

UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ ȘTIINȚE ALE NATURII
Consortiu: Universitatea Stat din Moldova, Institutul de Chimie

Cu titlu de manuscris
C.Z.U: 502.175:542.943'78:634.86(043)

VICOL CRINA

**INTERACȚIUNI ANTIOXIDANTE DINTRE UNII COMPUȘI FENOLICI ȘI ACIZI
ORGANICI DIN STRUGURI – CONTRIBUȚIE LA FORMAREA ECOVALEOLOGICĂ
A TINERILOR SPECIALIȘTI**

145.01 CHIMIE ECOLOGICĂ

Teză de doctorat în științe chimice

Conducător științific:

**Duca Gheorghe, dr. hab. în științe chimice,
prof. univ., acad.**

Autor:

Vicol Crina



CHIȘINĂU, 2024

© VICOL Crina, 2024

CUPRINS

ADNOTĂRI (în română, engleză, rusă).....	5
LISTA TABELELOR.....	8
LISTA FIGURILOR.....	9
LISTA ABREVIERILOR.....	13
INTRODUCERE.....	15
1. REPERE CONCEPTUALE ALE TEMEI DE CERCETARE.....	22
1.1. Antioxidanții și mecanismele de acțiunea ale acestora.....	22
1.2. Problema caracterului prooxidant al antioxidantilor.....	27
1.3. Interacțiuni antioxidante dintre compuși naturali.....	30
1.4. Antioxidanții fenolici și acizii organici din struguri.....	35
1.5. Valeologia – direcție științifică interdisciplinară ce răspunde provocărilor actuale.....	40
1.6. Sinteza Capitolului 1.....	46
2. MATERIALE ȘI METODE UTILIZATE ÎN STUDIUL INTERACȚIUNILOR ANTIOXIDANTE.....	48
2.1. Materii prime și metode de obținere a probelor de lucru.....	48
2.2. Metode de determinare a indicilor fizico-chimici de bază și specifici.....	50
2.3. Metode de determinare a activității antioxidante a extractelor din struguri și a amestecurilor de antioxidanți.....	53
2.4. Tehnica de laborator utilizată pentru efectuarea analizelor spectrofotometrice.....	58
2.5. Metode de calcul al interacțiunii antioxidante dintre compuși studiați.....	59
2.6. Metode didactice de integrare a conceptului de ecovaleologie în curriculumul disciplinei Chimie ecologică.....	61
2.7. Sinteza Capitolului 2.....	62
3. CARACTERIZAREA COMPOZIȚIEI CHIMICE A STRUGURILOR AUTOHTONI LA DIFERITE PERIOADE DE MATURARE.....	64
3.1. Indicii fizico-chimici de bază și specifici caracteristici strugurilor autohtoni.....	64
3.2. Activitatea antioxidantă a strugurilor studiați.....	69
3.3. Stabilirea concentrațiilor optime de compușilor fenolici și acizi organici pentru studiul interacțiunilor antioxidante.....	73
3.4. Sinteza Capitolului 3.....	77

4. INTERACȚIUNI ANTIOXIDANTE DINTRE COMPUȘII NATURALI DIN STRUGURI.....	79
4.1. Activitatea antioxidantă a compușilor fenolici în prezența acizilor organici – determinarea valorilor CE ₅₀	79
4.2. Interacțiuni antioxidante dintre compuși fenolici și acizi organici din struguri.....	83
4.3. Interacțiuni antioxidante dintre compușii fenolici din struguri și acidul dihidroxifumaric.....	89
4.4. Interacțiuni antioxidante dintre acidul ascorbic și alți compuși din struguri.....	93
4.4.1. <i>Interacțiuni antioxidante dintre acidul ascorbic și acizii tartric și citric.....</i>	93
4.4.2. <i>Interacțiuni antioxidante dintre acidul ascorbic și acidul dihidroxifumaric.....</i>	94
4.4.3. <i>Interacțiuni antioxidante dintre acidul ascorbic și resveratrol.....</i>	110
4.5. Activitatea antioxidantă a preparatului ENOXIL și interacțiunile antioxidante în amestec cu acidul ascorbic.....	115
4.6. Sinteza Capitolului 4.....	122
5. FORMAREA CONCEPTILOR ECOVALEOLOGICE LA DISCIPLINA CHIMIE ECOLOGICĂ.....	124
5.1. Relația dintre studiul interacțiunilor antioxidante și conceptul de valeologie.....	124
5.2. Formarea conceptelor ecovaleologice ale tinerilor – abordare sustenabilă în soluționarea problemelor ecologice.....	131
5.3. Integrarea conceptului de ecovaleologie în curriculumul disciplinei Chimie ecologică.....	136
5.4. Sinteza Capitolului 5.....	138
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI.....	140
BIBLIOGRAFIE.....	143
ANEXE.....	171
Anexa 1. Dreptele de calibrare utilizate pentru determinarea conținutului de compuși fenolici și a activității antioxidante.....	172
Anexa 2. Interacțiuni antioxidante dintre compușii fenolici și acizi organici din struguri....	173
Anexa 3. Act de implementare a activității științifice în practică.....	175
Anexa 4. Chestionarul la subiectul prelegerii „Chimia alimentară și asigurarea calității alimentelor. Antioxidanții”.....	176
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII.....	178
CV-UL AUTOAREI.....	179

ADNOTARE

Vicol Crina, „Interacțiuni antioxidante dintre unii compuși fenolici și acizi organici din struguri – contribuție la formarea ecovaleologică a tinerilor specialiști”, teză de doctor în științe chimice, Chișinău, 2024

Structura tezei. Teza este formată din introducere, cinci capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografia din 269 surse, 59 figuri, 8 tabele și 4 anexe, 128 pagini text de bază. Rezultatele obținute sunt publicate în 26 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: antioxidant, compuși fenolici, acizi organici, interacțiuni antioxidante, efect sinergic, efect antagonist, efect aditiv, struguri, ecovaleologie.

Domeniul de studiu: 145.01 Chimie Ecologică

Scopul și obiectivele tezei constau în determinarea (i) tipului de interacțiune antioxidantă dintre unii compuși fenolici și acizi organici din struguri și (ii) a dependenței efectelor antioxidante de concentrația și combinația substanțelor investigate; (iii) formularea unor concluzii privind consumul și utilizarea eficientă a antioxidantilor.

Noutatea și originalitatea științifică. În premieră au fost determinate tipurile de interacțiuni antioxidante dintre unii compuși fenolici și acizi organici naturali, fiind studiate combinațiile și concentrațiile similare celor din struguri. Au fost propuse mecanismele de interacțiune antioxidantă pentru amestecurile studiate: compus fenolic – acid organic, acid ascorbic – acid dihidroxifumaric, acid ascorbic – resveratrol. În premieră au fost aplicate metodele DPPH[•], ABTS^{•+} și PRFe pentru studierea activității antioxidante a soiurilor de struguri autohtoni de selecție nouă. Pentru prima dată, subiectului interacțiunilor antioxidante a fost abordat din perspectiva conceptului de ecovaleologie în scopul formulării concluziilor privind consumul și întrebunțarea eficientă a antioxidantilor.

Problema științifică soluționată rezidă în identificarea efectelor antioxidante existente între compușii fenolici și acizii organici din struguri, fapt care relevă avantajele consumului antioxidantilor din surse naturale sau în combinații și concentrații similare, și servește drept soluție pentru caracterul prooxidant al compușilor antioxidanți.

Semnificația teoretică. Rezultatele obținute îmbogățesc și completează studiile existente, de asemenea, permit formularea unor idei mai exacte referitoare la mecanismele și procesele redox în care pot fi implicate substanțele studiate – procese care au loc în struguri, vinuri, precum și în organismul uman odată ce compușii dați sunt consumați cu hrana. De asemenea, datele obținute argumentează importanța concentrației, a mediului de reacție și a consecutivității adăugării compușilor în reacție asupra activității antioxidante totale și tipului de interacțiune antioxidantă. Rezultatele investigației aduc un aport științific și didactic privind formarea ecovaleologică a tinerilor în instituțiile de învățământ superior.

Valoarea aplicativă se axează pe posibilitatea utilizării rezultatelor experimentale obținute pentru îmbunătățirea efectului antioxidant și a eficienței produselor farmaceutice, cosmetice și a procedurilor tehnologice existente. Totodată, rezultatele obținute pot fi ușor integrate în conținutul cursurilor didactice la disciplinele chimie, chimie ecologică, ecologie etc.

Implementarea rezultatelor științifice. Rezultatele obținute au fost integrate și prezentate, timp de patru ani consecutivi, în cadrul prelegerii „Chimia alimentară și asigurarea calității produselor. Antioxidanții” ce face parte din cursul de Chimie ecologică elaborat de acad. Gh. Duca la Universitatea de Stat din Moldova.

ANNOTATION

Vicol Crina, "Antioxidant interactions between some grape phenolic compounds and organic acids - contribution to the ecovaleological education of young experts", PhD thesis in chemical sciences, Chisinau, 2024

Thesis structure. The thesis consists of the introduction, five chapters, general conclusions and recommendations, the bibliography of 269 sources, 59 figures, 8 tables and 4 appendices, 128 pages of basic text. The results obtained are published in 26 scientific works.

Key words: antioxidant, phenolic compounds, organic acids, antioxidant interactions, synergistic effect, antagonistic effect, additive effect, grapes, ecovaleology.

Field of study: 145.01 Ecological Chemistry

The purpose and objectives of the thesis are to determine (i) the type of antioxidant interactions between some grape phenolic compounds and organic acids and (ii) the dependence of the antioxidant effects on the concentration and combination of the investigated substances; (iii) to formulate conclusions on consumption and effective use of antioxidants.

Scientific novelty and originality. For the first time, the types of antioxidant interactions between some natural phenolic compounds and organic acids have been determined, by studying the combinations and concentrations similar to those in grapes. Antioxidant interaction mechanisms were proposed for the studied mixtures: phenolic compound – organic acid, ascorbic acid – dihydroxyfumaric acid, ascorbic acid – resveratrol. For the first time, the DPPH[•], ABTS^{•+} and PRFe methods were applied to study the antioxidant activity of autochthonous grape varieties of new selection. A new perspective on the topic of antioxidant interactions was offered by addressing the subject from the view of the ecovaleology concept in order to formulate conclusions regarding the consumption and efficient use of antioxidants.

The **solved scientific problem** resides in the identification of the existing antioxidant effects between grape phenolic compounds and organic acids, a phenomenon that reveals the advantages of consumption of antioxidants from natural sources or in similar combinations and concentrations, and serves as a solution for the prooxidant character of antioxidant compounds.

Theoretical significance. The obtained results enrich and complement the existing studies, also allow the formulation of more accurate ideas regarding the redox mechanisms and processes in which the studied substances can be involved - processes that take place in grapes, wines, as well as in the human body once the given compounds are consumed with food. Also, the obtained data argue the importance of the concentration, reaction environment and consecutiveness of compounds addition in the reaction on the total antioxidant activity and the type of antioxidant interaction. The results of the investigation bring a scientific and didactic contribution regarding the ecovaleological training of young people in higher education institutions.

The **applicative value** relies on the possibility of using the conclusions developed based on the obtained results to improve the antioxidant effect and the efficiency of pharmaceutical, cosmetic products and the existing technological processes. At the same time, the obtained results can be easily integrated into didactic courses of chemistry, ecological chemistry, ecology disciplines.

Implementation of scientific results. The obtained results were integrated and presented, four consecutive years, within the lecture "Food chemistry and product quality assurance. Antioxidants" which is part of the Ecological Chemistry course taught by acad. Gh. Duca at the State University of Moldova.

АННОТАЦИЯ

Викол Крина, «Антиоксидантные взаимодействия между некоторыми фенольными соединениями винограда и органическими кислотами – вклад в эковалеологическое образование молодых специалистов», диссертация по на соискание ученой степени доктора химических наук, Кишинев, 2024 г.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, пяти глав, общих выводов и рекомендаций, библиографии из 269 источников, 59 рисунков, 8 таблиц и 4 приложений, 128 страниц основного текста. Полученные результаты опубликованы в 26 научных работах.

Ключевые слова: антиоксидант, фенольные соединения, органические кислоты, антиоксидантные взаимодействия, синергетический эффект, антагонистический эффект, аддитивный эффект, виноград, эковалеология.

Область исследования: 145.01 Экологическая химия

Цель и задачи диссертационной работы заключаются в определении: (i) типа антиоксидантных взаимодействий между некоторыми фенольными соединениями и органическими кислотами в винограде и (ii) зависимости антиоксидантного действия от концентрации и сочетания исследуемых веществ; (iii) формулирование выводов относительно потребления и эффективного использования антиоксидантов.

Научная новизна и оригинальность. Впервые были определены типы антиоксидантных взаимодействий между некоторыми фенольными соединениями и природными органическими кислотами, исследуемыми в сочетаниях и концентрациях, аналогичных таковым в винограде. Предложены механизмы антиоксидантного взаимодействия исследуемых смесей фенольных соединений и органических кислот. Впервые методы DPPH[•], ABTS^{•+} и PRFe были применены для изучения антиоксидантной активности автохтонных сортов винограда новой селекции. Впервые была рассмотрена тема антиоксидантных взаимодействий с позиций эковалеологической концепции с целью формулирования выводов об потреблении и эффективном использовании антиоксидантов.

Решенная научная проблема заключается в выявлении существующих антиоксидантных эффектов между фенольными соединениями и органическими кислотами из винограда, что раскрывает преимущества потребления антиоксидантов из природных источников или в аналогичных комбинациях и концентрациях и служит решением проблемы прооксидантного характера антиоксидантных соединений.

Теоретическое значение: Полученные результаты обогащают и дополняют существующие исследования, а также позволяют сформулировать более точные представления относительно окислительно-восстановительных механизмов и процессов, в которых могут участвовать изучаемые вещества. Результаты исследования вносят научный и дидактический вклад в эковалеологическую подготовку молодых специалистов.

Прикладное значение ориентировано на возможность использования результатов диссертации для повышения антиоксидантного действия и эффективности фармацевтических, косметических, а также существующих технологических процессов. Полученные результаты можно легко интегрировать в содержание дидактических курсов по дисциплинам химия, экологическая химия, экология и т.д.

Внедрение научных результатов: Полученные результаты были интегрированы и представлены на лекции „Химия пищевых продуктов и безопасность пищевых продуктов; Антиоксиданты” в рамках курса Экологическая химия, читаемого акад. Г. Дука в Государственном Университете Молдовы.

LISTA TABELELOR

Nr.	Titlul tabelului	Pag.
1.1	Structura chimică și activitatea antioxidantă a unor compușilor fenolici și acizilor organici din struguri.....	38
3.1	Indicii fizico-chimici de bază determinați în soiurile de struguri Riton, Viorica, Feteasca Neagră și Copceac la diferite etape de maturare. Analize efectuate în sucul de struguri storși.....	65
3.2	Concentrația compușilor fenolici și acizilor organici în struguri conform datelor din literatura de specialitate și celor obținute experimental.....	74
3.3	Raporturile de concentrație ale compușilor fenolici și acizilor organici din struguri conform datelor raportate în literatura de specialitate și datelor experimentale. Raporturile de concentrație utilizate în experimentele de determinare a interacțiunilor antioxidante.....	76
4.1	Valorile CE_{50} pentru compușii antioxidanți individuali și pentru combinațiile acestora cu acizii organici.....	82
4.2	Valorile pH-ului pentru fiecare concentrație de acid organic (AT, AC și DHF) utilizată în experimente. Solventul utilizat este EtOH.....	83
4.3	Constantele de viteză observate pentru DHF și AA în reacție cu DPPH' determinate în 98% etanol și matricea de vin.....	98
4.4	Constantele de viteză observate determinate în 98% etanol și matricea de vin pentru reacția dintre DPPH' și amestecurile DHF – AA utilizate în diferite concentrații.....	100

LISTA FIGURILOR

Nr.	Titlul figurii	Pag.
1.1	Schema interacțiunii β -carotenului și radicalului peroxil prin intermediul mecanismului RAF.....	24
1.2	Schema mecanismului de acțiune a vitaminei C în reacție cu radicalii peroxil.....	25
1.3	Schema reacției de chelare a ionului de Cu(II) de către cianidină.....	26
1.4	Tipurile de interacțiuni antioxidante și definirea acestora.....	31
1.5	Clasificarea compușilor fenolici.....	36
1.6	Numerotarea nucleului flavanoid.....	37
1.7	Interconexiunea valeologiei cu alte științe.....	42
1.8	Estimarea globală a deceselor atribuibile poluării (milioane) în funcție de tipul de poluare, 2019.....	45
2.1	Soiurile de struguri analizate: A) Viorica, B) Riton, C) Feteasca Neagră și D) Copceac.....	49
2.2	Schema de obținere a extractelor din struguri și a probelor de lucru.....	49
2.3	Schema reacție reactivului DMACA cu flavanolul epicatechina.....	52
2.4	Spectrul de absorbție a DPPH* în (a) EtOH, (b) în matricea de vin și (c) spectrul DPPH-H în matricea de vin.....	55
2.5	Schema reacției de anihilare a radicalului canion ABTS.....	57
3.1	Conținutul de acizi organici – AO, AT, AM, AC, determinat în strugurii verzi, la pârgă și coți din soiurile Riton, Viorica, Feteasca Neagră și Copceac.....	66
3.2	Conținutul total de compuși fenolici determinat în struguri verzi, la pârgă și în strugurii coți din soiurile Riton, Viorica, Feteasca Neagră și Copceac.....	67
3.3	Conținutul de proantocianidine determinat în struguri verzi, la pârgă și în strugurii coți din soiurile Riton, Viorica, Feteasca Neagră și Copceac.....	68
3.4	Conținutul de antociani determinat în struguri la pârgă și în strugurii coți din soiurile Feteasca Neagră și Copceac.....	69
3.5	Activitatea antioxidantă a strugurilor verzi, la pârgă și strugurilor coți din soiurile Riton, Viorica, Feteasca Neagră și Copceac determinată prin metoda DPPH*.....	70
3.6	Activitatea antioxidantă a strugurilor verzi, la pârgă și strugurilor coți din soiurile Riton, Viorica, Feteasca Neagră și Copceac determinată prin metoda ABTS*+	71

3.7	Activitatea antioxidantă a strugurilor verzi, la pârgă și strugurilor copti din soiurile Riton, Viorica, Feteasca Neagră și Copceac determinată prin metoda PRFe.....	72
3.8	Dependența activității antioxidante de conținutul în dinamică a compușilor fenolici și non-fenolici din struguri la diferite perioade de maturare.....	73
4.1	Interacțiunile antioxidante dintre compușii fenolici (Cat, AG, Que, Rut, Res) în combinație cu diferite concentrații de AT (A, B, C, D, E) sau AC (F, G, H, I, J).....	85
4.2	Schema generală a mecanismului reacției de anihilare a DPPH [*] de către Rut în prezența acizilor organici și oligomerizarea compusului fenolic.....	88
4.3	Ilustrarea dependenței mecanismului de acțiune a antioxidantului de prezența acizilor organici AT sau AC și ionizarea moleculei.....	89
4.4	Interacțiunile antioxidante dintre compușii fenolici și diferite concentrații de DHF	91
4.5	Interacțiunile antioxidante dintre acidul ascorbic (AA) și acizii A tartric (AT) și B citric (AC).....	95
4.6	Mecanismul HAT de anihilare a DPPH [*] de către AA în prezența acizilor organici AT sau AC.....	95
4.7	Ilustrarea interacțiunii DPPH [*] cu diferite concentrații de DHF și AA în (A, B) 98% EtOH și în (C, D) matricea de vin.....	97
4.8	Scăderea absorbanței după interacțiunea DPPH [*] cu amestecul de DHF (0.18 mM) – AA (0.18 mM) în (A) 98% EtOH și (D) matricea de vin. Spectrele de absorbție pentru reacția dintre DPPH [*] și amestecul DHF – AA la 0.001s și 2s în (B) 98% EtOH și (E) matricea de vin. Fitarea modelul cinetic A→B la 529 nm modelul (C) și (F).....	99
4.9	Reprezentarea grafică a dependenței %DPPH [*] remanent de raportul molar AH/DPPH [*] pentru reacția AA - DPPH [*] (A) și DHF - DPPH [*] (B). Date obținute la spectroscopia UV-Viz.....	101
4.10	Interacțiunile antioxidante dintre acidul ascorbic și acidul dihidroxifumaric.....	101
4.11	Spectrul RES pentru interacțiunea dintre AA și sistemul Fenton.....	102
4.12	Spectrul RES pentru 127 μM DPPH [*] , 65 μM AA și 65 μM DHF.....	103
4.13	Reprezentarea grafică a dependenței %DPPH [*] remanent de raportul molar AH/DPPH [*] pentru reacția AA - DPPH [*] (A) și DHF - DPPH [*] (B). Date obținute la spectroscopia RES.....	103

4.14	Reprezentarea %Inhibiției DPPH [*] determinată experimental și calculată teoretic (axa stângă); reprezentarea tipului de interacțiune antioxidantă pentru fiecare raport mM DHF/mM AA (axa dreaptă).....	104
4.15	Ilustrarea dependenței procentului de inhibiție a DPPH [*] de concentrația totală de antioxidanți (DHF+AA, μM) combinați în raport mM DHF/mM AA = 1.7; Inset: fitarea reacției dintre amestecul AA – DHF și DPPH [*] după modelul exponențial....	105
4.16	Spectrele ¹³ C RMN ale AA (A), ADA (B), DHF (C) și DPPH-H (D) în metanol- <i>d</i> ₄ /acetonă- <i>d</i> ₆ , regiunea 60-185 ppm.....	106
4.17	Spectrele ¹³ C RMN ale DHF și reacțiile studiate <i>in situ</i> în metanol- <i>d</i> ₄ /acetonă- <i>d</i> ₆ , regiunea 120-175 ppm.....	107
4.18	Schema oxidării DHF până la acidul dioxosuccinic urmată de hidratarea moleculei.....	107
4.19	Spectrele ¹³ C RMN ale DHF și reacțiile studiate <i>in situ</i> în metanol- <i>d</i> ₄ /cloroform- <i>d</i> ₁ , regiunea 120-175 ppm.....	108
4.20	Spectrele ¹³ C RMN ale DHF și ale reacțiilor studiate <i>in situ</i> în metanol- <i>d</i> ₄ /acetonă- <i>d</i> ₆ (A, B, C and E) și metanol- <i>d</i> ₄ /cloroform- <i>d</i> ₁ (D and F).....	109
4.21	Structura propusă pentru polimerul acetonei.....	109
4.22	Schemele generale ale mecanismelor de acțiune antioxidantă a amestecurilor AA – DHF în metanol- <i>d</i> ₄ /acetonă- <i>d</i> ₆ (A) și metanol- <i>d</i> ₄ /cloroform- <i>d</i> ₁ (B).....	110
4.23	Reprezentarea grafică a %It, %Ie și a IA pentru abordarea I (Res+AA+DPPH [*]), II (Res+DPPH [*] +AA) și III (AA+DPPH [*] +Res)	112
4.24	Reprezentarea grafică a interacțiunilor antioxidante ale diferitor raporturi molare Res/AA. Valorile mai mari de 1.05 (mai sus de linia întreruptă), inclusiv, sunt caracteristice IA sinergice.....	113
4.25	Spectrele ¹³ C RMN pentru: A) reacția Res – DPPH [*] , raport molar 1:1, t.c., 1 oră., în acetonă- <i>d</i> ₆ ; B) Res în acetonă- <i>d</i> ₆ ; C) AA în metanol- <i>d</i> ₄ ; D) ADA în metanol- <i>d</i> ₄	114
4.26	Spectrele ¹³ C RMN pentru AA : Res : DPPH [*] în raport molar 1:1:2.6 molar urmând I-a abordare (A) și a II-a abordare (B).....	115
4.27	Reprezentarea diferitor produși de reacție și a diferitor tipuri de efecte antioxidante generați(te) în urma abordărilor I și II.....	116

4.28	Reprezentarea activității antioxidante a preparatului ENOXIL dizolvat în apă și în STF în comparație cu activitatea antioxidantă a catechinei, quercetinei, acidului galic și resveratrolului în reacția cu DPPH*.....	117
4.29	Activitatea antioxidantă a preparatului ENOXIL în apă și în STF exprimată în g EAA/L în reacția cu 0.03 g/L DPPH*.....	117
4.30	Reprezentarea CE ₅₀ pentru probele de ENOXIL în apă, în STF și pentru Res în reacția cu ABTS* ⁺	118
4.31	Activitatea antioxidantă a ENOXIL-ului în apă și în STF determinată prin metoda ABTS* ⁺ și exprimată în g ETrolox/L.....	119
4.32	Rezultatele testului Folin-Ciocalteu de determinare a activității antioxidante a preparatului ENOXIL în apă și în STF exprimate în mg EAG/L.....	119
4.33	Activitatea prooxidantă a ENOXIL-ului în apă și în STF exprimată în g EAA/L....	120
4.34	Schemele generale ale mecanismelor HAT (A) și SPLET (B) prin care poate acționa preparatul ENOXIL în reacția de anihilare a DPPH*.....	120
4.35	Activitatea antioxidantă a combinațiilor ENOXIL – AA (0.0002N) în apă: abordarea I (ENOXIL-AA-DPPH*) și abordarea II (ENOXIL-DPPH*-AA); activitatea antioxidantă a AA și a preparatului ENOXIL testați individual prin metoda DPPH*.....	121
4.36	Activitatea antioxidantă a combinațiilor ENOXIL – AA (0.0002N) în apă: abordarea I (ENOXIL-AA-DPPH*), abordarea II (ENOXIL-DPPH*-AA) și abordarea III (AA-DPPH*-ENOXIL).....	122
5.1	Ilustrarea schematică a relației dintre ecovaleologie și studiul interacțiunilor antioxidante.....	131
5.2	Dinamica evoluției, în %, a cunoștințelor despre antioxidanți ale studenților prezenți la prelegere. Reprezentarea răspunsurilor oferite de studenți prin completarea chestionarului înainte și după audierea prelegerii. Numerele 1 – 18 reprezintă numărul întrebării.....	135

LISTA ABREVIERILOR

AA	acid ascorbic	FRAP	analiza puterii antioxidante de reducere a ferului
ABTS⁺	2,2'-azino-bis-(3- etilbenzotiazolin-6- sulfonic/forma radicalică	F⁺	cationului de flavilium
AC	acid citric	FIC	concentrație inhibitorie fracționată
ADA	acid dehidroascorbic	GOST	standard tehnic internațional
ADN	acidul dezoxiribonucleic	HAT	transferul atomului de hidrogen
AG	acid galic	HMBC	corelație de legături multiple heteronucleare
AH	antioxidant	HSQC	coerență cuantică unică heteronucleară
AM	acid malic	IA	interacțiune antioxidantă
AO	acid oxalic	k_{obs}	constanta observată
ARN	acidul ribonucleic	MeOH	metanol
AT	acid tartric	min	minute
BHT	hidroxitoluen butilat	min.	minim
Cat	catehină	nd	nu a fost determinat
CE₅₀	concentrație eficientă	ORAC	capacitatea de absorbție a radicalilor de oxigen
d	solvent deuterat	PCET	cuplarea protonului, transferul electronului
DFT	teoria funcțională a densității	pic.	picătură
DHF	acid dihidroxifumaric	PPT	power point
DMACA	4- dimetilaminocinamaldehydă	PRFe	puterea de reducere a Fe(III)
DPPH[•]	2,2-difenil-1-picrilhidrazil/ forma radicalică	Que	quercetină
DPPH-H	2,2-difenil-1-picrilhidrazil în forma redusă	RAF	formarea aducțiilor radicalici
EAA	echivalenți de acid ascorbic	RES	rezonanța electronică de spin
EAG	echivalenți de acid galic	Res	resveratrol
ECat	echivalenți de catehină	RMN	rezonanța magnetică nucleară
ech.	echivalenți	rpm	rotații per minut
EMalv	echivalenți de malvidină	Rut	rutină
EtOH	etanol	R[•]	specie radicalică
ETrolox	echivalenți de Trolox	SEPT	transferul secvențial al electronului și protonului
ET-PT	transfer de electroni – transfer de protoni		

SET	transferul electronului	TCF	conținutul total de compuși fenolici
SPLET	pierderea secvențială a protonului, transferul electronului	TMC	chelarea metalelor de tranziție
SPLHAT	pierderea secvențială a protonului, transferul atomului de hidrogen	Trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-acid carboxilic
STF	soluție tampon fosfat	UV	ultraviolet
SUA	Statele Unite ale Americii	UV-Viz	ultraviolet-vizibil
t.c.	temperatura camerei	δ	deplasare chimică
		%Inhibiție	procentul de inhibiție

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța temei abordate

Legătura dintre consumul de antioxidanți și starea de sănătate a oamenilor este intens abordată și cercetată în ultimii ani, atât în domeniul medical, medicinal, farmaceutic, al nutriției, cât și în sfera științifică și educațională. Datele demonstrează că datorită diversității și complexității structurale și a mecanismelor de acțiune, antioxidanții au capacitatea de a anihila speciile reactive [1, 2], care sunt produse în mod firesc și permanent în orice sistem natural, inclusiv în organismul uman. În condițiile expunerii zilnice la factorii de risc generatori de radicali liberi precum poluarea abundentă a aerului, apei, solului, stresul etc., aportul zilnic de compuși antioxidanți este necesar pentru echilibrarea balanței reacțiilor redox din organism, în conformitate cu necesitățile și condițiile ecologice de abitare, oportune unei vieți sănătoase [3, 4]. Consumul produselor alimentare, în special al celor de origine vegetală, este principala sursă de antioxidanți, alături de consumul de suplimente alimentare tot mai mult simpatizat de populație.

Principala diferență dintre antioxidanții din sursele naturale și cei din suplimentele alimentare constă, pe de o parte, în concentrațiile compușilor dați, care variază de la o sursă la alta, și, pe de altă parte, în faptul că, în natură, antioxidanții se află în combinație cu alți compuși antioxidanți sau non-antioxidanți – circumstanță care influențează semnificativ activitatea antioxidantă totală, prin generarea efectelor antioxidante sinergice, aditive sau antagoniste [5]. Contrar faptului dat, antioxidanții aplicați individual și în concentrații mari, comparativ cu conținutul lor în natură, pot manifesta caracter prooxidant în anumite condiții de presiune, pH, solvent, în prezența metalelor grele [6] etc. Prin urmare, eficiența antioxidanților este puternic afectată atât de condițiile de reacție, cât și de concentrația și combinația compușilor dați, studiile indicând asupra unei capacități antioxidante sporite a extractelor, sucurilor, a amestecurilor similare celor din sistemele naturale [7–10].

Strugurii reprezintă niște sisteme complexe care cuprind un număr impunător de compuși organici și anorganici, o mare parte dintre aceștia posedând activitate antioxidantă. Până în prezent, vitaminele și compușii fenolici din struguri au fost subiectul de studiu a sute de mii de cercetări științifice care au demonstrat și accentuat puterea antioxidantă a acestora, precum și importanța și beneficiul consumului compușilor fenolici și a vitaminelor pentru menținerea sănătății [11, 12]. Deși interesul științific rămâne concentrat asupra compușilor cu proprietăți antioxidante sporite, de exemplu: acidul ascorbic, acidul dihidroxifumaric, catehina, quercetina, rutina, acidul galic, resveratrolul [11] etc., prezența și efectul compușilor non-antioxidanți, precum acizii tartric, citric,

malic etc., se dovedește a fi semnificativă pentru activitatea antioxidantă totală a amestecurilor [10, 13]. Studiile recente indică asupra măririi eficienței compușilor antioxidanți generată de prezența substraturilor non-antioxidante precum acizi organici [10, 13, 14], zaharuri [7] etc. Impactul lor asupra reactivității antioxidantilor este justificat și de concentrațiile mari la care se găsesc în fructe și legume, comparativ cu conținutul relativ mic al compușilor antioxidanți [15]. Totodată, literatura de specialitate sugerează faptul că combinarea compușilor în concentrații similare celor din sursele naturale poate fi o soluție pentru problema caracterului prooxidant [6, 15–17] și pentru riscul iminent asupra organismului.

Ecovaleologia, în calitate de direcție științifică care studiază influența factorilor naturali și a consecințelor schimbărilor antropice survenite în natură asupra sănătății umane, precum și definește natura comportamentului uman în diferite condiții de mediu cu scopul menținerii sănătății [18, 19], prin definiție se dovedește a fi disciplina care se angajează să studieze impactul antioxidantilor și a efectului concentrației și combinației acestora, riscul caracterului prooxidant, avantajele/dezavantajele consumului suplimentelor alimentare, beneficiul aportului zilnic de antioxidanți naturali asupra stării de sănătate a indivizilor. Similitudinile considerabile dintre conceptele de valeologie, ecologie, chimie ecologică și sustenabilitate oferă actualitate acestei direcții științifice și subiectului ecovaleologic discutat în lucrarea dată, de asemenea, argumentează importanța educării tinerilor generații în conformitate cu principiile valeologice. Astfel, actuala teză tratează subiectul interacțiunilor antioxidante dintre anumiți compuși antioxidanți și non-antioxidanți din struguri ca un aspect al formării concepțiilor ecovaleologice la tineri și viitorii specialiști din domeniile tangențiale chimiei.

Problema științifică soluționată rezidă în identificarea efectelor antioxidante existente între compușii fenolici și acizii organici din struguri, fapt care relevă avantajele consumului antioxidantilor din surse naturale sau în combinații și concentrații similare, ceea ce servește drept soluție caracterului prooxidant al compușilor antioxidanți, concluziile formulate având potențial aplicativ în sfera educațională, ecologică, medicinală, farmaceutică, industrială etc.

Scopul tezei este determinarea tipurii interacțiunilor antioxidante dintre unii compuși fenolici și acizi organici din struguri și a dependenței efectelor antioxidante de concentrația și combinația substanțelor investigate, succedată de formularea unor concluzii privind consumul și utilizarea eficientă a antioxidantilor.

Obiectivele caracteristice scopului lucrării sunt:

- studiul teoretic al mecanismelor de acțiune antioxidantă a compușilor naturali, al problemei caracterului prooxidant, al tipurilor de interacțiune antioxidantă între compușii naturali, activității antioxidante a compușilor fenolici și non-fenolici din struguri și studiul ecovaleologiei ca direcție științifică;
- studiul compoziției chimice și a activității antioxidante a strugurilor autohtoni la diferite perioade de maturare și utilizarea datelor experimentale și bibliografice pentru determinarea concentrațiilor de antioxidanți – acidul ascorbic, acidul galic, catehina, quercetina, rutina, resveratrol, și de compuși non-antioxidanți – acidul tartric, acidul citric, potrivite pentru determinarea tipurilor de interacțiune antioxidantă;
- investigarea interacțiunilor antioxidante dintre acizii tartric, citric sau dihidroxifumaric în combinație cu compușii fenolici (acidul galic, catehina, quercetina, rutina, resveratrol) sau cu acidul ascorbic; investigarea interacțiunilor antioxidante în amestecurile acid ascorbic – resveratrol, acid ascorbic – ENOXIL și studiul influenței concentrației, a mediului de reacție, a ordinii adăugării compușilor în reacție asupra tipului și mecanismelor de interacțiune antioxidantă;
- abordarea studiului interacțiunilor antioxidante prin prisma ecovaleologiei și integrarea rezultatelor obținute în cursul de Chimie ecologică din cadrul Universității de Stat din Moldova, pentru formarea concepțiilor ecovaleologice ale studenților; formularea și diseminarea concluziilor privind consumul rațional și echilibrat al antioxidanților, și utilizarea eficientă a compușilor dați;

Metodologia și metodele de cercetare. Pentru atingerea scopului și obiectivelor propuse au fost aplicate metode generale de cercetare (logică, analiză, sistematică), metode analitice și fizico-chimice. Au fost utilizate testele de determinare a activității antioxidante descrise în literatura de specialitate – DPPH[•] [20], ABTS^{•+} [21], PRFe [22]; testele utilizate pentru identificarea claselor de compuși naturali în struguri – Folin-Ciocalteu [23], DMACA [24], metoda pH diferențială [25]; metodele clasice de determinare a parametrilor fizico-chimici de bază ai probelor de struguri investigate. Privind tehnica de laborator, au fost utilizate metode fizico-chimice moderne de analiză precum spectroscopia UV-Viz (Institutul de Chimie al Universității de Stat din Moldova, Chișinău, Republica Moldova), spectroscopia Stopped-Flow (Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, România), spectroscopia RES (Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni", Iași, România), spectroscopia RMN (Institutul de Chimie al Universității de Stat din

Moldova, Chișinău, Republica Moldova), electroforeza capilară (IP Institutul Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare, Chișinău, Republica Moldova).

Pentru integrarea conceptului de ecovaleologie în conținutul prelegerii din cadrul cursului de Chimie ecologică, au fost utilizate metode de comunicare orală expositive (prelegerea, explicația, demonstrația logică) și conversative (discuția liberă, problematizarea), metode de explorare mijlocită (analiza rezultatelor experimentale, analiza comparativă), metode bazate pe acțiune reală (analiza studiilor de caz).

Noutatea și originalitatea științifică. Pentru prima dată au fost determinate tipurile de interacțiuni antioxidante dintre compușii fenolici – acidul galic, catehina, quercetina, rutina, resveratrol, și acizii organici naturali – tartric, citric, ascorbic, dihidroxifumaric, în combinații și concentrații similare celor din struguri. A fost stabilită influența condițiilor de reacție – concentrație, mediu de reacție, ordinea adăugării compușilor în reacție, asupra tipului de interacțiune antioxidantă. A fost propus mecanismul de acțiune sinergică dintre acizii ascorbic și dihidroxifumaric, și dintre resveratrol și acidul ascorbic; de asemenea, au fost sugerate mecanismele de interacțiune antioxidantă dintre compușii fenolici și acizii organici din struguri. În premieră au fost aplicate metodele DPPH[•], ABTS^{•+} și PRFe pentru studierea activității antioxidante a soiurilor de struguri autohtoni de selecție nouă. Pentru prima dată subiectului interacțiunilor antioxidante a fost tratat din perspectiva conceptului de ecovaleologie.

Ipoteza de cercetare. Utilizarea sau consumul antioxidanților în combinațiile și concentrațiile la care aceștia se găsesc în natură este avantajoasă și benefică datorită efectelor sinergice, aditive sau antagoniste care apar între compușii din sistemele multicomponente. Totodată, combinarea antioxidanților reprezintă o soluție pentru caracterul prooxidant al antioxidanților, care se manifestă odată ce compușii sunt aplicați individual în concentrații mari. Valorificarea ideii expuse este în concordanță cu principiile chimiei ecologice și ecovaleologiei, prin urmare, familiarizarea studenților cu conceptului dat și cu rezultatele experimentale obținute este o parte importantă a dezvoltării aptitudinilor ecologice și sustenabile ale tinerilor.

Importanța teoretică. Rezultatele obținute îmbogățesc și completează studiile existente, permit formularea unor idei mai exacte referitoare la mecanismele și procesele redox în care pot fi implicate substanțele studiate – procese care au loc în struguri, vinuri, precum și în organismul uman odată ce compușii dați sunt consumați cu hrana. De asemenea, datele obținute argumentează importanța concentrației, a mediului de reacție și a consecutivității adăugării compușilor în reacție

asupra activității antioxidante totale și tipului de interacțiune antioxidantă. Rezultatele investigației aduc un aport științific și didactic privind formarea concepțiilor ecovaleologice ale tinerilor din instituțiile de învățământ superior.

Valoarea aplicativă a lucrării se axează pe posibilitatea utilizării rezultatelor experimentale obținute pentru îmbunătățirea efectului antioxidant și a eficienței produselor farmaceutice, cosmetice și a procedeeelor tehnologice existente. Totodată, rezultatele obținute pot fi ușor integrate în curriculumul disciplinelor din învățământul superior.

Implementarea rezultatelor științifice. Rezultatele obținute au fost integrate în conținutul prelegerii „Chimia alimentară și asigurarea calității alimentelor. Antioxidanții” ce face parte din cursul de Chimie ecologică elaborat de acad. Gh. Duca la Universitatea de Stat din Moldova, și au fost prezentate studenților timp de patru ani consecutivi,.

Publicații la tema tezei. Rezultatele cercetărilor la tema tezei sunt reflectate în 26 de lucrări științifice: 3 capitole de carte publicate în monografiile naționale și internaționale; 2 articole în reviste internaționale cu factor de impact; 1 articol în revistă națională de categoria A; 2 articole în reviste naționale de categoria B; 18 participări la evenimente științifice naționale și internaționale precum conferințe, simpozioane, saloane de inventică, școli de vară la tematica chimiei ecologice/chimiei verzi.

Sumarul capitolelor tezei. Materialul tezei este expus pe 128 pagini text de bază, ce include 59 de figuri și 8 tabele. Lucrarea este structurată în 5 capitole principale, unul cuprinzând noțiunile teoretice ale cercetării, celelalte 4 capitole de bază prezintă contribuția proprie a autoarei ce cuprinde rezultatele obținute experimental, discuții și argumentări teoretice, concluzii generale și recomandări.

Sumarul capitolelor tezei

Capitolul 1. Repere conceptuale ale temei de cercetare conține noțiuni introductive privind antioxidanții, descrierea mecanismelor de acțiune a acestora și oferă exemple concrete de reacții redox cu participarea compușilor antioxidanți. Este explicată problema și riscurile caracterului prooxidant al antioxidanților și descrise circumstanțele în care compușii bio-activi manifestă efectul dat. Drept soluție pentru caracterul prooxidant este sugerată combinarea compușilor naturali în concentrații similare celor din fructe și legume, fapt care rezultă cu generarea efectelor sinergice, aditive sau antagoniste. De asemenea, sunt prezentați principalii compuși antioxidanți din struguri, clasificările acestora și sunt descrise caracteristicile structurale ale compușilor naturali ce determină activitatea antioxidantă. Este oferită o introducere în subiectul

valeologiei și ecovaleologiei, și este evidențiată importanței studiilor date în contextul situației ecologice actuale.

În Capitolul 2. Materiale și metode utilizate în studiul interacțiunilor antioxidante este expusă metodologia de cercetare pentru realizarea scopului și obiectivelor propuse, care se concentrează asupra (i) analizei conținutului strugurilor autohtoni, ce presupune determinarea indicilor fizico-chimici de bază, a conținutului de acizi organici, de compuși fenolici, proantocianidine și antociani în probele de struguri; (ii) asupra metodelor de determinare a activității antioxidante a probelor de struguri, a compușilor individuali și a amestecurilor destinate studierii interacțiunilor antioxidante; și (iii) asupra metodelor didactice aplicate pentru familiarizarea studenților cu conceptul de ecovaleologie. De asemenea, sunt enumerate și descrise tehnicile de laborator utilizate pentru obținerea datelor experimentale, precum și metodele de calcul și de determinare a tipului de interacțiune antioxidantă.

În Capitolul 3. Caracterizarea compoziției chimice a strugurilor autohtoni la diferite perioade de maturare sunt prezentate rezultatele privind compoziția chimică la diferite perioade de maturare a patru soiuri de struguri autohtoni, albi și roșii – Riton, Viorica (soiuri de selecție nouă), Copceac și Feteasca Neagră. Sunt prezentate datele privind indicii fizico-chimici de bază (aciditate titrabilă, conținutul de zaharuri, pH, potențial redox, conținutul de acizi organici majoritari) și indicii fizico-chimici specifici (conținutul total de compuși fenolici, proantocianidine și antociani), aceste rezultate fiind comparate cu cele din literatura de specialitate. De asemenea, este expusă și argumentată activitatea antioxidantă a probelor de struguri, determinată prin multiple teste de determinare a activității antioxidante (DPPH[•], ABTS^{•+} și PRFe). Rezultatele obținute sunt prezentate prin compararea probelor în dependență de soi și de perioada de coacere, datele indicând asupra unei evoluții firești a indicilor fizico-chimici și asupra unei activități antioxidante sporite a strugurilor. În Capitolul 3 este expusă sinteza datelor cunoscute în literatura de specialitate și a celor experimentale privind conținutul de compuși antioxidanți și non-antioxidanți din struguri de interes pentru studiul dat, precum și raporturile de concentrații în care aceștia se găsesc în natură și sunt cercetați în cadrul acestei lucrări pentru determinarea interacțiunilor antioxidante.

Capitolul 4. Interacțiuni antioxidante dintre compușii naturali din struguri conține rezultatele experimentale privind interacțiunile antioxidante dintre acizii organici tartric sau citric și compușii fenolici – acidul galic, catehina, quercetina, rutina, resveratrol; interacțiunile antioxidante dintre acidul dihidroxifumaric și compușii fenolici studiați; efectele antioxidante

dintre amestecurile acid ascorbic – acid dihidroxifumaric, acid ascorbic – resveratrol, acid ascorbic – ENOXIL. Sunt prezentate și interpretate datele experimentale obținute prin diferite metode spectrale și este stabilită corelația dintre aceste rezultate pentru formarea unor concluzii privind tipul și modul de interacțiune dintre antioxidanți. Sunt discutate și ipotezate mecanismele de interacțiune antioxidantă dintre compușii studiați. Este investigată influența concentrației, a mediului de reacție și a ordinii adăugării compușilor în reacție asupra interacțiunilor antioxidante.

În Capitolul 5. Formarea concepțiilor ecovaleologice la disciplina Chimie ecologică este formulată și argumentată legătura dintre studiul interacțiunilor antioxidante și conceptul de valeologie, făcându-se apel la importanța și riscul consumului antioxidanților pentru sănătatea umană. De asemenea, formarea concepțiilor ecovaleologice este tratată drept o metodă sustenabilă și fezabilă de educare și instruire a tinerilor. În baza metodelor didactice utilizate, a fost stabilit impactul pozitiv al integrării conceptului de ecovaleologie în conținutul cursului de Chimie ecologică asupra tinerilor, în special asupra conștientizării avantajelor și riscurilor consumului antioxidanților.

Cercetările la subiectul dat au fost realizate prioritar în cadrul Laboratorului de Chimie Fizică și Cuantică din cadrul Institutului de Chimie al Universității de Stat din Moldova, precum și în urma colaborărilor cu I.P. Institutul Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare, Chișinău, Republica Moldova, Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, România, Institutul de Chimie Macromoleculara "Petru Poni", Iași, România.

1. REPERE CONCEPTUALE ALE TEMEI DE CERCETARE

În capitolul dat sunt definiți antioxidanții și este argumentată importanța lor pentru protecția substratului oxidabil. Mecanismele de acțiune și interacțiune antioxidantă a compușilor reducători sunt argumentate și exemplificate detaliat. Este descrisă problema caracterului prooxidant al antioxidanților și dezavantajele manifestării fenomenul dat, de asemenea, sunt expuse soluțiile relevante pentru eliminarea efectului prooxidant. Este descrisă abundența antioxidanților polifenolici în struguri și caracteristicile structurale care determină activitatea lor reducătoare, de asemenea, este accentuată importanța compușilor non-antioxidanți ca zaharurile și acizii organici în raport cu activitatea antioxidantă a compușilor reducători.

1.1. Antioxidanții și mecanismele de acțiunea ale acestora

Halliwell B. și Gutteridge J. M. C. au definit în 1995 antioxidanții ca fiind orice substanță care, prezentă în concentrații mici în comparație cu substratul oxidabil, semnificativ împiedică sau inhibă oxidarea substratului dat [26]. Ulterior, în 2007, Halliwell B. [27] menționează că antioxidanții sunt orice substanță care împiedică, previne sau elimină daunele oxidative la o moleculă țintă. În același an, Khlebnikov și col. [28] au definit antioxidanții ca fiind orice substanță care anihilează radicalii liberi sau acționează indirect pentru a regla protecția antioxidantă sau pentru a inhiba producerea de radicali liberi. Conform definiției lui Lobo și col., [29] un antioxidant este o molecula stabilă care poate dona un electron sau un atom de hidrogen unui radical liber agresiv, anihilându-l, astfel reducând capacitatea lui de a provoca daune.

În calitate de compuși reducători, antioxidanții pot anihila speciile reactive precum radicalii hidroxil ($\cdot\text{OH}$), radicalul anion superoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peroxidul de hydrogen (H_2O_2), radicalii alcoxil (RO^{\cdot}) și peroxil (ROO^{\cdot}), peroxinitriții (ONOO^-) etc., care sunt produși în mod natural și permanent în orice sistem natural, inclusiv în organismul uman. Prin cedarea electronilor sau a atomilor de hidrogen, antioxidanții înșiși devin specii radicalice, totuși au o reactivitate mică și nu interacționează cu alte molecule pentru a-și recupera electronii/atomii pierduți. Stabilitatea și nereactivitatea moleculelor de antioxidanți deveniți radicali sunt calitățile care caracterizează în mod special compușii dați.

În conformitate cu structura chimică, polaritatea, originea, funcțiile și mecanismul de acțiune, antioxidanții pot fi grupați în diferite clase de compuși chimici și pot fi clasificați în mai multe tipuri: antioxidanții hidro- și lipo-solubili [30]; antioxidanții naturali și sintetici [31]; antioxidanți enzimatici și non-enzimatici [32, 33]; antioxidanți endogeni și exogeni [32]; antioxidanți primari și secundari [34] – cu referire la mecanismul de acțiune.

Mecanismul de acțiune antioxidantă a compușilor reprezintă o caracteristică importantă a acestora. Până în prezent au fost raportate multiple moduri de acțiune a compușilor dați [31, 34]: (i) inhibarea formării radicalilor liberi lipidici (oxidanți preventivi); (ii) întreruperea propagării reacțiilor de autooxidare în lanț (antioxidanți primari); (iii) chelarea metalelor grele cu efect prooxidant și transformarea lor în produse stabile neoxidabile etc.

În anul 1992, Krinsky N. I. [33] a descris mecanismul de acțiune a antioxidantilor în reacția de peroxidare lipidică ca fiind unul alcătuit din câteva etape: inițierea, propagarea, reinițierea, etapa eliminării produsului și etapa terminală. Aceleași etape sunt menționate de către Nimse și col. [35], care oferă o schemă simplificată a acțiunii glutathionului ca antioxidant în stoparea peroxidării lipidice. Galano și col. [34], într-un studiu realizat recent în baza analizei cuantochimice a antioxidantilor, propun mai multe mecanisme de reacție prin care antioxidantii reușesc să anihileze radicalii liberi, după cum este redat în continuare:

Mecanismul HAT (transferul atomului de hidrogen)

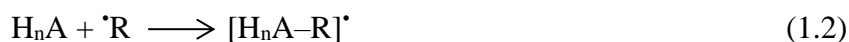


Mecanismul HAT presupune cedarea atomului de hidrogen de la reducător către radicalul liber, ecuația 1.1. Reacțiile HAT sunt dependente de solventul reacției și de pH, și, cel mai des, sunt rapide, decurgând în câteva secunde sau minute [36]. Acest mecanism de reacție a fost propus pentru compușii ca acidul ascorbic, glutathionul, acizii lipoici și dihidrolipoici, triptofanul și derivații acestuia. Date raportate în literatura de specialitate exemplifică mecanismul de acțiune HAT [37, 38].

Mecanismul PCET (cuplarea protonului, transferul electronului)

Reacțiile PCET duc la formarea acelorași produși ca și în cazul mecanismului HAT și, în general, pot fi reprezentate de aceeași reacție redată prin ecuația 1.1. Diferență este observată la nivel molecular, întrucât, în cazul reacțiilor HAT, protonul și electronul sunt transferați împreună ca o singură entitate - hidrogenul, dar în cazul reacțiilor PCET, electronul și protonul sunt transferați într-o singură etapă ca două particule separate care provin de pe orbitali diferiți. Acest tip de mecanism de reacție este caracteristic flavonoidelor [39], sistemelor de chinone și hidrochinone și diarilaminelor.

Mecanismul RAF (formarea aducțiilor radicalici)



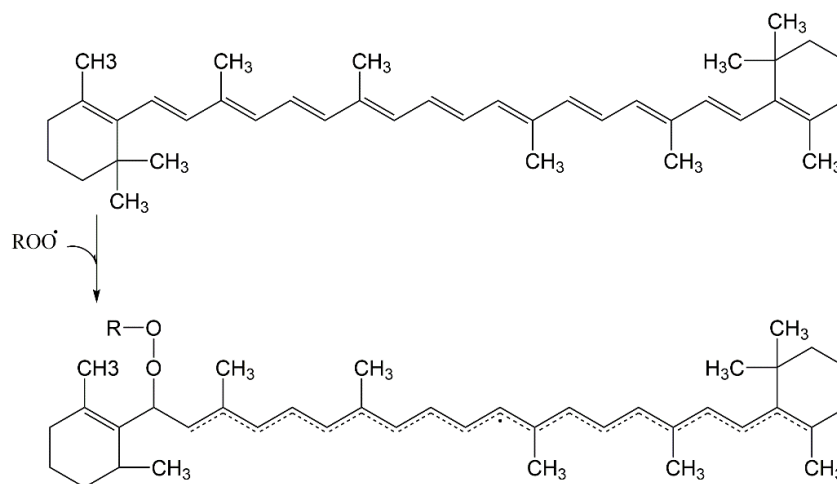


Figura 1.1. Schema interacțiunii β -carotenului și radicalului peroxil prin intermediul mecanismului RAF [40]

Caracteristica de bază a antioxidanților ce anihilează speciile radicalice prin mecanismul RAF este prezența legăturilor duble conjugate în structura lor moleculară, în același timp, în aceste reacții sunt implicați, preponderent, radicalii electrofili, ecuația 1.2. Exemplu elocvent ce ilustrează mecanismului RAF este interacțiunea β -carotenului cu radicalii peroxil (Figura 1.1). Datorită prezenței legăturilor duble conjugate în structura antioxidantului, aductul radicalic format dintre radicalul peroxil și β -caroten este mai stabil decât $ROO\cdot$. Mecanismul RAF este important pentru acțiunea antioxidantă a diverșilor compuși, precum carotenoidele, acidul gentisic, alcoolii hidroxibenzilici etc. [34].

Mecanismul SET (transferul electronului)

Acest mecanism se desfășură conform ecuațiilor 1.3 și 1.4:



Ecuația 1.3 este importantă pentru mecanismul de acțiune a izomerului enolic al curcuminului, pentru reacțiile carotenoidelor, compușilor fenolici etc., în procesul anihilării radicalilor $\cdot NO_2$, $CCl_3OO\cdot$, $\cdot OH$. Cea de-a doua cale presupune interacțiunea radicalului anionic superoxid $O_2^{\cdot-}$ cu antioxidanții ca xantonele, carotenoizii, precum și reacțiile acidului cafeic, acidului uric, etc. cu radicalul $\cdot NO$ [34]. În general, mecanismul SET este dependent de pH și de deprotonarea grupelor funcționale reactive [36]. Reacțiile SET sunt, de obicei, lente și necesită timp mai îndelungat pentru finalizarea procesului redox [36].

Mecanismul SPLET (pierderea secvențială a protonului, transferul electronului)

Mecanismul SPLET este caracterizat de cedarea secvențială a protonului, apoi transferul electronului către specia radicalică. Acest mecanism este reprezentat prin două ecuații, ecuațiile 1.5 și 1.6:



Tipul de reacție SPLET este operativ în solvenții care suportă ionizarea moleculelor de antioxidanți [41], respectiv, acest mecanism este crucial pentru anihilarea radicalilor liberi din mediul polar. Unele exemple de antioxidanți care urmează această cale de a interacționa cu radicalii liberi sunt curcuminul, quercentina, flavonoidele, acidul galic, catehina, rutina etc.

Mecanismul SEPT (transferul secvențial al electronului și protonului)

Mecanismul SEPT, de asemenea, este alcătuit din două etape care presupun transferul electronului (ecuația 1.7) și deprotonarea moleculei (ecuația 1.8), dar într-o ordine diferită decât în cazul SPLET:



Acesta este mecanismul caracteristic pentru acțiunea antioxidantă a α -tocoferolului în cazul anihilării radicalilor liberi DPPH, galvinoxil [34], și în reacția cu radicalul teroxil [34] etc.

Mecanismul SPLHAT (pierderea secvențială a protonului, transferul atomului de hidrogen)

Reacția reprezentativă pentru acest mecanism este indicată în ecuațiile 1.9 și 1.10, unde se observă deprotonarea antioxidantului, urmată de transferul atomului de H:



Mecanismul SPLHAT joacă un rol important pentru activitatea antioxidantă a antocianidinelor, a acidului galic cu radicalii $\cdot OH$, a acidului elagic, propil galatului etc. Acțiunea de captare a radicalilor peroxil de către vitamina C [34, 39] este descrisă de același mecanism, după cum este ilustrat în schema din Figura 1.2.

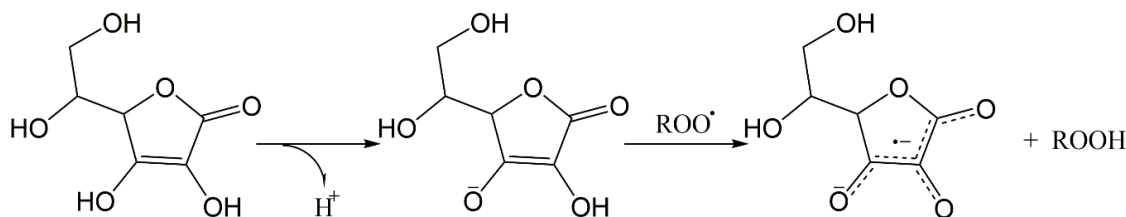
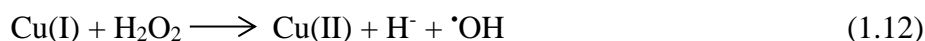
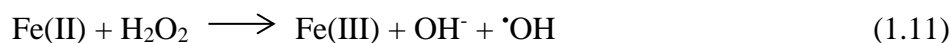


Figura 1.2. Schema mecanismului de acțiune a vitaminei C în reacție cu radicalii peroxil

[42]

TMC (chelarea metalelor de tranziție)

Două procese foarte importante care au loc în organismul uman și în urma cărora se produc radicali liberi sunt reacția Fenton și recombinația Haber-Weiss [34]. Aceste reacții duc la formarea radicalului liber hidroxil, care este extrem de reactiv și care are capacitatea de a interacționa și deteriora celulele, țesuturile și ADN-ul. Reacția Fenton presupune interacțiunea dintre forma redusă a ionilor de Fe(II) sau Cu(I) cu H₂O₂, producând [•]OH, ecuațiile 1.11 și 1.12:



Recombinația Haber-Weiss presupune procesul invers, adică oxidarea substratului și reducerea ionului de metal până la forma inițială, ecuațiile 1.13 și 1.14:



Asemenea procese sunt stopate de către antioxidanți prin intermediul mecanismului de acțiune TMC, care prin legarea ionilor de metale opresc formarea de noi radicali hidroxil și previn stresul oxidativ [43] (Figura 1.3).

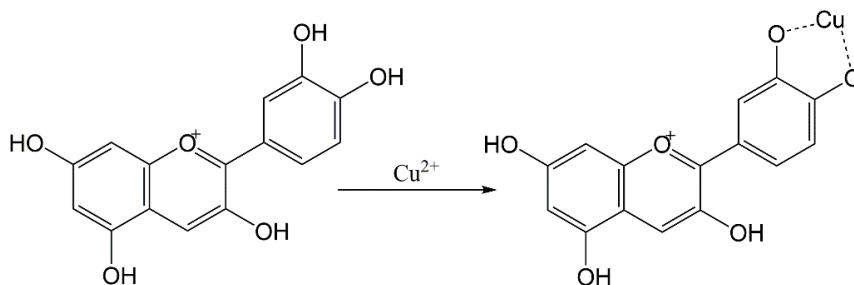


Figura 1.3. Schema reacției de chelare a ionului de Cu(II) de către cianidină [43]

În general, compușii polifenolici, în deosebi antocianii, posedă capacitate sporită de chelare a metalelor grele, astfel acționând ca antioxidanți preventivi prin reducerea concentrației de metale grele din sistemele de reacție.

Aceste exemple și mecanismele de acțiune enumerate demonstrează capacitatea antioxidanților de a anihila radicalii liberi, precum și căile diverse prin care sunt realizate aceste reacții. Dependența mecanismelor de acțiune antioxidantă de un șir de variabile precum solvenul, pH, prezența metalelor grele etc., accentuează complexitatea acestor procese redox, precum și necesitatea continuă de cercetare a lor.

1.2. Problema caracterului prooxidant al antioxidanților

Capacitatea antioxidanților de a anihila speciile radicalice și de a inhiba oxidarea este legată de abilitatea lor de a interacționa cu radicalii liberi mai rapid decât substratul oxidabil și de a produce specii radicalice de antioxidanți cu potențial redox relativ mic care nu promovează oxidarea ulterioară [17, 44]. Antioxidanții alimentari, cum ar fi vitaminele, compușii fenolici, carotenoizii etc., reprezintă clasa de antioxidanți naturali, exogeni care participă eficient la procesele redox de anihilare a radicalilor liberi din sistemele naturale și organismele vii. În ciuda faptului că o dietă echilibrată poate furniza o cantitate suficientă de antioxidanți, întrebuințarea suplimentelor alimentare pe bază de compuși bio-activi este pe larg popularizată ca o modalitate de menținere a sănătății, considerându-se că mărirea aportului de antioxidanți încetinește procesele oxidative biologice care duc la îmbolnăvire și îmbătrânire. În contextul dat, ar trebui luat în considerare riscul consumului dozelor mari de compuși reducători proveniți din consumul suplimentelor alimentare sau al produsele alimentare îmbogățite cu antioxidanți.

Conform datelor științifice, s-a constatat că concentrațiile mari de antioxidanți generează efecte prooxidante sau pot fi toxice [45]. Devenind prooxidanți, antioxidanții acționează ca radicalii liberi, respectiv, sunt extrem de instabili și reactivi față de alte molecule: proteine, ADN, ARN, lipide etc., interacționând cu acestea și deteriorând structura lor. În general, prooxidanții sunt definiți ca substanțe chimice care induc stresul oxidativ, de obicei prin formarea de specii reactive sau prin inhibarea sistemelor antioxidante [31]. Aceștia pot fi clasificați în mai multe categorii: medicamente, metale redox-active, pesticide, poluanți ai mediului, produse de dezinfectie, antioxidanți etc. [6].

Controversa privind capacitatea antioxidanților de a acționa prooxidativ în funcție de concentrația lor și de natura moleculelor din jur se referă chiar și la cei mai cunoscuți antioxidanți precum vitaminele C și E, β -carotenul, flavonoidele etc. Potrivit studiului efectuat de Sotler și col. [6], pe lângă concentrația antioxidanților, alți doi factori pot influența funcția unui antioxidant transformându-l într-un prooxidant: prezența metalelor de tranziție și potențialul redox al antioxidantului. De exemplu, vitamina C a fost studiată pe larg datorită activității sale reducătoare proeminente, totuși, acest compus capătă caracter prooxidant când este întrebuințat în doze mari (1000 mg/kg greutate corporală) [6] sau în prezența metalelor de tranziție. Concentrații mari de Vitamina E de asemenea posedă activitate prooxidantă [46]. Când reacționează cu speciile reactive, tocoferolul devine el însuși un radical, iar dacă nu există suficientă vitamina C pentru regenerarea lui, rămâne în stare reactivă și oxidează substratul.

În cazul β -carotenului, activitatea prooxidantă depinde de prezența co-antioxidanților și de presiunea oxigenului care, fiind ridicată, produce autooxidarea β -carotenului [47]. Compușii fenolici pot acționa la fel ca prooxidanți [48] în sistemele care conțin metale redox-active [49]. Într-un studiu realizat de Parker și col. [8] la spectroscopia RES, autorii au raportat concentrațiile mai multor compuși fenolici care sunt prooxidante în reacția cu reactivul Fenton. Rutina manifestă activitate prooxidativă semnificativă la concentrații de 400 μ M și peste; acidul ascorbic posedă activitatea prooxidantă la concentrații de 0.2 – 400 μ M, totuși, pe măsură ce concentrația de acid ascorbic crește peste 400 μ M, are loc donarea atomilor de hidrogen radicalilor hidroxil formați în reacția Fenton; acidul galic are efect prooxidant la concentrații de până la aproximativ 175 μ M; catechina este prooxidantă la concentrații între 0.75 și 2.3 mM, cu un proces de oxidare mai intens la concentrații mai mici [8]. Studiul activității antioxidante/prooxidante a quercetinei, naringeninei, hesperidinei și morinei realizat prin analiza limfocitelor umane a demonstrat că concentrația de H_2O_2 nu a putut fi detectată atunci când s-au adăugat flavanonele naringenină și hesperină în intervalul de concentrație de 0–200 μ M; flavonolii quercetina și morina, la intervalul de concentrație de 25-200 μ M și, respectiv, 125-200 μ M, au determinat mărirea concentrației de specii radicalice, caracteristică unui caracter prooxidant sporit [50]. Același studiu arată că generarea radicalului anion superoxid și a produselor de peroxidare a lipidelor (determinate în reacția cu acidului tiobarbituric) a crescut odată cu mărirea concentrației fiecăruia dintre aceste flavonoide [50], fapt care în mod clar indică asupra caracterului prooxidant al compușilor. Conform studiului efectuat de U. Cornelli [16], la concentrații mari, un produs oxidat – care este un antioxidant ce a cedat electronul, devine prooxidant deoarece tendința de recuperare a electronului pierdut crește în paralel cu concentrația acestuia ca produs oxidat.

În general, activitatea prooxidantă este considerată a fi proporțională cu numărul total de grupări donatoare de electroni (cum ar fi gruparea hidroxil) dintr-un compus antioxidant [51]. În consecință, trăsăturile structurale care determină puterea antioxidantă a unui compus influențează în mod egal proporțiile caracterului său prooxidant. Această dualitate poate fi explicată dacă ne referim la potențialele redox ale antioxidantilor, în special, la modificarea potențialului redox odată ce compușii suferă transformări oxidative. Antioxidanții se caracterizează printr-un potențial de oxido-reducere scăzut în comparație cu cel al radicalilor liberi. De exemplu, compușii cu potențial redox scăzut sunt acidul ascorbic (282 mV), quercetina (330 mV), *a*-tocoferolul (500 mV) etc. [17]. Pe de altă parte, radicalii liberi posedă energie mai mare și, prin urmare, un potențial de oxido-reducere ridicat: H_2O_2 ($O_2^{\cdot-}$, $2H^+$) (940 mV), radicalul alchil peroxil (1000 mV), H_2O_2 (HOO^{\cdot} , H^+) (1060 mV), radicalul alcoxil alifatic

(1800 mV) [17]. Antioxidanții pot inhiba inițierea și propagarea oxidării substratului prin eliminarea speciilor radicalice și reducerea energiei acestora. În consecință, radicalii antioxidanți formați vor avea o energie mai mare decât moleculele inițiale (neoxidate). Radicalii antioxidanți rezultanți pot acționa în continuare ca agenți reducători, prin donarea în continuare a electronilor, dacă aceștia sunt radicali cu energie scăzută. Pe de altă parte, radicalii antioxidanți cu energie înaltă vor promova oxidarea substratului, cum ar fi acizii grași polinesaturați și/sau a altor molecule din jur, respectiv vor acționa prooxidativ [17]. Un antioxidant eficient este considerat compusul care, oxidându-se, produce specii radicalice stabile și nereactive [52]. Acest lucru este posibil datorită diferitor factori structurali ai moleculelor de antioxidanți, cum ar fi delocalizarea (în toată structura inelului benzenic, în legăturile duble conjugate) și distribuția spinului în speciile radicalice [34].

