică pentru fructoză și acid ascorbic (SADILOVA, 2009).

2.2 Aplicațiile socrului în medicină

2.2 Applications of elder in medicine

Sintagma de "potențial medicinal al socrului", reunește două fundamente, ce converg astazi tot mai pregnant, și anume: medicina populară cu atributul de "remediu" adus socrului în diferite afecțiuni (ameliorarea sistemului imunitar cu frecvență) (KOHLMÜNZER, 1998), precursor pentru cel de-al doilea fundament, și anume "renumele" împreună cu cererea largă de consum pe piața producției de suplimente alimentare. Potrivit Asociației europene a producătorilor de plante medicinale, florile și fructele de *Sambucus nigra* L. s-au regăsit în topul celor mai recoltate plante medicinale cu destinația producției de ceai și fitofarmaceutice, pentru export, din România și Bulgaria (European Association of Growers Herb (Europam), 2010). Totodată piața suplimentelor alimentare pe bază de soc, clasează acest arbust pe locul al 18-lea, alături de cel mai bine vândut supliment din SUA, 2011 (ENGELS, 2013).

Capabilitatea "the healing properties" a socrului este datorată, în cea mai mare măsură, de prezența compușilor fenolici de unde reiese o activitate antioxidantă

Monitorizarea trasabilității unor compuși bioactivi de interes pe stadii de dezvoltare morfologică a fructelor de soc și evaluarea unui preparat fitoterapeutic cu efect nefroprotector

ridicată, cu eliminare de radicali liberi și contracararea stresului oxidativ (GOLLUCKE, 2013).

Întreg ansamblu vegetal al arbustului (frunze, muguri de inflorescențe, inflorescențe, fructe, rădăcini, scoarță), prezintă implicații terapeutice (PETRUȚ, 2017; MLYNARCZYK, 2018), iar biodisponibilitatea substanțelor active este descrisă atât *in vitro* cât și *in vivo* –tabel 2.2.

În ceea ce privesc frunzele de soc în "health-promoting properties", acestea sunt recunoscute în mecanismele de stagnare a bolilor infecțioase, în timp ce scoarța de soc prezintă proprietăți diuretice. Florile de soc, datorită aportului de flavonoide, vin cu proprietăți antipiretice, diuretice și diaforetice. Prezența flavonoidelor compozita lor, în special rutin, explică mecanismul de acțiune fitoterapeutică a florilor de soc, prin aceea că obturează pereții capilari, măresc flexibilitatea lor și anticipă infiltrarea celulor roșii din sânge și a plasmei în afara vaselor. Totodată este necesar să amintim și efectul antiinflamator și antibacterian demonstrat de florile de soc, ele fiind folosite în tratarea conjunctivitei, a durerilor de gât, sub forma de infuzii. Ceea ce le diferențiază în acțiunea lor terapeutică a fructelor față de florile de soc, este eficacitatea potențial analgezică, pretabilă în tratamente împotriva migrenelor sau a nevralgilor sciatici.

O altă notă definitorie pentru fructele de soc o reprezintă activitatea antivirală eficace, iar preparatul Sambucol, patentat în Israel, este un agent profilactic de acest gen (MLYNARCZYK, 2018; BEAUX, 1999; BOWN, 1995; KINOSHITA, 2012). Prezența antocianilor conținuți în fructele de soc, conform studiilor (MILBURY, 2002), se rezumă la absorbția lor în organism, în forma nativă de glicozilate, având efecte demonstrabile în cazul virusul gripal A și B precum și *Helicobacter pylori* (ZAFRA-STONE, 2007; ANTONA, 2013). Acești antociani sunt preluăți tocmai de celulele endoteliale, care sunt protejate ulterior de aceștia (YOUDIM, 2000). THOLE (2006) descrie într-un studiu activitatea antitumorală a fructelor de *Sambucus nigra* L. extrapoland la chemoprevenția cancerului. Astfel o fracție a extractului de fructe de soc, care pe lângă compușii fenolici existenți, au spre exemplu glicozide iridoide, sesquiterpene, fitosteroli ce dău o inducție puternică a chinon reductazei și inhibă calea ciclooxygenazei-2, fapt dovedit în focalizarea și preventia stadiilor de cancerogeneză.

Necesitatea ubicuitară a remediilor gripale sau ale altor boli infecțioase, fac din aceste flori și fructe de *Sambucus nigra* L., promotori veridici fie pe piața suplimentelor alimentare (sub formă de siropuri, capsule, aerosoli, emulsii etc.), fie ca atare.

Tabelul 2.2

Potențialul medicinal al preparatelor din socalul (*Sambucus nigra L.*)- studii *in vitro și vivo studies*
Medicinal potential of elderberry (*Sambucus nigra L.*) preparations – in vitro and vivo studies

Potențial medicinal/Medicinal potential	Preparat din soc/Elderberry preparation	Rezultate/Results	Referințe/References
"in vitro studies"			
Acțiunea antivirală	Extract lichid standardizat Extract din fructe de soc: concentrație de 252µg/ml concentrație de 1000µg/ml Suc concentrat din fructe de soc: Extract concentrat la 720µg/ml Extract concentrat la 3600µg/ml Extract din fructe de soc	Subdimensionarea focarelor virusului gripal A(KAN-1) și B pe celule Madin Darby de rinichi de câine (MDCK) IC50 pentru H1N1 Inhibare H1N1 de 100% H1N1 inhibă MDCK IC 50 pentru H1N1 (proba testată a fost administrată în timpul infecției) IC50 for H1N1 (proba testată a fost administrată imediat după infecție) Inhibarea bronșitei infecțioase (IBV), la un coronavirus de pui; Reducerea titrurilor de IBV cu câteva ordine de mărime, în funcție de doza aplicată; Eficiență împotriva virusului imunodeficienței feline (FIV) - virus comun al pisicilor domestice;	KRAWITZ (2011)
		Inhibarea 100% a virusului herpes Încetinete dezvoltarea microorganismelor <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Branhamella catarrhalis</i> Acțiune moderat inhibitoare pentru <i>Bacillus cereus</i> și <i>Serratia marcescens</i> ;	ROSCHEK (2009)
		Acțione inhibitoare pentru majoritatea celor 13 agenți patogeni nosocomiali (ex. <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus sp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella poona</i>) Cresterea absorbtiei de glucoză, oxidarea glucozei și glicogeneza mușchiilor abdominali la șoareci, fără adăos de insulină	KINOSHITA (2012)
Activitatea antibacteriană	Extract din scoarța de soc Extract concentrat la 500µg/ml Extract lichid standardizat Extract apos din frunze de soc Extract standardizat de flori și fructe de soc	Prevenția fazei incipiente și de propagare a cancerogenezei: inducerea puternică a quinon reductazei și inhibarea cyclooxygenase-2	CHEN (2014)
Tratament diabetic	Extract din flori de soc (1 g/L)	Nu există efecte inhibitorii asupra uridin difosfoglucuronoziltransferazei	UNCINI MANGANELLI (2005)
Indici privind examenul de urină	Extract din flori de soc sub formă de capsule		KRAWITZ (2011)
Acțiunea antitumorală	Extract din fructe de soc (fracțiune de extract ce cuprinde compuși fenolici, glicozide monoterpane, iridoide, fitosteroli și sesquiterpene)		HEARST (2010)
			GRAY (2000)
			CHOI (2014)
			THOLE (2006)

Potențial medicinal/Medicinal potential	Preparat din soc/Elderberry preparation	Design study	Doza/Durata Dosage/Duration	Rezultate/Results	Referințe/References
"in vivo studies"					
Acțiunea antivirală	Șoareci (sex feminin, vârstă de 6 săptămâni), infectați cu virusul gripal A	Concentrat de suc de fructe de soc separat în trei fracții (particule mici, mari, foarte mari)	2/zi-12 zile	Suprimarea randamentului viral în lichidul de lavaj bronhoalveolar și plămânilii; creșterea nivelului de infectare cu virusul specific în lavajul bronhoalveolar și ser	KINOSHITA (2012)
	R-DB-PC, 60 de pacienți (18–54 ani) cu simptome ale virusului gripal A și B	Sambucol (sirop)-extract standarizat din fructe de soc	15ml/4 zi-5 zile	Simptomele virusului gripal A și B au apărut abia după patru zile	ZAKAY-RONES (2004)

Monitorizarea trasabilității unor compuși bioactivi de interes pe stadii de dezvoltare morfologică a fructelor de soc și evaluarea unui preparat fitoterapeutic cu efect nefroprotector

Potențial medicinal/Medicinal potential	Preparat din soc/Elderberry preparation	Design study	Doza/Durata Dosage/Duration	Rezultate/Results	Referințe/References
R-DB-PC, 64 de pacienți (16-60 ani) prezintând simptome gripale	Tablete cu extract de fructe de soc (175 mg extract/tabletă)		4/zi-48 h	de tratament, la lotul la care s-a administrat extract de soc, comparativ cu grupul placebo 28% dintre pacienții supuși tratamentului cu soc, nu au manifestat simptome gripale iar 60% au prezentat totuși unele simptome, în timp ce grupul placebo nu a demonstrat nicio îmbunătățire	KONG (2009)
Tratamentul diabetic	Şobolani (sex masculin, 28 săptămâni), divizați în patru grupe, ce includ și şobolani diabetici	Extract polifenolic din fructe de soc	0.040 g/kg corp la fiecare 2 zile-16 săptămâni	Îmbunătățirea densității minerale osoase și a capacitatii antioxidantă a serului; scăderea grăsimii corporale la şobolani diabetici și a nivelului de peroxidare a lipidelor din ser; îmbunătățirea stării osteoporozei	BADESCU (2012)
Disfuncția metabolică în obezitate	Şoareci (sex masculin, 8 săptămâni) divizați în patru grupe, incluzând dieta de tip 2, cu conținut ridicat de grăsimi	Extract din fructe de soc (polar) Extract lipofitic din fructe de soc	350 mg/kg corp/zi-4 săptămâni 190 mg/kg corp/zi-4 săptămâni	Extractul polar reduce glucoza din sânge, extractul lipofitic scade secreția de insulină. Ambele extracte reduc rezistența la insulină	SALVADOR (2017)
Disfuncționalități la nivelul colesterolului HDL	Şoareci (10 săptămâni) cu hyperlipidemie și disfuncție HDL	Extract din fructe de soc (13% antocianii)	0.25% extract (20-40 mg antocianii/kg corp 1.25% extract (100-200 mg/kg corp)-16 săptămâni	Ambele grupe la care s-a administrat extract au prezentat o scădere greutății ficatului, rezistență redusă la insulină și hepatice comparativ cu grupurile de şoareci obezi; adăugarea a 1,25% extract reduce colesterolul la nivelul ficatului, comparativ cu ambele grupuri obeze; Nu există diferențe semnificative în lipidele serice la nivelul grupurilor; - reducerea transaminazei și a glucozei la cei cu administrare de extract; Schimbări la nivel hepatic și ARN, ce conduc la o îmbunătățirea funcției HDL și o reducere a nivelului de colesterol hepatic;	FARREL (2015)
Activitatea	R-DB-PC, 34 voluntari sănătoși (20 bărbați, 24 femei)	400 mg pulbere uscată încorporată prin pulverizare în capsule	3/zi-2-3 săptămâni	Nu se constată diferențe semnificative pentru grupul cu	MURKOVIC (2004)

antioxidantă și efectul asupra lipidelor		gelatinoase (10% antociani în fiecare capsulă)		
Potential medicinal/Medicinal potential	6 voluntari	Extract identic cu cel anterior	O singură doză/1 zi	Referințe/References
Efectul asupra scăderii în greutate	80 voluntari	Preparat din soc/Elderberry preparation	Design study	Doza/Durata Dosage/Duration
Parametrii urinari și efectul scăderii în greutate	11 voluntari	Suc de fructe de soc cu extract de flori; comprimate cu conținut de pudră de fructe de soc și extract din flori de soc (1 mg antociani, 370 mg flavonol-glicozide, 150 mg acid hidroxicinamic); Comprimatele conțin pudră de <i>Asparagus officinalis</i> powder (19 mg saponine)	Cel puțin 3 litri de suc de soc, 3 comprimate cu <i>Sambucus nigra</i> și 9 comprimate cu <i>Asparagus officinalis</i> /zi-15 zile	Indicele de masă corporală a scăzut cu aprox. 3%, greutatea a scăzut cu o medie de 3,2 kg, presiunea săngelui sistolic a scăzut cu o medie de peste 5% și presiunea diastolică cu 2,5%
Potențialul antidepresiv	Șoareci masculi divizați în sase grupe	Concentrat de fructe de soc (din 120 g de fructe de soc) plus flori de soc (suc de flori și extract din 3,9g de flori uscate); diluție de (1:5) Extract de <i>S. nigra</i> și extract de <i>S. ebulus</i>	200 ml împărțiti în 6 porții-7 zile	Scădere medie în greutate cu 2,6 kg; pH nemodificat, 24 ore excreție de hidrogen în urină;
	Imipramina		200-1200mg/kg	WALZ (2008)
			10 mg/kg	MAHMOUDI (2014)

*Notă: R- randomizat, D-B -studiu dublu-orb, P-C -controlat cu placebo;

2.2.1 Biodisponibilitatea principiilor active

2.2.1 Bioavailability of active principles

În ceea ce privește absorbția antocianelor la nivelul organismului uman, acești antioxidanti sunt ingerăți, în formele lor glicozilate, nemodificate. Conform cercetărilor lui MILBURY (2002), analizând antocianinele din conținutul plasmei sanguine și urinei, pe un eșantion de patru femei, cu administrare de extract din fructe de soc (12 mg extract a 720 mg antocianine din care amintim cyanidin-3-glucoside (C3G) și cyanidin-3-sambubioside (C3S)), au prezentat, după consum, compuși suplimentari pe lângă cei enumerați. Concentrația compușilor detectați a scăzut după o oră de la administrarea extractului, iar la un interval de 24 ore a dispărut. La minutul 72, în plasma sanguină s-a constatat o concentrație maximă a compușilor mai sus numiți, cu valori medii de 97,4 nmol/l din totalul antocianilor (cel puțin șase compuși au fost detectați la 520 nm după ingestia de extract), iar antocianii preponderenți au fost cyanidin-3-glucoside și cyanidin-3-sambubioside. În probele de urină, majoritatea compușilor antocianinici au apărut în primele 4 ore, iar în decurs de 24 de ore, nivelul antocianinelor excretate a fost de 397,0 µg echivalenți cyanidin-3-glucoside (MILBURY, 2002).

Proporția de antocianină, (în special C3S și C3G), în excreția urinară crește odată cu creșterea dozei de suc de soc, fapt constatat de NETZEL (2005), doze ce constau în 200, 300 și 400 ml, pentru 8 voluntari, și presupun următoarele reperecensiuni în analiza excreției urinare, cu privire la parametrii antioxidanti și la concentrațiile plasmatiche a antocianinelor: la 361 mg antocianină (conținută în 200 ml suc), s-a constatat o excreție în mediu de 41,4 µg/h de antociani, în timp ce pentru cei 722 mg antocianină (din doza maxima de suc - 400 ml), valoarea a fost de 113,2ug/oră. Tot în cuprinsul acestui studiu s-a determinat la un dozaj de 400 ml suc de soc, comparativ cu doza de control (apă), efectul asupra capacitatei antioxidantă, a acidului ascorbic și uric din plasmă sanguină. Toți acești parametrii urmăriți, cresc după ingestia sucului, valoarea maximă fiind scontată la o oră după administrare (NETZEL, 2005).

Un alt studiu întreprins de CZANK (2013) afirmă că biodisponibilitatea antocianilor este mult mai mare și implicit diversitatea de metaboliți rezultați. La o doză de 500 mg cianidin-3 glucozid (izotopii 6, 10,3',5'-13), aplicată celor 8 voluntari de sex masculin, cu examinare la 48 de ore după ingestie, a probelor de sânge, urină și fecale, relevă următoarele: izotopul 13C (24 de compuși metaboliti identificați), a fost regăsit în urină, fecale în proporție de 43,9%, unde biodisponibilitatea relativă din urină este de 12,38%; pentru 13 C5-C3G, metaboliții au atins un maxim de 42 de ori a concentrației serice relative, detectați fiind cu mult mai târziu decât antocianina propriu-zisă (CZANK, 2013). Comasarea datelor prezentate mai sus, precum și altele cu

subiect comun, privind biodisponibilitatea principiilor active din soc sunt expuse în tabelul 2.3.

Tabelul 2.3

Biodisponibilitatea compușilor activi din fructele de soc (MLYNARCZYK, 2018)
Bioavailability of elderberry active compounds (MLYNARCZYK, 2018)

Dоза/Дурату Dose/Duration	Extract de fructe de soc Elderberry preparation	Voluntari Human subjects	Excreția urinară Urinary excretion	C_{max}/ t_{max}	Metaboliti Metabolites	Surse Reference
720 mg antocianii /24 h	12 mg extract din fructe de soc dizolvat în 500 ml apă	4 voluntari (femei)	0,055%	97.4 nmol/l-72 min	-	MILBURY (2002)
3569 mg antocianii /5 h	150 ml suc concentrat de fructe de soc	7 voluntară (6 femei, 1 bărbat)	0.053%	-	Glucuronide conjugate (0.003%)	BITSCH (2004)
361 mg antocianii /7 h	200 ml suc de fructe de soc	8 voluntari (4 femei, 4 bărbați)	0.033%	-	-	NETZEL (2005)
541 mg antocianii /7 h	300 ml suc de fructe de soc		0.038%			
722 mg antocianii /7 h	400 ml suc de fructe de soc		0.040%			
2240 mg polifenoli totali/4 h	400 ml suc de fructe de soc			16.1 mg/l-1h		
710 mg antocianii /4 h	400 ml suc de fructe de soc			52.6µg/l-1h		
500 mg (sub formă de două capsule de 250 mg)/48 h	500 mg de cianidin-3 glucozid (izotopii 6, 10,3',5'-13)	8 voluntari (bărbați)	5.37%	0.14µmol/l -1.81h	Faza II conjugată de C3G și cianidină, degradare, fază II conjugată de acid protocatechuic, acizi fenilacetici, acizi fenilpropenoici, acid hipuric.	CZANK (2013)

*Abreviere: C_{max}-concentrația maxima de plasmă/ maximum plasma concentration; t_{max}- timpul maxim pana la C_{max}/time to reach C_{max}

3. Implicarea compușilor conținuți în florile de soc în tratamentul insuficienței renale.

3. Involvement of the compounds contained in the elderflowers in the treatment of renal insufficiency.

3.1. Insuficiența renală -preambul

3.1. Renal impairment - preamble

Insuficiența renală cronică (IRC) descrie un spectru de disfuncție clinică care variază de la anomalii detectabile numai prin teste de laborator privind stadiul de uremie (WILLIAM, 2012). O rată de filtrare glomerulară (GFR) <60 ml/min/1,73 m² sau prezența anormalități structurale/funcționale ale rinichiului pentru ≥ 3 luni, definește maladia rinichilor, ca una semnificativă din punct de vedere clinic (AJAY, 2010). Admițând problematica strategiilor de tratament, în această disfuncție renală, ca fiind una ușor promițătoare, ce poate să devieze dramatic (MELISSA, 2007; LEVEY, 2007), accentul se pune pe daunele instalate. Întrucât insuficiența renală acută (IRA), se poate transforma în IRC, se consideră deosebit de importantă tratarea IRA. Este de subliniat faptul că, boala cronică de rinichi se agravează progresiv, chiar dacă tulburarea care a provocat-o devine inactivă (WILLIAM, 2012).

În ceea ce privește cauzele instalării IRC, este unanim valabil și demonstrat că diabetul zaharat de tip 1 sau 2 și hipertensiunea arterială, reprezintă cei doi factori de risc majori în instalarea insuficienței renale, ambii putând leza vasele de sânge în rinichi (PENG, 2012; BEST PATRICIA, 2004, HSIEH, 2013). Alte studii descriu că anomaliiile metabolismului lipidic (hipercolesterolemia), consecința unei diete cu conținut ridicat de colesterol, pot însobi adesea și agravează afecțiunile renale (FRIED, 2001; AL-REJAEI 2012). Totodată această maladie este frecvent asociată cu eșecul de creștere (viteza de înălțime subnormală), care este consecința unei malnutriții proteine vs. calorii, tulburări de natură acido-bazice sau hiperparatiroidism (VIVIEN, 2011).

O notă distinctă pe acest subiect este adusă în discuție de RICHARDSON (2018), care remarcă consecința direct proporțională a impactului bolilor cronice asupra educației, cu precădere făcând referire la absenteismul cronic. Scopul studiului a fost acela de a cuantifica absenteismul în rândul copiilor din SUA, cu ușoare până la moderate forme de insuficiență renală și a compara prevalența datelor cu normele publicate printre copiii sănătoși din America. Rezultatele au confirmat că absenteismului școlar cronic la copiii cu boală renală cronică a fost de 17,3% (din 105 subiecți), în contrast cu un scor de 2,7% absenteism din rândul copii sănătoși.

3.2 Candidați în terapia patologiei renale: flavonoidele

3.2 Candidates for renal pathology: flavonoids

Revizuirea simptomelor uremice (eczeme, artralgii, greață, vărsături, prurit, dificultăți de somn, apetit scăzut și gust anormal) (AJAY, 2010), din perspectiva potențialul bioactiv a materialului vegetal, a stârnit preocuparea medicilor clinici pentru medicația în insuficiența renală (PENG, 2012).

"Fashion for organic" (MLYNARCZYK, 2018), în cazul de față, are corespondent direct tumultul vegetal ce se lasă repetitiv regenerat și comasat în noi formule fitoterapice individualizate. Esența veridicului tumult vegetal este reprezentat de aceste flori de soc, unde compușii conținuți promit implicații testate *in vitro* și *in vivo*, pentru atenuarea insuficienței renale. Importanța profilul antioxidant al florilor de soc, pe acestă temă, rezultă pe de-o parte din conținutul semnificativ crescut de principii active comparativ cu fructele sau frunzele arbustului (MLYNARCZYK, 2018; CHRISTENSEN, 2008; DAWIDOWICZ, 2006; MIKULIC-PETKOVSEK, 2015), iar pe de altă parte prin atributul compușilor biologic activi valoroși din clasa flavonolilor. Considerați modificatori naturali ai răspunsului biologic, flavonolii, sunt reprezentați, în florile de soc, de glicozide ale quercitinului, kaempferol și isorhamnetin. Însă flavonoul de importanță majoră din compoziția florilor de soc, este quercetin-3-rutinoside (rutin), care alături de kaempferol-3-rutinoside și isorhamnetin-3-rutinoside, reprezintă peste 90% din totalul flavonoidelor la cele mai multe genotipuri analizate. Alte clase de compuși polifenolici care se găsesc în florile de soc, pe langă flavonoide sunt flavanolii (reprezentate de catechin, epicatechin, procyanidin trimer), flavanonele (naringina) și acizii hidroxicinamici (acid neochlorogenic, acid cryptochlorogenic, acid 3-5-feruloylquinic, acids dicaffeoylquinic, acid 1,5-di-caffeooylquinic (MLYNARCZYK, 2018). De subliniat este faptul că un conținut ridicat de flavonoli se va înregistra la temperaturi de extracție mari (214.25 g/100g flavonoli la 100°C comparativ cu 139.32 g/100g flavonoli la 20°C) (DAWIDOWICZ, 2006).

Background-ul studiilor în ceea ce privește implicațiile compușilor bioactivi din soc în tratamentul insuficienței renale, redă actiunea lor atât individuală cât și combinată.

HSIEH (2013) pornind de la indicația controversată regăsită în studii că un aglycon și glicozidul său asociat ar acționa în mod similar, presupune că rutinul (RT) și quercetinul (QT) ar putea să acționeze în mod farmacodinamic în insuficiența renală. Chimic agliconul quercitin, quercetin glucosides și quercetin rutinoside sunt strâns legate, dar farmacocinetic acești patru compuși acționează diferit. În confirmarea acestora, doxorubicina (DR) (8,5 mg/kg) s-a utilizat pentru a induce boala renală cronică la șobolan (CKD) iar tratamentul (timp de 13 săptămâni), a constat din QT și RT (fiecare 70 mg/kg greutate corporală pe zi). În urma examinărilor (teste biochimice, histologice, ELISA și Western blot pentru unele citochine), s-au constatat:

QT a influențat o creștere mai bună a greutății corporale (420 ± 45) față de RT, 350 ± 57 g / șobolan. Raportul dintre greutatea rinichilor și a corpului (%) crește pe seama DR până la 0,82 față de QT 0,35 și RT 0,62. Rata de filtrare glomerulară este redusă de DR la 25,2 comparativ cu RT $48 \pm 11,3$, QT $124,7 \pm 12,8$ și control $191,5 \pm 15,7$ ml/h. Specific IRC indusă de doxorubicin, este creșterea ureei în sânge la 38 ± 3 față de RT, la 98 ± 6 mg / dL ($p < 0,001$), instaland "malnutriția protein-energetică". Prin faptul că RT a indus apoptoza prin implicarea căii mitocondriale intrinseci, iar QT în toate aspectele a demonstrat efecte mult mai benefice asupra terapiilor CKD, studiul arată că rutinul și quercetinul farmacocinetic și phamacodinamic acționează, distinct, în IRC indusă de doxorubicin (HSIEH, 2013).

Faptic, se demonstra în 2012, în mare parte de către aceeași echipă de cercetători (PENG, 2012), comparația efectului terapeutic a compușilor naringenina (flavanone), catechina (flavanoli), rutin și quercetina (flavonoli), asupra CKD indusă de doxorubicină (7,5 mg/kg). Importanța compusului flavonon naringenina, prezent în florile de soc, decurge din efectele inhibitorii manifestate prin citotoxicitate în diferite tipuri de celule umane, prezentând astfel interes în cooptarea în formule terapeutice (BAK, 2011). Cu toate acestea, datorită proprietăților antioxidantă și chelării metalelor grele, protejează disfuncția renală oxidativă indusă de doxorubicină la șobolani (PENG, 2012; RENUGADEVI, 2009). În acest sens, este oportun să precizăm că studiile pe extractul de flori de soc care conține naringenină nu numai că admit proprietatea metal-chelativă ci și o cantifică, ca fiind mult mai puternică decât a standardelor de rutin și quercetin (STOILOVA, 2007).

Catechina împreună cu vitamina C și E atenuază stresul oxidativ datorat IR, reduce acumularea de dimetilarginină asimetrică (ADMA), anihilează modificările date de rezistență la insulină și atheroscleroză la șobolani (KORISH, 2008).

Rutin (quercetin-3-rutinosid sau vitamina P), prezent în mod frecvent în matrice alimentare comune, cum sunt merele, ceapa, vinul roșu sau ceaiul (HERTOG, 1993), prezintă importanță prin rolul său protector în bolile mediate de stres oxidativ având astfel efect protectiv renal (AL-REJAIE, 2012; LOPEZ-REVUEL, 2006; KORKMAZ, 2010; MAHMOUD, 2011; HAN, 2015). Flavonolii din ceai împiedică dezvoltarea glomerulosclerozei prin inhibarea modificărilor din glomeruli (HASE, 2006). Într-un model experimental de diabet zaharat la șobolani, indus de streptozotocină, rutin acționează prin remodelarea nivelelor metaloproteinazelor și scăderea glucozei plasmaticice (KAMALAKKANNAN, 2006). Acest flavonol, mai este cunoscut și prin activități farmacologice, inclusiv anti-mutagene, antibacteriene, antitumorale (KWON, 2005), antidiareice, antiulceroase, antiinflamatoare (GUARDIA, 2001), imunomodulatoare (JANBAZ, 2002; AL-REJAIE, 2012). Quercetina, principalul flavonol din dieta noastră cu un proeminent caracter antioxidant, este regăsit ubicuitar în alimentație (BOOTS, 2008). Reprezentând 70% dintr-un aport de 23-24 mg/zi flavone și flavonoli într-un regim alimentar olandez (DE VRIES, 1997), consumul de quercitină

poate răpunde nevoilor unei scheme de preventie a cancerului renal, în rândul fumători de sex masculin, conform unui studiu efectuat în sud-vestul Finlandei (WILSON, 2009).

Astfel testarea comasată a celor patru flavonoide (12 săptămâni), descrise mai sus, adjuvante în terapia asupra CKD, izolate fiind din nutriceutice, conform lui PENG (2012) a presupus următoarele rezultate: în ceea ce privește edemul renal cel mai eficient candidat terapeutic este quercetina, cu scoruri bune în hipertensiune, hematocrit, creatinină serică, amiloidoza glomerulară, cardiopatie, calcificarea aortei, depunerea de colagen și epuizarea eritrocitelor în măduva osoasă. De asemenea, quercetinul a contribuit la restabilirea parțială a ratei de filtrare glomerulară, albuminuriei, colesterolului seric, albuminuriei, azotului de uree în sânge, trigliceridelor, superoxid dismutazei, malondialdehidei. Sub spectul semnalelor intracelulare a quercitinei, eficientă în inactivarea caspazei-3, parțial în suprimarea Bax și Bad, salvarea ADN-ului și restabilirea Bcl-2 (PENG, 2012). În concluzie, comparativ cu rutina, neringenina, catechina, quercetinul are statusul de candidat terapeutic mai bun, în terapia CKD.

Tot în această direcție, YAGMURCA (2015) identifică pe baza rezultatelor histologice, capacitatea quercetinului de a prevenii leziunile renale cauzate de doxorubicină. Administrare pe cale orală (20 mg/kg) a quercetinului la șaizeci de şobolani, în nefrotoxicitatea dată de doxorubicină și examinarea leziunilor la nivelul rinichiilor, s-a realizat, conform studiului, prin tehnica colorării cu hematoxilină-eozină (HE). La nivel microscopic, leziunile semnificate cauzate de doxorubicină sunt restrangerea spațiului bowman, dilatația tubulară cu creșterea vacuoletelor tubulare renale, vacuolizarea glomerulară și infiltrarea interstitială. Studiul concluzionează că afecțiunea renală indusă de doxorubicină se reduce la administrarea de quercetin (YAGMURCA, 2015)

În ceea ce privesc studiile în care rutin implică efecte definitoare de protecție a rinichiilor în implicațiile tratamentul nefropatiei induse de medicamente (KAMEL, 2014) a ischemiei-reperfuziei (KORKMAZ, 2013; KORKMAZ, 2010) sau a nefropatiei diabetice (KAMALAKKANNAN, 2006), HAN, 2015 supune atenției un model de rinichi cu nefrectomie (5/6 din masa renală) la şobolanii din linia Wistar. Leziunile renale și exprimarea moleculelor pro-fibrotice a celulelor renale, au contribuit la hipertensiunea sistemică împreună cu proteinuria. Este unanim valabil uzitarea nefrectomiei la un model animal, ce copiază nefropatia avansată, în glomeruloscleroză (SASAKI, 2011). Astfel, în studiul prezentat şobolanii dezvoltă insuficiență renală cronică prin nefrectomia 5/6. Schema de tratament prevede administrarea pe cale orală a două proporții de rutin (15 și 45 mg/kg) și losartan (10 mg /kg), timp de 20 de săptămâni; Pe lângă analiza funcției renale și a modificărilor histopatologice, pentru a înțelegere modul de acțiune benefic a rutinei s-a cuantificat și nivelul de proteină TGFβ1 din rinichi. Concluziile acestui studiu spun că în baza demonstrării inhibării expresiei TGFβ1, rutin reduce creatinina din sânge, proteinuria și stresul oxidativ din rinichi.

Monitorizarea trasabilității unor compuși bioactivi de interes pe stadii de dezvoltare morfologică a fructelor de soc și evaluarea unui preparat fitoterapeutic cu efect nefroprotector

Prin examinarea histologică, în dependență de doza de rutin administrată, acesta a scăzut scorul de glomerulare și leziunile tubulointerstitionale.

Dovezi științifice de monitorizare a stresului oxidativ al rinichiilor, susțin că hipercolesterolemia accentuează leziunile renale la modelele animale cu insuficiență renală (MORI, 2012; ZOU, 2003; WILSON, 2003). Rămanad tot în sfera de acțiune a rutinului, AL-REJAIE (2012), identifică avatajele suplimării de rutin și/sau acid ascorbic, într-o dietă bogată în colesterol la șobolanii Wistar albino, asupra nefrotoxicității induse, precum și diferențele de gen ca răspuns. Efectul protector renal testat pe 96 de șobolani, cu administrare de rutin sau alături de acid ascorbic timp de 6 săptămâni, afirmă că dieta cu conținut ridicat de colesterol induce nefrotoxicitatea cu relevanță mai mare la femele decât la masculi. Astfel că scorul de apărare a stresului oxidativ la rinchiul masculin este mai bun, comparativ cu cel femel. Sinergismul rutinului cu acidul ascorbic, acționează favorabil prin faptul că speciile reactive de oxigen scad peroxidarea lipidică, fapt ce atenuază leziunile renale induse de hipercolesterolemie la șobolanii Wistar albion.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

4. Ipoteza de lucru și obiective generale

4. Hypotheses and general objectives

Scopul prim al cercetărilor constă în cuantificarea și testarea unor compuși bioactivi, din structura trasabilității morfologice a arbustului de soc, în vederea selectării unui compus fitoterapic cu efect nefroprotector și antioxidant. Corelarea aspectele biochimice, de modificatori naturali ai răspunsului biologic cu cele clinice, hematologice și histopatologice, din perspectiva potențialului bioactiv a socalui, în tratamentul insuficienței renale constituie background-ul prezentei cercetări.

În ceea ce privește posibilitatea valorificării, în targhet superioar, a compușilor bioactivi din soc, sunt abordate următoarele direcții de cercetare cu obiectivele individualizate:

I. Studiul extractelor naturale ale diferitelor specii de soc și monitorizarea trasabilității unor compuși bioactivi de interes, pe stadii de dezvoltare morfologică a fructelor.

- Evaluarea indicilor fizici și chimici pe parcursul creșterii și dezvoltării arbustului în dinamica acumulării florilor și fructelor, la două genotipuri de soc (flora spontană *Sambucus nigra* L. /cultivată *Sambucus nigra Haschberg*);
- Identificarea și cuantificarea pigmentilor și a proprietăților antioxidantă a două genotipuri de soc (flora spontană *Sambucus nigra* L. /cultivată *Sambucus nigra Haschberg*), luate în studiu pe parcursul dezvoltării, prin analiza spectroscopică UV-VIS.
- Evidențierea și cuantificarea trasabilității unor compuși de interes (acizi organici, zaharuri, compuși de aromă), prin tehnici cromatografice la două genotipuri de soc (flora spontană *Sambucus nigra* L. /cultivată *Sambucus nigra Haschberg*), pe parcursul dezvoltării;
- Evaluarea amprentei extractelor metanolice a două genotipuri de soc (flora spontană *Sambucus nigra* L./cultivată *Sambucus nigra Haschberg*), prin spectroscopie FT-IR (Fourier-transform infrared spectroscopy);
- Reliefarea unor compuși specifici prin aplicarea metodei statistice de analiză PCA;

II. Testarea eficienței principiilor active din extractul de flori de soc în insuficiența renală indușă experimental pe model animal.

- Obținerea extractului fitoterapic din inflorescențe de *Sambucus nigra* L.
- Determinarea dozei medii a extractului fitoterapic pentru administrarea la șobolanii din linia Wistar;
- Realizarea modelului experimental de IR;

- Determinarea modificărilor biochimice, respectiv concentrațiile plasmatice de creatinină și uree, la animalele cu IR indusă experimental și tratate cu extract fitoterapic din flori de soc;
- Modificări biochimice întâlnite în concentrația indiceului NAG urinar la animalele cu IR indusă experimental și tratate cu extract fitoterapic din flori de soc;
- Evaluarea stresului oxidativ în urma administrării compusului fitoterapic la animalele cu IR indusă experimental și tratate cu extract fitoterapic din flori de soc;
- Evaluarea modificărilor histopatologice ale rinichiului, surprinse în timpul administrării compusului fitoterapic;

4.1 Taxoni pentru studiu

4.1 Study Taxons

Pentru realizarea cercetărilor din cadrul experimentelor propuse, s-a folosit material organic, soc, provenit din flora spontană (specia *Sambucus nigra* L.), din proximitatea orașului Cluj-Napoca și *Sambucus nigra Haschberg* din satul Mânău, Maramureș. Figura 4.3 indică aspecte ale variantelor luate în studiu, precum și modalitatea de codificare a probelor de soc (total 36 probe).

Protocolul de lucru aplicat pentru conservarea probelor de soc constă în congelarea materialului organic, la -18 °C, în ambalaj de polietilenă sub vid.

4.2 Model experimental

4.2 Experimental model

În vedere realizării celor două direcții majore de cercetare, conform figurii 4.2 s-a elaborat un model experimental general ce include atât partea de caracterizare a materialului organic luat în studiu (fiecare bulină are ca și corespondent o etapă morfologică de dezvoltare a fructului de soc, plus pedunculul adiacent), cât și aplicabilitatea unei rezultante din ciclul dezvoltării socalui (florile de soc), care în urma profilului biochimic testat, are toate atributele unui răspuns pozitiv în ameliorarea leziunilor tubulare renale (fig. 4.1; 4.2).