Caracterul antioxidant/prooxidant al compușilor depinde de energia radicalilor antioxidanți rezultanți. De exemplu, acizii grași polinesaturați, cu un potențial de oxido-reducere de 600 mV [17], pot fi oxidați cu ușurință de către radicalii antioxidanți cu energie înaltă, deoarece acizii grași polinesaturați, în sine, vor acționa în calitate de compuși reducători. În această situație, pentru a elimina efectul prooxidant al antioxidanților trebuie luată în considerare prezența altor compuși cu potențiale redox mai mici decât cele ale substratului și/sau a antioxidanților deveniți radicali liberi. Urmând aceeași logică de idei, compușii cu energie mai scăzută vor reacționa mai rapid cu radicalii antioxidanți formați, fiind preferențial oxidați înaintea acizilor grași polinesaturați sau a altor substraturi și țesuturi oxidabile. Acest comportament de regenerare reciprocă a compușilor este raportat în sistemele formate din mai mulți antioxidanți și reprezintă tipul de interacțiune antioxidantă sinergică. O astfel de relație există între acidul ascorbic și *a*-tocoferol, acidul ascorbic și *β*-caroten, polifenoli și *a*-tocoferol etc. Înțelegerea termodinamicii reacțiilor redox similare și a caracteristicilor intrinseci ale antioxidanților (cum ar fi potențialele de reducere) este importantă pentru predicția direcției transferului de electroni [17].

Până în acest moment, pot fi accentuați doi factori decisivi care contribuie la eliminarea caracterului prooxidant al antioxidanților: concentrația antioxidanților și combinația acestora. Aceste considerații sunt pe deplin respectate atunci când aportul de antioxidanți este determinat de consumul produselor alimentare naturale [16]. În alimente, antioxidanții consumați se află într-o combinație de diverși compuși, iar activitatea antioxidantă derivată din aceștia poate fi caracterizată fie de un efect aditiv, fie de unul antagonist sau de un efect sinergic (efect de combinație); totodată, cantitatea fiecărui antioxidant în produsele naturale este de obicei foarte mică, în intervalul (și chiar mai mici decât) dozelor zilnice recomandate (efect de concentrație)

[16]. Aceste idei au fost investigate intens de cercetători în ultimii ani [6, 10, 13, 31, 53–56]. Sistemele multicomponente care provin din alimente posedă mecanisme multiple de acțiune și pot inhiba oxidarea la diferite faze ale acesteia, prin urmare, activitatea antioxidantă rezultantă poate fi mai mare atunci când sunt utilizați mai mulți antioxidanți [17, 57]. Exemplele elocvente sunt combinațiile dintre compușii care chelează metale de tranziție și captatorii de radicali liberi, care adesea duc la interacțiuni sinergice și la ameliorarea activității antioxidante [13, 58].

Echilibrul dintre producerea și anihilarea speciilor radicalice de către antioxidanți, sau altfel spus, între activitatea prooxidantă și cea antioxidantă, este foarte delicat, iar dacă acest echilibru tinde spre supraproducția de radicali liberi, celulele încep să sufere consecințele stresului oxidativ [31]. Choueiri și col. [45] au subliniat clar că încă nu se știe exact ce cantități de antioxidanți sunt necesare pentru a avea un efect antioxidant benefic și care doză reflectă limita sigură și adecvată pentru utilizarea compușilor dați. Cu toate acestea, conform datelor, persoanele care consumă produse alimentare naturale bogate în antioxidanți, care sunt în concentrații mici și în combinații complexe, prezintă un risc scăzut de dezvoltare a afecțiunilor de sănătate [57, 59].

1.3. Interacțiuni antioxidante dintre compușii naturali

Pornind de la idea că fructele, legumele, plantele, nucile și produsele derivate, cum ar fi vinul, ceaiul, ciocolata sunt principalele surse de antioxidanți naturali precum vitaminele, mineralele, compușii fenolici etc., prezența lor în varii combinații și concentrații în alimentele date devine evidentă. Prin urmare, existența interacțiunilor reciproce dintre antioxidanții alimentari este actualmente pe larg acceptată în mediul științific, interacțiunile date fiind intensiv investigate.

Există trei tipuri distincte de interacțiuni antioxidante: sinergice, aditive și antagoniste. R. Tsao [5] a formulat definiții explicite pentru a descrie interacțiunile dintre antioxidanți, după cum este indicat în Figura 1.4. Dintre toate, interacțiunile sinergice sunt avantajoase datorită (1) eficacității crescute care duce la o calitate mai înaltă și o durată de valabilitate extinsă a alimentelor; (2) cantității reduse de antioxidanți necesari, astfel un cost de producție mai mic; și datorită (3) utilizării reduse sau înlocuirii totale a antioxidanților sintetici, care pot avea efecte adverse asupra sănătății [5].

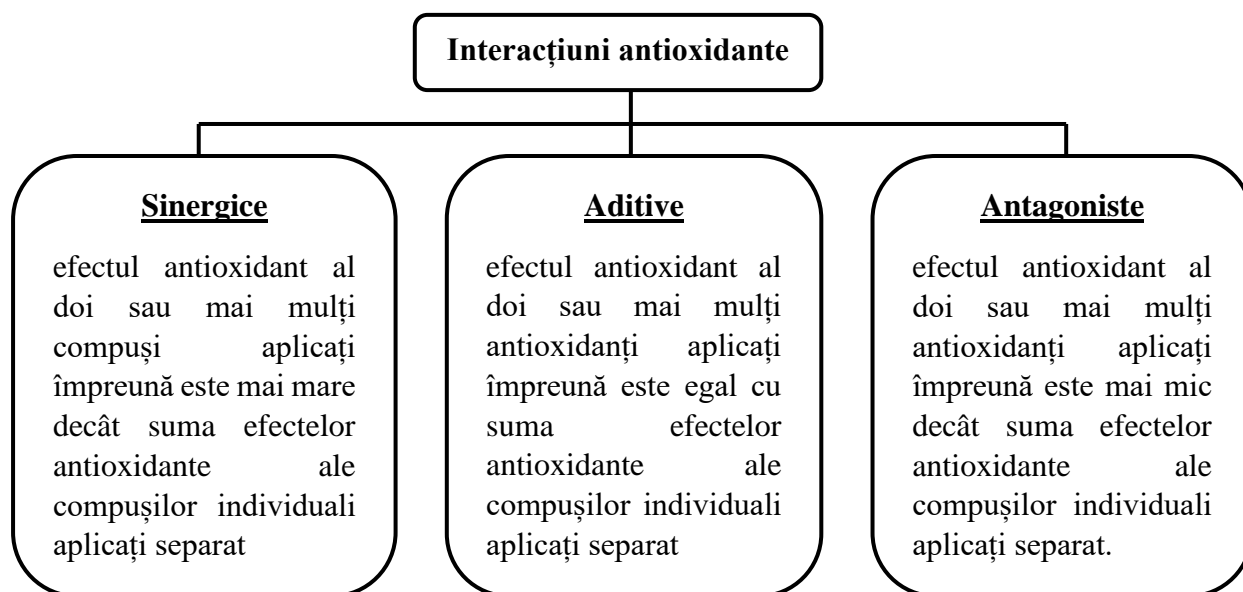


Figura 1.4. Tipurile de interacțiuni antioxidante și definirea acestora [5]

Cunoașterea caracteristicilor intrinseci ale antioxidanților precum numărul grupărilor electrono-donatoare, potențialul de oxido-reducere care influențează direct puterea antioxidantă a acestora nu este suficientă pentru a explica mecanismul interacțiunilor antioxidante. În ciuda numărului mare de publicații la acest subiect, mecanismul de interacțiune sinergică, aditivă sau antagonistă dintre antioxidanți nu a fost pe deplin elucidat, în principal, din cauza complexității acestor reacții. Cu toate acestea, au fost raportate un șir de observații și au fost sugerate următoarele ipoteze privind mecanismele de interacțiune dintre antioxidanți [60, 61]:

- fenomenul de regenerare – regenerarea celui mai puternic antioxidant de către cel mai slab are ca rezultat efectul sinergic; regenerarea antioxidantului mai slab de către cel mai puternic duce la un efect antagonist. Lipsa interacțiunilor dintre compușii antioxidanți are ca rezultat efecte aditive.
- formarea complexilor intermoleculari, dimerilor sau aducțiilor antioxidanți – formarea complexilor intermoleculari între antioxidanți, a dimerilor sau aducțiilor cu o proprietate antioxidantă mai mare va genera efecte sinergice; dimpotrivă, apariția complexilor, aducțiilor, proceselor de polimerizare care scad disponibilitatea grupărilor-donatoare de electroni va avea ca rezultat interacțiuni antagoniste.
- efecte complementare:
 - concentrație – în funcție de concentrația și raporturile molare ale compușilor din amestecuri, predomină activități antioxidante sau prooxidante.

- solubilitatea antioxidantilor – solubilitatea diferită a compușilor reducători joacă un rol decisiv în distribuția, localizarea și orientarea antioxidantilor în sistem.
- condițiile de reacție – solventul și pH-ul influențează ionizarea compușilor și interacțiunea intermoleculară prin procese de legare sau deprotonare a antioxidantilor.
- combinația de compuși cu mecanism antioxidant diferit – diferiți compuși posedă diverse mecanisme de acțiune și pot inhiba oxidarea la diferite faze ale acesteia.

Interacțiunile sinergice care au loc între compușii antioxidanți din fructe, legume și alte surse naturale sunt de cel mai mare interes datorită potențialului de sporire a activității antioxidante totale a amestecului. Cu toate acestea, celelalte două tipuri de interacțiuni – aditive și antagoniste, nu trebuie subestimate și neglijate. În ciuda rezultatului antioxidant mai scăzut indus de regenerarea antioxidantului mai slab de către cel mai puternic, sau de formarea complexelor intermoleculare între antioxidanți, dimeri sau aducți cu o putere antioxidantă mai mică, datele experimentale sugerează în mod subtil că interacțiunile aditive și cele antagoniste au potențialul de a elimina sau reduce efectul prooxidant. Deși nu este afirmat în mod direct, poate fi dedus că prezența mai multor antioxidanți (chiar și în cazul unei combinații cu efect aditiv sau antagonist) va reduce concentrația de antioxidanți deveniți radicali prin mecanismele menționate mai sus și va diminua riscul manifestării caracterului prooxidant.

În ultimii ani, în literatura de specialitate au fost publicate lucrări care tratează subiectul interacțiunilor antioxidante și care oferă exemple concrete ce ilustrează mecanismele menționate, o deosebită atenție oferindu-se interacțiunilor sinergice. Nogala-Kalucka și col. [62] au demonstrat influența structurii antioxidantilor, a concentrației acestora, a localizării în emulsie și a factorilor generatori de stres oxidativ asupra tipului de interacțiune – sinergică sau antagonistă, dintre quercetină, rutină și tocotrienoli în emulsia de acid linoleic. Efectul sinergic a apărut în cazurile când au fost combinați compuși a căror eficacitate antioxidantă individuală a fost relativ slabă și atunci când concentrația de antioxidanți a fost în jur de 1 μM [62]. Amestecuri binare echimolare de resveratrol și alți compuși fenolici (acid galic, acid cafeic, catechină, quercetină) investigate prin metodele FRAP, DPPH \cdot și reacția Briggs-Rauscher au demonstrat dependența activității antioxidante de mecanismul metodei aplicate [63]. Efectul sinergic dintre catechină și resveratrol a fost confirmat prin toate cele trei metode [63]. Alți compuși fenolici - tirozolul și derivații acestuia, au prezentat efecte antioxidante sinergice atunci când au fost combinați cu antioxidanții Trolox și acid ascorbic [64]. Sinergismul dintre flavonoidele rutină și naringină în combinație cu Trolox sau acidul ascorbic a fost demonstrat prin utilizarea metodei ORAC [65]. Importanța grupării O-glucozil

în structura moleculară a fost dezvăluită, deoarece quercetina și morina, care nu au grupa glucozil, au prezentat antagonism în combinație cu Trolox sau acid ascorbic [65]. Resveratrolul a demonstrat că regenerează sinergic analogul *α*-tocoferolului în micle și lipozomi, eficiența maximală fiind înregistrată la pH 6 (interval de pH testat 4 – 10) [66]. În comparație cu lipsa interacțiunilor sinergice în solvenții nepolari, datele obținute sugerează că persistența crescută a radicalilor tocoferoxil în sistemele dispersate lipide/apă și localizarea proximală a ambilor antioxidanți facilitează foarte mult posibilă recuperare a *α*-tocoferolului de către resveratrol în sistemele micelare [66]. Acidul rosmarinic în combinație cu *α*-tocoferol a demonstrat un efect sinergic în emulsiile ulei-în-apă [67]. Rezultatele au arătat că antioxidanții combinați prezintă cel mai puternic efect sinergic la pH-ul 7 datorită formării acidului cafeic ca produs de degradare oxidativă a acidului rosmarinic [67]. Investigații recente au stabilit prezența efectelor sinergice ale acidului *trans*-aconitic în prezența vitaminei C, acidului cafeic, acidului galic și Trolox [14]. Amploarea efectului sinergic s-a dovedit a fi dependentă de concentrațiile de antioxidanți.

Faptul că concentrațiile mari de antioxidant ar putea fi prooxidative și, în consecință, dăunătoare, este, în prezent, luat în considerare de comunitatea științifică. Investigațiile tind să favorizeze utilizarea unor cantități mici de antioxidanți sau să mimeze concentrațiile declarate în surse naturale precum fructele, legumele, plante etc. Astfel de experimente au fost efectuate de o echipă de cercetare americană [7, 53]. Autorii au luat drept referință cantitatea mai multor compuși fenolici găsiți în portocale și în căpșuni și au respectat concentrațiile relative în studiile lor [7, 53]. Interacțiunile sinergice și antagoniste, cu prevalența celor sinergice, au fost raportate pentru combinațiile de 2, 3 sau 4 compuși [7, 53].

Dualitatea antioxidanților de a acționa ca prooxidanți și ca reducători, a reorientat oamenii de știință spre investigarea compușilor mai puțin activi, dar importanți în raport cu studiul activităților antioxidante-prooxidante. Molecule precum acizi organici (acidul tartric, citric, acetic, malic), zaharuri simple și complexe (glucoză, pectină), fosfolipidele [68] etc., posedă activități antioxidante neglijabile împotriva radicalilor liberi, totuși, în combinații cu antioxidanții naturali pot exercita o influență puternică asupra mecanismului de acțiune a acestora. Trebuie menționat faptul că astfel de compuși cu activitate antioxidantă scăzută sunt prezenți fiziologic în sursele naturale într-o concentrație considerabil mai mare decât cea a captatorilor de radicali liberi, astfel contribuția lor pentru mersul reacțiilor poate deveni semnificativă [13]. În contextual dat, două rezultate diferite dintre interacțiunea *α*-terpinenului sau a BHT cu acizii acetic, malic și citric au fost observate de către Quiroga și col. [69]. Activitatea antioxidantă a compusului *α*-terpinen împotriva radicalului DPPH a fost

îmbunătățită de prezența acizilor organici; dimpotrivă, activitatea BHT a fost inhibată [69]. Prin creșterea concentrației de acid ascorbic în prezența acizilor acetic, malic sau citric s-a observat o inhibare a radicalilor liberi DPPH mai bună, prin urmare – un efect sinergic mai mare [10]. Utilizând spectroscopia RES, R. Lo Sclazo [13] a studiat interacțiunile antioxidante dintre acidul ascorbic, acidul clorogenic și cisteină în combinație cu substanțe non-antioxidante, cum ar fi glucoza și acidul citric împotriva a trei radicali liberi: anionul superoxid, radicalul hidroxil și radicalul hidroperoxid de *terț*-butil. Cisteina a demonstrat activitate prooxidantă în reacția cu radicalul hidroperoxid de *terț*-butil, dar, după amestecarea cu alți compuși antioxidanți sau non-antioxidanți, probele au manifestat efect sinergic [13].

În ultimii ani, au fost publicate numeroase lucrări care oferă date experimentale privind interacțiunile sinergice, aditive sau antagoniste dintre antioxidanții comuni cu diferite extracte și/sau sucuri [70–72], precum și rezultate privind interacțiunile antioxidante dintre diferite alimente [61, 73, 74]. Potrivit datelor raportate de Çelik E. E. & Gökmen V. [75], în alimente, captatorii de radicali sunt prezenți ca antioxidanți legați de proteine, lipide și carbohidrați. Acest fapt afectează proprietățile funcționale *in vivo* ale compușilor dați, cum ar fi biodisponibilitatea și bioaccesibilitatea, astfel încât antioxidanții legați sunt eliberați lent din matricea fibrelor, în formă intactă, abia în colon [75].

Muhammad și col. [56] au stabilit importanța raportului dintre extractele de cacao și scorțișoară și a compușilor lor individuali pentru activitatea antioxidantă a amestecurilor. Rezultatele au demonstrat faptul că prin creșterea concentrației extractului de scorțișoară, efectul antagonist devine mai pronunțat. De asemenea, tipul de interacțiune antioxidantă a compușilor individuali s-a dovedit a fi dependent de raportul de concentrație a acestora [56]. Îmbunătățirea activității antioxidante și a efectului sinergic la pH bazic a fost raportată în cazul amestecurilor dintre extractul de salată verde și quercetină, extractul de ceai verde sau extractul din semințe de struguri, împotriva oxidării lipozomilor [76]. Deprotonarea și stabilizarea anionilor fenolați în soluții alcaline afectează capacitatea lor de donare a electronilor, de asemenea, a fost sugerat faptul că interacțiunile lor sinergice sunt determinate de reacții de polimerizare [76].

După cum indică datele, actuala investigație a interacțiunilor dintre antioxidanții comuni și compuși non-antioxidanți, poate oferi o înțelegere mai bună a influenței concentrației, pH-ului, matricei/mediului de reacție, în care se găsesc în mod natural antioxidanții, asupra mecanismului de acțiune și asupra puterii antioxidante a amestecului;

poate descrie mai bine avantajul/dezavantajul combinării anumitor produse alimentare sau extracte din alimente; și, în cele din urmă, oferă noi perspective pentru cercetările ulterioare și pentru posibilitățile de aplicare a rezultatelor în industrie.

1.4. Antioxidanții fenolici și acizii organici din struguri

Strugurii sunt cele mai răspândite și recoltate fructe din lume, cu o producție anuală mai mare de 74.9 de milioane de tone în anul 2022 [77]. Obținerea și prelucrarea strugurilor lasă o amprentă semnificativă asupra stabilității și dezvoltării economice a țărilor producătoare și consumatoare de struguri. Aproximativ 80% din cantitatea de struguri produsă este utilizată în vinificație, cei mai importanți producători mondiali de struguri și vinuri fiind Franța, Spania, Italia și SUA. Pentru Republica Moldova, strugurii sunt un produs natural de interes economic strategic, deoarece sunt solicitați în stare proaspătă, de asemenea, servesc ca materie primă pentru vinificație – una din ramurile principale în industria prelucrătoare. Conform datelor oficiale ale Organizației Națiunilor Unite pentru Alimentație și Agricultură, în 2021, Republica Moldova s-a clasat pe locul 9 în topul țărilor europene la producția strugurilor și pe locul 25 în lume [77].

Compoziția complexă a strugurilor presupune prezența unui semnificativ număr de nutrienți și compuși biologic activi. Vitaminele, compușii fenolici, carbohidrații, acizii organici, mineralele sunt doar unele clase de compuși care conferă importanță culturii date [15]. Concentrația acestora are o însemnătate deosebită, deoarece contribuie la formarea culorii, gustului și aromei fructelor proaspete și, de asemenea, la conferirea culorii, gustului și calității vinurilor, sucurilor și a altor produse derivate.

Strugurii reprezintă o sursă bogată de compuși fenolici, care, după cum arată datele [78], posedă activitate antioxidantă comparabilă sau chiar superioară vitaminelor. Din punct de vedere calitativ, polifenolii din struguri aparțin diferitor subclase de compuși fenolici (Figura 1.5) și sunt distribuiți neuniform în toate părțile componente ale bobitelor și plantei. În pielea se conține cea mai mare cantitate de polifenoli, în particular, taninuri condensate (oligomerii catehinei și epicatehinei cu acidul galic), flavanoli, flavonoli, antociani, acizi fenolici și stilbeni [79]. Conținutul de taninuri în struguri atinge valori maxime înainte de pârgă, după care începe să se diminueze în urma polimerizării și asocierii cu pectinele [80]. Pielea soiurilor de strugurii roșii conține antocianidine, care determină colorația roșie intensă a bobitelor [81] și care posedă activitate antioxidantă pronunțată. De asemenea, în pielea strugurilor coapte este prezent un conținut ridicat de substanțe aromatizante și precursorii acestora [79]. În pulpa strugurilor se acumulează, în principal, acizii fenolici și flavonoidele monomerice în concentrații mai mici decât în pielea, de asemenea, acizi organici, zaharuri, minerale etc. [15].

Astfel, în sucul de struguri proaspăt extras și în vinurile albe se conțin, majoritar, acizi hidroxicinamici precum: acizii *p*-coumaric, caftaric, ferulic și izomerii *trans*- ai acestora [82]. Semințele din struguri conțin taninuri condensate, proantocianidine și flavonoide monomerice [82].

Din punct de vedere chimic și structural, polifenolii sunt excelenți captatori de radicali liberi [83]. Proprietățile antioxidante ale compușilor fenolici se datorează prezenței grupelor funcționale hidroxil în structura antioxidantului, care au capacitatea de a reduce radicalii liberi prin donarea de electroni; totodată, structura aromatică a compușilor permite stabilizarea radicalilor aroxil formați. Un rol foarte important în reacțiile de captare a radicalilor liberi îl are potențialul de oxido-reducere al substanțelor reducătoare, acest parametru fiind mai mic în cazul polifenolilor, ceea ce permite donarea rapidă a electronului de către aceștia și ruperea lanțului oxidativ.

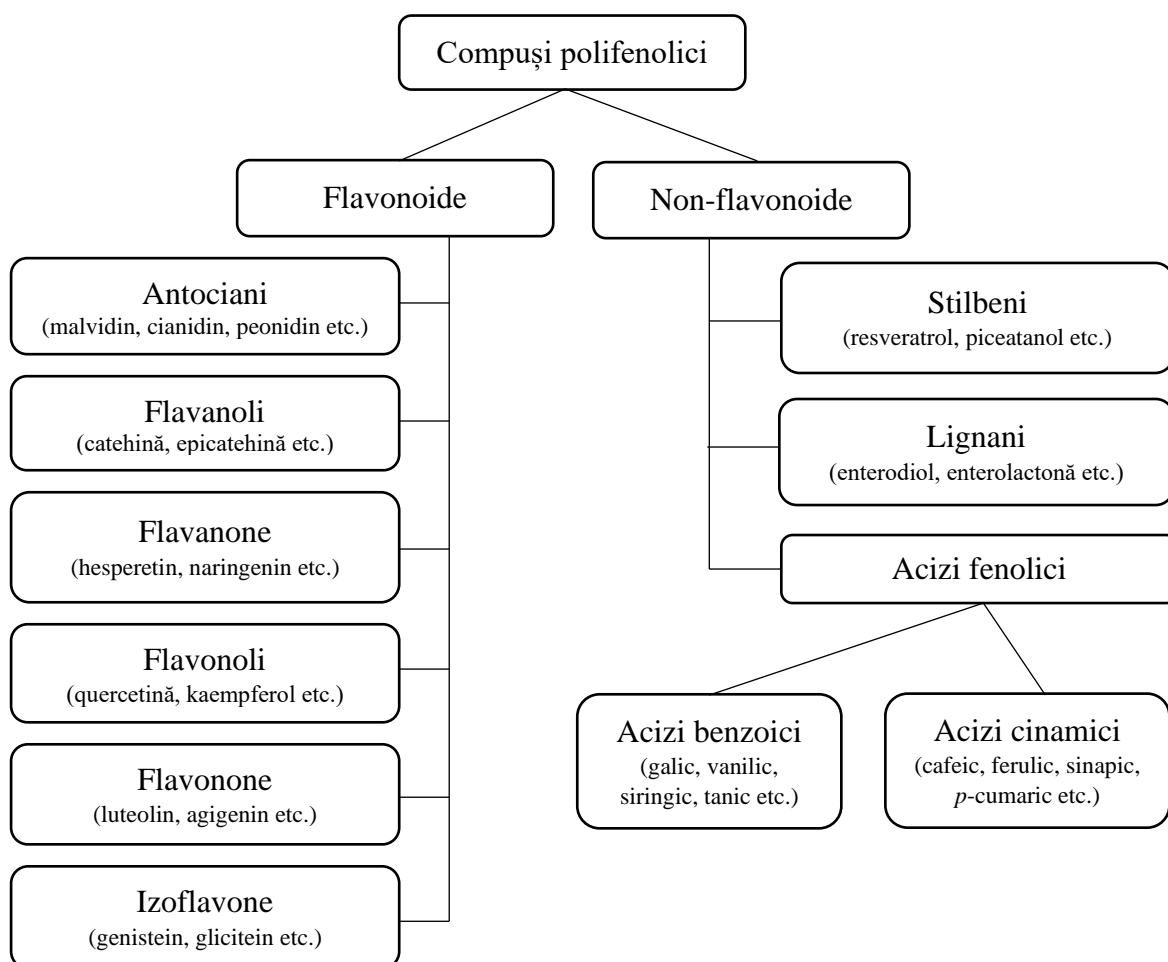


Figura 1.5. Clasificarea compușilor fenolici [84]

Mai concret, proprietatea antioxidantă a compușilor fenolici depinde de mai mulți factori chemo-structurali cum ar fi: 1) structura *orto*-dihidroxi (catechol) din ciclul B, pentru delocalizarea electronului; 2) legătura dublă-2,3 în combinație cu gruparea 4-oxo în ciclul C, care

permite delocalizarea electronului din ciclul B și stabilizarea moleculei; 3) grupările hidroxil în pozițiile 3 și 5 (Figura 1.6) [85]. În acest sens, flavonoidele posedă un potențial antioxidant sporit, deoarece compușii din această clasă conțin una sau mai multe elemente structurale enumerate mai sus. De asemenea, potențialul antioxidant al flavonoidelor depinde și de prezența multiplelor grupe hidroxil în structura lor. Spre exemplu, Villano și col. [86] au arătat că în reacția cu radicalul DPPH valorile stoichiometrice ale compușilor fenolici testați corespund, în mare parte, cu numărul de grupări hidroxil din molecula fiecărui compus. Astfel, un mol de catehina poate anihila până la 5 moli de DPPH^{*}, un mol de epicatehină – 7 moli de DPPH^{*}, quercetina – 5 moli de radical liber, rutina – 6 moli de DPPH^{*}, un mol de resveratrol poate anihila 1 mol de DPPH^{*} etc. [Tabel 1.1] [86].

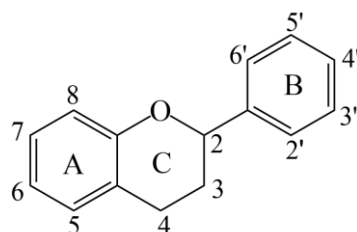
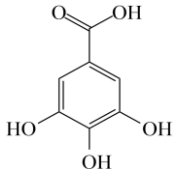
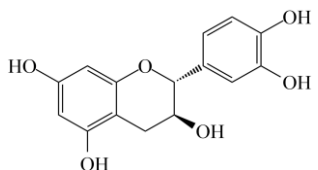
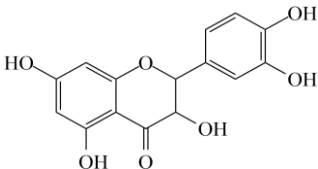
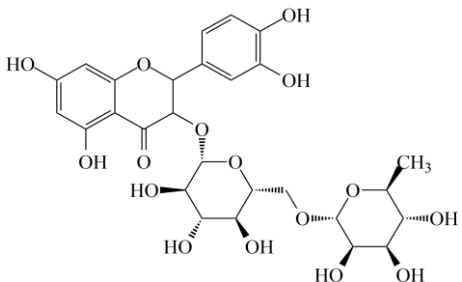
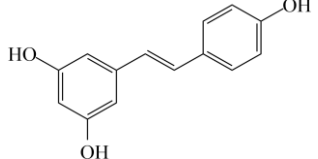
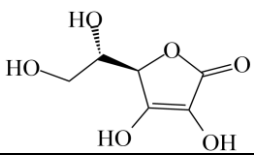
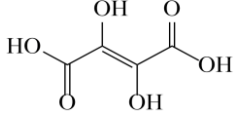
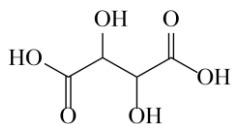
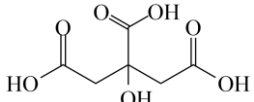


Figura 1.6. Numerotarea nucleului flavanoid [87]

Activitatea antioxidantă testată *in vitro* poate spori în urma polimerizării monomerilor flavonoidelor, cel mai bine cunoscut exemplu fiind proantocianidinele (de asemenea cunoscute ca taninuri condensate). Polimerii catehinei și epicatehinei sunt excelenți inhibitori de specii radicalice datorită numărului mare de grupări hidroxil disponibile de a interacționa. Activitatea antioxidantă a proantocianidinelor depinde de lungimea lanțului oligomeric și de tipul radicalilor liberi cu care intră în reacție [52].

O altă caracteristică importantă a polifenolilor, care se referă la activitatea antioxidantă a acestei clase de compuși, este capacitatea de chelare a ionilor metalelor de tranziție, care, prin reacția Fenton, pot genera radicali liberi. Prin legarea ionii de cupru și fier, aceștia participă la eliminarea efectului prooxidant al antioxidantilor, astfel, polifenolii joacă rolul de antioxidant secundari atunci când sunt combinați cu alți compuși reducători. Este sugerat faptul că siturile de chelare ale metalelor grele sunt secvența cateholică din ciclul B, grupările 3-hidroxil și 4-oxo din heterociclul C și grupările 4-oxo și 5-hidroxil dintre heterociclurile C și A [52].

Tabelul 1.1. Structura chimică și activitatea antioxidantă a unor compușilor fenolici și acizilor organici din struguri

Denumirea compusului (clasa de compuși)	Structura chimică	Activitatea antioxidantă	
		Nr. grupărilor OH electron-donatoare	Valoarea stoichiometrică în raport cu DPPH' [86]
Acid galic/ (acid fenolic)		3	5 – 6
Catehină (flavanol)		5	4 – 5
Quercetină (flavonol)		5	5 – 6
Rutină (flavonol)		4	5 – 6
Resveratrol (stilben)		3	1
Acid ascorbic (acid lactonic)		2	2 – 3
Acid dihidroxifumaric (acid dicarboxilic)		2	2 – 3
Acid tarttric (acid dicarboxilic)		-	-
Acid citric (acid tricarboxilic)		-	-

Datorită activității antioxidante a compușilor polifenolici, aceștia se formează în struguri drept răspuns la stres și la condițiile de mediu nefavorabile [88]. În deosebi, un rol protector îi revine stilbenului resveratrol, care prin acțiunea sa antioxidantă puternică protejează strugurii și ulterior și vinul produs, menținând calitatea acestuia. Concentrația compușilor fenolici din struguri este puternic influențată de soiul plantei de *Vitis Vinifera*, factorii viticoli și meteorologici, condițiile ecologice de mediu, condițiile agrotehnice etc. [82].

Alți compuși importanți conținuți în struguri sunt zaharurile și acizii organici – metaboliți primari importanți, care contribuie la creșterea viței de vie și la dezvoltarea bachelor. Acești compuși sunt considerați factori cheie pentru calitatea strugurilor și a vinului. Hexozele, glucoza și fructoza, precum și acizii organici malic, tartric și citric se conțin în pulpa bobitelor și sunt cei mai abundenți compuși care contribuie la gustul dulce și, respectiv, la aciditatea strugurilor și a produselor derivate [15]. Concentrațiile și/sau raportul de concentrații ale acestora variază pe durata etapelor de dezvoltare și maturare a bachelor. Acizii organici sunt produși atât în frunzele de viță de vie, cât și în struguri, și încep să se acumuleze în bobite în stadiile incipiente ale dezvoltării acestora [80]. După perioada de pârgă, concentrația de hexoze crește considerabil în bobite în timp ce concentrațiile de acizi organici scad drastic, cu excepția conținutului acidului tartric, care atinge media de 6 – 10 g/L în strugurii copti [89].

Multitudinea proceselor biochimice din struguri a căror dezvoltare și intensitate sunt strâns legate de condițiile de mediu, determină variația conținutului claselor de compuși importanți pentru calitatea strugurilor și a produselor din struguri. Perioada optimă pentru consumul și recolta fructelor date este la atingerea maturității depline, totuși, din punct de vedere a conținutului de metaboliți, faza erbacee se caracterizează prin acumularea cea mai intensă a acizilor organici și a compușilor fenolici [80], fapt care afectează pozitiv activitatea antioxidantă a strugurilor verzi. Cercetarea efectuată de Golubi R. [90], asupra posibilității de valorificare a strugurilor nematurați pentru a obține compoziții nutritive pe baza matricelor din fructe și legume demonstrează faptul dat. Autorul a arătat că din strugurii nematurați pot fi obținute, recurgând la procedee tehnologice, suc și acidifiant natural, cel din urmă fiind valoros pentru fabrica produse ecologice cu o valoare nutritivă înaltă [90].

Deși zaharurile și acizii organici din struguri nu posedă activitate antioxidantă împotriva radicalilor liberi, influența lor asupra activității antioxidante a compușilor fenolici sau a vitaminelor este demonstrată [13, 69]. Zaharurile și acizii organici pot afecta indirect mecanismului de interacțiune antioxidantă a compușilor reducători singulari sau a combinațiilor de antioxidanți prin schimbarea pH-ului, a potențialului de ionizare, prin generarea proceselor de polimerizare a antioxidanților.

1.5. Valeologia – direcție științifică interdisciplinară ce răspunde provocărilor actuale

Subcapitolul dat reprezintă o introducere în noțiunile de valeologie, ecovaleologie și valeologie pedagogică. Aici sunt definite conceptele date, este expusă importanța, scopurile și obiectivele acestor direcții științifice interdisciplinare. De asemenea, este demonstrată și exemplificată actualitatea subiectului dat în contextul problemelor ecologice existente și iminente.

Definirea conceptelor de valeologie, ecovaleologie și valeologie pedagogică

În pofida existenței unui șir de științe care au ca obiect de studiu omul, esența și existența acestuia (medicina, biologia, genetica, fiziologia, ecologia, psihologia, sociologia etc.), aceste științe tratează omul ca obiect al cunoașterii, care este privit din diferite puncte de vedere și, prin urmare, este fragmentat în funcție de interesul de studiu al fiecărei științe (cu posibila excepție a filosofiei) [19]. Din păcate, aceste fragmente care sunt acumulate și îmbunătățite de fiecare domeniu în parte, au puține căi și momente de interconectare și de formare a imaginii de ansamblu asupra ideii de stare de sănătate a individului. La intersecția dintre aceste domenii de studiu și cercetare stă valeologia, care, pe de o parte, aplică metodele și tehnologiile din domeniile medicale, biologice, chimice, pedagogice, psihologice etc. pentru acumularea datelor necesare privind caracterizarea sănătății indivizilor, iar, pe de altă parte, utilizează și interpretează datele obținute în domenii tangențiale pentru formularea unor concluzii și recomandări pentru sănătatea umană.

Conceptul de valeologie a fost propus și descris pentru prima dată de către cercetătorul rus I. I. Brekhman [18] care a evidențiat problema necesității de a dezvolta bazele unei noi științe și în 1980 a introdus termenul de „valeologie”, care derivă din latinescul *valeo* - „sănătate”, „a fi sănătos”. Conceptul de „sănătate” este definit de Organizația Mondială a Sănătății ca atingerea unei stări de bunăstare mentală, fizică și socială absolută, și nu doar eliminarea bolilor și absența dizabilităților fizice [91]. Aceeași organizație menționează că un om sănătos este acela care are capacitatea de a trăi armonios într-un mediu permanent în schimbare [91].

Literatura de specialitate [18, 19] definește valeologia ca o direcție științifică interdisciplinară de studiu și cunoaștere a sănătății umane, a modalităților de asigurare, formare și conservare a acesteia în condiții specifice de viață [18, 19]. Ca disciplină academică, valeologia reprezintă un ansamblu de cunoștințe despre sănătate și stilul de viață sănătos [18, 19]. Subiectul valeologiei este sănătatea individuală, rezervele sănătății umane și mecanismele formării acesteia, iar scopul principal al valeologiei este de a spori utilizarea mecanismelor și rezervelor moștenite de individ și menținerea un nivel ridicat de adaptare a organismului la condițiile mediului intern și extern [19].

În termeni teoretici, scopul valeologiei este de a studia tiparele de menținere a sănătății, modelarea și realizarea unui stil de viață sănătos. În termeni practici, scopul valeologiei poate fi văzut în elaborarea măsurilor și determinarea condițiilor pentru menținerea și promovarea sănătății [19]. Astfel, principalele sarcini ale valeologiei sunt [19]:

1. Cercetarea și evaluarea sănătății umane și a rezervelor de sănătate;
2. Formarea unor deprinderi de viață sănătoase;
3. Conservarea și întărirea sănătății umane și a rezervelor de sănătate prin adaptarea unui stil de viață sănătos;

Astfel, valeologia ia în considerare sănătatea într-un mod complex, holistic, incluzând toate laturile și aspectele sale și studiind starea de sănătate umană din toate aspectele și opțiunile posibile. Deși această direcție științifică are propriul domeniu de activitate, trebuie remarcat că în anumite aspecte este dificil de trasat o linie clară care să separe valeologia și alte științe precum cele medicale, biologice, biochimice, ecologice, psihologice, pedagogice, sociologice, politice, economice, filozofice etc., astfel încât interesele valeologiei sunt uneori destul de strâns legate, de exemplu, de igienă, salubritate, prevenirea bolilor, starea mentală etc. [19]. Actualmente, valeologia este cunoscută și studiată sub mai multe aspecte: cel general, medical, pedagogic, profesional, familial, social și ecologic (Figura 1.7).

În studiul actual se pune accent pe două aspecte ale valeologiei – aspectul ecologic și cel pedagogic. Prin urmare, este important de evidențiat baza generală a relației dintre valeologie ca direcție științifică cu științele ecologice și pedagogice [18, 19]:

- relația valeologie-ecologie – oferă baza științifică pentru managementul rațional al mediului, explorează natura relației „om – mediu – sănătate”, dezvoltă modele optime pentru construirea acestora și generează cunoștințe despre aspectele dependenței sănătății de mediu [18, 19];
- relația valeologie-pedagogie – dezvoltă scopurile, obiectivele, conținutul și tehnologiile educației, inclusiv ale educației valeologice, menite să formeze o motivație puternică de menținere a unei vieți sănătoase și să inițieze persoanele în principiile unui stil de viață sănătos [18, 19].

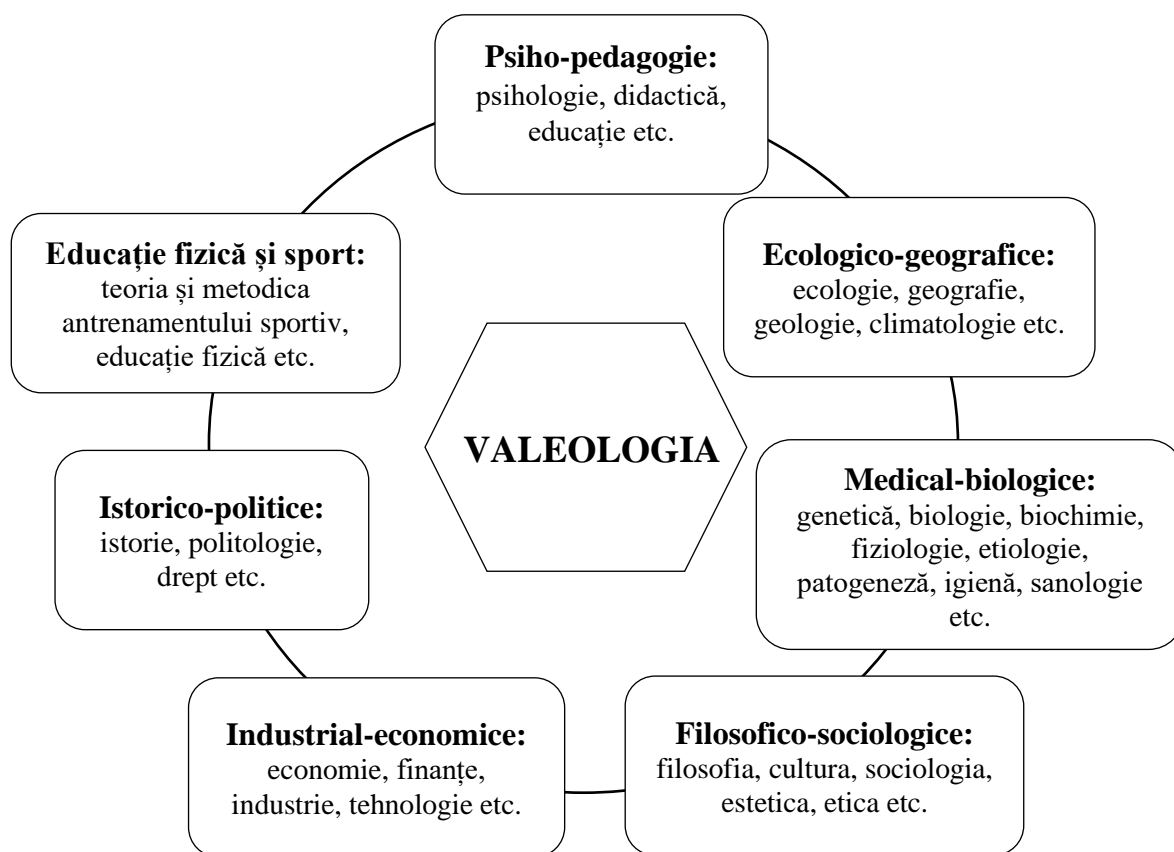


Figura 1.7. Interconexiunea valeologiei cu alte științe [18]

Valeologia ecologică, numită și ecovaleologie, studiază influența factorilor naturali și a consecințelor schimbărilor antropice din natură asupra sănătății umane, studiază și determină natura comportamentului uman în diferite condiții de mediu cu scopul menținerii sănătății [18, 19]. Intervenția omului în dezvoltarea și evoluția firească a naturii creează contradicții tot mai profunde între mediul înconjurător și corpul uman, care este un produs al evoluției naturale și biologice. În ultimele decenii, oamenii și mediul înconjurător au fost (și sunt) expuși tot mai mult consecințelor negative ale dezvoltării necontrolate a mai multor activități umane, cum ar fi urbanizarea intensă, transportul, industria, agricultura etc. Creșterea nivelului de trai și abordarea stilului de viață bazat pe consumerism au amplificat poluarea apei cu o varietate de substanțe chimice, nutrienți, scurgeri de petrol etc.; poluarea aerului cu CO₂, SO₂, NO_x și alte gaze cu efect de seră și particule; poluarea solului din cauza eliminării deșeurilor periculoase, a nămolului, a pesticidelor, precum și a utilizării materialelor de unică folosință sau non-biodegradabile și a lipsei unor instalații adecvate pentru stocarea deșeurilor [92]. Aceste schimbări la nivel calitativ survenite în mediul înconjurător afectează direct sănătatea omului, care folosește elementele din natură pentru a se hrăni, a respira și pentru a-și întreține viața.

Sistemele biologice interacționează cu mediul extern pentru a menține un mediu intern care favorizează supraviețuirea, creșterea și reproducerea. Substanțele din produsele alimentare

constituie partea principală a fluxului de informații structurale; acestea, trecând prin organism, participă la cea mai intimă comunicare dintre individ și mediul extern, creându-i ecologia internă [18]. Fluxul alimentar, la fel de complex ca natura, este format din aceleași elemente ca și mediul înconjurător; conține sute de mii de substanțe naturale [18], precum și o cantitate tot mai mare de poluanți toxici și nocivi pentru organism.

În contextul dat, obiectivele ecovaleologiei sunt, pe de o parte, de a studia natura influenței mediului, care a suferit schimbări, asupra sănătății umane și, pe de altă parte, de a elabora recomandări privind adaptarea comportamentului uman la condițiile de mediu actuale și reale, pentru a asigura și menține o stare de sănătate bună.

Conceptul de ecovaleologie are multe laturi tangențiale cu conceptele de ecologie și chimie ecologică. Prin definiție, ecologia este știința care studiază relațiile dintre organismele vii și mediul lor de abitare, interacțiunile organismelor între ele și modelele și cauzele abundenței și distribuției organismelor în natură [93]. Pe de altă parte, chimia ecologică este știința ce studiază procesele chimice și interacțiunile în ecosferă, determină compoziția și proprietățile chimice ale mediului ambiant, adecvat valorii biologice de abitare [3]. La rândul său, ecovaleologia se face remarcată prin faptul că își concentrează studiul asupra interacțiunii omului cu mediul și asupra modului în care aceste interacțiuni afectează sănătatea individului și starea sa de bine.

Valeologia pedagogică studiază problemele de pregătire și educare a persoanelor în scopul formării unei motivații puternice orientate către asigurarea și menținerea unui vițel sănătos și a unui stil de viață sănătos la diferite vârste și etape de dezvoltare [19]. Această ramură a valeologiei se dezvoltă cel mai dinamic, în special în țările din spațiul post-sovietic [94–98]. Scopul propus spre realizare prin educația valeologică este modelarea conștiinței umane și formarea culturii valeologice a indivizilor. Faptul dat presupune cunoașterea capacităților genetice, fiziologice și psihologice personale, a metodelor și mijloacelor de control, conservare și dezvoltare a sănătății individuale, precum și capacitatea de diseminare a cunoștințelor valeologice [19].

Caracterul interdisciplinar al valeologiei și ecovaleologiei, precum și legătura incontestabilă dintre procesele din mediul ambiant și viața și sănătatea umană permite de a trata problema formării și dezvoltării orientărilor valeologice în comportamentul tinerilor la orice disciplină școlară și universitară [94]. În literatură sunt raportate multiple studii cu tentă valeologică efectuate în instituții de învățământ, care demonstrează abordarea subiectului din punct de vedere al chimiei [94, 99], al biologiei și medicinei [95], al educației fizice [100] etc.

Lucrarea dată tratează subiectul interacțiunilor antioxidante dintre compușii naturali din mai multe perspective – cea chimică, ecologică și cea valeologică. Prin urmare, se vor accentua și discuta aspectele care stau la intersecția dintre aceste științe, evidențiindu-se incontestabila relație

dintre acestea și formulându-se concluzii și recomandări privind menținerea stării de sănătate și a unui stil de viață sănătos în condițiile necesității consumului de antioxidanților.

Importanța valeologiei în contextul problemelor și provocărilor actuale

Actualmente, una dintre problemele globale ale societății este poluarea și impactul poluării asupra mediului și sănătății omului. Datele recent publicate [92, 101] confirmă că poluarea este o amenințare globală majoră pentru sănătate și prosperitate, care provoacă peste 9 milioane de decese în fiecare an la nivel global. În ultimele două decenii, decesele cauzate de formele moderne de poluare (de ex., poluarea aerului și poluarea cu substanțe toxice) au crescut cu 66%, ca urmare a industrializării, urbanizării necontrolate, creșterii numărului populației, arderii combustibililor fosili și absenței unei politici chimice naționale sau internaționale adecvate [102].

Potrivit Figurii 1.8, poluarea aerului cauzează cel mai mare număr de decesuri, mai mult de 6.5 milioane, urmată de poluarea modernă – aproximativ 6 milioane, ce presupune poluarea de pe urma proceselor de industrializare și urbanizare. Poluare tradițională cauzează moartea a 3.6 milioane persoane, iar poluarea apei, la locul de muncă și poluare cu plumb, în sumă, provoacă decesul a 3.1 milioane oameni.

Drept consecință a poluării intensive și a creșterii impactului negativ asupra sănătății, în ultimele două decenii a căpătat amploare conceptul de sustenabilitate și dezvoltare durabilă. Conform Comitetului de Sustenabilitate de la Universitatea din California, sustenabilitatea este: „integrarea bunăstării mediului, echității sociale și vitalității economice pentru a crea comunități prospere, sănătoase, diverse și rezistente pentru această generație și pentru generațiile viitoare. Practica sustenabilității recunoaște modul în care aceste probleme sunt interconectate și solicită o abordare sistemică și o recunoaștere a complexității.” [103]. Comparând definiția sustenabilității cu cea a ecovaleologiei, se fac remarcate similaritățile dintre cele două concepte, întrucât ambele se focusează pe studiul interacțiunilor dintre mediului și individ, și asupra formării unor conexiuni armonioase între acești doi factori. În mod similar, principiile atât a sustenabilității, cât și a valeologiei se extind asupra mai multor sfere de activitate: alimentație, educație, sănătate, industrie, mediu, societate, justiție, psihologie etc.

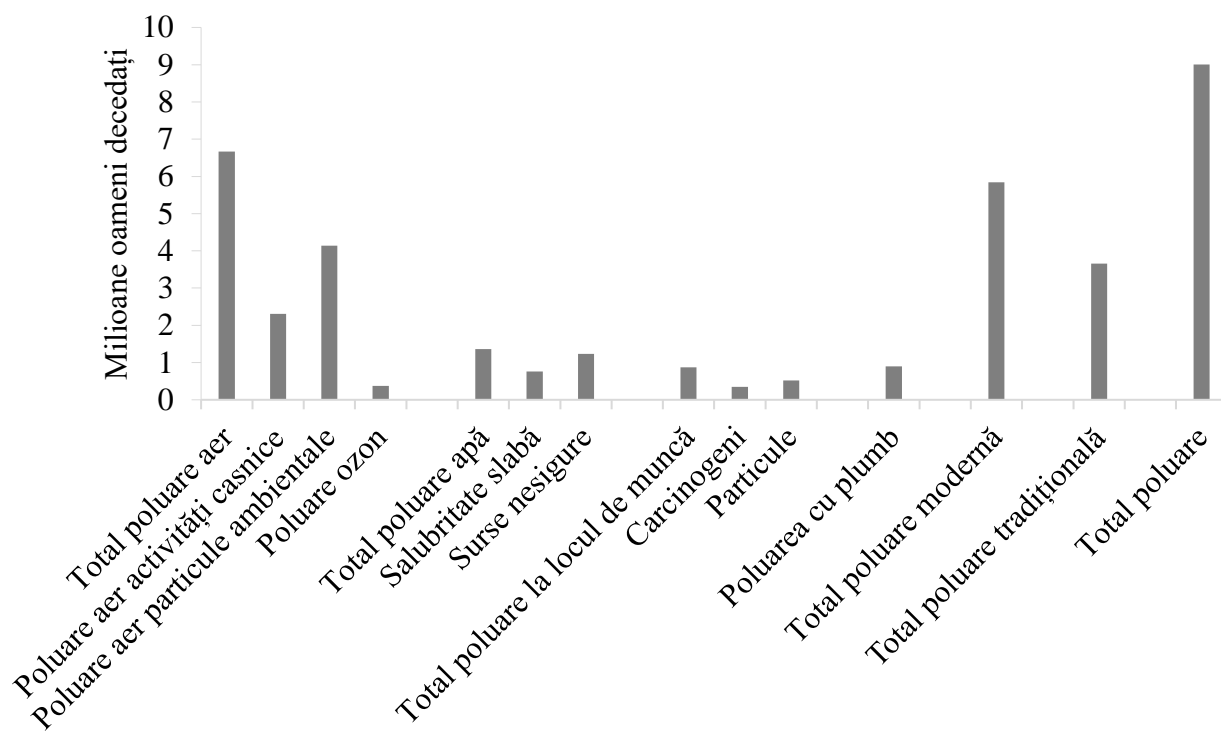


Figura 1.8. Estimarea globală a deceselor atribuite poluării (milioane) în funcție de tipul de poluare, 2019 [102]

Analiza detaliată a celor 17 Obiective de Dezvoltare Durabilă stabilite în 2015 de statele membre ale Națiunilor Unite [104], arată că valeologia răspunde la toate cele 17 obiective, iar subiectul discutat în lucrarea dată răspunde la minim 4 dintre ele: (1) stoparea foamei, obținerea securității alimentare și îmbunătățirea nutriției, promovarea agriculturii durabile, (2) asigurarea unei vieți sănătoase și promovarea bunăstării tuturor, la toate vârstele, (3) asigurarea unei educații incluzive și echitabile de calitate și promovarea oportunităților de învățare pe tot parcursul vieții pentru toți, (4) asigurarea unor modele de consum și producție durabile. Abordarea holistică a legăturii cauzale dintre problema poluării/degradării mediului și consecințele asupra sănătății, atât din punct de vedere a sustenabilității, cât și conform conceptului de ecovaleologie, oferă o notă intensă de actualitate acestei direcții științifice, precum și studiului efectuat.

1.6. Sinteza Capitolului 1

Antioxidanții sunt compuși care pot anihila speciile radicalice prin cedarea electronilor sau a atomilor de hidrogen. Aceștia aparțin diferitor clase de compuși și acționează prin diverse mecanisme de reacție: HAT, SET, SPLET, RAF, PCET, SEPT, SPLHAT și TMC.

La concentrații mari, compușii antioxidanți pot manifesta caracter prooxidant, comportându-se asemeni radicalilor liberi și participând la reacții de oxidare și deteriorare a substratului oxidabil, fapt care reprezintă o problemă științifică actuală. Activitatea prooxidantă depinde de numărul de grupări donatoare de electroni și de potențialul de oxido-reducere al antioxidanților. Concentrația compușilor antioxidanți și combinarea acestora în sisteme multicomponente similare celor din sursele naturale (fructe, legume, plante etc.) sunt factori decisivi în eliminarea problemei efectului prooxidant.

Combinarea diferitor antioxidanți reduce riscul manifestării caracterului prooxidant al compușilor reducători și generează efecte sinergice, aditive sau antagoniste. Tipul de interacțiune antioxidantă este determinat de mecanismul de interacțiune dintre antioxidanți: (i) regenerare reciprocă, (ii) formarea complexelor intermoleculare, dimerilor sau aducțiilor antioxidanți și (iii) efecte complementare.

Compușii non-antioxidanți precum acizii organici și zaharurile, pot avea influență pozitivă asupra mecanismului de acțiune a antioxidanților și asupra activității antioxidante rezultante, prin schimbarea pH-ului, a potențialului de ionizare, prin condiționarea deprotonării antioxidanților.

Strugurii sunt o sursă bogată de antioxidanți naturali, reprezentanții de bază fiind compușii fenolici. Polifenolii manifestă activitate antioxidantă datorită prezenței grupelor funcționale hidroxil și datorită factorilor chimico-structurali specifici. În struguri se găsesc concentrații considerabile de acizi organici și zaharuri, care pot influența activitatea antioxidantă a compușilor polifenolici sau a altor antioxidanți prezenți.

Ecovaleologia, ca direcție științifică interdisciplinară, investighează interacțiunile dintre om și mediul ambiant, precum și modul în care aceste interacțiuni pot afecta starea de sănătate a individului. Consumul antioxidanților în anumite concentrații și combinații reprezintă un mod primar al organismului de a relaționa cu mediul înconjurător, prin urmare, ecovaleologia este direcția științifică abilitată să cerceteze subiectului dat.

Rezultatele științifice raportate în literatura de specialitate și discutate în Capitolul I accentuează actualitatea studiului efectuat, și evidențiază direcțiile de cercetare neexplorate: (i) elucidarea interacțiunilor antioxidante dintre compușii naturali la concentrații similare celor din struguri, (ii) investigarea mecanismelor de interacțiune antioxidantă dintre compușii naturali din

struguri și a efectului mediului de reacție, (iii) abordarea subiectului interacțiunilor antioxidante din perspectiva conceptului de ecovaleologie și formularea concluziilor corespunzătoare privind consumul rațional și utilizarea eficientă a antioxidanților.

2. MATERIALE ȘI METODE UTILIZATE ÎN STUDIUL INTERACȚIUNILOR ANTIOXIDANTE

În acest capitol este expusă metodologia de cercetare pentru realizarea scopului și obiectivelor propuse, după cum urmează: materiile prime folosite la obținerea mostrelor destinate cercetării; metodele de obținere a extractelor din struguri și a probelor de lucru (extracție termică și stoarcere); metode de determinare a indicilor fizico-chimici de bază la diferite perioade de coacere a strugurilor (conținutului de zaharuri, aciditatea titrabilă, pH-ul și potențial redox în struguri); determinarea conținutului de acizi organici în struguri (utilizând electroforeza capilară); determinarea conținutului total de compuși fenolici în struguri (metoda Folin-Ciocalteu); determinarea conținutului de proantocianidine în struguri (metoda DMACA); determinarea conținutului de antociani în strugurii roșii (metoda pH diferențială); metodele de determinare a activității antioxidante a extractelor din struguri și a amestecurilor de antioxidanți (metodele DPPH[•], ABTS^{•+} și PRFe); tehnica de laborator utilizată pentru efectuarea analizelor spectrofotometrice (UV-Viz, Stopped-Flow, RES, RMN); metodele de calcul și determinare a interacțiunilor antioxidante dintre compușii antioxidanți și non-antioxidanți; metode didactice de integrare a conceptului de ecovaleologie în conținutul cursului de Chimie ecologică.

2.1. Materii prime și metode de obținere a probelor de lucru

Pentru determinarea conținutului unor compuși sau clase de compuși în strugurii autohtoni, au fost cercetați strugurii din soiurile Viorica, Riton, Fetească Neagră și Copceac (Figura 2.1), utilizați pe larg în vinificație în Republica Moldova. Soiurile Viorica și Riton sunt struguri albi, autohtoni, de selecție nouă, aromați, cu un conținut relativ ridicat de zaharuri și acizi titrabili. Strugurii din soiurile Fetească Neagră și Copceac sunt struguri roșii, autohtoni, intens utilizați în vinificație. Cercetările realizate anterior în baza soiurilor autohtone și de selecție nouă [105], [106] au demonstrat că acestea sunt rezistente și ajung, în anii favorabili, să ofere produse vitivinicole ce pot concura, la nivel de calitate, cu vinurile obținute din soiuri europene [105].

Strugurii din soiurile autohtone cercetate – Viorica, Riton, Copceac și Fetească Neagră, au fost obținuți de pe plantațiile experimentale ale I.P. Institutul Științific – Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare (Chișinău, Republica Moldova), aflat în zona centrală a țării. Pentru a urmări evoluția indicilor fizico-chimici de bază și specifici, în deosebi a conținutului de compuși fenolici și acizi organici, au fost colectate probe de struguri verzi (12 – 17 iulie), struguri la pârgă (12 – 17 august) și struguri copti (1 – 10 septembrie). Experimentele au fost efectuate pe durata a trei ani consecutivi, 2020 – 2022.

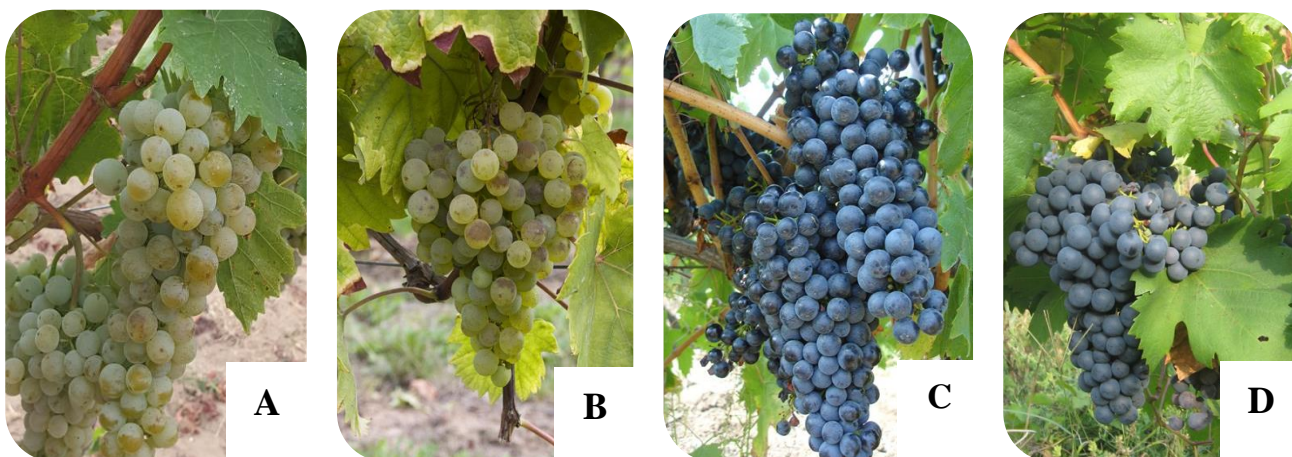


Figura 2.1. Soiurile de struguri analizate: A) Viorica, B) Riton, C) Feteasca Neagră și D) Copceac

Extracția compușilor bio-activi din struguri presupune anumite provocări, întrucât strugurii reprezintă un sistem multicomponent foarte complex, format din substanțe polare și nepolare. Astfel, înainte de extracție, bobitele întregi erau cântărite, apoi plasate într-un blender electric și strivite la putere minimă pentru asigurarea omogenizării pulpei și pielii, dar lăsând semințele intacte [107]. Pentru extracția compușilor bio-activi din struguri a fost utilizată metoda termică, după cum este reprezentat în Figura 2.2.

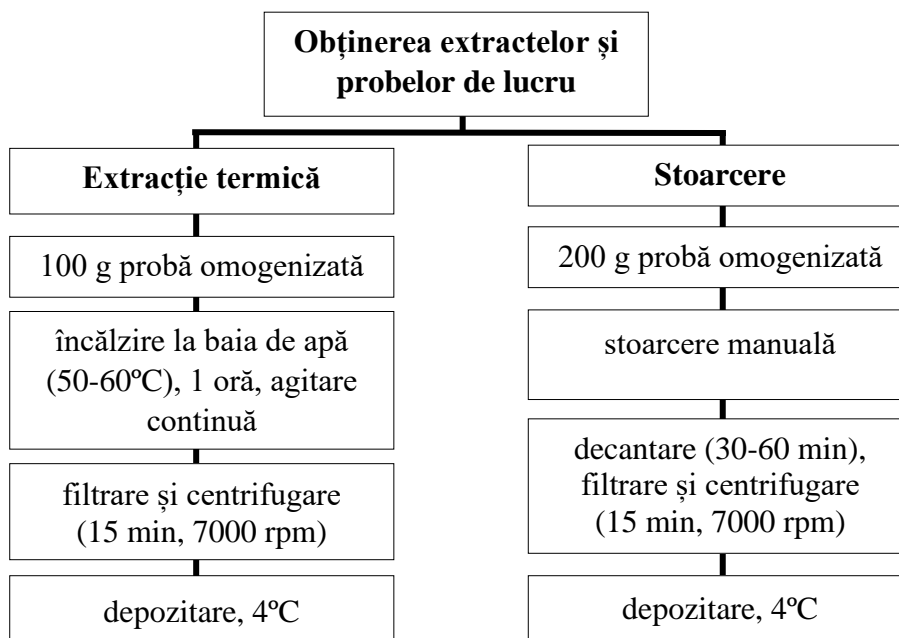


Figura 2.2. Schema de obținere a extractelor din struguri și a probelor de lucru

Probele de lucru obținute prin stoarcerea strugurilor (Figura 2.2) au fost necesare determinării indicilor fizico-chimici de bază (aciditate titrabilă, conținutul de zaharuri, pH, potențial redox) și a conținutului acizilor organici majoritari.

2.2. Metode de determinare a indicilor fizico-chimici de bază și specifici

Determinarea indicilor fizico-chimici de bază

Calitatea organoleptică a strugurilor de masă, precum și calitatea vinului, aroma și stabilitatea, depinde foarte mult de conținutul zaharurilor și acizilor organici din struguri. Conținutul total de zaharuri este unul dintre cei mai importanți factori ai calității strugurilor de masă, determinând gustul dulce al acestora și conținutul de alcool în vinuri. Glucoza și fructoza sunt zaharurile predominante în boboșele de struguri [15]. De asemenea, conținutul de zaharuri și aciditatea titrabilă din struguri sunt utilizați ca indicatori ai maturității fructelor.

- Conținutul de zaharuri în struguri a fost determinat prin trei metode diferite, în dependență de gradul de maturitate a strugurilor și de conținutul de zaharuri:
 - metoda refractometrică – utilizată pentru determinarea concentrației substanțelor uscate în sucul obținut prin stoarcere. Metoda dată măsoară optic indicele de refracție al sucului, rezultatele fiind exprimate în °Brix.
 - metoda densimetrică – pentru determinarea concentrației în masă a zaharurilor în sucul stors; a fost efectuată conform GOST 13192-73 [108].
 - metoda titrimetrică – determinarea concentrației în masă a zaharurilor efectuată prin metoda titrării indirecte, conform GOST 13192 [108].
- Aciditatea titrabilă – a fost determinată prin metoda titrării directe conform GOST 14252 [109].
- Determinarea pH-ului și potențialul de oxido-reducere - a fost realizată prin metoda potențiometrică conform GOST 26188-84 [110] cu pH-metrul „Mettler Toledo MA 235”.

Determinarea conținutului de acizi organici în struguri

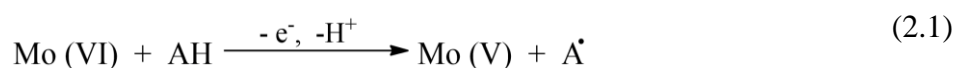
Pentru determinarea conținutului de acizi organici în strugurii din soiurile Viorica, Riton, Feteasca Neagră și Copceac a fost utilizată metoda electroforezei capilare la sistemul KAPEL 105M. Sistemul de electroforeză capilară KAPEL 105M este dotat cu un autosampler, având opțiunea de comutare automată a polarității, controlată de la computer. Principala caracteristică distinctivă a modelului KAPEL 105M este funcția de detectare spectrofotometrică. O lampă cu deuteriu este folosită ca sursă de lumină, iar un monocromator de difracție cu un interval spectral

de 190 – 380 nm este folosit ca element de dispersie. Acest interval permite selectarea lungimii de undă de detecție care este cea mai sensibilă la componentele țintă.

Electroforeza capilară, fiind modalitatea cea mai potrivită și eficientă de a separa moleculele încărcate, mari și mici, oferă o largă varietate de aplicații privind analiza lichidelor biologice. Astfel, conținutul acizilor organici a fost determinat în probele obținute prin stoarcere, întrucât acizii dați se concentrează în pulpa bachelor [79].

Determinarea conținutului total de compuși fenolici în struguri

Compușii fenolici au capacitate pronunțată de anihilare a radicalilor liberi din sistemele naturale, în mare parte, datorită prezenței grupelor hidroxil și a legăturilor duble conjugate [83], [85]. Astfel, în baza proprietăților antioxidante, compușii fenolici pot fi identificați și cuantificați. Reacția generală a metodei Folin-Ciocalteu presupune reducerea Mo(VI) până la Mo(V) în prezența compușilor fenolici antioxidanți [23] (reacția 2.1 [111]).



Pentru efectuarea testului dat, într-un balon cotat de 100 mL se adăugă 1 mL de probă, care, ulterior, este diluată cu 20 mL apă distilată. În balon se adaugă 1 mL soluție Folin – Ciocalteu, iar peste 5 min se adaugă 10 mL soluție de 20% Na₂CO₃ și se aduce la cotă cu apă distilată. Amestecul se lasă la întuneric 20 min, la t.c., după care este supus analizei la spectroscopia UV-Viz, la lungimea de undă 760 nm. Pentru creare probei martor, proba extrasă termic este înlocuită cu apă distilată, astfel că, până de efectuarea măsurătorii, soluția din balonul cotat devine incoloră. Rezultatele obținute au fost exprimate în g EAG/L, iar pentru aceasta a fost construită dreapta de calibrare după cum este arătat în Anexa 1, Figura A1.1.

Metoda Folin-Ciocalteu este pe larg utilizată în investigațiile privind conținutul de compuși fenolici în diverse produse vegetale și extractele acestora [107]. Deși această metodă este frecvent raportată în literatura de specialitate drept una accesibilă și eficientă, aceasta este sensibilă și față de substanțele antioxidante interferente precum vitaminele și enzimele.