Fig 4.1 Schema determinărilor efectuate din cadrul direcțiilor de cercetare I și II

Fig. 4.1 Directions Research Program I and II

Monitorizarea trasabilității unor compuși bioactivi de interes pe stadii de dezvoltare morfologică a fructelor de soc și evaluarea unui preparat fitoterapeutic cu efect nefroprotector

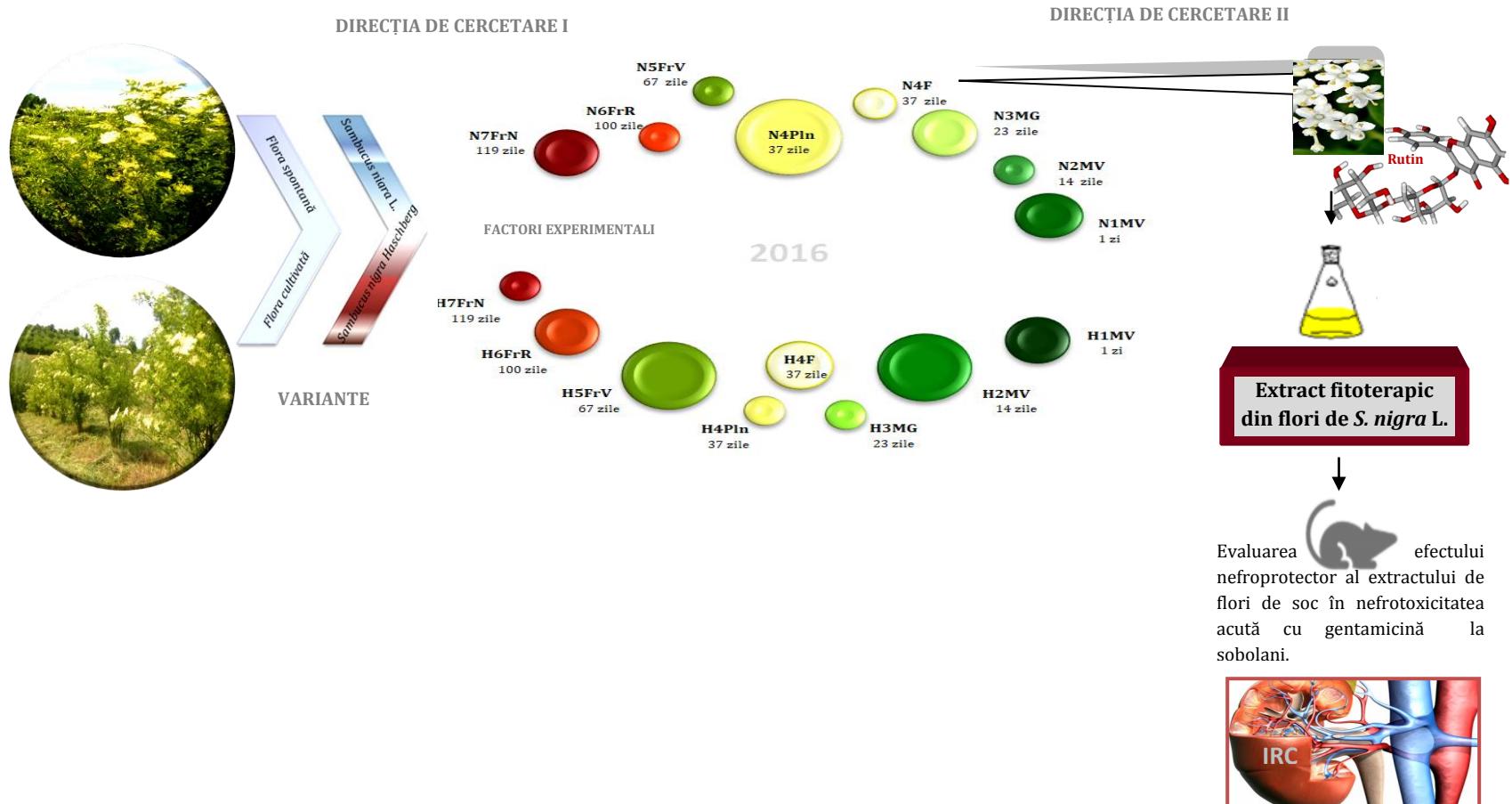
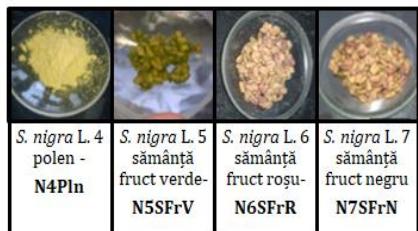
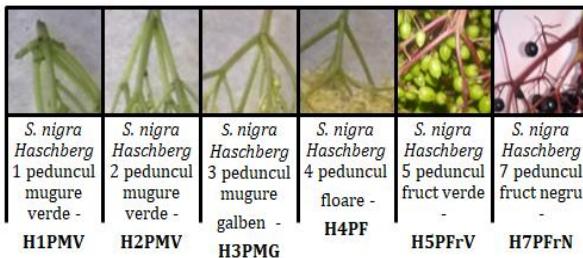
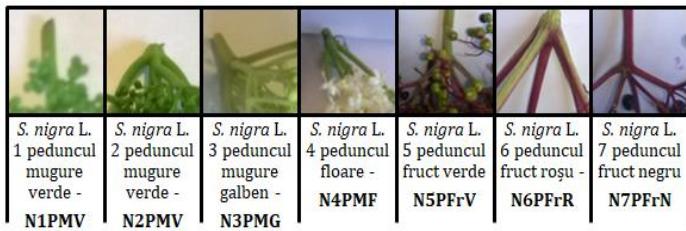
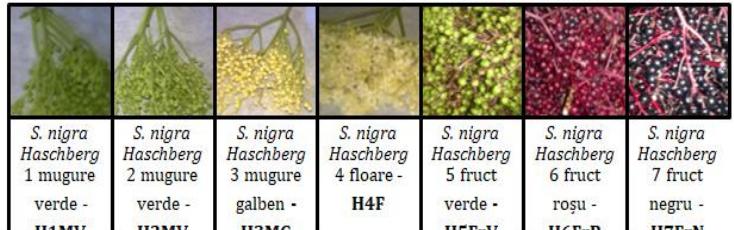
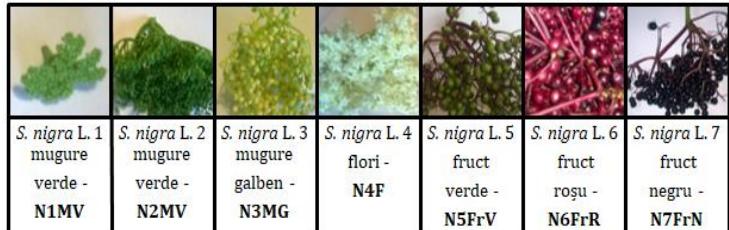


Fig 4.2 Protocolul experimental al cercetărilor privind monitorizarea trasabilității unor compuși bioactivi de interes pe stadii de dezvoltare morfologică a fructelor de soc și evaluarea unui preparat fitoterapeutic cu efect nefroprotector

Fig 4.2 Experimental design of research regarding the monitoring the traceability of bioactive compounds of interest on stages of morphological development of the elderberry and the evaluation of a phytotherapeutic product with a nephroprotective effect



a.



b.

Fig. 4.3 Material experimental – codificare probe: a. Specia *Sambucus nigra* L. b. Specia *Sambucus nigra* Haschberg
 Fig. 4.3 Experimental material - samples codification: a. Specia *Sambucus nigra* L. b. Specia *Sambucus nigra* Haschberg

5. Material și metodă

5. Material and method

5.1. Metode experimentale utilizate în determinarea claselor de compuși biochimici din diferite genotipuri de soc

5.1 Experimental methods used in the determination of classes of biochemical compounds from different elder genotypes

5.1.1 Indici fizico-chimici

5.1.1 Physico-chemical evaluation

5.1.1.1 Determinarea umidității

5.1.1.1.1 Moisture determination

Conform SR EN ISO 712:2010, probele de soc sunt supuse pentru evaluarea valorii conținutului de apă, indice fizico-chimic ușual și echivoc important pentru analizele ulterioare. O masă a probei de 3 g, supusă la 103°C (etuvă electrică termoreglabilă), este adusă la masă constantă. Rezultatele obținute sunt calculate după formula: $S_U (\%) = (G_1 - G_g) / (G_0 - G_g) \times 100$; $U_p (\%) = 100 - S_U$ unde: G_g -masa fiolei goale (g), G_0 -masa fiolei cu probă înainte de uscare (g), G_1 -masa fiolei cu probă după uscare (g) S_U -substanță uscată (%) U_p -umiditate probă (%).

5.1.1.2 Determinarea și cantificarea substanțelor minerale totale

5.1.1.2 Determination and quantification of total mineral substances.

Metoda utilizată a urmat protocolul de lucru de mai jos, determinarea substanțelor minerale făcându-se prin calcinare (600 °C), până la rezultatul unei colorații albe a cenușei din probă, conform SR EN ISO 2171:2010. O cantitate stabilită din probă de analizat (3 g), cântărită într-un creuzet tarat și calcinat anterior, este introdus în cuproul calcinatorului. La un interval de o oră, după răcirea probei, se constată ne/existența punctelor negre de cărbune. Remedirea acestor puncte se face prin umectare cu apă, iar mai apoi probele de soc, se calcinează până la culoarea alb/cenușiu, într-un timp total de 6 ore. Procentul de substanțe minerale totale este calculat: $C_n (\%) = (G_n / m) \times 100$, unde: G_n (valoarea substanțelor minereale după calcinare (g); m (valoarea probei luată în studiu (g);

5.1.1.3 Cuantificarea mineralelor prin spectroscopie de absorbție atomică

5.1.1.3 Determination of mineral content by atomic absorption spectroscopy

Evaluarea micro- și macroelementelor (Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Se, Zn), prin spectrometria de absorbție atomică (SAA), cuplată cu atomizare în

cupitorul de grafit THGA, s-a realizat conform metodei descrise de PAŞCA CLAUDIA (2017). Echipamentul utilizat constă în spectrometru Aanalyst 800, având un cupor de grafit a cărui încălzire electrică este transversală. Tensiunea aplicată este transversală pe tub, adiacentă pe fascicul de lumină, iar spre final electromagnetul creează un câmp magnetic, a cărui traекторie este paralelă cu fascicul propagat de lampă. Proba de analiză parcurge trei etape (uscare, urmată de piroliză și atomizare), datorate temperaturii în creștere a tubului.

Utilizând cupotorul de calcinare "Berghof microwawe digestion system MWS-2", s-a efectuat mineralizarea probelor de soc. Se cântăresc 0.3 ± 0.01 g probă mărunțită și se omogenizează cu 2 ml soluție de HNO_3 (65%), după care urmează un timp de repaus de 15 minute (fig. 5.1). Înainte de închiderea ermetică a recipientelor cu probă se adaugă 3 ml de H_2O_2 (PAŞCA CLAUDIA, 2017).

Tabelul 5.1

Parametrii pentru digestia acidă a probelor de soc*Table . Parameters for acid digestion in elder samples*

Etape Steps	1	2	3
	145	170	100
Putere [%]	75	90	40
Timp [min]	5	10	10

Transvazarea soluției se realizează la finele programului inițial, în recipiente de grădate. În cazul probelor de soc, până la gradația de 125 ml se aduc la semn cu apă ultrapură. Injectarea probelor de soc în SAA cu autosampler AS-800, se efectuează imediat după mineralizare. În ceea ce privește trasarea curbei de calibrare se utilizează: calciu ($2 \mu\text{g/l}$), cadmiu ($2.0 \mu\text{g/l}$), crom ($10 \mu\text{g/l}$), cupru ($25 \mu\text{g/l}$), fier ($20 \mu\text{g/l}$), potasiu ($5.0 \mu\text{g/l}$), magneziu ($1.0 \mu\text{g/l}$), mangan ($10 \mu\text{g/l}$), sodiu ($4.0 \mu\text{g/l}$), nichel ($50 \mu\text{g/l}$), plumb ($50 \mu\text{g/l}$), seleniu ($100 \mu\text{g/l}$), zinc ($2.0 \mu\text{g/l}$), ca diluții a soluțiilor standard (PERKINELMER INSTRUMENTS LLC, 1999). Rezultatele permit exprimarea lor ca valoare medie aritmetică, în mg/kg probă ca tare.

Concentrația elementelor minerale din probe de soc exprimată în mg/kg, se calculează astfel:

$$\text{Concentrația finală [mg/kg]} = \frac{\text{concentrația inițială} \left[\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right] * \text{diluția [ml]}}{\text{masa probei [g]}}$$

5.1.2 Indici ai proprietăților antioxidantă

5.1.2 Indications of antioxidant properties

5.1.2.1 Protocol de obținere a extractelor metanolice

5.1.2.1 Protocol of obtaining methanolic extracts

Protocol de obținere a extractelor metanolice din proble de soc a urmat metoda propusă de (DUYUMUS, 2014), cu unele modificări. Alegerea metanolului ca solvent de extracție s-a făcut în baza considerentelor: punct de fierbere scăzut ce implică concentrarea extractului mult mai rapid și date comparative cu alți solvenți testați pe probe similare de soc, ce evidențiază metanolul ca prim solvent de extracție rapidă, conform lui INES SEABRAA (2010).

Proba fin măruntită (1 g) și omogenizată rapid cu 100 ml MeOH este agitată utilizând centrifugă tip Sigma model 2-5 (4000 rpm), 10 minute. Operația de extracție continuă prin macerare la întuneric, timp de 24 ore, la temperatura de 3-6°C. Supernatantul rezultat este concentrat la 35°C sub presiune redusă (Rotavap Laborata 4010 Digital, Heidolph). Extractul obținut din aducerea la sec, este recuperat în 10 ml MeOH și depozitat la -18°C. Înainte de păstrare, se filtrează cu filtre Millipore de 0.45 µm, extractul rezultat. Procedura de obținere a extractelor metanolice este prezentată schematic în figura 5.1.

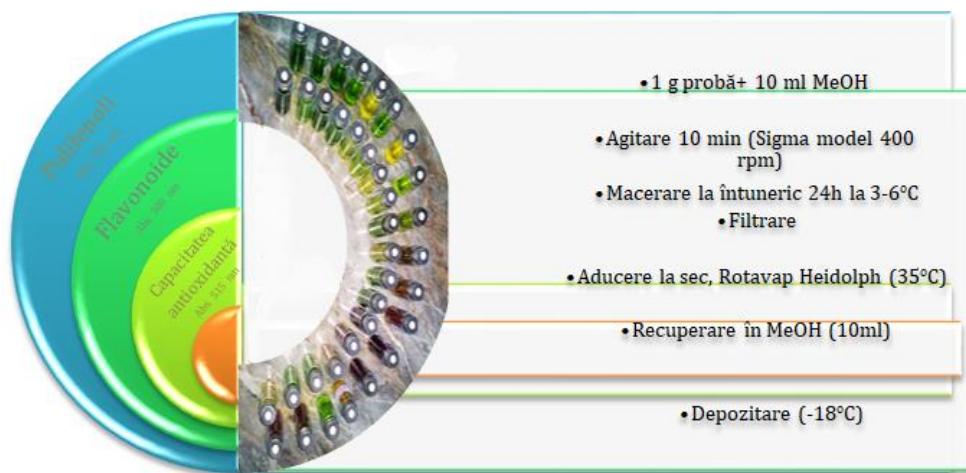


Fig. 5.1 Protocolul aplicat pentru obținerea extractului metanolic

Fig.5.1 The protocol applied for obtaining the methanolic extract

5.1.2.2 Determinarea conținutului total de polifenoli

5.1.2.2 Determination of total polyphenols

Aplicând metoda spectrofotometrică Folin-Ciocâlteu, descrisă de MUREŞAN ELENA (2014), cantificarea polifenolilor a presupus următoarele: peste 25 µl de extract metanolic se adaugă 1.8 ml apă distilată și 120 µl de reactiv Folin-Ciocâlteu; pentru a crea un pH~10, la un interval de 5 minute, se adaugă 340 µl soluție de Na₂CO₃ (7.5%), realizându-se astfel reacția dintre compușii fenolici și reactivul folosit. A urmat o incubare a probelor timp de 90 de minute la temperatura camerei, după care s-a citit absorbanța cu ajutorul unui spectrofotometru Shimadzu UV-VIS 1700, la 750 nm. Proba de referință a fost reprezentată de metanol. Curba de calibrare s-a realizat utilizând concentrații de 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1 mg/ml de acid galic. Conținutul total de polifenoli din probele analizate este exprimat în echivalenti acid galic, mg GAE/100 g probă (MUREŞAN ELENA, 2012). Determinarea s-a realizat în duplicat.

5.1.2.3 Determinarea și cantificarea conținutului total de flavonoide

5.1.2.3 Determination and quantification of total flavonoid content

Protocolul de lucru în vederea determinării flavonoidelor totale din probele de soc a urmat metoda colorimetrică descrisă de KIM (2003). Prima etapă a constat în diluarea cu apă distilată a extractelor metanolice, până la un volum de 5 ml și adăugarea de 300 µl de NaNO₂ (5%). După un repaus de 5 minute, amestecul a fost omogenizat cu 300 µl AlCl₃ (10%) iar după 6 minute, cu 2 ml NaOH (1 N). Apoi s-a trecut la etapa de citire a absorbanței, utilizând un spectrofotometru UV-VIS 1700 Shimadzu, la 500 nm. Conținutul de flavonoide totale, efectuat în duplicat, este exprimată în mg echivalent quercetin/100 g de probă ca atare, curba de calibrare fiind realizată utilizând soluții de quercitină de diferite concentrații (0, 0.25, 0.50, 0.75, 1 mg/ml QE).

Cantificarea conținutului total de flavonoide s-a realizat prin metoda HPLC-DAD-ESI⁺, descrisă de BUNEA (2013), cu unele modificări. Faza mobilă reprezentată de amestecul de apă și 0,1 % acid acetic, respectiv faza mobilă B formată din acetonitril și aceeași cantitate de acid acetic, au fost supuse, în vederea distincției compușilor fenolici din soc, pe coloana Eclipse XDB C18, cu parametrii gradientului (B de la 5% la 40% (0-18 minute), B de la 40% la 90% (8-24 minute), B de la 90% la 5% (24-30 minute), debit de 0,5 ml/minut, la 25⁰ C. Lungimea de undă a cromatogramelor este de 280, 340 și 520 nm, iar spectrul cuprinde aceleași valori, pentru peak-uri, din domeniul 200-600 nm. În ceea ce prevede MS s-a uzitat modul ESI pozitiv de ionizare având condițiile de lucru: debit azot 8 l/minut, capillary voltage 3000 V, m/z 100-1000 full-scan, temperatura de lucru 300⁰ C. Softul pentru interpretarea datelor este reprezentat de Agilent ChemStation.

5.1.2.4 Determinarea capacitatei antioxidantă

5.1.2.4 Determination of radical scavenging capacity

Metoda de lucru propusă de către DAWIDOWICZ (2006) și VLAIC ROMINA (2017), cu unele modificări, permite estimarea capacitatei de reducere a radicalilor liberi folosind o soluție de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), și adoptată pentru evaluarea activității antioxidantă a extractelor examineate. Peste soluție de DPPH (0.025g/l) 3.9 ml se adaugă 100 µl din extractul metanolic al probelor de analizat. Amestecul format este omogenizat corespunzător și după un interval de timp (30 minute), păstrat la întuneric se înregistrează absorbanța probelor la 515 nm (UV-VIS 1700 Shimadzu). Soluția de control este preparată după același protocol însă înlocuind cei 100 µl de probă (extract metanolic) cu metanol. Rezultatele sunt evaluate ca procentaj al capacitatei de inhibiție, pe baza următoarei ecuații: DPPH scavenging effect (%) = [(A_c - A_p) × 100]/ A_c, unde: A_c – absorbanța soluției de control (nm); A_p – absorbanța probei (nm).

5.1.2.5 Determinarea pigmentelor clorofilieni

5.1.2.5 Determination of chlorophyll pigments

În ceea ce privește metoda de extracție a pigmentelor clorofilieni din probele de soc, s-a urmărit protocolul descris de BARROS (2011), cu unele modificări aduse. Proba măruntită (1 g) este omogenizată la scurt timp, într-un mojar cu 15 ml acetonă de concentrație 80%, realizându-se extracții succesive. Extractele sunt centrifugate timp de 10 minute la 5000 rpm, urmând citirea absorbanței la 645 respectiv 663 nm. Determinarea se realizează în condiții semiobscură.

Cantitativ clorofila s-a calculat conform ecuațiilor aplicate de VLAIC ROMINA (2018): Cl_a (mg g⁻¹) = [(12.7 × A₆₆₃) - (2.6 × A₆₄₅)] × ml acetonă/mg probă; Cl_b (mg g⁻¹) = [(22.9 × A₆₄₅) - (4.68 × A₆₆₃)] × ml acetonă/mg probă; Cl_T = Cl_a + Cl_b unde: Cl_a – clorofila a; Cl_b – clorofila b; A₆₆₃ – absorbanța la 663 nm; A₆₄₅ – absorbanța la 645 nm; Cl_T – clorofila totală.

5.1.2.6 Determinarea vitaminei C

5.1.2.6 Determination of vitamin C

Principiul de bază în cuantificarea vitaminei C din proble de soc îl constituie extragerea probei de analizat într-un amestec de metanol, apă, sau ambele și analiza la PHOTOCHEM, realizându-se astfel combinația excitării fotochimice a radicalilor cu detecția luminometrică. Reactivi utilizati: Kit ACW (soluție de diluare pentru probe hidrosolubile, soluție standard de antioxidant, soluție tampon, soluție de fotosensibilizator), Kit ACL (soluție tampon, soluție standard de antioxidant, soluție de fotosensibilizator,), metanol, apa ultrapură. Din proba de soc, se omogenizează 0.5 g, într-un flacon de plastic (de 50 ml) peste care se adaugă 5 ml soluția de extractie,

urmând a fi centrifugate 5 minute 10 000 rpm. Supernatantul recuperat va fi luat în analizare. Rezultatul este exprimat în echivalent trolox, fiind evaluat după ecuația: Concentrație acid ascorbic ($\mu\text{g}/\text{ml}$) = $(Q \times D \times M) / V$, în care: Q - nmol trolox citit de aparat; D- factorul de diluție; M- masa moleculară (trolox=250,3 ng/nmol); V- volumul pipetat în eprubeta;

5.1.3 Evidențierea trasabilității unor compuși de interes prin tehnici cromatografice

5.1.3 Highlighting traceability of compounds of interest through chromatographic techniques

5.1.3.1 Determinarea acizilor organici

5.1.3.1 Determination of organic acids

Pentru extracția metaboliștilor primari reprezentați, în cazul de față de acizi organici, s-a stabilit două protocoale de lucru distințe, impuse datorită specificității probelor de soc, respectiv pentru probele de bace de soc (inclusiv mugurii florali), și pentru inflorescențele de soc. Extracția acizilor organici din bacele de soc a presupus următoarele etape: omogenizarea la Centrifuga HETTICH Universal 320 R, a 5 g bace de soc cu 25 ml apă dublu distilată, etapă urmată de rapaus la temperatură camerei timp de 30 de minute, conform metodei aplicate de MIKULIC-PETKOVSEK (2016) cu mici modificări. Totodată, conform acelaiași autor, pregătirea infuziei florale de soc a constat în infuzarea a 0,5 g de flori de soc cu 80 ml apă distilată în jurul temperaturii de fierbe, timp de 5 minute. Infuziile rezultate sunt filtrate și centrifugate (HETTICH Universal 320 R) la 12,857 g timp de 7 minute. Supernatantul s-a filtrat prin filtre Millipore 0.45 μm utilizându-se mai departe în analiză 10 μL de probă. Determinarea propriu-zisă a acizilor organici s-a efectuat utilizând sistemul HPLC-PDA, cuplat cu detector UV-VIS cu retea de fotodiode setată la 202 nm, utilizând o coloană Atlantis d C18 (250mm x 4,6 mm, 5 μm) de la Waters la temperatură de 30°C. S-a lucrat în mod izocratic cu faza mobilă constituită din tampon fosfat 15mM la pH 2.4. cu un debit de 0.6 ml/minut, într-un timp total de separare de 60 de minute. În baza timpilor de retenție și a spectrelor rezultate pentru standardele de acizi, s-a procedat în identificarea acizilor organici. Cuantificarea acestor metaboliți s-a calculat conform curbelor de calibrare pentru fiecare acid în parte, rezultatul exprimându-se în g/kg probă ca atare.

5.1.3.2 Determinarea zaharurilor

5.1.3.2 Determination of sugars

Pentru cuantificarea carbohidrațiilor din probele de soc este reprezentată de HPLC-ul Jasco (Japonia). Acest echipament este format din pompă (PU-980), unitate cu gradient ternar (LG-980-02), termostat de coloană (CO-2060 Plus), detector (RI-

2031Plus) și o supapă de injecție (Rheodyne), cu un volum al probei de 20 µl, protocolul de lucru fiind adaptat după FILIP MIUȚA (2016). Separarea compușilor s-a efectuat pe o coloană model CARBOSep COREGel 87°C, precoloană tip CARBOSep 87C și un cartuș CARBOSep COREGel 87C, la o temperatură de 70°C (faza staționară). Viteza de eluție ($0,5 \text{ ml/min}^{-1}$), detecție RI, apă bidistilată ($18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$), reprezintă faza mobilă. Probele de soc, sunt pregătite în prealabil în vederea injectării la HPLC, prin metoda descrisă la cuantificarea aciziilor organici din soc (capitol 5.1.3.1), conform lui MIKULIC-PETKOVSEK (2016). În ceea ce privește proveniența standardelor (fructoză, zaharoză, glucază), acestea provin de la Aldrich (Milwaukee, USA), iar programul pentru prelucrarea datelor este soft ChromPASS. Liniaritatea citirii curbei de calibrare s-a stabilită cu un amestec standard la cinci concentrații diferite (între 0,333 și 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) cu o regresie $R^2 > 0,998$. S-a convenit folosirea, pe întreg procesul de detecție, a apei Millipore ($18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$). Rezultatele probelor de soc exprimate în µg conținut de carbohidrați/ml extract.

5.1.3.3 Determinarea compușilor de aromă

5.1.3.3 Determination of volatile compounds

Analiza calitativă a compușilor volatili din probele de soc s-a efectuat cu ajutorul tehnicii ITEX/GC-MS (“in-tube extraction” cuplată cu cromatografia de gaze și spectrometria de masă), folosindu-se un echipament GC-MS Shimadzu (Model QP-2010 cu autosampler Combi-PAL AOC-5000 (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) și coloană capilară ZB- 5ms (Phenomenex, USA). Metoda de lucru aplicată a fost în concordanță cu metoda descrisă de SONIA SOCACI (2013), cu unele modificări. Astfel, în fiole distințe headspace, se introduce o cantitate stabilită (1 g), din fiecare probă de analiză, urmate de o agitare continuă în condiții de incubare (60°C), timp de 20 minute. Adsorbirea compușilor volatili acumulați în faza de headspace s-a realizat cu o siringă, în fibra Tenax (ITEX-2TRAPXTA, Tenax ta 80/100 mesh, Switzerland) iar desorbția termică este făcută în injectorul echipamentului. Trecerea unu curent de N₂ după fiecare probă de analiză în parte, asigură curățarea fibrei de Tenax. Parametrii de lucru a coloanei cromatografice sunt: 12 minute cu menținerea temperaturii de 35°C; creșterea cu o marjă de 5°C/minut, până la temperatura de 105°C; creșterea din nou a temperaturii până la 135°C cu 2°C/minut, pentru ca în final coloană să atingă temperatura de 230°C, cu menținerea temperaturii (5 minute). Heliul (gazul purtător) a înregistrat un debit constant în valori de 1ml/minut. Temperatura interfaței, precum și a injectorului a fost de 250°C. În modul de ionizare cu impact electronic s-a utilizat detectorul MS într-un interval a scanării de 40-350 m/z, iar raportul de splitare fiind 1:20. Compararea cu spectrele de masă a bibliotecilor (NIST147, NIST27), a constat la baza nominalizării compușilor volatili separați, iar o prealabilă verificare s-a realizat cu indicii de retenție furnizați de bazele de date www.flavornet.org și

www.pherobase.com. Exprimarea rezultatului se face ca procent (100%) din aria totală a picurilor.

5.1.3.4 Determinarea spectrelor FT- IR (Fourier Transform Infrared Spectrometer) pentru probele de soc analizate

5.1.3.4 FTIR spectrometers (Fourier Transform Infrared Spectrometer) of elderberry samples

Inregistrarea spectrelor FT-IR a probelor de soc, după ce în prealabil acestea sunt centrifugate 15 minute la 3000 rot/minut, s-a efectuat direct folosind spectofotometrului Shimadzu IR Prestige 21 accesorizat cu HATR ZnSe (Horizontal Attenuated Total Reflectance). În domeniul lungimii de undă cuprinse între 600-4000 cm⁻¹, s-au identificat valorile spectrale, cu o rezoluție de 4 cm⁻¹ și 64 scanari/spectru. Un volum de 100 µl extract metanolic a fost evaporat pe accesoriul HATR. Identificarea benzilor de absorbție în concordanță cu tipul și gruparea funcțională, s-a stabilit pentru probele în lucru pe domeniul 600-1800 cm⁻¹, 2800-3100 cm⁻¹. În baza programelor OriginR 7SR1 Software (OriginLab Corporation, Northampton, USA) și Ir solution Software Overview (Shimadzu), rezultatele au fost prelucrate (SOCACIU CARMEN 2009).

5.2 Metode experimentale utilizate în evaluarea unui compus fitoterapic cu efect nefroprotector și antioxidant

5.2 Experimental methods used to evaluate a phytotherapeutic compound with a nephroprotective and antioxidant effect

5.2.1 Protocol de obținere a compusului fitoterapic în vederea administrației "in vivo"

5.2.1 Protocol for obtaining the phytotherapeutic compound for "in vivo" administration

5.2.1.1. Colectarea și prelucrarea inflorescențelor de soc

5.2.1.1. Collection and processing of elder inflorescences

Pentru realizarea cercetarilor din cadrul experimentelor propuse, s-a folosit material organic reprezentat de inflorescențe de soc (specia *Sambucus nigra* L.), provenite din proximitatea orașului Cluj-Napoca, Romania, aparținând florei spontane. O parte din inflorescențele recoltate sunt congelate la -18 °C, în ambalaj de polietilenă sub vid, iar o altă parte sunt supuse uscării timp de 10 zile (loc uscat), la întuneric (fig. 5.2).



Fig.5.2 Protocolul de lucru aplicat pentru conservarea probelor de flori de soc: N4FC- *S. nigra* L. flori congelate (1.), N4FU- *S. nigra* L. flori uscate (2.)

Fig.5.2 The protocol applied for the preservation of the elderflowers samples: N4FC- *S. nigra* L. flori congelate (1.), N4FU- *S. nigra* L. flori uscate (2.)

5.2.1.2 Determinarea cantitativă a compușilor fenolici din florile de soc

5.2.1.2 Quantitative determination

Determinarea compușilor fenolici din probele luate în studiu N4FU și N4FC (inflorescențe fără peduncul), s-a făcut după metoda propusă de MIKULIC-PETKOVSEK (2015), cu unele modificări. Ca solvent s-a ales etanolul, unde s-a adăugat 1 g de probă măruntită, omogenizându-se după care a fost lăsată în repaus 24 h la 2°-3°C. Folosind Rotavapul Laborata 4010 Digital, Heidolph, proba a fost adusă la sec, iar extractul rezultat recuperat în 10 ml etanol, filtrat prin filtre Millipore de 0.45 µm și păstrat la -20°C până la analizare.

Analizele s-au efectuat conform metodei descrise de FILIP MIUȚA (2017), utilizând un cromatograf de lichide de înaltă performanță (HPLC) Jasco (Japonia) echipat cu o pompă HPLC, un termostat de coloană, o unitate de gradient ternar, un detector UV/VIS și o supapă de injecție cu buclă de probă de 20 µL (Rheodyne) (seringă Hamilton Rheodyne de 50 ml) de probă. Prelucrarea datelor experimentale s-a realizat cu software-ul ChromPass. Condițiile de separare a flavonoidelor și a acizilor fenolici s-a efectuat pe coloană Lichrosorb RP-C18 (25 x 0,46 cm) la temperatura coloanei de 22 ° C și detecție UV la 270 nm. Faza mobilă a fost un amestec de metanol (grad A, grad HPLC) și soluție de acid formic 0,1% (apă ultrapură Milipore) și s-a aplicat un gradient conform următoarei metode: 0-10 min, gradient liniar 10-25% A; 10-25 min, gradient liniar 25-30% A; 25-50 min, gradient liniar 35-50% A; 50-70 min, izocratic 50% A. Viteza de curgere a fost de 1 ml/min și volumul injectorului a fost de 20 µl. Toți compușii au fost identificați prin compararea timpilor lor de eluare cu cei ai compușilor standard în aceeași condiții HPLC (FILIP MIUȚA, 2017).

5.2.1.3 Model experimental privind obținerea compusului fitoterapeutic din flori de soc (*Sambucus nigra* L.)

5.2.1.3 Experimental model for obtaining the phyto-therapeutic compound from elderflowers (*Sambucus nigra* L.)

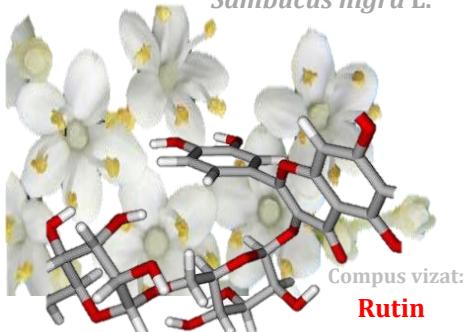
Protocolul de lucru privind obținerea extractului etanic din flori de soc (*Sambucus nigra* L.), în vederea administrării "in vivo" este prezentat în figura 5.3. S-a utilizat proba N4FC (fără peduncul), pentru obținerea unei "tincturi mame", probă ce a

dovedit, comparativ cu N4FU, un conținut mai ridicat în rutin (tabel 6.12, din cap. 6.1.2). Totuși discriminarea probelor și afirmarea valorificării inflorescențelor de soc s-a făcut în baza rezultatelor obținute din Direcția I de cercetare, fapt stabilit încă din obiectivele lucrării, unde în capitolul 6.3.1.3. reiese faptul că acumularea maximă de rutin se află în florile de soc, comparativ cu celelalte probe. Marticea de lucru fiind aleasă, reprezentând inflorescențele de soc, a urmat elucidarea genotipului, însemnând *Sambucus nigra L.* și *Sambucus nigra Haschberg*, se pretează cel mai eficient într-un viitor preparat fitoterapeutic.

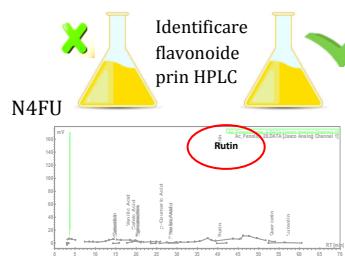
Considerentul care a stat la baza valorificării inflorescențelor de *S. nigra L.* a fost largă răspândirea a genotipului, apartinând florei spontane și buna accesibilitate a materialului biologic, tradus printr-un preț de cost scăzut, cu toate că genotipul de cultură *Sambucus nigra Haschberg* a obținut valori mai mari în rutin. S-a luat în lucru 100 g de N4FC fin mojarate, peste care s-a adăugat 1200 ml de etanol, rezultând "tinctura mamă". După un repaus de 24 de h, s-a mers pe măsurarea unor volume de 102.4 ml aduse la sec, cu Rotavapul Laborata 4010 Digital, Heidolph, extractul rezultat fiind recuperat în 32 ml ser fiziological.

Inflorescențe de

Sambucus nigra L.



Extractie
inflorescențe de soc
cu EtOH (1g)
(10ml)

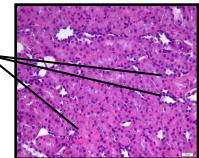


N4FC
Extractie N4FC
(100g) cu EtOH
(1200 ml)



Evaporare Rotavap
t°C 35 (102,4 ml)
extract din flori de soc
recuperat în 32 ml ser
fiziologic

Regenerare tubulară caracterizată prin
epiteliu aplatizat, bazofilie celulară,
aglomerări de nuclei și indice mitotic
crescut, după administrarea extractului
de soc; HE x200, Scale bar=200 μ.



Disease kidney
IRC

Evaluarea efectului
nefroprotector al
extractului de flori
de soc în
nefrotoxicitatea
acută cu
gentamicină la
șobolani.

- ➡ Creatinină și uree
- ➡ Indicele NAG urinar
- ➡ Stres oxidativ
- ➡ Examen histopatologic



Administreare
prin gavaj 1 ml
extract/10 zile;

Şobolani Wistar 4 loturi egale de n=8
Lot 1: 1-7 control (C)
Lot 2: 8-15 martor flori soc (SN)
Lot 3: 16-23 gentamicină (GM)
Lot 4: 24-31 gentamicină + flori soc (GM+SN)

Fig.5.3 Protocolul de lucru privind obținerea extractului fitoterapeutic din inflorescențe de soc (*Sambucus nigra L.*) și modelul experimental IR
Fig.5.3 Experimental model for obtaining the phyto-therapeutic compound from elderflowers (*Sambucus nigra L.*) and the IR experimental model

5.2.2 Testarea eficienței principiilor active din extractul de flori de soc în insuficiență renală indușă experimental pe model animal

5.2.2 Testing the effectiveness of active principles in elderflower extract in renal insufficiency experimentally induced on animal model

5.2.2.1 Modele animale

5.2.2.1 Animal models

Procedura experimentală s-a realizat în conformitate cu Directiva 63/2010/UE și cu legislația națională (Legea nr. 43/2014) precum și cu autorizarea Consiliului de Bioetică al Facultății de Medicină Veterinară din Cluj-Napoca. Șobolanii Wistar masculi (32 indivizi), furnizați de Institutul Național de Cercetare Dezvoltare pentru Microbiologie și Imunologie „Cantacuzino” București, au prezentat o greutate corporală de 250-300 g. Adăpostul modelelor animale au constat din cuști de policarbonat, cu o temperatură controlată (21-22 °C), umiditate (40-60%) și un ciclu de 12/12h lumină/ întuneric.

5.2.2.2 Etica experimentelor și recoltarea probelor biologice

5.2.2.2 Ethics of experiments and sampling of biological samples

Modelele animale au fost împărțite în 4 loturi egale (aleator), constând din 8 indivizi fiecare ($n=8$), studiul a durat timp de 10 zile, iar animalele au primit substanțele luate în studiu zilnic pe cale intraperitoneală respectiv gavaj (cale orala). În lotul 1 control (fără tratament) (C), șobolanii au fost injectați intraperitoneal cu soluție salină normal (NaCl 0.9%). Șobolanii din grupul soc (SN) au primit extractul de soc prin gavaj (1 ml). Șobolanii din grupul gentamicină (GM) au fost injectați cu 100 mg/kg/zi gentamicina sulfat. Șobolanii din grupul gentamicină + extract soc (GM+SN) au fost injectați zilnic cu 100 mg/kg gentamicina și au primit extract de soc prin gavaj.

Insuficiența renală acută (IRA) a fost indușă prin administrare de gentamicină (GM). Utilizată frecvent în tratarea infecțiilor severe cu germenii gram-negativi (valoroasă în sepsis), GM apare ca antibiotic cu spectru larg din clasa aminoglicozidelor. Elementul limitativ în utilizarea clinică a acestui medicament îl reprezintă efectele nefrotoxice și potențialul ototoxic. Nefrotoxicitatea este corespondent direct de acumulare selectivă a gentamicinei în cortexul renal (MORIN, 1980), mai ales în tubulii renali proximali contorți (50-100 de ori mai mari decât serul) și producția de radicali liberi (BALGRADEAN, 2013). Experimentele din ultimele decenii, indică faptul că nefrotoxicitatea indușă de GM are ca și acțiune directă necroza tubulară (în special în tubulul proximal). Lângă toate acestea, se admite că GM crește producția unei generații de specii reactive de oxigen, ce implică o deficiență în activitatea antioxidantă intrinsecă. Așadar, este demonstrabilă aclamarea substanțelor

Monitorizarea trasabilității unor compuși bioactivi de interes pe stadii de dezvoltare morfologică a fructelor de soc și evaluarea unui preparat fitoterapeutic cu efect nefroprotector

cu potențial antioxidant ridicat în prevenția/ameliorarea nefrotoxicității modificate genetic (ABDEL-RAHEEM, 2009; TESLARIU, 2016).

Cele 4 loturi de animale au fost eutanasiate (în a 11-a zi), în camera de eutanasie Isoflurane. S-a gestionat numărul total de probe de sânge, acestea fiind colectate în tuburi heparinizate. În ceea ce privește determinarea creatininei și a ureei, plasma s-a separat prin centrifugare timp de 10 minute, la 3000 rpm, la 4°C. Probele de urină au fost colectate prin chistocenteză (centrifugare timp de 5 minute la 1000 rpm, la 4°C). Supernatantul recoltat, a constituit drept probă în vederea testării indexului NAG, iar pentru evaluarea histologică, s-a colectat și fixat cu o soluție de formaldehidă 10% la temperatura camerei, rinichiul stâng.

5.2.3 Determinări biochimice

5.2.3 Biochemical analysis

5.2.3.1. Determinarea concentrațiilor plasmatic de creatinină și uree

5.2.3.1. Determination of plasma creatinine and urea concentrations

Cuantificarea concentrațiilor plasmatic ale creatininei și ureei s-a efectuat folosind metoda cinetică spectrofotometrică și reacția Jaffe, în acord cu metoda descrisă de (CODEA, 2018). Reacția Jaffe constă în formarea complexului de culoare între creatinină și picratul alcalin (1:1), la 37°C. Citirea s-a realizat după calibrarea spectrofotometrului la lungimea de undă 515 nm. Rezultatele au fost exprimate în mg/dL.

5.2.3.2. Determinarea concentrației indiceului NAG urinar

5.2.3.2. Determination of urinary NAG index concentration

Determinarea activității indexului NAG urinar a presupus următoarele: probele de urină au fost centrifugate la 1000 rpm timp de 5 minute la 4°C, mai apoi s-a măsurat activitatea enzimatică printr-o metodă spectrofotometrică (colorimetrică). Indicele NAG a fost cuantificat utilizând o reacție spectrofotometrică la punctul final, în timp ce concentrația urinară a creatininei a fost determinată printr-o reacție cinetică spectrofotometrică, folosind metoda Jaffe. Indicele NAG urinar s-a calculat prin ecuația:

$$\text{Indice NAG (U/g)} = \frac{\text{activitatea NAG urinară (U/l)}}{\text{concentrația creatininei urinare (g/l)}} \quad (\text{SATO, 2002}).$$

5.2.3.3 Evaluarea stresului oxidativ

5.2.3.3 Evaluation of oxidative stress

Determinarea malondialdehidei (MDA)

Evidențierea stresului oxidativ prin dozarea peroxizilor lipidici prin fluorescență apare ca fiind metoda cea mai uzitată, constând în formarea unui aduct fluorescent, ca rezultat a reacției dintre malondialdehida rezultată din acest proces și acidul tiobarbituric. Cunțificarea în probele biologice a nivelului de aldehyde și peroxizi lipidici (produși stabili), este facilitată datorită duratei de viață mai lungă a acestor compuși. În ceea ce privește dozarea probei de analizat, acesta constă în fierberea într-o soluție de acid 2-tiobarbituric (10mM) cu K₂HPO₄ (75mM) la pH 3, timp de o oră, urmată de o răcire bruscă (extracția produsului de reacție realizându-se în n-butanol). Urmează o prealabilă centrifugare, pentru determinarea concentrației în fază organică. Abordând tehnica de fluorescență sincronă, pe un spectrofluorimetru Perkin Elmer, la o diferență a lungime de undă de ($\Delta\lambda$) 14 nm, dintre excitație și emisie, cunțificarea intensității emisiei făcându-se la 534 nm. Cu ajutorul curbelor de etalonare calculate la concentrații de malondialdehidă cunoscute pregătite în același mod, se stabilește concentrația de MDA, valoare exprimată în nmoli/ml (CONTI, 1991).

Determinarea glutationului

Evidențierea glutationului folosind fluorescență are ca considerent formarea unui produs fluorescent în reacție cu o-phthalaldehyda. Protocolul metodei prevede amestecarea unui volum cunoscut de plasmă cu 10% TCA, timp de 10 minute, urmat de centrifugare, colectare supernatant și adaos de 1,7 ml tampon fosfat (pH 8) și 1 ml o-phthalaldehyda. Intensitatea emisiei se măsoară la 420 nm, la o excitare de 350 nm, după 15 minute iar concentrația glutationului determinându-se după o curbă de calibrare, rezultatul fiind exprimat în nmol/ml Hu ML. (1994).

Determinarea glutationului oxidat

Un volum de plasmă în reacție cu acidul metafosforic (10%), precipită urmând o centrifugare timp de 10 min la 1000 xg. În continuare, se colectează supernatantul peste care se adaugă N-etilmaleimida (40nmol/l), probă incubată 30 de minute. Mai apoi urmează o neutralizare cu NaOH (0.1 N) și tratare cu orto-ftalaldehyda. Stabilirea concentrației (pe baza curbelor de calibrare), se face la spectrofluorimetru Perkin – Elmer LS 45, după 15 minute, când se masoara intensitatea emisiei la 420 nm la o excitare de 350 nm (nmol / litru) (VATS, 2008).

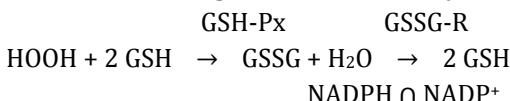
Determinarea catalazei (CAT)

Localizată în citosol și în peroxizomi, catalaza, este considerată o enzimă cu rol antioxidant, prin aceea că reglează nivelul H₂O₂ care, în lipsa ei, duce la creșterea și la apariția unui exces de radicali OH reactivi. Dozarea activității acestei enzime se face pe omogenate tisulare sau pe lizate eritrocitare. Modificarea absorbanței unei solutii tampon de H₂O₂ (10mM) în K₃PO₄ 0,05M (pH 7,4) la lungimea de undă 240 nm, reprezintă principiul metodei. Definirea unității de activitate ca fiind o cantitate de enzimă ce induce scăderea absorbanței de 0,43 la 25°C timp de 3 minute. Activitatea exprimată în U/mg proteină sau hemoglobină, are ca formulă de calcul:

CAT= A₂₄₀/0,43x0,02 (mg/ml), unde A₂₄₀-absorbanța la 240 nm (PIPPINGER, 1993)

Determinarea glutation-peroxidazei (GSH-Px)

Selenoproteina, glutation peroxidaza (GSH-Px), catalizează reacția dintre un hidroperoxid și glutation (GSH) ca donor de electroni cu formare de glutation oxidat (GSSH) și H₂O. Determinarea activitatii GSH-Px se realizează prin monitorizarea scăderii concentrației de NADPH în prezența căruia GSSH (format în reacție), este convertit de către glutation reductază (GSSG-R) la GSH (metodă indirectă).



Metoda propriu zisă constă în urmărirea extincției NADPH într-un mediu de reacție format din 2,4 U/ml glutation reductază, 1,5mM NADPH, 10mM GSH, 1,5mM H₂O₂ în tampon fosfat 0,1M (pH7), la 340 sau 365nm, timp de 6 minute. Activitatea enzimatică a acesteia este definită ca fiind cantitatea de glutation peroxidază ce determină o scădere de 10% a GSH din concentrația initială într-un minut la 37° si pH de 7. Calcul:

A = 0,868(Δ[NADPH]/[GSH]_{0t})(Vi/Vs), unde [NADPH] - concentrația molară a NADPH, [GSH]₀ - concentrația initială a GSH, t - durata reacției, Vi - volumul amestecului de incubare iar Vs- volumul probei de analizat.

Activitatea se raportează la 1 mg proteină sau hemoglobină pentru omogenate de țesut sau în cel de al doilea caz lizate eritrocitare (FLOHE, 1984).

Determinarea superoxididismutazei (SOD)

Catalogată ca fiind un agent de apărare împotriva efectelor toxice ale superoxidului (•O₂⁻), superoxididismutaza (SOD) catalizează dismutarea radicalului superoxid în apă oxigenată (H₂O₂) și oxigen (O₂). Mecanismul reacției presupune reducerea de către SOD a concentrației ionilor superoxid și astfel se inhibă reducerea cytocromului C, calculul cantității de SOD rezultând din gradul de inhibare a reducerii acestui cytocrom C, uzând o curba de calibrare efectuată cu standarde cunoscute de SOD.

Definirea unei unități de activitate SOD este dată de cantitatea de enzima capabilă să inhibe rata reducerii cytocromului C în condițiile specificate cu 50%. Dozarea la temperatura de 25°C, s-a efectuat pe lizate eritrocitare. Calculul se exprima în U SOD/g proteina sau hemoglobina (FLOHE, 1984).

5.2.3.4 Examen histopatologic

5.2.3.4 Histopathological evaluation:

Necropsia s-a efectuat pentru toate loturile iar în ceea ce privește cavitatea abdominală a fost disecată cu grijă și rinichiul stâng îndepărtat pentru analiza histologică. Ulterior, probele renale au fost fixate în formalina 10% neutră tamponată, țesutul urmând a fi deshidratat în alcool, curățat în xilen și, în final încorporat în parafină la 60°C. Secționarea blocurilor de parafină la dimensiuni de 5-6 µm, s-a realizat cu microtomul Leica RM 2125 RT iar colorarea lor a urmat metoda hematoxilin-eozină (HE). Un număr de zece câmpuri pentru fiecare secțiune de rinichi s-a examinat cu ajutorul microscopului Olympus BX41. Schimbările histopatologice s-au evaluate prin scoruri 0-4 (0-țesut sănătos; 1-țesut cu leziuni minime; 2-țesut cu leziuni moderate; 3-țesut cu leziuni moderate până la severe; 4-țesut cu leziuni severe), conform lui RANDJELOVIC (2012) și KHALID (2016).

6. Rezultate și discuții

6. Results and discussions

6.1 Evaluarea trasabilității claselor de compuși biochimici pe parcursul dezvoltării florilor și fructelor plantei, la diferite genotipuri de soc.

6.1 Highlighting traceability of biochemical compounds during plant growth at different genotypes elder.

6.1.1 Evaluarea indicilor fizico-chimici

6.1.1 Evaluation of physico-chemical indices

6.1.1.1 Variația umidității diferitelor genotipuri de soc pe parcursul dezvoltării fructelor

6.1.1.1 Variation of humidity of different genotypes of elder during fruit development

Specificitatea matricei vegetale imprimă ca considerent variația definitorie a dezvoltării mugurelui floral de soc până la fruct. În analiza celor 36 de probe, regăsim un interval procentual de umiditate cuprins între 83.619%, înregistrat de *S. nigra* L. la timpul 37 de zile, corespondent cu faza de vegetație în floare, și limita inferioră a umidității la polen de 16.880% pentru genotipul *S. Haschberg*. În referința lui SILVA (2016), găsim exprimat o valoare de 75.2 % umiditate (*S. nigra* L.), pentru faza de fruct negru, valoare comparabilă cu cea identificată în graficul 6.1, 77.304 % tot la același genotip *S. nigra* L. (N7FrN).

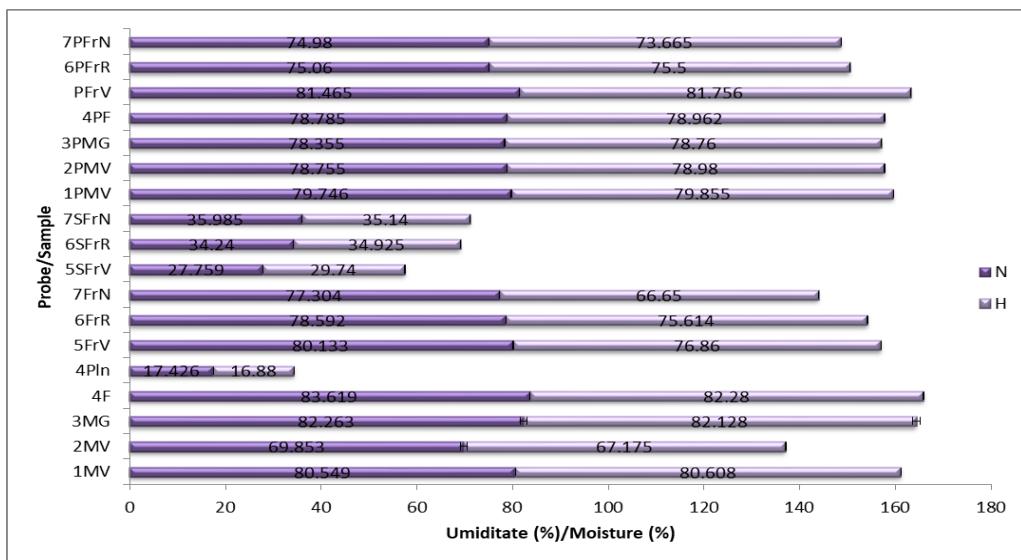


Fig. 6.1 Variația conținutului de umiditate din probele de soc

Fig.6.1 Variation of moisture content in elder samples

6.1.1.2 Identificarea și cuantificarea substanțelor minerale la diferitele genotipuri de soc pe parcursul dezvoltării fructelor

6.1.1.2 Identification and quantification of mineral substances of different genotypes of elder during fruit development

Conținutul mineral al probelor variază între 0,253-5,572%, conform datelor prezentate în figura 6.2. Specific pentru fructul de soc, este prezența în cantitate apreciabilă a macroelementelor (Ca, K, Mg, Na) (tabelul 6.1), dintr-un total de minerale de 1.011%. Făcând o paralelă cu alte date obținute în literatură, MLYNARCZYK (2018) obține un total al conținutului de minerale la fructele de *S. nigra* L. de 0.90–1.55%, rezultat marcat și de proba de fruct analizată. Variația calciului, în probele analizate, confirmă o cantitate semnificativă pentru genotipul de cultură, comparativ cu cel spontan, pe fenofaze. Astfel că valori ridicate de calciu se întâlnesc începând de la mugurele floral verde (707.228 ± 0.013 mg/kg), floare (608.674 ± 0.830 mg/kg), continuând la fructul verde (678.972 ± 0.051 mg/kg) (evolutiv în dezvoltarea arbustului), declinul valorii fiind în fructul copt, literatura specificând valori între 574–1528 mg/kg (MLYNARCZYK, 2018). Sub aspectul sodiului valorile obținute în fructele de soc sunt conforme cu literatura, Na (13–146 mg/kg).

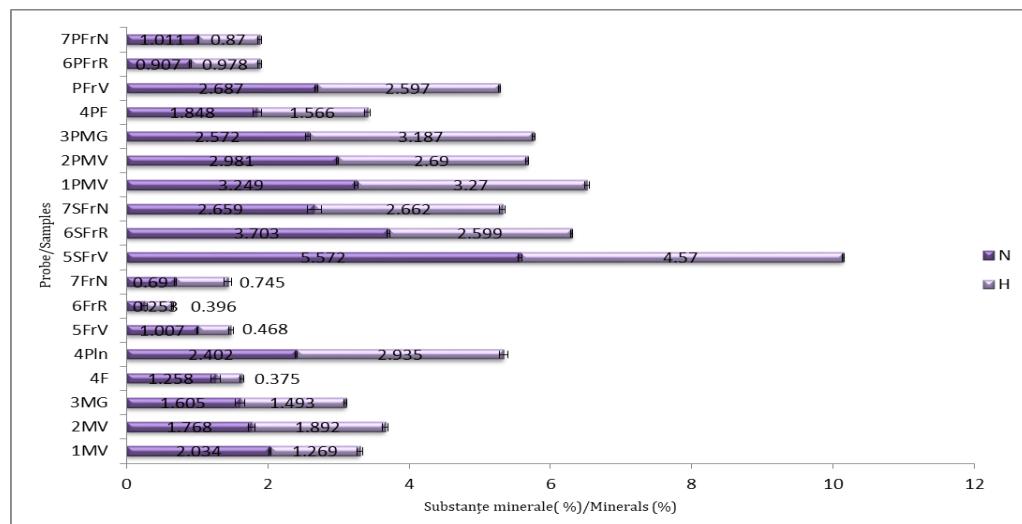


Fig.6.2 Variația conținutului de minerale totale din probele de soc

Fig. 6.2 Variation of total mineral content in elder samples

Deasemenea în tabelul 6.1 sunt prezentate cantitativ și metalelor grele, contaminați ai arbustului, cum este cazul cadmiului, cu valori înregistrate de N7FrN 0.0011 ± 0.0001 mg/kg. Alte studii prevăd o cantitate de 0.039–0.053 mg/kg cadmiu pentru fructele de soc (MLYNARCZYK, 2018), iar STAS 9036-85 8/90 confirmă o limită de maxim 0.05 mg/kg fruct proaspăt.

Tabelul 6.1

Variația macro și microelementelor din probele de soc
Variation of macro- and microelements content in elder samples

Ca	K	Mg	Na	Proba/ Samples	Fe	Cr	Cu	Mn	Se	Cd	Pb	Ni
298.336±0.	75.92±0.0	24.165±0	28.045±0.	N1MV	6.38±0.02	0.685±0.	11.285±0	30.835±0.	0.855±0.0	0.001±0.0	0.004±0.0	0.415±0.0
004d	42f	.021b	007i		8e	007f	.021c	021c	21f	00c	00b	07g
707.229±0.	15.945±0.	15.05±0.	97.638±0.	H1MV	1.185±0.0	0.46±0.0	16.115±0	38.585±0.	0.915±0.0	0.002±0.0	Nd	0.397±0.0
001a	007i	014e	000e		07h	14i	.021a	007a	07e	00b		01h
74.552±0.0	175.447±0	27.966±0	114.398±0	N4F	7.627±0.0	0.315±0.	9.925±0.	25.21±0.0	1.481±0.0	0.002±0.0	0.001±0.0	1.227±0.0
00i	.000c	.000a	.001c		001b	007j	007d	00g	01a	00b	00d	00d
608.674±0.	438.245±0	7.089±0.	12.727±0.	H4F	8.52±0.00	3.142±0.	6.891±0.	36.122±0.	0.562±0.0	0.002±0.0	0.005±0.0	0.252±0.0
000c	.000a	000g	000j		0a	003a	001g	002b	02h	00b	00a	00i
255.789±0.	0.48±0.00	10.744±0	209.725±0	N5FrV	7.183±0.0	2.231±0.	7.711±0.	26.56±0.0	1.191±0.0	0.001±0.0	0.005±0.0	1.396±0.0
000e	0j	.000f	.000a		00c	001c	001f	00f	01b	00c	00a	00c
678.972±0.	21.506±0.	6.707±0.	72.726±0.	H5FrV	1.224±0.0	0.89±0.0	6.71±0.0	30.174±0.	0.221±0.0	0.002±0.0	Nd	1.475±0.0
000b	000h	000h	000g		00g	00d	14h	005d	02i	00b		00b
215.874±0.	53.087±0.	22.687±0	141.004±0	N6FrR	6.772±0.0	2.78±0.0	9.871±0.	27.394±0.	0.681±0.0	0.002±0.0	0.003±0.0	0.421±0.0
000g	000g	.000c	.000b		00d	00b	001e	006e	01g	00b	00c	00g
235.743±0.	257.261±0	6.147±0.	109.292±0	H6FrR	0.963±0.0	0.63±0.0	6.551±0.	20.561±0.	1.15±0.00	0.002±0.0	Nd	0.634±0.0
000f	.000b	000i	.000d		00i	00g	001i	001h	0c	00b		00f
156.476±0.	117.409±0	21.714±0	57.344±0.	N7FrN	5.034±0.0	0.751±0.	13.212±0	13.87±0.0	0.705±0.0	0.001±0.0	0.001±0.0	1.531±0.0
000h	.000e	.000d	000h		00f	001e	.003b	00j	07g	00c	00d	00a
71.239±0.0	152.187±0	2.618±0.	80.815±0.	H7FrN	0.951±0.0	0.56±0.0	5.37±0.0	14.93±0.0	1.09±0.00	0.003±0.0	Nd	0.909±0.0
00j	.000d	000j	000f		00i	00h	00j	00i	0d	00a		00e
***	***	***	***		***	***	***	***	***	**	***	***

Values are expressed as mean of two replicates. Values with different letters in the same column indicate statistically significant (S) differences (Tukey's test, NS not significant, P>0.05; *significant P≤0.05; **very significant P≤0.01; ***extremely significant P≤0.001;

Macroelemente (mg/kg)

Microelemente (mg/kg)

6.2.1 Evaluarea indicilor proprietăților antioxidantă

6.2.1 Evaluation of antioxidant properties indices

6.2.1.1 Variația conținutului de polifenoli totali

6.2.1.1 Variation in total polyphenol content

În vederea cuantificării polifenolilor totali din cele 36 de matrici vegetale de soc, provenite de la diferite genotipuri, s-a aplicat în obținerea extractelor metanolice a probelor, ecuația curbei de regresie $y = 0.6859x + 0.0098$, $R^2 = 0.9897$ (figura 6.3; 6.4). Profilul polifenolilor prezentați în tabelul 6.2, prezintă în primul rând, cantitatea conținută pe cele două traiectorii majore de dezvoltare a fructului (traiectoria I –până la apariția florii, compusă din timpii de recoltare 1, 7, 23, 37 zile de la mugurele 1 și traiectoria II-până la fructificație, corespunzătoare perioadei de 67, 100, 119 zile de la mugurele 1). Astfel deducem următorul parcurs: în faza incipientă a mugurelului avem o valoare semnificativă de polifenoli pentru ambele genotipuri, ($N1MV\ 565.445 \pm 0.003$ mg GAE/100 g, $H1MV\ 570.442 \pm 0.00$ mg GAE/100 g), care crește în parcursul evolutiv al dezvoltării caracterelor morfologice, până la finalul traiectoriei I, corespunzătoare cu apariția florii. Aceeași tendință se observă și pentru traiectoria II, vis-a-vis de faza inițială reprezentată de fructul verde și până la maturitatea acestuia. Astfel cantitatea lor variabilă este corelată cu sezonul de dezvoltare (MLYNARCZYK, 2018), cu altitudinea (WU, 2004), eșantionarea sau varietatea (MIKULIC-PETKOVSEK, 2016).

Cantitatea de polifenoli acumulată în fructele de *S. nigra* L. 591.597 ± 0.00 mg GAE/100 g, interferă cu cea semnalată de LEE and FINN (2007), 364–582 mg GAE/100 g, AKBULUT (2009), 371–432 mg GAE/100 g FW, OCHMIAN (2009), 513.6 mg/100 g FW. Totodată *S. nigra* L. înregistrează cea mai ridicată cantitate de fenoli totali în fructele sale ajunse la maturitate, raport dat de MIKULIC-PETKOVSEK (2016), comparativ cu soiurile *S. Cerulea*, *S. nigra* var. *viridis* și alți 7 hibrizi. Făcând analogie cu alte fructe de pădure, sub aspectul cantitativ al polifenolilor, rezultatul e net superior, ajungând până la de 7 ori mai ridicat în fructele de soc comparativ cu fructe de aceeași colorație: coacăze negre (952 mg/kg), dud negru (1794 mg/kg), afine (1800 mg/kg), (MIKULIC-PETKOVSEK, 2012). Rezultatele prezентate, sunt bineînțeles dependente de metoda de extracție, iar ca exemplu în acest sens COSMULESCU (2014), obține valori ridicate de polifenoli la coacăzul negru, 5700 mg/kg FW cu extracția probei în MeOH 80%. În ceea ce privește nivelul de polifenoli din florile de soc, acesta este semnificativ mai mare, comparativ cu fructele sale. Conținutul total de fenoli întâlnit la N4F este de 789.194 ± 0.001 mg/kg și de 770.144 ± 0.04 mg/kg la H4F, fapt raportat și de MLYNARCZYK (2018). Lunând în considerare conținutul ridicat de polifenoli din florile de soc, atât infuziile cât și siropul acestor flori pot fi considerate și sunt demonstrabile ca fiind stimulente imunitare naturale (YIN, 2015). Un simplu extract apos din flori de soc, conform lui BADESCU (2015), are capabilitatea *in vitro* asemenea insulinei în absorbția glucozei și reducerea stresului oxidativ.

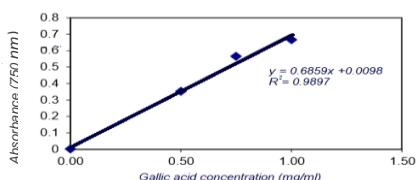


Fig. 6.3 Curba standard de calibrare a acidului galic
Fig.6.3 Standard calibration curve for gallic acid

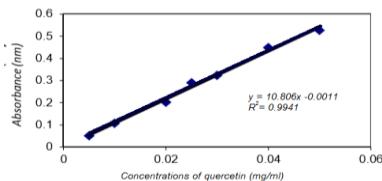


Fig.6.4 Standard calibration curve for quercetin
Fig.6.4 Standard calibration curve for quercetin

6.2.1.2 Variatia continutului de flavonoide totale

6.2.1.2 Variation in total flavonoids content

Aspectul cantitativ al flavonoidelor conținute în probele analizate, comportă pentru relația peduncul - mugure, peduncul - floare sau peduncul - fruct, o variație specificitară (tabel 6.2). În acest sens, SILVA (2016), supune atenției și acești pedunculi, în special cei ai fructelor coapte, ca subprodus rezultat din prelucarea fructelor. Acest autor susține ideea că o cantitate semnificativ ridicată de flavonoide, este în dependență directă cu creșterea valorii și în penduncul. Totodată raportează pentru penduncul fructului copt, o valoare de 708 ± 22 nmg/100 g în corelație cu conținutul de 1191 ± 85 nmg/100 g a fructului de la care s-a îndepărtat. Atenția acestuia a fost canalizată și pe "friendly metode" de extracție, sugerând prin studiul interprins, noi alternative de surse bioactive. Un alt aspect definitoriu se remarcă la proba mugurelui galben (23 de zile de la mugure 1), la ambele genotipuri și anume, valori foarte semnificative, 1461.262 ± 0.038 mg QE/100 g N3MG, respectiv 1369.17 ± 0.084 mg QE/100 g H3MG, după care acești compuși înregistrează un declin în faza de floare. Analizând valorea maximă de flavonoide în proba de polen paralel cu declinul înregistrat în inflorescențe, rezultă că mugurele galben surprinde cel mai corect conchiderea atât a fenolilor din polen cât și pe cei conținuți în viitoarea floare.

Tabelul 6.2

Activitatea antioxidantă (%), flavonoide totale (mg QE/100 g) și polifenoli totali (mg GAE/100g), identificăți pe parcursul fazei de dezvoltare a fructelor, la două genotipuri de soc

Antioxidant activity (%), total flavonoids content (mg QE/100 g) and polyphenols (mg GAE/100g), profile determined in ripening fruits of different elderberry genotype

DPPH		Flavonoide totale		Polifenoli totali		Proba
		<i>Total flavonoids</i>		<i>Total phenol</i>		<i>Sample</i>
70.007±0.000	e	1019.662±0.001	d	565.445±0.003	f	N1MV
72.058±0.033	d	1020.545±0.007	c	648.063±0.002	d	N2MV
89.608±0.001	b	1461.262±0.038	b	883.066±0.001	b	N3MG
87.01±0.002	c	973.178±0.001	f	789.194±0.001	c	N4F
91.007±0.000	a	2131.235±0.005	a	1031.06±0.014	a	N4Pln
32.994±0.007	h	488.895±0.002	k	278.195±0.003	m	N5FrV
30.635±0.002	i	304.548±0.01	o	249.243±0.003	n	N6FrR
50.355±0.004	f	502.012±0.00	j	591.597±0.00	e	N7FrN
7.723±0.002	s	273.693±0.006	r	41.507±0.001	s	N5FrV
8.424±0.004	r	253.83±0.012	s	57.614±0.001	r	N6SFrR
9.012±0.012	p	292.803±0.002	p	58.716±0.002	p	N7SFrN
10.00±0.007	o	425.557±0.00	m	190.285±0.005	o	N1PMV
21.004±0.001	l	578.778±0.00	h	321.469±0.001	j	N2PMV
23.197±0.001	k	562.074±0.004	i	289.274±0.002	k	N3PMG
30.065±0.007	j	739.255±0.001	g	345.708±0.002	h	N4PF
39.707±0.002	g	986.828±0.00	e	442.224±0.00	g	N5PfrV
15.015±0.004	m	455.485±0.002	l	276.586±0.007	m	N6PfrR
12.066±0.004	n	317.819±0.001	n	338.143±0.002	i	N7PfrN

(S)

Values are expressed as mean of two replicates. Values with different letters in the same column indicate statistically significant (S) differences (Tukey's test, NS not significant, P>0.05; *significant P≤0.05; **very significant P≤0.01; ***extremely significant P≤0.001;

Proba	Polifenoli totali	Flavonoide totale	DPPH
<i>Sample</i>	<i>Total phenol</i>	<i>Total flavonoids</i>	
H1MV	570.442±0.00	f	71.005±0.005
H2MV	640.086±0.00	e	70.057±0.002
H3MG	890.04±0.00	b	90.004±0.00
H4F	770.144±0.04	c	89.047±0.007
H4Pln	9979.126±0.002	a	92.007±0.00
H5FrV	269.877±0.002	m	30.588±0.00
H6FrR	290.586±0.00	k	45.222±0.012
H7FrN	679.254±0.004	d	65.965±0.003
H5SFrV	39.124±0.00	s	6.398±0.00
H6SFrR	56.241±0.007	r	7.984±0.006
H7SFrN	59.367±0.002	p	9.125±0.003
H1PMV	192.214±0.00	o	11.254±0.007
H2PMV	310.787±0.002	j	19.588±0.001
H3PMG	279.214±0.002	l	22.564±0.00
H4PF	360.705±0.005	h	29.633±0.002
H5PfrV	429.963±0.002	g	42.565±0.004
H6PfrR	249.347±0.005	n	16.174±0.004
H7PfrN	323.415±0.002	i	13.257±0.00

6.2.1.3 Variația capacitatii antioxidantante

6.2.1.3 Variation of antioxidant activity

Proprietatea antioxidantă a extractelor de soc analizate înregistrează diferențe semnificative în fenofazele dezvoltării fructului de la $92.007 \pm 0.00\%$ la $6.398 \pm 0.00\%$ (tabel 6.2). Acest fapt se datorează preponderent prezenței flavonolilor și antocianinelor. Literatura prevede că în florile de *Sambucus nigra* L, activitatea antioxidantă este mai ridicată decât în fructele sau frunzele sale (DAWIDOWICZ, 2006), și anume: 94,15% în flori, 67,69% în fructe și 48,52%, procente rezultate prin extrația alcoolică a probelor, la o temperatură ridicată (100°C). Sub aspectul activității de neutralizare a radicalilor liberi proba reprezentată de florile de soc din arealul spontan ($87.01 \pm 0.002\%$) cât și cele din cultură ($89.047 \pm 0.007\%$), dețin o activitate mai însemnată, comparativ cu probele de fructe.

Estimarea eficienței antioxidantante a extractelor, conform metodelor aplicate, nu reduce capabilitatea interacțiunilor individuale dintre compuși, opinie susținută de DAWIDOWICZ (2006), precum și efectele sinergetice sau de inhibare cu metoda utilizată pentru testarea proprietății antioxidantante.

6.2.1.4 Identificarea și cuantificarea pigmentilor clorofilieni

6.2.1.4 Identification and quantification of chlorophyll pigments

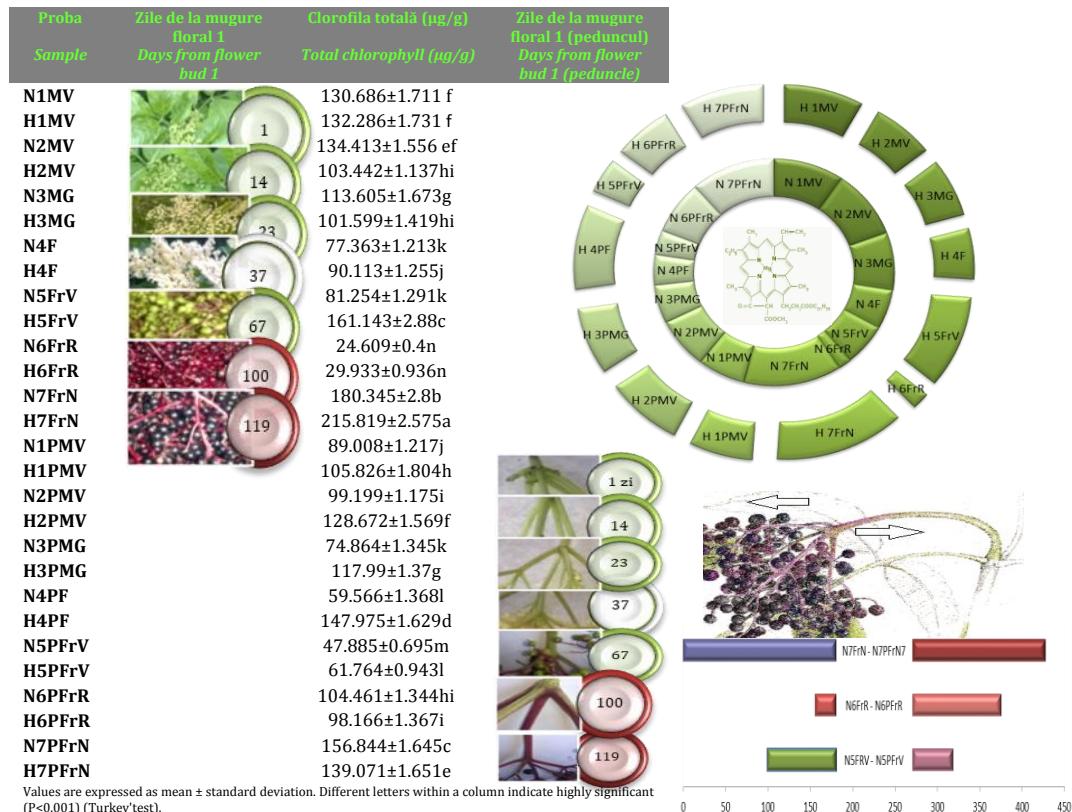
Mecanismele demonstrabile ale clorofilei, în studiile *in vivo* sunt inhibarea peroxidării lipidelor și protecția mitocondriilor în degradările oxidative induse de diferiți radicali liberi. Astfel clorofila și derivații ei, sunt pigmenți ce prezintă activitate antioxidantă (BARRO LILLIAN, 2011). În probele analizate (tabel 6.3), un caz aparte îl constituie remanența clorofilei la maturitatea fructelor, cu valori însemnate ($215.819 \pm 2.575\ \mu\text{g/g}$ la genotipul cultivat și 180.345 ± 2.800 la genotipul spontan), în opozиie cu fazele mecanismului de senescență a arbustului.

Un punct de vedere plauzibil din catabolismul clorofilic, este că există un punct incipient în secvențele catabolice a clorofilei, unde înainte de degradarea clorofilei b, acesta este transformată în clorofila a, pe calea enzimatică a reductazei. Modificarea raportului clorofila a/b, prin creșterea ei, determină blocarea căii catabolice a clorofilei. Pe măsură ce clorofila b este degradată în clorofila a normală, degradarea celei din urmă, devine mai lentă schimbând astfel echilibrul stabilit între ele (MARIA ROCA, 2006). În ceea ce privește cantitatea de $77.363 \pm 1.213\ \mu\text{g/g}$ la *S. Nigra* L., respectiv $90.113 \pm 1.255\ \mu\text{g/g}$ la *S. Haschberg*, corespunzătoare acumulării clorofilei în florile de soc, valorile sunt confomе cu literatura ($77.00 \pm 0.08\ \mu\text{g/g}$ la genotipul *S. nigra* L. iar valorile mai ridicate înregistrate de celălalt genotip, urmează aceeași creșterea pe toate fazele dezvoltării, comparativ cu socul spontan).

Tabelul 6.3

Conținutul clorofilei genotipurilor *S. Nigra L.* și *S. Haschberg*, în decursul maturității fructelor

Chlorophyll content during the ripening of *S. Nigra L.* and *S. Haschberg* fruits



6.2.1.5. Identificarea și cuantificarea vitaminei C

6.2.1.5. Identification and quantification of vitamin C

Privit ca parametru important al calității materialului vegetativ, conținutul de vitamina C, variază între genotipuri de la 1501.74 ± 0.002 µg/ml echivalent Trolox (genotip *S. nigra L.*) la 913.308 ± 0.002 (genotip *S. Haschberg*). O analiză comparativă a acestui parametru, privită la nivel de genotip, indică o interdependență pozitivă a acestui parametru și altitudinea arealului de unde provin genotipurile (MRATINIC, 2007), specific și pentru materialul biologic prezent. Datele expuse în tabelul 6.4 coincid cu studiile interprinse de KAACK (1998), analizând conținutul mediu de vitamina C la 13 genotipuri, concluzionăm că în toate probele studiate, acest

parametru este semnificativ mai mare sau fie la media nivelului pentru hibrizi (MRATINIC, 2007).

Tabelul 6.4

**Variația cantitativă a vitaminei C ($\mu\text{g}/\text{ml}$ echivalent Trolox), a probelor reprezentative din fenofazele dezvoltării fructului de soc, aparținând unor genotipuri diferite
The quantitative variation of vitamin C ($\mu\text{g}/\text{ml}$ Trolox equivalent), of representative samples of the elderberry growth phenotypes belonging to different genotypes**

Proba Sample	Vitamina C Vitamin C	
N1MV	825.957 \pm 0.002	e
N4F	1501.74 \pm 0.002	a
N5FrV	135.156 \pm 0.003	i
N6FrR	114.132 \pm 0.002	j
N7FrN	809.938 \pm 0.002	f
H1MV	913.308 \pm 0.002	b
H4F	901.544 \pm 0.003	c
H5FrV	567.407 \pm 0.002	g
H6FrR	395.208 \pm 0.002	h
H7FrN	877.016 \pm 0.002	d
(S)	***	

Values are expressed as mean of two replicates. Values with different letters in the same column indicate statistically significant differences (Tukey's test, NS not significant, P>0.05; *significant P≤0.05, **very significant P≤0.01; ***extremely significant P≤0.001;

Explicația acumulării valorii maxime de vitamina C în florile de soc comportă următoarea corelație, stabilită între vitamină și conținutul de flavonoide (KAACK, 1998), subiect discutat în capitolul corelații 6.6.1.4.