Determinarea conținutului de proantocianidine în struguri

Conținutul de proantocianidine din extractele de struguri a fost determinat utilizând compusul cromofor 4-dimetilaminocinamaldehydă. Metoda DMACA a fost pentru prima dată raportată de McMurrugh și col. în 1978 [87]. Autorii menționează ca reactivul dat oferă reacție pozitivă exclusiv cu flavanoidele care posedă grupări hidroxil *meta*-orientate în ciclul A și o

legătură simplă în poziția C2 – C3 (Figura 2.3), acestea fiind catehina, epicatehina și proantocianidinele [87].

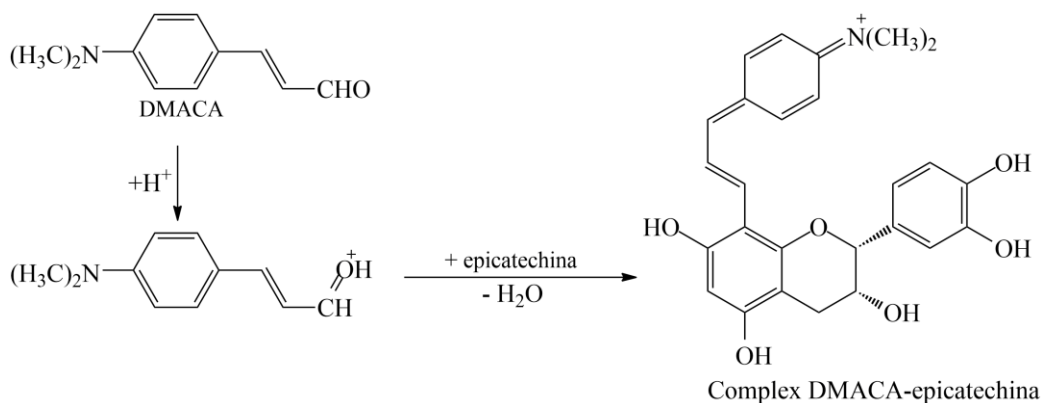


Figura 2.3. Schema de reacție a reactivului DMACA cu flavanolul epicatehina [112]

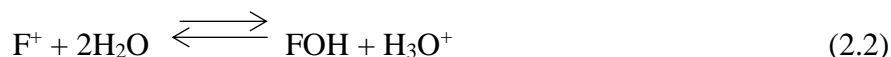
În experimentele efectuate, a fost utilizată metoda DMACA raportată de Arnous și col. [24], adaptată condițiilor de laborator existente. Astfel, soluția de DMACA a fost obținută prin amestecarea a 1 g de reactiv DMACA, 25 mL 37% HCl și un volum de MeOH până se atinge cota unui balon cotat de 100 mL. Soluția oranj obținută este lăsată peste noapte la -19°C . Pentru determinarea conținutului de proantocianidine, într-un balon cotat de 25 mL se transferă 1 mL probă de analizat diluată corespunzător, la care se adaugă succesiv 3 pic. de glicerol, 5 mL soluție DMACA și se aduce la cotă cu MeOH. Timpul de reacție este 7 min, după care se efectuează măsurătoarea la spectrometrul UV-Viz, lungimea de undă setată fiind 640 nm. Proba martor este preparată asemănător, prin excluderea reactivului DMACA. Rezultatele obținute au fost exprimate în g ECat/L, iar pentru aceasta a fost construită dreapta de calibrare după cum este arătat în Anexa 1, Figura A1.2.

Metoda DMACA are un avantaj mare comparativ cu alte metode de determinare a conținutului de proantocianidine, întrucât, antocianii – alți compuși fenolici din struguri, nu oferă semnale interferente. De asemenea, metoda dată este raportată drept una sensibilă și specifică [24].

Determinarea conținutului de antociani în strugurii roșii

Antocianii sunt pigmenții roșii din struguri sau alte produse vegetale colorate în nuanța dată. Sunt compuși solubili în apă și cu proprietăți antioxidante, anihilând eficient speciile radicalice [113]. Conținutul de antociani este un indicator important pentru evaluarea calității strugurilor și produselor din struguri, în special pentru vinuri. Faptul că antocianii sunt niște compuși cromofori, permite determinarea conținutului acestora recurând la metode accesibile [25]. În sensul dat, o importanță deosebită are echilibrul dintre formele colorate și incolore de

antociani, ce depinde de prezența unui mediu puternic acid care îndreaptă echilibrul reacției spre formarea cationului de flavilium de culoare roșie, formele de FOH fiind incolore (reacția 2.2) [25]:



Determinarea conținutului de antociani în extractele de struguri autohtoni a fost efectuată prin metoda pH diferențială, numită și metoda diluției în alcool etilic acidulat cu HCl, raportată în literatura de specialitate [25]. Prin urmare, într-un balon cotat de 25 mL se transferă 3 mL de probă diluată corespunzător, 12.5 mL EtOH acidulat (acidulat cu HCl, pH 1 – 2), 3 pic. de 37% HCl și se aduce la cotă cu apă distilată. Amestecul obținut se centrifughează timp de 15 min, la viteza 7000 rpm. Supernatantul este supus analizei spectrale la UV-Viz, la lungimea de undă de 530 nm. Rezultatele obținute la spectrometrul UV-Viz au fost înmulțite cu coeficientul de extincție al malvidin-3-glucozidei – $1056.7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [114] și au fost exprimate în mg EMalv/L.

2.3. Metode de determinare a activității antioxidante a extractelor din struguri și a amestecurilor de antioxidanți

În subcapitolul dat sunt descrise metodele cunoscute în literatura de specialitate de testare a activității antioxidante a substanțelor naturale, și anume: utilizarea compușilor cromofori comercial accesibili – DPPH^{*} și ABTS^{•+}, și a reacției de formare a Albastrului de Berlin. Datele au fost obținute la diferite spectrometre.

Metoda DPPH^{}*

Metoda de testare a activității antioxidante prin utilizarea radicalului liber 2,2-difenil-1-picrilhidrazil [20] este pe larg răspândită drept o metoda simplă și accesibilă de evaluare a activității antioxidante a extractelor din plante, produselor alimentare sau a compușilor individuali. Transferul atomilor de hidrogen sau a electronilor către DPPH^{*} determină o scădere a absorbanței la 510 - 520 nm, care poate fi observată la un spectrofotometru comun setat în regiunea vizibilă [20]. Radicalul DPPH poate fi anihilat de un antioxidant sau de o specie radicalică după cum demonstrează reacțiile 2.3 și 2.4 [20]:



Măsurători la spectroscopia UV-Viz. Pentru determinarea activității antioxidante a extractelor din struguri, a compușilor individuali și a amestecurilor de compuși naturali a fost utilizată metoda descrisă de Brand-Williams și col. [20]. Concentrația soluției de DPPH^{*} dizolvat

în 96% EtOH a fost verificată zilnic utilizând dreapta de calibrare, concentrația fiind de aproximativ 0.03 g/L (absorbanta = 1.000 ± 0.020 a.u.). Maximul de absorbție a DPPH^{*} a fost găsit la 517 nm cu un coeficient de extincție molar, ϵ , de $11858 \pm 16 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Activitatea antiradicalică a extractelor din struguri, a compușilor individuali și a amestecurilor de compuși a fost estimată conform procedurii descrise anterior [20]. La 3.9 mL de DPPH^{*}, s-au adăugat 0.1 mL de probă diluată corespunzător. Absorbanta a fost înregistrată după plasarea reacțiilor la întuneric și atingerea stării de echilibru: 30 min pentru AG, AA, DHF, AT și AC și 60 min pentru Que, Cat, Rut, Res, preparatul ENOXIL și extractele din struguri. Concentrația compușilor studiați a variat în limita conținutului acestora în struguri (detalii în Capitolul 3).

Pentru studiul interacțiunilor antioxidante în amestecurile Res – AA și ENOXIL – AA fost utilizată metoda raportată de Brand-Williams [20] adaptată corespunzător prin modificarea volumelor soluțiilor de reacție. Prin urmare, amestecul reactant a fost compus din: 3.8 mL DPPH^{*} dizolvat în 96% EtOH, 0.1 mL soluție etanolică de compus fenolic și 0.1 mL soluție etanolică de AA. Au fost cercetate trei abordări de realizare a reacțiilor:

- I) interacțiunea compusului fenolic cu DPPH^{*} (timp de reacție - 60 min), apoi adăugarea AA (timp de reacție - 30 min);
- II) interacțiunea AA cu DPPH^{*} (timp de reacție - 30 min), apoi adăugarea compusului fenolic (timp de reacție – 60 min);
- III) amestecarea ambilor antioxidanți și adăugarea DPPH^{*} (timp de reacție - 60 min).

Rezultatele obținute pentru extractele din struguri au fost exprimate în g EAA/L, iar pentru aceasta a fost construită dreapta de calibrare după cum este arătat în Anexa 1, Figura A1.3.

Măsurători la spectroscopia Stopped-Flow. Stopped-flow este o tehnică experimentală pentru studierea reacțiilor chimice rapide de ordinul a 1 ms. Tehnica dată a fost utilizată pentru analiza reacțiilor rapide dintre AA și/sau DHF și DPPH^{*}. Experimentele au fost efectuate în 98% EtOH și în matricea de vin. Matricea de vin a fost preparată prin dizolvarea a 5 g/L AT în amestecul apă – EtOH (12% v/v), după care pH soluției obținute a fost ajustat la 3.2 prin adăugarea soluției bazice de NaOH.

Soluțiile stoc de antioxidanți au fost preparate de două ori pe zi pentru a evita oxidarea acestora. Soluția de DPPH^{*} de 0.25 mM (în 98% EtOH) a fost preparată și verificată în fiecare zi. Pentru asigurarea dizolvării complete a compușilor, toate soluțiile stoc au fost supuse iradierii cu ultrasunete pentru 5 min. Intervalul lungimilor de undă operabile a fost stabilit în baza spectrului de absorbție determinat prin spectroscopia UV-Viz, maximele fiind la 517 nm pentru soluțiile în

EtOH și la 529 nm pentru soluțiile în matricea de vin (Figura 2.4). Această schimbare a lungimii de undă se datorează modificării solventului și pH-ului așa cum este descris în literatura de specialitate [115], [116].

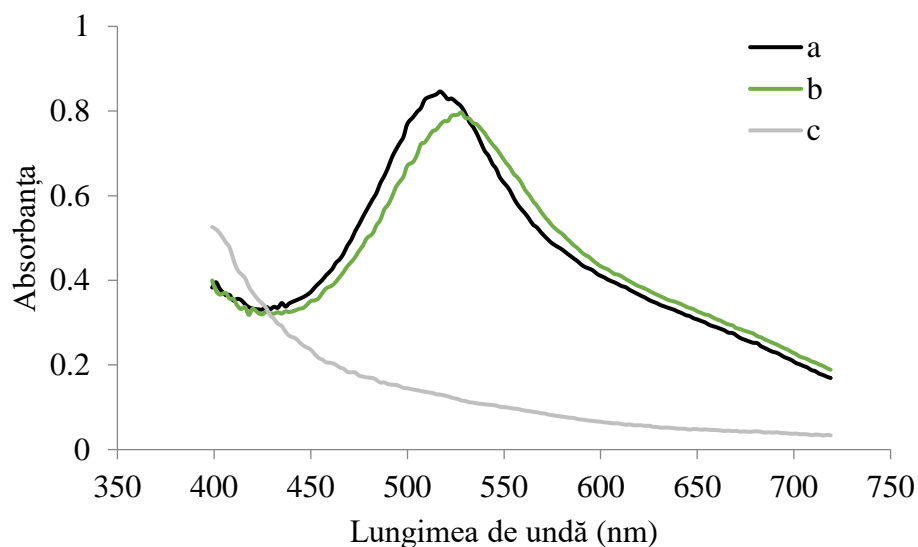


Figura 2.4. Spectrul de absorbție al DPPH• în (a) EtOH, (b) în matricea de vin și (c) spectrul DPPH-H în matricea de vin

Măsurători la spectroscopia RES. Investigarea reacțiilor cu participarea radicalilor liberi prin Spectroscopia Electronică de Spin permite detectarea speciilor radicalice și cuantificarea acestora. Pentru studiul interacțiunilor antioxidante dintre AA și DHF au fost preparate soluțiile stoc de antioxidanți – 130 μ M AA sau DHF, și soluția stoc de 0.05 mg/mL DPPH•, toți compușii fiind dizolvați în 96% EtOH. Variind volumul soluțiilor de fiecare antioxidant, au fost obținute raporturile de concentrație DHF/AA necesare pentru efectuarea reacțiilor (detalii în Capitolul 4). Amestecul de reacție a fost obținut prin amestecarea părților egale – 0.5 mL, de proba și DPPH•. Timpul de reacție setat a fost de 30 min, la întuneric.

Măsurători la spectroscopia RMN. Pentru studiul interacțiunilor antioxidante dintre DHF și AA în reacția cu DPPH•, a fost urmată abordarea descrisă anterior de Sawai și col. [117], cu utilizarea Spectroscopiei de Rezonanță Magnetică Nucleară. În experimentele din cadrul acestui studiu au fost obținute atât spectrele ^{13}C RMN, cât și ^1H RMN. Interacțiunile DHF și AA cu DPPH• au fost studiate în amestecul de solvenți deuterati acetonă- d_6 - metanol- d_4 și cloform- d_1 - metanol- d_4 , în tubul RMN. Concentrațiile utilizate în experiment au fost de 0.015 mmol de AA sau DHF și 0.03 mmol DPPH•. Astfel, raportul molar analizat a fost AA: DHF: DPPH• (1:1:2.6), având în vedere stoichiometria reacțiilor [86, 118].

Au fost urmate trei abordări de realizare a reacțiilor:

- I) amestecarea DHF și DPPH* (timp de reacție - 30 min), apoi adăugarea de AA (timp de reacție - 10 min), analiza RMN;
- II) amestecarea AA și DPPH* (timp de reacție - 10 min), apoi adăugarea DHF (timp de reacție - 30 min), analiză RMN;
- III) amestecarea ambilor antioxidanți, și adăugarea DPPH* (timp de reacție - 30 min).

Pentru a facilita analiza datelor, au fost stabilite semnalele caracteristice fiecărui compus, conform spectrelor ^{13}C RMN obținute și datelor din literatura de specialitate [119]: AA – δ 63.8, 70.9, 77.1, 120.1, 154.8, 173.6 (ppm); ADA – δ 74.8, 75.0, 77.1, 77.2, 89.4, 89.6, 107.0, 107.5, 171.7, 172.6 (ppm); DHF – δ 136.5, 170.8 (ppm); DPPH-H – δ 121.6, 126.2, 127.9, 129.6, 130.2, 131.2, 135.2, 137.8, 143.1, 147.5 (ppm).

Pentru clarificarea mecanismului de interacțiune antioxidantă dintre Res și AA în reacția cu DPPH*, au fost obținute spectre ^{13}C RMN, în amestecul de solvenți deuterati acetonă- d_6 – metanol- d_4 în tubul RMN. Au fost analizate raporturile molare AA : Res : DPPH* (1:1:2.6), luând în considerație stoichiometria reacțiilor [86]. Pentru obținerea spectrelor compușilor individuali au fost dizolvați 0.015 mmol de Res sau AA și 0.039 mmol pentru DPPH* într-un volum total de 0.7 mL. Pentru a acumula date despre reacția dintre Res sau AA și DPPH*, 0.015 mmol din fiecare antioxidant au interacționat cu 0.039 mmol de DPPH* într-un volum total de 0.7 mL. Mecanismele interacțiunilor antioxidante dintre Res și AA au fost investigate pentru două abordări de realizare a reacțiilor [117, 120]:

- I) amestecarea antioxidanților, apoi adăugarea DPPH* (timp de reacție - 1 oră), analiza RMN;
- II) interacțiunea Res cu DPPH* (timp de reacție - 1 oră), apoi adăugarea AA (timp de reacție - 15 min), urmată de analiza RMN.

Pentru a facilita interpretarea datelor ^{13}C RMN, următoarele semnale caracteristice au fost stabilite pentru identificare: AA – δ 64.3, 70.9, 77.1, 120.1, 154.8, 173.6 (ppm), ADA – δ 74.8, 75.0, 77.1, 77.2, 89.4, 89.9, 107.0, 107.5, 171.7, 172.6 (ppm), Res – δ 103.5, 106.7, 117.1, 127.8, 129.5, 130.0, 130.8, 141.7, 158.9, 160.4 (ppm), DPPH-H – δ 122.1, 126.2, 127.9, 129.6, 130.2, 131.2, 135.2, 137.8, 143.1, 147.5 (ppm), dimer Res – δ 58.9, 94.8, 103.4, 106.5, 108.2, 110.9, 117.2, 127.7, 129.5, 129.9, 130.8, 141.7, 159.0, 160.4 (ppm).

Metoda ABTS^{•+}

Metoda dată presupune utilizarea acidului 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic) și a persulfatului de potasiu pentru obținerea cation-radicalului ABTS^{•+} [21]. Radicalul dat este utilizat pe larg [121] pentru determinarea capacității antioxidante a extractelor din plante, a alimentelor, fluidelor clinice, a compușilor individuali etc. Prezența în soluție a compușilor antioxidanți determină reducerea ABTS^{•+} până la forma neutră – ABTS (Figura 2.5) [122], acest lucru fiind observat prin pierderea culorii verzi-albăstrui și decolorarea soluției. Metoda dată este potrivită pentru determinările colorimetrice, întrucât compusul ABTS^{•+} are mai multe maxime de absorbție la lungimi de undă diferite, care sunt ușor detectabile prin spectroscopia UV-Viz.

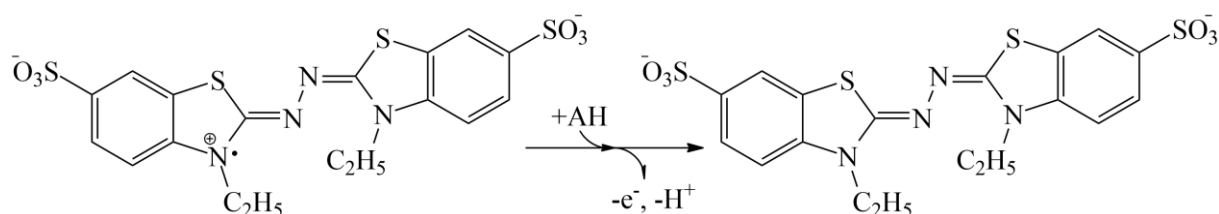


Figura 2.5. Schema reacției de anihilare a radicalului canion ABTS [122]

În investigația actuală, radicalul ABTS^{•+} a fost obținut conform metodei existente în literatura de specialitate [123]. Soluția de lucru de ABTS^{•+} a fost obținută prin diluarea cu apă distilată a soluției stoc până la valoarea absorbanței inițiale de 0.700 ± 0.020 u.a. Lungimea de undă la care au fost efectuate măsurătorile a fost de 734 nm. Amestecul de reacție a fost compus din 3.0 mL ABTS^{•+} și 0.3 mL probă diluată corespunzător [123], fiind lăsat la întuneric 20 min înainte de măsurătoare [22]. Soluția martor a fost formată din 3.0 mL ABTS^{•+} și 0.3 mL solvent. Rezultatele au fost exprimate în g ETrolox/L, iar pentru aceasta a fost construită dreapta de calibrare după cum este arătat în Anexa 1, Figura A1.4.

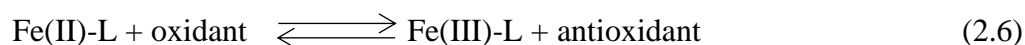
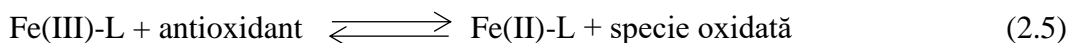
Similar radicalului DPPH, anihilarea ABTS^{•+} are loc prin două mecanisme principale: reacția HAT care implică transferul într-o singură etapă a unui atom de hidrogen și reacția SET în care un singur electron este transferat pentru a reduce un specia radicalică [36].

Metoda PRFe

Metoda PRFe este cunoscută în literatura de specialitate și sub numele de activitatea prooxidantă [22], întrucât se bazează pe puterea probelor de analizat de a reduce ionul de Fe(III) în reacția Fenton [124]. Soluția oxidantă a fost obținută conform metodelor existente [22, 124].

Amestecul de reacție a fost compus din 2 mL probă diluată corespunzător, la care s-a adăugat 2 mL soluție de 1% ferocianura de potasiu, totul fiind plasat în baia de apă la 50°C pentru 20 min. Apoi, 2 mL soluție de 35% acid tricloroacetic au fost transferați în amestecul de reacție și agitată fiola. Un volum de 2 mL de amestec obținut a fost transferat în altă fiolă, la care au fost adăugați 2 mL apă distilată și 0.5 mL soluție de 1% dodecil sulfat de sodiu pentru a împiedica precipitarea Albastrului de Berlin care se formează în amestecul de reacție. La final, au fost adăugați 0.5 mL soluție de 0.1% clorură de fier. Absorbanta maximă se găsește la lungimea de undă de 700 nm. Puterea de reducere a Fe(III) a fost exprimată în g EAA/L, iar pentru aceasta a fost construită dreapta de calibrare după cum este arătat în Anexa 1, Figura A1.5.

Din punct de vedere a chimiei reacției, metoda PRFe simulează reacția Fenton și poate fi descrisă prin ecuațiile 2.5 și 2.6 [124]:



În ecuațiile de mai sus L este ligandul cromogen care coordonează la ionul de Fe(II) sau Fe(III).

2.4. Tehnica de laborator utilizată pentru efectuarea analizelor spectrofotometrice

Spectrometria UV-Viz. Măsurătorile au fost efectuate la spectrofotometrele Lambda 25 UV-Viz (Perkin Elmer) și Cary 50 (Varian, Inc., Foster City, CA USA), la t.c. (25°C), folosind cuve de cuarț de 10 mm.

Spectrometria Stopped-Flow. Spectrele au fost înregistrate la t.c. (25°C) pe un sistem Biologic SFM-300 echipat cu trei seringi și capabil de amestecare secvențială, cu un detector cu matrice de diode de mare viteză. Datele privind fluxul oprit au fost analizate cu pachetul software SPECFIT32 (BioLogic Science Instruments, Seyssinet-Pariset, Franța), iar spectrele au fost adaptate la modele cinetice simple folosind Algoritmii Levenberg – Marquardt sau Simplex.

Spectroscopia RES. Datele au fost obținute la un spectrometru RES cu bandă X EMX (Bruker, Germania) care funcționează la 9.8 GHz, cu o frecvență de modulație de 100 kHz. Spectrele au fost înregistrate la t.c. (25°C) utilizând următorii parametri: câmp central 3490 G,

lățime de baleiaj 100 G, câștig receptor 40 dB, amplitudine de modulație 5 G, atenuare 10 dB (20000 mW), timp constant 40.96 ms.

Spectroscopia RMN. Spectrele RMN au fost înregistrate la t.c. (25°C), la un spectrometru Bruker AVANCE 400 echipat cu o sondă inversă de bandă largă de 5 mm cu gradient de câmp z, care funcționează la 400.13 și 100.61 MHz pentru nucleele ^1H și, respectiv, ^{13}C . Pentru spectrele ^{13}C RMN au fost înregistrate 10240 de scanări. Deplasările chimice sunt exprimate în părți per milion și sunt raportate la vârful rezidual nedeuterat al metanol- d_4 (3.31 ppm pentru ^1H și 49.0 ppm pentru ^{13}C).

2.5. Metode de calcul al interacțiunii antioxidante dintre compușii studiați

Urmând abordarea raportată de Brand-Williams și col. [20], activitatea antioxidantă a compușilor sau amestecurilor de compuși testați în reacția cu DPPH $^{\bullet}$ a fost estimată prin determinarea Concentrației Eficiente, definită ca concentrația de antioxidant necesară pentru a anihila 50% din radical. Parametrul dat a fost exprimat în mol de antioxidant per mol de DPPH $^{\bullet}$ (mol AH/mol DPPH $^{\bullet}$). Acest parametru este invers proporțional capacității antioxidante a compusului studiat, valorile mai mici ale CE $_{50}$ indicând asupra unei activități antioxidante sporite.

Pentru a determina parametrul CE $_{50}$, procentul de DPPH $^{\bullet}$ remanent la atingerea echilibrului în reacție a fost calculat conform ecuației 2.7. Pentru reprezentarea grafică, rezultatele obținute pentru fiecare probă au fost raportate la valorile mol AH/mol DPPH.

$$\% \text{DPPH}^{\bullet} \text{ remanent} = \left(\frac{A_{\text{proba}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100, \text{ unde} \quad (2.7)$$

%DPPH $^{\bullet}$ remanent – procentul de DPPH $^{\bullet}$ remanent;

A $_{\text{proba}}$ – absorbanta probei analizate la atingerea echilibrului în reacție;

A $_{\text{control}}$ – absorbanta probei la momentul zero.

Deoarece indicatorul CE $_{50}$ este corelat cu stoichiometria reacției, reprezentarea activității antioxidante ca valori CE $_{50}$ este mai exactă și ușor comparabilă cu datele cunoscute în literatura de specialitate.

Procentul de inhibiție a fost obținut folosind ecuația 2.8 și a fost utilizat în continuare pentru a determina tipul de IA.

$$\% \text{Inhibiție} = \left(1 - \frac{A_{\text{proba}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100, \text{ unde} \quad (2.8)$$

%Inhibiție – inhibiția DPPH $^{\bullet}$ exprimată în procente;

A $_{\text{proba}}$ – absorbanta probei analizate la atingerea echilibrului în reacție;

A $_{\text{control}}$ – absorbanta probei la momentul zero.

Tipul de interacțiune antioxidantă într-un amestec de compuși a fost calculat prin raportarea valorii experimentale a procentului de inhibiție a amestecului de antioxidanți la valoarea teoretică (ecuația 2.10) [14], după cum este arătat în ecuația 2.9:

$$IA = \left(\frac{\%I_e}{\%I_t} \right), \text{ unde} \quad (2.9)$$

$\%I_e$ – valoarea experimentală a inhibiției DPPH' exprimată în procente;

$\%I_t$ – valoarea teoretică a inhibiției DPPH' exprimată în procente.

$$\%I_t = \%I_A + \%I_O - \left(\frac{\%I_A \times \%I_O}{100} \right), \text{ unde} \quad (2.10)$$

$\%I_A$ și $\%I_O$ reprezintă inhibiția în procente a radicalului liber cauzată de antioxidant și, respectiv, de acidul organic, testați individual în reacția cu DPPH'.

Prin urmare, se constată un efect sinergic atunci când $IA > 1$; dacă $IA = 1$, atunci interacțiunea este aditivă; iar un $IA < 1$ corespunde unui efect antagonic.

Metoda FIC. Experimentele realizate la spectroscopia RES cu scopul de a determina tipul de interacțiune antioxidantă dintre AA și DHF au permis efectuarea calculelor prin două metoda: metoda descrisă mai sus și metoda FIC. Aceasta din urmă se descrie ca indicele de concentrație inhibitorie fracționată și este utilizat în microbiologie pentru evaluarea efectului sinergic dintre agenții antimicrobieni sau antifungici împotriva organismelor patogene, sau pentru a determina natura interacțiunilor în combinarea medicamentelor [125]. Prin urmare, indicele FIC este calculat prin sumarea valorilor FIC caracteristice fiecărui medicament testat. Pentru aceasta este nevoie de a cunoaște CE_{50} pentru fiecare compus testat individual și în combinație.

Astfel, calculul FIC pentru combinațiile de antioxidanți AA și DHF a fost efectuat conform ecuațiilor 2.11, 2.12 și 2.13, FIC pentru fiecare compus fiind determinat prin raportarea valorii CE_{50} a combinației de antioxidanți la valoarea CE_{50} pentru compusul individual.

$$FIC_{INDICE} = FIC_{AA} + FIC_{DHF} \quad (2.11)$$

$$FIC_{AA} = \frac{CE_{50} \text{ a AA în prezența DHF}}{CE_{50} \text{ a AA individual}} \quad (2.12)$$

$$FIC_{DHF} = \frac{CE_{50} \text{ a DHF în prezența AA}}{CE_{50} \text{ a DHF individual}} \quad (2.13)$$

În ecuațiile de mai sus, FIC_{AA} și FIC_{DHF} sunt valorile concentrației inhibitorii fracționate pentru AA și, respectiv, pentru DHF. În cazul indicelui FIC, se constată un efect sinergic atunci

când $FIC < 1$; dacă $FIC = 1$, atunci interacțiunea este aditivă; iar un $FIC > 1$ demonstrează prezența un efect antagonist.

2.6. Metode didactice de integrare a conceptului de ecovaleologie în curriculumul disciplinei Chimie ecologică

Pentru familiarizarea studenților cu conceptului de ecovaleologie au fost prezentate mai multe prelegeri în cadrul Universității de Stat din Moldova, la cursul de Chimie ecologică elaborat de acad. Gh. Duca. Prelegerea intitulată „Chimia alimentară și asigurarea calității alimentelor. Antioxidanții”, care a abordat materialul didactic dintr-o perspectivă ecovaleologică, a fost prezentată patru ani consecutivi studenților de la specialitățile Tehnologia produselor cosmetice și medicinale, Chimie, Chimie biofarmaceutică și Tehnologia chimică industrială (Anexa 3).

- Metodele de predare utilizate au fost multiple și enumeră:
 - metode de comunicare orală expositive (prelegerea, explicația, demonstrația logică) și conversative (discuția liberă, problematizarea);
 - metode de explorare mijlocită (analiza rezultatelor experimentale, analiza comparativă);
 - metode bazate pe acțiune reală (analiza studiilor de caz).
- Mijloacele de învățământ utilizate: proiector, computer, programul Microsoft PowerPoint pentru prezentarea materialului didactic ce a cuprins mijloace vizuale precum grafice, fotografii, tabele, scheme de reacție, structuri moleculare, efecte animate precum descompunerea imaginii și prezentarea ei pe secvențe, pentru a asigura înțelegerea problematicii supusă dezbaterii.

În scopul evaluării procesului de învățare și pentru autoevaluarea studenților a fost elaborat un chestionar la subiectul antioxidanților, ce cuprinde 18 întrebări referitoare la sursele și proprietățile compușilor dați, la avantajele și riscurile consumului de antioxidanți (Anexa 4). Chestionarul a fost completat de 30 studenți (în anul 2023), iar răspunsurile oferite au fost analizate pentru evaluarea impactului pe care l-a avut prelegerea intitulată „Chimia alimentară și asigurarea calității alimentelor. Antioxidanții” asupra (i) interpretării materialului predat, (ii) formării unor opinii referitoare la conceptul de antioxidanți și radicali liberi, (iii) formării concluziilor privind consumul antioxidanților din produse alimentare și din suplimentele alimentare. Chestionarul a fost completat de două ori de aceiași studenți – înainte și după audierea prelegerii pentru o estimare obiectivă a efectului produs de aceasta.

Sinteza Capitolului 2

Studiul interacțiunilor antioxidante dintre compușii fenolici și acizii organici, la concentrații similare celor din struguri, presupune utilizarea diverselor metode de analiză atât în probele de struguri, cât și în soluțiile experimentale de compuși antioxidanți naturali.

Struguri din soiurile autohtone de Riton, Viorica, Feteasca Neagră și Copceac au servit drept materii prime pentru determinarea conținutului de compuși fenolici și acizi organici. Au fost prelevate probe de struguri verzi, la pârgă și copti, în perioada anilor 2020 – 2022.

Pentru obținerea extractelor de struguri și a probelor de lucru, a fost utilizată extracția termică și stoarcerea strugurilor. Probele de lucru obținute prin stoarcere au fost utilizate pentru determinarea indicilor fizico-chimici de bază, inclusiv a conținutului de acizi organici majoritari; extractele obținute termic au servit drept material pentru determinarea indicilor fizico-chimici specifici și a proprietăților antioxidante ale strugurilor.

Metodele de analiză utilizate au fost preluate din surse științifice, unele dintre acestea fiind adaptate condițiilor experimentale caracteristice pentru actuala cercetare. Prin urmare, au fost utilizate multiple standarde tehnice internaționale pentru determinarea indicilor fizico-chimici de bază. Au fost aplicate trei metode spectrofotometrice de determinare a diferitor clase de compuși fenolici în strugurii analizați: metoda Folin-Ciocalteu (conținutul total de compuși fenolici), metoda DMACA (conținutul de proantocianidine) și metoda pH diferențială (conținutul de antociani). Pentru exprimarea rezultatelor, au fost utilizate standarde de referință ca: acidul galic, catechina și, respectiv, malvidin-3-glucozida.

Pentru determinarea activității antioxidante a probelor de struguri, a compușilor naturali și a amestecurilor de compuși naturali, au fost aplicate trei metode raportate în literatura de specialitate, ce presupun utilizarea compușilor cromofori: testele DPPH[•], ABTS^{•+} și PRFe de determinare a activității antioxidante. Exprimarea rezultatelor a fost realizată în echivalenți de Trolox și acid ascorbic. A fost descrisă relația de calcul a concentrației eficiente în scopul stabilirii parametrului dat pentru fiecare compus natural și pentru amestecurile de compuși testate.

Două metode de calcul au fost întrebuințate pentru determinarea tipului de interacțiune antioxidantă între compușii naturali testați, acestea fiind metode cunoscute în literatura de specialitate și pe larg utilizate în studiul substraturilor bio-active.

Determinarea tipului și mecanismelor de interacțiune antioxidantă a compușilor naturali a fost efectuat prin aplicarea metodelor și tehnicilor analitice, precum: spectroscopia UV-Viz, spectroscopia Stopped-Flow, spectroscopia RES și spectroscopia RMN.

Metodele didactice de integrare a conceptului de ecovaleologie în conținutul prelegerii „Chimia alimentară și asigurarea calității alimentelor. Antioxidanții” s-au axat pe metodele de comunicare orală expozitive și conversative, metode de explorare mijlocită, și metode bazate pe acțiune reală. În scopul estimării impactului prelegerii asupra adoptării concepției ecovaleologice de către tineri, a fost elaborat și propus pentru completare un chestionar la subiectul antioxidanților.

3. CARACTERIZAREA COMPOZIȚIEI CHIMICE A STRUGURILOR AUTOHTONI LA DIFERITE PERIOADE DE MATURARE

Monitorizarea, la diferite etape de creștere și procesare a strugurilor, a conținutului unor compuși sau a unor clase de compuși este o condiție esențială atât pentru fabricarea produselor calitative, cât și din punct de vedere al rolului benefic pe care îl au compușii bio-activi din struguri asupra sănătății omului [9]. În capitolul dat sunt prezentate datele privind conținutul unor clase de compuși: acizi organici, compuși fenolici, proantocianidine, antociani, compuși antioxidanți, în patru soiuri de struguri autohtoni – Viorica, Riton, Feteasca Neagră, Copceac, importanți în industria vinicolă. Rezultatele au fost obținute în diferite perioade de maturare a fructelor (în struguri verzi, la pârgă și copti), prin utilizarea multiplelor metodelor analitice – titrări acido-bazice, metodele Folin-Ciocalteu, DMACA, metoda pH diferențială și metodele DPPH^{*}, ABTS⁺⁺, PRFe pentru determinarea activității antioxidante. În baza rezultatelor obținute au fost stabilite raporturile de concentrație relevante studiului interacțiunilor antioxidante dintre compușii fenolici și acizii organici din struguri.

3.1. Indicii fizico-chimici de bază și specifici caracteristici strugurilor autohtoni

Parametrii fizico-chimici sunt primii indicatori ai calității strugurilor și ai gradului de maturitate a acestora. După cum se vede din Tabelul 3.1, la diferite perioade de timp indicii fizico-chimici variază corespunzător gradului de maturitate a strugurilor [126]. Conținutul de zaharuri crește de la 38 g/L (media) în strugurii verzi până la aproximativ 136 g/L la pârgă, ajungând la o medie de 227 g/L în strugurii copti – conținut de zaharuri care este considerat optim pentru recoltă și pentru producerea vinurilor. Conform literaturii, zaharurile se formează în struguri în urma procesului de fotosinteză, zaharoza fiind produsul primar [80]. Concentrațiile mici de zaharuri din strugurii necopti pot fi argumentate de consumul acestora pentru a menține dezvoltarea bachelor, proces care este mult mai intens în strugurii verzi și la pârgă. Odată cu atingerea maturității strugurilor, consumul zaharurilor este diminuat, înregistrându-se o acumulare semnificativă a acestora.

Evoluția acidității titrabile este invers proporțională conținutului de zaharuri. Astfel că, indicele dat scade de la aproximativ 28 g-ech. H₂SO₄/L în strugurii verzi până la aproximativ 5 g-ech. H₂SO₄/L în bobitele coapte [126]. Aciditatea titrabilă depinde, în principal, de prezența acizilor tartric, malic și citric (mai puțin). Acizii organici se află într-un proces continuu de formare și acumulare în bacele strugurilor, în special la strugurii verzi [80]. După perioada de pârgă, aciditatea titrabilă scade din cauza consumului acizilor organici în procesul de respirație celulară.

Determinarea pH-ului este un alt indice al gradului de maturitate și al calității strugurilor. Parametrul dat crește în probele analizate de la aproximativ 2.4 în strugurii verzi până la o medie de 2.9 în cei copti [126]. Această creștere a valorilor pH-ului este determinată de scăderea acidității titrabile, întrucât un conținut mai mic de acizi organici produce un mediu mai puțin acid.

Tabelul 3.1. Indicii fizico-chimici de bază determinați în soiurile de struguri Riton, Viorica, Feteasca Neagră și Copceac la diferite etape de maturare. Analize efectuate în suc de struguri storși.

Gradul de maturitate	Denumire soi	Conținut zaharuri, g/L	Aciditatea titrabilă, g-ech. H ₂ SO ₄ /L	pH	Potențial redox, mV
Struguri verzi	Riton	35.74±7.21	30.01±7.39	2.36±0.14	245.57±17.91
	Viorica	33.11±3.54	29.06±10.79	2.28±0.61	264.90±2.14
	Feteasca N.	43.39±10.89	25.27±2.58	2.37±0.15	260.17±7.94
	Copceac	39.78±8.65	28.01±6.19	2.43±0.10	254.83±7.01
Struguri la pârgă	Riton	140.25±10.82	9.15±2.19	2.61±0.16	245.55±8.98
	Viorica	158.13±14.42	9.73±1.68	2.79±0.13	235.35±8.13
	Feteasca N.	116.33±23.05	10.74±1.83	2.63±0.11	245.05±6.01
	Copceac	130.05±39.67	8.61±4.38	2.66±0.13	243.25±7.57
Struguri copti	Riton	215.73±16.59	5.17±0.06	2.82±0.09	233.85±6.15
	Viorica	221.85±32.46	5.79±0.55	2.91±0.02	228.70±1.27
	Feteasca N.	241.23±23.81	4.41±0.83	2.91±0.51	228.45±29.49
	Copceac	229.52±21.64	5.03±1.16	2.95±0.53	226.61±31.11

Potențialul redox este invers proporțional pH-ului și depinde de concentrația speciilor oxidante și reducătoare din probă. Prin urmare, potențialul redox scade de la media de 256 mV în strugurii verzi până la aproximativ 228 mV în bacele coapte [126]. Valorile diminuate ale parametrului dat relevă o capacitate mai mare a probelor de suc stors de a ceda electroni și, respectiv, o activitate antioxidantă mai bună.

Rezultatele obținute corespund cu datele raportate de alți autori referitoare la indicii fizico-chimici în soiurile de Viorica, Riton, Feteasca Neagră și Copceac [105].

Conținutul de acizi organici în strugurii autohtoni

Conținutul acizilor organici în strugurii de Viorica, Riton, Copceac și Feteasca Neagră variază în dependență de gradul de maturare a fructelor [127, 128]. După cum arată Figura 3.1 și după cum a demonstrat indicele de aciditate titrabilă (Tabelul 3.1), în strugurii verzi conținutul de acizi organici este mai mare, acesta diminuându-se odată cu atingerea maturității depline a strugurilor [127, 128].

Acizii tartric și malic reprezintă aproximativ 90% din totalul acizilor organici din struguri; pe lângă aceștia, mai sunt prezenți în concentrații mai mici acizii citric și oxalic [15]. Conform Figurii 3.1, AT atinge valorile maxime de aproximativ 15 g/L în bobitele verzi, iar AM ajunge

până la o medie de 22 g/L [127, 128]. Aceste valori maxime sunt succedate de o descreștere bruscă în perioada de pârgă, până la 6 – 8 g/L în cazul AT și până la 1 – 2 g/L pentru AM. La coacere, conținutul de AT și AM crește până la o medie de 8 g/L și, respectiv, 5 g/L. Acizii organici AO și AC se găsesc în struguri, în deosebi în cei copti, într-o cantitate mică care nu depășește 1 g/L, excepție făcând AC în strugurii verzi, care înregistrează valori de aproximativ 3 g/L (Figura 3.1) [127, 128].

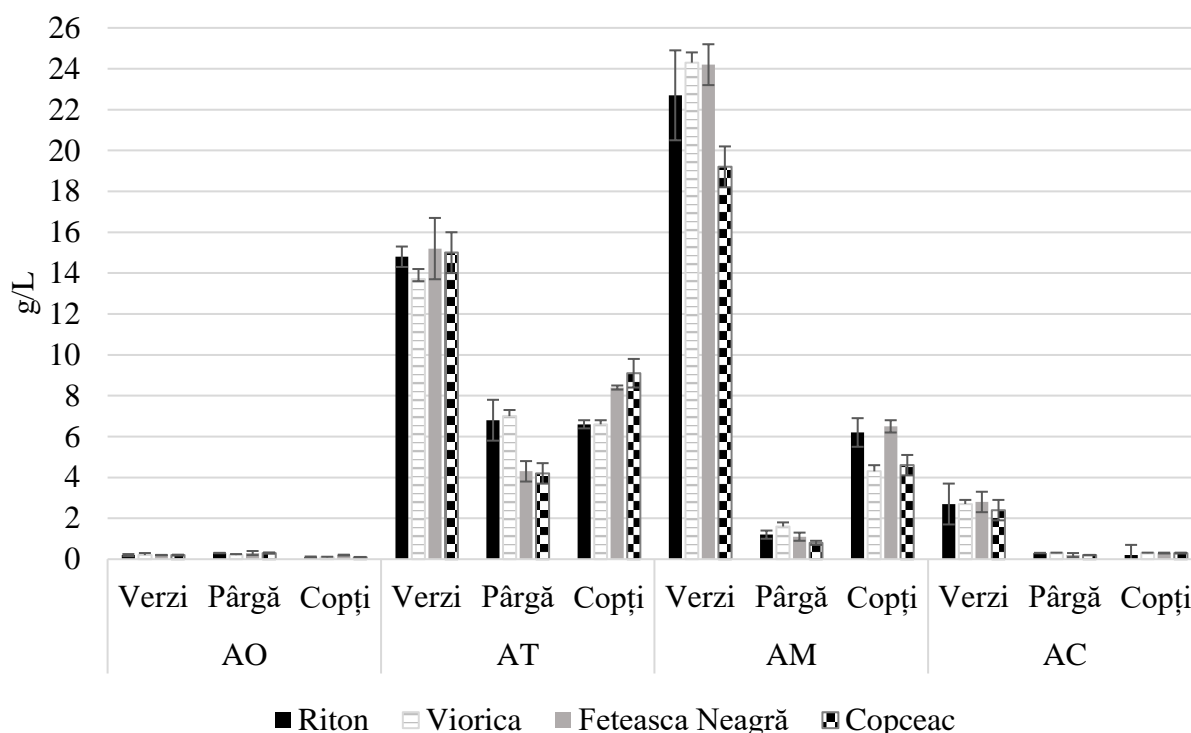


Figura 3.1. Conținutul de acizi organici – AO, AT, AM, AC, determinat în strugurii verzi, la pârgă și în strugurii copti din soiurile Riton, Viorica, Feteasca Neagră și Copceac

Rezultatele obținute corespund datelor și proceselor din struguri descrise în literatură [79, 80], conform cărora reducerea conținutului de acizi organici, în special a AT și AM, se datorează combustiei acestora în respirație – proces în care cei doi acizi sunt utilizați ca substrat respirator odată ce temperatura depășește 20°C. Acizii AT și AM se formează în frunzele și boabele verzi, strugurii fiind unicul fruct de origine europeană care acumulează concentrații semnificative de AT [79].

Conținutul total de compuși fenolici în strugurii autohtoni

Conținutul total de compuși fenolici a fost determinat prin metoda Folin-Ciocalteu, utilizând acidul galic în calitate de standard de referință, parametrul dat exprimând conținutul de polifenoli în probele analizate. Conținutul total de compuși fenolici presupune prezența în struguri a unui număr mare de substanțe ce derivă de la benzen și arene, la care se grefează una sau mai

multe grupe hidroxil [15]. Din această mare clasă de compuși fac parte: acizii fenolici (hidroxibenzoici și hidroxicinamici), fenolii volatili, substanțele tanante (catechine, proantocianidine), substanțe colorate (antocianii, flavonele), stilbeni etc. [15].

Figura 3.2 demonstrează că strugurii verzi au cel mai înalt conținut de compuși fenolici de aproximativ 4 g EAG/L, indiferent de soi [128–130]. Concentrația de compuși fenolici scade treptat și semnificativ în soiurile de Viorica, Riton și Feteasca Neagră în perioadele de pârgă și la coacere. Astfel că, la în strugurii copti conținutul total de compuși fenolici ajunge să fie de 1.2 – 1.5 g EAG/L în soiurile albe și de 2.4 g EAG/L în strugurii de Feteasca Neagră [128–130]. În cazul soiului Copceac, conținutul total de compuși fenolici înregistrează o scădere moderată până la 3.1 g EAG/L, această valoare menținându-se până la coacere [128–130]. Recent, Taran și col. [105] au raportat date similare referitoare la conținutul de compuși fenolici în soiurile Feteasca Neagră și Copceac.

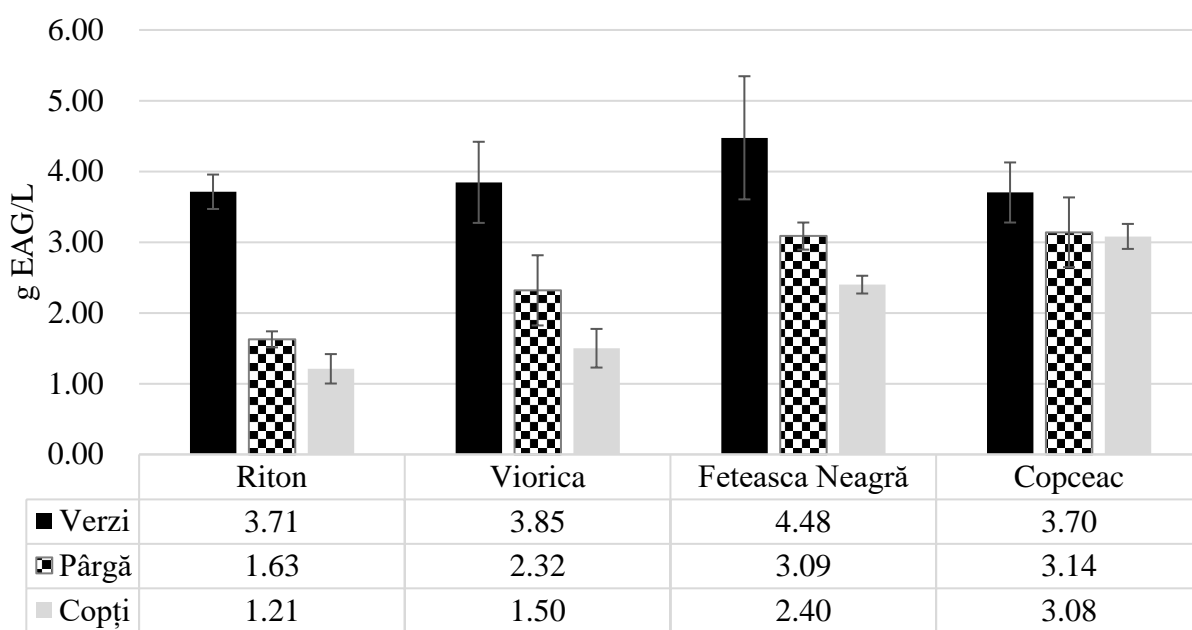


Figura 3.2. Conținutul total de compuși fenolici determinat în struguri verzi, la pârgă și în strugurii copti din soiurile Riton, Viorica, Feteasca Neagră și Copceac

Descreșterea conținutului de compuși fenolici înregistrată în struguri odată cu maturarea acestora se datorează migrației polifenolilor din pulpă (unde se găsesc când bobitele sunt verzi) în semințe [79]. În soiurile roșii, pe lângă acumularea în semințe, compușii fenolici se concentrează în pielea, unde participă la formarea pigmentilor roșii – antocianii. În urma extracției termice, o parte din antociani trec în extract, prin urmare, valorile descrise în Figura 3.2 sunt mai mari pentru Feteasca Neagră și Copceac – soiuri roșii cu un conținut ridicat de antociani.

Conținutul de proantocianidine în strugurii autohtoni

Conținutul de proantocianidine este exprimat în g ECat/L. Acest parametru indică prezența oligomerilor catehinei, epicatehinei și esterilor acestora cu acidul galic, fiind numite și taninuri condensate. Conform Figurii 3.3, cel mai mare conținut de proantocianidine este înregistrat în strugurii verzi, în special în soiul Viorica – aproximativ 1.2 g ECat/L [128–130].

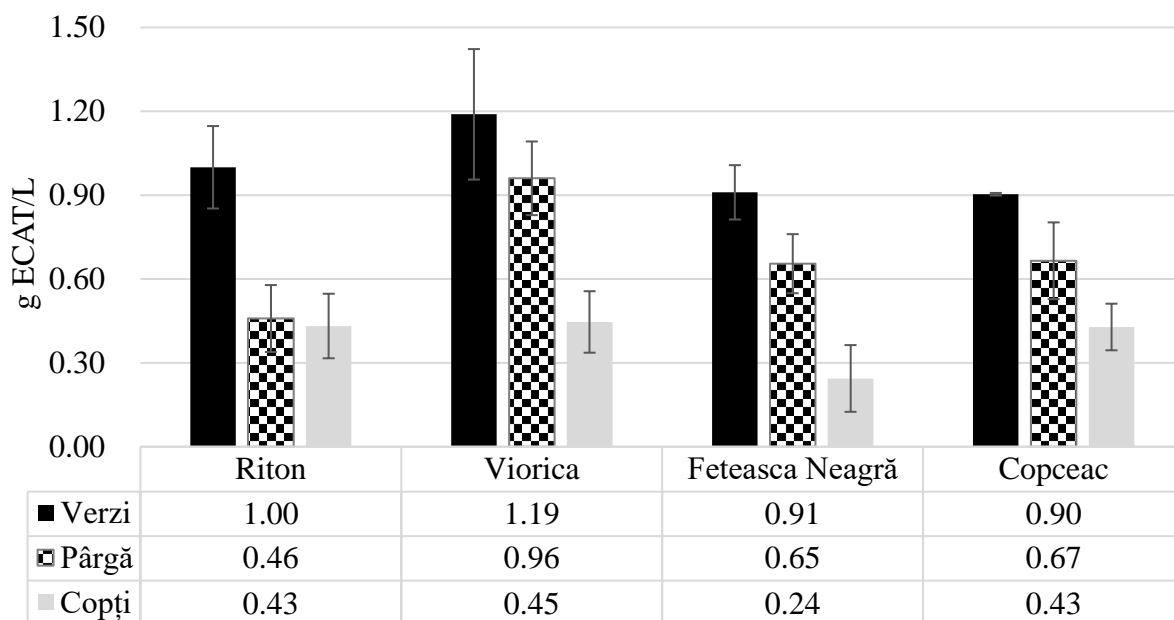


Figura 3.3. Conținutul de proantocianidine determinat în struguri verzi, la pârgă și în strugurii copti din soiurile Riton, Viorica, Feteasca Neagră și Copceac

Pe parcursul coacerii, indicele dat scade până la o medie de 4.3 g ECat/L în bacele coapte de Riton, Viorica și Copceac, și până la 0.24 g ECat/L în soiul de Feteasca Neagră [128–130]. Similar diminuării conținutului total de compuși fenolici (Figura 3.2), reducerea considerabilă (practic înjumătățirea) conținutului de proantocianidine este cauzată de migrația masivă a compușilor dați către semințe și piele pentru a participa la formarea acestora [79]. Aceste rezultate sunt în concordanță cu datele cunoscute în literatura de specialitate privind evoluția firească a conținutului de proantocianidine pe parcursul coacerii strugurilor [79].

Conținutul de antociani în soiurile de struguri roșii

Conținutul de antociani este exprimat în mg EMalv/L și presupune prezența a cinci compuși de bază – cianidina, poenidina, delfinidina, petunidina și malvidina [15]. Acest parametru a fost determinat doar în extractele soiurilor roșii de Feteasca Neagră și Copceac, întrucât antocianii reprezintă pigmentul roșu din pulpa și pielea strugurilor.

Formarea pigmentilor roșii în strugurii de Feteasca Neagră și Copceac în perioada de pârgă și la coacere este clar demonstrată de Figura 3.4. Conținutul maximal de antociani se observă în

soiul de strugurii Copceac, care conține aproximativ 500 mg EMalv/L în perioada de pârgă și 875 mg EMalv/L în strugurii copti [128–130]. Feteasca Neagră demonstrează prezența unei concentrații mai mici de antociani și anume 300 mg EMalv/L la pârgă și aproximativ 700 mg EMalv/L în bobitele coapte [128–130]. Compușii antociani se formează în perioadele de pârgă și coacere a strugurilor roșii, conținutul de antociani dublându-se în acest interval de timp [128–130]. Fenomenul dat este observat în mod natural prin colorarea bachelor în pigmentul roșu intens cunoscut la soiurile roșii. Majoritatea antocianilor sunt localizați în pielea unde pot exercita rolul de protecție a bobitelor contra factorilor patogeni, totuși o concentrație mică de antocini se află și în pulpă. Raportând rezultatele din Figura 3.4 la datele din Figura 3.2, putem justifica conținutul sporit de compuși fenolici (aproximativ 3 g EAG/L) din strugurii Feteasca Neagră și Copceac (comparativ cu valorile pentru Riton și Viorica) la etapele de pârgă și coacere.

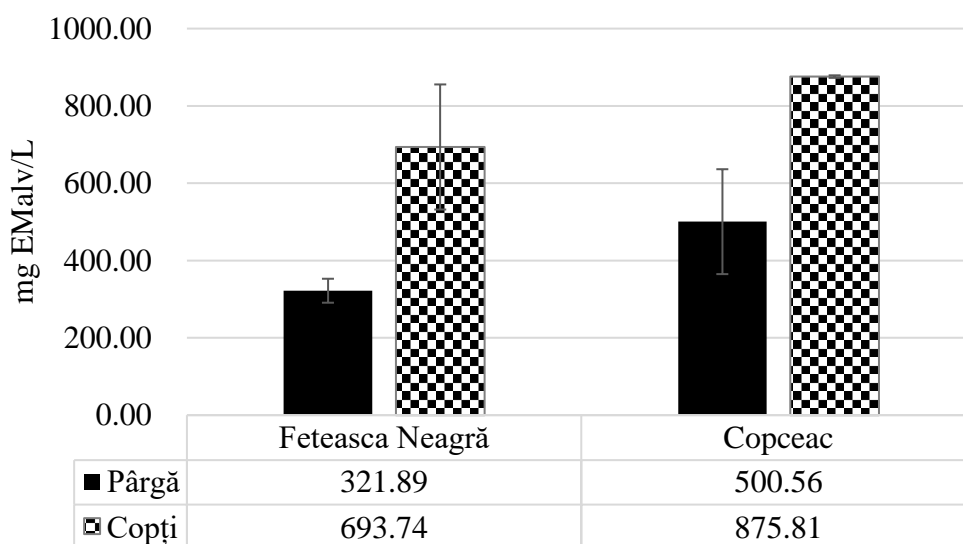


Figura 3.4. Conținutul de antociani determinat în struguri la pârgă și în strugurii copti din soiurile Feteasca Neagră și Copceac

Datele raportate în literatura de specialitate [105] demonstrează o bună corelare cu rezultatele prezentate în Figura 3.4, de asemenea, argumentează faptul că soiurile Feteasca Neagră și Copceac au un conținut relativ înalt de antociani, comparativ cu alte soiuri autohtone.

3.2. Activitatea antioxidantă a strugurilor studiați

Activitatea antioxidantă a extractelor din struguri autohtoni a fost determinată prin trei metode descrise în literatură – DPPH[•], ABTS^{•+} și PRFe. Decolorarea sau intensificarea culorii soluțiilor de radicali liberi demonstrează prezența, în probele analizate, a unui șir de compuși care posedă activitate antioxidantă și intra în reacție cu speciile radicalice: substanțe din clasa compușilor fenolici, vitamine, enzime etc. [15] Până în prezent, date privind activitatea

antioxidantă a soiurilor Riton, Viorica și Copceac obținute prin metodele enumerate nu au fost raportate de alți autori.

*Metoda DPPH**

Conform Figurii 3.5, în care sunt prezentate rezultatele privind activitatea antioxidantă a probelor analizate în reacția cu radicalului DPPH, după cum era de așteptat, extractele din strugurii verzi posedă cea mai mare activitate antioxidantă care depășește 2 g EAA/L [129–131]. Judecând după datele descrise în subcapitolul 3.1, activitatea antioxidantă sporită în aceste probe se datorează conținutului ridicat de compuși fenolici (Figura 3.2) și proantocianidine (Figura 3.3).

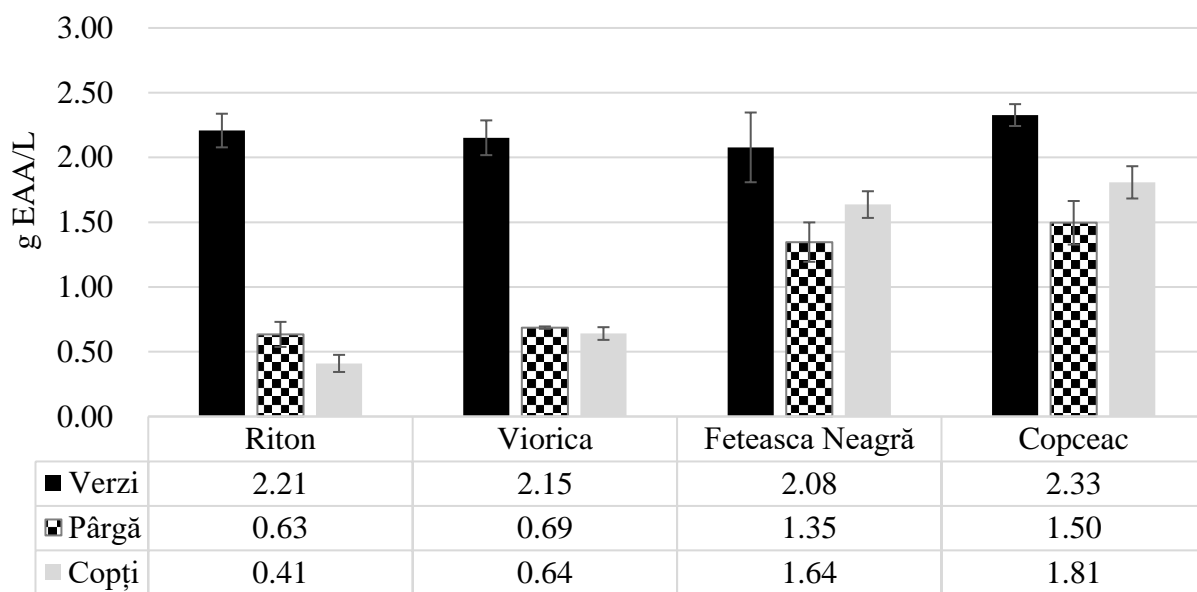


Figura 3.5. Activitatea antioxidantă a strugurilor verzi, la pârgă și strugurilor copti din soiurile Riton, Viorica, Feteasca Neagră și Copceac determinată prin metoda DPPH*

Extractele din struguri la pârgă și copti posedă o activitate antioxidantă mai redusă, în special în cazul soiurilor de struguri albi de Riton și Viorica – aproximativ 0.6 g EAA/L; strugurii de Feteasca Neagră și Copceac demonstrează o activitate antioxidantă echivalentă cu aproximativ 1.6 g EAA/L [129–131]. Faptul dat este cauzat de formarea și acumularea în perioada de pârgă și la coacere a antocianilor, care sunt compuși ce anihilează eficient DPPH* [132]. Studiile indică o corelare bună dintre conținutul de antociani în struguri și activitatea antioxidantă a acestora [129, 132, 133].

*Metoda ABTS***

Metoda ABTS** de determinare a activității antioxidante a extractelor de struguri a oferit rezultate similare metodei DPPH*, ceea ce confirmă corectitudinea efectuării experimentelor. Datele citate de literatura de specialitate indică că cele două metode de testare a activității

antioxidante oferă rezultate comparabile. Potrivit studiului efectuat de Prior și col. [36], ambii radicali liberi acționează prin sustragerea atomului de hidrogen sau a electronilor de la antioxidant prin mecanismele HAT și SET. De asemenea, radicalul $ABTS^{*+}$ este reactiv față de majoritatea antioxidantilor precum sunt compușii fenolici, tiolii și vitaminele.

Activitatea antioxidantă determinată prin metoda $ABTS^{*+}$ este exprimată în echivalenți de Trolox (Figura 3.6). Astfel că, extractele din struguri verzi posedă cea mai mare activitate antioxidantă de aproximativ 8 g ETrolox/L [129–131]. În strugurii copti de Riton și Viorica activitatea antioxidantă scade până la 1.6 g ETrolox/L, iar în cazul soiurilor Feteasca Neagră și Copceac – până la o medie de 5 g ETrolox/L, această diferență între soiurile albe și cele roșii datorându-se prezenței antocianilor în strugurii roșii [129–131].

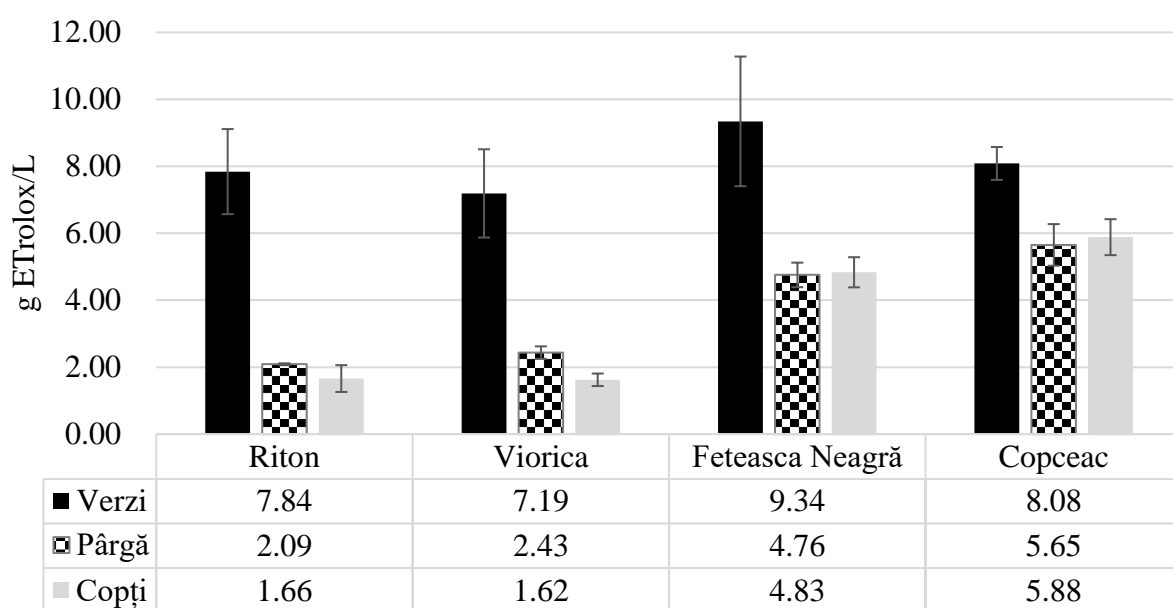


Figura 3.6. Activitatea antioxidantă a strugurilor verzi, la pârgă și strugurilor copti din soiurile Riton, Viorica, Feteasca Neagră și Copceac determinată prin metoda $ABTS^{*+}$

Metoda PRFe

Analiza puterii de reducere a $Fe(III)$ este exprimată ca echivalenți de acid ascorbic per litru. Rezultatele acestui test de determinare a activității antioxidante furnizează informații despre proprietățile prooxidante ale probelor. Metoda PRFe imită reacția Fenton și se bazează pe oxidarea-reducerea fierului $Fe(II)$ - $Fe(III)$ în prezența unui acid puternic și a antioxidantilor din probele analizate.

Extractele obținute în strugurii verzi demonstrează cea mai mare putere de reducere a $Fe(III)$ – mai mare de 3.6 g EAA/L (Figura 3.7), în același timp, și cea mai mare activitate prooxidantă [129–131].

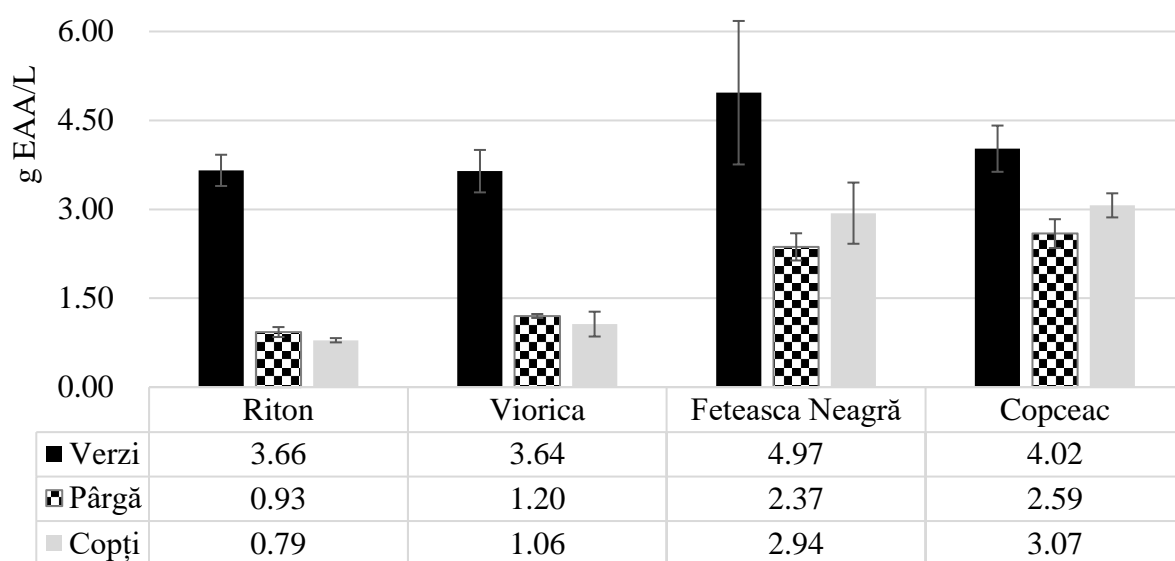


Figura 3.7. Activitatea antioxidantă a strugurilor verzi, la pârgă și strugurilor copti din soiurile Riton, Viorica, Feteasca Neagră și Copceac determinată prin metoda PRFe

Odată cu diminuarea conținutului de compuși fenolici (Figura 3.2) și conținutul de proantocianidine (Figura 3.3), puterea de reducere a Fe(III) este, de asemenea, în scădere la strugurii albi în perioada de pârgă și la maturitate, înregistrând valori de aproximativ 1 g EAA/L [129–131]. Pe de altă parte, pentru soiurile roșii Copceac și Feteasca Neagră, indicatorul PRFe depășește valoarea de 2.4 g EAA/L în perioada de pârgă și în strugurii copti, în contextul acumulării concentrației mari de antociani [129–131].