Făcând referire la un preparat obținut din fructe de soc, mai exact, un suc proaspăt de soc, vitamina C endogenă micșorează nivelul de degradare oxidativă pentru doi antociani prezenți frecvent în profilul polifenolilor, respectiv pentru quercetin și antocianine (KAACK, 1998). Aplicabilitatea acestui fapt în industria alimentară vis-a-vis de procesarea fructelor de soc, este transpusă prin selectarea de soiuri cu conținut ridicat de acid ascorbic.

6.3.1 Evaluarea trasabilității unor compuși de interes prin tehnici chromatografice

6.3.1 Evaluation of the traceability of some compounds of interest by chromatographic techniques

6.3.1.1 Identificarea și cuantificarea acizilor organici

6.3.1.1 Identification and quantification of organic acids

Cinci acizi organici sunt identificați în probele analizate (tabel 6.5), aceștia fiind regăsiți și de VEBERIC (2009) și MIKULIC-PETKOVSEK (2016). Analiza statistică a datelor din tabelul 6.5, s-a realizat cu softul SPSS 19.0 (IBM, Armonk, New York, USA). În urma analizei varianței (Testul ANOVA, TUKES) s-au obținut rezultate foarte

Monitorizarea trasabilității unor compuși bioactivi de interes pe stadii de dezvoltare morfologică a fructelor de soc și evaluarea unui preparat fitoterapeutic cu efect nefroprotector

semnificative din punct de vedere statistic la probele analizate p< și egal cu 0.05 (testul TUKEY) și un interval de încredere cuprins între 95-99%.

Astfel, un conținut semnificativ de acid citric a fost înregistrat la proba H6FrR (13.31 ± 0.02 g/kg FW), în timp ce la proba H1MV întâlnim valori nesemnificative de acid citric pentru $p \leq 0.05$. De remarcat este faptul că fructul genotipului "Haschberg", extrapolând și pentru toate cultivarurile arbustului de soc, media acidului citric este în cantitatea cea mai ridicată, fapt demonstrat de VEBERIC (2009). Astfel, același autor afirmă că, în cultura de soc din Europa, regăsim acest genotip, cu cea mai mare frecvență de cultivare, preabil în industria procesării fructelor de soc (industria de gemuri, sucuri, vin), din considerentul că detine cel mai bogat conținut de acid citric (68.5 g/kg/FW) și cantități reduse de glucide. În urma determinărilor efectuate pentru conținutul total de acizi organici din fruct, rezultă 20.331 ± 0.06 g/kg FW pentru *S. nigra* L., valoare superioară similară cu literatura (20.07 g/kg FW *S. nigra* L.) MIKULIC-PETKOVSEK (2016).

Literatura prevede, în ceea ce privește repartitia tipului de acid organic în florile de soc, acidul tartaric ca fiind particular pentru acestă fenofază a înfloririi (3-10% din totalul acizilor) (MIKULIC-PETKOVSEK, 2016), însă în proble analizate se observă și cantități semnificative de acid quinic (N4F 8.308 ± 0.014 g/kg FW; H4F 11.774 ± 0.014 g/kg FW).

Tabelul 6.5

Conținutul individual (media ± SD, în g/kg produs proaspăt) a acizilor organici (media ± SD, în g/kg produs proaspăt) pe diferite etape de dezvoltare și pe genotipuri

Content level of individual (mean ± SE, in g/kg FW) and total organic acids (mean ± SE, g/kg FW) of different developmental stages in elderberry fruits and genotype

Zile de la mugurele floral I Day 1 of flower bud	Proba Sample	Acid citric <i>Citric acid</i>	Acid malic <i>Malic acid</i>	Acid tartaric <i>Tartaric acid</i>	Acid quinic <i>Quinic acid</i>	Acid shikimic <i>Shikimic acid</i>	Acizi totali <i>Total acid</i>
	N1MV	1.459±0.002 i	1.274±0.014 j	Nd ¹	1.119±0.014 j	0.185±0.002 d	4.0370±0.033 j
	H1MV	1.203±0.002 j	3.018±0.014 d	Nd ¹	3.836±0.014 i	0.33±0.002 c	8.387±0.033 i
	N4F	3.231±0.002 g	4.923±0.014 b	4.462±0.028 a	8.308±0.014 e	0.385±0.002 b	21.309±0.062 f
	H4F	1.857±0.002 h	6.491±0.014 a	2.717±0.028 b	11.774±0.014 b	0.583±0.002 a	23.422±0.062 c
	N5FrV	10.161±0.002 c	2.262±0.014 h	1.094±0.028 e	10.841±0.014 c	0.175±0.002 d	24.533±0.062 a
	H5FrV	7.101±0.002 f	2.584±0.014 f	0.812±0.028 f	Nd ¹	0.153±0.002 e	22.54±0.062 d
	N6FrR	7.820±0.002 e	2.023±0.014 i	1.083±0.028 e	8.490±0.014 d	0.138±0.002 f	19.554±0.062 h
	H6FrR	13.311±0.002 a	2.481±0.014 g	0.677±0.028 g	7.529±0.014 f	0.134±0.002 f	24.132±0.062 b
	N7FrN	8.934±0.002 d	3.782±0.014 c	1.512±0.028 c	6.016±0.014 h	0.087±0.002 g	20.331±0.062 g
	H7FrN	10.498±0.002 b	2.650±0.014 e	1.286±0.028 d	7.07±0.014 g	0.058±0.002 h	21.562±0.062 e

Values are expressed as mean of two replicates. Values with different letters in the same column indicate statistically significant differences (Tukey's test, NS not significant, P>0.05; *significant P≤0.05; **very significant P≤0.01; ***extremely significant P≤0.001; 1 - n.d., cannot be determined as there is no statistical difference between the results.

6.3.1.2 Identificarea și cuantificarea zaharurilor

6.3.1.2 Identification and quantification of sugars

Analizând cele mai reprezentative probe de soc din etapa de apariție a fructului, pentru cele două genotipuri de soc studiate, se constată, în urma determinării zaharurilor (tabel 6.6), îndeplinirea unei perspective nutriționale de remarcă. Definirea ei este aceea că fructele acumulează un nivel crescut de fructoză, preferabil de către consumatori pentru faptul că acest glucid deține un gust mai dulce comparativ cu glucoza sau zaharoza și are un indice glicemic mult mai scăzut dacă facem referire la celelalte zaharuri analizate. Informația privind variația glucidelor în lanțul dezvoltării mugurelui floral până la fruct, este dată de peduncul ce susține, în cazul nostru mugurele (3 faze: 1MV, 2MV, 3MG), floarea sau fructul (5FrV, 6FrR, 7FrN), în corelație cu procentul de clorofilă. Această remarcă, expusă de SCHAEFER (2009), denotă că există o proporționalitate inversă între cele două, admitând că valorile scăzute ale clorofilei din peduncul au ca și corespondent în mugure/flori/fruct, creșterea nivelului de glucide, de aici diversitatea de culori.

În ceea ce privește cantitatea totală de glucide acumulate în fructele de soc, acesta este sub limita unor fructe comune, de exemplu mere (128,2-191,55 g / kg FW) sau cireșe (177,91-242,87 g / kg FW), MIKULIC-PETKOVSEK (2016). Totuși glucoza și fructoza dețin 80% din totalul zaharurilor analizate în fructele de soc iar în flori ambele ocupă un procent de 60%. Nivelul glucidic total din florile de soc mai mare pentru socul din flora spontană (N4F $10.772 \pm 23.55 \mu\text{g}/\text{ml FW}$), comparativ cu cel de cultură (H4F $4.132 \pm 18.85 \mu\text{g}/\text{ml FW}$), demonstrează complexitatea calitativă a soiurilor primare de soc, vis-a-vis de consumul florilor de soc în infuzii sau sucuri fermentate. În ceea ce privește raportul zaharuri/acizi organici, cu rol major în atribuirea gustului respectivului fruct dar și în procesarea lui proba H7FrN 547.641 ± 1.154 justifică valori scăzute de acizii organici în timp ce zaharurile predomină.

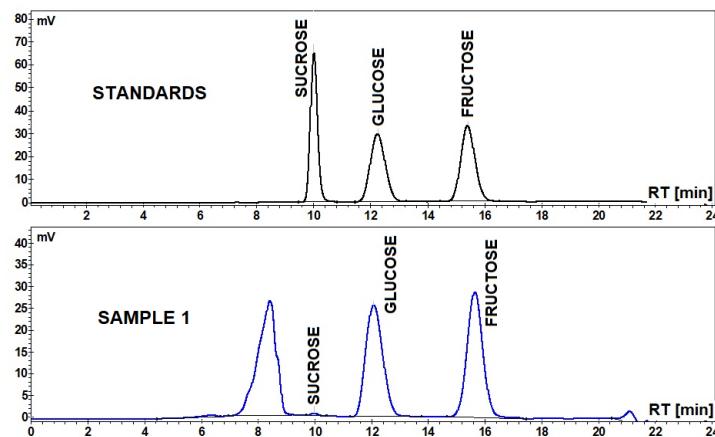


Fig.6.5 Cromatogramele HPLC a standardelor mixte de glucoză (RT=12.20 min), fructoză (RT=15.39 min) și sucreză (RT=9.96 min);

Fig 6.5 HPLC chromatograms of the standards mixture glucose (RT=12.20 min), fructose (RT=15.39 min) and sucrose (RT=9.96 min);

Tabelul 6.6

Conținutul individual (media ± SD, în µg/ml produs proaspăt) de zaharuri totale (media ± SD, în µg/ml produs proaspăt) și raportul zaharuri/ acizi organici la diferite genotipuri de soc pe stadii de dezvoltare distinctă a fructelor

Content level of individual (mean ± SE, in µg/ml FW) and total sugars (mean ± SE, µg/ml FW) and sugars/organic acids ratio in different elderberry species and to various developmental stages in elderberry fruits

Zile de la mugurele floral 1 <i>Day 1 of flower bud</i>	Proba <i>Sample</i>	Fructoza <i>Fructose</i>	Glucoza <i>Glucose</i>	Sucroza <i>Sucrose</i>	Zaharuri totale <i>Total sugars</i>	Raport Z/A <i>Ratio S/A</i>					
	N1MV	726.555±0.424	f	838.995±0.707	e	250.27±0.282	a	1815.82±1.414	e	449.808±1.124	c
	H1MV	1167.325±0.424	d	126.18±0.707	h	100.56±0.282	c	1394.065±1.414	f	166.218±0.504	e
	N4F	109.793±0.424	i	97.70±0.707	i	22.055±0.282	e	229.548±1.414	i	10.772±0.034	h
	H4F	63.917±0.424	j	32.87±0.707	j	Nd ¹		96.787±1.131	j	4.132±0.037	i
	N5FrV	1143±0.424	e	1980.11±0.707	d	Nd ¹		3123.4±1.131	d	127.314±0.276	f
	H5FrV	242.65±0.424	h	517.85±0.707	f	Nd ¹		760.5±1.131	h	33.74±0.042	g
	N6FrR	3277.83±0.424	c	4783.37±0.707	c	Nd ¹		8061.2±1.131	c	412.255±1.254	d
	H6FrR	437.05±0.424	g	409.56±0.707	g	Nd ¹		846.61±1.131	g	35.082±0.043	g
	N7FrN	4650±0.424	b	4975.68±0.707	b	94.44±0.282	d	9720.12±1.414	b	478.095±1.393	b
	H7FrN	5771.65±0.424	a	5922.65±0.707	a	113.9±0.282	b	11808.2±1.414	a	547.641±1.154	a

Values are expressed as mean of two replicates. Values with different letters in the same column indicate statistically significant differences (Tukey's test, NS not significant, P>0.05; *significant P≤0.05; **very significant P≤0.01; ***extremely significant P≤0.001; 1 - n.d., cannot be determined as there is no statistical difference between the results.

6.3.1.3 Identificarea și cuantificarea flavonoidelor

6.3.1.3 Identification and quantification of flavonoids

Profilul cantitativ al compușilor individuali flavonoidici din probele cheie pe parcursul dezvoltării fructului, este prezentat în tabelul 6.7, iar curbele de calibrare (rutin, cianidin, chatechin), sunt reprezentate în fig. 6.6. Dintr-un total de 13 compuși identificați în probele de soc, prin metoda HPLC-DAD-ESI+, rutin este flavonolul cel mai reprezentativ pentru acest arbust, compus ce face subiectul capitolului 6.2 din prezenta lucrare, cu aplicabilitate practică. Prezent în toate probele analizate, rutin atinge valoarea cea mai semnificativă de 6178.463 ± 0.002 la genotipul cultivat, demonstrând aportul selecției plantelor ($p \leq 0.01$). Acidul clorogenic, este prezent și el, în cantități considerabile, până aproape de fază de fruct roșu când înregistrează un declin (de la 10257.656 ± 0.002 g/ml pentru H1MV la 884.757 ± 0.002 g/ml H6FrH).

Isoquerçitrin (PIETTA, 1992), cyanidin3-glucoside și cyanidin 3-sambubioside (WU 2004, KAACK, 2008), conform cercetărilor din literatură sunt cele mai importante din fructul copt la *S. nigra* L. Pe parcursul etapelor de maturitate a fructului, conținutul de flavonoide se modifică (fig. 6.7; 6.8), iar fiecare compus deține propriul model individual de apariție/dispariție. Conținutul de antociani, cyanidin-3-sambubioside-5-glucoside, cyanidin-3- sambubioside și cyanidin-3-glucoside, prezintă tendință de creștere la maturitatea fructelor (KAACK, 2008), fapt observat și la probele studiate. Astfel cyanidin 3-sambubioside-5-glucoside ating valoarea maximă de 332.164 ± 0.002 în fază de coacere pentru genotipul de cultură *S. nigra Haschberg*.

Este stabilită o corelație între conținutul de cianidin-3-glucozid, chelarea metalului și reducerea fierului, unde extractele interacționează cu fierul și cuprul, și confirmă că acest efect este datorat compusului cianidin-3-glucozidei (MLADENKA, 2016).

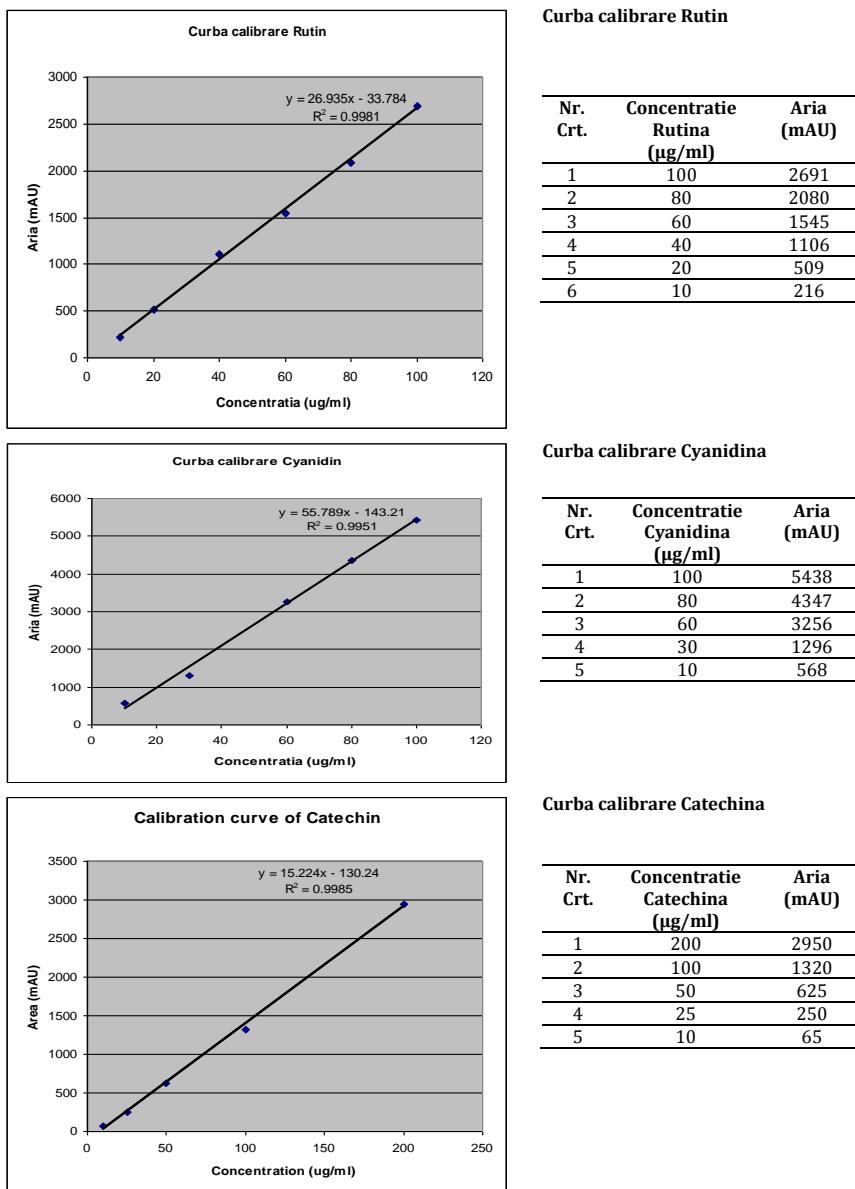
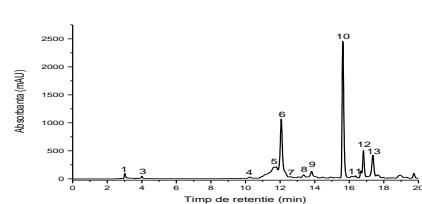
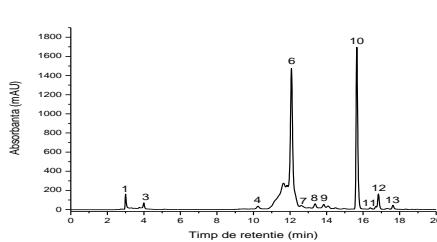
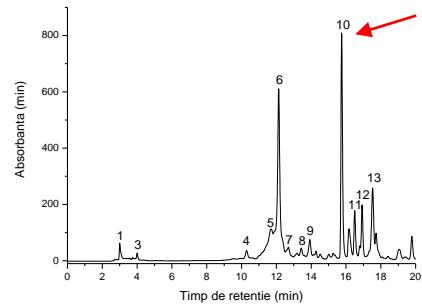
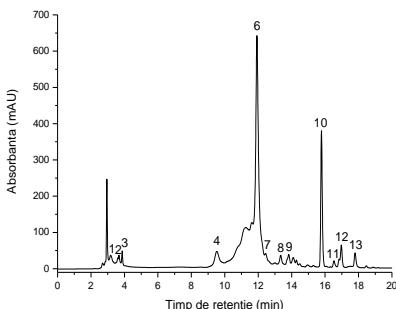


Fig.6.6 Curbele de calibrare pentru rutin, cianidin și catechină
Fig.6.6 Rutin, cyanidin and catechin calibration curves



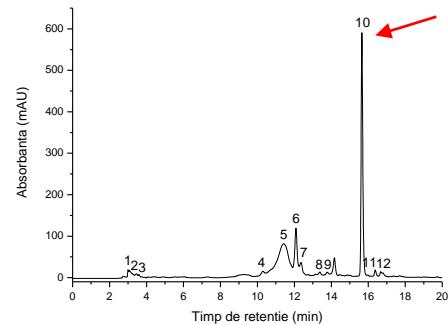
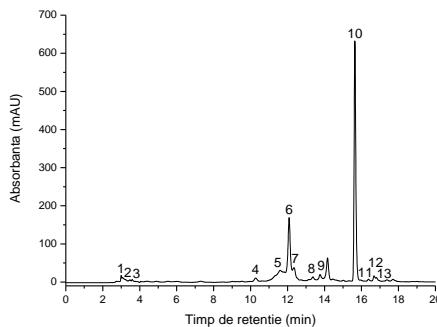
a.1. H1MV 280 nm

b.1. H4F 280 nm



a.2. N1MV 280 nm

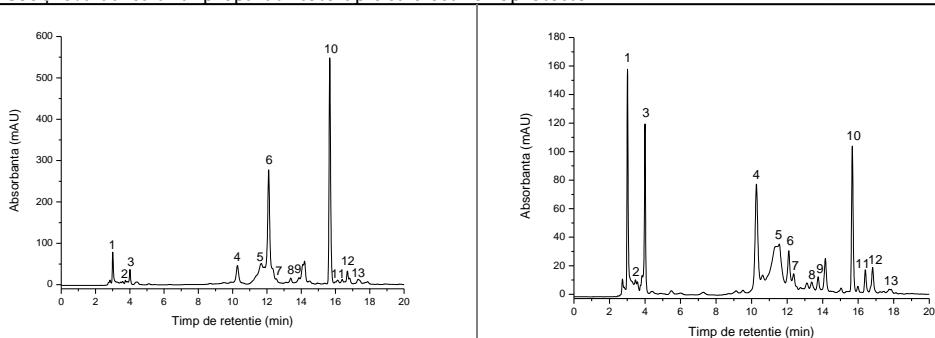
b.2. N4F 280 nm



c.1. H5FrV280 nm

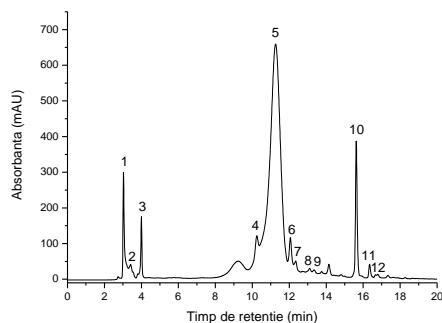
d.1. H6FrR 280 nm

Monitorizarea trasabilității unor compuși bioactivi de interes pe stadii de dezvoltare morfologică a fructelor de soc și evaluarea unui preparat fitoterapeutic cu efect nefroprotector

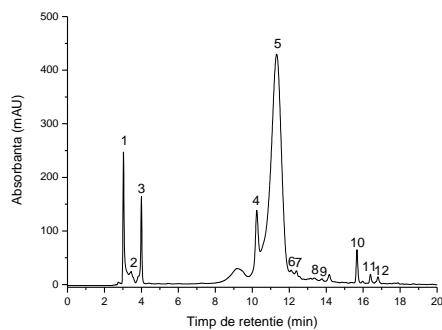


c.2. N5FrV 280 nm

d.2. N6FrR 280 nm



e.1. H7FrN 280 nm



e.2. N7FrN 280 nm

Fig. 6.7 Cromatogramele HPLC-DAD-ESI⁺ ale flavonoidelor regăsite în probele de soc analizate
Fig. 6.7 HPLC-DAD-ESI⁺ chromatograms of the flavonoids content in elder samples

Tabelul 6.7

Conținutul flavonoidelor reprezentative din extractul metanolic de *Sambucus nigra* L. și *Sambucus nigra* Haschberg la diferite stadii de dezvoltare a fructelor

Amounts of representative flavonoids contained in metanolic extracts from *Sambucus nigra* L. and *Sambucus nigra* Haschberg variation in different growth stages of fruit

Nr. peak Retention time (min.)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Amount of (g/ml)		
	3.01	3.47	4.02	10.27	11.55	12.09	12.37	13.38	13.74	15.67	16.40	16.81	17.67			
[M-H] ⁺ (m/z)	743,581,4 49,287	581,287 87	611,449,2 87	579	449,287	355,181	291	291	579	611,303	465,303	595,287	579			
UV λ _{max} (nm)	520, 280	520, 280	520,350, 280	279	520, 280	330, 280	280	280	279	360, 270	360, 270	356, 264	279			
Proba Matrix type	Cy 3- sam-5- gluc	Cy 3-sam	Cy 3,5- digluc	Procy dim is 1	Cy 3-gluc	Ac chlor	Catech	Epicatec h	Procy dim is 2	Q 3-rut	Q 3-gluc	K 3-rut	Procy dimer is 3	Anthocy	Flav	Hydr oxye ac
N1MV	40.783± 0.002g	33.788± 0.002g	28.891± 0.002i	244.953± 0.002g	Nd	5808.697±0. 002c	125.758± 0.002j	112.941± 0.002j	116.145± 0.002h	905.806± 0.002e	73.45± 0.002d	182.837± 0.002c	317.368± 0.002c	103.462 ±0.006	2079.2 31±0.0 16	5808. 697± 0.002
H1MV	40.545± 0.002h	Nd	29.53± 0.002i	181.152± 0.002j	Nd	10257.656±0. .002a	129.718± 0.002h	140.135± 0.002g	142.739± 0.002e	4057.00± 0.002b	73.15± 0.002f	410.596± 0.002c	310.062± 0.002d	70.075± 0.004	5444.5 52±0.0 16	1025 7.656 ±0.00 2
N4F	33.508± 0.002j	Nd	31.728± 0.002g	259.168± 0.002f	77.839± 0.002h	4948.771± 0.002d	160.652± 0.002g	162.609± 0.002e	139.775± 0.002g	1983.462 ±0.002c	127.141± 0.002b	520.236± 0.002b	1827.588 ±0.002b	143.075 ±0.006	5180.5 88±0.0 16	4948. 771± 0.002
H4F	37.916± 0.002i	Nd	29.787± 0.002h	358.277± 0.002c	121.287± 0.002g	7429.495± 0.002b	195.378± 0.002d	202.984± 0.002b	147.205± 0.002d	6178.463 ±0.002a	209.863± 0.002a	1244.874 ±0.002a	2913.322 ±0.002a	188.99± 0.006	11450. 366±0. 016	7429. 495± 0.002
N5FrV	53.048± 0.002f	34.972± 0.002f	31.843± 0.002f	206.516± 0.002i	228.418± 0.002e	2072.697± 0.002e	173.396± 0.002f	191.229± 0.002d	198.236± 0.002c	1254.869 ±0.002f	51.402± 0.002i	57.882± 0.002g	95.691±0 .002g	348.281 ±0.008	2229.2 21±0.0 16	2072. 697± 0.002
H5FrV	55.598± 0.002e	39.319± 0.002e	35.78± 0.002e	240.074± 0.002h	177.161± 0.002f	1186.13± 0.002f	396.994± 0.002a	205.707± 0.002a	239.426± 0.002a	1504.402 ±0.002d	37.304± 0.002j	55.995± 0.002h	106.498± 0.002e	307.858 ±0.008	2786.4 ±0.016	1186. 13±0. 002
N6FrR	92.338± 0.002c	40.903± 0.002d	76.132± 0.002c	350.014± 0.002d	277.996± 0.002d	302.247± 0.002i	191.222± 0.002e	140.873± 0.002f	142.164± 0.002i	256.771± 0.002d	73.984± 0.002e	72.89± 0.002e	98.916±0 .002f	487.369 ±0.008	1326.8 34±0.0 16	302.2 47±0. 002
H6FrR	74.825± 0.002e	41.469± 0.002e	37.607± 0.002e	259.423± 0.002e	680.508± 0.002c	884.757± 0.002c	384.233± 0.002c	200.235± 0.002b	216.962± 0.002b	1407.889 ±0.002e	65.738± 0.002e	49.011± 0.002e	Nd	834.409 ±0.008	2583.4 91±0.0 14	884.7 57±0.

Monitorizarea trasabilității unor compuși bioactivi de interes pe stadii de dezvoltare morfologică a fructelor de soc și evaluarea unui preparat fitoterapeutic cu efect nefroprotector

	0.002d	0.002c	0.002d	0.002c	0.002h				0.002g	0.002j			002
N7FrN	260.971± 0.002b	82.463± 0.002b	156.729± 0.002b	1361.398 ±0.002b	3045.063± 0.002b	99.587± 0.002j	129.298± 0.002i	131.723± 0.002h	127.479± 0.002h	158.603± 0.002j	61.958± 0.002h	59.901± 0.002f	Nd
													3545.22 6±0.008 14
H7FrN	332.164± 0.002a	121.412± 0.002a	170.991± 0.002a	1479.139 ±0.002a	4611.039± 0.002a	923.757± 0.002g	386.604± 0.002b	118.635± 0.002i	122.281± 0.002i	948.865± 0.002g	118.758± 0.002c	51.443± 0.002i	Nd
													5235.60 6±0.002 14
(S)	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***

Flavonoids in matrix type: **cy 3-sam-5-gluc**: cyanidin 3-sambubioside-5-glucoside; **cy 3-sam**: cyanidin 3-sambubioside; **cy 3,5-digluc**: cyanidin 3,5-diglucoside; **procyan dimer is1**: procyanidin dimer isomer1; **cy 3-glu**: cyanidin 3-glucoside; **ac chlor**: acid chlorogenic; **catech**: catechina; **epicatech**: epicatechino; **procyan dim is2**: procyanidin dimer isomer 2; **q 3-rut**: quercentin 3-rutinoside (rutin); **q 3-gluc**: quercentin 3-glucoside; **k 3-rut**: kaempferol-3-rutinoside; **procyan dim is3**: procyanidin dimer isomer 3; **anthoc**: anthocyanins; **flav**: flavonols; **hydroxyc ac**: hydroxycinnamic acids; Values are expressed as mean of two replicates. Values with different letters in the same column indicate statistically significant differences (Tukey's test). NS not significant, P>0.05; *significant P≤0.05; **very significant P≤0.01; ***extremely significant P≤0.001; 1 - n.d., cannot be determined as there is no statistical difference between the results.

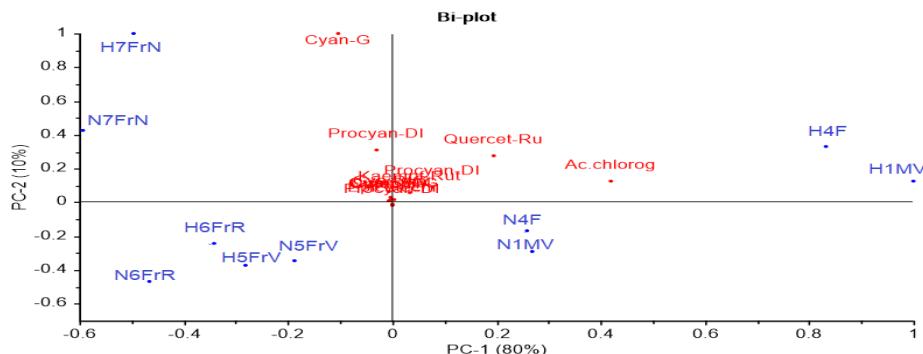


Fig. 6.8 Loading plot pentru PCA în funcție de 13 variabile măsurate la HPLC: (1) cyanidin 3-sambubioside-5-glucoside; (2) cyanidin 3-sambubioside; (3) cyanidin 3,5-diglucoside; (4)procyanidin dimer isomer1; (5)cyanidin 3-glucoside; (6) acid chlorogenic; (7) catechina; (8)epicatechino; (9) procyanidin dimer isomer 2; (10) quercentin 3-rutinoside (rutin); (11) quercentin 3-glucoside; (12) kaempferol-3-rutinoside; (13) procyanidin dimer isomer 3;

Fig. 6.8 PCA loading plot of 13 variables measured on HPLC: (1) cyanidin 3-sambubioside-5-glucoside; (2) cyanidin 3-sambubioside; (3) cyanidin 3,5-diglucoside; (4)procyanidin dimer isomer1; (5)cyanidin 3-glucoside; (6) acid chlorogenic; (7) catechina; (8)epicatechino; (9) procyanidin dimer isomer 2; (10) quercentin 3-rutinoside (rutin); (11) quercentin 3-glucoside; (12) kaempferol-3-rutinoside; (13) procyanidin dimer isomer 3;

6.3.1.4 Identificarea și cuantificarea compușilor de aromă

6.3.1.4 Identification and quantification of volatile compounds

Profilul de aromă al inflorescențelor de soc este prin excelență un cumul a peste 100 de compuși de aromă, ce îmbină individualitatea fiecăruiu într-un tot unitar parfumat. Dependent de această cifră cuantificată de PAPI (2014), conform autorului profilul compușilor de aromă rezultat în urma comparării a 11 soiuri cultivate de soc, pe același sit de plantare și recoltate în același timp, indică faptul că compoziția volatilelor este în mare măsură dependentă de soi, iar habitatul de dezvoltare al arbustului are un rol minor în amprenta profilului volatil, pentru aceeași perioadă de vegetație.

Nota distinctă a profilelor de aromă este redată, conform literaturii (KAACK, 2010), în funcție de variația componentelor terpenoidice. Studiu de față aduce în prim plan sub aspectul analizei compușilor volatili, trasabilitatea acestora începând de la fază inițială de dezvoltare a mugurelui verde urmată de mugure glaben, continuând cu inflorescențele, fruct de soc verde, fruct de soc roșu și până la maturitatea fructului, la două genotipuri de soc distințe (*S. nigra* L. și *S. nigra Haschberg*). Astfel, analizând tabelul 6.8 se observă o concentrare a claselor de aldehide și alcoolii, pentru probele de muguri florali și muguri galbeni la ambele genotipuri, ce precedă etapa de înflorire a socului, cu deosebirea că în cea de a două fază sunt prezenți și esteri și furani. În ceea ce privește inflorescențe de soc, s-au identificat un număr de 30-32 de compuși volatili pentru varinta de soc cultivată, respectiv soc spontan, sumă variabilă în funcție de tehnica de extracție a aromei delicate a florilor și pragul de detecție a compusului.

Caracterizarea profilului de aromă al florilor de soc, pentru ambele variante, cuprinde cea mai însemnată cantitate de terpenoide ($38.91 \pm 0.365\%$ N4F, $29.67 \pm 0.246\%$ H4F), în timp ce aldehidele se înjumătătesc ca și procent față de etapa de mugure floral. Aroma distinctă dezvoltată de florile de soc cuprinde nuanțe florale, fructate și dulci, redată de linalool, cis-rose oxide sau benzaldehide. În figura 6.9 este prezentată suprapunerea chromatogramelor ITEX/GC-MS pentru varianta de soc spontan (*S. nigra* L.) și varianta cultivată (*Sambucus nigra Haschberg*), pentru toate probele studiate. Cromatogramele suprapuse confirmă fază de mugure floral glaben și inflorescențe de soc, ca fiind cele mai abundente în dezvoltarea profilului de aromă. Culorile predominante de roz (mugure floral glaben) și albastru (inflorescențe de soc), din figura 6.9 indică procentul și numărul de compuși volatili mai abundant la varianta de soc din flora spontană comparativ cu cea de cultură. Literatura demonstrează faptul că componentele volatile regăsite în formele spontane ale socului (cu referire la inflorescențe), nu pot fi atribuite prin comparare cu forme cultivate de soc, fiind luat în studiu chiar *S. nigra Haschberg*, conform lui PAPI (2014). Pentru etapele finale de dezvoltare morfologică a fructului de soc, procentul de aldehide din nou crește, având valorile cele mai ridicate.

Tabelul 6.8

Concentrațiile relative medii (% din aria totală a picurilor) a compușilor volatili din probele analizate, prin tehnica HS-ITEX/GC-MS
Mean relative concentrations (% from total peak areas) of volatile compounds analyzed by HS-ITEX/GC-MS technique

Compuș volatil Volatile compound	Aroma percepță Odour perception	Timp de retinție Retention time (min)	Proba / Sample (%) / Genotypes					
			N1MV H1MV	N3MG H3MG	N4F H4F	N5FrV H5FrV	N6FrR H6FrR	N7FrN H7FrN
Benzaldehyde	Migdale,zahar ars	19.07	12.59±0.007 42.96±0.014	40.81±0.014 37.05±0.007	17.8±0.071 37.9±0.021	2.37±0.014 3.6±0.141	2.43±0.0141 3.24±0.007	0.85±0.0283 11.68±0.014
Benzeneacetaldehyde	Floral	23.077	0.00	0.00	0.00	0.00	0.37±0.0141	0.00
Hexanal	Iarbă, seu, grăsimă	7.348	29.91±0.014 18.75±0.021	20.75±0.035 28.72±0.035	12.74±0.028 3.95±0.035	24.79±0.014 36.45±0.014	35.83±0.0424 40.09±0.007	64.53±0.0141 2.07±0.007
2-Hexenal, (E)-	Verde, frunza	11.439	33.43±0.007 21.78±0.014	17.08±0.007 24.25±0.021	15.15±0.021 9.08±0.014	58.95±0.021 29.42±0.021	51.82±0.0212 13.15±0.021	22.97±0.0141 0.00
Heptanal	Grăsimă, citrice, rânced	15.603	0.00 0.00	0.00 0.68±0.014	2.85±0.028 0.00	0.00	0.00	0.00
2-Pentenal, (E)-	Căpșuni, fructe, tomate	5.203	0.00 0.00	0.00 0.38±0.007	0.00	0.00	0.00	0.00
Pentanal, 3-methyl-	Migdale, malt, picant	5.72	0.00 0.00	0.00 0.07±0.007	0.00	0.00	0.00	0.00
Nonanal	Grăsimă, citrice, verde	25.565	0.00 0.00	0.00 0.07±0.007	1.21±0.014 0.98±0.014	1.06±0.028 2.11±0.007	0.88±0.0141 2.34±0.0014	1.84±0.0071 0.35±0.014
(Total) Aldehydes			75.93±0.028 83.49±0.049	78.64±0.056 90.61±0.091	49.75±0.162 52.59±0.098	87.17±0.077 71.58±0.183	91.33±0.1059 58.82±0.049	90.19±0.0636 17.63±0.042
Benzoic Acid	Urină	27.717	0.45±0.007	0.00	1.06±0.014	0.00	0.00	1.69±0.0707
(Total) Acids			0.45±0.007 0.00	0.00 0.00	1.06±0.014 0.00	0.00	0.00	1.69±0.0707 0.51±0.028
1-Butanol, 3-methyl-	Whiskey, malt	4.447	0.51±0.007 1.38±0.014	1.57±0.014 0.94±0.014	0.58±0.014 0.87±0.007	0.93±0.007 0.00	0.9±0.0071 2.29±0.007	0.00 55.29±0.007
1-Butanol, 2-methyl-	Vin, ceadă, malt	4.543	1.94±0.014 0.44±0.007	0.78±0.007 0.79±0.007	0.23±0.014 1.05±0.014	1.09±0.007 0.00	0.67±0.0071 0.00	0.00 10.64±0.014
1-Pentanol	Fructat, balsamic	5.84	0.37±0.007 0.00	0.00 0.13±0.007	0.00	0.55±0.014 0.00	0.44±0.0071 4.49±0.014	0.00 7.52±0.021
2-Penten-1-ol, (E)-	Verdeață, plastic, cauciuc	5.893	0.23±0.014 0.00	0.00 0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Phenylethyl Alcohol	Miere, condiment, trandafir, liliac	25.799	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00	0.00	0.00	2.35±0.021
1-Hexanol	Răsină, flori, verde	13.336	2.59±0.014 0.00	0.00 0.00	0.00 1.29±0.035	0.29±0.014 1.13±0.014	0.88±0.0141 0.00	2.33±0.0071 0.55±0.035
3-hexen-1-ol, (Z)-	Iarbă	11.737	13.37±0.014 7.89±0.014	10.01±0.021 3.14±0.007	0.68±0.014 8.97±0.007	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00
2-Hexen-1-ol, (E)-	Verde, frunze, nuc	12.957	1.57±0.007 0.00	0.00 0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1-Octen-3-ol*	Săpun, plastic	20.328	0.26±0.007 0.34±0.007	0.00 0.28±0.014	0.00 0.38±0.014	0.00	0.00	0.00
2-Octen-1-ol, 3,7-dimethyl-	Săpun, plastic	30.483	0.51±0.007 0.00	0.00 0.00	2.2±0.141 1.13±0.014	0.00	0.00	0.00
3-Hexen-1-ol, (E)-	Mușchi, proaspăt	11.751	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00	0.00	0.00
(Total) Alcohols			20.7±0.091 10.05±0.042	12.36±0.042 5.28±0.049	3.69±0.183 13.69±0.091	2.89±0.042 9.75±0.035	2.89±0.0354 12.7±0.028	2.33±0.0071 68.83±0.077
Benzoic acid, ethyl ester	Urină	28.097	0.00 0.44±0.007	0.00 0.22±0.021	0.00	0.00	0.00	0.00
Butanoic acid, 3-methyl-, methyl ester	Măr	11.69	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.28±0.014	0.00	0.00	0.00 1.62±0.021
Butanoic acid, 3-methyl-, ethyl ester	Fructe	6.093	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00	0.00	0.00
Butanoic acid, 2 methyl-, ethyl ester	Fructe	11.153	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.72±0.021	0.00	0.00	0.00
Butanoic acid, 3-methyl-, 3-	Măr	25.662	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Georgiana Smaranda Petut

methylbutyl ester		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.94±0.07
Hexanoic acid, ethyl ester	Ceară	21.206	0.00	0.00	0.51±0.014	0.00	0.00
			0.00	0.33±0.014	1.13±0.014	0.00	0.00
Hexanoic acid, methyl Ester	Ananas	17.17	0.00	0.00	0.61±0.014	0.00	0.00
			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Methyl Salicylate	Mentă	28.894	0.00	0.00	0.6±0.007	0.00	0.00
			0.00	0.12±0.014	0.00	0.00	0.00
Methyl 3-methyl-2-pentenoate	Fructe	16.775	0.00	0.00	0.42±0.014	0.00	0.00
			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
n-Valeric acid cis-3-hexenyl ester	ranced	30.581	0.00	0.00	0.83±0.014	0.00	0.00
			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Valeric acid, 3-methyl-2-oxo, methyl ester	Sudoare, acid ,rânced	19.681	0.00	3.01±0.014	0.00	0.00	0.00
			0.00	0.26±0.007	0.53±0.014	0.00	0.00
(Total) Esteri		0.44±0.007		0.93±0.056	2.97±0.063	0.00	0.00
Furan, 2-pentyl-	Fasole verde, unt	20.71	0.00	2.89±0.021	0.00	0.00	0.00
			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2-n-Pentylfuran	Fasole verde, unt	20.709	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			0.54±0.007	0.73±0.014	0.00	0.00	0.00
Trans-2-(2-Pentenyl) furan	Verde	21.137	0.00	0.15±0.014	0.00	0.00	0.00
			0.00	0.12±0.000	0.00	0.00	0.00
(Total) Furani		0.54±0.007		0.83±0.014	0.00	0.00	0.00
Acetophenone	Must, floare, migdale	23.98	0.74±0.007	0.73±0.014	0.61±0.028	2.56±0.007	1.96±0.0141
			0.37±0.007	0.35±0.021	0.37±0.014	6.94±0.014	10.84±0.007
2,3-Octanedione	Unt	20.634	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			0.22±0.007	0.00	0.00	0.00	0.00
(Total) Ketones		0.74±0.028/0.95±0.014		0.73±0.014/0.35±0.021	0.61±0.028/0.37±0.014	2.56±0.007/6.94±0.014	1.96±0.0141/10.84±0.007
Citral	Lămâie	32.255	0.00	0.00	0.42±0.007	0.00	0.00
			0.00	0.00	0.63±0.014	0.00	0.00
Caryophyllene	Lemn	39.993	0.00	0.66±0.021	0.00	0.00	0.00
			4.13±0.014	1.81±0.021	1.03±0.014	3.68±0.014	0.00
Alpha-Caryophyllene	Pământ	41.632	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			0.24±0.014	0.07±0.014	0.06±0.014	0.00	0.00
P-Cymenene	Solvent, benzină, citrice	24.931	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			0.00	0.00	0.17±0.014	0.00	0.00
Limonene	Lămâie, portocală	22.417	0.14±0.007	0.00	1.1±0.071	2.55±0.028	2.91±0.0141
			0.00	0.12±0.007	0.00	0.00	1.72±0.000
D-Limonene	Portocală	22.392	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			0.00	0.00	0.00	2.97±0.007	14.61±0.007
Linalool oxide	Flori, lemn	24.816	0.00	0.00	0.22±0.014	0.00	0.00
			0.00	0.00	0.1±0.014	0.00	0.00
Linalool oxide pyranoside	Floral	28.025	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			0.00	0.00	4.1±0.028	0.00	0.00
Beta-Linalool	Floare, lavandă	25.414	0.35±0.014	0.00	8.93±0.014	4.87±0.014	0.91±0.0071
			0.00	0.00	8.76±0.014	0.19±0.007	0.00
Epoxylinalol	Floare	28.092	1.04±0.007	0.00	15.19±0.028	0.00	0.00
			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Germacrene D	Lemn, condimente	42.377	0.00	0.00	0.17±0.007	0.00	0.00
			0.00	0.00	0.07±0.007	0.00	0.00
Isopulegol	larbă	27.35	0.00	0.00	0.11±0.007	0.00	0.00
			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
(+)-4-Carene	Coaja de portocală	24.751	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			0.00	0.00	0.00	1.5±0.071	0.00
Beta-cis-Ocimene	Dulce, ierburi	23.277	0.00	1.57±0.014	1.46±0.014	0.00	0.00
			0.00	0.00	12.11±0.021	0.00	0.00
Beta-trans-Ocimene	Dulce, ierburi	22.788	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			0.00	0.00	0.5±0.071	0.00	0.00
Cis-Rose oxide	Dulce, trandafir	25.717	0.00	0.00	0.74±0.007	0.00	0.00
			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Trans-Rose oxide	Flori	25.733	0.00	0.00	0.3±0.007	0.00	0.00
			0.00	0.00	0.16±0.014	0.00	0.00
Alpha-Pinene	Pin	17.288	0.00	0.00	0.22±0.007	0.00	0.00
			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Beta-Myrcene	Balsamic, must, condimente	20.634	0.00	0.00	2.12±0.021	0.00	0.00
			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1,3,8-p-Menthatriene	Terebentină	26.452	0.00	0.00	0.6±0.007	0.00	0.00
2-Pinen-4-one, Verbenone	Pin	25.047	0.00	0.00	0.26±0.014	0.00	0.00
			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Monitorizarea trasabilității unor compuși bioactivi de interes pe stadii de dezvoltare morfologică a fructelor de soc și evaluarea unui preparat fitoterapic cu efect nefroprotector

1,2-Oxolinalool	Gras	23.904	0.00	0.00	7.67±0.021	0.00	0.00	0.00
			0.00	0.00	1.38±0.014	0.00	0.00	0.00
(Total) Terpenoids			1.53±0.028	2.23±0.035	38.91±0.365	7.42±0.042	3.82±0.0212	2.84±0.0212
			4.37±0.028	2±0.042	29.67±0.246	4.66±0.085	14.61±0.007	1.72±0.000
n.i		21.37	0.00	0.00	1.16±0.014	0.00	0.00	0.00
			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

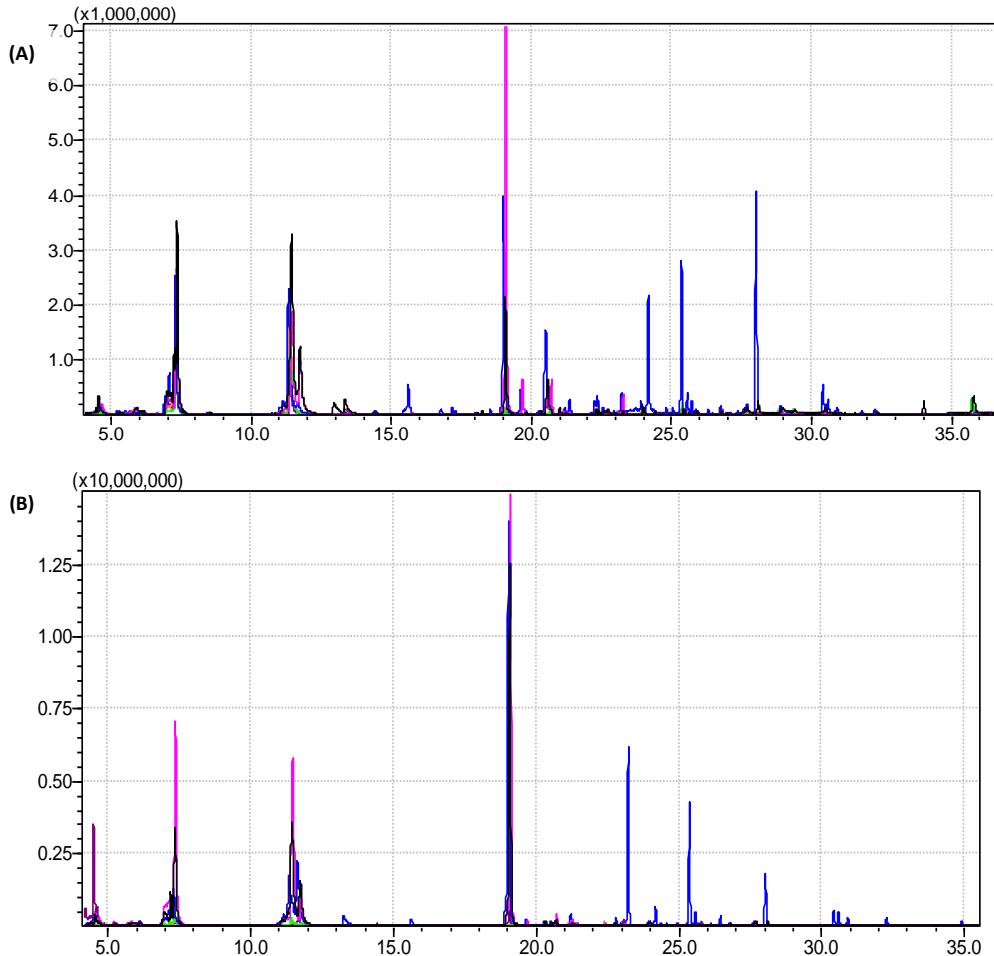


Fig.6.9 Suprapunerea chromatogramelor ITEX/GC-MS pentru (A) *S. nigra* L. (B) *Sambucus nigra* Haschberg
 Fig. negru (muguri florali de soc), roz (muguri florali galbeni), albastru (inflorescențe de soc), verde (fruct de soc verde), portocaliu (fruct de soc roșu), mov (fruct de soc violet);

Fig. 6.9 The overlapping of ITEX/GC-MS chromatograms for (A) *S. nigra* L. (B) *Sambucus nigra* Haschberg :- black (elderflower buds swelling), pink (elderflower bud), blue (elderflowers), green (green elder berries), orange (red elder berries), purple (violet elder berries);

Pe parcursul dezvoltării mugurelui și până la fructul copt, s-au identificat 5 compuși volatili prezenti în fiecare etapă. În figurile 6.10 și 6.11 sunt prezentate suprapunerea chromatogramelor ITEX/GC-MS pentru compușii 2-Hexenal, (E)-, 3-

Hexen-1-ol, (Z)- și pentru benzaldehidă, la genotipul spontan, cu precizarea că primele două componente au fost identificate ca fiind de referință și în probele analizate de KAACK (2008). Aroma verde dezvoltată de 2-Hexenal (E)- este cea mai intensă în faza de mugure, urmată de inflorescență și mugure galben. Nota de migdal, de zahăr ars percepță pentru benzaldehidă, se regăsește preponderent în faza de mugure galben și cel mai salb dezvoltată pentru fructul verde.

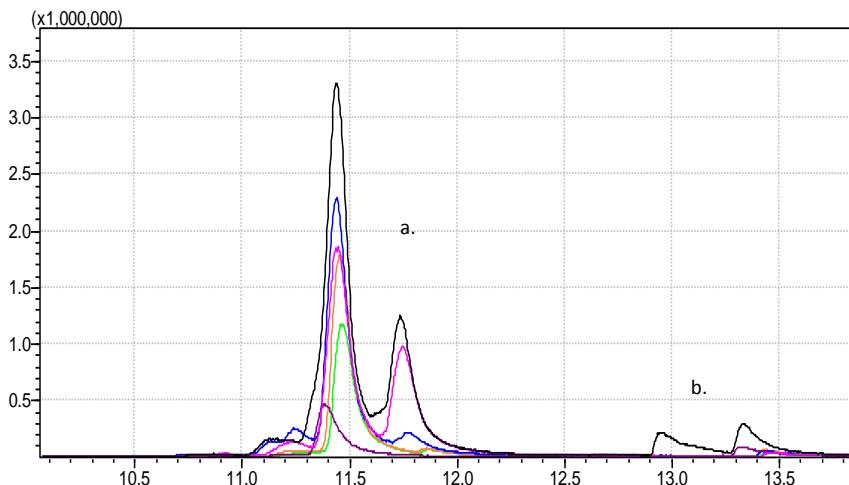


Fig.6.10 Suprapunerea chromatogramelor ITEX/GC-MS pentru compușii (a) 2-Hexenal, (E)- și (b) 3-Hexen-1-ol, (Z)-, în cazul *S. nigra* L.: negru (muguri florali de soc), roz (muguri florali galbeni), albastru (inflorescențe de soc), verde (fruct de soc verde), portocaliu (fruct de soc roșu), mov (fruct de soc violet);

Fig. 6.10 The overlapping of ITEX/GC-MS chromatograms for (a) 2-hexenal, (E)- and (b) 3-hexen-1-ol, (Z)-: black (elderflower buds swelling), pink (elderflower bud), blue (elderflowers), green (green elder berries), orange (red elder berries), purple (violet elder berries);

În ceea ce privește stabilirea interrelațiilor dintre materialul biologic (muguri florali de soc, muguri florali galbeni, inflorescențe de soc, fruct de soc verde, fruct de soc roșu, fruct de soc violet) și compușii volatili în vederea interpretării similitudinilor și diferențele caracteristice probelor analizate, s-a utilizat metoda chemometrică numită analiza componentelor principale (PCA), conform figurii 6.12.

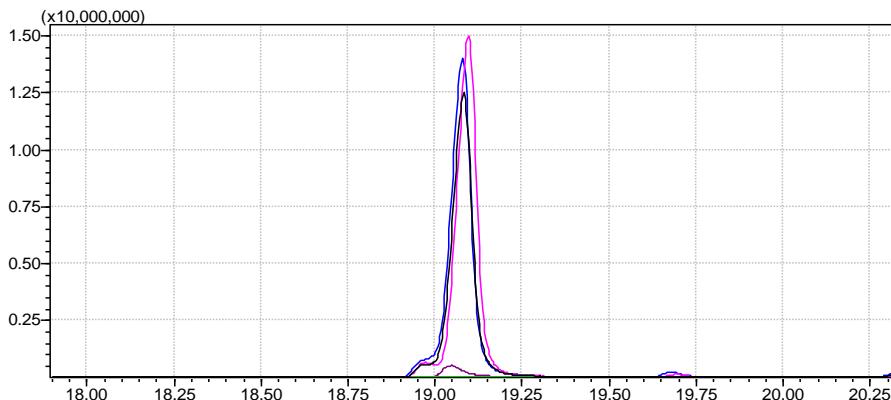


Fig. 6.11 Suprapunerea chromatogramelor ITEX/GC-MS pentru benzaldehidă, în cazul *S. nigra* L: negru (muguri florali de soc), roz (muguri florali galbeni), albastru (inflorescențe de soc), verde (fruct de soc verde), portocaliu (fruct de soc roșu), mov (fruct de soc violet);

Fig.6.11 The overlapping of ITEX/GC-MS chromatograms for benzaldehyde: black (elderflower buds swelling), pink (elderflower bud), blue (elderflowers), green (green elder berries), orange (red elder berries), purple (violet elder berries);

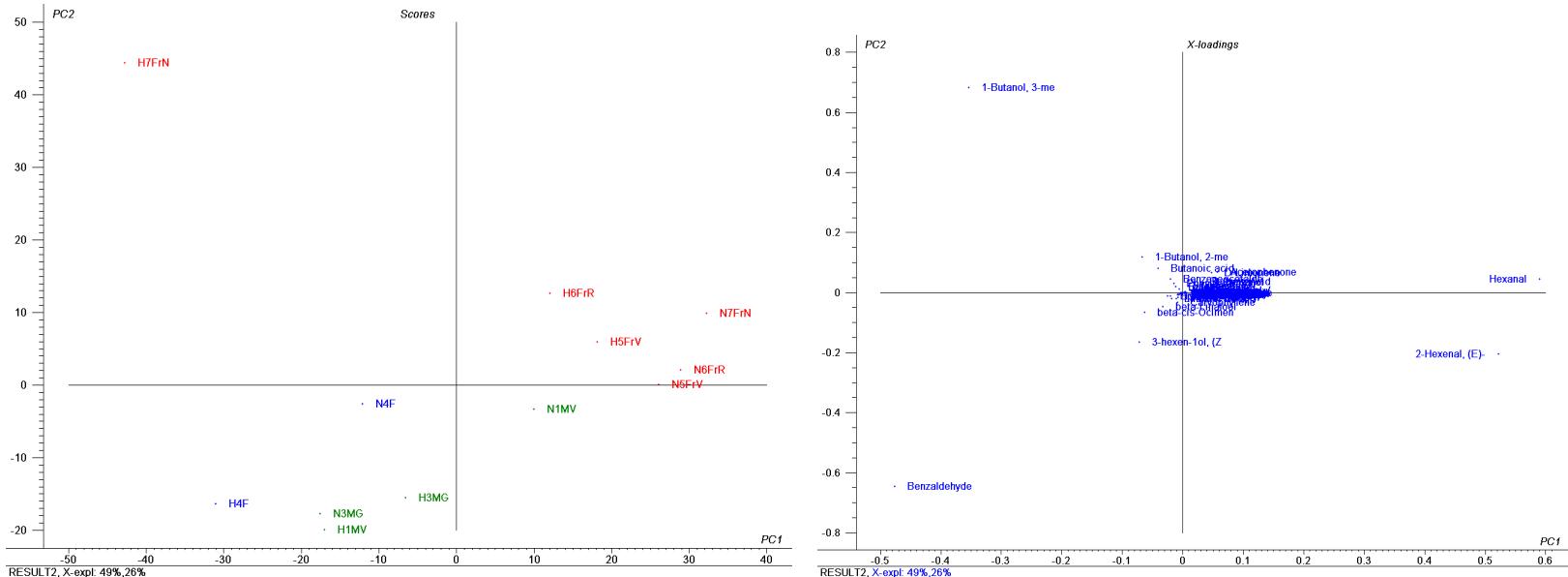


Fig.6.12 Analiza de tip PCA a compușilor de aromă în funcție de materialul biologic

Fig. 6.12 PCA analysis type aroma compounds according to organic material

6.4.1 Amprenta IR a extractelor metanolice

6.4.1 IR spectra of methanolic extracts

Spectrele FT-IR pentru toate extractele metanolice din soc prezintă semnale similare (fig. 6.13). În alcătuirea lor, extractele din soc dețin: metanol (solventul în care s-a făcut extracția), compuși fenolici (acizi fenolici, flavonoide, catechine, epicatechine, procianidine), zaharuri, acizi organici. În cazul fenolilor, esterilor, acetalilor, în conformitate cu KHALIDDINOV (1985), aceștia dețin absorbții maxime în regiunea $750\text{-}900\text{ cm}^{-1}$. Prezența bandei IR în această regiune, dă indicii asupra prezenței compușilor aromatici. Compusii fenolici au un rol major fiind asociați și cu întinderea aromatică -OH de la $1200\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$. Toate probele dețin aceste semnale în regiunea mai sus amintită.

În ceea ce privește regiunea $1030\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$, regiune legată de gruparea -COH (BEVIN, 2006), aceasta este asociată cu zaharurile (C-O întindere în cazul glucozei la 1030 cm^{-1} iar pentru fructoză la 1060 cm^{-1}). Banda de 1600 cm^{-1} (C=C), caracterizează prezența polifenolilor simpli (exemplu acid galic, catechine) (ROGGERO, 1989). Banda de absorbție caracteristică acizilor organici prezenți (citric și malic), implicați în procesele de glicoliză este de la $1716\text{-}1743\text{ cm}^{-1}$. Pentru benzile de acizi se constată următorul fapt, acestea se suprapun în spectrul FTIR, iar acizii neputând fi discriminați unul față de altul din punct de vedere calitativ, se raportează astfel la valoarea totală a acestora. Banda de la $2852\text{-}2924\text{ cm}^{-1}$ specifică unor derivați și precursori lipidici, denotă vibrații de întindere -C-H din interiorul grupurilor CH_3 sau CH_2 . Banda de la 3010 cm^{-1} vizibilă doar la fruct roșu și fruct copt, în special la genotipul *Sambucus nigra Haschberg*, pune în evidență prezența de legături duble multiple, specifice pigmentilor acumulați (antociani).

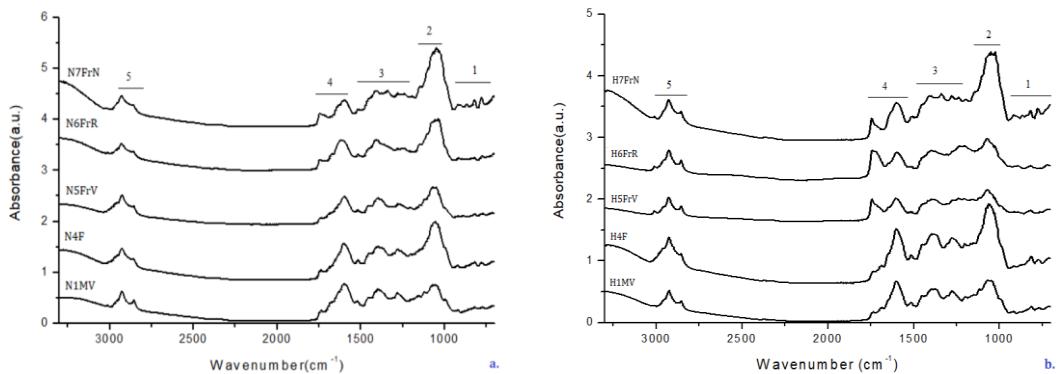


Fig. 6.13 Spectrele ATR-FTIR suprapuse pentru (a.) *S.nigra* L. (N1MV, N4F, N5FrV, N6FrR, N7FrN) și (b.) *Sambucus nigra* Haschberg (H1MV, H4F, H5FrV, H6FrR, H7FrN), pe domeniul 650-3300 cm⁻¹

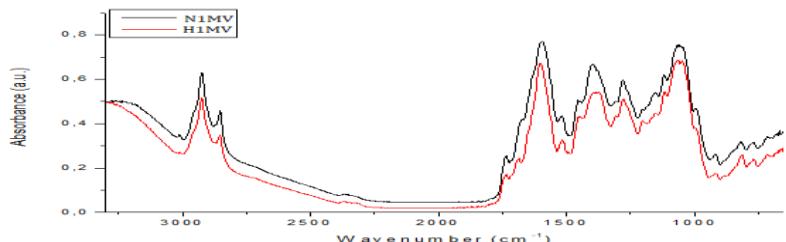
Fig.6.13 The overlapping of ATR-FTIR for (a.) *S.nigra* L. (N1MV, N4F, N5FrV, N6FrR, N7FrN) și (b.) *Sambucus nigra* Haschberg (H1MV, H4F, H5FrV, H6FrR, H7FrN), in the field range 650-3300 cm⁻¹

Zona de frecvență	Atribuire
Zona 1 (700-990 cm ⁻¹)	=C-H vibrația de indoare în afara planului, benzi asociate cu structura inelului fenolic; Inele de benzen monosubstituite prezintă două benzi: 690 și 745cm ⁻¹ ;
Zona 2 (1000-1210cm ⁻¹)	950-1200 cm ⁻¹ asociată cu vibrația de întindere (C—O—C) la polizaharide; Banda de la nr. de undă 1033 cm ⁻¹ se datorează vibrației de întindere C—OH a oligozaharidelor, respectiv cea de la 972 cm ⁻¹ pentru OCH ₃ (polizaharide);
Zona 3 (1210-1500cm ⁻¹)	Compuși amino prezintă o vibrație de întindere asimetrică la 1600-1530 cm ⁻¹ ;
Zona 4 (1500-1790 cm ⁻¹)	C = C vibrație de întindere din inel benzenic apare adesea ca o bandă la 1600 cm ⁻¹ ; C=O din acizi organici –vibrație de întindere la 1700 cm ⁻¹ ;
Zona 5 (2850-3020)	- OH vibrație de întindere și lanțuri acil CH ₂ /CH ₃ și legături duble (catechine, ac. galic, dioli, trioli – compuși polifenolici cu duble legături;

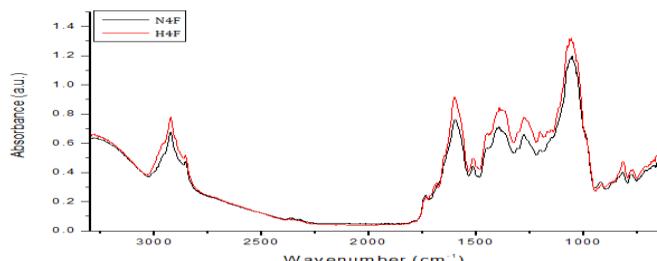
Monitorizarea trasabilității unor compuși bioactivi de interes pe stadii de dezvoltare morfologică a fructelor de soc și evaluarea unui preparat fitoterapeutic cu efect nefroprotector



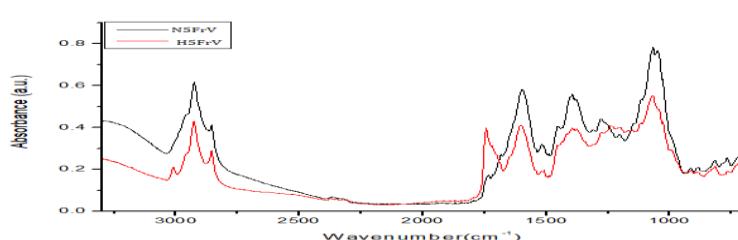
Spectrele ATR-FTIR suprapuse pentru N1MV și H1MV, pe domeniul 650-3300 cm⁻¹



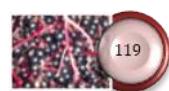
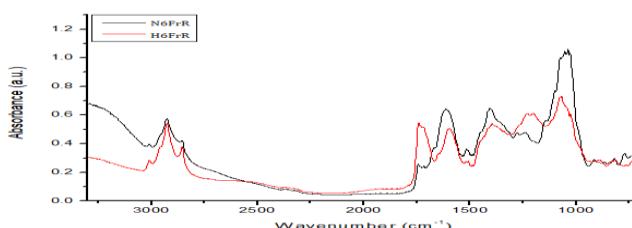
Spectrele ATR-FTIR suprapuse pentru N4F și H4F, pe domeniul 650-3300 cm⁻¹



Spectrele ATR-FTIR suprapuse pentru N5FrV și H5FrV, pe domeniul 650-3300 cm⁻¹



Spectrele ATR-FTIR suprapuse pentru N6FrR și H6FrR, pe domeniul 650-3300 cm⁻¹



Spectrele ATR-FTIR suprapuse pentru N7FrV și H4FrV, pe domeniul 650-3300 cm⁻¹

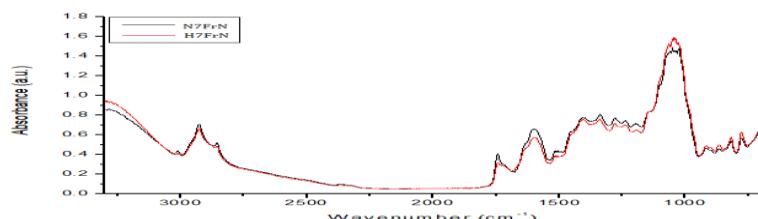


Fig. 6.14 Imaginea spectrelor comparativă pe diferite domenii de frecvențe, pentru probele de soc
Fig. 6.14 The image of comparative spectra on different frequency domains, for elder samples

În ceea ce privește interpretarea comparativă a datelor, s-au identificat în mod individual numerele de undă pe cele 5 zone ale spectrului FTIR (Tabel 6.9).

Tabelul 6.9

Numerele de undă pe cele cinci zone ale spectrului FTIR, la probele examineate
Wave numbers of a FTIR spectrum for five fields of samples examined

Sample	ZONA 1 (700-990 cm ⁻¹)	ZONA 2 (1000-1210 cm ⁻¹)	ZONA 3 (1210-1500 cm ⁻¹)	ZONA 4 (1500-1790 cm ⁻¹)	ZONA 5 (2850-3030 cm ⁻¹)
N1MV	713,767,817,918	996,1043,1118,1151,1203	1278,1307,1379,1398,1446	1519,1595,1668,1734	2852,2924,3010
H1MV	715,769,813,891,916	999,1047,1066,1116,1151	1201,1276,1305,1373,1448	1516,1602,1633,1734	2854,2924,3010
N4F	775,784,920	1029,1053,1149,1201	1276,1306,1377,1394,1446	1516,1598,1734	2854,2954,-
H4F	711,771,817,864,914	1049,1056,1149,1166	1201,1377,1448	1516,1600,1685,1734	2854,2926,-
N5FrV	711,767,817,883,914	1028,1047,1066,1114,1149,1203	1276,1311,1379,1394,1446	1516,1579,1683,1734	2854,2924,-
H5FrV	719,763,815,891,914	999,1029,1066,1116,1151	1201,1236,1276,1400,1417,1456	1561,1600,1716,1743	2854,2924,3010
N6FrR	704,771,819,866,894,916	1037,1053,1149,1199	1240,1278,1409,1446	1516,1614,1668,1743	2856,2926,3010
H6FrR	719,815,889,914,937	1028,1068,1116	1203,1228,1394	1516,1597,1716,1741	2854,2926,3010
N7FrN	702,777,817,866,896,916	1028,1143,1193	1240,1338,1404	1516,1597,1716,1743	2854,2924,3010
H7FrN	702,777,817,866,898,916	1024,1051,1195	1238,1276,1338,1417,1456	1516,1600,1716,1743	2854,2926,3010

Spectrele FTIR prezintă patru zone majore de absorbție 700-990 cm⁻¹, 1000-1210 cm⁻¹, 1210-1500 cm⁻¹, 1500-1790 cm⁻¹, 2850-3020 cm⁻¹, prezentate în tabelul de mai sus cu diferențe calitative între probe.

Interpretarea comparativă a datelor cantitative (intensitatea de absorbție a semnalelor), este prezentată în tabelul 6.10.

Tabelul 6.10

Raportul intensităților principalelor nr. de undă specifice spectrului FT-IR, pentru același stadiu de dezvoltare a planței

The intensity ratio of the main no. wave-specific FT-IR spectrum for the same stage of plant development

Raportul intensități (cm ⁻¹)	1043	1203	1278	1398	1446	1519	1596	1716	1734	2852	2924	3010
N1MV /	0,7445/	0,4641/	0,5987/	0,6695/	0,5008/	0,4344/	0,7720/	-/-	0,2560/	0,4593/	0,6294/	0,3472/-
H1MV	0,6827	0,5107	0,5107	0,5370	0,4325	0,3276	0,6729		0,1718	0,3495	0,5153	0,2701
N4F /	1,1967/	0,5544/	0,6572/	0,7147/	0,5679/	0,4429/	0,7632/	-/-	0,2432/	0,4749/	0,6788/	-
H4F	1,1691	0,6800	0,7760	0,8417	0,6667	0,4981	0,9167	0,3253	0,2347	0,5173	0,7786	
N5FrV /	0,7674/	0,3673/	0,4420/	0,5596/	0,4042/	0,3215/	0,5826/	-/-	0,17364/	0,4118/	0,6181/	-
H5FrV	0,5534	0,4019	0,3769	0,3928	0,1968	0,1973	0,4114	0,3132	0,3977	0,2906	0,4293	/0,2092
N6FrR /	1,0471/	0,4197/	0,4785/	0,6482/	-	0,3656/	0,6441/	0,2448/	0,2583/	0,4223/	0,5749/	0,3957/-
H6FrR	0,7305	0,6124	0,6075	0,5247	/0,2791	0,2759	0,5070	0,5172	0,5454	0,3776	0,5430	0,2847
N7FrN /	1,5895/	0,6494/	0,7156/	0,7568/	-	-/-	0,5737/	0,2915/	0,2975/	0,4832/	0,6582/	0,4136/-
H7FrN	1,4897	0,7152	0,7733	0,7742		0,4312	0,6590	0,3002	0,4100	0,5198	0,7074	0,4393

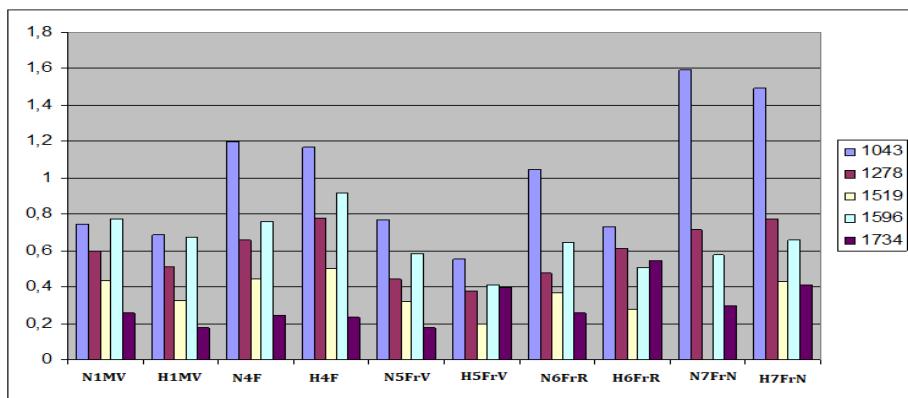


Fig. 6.15 Intensitatea semnalelor diferențiate pe diversele stadii de dezvoltare pentru soiurile *S. nigra* L. și *S. nigra* Haschberg în funcție de glucide ($1043\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$), compuși fenolici (1270 cm^{-1}), compuși amino ($1520\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$), acizi organici și esteri (1743 cm^{-1});

Fig. 6.15 The intensity of the differentiated signals at different stages of development for *S. nigra* L. and *S. nigra* Haschberg varieties depending on carbohydrates ($1043\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$), phenolic compounds (1270 cm^{-1}), amino compounds ($1520\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$), organic acids and esters (1743 cm^{-1});

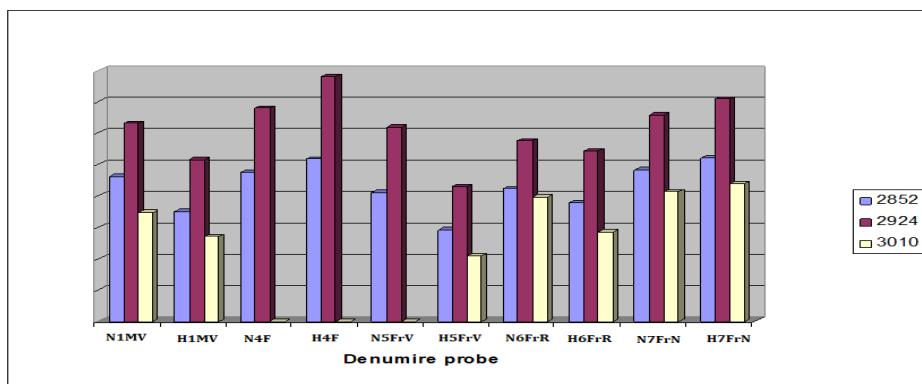


Fig. 6.16 Intensitatea semnalelor diferențiate pe diversele stadii de dezvoltare pentru soiurile *S. nigra* L. și *S. nigra* Haschberg în funcție de precursori lipidici ($2852, 2924, 3010\text{ cm}^{-1}$)

Fig. 6.16 The intensity of differentiated signals at the various stages of development for *S. nigra* L. and *S. nigra* Haschberg according to lipid precursors ($2852, 2924, 3010\text{ cm}^{-1}$)

6.5.1 Analiza biostatistică de tip Principal Component Analysis

6.5.1 Biostatistic analysis type of Principal Component Analysis

Amprentele FTIR s-au comparat pe diferite domenii de numere de undă, evidențindu-se asemănările și mai ales deosebirile care identifică specificul fiecărei probe. În dinamica de dezvoltare, de la mugurele floral la floare nu apar deosebiri semnificative între soiul spontan și cultivat. În schimb formarea fructului verde și conversia sa la fruct roșu (biosinteza de pigmenți), după fecundare devine diferită. În final, produșii antocianici sunt similari, N și H ajungând să dețină profile asemănătoare (fig. 6.17, 6.18).