Figurile 3.5 – 3.7 demonstrează dependența activității antioxidante a probelor de struguri analizate de conținutul în dinamică a compușilor bio-activi, care depinde de procesele biochimice din struguri la anuite perioade de maturare. Figura 3.8 sunează concluziile formulate în subcapitolul dat, prin urmare, probele de struguri verzi posedă activitate antioxidantă maximală datorită conținutului maximal de compuși fenolici, inclusiv proantocianidine. Totodată, concentrațiile sporite de acizi organici în strugurii verzi pot influența semnificativ activitatea antioxidantă a compușilor reducători. Strugurii la pârgă sunt caracterizați de o activitate antioxidantă redusă, cauza principală fiind migrarea compușilor fenolici din pulpă în semințe și pielea. De asemenea, la această etapă are loc o acumulare moderată a zaharurilor și a antocianilor în soiurile de struguri roșii (Figura 3.8). Activitatea antioxidantă a strugurilor copti este semnificativ mai mare decât a celor la pârgă, totuși mai redusă decât a strugurilor verzi (Figurile 3.5 – 3.7).

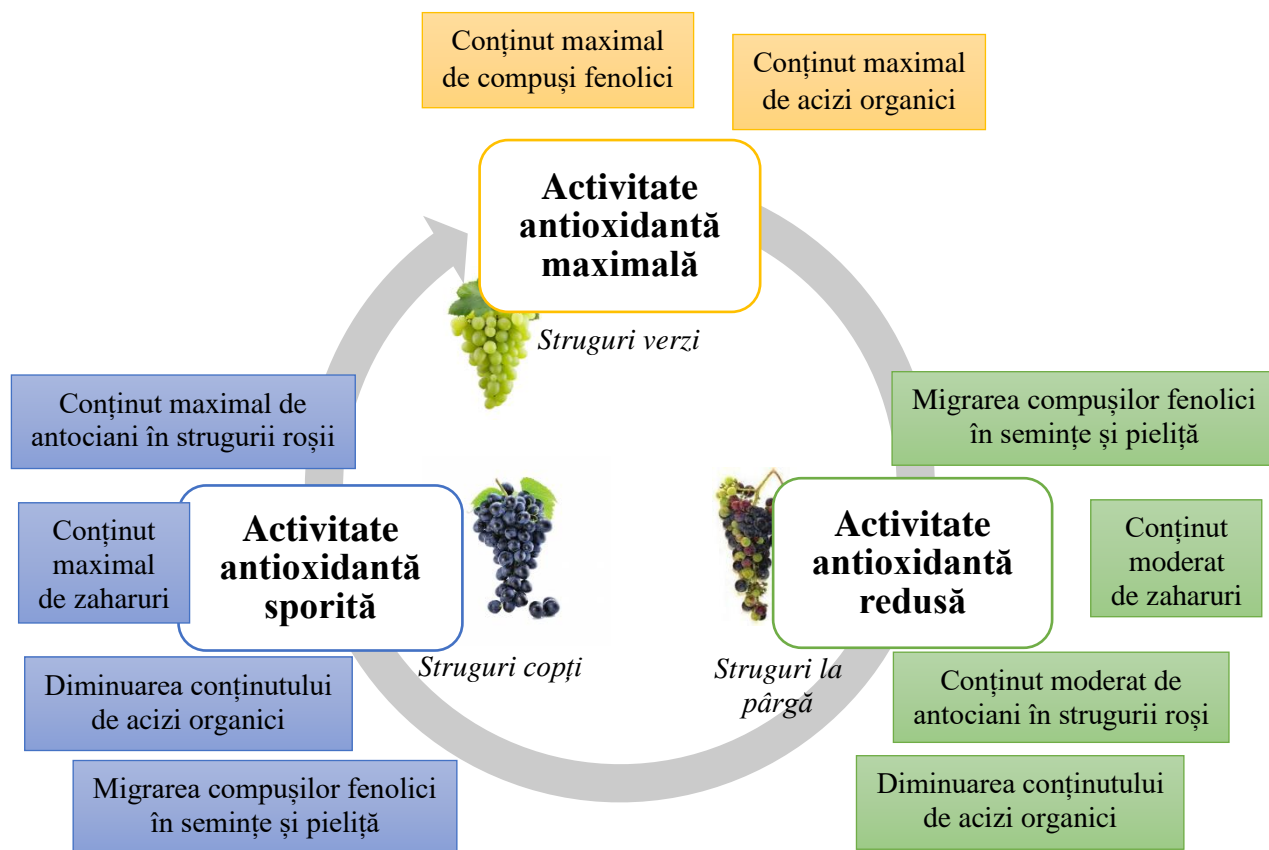


Figura 3.8. Dependența activității antioxidante de conținutul în dinamică a compușilor fenolici și non-fenolici din struguri la diferite perioade de maturare

Accelerarea procesului de formare a antocianilor (ce posedă activitate antioxidantă) în strugurii roșii contribuie la ameliorarea activității antioxidante a probelor obținute din soiurile roșii de Copceac și Feteasca Neagră (Figura 3.8). Conținutul ridicat de zaharuri în strugurii copti, de asemenea poate influența activitatea antioxidantă a probelor analizate.

3.3. Stabilirea concentrațiilor optime de compușilor fenolici și acizi organici pentru studiul interacțiunilor antioxidante

Deși conținutul compușilor fenolici și a acizilor organici din struguri variază mult în dependență de maturitatea strugurilor, regiune, condițiile climaterice, metodele analitice utilizate etc., rezultatele experimentale descrise în acest capitol, precum și datele cunoscute în literatura de specialitate (Tabel 3.2), au permis stabilirea concentrațiilor și raporturilor optime pentru efectuarea experimentelor de determinare a interacțiunilor antioxidante dintre compușii studiați. Tabelul 3.2 conține date privind conținutul de compuși antioxidanți (acizii ascorbic, dihidroxifumaric, galic, catehina, quercetina, rutina, resveratrol) și non – antioxidanți (acizitartric și citric) raportat în literatura de specialitate și conținutul aceluiași compuși determinat experimental și exprimat în echivalenți de compus standard.

În Tabelul 3.2 sunt prezentate datele raportate în literatura de specialitate și cele obținute experimental privind conținutul de compuși naturali în struguri, a caror interacțiuni antioxidante au fost investigate ulterior în lucrare. Tabelul conține rezultate experimentale obținute prin metode similare ce presupun etape ca: utilizarea bobîțelor integrale, omogenizarea materiei prime, timpul de extracție de maximum 1 oră, centrifugare.

Tabelul 3.2. Concentrația compușilor fenolici și acizilor organici în struguri conform datelor din literatura de specialitate și celor obținute experimental [128]–[130]

Compus	Concentrația compușilor în struguri conform literaturii de specialitate	Concentrația compușilor în struguri autohtoni
AT	- 3713.33 - 5050.00 mg/kg [134, 135]; - 2816.00 - 6775.56 mg/L [105, 136];	- 7675.22 ± 1273.77 mg/L [127, 128]**
AC	- 53.01 - 406.67 mg/kg [134, 135]; - 346.00 - 473.00 mg/L [105, 136];	- 275.54 ± 50.04 mg/L [127, 128]**
AA	- 48.67 - 235.29 mg/kg [134, 136]; - 50 - 250.00 mg/L [15, 137, 138];	- 41.33 ± 16.40 mg/L **
DHF	- nd	- nd
AG	- 0.60 - 336.00 mg/kg [135, 139, 140]; - 0.67 - 8.81 mg/L [136, 141];	- 1.03 ± 0.34 mg/L **
Cat	- 2.30 - 1170.33 mg/kg [135, 139, 140]; - 1.03 - 10.90 mg/L [136, 142, 143];	- 9.21 ± 2.95 mg/L **
Que	- 0.61 - 482.83 mg/kg [135, 139, 140]; - 0.31 - 4.66 mg/L [136, 142];	- 5.15±1.01 mg/L **
Rut	- 1.37 - 364.83 mg/kg [135, 139, 140]; - 2.02 - 200.95 mg/L [136, 141];	- 17.55±10.62 mg/L **
Res	- 0.17 - 32.65 mg/kg [139, 140]; - 3.52 - 43.95 mg/L [141, 142];	- 4.53±0.57 mg/L **
Proantocianidine	- 113.80 - 536.2 mg ECat/L [144];	- 690.99 ± 295.55 mg ECat/L [129]***
TCF*	- 1069.17 - 4834.50 mg EAG/kg [134, 145]; - 1749.00 - 3454.00 mg EAG/L [144];	- 2841.97 ± 1035.21 mg EAG/L [128–130] *

*TCF – conținutul total de compuși fenolici, parametru determinat prin metoda Folin-Ciocalteu. **Date obținute la Electroforeza capilară, în soiuri de struguri roșii autohtoni. ***Date obținute prin metoda DMACA. nd – nu a fost determinat.

Datele din literatura de specialitate selectate reflectă conținutul compușilor cercetați din strugurii diferitor zone teritoriale - Turcia, Grecia, Iran, Moldova, Slovenia, SUA, Africa de Sud, Algeria, pentru obținerea unor valori maxime și minime caracteristice diferitor regiuni geografice și pentru analiza comparativă cu datele experimentale obținute în struguri autohtoni. Pe lângă diferența creată de factorul geografic, oscilarea valorilor este puternic influențată de modul de

exprimare a datelor. Prin urmare, au fost comparate concentrațiile exprimate în aceleași unități de măsură.

Tabelul 3.2 conține și date obținute experimental în soiurile de struguri din Republica Moldova. Se observă că valorile determinate în strugurii autohtoni sunt comparabile cu cele ale strugurilor din alte regiuni. Spre exemplu, concentrația AT de 7675.22 ± 1273.77 mg/L din strugurii locali este comparabilă cu concentrațiile aceluiași acid declarate în literatura de specialitate: 2816.00 – 6775.56 mg/L [105, 136]; conținutul de AC în strugurii autohtoni (275.54 ± 50.04 mg/L) de asemenea este comparabilă cu cea a strugurilor din alte regiuni (346.00 – 473.00 mg/L) [105, 136]. Conținutul de acid ascorbic indentificat în strugurii autohtoni (41.33 ± 16.40 mg/L) este mai mic comparativ cu datele raportate anterior (50 - 250.00 mg/L) [15, 137, 138]. Concentrațiile de AG (1.03 ± 0.34 mg/L) și Cat (9.21 ± 2.95 mg/L) din strugurii locali sunt similare cu cele din literatura de specialitate, iar conținutul de Que (5.15 ± 1.01 mg/L) depășește puțin conținutul aceluiași compus în strugurii străini (0.31 - 4.66 mg/L) [136, 142]. Concentrații polifenolilor Rut (17.55 ± 10.62 mg/L) și Res (4.53 ± 0.57 mg/L) în soiurile autohtone sunt comparabile celor din alte regiuni: 2.02 - 200.95 mg/L [136, 141] și, respectiv, 3.52 – 43.95 mg/L [141, 142]. Soiurile de struguri autohtoni Viorica, Riton, Feteasca Neagră și Copceac au un conținut ridicat de proantocianidine (690.99 ± 295.55 mg ECat/L) [129] comparativ cu datele în soiurile străine (113.80 – 536.2 mg ECat/L) [144], iar conținutul total de compuși fenolici (2841.97 ± 1035.21 mg EAG/L) [128]–[130] este comparabil cu valorile raportate în literatura de specialitate pentru soiuri din alte regiuni (1749.00 – 3454.00 mg EAG/L) [144]. Prin urmare, aceste date au stat la baza formulării raporturilor de concentrații în care compușii analizați se găsesc în natură (Tabelul 3.3), iar apoi, utilizarea datelor respective pentru determinarea interacțiunilor antioxidante.

Tabelul 3.3 reflectă raporturile dintre cele mai mari și cele mai mici concentrații de compuși identificați în struguri conform literaturii de specialitate și datelor obținute experimental în strugurii autohtoni și intervalul de raporturi de concentrație în care au fost combinați compușii antioxidanți și non-antioxidanți pentru stabilirea tipului de IA.

Pentru stabilirea raporturilor conform datelor cunoscute în literatura de specialitate și rezultatelor obținute în strugurii autohtoni, au fost utilizate valorile prezentate în Tabelul 3.2. Se observă că, în mare parte, raporturile dintre datele raportate în literatura de specialitate sunt similare și comparabile cu cele obținute în strugurii autohtoni, fapt care asigură credibilitatea datelor experimentale.

Tabelul 3.3. Raporturile de concentrație ale compușilor fenolici și acizilor organici din struguri conform datelor raportate în literatura de specialitate și datelor experimentale. Raporturile de concentrație utilizate în experimentele de determinare a interacțiunilor antioxidante

Raporturi de concentrație								
		Conform datelor din literatura de specialitate		Conform datelor experimentale		Raporturi utilizate pentru determinarea IA		
Acid organic		AT	AC	AT	AC	AT	AC	DHF
Compus antioxidant	AA	11- 173	1 - 9	31 - 154	5 - 25	1 - 700	1 - 700	0.1 - 5
	AG	11 - 10113	0.2 - 706	11456	1901	1 - 2500	1 - 1500	0.1 - 5
	Cat	3 - 6578	0.1 - 459	7452	1237	1 - 1000	1 - 1000	0.1 - 5
	Que	8 - 21856	0.1 - 1116	1490	247	1 - 800	1 - 800	0.1 - 10
	Rut	10 - 3686	0.2 - 297	437	73	1 - 900	1 - 900	0.1 - 10
	Res	114 - 29706	1.6 - 2392	1694	281	1 - 5000	1 - 4000	0.05 - 5

Raporturile în care au fost amestecați compușii pentru determinarea efectului antioxidant au fost stabilite în limitele intervalelor declarate în Tabelul 3.3 (Date din literatura de specialitate și Date experiment). În ceea ce privește raporturile dintre AA și AT sau AC, se observă că acestea depășesc limitele maxime de 173 (pentru AT) și de 25 (pentru AC), raporturile AA – AT și AA – AC fiind în intervalul 1 – 700. Faptul dat poate fi explicat de abundența AT și AC în strugurii verzi și la pârgă, care, este de aproximativ 1000 ori mai mare decât conținutul de AA. Raporturile de concentrație stabilite pentru determinarea IA dintre compușii fenolici și AT sau AC sunt de ordinul sutelor și miilor, fapt care corespunde cu datele experimentale și cele din literatură (Tabelul 3.2). De asemenea, aceste date corespund cu raporturile de concentrații determinate în strugurii verzi, etapă la care conținutul de compuși fenolici, proantocianidine, acizi organici AT și AC este maximal. Concentrația compusului antioxidant DHF în struguri nu a fost determinată în această lucrare și nu a fost raportată în literatura de specialitate din cauza decarboxilării și oxidării rapide a compusului [118]. Respectiv, raporturile de concentrație dintre DHF și ceilalți antioxidanți investigați au fost stabilite pornind de la ideea că DHF este un constituent al ciclului Baround de transformare a acidului tartric și a produselor intermediare în acidul oxalic [146]. Cunoscând lucrul dat și puterea antioxidantă sporită a compusului [118], au fost stabilite concentrații mici de DHF pentru utilizarea în experimentele de determinare a interacțiunilor antioxidante.

3.4. Sinteza Capitolului 3

Maturarea strugurilor, acompaniată de schimbări biochimice, provoacă variații semnificative ale indicilor fizico-chimici de bază: conținutul de zaharuri crește de la 38 g/L în strugurii verzi până la aproximativ 227 g/L în strugurii copti; aciditatea titrabilă scade de la aproximativ 28 g-ech. H₂SO₄/L în strugurii verzi până la aproximativ 5 g-ech. H₂SO₄/L în bobitele coapte; pH-ul în struguri crește de la aproximativ 2.4 în perioada incipientă de dezvoltare a bobitelor până la o medie de 2.9 la coacerea fructelor; potențialul redox scade de la media de 256 mV în strugurii verzi până la aproximativ 228 mV în bacele coapte. Evoluția dată a indicilor fizico-chimici de bază este una firească și descrie principalele etape de dezvoltare a strugurilor.

În strugurii verzi conținutul de acizi organici este maximal, atingând valori cuprinse între 19 – 24 g/L. Acizii malic și tartric sunt acizi organici majoritari la toate etapele de maturare a bachelor, fiind înregistrate valori medii de 22 g/L și, respectiv, 15 g/L în strugurii verzi, 1.5 g/l și, respectiv, 5 g/L la pârgă și 5 g/L și, respectiv, 8 g/L în strugurii copti. Acizii citric și oxalic se găsesc în concentrații mici de maximum 3 g/L și, respectiv, 1 g/L în strugurii verzi, iar la coacere conținutul acestora scade până la un maxim de 0.3 g/L.

Conținutul de compuși fenolici atinge cele mai înalte valori în strugurii verzi, 3.7 – 4.5 g EAG/L, care, la coacere, scade până la o medie de 1.4 g EAG/L în strugurii din soiurile albe Viorica și Riton, și până la media de 2.7 g EAG/L în soiurile roșii Feteasca Neagră și Copceac. Similar, conținutul maximal de proantocianidine este înregistrat în strugurii verzi, 0.9 – 1.2 g ECat/L. La coacere, conținutul de proantocianidine scade până la o medie comună de 0.4 g EAG/L.

Conținutul de antociani în strugurii roșii înregistrează valori mai mari odată cu maturarea completă a fructelor, în special în soiul Copceac, unde conținutul de antociani crește de la 500 mg EMalv/L, în perioada de pârgă, până la 875 mg EMalv/L în strugurii copti. Fructele din soiul Feteasca Neagră înregistrează o sporire a conținutului de antociani în limita 321.9 mg EMalv/L (pârgă) – 639.7 mg EMalv/L (coacere).

Activitatea antioxidantă a strugurilor din soiurilor studiate este dependentă de conținutul de compuși fenolici, proantocianidine și antociani. Prin urmare, cele trei metode indică o activitate antioxidantă maximală a probelor de struguri verzi: ≈ 2.2 g EAA/L (metoda DPPH^{*}), 7.2 – 9.3 g ETrolox/L (metoda ABTS⁺⁺) și 3.6 – 5.0 g EAA/L (metoda PRFe). Odată cu dezvoltarea bachelor, indicatorii dați scad semnificativ în soiurile de struguri albi Viorica și Riton până la o medie minimă de 0.5 g EAA/L (metoda DPPH^{*}), 1.6 g ETrolox/L (metoda ABTS⁺⁺), 0.9 g EAA/L (metoda PRFe); în cazul soiurilor roșii de Copceac și Feteasca Neagră, activitatea antioxidantă se

menține la valori mai mari datorită prezenței antocianilor: 1.7 g EAA/L (metoda DPPH^{*}), 5.4 g ETrolox/L (metoda ABTS⁺⁺) și 3.0 g EAA/L (metoda PRFe).

Rezultatele experimentale și datele citate de literatura de specialitate au permis stabilirea raporturilor de concentrații dintre compușii fenolici și acizilor organici din struguri pentru studiul interacțiunilor antioxidante. Raporturile de concentrație stabilite sunt similare celor din struguri, unde concentrația acizilor tartric și citric este de aproximativ 150 – 700 ori mai mare decât conținutul de acid ascorbic, de 800 – 1000 ori mai mare decât concentrația de catehină, quercetină sau rutină și de 2000 – 5000 ori mai mare decât conținutul de acid galic și resveratrol.

Au fost publicate un articol în revistă națională de categoria B și 6 teze la conferințe naționale și internaționale la subiectul conținutului compușilor antioxidanți și non-antioxidanți în struguri și privind activitatea antioxidantă a strugurilor din soiurile autohtone Viorica, Riton, Feteasca Neagră și Copceac.

4. INTERACȚIUNI ANTIOXIDANTE DINTRE COMPUȘII NATURALI DIN STRUGURI

Interesul pentru studiul interacțiunilor antioxidante dintre compușii fenolici din struguri a crescut în ultimii ani, fiind raportate interacțiuni antagoniste, sinergice și aditive dependente de concentrația și combinarea compușilor [60, 147–149]. Explicațiile privind mecanismului de IA dintre compușii dați se referă la (1) procese de regenerare, (2) formarea complexelor intermoleculare, dimerilor sau aducțiilor antioxidanților și (3) efecte complementare care presupun efectul solventului, pH-ului, concentrației, solubilității etc. [149]. Totodată, mai multe cercetări au stabilit prezența proceselor de polimerizare dintre compușii fenolici, însoțite de scăderea numărului de grupări donatoare de electroni și efecte antagoniste [9, 45, 56, 63, 150].

Acizii organici precum acizii tartric și citric sunt compuși non – antioxidanți care se găsesc în cantități mari în struguri și pot influența activitatea antioxidantă a compușilor reducători [13, 14, 69]. Aceleași studii au dovedit prezența efectelor sinergice dintre diverși captatori de radicali liberi și acizii organici din struguri.

Tipul de IA este puternic afectat de concentrațiile compușilor participanți în reacție [45, 56, 151]. Conform datelor raportate, combinând compușii în concentrații similare celor din natură (în acest caz, similare celor din struguri) se pot obține efecte sinergice mai puternice [8, 13, 45, 47, 152, 153], deoarece sistemele multicomponente, similare cu cele din alimente naturale, din punct de vedere a compoziției și concentrației, posedă mecanisme de acțiune multiple și pot inhiba oxidarea în diferite faze ale acesteia [17].

Astfel, în capitolul de față sunt expuse rezultatele investigațiilor privind influența diferitor concentrații de acizi organici – acizii tartric, citric și dihidroxifumaric, asupra activității antioxidante a compușilor fenolici și non – fenolici din struguri: catechină, quercetină, rutină, resveratrol, acid galic și acid ascorbic. Sunt cercetate efectele sinergice dintre acidul ascorbic și preparatul ENOXIL, mecanismele de interacțiune antioxidantă dintre acidul ascorbic – acidul dihidroxifumaric și acidul ascorbic - resveratrol. Rezultatele au fost obținute prin aplicarea diverselor metode spectrometrice și tehnici de laborator: UV-Viz, Stopped-Flow, RES, RMN.

4.1. Activitatea antioxidantă a compușilor fenolici în prezența acizilor organici – determinarea valorilor CE₅₀

Utilizarea metodei DPPH* pentru investigarea activității antioxidante a compușilor individuali și pentru determinarea tipului de interacțiune antioxidantă dintre compușii naturali este frecvent raportată în literatură [14, 63, 69, 86]. Radicalul DPPH poate fi anihilat atât prin mecanismele HAT, cât și prin mecanismele SET [36], în funcție de condițiile de reacție. Acest

lucru indică faptul că, pentru a fi neutralizat, DPPH^{*} va capta fie electroni, fie atomi de H de la antioxidanți.

Compușii fenolici posedă o activitate antioxidantă sporită împotriva diferitor radicali liberi [9, 45, 63, 86] datorită prezenței grupărilor funcționale și a legăturilor duble conjugate. Tabelul 4.1 prezintă valorile CE₅₀ obținute pentru compușii cercetați, aplicați individual, în reacția cu radicalul DPPH. De asemenea, sunt prezentate valorile CE₅₀ pentru combinațiile formate din AA, Cat, Que, Rut, Res sau AG în amestec cu acizi organici – DHF, AT sau AC. Cu cât este mai mică valoarea CE₅₀ pentru un compus, cu atât este mai mare activitatea antioxidantă. Astfel, din șirul compușilor testați, AG este cel mai puternic antioxidant în aceste condiții de reacție, urmat de ceilalți compuși în ordinea: Que < Cat = DHF < AA = Rut < Res [154–156].

Rezultate și tendințe similare au fost raportate de alți autori [9, 63, 86, 157]; puținele diferențe sunt atribuite utilizării diferitor solvenți, fapt care s-a dovedit a avea o influență semnificativă asupra mecanismului de acțiune al antioxidanților.

Stilbenul Res posedă o bună capacitate antioxidantă împotriva speciilor reactive de oxigen, în special împotriva anionului superoxid [158]. Totuși, în reacția cu DPPH^{*}, Res demonstrează activitate antioxidantă scăzută, aceste date fiind susținute de studiile anterioare [9, 63, 86, 157]. Compusul DHF, care în investigația dată este tratat ca un acid organic, posedă o bună activitate antioxidantă, având CE₅₀ = 0.18, ceea ce înseamnă că într-un sistem multicomponent, chiar și în concentrații mici similare celor din struguri, DHF poate influența activitatea antioxidantă totală [154]. Spre deosebire de DHF, acizii organici AT și AC au prezentat o activitate nesemnificativă de captare a radicalilor liberi – chiar și la concentrații mari, AT și AC sunt capabili să anihileze doar 3% din radicalii liberi [154]. Rezultate similare au fost raportate anterior [10, 14, 69].

Prezența acizilor organici în amestecurile de reacție scade pH-ul soluției, acest parametru fiind dependent de concentrația de acizi organici (Tabelul 4.2) [154]. Astfel de valori ale pH-ului sunt reprezentative pentru vinuri, sucuri naturale sau fructe [15, 159].

Tabelul 4.1. Valorile CE₅₀ pentru compușii antioxidanți individuali și pentru combinațiile acestora cu acizii organici [154]

		Compus antioxidant						
		AA	Cat	Que	Rut	Res	AG	DHF
Timpul de reacție, min		30	60	60	60	60	30	30
Fără acizi organici		<i>0.24±0.00</i>	<i>0.18±0.02</i>	<i>0.15±0.00</i>	<i>0.24±0.00</i>	<i>1.15±0.03</i>	<i>0.06±0.00</i>	<i>0.18±0.01</i>
CE ₅₀ (mol AH/mol DPPH')	AT	16×10 ⁻⁴ N	0.22±0.01	0.19±0.00	0.16±0.01	0.25±0.01	1.22±0.01	0.06±0.00
		160×10 ⁻⁴ N	0.22±0.01	0.18±0.01	0.18±0.00	0.26±0.00	0.98±0.00	0.06±0.01
		800×10 ⁻⁴ N	0.23±0.00	0.18±0.01	0.18±0.00	0.27±0.01	1.78±0.00	0.06±0.01
	AC	16×10 ⁻⁴ N	0.23±0.00	0.18±0.00	0.17±0.00	0.25±0.00	1.59±0.02	0.06±0.00
		160×10 ⁻⁴ N	0.23±0.00	0.21±0.02	0.18±0.03	0.26±0.00	1.14±0.00	0.05±0.00
		800×10 ⁻⁴ N	0.24±0.01	0.18±0.00	0.18±0.02	0.29±0.01	2.83±0.04	0.06±0.00
	DHF	2×10 ⁻⁴ N	0.20±0.00	0.13±0.00	0.14±0.01	0.21±0.00	1.32±0.01	0.09±0.00
		4×10 ⁻⁴ N	0.17±0.00	0.12±0.00	0.13±0.00	0.17±0.00	2.19±0.04	0.08±0.01
		8×10 ⁻⁴ N	0.09±0.01	0.09±0.00	0.09±0.00	0.09±0.02	1.01±0.01	0.06±0.00

Tabelul 4.2. Valorile pH-ului pentru fiecare concentrație de acid organic (AT, AC și DHF) utilizată în experimente. Solventul utilizat este EtOH [154]

		Acizi Organici			96% EtOH
		AT	AC	DHF	
Concentrații	16×10 ⁻⁴ N	4.43	4.42		6.58
	160×10 ⁻⁴ N	3.75	3.89		
	800×10 ⁻⁴ N	3.10	3.58		
	2×10 ⁻⁴ N			4.04	
	4×10 ⁻⁴ N			3.86	
	8×10 ⁻⁴ N			3.64	

Prin adăugarea acizilor organici – DHF, AT sau AC, la amestecurile de reacție dintre compusul antioxidant și DPPH^{*}, s-au observat diferite rezultate [154]. Scăderea valorilor CE₅₀, care poate fi interpretată ca o activitate antioxidantă cooperantă dintre doi compuși, ce produce creșterea activității antioxidante totale a amestecului, a fost înregistrată pentru combinațiile: AA – DHF, AA – AT și pentru polifenolii Cat, Que sau Rut în amestec cu DHF [154]. Contrar rezultatelor date, adăugarea acizilor AT sau AC la soluțiile de compuși fenolici au o influență negativă asupra valorilor CE₅₀ ale amestecurilor, cauzând, în majoritatea cazurilor, creșterea acestui parametru [154].

Concentrația de acizi organici s-a dovedit a fi importantă pentru activitatea antioxidantă a amestecurilor testate, totuși o tendință predominantă nu a fost observată. De exemplu, odată cu creșterea concentrației de DHF de la 2×10⁻⁴ N la 8×10⁻⁴ N, CE₅₀ pentru amestecurile formate din DHF și AA, Cat, Que sau Rut scade, dar devine mai mare în probele cu DHF și Res sau AG [154].

În ceea ce privește ceilalți acizi organici, prezența AT sau AC la concentrații de 16×10⁻⁴ N și 160×10⁻⁴ N are o influență ușor pozitivă asupra activității antioxidante a AA, dar o influență negativă sau nici o influență în amestecurile cu Cat, Que, Rut și pentru majoritatea combinațiilor cu AG [154]. Prezența concentrațiilor de 16×10⁻⁴ N și 800×10⁻⁴ N de AT sau AC în amestecurile de reacție Res – DPPH^{*} produc o creștere semnificativă a valorilor CE₅₀, în special pentru combinarea Res – 800×10⁻⁴ N AC [154].

Investigarea influenței diferitor concentrații de DHF, AT sau AC asupra activității antioxidante totale arată că mediul acid caracteristic strugurilor și produselor din struguri poate afecta pozitiv sau negativ reactivitatea compușilor fenolici și non – fenolici. În mod natural, asemenea mecanisme au loc în urma atacului microorganismelor patogene asupra bachelor, urmat de mărirea pH-ului și activarea proprietăților antioxidante a compușilor fenolici în scopul protecției [80]. Deși datele din Tabelul 4.1 demonstrează că prezența acizilor organici afectează activitatea antioxidantă a compușilor fenolici și AA, provocând variația valorilor CE₅₀, aceste

rezultate sunt insuficiente pentru clasificarea amestecurilor testate în funcție de tipul de interacțiune antioxidantă – sinergică, aditivă sau antagonistă, prin urmare, sunt necesare calcule suplimentare [154].

4.2. Interacțiuni antioxidante dintre compușii fenolici și acizii organici din struguri

Dintre cele trei tipuri de interacțiuni antioxidante, interacțiunile sinergice sunt cele mai avantajoase, prin urmare mai intens investigate. Recent, autorii au demonstrat importanța substanțelor non-antioxidante precum acizii organici, glucoza etc. pentru îmbunătățirea activității antioxidante a compușilor bio-activi naturali [10, 13, 14, 69] și pentru menținerea calității produselor alimentare [160–162]. La fel de importante pentru efectele antioxidante s-au dovedit a fi concentrațiile compușilor utilizați, prin urmare, aceiași compuși testați în diferite raporturi molare pot manifesta efecte sinergice, aditive sau antagoniste [149]. În acest studiu, utilizarea a trei concentrații de acizi organici – AT și AC, a fost necesară pentru evaluarea impactului acestora asupra activității antioxidante a substanțelor fenolice [154]. De asemenea, dependența tipului de interacțiune antioxidantă de concentrația antioxidantilor a fost evaluată prin aplicarea mai multor concentrații de compuși fenolici așa cum este ilustrat în Figura 4.1 [154].

Interacțiunile antioxidante dintre catehină și acizi organici

Compusul fenolic Cat, în prezența acizilor organici, demonstrează o evoluție progresivă a valorilor IA – de la puternice efecte antagoniste la efecte aditive (Figura 4.1, cazurile A și F, Anexa 2) [154]. Atât în combinație cu AT, cât și cu AC, la concentrații mici de Cat au fost observate efecte antagoniste (0.33 – 0.93); odată ce concentrația de Cat a fost mărită, au fost depistate interacțiuni antioxidante aditive [154]. Modificarea conținutului de AT sau AC nu a afectat în mod considerabil activitatea antioxidantă a Cat. Rezultate antagoniste similare au fost raportate de Zhang și col. [161] care au investigat influența acizilor organici asupra activității antioxidante a compușilor fenolici din oțetul aromatic de Zhenjiang.

Interacțiunea dintre catehină și DPPH^{*} a fost studiată anterior în alcoolii [163–166]. A fost demonstrat că există multiple posibilități de decurgere a reacției și anume: (1) formarea aducțiilor între radicalul liber și forma oxidată a catehinei sau (2) declanșarea reacției de polimerizare a polifenolului, care s-a dovedit a fi mai puțin eficientă pentru anihilarea DPPH^{*} [165]. Urmarea uneia dintre cele două căi de reacție depinde de polaritatea solventului și de raportul flavanol/DPPH^{*}. Adăugarea la amestecul de reacție a unui acid organic poate influența semnificativ reactivitatea catehinei și, în cele din urmă, activitatea antioxidantă totală. Catehinele sunt mai stabile la pH scăzut [167, 168], activitatea lor antioxidantă fiind de 10 ori mai mare la un pH neutru decât la unul acid [169].

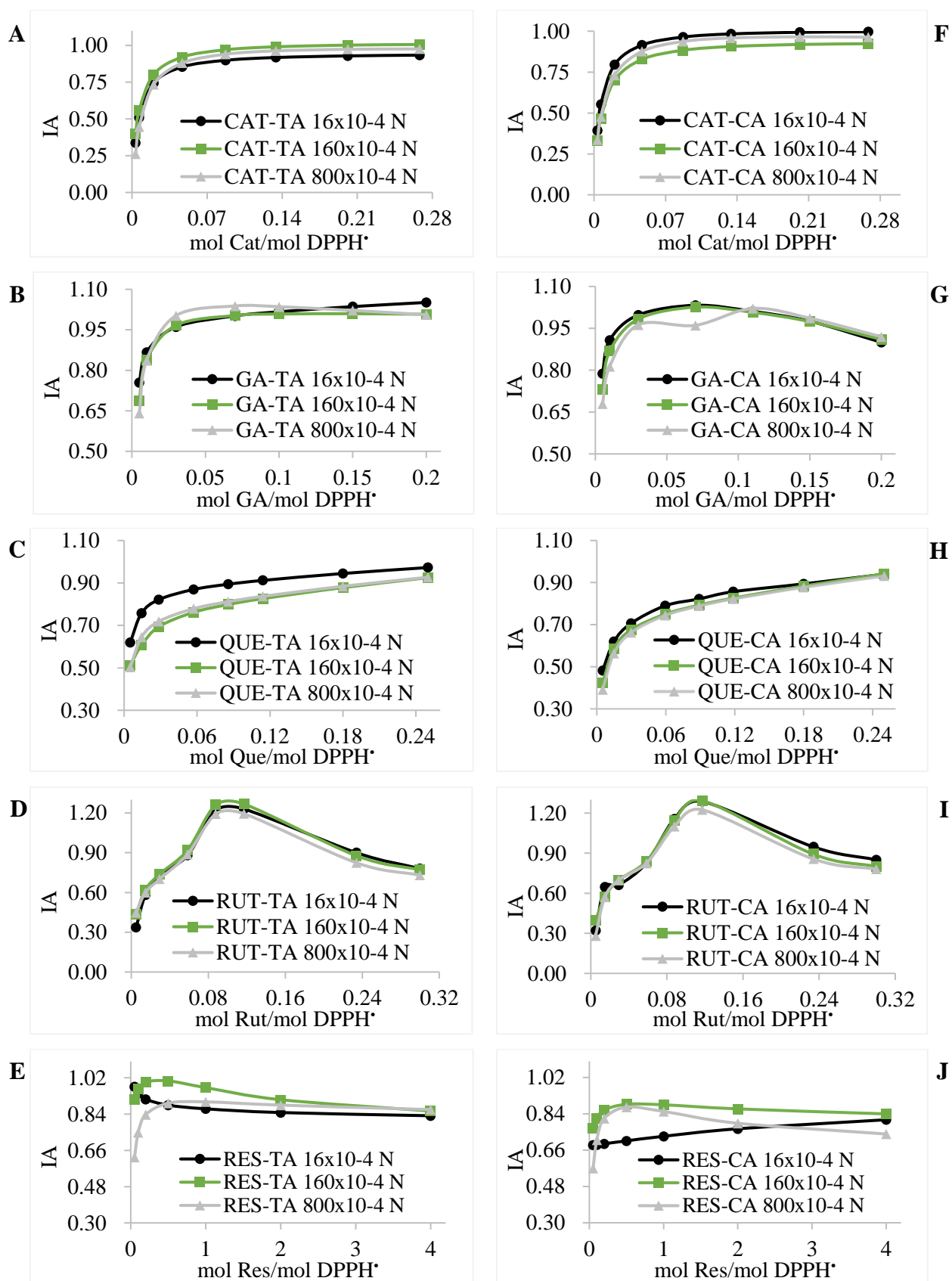


Figura 4.1. Interacțiunile antioxidante dintre compușii fenolici (Cat, AG, Que, Rut, Res) în combinație cu diferite concentrații de AT (A, B, C, D, E) sau AC (F, G, H, I, J) [154] (Anexa 2)

În mediile acide precum cele create prin adăugarea de AT sau AC (Tabelul 4.2), cresc constantele reacțiilor de oxidare ale compușilor fenolici. În consecință, capacitatea Cat de a dona electroni și de a elimina DPPH^{*} scade. În modul dat, poate fi justificată și înregistrarea interacțiunilor antioxidante aditive și antagoniste dintre Cat și AT sau AC. Dependența de pH a activității antioxidante a polifenolilor a fost raportată anterior [76, 170]; reactivitatea mai mare a compușilor fenolici la valori mai mari ale pH-ului a fost atribuită transferului rapid de electroni de la ionul fenolat la specia reactivă.

Conform datelor din literatura de specialitate, solvenții polari mențin mecanismul SPLET de acțiune antioxidantă a compușilor fenolici [165, 171], deoarece astfel de solvenți acceptă protonii pe care îi cedează compușii fenolici formând anionul fenolat, urmat de transferul de electroni la specia reactivă. Prezența ionilor de acizi în amestecul de reacție inhibă deprotonarea substanțelor fenolice și, prin aceasta, mecanismul SPLET de acțiune, deci donatorul de electroni va fi molecula părinte [41]. Prin urmare, unele studii sugerează faptul că la pH scăzut catehina este oxidată prin mecanismul ET-PT, ceea ce implică sustragerea electronului de la molecula neutră, urmată de eliberarea protonului [172].

În egală măsură, reducerea activității antioxidante a Cat în prezența AT sau AC poate fi justificată prin faptul că condițiile de pH scăzut ar putea cauza polimerizarea și/sau condensarea Cat [168]. Studiul asupra taninurilor condensate a demonstrat că în condiții acide au loc două reacții competitive: (1) lanțul polimeric sau oligomeric poate degrada până la unitățile monomere corespunzătoare sau (2) unitățile flavonoide pot condensa [173]. Procesele de hidroliză, condensare și deschidere a inelului heterociclic la pH scăzut sunt descrise în literatură ca reacții caracteristice taninurilor [174]. Studiile au arătat că formarea oligomerilor de catehină sau quercetină se datorează ruperii legăturii interflavonoide, de asemenea, procesul dat poate fi catalizat de prezența acizilor [175, 176]. Astfel de reacții opuse și concurente sunt caracteristice sistemelor din vinuri, în care prezența acizilor organici favorizează atât polimerizarea, cât și hidroliza compușilor fenolici [177].

Interacțiunile antioxidante dintre acidul galic și acizi organici

În amestecurile de AG și AT sau AC (Figura 4.1, cazurile B și G, Anexa 2) au fost observate majoritar efecte aditive (0.96 – 1.04) și efecte antagoniste (0.64 – 0.92) comparabile cu cele caracteristice interacțiunilor Cat cu aceiași acizii organici [154]. În prezența AT, valorile IA (Figura 4.1, Anexa 2) sunt mai reduse la concentrații mici ale AG, dar cresc până la interacțiuni aditive odată ce raporturile molare AG/DPPH^{*} devin mai mari [154]. Singurul efect sinergic moderat de 1.05 a fost înregistrat pentru interacțiunea AG – AT la raportul molar AG/DPPH^{*} de

0.20 și concentrația AT de 16×10^{-4} N [154]. În combinație cu AC, amestecul de compuși a prezentat o tendință ascendentă urmată de una descendentă în ceea ce privește tipul de interacțiune antioxidantă. Amestecurile AG – AC nu au manifestat efecte sinergice, ci doar interacțiuni aditive și antagoniste [154]. Rezultatele obținute sunt susținute de datele raportate de Piang-Siong și col. [14], care au descris interacțiuni antioxidante similare între AG și acizii organici. Judecând după lipsa variațiilor semnificative ale valorilor IA (Figura 4.1, Anexa 2) în urma creșterii concentrațiilor de AT sau AC, se poate concluziona că aciditatea, indiferent de amplitudinea ei, are același efect asupra activității antioxidante a AG [154]. Excepție este amestecul cu cea mai mică concentrație de AT, unde reacția păstrează o tendință pozitivă.

Conform valorilor CE_{50} (Tabelul 4.1) și ale valorilor IA (Figura 4.1, Anexa 2) ale amestecurilor AG – acizii organici, se poate deduce că AT sau AC au o influență ușor negativă sau nulă asupra activității antioxidante a AG [154]. Prin urmare, putem presupune că AG acționează eficient prin mecanismul HAT în soluții etanolice acidificate. Gruparea carboxil a AG împreună cu gruparea OH fenolică tinde să se deprotoneze în etanol, dar prezența ionilor de AT sau AC inhibă acest proces, prin urmare, la fel ca exemplul Cat, mecanismul SPLET este inhibat. Astfel, mecanismul HAT devine operativ pentru AG în mediu dat. Această ipoteză este în concordanță cu datele calculelor DFT [178–180] care demonstrează că AG este un excelent captator de radicali liberi care acționează eficient prin cedarea atomului de hidrogen.

Interacțiunile antioxidante dintre quercetină și acizi organici

Interacțiunile antioxidante dintre diferite concentrații de Que și AT sau AC s-au dovedit a fi doar antagoniste (în intervalul 0.50 – 0.94 și respectiv 0.39 – 0.94), cu excepția unei interacțiuni aditive (0.97) observată în amestecul Que – AT (Figura 4.1, cazurile C și H, Anexa 2) [154]. Figura 4.1C, demonstrează că concentrațiile mai mari de AT influențează negativ activitatea antioxidantă a compusului fenolic [154]. Faptul dat și persistența efectelor antagoniste independent de concentrația AT sau AC subliniază ideea că în medii acide activitatea antiradicalică a polifenolilor se diminuează [76, 165, 170]. Asemănător catechinelor [167, 168], molecula de Que este mai stabilă la pH scăzut și, prin urmare, mai puțin susceptibilă la oxidare.

Interacțiunile antioxidante dintre rutină și acizi organici

Deși, din punct de vedere structural, Que și Rut au partea flavonoidă similară, Rut manifestă un comportament diferit în prezența acizilor organici. La cele mai scăzute concentrații de polifenol s-au observat efecte antagoniste puternice, în intervalul 0.29 – 0.92 (Figura 4.1, cazurile D și I, Anexa 2) [154]. Totuși, la raporturile Rut/DPPH* de 0.09 și 0.12 au fost înregistrate interacțiuni sinergice semnificative de 1.19 și 1.27 (pentru amestecul Rut – AT) și de 1.10 și 1.29

(pentru amestecul Rut – AC) [154]. Efectul sinergic al acestor două raporturi molare scade odată cu creșterea conținutului de Rut. În același timp, rezultate obținute indică ca interacțiunile antioxidante dintre Rut și AT sau AC sunt puțin dependente de concentrația de acizi organici [154]. Aceste rezultate indică faptul că, în cazul combinațiilor Rut – AT sau Rut – AC, efectul sinergic se bazează în principal pe concentrația polifenolului și pe prezența acizilor organici în amestecul de reacție (dar nu și pe concentrația de AT sau AC), întrucât activitatea antioxidantă a Rut în lipsa AT sau AC este mai mică pentru raporturile molare Rut/DPPH• de 0.09 și 0.12 [154].

Trecerea de la interacțiuni antioxidante antagoniste la cele sinergice, precum și dependența acestei treceri de concentrația compusului fenolic, a fost observată și în amestecurile catehină – acid ascorbic testate în diferite raporturi molare [151]. Studiul a demonstrat că diferite concentrații de acid ascorbic influențează comportamentul catehinei, susținând formarea diferitelor structuri, inclusiv dimerizarea polifenolului cu formarea proantocianidinelor [151]. Acest scenariu poate fi reprezentativ și pentru efectul sinergic dintre Rut și AT sau CA, totuși, în cazul dat concentrația acizilor organici nu este importantă, contează doar prezența acestora (Figura 4.2).

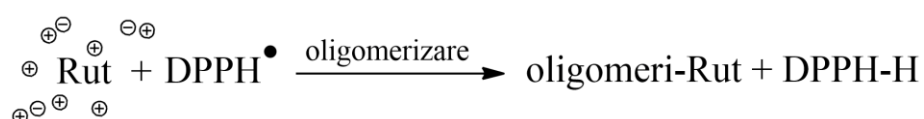


Figura 4.2. Schema generală a mecanismului reacției de anihilare a DPPH• de către Rut în prezența acizilor organici și oligomerizarea compusului fenolic

Această presupunere este argumentată de datele raportate în literatura de specialitate care descriu formarea dimerilor și polimerilor de catehină, quercetină și rutină în condiții acide [175, 176]. Pe de altă parte, este important de menționat că unele procese de polimerizare și de formare a aducțiilor pot fi determinate de însuși raportul molar dintre flavanol și DPPH•, așa cum a fost demonstrat anterior [163–165] – procese care generează structuri complexe cu proprietăți antioxidante.

Interacțiunile antioxidante dintre resveratrol și acizi organici

Stilbenul Res a demonstrat în mare parte efecte antagoniste în prezența acizilor organici (Figura 4.1, cazurile E și J, Anexa 2) [154]. Tendințele efectelor antioxidante sunt diferite pentru fiecare concentrație de acizi organici testată. Cele mai puternice interacțiuni antagoniste au fost stabilite pentru concentrația de AT sau AC de 16×10^{-4} N, iar pentru concentrația de 160×10^{-4} N a fost înregistrată cel mai slab efect antagonist [154]. Influența negativă a acizilor organici asupra activității antioxidante a Res este în concordanță cu datele raportate de Shang și col. [41]. Autorii

au arătat că în mediile acide ionizarea Res este suprimată, împreună cu mecanismul de acțiune SPLET, prin urmare, activitatea antioxidantă a compusului este redusă [41].

Figura 4.3 este o reprezentare generalizată a efectului pe care îl au acizii organici asupra activității antioxidante a compușilor fenolici [154]. Compușii fenolici sunt antioxidanți eficienți prin mecanismul SPLET, care are loc odată ce molecula inițială ionizează. În prezența acizilor organici, ionizarea este împiedicată, iar mecanismul HAT devine operativ, prin urmare activitatea antioxidantă scade, întrucât compușii fenolici nu sunt atât de eficienți în anihilarea speciilor radicalice prin mecanismul HAT. Excepție de la această schemă face compusul Rut, care la anumite concentrații manifestă efect sinergic puternic datorită proceselor de polimerizare.

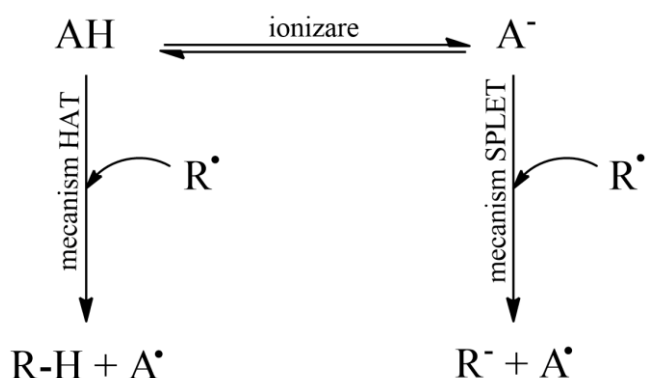


Figura 4.3. Ilustrarea dependenței mecanismului de acțiune a antioxidantului de prezența acizilor organici AT sau AC și ionizarea moleculei [149]

În baza Figurii 4.1 și a rezultatelor descrise în literatura de specialitate, putem deduce faptul că acizii organici pot influența activitatea antioxidantă a compușilor fenolici fie prin afectarea mecanismului lor de acțiune, fie prin inducerea polimerizării sau ruperii legăturilor intermoleculare ale oligomerului format [154]. Mai multe cercetări au demonstrat că combinația dintre polifenolii naturali oferă, în majoritatea cazurilor, efecte antagoniste datorită tendinței lor de a se combina prin reacții de polimerizare, reducând, astfel, numărul grupărilor hidroxil [13, 14, 150, 178]. Reieșind din contextul studiilor efectuate, presupunem că adăugarea acizilor organici la amestecurile de reacție, urmată de creșterea acidității soluției, ar putea menține o balanță optimă dintre reacțiile de polimerizare și depolimerizare prin formarea sau ruperea legăturilor intermoleculare dintre compușilor antioxidanți, de asemenea, ar putea menține o concentrație ridicată a structurilor de complexitate scăzută și un număr constant de grupări donatoare de electroni. Această ipoteză este susținută de faptul că mediul în care antioxidanții se găsesc în mod natural, spre exemplu în fructe și legume, se caracterizează printr-un conținut ridicat de acizi organici și o aciditate relativ mare, comparabilă cu cea creată prin adăugarea AT, AC sau DHF (Tabelul 4.2) [154]. De asemenea, activitatea antioxidantă a extractelor din fructe și legume

comparativ mai mare decât suma activităților antioxidante ale compușilor naturali testați individual [13, 150] poate fi argumentată ținând cont de prezența compușilor mai puțin activi din surse naturale – cum ar fi acizii organici.

4.3. Interacțiuni antioxidante dintre compușii fenolici din struguri și acidul dihidroxifumaric

Acidul dihidroxifumaric a fost pentru prima dată descoperit în 1994 de către Fenton H. J. [181] în încercarea sa de a oxida acidul tartric în prezența peroxidului de hidrogen și a fierului. În ultimii ani, acidul dihidroxifumaric a fost intens studiat din perspectiva „scenariului glioxilatului” [182–184]. Aceste investigații s-au concentrat asupra ipotezei că moleculele acidului dat constituie materia primă necesară pentru formarea moleculelor biogene [182–185].

În natură, acidul dihidroxifumaric este răspândit în fructe, legume, plante etc, fiind un constituent al ciclului acidului citric și un precursor direct al aminoacizilor [184]; de asemenea, DHF este un constituent al ciclului acizilor dicarbonici – ciclul Baround al transformării acidului tartric și a produselor intermediare în acidul oxalic [146, 186]. Acidul dihidroxifumaric se găsește în vinuri ca produs de reacție al oxidării acidului tartric de către radicalii hidroxil [187], totodată, acidul dihidroxifumaric se adaugă în vinuri pentru îmbunătățirea calității [188, 189].

În reacția cu DPPH^{*}, acidul dihidroxifumaric acționează ca un antioxidant puternic, activitatea sa antiradicalică fiind comparabilă și chiar mai puternică decât cea a acidului ascorbic [118, 190]. Contextul dat a permis înaintarea ipotezei conform căreia acidul dihidroxifumaric, în combinație cu compușii fenolici, s-ar comporta similar acidului ascorbic. Datele citate de literatura de specialitate din ultimii ani asupra interacțiunilor sinergice dintre compușii fenolici și acidul ascorbic [45, 119, 151, 152] sugerează că efectul sinergic se datorează capacității acidului ascorbic de a regenera polifenolii din forma lor oxidată. Astfel că un rezultat similar a fost ipotezat și pentru interacțiunile dintre DHF și compușii fenolici cercetați în acest studiu. Pe de altă parte, DHF decarboxilează ușor în mediul acid [185, 191], fapt care ar putea afecta mecanismul reacției și activitatea antioxidantă totală.

Pentru a efectua o investigație amplă a interacțiunilor antioxidante dintre compușii fenolici și DHF au fost aplicate trei concentrații de DHF (2×10^{-4} N, 4×10^{-4} N și 8×10^{-4} N) și multiple concentrații de compuși fenolici după cum este reprezentat în Figura 4.4 [154].

Interacțiunile antioxidante dintre catechină și acidul dihidroxifumaric

Conform Figurii 4.4A, interacțiunile antioxidante dintre Cat și DHF se dovedesc a fi dependente de concentrația acidului organic [154]. Valorile maxime ale interacțiunilor sinergice, de aproximativ 1.08 (Anexa 2), au fost observate în toate probele cu cea mai mică concentrație de

DHF (2×10^{-4} N) [154]. Creșterea conținutului de DHF determină modificări semnificative ale activității antioxidante totale și, respectiv, a valorilor IA; astfel, activitatea antioxidantă scade în probele cu 4×10^{-4} N și 8×10^{-4} N de DHF, observându-se, în mare parte, interacțiuni aditive [154].

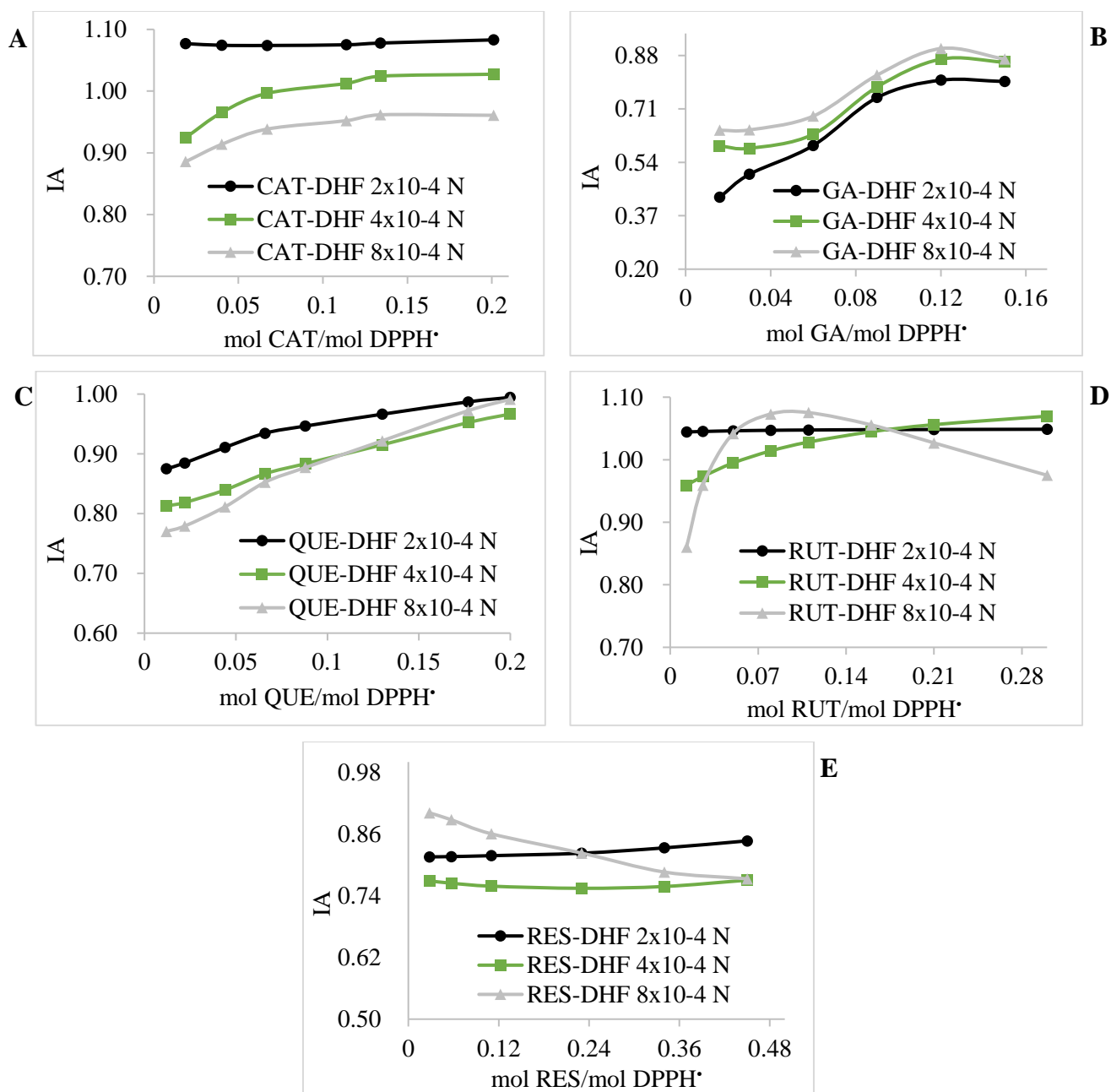


Figura 4.4. Interacțiunile antioxidante (IA) dintre compușii fenolici și diferite concentrații de DHF [154] (Anexa 2)

Mai mulți autori au raportat date care atestă prezența interacțiunilor sinergice dintre un antioxidant puternic și compuși fenolici [45, 119, 151, 152] și au argumentat fenomenul dat prin regenerarea reciprocă a antioxidanților. DHF este un antioxidant puternic care acționează rapid [118, 190], astfel că este primul care interacționează cu DPPH[•], înainte de Cat, prin urmare, regenerarea Cat de către DHF poate fi exclusă. De asemenea, posibilitatea decarboxilării formei

oxidate a DHF face discutabilă ideea reducerii de către Cat a acidului până la forma inițială a acestuia.

În acest caz, mecanismul de acțiune plauzibil este formarea aducțiilor și a compușilor oligomerici. Un exemplu elocvent descris în literatură este amestecul dintre catehină și acidul ascorbic, unde efectul sinergic este determinat de oligomerizarea polifenolului și formarea procianidinelor [151]. Similar cazului Cat – DHF, datele au arătat că prezența acidului ascorbic în reacție modifică capacitatea catehinei de captare a radicalilor liberi [151]. Amestecați în diferite raporturi molare de Cat/AA, interacțiunile antioxidante variază de la efecte synergice până la efecte prooxidante [151]. Mai multe date experimentale [151, 163, 165] demonstrează că oligomerizarea catehinei cu formarea ulterioară a structurilor procianidine este un factor decisiv care afectează activitatea antioxidantă totală.

Interacțiunile antioxidante dintre acidul galic și acidul dihidroxifumaric

Amestecurile AG – DHF posedă, în principal, efecte antagoniste în intervalul 0.43 - 0.82. Din Figura 4.4B (Anexa 2) se observă că sporirea concentrațiilor ambilor compuși ameliorează activitatea antioxidantă totală a amestecurilor, cu toate acestea, majoritatea interacțiunilor rămân în intervalul valorilor IA antagoniste [154]. Probele formate din AG/DPPH' în raport molar de 0.12 în combinație cu DHF au înregistrat cea mai mare valoare a IA (maximum de 0.90), urmate de o scădere moderată a valorilor IA [154].

Piang - Siong și col. [14] au publicat date ce atestă prezența synergismului dintre acidul galic și acidul *trans*-aconitic, ultimul având fragmente structurale similare cu acidul dihidroxifumaric. Astfel, pentru amestecul AG – DHF de asemenea au fost anticipate rezultate experimentale similare, care, totuși, nu au corespuns realității. Pe de altă parte, acidul galic în combinație cu diferite concentrații de acid ascorbic a prezentat efecte antagoniste puternice [192]. Recent au fost descrise efecte antagoniste ale amestecurilor de compuși fenolici și acid galic [147, 193]. Autorii au sugerat că antagonismul este o consecință a regenerării antioxidantului mai slab de către cel mai puternic, ipoteză care a fost susținută de analiza potențialelor de reducere [147]. Deopotrivă, efectul dat a fost argumentat prin diferența cineticilor de reacție a antioxidantului și radicalului liber [193].

De asemenea, a fost admisă oligomerizarea AG, cu toate acestea, conform datelor existente în literatura de specialitate, polimerizarea acidului dat ar spori activitatea antioxidantă a produselor de reacție [194, 195], ceea ce este în discrepanță cu rezultatele experimentale obținute în studiul dat.

Interacțiunile antioxidante dintre quercetină și acidul dihidroxifumaric

Amestecurile dintre Que și DHF au înregistrat, în principal, efecte aditive care nu au depășit valoarea de 0.99 (Anexa 2) [154]. Conform Figurii 4.4C, o concentrație mai mare de DHF influențează negativ activitatea antioxidantă totală a soluțiilor și intensifică efectele antagoniste, în special în amestecurile cu concentrații mai mici de Que [154]. Astfel de rezultate au fost neprevăzute deoarece în literatura de specialitate există date care demonstrează prezența interacțiunilor sinergice dintre Que și AA, AA fiind un antioxidant puternic asemeni acidului dihidroxifumaric; efectul sinergic datorându-se regenerării Que din *o*-chinonă [45, 152]. Alți autori [148, 196] de asemenea au confirmat prezența interacțiunilor sinergice în amestecul quercetină – acid ascorbic, precum și în combinațiile dintre quercetină și diverși compuși bio-activi [197, 198]. În cazul amestecului Que – DHF, efectele aditive și antagoniste s-ar putea datora decarboxilării DHF sau a produselor de oxidare a DHF, fapt care ar împiedica ulterioarele procese de regenerare dintre compușii dați.

Interacțiunile antioxidante dintre rutină și acidul dihidroxifumaric

Multiple interacțiuni sinergice moderate, în intervalul 1.05 – 1.08, au fost observate în amestecurile de Rut – DHF (Figura 4.4D, Anexa 2) [154]. Diferite concentrații de DHF produc efecte și tendințe diferite, în ceea ce privește valorile IA [154]. De exemplu, Rut în combinație cu 2×10^{-4} N DHF manifestă efecte sinergice de 1.05 indiferent de modificarea conținutului de Rut [154]. Pentru a doua concentrație de DHF de 4×10^{-4} N, valorile IA încep cu 0.96 și cresc până la 1.07 odată ce crește raportul molar Rut/DPPH* [154]. La concentrația de 8×10^{-4} N DHF, cel mai mare efect sinergic de 1.07 a fost observat pentru raportul molar Rut/DPPH* de 0.11, urmat de o scădere semnificativă a valorilor IA [154].

Efecte sinergice similare au fost obținute de Tavadyan și col. [65] în amestecuri binare de bioflavonoide și acid ascorbic sau Trolox, folosind metoda ORAC. Ei au observat interacțiuni sinergice ale acidului ascorbic cu flavonoidele rutina și naringina care au grupa O-glucosyl în structura moleculară; în același timp, amestecurile de acid ascorbic în combinație cu compușii quercetina și morina au demonstrat efecte antagoniste. Aceste constatări sunt în conformitate cu datele privind interacțiunea antioxidantă a polifenolilor Que și Rut cu DHF (Figura 4.4, cazurile C și D). Tavadyan și col. [65] au sugerat că activitatea antioxidantă îmbunătățită a amestecului Rut – AA se datorează prezenței glicozidei în structura sa care condiționează formarea legăturilor de hidrogen intramoleculare între atomii de hidrogen și grupările OH fenolice responsabile de interacțiunea cu radicalii și atomii de oxigen donatori de electroni ai substituentului glucozil. În cazul interacțiunilor Rut – DHF, gruparea O-glucozil ar putea influența pozitiv stabilitatea DHF și

ar putea preveni procesul de decarboxilare. Această idee este susținută de studiile recente privind polimerizarea moleculelor de DHF, acetonă și metanol [199]. Prin urmare, o astfel de situație ar favoriza unele procese de regenerare între Rut și DHF.

Interacțiunile antioxidante dintre resveratrol și acidul dihidroxifumaric

Amestecurile de Res și DHF au demonstrat, în mare parte, efecte antagoniste (0.75 – 0.83) și doar unele interacțiuni aditive (0.85 – 0.90) (Figura 4.4E, Anexa 2) [154]. Datele privind amestecurile formate din Res și primele două concentrații de DHF – 2×10^{-4} N și 4×10^{-4} N, demonstrează că valorile IA scad semnificativ odată cu creșterea concentrației de DHF [154]. În amestecurile cu 8×10^{-4} N DHF, IA evoluează negativ – de la efecte aditive la cele antagoniste, odată cu mărirea conținutului de Res [154].

Alte investigații au dovedit prezența interacțiunilor atât sinergice, cât și antagoniste între resveratrol și diverși compuși naturali [9, 63, 147]. În reacția cu radicalii liberi, Res se oxidează producând diverși oligomeri [41, 200, 201]. Investigațiile RMN au arătat că, în combinație cu acidul ascorbic, producția de oxidarea ai resveratrolului se polimerizează formând viniferine [202]; în acest caz, regenerarea stilbenului de către acidul ascorbic este imposibilă. În prezența DHF, polimerizarea Res poate fi accelerată, proces care reduce numărul grupărilor OH disponibile pentru captarea radicalilor liberi, așa cum a fost raportat în cazul altor compuși fenolici [151, 203].

4.4. Interacțiuni antioxidante dintre acidul ascorbic și alți compuși din struguri

Studiile recente demonstrează prezența interacțiunilor sinergice între acidul ascorbic și diverși compuși naturali – acizi organici, compuși fenolici. Efectul dat se datorează atât unor procese de regenerare, unde acidul ascorbic se oxidează odată ce reduce compușii fenolici, cât și unor efecte ale solventului și pH-ului care ameliorează activitatea antioxidantă a acidului ascorbic.

4.4.1. Interacțiuni antioxidante dintre acidul ascorbic și acizii tartric și citric

Interacțiunile dintre acidul ascorbic și acizii organici au fost investigate în soluții alcoolice de R. LoScalzo [10] și Piang-Siong și col. [14], care au constatat multiple efecte sinergice. În mod similar, rezultatele cercetării date arătată că la anumite concentrații, acizii organici AT și AC ameliorează activitatea antioxidantă a AA [204–206]. Datele raportate în Figura 4.5 (Anexa 2) demonstrează că AT are o influență mai bună decât AC, remarcându-se șase combinații de AA – AT cu efect sinergic, și o singură combinație de AA – AC cu același efect [154]. În ambele cazuri, probele cu concentrații mai mici de AT sau AC – 16×10^{-4} N și 160×10^{-4} N, au demonstrat activitate antioxidantă mai bună, înregistrându-se efecte sinergice de maximum 1.08 pentru amestecul AA – AT și de maximum 1.06 pentru AA – AC [154].

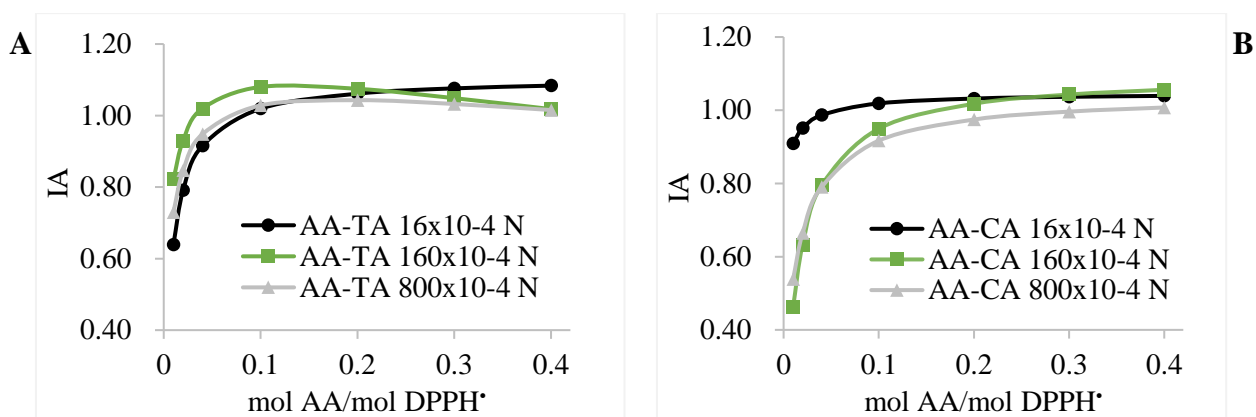


Figura 4.5. Interacțiunile antioxidante dintre acidul ascorbic (AA) și acizii A) tartric (AT) și B) citric (AC) [154] (Anexa 2)

La fel de importantă s-a dovedit a fi concentrația de AA [206]. Se poate observa că la concentrații mai mici de AA se observă un efect antagonist puternic, iar măririi conținutului de AA, valorile IA cresc până la efecte aditive sau sinergice [154]. Antagonismul puternic de 0.46 – 0.79 caracteristic pentru concentrațiile mai mici de AA, precum și efectele sinergice constatate la concentrații mai mari de AA, subliniază importanța raporturilor molare în care ambii compuși naturali sunt amestecați [154].

Îmbunătățirea activității antioxidante a AA în prezența acizilor organici se poate datora mecanismului de acțiune al acestui captator de radicali liberi. În acest mediu de reacție, ionizarea AA este blocată din cauza concentrației mari de ioni de AT sau AC prezenți în soluție (Figura 4.6) [154].

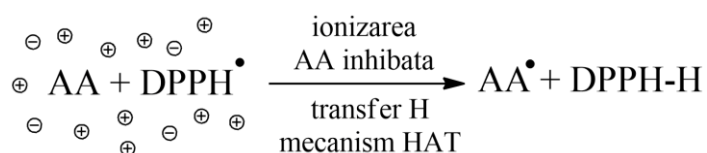


Figura 4.6. Mecanismul HAT de anihilare a DPPH[•] de către AA în prezența acizilor organici AT sau AC

În consecință, mecanismul SPLET este inhibat, iar mecanismul HAT devine operativ pentru anihilarea DPPH[•]. Se știe că AA acționează eficient prin mecanismul HAT donând doi atomi de H speciilor radicalice [207]. Alți autori sugerează că un pH scăzut poate contribui la regenerarea lentă a AA, justificând astfel creșterea activității antioxidante [10].

4.4.2. Interacțiuni antioxidante dintre acidul ascorbic și acidul dihidroxifumaric

Fiind unul dintre cei mai studiați antioxidanți, activitatea antiradicalică a AA precum și interacțiunile antioxidante dintre AA și alți compuși naturali au fost investigate [208]. Pe de altă parte, DHF este un acid organic natural care posedă activitate antioxidantă asemănătoare cu cea a

AA [209], totuși, în ceea ce privește interacțiunile antioxidante cu alți compuși, DHF nu a fost studiat. În natură, interacțiunea compușilor dați este posibilă în fructe, ex. în struguri, unde a fost remarcată prezența, în concentrații mici, a AA și DHF [146]. De asemenea, ambii acizi organici se găsesc în vinuri, AA fiind adăugat pentru menținerea calității și pentru împiedicarea oxidării compușilor fenolici [210], iar DHF este obținut prin oxidarea lentă a AT în prezența radicalilor liberi [187].

Pentru investigarea interacțiunilor antioxidante dintre acești doi compuși naturali cu acțiune antioxidantă puternică au fost utilizate mai multe metode spectrale, precum spectroscopia Stopped-Flow, UV-Viz, RES și RMN. Fiecare dintre aceste metode oferă date distincte, care, interpretate în ansamblu, pot oferi o imagine mai clară asupra mecanismului de acțiune și interacțiune antioxidantă dintre compuși.

Investigații la spectroscopia Stopped-Flow

Activitatea antioxidantă a AA și DHF, precum și a diferitor combinații de AA – DHF, a fost studiată prin metoda DPPH[•] [209]. Spectroscopia Stopped-Flow, fiind o metodă de determinare a vitezei și a constantelor de reacție, a permis investigarea primelor 2 secunde de interacțiune dintre antioxidanți AA și DHF cu radicalul liber DPPH[•]. Influența mediului de reacție asupra activității antioxidante a DHF și AA și a combinațiilor AA – DHF a fost investigată în 98% etanol și în matricea de vin (5 g/L acid tartric într-un amestec apă – etanol (12% v/v); pH-ul stabilit la 3.2 prin adăugarea de hidroxid de sodiu) [209].

Matricea de vin, conținând 5 g/L AT, a demonstrat o activitate antioxidantă mică împotriva DPPH[•], asemănătoare cu cea a acidului tartric în reacție cu același radical liber. Cu toate acestea, matricea de vin are o influență semnificativă asupra activității antioxidante și vitezei de reacție a compușilor testați [209]. Un set de spectre a fost înregistrat după amestecarea soluțiilor de DPPH[•] (0.25 mM) cu diferite concentrații de DHF sau AA, în 98% etanol și în matricea de vin, așa cum este ilustrat în Figura 4.7 [209].

Se observă că, în etanol, DHF are o activitate antioxidantă mult mai scăzută (Figura 4.7A), eficiența maximă fiind de 16% pentru 0.8 mM de DHF [209]. Dimpotrivă, în matricea de vin activitatea antioxidantă a DHF este mult mai mare, aceeași concentrație de DHF anihilând aproximativ 80% de DPPH[•]. Figura 4.7 arată că mediul de reacție influențează puternic activitatea antioxidantă a DHF, provocând o creștere majoră a capacității de anihilare a DPPH[•] [209]. Activitatea antioxidantă a AA de asemenea crește în matricea de vin, dar nu atât de drastic ca în cazul DHF. Conform Figurii 4.7, AA are o activitate antioxidantă mai mare în etanol în comparație cu cea a DHF în același solvent, la concentrația de 0.18 mM AA eliminând 40% din DPPH[•] [209].

Aceeași concentrație de AA în matricea de vin reduce peste 50% din concentrația radicalului liber. O modificare considerabilă a activității antioxidante este înregistrată pentru cea mai mică concentrație de AA (0.06 mM), a cărei eficiență crește de la 10% în etanol la 30% în matricea de vin (Figura 4.7D) [209].

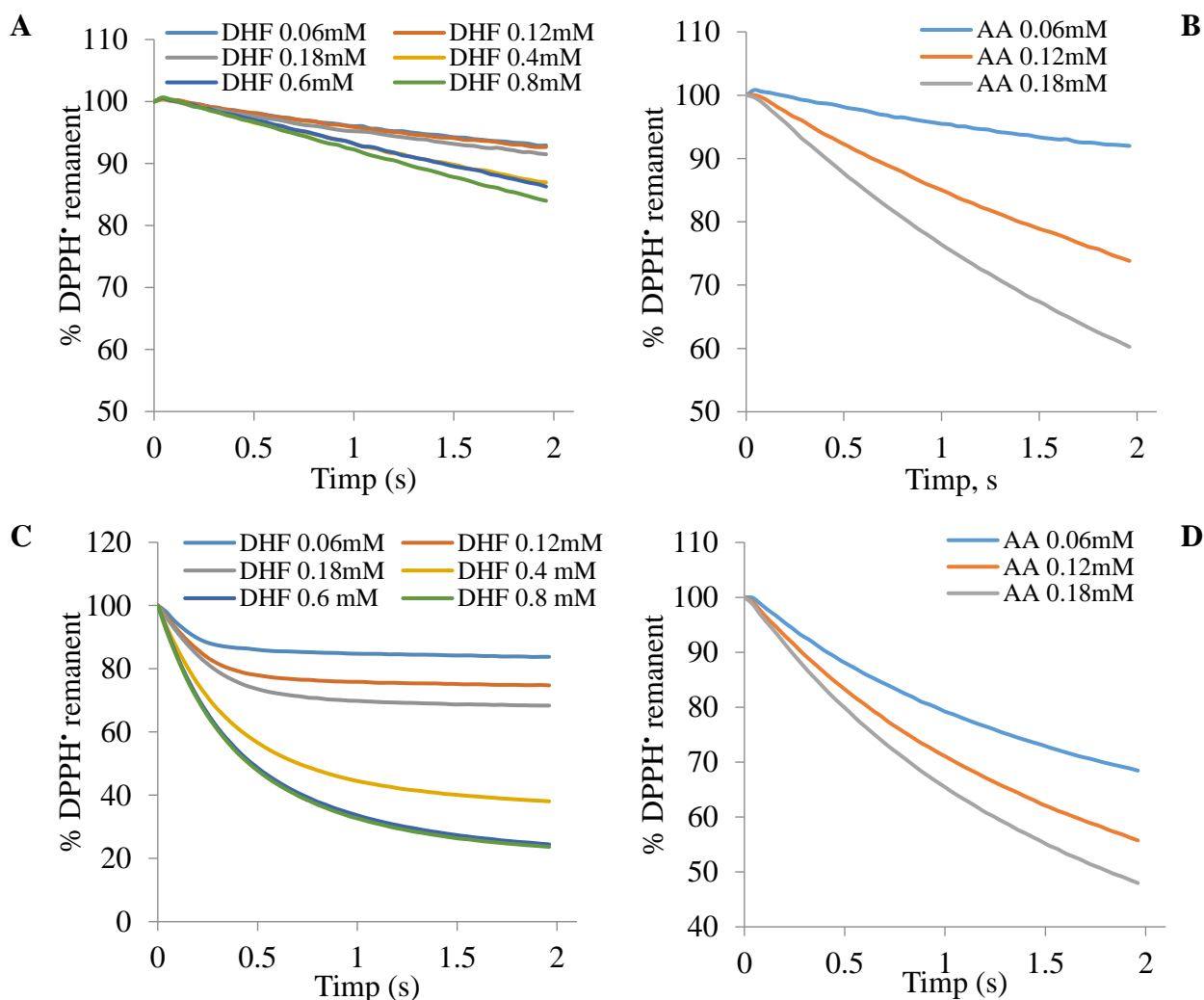


Figura 4.7. Ilustrarea interacțiunii DPPH• cu diferite concentrații de DHF și AA în (A, B) 98% EtOH și în (C, D) matricea de vin [209]

Rezultatele din Figura 4.7 sunt confirmate de datele din Tabelul 4.3, unde sunt reprezentate constantele de viteză observate pentru ambii antioxidanți, utilizați în diferite concentrații, în 98% etanol și în matricea de vin. Valorile k_{obs} pentru DHF sunt de 10 ori mai mari în matricea de vin, comparativ cu cele în 98% etanol, iar k_{obs} pentru AA sunt de două ori mai mari în matricea de vin [209].

Sporirea activității antioxidante și a vitezei de reacție în matricea de vin poate fi favorizată de prezența unei concentrații mari de acid tartric prezent în soluția model de vin, întrucât influența acizilor organici asupra activității antioxidante totale a amestecului a fost raportată în anterior

[208]. Datele din Tabelul 4.3 sunt în concordanță cu rezultatele obținute la interacțiunea AA – AT (Figura 4.7), astfel, și în cazul dat, concentrația mare de ioni de acid tartric din matricea de vin suprimă ionizarea AA sau a DHF și, prin urmare, inhibă mecanismul SPLET care, dimpotrivă, este operativ în mediul de 98% etanol [209]. Prin urmare, în matricea de vin, antioxidanții anihilează DPPH• prin mecanismul HAT. Pe de altă parte, reacția poate fi afectată considerabil și de conținutul mare de apă din matricea de vin.

Tabelul 4.3. Constante de viteză observate pentru DHF și AA în reacție cu DPPH• determinate în 98% etanol și matricea de vin [209]

Proba	Concentrația, mM	k_{obs}, s^{-1}	
		98% Etanol	Matricea de vin
DHF	0.06	0.368 ± 0.049	3.656 ± 0.496
	0.12	0.350 ± 0.030	3.863 ± 0.155
	0.18	0.383 ± 0.054	3.371 ± 0.091
	0.40	0.167 ± 0.024	2.277 ± 0.049
	0.60	0.107 ± 0.076	2.122 ± 0.032
	0.80	0.040 ± 0.016	2.181 ± 0.057
AA	0.06	0.328 ± 0.036	0.654 ± 0.021
	0.12	0.327 ± 0.017	0.653 ± 0.006
	0.18	0.385 ± 0.020	0.681 ± 0.015

Pentru a determina tipul IA dintre DHF și AA în 98% etanol și în matricea de vin, a fost efectuată o serie de experimente folosind șase concentrații de DHF (de la 0.06 mM până la 0.80 mM) amestecate cu fiecare dintre cele trei concentrații de AA – 0.06, 0.12 și 0.18 (mM) (Tabelul 4.4) [209].

Rezultatele referitoare la capacitatea antioxidantă a combinațiilor de AA – DHF relevă aceeași tendință ca în cazul utilizării unui singur antioxidant în reacție cu DPPH•. În etanol 98% toate amestecurile prezintă activitate antioxidantă scăzută comparativ cu valorile obținute în matricea de vin (Figura 4.8) [209]. Figura 4.8 demonstrează efectul solventului asupra cineticii reacției și capacității de reducere a radicalului liber de acizii studiați [209]. În ambele exemple prezentate în Figura 4.8 a fost folosită aceeași concentrație pentru ambii antioxidanți – 0.18 mM, totuși în matricea de vin DPPH• este anihilat aproape în întregime după 2 secunde [209]. Pentru amestecurile cu cele mai mari concentrații de antioxidanți, cea mai mare eficiență în etanol este de 20%, în timp ce în matricea de vin aceeași combinație de antioxidanți captează 85% din DPPH• [209].

În matricea de vin, valorile k_{obs} sunt mai mari și variază în diapazonul $0.9 s^{-1} - 1.1 s^{-1}$, aceste valori fiind de trei ori mai mari decât k_{obs} determinate în 98% EtOH (Tabelul 4.4). Deși viteza de reacție în amestecurile DPPH• – DHF – AA este sporită în matricea de vin, valorile date nu depășesc k_{obs} pentru cazurile când antioxidanții au fost testați separat (Tabelul 4.3) [209].

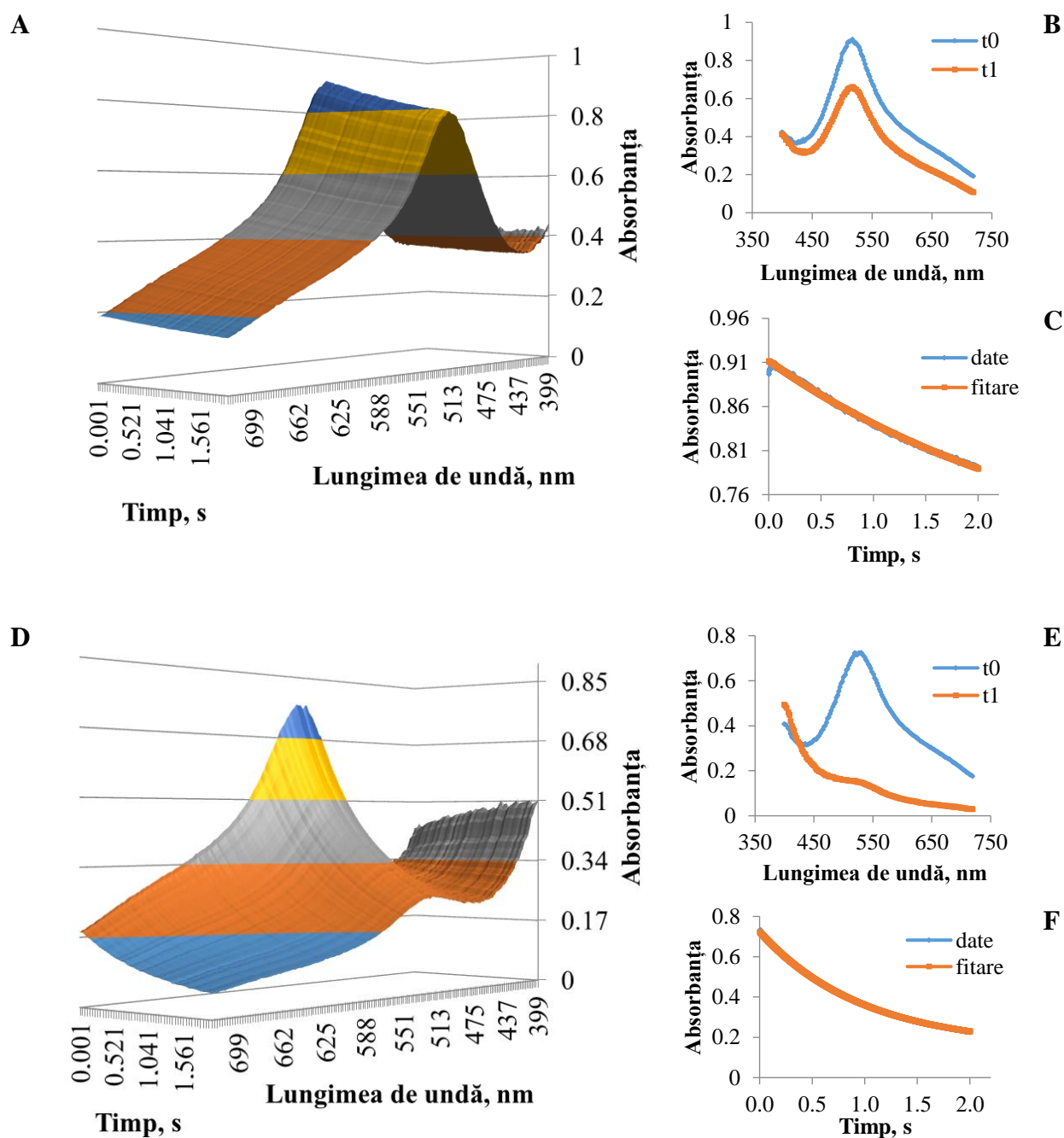


Figura 4.8. Scăderea absorbanței după interacțiunea DPPH[•] cu amestecul de DHF (0.18 mM) – AA (0.18 mM) în (A) 98% EtOH și (D) matricea de vin. Spectrele de absorbție pentru reacția dintre DPPH[•] și amestecul DHF – AA la 0.001s și 2s în (B) 98% EtOH și (E) matricea de vin. Fitarea modelul cinetic A→B la 529 nm modelul (C) și (F) [209]

Astfel, comparând rezultatele prezentate în Tabelele 4.3 și 4.4, se observă că k_{obs} pentru reacțiile de anihilare a DPPH[•] în matricea de vin scad de la aproximativ 3 s^{-1} , în cazul utilizării unui singur antioxidant, la 1 s^{-1} atunci când în reacție sunt ambii antioxidanți [209]. Faptul dat demonstrează că, odată amestecați, DHF și AA captează mai lent speciile radicalice, ceea ce ar putea semnaliza asupra unor procese secundare, precum este decarboxilarea DHF în medii mai

acide. Totuși, după 2 s de interacțiune, reacția nu este completă, respectiv concluzii clare asupra tipului de interacțiune antioxidantă dintre AA și DHF nu poate fi formulată la această etapă [209].

Tabelul 4.4. Constantele de viteză observate determinate în 98% etanol și matricea de vin pentru reacția dintre DPPH^{*} și amestecurile DHF – AA utilizate în diferite concentrații [209]

Concentrația de AA, mM	Concentrația de DHF, mM	k_{obs} , s ⁻¹	
		Etanol	Matricea de vin
0.06	0.06	0.303 ± 0.040	0.914 ± 0.035
	0.12	0.310 ± 0.032	0.962 ± 0.026
	0.18	0.311 ± 0.021	1.029 ± 0.048
	0.40	0.184 ± 0.015	1.174 ± 0.130
	0.60	0.117 ± 0.008	1.159 ± 0.134
	0.80	0.047 ± 0.011	1.103 ± 0.092
0.12	0.06	0.354 ± 0.010	0.734 ± 0.043
	0.12	0.347 ± 0.022	0.873 ± 0.014
	0.18	0.322 ± 0.035	0.950 ± 0.029
	0.40	0.004 ± 0.000	0.997 ± 0.009
	0.60	0.130 ± 0.007	0.882 ± 0.021
	0.80	0.048 ± 0.008	0.984 ± 0.028
0.18	0.06	0.347 ± 0.016	0.874 ± 0.014
	0.12	0.326 ± 0.009	0.946 ± 0.008
	0.18	0.333 ± 0.017	1.009 ± 0.009
	0.40	0.199 ± 0.018	1.034 ± 0.039
	0.60	0.131 ± 0.011	1.044 ± 0.021
	0.80	0.042 ± 0.030	1.077 ± 0.010

Investigații la spectroscopia UV-Viz

Datele cunoscute în literatura de specialitate precizează că AA anihilează DPPH^{*} în 1 – 3 min [86], iar DHF cedează electroni speciilor de DPPH^{*} în aproximativ 1 min, partea cinetică fiind caracterizată de o etapă rapidă și una lentă de interacțiune cu radicalul liber [118]. Conform literaturii [20, 118], valoarea CE₅₀ pentru AA corespunde cu cea pentru DHF și este de 0.24 mol AH/mol DPPH. Repetarea acestor experimente a confirmat valoarea CE₅₀ pentru AA de 0.24 [206, 208], iar în cazul DHF a fost obținută CE₅₀ = 0.18 (Figura 4.9) [154]. Această diferență se poate datora mediului de reacție diferit (70% metanol [118] și 96% EtOH).

Pentru determinarea tipului de interacțiune antioxidantă dintre compușii dați, mai multe concentrații de AA au fost combinate cu trei concentrații de DHF (2×10⁻⁴ N, 4×10⁻⁴ N, 8×10⁻⁴ N), și la amestecul dat a fost adăugat DPPH^{*} (Figura 4.10, Anexa 2) [154]. Reacția a decurs timp de 30 min pentru a fi asigurată stabilirea stării de echilibru. Valorile IA dintre AA – DHF determinate prin metoda UV-Viz evoluează de la efecte antagoniste la cele sinergice ca consecință a creșterii concentrațiilor ambilor antioxidanți.

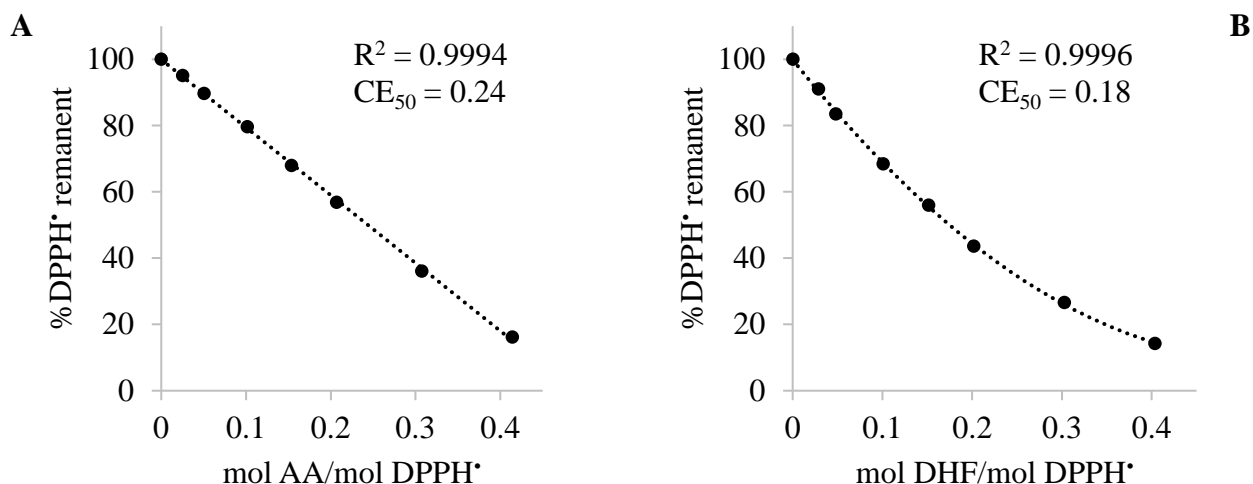


Figura 4.9. Reprezentarea grafică a dependenței %DPPH• remanent de raportul molar AA/DPPH• pentru reacția AA - DPPH• (A) și DHF - DPPH• (B). Date obținute la spectroscopia UV-Viz

Prin urmare, cea mai mare valoare ce caracterizează o interacțiune sinergică – 1.17, a fost obținută pentru raportul molar AA/DPPH• de 0.30 în combinație cu 8×10^{-4} N de DHF (Figura 4.10, Anexa 2), care reprezintă cele mai mari concentrații de AA și DHF utilizate în acest experiment [154]. Diapazonul larg de concentrații utilizate au permis studierea influenței raportului DHF/AA asupra efectului sinergic, astfel că, raporturile DHF/AA stabilite pentru experiment s-au încadrat în valorile 0.1 – 7.5 [154].

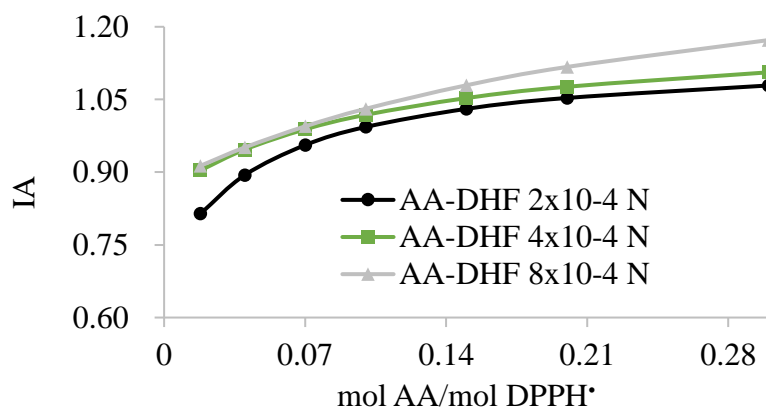


Figura 4.10. Interacțiunile antioxidante dintre acidul ascorbic și acidul dihidroxifumaric [154]

Investigații la spectroscopia RES

Spectroscopia RES este o tehnică de laborator întrebuințată pentru studierea substanțelor care au unul sau mai mulți electroni neîmperecheați. Conceptul de bază al RES este analog cu cel al RMN, cu excepția faptului că spinurile excitate sunt cele ale electronilor în locul nucleelor atomice. Spectroscopia RES este utilă pentru studierea complexelor metalice și a radicalilor liberi

organici și anorganici. Fiind o metodă sensibilă și specifică pentru investigarea atât a radicalilor formați în reacții chimice, cât și a reacțiilor în sine, utilizarea spectroscopiei RES este oportună pentru investigarea activității antioxidante și a interacțiunilor dintre AA, DHF și DPPH^{*}.

În literatură sunt raportate rezultate care demonstrează întrebuintarea cu succes a metodei RES pentru studierea interacțiunilor antioxidante dintre unii compuși naturali [8, 13]. Datorită detectării speciilor radicalice și a cuanficării acestora prin metoda RES, a fost clar demonstrat efectul prooxidant al AA în sistemul Fenton [8]. Rezultate similare au fost obținute și în cadrul studiului de față. Conform Figurii 4.11, la concentrații mici de 10 – 25 (μg/ml), AA diminuează semnalul produs de radicalii ^{*}OH; odată cu mărirea conținutului de antioxidant până la 50 – 100 (μg/ml) AA manifestă un caracter prooxidant și intensifică semnalul RES, acesta depășind însuși semnalul sistemului Fenton [211].

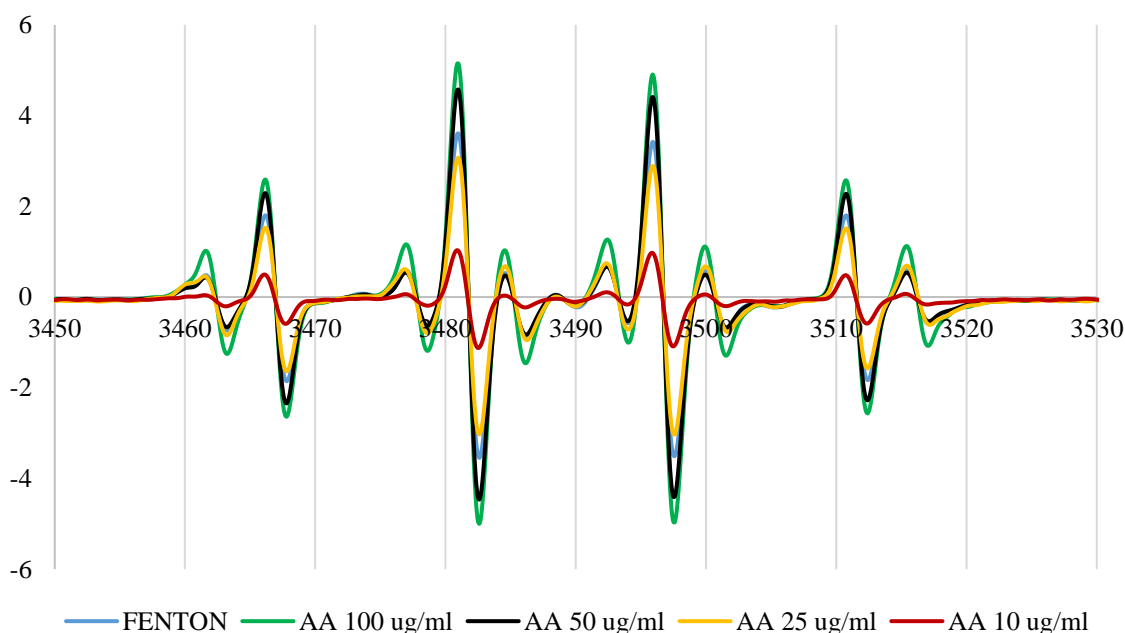


Figura 4.11. Spectrul RES pentru interacțiunea dintre AA și sistemul Fenton

Spectru RES pentru DPPH^{*} este diferit de cel al sistemului Fenton și corespunde cu descrierea oferită de alți autori [212, 213]. Figura 4.12 ilustrează spectru pentru 127 μM DPPH^{*}; din aceeași figură se observă că acizii organici AA și DHF, în concentrație de 65 μM, nu se află sub formă de radicali liberi și nu oferă semnale detectabile prin spectroscopia RES [211, 214].

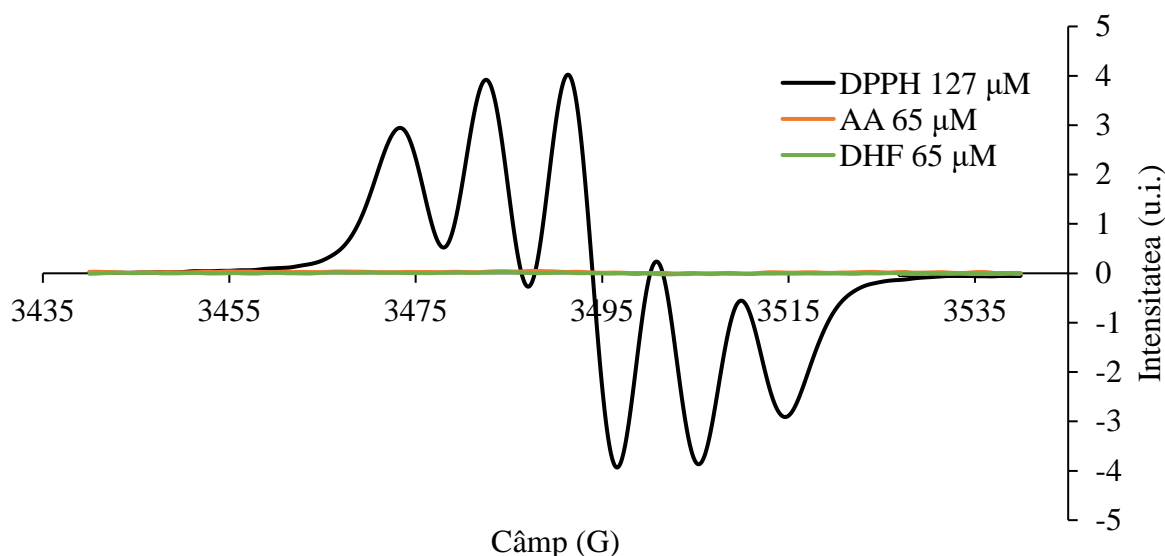


Figura 4.12. Spectrul RES pentru 127 μM DPPH $^{\bullet}$, 65 μM AA și 65 μM DHF [211, 214]

Interacționând cu diferite concentrații de AA sau DHF, concentrația de DPPH $^{\bullet}$ scade linear sau exponențial, după cum demonstrează Figura 4.13 [211, 214]. Conținutul de specii radicalice remanente a fost stabilit prin spectroscopia RES după 30 min de reacție. Valorile CE_{50} pentru ambii antioxidanți corespund cu rezultatele obținute la spectroscopia UV-Viz – 0.24 pentru AA și 0.18 în cazul DHF (Figurile 4.9 și 4.13). Datele RES reflectă o relație directă dintre intensitatea semnalului și conținutul de specii radicalice din sistem, astfel, datele din Figura 4.13 demonstrează anihilarea totală a DPPH $^{\bullet}$, fapt care nu este caracteristic și pentru datele obținute prin metoda UV-Viz.

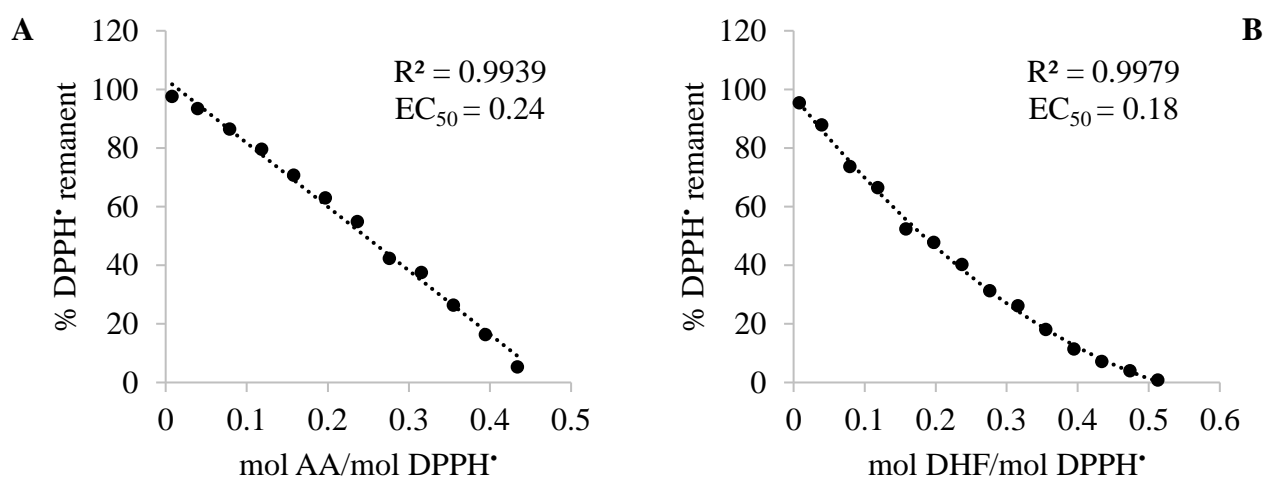


Figura 4.13. Reprezentarea grafică a dependenței %DPPH $^{\bullet}$ remanent de raportul molar AH/DPPH $^{\bullet}$ pentru reacția AA - DPPH $^{\bullet}$ (A) și DHF - DPPH $^{\bullet}$ (B). Date obținute la spectroscopia RES [211, 214]

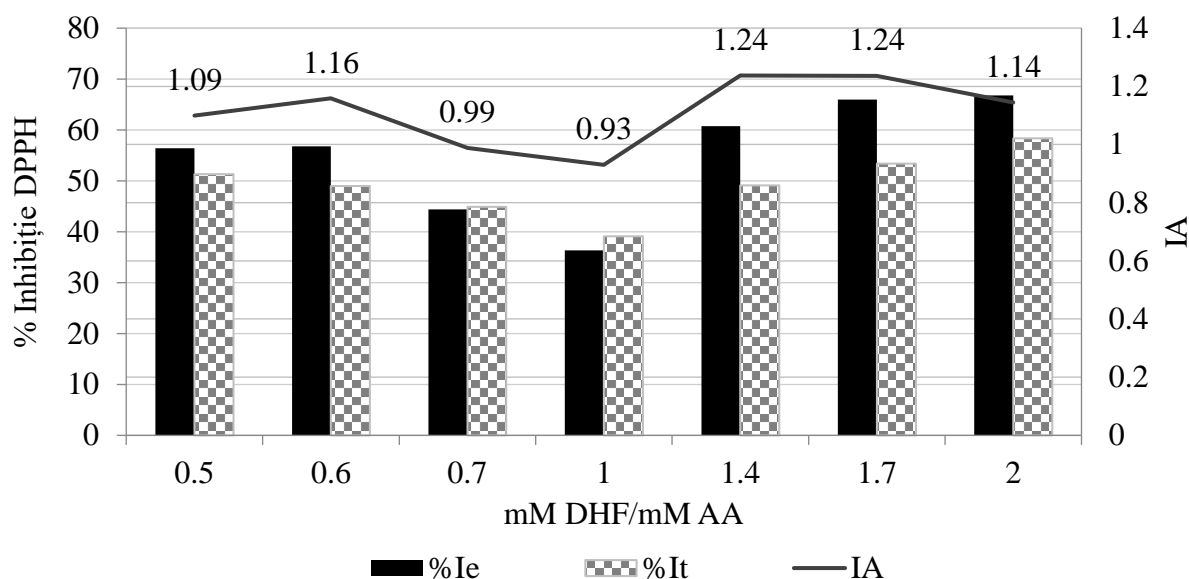


Figura 4.14. Reprezentarea %Inhibiției DPPH' determinată experimental și calculată teoretic (axa stângă); reprezentarea tipului de interacțiune antioxidantă pentru fiecare raport mM DHF/mM AA (axa dreaptă) [211, 214]

Pentru determinarea tipului de interacțiune antioxidantă dintre AA și DHF prin spectroscopia RES, mai multe raporturi de concentrații mM DHF/mM AA: 0.5, 0.6, 0.7, 1, 1.4, 1.7 și 2, au fost utilizate în reacția cu DPPH', după cum este ilustrat în Figura 4.14 [211, 214]. Dintre cele 7 raporturi investigate, raportul mM DHF/mM AA = 1 a oferit cel mai slab rezultat de 0.93, fiind caracteristic interacțiunilor aditive [211]. Raporturile mM DHF/mM AA de 1.4 și 1.7 au demonstrat cel mai puternic efect sinergic de 1.24 și, respectiv, cea mai mare activitate antioxidantă [211]. Faptul dat este observat și prin analiza procentelor de inhibiție a DPPH' teoretică și în amestec (Figura 4.14) [211, 214]. Astfel, pentru raporturile DHF/AA de 0.7 și 1, inhibiția radicalului calculată teoretic este mai mare decât cea determinată în amestec [211]. Totodată, în probele cu cel mai mare sinergism inhibiția DPPH' stabilită în amestec este mai mare decât cea teoretică [211].

Găsind raportul mM DHF/mM AA = 1.7 ca fiind cel care posedă cel mai puternic efect sinergic și inhibă eficient DPPH', în continuare a fost investigată dependența efectului sinergic de concentrația totală a antioxidantilor, respectând în toate probele raportul mM DHF/mM AA = 1.7 (conform Figurii 4.15) [211, 214]. Faptul dat, a permis determinarea indicelui FIC, care este o altă metodă de calcul a tipului de interacțiune antioxidantă dintre compuși. Metoda dată este des utilizată în biochimie și farmacologie pentru determinarea sinergismul/antagonismului dintre preparatele medicamentoase [215], de asemenea, este utilizată în microbiologie pentru evaluarea interacțiunilor sinergice dintre agenții antimicrobieni [125]. Spre deosebire de metoda descrisă de

ecuațiile 2.8 și 2.9 (Capitolul 2), în cazul metodei FIC, valorile mai mici decât 1 corespund tipului de interacțiune sinergică, iar cele mai mari decât 1 – interacțiunilor antagoniste.

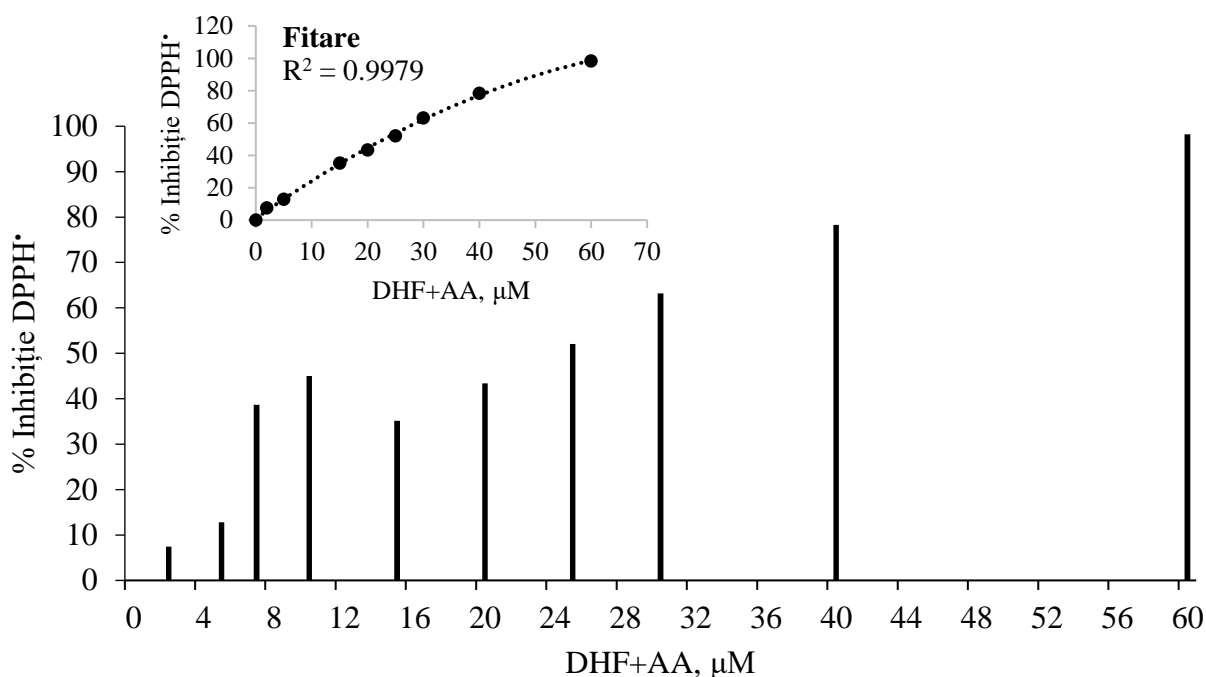


Figura 4.15. Ilustrarea dependenței procentului de inhibiție a DPPH• de concentrația totală de antioxidanți (DHF+AA, μM) combinați în raport mM DHF/mM AA = 1.7; Insert: fitarea reacției dintre amestecul AA – DHF și DPPH• după modelul exponențial [211, 214]

Pentru determinarea indicelui FIC, inițial este nevoie de a găsi valorile FIC individuale pentru fiecare antioxidant, care au fost calculate utilizând ecuațiile 2.11 și 2.12 (Capitolul 2). Utilizând ecuația 2.10, indicele FIC pentru raportul mM DHF/mM AA = 1.7 a fost stabilit ca fiind 0.9, valoare care descrie o interacțiune sinergică dintre cei doi antioxidanți [211, 214]. Astfel, prin utilizarea spectroscopiei RES și a două metode de calcul, a fost demonstrat efectul sinergic pronunțat dintre AA și DHF.

Datele obținute prin metoda RES sunt în concordanță cu rezultatele UV-Viz, care demonstrează efectul sinergic dintre AA și DHF, de asemenea, arată că, odată ce concentrația ambilor compuși crește, se îmbunătățește activitate antioxidantă totală și se mărește efectul sinergic.

Investigații la spectroscopia RMN

Utilizarea spectroscopiei ^{13}C RMN a reprezentat o tentativă de a elucidă mecanismul de interacțiune antioxidantă dintre AA și DHF în reacția cu DPPH• [199, 216]. Metoda dată a fost utilizată cu succes de către cercetătorii japonezi [117] într-o serie de experimente de determinare a modului de interacțiune dintre compușii naturali din ceai. Aceștia au demonstrat că între

antioxidanții din clasa compușilor fenolici și unii compuși non – fenolici există procese de regenerare reciprocă [117, 119, 120] asemănătoare celor prezente între AA și vitamina E [217]. În mod similar, studiul dat s-a axat pe ipoteza prezenței unor integrațiuni antioxidante sinergice dintre DHF și AA bazată pe mecanismul regenerării reciproce.

Respectând metodologia descrisă în literatură [120], în încercările de a stabili mecanismul efectului sinergic dintre AA și DHF, au fost urmate trei abordări de realizare a reacțiilor, fiecare dintre cele trei abordări fiind efectuată în amestecul de solvenți metanol- d_4 /acetonă- d_6 și în metanol- d_4 /cloroform- d_1 (detalii în Capitolul 2). Pentru a facilita analiza datelor, au fost stabilite semnalele caracteristice fiecărui compus, conform spectrelor RMN obținute (Figura 4.16) și datelor cunoscute în literatura de specialitate: [117, 119, 120]: AA: δ 63.8, 70.9, 77.1, 120.1, 154.8, 173.6 (ppm); ADA: δ 74.8, 75.0, 77.1, 77.2, 89.4, 89.6, 107.0, 107.5, 171.7, 172.6 (ppm); DHF: δ 136.5, 170.8 (ppm); DPPH-H: δ 121.6, 126.2, 127.9, 129.6, 130.2, 131.2, 135.2, 137.8, 143.1, 147.5 (ppm) [199, 216].

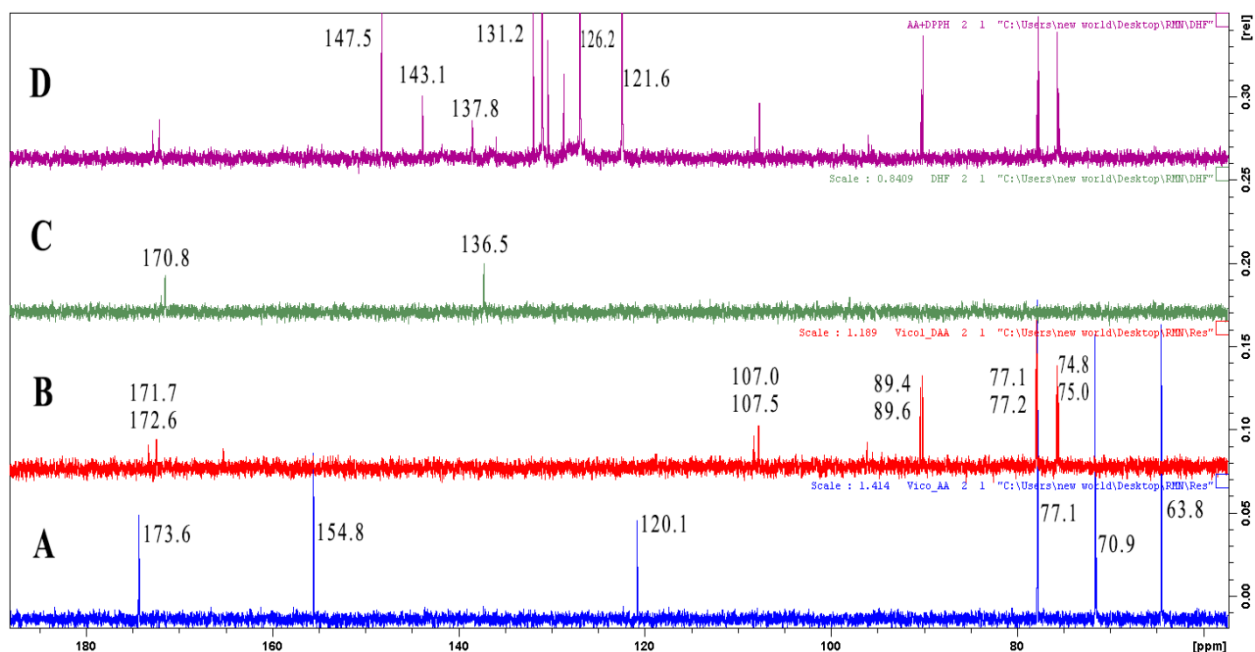


Figura 4.16. Spectrele ^{13}C NMR ale AA (A), ADA (B), DHF (C) și DPPH-H (D) în metanol- d_4 /acetonă- d_6 , regiunea 60-185 ppm [199, 216]

➤ Rezultate în metanol- d_4 /acetonă- d_6

Conform Figurii 4.17, după interacțiunea DHF cu DPPH*, semnalele caracteristice pentru DHF (136.5, 170.8 (ppm)) (Figura 4.17A) au dispărut și a apărut un nou semnal la 169.5 ppm (Figura 4.17B), care a fost atribuit speciei oxidate de DHF [199, 216]. Prezența semnalului dat demonstrează transferul de electroni către specia radicalică și oxidarea DHF. Conform studiilor anterioare [118], oxidarea DHF se soldează cu pierderea atomilor de hidrogen de la grupările

hidroxil și formarea *ceto*-grupelor. Conform datelor de interpretare a spectrelor ^{13}C RMN, deplasarea chimică pentru *ceto*-grupe este în zona 180 – 200 (ppm). Această disconcordanță dintre datele obținute și cele existente în literatură poate semnaliza asupra existenței unor procese secundare.

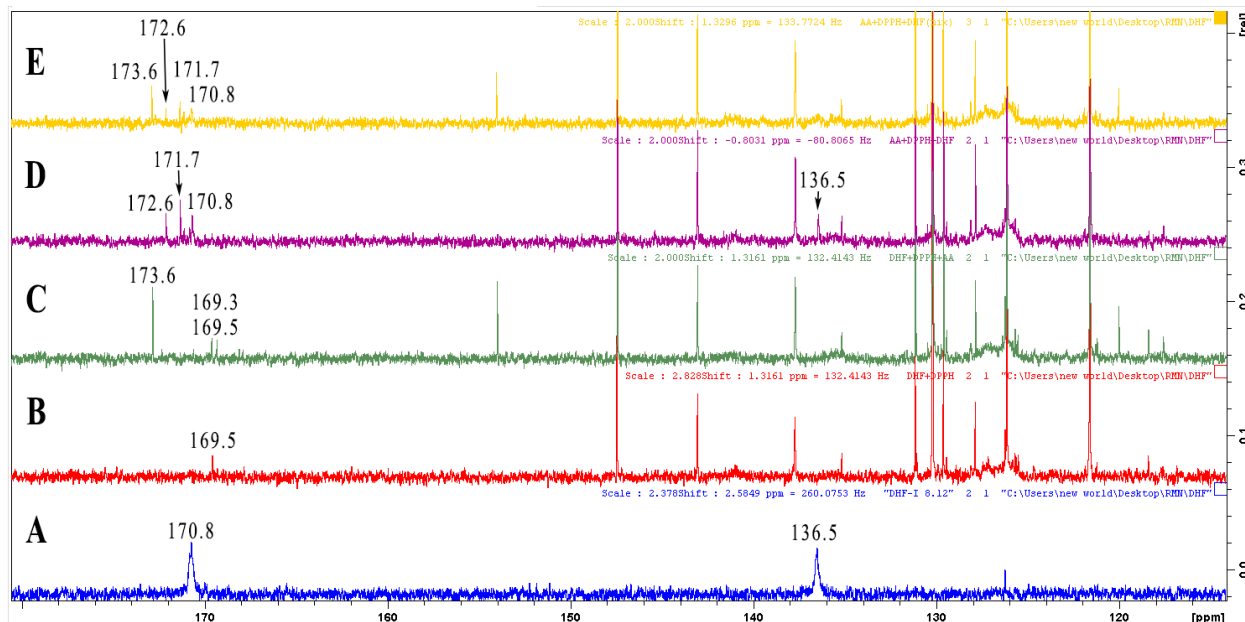


Figura 4.17. Spectrele ^{13}C RMN al DHF și reacțiile studiate *in situ* în metanol- d_4 /acetonă- d_6 , regiunea 120-175 ppm [199, 216]

Sazou și col. [218] au demonstrat că oxidarea DHF până la acidul dioxosuccinic este urmată de hidratarea moleculei și obținerea acidului dihidroxitartric (Figura 4.18) – eventuală situație și pentru exemplul dat.

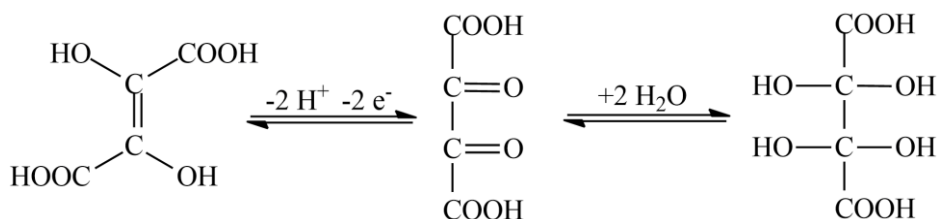


Figura 4.18. Schema oxidării DHF până la acidul dioxosuccinic urmată de hidratarea moleculei (Preluată [218])

Adăugarea AA la reacția dintre DHF și DPPH $^{\bullet}$ a determinat apariția în spectrul de ^{13}C RMN a semnalelor caracteristice AA (Figura 4.17C) [199, 216]. Lucrul dat indică că AA nu poate regenera DHF din forma sa oxidată. De asemenea, conform Figurii 4.17D, unde la reacția AA – DPPH $^{\bullet}$ a fost adăugat DHF, sunt prezente semnalele caracteristice DHF (136.5, 170.8 (ppm)) și ADA, care demonstrează că nici în experimentul dat procese de regenerate dintre antioxidanți nu au loc [199, 216].

Amestecând cei doi antioxidanți și adăugând DPPH*, în spectrul RMN (Figura 4.17E) sunt prezente, în proporții egale, semnalele pentru AA și ADA; de asemenea, a fost detectat semnalul la 170.8 ppm caracteristic DHF [199, 216]. Efectuând experimentul după abordarea III, a fost urmărit scopul de a determina care dintre antioxidanți se oxidează mai rapid [199, 216]. Prin urmare, prezența semnalelor caracteristice formelor reduse de DHF și AA demonstrează că o anumită cantitate din ambii compuși au interacționat cu DPPH* anihilându-l complet [199, 216]. Faptul dat este în concordanță cu studiile existente [118] și confirmă ca DHF este un antioxidant rapid cu acțiune antiradicalică similară cu cea a AA.

➤ Rezultate în metanol- d_4 /cloroform- d_1

Spre deosebire de rezultatele obținute în metanol- d_4 /cloroform- d_1 , după oxidarea DHF în amestecul de solvenți metanol- d_4 /cloroform- d_1 , în spectrul ^{13}C RMN nu a fost detectat semnalul atribuit formei oxidate de DHF de la 169.5 ppm (Figura 4.19B) [199, 216]. Totuși, judecând după datele obținute la spectroscopia UV-Viz și conform schimbarea culorii amestecului DHF – DPPH* din violet în maro, reacția de oxido-reducere dintre DHF și DPPH* a avut loc [199, 216].

Sazou și col. [218] au arătat prin intermediul voltametriei ciclice că, în medii acide, produsul de oxidare al DHF decarboxilează până la CO_2 și acidul 1,2-dihidroxiacrilic [218], care în continuare poate să se descompună producând glicolaldehidă [219].

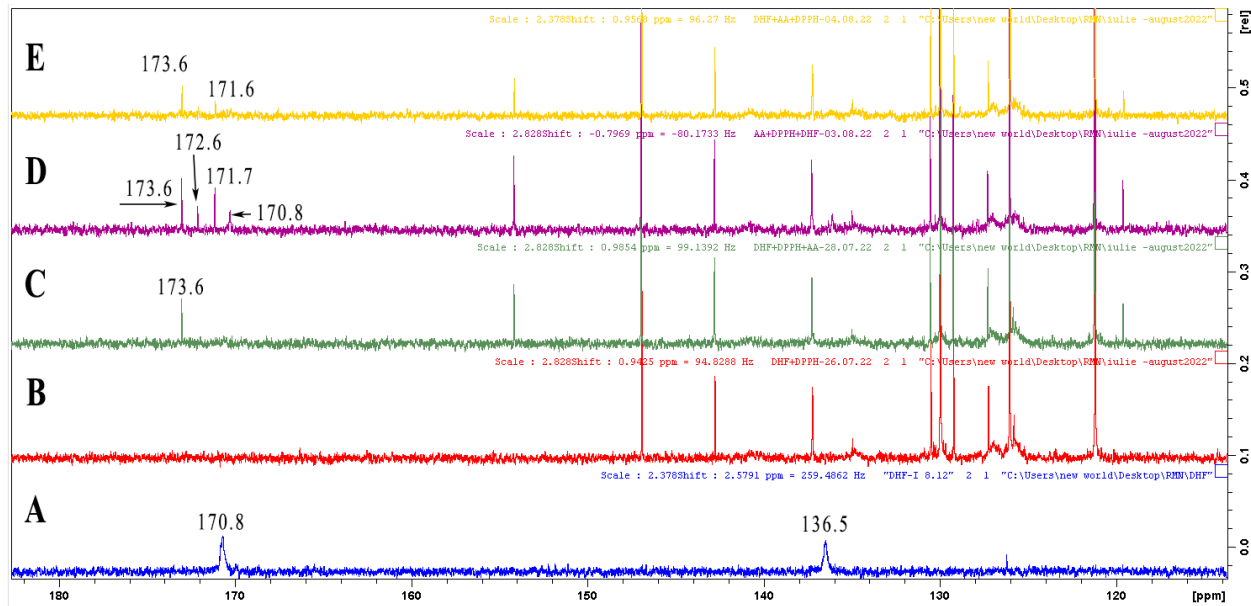


Figura 4.19. Spectrele ^{13}C RMN al DHF și reacțiile studiate *in situ* în metanol- d_4 /cloroform- d_1 , regiunea 120-175 ppm [199], [216]

Pentru a clarifica condițiile de apariție a semnalului de la 169.5 ppm atribuit formei oxidate de DHF (Figura 4.17B), care poate fi observat în metanol- d_4 /cloroform- d_6 , au fost analizate spectre ^1H și ^{13}C RMN [199, 216]. Datele au demonstrat că în solvenții metanol- d_4 /acetonă- d_6 , DHF este

implicat atât în setul dublu de semnale din spectrele ^1H și ^{13}C caracteristice amestecului de solvenți, cât și în semnalul puternic de la 100.8 ppm în spectrele ^{13}C (Figura 4.20, cazurile B, C, E) [199, 216].

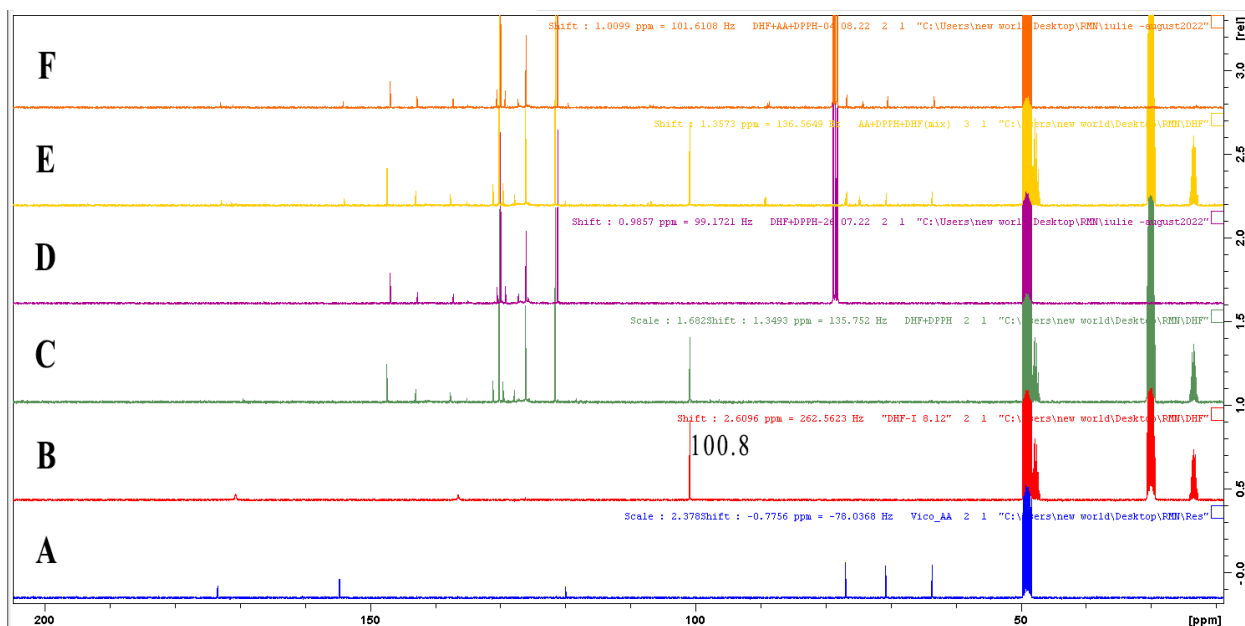


Figura 4.20. Spectrele ^{13}C RMN ale DHF și ale reacțiilor studiate *in situ* în metanol- d_4 /acetona- d_6 (A, B, C and E) și metanol- d_4 /cloroform- d_1 (D and F) [199, 216]

Astfel că, în baza experimentelor RMN 2D (Figura 4.21) și DOSY poate fi sugerată posibilitatea existenței unor procese de polimerizare a acetonei declanșată de DHF, cu participarea metanolului [199, 216]. În amestecul metanol- d_4 /cloroform- d_1 , această dublare a semnalului nu a fost detectată (Figura 4.20, cazurile D și E) [199, 216], faptul dat susținând posibilitatea decarboxilării DHF în metanol- d_4 /cloroform- d_1 după exemplul raportat în literatură [218].

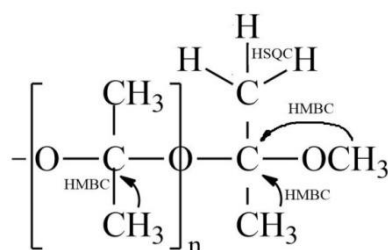


Figura 4.21. Structura propusă pentru polimerul acetonei [199, 216]

Pe de altă parte, asemenea procese secundare în care este implicat DHF ar putea fi prezente și în amestecul DHF – Rut, descris în subcapitolul 4.3. Reacții de condensarea dintre DHF și alți compuși naturali sunt descrise în literatură [182, 183].

Analizând în continuare Figura 4.19C, poate fi menționat că prezența semnalelor de intensitate mare caracteristice AA confirmă faptul că AA nu regenerează DHF nici în amestecul

de solvenți metanol- d_4 /cloroform- d_1 , probabil, din cauza decarboxilării acestuia [199, 216]. Pe de altă parte, în Figura 4.19D, care conține spectrul ^{13}C RMN pentru reacția dintre AA – DPPH $^\bullet$, la care a fost adăugat DHF, pot fi identificate semnalele pentru AA și ADA, precum și semnale de intensitate mică la 136.5, 170.8 (ppm) specifice DHF [199, 216]. Dacă comparăm spectrul din Figura 4.17D cu cel din Figura 4.19D observăm că în primul sunt prezente picurile la 172.6 și 171.7 (ppm) atribuite ADA; în Figura 4.19D, pe lângă semnalele pentru ADA este prezent și un pic de intensitate mare la 173.6 ppm care este caracteristic AA. Aceste date sugerează că în metanol- d_4 /cloroform- d_1 DHF poate regenera parțial ADA până la AA [199, 216].

Judecând după intensitatea mică a semnalelor atribuite AA și ADA din Figuri 4.19E, ambii antioxidanți – AA și DHF, anihilează rapid specia radicalică, asemănător rezultatelor obținute în metanol- d_4 /acetonă- d_6 . Pe de altă parte, dispariția completă a semnalelor pentru DHF confirmă că DHF este un antioxidant rapid și susține ideea unei parțiale regenerări a ADA până la AA [199, 216].

Regenerarea reciprocă a antioxidanților AA și DHF s-a dovedit a fi dependentă de natura solvenților utilizați, în cazul de față, ipoteza dată fiind valabilă numai în mediul de metanol- d_4 /cloroform- d_1 , unde s-a stabilit regenerarea parțială a ADA de către DHF [199, 216] (Figura 4.22B). Fenomenul dat are o legătură directă cu procesele de polimerizare sau de decarboxilare care au loc și care depind de solvenții utilizați (Figura 4.22). Prin urmare, poate fi presupus că în 96% EtOH pot avea loc procese similare de regenerare dintre antioxidanți.

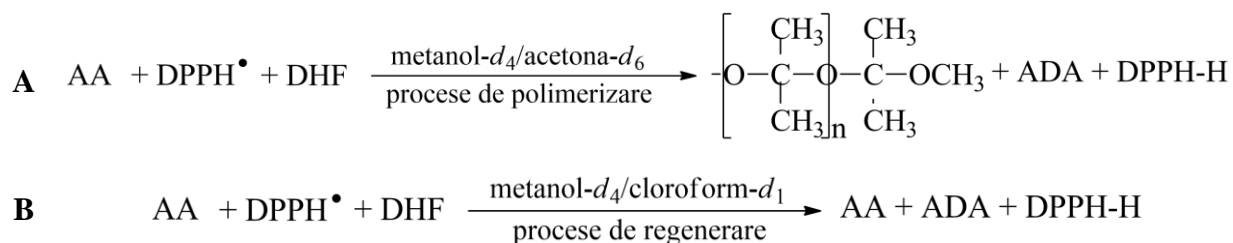


Figura 4.22. Schemele generale ale mecanismelor de acțiune antioxidantă a amestecurilor AA – DHF în metanol- d_4 /acetonă- d_6 (A) și metanol- d_4 /cloroform- d_1 (B)

Raportând rezultatele obținute prin spectroscopia RMN la datele experimentele obținute la spectroscopiile Stopped-Flow, UV-Viz și RES, unde a fost urmată abordarea III (DHF și AA au fost amestecați, apoi a fost adăugat DPPH $^\bullet$), poate fi afirmat că în reacția cu DPPH $^\bullet$, între AA și DHF există o competitivitate îndreptată spre anihilarea radicalului liber. Această situație este determinată de acțiunea rapidă a ambilor compuși și de capacitatea antioxidantă sporită a acestora. În cazul de față, deși nu poate fi afirmat cu certitudine care este mecanismul de interacțiune antioxidantă operativ în combinația AA – DHF, a fost stabilit că 1) procese de regenerare parțială dintre AA și DHF au loc în anumite condiții de reacție și că 2) DHF este compusul care regenerează

AA și nu invers după cum se întâmplă în amestecurile AA – compuși fenolici [120]. De asemenea, soluțiile formate din 96% EtOH, AA și DHF posedă aciditate relativ mare – 3.64 până la 4.04 (Tabelul 4.2), caracterizată prin predominarea formei *ceto*- [218], fapt care poate determina decarboxilarea parțială a DHF.

4.4.3. Interacțiuni antioxidante dintre acidul ascorbic și resveratrol

Resveratrolul este un stilben natural intens investigat în ultimii ani datorită activităților antioxidante, antimicrobiene, antifungice, cardioprotectoare, antitumorale [158, 220–223] pe care le manifestă. Acest compus este pe larg răspândit în natură, totuși, se poate găsi doar în concentrații mici, fructele cu cel mai mare conținut de resveratrol fiind strugurii [15].

Descoperirea activității antioxidante a stilbenului dat a intensificat studiul mecanismului său de oxidare. Unele surse bibliografice sugerează că oxidarea Res se petrece la gruparea carbonil în ciclul B, la grupa 4' – OH [224, 225]; alte studii sugerează că în timpul oxidării Res au loc procese de polimerizare, cu formarea viniferinelor [41, 200, 201]. Viniferinele sunt compuși naturali, dimeri, trimeri, tetrameri și oligomeri ai resveratrolului [226], care posedă activitate biologică, inclusiv activitate antioxidantă [227, 228].