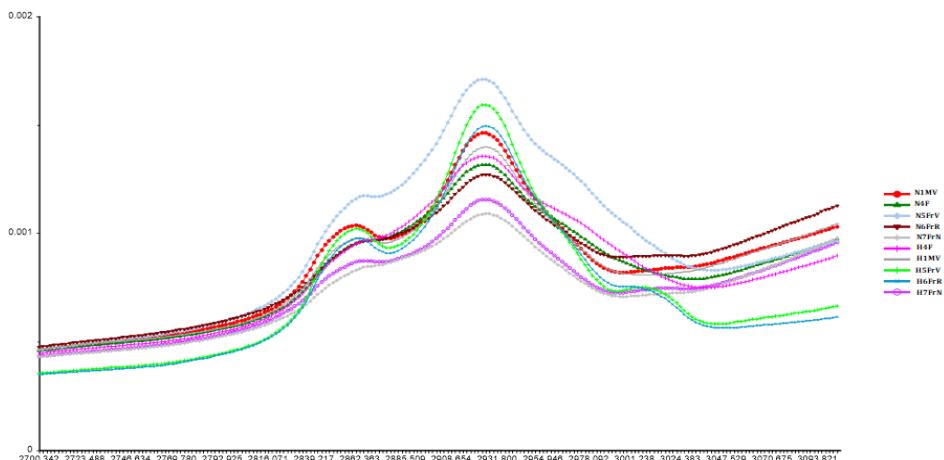


Fig. 6.17 Spectrele FTIR suprapuse pentru regiunea 2700-3100cm⁻¹ folosită la analiza PCA de mai jos

Fig. 6.17 FTIR overlapped spectra for the 2700-3100cm⁻¹ region used for PCA analysis
below

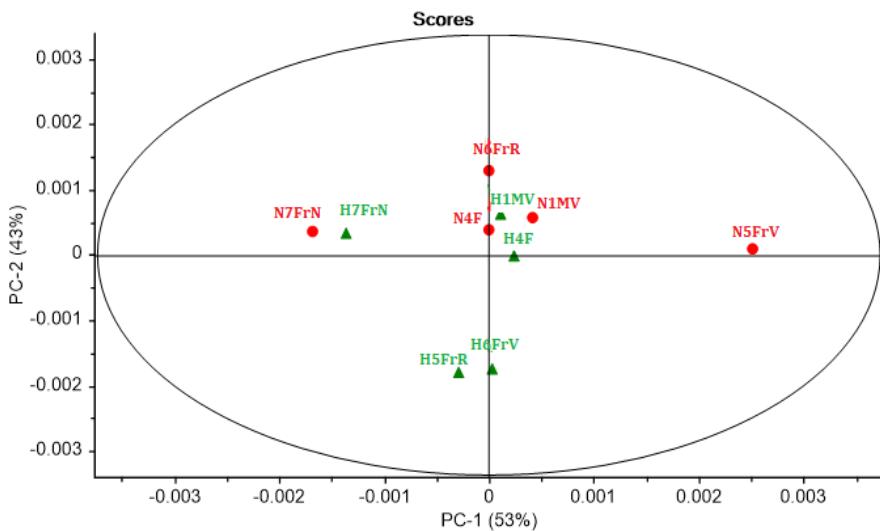


Fig. 6.18 PCA plot pentru probele de soc în funcție de spectrele FTIR pe domeniul $2700\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$

Fig. 6.18 PCA plot for elder samples depending on FTIR spectra on the $2700\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ range

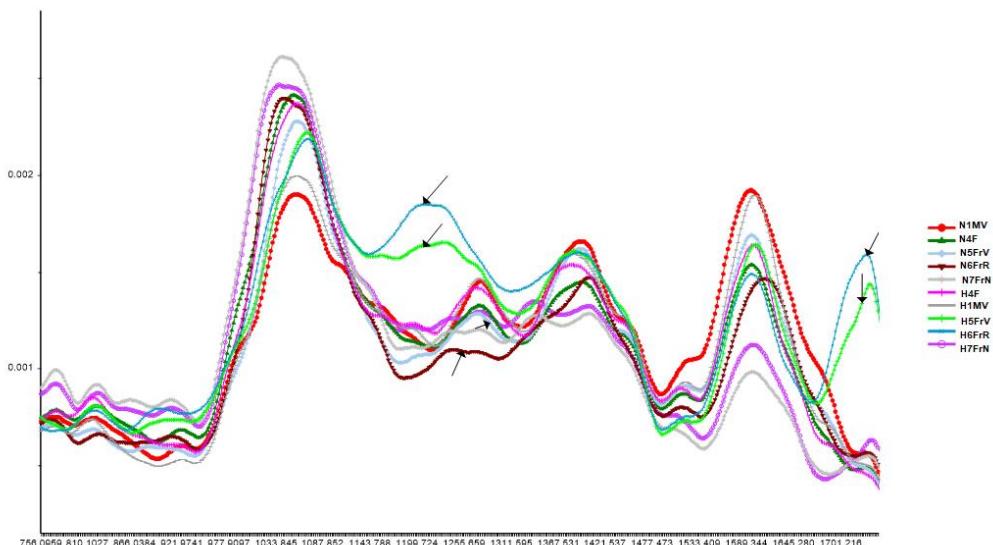


Fig. 6.19 Spectrele FTIR pe domeniul $750\text{-}1800\text{cm}^{-1}$ cu evidențierea diferențelor dintre genotipul spontan și cultivat

Fig. 6.19 FTIR spectra on the $750\text{-}1800\text{cm}^{-1}$ range, highlighting the differences between spontaneous and cultivated genotype

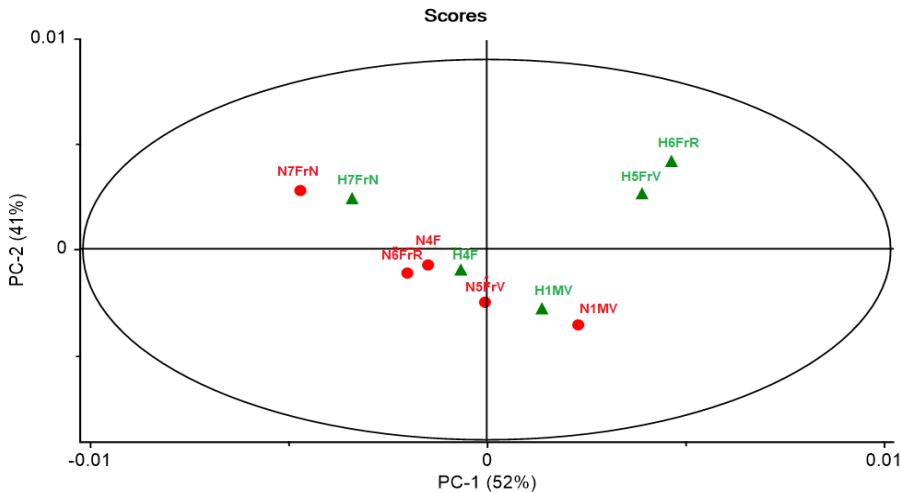


Fig. 6.20 PCA plot pentru probele de soc în funcție de spectrele FTIR pe domeniul $700\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$

Fig. 6.20 PCA plot for elder samples depending on FTIR spectra on the $700\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$

Prin analiza PCA a diferențelor între profilurile spectrelor s-a obținut gruparea probelor după structura din fig. 6.19 și fig. 6.20. Primele două componente (PC1 și PC2) au explicat 93% din varianța totală a probelor de soc și arată diferențele și similaritățile dintre acestea, în cazul de față în funcție de tipurile de carbohidrați, conținutul de acizi organici și conținutul de compuși fenolici. Rezuniile $700\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$, $2700\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ s-au determinant în distribuția probelor de-a lungul axei PC-1 și PC-2. Probele se grupează pe același stadiu de dezvoltare, mai puțin H5FrV – verde și HFrR – turcoaz care se coreleză foarte bine între ele (marcate cu săgeți), după cum se poate observa în analiza PCA. De asemenea N5FrV – bleu și NFrR – vișiniu (marcate cu săgeți), se coreleză între ele. N7FrN și H7FrN au cea mai mare cantitate de cyanidin 3 - glucoside în urma determinării la HPLC (3045.063 ± 0.002 g/ml N7FrN, 4611.039 ± 0.002 g/ml H7FrN), dar se și coreleză cu analiza PCA, de mai sus, pe spectrele FTIR, unde cele două probe se grupează. Analizând plotul PCA pe determinările cromatografice și spectrele FTIR observăm o bună corelare și pentru acidul clorogenic H1MV având cea mai mare concentrație disponere de-a lungul axei x fiind asemănătoare.

6.6.1 Discuții privind corelațiile unor compuși biochimici relevanți pentru matricea vegetală studiată

6.6.1 Discussions on correlations of relevant biochemical compounds for the studied plant matrix

6.6.1.1 Variația conținutului de zaharuri din probele de soc dependent de clorofila totală

6.6.1.1 Variation in the total sugar content of total chlorophyll elder samples

Calitatea fructelor de soc, este o funcție liniară între două stadii de dezvoltare a colorației peduncului, în strânsă dependență cu clorofilă. Relația strânsă între pobele examinate (muguri florali, flori, bace verzi, roșii și negre, a ambelor variante de soc -*S. nigra* L. și *S. nigra Haschberg*), se corelează cu testul de corelație Pearson, cu un interval de încredere de 95%. Între cantitatea totală de zaharuri determinată (tab. 6.6) și clorofila totală (tab. 6.3), pentru probele enumerate mai sus s-a stabilit o corelație bună ($r=0.443$), dar nesemnificativă statistic ($p=0.051$) (tab. 6.11).

Conform lui SCHAEFER (2011), acest fapt surprinde colorația diferită a fructelor și pedunculilor pe stadii de dezvoltare morfologică ca rezultat al radiației solare mai eficientă în golarile pedunculilor (rată mare de fotosinteză a pedicelelor), determinând astfel în etapa de colorație roșie un maxim în conținutul de zaharuri (fig. 6.21), moment ce corespunde cu modificări cantitative ale nutrientilor. Contrastul de culoare a fructelor, explică corelația strânsă dintre zaharurile totale și pigmentii clorofilieni.

Tabelul 6.11

Descrierea statistică a coeficienților de corelație Pearson Descriptive Statistics of Pearson correlation coefficients

Corelații între Correlation between		r	p	N
Zaharuri totale	Clorofila	0.443	0.051 ^{ns}	20
Zaharuri totale	Cyanidin-3-glucoside	0.846	0.000***	20
Zaharuri totale	Quercetin-3-rutinoside (Rutin)	-0.561	0.010**	20
Flavonoide totale	Fe	-0.46	0.08 ^{ns}	20
Flavonoide totale	Vitamina C	0.486	0.030*	20

*Significance of effect (p): NS not significant, P>0.05; *significant P≤0.05;*

***very significant P≤0.01; ***extremely significant P≤0.001*

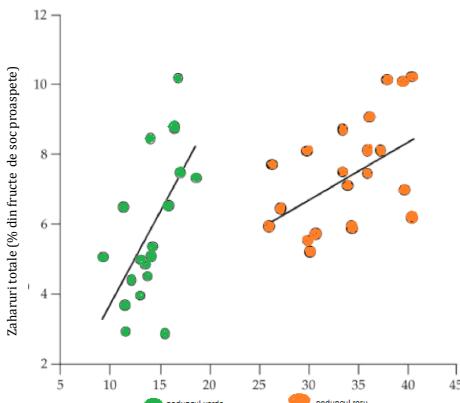


Fig. 6.21 Conținutul de zaharuri și contrastul cromatic al peduncului fructelor de soc (Grafic adaptat după SCHAEFER, 2011)

Fig. 6.21 Sugar content and chromatic contrast of the elderberries peduncle (Adapted from SCHAEFER, 2011)

6.6.1.2 Variația conținutului de zaharuri în funcție de cyanidin-3-glucoside și rutin din probele de soc

6.6.1.2 Variation of sugar content by cyanidine-3-glucoside and rutin from elder samples

Variația conținutului de zahăr din fructele de soc este plauzibilă din punct de vedere al mediului natural, întrucât nivelul de iradiere influențează sinteza antocianilor și implicit cea de zaharuri. În plus, zaharurile dețin un rol major în biosinteza antocianilor deoarece expresia genetică a celor mai importante enzime (ex. calcon sintaza), este indusă direct de către zaharuri (CINZIA SOLFANELLI, 2006).

Analizând probele de soc (varinta cultivată și varianta spontană), atât muguri florali, florile, fructele verzi, roșii și negre, prin testul de corelație Pearson, cu un interval de încredere de 95%, pentru parametrii zaharuri/cyanidin-3-glucoside, rezultă o corelație foarte înaltă ($r=0.846$), relație foarte strânsă între variabile și extrem de semnificativă statistic ($p=0.000$), conform tabelului 6.11.

Compusul de interes major, din partea a II-a a cercetării noastre, querctein-3-rutinoside (rutin) indifică faptul că matricea floarală, din care s-a obținut preparatul fitoterapic, stabilăște o corelație negativ moderată ($r= -0.561$) și foarte semnificativă statistic ($p=0.010$), cu conținutul în zaharuri, a probelor analizate, prin testul de corelație Pearson (cu un interval de încredere de 95%).

6.6.1.3 Variația conținutului de fier din probele de soc dependent de flavonoidele totale

6.6.1.3 Changes in iron content from total flavonoid-dependent elder samples

Corelația dintre conținutul de flavonoide din fructele de soc și reducerea fierului se datorează, în principal, compusului cyanidin 3-glucoside (MLADENKA, 2016). O corelație negativ moderată ($r=-0.46$) și nesemnificativă statistic ($p=0.08^{ns}$) este realizată în studiu nostru (tab. 6.11), prin testul de corelație Pearson (cu un interval de încredere de 95%), la muguri florali, flori, fructe verzi, roșii și negre pentru ambele variante de soc (*S. nigra L.* și *S. nigra Haschberg*). Astfel MLADENKA (2016), în studiu interprins (fig. 6.22), obține tot o corelație negativă dar semnificativă 0,753 ($p < 0,005$), dintre chelarea fierului și reducerea sa la un pH 4,5. Tot acolo este demonstrat faptul că extractul din "Haschberg" este cel mai puternic chelator de metal și mai eficient decât standardele în toate condițiile testate ale pH-ului.

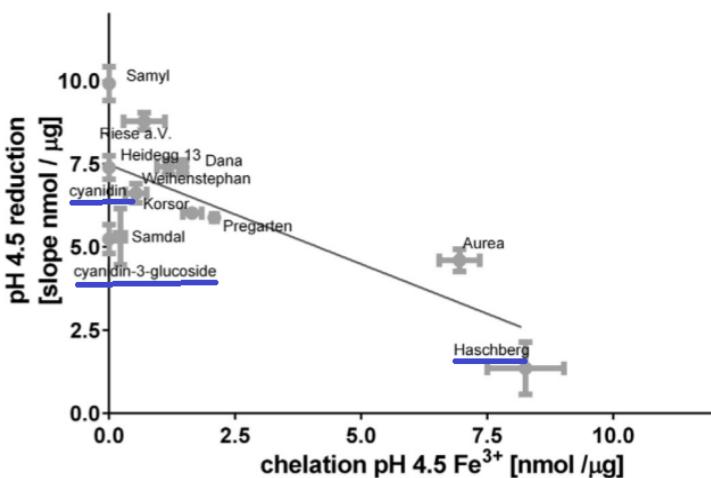


Fig. 6.22 Relația dintre chelarea fierului și reducerea sa la pH 4,5.

Coefficientul de corelație Pearson este de 0,753 ($p < 0,005$), (Grafic adaptat după MLADENKA, 2016)

Fig. 6.22 The relationship between the activity iron chelation and its reduction at pH 4.5. (Pearson correlation 0,753 ($p < 0,005$), (Adapted from MLADENKA, 2016)

6.6.1.4 Variația conținutului de vitamina C în funcție de flavonoidele totale din probele de soc

6.6.1.4 Variation in the vitamin C content of total flavonoid-dependent elder samples

În principal, în industria de procesare a fructelor de soc, și implicit a legumelor și fructelor de orice fel, se doresc materii prime vegetale cu conținut ridicat de acid ascorbic, fapt datorat plus valorii nutriționale produsului finit, dar mai ales protecției antocianilor împotriva degradării oxidative.

Rezultatele din tabelul 6.11, confirmă o corelație bună și semnificativă statistică pentru $r=0.486$ și $p=0.030$, privind testul de corelație Pearson (cu un interval de încredere de 95%), dintre vitamina C și flavonoidele totale a celor 10 probe de soc analizate, diferențiat flora spontană de cea cultivată.

Datorită interferenței mecanismului de reacția în lanț a radicalilor liberi în autooxidarea acidului ascorbic, conform lui KAACK (1998), acțiunea de protecție a flavonoidelor de către vitamina C, este plauzibilă.

6.2 Evaluarea eficienței testării unui compus fitoterapeutic în insuficiența renală indusă experimental pe model animal

6.2 Evaluation of the effectiveness of testing a phytotherapeutic compound in renal insufficiency experimentally induced in the animal model

6.2.1 Evaluarea cantitativă a compușilor fenolici din inflorescențele de *S. nigra* L.

6.2.1 Quantitative evaluation of phenolic compounds from *S. nigra* L. inflorescences

Ca răspuns la obiectivul propus pentru acestă direcție de cercetare, cantitatea de rutin încă din determinarea valorii sale pe parcursul stadiilor de dezvoltare a fructelor de soc, se observă o acumulare cantitativ superioară în inflorescențe. Această premisă, este cea care a restrâns partea de cercetare/valorificare fitoterapeutică, canalizându-ne pe segmentul de flori de soc. Protocolul a dispus cuantificarea rutinei din două probe de flori de soc, păstrate în condiții diferite, cu scopul surprinderii valorii maxime de rutin din inflorescențele de soc. S-a constatat că concentrația de rutin este net superioara în floarea de *S. nigra* L. congelată (463,20 µg/mL), comparativ cu floarea uscată a cărei valoare este mai scăzută (385,63 µg/mL). (tabel 6.12)

Tabelul 6.12

Cantitatea de compuși fenolici din extractul etanic de N4FC prin HPLC-UV la 270 nm HPLC-UV 270 nm identification of phenolic compounds in etanolic extract N4FC

Polifenoli Polifenolics	Cantitatea (µg/mL) Amount of (µg/mL)		Total (µg/mL) Total amount of (µg/mL)
Flavanoli			13.77
Catechina	3.65±0.40		
Epicatechina	10.12±1.53		
Flavonoli			463.20
Quercetin-3-O-rutinoside (rutin)	463.20±0.00		
Acizi hidroxicinamici			5.53
Acid cafeic	3.66±0.05		
Acid feluric	1.87±0.62		

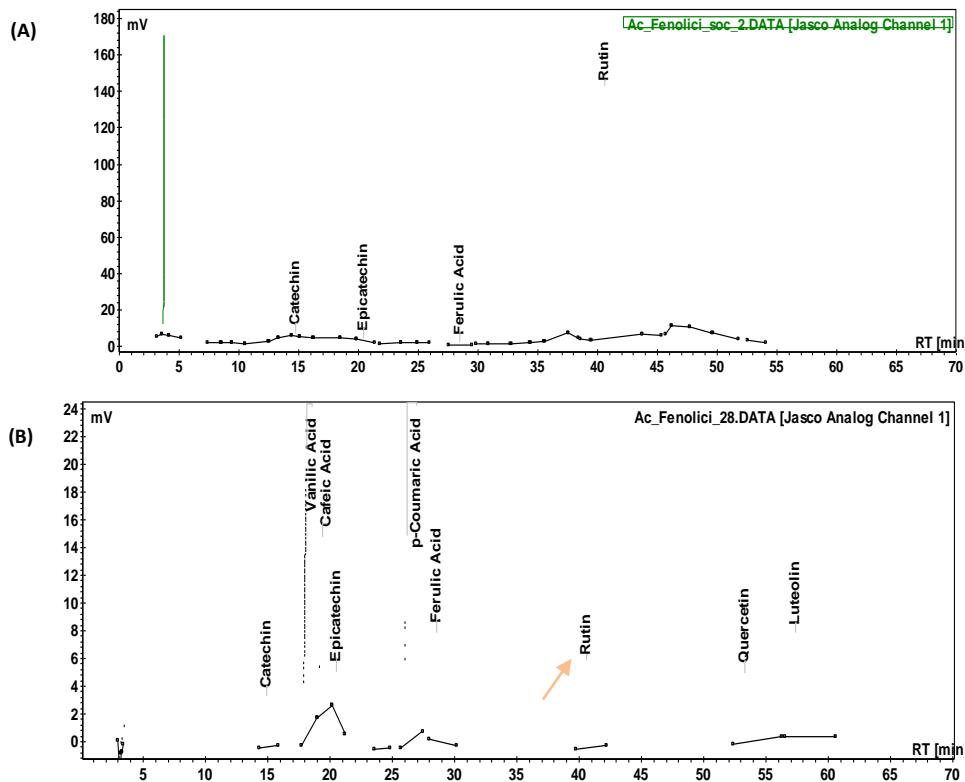


Fig. 6.23 Extract de inflorescențe *S. nigra* L.: HPLC UV-270 nm; (A) Amestec standard; (B) Extract de inflorescențe *S. nigra* L. în etanol

Fig. 6.23 Inflorescence extracts of *S. nigra* L.: HPLC UV-270 nm; (A) Standard blend; (B) Ethanolic extract inflorescence of *S. nigra* L.

6.2.2 Evaluarea indicilor biochimici urmăriți la şobolani

6.2.2. Evaluation of biochemical indices in rats

6.2.2.1 Determinarea concentrațiile plasmatiche de creatinină și uree, la animalele cu IR indusă experimental și tratate cu extract fitoterapic din flori de soc;

6.2.2.1 Determination of creatinine and urea plasma concentrations in experimentally induced RI animals treated with phytopathological extract from elderflowers;

Sobolanii supuși toxicității gentamicinei au rămas în viață până la sfârșitul studiului. Nivelul de uree și creatinină din sânge s-au dovedit a fi scăzute în grupurile GM + SN în comparație cu grupul GM. Aceste constatări au fost confirmate de examenul histopatologic, în timp ce grupul GM + SN a înregistrat o scădere a scorului lezional microstructural comparativ cu grupul GM. Ureea și creatinina au crescut semnificativ la lotul tratat cu GM, comparativ cu lotul martor pentru $p < 0,005$. (Fig. 6.24, 6.25)

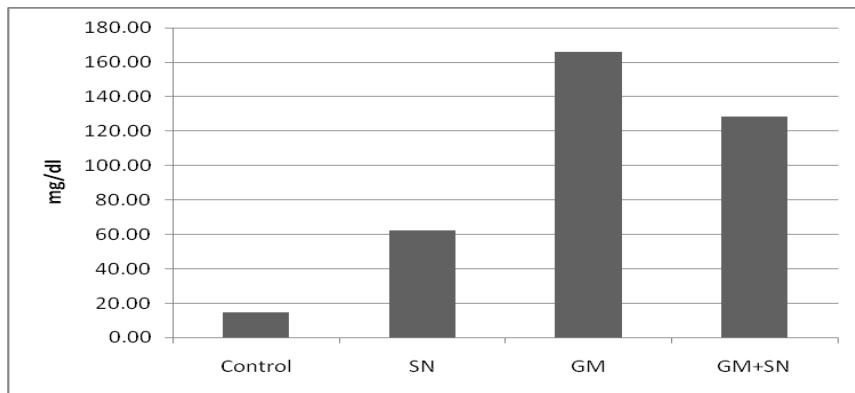


Fig. 6.24 Efectele extractului fitoterapic de *S. nigra* L. asupra nivelului de uree din sânge în nefropatia indușă de gentamicină (mg/dL) (media)

Fig. 6.24 Effects of *S. nigra* L. extract therapy on blood urea levels in gentamicine induced nephropathy (mg/dL) (mean)

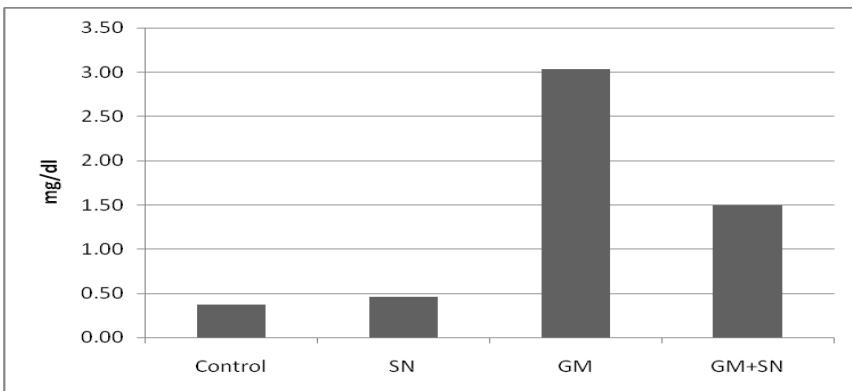


Fig. 6.25 Efectele extractului fitoterapeutic de *S. nigra* L. asupra nivelului de creatinină din sânge în nefropatia indusă de gentamicină (mg/dL) (media)

Fig. 6.25 Effects of *S. nigra* L. extract therapy on blood creatinine levels in gentamicine induced nephropathy (mg/dL) (mean)

6.2.2.2 Modificări biochimice întâlnite în concentrația indiceului NAG urinar la animalele cu IR indusă experimental și tratate cu extract fitoterapeutic din flori de soc;

6.2.2.2 Biochemical changes encountered in urinary NAG concentration in animals with experimentally induced RI and treated with phytopathological extract from elderflowers;

Activitatea indexului NAG urinar înregistrează valori de 9 ori mai scăzute la lotul tratat cu SN ($p < 0,001$) comparativ cu lotul netratat (GM). (Fig. 6.26)

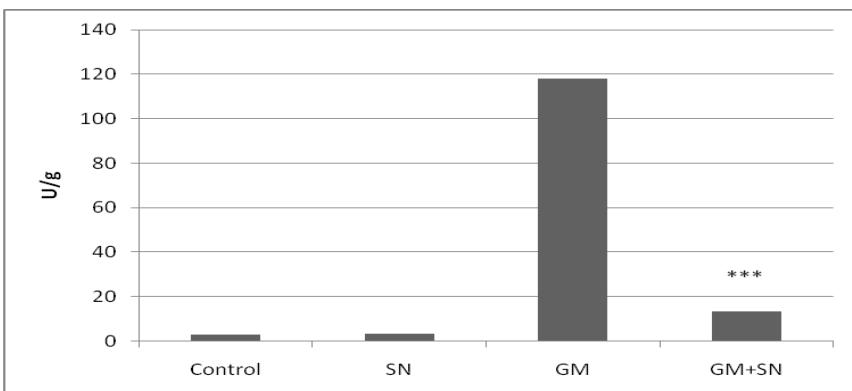


Fig. 6.26 Efectele extractului fitoterapeutic de *S. nigra* L. asupra indexului NAG urinar în nefropatia indusă de gentamicină (U/g) (media). (***= $p > 0,001$) (8 animale/group)

Fig. 6.26 Effects of *S. nigra* L. extract therapy on iNAG activity in gentamicine induced nephropathy (U/g) (mean).

(***= $p > 0,001$) (8 animals / group). Data are expressed as means \pm SD. Statistical analysis was preformed by means of Student's t -test for nondependent samples, $P < 0,05$ was considered statistically significant.

6.2.3. Evaluarea stresului oxidativ în urma administrării compusului fitoterapeutic la animalele cu IR indusă experimental și tratate cu extract fitoterapeutic din flori de soc;

6.2.3. Evaluation of oxidative stress following phytotherapeutic compound administration in animals with experimentally induced RI and treated with phytopathological extract from elderflowers;

■ Peroxidarea lipidică

Markerul prezenței peroxidării lipidice, malondialdehida, înregistrează o creștere semnificativ statistic ($p=0.0006$), pentru lotul GM comparativ cu lotul C. Pentru lotul GM+SN, administrarea extractului de soc previne creșterea valorică a MDA indusă de GM, MDA clasându-se la o valoare semnificativ statistic mai mică pentru lotul GM+SN, în detrimentul lotului GM ($p=0.03$). Pentru designul experimental aplicat, extractul utilizat nu exclude total efectele GM, astfel comparativ cu lotul C, valoarea MDA s-a situat la o valoare semnificativ statistic mai mare la lotul GM+SN ($p=0.0003$).

■ Glutationul

În ceea ce privește glutationul redus (GSH), glutationul oxidat (GSSG) și raportul GSH/GSSG, rezultatul obținut nu modifică valoarea semnificativ statistic, în cazul lotului GM comparativ cu lotul C ($p>0.1$). Mai mult GSH și GSSG înregistrează, la lotul GM, valori semnificativ statistic mai mari ($p=0.04$ la ambele determinări), comparativ cu lotul GM+SN. Sub aspectul raportului GSH/GSSG, acesta este identic între cele două loturi ($p=0.18$). Utilizarea în dieta şobolanilor a extractului de soc, pentru lotul SN, acesta nu a modificat semnificativ valorile GSH, GSSG și GSH/GSSG, comparativ cu lotul C ($p>0.5$). Pentru GSSG, s-a constatat o diferență semnificativă statistic, mai mare în cazul lotului GM+SN comparativ cu lotul C ($p=0.0004$).

■ Enzimele antioxidantă

Pentru lotul GM comparativ cu lotul C, superoxid dismutaza (SOD) și catalaza (CAT), scad semnificativ satatistic, pentru $p= 0.004$, respectiv $p=0.009$. Administrarea de extract, inițializează activitatea SOD și CAT, care este semnificativ statistic mai mare la lotul GM+SN comparativ cu lotul GM ($p=0.05$, respectiv $p=0.01$) și înregistrează valori comparabile cu cele ale lotului C ($p=0.10$, respectiv $p=0.95$). Extractul de soc crește activitatea SOD și CAT chiar și în lipsa expunerii la GM. Datorită acestui fapt, valoarea înregistrată de SOD este semnificativ statistic mai mare la lotul SN în comparație cu lotul C ($p=0.06$). Valoarea cuantificată de CAT este semnificativ statistic mai mare la lotul SN comparativ cu lotul C ($p=0.01$). GPX, glutation peroxidazei, valoric nu a înregistrat diferențe semnificative statistic între loturile GM și GM+SN ($p=0.21$) și

GM /C ($p=2.5$), însă a fost semnificativ statistic mai ridicat la lotul C comparativ cu lotul GM+SN ($p= 0.001$).

■ Discuții

În mod cert, la nivelul organismului uman, se produc (în cantități scăzute), specii reactive ale oxigenului (SRO) și specii reactive ale azotului (SRN), specii implicate în procesele de diviziune celulară, adaptare la ischemie, angiogeneză, protecția antimicrobiană și sintezele hormonale (KRYLATOV, 2018). Reprezentative pentru SRO sunt anionul superoxid ($O_2 \cdot^-$), peroxidul de hidrogen (H_2O_2) și radicalul hidroxil ($OH \cdot$). În timp ce pentru SRN, cele mai cunoscute sunt oxidul nitric (NO) și peroxinitrit ($ONOO^-$).

În ceea ce privește producția speciilor reactive ale oxigenului (SRO), acesta este influențată de factori precum cei hormonali, metabolici, citokine proinflamatorii și de mediu. Este evident faptul că, cu o durată redusă SRO, pot fi rapid neutralizate de mecanismele apărării antioxidantă care cuprind atât factori enzimatici (enzimele antioxidantă), cât și neenzimatici (acidul uric, melatonina, glutationul, bilirubina, vitaminele C și E, polifenolii din materialul vegetal)(MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA, 2018).

Existența unui echilibru dintre antioxidantă și oxidanții (SRO, SRN), asigură protecție organismelor vii de agresiunea speciilor reactive (SR). În cazul în care apare o scădere a apărării antioxidantă sau o hiperproducție de SRO și/sau SRN, apare stresul oxidativ (SO), cu umătoarele consecințe nefaste la nivelul țesuturilor și organelor: denaturarea proteică, peroxidarea lipidică, modificarea acidului dezoxiribonucleic (ADN), deteriorarea membranelor mitocondriale și celulare. Aparatul excretor prezintă o sensibilitate aparte la SO datorită prezenței în cantitate ridicată a acizilor grași polinesaturați cu lanț lung (ce intră în compoziția lipidelor renale), care se transformă, pentru SRO, în ținte ușor de atins (OZBEK, 2012). Este admis faptul că mecanismul principal nefrotoxic deținut de gentamicină, este dat de SO ce deține un dublu mecanism: pe de-o parte creșterea sintezei de SRO, iar pe de altă parte reducerea apărării antioxidantă, existând totodată un cumul de studii ce atestă efectul nefroprotector al substanțelor cu efect antioxidant.

Studiul de față demonstrează capacitatea extractului de soc în creșterea apărării antioxidantă simultan cu reducerea peroxidării lipidice.

■ Malondialdehida (MDA)

MDA apare ca factor de confirmare pentru prezența SO și principalul marker în peroxidarea lipidică. Numeroase articolele științifice susțin ipoteza că GM cauzează creșterea MDA în țesutul renal, simultan cu alterări morfologice și reducerea funcției renale (OTUNCDEMUR, 2013; KHATTAB, 2016). În concordanță cu aceste rezultate, în cercetarea de față, administrarea de GM determină o creștere considerabilă a

Monitorizarea trasabilității unor compuși bioactivi de interes pe stadii de dezvoltare morfologică a fructelor de soc și evaluarea unui preparat fitoterapeutic cu efect nefroprotector

peroxidării lipidice, MDA având valori semnificativ statistic mai mari la lotul GM comparativ cu lotul C ($p=0.0006$).

■ Gentamicina (GM)

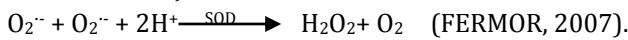
Sediul acumulării GM este cortica renală, unde provoacă o eliberare a fierului (Fe) de la nivel mitocondrial. Alături de Fe, GM formează complexe ce duc la creșterea sintezei pentru principalele SRO, O_2^- , H_2O_2 și $OH\cdot$, cu instalarea SO (Walker, 1988). Cantitatea ridicată de SRO la nivelul țesutul renal conduce la denaturarea proteinelor, deteriorarea membranelor fosfolipidice, leziuni mitocondriale cu eliberare de citocrom c, leziuni ADN, iar în final modificări vasculare și mesangiale alături de necroza/apoptoza celulelor epiteliale din tubii renali proximali (MORALES, 2010; NAKAZAWA, 2016; MORALES, 2010; NEGRETTE-GUZMÁN, 2015; HELAL, 2018). Neutralizarea radicalilor $OH\cdot$, alături de scăderea SO, reduce efectele nefrotoxice ale GM (WALKER, 1988). În numeroase studii regăsim folosirea compușilor antioxidanti, precum acid garlic sau apocynin, care determină restrângerea leziunilor tisulare rezultate de GM alături de reducerea peroxidării lipidice din perspectiva nivelului MDA (HELAL, 2018; GHAZNAVI, 2017; ABDELRAHMAN, 2018). În cercetarea de față, extractul de soc nu a reușit să mențină valoarea MDA la un nivel comparabil cu cel al lotului de control ($p=0.0003$), dar a redus semnificativ statistic producția de MDA la lotul care a primit extract de soc alături de GM, comparativ cu lotul tratat exclusiv cu GM ($p=0.03$). Acest lucru susține proprietatea extractului de soc în a scădea peroxidarea lipidică rezultată de SO, indusă de GM și s-a corelat cu reducerea markerilor biochimici și histologici de afectare renală la lotul GM+S.

În extractul de soc testat, printre principaliii compuși prezenti, concentrația cea mai ridicată este dată de rutin. Acesta este un bioflavonoid (glicozidă a quercteinului), ce posedă efect antioxidant și antiinflamator. Efectul nefroprotector al rutinului, testat în studii anterioare, în funcție de doză, precum și capacitatea rutinului de a ameliora nivelul MDA simultan cu creșterea activității enzimelor antioxidantă, reducerea factorilor proinflamatori și proapoptotici în modelele experimentale de nefrotoxicitate induse de GM sau lipopolizaharide (KHAJEVAND-KHAZAEI, 2018; KANDEMIR, 2015). Rutinul prezintă funcția de scavenger pentru SRO și SRN prin aceea că reduce SO tisular (corelată cu capacitatea sa de donor de hidrogen) și funcția de chelator al metalelor admisând capacitatea de a neutraliza ionii ferici și de a forma compuși de fier inactivi (SU, 2014).

Enzimele antioxidantă superoxid dismutaza (SOD), catalaza (CAT), glutation peroxidaza (GPX)

În prezentul studiu, administrarea de GM implică o scădere a activității SOD și CAT în țesutul renal la o valoare semnificativ statistic mai mică în lotul GM comparativ cu lotul C, fapt constatat și în studiile precedente.

Prima linie de protecție împotriva anionului supreroxid O_2^- , o reprezintă SOD, prin catalizarea reacției



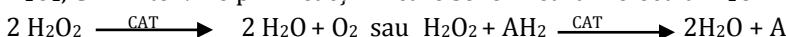
Principalul considerent al acțiunii sale este transformarea O_2^- în $ONOO^-$ și HO^- , compuși cu reactivitate ridicată ce implică fragmentarea ADN-ului, a structurilor lipidice membranare și forma matriceală (REGAN, 2005).

Prin combinarea O_2^- cu NO, în cazul deficienței SOD, se ajunge la două rezultate negative, și anume: (1) NO pierde funcția de molecule semnalizatoare concomitent cu efectele benefice de reglare a fluxului sanguin în corticala renală; (2) generarea unui compus extrem de agresiv ($ONOO^-$ induce peroxidarea lipidelor, nitrosilarea proteinelor, perturbă lanțul respirator mitocondrial și inhibă enzimatic, conform lui RANDJELOVIC (2007), pentru structurile renale, după reacția: $O_2^- + NO \rightarrow ONOO^-$). Toate aceste consecințe sunt realizate și cu apoftoza celulelor renale (PAN, 2014). Un alt compus nociv ce poate fi implicat în fragmentarea acidul dezoxiribonucleic (ADN), a proteinelor și lipidelor este radicalul HO^- ; ca și consecință a lipsei neutralizării de către SOD a O_2^- , în prezența ionilor liberi de Fe^{+2} și Cu^{+2} (NAKANISHI, 2018)

Pentru eficientizarea acțiunii SOD, concomitent acesta trebuie pusă în dependență cu cea a GPX și CAT, ce implică neutralizarea H_2O_2 . Sub aspectul neutralizării H_2O_2 , de către GPX, această enzimă se implică dar de pe poziția a doua. De asemenea GPX se întâlnește și la neutralizarea hidroperoxizilor rezultați din peroxidarea PUFA. Reacția în care glutationul, utilizat ca substrat, este catalizată tot de GPX, unde glutationul redus (GSH) trece în formă de glutation oxidat (GSSG).