Studiul în combinație cu diverși compuși antioxidanți și non-antioxidanți [9, 63, 223], datele au arătat diferite rezultate, astfel, demonstrându-se că tipul de interacțiune antioxidantă dintre resveratrol și compușii naturali este puternic influențat de condițiile experimentale. Referitor la studiul efectelor antioxidante dintre resveratrol și acidul ascorbic, puține date au fost publicate până în prezent, în ciuda faptului că ambii compuși sunt prezenți în diverse surse naturale și ar putea interacționa cu ușurință. Mai mult, există date despre interacțiunile antioxidante ale acestor compuși în reacția cu DPPH[•]. Astfel, în continuare au fost utilizate spectrometriile UV-Viz și RMN, pentru a înțelege mecanismul de interacțiune antioxidantă dintre resveratrol și acidul ascorbic în reacția cu DPPH[•].

Investigații la spectroscopia UV-Viz

După cum este redat în subcapitolul 4.1, valoarea CE₅₀ pentru AA este de 0.24, iar pentru Res este de 1.15, ceea ce demonstrează că AA este un antioxidant mai eficient în reacția redox de anihilare a DPPH[•] [154].

Constatările raportate anterior demonstrează efectul pozitiv al amestecului Res – AA în reducerea stresului oxidativ [229], în diminuarea incidenței infarctului miocardic [222], combinația dată manifestând interacțiuni antioxidante regenerative [230].

În actuala investigație la spectroscopia UV-Viz, au fost urmate trei abordări de efectuare a experimentului, cu scopul de a înțelege efectul consecutivității adăugării compușilor asupra

activității antioxidante: I) amestecarea antioxidanților în raport molar 1:1 Res/AA, urmată de adăugarea DPPH^{*} (timp de reacție – 1 oră); II) amestecarea Res și DPPH^{*} (timp de reacție - 1 oră), apoi adăugarea AA (timp de reacție – 15 min); III) amestecarea AA și DPPH^{*} (timp de reacție – 15 min), apoi adăugarea Res (timp de reacție – 1 oră) [202, 231, 232]. Din Figura 4.23, se poate observa că doar abordarea II, care presupune, în primul rând, interacțiunea Res cu DPPH^{*}, urmată de adăugarea AA, oferă un efect sinergic pronunțat de 1.19 [202, 231, 232]. Celelalte abordări – I și III, au valorile inhibiției experimentale (%Ie) mai mici decât cele teoretice (%It), prin aceasta fiind argumentate efectele antagoniste de 0.87 și, respectiv, 0.86 [202, 231, 232].

Rezultatele reprezentate în Figura 4.23 indică clar că, în aceste condiții de reacție, (1) sunt posibile atât IA sinergice, cât și antagoniste între aceleași concentrații de Res și AA, de asemenea (2) consecutivitatea adăugării compușilor în reacție este un factor determinant pentru manifestarea unui anumit tip de IA dintre antioxidanți [202, 231, 232]. Prin urmare, putem presupune că prin modificarea ordinii de adăugare a compușilor, mecanismele de interacțiune antioxidantă sunt semnificativ afectate.

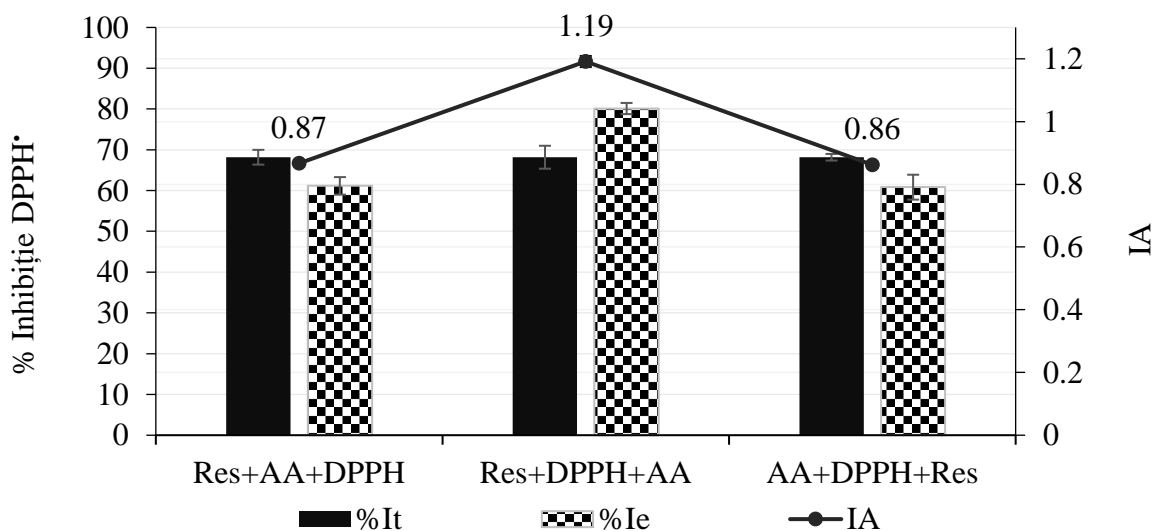


Figura 4.23. Reprezentarea grafică a %It, %Ie și a IA pentru abordările I (Res+AA+DPPH^{*}), II (Res+DPPH^{*}+AA) și III (AA+DPPH^{*}+Res) [202, 231 232]

Potrivit literaturii de specialitate, exista mai multe mecanisme de interacțiune între compuși: (1) procesele de regenerare, (2) formarea complexilor intermoleculari, dimerilor sau aducțiilor și (3) efecte complementare [60, 61]. Datele publicate anterior [45, 152] confirmă că prezența acidului ascorbic în soluție determină procese de polimerizare, fenomen care ar putea fi valabil și pentru combinația AA – Res.

Raportul molar DPPH^{*}/antioxidant poate, de asemenea, influența semnificativ activitatea antioxidantă a compușilor testați, prin aceasta, și tipul interacțiunii antioxidante, după cum a fost

în cazul catechinei [165]. Pentru a investiga impactul concentrației compușilor asupra activității antioxidante, au fost testate diferite raporturi molare Res/AA în reacția cu DPPH*, respectând cea de-a doua abordare de efectuare a experimentului.

Figura 4.24 demonstrează că toate probele cu diferite raporturi molare Res/AA, de la 5:1 la 1:5, posedă efect sinergic [202, 231, 232]. Cel mai puternic efect sinergic – 1.19, a fost înregistrat pentru raportul molar 1:1 Res/AA, urmat de raporturile Res/AA 2:1 și 1:2 cu efecte sinergice de 1.17 fiecare [202, 231, 232].

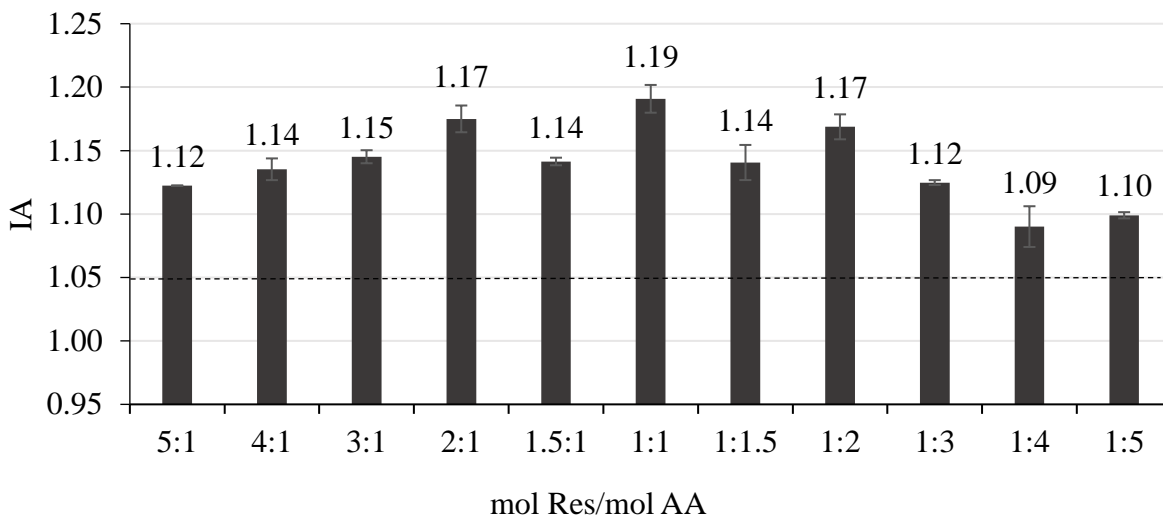


Figura 4.24. Reprezentarea grafică a interacțiunilor antioxidante ale diferitor raporturi molare Res/AA. Valorile mai mari de 1.05 (mai sus de linia întreruptă), inclusiv, sunt caracteristice IA sinergice [202, 231, 232]

Raporturile molare 1.5:1 și 1:1.5 Res/AA au înregistrat o valoare a IA de 1.14. Pe măsură ce diferența de concentrație între cei doi antioxidanți devine mai mare, efectul sinergic scade (Figura 4.24) [202, 231, 232]. Cea mai mică valoare a IA de 1.09 a fost observată pentru raportul molar 1:4 Res/AA [202, 231, 232].

Interacțiunile antioxidante sinergice prezintă cel mai mare interes pentru știință și industrie datorită avantajelor pe care le oferă [5]. Prin urmare, investigațiile ulterioare s-au concentrat pe stabilirea mecanismului de acțiune ce determină prezența efectului sinergic al raportului molar Res/AA = 1:1, urmând consecutivitatea adăugării compușilor din abordarea II [202, 231, 232].

Investigații la spectroscopia C^{13} RMN

Spectroscopia ^{13}C RMN a fost utilizată pentru a clarifica mecanismului de acțiune antioxidantă dintre AA și Res, urmând metoda descrisă în literatură [117, 119, 120]. Rezultatele obținute de la spectroscopia UV-Viz sugerează că abordările I și III urmează același mecanism de interacțiune antioxidantă: AA, fiind un antioxidant rapid, interacționează primul cu DPPH*, apoi

speciile radicalice rămase interacționează cu Res. Astfel, au fost alese abordările I și II pentru studiul comparativ la spectroscopia RMN [202, 231, 232].

Pentru a facilita analiza datelor ^{13}C RMN, următoarele semnale caracteristice au fost alese pentru identificarea compușilor: AA – 64.3 ppm, ADA – 89.9 ppm, Res – 117.1 ppm, DPPH-H – 122.1 ppm, oligomer Res – 58.9 ppm (Figura 4.25) [202, 231, 232].

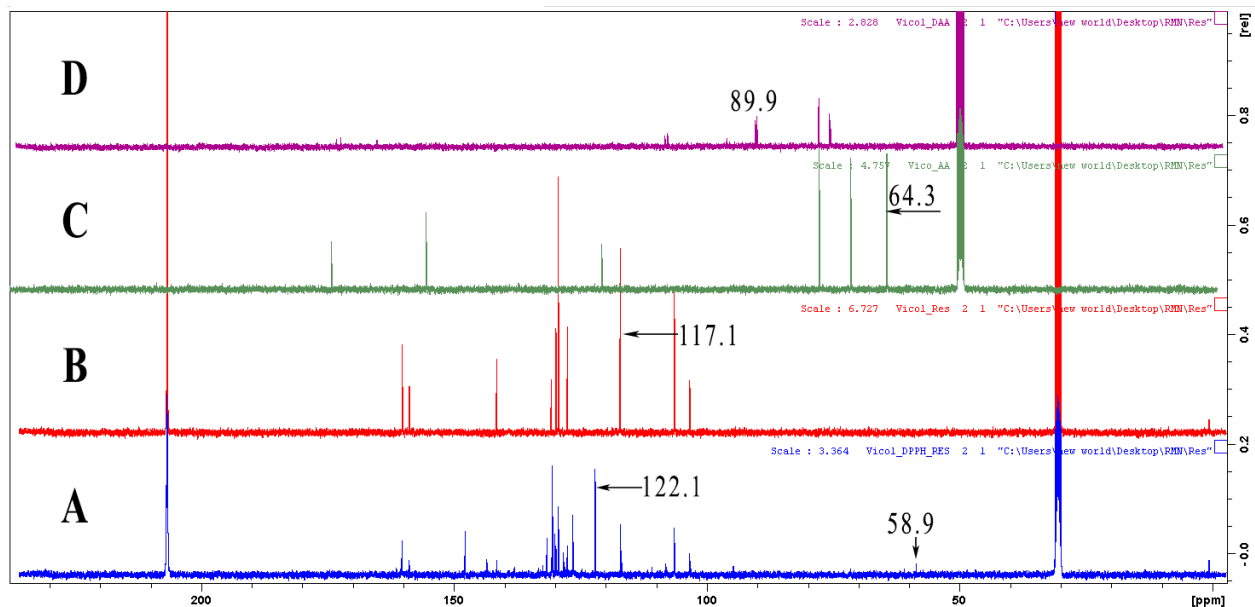


Figura 4.25. Spectrele ^{13}C RMN pentru: A) reacția Res – DPPH', raport molar 1:1, t.c., 1 oră, în acetonă- d_6 ; B) Res în acetonă- d_6 ; C) AA în metanol- d_4 ; D) ADA în metanol- d_4 [202, 231, 232]

Conform Figurii 4.25A, în spectru nu sunt prezente semnalele carbonil caracteristice Res-chinonei, la aproximativ 180 ppm, formarea căreia a fost propusă anterior [224, 225] în urma oxidării stilbenului. Cu toate acestea, schimbarea culorii probei de analizat din violet în galben închis a demonstrat că reacția a avut loc. Drept confirmare a servit semnalul de la 58.9 ppm în regiunea tipică oligomeriilor Res (ca produse de reacție a oxidării stilbenului) [41, 68, 201], care poate fi observat în spectrul A al Figurii 4.25 [202, 231, 232].

Resveratrolul și oligomerii acestuia sunt cunoscuți ca fitoalexine produse de plante ca răspuns la infecții, iradiere UV sau alte tipuri de stimuli fiziologici [226]. Studiile au demonstrat că formarea viniferinelor este o consecință a oxidării resveratrolului în prezența diverșilor radicali liberi [41, 200, 201, 233]. După cum se observă din Figura 4.25A, interacțiunea dintre Res și DPPH' de asemenea se soldează cu formarea viniferinelor, și anume a *trans*- δ -viniferinelor [202, 231, 232]. Întrucât polimerizarea Res și formarea viniferinelor este un proces ireversibil, ipoteza potrivit căreia efectul sinergic dintre cei doi compuși se datorează proceselor de polimerizare provocate capătă o argumentare temeinică [202, 231, 232].

Din Figura 4.26 se poate observa că oligomerii Res - *trans*- δ -viniferinele, se formează doar urmând cea de-a II-a abordare de efectuare a experimentului – aceeași abordare pentru care, la spectroscopia UV-Viz, a fost observată cea mai puternică interacțiune antioxidantă sinergică (Figura 4.23) [202, 231, 232].

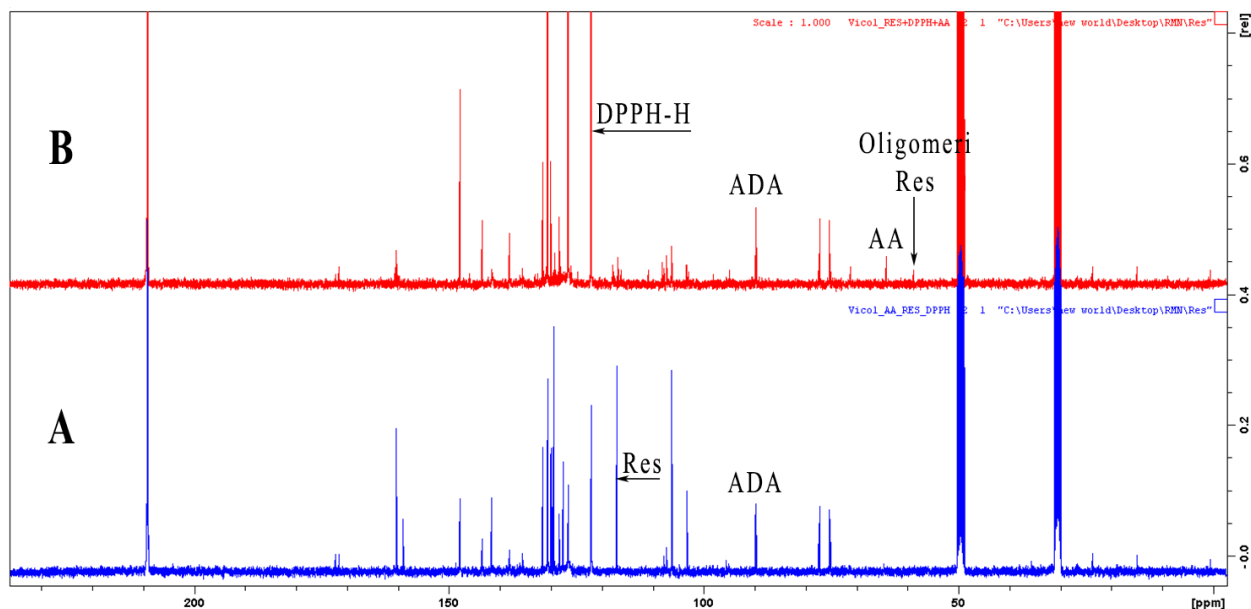


Figura 4.26. Spectrele ^{13}C RMN pentru AA : Res : DPPH' în raport molar 1:1:2.6 molar urmând I-a abordare (A) și a II-a abordare (B) [202, 231, 232].

Pe lângă aceasta, în spectre apare un semnal intens pentru ADA, la 89.9 ppm, demonstrând că AA participă la reacțiile efectuate prin ambele abordări (Figura 4.26) [202, 231, 232]. Comparând spectrele A și B (Figura 4.26), se poate observa că, în spectrul B, apar ambele semnale pentru AA și ADA [202, 231, 232]. Acest lucru se datorează anihilării DPPH' de către AA, deoarece raportul molar Res:DPPH' (1:2.6) este insuficient pentru a elimina tot radicalul liber, ulterior, speciile radicalice rămase interacționează cu AA. Acest lucru confirmă stoichiometria compușilor declarată în subcapitolul 4.4.1 [202, 231, 232].

În reacția descrisă de spectrul A din Figura 4.26, care a urmat I-a abordare, AA anihilează toți radicalii liberi, deoarece se oxidează mai rapid, iar Res rămâne în forma sa redusă. Cazurile A și B din Figura 4.26 demonstrează că AA nu regenerează oligomerii Res, după cum nici Res nu regenerează ADA până la forma inițială de AA [202, 231, 232]. De asemenea, este important de subliniat că ordinea adăugării compușilor în reacție este decisivă, deoarece oligomerii Res se formează doar prin a II-a abordare, unde, în primul rând, Res interacționează cu DPPH' și formează *trans*- δ -viniferine, așa cum este arătat în Figura 4.25A, apoi este adăugat AA și restul radicalilor liberi sunt anihilați [202, 231, 232].

Figura 4.27 sunează rezultatele obținute cu privire la tipurile de interacțiuni antioxidante dintre AA și Res în conformitate cu abordările urmate:

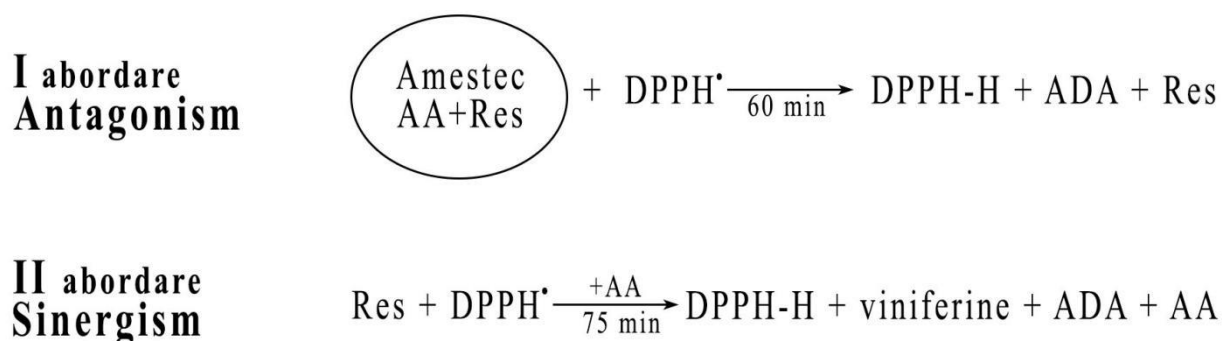


Figura 4.27. Reprezentarea diferitor produși de reacție și a diferitor tipuri de efecte antioxidante generați(te) în urma abordărilor I și II [202, 231, 232]

Pe baza Figura 4.27, se poate concluziona că tipul sinergic de interacțiune între Res și AA depinde de formarea *trans-δ*-viniferinelor, despre care se știe că posedă activitate antioxidantă. Prin urmare, combinația Res – AA urmează mecanismul de „formare a complexilor intermoleculari, dimerilor sau aducților” și generează efect sinergic pronunțat [202, 231, 232]. De asemenea, putem menționa că raportul molar AA : Res : DPPH* este la fel de important, așa cum a fost demonstrat și pentru exemplul de interacțiune acid ascorbic – catehină [45].

4.5. Activitatea antioxidantă a preparatului ENOXIL și interacțiunile antioxidante în amestec cu acidul ascorbic

Preparatul ENOXIL este un produs medicinal autohton obținut din enotaninurile din struguri prin procese de oxidare lentă [234]. Preparatul dat constă din compuși fenolici și carboxilici, cetone, aldehide și esteri [234], fiind un produs foarte higroscopic și instabil la temperaturi mai mari de 70°C. Preparatul ENOXIL posedă activități antiseptice și antioxidante, de asemenea, este un produs medicinal non-toxic și eficient contra infecțiilor de piele [234].

În studiul dat, activitatea antioxidantă a preparatului autohton ENOXIL a fost studiată prin intermediul metodelor spectrale descrise în literatură, cu utilizarea compușilor cromofori: DPPH*, ABTS^{•+}, Folin-Ciocalteu, PRFe, în apă distilată și în STF (pH = 7.4) [235, 236].

Conform Figurii 4.28, preparatul ENOXIL posedă activitate antioxidantă în reacția cu DPPH* comparabilă cu cea a compușilor polifenolici naturali [235, 236]. Valoarea CE₅₀ atât pentru proba dizolvată în apă, cât și pentru cea din STF este de 2.1, ENOXUL-ul având proprietăți antioxidante mai puțin pronunțate decât restul compușilor testați (Figura 4.28) [235, 236]. Faptul

dat demonstrează că 2.1 g/L ENOXIL anihilează în proporție de 50% 1 g/L DPPH^{*}, iar pentru a anihila 100% radicalul de aceeași concentrație, este nevoie de 4.2 g/L ENOXIL [235, 236].

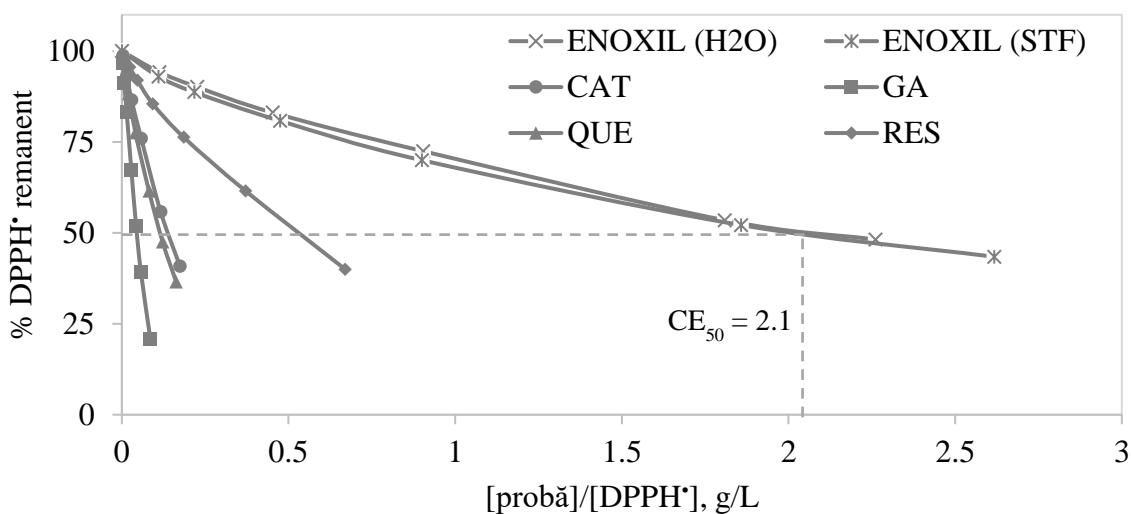


Figura 4.28. Reprezentarea activității antioxidante a preparatului ENOXIL dizolvat în apă și în STF în comparație cu activitatea antioxidantă a catechinei, quercetinei, acidului galic și resveratrolului în reacția cu DPPH^{*} [235, 236]

Comparând aceste date cu activitatea antioxidantă a compușilor naturali din struguri – Cat, Que, GA, Res, se observă că preparatul ENOXIL posedă activitate antioxidantă mai slabă, întrucât este nevoie de mai mult compus pentru a neutraliza aceeași concentrație de radicali liber [235, 236].

Exprimând rezultatele în g EAA/L, devine posibilă compararea activităților antioxidante a probelor de ENOXIL în apă și în STF după cum este ilustrat în Figura 4.29 [235, 236].

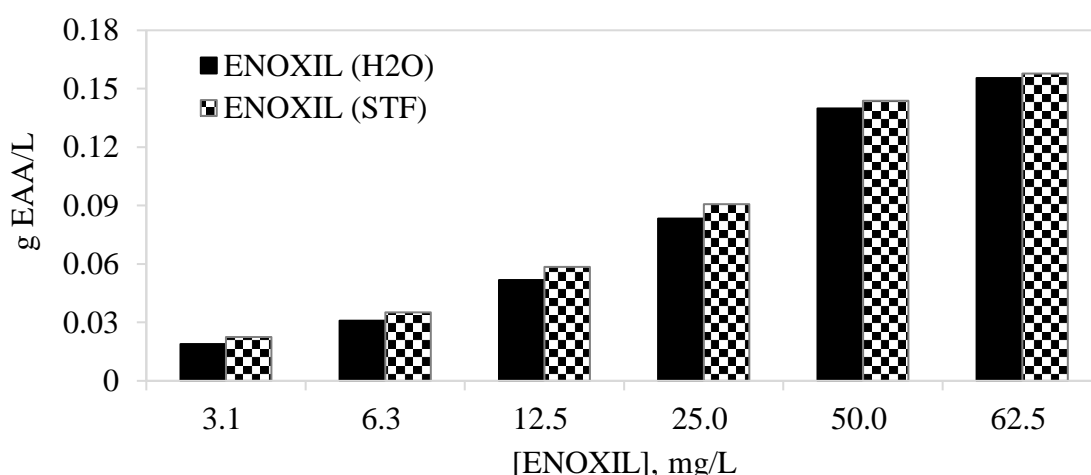


Figura 4.29. Activitatea antioxidantă a preparatului ENOXIL în apă și în STF exprimată în g EAA/L în reacția cu 0.03 g/L DPPH^{*} [235, 236]

Figura 4.29 ilustrează dependența activității antioxidante a ENOXIL-ului de concentrația acestuia, demonstrând că 25.00 mg/L ENOXIL acționează ca 0.08 g EAA/L, 62.50 mg/L ENOXIL acționează ca 0.16 g EAA/L etc [235, 236]. Diferența dintre datele obținute în apă și în STF este nesemnificativă, cu un mic avantaj al rezultatelor în STF, ceea ce s-ar putea fi o consecință a specificului metodei DPPH^{*} utilizate [235, 236].

În reacția cu ABTS^{•+}, preparatul ENOXIL prezintă activitate antioxidantă sporită (Figura 4.30). Cele două probe de ENOXIL demonstrează activitate antioxidantă mai mare decât compusul natural din struguri – Res [235, 236].

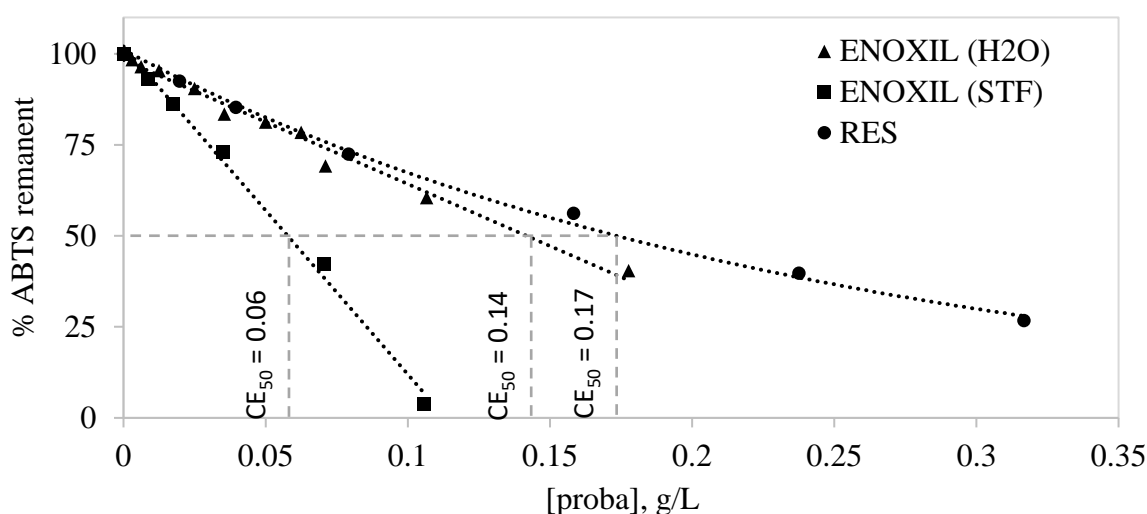


Figura 4.30. Reprezentarea CE₅₀ pentru probele de ENOXIL în apă, în STF și pentru Res în reacția cu ABTS^{•+} [235, 236]

Comparând cele două probe de ENOXIL (în apă și în STF), se observa că proba dizolvată în STF posedă activitate antioxidantă semnificativ mai mare, având indicele CE₅₀ = 0.06, comparativ cu CE₅₀ = 0.14 pentru proba în apă [235, 236]. Faptul dat indică că în STF este nevoie de mai puțin ENOXIL pentru anihilarea aceleiași cantități de radical liber, respectiv, în acest mediu captarea radicalilor liberi de preparatul ENOXIL este mai eficientă [235, 236].

În Figura 4.31 este reprezentată diferența în g ETrolox/L dintre activitatea antioxidantă a ENOXIL-ului în apă și în STF în reacția cu ABTS^{•+}. Se observa clar că în STF activitatea antioxidantă a preparatului este de două ori mai mare decât în apă, spre exemplu, pentru concentrația de 105.60 mg/L ENOXIL activitatea antioxidantă este de 0.28 g ETrolox/L pentru proba în apă, iar pentru proba în STF este de 0.70 g ETrolox/L [235, 236].

Metoda Folin-Ciocalteu (Figura 4.32) a confirmat activitatea antioxidantă a preparatului ENOXIL și a întărit ideea că în STF preparatul dat este mai activ decât în apă, spre exemplu,

pentru concentrația 140.80 mg/L de probă a fost înregistrată o activitate antioxidantă de 5.30 mg EAG/L în apă și de 7.50 mg EAG/L în STF.

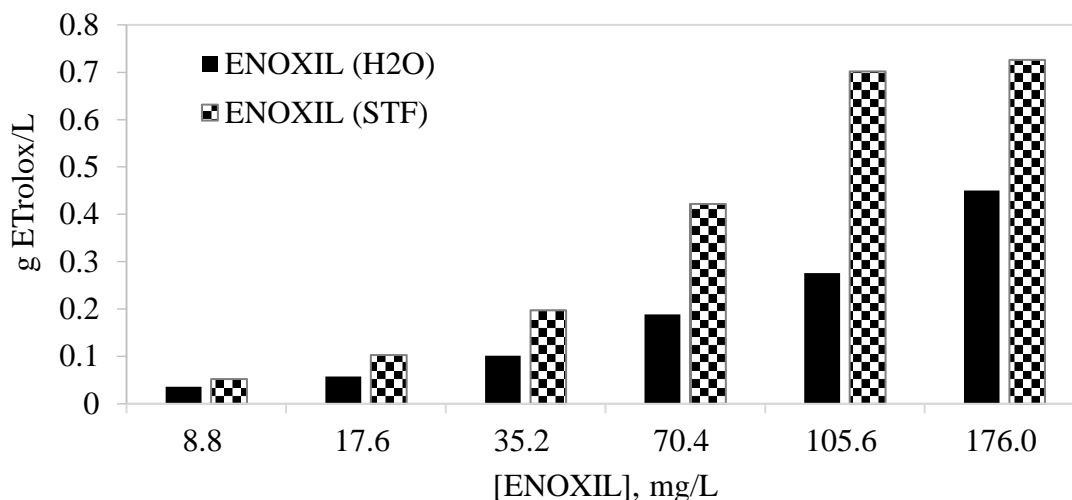


Figura 4.31. Activitatea antioxidantă a ENOXIL-ului în apă și în STF determinată prin metoda ABTS⁺ și exprimată în g ETrolox/L [235, 236]

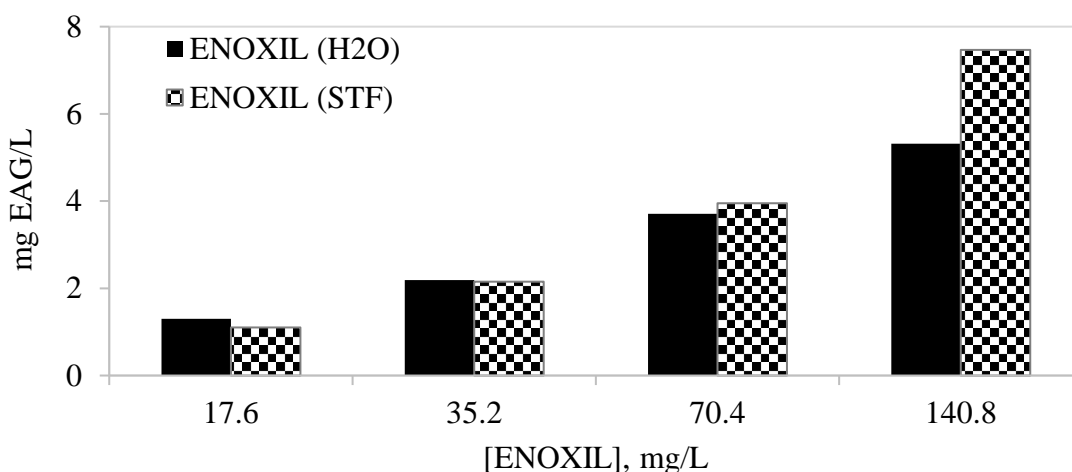


Figura 4.32. Rezultatele testului Folin-Ciocalteu de determinare a activității antioxidante a preparatului ENOXIL în apă și în STF exprimate în mg EAG/L [235, 236]

De asemenea, odată cu creșterea concentrației de ENOXIL se mărește și diferența dintre activitatea antioxidantă a probelor dizolvate în apă și în STF [235, 236].

Activitatea prooxidantă a compușilor naturali constă în capacitatea acestora de reducere a ionul de Fe(III) până la Fe(II) urmată de formarea compusului cromofor Albastru de Berlin. Figura 4.33 indică asupra unei capacități sporite a ENOXIL-ului de a reduce Fe(III) [235, 236]. În special, activitate semnificativă manifestă proba dizolvată în STF, care prezintă capacitate prooxidantă de trei ori mai mare decât proba în apă: pentru concentrația maximă analizată de 70,40 mg/L ENOXIL– 0.13 g EAA/L în apă, și 0.51 g EAA/L în STF [235, 236].

Activitatea antioxidantă sporită a preparatului ENOXIL în STF se poate datora faptului că compușii polifenolici sunt mai susceptibili la oxidare la pH bazic [237], iar în studiul dat, cele două medii de reacție au avut pH diferit: apă distilată – 7.0, iar STF – 7.4 (Figura 4.34).

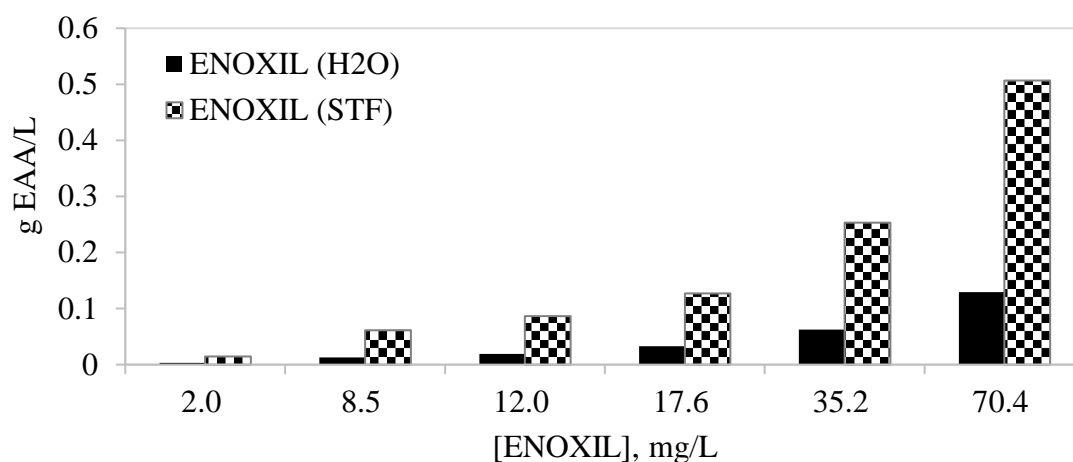


Figura 4.33. Activitatea prooxidantă a ENOXIL-ului în apă și în STF exprimată în g EAA/L [235, 236]

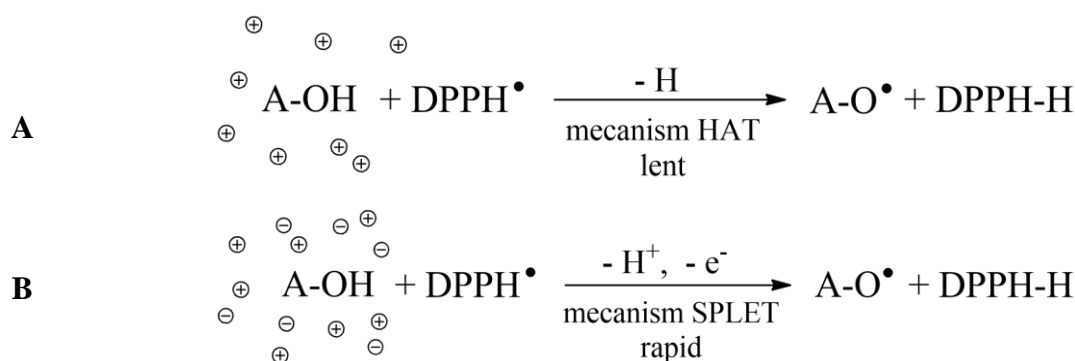


Figura 4.34. Schemele generale ale mecanismelor HAT (A) și SPLET (B) prin care poate acționa preparatul ENOXIL în reacția de anihilare a DPPH[•]

În mediul bazic, compușii polifenolici anihilează speciile radicalice prin mecanismul SPLET, care presupune inițial cedarea protonului, apoi transferul electronului, astfel că, eficiența mecanismului dat este direct proporțională cu posibilitatea moleculelor antioxidante de a ceda protonii (Figura 4.34). În STF, acest mecanism este sporit prin neutralizarea de către soluția tampon a protonilor cedați de antioxidant, urmată de cedarea electronului de la speciile deprotonate [235, 236] (Figura 4.34).

Interacțiuni antioxidante dintre ENOXIL și acidul ascorbic

Probele cu anumite concentrații de AA și preparatul ENOXIL prezintă activitatea antioxidantă sporită contra radicalului DPPH (Figura 4.35) [235, 236]. Studiile realizate în baza

combinației AA – Res [202, 231, 232] au demonstrat că consecutivitatea adăugării compușilor în reacție este decisivă pentru activitatea antioxidantă și, de asemenea, determină tipul de interacțiune antioxidantă. Pentru a stabili importanța consecutivității adăugării compușilor în reacție în cazul combinațiilor ENOXIL - AA, au fost analizate 2 abordări care diferențiază prin ordinea adăugării compușilor în reacție: I. 0.1 mL soluție de ENOXIL de diferite concentrații se amestecă cu 0.1 mL soluție AA (0.0002 N), după care se adaugă 3.8 mL DPPH*, timp de reacție – 2.5 ore; și II. la 0.1 mL soluție de ENOXIL de diferite concentrații se adaugă 3.8 mL DPPH*, după 2 ore la amestecul de reacție de adaugă 0.1 mL soluție AA (0.0002 N) și se lasă la întuneric încă 30 min [235, 236].

Figura 4.35 demonstrează că ordinea adăugării compușilor în reacție este esențială. Astfel, pentru abordarea I, valoarea CE_{50} este de 1.7 – mai mică decât în cazul interacțiunii ENOXIL – DPPH* ($CE_{50}= 2.1$), totuși, mai mare comparativ cu cea de-a II-a abordare [235, 236].

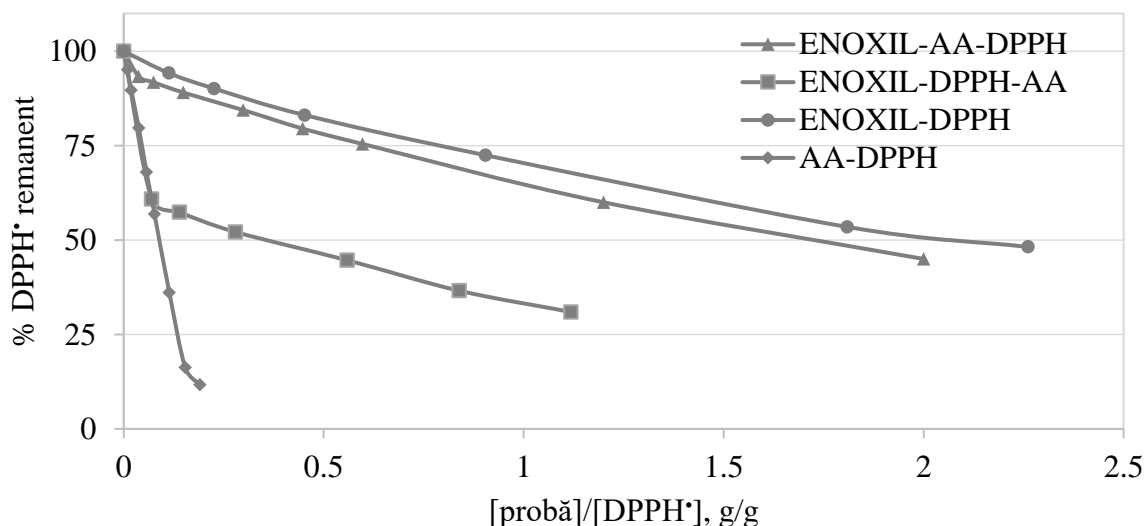


Figura 4.35. Activitatea antioxidantă a combinațiilor ENOXIL – AA (0.0002N) în apă: abordarea I (ENOXIL-AA-DPPH*) și abordarea II (ENOXIL-DPPH*-AA); activitatea antioxidantă a AA și a preparatului ENOXIL testați individual prin metoda DPPH* [235, 236]

În cazul abordării II, a fost stabilită o valoare CE_{50} de aproximativ 0.4 – o valoare de 4.25 ori mai mică decât cea pentru abordarea I [235, 236]. Faptul dat semnifică că, într-un proces chimic sau biochimic, urmând abordarea II, se poate obține un efect antioxidant de 4.25 ori mai mare decât prin I-a abordare [235, 236].

Activitatea antioxidantă distinctă pentru fiecare dintre cele două abordări se poate datora mecanismului de acțiune diferit. În cazul I-ei abordări, primul compus care interacționează cu DPPH* este AA, întrucât acesta este un antioxidant rapid și puternic, apoi, proba de ENOXIL anihilează DPPH* cu o eficiență mai mică, care corespunde puterii antioxidante a preparatului dat

(Figura 4.35) [235, 236]. În cea de-a II-a abordare, după interacțiunea ENOXIL – DPPH[•] și consumarea ENOXIL-ului, conținutul de AA adăugat poate provoca unele reacții de regenerare a speciilor oxidate sau unele procese de polimerizare și formare a structurilor cu proprietăți antioxidante, după cum a fost raportat pentru cazul AA – Res (subcapitolul 4.4.3) [235, 236].

În ceea ce privește interacțiunile antioxidante dintre ENOXIL și AA, acestea au fost determinate respectând trei moduri de realizare a experimentului (Figura 4.36): abordările I și II sunt identice cu cele din Figura 4.35, abordarea III presupune amestecarea 0.1 mL soluție de AA (0.0002 N) și 3.8 mL soluție DPPH[•], timp de reacție – 30 min; după care se adaugă 0.1 mL soluție de ENOXIL de diferite concentrații și se lasă reacția la întuneric timp de 2 ore [235, 236].

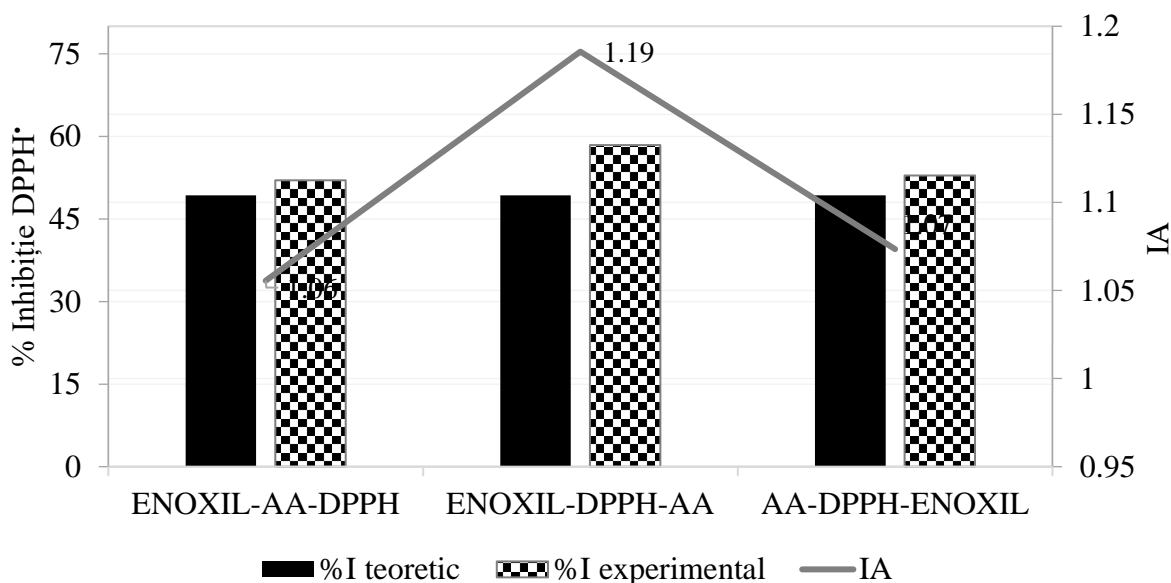


Figura 4.36. Activitatea antioxidantă a combinațiilor ENOXIL – AA (0.0002N) în apă: abordarea I (ENOXIL-AA-DPPH[•]), abordarea II (ENOXIL-DPPH[•]-AA) și abordarea III (AA-DPPH[•]-ENOXIL) [235, 236]

Datele din Figura 4.36 dovedesc că toate cele trei abordări manifestă efect sinergic, totuși abordarea II posedă cea mai puternică interacțiune sinergică de 1.19 [235, 236]. Abordările I și III posedă efect sinergic asemanător de 1.06 și, respectiv, 1.07, de asemenea, valorile %I experimentale ale DPPH[•] sunt similare – aproximativ 52%. Faptul dat poate fi cauzat de urmarea aceluiași mecanism de acțiune în ambele abordări: inițial AA interacționează cu DPPH[•], apoi ENOXIL anihilează speciile radicalice rămase [235, 236].

Testele de determinare a activității antioxidante efectuate confirmă și completează studiile anterioare realizate în cadrul Institutului de Chimie al USM asupra preparatului ENOXIL. Datele obținute demonstrează activitatea antioxidantă a ENOXIL-ului și susține utilitatea și eficacitatea acestuia în calitate de preparat medicinal, de asemenea, propune ideea utilizării preparatului

ENOXIL în combinație cu un antioxidant natural, după cum este AA pentru îmbunătățirea proprietăților terapeutice.

4.6. Sinteza Capitolului 4

Concentrația eficientă a compușilor antioxidanți din struguri scade în amestecurile catehină – acid dihidroxifumaric (min. 0.09), quercetină – acid dihidroxifumaric (min. 0.09) și în toate probele ce conțin acid ascorbic (min. 0.22 și 0.09), fapt care indică asupra îmbunătățirii activității antioxidante totale. În amestecurile formate dintr-un compus fenolic și un acid organic, valorile concentrației eficiente cresc sau rămân neschimbare.

Tipul interacțiunilor antioxidante într-un amestec binar de compuși naturali depinde de concentrația compușilor analizați. La concentrații mici de compus fenolic, în majoritatea probelor studiate au fost înregistrate efecte antagoniste puternice (min. 0.28); mărirea concentrației compusului fenolic se soldează cu efecte aditive (≈ 1) sau sinergice (>1). Sporirea concentrației de acid tartric sau citric nu afectează semnificativ tipul interacțiunilor antioxidante, cu excepția amestecurilor resveratrol – acid tartric sau citric. Contrar faptului dat, mărirea concentrației acidului dihidroxifumaric afectează tipul interacțiunilor antioxidante, favorizând manifestarea efectelor sinergice în cazul combinațiilor cu acidul ascorbic (max. 1.17) și rutina (max. 1.07); sporirea concentrației de acid dihidroxifumaric în probele cu catehina, diminuează efectele sinergice și determină apariția celor aditive și antagoniste (min. 0.89); în probele cu acid galic, quercetină sau resveratrol, concentrația acidului dihidroxifumaric nu a produs variații semnificative ale tipului de interacțiune antioxidantă.

Interacțiunile antioxidante dintre compușii fenolici și acizii organici tartric și citric sunt preponderent antagoniste (0.28 – 0.94), în special în probele cu quercetină și resveratrol. Efectul antagonist este cauzat de prezența concentrațiilor mari de ioni de acizi organici în mediul de reacție ce duce la inhibarea mecanismului SPLET de acțiune a compușilor fenolici. În amestecurile cu acidul galic sau catehină au fost observate multiple efecte aditive (0.95 – 1.04), iar probele formate din rutina și acizii tartric sau citric au demonstrat puternice efecte sinergice de maximum 1.27 și, respectiv, 1.29. Manifestarea efectului sinergic în probele date poate fi provocată de oligomerizarea compușilor fenolici, proces care se soldează cu formarea structurilor cu capacitate antioxidantă sporită.

Amestecurile de acid dihidroxifumaric și catehina sau rutina manifestă un efect sinergic de 1.08 și, respectiv, 1.07, datorită potențialelor reacții de oligomerizare a polifenolilor. Combinația quercetină – acid dihidroxifumaric demonstrează, preponderent, interacțiuni antioxidante aditive în intervalul 0.95 – 0.99, iar amestecurile de acid galic – acid dihidroxifumaric și resveratrol – acid

dihidroxifumaric manifestă antagonism puternic, înregistrându-se valori minime de 0.43 și, respectiv, de 0.75.

Probele formate din acidul ascorbic și acidul tartric, demonstrează activitate antioxidantă sporită și efecte sinergice de maximum 1.08; în cazul amestecurilor acid ascorbic – acid citric, este observată predominarea efectelor aditive (0.95 – 1.04). Prezența interacțiunilor sinergice și aditive se datorează concentrației mari de ioni de acid tartric sau citric în mediul de reacție, care susține mecanismul HAT de acțiune a acidului ascorbic.

Au fost aplicate patru metode spectrale de analiză – UV-Viz, Stopped-Flow, RES și RMN, pentru determinarea tipului de interacțiune antioxidantă dintre acizii ascorbic și dihidroxifumaric. Activitatea antioxidantă și viteza de reacție a acizilor ascorbic și dihidroxifumaric este semnificativ mai mare în matricea de vin comparativ cu rezultatele obținute în 98% EtOH. Conform datelor obținute la spectroscopia UV-Viz, efecte sinergice în intervalul 1.05 – 1.17 sunt observate la concentrațiile maxime ale compușilor testați. Spectroscopia RES a demonstrat existența efectelor antioxidante sinergice puternice (1.24) și moderate (0.9 – metoda FIC) între acizii ascorbic și dihidroxifumaric, aplicând două metode de calcul diferite. Interacțiunea antioxidantă sinergică este favorizată de unele procese de regenerare parțială dintre acidul ascorbic și dihidroxifumaric, ultimul având capacitatea de regenerare a acidului ascorbic.

Amestecul acid ascorbic – resveratrol posedă efecte antioxidante antagoniste și sinergice dependente de ordinea adăugării compușilor în reacție. Efectul sinergic maximal de 1.19 este obținut atunci când la soluția de DPPH^{*} se adaugă inițial resveratrol, iar după consumarea completă a stilbenului, se adaugă acid ascorbic. Spectrele RMN au demonstrat că acest scenariu se soldează cu formarea *trans*-viniferinelor, care posedă activitate antioxidantă și sporesc efectul sinergic al amestecului de compuși.

Preparatul ENOXIL posedă activitate antioxidantă de 2-3 ori mai mare în mediu de soluție tampon fosfat decât în apă. Adăugând acid ascorbic la soluția de ENOXIL, sunt observate efecte sinergice în toate probele analizate (1.06 – 1.19). Activitatea antioxidantă totală și amploarea efectului sinergic depind de ordinea adăugării compușilor în reacție, astfel că cel mai mare efect sinergic – 1.19, a fost obținut în proba în care inițial interacționează preparatul ENOXIL cu DPPH^{*}, apoi se adaugă acidul ascorbic.

La subiectul interacțiunilor antioxidante au fost publicate 3 capitole de carte în monografiile naționale și internaționale, 2 articole în reviste cu factor de impact, 2 articole în reviste naționale de categoria A și B, 11 teze la conferințe naționale și internaționale și o participare la Expoziția Internațională Specializată „INFOINVENT”.

5. FORMAREA CONCEPȚIILOR ECOVALEOLOGICE LA DISCIPLINA CHIMIE ECOLOGICĂ

În capitolul dat este în premieră prezentată și argumentată legătura dintre conceptele de valeologie și ecovaleologie și studiul interacțiunilor antioxidante, atât sub aspect chimic și molecular, cât și din punct de vedere al sănătății umane. În mod special, datorită datelor științifice, este demonstrată relația dintre consumul de antioxidanți și activitatea mitocondriilor ca indicator general al stării de sănătate, care este obiectul de studiu al valeologiei și ecovaleologie. De asemenea, este tratat subiectul formării concepțiilor ecovaleologice ale studenților ca o abordare sustenabilă în rezolvarea problemelor ecologice actuale, unde se accentuează influența procesului didactic asupra educării tinerilor și formării unor deprinderi sănătoase și sustenabile. Este discutat și exemplificat procesul de integrare a conceptului de ecovaleologie în curriculumul disciplinei Chimie ecologică.

5.1. Relația dintre studiul cu tentă ecologică al interacțiunilor antioxidante și conceptul de valeologie

Valeologia, ca direcție științifică ce studiază sănătatea umană, acceptă complexitatea conceptului dat și încearcă să abordeze subiectul sănătății în mod integrant, fără a-l fragmenta. Pe de altă parte, valeologia reprezintă acea verigă care leagă și conectează celelalte științe între ele și argumentează colaborarea și relaționarea acestora prin intenția de a investiga sănătatea individului sub toate aspectele ei și de a oferi recomandări privind un mod de viață sănătos. Desigur că conceptul de sănătate poartă un caracter filosofic [99], cu toate acestea, nu se poate nega faptul că orientarea către un stil de viață sănătos nu este doar o filozofie, ci și un ansamblu de cunoștințe în domeniile biologiei, chimiei, biochimiei, medicinei etc. [99].

Din punct de vedere somatic, sănătatea umană este inițial dată (din punct de vedere genetic) și apoi controlată în mod conștient de: (1) interacțiunile optime ale structurilor și proceselor (funcțiilor) interne ale unui organism, adică de natura sa materialo-energetică; (2) rezistența la influențele agresive externe; (3) interacțiunea optimă cu sistemele și mediile complementare [95]. Hanselmann și col. [238, 239] afirmă că, la nivel celular, starea de sănătate depinde de trei factori: energia, informația și materia de care dispun celulele. Autorii sugerează că pierderea energiei (din cauza afecțiunilor la nivel de mitocondrie), anomaliile la nivel de informație genetică (cauzate de mutații sau aneuploidie) sau schimbările în compoziția și distribuția materiei (provocate de schimbarea micro-mediului sau de prezența agenților toxici) duc la creșterea entropiei funcțiilor și structurilor celulare, ceea ce echivalează cu apariția bolilor [238]. Energia, informația și materia sunt interconectate la nivel cuantic, respectiv, perturbarea unuia dintre factorii enumerați poate

provoca dezintegrarea și moartea celulelor, iar la nivel de organism, are loc îmbolnăvirea individului [238].

Aparatul mitocondrial are un rol central în metabolismul energetic, iar starea mitocondriilor reprezintă un parametrul important pentru estimarea nivelului de sănătate al indivizilor [240–244]. Totodată, mitocondriile sunt o țintă ușoară pentru factorii de risc din mediul extern, deoarece nu sunt doar organele care furnizează 90% din energia celulei (prin producerea de ATP, menținerea echilibrului ionic, reglarea apoptozei etc.), dar sunt implicate și în metabolismul substanțelor chimice xenobiotice care includ și substanțele toxice [240]. Dependența stării de sănătate a omului de energia produsă de aparatul mitocondrial este tratată și de Apanasenko G. L. [245]. Prin cercetările sale, autorul încearcă să ofere o unitate de măsură a sănătății umane, care ar putea fi aplicabilă în valeologie. Astfel, Apanasenko G. L. [245] menționează că baza sănătății somatice depinde de eficacitatea aparatului mitocondrial care, la nivelul organismului, apare, în condiții aerobe, sub forma capacității maxime de producere a energiei. Prin alte cuvinte, funcția mitocondriilor de a produce energie este criteriul de bază care indică asupra vitalității omului și, respectiv, asupra sănătății acestuia [245]. Contrar faptului dat, îmbolnăvirile, bolile cronice sunt efectul insuficienței mitocondriale, care poate fi cauzată de factorii externi precum poluarea mediului [240, 242, 243, 246, 247], stilul de viață.

Pornind de la ideea că celulele, la fel ca organismul uman, sunt niște sisteme termodinamice deschise, acestea mențin un schimb permanent de materie și energie cu mediul extracelular (și cu mediul ambiant). Prin urmare, celulele sunt dependente de matricea extracelulară care conține diverse molecule necesare pentru asigurarea condițiilor optime de funcționare a celulei: nutrienți, electroliți, oxigen, protoni (pH) etc. Prezența compușilor dați în concentrații corespunzătoare determină celulele, sistemele biologice și omul să reziste impactului provocărilor mediului extern [238, 245]. Expunerea celulelor la un mediu non-fiziologic creat de agenți toxici, pH mic, infecții, radiație etc. [238], induce schimbări semnificative de ordin genetic, metabolic, morfologic la nivel celular și inițiază dezvoltarea condițiilor patologice, inclusiv a cancerului. Contează atât schimbările calitative, cât și cele cantitative ale materiei, adică concentrația compușilor ce provin din mediul extern – schimbări care pot afecta negativ funcționalitatea aparatului mitocondrial, a producerii energiei și a vitalității celulei [238]. Astfel, asigurarea organismului uman cu nutrienții necesari, în concentrații necesare, este o condiție primordială și esențială vieții. Pe lângă nutrienții principali (carbohidrați, lipide, proteine), micronutrienții precum vitaminele și mineralele joacă un rol important pentru sănătatea umană.

Antioxidanții, în jurul cărora este focusat studiul dat, reprezintă o clasă mare de compuși, ce cuprinde vitaminele și mineralele. Antioxidanții sunt compușii implicați în mecanismul celular

de apărare împotriva concentrațiilor mari de specii reactive, de asemenea, acești compuși oferă protecție intra sau extracelulară prin reducerea proteinelor oxidate de radicalii liberi, a acizilor grași oxidați din membrane și eliminarea daunelor ADN-ului cauzate de radicalii liberi. Pe lângă aceasta, antioxidanții sunt esențiali pentru reacțiile metabolice din organism participând în calitate de catalizatori sau coenzime. Multe vitamine funcționează în complexe enzimatic care participă la respirația mitocondrială și la producerea de energie sau sunt necesare pentru sinteza componentelor lanțului respirator mitocondrial [248]. Spre exemplu, biosinteza componentei lanțului respirator mitocondrial – coenzima Q, este dependentă de vitaminele B₂, B₃, B₅, B₆, B₉, B₁₂ și vitamina C [248, 249]. Vitaminele B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇, B₉ sunt importante pentru căile metabolice în respirația mitocondrială și producerea energiei [248], [249]. Vitaminele C, E, D, B₃ și B₉ fiind niște anihilatori eficienți ai radicalilor liberi, previn formarea oxidanților mitocondriali și îmbătrânirea mitocondrială [248, 250, 251]. Studiile [251] arată că îmbogățirea celulelor cu antioxidanți reprezintă o eficientă strategie de protecție a organelor și a integrității celulelor, prin limitarea daunelor oxidative ale aparatului mitocondrial, a leziunilor celulare și prin stoparea dezvoltării sau inițierii bolilor. În literatură sunt propuși o serie de antioxidanți eficienți în eliminarea disfuncțiilor mitocondriale rezultante cu oboseală cronică [252], sau antioxidanți cu rol protectiv în cazul expunerii la medii toxice [251].

La nivel de organism, deficiențele de vitamine și antioxidanți cauzate de malnutriție pot genera boli coronariene, cancer, boli neurodegenerative, boli psihice etc. [248]. Actualmente, lipsa de nutrienți este adesea substituită cu suplimentele alimentare. Deși multiple investigațiile demonstrează capacitățile reducătoare sporite ale antioxidanților, unele studii atenționează asupra efectelor adverse manifestate de substanțele date consumate sub formă de suplimente alimentare [253–256]. Deosebirea dintre antioxidanții din produsele naturale și cei din suplimente este remarcată în mod special analizând efectul concentrației compușilor dați asupra proceselor biochimice din organism [253–256]. Suplimentele alimentare conțin concentrații de antioxidanți în limita dozelor zilnice admisibile, ceea ce este semnificativ mai mult decât concentrațiile acelorași antioxidanți și vitamine în produsele naturale. Literatura de specialitate menționează că dozele mari de antioxidanți pot duce la efecte prooxidante, disfuncții celulare, interferează cu metabolismul unor nutrienți, pot crește riscul de cancer sau pot reduce eficacitatea tratamentelor pentru cancer (de exemplu, radioterapie, chimioterapie) [255, 256]. Spre exemplu, dozele mari de vitamina E alterează masa și forma oaselor, crește riscul de cancer pulmonar, de mortalitate, induce apoptoza. În special, efectul negativ al consumului de vitamina E în doze mari a fost remarcat la persoanele fumătoare: a fost observată o creștere cu 7% a riscului de cancer pulmonar pentru consumul de 100 mg/zi, iar pentru doza de 400 mg/zi de vitamina E – riscul a crescut până la 28%

[255, 257]. Similar concentrațiilor mari de vitamina E, dozele sporite de β -caroten, administrate ca supliment alimentar, măresc riscul de cancer pulmonar [253] și, de asemenea, intensifică sinteza mediatorilor pro-inflamatori [255]. Consumul acidului ascorbic în concentrații mari produce acumularea de oxalați în rinichi; sporește autooxidarea lipidelor, care este acompaniată de producția de O_2^- și H_2O_2 [255]. Suplimentarea dietelor oamenilor sănătoși cu doze mari de vitamina C (500 mg/zi) generează o creștere a daunelor oxidative la nivelul ADN-ului, demonstrând efecte prooxidative la doze crescute [255]. Gonzalez și col. [256] au arătat că acidul ascorbic prezintă atât activități reducătoare, cât și oxidante, în funcție de mediul în care este prezentă această vitamină precum și de concentrația ei. Compușii fenolici precum catehina, quercetina, acidul galic etc. sunt constituenți ai plantelor și posedă activitate antioxidantă pronunțată, totuși, echilibrul dintre caracterul antioxidant și cel prooxidant al compușilor dați depinde de concentrația acestora. Spre exemplu, la concentrații de 50 μ M de quercetină s-a înregistrat reducerea viabilității celulelor, a capacității antioxidante totală și a activității antioxidantilor endogeni (superoxid dismutaza, catalaza și glutatión transferaza) [258]. Dozele crescute de flavonoide (50-250 μ M) duc la citotoxicitate, leziuni ale ADN-ului, apoptoză și prezența speciilor reactive provocate de autooxidare [255]. Antioxidanții fenolici în concentrații mari prezintă activități prooxidante atunci când sunt prezenți ionii metalelor de tranziție, cum ar fi fierul și cuprul; caracterul prooxidant al compușilor în prezența metalelor este specific majorității antioxidantilor și vitaminelor. Stilbenul resveratrol în concentrații de 10-25 μ M poate genera, de asemenea, efecte prooxidante, provocând leziuni mitocondriale și moartea celulelor endoteliale [259]. În mod similar, alți antioxidanți naturali, cum ar fi acizii cumaric, clorogenic, ferulic, cafeic și caftauric – compuși fenolici derivați din produsele alimentare, în doze mari de 25 μ M pot crește producția intracelulară de specii reactive și manifestă efecte prooxidante [260]. Totodată, studiile [255] demonstrează că excesul de antioxidanți poate anihila toate speciile radicalice, fapt care duce la manifestarea fenomenului de stres reductiv, ce declanșează formarea de H_2O_2 în mitocondrii și apoi induce stresul oxidativ [255].

Cercetările existente susțin ideea că acțiunea negativă a antioxidantilor se datorează efectului prooxidant al acestora [253, 255], care depinde de mediu și concentrația compușilor. După cum este expus în subcapitolul 1.2, multiple studii au demonstrat caracterul prooxidant al compușilor bio-activi la anumite concentrații, în special când aceștia sunt aplicați individual. U. Cornelli [16] menționează două considerații care sunt importante pentru înclinarea balanței antioxidant – prooxidant în favoarea caracterului antioxidant: prima considerație este că antioxidanții obișnuiți consumați cu alimentele sunt o combinație de mulți compuși diferiți, iar activitatea derivată din aceștia poate fi acompaniată fie de un efect aditiv, fie de unul sinergic, sau

chiar de unul antagonist (numit de autor efect de combinație); a doua considerație este legată de cantitatea fiecărui antioxidant, care în produsele alimentare este, de obicei, foarte scăzută (efectul de concentrație). Aceste două premise sunt respectate pe deplin atunci când aportul de antioxidanți este determinat de consumul produselor naturale, contrar cazurilor administrării suplimentelor alimentare, care nu respecta cele două considerații privind combinația și concentrația compușilor bio-activi. Problema consumului substanțelor individuale a fost atinsă și de cercetătorul rus I. I. Brekhman în contextul valeologiei și al sănătății umane [18]. Autorul pune în discuție situația controversată în care se observă tendința globală de a rafina și trata produsele alimentare – lucru ce rezultă cu obținerea unor produse pure și cu sărăcirea valorii nutritive a alimentelor; în același timp, industriile încearcă să compenseze lipsa complexelor naturale de compuși bio-activi și a efectului pe care îl produc acestea prin adăugarea antioxidantilor, aditivilor alimentari în doze care depășesc concentrațiile naturale [18]. Întrucât valeologia studiază influența tuturor claselor de nutrienți (nu doar a micronutrienților – antioxidantilor) asupra sănătății umane, autorii au argumentat efectul negativ al produselor rafinate pe exemplul zahărului rafinat consumat în cantități mari, al produselor de panificație rafinate, al uleiului rafinat, al alcoolului etc., făcând comparație cu aportul nutrițional valoros și cu efectul benefic al produselor integrale, ex. zahărul brun, pâine integrală etc. [18]. Brekhman I. I. afirmă că pentru soluționarea problemei calității produselor alimentare trebuie să fie considerate trei idei principale: (1) păstrarea complexului natural de nutrienți și compuși biologic activi în produsele naturale; (2) utilizarea complexelor naturale de compuși bio-activi în calitate de suplimente alimentare; (3) lărgirea asortimentului de produse alimentare naturale [18]. Principiile date pot fi cu ușurință aplicate și proiectate asupra problemei caracterului prooxidant al compușilor, întrucât, similar micronutrienților, micronutrienții – antioxidanții și vitaminele, acționează în favoarea sau defavoarea organismului uman în dependență de concentrația la care se află și de prezența altor compuși cu care aceștia pot acționa în combinație. Sistemele multicomponente naturale sunt întotdeauna foarte complexe și, dacă conțin una sau un grup de substanțe cu un efect nutrițional sau medicinal mai pronunțat (antioxidanți, vitamine, minerale etc.), atunci ele sunt în combinație cu un număr mult mai mare de substanțe însoțitoare – cum ar fi acizii organici, zaharurile, care sporesc acțiunea principalelor componente ale complexului, le slăbesc toxicitatea și efectele secundare [18]. Exemplu elocvent de sisteme multicomponente complexe sunt strugurii, unde substanțele bio-actives sunt în concentrații mai mici, ex. acidul ascorbic: max. 50 mg/L [15], vitamina A: 0.2 – 0.5 mg/kg [15], vitamina B1: 160 – 650 μg/L [15], vitamina B2: 10 – 150 μg/L [15], vitamina B3: 1.5 – 3 μg/L [15], vitamina B5: 500 μg/kg [15], vitamina B6: 200 μg/kg [15], vitamin B8: 2 – 4 μg/kg [15], vitamina B9: 1.5 μg/kg [15], vitamina B10: 15 μg/kg [15], vitamina B12: 14 μg/kg [15], catehină:

660 – 2200 mg/kg, [261], resveratrol: 20 – 40 mg/kg [15], epicatehina: 47 – 237 mg/kg [261], rutina: 10 – 68 mg/kg [261], acidul galic: 1.8 – 13.3 mg/kg [261] etc.; iar substanțele non-antioxidante se găsesc în concentrații semnificativ mai mari – zaharuri: 150 – 250 g/kg [15], AT: 3.5 – 11 g/L [15], AC: 0.2 – 0.4 g/L [15], substanțe odorante: 0.6 – 1.2 g/L [15], substanțe azotate (inclusiv aminoacizi): 0.6 – 2.4 g/kg [15] etc. De asemenea, trebuie de menționat observația adusă de Brekhman I. I. că în natură funcționează legea multiplicării reprezentanților grupurilor individuale de substanțe, adică fiecare grup restrâns de substanțe este întotdeauna reprezentat nu de o substanță individuală, ci de un număr de substanțe foarte asemănătoare din punct de vedere structural, dar cu detalii structurale distinctive [18]. Drept exemple pot fi enumerați flavanolii, flavonolii, antocianii, acizi hidroxibenzoici, acizi hidroxicinamici, vitamina E, vitamina A [15] etc. Prin urmare, simplificarea compoziției chimice a unui complex natural izolat dintr-o plantă cu scopul de a spori un anumit efect duce la pierderea multor proprietăți calitative ale complexului [18], după cum a fost demonstrat pe exemplul caracterului antioxidant – prooxidant al compușilor bio-activi (subcapitolul 1.3).

O altă idee tratată de Brekhman I. I. care este relevantă subiectului ecovaleologiei este problema industrializării și a schimbărilor radicale pe care le-au suferit produsele alimentare în ultimele două secole [18]. Omenirea, mii de ani la rând, a consumat doar acei compuși care se găseau în natură, în concentrațiile și combinațiile respective. Industrializarea intensificată din ultimele decenii, s-a soldat nu doar cu îmbunătățirea calității vieții oamenilor, dar și cu probleme ecologice, care au dus la schimbări importante la nivel de structură și calitate a produselor alimentare din contul acumulării de pesticide, metale grele, poluanți organici persistenți etc. Pe de altă parte, industria alimentară concentrată pe rafinarea produselor alimentare și pe adăugarea aditivilor alimentari în hrană contribuie, în proporții mari, la schimbarea calitativă și calitativă a produselor alimentare. Adaptarea în termen scurt a populației la o asemenea schimbare, unde concentrațiile anumitor nutrienți sunt prea mari sau prea mici comparativ cu aceiași compuși în produsele naturale, este practic imposibilă. Faptul dat este confirmat de numărul de îmbolnăviri raportate la nivel global a căror cauză principală este poluarea mediului și a organismului uman [102].

Figura 5.1 sumează ideile expuse în subcapitolul dat și ilustrează schematic conexiunea dintre ecovaleologie și studiul interacțiunilor antioxidante. Valeologia ca direcție științifică se interconectează cu studiul interacțiunilor antioxidante prin intermediul ecovaleologiei, care investighează schimbările stării de sănătate a omului în dependență de schimbările care au loc în mediul ambiant și în natură. După cum indică datele din literatura de specialitate, concentrațiile și combinațiile antioxidantilor pot influența semnificativ echilibrul antioxidant – prooxidant, și, prin

acesta, reacțiile biochimice din mitocondrii, celule și întregul organism (Figura 5.1). Puterea de generare a energiei de mitocondrii este propusă în valeologie ca indicator al stării de sănătate a individului.

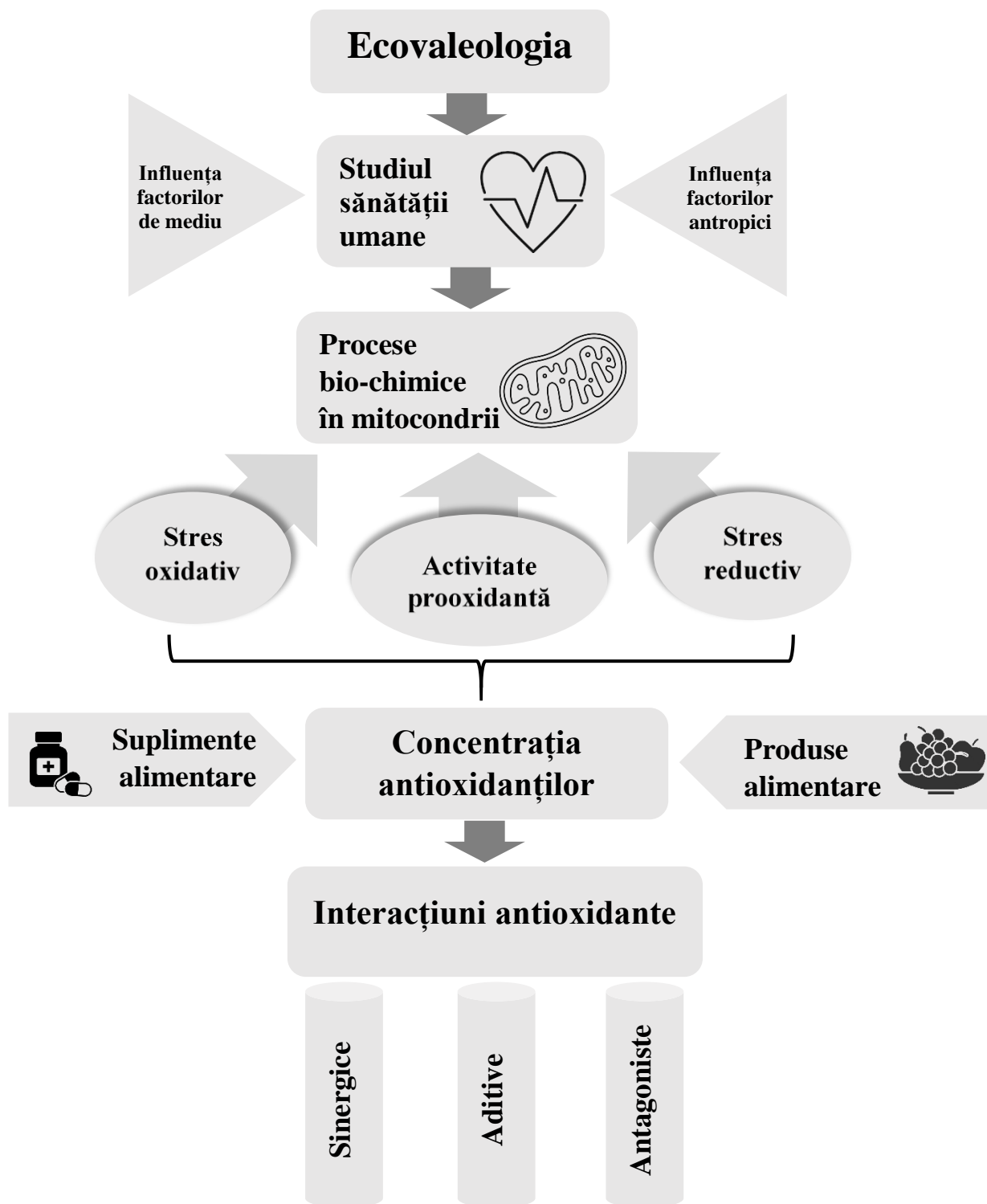


Figura 5.1. Ilustrarea schematică a relației dintre ecovaleologie și studiul interacțiunilor antioxidante

În dependență de concentrația antioxidantilor, în mitocondrii pot fi generate reacții ce se soldează cu stres oxidativ, reductiv sau efecte prooxidante. Concentrațiile antioxidantilor în suplimentele alimentare și în produsele naturale sunt diferite, prin urmare afectează în mod distinct interacțiunile antioxidante dintre compușii constituenți. Astfel, relația dintre mitocondrii – antioxidanți – ecovaleologie – sănătate se conturează și mai bine, luând în calcul impactul pozitiv sau negativ pe care îl pot avea antioxidanții în mitocondrii – prin afectarea sau reglarea echilibrului redox din mediul intracelular.

Corelarea conceptului de ecovaleologie cu subiectul interacțiunilor antioxidante reprezintă o abordare nouă, nemiîntâlnită în literatura de specialitate, iar scopul capitolului dat este de a argumenta interconexiunea dintre aceste subiecte de cercetare și actualitatea studiului realizat.

5.2. Formarea conceptelor ecovaleologice ale tinerilor – abordare sustenabilă în soluționarea problemelor ecologice

Educația și formarea abilităților ecologice și valeologice în instituțiile de învățământ este o metodă sustenabilă de educare a tinerilor în scopul dezvoltării deprinderilor sănătoase și durabile [262]. Conform lui Corcoran B., marea provocare a învățământului superior este de a crea instituții universitare reorientate spre ecologie și sustenabilitate într-o societate non-sustenabilă [263]. Prin urmare, comunitatea din învățământul superior este chemată să răspundă vremurilor de crize de mediu dezastruoase, sistemelor politice eșuate, intoleranței religioase și dezvoltării economice non-sustenabile și inechitabile [263]. Cortese T. [264] afirmă că „Instituțiile de învățământ superior poartă o responsabilitate morală profundă de a spori conștientizarea, cunoștințele, abilitățile și valorile necesare pentru a crea un viitor echitabil și durabil. Aceste instituții au mandatul și potențialul de a dezvolta cadrul intelectual și conceptual pentru atingerea acestui obiectiv. Ei trebuie să joace un rol puternic în educație, cercetare, dezvoltare de politici, schimbul de informații, sensibilizarea și sprijinul comunității... Ei au libertatea unică de a dezvolta idei noi, de a comenta despre societate și de a se angaja în experimente îndrăznețe, precum și de a contribui la crearea de noi cunoștințe”. În aceeași ordine de idei, Organizația Națiunilor Unite pentru Educație, Știință și Cultură - Programul Națiunilor Unite pentru Mediu [263] afirmă că „Universitățile, ca centre de cercetare, predare și formare a personalului calificat pentru națiune, trebuie să fie din ce în ce mai disponibile pentru a întreprinde cercetări în domeniul educației pentru mediu și pentru a forma experți în educația formală și non-formală. Educația pentru mediu este necesară studenților din toate domeniile, nu numai științe naturale și tehnice, ci și științe sociale și arte, deoarece relația dintre natură, tehnologie și societate marchează și determină dezvoltarea unei societăți.”. Conform Declarației de la Talloires, prin punerea în practică a ceea

ce se predică, universitatea poate motiva studenții să participe activ la minimizarea poluării și producerii de deșeuri [263].

În ultimii ani, se încearcă tot mai intens integrarea în învățământul superior a subiectelor și practicilor sustenabile cu caracter ecologic, social și cultural, economic și instituțional, educațional și politic, prin activități de predare, cercetare, operațiuni din campus, sensibilizare comunitară și activități de evaluare și raportare [265]. Conform datelor [266] subiectele ce țin de securitatea alimentară, agricultura sustenabilă, climă și mediu, resurse naturale sunt cele mai intens tratate în cadrul strategiilor de dezvoltare sustenabilă în învățământul superior. Înafara studiului teoretic, s-a dovedit a fi eficientă implicarea studenților în activități practice precum separarea deșeurilor pentru reciclare, stabilirea planurilor de reducere a producției de deșeuri, utilizarea eficientă a energiei, practici de promovare a consumului eficient de apă etc. [265]. Rezultatele unui sondaj efectuat de studenții din învățământul superior din întreaga lume [267] arată că (i) 92% din participanți sunt de acord că dezvoltarea durabilă (cere nemijlocit cuprinde în sine protecția mediului și a omului) este un subiect pe care toate instituțiile de învățământ superior ar trebui să îl încorporeze și să îl promoveze în mod activ, (ii) 40% din tineri raportează o incluziune scăzută sau inexistentă a conceptului de dezvoltare durabilă în curriculum, (iii) 90% dintre respondenți menționează că sunt dispuși să accepte un sacrificiu salarial pentru a lucra într-o companie care respectă principiile sustenabilității și a protecției mediului, (iv) la cererea să identifice cuvântul care descrie cel mai bine sentimentele lor în legătură cu schimbările climatice și viitorul lor, 75% au admis că sunt îngrijorați.

Sustenabilitatea ca un proces socio-ecologic, cuprinde mai multe dimensiuni de dezvoltare, în special cel al protecției mediului, și nu exclude sub nici o formă valeologia și ecovaleologia, întrucât, ambele – sustenabilitatea și ecovaleologia, sunt axate pe studiul interacțiunilor dintre om și mediul înconjurător. Conform literaturii, ecovaleologia studiază impactul mediului și al factorilor antropici din natură asupra sănătății umane, precum și starea organismului în condițiile unui mediu în dinamică [19]. Totodată, valeologia pedagogică studiază problemele de pregătire și educare a persoanelor în scopul formării unor cunoștințe fundamentale și a motivației puternice orientate către asigurarea și menținerea unui vieti sănătoase și a unui stil de viață sănătos la diferite vârste și etape de dezvoltare [19].

Educația valeologică a tinerilor presupune formarea deprinderilor și atitudinii conștiente față de sănătate în raport cu sensibilitatea personalității față de starea ecologică a mediului [94]. În scopul familiarizării studenților cu conceptul de ecovaleologie, în conținutul prelegerii intitulată „Chimia alimentară și asigurarea calității produselor. Antioxidanții” din cadrul cursului de Chimie ecologică elaborat de acad. Gh. Duca, au fost introduse, accentuate, puse în discuție noțiuni și idei

relevante subiectului dat, menite să sensibilizeze tinerii și să le provoace gândirea și cugetarea asupra relației dintre sănătate, un stil de viață echilibrat și calitatea/siguranța produselor alimentare, precum și analizarea efectului pozitiv/negativ al antioxidanților asupra stării de sănătate [262].

Pentru determinarea impactului prelegerii, studenții (30 persoane) au completat, în mod repetat, un chestionar la subiectul dat, înainte și după audierea acesteia [262]. Chestionarul format din 18 întrebări (Figura 5.2), tratează subiectul antioxidanților și efectul pe care îl pot avea aceștia consumați în concentrații și combinații diferite, sursele acestora etc. (Anexa 4) [262]. Conform Figurii 5.2, părerea studenților a fost diferită înainte și după audierea prelegerii [262].

Poate fi remarcat faptul că la întrebările 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 16 și 17, care au un caracter mai general, majoritatea studenților au oferit, la prima completare a chestionarului, răspunsuri satisfăcătoare, iar după prelegere, numărul răspunsurilor de același fel a crescut nesemnificativ, cu maximum 5% (Figura 5.2) [262]. Faptul dat este un indicator bun care demonstrează prezența unui grad înalt de informare a tinerilor și prezența unor atitudini pozitive față de consumul de antioxidanți, în special a celor din fructe și legume [262]. La întrebările 3, 4, 8 și 12 (Figura 5.2), care se referă la unele cunoștințe/informații concrete despre antioxidanți, studenții au oferit mai multe răspunsuri corecte după audierea prelegerii [262]. Spre exemplu, răspunsul „vitamina C” de la întrebarea 3 – *Care dintre acestea este o substanță antioxidantă?* (Anexa 4), a fost ales de 59% dintre tineri după prezentarea prelegerii, comparativ cu 80% obținute inițial; la a doua completare a formularului, studenții au bifat atât varianta „vitamina C”, cât și varianta „ β -caroten” (53%), odată ce ambii compuși sunt antioxidanți (Figura 5.2) [262]. Similar, varianta corectă „ α -tocoferol” de la întrebarea 4 (Anexa 4) a fost bifată de majoritatea studenților (90%) după prezentarea prelegerii (Figura 5.2) [262]. Întrebarea 8 referitoare la conținutul de antioxidanți în unele produse alimentare și întrebarea 12 cu privire la sursele de radicali liberi (Anexa 4) au obținut răspunsuri corecte după audierea prelegerii în raport de 50% și, respectiv, 90% [262].

Conform răspunsurilor la întrebarea 10 – *Într-o reacție redox, ce schimbări suferă un antioxidant?* (Anexa 4), studenții au demonstrat un grad mai mare de înțelegere a semnificației reacțiilor redox după audierea prelegerii, întrucât varianta corectă „se oxidează” a fost aleasă de 73% dintre studenți după prezentarea materialului didactic, comparativ cu 40% dinainte de prelegere (Figura 5.2) [262]. Referitor la natura radicalilor liberi, datele arată că studenții posedau o înțelegere relativ bună a conceptului de radicali liberi, aceștia alegând varianta corectă – „o specie reactivă” atât înainte de prelegere (80%), cât și după audierea acesteia (90%) (Figura 5.2) [262].

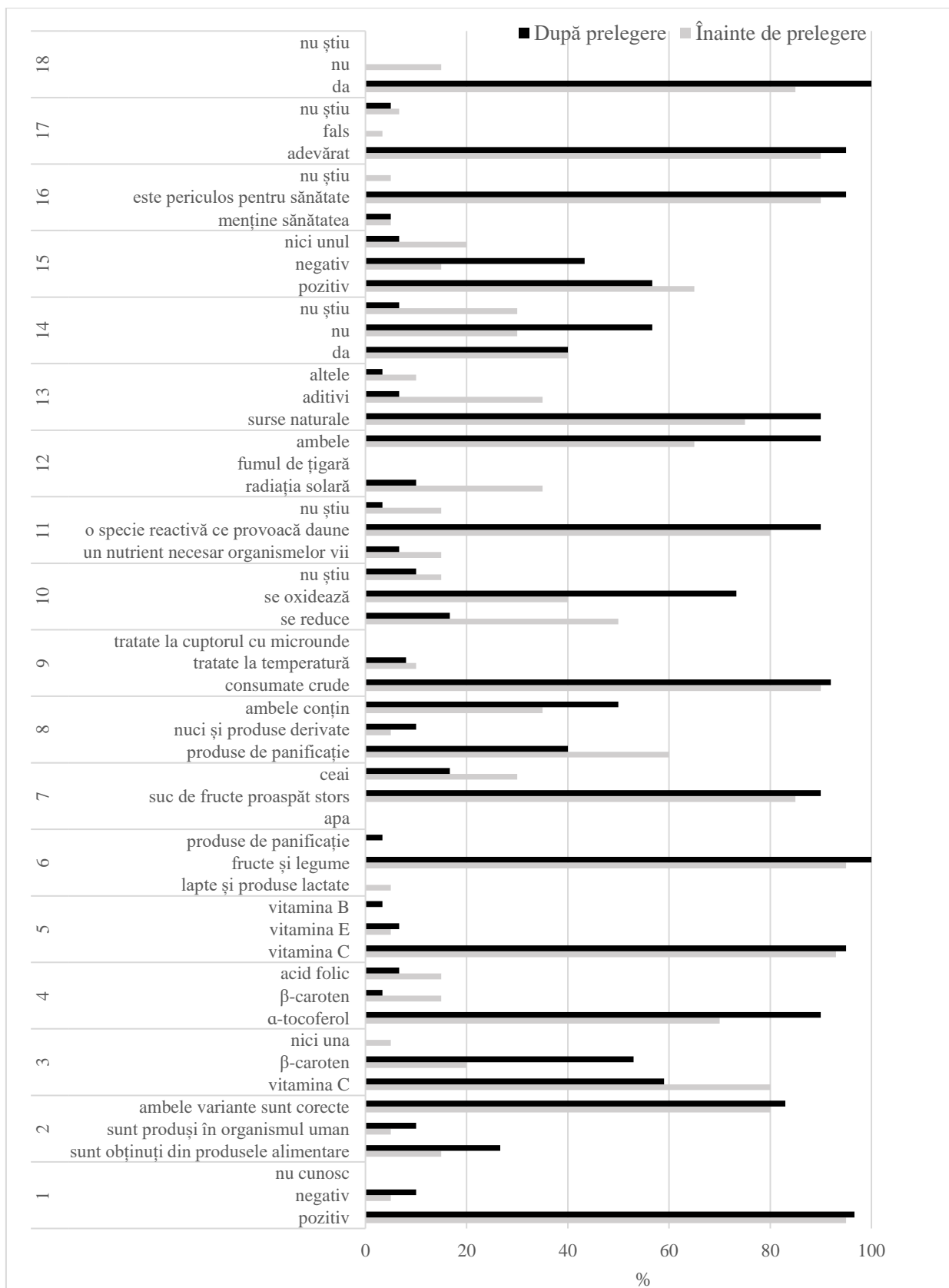


Figura 5.2. Dinamica evoluției, în %, a cunoștințelor despre antioxidanți ale studenților prezenți la prelegere. Reprezentarea răspunsurilor oferite de studenți prin completarea chestionarului înainte și după audierea prelegerii. Numerele 1 – 18 reprezintă numărul întrebării (Anexa 4) [262]

Conform Figurii 5.2, întrebarea 12, originea și cauzele formării speciilor radicalice reprezentau un subiect de confuzie pentru studenți înainte de audierea prelegerii, odată ce varianta „fumul de țigară” nu a fost bifată de nimeni [262]. Totuși, după prezentarea materialului didactic referitor la poluanții din aer care pot genera specii radicalice, 90% dintre studenți au ales varianta „ambele”, care este cea corectă. Îmbucurătoare sunt răspunsurile tinerilor oferite la întrebarea 13 referitoare la preferințele individuale privind sursele de antioxidanți/vitamine pentru consum [262]. Majoritatea studenților, 75% până la audierea prelegerii și 90% după prezentarea acesteia, au pledat pentru consumul antioxidanților din surse naturale. Varianta „aditivi” alimentari a fost aleasă, inițial, de 35%, iar după prelegere doar de 6.7% dintre studenți [262]. Această schimbare s-ar putea datora abordării, în cadrul prelegerii, a subiectului caracterului prooxidant al antioxidanților dependent de concentrația și combinația compușilor, precum și a beneficiului efectului sinergic dintre antioxidanți [262]. Totuși, relativ mulți studenți consideră că antioxidanții consumați sub formă de pastile și suplimente alimentare sunt eficienți (40%), după cum indică răspunsurile la întrebarea 14 din Figura 5.2. În același timp, este promițător faptul că după audierea prelegerii 56.7% dintre studenți au bifat varianta „nu”, adică nu consideră consumul antioxidanților sub formă de pastile a fi mai eficient, comparativ cu rezultatele dinaintea prelegerii, când doar 30% din studenți au ales răspunsul „nu” [262]. Multiple studii demonstrează efectul controversat al concentrațiilor mari de antioxidanți din suplimentele alimentare [255], iar enumerarea acestora și exemplificarea efectelor adverse și a riscurilor posibile a fost un exercițiu eficient și educativ, după cum demonstrează rezultatele din Figura 5.2 [262]. Similar întrebării 14, răspunsurile la întrebarea 15 – *Care considerați că este impactul consumului de suplimente alimentare?* (Anexa 4), demonstrează schimbarea părerii tinerilor, care, inițial, au ales răspunsul „impact pozitiv” (65%), iar după audierea prelegerii, studenții au bifat atât varianta „impact pozitiv”, cât și varianta „impact negativ” în proporții asemănătoare de 56% și, respectiv, 43%, fapt care reflectă părerea studenților, dar și adevărul privind caracterul antioxidant-prooxidant al compușilor reducători [262]. Pentru întrebarea 16 referitoare la efectul consumului unei concentrații mari de un singur antioxidant, majoritatea studenților au ales răspunsul „este periculos pentru sănătate” atât înainte de prelegere (90%), cât și după audierea acesteia (95%) (Figura 5.2) [262].

Rezultatele prezentate în Figurile 5.2 dovedesc eficiența prelegerii și a metodelor utilizate pentru expunerea clară și convingătoare a materialului didactic [262]. Pe parcursul prezentării prelegerii au fost observate anumite instrumente și metode didactice la care studenții au prezentat cel mai mare interes și au manifestat implicare deosebită. Spre exemplu, studenții au fost receptivi la analiza studiilor de caz plasate strategic în prezentarea PPT, care se bazează pe exemple actuale

și bine cunoscute de produse alimentare din comerț și pe analiza și compararea nutrienților, aditivilor alimentari pe care le conțin acestea, cu ulterioara exprimare a opiniilor referitor la efectul pozitiv sau negativ pe care îl pot avea acești compuși asupra sănătății oamenilor. Interes sporit din partea tinerilor a fost remarcat la analiza schemelor de reacție și a mecanismelor de reacție dintre antioxidanți și radicali liberi [262]. La acest subiect, la inițiativa studenților, s-a demarat o serie de întrebări și răspunsuri, în special legate de acțiunea antioxidantă a vitaminei C și a β -carotenului. Schemele date au fost analizate detaliat, studenții fiind atenți la modificările structurale pe care le suferă un antioxidant în reacția redox [262]. Datele statistice actuale și reprezentative Republicii Moldova, de asemenea au trezit interesul studenților, aici fiind enumerate datele privind preferințele alimentare ale moldovenilor [268], cantitatea de fertilizanți și pesticide utilizate pe teritoriul țării [269] etc. Prezentarea multiplelor date experimentale obținute de echipa de cercetare din Laboratorul de Chimie Fizică și Cuantică din cadrul Institutului de Chimie al Universității de Stat din Moldova, care sunt descrise în Capitolul 4 al acestei lucrări, a reprezentat o noutate pentru tineri, subiectul dat generând discuții și păreri contradictorii între studenți, care gestionate corespunzător, au servit la familiarizarea și memorizarea conceptelor discutate [262].

5.3. Integrarea conceptului de ecovaleologie în curriculumul disciplinei Chimie ecologică

Educarea tinerilor în scopul adoptării concepțiilor valeologice și ecovaleologice poate fi realizată la orice disciplină de studiu. Totuși, tratarea subiectului dat la disciplinele ce vizează ecologia și protecția mediului facilitează această sarcină, datorită similitudinilor dintre conceptele de ecologie și ecovaleologie. Conform datelor citate de literatura de specialitate, metoda cea mai eficientă de familiarizare a tinerilor cu noțiunea de ecovaleologie este de a integra și include conținut teoretic și practic cu caracter valeologic în programul de studiu [94], recurgând la metodele didactice cunoscute.

Ecovaleologia, ca direcție științifică interdisciplinară, are ca scop studiu și cunoașterea sănătății umane, a modalităților de asigurare, formare și conservare a acesteia în condiții specifice de viață [20, 21]. Prin urmare, crearea legăturii cauzale dintre: subiectele discutate la disciplina Chimie ecologică, și anume riscurile pentru starea mediului, expunerea indivizilor la unii factori și la unele condiții de risc, efectul acestora asupra sănătății umane, reprezintă o metodă generală și eficientă de integrare a conceptului de ecovaleologie. Spre exemplu, în cadrul prelegerii intitulate „Chimia alimentară și asigurarea calității produselor. Antioxidanții”, ce face parte din cursului de Chimie ecologică elaborat de acad. Gh. Duca, au fost combinate subiectele ecologice și ecovaleologice, fiind accentuată și exemplificată relația dintre acestea [262].

Obiectivele de bază ale prelegerii au fost (1) oferirea definițiilor și conceptelor de bază privind nutrienții, antioxidanții, radicalii liberi, poluanții, (2) determinarea constituenților de bază ai alimentelor și importanța acestora, (3) stabilirea aportului nutrițional al produselor alimentare, (4) stabilirea surselor și căilor de poluare și contaminare a produselor, (5) analiza impactului radicalilor liberi asupra stării și valabilității produselor alimentare și a rolului antioxidanților din alimente pentru menținerea calității produselor, (6) analiza beneficiilor privind efectul sinergic dintre antioxidanți.

În timpul prelegerii au fost prezentate scheme de reacții chimice, diagrame, imagini reprezentative și utile subiectului discutat. Prelegerea a fost abordată dintr-o perspectivă preponderent chimică, fiind utilizate și puse în discuții multiple reacții chimice cu implicarea nutrienților, antioxidanților, poluanților, radicalilor liberi etc. Studenții au fost implicați în discuții prin intermediul multiplelor studii de caz plasate strategic în prezentarea PPT, care ilustrau situații și exemple actuale și familiare studenților.

Subiectul ecovaleologiei a fost tratat într-un mod subtil, la fiecare subiect/obiectiv al prelegerii, accentuându-se importanța nutrienților pentru menținerea sănătății, influența negativă asupra sănătății a poluanților și a radicalilor liberi generați de poluanți, efectul benefic sau nociv al antioxidanților dependent de concentrația acestora etc. Atenție deosebită a fost oferită interacțiunilor dintre antioxidanți, subiect care a fost exemplificat prin expunerea rezultatelor actuale raportate în literatura de specialitate și a datelor experimentale obținute în Laboratorului de Chimie Fizică și Cuantică din cadrul Institutului de Chimie al Universității de Stat din Moldova, care reprezintă Capitolul 4 al acestei lucrări.

O importanță deosebită pentru integrarea conceptului de ecovaleologie în conținutul disciplinelor de învățământ și în conținutul didactic al prelegerilor o are specificarea rolului anumitor factori din mediul ambiant asupra sănătății indivizilor, ex. rolul calității produselor alimentare, a apei, a aerului etc. [262]. Astfel, îmbinarea subiectelor cu aspect ecologic cu cele ecovaleologice a fost realizată după principiul cauza – efect: identificarea problemei și enumerarea riscurilor pentru starea de sănătate a oamenilor [262].

Unele subiecte cu aspect ecovaleologic discutate în cadrul prelegerii sunt:

- importanța și rolul nutrienților pentru sănătatea umană;
- aportul nutrițional și caloric al produselor alimentare și influența asupra sănătății;
- impactul poluării mediului asupra calității produselor alimentare și asupra sănătății indivizilor:
- riscurile consumului de produse alimentare cu un conținut ridicat de aditivi alimentari;
- maladiile și afecțiunile produse de expunerea la diferiți poluanți din produsele alimentare;

- stresul oxidativ și maladiile generate de radicalii liberi;
- efectul protectiv al antioxidanților din produsele alimentare;
- caracterul antioxidant-prooxidant al compușilor dependent de concentrația și combinația acestora și căile de afectare a sănătății;
- pericolul pentru sănătate a concentrației mari de antioxidanți din suplimentele alimentare;
- beneficiul pentru organism a consumului de antioxidanți din surse naturale.

Spre exemplu, în cadrul prelegerii, după stabilirea faptului că poluanții generează specii radicalice, au fost enumerate tipurile de afecțiuni care pot fi cauzate de o concentrație mare de radicali liberi în organism. Prin acesta, s-a făcut legătura logică și firească dintre subiectul ecologic (legat de poluanți) cu ecovaleologia (privind afectarea sănătății). De asemenea, punându-se în discuție efectul pozitiv al antioxidanților asupra sănătății, s-a accentuat și mai bine aspectul ecovaleologic și practic al prelegerii [262].

Strategiile didactice aplicate au provocat implicarea și receptivitatea studenților în raport cu materialul didactic prezentat, și au facilitat familiarizarea studenților cu conceptul de ecovaleologie. În mod special pot fi menționate analiza studiilor de caz, analiza mecanismelor de reacție a antioxidanților, completarea chestionarului, sesiunea de întrebări, răspunsuri și discuții. Literatura de specialitate menționează și alte metode de integrare a conceptului de ecovaleologie în disciplinele de învățământ: dezbateri, eseuri, lucrări practice, proiecte de cercetare, conferințe sau alte evenimente științifico-didactice etc. [94]. De asemenea, conceptele de valeologia și ecovaleologia pot fi predate la lecțiile practice, prin efectuarea experimentelor de laborator la disciplinele chimie, ecologie, biologie, biochimie etc. care pot fi corelate cu starea de sănătate a omului.

5.4. Sinteza Capitolului 5

În premieră este argumentată relația dintre conceptul de ecovaleologie și studiul interacțiunilor dintre antioxidanți. Consumul antioxidanților influențează sănătatea individului prin afectarea proceselor biochimice din mitocondrii, care reprezintă indicatorii generali ai stării de sănătate. Concentrația antioxidanților este importantă pentru activitatea normală a aparatului mitocondrial și a întregului organism, întrucât concentrații prea mici sau prea mari de antioxidanți generează dezechilibre antioxidante – prooxidante și, ulterior, afecțiuni la nivel de corp. Ecovaleologia ca direcție științifică interdisciplinară ce are ca subiect de studiu sănătatea umană și răspunsul organismului la factorii de mediu mereu în schimbare, este abilitată de a utiliza datele din diverse domenii pentru formularea concluziilor și recomandărilor potrivite pentru menținerea sănătății.

Integrarea conceptului de ecovaleologie în conținutul prelegerii „Chimia alimentară și asigurarea calității produselor. Antioxidanți” din cadrul cursului de Chimie ecologică de la Universitatea de Stat din Moldova a oferit o viziune nouă asupra antioxidantilor și studiului interacțiunilor antioxidante. Prezentarea și argumentarea rezultatelor științifice obținute în Institutul de Chimie al Universității de Stat din Moldova au favorizat familiarizarea studenților cu subiectul interacțiunilor antioxidante, caracterul prooxidant al compușilor, importanța concentrației antioxidantilor, mecanismul de reacție. Menționarea avantajelor și riscurilor pentru sănătate a consumului de antioxidanți, a concentrației și combinației acestora a facilitat integrarea principiilor ecovaleologice în conținutul prelegerii.

Conform rezultatelor chestionarului elaborat, studenții demonstrează o atitudine pozitivă față de consumul de antioxidanți. Materialele didactice prezentate au consolidat cunoștințele privind sursele bogate în antioxidanți, reacțiile redox, importanța consumului antioxidantilor, cauzele formării speciilor radicalice. În urma prelegerii cu caracter ecovaleologic, 90% dintre studenți au pledat pentru consumul de antioxidanți din sursele naturale și doar 6.7% persoane au ales varianta ”aditivi alimentari”; 56.7% dintre studenți nu consideră suplimentele alimentare mai eficiente decât antioxidanții din surse naturale; 95% dintre tineri sunt de părerea că consumul unei concentrații mari de un singur antioxidant „este periculos pentru sănătate”, această alegere datorându-se abordării problemei caracterului prooxidant al antioxidantilor.

La subiectul formării ecovaleologice a tinerilor specialiști a fost publicat un articol la conferință internațională în domeniul științei și educației.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Rezultatele originale obținute în urma investigațiilor la subiectul interacțiunilor antioxidante dintre compușii naturali din struguri, tratat sub aspect ecovaleologic, permite formularea următoarelor concluzii:

1. Conținutul de compuși fenolici și acizi organici în soiurile de strugurii autohtoni – Copceac, Feteasca Neagră, Viorica, Riton, variază considerabil în funcție de stadiu de maturare: bacele verzi, la pârgă și coapte. Rezultatele obținute demonstrează o dinamică firească a indicatorilor fizico-chimici de bază, a conținutului de acizi organici majoritari (max. 15 – 22 g/L în strugurii verzi, min. 1 – 8 g/L în strugurii copti), de compuși fenolici (de la 3.94 g EAG/L în strugurii verzi, până la 2.05 g EAG/L în strugurii copti), proantocianidine (struguri verzi – 1 g ECat/L, struguri copti – 0.39 g ECat/L) și antociani (struguri la pârgă – 411.23 mg EMalv/L, struguri copti – 784.78 mg EMalv/L). Aceste variații sunt dependente de perioada de maturare și de soiul strugurilor, influențând semnificativ calitatea și proprietățile antioxidante ale acestora.
2. Au fost aplicate testele DPPH^{*}, ABTS⁺, PRFe pentru determinarea activității antioxidante și a fost stabilit că activitatea antioxidantă a probelor de struguri din soiurile cercetate este în concordanță cu variațiile conținutului de compuși fenolici. Valorile cele mai mari de 2.19 g EAA/L (metoda DPPH^{*}), 8.11 g ETrolox/L (metoda ABTS⁺), 4.07 g EAA/L (metoda PRFe) au fost înregistrate în probele de struguri verzi datorită conținutului mare de compuși fenolici și proantocianidine în pulpa bachelor.
3. Au fost stabilite raporturile de concentrații optime pentru determinarea interacțiunilor antioxidante în amestecurile de compuși, similare celor din struguri, în termeni de combinație și concentrație. Astfel, în amestecurile cu acizii organici tartric sau citric, raporturile de concentrație studiate variază pentru fiecare compus – acidul ascorbic: 1 – 700, acidul galic: 1 – 2500, catehina: 1 – 1000, quercetina: 1 – 800, rutina: 1 – 900 și resveratrol: 1 – 5000; iar în amestecurile cu acidul dihidroxifumaric, în intervalul 0.05 – 10.
4. La concentrații mici de compus fenolic, în majoritatea probelor experimentale studiate au fost înregistrate efecte antagoniste puternice (min. 0.28); mărirea concentrației compusului fenolic se soldează cu efecte aditive (≈ 1) sau sinergice (>1). Sporirea concentrației acizilor tartric sau citric nu afectează semnificativ tipul interacțiunilor antioxidante, cu excepția amestecurilor formate din resveratrol – acid tartric sau citric. Contrar faptului dat, mărirea concentrației acidului dihidroxifumaric afectează tipul interacțiunilor antioxidante, favorizând manifestarea efectelor sinergice în cazul combinațiilor cu acidul ascorbic (max. 1.17) și rutina (max. 1.07); sporirea concentrației de acid dihidroxifumaric în probele cu catehina, diminuează efectele

sinergice și determină apariția celor aditive și antagoniste (min. 0.89); în probele cu acid galic, quercetină sau resveratrol, concentrația acidului dihidroxifumaric nu a produs variații semnificative ale tipului de interacțiune antioxidantă.

5. Interacțiunile antioxidante dintre compușii fenolici și acizii organici tartric și citric sunt preponderent antagoniste (0.28 – 0.94), în special în probele cu quercetină și resveratrol. A fost stabilit că efectul antagonist este cauzat de prezența concentrațiilor mari de ioni de acizi organici în mediul de reacție ce duce la inhibarea mecanismului SPLET de acțiune a compușilor fenolici. În amestecurile cu acid galic sau catehină au fost observate multiple efecte aditive (0.95 – 1.04), iar probele formate din rutina și acidul tartric sau citric au demonstrat puternice efecte sinergice de max. 1.27 și, respectiv, 1.29. Manifestarea efectului sinergic în probele date poate fi provocată de procesele de oligomerizare a compușilor fenolici, fenomen care se poate solda cu formarea structurilor cu capacitate antioxidantă sporită.
6. Datele obținute în amestecurile formate dintr-un compus fenolic și acidul dihidroxifumaric relevă prezența efectelor antioxidante sinergice, aditive și antagoniste. Amestecurile de acid dihidroxifumaric și catehina sau rutina manifestă cel mai sporit efect sinergic de 1.08 și, respectiv, 1.07, datorită potențialelor reacții de oligomerizare a polifenolilor. Combinația quercetină – acid dihidroxifumaric demonstrează, preponderent, interacțiuni antioxidante aditive în intervalul 0.95 – 0.99, iar amestecurile de acid galic – acid dihidroxifumaric și resveratrol – acid dihidroxifumaric manifestă antagonism puternic, înregistrându-se valori minime de 0.43 și, respectiv, de 0.75.
7. În amestecurile dintre acidul ascorbic și acidul tartric, au fost stabilite efecte sinergice moderate, valorile maxime fiind de 1.08; în cazul amestecurilor acid ascorbic – acid citric, a fost observată predominarea efectelor aditive (0.95 – 1.04). Prezența interacțiunilor sinergice și aditive se datorează concentrației mari de ioni de acid tartric sau citric în reacție, care susține mecanismul HAT de acțiune a acidului ascorbic.
8. A fost determinată prezența efectelor sinergice puternice dintre acidul ascorbic și dihidroxifumaric prin adaptarea și aplicarea a patru metode spectrale de analiză – UV-Viz, Stopped-Flow, RES și RMN. Datele obținute la spectroscopia UV-Viz demonstrează efecte sinergice în intervalul 1.05 – 1.17, înregistrate la concentrațiile maximale ale compușilor testați; rezultatele investigațiilor la spectroscopia Stopped-Flow indică asupra măririi vitezei de reacție (de 10 ori în cazul acidului dihidroxifumaric și de 2 ori în cazul acidului ascorbic) și a activității antioxidante a acizilor analizați în matricea de vin comparativ cu rezultatele obținute în 98% etanol; spectroscopia RES a demonstrat existența efectelor antioxidante sinergice puternice (1.24) și moderate (0.9 – metoda FIC) între acizii ascorbic și

dihidroxifumaric, fiind aplicate două metode de calcul diferite; recurgând la spectroscopia RMN, a fost stabilit că interacțiunea antioxidantă sinergică este favorizată de unele procese de regenerare parțială dintre acizii ascorbic și dihidroxifumaric, ultimul având capacitatea de regenerare a acidului ascorbic.

9. În amestecul acid ascorbic – resveratrol există efecte antioxidante antagoniste și sinergice dependente de ordinea adăugării compușilor în reacție. Efectul sinergic maximal de 1.19 este obținut atunci când la soluția de DPPH^{*} se adaugă inițial resveratrol, iar după consumarea completă a stilbenului, se adaugă acid ascorbic. Spectrele RMN au demonstrat că acest scenariu se soldează cu formarea *trans*- δ -viniferinelor, care posedă activitate antioxidantă și sporesc efectul sinergic al amestecului de compuși.
10. În mediu de soluție tampon fosfat, preparatul ENOXIL posedă activitate antioxidantă de 2 – 3 ori mai mare decât în apă. Adăugând acid ascorbic la soluția de ENOXIL, rezultatele demonstrează prezența sinergismului în toate probele analizate. Activitatea antioxidantă totală și amploarea efectului sinergic depind de ordinea adăugării compușilor în reacție, astfel că cel mai mare efect sinergic – 1.19, a fost obținut în proba în care inițial interacționează preparatul ENOXIL cu DPPH^{*}, apoi se adaugă acidul ascorbic.
11. Abordarea rezultatelor studiului interacțiunilor antioxidante din perspectiva ecovaleologică oferă o viziune nouă asupra subiectului dat. Integrarea conceptului de ecovaleologie în conținutul prelegerii „Chimia alimentară și asigurarea calității produselor. Antioxidanții” din cadrul cursului de Chimie ecologică de la Universitatea de Stat din Moldova a permis familiarizarea studenților cu avantajele și riscurile pentru sănătate a consumului antioxidantilor, efectul concentrației compușilor dați asupra sănătății, a facilitat argumentarea beneficiului consumului de antioxidanți din surse naturale, precum și orientarea studenților spre abordări sustenabile și în rezonanță cu dezvoltarea durabilă a societății. Chestionarul elaborat a demonstrat că prelegerea a avut impact pozitiv asupra interpretării materialului didactic și asupra formării unor concluzii privind consumul antioxidantilor, impactului concentrației compușilor dați și importanței antioxidantilor pentru sănătate.

Recomandări practice

- Se recomandă aplicarea rezultatelor științifice obținute pentru îmbunătățirea efectului antioxidant și a eficienței produselor alimentare, cosmetologice, medicinale, farmacologice și a procedurilor tehnologice existente.
- Se recomandă introducerea în curriculumul cursului de Chimie ecologică din cadrul Universității de Stat din Moldova a conceptului de ecovaleologie pentru formarea deprinderilor sănătoase, ecologice și sustenabile în rândul tinerilor.

BIBLIOGRAFIE

1. MARTEMUCCI, G., COSTAGLIOLA, C., MARIANO, M., D'ANDREA, L., NAPOLITANO, P., D'ALESSANDRO, A. G. Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. In: *Oxygen*. 2022, nr. 2(2), pp. 48-78. ISSN 2673-9801.
2. NWOZO, O. S., EFFIONG, E. M., AJA, P. M., AWUCHI, C. G. Antioxidant, phytochemical, and therapeutic properties of medicinal plants: A review. In: *International Journal of Food Properties*. 2023, nr. 26(1), pp. 359-388. ISSN 1094-2912, ISSN 1532-2386.
3. DUCA, G. Ecological & Environmental Chemistry. In: *Proceedings of the 6th International Conference Ecological and Environmental Chemistry, 2-3 March 2017, Chisinau, Republic of Moldova*. pp. 11-20. ISBN 978-9975-51-810-9.
4. DUCA, G., SCURLATOV, Iu., MISITI, M., MACOVEANU, M., SURPĂȚEANU, M. *Chimie ecologică*. București: Matrix Rom, 1999, p. 305. ISBN 973-685-016-1.
5. TSAO, R. Synergistic interactions between antioxidants used in food preservation. In: *Handbook of antioxidants for food preservation*. Woodhead Publishing, 2015, pp. 335-347. ISBN 978-1-78242-089-7.
6. SOTLER, R., POLJŠAK, B., DAHMANE, R., JUKIĆ, T., PAVAN JUKIĆ, D., ROTIM, C., TREBŠE, P., STARC, A. Prooxidant activities of antioxidants and their impact on health. In: *Acta Clinica Croatica*. 2019, nr. 58(4), pp. 726-736. ISSN 0353-9466.
7. FREEMAN, B. L., EGGETT, D. L., PARKER, T. L. Synergistic and antagonistic interactions of phenolic compounds found in navel oranges. In: *Journal of Food Science*. 2010, nr. 75(6), pp. 570-576. ISSN 1750-3841, ISSN 0022-1147.
8. PARKER, T. L., MILLER, S. A., MYERS, L. E., MIGUEZ, F. E., ENGESETH, N. J. Evaluation of synergistic antioxidant potential of complex mixtures using oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and electron paramagnetic resonance (EPR). In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, nr. 58(1), pp. 209-217. ISSN 0021-8561, ISSN 1520-5118.
9. IACOPINI, P., BALDI, M., STORCHI, P., SEBASTIANI, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. In: *Journal of Food Composition and Analysis*. 2008, nr. 21(8), pp. 589-598. ISSN 0889-1575, ISSN 1096-0481.
10. SCALZO, R. L. Organic acids influence on DPPH scavenging by ascorbic acid. In: *Food Chemistry*. 2008, nr. 107(1), pp. 40-43. ISSN 0308-8146, ISSN 1873-7072.

11. COSME, F., PINTO, T., VILELA, A. Phenolic compounds and antioxidant activity in grape juices: A chemical and sensory view. In: *Beverages*. 2018, nr. 4(1), pp. 1-14. ISSN 2306-5710.
12. ZHOU, D. D., LI, J., XIONG, R. G., SAIMAITI, A., HUANG, S. Y., WU, S. X., YANG, Z. J., SHANG, A., ZHAO, C. N., GAN, R. Y., LI, H. B. Bioactive compounds, health benefits and food applications of grape. In: *Foods*. 2022, nr. 11(18), pp. 2-22. ISSN 2304-8158.
13. LO SCALZO, R. EPR free radical scavenging activity on superoxide, hydroxyl and tert-butyl hydroperoxide radicals by common hydrophilic antioxidants: effect of mixing and influence of glucose and citric acid. In: *European Food Research and Technology*. 2021, nr. 247, pp. 2253-2265. ISSN 1438-2385, ISSN 1438-2377.
14. PIANG-SIONG, W., DE CARO, P., MARVILLIERS, A., CHASSERAY, X., PAYET, B., SING, A. S. C., ILLIEN, B. Contribution of trans-aconitic acid to DPPH scavenging ability in different media. In: *Food Chemistry*. 2017, nr. 214, pp. 447-452. ISSN 0308-8146, ISSN 1873-7072.
15. COTEA, V. D., ZĂNOAGĂ, C. V., COTEA, V. V. *Tratat de Oenochimie, Vol. I*, București: Editura Academiei Române, 2009. 684 p. ISBN 978-973-27-1756-1.
16. CORNELLI, U. Antioxidant use in nutraceuticals. In: *Clinics in dermatology*. 2009, nr. 27(2), pp. 175-194. ISSN 1879-1131, ISSN 0738-081X.
17. DECKER, E. A., CHEN, B., PANYA, A., ELIAS, R. J. Understanding antioxidant mechanisms in preventing oxidation in foods. In: *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications*. Woodhead Publishing, 2010, pp. 225-248. ISBN 978-1-84569-648-1.
18. БРЕХМАН, И. И. *Валеология - наука о здоровье*. Москва: Физкультура и спорт, 1990. 206 p. ISBN 5-278-00214-X:80к.
19. ВАЙНЕР, Э. Н. *Валеология. Учебник для вузов*. Москва: Флинта: Наука, 2001, 416 p. ISBN 5-89349-329-X, ISBN 5-02-013095-8.
20. BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. In: *LWT-Food science and Technology*. 1995, nr. 28(1), pp. 25-30. ISSN 0023-6438, ISSN 1096-1127.
21. RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. In: *Free Radical Biology and Medicine*. 1999, nr. 26(9-10), pp. 1231-1237. ISSN 1873-4596, ISSN 0891-5849.

22. SECK, I., HOSU, A., CIMPOIU, C., NDOYE, S. F., BA, L. A., SALL, C., SECK, M. Phytochemicals content, screening and antioxidant/pro-oxidant activities of *Carapa procera* (barks)(Meliaceae). In: *South African Journal of Botany*. 2021, nr. 137, pp. 369-376. ISSN 1727-9321, ISSN 0254-6299.
23. SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: *Methods in enzymology*. 1999, nr. 299, pp. 152-178. ISSN 0076-6879.
24. ARNOUS, A., MAKRIS, D. P., KEFALAS, P. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, nr. 49(12), pp. 5736-5742. ISSN 0021-8561, ISSN 1520-5118.
25. RAPISARDA, P., FANELLA, F., MACCARONE, E. Reliability of analytical methods for determining anthocyanins in blood orange juices. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, nr. 48(6), pp. 2249-2252. ISSN 0021-8561, ISSN 1520-5118.
26. HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. In: *Free Radical Research Communications*. 1990, nr. 9(1), pp. 1-32. ISSN 1071-5762, ISSN 1029-2470.
27. HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. In: *Biochemical Society Transactions*. 2007, nr. 35(5), pp. 1147-1150. ISSN 0300-5127, ISSN 1470-8752.
28. KHLEBNIKOV, A. I., SCHEPETKIN, I. A., DOMINA, N. G., KIRPOTINA, L. N., QUINN, M. T. Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2007, nr. 15(4), pp. 1749-1770. ISSN 1464-3391, ISSN 0968-0896.
29. LOBO, V., PATIL, A., PHATAK, A., CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. In: *Pharmacognosy Reviews*. 2010, nr. 4(8), pp. 118-126. ISSN 0973-7847, ISSN 0976-2787.
30. PRADEDOVA, E. V., ISHEEVA, O. D., SALYAEV, R. K. Classification of the antioxidant defense system as the ground for reasonable organization of experimental studies of the oxidative stress in plants. In: *Russian Journal of Plant Physiology*. 2011, nr. 58, pp. 210-217. ISSN 1608-3407, ISSN 1021-4437.
31. CAROCHO, M., FERREIRA, I. C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. In: *Food and Chemical Toxicology*. 2013, nr. 51, pp. 15-25. ISSN 0278-6915, ISSN 1873-6351.
32. NUNES, X. P., SILVA, F. S., ALMEIDA, J. R. G. D. S., BARBOSA FILHO, J. M., DE LIMA, J. T., DE ARAÚJO RIBEIRO, L. A., JÚNIOR, L. J. Q. Biological oxidations and

- antioxidant activity of natural products. In: *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*. New York: INTECH Open Access Publisher, 2012, pp. 1-20. ISBN 978-953-51-0203-8.
33. KRINSKY, N. I. Mechanism of action of biological antioxidants. In: *Experimental Biology and Medicine*. 1992, nr. 200(2), pp. 248-254. ISSN 1535-3702, ISSN 1535-3699.
 34. GALANO, A., MAZZONE, G., ALVAREZ-DIDUK, R., MARINO, T., ALVAREZ-IDABOY, J. R., RUSSO, N. Food antioxidants: chemical insights at the molecular level. In: *Annual Review of Food Science and Technology*. 2016, nr. 7, pp. 335-352. ISSN 1941-1421.
 35. NIMSE, S. B., PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. In: *RSC Advances*. 2015, nr. 5(35), pp. 27986-28006. ISSN 2046-2069.
 36. PRIOR, R. L., WU, X., SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, nr. 53(10), pp. 4290-4302. ISSN 0021-8561, ISSN 1520-5118.
 37. MARTEAU, C., NARDELLO-RATAJ, V., FAVIER, D., AUBRY, J. M. Dual role of phenols as fragrances and antioxidants: mechanism, kinetics and drastic solvent effect. In: *Flavour and Fragrance Journal*. 2013, nr. 28(1), pp. 30-38. ISSN 1099-1026, ISSN 0882-5734.
 38. LEOPOLDINI, M., RUSSO, N., TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. In: *Food Chemistry*. 2011, nr. 125(2), pp. 288-306. ISSN 0308-8146, ISSN 1873-7072.
 39. AMIĆ, A., MARKOVIĆ, Z., MARKOVIĆ, J. M. D., STEPANIĆ, V., LUČIĆ, B., AMIĆ, D. Towards an improved prediction of the free radical scavenging potency of flavonoids: The significance of double PCET mechanisms. In: *Food Chemistry*. 2014, nr. 152, pp. 578-585. ISSN 0308-8146, ISSN 1873-7072.
 40. KRINSKY, N. I. Antioxidant functions of carotenoids. In: *Free Radical Biology and Medicine*. 1989, nr. 7(6), pp. 617-635. ISSN 1873-4596, ISSN 0891-5849.
 41. SHANG, Y. J., QIAN, Y. P., LIU, X. D., DAI, F., SHANG, X. L., JIA, W. Q., ZHOU, B. Radical-scavenging activity and mechanism of resveratrol-oriented analogues: Influence of the solvent, radical, and substitution. In: *The Journal of Organic Chemistry*. 2009, nr. 74(14), pp. 5025-5031. ISSN 0022-3263, ISSN 1520-6904.
 42. LÜ, J. M., LIN, P. H., YAO, Q., CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. In: *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2010, nr. 14(4), pp. 840-860. ISSN 1582-4934, ISSN 1582-1838.

43. SARMA, A. D., SREELAKSHMI, Y., SHARMA, R. Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation. In: *Phytochemistry*. 1997, nr. 45(4), pp. 671-674. ISSN 0031-9422, ISSN 1873-3700.
44. HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. *Free radicals in biology and medicine*. United Kingdom: Oxford University Press, 2015. 905 p. ISBN 978-0-19-871747-8.
45. CHOUEIRI, L., CHEDEA, V. S., CALOKERINOS, A., KEFALAS, P. Antioxidant/pro-oxidant properties of model phenolic compounds. Part II: Studies on mixtures of polyphenols at different molar ratios by chemiluminescence and LC-MS. In: *Food Chemistry*. 2012, nr. 133(3), pp. 1039-1044. ISSN 0308-8146, ISSN 1873-7072.
46. RIETJENS, I. M., BOERSMA, M. G., DE HAAN, L., SPENKELINK, B., AWAD, H. M., CNUBBEN, N. H., KOEMAN, J. H. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. In: *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2002, nr. 11(3-4), pp. 321-333. ISSN 1382-6689, ISSN 1872-7077.
47. RIBEIRO, D., FREITAS, M., SILVA, A. M., CARVALHO, F., FERNANDES, E. Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products. In: *Food and Chemical Toxicology*. 2018, nr. 120, pp. 681-699. ISSN 0278-6915, ISSN 1873-6351.
48. YORDI, E. G., PÉREZ, E. M., MATOS, M. J., VILLARES, E. U. Antioxidant and pro-oxidant effects of polyphenolic compounds and structure-activity relationship evidence. In: *Nutrition, well-being and health*. Croatia: IntechOpen, 2012, pp. 23-48. ISBN 978-953-51-0125-3.
49. GAO, Q., LI, Y., LI, Y., ZHANG, Z., LIANG, Y. Antioxidant and prooxidant activities of phenolic acids commonly existed in vegetables and their relationship with structures. In: *Food Science and Technology*. 2022, nr. 42, e07622. ISSN 0101-2061, ISSN 1678-457X.
50. YEN, G. C., DUH, P. D., TSAI, H. L., HUANG, S. L. Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2003, nr. 67(6), pp. 1215-1222. ISSN 0916-8451, ISSN 1347-6947.
51. RAHAL, A., KUMAR, A., SINGH, V., YADAV, B., TIWARI, R., CHAKRABORTY, S., DHAMA, K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. In: *BioMed Research International*. 2014, pp.1-19. ISSN 2314-6133, ISSN 2314-6141.
52. PROCHÁZKOVÁ, D., BOUŠOVÁ, I., WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. In: *Fitoterapia*. 2011, nr. 82(4), pp. 513-523. ISSN 1873-6971, ISSN 0367-326X.

53. REBER, J. D., EGGETT, D. L., PARKER, T. L. Antioxidant capacity interactions and a chemical/structural model of phenolic compounds found in strawberries. In: *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2011, nr. 62(5), pp. 445-452. ISSN 0963-7486, ISSN 1465-3478.
54. PALAFOX-CARLOS, H., GIL-CHÁVEZ, J., SOTELO-MUNDO, R. R., NAMIESNIK, J., GORINSTEIN, S., GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Antioxidant interactions between major phenolic compounds found in 'Ataulfo' mango pulp: chlorogenic, gallic, protocatechuic and vanillic acids. In: *Molecules*. 2012, nr. 17(11), pp. 12657-12664. ISSN: 1420-3049.
55. LÓPEZ-MARTÍNEZ, L. M., SANTACRUZ-ORTEGA, H., NAVARRO, R. E., SOTELO-MUNDO, R. R., GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. A ¹H NMR investigation of the interaction between phenolic acids found in mango (*Mangifera indica* cv Ataulfo) and papaya (*Carica papaya* cv Maradol) and 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radicals. In: *PloS one*. 2015, nr. 10(11), pp. 1-11. ISSN 1932-6203.
56. MUHAMMAD, D. R. A., PRASEPTIANGGA, D., VAN DE WALLE, D., DEWETTINCK, K. Interaction between natural antioxidants derived from cinnamon and cocoa in binary and complex mixtures. In: *Food Chemistry*. 2017, nr. 231, pp. 356-364. ISSN 0308-8146, ISSN 1873-7072.
57. OHIGASHI, H., MURAKAMI, A. Cancer prevention with food factors: alone and in combination. In: *Biofactors*. 2004, nr. 22(1-4), pp. 49-55. ISSN 1872-8081, ISSN 0951-6433.
58. TIMOSHNIKOV, V. A., KOBZEVA, T. V., POLYAKOV, N. E., KONTOGHIORGHES, G. J. Redox interactions of vitamin C and iron: Inhibition of the pro-oxidant activity by deferiprone. In: *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, nr. 21(11), pp. 1-16. ISSN: 1422-0067.
59. SEIFRIED, H. E., MCDONALD, S. S., ANDERSON, D. E., GREENWALD, P., MILNER, J. A. The antioxidant conundrum in cancer. In: *Cancer Research*. 2003, nr. 63(15), pp. 4295-4298. ISSN 0008-5472, ISSN 1538-7445.
60. OLSZOWY-TOMCZYK, M. Synergistic, antagonistic and additive antioxidant effects in the binary mixtures. In: *Phytochemistry Reviews*. 2020, nr. 19, pp. 63-103. ISSN 1572-980X, ISSN 1568-7767.
61. CHEN, X., LI, H., ZHANG, B., DENG, Z. The synergistic and antagonistic antioxidant interactions of dietary phytochemical combinations. In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2022, nr. 62(20), pp. 5658-5677. ISSN 1040-8398, ISSN 1549-7852.
62. NOGALA-KAŁUCKA, M., DWIECKI, K., SIGER, A., GÓRNAŚ, P., POLEWSKI, K., CIOSEK, S. Antioxidant synergism and antagonism between tocotrienols, quercetin and rutin

- in model system. In: *Acta Alimentaria*. 2013, nr. 42(3), pp. 360-370. ISSN 0139-3006, ISSN 1588-2535.
63. SKROZA, D., MEKINIĆ, I. G., SVILOVIĆ, S., ŠIMAT, V., KATALINIĆ, V. Investigation of the potential synergistic effect of resveratrol with other phenolic compounds: A case of binary phenolic mixtures. In: *Journal of Food Composition and Analysis*. 2015, nr. 38, pp. 13-18. ISSN 0889-1575, ISSN 1096-0481.
64. CASADEY, R., CHALLIER, C., ALTAMIRANO, M., SPESIA, M. B., CRIADO, S. Antioxidant and antimicrobial properties of tyrosol and derivative-compounds in the presence of vitamin B2. Assays of synergistic antioxidant effect with commercial food additives. In: *Food Chemistry*. 2021, 335, pp. 1-8. ISSN 0308-8146, ISSN 1873-7072.
65. TAVADYAN, L. A., MINASYAN, S. H. Synergistic and antagonistic co-antioxidant effects of flavonoids with trolox or ascorbic acid in a binary mixture. In: *Journal of Chemical Sciences*. 2019, nr. 131, pp. 1-11. ISSN 0973-7103.
66. KONOPKO, A., LITWINIENKO, G. Unexpected role of pH and microenvironment on the antioxidant and synergistic activity of resveratrol in model micellar and liposomal systems. In: *The Journal of Organic Chemistry*. 2021, nr. 87(3), pp. 1698-1709. ISSN 0022-3263, ISSN 1520-6904.
67. KITTIPONGPITTAYA, K., PANYA, A., PHONSATTA, N., DECKER, E. A. Effects of environmental pH on antioxidant interactions between rosmarinic acid and α -tocopherol in oil-in-water (O/W) emulsions. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016, nr. 64(34), pp. 6575-6583. ISSN 0021-8561, ISSN 1520-5118.
68. LIU, H., LIU, M., WANG, D., WANG, L., ZHAO, Y., LIU, J., ZHANG, Y. Competitive binding of synergistic antioxidant chlorogenic acid and (-)-epigallocatechin gallate with lysozyme: Insights from multispectroscopic characterization, molecular docking and activity evaluation. In: *Journal of Molecular Liquids*. 2021, nr. 341, pp. 117387-117397. ISSN 0167-7322, ISSN 1873-3166.
69. QUIROGA, P. R., NEPOTE, V., BAUMGARTNER, M. T. Contribution of organic acids to α -terpinene antioxidant activity. In: *Food chemistry*. 2019, nr. 277, pp. 267-272. ISSN 0308-8146, ISSN 1873-7072.
70. COLON, M., NERÍN, C. Synergistic, antagonistic and additive interactions of green tea polyphenols. In: *European Food Research and Technology*. 2016, nr. 242, pp. 211-220. ISSN 1438-2385, ISSN 1438-2377.
71. SLAVOVA-KAZAKOVA, A., JANIÁK, M. A., SULEWSKA, K., KANCHEVA, V. D., KARAMAĆ, M. Synergistic, additive, and antagonistic antioxidant effects in the mixtures of

- curcumin with (-)-epicatechin and with a green tea fraction containing (-)-epicatechin. In: *Food Chemistry*. 2021, nr. 360, pp. 1-7. ISSN 0308-8146, ISSN 1873-7072.
72. STEVENS-BARRÓN, J. C., WALL-MEDRANO, A., ÁLVAREZ-PARRILLA, E., OLIVAS-ARMENDÁRIZ, I., ASTIAZARAN-GARCÍA, H., ROBLES-ZEPEDA, R. E., DE LA ROSA, L. A. Synergistic interactions between tocol and phenolic extracts from different tree nut species against human cancer cell lines. In: *Molecules*. 2022, nr. 27(10), pp. 1-15. ISSN 1420-3049.
73. PURKAIT, S., BHATTACHARYA, A., BAG, A., CHATTOPADHYAY, R. R. Synergistic antibacterial, antifungal and antioxidant efficacy of cinnamon and clove essential oils in combination. In: *Archives of Microbiology*. 2020, nr. 202, pp. 1439-1448. ISSN 1432-072X, ISSN 0302-8933.
74. ALVES, A. C., TAVARES, G. M. Mixing animal and plant proteins: Is this a way to improve protein techno-functionalities?. In: *Food Hydrocolloids*. 2019, nr. 97, pp. 1-10. ISSN 0268-005X, ISSN 1873-7137.
75. CELIK, E. E., GÖKMEN, V. Interactions between free and bound antioxidants under different conditions in food systems. In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2022, nr. 62(21), pp. 5766-5782. ISSN 1040-8398, ISSN 1549-7852.
76. ALTUNKAYA, A., GÖKMEN, V., SKIBSTED, L. H. pH dependent antioxidant activity of lettuce (*L. sativa*) and synergism with added phenolic antioxidants. In: *Food chemistry*. 2016, nr. 190, pp. 25-32. ISSN 0308-8146, ISSN 1873-7072.
77. Food and Agriculture Organization of the United Nations - Data. Disponibil: <https://www.fao.org/faostat/en/#data>
78. MOTTA, S., GUAITA, M., CASSINO, C., BOSSO, A. Relationship between polyphenolic content, antioxidant properties and oxygen consumption rate of different tannins in a model wine solution. In: *Food chemistry*. 2020, 313, pp.1-10. ISSN 0308-8146, ISSN 1873-7072.
79. RIBÉREAU-GAYON, P., DUBOURDIEU, D., DONÈCHE, B., LONVAUD, A. *Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications. 2nd Edition*. England: John Wiley & Sons, 2006. 497 p. ISBN-13 978-0-470-01034-1, ISBN-10 0-470-01034-7.
80. IRIMIA, L. M. *Biologia, ecologia și fiziologia vi ei de vie*. Iași: Editura „Ion Ionescu de la Brad, 2012. 260 p. ISBN 978-973-147-106-8.
81. NEL, A. P. Tannins and anthocyanins: From their origin to wine analysis-A review. In: *South African Journal of Enology and Viticulture*. 2018, nr. 39(1), pp. ISSN 2224-7904, ISSN 0253-939X1-20.