Așadar GPX depinde în mare măsură de GSH în acțiunea sa de donor de hidrogen (BURTON, 2011). O lipsă parțială de GPX și CAT face ca H_2O_2 să acționeze ca SR, prin difuzia în țesuturi. La nivel renal, mecanismul prim de acțiune al H_2O_2 , îl reprezintă inhibarea pexofagiei responsabilă de refacerea structurală a peroxizomilor și limitarea generării de SRO de la nivel peroxizomal (SHAMEKHI, 2016). Pentru îndepărtarea H_2O_2 , CAT intervine prin reacții în care se formează molecula H_2O .



In studiul nostru, administrarea de GM duce la reducerea activității enzimelor antioxidantă SOD, CAT și GPX, în conformitate cu literatura. Consecința adiacente acestui fapt sunt intensificarea SO (consecința creșterii MDA), modificări morfologice renale și reducerea funcției renale la lotul tratat cu GM.

Prin studiul de față extractul de soc demonstrează capacitatea de a restaura activitatea enzimatică a SOD, și CAT care la lotul GM+S a fost semnificativ mai mare comparativ cu lotul GM. În plus, activitatea SOD și CAT ating valori comparabile cu

lotul C ceea ce denotă o normalizare a capacitatei lor antioxidantă. Efectul implică, cel mai probabil, rutinul care a demonstrat un efect similar în studii publicate anterior (KHAJEVAND-KHAZAEI, 2018; KANDEMIR, 2015).

O notă interesantă printre rezultatele studiului de față, este că extractul de soc crește activitatea SOD și CAT și în absența unui agent nefrotoxic (SN comparativ cu lotul C) afirmând capacitatea sa de intervenție în condiții de stres minor.

Conform lui SU (2014) în urma administrării de rutin la șoareci expuși unui efort fizic intens rezultă creșterea activității GPX.

Totodată rutinul a restabilit activitatea GPX (80 mg GM/kg/zi) în doza de 150 mg/kg administrat la șobolan timp de 8 zile, în același timp cu reducerea SO, ameliorarea funcției și leziunilor histologice renale (KANDEMIR, 2015).

În studiul nostru se constată doar o creștere nesemnificativă a GPX după administrarea extractului de soc, rezultat care poate fi explicat prin faptul că doza de GM a fost mai mare, iar cea de rutin prezent în extractul de soc mai mică față de studiu publicat anterior.

Pe parcursul reacțiilor catalizate de GPX, GSH funcționează ca substrat care se consumă rezultând GSSG. Reducerea activității enzimelor antioxidantă la lotul tratat cu GM a favorizat ca nivelul de GSH (neconsumat ca substrat pentru reducerea SR), să fie mai ridicat comparativ cu lotul care a primit alături de GM extract de soc care a crescut activitatea enzimelor antioxidantă, inclusiv cea a GPX consumatoare de GSH. Considerându-se inițial că nivelul GSH se corelează cu nivelul de MDA și SO, acest considerent este doar în cazul indivizilor izolați. GSH trebuie interpretat, la nivel populațional, doar în calitate de compus antioxidant, în timp ce MDA rămâne produsul final și markerul reacțiilor de oxidare induse de SO (CASANOVA, 2017).

Improporțional cu nivelul de activitate al GPX, GSSG în comparație cu lotul care a primit alături de GM extractul de soc, se situează la un nivel superior la lotul tratat cu GM, însă fără o diferență a raporturilor GSH/GSSG între cele două loturi.

În mod discordant cu nivelul de activitate al GPX, GSSG s-a situat la un nivel superior la lotul tratat cu GM conmparativ cu lotul care a primit alături de GM extractul de soc, fără a se înregistra însă o diferență a raporturilor GSH/GSSG între cele două loturi.

Tabelul 6.13

Evaluarea stresului oxidativ în urma administrării compus fitoterapeutic la animalele cu IR
Evaluation of oxidative stress following phytotherapeutic compound administration in animals with experimentally induced RI

Lot	GSSG	MDA	GSH	SOD	CAT	GPX	GSH/GSSG
GM	0.27±0.03	1.61±0.58	4.25±33	20.99±3.39	0.35±0.07	33.11±3.92	
GM+SN	0.23±0.02	1.05±0.24	2.99±0.77	24.22±2.65	0.45±0.06	35.99±4.83	
SN	0.18±0.02	0.52±0.23	2.49±0.48	30.41±3.41	0.55±0.07	49.48±2.39	
C	0.19±0.02	0.49±0.21	2.78±1.87	26.85±3.1	0.45±0.06	46.69±1.17	
Test T (p) GM/C	5.39803	0.00063	0.11174	0.00395	0.00891	0.00024	0.88058
Test T (p) GM+S/C	0.00042	0.00037	0.79133	0.10622	0.95002	0.00099	0.56997

Data are expressed as means ±SD. Statistical analysis was preformed by means of Student's *t* -test for nondependent samples, P<0.05 was considered statistically significant.

Nota: Glutatinal oxidat (GSSG); Malondialdehida (MDA); Glutatinal redus (GSH); Superoxid dismutaza (SOD); Catalaza (CAT); Glutation peroxidazei (GPX);

Note: Oxidized glutathione(GSSG); Malondialdehyde (MDA); Reduced glutathione (GSH); Superoxide dismutase (SOD); Catalase (CAT); Glutathione peroxidase (GPX);

6.2.4 Rezultatele examenului histopatologic al țesutului renal și a markerilor de suferință renală

6.2.4 Results of histopathological examination of renal tissue and markers of renal impairment

- Lot control și lot SN

În ceea ce privește examinarea probelor renale de la lotul control și lotul SN, rezultatul confirmă că şobolanii din cele două loturi nu au prezentat modificări structurale ale parenchimului renal (tabel 6.14).

Tabelul 6.14

Efectul extractului de *S. nigra* L. asupra leziunilor renale induse de gentamicină
*The effect of *S. nigra* L. extract on histological damage induced by gentamicine nephrotoxicity*

Lot Lot	Leziune tubulară <i>Tubular damage</i>	Leziune endothelială <i>Endothelial damage</i>	Leziune glomerulară <i>Glomerular damage</i>	Leziune tubulo-intersticială <i>Tubulo/interstitial damage</i>
Control	0.1	0	0	0
SN	0.3	0	0	0
GM	4	2.2	2.8	3
GM+SN	2.1	1.5	1.7	2.1

Notă: 0 reprezintă țesut sănătos, 1 țesut cu leziuni minime, 2 țesut cu leziuni moderate, 3 țesut cu leziuni moderate până la severe, 4 țesut cu leziuni severe; (media scorului);

Note: 0 represents healthy tissue, 1 represents minimal lesions, 2 moderate lesions, 3 moderate to severe lesions, and 4 severe lesions; (mean)

- Lot GM

În probele prelevate de la şobolanii injectați cu gentamicină, se observă o necroză severă și difuză caracterizată prin prezența reziduurilor celulare necrotice în interiorul tubilor renali, denudarea difuză a celulelor tubilor renali, pierderea marginii în perie, aplativarea celulelor tubulare renale și distrugerea focală a membranei bazale. Se observă hialinoza renală reprezentată de formațiuni hialine intratubulare și de asemenea infiltrat inflamator sever în probele renale din acest grup.

- Lot GM+SN

Probele de rinichi prelevate de la şobolanii tratați cu gentamicină și soc indică o îmbunătățire, sub aspect histologic, a glomerulilor și tubilor renali, conform sistemului de evaluare EGTI. Caracterele histologice identificate în probele amintite, precum epitelium aplatinat, bazofilia celulelor epiteliale, aglomerarea nucleilor și indicele mitotic crescut, sugerează prezența unui proces de regenerare după leziunea epitelială tubulară induată de administrarea de gentamicină.

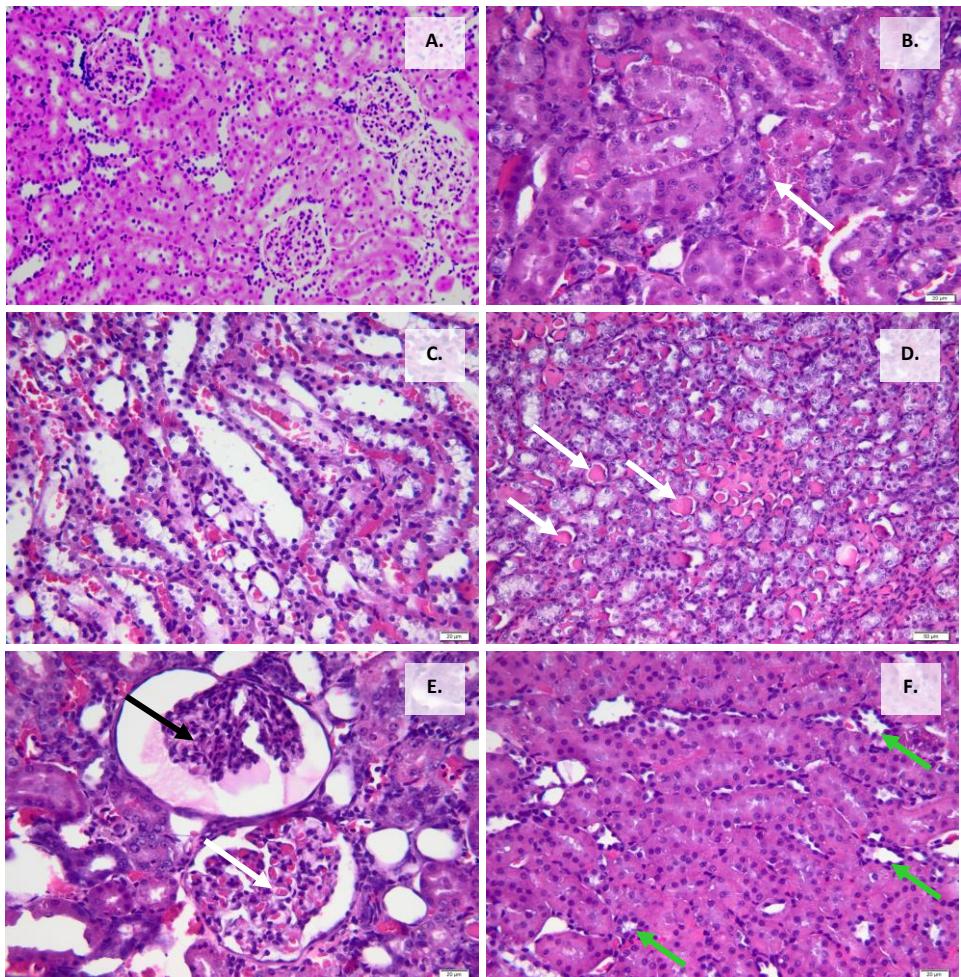


Fig.6.27 Modificări histopatologice la diferitele loturi experimentale: (A) Lot control cu aspect morfologic normal; Lot GM (B, C, D, E), Hialinoza renală cu prezența materialului hialin în citoplasma celulelor tubulare (săgeată albă) (B); Necroza tubulară severă și difuză și congestia tubilor renali (C); Hialinoza renală severă reprezentată de cilindrii hialini (săgeată albă) (D); Congestie (săgeată albă) și scleroză glomerulară (săgeată neagră) (E); Lot GM+S (F), Regenerarea tubulară (săgeata verde) caracterizată prin epiteliu aplatizat, bazofilie celulară, aglomerări de nuclei și indice mitotic crescut (F); HE x200, Scale bar=200 μ .

Fig. 6.27 Histological changes in different experimental groups. (A) Control group showing normal morphology; GM group (B, C, D, E), Renal hyalnosis with the presence of the hyaline material in the cytoplasm of the tubular cells (white arrow) (B); Severe and diffuse tubular necrosis and congestion (C); Severe renal hialinosys represented by intratubular hyaline casts (white arrow) (D); Congestion (white arrow) and glomerular sclerosis (black arrow) (E); GM+S group (F), Tubular regeneration (green arrow) characterized by flattened epithelium, cell basophilia, nuclear crowding and increased mitotic index; HE x200, Scale bar=200 μ .

7. CONCLUZII GENERALE

7. Overall conclusions

În ceea ce privește expunerea concluziilor în urma studiului legat de monitorizarea trasabilității unor compuși bioactivi de interes pe stadii de dezvoltare morfologică a fructelor de soc și evaluarea unui preparat fitoterapic cu efect nefroprotector, acestea vor fi trasate în funcție de cele două direcții majore de cercetare.

Directia de cercetare I - axată pe studiul extractelor naturale ale diferitelor specii de soc și monitorizarea trasabilității unor compuși bioactivi de interes, pe stadii de dezvoltare morfologică a fructelor, în raport cu obiectivele aferente, denotă umătorele concluzii:

1. Gradul de maturitate, genotipul sunt doar câteva considerente ce disting distribuția variabilă a compușilor bioactivi și implicit maxima nutrițională pe parcursul trasabilității mugurelui floral de soc până la fruct.
2. Indicii fizici și chimici vizăți din parcursul creșterii și dezvoltării arbustului în dinamica acumulării florilor și fructelor, la două genotipuri de soc (flora spontană *Sambucus nigra* L. /cultivată *Sambucus nigra* Haschberg), pun în evidență specificitatea celor 36 de matrici vegetale alese.
3. Profilul mineralelor totale variază între 0,253-5,572% la cele 36 de probe analizate. Utilizând tehnica spectroscopiei de absorbție atomică s-au identificat și cuantificat, la ambele genotipuri de soc, macro și microelementele constitutive. În unanimitate se constată în fructul de soc, pentru cele două genotipuri, valori semnificative a macroelementelor Ca (156.476 ± 0.000 mg/kg la proba N7FrN), K (117.409 ± 0.000 mg/kg N7FrN), Mg (21.714 ± 0.000 mg/kg N7FrN) și Na (57.344 ± 0.000 mg/kg N7FrN).
4. Evolutiv în dezvoltarea materialului biologic reperat aparținând arbustului de soc, se întâlnesc valori ridicate de calciu începând cu mugurele floral verde (707.228 ± 0.013 mg/kg), apoi semnalat în floare (608.674 ± 0.830 mg/kg) și continuând în fructul verde (678.972 ± 0.051 mg/kg). Declinul valorii se constată în fructul copt, literatura specificând valori între 574-1528 mg/kg.
5. Analiza cantitativă a metalelor grele, nu implică atingerea pragului maxim admis în parte, stabilit de normative. Semnalăm prezența cadmiului, cu valori înregistrate la

- N7FrN de 0.0011 ± 0.0001 mg/kg, pentru care STAS 9036-85 8/90 prevede o limită de maxim 0.05 mg/kg fruct proaspăt.
6. Variația procentul de umiditate cunoște limita inferioară în proba analizată de polen 16.880% pentru genotipul *S. nigra Haschberg*, limita superioară din cuprinsul probelor, apăținând inflorescențelor de soc (83.619% N4F).
 7. Cuantificarea polifenolilor totali, prin analiza spectroscopică UV-VIS, denotă următoarele aspecte: faza incipientă a mugurelului floral înregistrează o valoare semnificativă de polifenoli pentru ambele genotipuri, (N1MV 565.445 ± 0.003 mg GAE/100 g, H1MV 570.442 ± 0.00 mg GAE/100 g), care va crește în parcursul evolutiv al dezvoltării caracterelor morfologice, până la finalul traectoriei I, corespunzătoare cu apariția florii. Aceeași tendință se observă și pentru traectoria II, vis-a-vis de faza inițială reprezentată de fructul verde și până la maturitatea acestuia.
 8. Realizând o paralelă cu alte fructe de pădure, sub aspectul cantitativ al polifenolilor, rezultatul e net superior, ajungând până la de 7 ori mai ridicat în fructele de soc comparativ cu fructe de aceeași colorație: coacăze negre (952 mg/kg), dud negru (1794 mg/kg), afine (1800 mg/kg), (MIKULIC-PETKOVSEK, 2012).
 9. În ceea ce privește nivelul de polifenoli din florile de soc, acesta este semnificativ mai mare, comparativ cu fructele sale. Conținutul total de fenoli întâlnit la N4F este de 789.194 ± 0.001 mg/kg și de 770.144 ± 0.04 mg /kg la H4F. Lunând în considerare conținutul ridicat de polifenoli din florile de soc, atât infuziile cât și siropul acestor flori pot fi considerate ca fiind stimulente imunitare naturale.
 10. O altă sursă de polifenoli din cuprinsul arbustului de soc, privită ca și alternativă a prețului de cost, în detrimentul fructelor sau a florilor, o reprezintă pendunculul fructelor de soc. Profilul antocianilor prezenti în penduncul socalui, este mai scăzut decât în fruct, dar totuși sunt prezente cantități însemnante de flavonoli și esteri ai acidului cinamic, ce determină o acțiune antioxidantă comparabilă cu cea a fructelor.
 11. Flavonoidele, o altă clasă de compuși fenolici cu implicații în controlul unor reacții de inhibare a radicalilor liberi, la ambele genotipuri înregistrează la proba mugure galben (23 de zile de la mugure 1), valori foarte semnificative, 1461.262 ± 0.038 mg QE/100 g N3MG, respectiv 1369.17 ± 0.084 mg QE/100 g H3MG, după care acești compuși scad în faza de floare. Analizând valoarea maximă de flavonoide în proba de polen paralel cu declinul înregistrat în inflorescențe, rezultă că mugurele galben surprinde cel mai corect conchiderea atat a fenolilor din polen cât și pe cei conținuți în viitoarea floare. Totodată rezultă o relație direct proporțională a cantității semnificative de flavonoide din fruct, cu creșterea valorii și în penduncul.
 12. Proprietatea antioxidantă a extractelor de soc analizate înregistrează diferențe semnificative în fenofazele dezvoltării fructului de la $92.007 \pm 0.00%$ la $6.398 \pm 0.00\%$. Estimarea eficienței antioxidantă a extractelor, conform metodelor

- aplicate, acesta nu reduce capabilitatea interacțiunilor individuale dintre compuși, precum și efectele sinergetice sau de inhibare cu metoda utilizată pentru testarea proprietății antioxidantă.
13. Sub aspectul activității de neutralizare a radicalilor liberi proba reprezentată de florile de soc din arealul spontan (87.01 ± 0.002 %) cât și cele din cultură (89.047 ± 0.007 %), dețin o activitate mai însemnată, comparativ cu probele de fructe.
14. Un rezultat aparte, în ceea ce privește pigmenții clorofilieni, îl constituie remanența clorofilei la maturitatea fructelor, cu valori însemnante (215.819 ± 2.575 $\mu\text{g/g}$ la genotipul cultivat și 180.345 ± 2.800 la genotipul spontan), în opoziție cu fazele mecanismului de senescență a arbustului.
15. Calitatea fructelor de soc, este o funcție liniară între două stadii de dezvoltare a clorației pedunculului, în strânsă dependență cu clorofilă.
16. Conținutul de vitamina C, privit ca parametru important al calității materialului biologic, variază între genotipuri de la N4F 1501.74 ± 0.002 $\mu\text{g/ml}$ echivalent Trolox (genotip *S. Nigra L.*) la H1MV 913.308 ± 0.002 (genotip *S. Haschberg*). Explicația acumulării în cantități mari a vitaminei C în inflorescențele de soc, este legată de corelația cu conținutul de flavonoide însemnat.
17. Cantitativ, predominant s-a identificat acidul citric, din structura acizilor organici. Nivelul ridicat al acestor acizi, face pretabile atât florile cât și fructele în tehnologia produselor acidulate și a suplimentelor dietetice. Fructul genotipului "Haschberg", deține un conținut de acid citric ridicat (10.498 ± 0.002 g/kg) și cantități reduse de glucide (11808.2 ± 1.414 $\mu\text{g/ml}$), ceea ce explică considerentul de genotip cu cea mai mare frecvență de cultivare.
18. Se constată îndeplinirea unei perspective nutriționale de remarcată, privind conținutul în zaharuri a fructelor de soc și anume că acestea acumulează un nivel crescut de fructoză, preferabil de către consumatori pentru faptul că acest glucid deține un gust mai dulce comparativ cu glucoza sau zaharoza și are un indice glicemic mult mai scăzut dacă facem referire la celealte zaharuri analizate. Nivelul glucidic total din florile de soc este mai mare pentru socal din flora spontană (N4F 10.772 ± 23.55 $\mu\text{g/ml FW}$) comparativ cu cel de cultură (H4F 4.132 ± 18.85 $\mu\text{g/ml FW}$), demonstrează complexitatea calitativă a soiurilor primare de soc, vis-a-vis de consumul florilor de soc în infuzii sau sucuri fermentate.
19. Dintr-un total de 13 compuși flavonoidici identificați în probele de soc, prin metoda HPLC-DAD-ESI+, în paralel și cu analiza componentelor principale (PCA), quercetin-3-rutinoside (rutin) este flavonoul cel mai reprezentativ pentru acest arbust. Prezent în toate probele analizate, rutin atinge valoarea cea mai semnificativă de 6178.463 ± 0.002 g/ml la genotipul cultivat, faza H4F, demonstrând aportul selecției plantelor. Pe parcursul etapelor de maturitate a fructului, conținutul de flavonoide se modifică iar fiecare compus deține propriu

- model individual de apariție/dispariție (acidul clorogenice este în cantități considerabile până aproape de fază de fruct roșu când înregistrează un declin de la 10257.656 ± 0.002 g/ml pentru H1MV la 884.757 ± 0.002 g/ml H6FrH).
20. Utilizând tehnica ITEX/GC-MS au fost separați și cuantificați un număr de 59 compuși volatili reprezentativi pentru clasa aldehidelor, acizi, alcoolilor, esteri, furani, cetonelor și terpene, dintre care 32 de compuși s-au regăsit în inflorescențele de soc (cazul genotipului cultivat). Caracterizarea profilului de aromă al florilor de soc, pentru ambele variante, cuprinde cea mai însemnată cantitate de terpenoide ($38.91 \pm 0.365\%$ N4F, $29.67 \pm 0.246\%$ H4F), în timp ce aldehidele se înjumătățesc ca și procent față de etapa de mugure floral.
 21. Amprenta IR a extractelor metanolice prezintă semnale similare. Banda de la 3010 cm^{-1} vizibilă doar la fruct roșu și fruct copt, în special la genotipul *Sambucus nigra Haschberg*, pune în evidență prezența de legături duble multiple, specifice pigmentilor acumulați (antocianii).
 22. În dinamica de dezvoltare, de la mugurele floral la floare nu apar deosebiri semnificative între soiul spontan și cultivat. În schimb formarea bobului verde și conversia sa la bob roșu (biosinteza de pigmenti), după fecundare devine diferită. În final, produșii antocianici sunt similari, *S. nigra L.* și *S. nigra Haschberg* ajungând să dețină profile asemănătoare.
 23. Prin analiza PCA s-a explicat 93% din varianța totală a probelor de soc indicând diferențele și similaritățile dintre acestea, în cazul de față în funcție de tipurile de carbohidrați, conținutul de acizi organici și conținutul de compuși fenolici. Probele N7FrN și H7FrN au cea mai mare cantitate de cyanidin 3 - glucoside în urma determinării la HPLC (3045.063 ± 0.002 g/ml N7FrN, 4611.039 ± 0.002 g/ml H7FrN), dar se și coreleză cu analiza PCA pe spectrele FTIR, unde cele două probe se grupează. Analizând plotul PCA pe determinările cromatografice și spectrele FTIR rezultă o buna corelare și pentru acidul clorogenic H1MV având cea mai mare concentrație disponerea de-a lungul axei x fiind asemănătoare.
 24. Corelația dintre conținutul de flavonoide din fructele de soc și reducerea fierului se datorează, în principal, compusului cyanidin 3-glucoside.
 25. Rezultatele confirmă o corelație buna și semnificativă statistic pentru $r=0.486$ și $p=0.030$, privind testul de corelație Pearson (cu un interval de încredere de 95%), dintre vitamina C și flavonoidele totale a celor 10 probe de soc analizate, diferențiat flora spontană de cea cultivată.

Direcția de cercetare II –privind testarea eficienței principiilor active din extractul de flori de soc în insuficiența renală indușă experimental pe model animal.

1. Extractul de *Sambucus Nigra L.* ameliorează semnificativ valorile ureei și creatininei serice la indivizii la care s-a indus nefroptia toxică cu gentamicină ($p<0,005$ lot cu GM versus lot cu SN).

2. Indexul NAG urinar înregistrează valori de 9 ori mai scăzute la lotul la care s-a administrat extract fitoterapeutic *S. nigra* L. comparativ cu lotul cu nefropatie toxică indușă de GM, sugerează ameliorarea semnificativă a leziunilor tubulare renale prin administrarea extractului.
3. Scorul de leziune histopatologică renală înregistrează valori semnificativ mai scăzute la lotul care beneficiază de administrarea extractului de *S. nigra* L. comparativ cu lotul cu GM la care s-a administrat.
4. Extractul de *S. nigra* L demonstrează efecte nefroprotectoare în leziunea renală toxic indușă cu gentamicină, ameliorând semnificativ instalarea și evoluția acestora, în special la nivelul tubilor renali.
5. Extractul de soc cu un conținut de rutin de 463.20 ± 0.00 ($\mu\text{g/mL}$), administrat în cantitatea de 1 ml/zi poate restabili nivelul de activitate pentru SOD, CAT la o valoare comparabilă cu cea a lotului control.
6. Stresul oxidativ apreciat prin nivelul MDA crește în urma administrării de gentamicină la o valoare semnificativ statistic mai mare comparativ cu lotul control.
7. Gentamicina administrată la şobolan în doza de 100mg/kg timp de 10 zile reduce activitatea enzimelor antioxidantă SOD, CAT și GPX din țesutul renal cu o valoare semnificativă statistic comparativ cu lotul control.
8. Administrarea extractului de soc în asociere cu gentamicina crește activitatea SOD, CAT și GPX, principalele enzime antioxidantă din parenchimul renal, la o valoare statistic semnificativ mai mare comparativ cu lotul la care s-a administrat exclusiv gentamicină.
9. Administrarea extractului de soc în asociere cu gentamicina reduce nivelul de MDA la o valoare semnificativ statistic mai mică comparativ cu cea înregistrată la lotul administrat exclusiv cu gentamicină.
10. Glutationul pare să nu fie un marker fidel al nivelului de SO sau al apărării antioxidantă în modelul experimental propus.

7.1 Originalitatea și elementele inovative ale tezei

7.1 Original elements of the thesis

Studiul de față dezvoltă următoarele elemente inovative ce implică originalitatea prezentei cercetări:

- Studiul extractelor naturale ale diferitelor genotipuri de soc (*Sambucus nigra* L. și *Sambucus nigra Haschberg*) și monitorizarea trasabilității unor compuși

bioactivi de interes, pe statii de dezvoltare morfologică de la mugurele floral până la maturitatea fructului.

- Corelarea aspectele biochimice, de modifierilor naturali ai răspunsului biologic cu cele clinice, hematologice și histopatologice, din perspectiva potențialului bioactiv a socalui, în tratamentul insuficienței renale.
- Testarea eficienței principiilor active din extractul de flori de soc în insuficiența renală indusă experimental pe model animal.
- Caracterizarea extractului fitoterapeutic realizat din inflorescențe de *Sambucus nigra* L. precum și demonstrarea capacității acestuia în creșterea apărării antioxidantă simultan cu reducerea peroxidării lipidice.

BIBLIOGRAFIE

REFERENCES

1. ABDEL-RAHEEM I.T, A.A ABDEL-GHANY, G.A MOHAMED, 2009, Protective effect of quercetin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats, *Biol. Pharm. Bull.* 32(1):61-67.
2. ABDELRAHMAN RS., 2018, Protective effect of apocynin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats, *Hum Exp Toxicol.* 37(1):27-37.
3. AJAY K. SINGH MBBS, FRCP, 2010, Hypomagnesemia, *Decision Making in Medicine (Third Edition), Pages 388-389*
4. AKBULUT M., S. ERCISLI, M. TOSUN, 2009, Physico-chemical characteristics of some wild grown European elderberry (*Sambucus nigra L.*) genotypes, *Pharmacognosy Magazine*, 5(20), 320–323.
5. AL-REJAE SALIM SALIH, H.M. ABUOHASHISH, O.A. ALKHAMEES, A.M. ALEISA, A.S. ALROUJAYEE, 2012, Gender difference following high cholesterol diet induced renal injury and the protective role of rutin and ascorbic acid combination in Wistar albino rats, *Lipids in Health and Disease*, 11:41.
6. ANTONA A.M., A.M. PINTEA, D.O. RUGINĂ, Z.M. SCONȚA, D. HANGANU, L. VLASE C, D. BENEDEC, 2013, Preliminary studies on the chemical characterization and antioxidant capacity of polyphenols from *Sambucus sp.*, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 8(3), 973 – 980.
7. ATKINSON F.S., K. FOSTER-POWELL, J.C. BRAND-MILLER, 2008, International tables of glycemic index and glycemic load values, *Diabetes Care*, 31(12), 2281–2283.
8. ATKINSON M.D., E. ATKINSON, 2002, *Sambucus nigra* L. Biological flora of the British Isles. *Journal of Ecology*, 90, 895–923.
9. BADESCU L., O. BADULESCU, M. BADESCU, M. CIOCOIU, 2012, Mechanism by *Sambucus nigra* extract improves bone mineral density in experimental diabetes, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 848269, 6 pages.
10. BADESCU M., O. BADULESCU, L. BADESCU, M. CLOCOLU, 2015, Effects of *Sambucus nigra* and *Aronia melanocarpa* extracts on immune system disorders within diabetes mellitus, *Pharmaceutical Biology*, 53(4), 533–539.
11. BAK, Y., H. KIM, J.W KANG, D.H. LEE, M.S. KIM, Y.S. PARK, J.H. KIM, K.Y. JUNG, Y. LIM, J. HONG, D.Y. YOON, 2011, A synthetic naringenin derivative, 5-hydroxy-7,4'-diacetoxyflavanoneN-phenyl hydrazone (N101-43), induces apoptosis through up-regulation of Fas/FasL expression and inhibition of PI3K/Akt signaling pathways in non-small-cell lung cancer cells, *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 10286–10297.
12. BALGRADEAN M., E. CINTEZA, F. FILIPOIU, V. JINGA, 2013, Gentamicine, infections and acute tubular necrosis in children, *Farmacia*, 61(4):772-780.

13. BARROS LILLIAN, L. CABRITA, M. VILASBOAS, ANA MARIA CARVALHO, ISABEL C.F.R FERREIRA, 2011, Chemical, biochemical and electrochemical assays to evaluate phytochemicals and antioxidant activity of wild plants, *Food Chemistry*, 127(4), 1600-1608.
14. BEAUX D., J. FLEURENTIN, F. MORTIER, 1999, Effect of extracts of *Orthosiphon stamineus* Benth, *Hieracium pilosella* L., *Sambucus nigra* L. and *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) spreng. in rats, *Phytotherapy Research*, 13(3), 222-225.
15. BERMUDEZ-SOTO M. J., F.A. THOMÁS-BARBERÁN, 2004, Evaluation of commercial red fruit juice concentratesas ingredientsfor antioxidant functional juices, *European Food Research and Technology*, 219, 133-141.
16. BEST PATRICIA J., D.N. REDDAN, P.B BERGER, L.A. SZCZECH, P.A. MCCULLOUGH, R.M. CALIFF, Cardiovascular disease and chronic kidney disease: insights and an update, *Am. Heart J.* 2004, 148, 230-242.
17. BEVIN CHRISTOPHER J., A.J. FERGUSSON, W.B. PERRY, L.J. JANIK, D. COZZOLINO, 2006, Development of a Rapid "Fingerprinting" System for Wine Authenticity by Mid-infrared Spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.*, 54 (26), 9713-9718.
18. BITSCH R., M. NETZEL, S. SONNTAG, G. STRASS, T. FRANK, I. BITSCH, 2004, Urinary excretion of cyanidin glucosides and glucuronides in healthy humans after elderberry juice ingestion, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 343-345.
19. BOOTS A.W., G.R. HAENEN, A. BAST, 2008, Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical, *Eur. J. Pharmacol.* 585, 325-337.
20. BOROWSKA J., R. ZADERNOWSKI, J. WAŽBIŃSKA, U. PUCZEL, 2000, Charakterystyka chemiczna owoców bzu czarnego (*Sambucus nigra* L.), *Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu*, 31, 13-17.
21. BOWN D., 1995, Encyclopaedia of herbs and their uses. London: Dorling Kindersley.
22. BROMLEY J., B.G.M. HUGHES, D.C.S. LEONG, N.A. BUCKLEY, 2005, Life-threatening interaction between complementary medicines: cyanide toxicity following ingestion of amygdaline and vitamin C, *Annals of Pharmacotherapy*, 39, 1566e1569.
23. BRONNUM-HANSEN K., F. JACOBSEN, J.M. FLINK, 1985, Anthocyanin colourants from elderberry (*Sambucus nigra* L.) Process considerations for production of the liquid extract, *Journal of Food Technology*, 20(6), 703-711.
24. BUNEA A., D. RUGINĂ, Z. SCONȚA, R.M. POP, A. PINTEA, C. SOCACIU, F. TĂBĂRAN, C. GROOTAERT, K. STRUIJS, J.VANCAMP, 2013, Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells, *Phytochemistry*, 95:436-44.
25. BURTON GJ, E. JAUNIAUX, 2011, Oxidative stress, *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 25(3):287-99.
26. BYERS P.L., A.L THOMAS, M.A. GOLD, 2014, Growing and marketing elderberries in Missouri, *Agroforestry in Action University of Missouri Center for Agroforestry AF10161-12*.
27. CASANOVA A.G., L. VICENTE-VICENTE, M.T. HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, M. PESCADOR, M. PRIETO, C. MARTÍNEZ-SALGADO, AI. MORALES, LÓPEZ-HERNÁNDEZ, 2017, Key role of oxidative stress in animal models of aminoglycoside nephrotoxicity revealed by a systematic analysis of the antioxidant-to-nephroprotective correlation, *F.J. Toxicology*, 385:10-17.
28. CASATI C.B., V. SÁNCHEZ, R. BAEZA, N. MAGNANI, P. EVELSON, M.C. ZAMORA, 2012, Relationships between colour parameters, phenolic content and sensory changes of processed blueberry, elderberry and blackcurrant commercial juices, *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 1728-1736.
29. CHARLEBOIS D., P. BYERS, C.E. FINN, A. THOMAS, 2010, Elderberry: Botany, Horticulture,

30. CHEN C., D.M. ZUCKERMAN, S. BRANTLEY, M. SHARPE, K. CHILDRESS, E. HOICZYK, A.R. PENDLETON, 2014, *Sambucus nigra* extracts inhibit infectious bronchitis virus at an early point during replication, *BMC Veterinary Research*, 10, 24.
31. CHOI E.J., J.B. PARK, K.D. YOON, S.K. BAE, 2014, Evaluation of the in vitro/in vivo potential of five berries (bilberry, blueberry, cranberry, elderberry and raspberry ketones) commonly used as a herbal supplements to inhibit uridine diphospho-glucuronosyltransferase, *Food and Chemical Toxicology*, 72, 13–19.
32. CHOI Y., S.M. LEE, J. CHUN, H.B. LEE, J. LEE, 2006, Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom, *Food Chemistry*, 99, 381e387.
33. CHRISTENSEN L.P., K. KAACK, X.C. FRETTÉ, 2008, Selection of elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes best suited for the preparation of elderflower extracts rich in flavonoids and phenolic acids, *European Food Research and Technology*, 227, 293–305.
34. CHRUBASIK C., T. MAIER, C. DAWID, T. TORDA, A. SCHIEBER, T. HOFMANN, S. CHRUBASIK, 2008, An observational study and quantification of the actives in a supplement with *Sambucus nigra* and *Asparagus officinalis* used for weight reduction, *Phytotherapy Research*, 22, 913–918.
35. CINZIA SOLFANELLI, ALESSANDRA POGGI, ELENA LORETI, AMEDEO ALPI, AND PIERDOMENICO PERATA, 2006, Sucrose-Specific Induction of the Anthocyanin Biosynthetic Pathway in Arabidopsis, *Plant Physiology*, 140, 637–646.
36. CODEA R., M. MIRCEAN, ORSOLYA SARPATAKI, B. SEVASTRE, G. GIURGIU, C. POPOVICI, I. SCURTU, DANIELA NEAGU, L. OANA, 2018, Urinary n-acetyl-beta-d-glucosaminidase index activity normal values in healthy wistar rats, *Bulletin UASVM Veterinary Medicine* 75 (1) / 2018.
37. CONTI M., P.C MORAN, P. LEVILLAIN, A. LEMONNIER, 1991, Improved fluorimetric determination of malondialdehyde, *Clin.Chem.* 37, 1273 - 1275.
38. COSMULESCU S., I. TRANDAFIR, V. NOUR, 2014, Influence of the extraction solvent on antioxidant capacity and total phenolic content in currant fruits, *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 87, 206–209.
39. CZANK C., A. CASSIDY, Q. ZHANG, D.J. MORRISON, T. PRESTON, P.A. KROON, N.P. BOTTING, C.D. KAY, 2013, Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: a¹³-tracer study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 97, 995–1003.
40. DAI J., R.J. MUMPER, 2010, Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties, *Molecules*, 15, 7313e7352.
41. DAWIDOWICZ A.L., DOROTA WIANOWSKA, BARBARA BARANIAK, 2006, The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts), *LWT* 39, 308–315.
42. DE VRIES J.H., P.L. JANSEN, P.C. HOLLMAN, W.A. VAN STAVEREN, M.B. KATAN, 1997, Consumption of quercetin and kaempferol in free-living subjects eating a variety of diets, *Cancer Lett.* 114, 141–144.
43. DELLAGRECA M., A. FIORENTINO, P. MONACO, L. PREVITERA, A.M. SIMONET, 2000, Cyanogenic glycosides from *Sambucus nigra*, *Natural Product Letters*, 14, 175–182.
44. DULF F.V., I. OROIAN, D.C. VODNAR, CARMEN SOCACIU, ADELA PINTEA, 2013, Lipid classes and fatty acid regiodistribution in triacylglycerols of seed oils of two *Sambucus species* (*S. nigra* L. and *S. ebulus* L.), *Molecules*, 18, 11768–11782.
45. DUYMUŞ H.G., F. GÖGER, K. ÜSNÜ CAN BAŞER, 2014, In vitro antioxidant properties and anthocyanin compositions of elderberry extracts, *Food Chemistry*, 155, 112–119.

46. ELLENBERG H., 1988, Vegetation ecology of Central Europe, Cambridge, UK: Cambridge University Press.
47. ENGELS G., J. BRINCKMANN, 2013, European elder, *Herbal Gram*, 97,1-7.
48. EUROPEAN HERB GROWERS ASSOCIATION (EUROPAM), 2010, Production of medicinal and aromatic plants in Europe status 2010. Vienna, Austria: Europam. www.europam.net.
49. FARREL N.J., G.H NORRIS, J. RYAN, C.M. PORTER, C. JIANG, C.N. BLESSO, 2015, Black elderberry extract attenuates inflammation and metabolic dysfunction in diet-induced obese mice, *British Journal of Nutrition*, 114, 1123-1131.
50. FAZIO A., P. PLASTINA, J. MEIJERINK, R.F. WITKAMP, B. GABRIELE, 2013, Comparative analyses of seeds of wild fruits of *Rubus* and *Sambucus* species from Southern Italy: Fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts, *Food Chemistry*, 140, 817-824.
51. FEJER J., I. SALAMON, D. GRULLOVA, S. MICHALEK, M. ZVALOVA, 2015, Elderberry (*Sambucus nigra*) cultivation in Slovak Republic and identification and quantification of anthocyanins, Ed.: A.L. Thomas Acta Hort. 1061.
52. FERMOR B., S.E. CHRISTENSEN, I. YOUN, J.M. CERNANEC, C.M. DAVIES, J.B. WEINBERG, 2007, Oxygen, nitric oxide and articular cartilage, *Eur Cell Mater*.13:56-65.
53. FILIP MIUȚA L., SILAGHI-DUMITRESCU, D. PRODAN, C. SAROSI, M. MOLDOVAN, I. COJOCARU, 2017, Analytical Approaches for Characterization of Teeth Whitening Gels Based on Natural Extracts, *Key Engineering Materials*, ISSN: 1662-9795, 2017, 752, 24-28.
54. FINN C.E., A.L. THOMAS, P.L. BYERS, M. KEMAL, 2008, Evaluation of American (*Sambucus canadensis*) and European (*S. nigra*) elderberry genotypes grown in diverse environments and implications for cultivar development, *HortScience*, 43(5), 1385-1391.
55. FLOHE L., F. OTTING, 1984, Superoxide dismutase assay, *Methods Enzymol*, 105, 93.
56. FLOHE L., W. GUNZLER, 1984, Assays of glutathione peroxidase, *Methods in Enzymology* vol.105: 114-21.
57. FÖRSTER-WALDL E., M. MARCHETTI, I. SCHÖLL, M. FOCKE, C. RADAUER, T. KINACIYAN, I. NENTWICH, S. JÄGER, E.R. SCHMID, G. BOLTZ-NITUDESCU, O. SCHEINER, E. JENSEN-JAROLIM, 2003, Type I allergy to elderberry (*Sambucus nigra*) is elicited by a 33.2 kDa allergen with significant homology to ribosomal inactivating proteins. *Clinical and Experimental Allergy*, 33, 1703-1710.
58. FRIED L.F., T.J. ORCHARD, B.L. KASISKE, 2001, Effect of lipid reduction on the progression of renal disease: a meta-analysis, *Kidney Int*, 59:260-269.
59. GALIC A., V. DRAGOVIC-UZELAC, B. LEVAJ, D. BURSAC KOVACEVIC, S. PLIESTIC, S. ARNAUTOVIC, 2009, The polyphenols stability, enzyme activity and physico-chemical parameters during producing wild elderberry concentrated juice, *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 74, 181-186.
60. GHAZNAVI H., I. FATEMI, H. KALANTARI, S.M.T. HOSSEINI TABATABAEI, M. MEHRABANI, B. GHOLAMINE, M. KALANTAR, S. MEHRZADI, M. GOUDARZI, 2017, Ameliorative effects of gallic acid on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats, *J Asian Nat Prod Res*. 5:1-12.
61. GOLLUCKE A.P., R.C. PERES, A. ODAIR, D.A. RIBEIRO, 2013, Polyphenols: A nutraceutical approach against diseases, *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 5(3), 214-219.
62. GRAY A.M., Y.H.A. ABDEL-WAHAB, P.R. FLATT, 2000, The traditional plant treatment, *Sambucus nigra* (elder), exhibits insulin-like and insulin-releasing actions in vitro, *Journal of Nutrition*, 130(1), 15-20.
63. GUARDIA T., A.E ROTELLI, A.O. JUAREZ, L.E. PELZER, 2001, Antiinflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat, *Farmaco*, 56, 683-687.

Monitorizarea trasabilității unor compuși bioactivi de interes pe stadii de dezvoltare morfologică a fructelor de soc și evaluarea unui preparat fitoterapeutic cu efect nefroprotector

64. HAN Y., J.S. LU, Y. XU, L. ZHANG, B.F. HONG, 2015, Rutin ameliorates renal fibrosis and proteinuria in 5/6-nephrectomized rats by anti-oxidation and inhibiting activation of TGF β 1-smad signaling, *Int J Clin Exp Pathol*, 8(5):4725-4734.
65. HASE M., T. BABAZONO, S. KARIKE, N. KINAE, I. YASUHIKO, 2006, Renoprotective effects of tea catechin in streptozotocin- induced diabetic rats, *Int. Urol. Nephrol*, 38, 693-699.
66. Hearst C., G. McCollum, D. Nelson, L.M. Ballard, B. C. Millar, C.E. Goldsmith, P.J. Rooney, Anne Loughrey, J.E. Moore, J.R. Rao, 2010, Antibacterial activity of elder (*Sambucus nigra* L.) flower or berry against hospital pathogens, *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(17), 1805-1809.
67. HELAL M.G., M. ZAKI, E. SAID, 2018, Nephroprotective effect of saxagliptin against gentamicin-induced nephrotoxicity, emphasis on anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-apoptic effects, *Life Sci. pii: S0024-3205(18)30398-9*.
68. HERTOG M.G., E.J. FESKENS, P.C. HOLLMAN, M.B. KATAN, D. KROMHOUT, 1993, Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly study, *Lancet* 342:1007-1011.
69. HSIEH C.L., C.C. PENG, K.C. CHEN, R.Y. PENG, 2013, Rutin (Quercetin Rutinoside) Induced protein-energy malnutrition in chronic kidney disease, but quercetin acted beneficially, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 7258-7267.
70. JANBAZ K.H., S.A. SAEED, A.H. GILANI, 2002, Protective effect of rutin on paracetamol and CCl₄-induced hepatotoxicity in rodents, *Fitoterapia*, 73:557-563.
71. JIMENEZ P., P. CABRERO, J.E. BASTERRECHEA, J. TEJERO, D. CORDOBA-DIAZ, T. GIRBES, 2013, Isolation and molecular characterization of two lectins from dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.) blossoms related to the Sam n1 allergen, *Toxins*, 5, 1767-1779.
72. JIMENEZ P., P. CABRERO, D. CORDOBA-DIAZ, M. CORDOBA-DIAZ, M. GARROSA, T. GIRBÉS, 2017, Lectin digestibility and stability of elderberry antioxidants to heat treatment in vitro, *Molecules*, 22, 95.
73. JIMENEZ P., P. CABRERO, J.E. BASTERRECHEA, J. TEJERO, D. CORDOBA-DIAZ, M. CORDOBA-DIAZ, T. GIRBES, 2014, Effects of short-term heating on total polyphenols, anthocyanins, antioxidant activity and lectins of different parts of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.), *Plant Food for Human Nutrition*, 69, 168e174.
74. KAACK K., L.P. CHRISTENSEN, M. HUGHES, R. EDER, 2006, Relationship between sensory quality and volatile compounds of elderflower (*Sambucus nigra* L.) extracts, *European Food Research and Technology*, 223, 57-70.
75. KAACK K., 1997, 'Sampo' and 'Samdal', elderberry cultivars for juice concentrates, *Fruit Varieties Journal*, 51(1), 28-31.
76. KAACK K., L. CHRISTENSEN, 2008, Effect of packing materials and storage time on volatile compounds in tea processed from flowers of black elder (*Sambucus nigra* L.), *European Food Research and Technology*, 227, 1259-1273.
77. KAACK K., L.P. CHRISTENSEN, 2010, Phenolic acids and flavonoids in tea processed from flowers of black elder (*Sambucus nigra* L.) stored in different packing materials, *Eur. J. Horticul. Sci.* 75, 214-220.
78. KAACK K., T. AUSTED, 1998, Interaction of vitamin C and flavonoids in elderberry (*Sambucus nigra* L.) during juice processing, *Plant Foods for Human Nutrition*, 52, 187-198.
79. KAACK K., X.C. FRETTE, L.P. CHRISTENSEN, A.K. LANDBO, A.S. MEYER, 2008, Selection of elderberry genotypes best suited for the preparation of juice, *European Food Research and Technology*, 226, 843-855.

80. KAMALAKKANNAN N., P. STANELY MAINZEN PRINCE, 2006, Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues, *Mol Cell Biochem*, 293: 211-219.
81. KAMALAKKANNAN N., P. STANELY MAINZEN PRINCE, 2006, The influence of rutin on the extracellular matrix in streptozotocininduced diabetic rat kidney, *J. Pharm. Pharmacol.*, 58, 1091-1098.
82. KAMEL K.M., O.M. ABD EL-RAOUF, S.A METWALLY, H.A. ABD EL-LATIF, M.E. EL-SAYED, 2014, Hesperidin and rutin, antioxidant citrus flavonoids, attenuate cisplatin-induced nephrotoxicity in rats, *J. Biochem Mol. Toxicol.* 28: 312-319.
83. KANDEMIR F.M., M. OZKARACA, B.A. YILDIRIM, B. HANEDAN, A. KIRBAS, K. KILIC, E. AKTAS, F. BENZER, 2015, Rutin attenuates gentamicin-induced renal damage by reducing oxidative stress, inflammation, apoptosis, and autophagy in rats, *Ren Fail*. 37(3):518-25.
84. KHAJEVAND-KHAZAEI M.R., P. MOHSENI-MOGHADDAM, M. HOSSEINI, L. GHOLAMI, T. BALUCHNEJADMOJARAD, M. ROGHANI, 2018, Rutin, a quercetin glycoside, alleviates acute endotoxemic kidney injury in C57BL/6 mice via suppression of inflammation and up-regulation of antioxidants and SIRT1, *Eur J Pharmacol.*;833:307-313.
85. KHALID U., G. PINO-CHAVEZ, P. NESARGIKAR, R.H. JENKINS, T. BOWEN, D.J. FRASER, R. CHAVEZ, 2016, Kidney ischaemia reperfusion injury in the rat: the EGTI scoring system as a valid and reliable tool for histological assessment, *J Histol Histopathol.* 3:1.
86. KHOLIDDINOV K.H., and L.A. GRIBOV, 1985, IR spectroscopy for the determination of the solids content of grape wines, *Izv. Timiryazevsk. S.-kh. Akad.* 5, 192.
87. KIM D.O., S.W. JEONG, C.Y. LEE, 2003, Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums, *Food Chem* 81:321-326.
88. KINOSHITA E., K. HAYASHI, H. KATAYAMA, T. HAYASHI, A. OBATA, 2012, Anti-Influenza virus effects of elderberry juice and its fractions, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(9), 1633-1638.
89. KINOSHITA E., K. HAYASHI, H. KATAYAMA, T. HAYASHI, A. OBATA, 2012, Anti-Influenza virus effects of elderberry juice and its fractions, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(9), 1633-1638.
90. KOHLMÜNZER S., 1998, Farmakognozja. Podręcznik dla studentów farmacji, *Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL*163-176.
91. KOLLANYI I., G. KOLLANYI, B. HAJDU, 2005, Varieties and candidate varieties for enlarging the assortment of elderberry (Special edition), *Horticulture [Kertgazdaság]*83-88.
92. KOŁODZIEJ B., N. MAKSYMIEC, K. DROŻDŻAL, J. ANTONKIEWICZ, 2012, Effect of traffic pollution on chemical composition of raw elderberry (*Sambucus nigra* L.), *Journal of Elementology*, 17, 67-78.
93. KOŁODZIEJ B., N. MAKSYMIEC, K. DROŻDŻAL, J. ANTONKIEWICZ, 2012, Effect of traffic pollution on chemical composition of raw elderberry (*Sambucus nigra* L.), *Journal of Elementology*, 17, 67-78.
94. KONG F., 2009, Pilot clinical study on a proprietary elderberry extract: Efficacy in addressing influenza symptoms. *Online J Pharmacol Pharmacokin*, 5, 32-43.
95. KORISH A.A., M.M. ARAFAH, 2008, Catechin combined with vitamins C and E ameliorates insulin resistance (IR) and atherosclerotic changes in aged rats with chronic renal failure (CRF), *Arch. Gerontol. Geriatr.* 46, 25-39.
96. KORKMAZ A., D. KOLANKAYA, 2010, Protective effect of rutin on the ischemia/reperfusion induced damage in rat kidney, *J Surg Res*, 164: 309-315.

97. KORKMAZ A., D. KOLANKAYA, 2013, Inhibiting inducible nitric oxide synthase with rutin reduces renal ischemia/reperfusion injury, *Can J Surg.* 56: 6-14.
98. KRAWITZ C., M.A. MRAHEIL, M. STEIN, C. IMIRZALIOGLU, E. DOMANN, S. PLESCHKA, T. HAIN, 2011, Inhibitory activity of a standardized elderberry liquid extract against clinically-relevant human respiratory bacterial pathogens and influenza A and B viruses. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11, 16.
99. KWON K.H., A. MURAKAMI, T. TANAKA, H. OHIGASHI, 2005, Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression, *Biochem Pharmacol*, 69, 395–406.
100. LEE J., & C.E. FINN, 2007, Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2665–2675.
101. LENNON J.J., & J.R.G. TURNER, 1995, Predicting the spatial distribution of climate: Temperature in Great Britain, *Journal of Animal Ecology*, 64, 370–392.
102. LEVEY A.S., R. ATKINS, J. CORESH, E.P. COHEN, A.J. COLLINS, K.U. ECKARDT, M.E. NAHAS, B.L. JABER, M. JADOU, A. LEVIN, N.R. POWE, J. ROSSEURT, D.C. WHEELER, N. LAMEIRE, G. EKNOYAN, 2007, Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives-a position statement from Kidney Disease Improving Global Out- comes, *Kidney Int.* 72: 247-259.
103. LOPEZ-REVUELTA A., J.I. SANCHEZ-GALLEG, A. HERNANDEZ-HERNANDEZ, J. SANCHEYAGUE, M. LLANILLO, 2006, Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress, *Chem Biol Interact*, 161:79-91.
104. MAHMOUD A.M., 2011, Influence of rutin on biochemical alterations in hyperammonemia in rats, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(7-8): 783-789.
105. MAHMOUDI M., M.A. EBRAHIMZADEH, A. DOOSHAN, A. ARIMI, N. GHASEMI, F. FATHIAZAD, 2014, Antidepressant activities of *Sambucus ebulus* and *Sambucus nigra*, *European Review form Medical and Pharmacological Sciences*, 18(22):3350-3353.
106. MARIA ROCA and MARIA ISABEL MI NGUEZ-MOSQUERA, 2006, Chlorophyll Catabolism Pathway in Fruits of *Capsicum annuum* (L.): Stay-Green versus Red Fruits, *J. Agric. Food Chem.* 54, 4035-4040.
107. MATĚJÍČEK A., J. KAPLAN, J. MATĚJÍČKOVÁ, M. VESPALCOVÁ, 2013, Elderberry cultivar 'Haschberg'(ODRŮDA ČERNÉHO BEZU 'HASCHBERG'), *Vědecké Práce Ovocnářské*, No.23 pp.87-90.
108. MELISSA GREGORY, 2007, Comprehensive Pediatric Hospital Medicine, ISBN 978-0-323-03004-5
109. MIKULIC-PETKOVSEK M., A. IVANCIC, V. SCHMITZER, R. VEBERIC, F. STAMPAR, 2016, Comparison of major taste compounds and antioxidative properties of fruits and flowers of different *Sambucus* species and interspecific hybrids, *Food Chem* 200: 134-140.
110. MIKULIC-PETKOVSEK M., ANA SLATNAR, F. STAMPAR, R. VEBERIC, 2012, HPLC-MSⁿ identification and quantification of flavonol glycosides in 28 wild and cultivated berry species, *Food Chemistry* 135:2138-2146.
111. MIKULIC-PETKOVSEK M., J. SAMOTICHA, K. ELER, F. STAMPAR, R. VEBERIC, 2015, Traditional elderflower beverages: A rich source of phenolic compounds with high antioxidant activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 63, 1477-1487.
112. MILBURY P.E., G. CAO, R.L. PRIOR, J. BLUMBERG, 2002, Bioavailability of elderberry anthocyanins, *Mechanisms of Ageing and Development*, 123, 997-1006.

113. MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA I., A.M. WITKOWSKA, M.E. ZUJKO, 2018, Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body, *Adv Med Sci.* 63(1):68-78.
114. MIUTA FILIP, MIHAELA VLASSA, VIRGINIA COMAN, ADELA HALMAGYI, 2016, Simultaneous determination of glucose, fructose, sucrose and sorbitol in the leaf and fruit peel of different apple cultivars by the HPLC-RI optimized method, *Food Chemistry* 199:653-659.
115. ML H., 1994, Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma, *Methods in Enzymology*, 233:380-384.
116. MLADENKA PREMYSL, M. RIHA, J. MARTIN, BARBORA GOROVA, A. MATEJICEK, JIRINA SPILKOVÁ, 2016, Fruit extracts of 10 varieties of elderberry (*Sambucus nigra* L.) interact differently with iron and copper, *Phytochemistry Letters* 18:232-238.
117. MLYNARCZYK KAROLINA, DOROTA WALKOWIAK-TOMCZAK, P. GRZEGORZ ŁYSIAK, 2018, Bioactive properties of *Sambucus nigra* L. As a functional ingredient for food and pharmaceutical industry, *Journal of Functional Foods*, 40:377-390.
118. MORALES A.I., D. DETAILLE, M. PRIETO, A. PUENTE, E. BRIONES, M. ARÉVALO, X. LEVERVE, J.M. LÓPEZ-NOVOA, M.Y. EL-MIR, 2010, Metformin prevents experimental gentamicin-induced nephropathy by a mitochondria-dependent pathway, *Kidney Int.* 77(10):861-869.
119. MORI Y., T. HIRANO, 2012, Ezetimibe alone or in combination with pitavastatin prevents kidney dysfunction in 5/6 nephrectomized rats fed highcholesterol, *Metabolism* 61:379-88.
120. MORIN J.P., G. VIOTTE, A. VANDEWALLE, F. VAN HOOF, P. TULKENS, J.P. FILASTRE, 1980, Gentamicin-induced nephrotoxicity: A cell biology approach, *Kidney international*, 18(5):583-590.
121. MRATINIC EVICA and MILICA FOTIRIĆ, 2007, Selection of black elderberry (*Sambucus nigra* L.) and evaluation of its fruits usability as biologically valuable food, *GENETIKA*, 39(3): 305-314.
122. MUNTEAN L.S., M. TĂMAŞ, S. MUNTEAN, L. MUNTEAN, M.M. DUDA, D.I. VÂRBAN, S. FLORIAN, 2007, Tratat de plante medicinale cultivate și spontane, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, ISBN 978-973-751-463-9.
123. MUREŞAN (CERBU) ELENA ANDRUTA, SEVASTIȚA MUSTE, BORŞA A., ZORIȚA SCONȚA, DIANA CRAINIC, V. MUREŞAN, 2012, Total phenolic content changes during apple growth as a function of variety and fruit position in the crown, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 18(4).
124. MUREŞAN ELENA ANDRUȚA, SEVASTIȚA MUSTE, A. BORŞA, ROMINA ALINA VLAIC, V. MUREŞAN, 2014, Evaluation of physical-chemical indexes, sugars, pigments and phenolic compounds of fruits from three apple varieties at the end of storage period, *Bulletin UASVM Food Science and Technology* 71(1).
125. MURKOVIC M., P.M. ABUJA, A.R. BERGMANN, A. ZIRNGAST, U. ADAM, B.M. WINKLHOFER-ROOB, H. TOPLAK, 2004, Effects of elderberry juice on fasting and postprandial serum lipids and low-density lipoprotein oxidation in healthy volunteers: A randomized, doubleblind, placebo-controlled study, *European Journal of Clinical Nutrition*, 58(2), 244-249.
126. MUSTE SEVASTIȚA, 2010, Materii prime vegetale în industria alimentară, Ed. AcademicPres, ISBN 978-973-744-131-7, Cluj-Napoca.
127. NAKANISHI T., T. KURAGANO, M. NANAMI, Y. NAGASAWA, Y. HASUIKE, 2018, Misdistribution of iron and oxidative stress in chronic kidney disease, *Free Radic Biol Med.* pii: S0891-5849(18)31115-8.
128. NAKAZAWA T., Y. MIYANOKI, Y. URANO, M. UEHARA, Y. SAITO, N. NOGUCHI, 2016, Effect of vitamin E on 24(S)-hydroxycholesterolinduced necroptosis-like cell death and apoptosis, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* pii: S0960-0760(16)30049-8.

Monitorizarea trasabilității unor compuși bioactivi de interes pe stadii de dezvoltare morfologică a fructelor de soc și evaluarea unui preparat fitoterapeutic cu efect nefroprotector

129. NEGRETTE-GUZMÁN M., W.R. GARCÍA-NIÑO, E. TAPIA, C. ZAZUETA, S. HUERTA-YEPEZ, J.C. LEÓN-CONTRERAS, R. HERNÁNDEZ-PANDO, O.E. APARICIO-TREJO, M. MADERO, PEDRAZA CHAVERRI J. CURCUMIN, 2015, Attenuates Gentamicin-Induced Kidney Mitochondrial Alterations: Possible Role of a Mitochondrial Biogenesis Mechanism, *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* ID 917435.
130. NETZEL M., G. STRASS, M. HERBST, H. DIETRICH, R. BITSCH, I. BITSCH, T. FRANKD, 2005, The excretion and biological antioxidant activity of elderberry antioxidants in healthy humans, *Food Research International*, 38, 905–910.
131. OCHMIAN I., J. OSZMIANSKI, K. SKUPIEN, 2009, Chemical composition, phenolics, and firmness of small black fruits, *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 83, 64–69.
132. OGNIK K., E. RUSINEK, I. SEMBRATOWICZ, J. TRUCHLIŃSKI, 2006, Zawartość metali ciężkich oraz azotanów (V) i azotanów (III) w owocach bzu czarnego i aronii czarnoowocowej w zależności od miejsca pozyskania i okresu wegetacyjnego, *Rocz PZH*, 57(3), 235–241.
133. OLEJNIK A., M. OLKOWICZ, K. KOWALSKA, J. RYCHLIK, M. DEMBCZYŃSKI, K. MYSZKA, J. WOJCIECH, B. WOJCIECH, P.M. MARY, 2016, Gastrointestinal digested *Sambucus nigra* L. fruit extract protects in vitro cultured human colon cells against oxidative stress, *Food Chemistry*, 197, 648–657.
134. ONYEIKE E.N., & T.T. OMUBO-DEDE, 2002, Effect of heat treatment on the proximate composition, energy values, and levels of some toxicants in African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*) seed varieties, *Plant Foods for Human Nutrition*, 57, 223e231.
135. OZBEK E., 2012, Induction of oxidative stress in kidney, *Int J Nephrol.* 465897.
136. PABI N., G. INNERHOFER, E. LEITNER, BARBARA SIEGMUND, 2014, Chapter 17 - The Flavor of Elderflower – Species Differentiation via Flavor Compounds, *Flavour Science, Proceedings from XIII Weurman Flavour Research Symposium*, Pages 95-99.
137. PAN H., K. SHEN, X. WANG, H. MENG, C. WANG, B. JIN, 2014, Protective effect of metalloporphyrins against cisplatin-induced kidney injury in mice, *PLoS One.* 14;9(1):e86057.
138. PAŞCA CLAUDIA, L. MĂRGHITAŞ, D. DEZMIREAN, OTILIA BOBİŞ, VICTORIȚA BONTA, F. CHIRILĂ, IOANA MATEI, N. FIȚ, 2017, Medicinal Plants Based Products Tested on Pathogens Isolated from Mastitis Milk, *Molecules*, 22, 1473.
139. PENG C.C., C.L. HSIEH, Y.B. KER, H.Y. WANG, K.C. CHEN, R.Y. PENG, 2012, Selected nutraceutical screening by therapeutic effects on doxorubicin-induced chronic kidney disease, *Mol. Nutr. Food Res.*, 56, 1–18.
140. PERKINELMER INSTRUMENTS LLC, THE THGA GRAPHITE FURNACE, Techniques and recommended conditions, Germany, B3210, Release 1.0, 7:1-65, *Information Publishing Group*, 1991-1999.
141. PETRUȚ GEORGIANA S., SEVASTIȚA MUSTE, CRINA MUREȘAN, ADRIANA PĂUCEAN, ANDRUȚA E. MUREȘAN, 2017, Chemical Profiles and Antioxidant Activity of Black Elder (*Sambucus Nigra* L.) - A Review, *Bulletin UASVM Food Science and Technology* 74(1).
142. PIETTA P., P. MAURI, R. MAFFEI FACINO, M. CARINI, 1992, Analysis of flavonoids by MECC with ultraviolet diode array detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 10(10-12): 1041-1045.
143. PIPPENGER C.E., R.W. BROWNE, D. ARMSTRONG, 1993, Regulatory antioxidant enzymes, *Methods in Molecular Biology*, 108: Free Radicals and Antioxidant Protocols D. Armstrong (ed.). Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 299-311.
144. PLISZKA B., J. WAŽBIŃSKA, U. PUCZEL, G. HUSZCZA-CIOŁKOWSKA, 2005, Biologicznie czynne związki polifenolowe zawarte w owocach różnych odmian hodowlanych i dziko rosnącego bzu

czarnego, *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 507, 443–449.

145. RANDJELOVIC P., S. VELJKOVIC, N. STOJILJKOVIC, L. JANKOVIC-VELICKOVIC, D. SOKOLOVIC, M. STOILJKOVIC, I. ILIC, 2012, Salicylic acid attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats, *The ScientificWorld Journal*, Article ID 390613, 6 pages.
146. REGAN E., J. FLANNELLY, R. BOWLER, K. TRAN, M. NICKS, B.D. CARBONE, D. GLUECK, H. HEIJNEN, R. MASON, J. CRAPO, 2005, Extracellular superoxide dismutase and oxidant damage in osteoarthritis, *Arthritis Rheum.* 52(11):3479–91.
147. RENUGADEVI J., S.M. PRABU, 2009, Naringenin protects against cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats. *Toxicology* 2009, 256, 128–134.
148. RICHARDSON KELSEY L., N.S. WEISS, S. HALBACH, 2018, Chronic School Absenteeism of Children with Chronic Kidney Disease, *The Journal of Pediatrics*.
149. ROCGERO J.P., P. ARCHIER, 1989, Demonstration of a method for determining simple phenols in wines, application to wines of different origins and ages, *connaiss, Vigne Vin.* 23(I), 25.
150. ROSCHEK B.JR., R.C. FINK, M.D. McMICHAEL, D. LI, R.S. ALBERTE, 2009, Elderberry flavonoids bind to and prevent H1N1 infection in vitro. *Phytochemistry*, 70(10), 1255–1261.
151. RUPASINGHE H.P.V., & S. CLEGG, 2007, Total antioxidant capacity, total phenolic content, mineral elements, and histamine concentrations in wines of different fruit sources, *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 133–137.
152. SADILOVA E., F.C. STINTZING, D.R. KAMMERER, & R. CARLE, 2009, Matrix dependent impact of sugar and ascorbic acid addition on color and anthocyanin stability of black carrot, elderberry and strawberry single strength and from concentrate juices upon thermal treatment, *Food Research International*, 42, 1023–1033.
153. SALVADOR A.C., E. KRÓL, V.C. LEMOS, S.A.O. SANTOS, F.P.M.S. BENTO, C.P. COSTA, A. ALMEIDA, D. SZCZEPANKIEWICZ, B. KULCZYŃSKI, Z. KREJPCIO, A.J.D. SILVESTRE and S.M. ROCHA, 2017, Effect of elderberry (*Sambucus nigra* L.) extract supplementation in STZ-induced diabetic rats fed with a high-fat diet, *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 13.
154. SASAKI M., K. SHIKATA, S. OKADA, S. MIYAMOTO, S. NISHISHITA, HU. KATAOKA, C. SATO, J. WADA, D. OGAWA and H. MAKINO, 2011, The macrophage is a key factor in renal injuries caused by glomerular hyperfiltration, *Acta medica Okayama* 65: 81–89.
155. SATO R., S. SOETA, M. MIYAZAKI, B. SYUTO, J. SATO, Y. MIYAKE, J. YASUDA, K. OKADA, Y. NAITO, 2002, Clinical availability of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase index in dogs with urinary diseases, *J Vet Med Sci.* 64(4):361–365.
156. SCHAEFER H.M., D.R. GRAEME, 2011, Plant-Animal Communication, *Oxford University Press*, cap. 4.8.
157. SCHAEFER H.M., J. BRAUN, 2009, Reliable cues and signals of fruit quality are contingent on the habitat in black elder (*Sambucus nigra*), *Ecology*, 90(6):1564–1573.
158. SCHMITZER V., R. VEBERIC, A. SLATNAR, F. STAMPAR, 2010, Elderberry (*Sambucus nigra* L.) wine: A product reach in health promoting compounds, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 10143–10146.
159. SEABRA I.J., MARA ELGA M. BRAGA, MARIA TERESA BATISTA, & H.C DE SOUSA, 2010, Fractioned high pressure extraction of anthocyanins from elderberry (*Sambucus nigra* L.) pomace, *Food and Bioprocess Technology*, 3, 674–683.
160. SEABRAA I.J., MARA ELGA M. BRAGA, MARIA TERESA BATISTA, H.C. DE SOUSA, 2010, Effect of solvent (CO₂/ethanol/H₂O) on the fractionated enhanced solvent extraction of anthocyanins from elderberry pomace, *J. of Supercritical Fluids* 54 :145–152.

Monitorizarea trasabilității unor compuși bioactivi de interes pe stadii de dezvoltare morfologică a fructelor de soc și evaluarea unui preparat fitoterapeutic cu efect nefroprotector

161. SENICA M., F. STAMPARA, R. VEBERICA, M. MIKULIC-PETKOVSEKA, 2016, The higher the better? Differences in phenolics and cyanogenic glycosides in *Sambucus nigra* leaves, flowers and berries from different altitudes, *J Sci Food Agric.*
162. SENICA M., F. STAMPARA, R. VEBERICA, M. MIKULIC-PETKOVSEKA, 2016, Processed elderberry (*Sambucus nigra* L.) products: A beneficial or harmful food alternative? *LWT, Food Science and Technology* 72: 182-188.
163. SHAMEKHI AMIRI F., 2018, Intracellular organelles in health and kidney disease, *Nephrol Ther. pii: S1769-7255(18)30115-9.*
164. SIDOR A., and A. GRAMZA-MICHAŁOWSKA, 2014, Advanced research on the antioxidant and health benefit of elderberry (*Sambucus nigra*) in food – a review, *Journal of Functional Foods* 18: 941-958.
165. SILVA P., S. FERREIRA, F.M. NUNES, 2016, Elderberry (*Sambucus nigra* L.) by-products a source of anthocyanins and antioxidant polyphenols, *Industrial Crops and Products* 95.
166. SKIDMORE-ROTH L., 2005, Handbook of herbs and natural supplements (3rd ed., pp. 365e369) St Louis: Mosby.
167. SOCACI SONIA ANCUȚA, CARMEN SOCACIU, MARIA TOFANĂ, I.V. RAȚI, ADELA PINTEA, 2013, In-tube Extraction and GC-MS Analysis of volatile components from wild and cultivated sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *Carpathica*) berry varieties and juice, *Phytochemical Analysis*, 24, 319-328.
168. SOCACIU CARMEN, FLORICUȚA RANGA, FLORINELA FETEA, LOREDANA LEOPOLD, F. DULF, R. PARLOG, 2009, Complementary advanced techniques applied for plant and food authentication, *Jurnal Czech J Food Sci.* 27: S70-S75.
169. STAS 9036-85 8/90
170. STIRPE F., 2004, Ribosome-inactivating proteins, *Toxicon* 44: 371–383.
171. STOILOVA I., M. WILKER, A. STOYANOVA, A. KRASTANOV, V. STANCHEV, 2007, Antioxidant activity of extract from elder flower (*Sambucus nigra* L.), *Herba Polonica*, 53(1), 45–54.
172. SU K., C. YU, Y. CHEN, Y. HUANG, C. CHEN, H. WU, Y. CHEN, 2014, Rutin, a flavonoid and principal component of saussurea involucrata, attenuates physical fatigue in a forced swimming mouse model, *Int J Med Sci.* 11(5):528-37.
173. TEJERO J., P. JIMENEZ, E.J. QUINTO, D. CORDOBA-DIAZ, M. GARROSA, M. CORDOBA-DIAZ, M.J. Gayoso, T. Girbés, 2015, Elderberries: A source of ribosome-inactivating proteins with lectin activity, *Molecules*, 20, 2364–2387.
174. TESLARIU O., L. AGOROAIE, L. MITITELU-TARȚĂU, C. ZAMFIR, E. TESLARIU, M. NECHIFOR, 2016, Experimental researches regarding the montelucast influence in gentamicine induced acute nephrotoxicity, *Farmacia*, 64(2):252-256.
175. THOLE J.M., T.F. BURNS KRAFT, L.A. SUEIRO, Y.H. KANG, J.J. GILLS, M. CUENDET, J.M. PEZZUTO, D.S. SEIGLER, M.A. LILA, 2006, A comparative evaluation of the anticancer properties of European and American elderberry fruits, *Journal of Medicinal Food*, 9(4), 498–504.
176. UNCINI MANGANELLI R.E., L. ZACCARO, P.E. TOMEI, 2005, Antiviral activity In vitro of *Urtica dioica* L., *Parietaria diffusa* M. et K. and *Sambucus nigra* L, *Journal of Ethnopharmacology*, 98(3), 323–327.
177. VATS P., V.K. SINGH, S. SINGH, S.S. SING, 2008, Glutathione metabolism under high altitude stress and effect of antioxidant supplementation, *Aviation, Space and Environmental Medicine* 79, 132, 1106-1111.
178. VEBERIC R., J. JAKOPIC, F. STAMPAR, V. SCHMITZER, 2009, European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols, *Food Chemistry*,

179. VIVIEN S.H.B., S. MELMED, 2011, The Pituitary (Third Edition), Pages 83–117.
180. VLAIC ROMINA ALINA, V. MURESAN, ANDRUTA ELENA MURESAN, CRINA CARMEN MURESAN, ADRIANA PAUCEAN, V. MITRE, SIMONA MARIA CHIS, SEVASTIȚA MUSTE, 2018, The changes of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and chlorophyll content in plum peels during growth phases: from fructification to ripening, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(1): 148-155.
181. VLAIC ROMINA, SONIA ANCUTA SOCACI, ANDRUȚA ELENA MUREȘAN, CRINA MUREȘAN, O. P. MOLDOVAN, SEVASTIȚA MUSTE, V. MUREȘAN, Bioactive compounds and volatile profile dynamics during fruit growth of several plums cultivars, *J. Agr. Sci. Tech.* 19: 1565-1576.
182. WALKOWIAK-TOMCZAK D., J. CZAPSKI, K. MŁYNARCZYK, 2016, Assessment of colour changes during storage of elderberry juice concentrate solutions using the optimization method, *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 15(3), 299–309.
183. WALZ B., & S. CHRUBASIK, 2008, Impact of a proprietary concentrate of *Sambucus nigra* L. on urinary pH, *Phytotherapy Research*, 22, 977-978.
184. WILLIAM E. MITCH, 2012, Goldman's Cecil Medicine (Twenty-Fourth Edition), Pages 810–818, Volume 1.
185. WILLIAMSON E., S. DRIVER, K. BAXTER, 2009, Stockley's herbal medicines interactions. A guide to the interactions of herbal medicines, dietary supplements and nutraceuticals with conventional medicines, London: Pharmaceutical Press.
186. WILSON R.T., J. WANG, V. CHINCHILLI, J.P. RICHIE, V. JARMO, E.M. LEE, A. DEMETRIUS, 2009, Fish, vitamin D, and flavonoids in relation to renal cell cancer among smokers, *Am. J. Epidemiol.* 170, 717-729.
187. WILSON S.H., A.R. CHADE, A. FELDSTEIN, T. SAWAMURA, C. NAPOLI, A. LERMAN, L.O. LERMAN, 2003, Lipid-lowering-independent effects of simvastatin on the kidney in experimental hypercholesterolaemia, *Nephrol Dial Transplant*, 18:703-709.
188. WU X., L. GU, R. PRIOR, S. MCKAY, 2004, Characterization of anthocyanins and proanthocyanins in some cultivars of *ribes*, *aronia*, and *sambucus* and their antioxidant capacity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7846–7856.
189. www.flavornet.org
190. www.pherobase.com
191. YAGMURCA M., Z. YASAR, O. BAS, 2015, Effects of quercetin on kidney injury induced by doxorubicin, *Bratisl Med*, 116 (8) 486–489.
192. YIN D.D., R.Y. Yuan, Q. Wu, S.S. Li, S. Shao, Y.J. Xu, L.S. Wang, 2015, Assessment of flavonoids and volatile compounds in tea infusions of water lily flowers and their antioxidant activities, *Food Chemistry*, 187, 20–28.
193. YOUDIM K.A., A. MARTIN, J.A. JOSEPH, Incorporation of elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress, *Free Radic Biol Med* 2000;29:51–60.
194. ZAFRA-STONE SHIRLEY, TAHARAT YASMIN, B. MANASHI, C. ARCHANA, A.V. JOE, D. BAGCHI, 2007, Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention, *Mol. Nutr. Food Res.*, 675 51, 675 – 683.
195. ZAHMANOV G., K. ALIPIEVA, S. SIMOVA, & M.I. GEORGIEV, 2015, Metabolic differentiations of dwarf elder by NMR-based metabolomics, *Phytochemistry letters*, 11, 404e409.
196. ZAKAY-RONES Z., E. THOM, T. WOLLAN, & J. WADSTEIN, 2004, Randomized study of the efficacy and safety of oral elderberry extract in the treatment of influenza A and B virus infections,

Monitorizarea trasabilității unor compuși bioactivi de interes pe stadii de dezvoltare morfologică a fructelor de soc și evaluarea unui preparat fitoterapeutic cu efect nefroprotector
Journal of International Medical Research, 32(2), 132–140.

197. ZOU J.G., Z.R. WANG, Y.Z. HUANG, K.J. CAO, J.M. WU, 2003, Effect of red wine and wine polyphenol resveratrol on endothelial function in hypercholesterolemic rabbits, *Int J Mol Med, 11:317-320.*