82. BUBOLA, M., PERŠURIĆ, Đ., KOVAČEVIĆ GANIĆ, K., KAROGLAN, M., KOZINA, B. Effects of fruit zone leaf removal on the concentrations of phenolic and organic acids in Istrian Malvasia grape juice and wine. In: *Food Technology and Biotechnology*. 2012, nr. 50(2), pp. 159-166. ISSN 1330-9862, ISSN 1334-2606.
83. FLORA, S. J. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. In: *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2009, nr. 2, pp. 191-206. ISSN 1942-0900, ISSN 1942-0994.
84. RODRÍGUEZ-DAZA, M. C., PULIDO-MATEOS, E. C., LUPIEN-MEILLEUR, J., GUYONNET, D., DESJARDINS, Y., ROY, D. Polyphenol-mediated gut microbiota modulation: Toward prebiotics and further. In: *Frontiers in Nutrition*. 2021, nr. 8, pp. 1-24. ISSN 2296-861X.
85. FRAGA, C. G., GALLEANO, M., VERSTRAETEN, S. V., OTEIZA, P. I. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. In: *Molecular Aspects of Medicine*. 2010, nr. 31(6), pp. 435-445. ISSN 1872-9452, ISSN: 0098-2997.
86. VILLAÑO, D., FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S., MOYÁ, M. L., TRONCOSO, A. M., GARCÍA-PARRILLA, M. C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. In: *Talanta*. 2007, nr. 71(1), pp. 230-235. ISSN 1873-3573, ISSN 0039-9140.
87. MCMURROUGH, I., MCDOWELL, J. Chromatographic separation and automated analysis of flavanols. In: *Analytical Biochemistry*. 1978, nr. 91(1), pp. 92-100. ISSN 0003-2697, ISSN 1096-0309.
88. GARRIDO, T., GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, M., LECETA, I., URDANPILLETA, M., GUERRERO, P., DE LA CABA, K., KILMARTIN, P. A. Optimizing the extraction process of natural antioxidants from chardonnay grape marc using microwave-assisted extraction. In: *Waste Management*. 2019, nr. 88, pp. 110-117. ISSN 0956-053X, ISSN 1879-2456.
89. EYÉGHÉ-BICKONG, H. A., ALEXANDERSSON, E. O., GOUWS, L. M., YOUNG, P. R., VIVIER, M. A. Optimisation of an HPLC method for the simultaneous quantification of the major sugars and organic acids in grapevine berries. In: *Journal of Chromatography B*. 2012, nr. 885, pp. 43-49. ISSN 1570-0232, ISSN 1873-376X.
90. GOLUBI, R. *Valorificarea strugurilor nematurați la obținerea compozițiilor nutritive: tz. de doct. în șt. tehnice*. Chișinău, 2019, 143 p.
91. World Health Organization. One Health Definition and Principles. Disponibil: <https://www.who.int/publications/m/item/one-health-definitions-and-principles>

92. ÖZKARA, A., AKYIL, D. Environmental Pollution and the Effects of the Pollutants on the Ecosystem. In: *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*. 2018, nr. 11(2), pp. 11-17. ISSN 2146-0132.
93. SCHEINER, S. M., WILLIG, M. R. A general theory of ecology. In: *Theoretical ecology*. 2008, nr. 1, pp. 21-28. ISSN 1874-1746.
94. CALMUȚCHI, L., FILIPENCO, T. Formarea orientărilor eco-valeologice a personalității elevului în predarea chimiei organice. In: *Culegerile Conferinței "Probleme actuale ale didacticii științelor reale" consacrată aniversării a 80-a a profesorului universitar Ilie Lupu, 11-12 mai 2018, Chișinău, Republica Moldova*. pp. 48-53. Disponibil: https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/94707
95. AN, S. A., LENSKAYA, I. F., METALNIKOV, A. I., FEDOSOVA, N. A., SHCHERBININA, L. F. An Integrated Sociocultural, Valeological, and Biomedical Approach to Human Health. In: *Proceedings of the International Scientific and Practical Conference on Education, Health and Human Wellbeing (ICEDER 2019), vol. 396, January 2020, Atlantis Press*. pp. 432-436. Disponibil: <https://www.atlantispress.com/proceedings/iceder-19/125932718>
96. RASULOVA, N., SHORUSTAMOVA, M. Healthy lifestyle is health through education. In: *Science and Innovation*. 2023, nr. 2(6), pp. 24-26. ISSN 2181-3337.
97. MASALIMOVA, A. R., LUCHININA, A. O., ULENGOV, R. A. Technological Education as a Means of Developing Students' Health Culture. In: *International Journal of Environmental and Science Education*. 2016, nr. 11(5), pp. 623-632. ISSN 1306-3065.
98. KONOVALOVA, O., SAMOILOVA, N., POLUBOJAROV, O., TSYMBALOV, I. Health-Improving Nourishment as a method of strengthening the health of participants of the educational process. In: *School and Health 21, 2009, Topical Issues in Health Education*. Brno: Universitas Masarykiana Brunensis, 2009, pp. 147-154. ISBN 978-80-210-4930-7, ISBN 978-80-7392-097-5.
99. GOLOVINA, N. V., DOBROKHOTOV, D. A., FILIPPOVA, A. A. Valeological Aspects in the Determination of the Content of the Course of Chemistry at the Medical and Pediatric Faculty of the Medical University. In: *Educational Researcher, Issue 9 (2)*. American Educational Research Association, 2018, nr. 47, pp. 1088 - 1098. ISSN 0013-189X, ISSN 1935-102X.
100. PRANOVA, E. V. The nature and structure of the socio-valuable component of valeological direction of future specialists in the field of physical education. In: *Pedagogics, Psychology,*

- Medical-Biological Problems of Physical Training and Sports*. 2013, nr. 17(7), pp. 51-55. ISSN 2308-7269, ISSN 1818-9172, ISSN 2308-7269.
- 101.MENSAH, G. A., FUSTER, V., MURRAY, C. J., ROTH, G. A. Global burden of cardiovascular diseases and risks, 1990-2022. In: *Journal of the American College of Cardiology*. 2023, nr. 82(25), pp. 2350-2473. ISSN 0735-1097.
- 102.FULLER, R., LANDRIGAN, P. J., BALAKRISHNAN, K., BATHAN, G., BOSE-O'REILLY, S., BRAUER, M., YAN, C. Pollution and health: a progress update. In: *The Lancet Planetary Health*. 2022, nr. 6(6), pp. e535-e547. ISSN 2542-5196, ISSN 2542-5196.
- 103.Green Guide to Sustainable Living at UCLA. Disponibil: <https://www.sustain.ucla.edu/wp-content/uploads/2021/01/Green-Guide-2021-final.pdf>
- 104.The Sustainable Development Goals Report 2023: Special Edition. Disponibil: <https://unstats.un.org/sdgs/report/2023/>
- 105.TARAN, N., PONOMARIOVA, I., MORARI, B., NEMȚEANU, S. Studiul potențialului tehnologic al soiurilor de struguri de selecție nouă în contextul schimbărilor climatice în Republica Moldova. In: *Pomicultura, Viticultura și Vinificația*. 2022, nr. 87(1), pp. 42-48. ISSN 1857-3142.
- 106.SCORBANOVA, E., TARAN, N., PONOMARIOVA, I., DEGTEARI, N., RÎNDA, P., EFREMOV, E. Complexul aromatic al vinurilor albe seci din soiuri de struguri de selecție nouă prin metoda GC-MS. In: *Pomicultura, Viticultura și Vinificația*. 2021, nr. 85(1), pp. 34-37. ISSN 1857-3142.
- 107.SOMMER, S., COHEN, S. D. Comparison of different extraction methods to predict anthocyanin concentration and color characteristics of red wines. In: *Fermentation*. 2018, nr. 4(2), pp. 2-14. ISSN 2311-5637.
- 108.GOST 13192-73. Disponibil: <https://internet-law.ru/gosts/gost/1573/>
- 109.GOST 14252-73. Disponibil: <https://internet-law.ru/gosts/gost/44827/>
- 110.GOST 26188-84. Disponibil: <https://internet-law.ru/gosts/gost/39192/>
- 111.PHONCHAI, A., KIM, Y., CHANTIWAS, R., CHO, Y. K. Lab-on-a-disc for simultaneous determination of total phenolic content and antioxidant activity of beverage samples. In: *Lab on a Chip*. 2016, nr. 16(17), pp. 3268-3275. ISSN 1473-0189.
- 112.WALLACE, T. C., GIUSTI, M. M. Evaluation of parameters that affect the 4-dimethylaminocinnamaldehyde assay for flavanols and proanthocyanidins. In: *Journal of Food Science*. 2010, nr. 75(7), pp. C619-C625. ISSN 1750-3841.
- 113.DUDEK, A., SPIEGEL, M., STRUGAŁA-DANAK, P., GABRIELSKA, J. Analytical and theoretical studies of antioxidant properties of chosen anthocyanins; a structure-dependent

- relationships. In: *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, nr. 23(10), pp. 2-18. ISSN: 1422-0067.
114. ГЕРЖИКОВА В. Г. *Методы технокимического контроля в виноделии*. Симферополь: Таврида, 2002. 260 p. ISBN 978-966-584-194-4.
115. FRIAA, O., BRAULT, D. Kinetics of the reaction between the antioxidant Trolox® and the free radical DPPH in semi-aqueous solution. In: *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2006, nr. 4(12), pp. 2417-2423. ISSN 1477-0539.
116. FOTI, M. C., DAQUINO, C., GERACI, C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH' radical in alcoholic solutions. In: *The Journal of Organic Chemistry*. 2004, nr. 69(7), pp. 2309-2314. ISSN 0022-3263, ISSN 1520-6904.
117. SAWAI, Y., MOON, J. H., SAKATA, K., WATANABE, N. Effects of structure on radical-scavenging abilities and antioxidative activities of tea polyphenols: NMR analytical approach using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, nr. 53(9), pp. 3598-3604. ISSN 0021-8561, ISSN 1520-5118.
118. SECARA, N. Stopped-flow spectrophotometric studies of the kinetics of interaction of dihydroxyfumaric acid with the DPPH free radical. In: *Chemistry Journal of Moldova*. 2010, nr. 5(2), pp. 83-87. ISSN 1857-1727, ISSN 2345-1688.
119. SAWAI, Y., MOON, J. H. NMR analytical approach to clarify the molecular mechanisms of the antioxidative and radical-scavenging activities of antioxidants in tea using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, nr. 48(12), pp. 6247-6253. ISSN 0021-8561, ISSN 1520-5118.
120. SAWAI, Y., SAKATA, K. NMR analytical approach to clarify the antioxidative molecular mechanism of catechins using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998, nr. 46(1), pp. 111-114. ISSN 0021-8561, ISSN 1520-5118.
121. CANO, A., MAESTRE, A. B., HERNÁNDEZ-RUIZ, J., ARNAO, M. B. ABTS/TAC Methodology: main milestones and recent applications. In: *Processes*. 2023, nr. 11(1), pp. 185. ISSN 2227-9717.
122. BECKER, M. M., NUNES, G. S., RIBEIRO, D. B., SILVA, F. E., CATANANTE, G., MARTY, J. L. Determination of the antioxidant capacity of red fruits by miniaturized spectrophotometry assays. In: *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2019, nr. 30, pp. 1108-1114. ISSN 1678-4790.
123. CEBAN, G. I., NASTAS, R. (2018). Adaptarea metodei ABTS^{•+} pentru determinarea proprietăților antioxidante ale cărbunilor active. In: *Culegerile Conferinței Perspectivele și Problemele Integrării în Spațiul European a Cercetării și Educației, 7 iunie 2018, Cahul*.

- Cahul, Republica Moldova: Universitatea de Stat „Bogdan Petriceicu Hasdeu din Cahul, 2018, Vol. 1. pp. 316-321. Disponibil: https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/66804*
124. BERKER, K. I., GÜÇLÜ, K., TOR, İ., APAK, R. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. In: *Talanta*. 2007, nr. 72(3), pp. 1157-1165. ISSN 1873-3573, ISSN 0039-9140.
125. HSIEH, M. H., CHEN, M. Y., VICTOR, L. Y., CHOW, J. W. Synergy assessed by checkerboard a critical analysis. In: *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 1993, nr. 16(4), pp. 343-349. ISSN 0732-8893, ISSN 1879-0070.
126. VICOL, C. Analiza indicatorilor fizico-chimici în strugurii autohtoni cu scopul estimării calității produselor. In: *Rezumatele Comunicărilor la Conferința Științifică Studentească Online Consacrată Zilei Internaționale a Studenților „Chimia Ecologică și a Mediului”, Ediția XVIII, 17 Noiembrie 2020, Chișinău, Republica Moldova*. pp 46-47. ISBN 978-9975-152-63-1.
127. VICOL, C., MORARI, B., SCORBANOVA, E., DUCA, G. Evoluția conținutului de acizi organici în strugurii moldovenești până la atingerea valorilor optime pentru consum. In: *Analele Universității din Craiova, Seria Chimie, Simpozionul Național de Chimie „Contribuții la Creșterea Calității Învățământului și Cercetării în Domeniul Chimiei”, Ediția a XII-a, 28 Noiembrie 2020, Craiova, România*. p. 40. ISSN 1223-5288.
128. TARAN, N., MORARI, B., SOLDATENCO, G. O., PONOMARIOVA, I., NEMȚEANU, S., GĂINĂ, B., VICOL, C. Potențialul oenologic al soiurilor de struguri autohtone și de selecție nouă. In: *Revista de Știință, Inovare, Cultură și Artă „Akademos”*. 2022, nr. 67(4), pp. 58-65. ISSN 1857-0461, ISSN 2587-3687.
129. VICOL, C., MORARI, B., TARAN, N., DUCA, G. Study of the evolution of polyphenolic content and antioxidant activity of local grape varieties at different maturation periods. In: *Proceeding of The 7th International Conference Ecological & Environmental Chemistry-2022, 3-4 March 2022, Chisinau, Republic of Moldova*. p. 162. Disponibil: https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/152021
130. VICOL, C., DUCA, G. Phenolic compounds and antioxidant activity of some Moldovan white and red grape varieties at different maturation periods. In: *Proceedings of the National Conference with International Participation „Life Sciences In The Dialogue Of Generations: Connections Between Universities, Academia And Business Community”, 2nd Edition, 29-30 September 2022, Chisinau, Republic of Moldova*. p. 229. Disponibil: https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/168304

131. **VICOL, C., DUCA, G.** The antioxidant activity of some Moldovan white grapes and wines. In: *Proceeding of the Young Researchers' International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (YRICCCE III)*, 4 – 5 June 2021, Cluj-Napoca, Romania. p. 54. Disponibil: <https://www.chem.ubbcluj.ro/~schr/yriccce2020/program.html>
132. **NILE, S. H., KIM, D. H., KEUM, Y. S.** Determination of anthocyanin content and antioxidant capacity of different grape varieties. In: *Ciência e Técnica Vitivinícola*. 2015, nr. 30(2), pp. 60-68. ISSN 2416-3953
133. **KARAMAN, H. T., KÜSKÜ, D. Y., SÖYLEMEZOĞLU, G.** Phenolic compounds and antioxidant capacities in grape berry skin, seed and stems of six winegrape varieties grown in Turkey. In: *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*. 2021, nr. 20(1), pp. 15-25. ISSN 1644-0692, ISSN 2545-1405.
134. **MIKULIC-PETKOVSEK, M., SKVARC, A., RUSJAN, D.** Biochemical composition of different table grape cultivars produced in Slovenia. In: *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 2019, nr. 94(3), pp. 368-377. ISSN 1462-0316, ISSN 2380-4084.
135. **GOKTURK BAYDAR, N.** Organic acid, tocopherol, and phenolic compositions of some Turkish grape cultivars. In: *Chemistry of Natural Compounds*. 2006, nr. 42, pp. 156-159. ISSN 0009-3130, ISSN 1573-8388.
136. **EYDURAN, S. P., AKIN, M., ERCISLI, S., EYDURAN, E., MAGHRADZE, D.** Sugars, organic acids, and phenolic compounds of ancient grape cultivars (*Vitis vinifera* L.) from Iğdir province of Eastern Turkey. In: *Biological Research*. 2015, nr. 48(1), pp. 1-8. ISSN 0717-6287.
137. **DERRADJI-BENMEZIANE, F., DJAMAI, R., CADOT, Y.** Antioxidant capacity, total phenolic, carotenoid, and vitamin C contents of five table grape varieties from Algeria and their correlations. In: *OENO One*. 2014, nr. 48(2), pp. 153-162. ISSN 2494-1271.
138. **DALICUBA, M., NEL, A. P., VAN JAARVELD, F. P.** Ascorbic acid derivatives in the Sauvignon Blanc cultivar (*Vitis vinifera* L.) during berry development in the Wellington and Elgin Regions. In: *South African Journal of Enology and Viticulture*. 2021, nr. 42(2), pp. 184-192. ISSN 2224-7904, ISSN 0253-939X.
139. **SOMKUWAR, R. G., BHANGE, M. A., OULKAR, D. P., SHARMA, A. K., AHAMMED SHABEER, T. P.** Estimation of polyphenols by using HPLC–DAD in red and white wine grape varieties grown under tropical conditions of India. In: *Journal of Food Science and Technology*. 2018, nr. 55(12), pp. 4994-5002. ISSN 0975-8402, ISSN 0022-1155.
140. **FARHADI, K., ESMAEILZADEH, F., HATAMI, M., FOROUGH, M., MOLAIE, R.** Determination of phenolic compounds content and antioxidant activity in skin, pulp, seed,

- cane and leaf of five native grape cultivars in West Azerbaijan province, Iran. In: *Food Chemistry*. 2016, nr. 199, pp. 847-855. ISSN 0308-8146, ISSN 1873-7072.
141. LENGYEL, E., OPREAN, L., STEGĂRUS, D., IANCU, R., SANDRU, D. et al. Chromatographic detection of rutin in the aromatic and semi aromatic romanian autochthonous musts variety. In: *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology*. 2014, nr. 18(1), pp. 47-52. ISSN 2344-150X.
142. GARCÍA-MARTÍNEZ, D. J., ARROYO-HERNÁNDEZ, M., POSADA-AYALA, M., SANTOS, C. The high content of quercetin and catechin in airen grape juice supports its application in functional food production. In: *Foods*. 2021, nr. 10(7), 1532. ISSN 2304-8158.
143. DA SILVA PADILHA, C. V., MISKINIS, G. A., de SOUZA, M. E. A. O., PEREIRA, G. E., de OLIVEIRA, D. et al. Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. In: *Food Chemistry*. 2017, nr. 228, pp. 106-115. ISSN 0308-8146.
144. MUÑOZ-BERNAL, Ó. A., de la ROSA, L. A., RODRIGO-GARCÍA, J., MARTÍNEZ-RUIZ, N. R., SÁYAGO-AYERDI, S. et al. Phytochemical characterization and antiplatelet activity of Mexican red wines and their by-products. In: *South African Journal of Enology and Viticulture*. 2021, nr. 42(1), pp. 77-90. ISSN 2224-7904.
145. BREKSA III, A. P., TAKEOKA, G. R., HIDALGO, M. B., VILCHES, A., VASSE, J., RAMMING, D. W. Antioxidant activity and phenolic content of 16 raisin grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars and selections. In: *Food Chemistry*. 2010, nr. 121(3), pp. 740-745. ISSN 0308-8146, ISSN 1873-7072.
146. DUCA, G. *Homogeneous catalysis with metal complexes: fundamentals and applications, Vol. 102*. Springer Science & Business Media, 2012. 487 p. ISBN 978-3-642-24628-9.
147. RÚA, J., DE ARRIAGA, D., GARCÍA-ARMESTO, M. R., BUSTO, F., DEL VALLE, P. Binary combinations of natural phenolic compounds with gallic acid or with its alkyl esters: An approach to understand the antioxidant interactions. In: *European Food Research and Technology*. 2017, nr. 243, pp. 1211-1217. ISSN 1438-2385, ISSN 1438-2377.
148. COLUNGA BIANCATELLI, R. M. L., BERRILL, M., CATRAVAS, J. D., MARIK, P. E. Quercetin and vitamin C: an experimental, synergistic therapy for the prevention and treatment of SARS-CoV-2 related disease (COVID-19). In: *Frontiers in Immunology*. 2020, nr. 11, pp. 1-11. ISSN 1664-3224.
149. VICOL, C., DUCA, G. Antioxidant Interactions Between Natural Compounds: Synergistic, Additive, Antagonistic Effects and the Prooxidant Character of Antioxidants. In: *Fundamental*

- and Biomedical Aspects of Redox Processes*. IGI Global, 2023, pp. 224-249. ISBN13 9781668471982, ISBN10 1668471981, ISBN13 9781668472002.
150. PINELO, M., MANZOCCO, L., NUÑEZ, M. J., NICOLI, M. C. Interaction among phenols in food fortification: negative synergism on antioxidant capacity. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, nr. 52(5), pp. 1177-1180. ISSN 0021-8561, ISSN 1520-5118.
151. MAHMOUD, M. A. A., CHEDEA, V. S., DETSI, A., KEFALAS, P. Ascorbic acid modifies the free radical scavenging behaviour of catechin: An insight into the mechanism. In: *Food Research International*. 2013, nr. 51(2), pp. 907-913. ISSN 1873-7145.
152. ABOU SAMRA, M., CHEDEA, V. S., ECONOMOU, A., CALOKERINOS, A., KEFALAS, P. Antioxidant/prooxidant properties of model phenolic compounds: Part I. Studies on equimolar mixtures by chemiluminescence and cyclic voltammetry. In: *Food chemistry*. 2011, nr. 125(2), pp. 622-629. ISSN 0308-8146, ISSN 1873-7072.
153. PROCHÁZKOVÁ, D., BOUŠOVÁ, I., WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. In: *Fitoterapia*. 2011, nr. 82(4), pp. 513-523. ISSN 1873-6971, ISSN 0367-326X.
154. VICOL, C., DUCA, G. Synergistic, Additive and Antagonistic Interactions of Some Phenolic Compounds and Organic Acids Found in Grapes. In: *Acta Chimica Slovenica*. 2023, nr. 70(4), pp. 588–600. ISSN 1318-0207, ISSN 1580-3155.
155. VICOL, C. Study of synergic and anti-synergic interactions of some grape antioxidants with organic acids. In: *Proceeding of The 7th International Conference Ecological & Environmental Chemistry-2022, 3-4 March 2022, Chisinau, Republic of Moldova*. p. 56. Disponibil: https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/152021
156. VICOL, C., DUCA, G. Influența acizilor organici asupra reacțiilor de anihilare a radicalilor liberi de către unii antioxidanți din struguri și vin. In: *Expoziția Internațională Specializată „INFOINVENT”, Ediția a XVII-a, 17-20 Noiembrie 2021, Chișinău, Republica Moldova*.
157. GONTA, M., DUCA, G., PORUBIN, D. Establishment of the antioxidant/antiradical activity of the inhibitors using the DPPH–radical. In: *Chemistry Journal of Moldova*. 2008, nr. 3(1), pp. 118. ISSN 1857-1727, ISSN 2345-1688.
158. GÜLÇİN, İ. Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. In: *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2010, nr. 11(1), pp. 210-218. ISSN 1878-5522, ISSN 1466-8564.
159. COTEA, V. D., ZĂNOAGĂ, C. V., COTEA, V. V. *Tratat de Oenochimie, Vol. II*, București: Editura Academiei Române, 2009. 750 p. ISBN 978-973-27-1851-3.

- 160.FONTOIN, H., SAUCIER, C., TEISSEDE, P. L., GLORIES, Y. Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. In: *Food Quality and Preference*. 2008, nr. 19(3), pp. 286-291. ISSN 0950-3293, ISSN 1873-6343.
- 161.ZHANG, L., VIRGOUS, C., SI, H. Synergistic anti-inflammatory effects and mechanisms of combined phytochemicals. In: *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2019, nr. 69, pp. 19-30. ISSN 1873-4847, ISSN 0955-2863.
- 162.SALAS-PÉREZ, L., GAUCÍN DELGADO, J. M., PRECIADO-RANGEL, P., GONZALES FUENTES, J. A., AYALA GARAY, A. V., SEGURA CASTRUITA, M. Á. The application of citric acid increases the quality and antioxidant capacity of lentil sprouts. In: *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2018, nr. 9(20), pp. 4301-4309. ISSN 2007-0934.
- 163.SANG, S., CHENG, X., STARK, R. E., ROSEN, R. T., YANG, C. S., HO, C. T. Chemical studies on antioxidant mechanism of tea catechins: analysis of radical reaction products of catechin and epicatechin with 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2002, nr. 10(7), pp. 2233-2237. ISSN 1464-3391, ISSN 0968-0896.
- 164.TSIMOGIANNIS, D. I., OREOPOULOU, V. The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. In: *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2006, nr. 7(1-2), pp. 140-146. ISSN 1878-5522, ISSN 1466-8564.
- 165.OSMAN, A. M. Multiple pathways of the reaction of 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) with (+)-catechin: Evidence for the formation of a covalent adduct between DPPH and the oxidized form of the polyphenol. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011, nr. 412(3), pp. 473-478. ISSN 1090-2104, ISSN 0006-291X.
- 166.AHMADI, S. M., FARHOOSH, R., SHARIF, A., REZAIE, M. Structure-antioxidant activity relationships of luteolin and catechin. In: *Journal of Food Science*. 2020, nr. 85(2), pp. 298-305. ISSN 1750-3841, ISSN 0022-1147.
- 167.FRIEDMAN, M., JÜRGENS, H. S. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, nr. 48(6), pp. 2101-2110. ISSN 0021-8561, ISSN 1520-5118.
- 168.LI, N., TAYLOR, L. S., FERRUZZI, M. G., MAUER, L. J. Kinetic study of catechin stability: Effects of pH, concentration, and temperature. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, nr. 60(51), pp. 12531-12539. ISSN 0021-8561, ISSN 1520-5118.
- 169.NANJO, F., GOTO, K., SETO, R., SUZUKI, M., SAKAI, M., HARA, Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. In: *Free*

- Radical Biology and Medicine*. 1996, nr. 21(6), pp. 895-902. ISSN 1873-4596, ISSN 0891-5849.
170. MUKAI, K., MITANI, S., OHARA, K., NAGAOKA, S. I. Structure–activity relationship of the tocopherol-regeneration reaction by catechins. In: *Free Radical Biology and Medicine*. 2005, nr. 38(9), pp. 1243-1256. ISSN 1873-4596, ISSN 0891-5849.
171. AMORATI, R., VALGIMIGLI, L. Modulation of the antioxidant activity of phenols by non-covalent interactions. In: *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2012, nr. 10(21), pp. 4147-4158. ISSN 1477-0520.
172. MARTINEZ, S., VALEK, L., PETROVIĆ, Ž., METIKOŠ-HUKOVIĆ, M., PILJAC, J. Catechin antioxidant action at various pH studied by cyclic voltammetry and PM3 semi-empirical calculations. In: *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2005, nr. 584(2), pp. 92-99. ISSN 1873-2569, ISSN 1572-6657.
173. GARCIA, D. E., GLASSER, W. G., PIZZI, A., PACZKOWSKI, S. P., LABORIE, M. P. Modification of condensed tannins: from polyphenol chemistry to materials engineering. In: *New Journal of Chemistry*. 2016, nr. 40(1), pp. 36-49. ISSN 1369-9261.
174. ARBENZ, A., AVEROUS, L. Chemical modification of tannins to elaborate aromatic biobased macromolecular architectures. In: *Green Chemistry*. 2015, nr. 17(5), pp. 2626-2646. ISSN 1463-9270.
175. LATOS-BROZIO, M., MASEK, A. Structure-activity relationships analysis of monomeric and polymeric polyphenols (Quercetin, Rutin and Catechin) obtained by various polymerization methods. In: *Chemistry & Biodiversity*. 2019, nr. 16(12), pp. 1-14. ISSN 1612-1880, ISSN 1612-1872.
176. OLIVER, S., HOOK, J. M., BOYER, C. Versatile oligomers and polymers from flavonoids—a new approach to synthesis. In: *Polymer Chemistry*. 2017, nr. 8(15), pp. 2317-2326. ISSN 1759-9962.
177. SONNI, F., MOORE, E. G., CLARK, A. C., CHINNICI, F., RIPONI, C., SCOLLARY, G. R. Impact of glutathione on the formation of methylnethine- and carboxymethine-bridged (+)-catechin dimers in a model wine system. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, nr. 59(13), pp. 7410-7418. ISSN 0021-8561, ISSN 1520-5118.
178. BADHANI, B., SHARMA, N., KAKKAR, R. Gallic acid: A versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. In: *Rsc Advances*. 2015, nr. 5(35), pp. 27540-27557. ISSN 2046-2069.
179. MARINO, T., GALANO, A., RUSSO, N. Radical scavenging ability of gallic acid toward OH and OOH radicals. Reaction mechanism and rate constants from the density functional

- theory. In: *The Journal of Physical Chemistry B*. 2014, nr. 118(35), pp. 10380-10389. ISSN 1520-6106, ISSN 1520-5207.
- 180.ROHMAN, R., KAR, R. How does the presence of an oxyradical influence the behavior of polyphenolic antioxidant? A case study on gallic acid. In: *Journal of Molecular Modeling*. 2018, nr. 24, pp. 1-10. ISSN 0948-5023, ISSN 1610-2940.
- 181.FENTON, H. J. H. Further studies on dihydroxymaleic acid. In: *Journal of the Chemical Society, Transactions*. 1905, nr. 87, pp. 804-818. ISSN 0368-1645.
- 182.SAGI, V. N., PUNNA, V., HU, F., MEHER, G., KRISHNAMURTHY, R. Exploratory experiments on the chemistry of the “glyoxylate scenario”: formation of ketosugars from dihydroxyfumarate. In: *Journal of the American Chemical Society*. 2012, nr. 134(7), pp. 3577-3589. ISSN 0002-7863, ISSN 1520-5126.
- 183.WARD, G., LIOTTA, C. L., KRISHNAMURTHY, R., FRANCE, S. Base-mediated cascade aldol addition and fragmentation reactions of dihydroxyfumaric acid and aromatic aldehydes: Controlling chemodivergence via choice of base, solvent, and substituents. In: *The Journal of Organic Chemistry*. 2018, nr. 83(23), pp. 14219-14233. ISSN 0022-3263, ISSN 1520-6904.
- 184.ESCHENMOSER, A. On a hypothetical generational relationship between HCN and constituents of the reductive citric acid cycle. In: *Chemistry & Biodiversity*. 2007, nr. 4(4), pp. 554-573. ISSN 1612-1880, ISSN 1612-1872.
- 185.RICHTER, C., BERNDT, F., KUNDE, T., MAHRWALD, R. Decarboxylative Cascade Reactions of Dihydroxyfumaric Acid: A Preparative Approach to the Glyoxylate Scenario. In: *Organic Letters*. 2016, nr. 18(12), pp. 2950-2953. ISSN 1523-7060, ISSN 1523-7052.
- 186.SECARA, N., DUCA, G., VLAD, L., MACAEV, F. Occurrence and chemistry of dihydroxyfumaric acid. In: *Chemistry Journal of Moldova*. 2011, nr. 6(1), pp. 29-44. ISSN 1857-1727, ISSN 2345-1688.
- 187.CLARK, A. C. The production of yellow pigments from (+)-catechin and dihydroxyfumaric acid in a model wine system. In: *European Food Research and Technology*. 2008, nr. 226, pp. 925-931. ISSN 1438-2385, ISSN 1438-2377.
- 188.GARCIA, B., RUIZ, R., LEAL, J. M. Kinetic study of the hexacyanoferrate (III) oxidation of dihydroxyfumaric acid in acid media. In: *The Journal of Physical Chemistry A*. 2008, nr. 112(22), pp. 4921-4928. ISSN 1089-5639, ISSN 1520-5215.
- 189.VACARCIUC, L. Potentialul biotehnologic la producerea vinurilor ecologice roze in Moldova. In: *Agricultura*. 2006, nr. 57(1-2), pp. 1-8. ISSN 1221-5317.
- 190.VICOL, C., CIMPOIU, C., DUCA, G. Investigation of interactions of dihydroxyfumaric acid with DPPH in different solvents. In: *Proceedings of the XII International Conference on*

Chemistry for Young Scientists „Mendeleev 2021”, 6 – 10 September 2021, Saint Petersburg, Russia. p. 104. ISBN 978-5-9651-1364-4.

191. HAY, R. W., HARVIE, S. J. The uncatalysed and nickel (II) catalysed decarboxylation of dihydroxyfumaric acid. In: *Australian Journal of Chemistry*. 1965, nr. 18(8), pp. 1197-1209. ISSN 0004-9425, ISSN 1445-0038.
192. ADISAKWATTANA, S., THILAVECH, T., SOMPONG, W., PASUKAMONSET, P. Interaction between ascorbic acid and gallic acid in a model of fructose-mediated protein glycation and oxidation. In: *Electronic Journal of Biotechnology*. 2017, nr. 27, pp. 32-36. ISSN 0717-3458.
193. OLSZOWY, M., DAWIDOWICZ, A. L., JÓŹWIK-DOŁĘBA, M. Are mutual interactions between antioxidants the only factors responsible for antagonistic antioxidant effect of their mixtures? Additive and antagonistic antioxidant effects in mixtures of gallic, ferulic and caffeic acids. In: *European Food Research and Technology*. 2019, nr. 245, pp. 1473-1485. ISSN 1438-2385, ISSN 1438-2377.
194. SPIZZIRRI, U. G., IEMMA, F., PUOCI, F., CIRILLO, G., CURCIO, M., PARISI, O. I., PICCI, N. Synthesis of antioxidant polymers by grafting of gallic acid and catechin on gelatin. In: *Biomacromolecules*. 2009, nr. 10(7), pp. 1923-1930. ISSN 1525-7797, ISSN 1526-4602.
195. KADE, I. J., JOHNSON, D. O., AKPAMBANG, V. O. E., ROCHA, J. B. T. Polymerization of gallic acid enhances its antioxidant capacity: Implications for plant defence mechanisms. In: *Biokemistri*. 2012, nr. 24(1), pp. 15-22. ISSN 0795-8080.
196. FABRE, G., BAYACH, I., BERKA, K., PALONCÝOVÁ, M., STAROK, M., ROSSI, C., TROUILLAS, P. Synergism of antioxidant action of vitamins E, C and quercetin is related to formation of molecular associations in biomembranes. In: *Chemical Communications*. 2015, nr. 51(36), pp. 7713-7716. ISSN 1364-548X.
197. LIU, D., LI, Y., QIAN, Y., XIAO, Y., DU, S., QIU, X. Synergistic antioxidant performance of lignin and quercetin mixtures. In: *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2017, nr. 5(9), pp. 8424-8428. ISSN 2168-0485.
198. TSIMOGIANNIS, D., BIMPILAS, A., OREOPOULOU, V. DPPH radical scavenging and mixture effects of plant o-diphenols and essential oil constituents. In: *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2017, nr. 119(9), pp. 16003473. ISSN 1438-7697.
199. GORINCIOI, E., VICOL, C., BARBA, A., DUCA, G. Preliminary results on ¹³C NMR studies regarding the radical scavenging activities of ascorbic acid and dihydroxyfumaric acid using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. In: *Proceeding of The 7th International Conference*

- Ecological & Environmental Chemistry-2022, 3-4 March 2022, Chisinau, Republic of Moldova.* p. 64. Disponibil: https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/151365
200. MEI, Y. Z., LIU, R. X., WANG, D. P., WANG, X., DAI, C. C. Biocatalysis and biotransformation of resveratrol in microorganisms. In: *Biotechnology Letters*. 2015, nr. 37, pp. 9-18. ISSN 1573-6776, ISSN 0141-5492.
201. MAO, Q. *The synthesis and antioxidant capacities of a range of resveratrol and related phenolic glucosides*: Doctoral dissertation. The University of Adelaide, 2015, 184 p.
202. VICOL C., GORINCIOI E., DUCA G. ¹³C NMR Investigations Of Radical Scavenging Activities Of Ascorbic Acid And Resveratrol Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. In: *Proceeding of the 23rd International Conference "New Cryogenic and Isotope Technologies For Energy and Environment,, - EnergEn 2021, 26-29 October 2021, Băile Govora, Romania.* pp. 312-316. ISSN 2810-3203, ISSN-L 2810-3203.
203. HIDALGO, M., SÁNCHEZ-MORENO, C., DE PASCUAL-TERESA, S. Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. In: *Food Chemistry*. 2010, nr. 121(3), pp. 691-696. ISSN 0308-8146, ISSN 1873-7072.
204. VICOL, C., DUCA, G. Contribution of tartaric acid to the free radical scavenging activity of ascorbic acid. In: *Proceedings from the Green Chemistry Postgraduate Summer School Online, 6 – 10 July 2020, Venice, Italy.* p. 148. Disponibil: <https://www.greenchemistry.school/>
205. VICOL, C., DUCA, G. The influence of tartaric acid on DPPH radical scavenging activity of vitamin C. In: *Proceeding of the XII International Conference "Electronic Processes in Organic and Inorganic Materials" (ICEPOM-12), 1 – 5 June 2020, Kamianets-Podilskyi, Ukraine.* p. 8.
206. VICOL, C., DUCA, G. Influența acidului tartric asupra procesului de anihilare a radicalilor liberi de către acidul ascorbic. In: *Revista de Știință, Inovare, Cultură și Artă „Akademos”*. 2020, nr. 1(56), pp. 39-43. ISSN 1857-0461.
207. BOULEBD, H. Comparative study of the radical scavenging behavior of ascorbic acid, BHT, BHA and Trolox: Experimental and theoretical study. In: *Journal of Molecular Structure*. 2020, nr. 1201, pp. 127210. ISSN 1872-8014, ISSN 0022-2860.
208. VICOL, C., DUCA, G. Study of DPPH radical interaction with some organic acids. In: *Proceedings of the International Conference „Achievements and Perspectives of Modern Chemistry” dedicated to the 60th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry, 9 – 11 October 2019, Chisinau, Republic of Moldova.* p. 170. ISBN 978-9975-62-428-2.

209. **VICOL, C.**, CIMPOIU, C., DUCA, G. Investigation of synergic/anti-synergic interactions of dihydroxifumaric acid and ascorbic acid with DPPH. In: *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Chemia*. 2021, nr. 66(2), pp. 49-58. ISSN 1224-7154.
210. **BARRIL, C.**, RUTLEDGE, D. N., SCOLLARY, G. R., CLARK, A. C. Ascorbic acid and white wine production: a review of beneficial versus detrimental impacts. In: *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2016, nr. 22(2), pp. 169-181. ISSN 1755-0238, ISSN 1322-7130.
211. **VICOL, C.**, IACOBESCU, A., FIFERE, A., DUCA, G. Study of the synergic interactions of ascorbic and dihydroxyfumaric acids by EPR spectroscopy. In: *Proceedings of the 14th Green Chemistry Postgraduate Summer School (online/in-person) 3-8 July 2022, Venice, Italy*. p. 90. ISBN 978-88-945537-2-7.
212. **SANNA, D.**, DELOGU, G., MULAS, M., SCHIRRA, M., FADDA, A. Determination of free radical scavenging activity of plant extracts through DPPH assay: An EPR and UV–Vis study. In: *Food Analytical Methods*. 2012, nr. 5, pp. 759-766. ISSN 1936-976X, ISSN 1936-9751.
213. **MARANO, S.**, MINNELLI, C., RIPANI, L., MARCACCIO, M., LAUDADIO, E., MOBBILI, G., STIPA, P. Insights into the antioxidant mechanism of newly synthesized benzoxazinic nitrones: in vitro and in silico studies with DPPH model radical. In: *Antioxidants*. 2021, nr. 10(8), pp 1-17. ISSN 2076-3921.
214. **VICOL, C.**, SÂRGHI, A., FIFERE, A., DUCA G. Antioxidant co-actions of ascorbic and dihydroxyfumaric acids investigated by EPR spectroscopy. In: *Chemistry Journal of Moldova*. (Acceptat pentru publicare: <http://cjm.ichem.md/antioxidant-co-actions-of-ascorbic-and-dihydroxyfumaric-acids-investigated-by-epr-spectroscopy>).
215. **MELETIADIS, J.**, **POU•NARAS, S.**, ROILIDES, E., WALSH, T. J. Defining fractional inhibitory concentration index cutoffs for additive interactions based on self-drug additive combinations, Monte Carlo simulation analysis, and in vitro-in vivo correlation data for antifungal drug combinations against *Aspergillus fumigatus*. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010, nr. 54(2), pp. 602-609. ISSN 0066-4804, ISSN 1098-6596.
216. **VICOL, C.**, GORINCIOI, E., BARBA, A., DUCA, G. Use of UV-Vis and NMR spectroscopies in studies of antioxidants' synergism involving ascorbic and dihydroxyfumaric acids. In: *Book of Abstracts of National Chemical Conference, Edition XXXVI, 4 – 7 October 2022, Călimănești - Căciulata, Romania*. p. 107. Disponibil: <https://chimcomplex.com/cnchim-2022/>

- 217.КАНАРОВСКИЙ, Е., ЯЛТЫЧЕНКО, О. Учёт синергии витаминов Е и С в кинетической модели перекисного окисления липидов. In: *Электронная обработка материалов*. 2022, nr. 59(5), pp. 44-50. ISSN 0013-5739.
- 218.SAZOU, D., KARABINAS, P., JANNAKOUDAKIS, D. Cyclic voltammetric study of the homogeneous decarboxylation kinetics of dihydroxyfumaryl acid in acid solutions. In: *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. 1984, nr. 176(1-2), pp. 225-234. ISSN 0302-4598.
- 219.LOCKE, A. The decomposition of dihydroxymaleic acid. In: *Journal of the American Chemical Society*. 1924, nr. 1891(46), pp. 1246–1252, 1246-1252. ISSN 0002-7863, ISSN 1520-5126.
- 220.WANG, J., ZHANG, X., GAO, L., WANG, L., SONG, F., ZHANG, L., WAN, Y. The synergistic antifungal activity of resveratrol with azoles against *Candida albicans*. In: *Letters in Applied Microbiology*. 2021, nr. 72(6), pp. 688-697. ISSN 1472-765X, ISSN 0266-8254.
- 221.PLATELLA, C., GUIDA, S., BONMASSAR, L., AQUINO, A., BONMASSAR, E., RAVAGNAN, G., FUGGETTA, M. P. Antitumour activity of resveratrol on human melanoma cells: A possible mechanism related to its interaction with malignant cell telomerase. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2017, nr. 1861(11), pp. 2843-2851. ISSN 0304-4165, ISSN 1872-8006.
- 222.GAO, H., WANG, H., HAN, T., HUANG, X., LI, S., WANG, X. Combined Antioxidant Formulation of Ascorbic Acid with Resveratrol Ameliorates Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Rats. In: *Sains Malaysiana*. 2022, nr. 51 (7), pp. 2137–2146. ISSN 0126-6039.
- 223.SKROZA, D., ŠIMAT, V., SMOLE MOŽINA, S., KATALINIĆ, V., BOBAN, N., GENERALIĆ MEKINIĆ, I. Interactions of resveratrol with other phenolics and activity against food-borne pathogens. In: *Food Science & Nutrition*. 2019, nr. 7(7), pp. 2312-2318. ISSN 2048-7177, ISSN 2048-7177.
- 224.LEOPOLDINI, M., RUSSO, N., TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. In: *Food Chemistry*. 2011, nr. 125(2), pp. 288-306. ISSN 0308-8146, ISSN 1873-7072.
- 225.HUSSEIN, M. A. A convenient mechanism for the free radical scavenging activity of resveratrol. In: *International Journal of Phytomedicine*. 2011, nr. 3(4), pp. 459-469. ISSN 0975-0185.

226. LANGCAKE, P., PRYCE, R. J. The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. In: *Phytochemistry*. 1977, nr. 16(8), pp. 1193-1196. ISSN 0031-9422, ISSN 1873-3700.
227. ZGHONDA, N., YOSHIDA, S., EZAKI, S., OTAKE, Y., MURAKAMI, C., MLIKI, A., MIYAZAKI, H. ϵ -Viniferin is more effective than its monomer resveratrol in improving the functions of vascular endothelial cells and the heart. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2012, nr. 76(5), pp. 954-960. ISSN 0916-8451, ISSN 1347-6947.
228. FICARRA, S., TELLONE, E., PIROLI, D., RUSSO, A., BARRECA, D., GALTIERI, A., DE ROSA, M. C. Insights into the properties of the two enantiomers of trans- δ -viniferin, a resveratrol derivative: Antioxidant activity, biochemical and molecular modeling studies of its interactions with hemoglobin. In: *Molecular Biosystems*. 2016, nr. 12(4), pp. 1276-1286. ISSN 1742-2051.
229. OLAS, B., WACHOWICZ, B. Resveratrol and vitamin C as antioxidants in blood platelets. In: *Thrombosis Research*. 2002, nr. 106(2), pp. 143-148. ISSN 0049-3848, ISSN 1879-2472.
230. KERZIG, C., HOFFMANN, M., GOEZ, M. Resveratrol radical repair by vitamin C at the micelle-water interface: Unexpected reaction rates explained by ion-dipole interactions. In: *Chemistry-A European Journal*. 2018, nr. 24(12), pp. 3038-3044. ISSN 1521-3765, ISSN 0947-6539.
231. GORINCIOI, E., BARBA, A., **VICOL, C.** Datele spectrale RMN - mărturii notabile în studiile interacțiunilor antioxidante: Studii de caz privind unii metaboliți din struguri. In: *Procese redox cu transfer de electroni și protoni*. Chișinău: Editura USM, 2023, pp. 184-198. ISBN 978-9975-62-658-3.
232. GORINCIOI, E., **VICOL, C.**, BARBA, A., DUCA, G. NMR spectral data as a robust evidence in studies of the antioxidant's interplay: report on some grape metabolites. In: *Book of Abstracts of The Central European NMR Symposium & Bruker Users Meeting Solid-State NMR Workshop (CEUM 2023), 13 – 15 September 2023, Prague, Czech Republic*. p. 35. Disponibil: <http://ceum2023.uochb.cas.cz/programme.php>
233. PEZET, R., PERRET, C., JEAN-DENIS, J. B., TABACCHI, R., GINDRO, K., VIRET, O. δ -Viniferin, a resveratrol dehydrodimer: one of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, nr. 51(18), pp. 5488-5492. ISSN 0021-8561, ISSN 1520-5118.
234. LUPAȘCU, T., DUCA, G., GONCIAR, V. *Enoxil – preparat ecologic pentru sănătatea omului*. Chișinău: Tipografia AȘM, 2012. 256 p. ISBN 978-9975-62-304-9.

235. **VICOL, C.**, DUCA, G. Antioxidant activity of ENOXIL determined via interaction with various free radicals. In: *Book of Abstracts of The National Conference with International Participation „Natural Sciences In The Dialogue Of Generations”*, 14 – 15 September 2023, Chisinau, Republic of Moldova. p. 223. Disponibil: https://ibn.idsi.md/ro/collection_view/2377
236. **VICOL, C.**, DUCA, G. Interacțiuni antioxidante dintre unii compuși naturali din struguri. In: *Procese redox cu transfer de electroni și protoni*. Chișinău: Editura USM, 2023, pp. 159-183. ISBN 978-9975-62-658-3.
237. **ABRAMOVIČ, H.**, GROBIN, B., ULRIH, N. P., CIGIĆ, B. The methodology applied in DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu assays has a large influence on the determined antioxidant potential. In: *Acta Chimica Slovenica*. 2017, nr. 64(2), pp. 491-499. ISSN 1318-0207, ISSN 1580-3155.
238. **HANSELMANN, R. G.**, WELTER, C. Origin of Cancer: Cell work is the Key to Understanding Cancer Initiation and Progression. In: *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022, nr. 10, pp. 1-14. ISSN 2296-634X.
239. **HANSELMANN, R. G.**, WELTER, C. Origin of cancer: an information, energy, and matter disease. In: *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2016, nr. 4, pp. 1-12. ISSN 2296-634X.
240. **BOOVARAHAN, S. R.**, KURIAN, G. A. Mitochondrial dysfunction: A key player in the pathogenesis of cardiovascular diseases linked to air pollution. In: *Reviews on Environmental Health*. 2018, nr. 33(2), pp. 111-122. ISSN 2191-0308.
241. **BRATIC, I.**, TRIFUNOVIC, A. Mitochondrial energy metabolism and ageing. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2010, nr. 1797(6-7), pp. 961-967. ISSN 1879-2650, ISSN 0005-2728.
242. **KIM, J. T.**, LEE, H. K. Metabolic syndrome and the environmental pollutants from mitochondrial perspectives. In: *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2014, nr. 15, pp. 253-262. ISSN 1573-2606, ISSN 1389-9155.
243. **MEYER, J. N.**, LEUNG, M. C., ROONEY, J. P., SENDOEL, A., HENGARTNER, M. O., KISBY, G. E., BESS, A. S. Mitochondria as a target of environmental toxicants. In: *Toxicological Sciences*. 2013, nr. 134(1), pp. 1-17. ISSN 1096-0929, ISSN 1096-6080.
244. **NUNNARI, J.**, SUOMALAINEN, A. Mitochondria: in sickness and in health. In: *Cell*. 2012, nr. 148(6), pp. 1145-1159. ISSN 1097-4172.
245. **APANASENKO, G. L.** The individual health doctrine: some findings. In: *Archives of Physiotherapy & Global Researches*. 2014, nr. 18(3), pp. 7-9. ISSN 2353-4389.

- 246.ROUBICEK, D. A., DE SOUZA-PINTO, N. C. Mitochondria and mitochondrial DNA as relevant targets for environmental contaminants. In: *Toxicology*. 2017, nr. 391, pp. 100-108. ISSN 1879-3185, ISSN 0300-483X.
- 247.LEE, H. K., PAK, Y. K. Persistent organic pollutants, mitochondrial dysfunction, and metabolic syndrome. In: *Mitochondrial Dysfunction Caused by Drugs and Environmental Toxicants*. John Wiley & Sons, Inc., 2018, pp. 691-707. ISBN 9781119329701, ISBN 9781119329725.
- 248.KUCHARSKÁ, J. Vitamins in mitochondrial function. In: *Mitochondrial Medicine: Mitochondrial Metabolism, Diseases, Diagnosis and Therapy*. Springer: Dordrecht, 2008, pp. 367-384. ISBN 978-1-4020-6713-6, ISBN 978-1-4020-6714-3.
- 249.DEPEINT, F., BRUCE, W. R., SHANGARI, N., MEHTA, R., O'BRIEN, P. J. Mitochondrial function and toxicity: role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism. In: *Chemico-Biological Interactions*. 2006, nr. 163(1-2), pp. 94-112. ISSN 1872-7786, ISSN 0009-2797.
- 250.DZIK, K. P., KACZOR, J. J. Mechanisms of vitamin D on skeletal muscle function: oxidative stress, energy metabolism and anabolic state. In: *European Journal of Applied Physiology*. 2019, nr. 119, pp. 825-839. ISSN 1439-6327, ISSN 1439-6319.
- 251.FARISS, M. W., CHAN, C. B., PATEL, M., VAN HOUTEN, B., ORRENIUS, S. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. In: *Molecular Interventions*. 2005, nr. 5(2), pp. 94-111. ISSN 1534-0384, ISSN 1543-2548.
- 252.NICOLSON, G. L. Mitochondrial dysfunction and chronic disease: treatment with natural supplements. In: *Integrative Medicine: A Clinician's Journal*. 2014, nr. 13(4), pp. 35-43. ISSN 1945-7081.
- 253.ZAHRA, K. F., LEFTER, R., ALI, A., ABDELLAH, E. C., TRUS, C., CIOBICA, A., TIMOFTE, D. The involvement of the oxidative stress status in cancer pathology: A double view on the role of the antioxidants. In: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021, pp. 1-25. ISSN 1942-0900, ISSN 1942-0994.
- 254.SOSA, V., MOLINÉ, T., SOMOZA, R., PACIUCCI, R., KONDOH, H., LLEONART, M. E. Oxidative stress and cancer: an overview. In: *Ageing Research Reviews*. 2013, nr. 12(1), pp. 376-390. ISSN 1568-1637, ISSN 1872-9649.
- 255.PÉREZ-TORRES, I., GUARNER-LANS, V., RUBIO-RUIZ, M. E. Reductive stress in inflammation-associated diseases and the pro-oxidant effect of antioxidant agents. In: *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, nr. 18(10), pp. 1-26. ISSN 1422-0067.

256. GONZÁLEZ, M. J., ROSARIO-PÉREZ, G., GUZMÁN, A. M., MIRANDA-MASSARI, J. R., DUCONGE, J., LAVERGNE, J., RICART, C. M. Mitochondria, energy and cancer: the relationship with ascorbic acid. In: *Journal of Orthomolecular Medicine: Official Journal of the Academy of Orthomolecular Medicine*. 2010, nr. 25(1), pp. 1-12. ISSN 0317-0209, ISSN 0834-4825.
257. WU, Q. J., XIANG, Y. B., YANG, G., LI, H. L., LAN, Q., GAO, Y. T., FOWKE, J. H. Vitamin E intake and the lung cancer risk among female nonsmokers: A report from the Shanghai Women's Health Study. In: *International Journal of Cancer*. 2015, nr. 136(3), pp. 610-617. ISSN 1097-0215, ISSN 0020-7136.
258. ROBASZKIEWICZ, A., BALCERCZYK, A., BARTOSZ, G. Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. In: *Cell Biology International*. 2007, nr. 31(10), pp. 1245-1250. ISSN 0309-1651.
259. POSADINO, A. M., COSSU, A., GIORDO, R., ZINELLU, A., SOTGIA, S., VARDEU, A., PINTUS, G. Resveratrol alters human endothelial cells redox state and causes mitochondrial-dependent cell death. In: *Food and Chemical Toxicology*. 2015, nr. 78, pp. 10-16. ISSN 0278-6915, ISSN 1873-6351.
260. GIORDO, R., COSSU, A., PASCIU, V., HOA, P. T., POSADINO, A. M., PINTUS, G. Different redox response elicited by naturally occurring antioxidants in human endothelial cells. In: *The Open Biochemistry Journal*. 2013, nr. 7, pp. 44-53. ISSN 1874-091X.
261. MIKEŠ, O., VRCHOTOVÁ, N., TRÍSKA, J., KYSELÁKOVÁ, M., ŠMIDRKAL, J. Distribution of major polyphenolic compounds in vine grapes of different cultivars growing in south Moravian vineyards. In: *Czech Journal of Food Sciences*. 2008, nr. 26(3), pp. 182-189. ISSN 1212-1800, ISSN 1805-9317.
262. VICOL, C., DUCA, G. Formarea ecovaleologică a tinerilor specialiști în cadrul cursului de chimie ecologică: abordarea subiectului interacțiunilor antioxidante. In: *Proceedings of the International Scientific Conference "Science And Education: New Approaches And Perspectives"*, 21 – 22 March 2024, Chisinau, Republic of Moldova. Disponibil: <https://upsc.md/cercetare/manifestari-stiintifice/congrese-simpozioane-conferinte-internationale-2024/>
263. CORCORAN, P. B., WALSH, A. E. The problematics of sustainability in higher education: an introduction. In *Higher Education and the Challenge of Sustainability: Problematics, Promise, and Practice*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2004, pp. 3-6. ISBN 978-0-306-48515-2.

- 264.CORTESE, A. D. Education for an environmentally sustainable future. In: *Environmental Science & Technology*. 1992, nr. 26(6), pp. 1108-1114. ISSN 0013-936X.
- 265.ALEIXO, A. M., AZEITEIRO, U., LEAL, S. The implementation of sustainability practices in Portuguese higher education institutions. In: *International Journal of Sustainability in Higher Education* 2018, nr. 19(1), pp. 146-178. ISSN 1467-6370.
- 266.BAUTISTA-PUIG, N., SANZ-CASADO, E. Sustainability practices in Spanish higher education institutions: An overview of status and implementation. In: *Journal of Cleaner Production*. 2021, nr. 295, pp. 1-12. ISSN 0959-6526, ISSN 1879-1786.
- 267.Survey “Students, sustainability and education, 2021”. Disponibil: <https://sos.earth/survey-2020/>
- 268.Biroul Național de Statistică al Republicii Moldova. Disponibil: <https://statistica.gov.md/ro/banca-de-date-statistice-78.html>
- 269.PÎNZARU, I., SÎRCU, R., ȚURCANU, G. Estimarea aplicării pesticidelor în Republica Moldova și a impactului lor asupra sănătății populației. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. 2017, nr. 53(1), pp. 132-136. ISSN 1857-0011.

ANEXE

ANEXA 1. Dreptele de calibrare utilizate pentru determinarea conținutului de compuși fenolici și a activității antioxidante

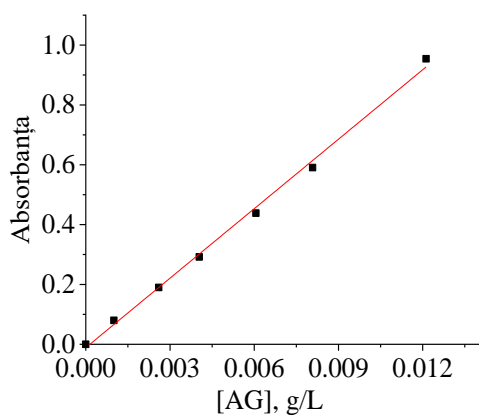


Figura A1.1. Dreapta de calibrare a reactivului Folin-Ciocalteu realizată cu acidul galic (AG). $R^2 = 0.9962$

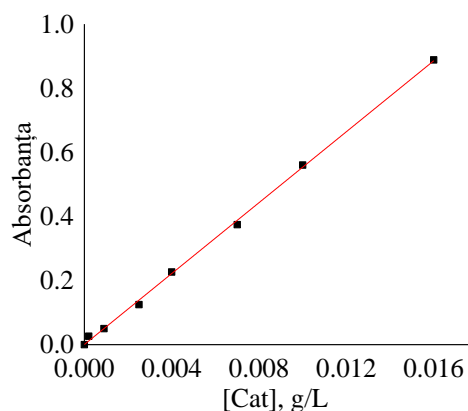


Figura A1.2. Dreapta de calibrare a reactivului DMACA realizată cu catehina (Cat). $R^2 = 0.9989$

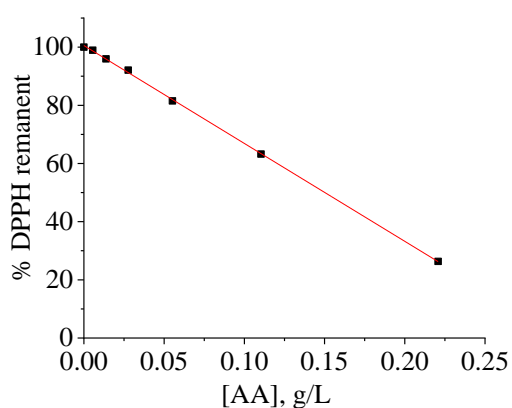


Figura A1.3. Dreapta de calibrare a reactivului DPPH realizată cu acidul ascorbic (AA). $R^2 = 0.9996$

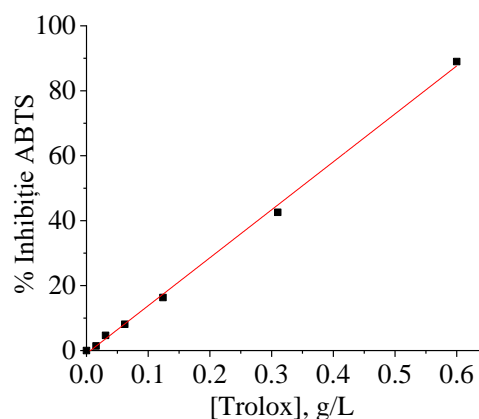


Figura A1.4. Dreapta de calibrare a reactivului ABTS⁺ realizată cu Trolox. $R^2 = 0.9981$

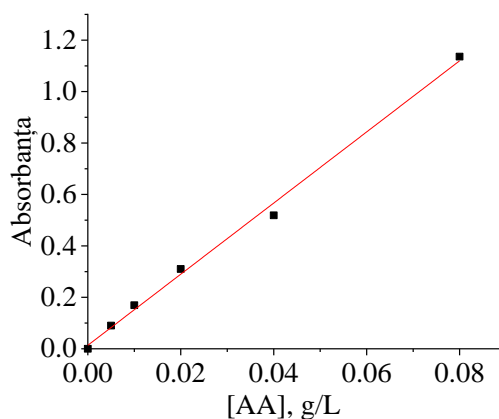


Figura A1.5. Dreapta de calibrare a metodei PRFe în reacție cu acidul ascorbic (AA). $R^2 = 0.9949$

ANEXA 2. Interacțiuni antioxidante dintre compușii fenolici și acizi organici din struguri

Tabelul A1.1. Interacțiuni antioxidante dintre acidul ascorbic sau compușii fenolici în combinație cu diferite concentrații de AT, AC și DHF

		IA									
Compusul antioxidant	mol AH/ mol DPPH'	Concentrații de AT			Concentrații de AC			mol AH/ mol DPPH'	Concentrații de DHF		
		16×10 ⁻⁴ N	160×10 ⁻⁴ N	800×10 ⁻⁴ N	16×10 ⁻⁴ N	160×10 ⁻⁴ N	800×10 ⁻⁴ N		2×10 ⁻⁴ N	4×10 ⁻⁴ N	8×10 ⁻⁴ N
AA	0.01	0.64	0.82	0.73	0.91	0.46	0.54	0.02	0.81	0.90	0.91
	0.02	0.79	0.93	0.85	0.95	0.63	0.66	0.04	0.89	0.95	0.95
	0.04	0.92	1.02	0.95	0.99	0.79	0.79	0.07	0.96	0.99	0.99
	0.10	1.02	1.08	1.03	1.02	0.95	0.92	0.10	0.99	1.02	1.03
	0.20	1.06	1.07	1.04	1.03	1.02	0.97	0.15	1.03	1.05	1.08
	0.30	1.08	1.05	1.03	1.04	1.04	1.00	0.20	1.05	1.08	1.12
	0.40	1.08	1.02	1.02	1.04	1.06	1.01	0.30	1.08	1.11	1.17
Cat	0.003	0.34	0.40	0.26	0.39	0.33	0.34	0.02	1.08	0.92	0.89
	0.007	0.51	0.56	0.45	0.55	0.47	0.48	0.04	1.07	0.97	0.91
	0.02	0.74	0.80	0.73	0.80	0.70	0.73	0.07	1.07	1.00	0.94
	0.05	0.85	0.92	0.88	0.92	0.83	0.88	0.11	1.08	1.01	0.95
	0.09	0.90	0.97	0.94	0.96	0.88	0.94	0.13	1.08	1.02	0.96
	0.13	0.92	0.99	0.96	0.98	0.91	0.96	0.20	1.08	1.03	0.96
	0.20	0.93	1.00	0.97	0.99	0.92	0.97		**	**	**
	0.27	0.93	1.01	0.98	1.00	0.92	0.96				
GA	0.005	0.75	0.69	0.64	0.79	0.73	0.68	0.02	0.43	0.59	0.64
	0.01	0.87	0.84	0.84	0.91	0.87	0.81	0.03	0.50	0.58	0.64
	0.03	0.96	0.97	1.00	1.00	0.98	0.96	0.06	0.59	0.63	0.69
	0.07	1.00	1.00	1.04	1.03	1.03	0.96	0.09	0.75	0.78	0.82
	0.10	1.02	1.01	1.04	1.01	1.01	1.02	0.12	0.80	0.87	0.90
	0.15	1.04	1.01	1.02	0.98	0.97	0.99	0.15	0.80	0.86	0.87
	0.20	1.05	1.01	1.01	0.90	0.91	0.92				

Continuare Tabel A1.1

Que	0.005	0.62	0.51	0.50	0.48	0.42	0.39	0.01	0.87	0.81	0.77
	0.01	0.76	0.61	0.64	0.62	0.59	0.56	0.02	0.88	0.82	0.78
	0.03	0.82	0.69	0.72	0.71	0.68	0.66	0.04	0.91	0.84	0.81
	0.06	0.87	0.76	0.78	0.79	0.75	0.74	0.07	0.93	0.87	0.85
	0.09	0.89	0.80	0.81	0.82	0.79	0.79	0.09	0.95	0.88	0.88
	0.12	0.91	0.83	0.84	0.86	0.83	0.82	0.13	0.97	0.92	0.92
	0.18	0.94	0.88	0.88	0.89	0.88	0.88	0.18	0.99	0.95	0.97
	0.25	0.97	0.92	0.93	0.94	0.94	0.93	0.20	0.99	0.97	0.99
Rut	0.005	0.34	0.44	0.45	0.32	0.40	0.28	0.01	1.04	0.96	0.86
	0.02	0.58	0.62	0.60	0.65	0.57	0.57	0.03	1.05	0.97	0.96
	0.03	0.73	0.74	0.70	0.66	0.70	0.70	0.05	1.05	0.99	1.04
	0.06	0.88	0.92	0.89	0.83	0.84	0.82	0.08	1.05	1.01	1.07
	0.09	1.22	1.26	1.19	1.16	1.14	1.10	0.11	1.05	1.03	1.08
	0.12	1.23	1.27	1.19	1.29	1.29	1.22	0.16	1.05	1.04	1.06
	0.23	0.90	0.88	0.82	0.95	0.89	0.86	0.21	1.05	1.06	1.03
	0.30	0.78	0.77	0.73	0.85	0.80	0.78	0.30	1.05	1.07	0.98
Res	0.05	0.98	0.91	0.63	0.68	0.77	0.57	0.03	0.82	0.77	0.90
	0.10	0.94	0.96	0.75	0.69	0.82	0.71	0.06	0.82	0.76	0.89
	0.20	0.91	1.00	0.84	0.69	0.86	0.82	0.11	0.82	0.76	0.86
	0.50	0.88	1.00	0.89	0.71	0.89	0.87	0.23	0.82	0.75	0.82
	1.00	0.87	0.97	0.90	0.73	0.88	0.85	0.34	0.83	0.76	0.79
	2.00	0.85	0.91	0.88	0.77	0.86	0.79	0.45	0.85	0.77	0.77
	4.00	0.83	0.85	0.86	0.81	0.84	0.74		**	**	**
		**	**	**	**	**	**				

Datele sunt prezentate ca media valorilor ($n \geq 3$). ** Diferența semnificativă ($p < 0.05$) este determinată prin ANOVA.

ANEXA 3. Act de implementare a activității științifice în practică

Act

de implementare a activității științifice în practică

mun. Chișinău

„14,, februarie 2024

Universitatea de Stat din Moldova
Facultatea de Chimie și Tehnologie chimică
Departamentul Chimie Industrială și Ecologică “Academician Gheorghe DUCA”

în persoana șefului de departament, dnei conf. univ., dr. Elena BUNDUCHI, pe de o parte, și dna Crina VICOL, candidat la titlul științific de doctor în științe chimice cu tema tezei “*Interacțiuni antioxidante dintre unii compuși fenolici și acizi organici din struguri – contribuție la formarea ecovaleologică a tinerilor specialiști*”, specialitatea 145.01 Chimie ecologică, pe de altă parte, au întocmit prezentul act și menționează că rezultatele cercetării au fost implementate la pregătirea profesională a studenților de la programele de studii de la ciclul Licență, *Tehnologia chimică industrială, Tehnologia produselor cosmetice și medicinale, Chimie, Chimie biofarmaceutică:*

- disciplina de studii “Chimie ecologică”, 1 unitate de conținut (2 ore curs), tema: “Chimia alimentară și asigurarea calității alimentelor. Antioxidanții”.

- disciplina de studii “Chimie ecologică”, subiecte pentru testele de evaluare curentă și finală.

În corespundere cu cele menționate mai sus, ambele părți au convenit că departamentul Chimie industrială și ecologică “Academician Gheorghe DUCA” a implementat și în continuare va implementa, în scopul formării profesionale a studenților de la programele de studii ale departamentului, rezultatele cercetărilor științifice obținute în cadrul temei de cercetare.

Șef departament Chimie industrială și ecologică “Academician Gheorghe DUCA”,
Conf. univ, dr. Elena BUNDUCHI



ANEXA 4. Chestionarul la subiectul prelegerii „Chimia alimentară și asigurarea calității alimentelor. Antioxidanții”

CHESTIONAR

Chestionarul dat va fi utilizat pentru evaluarea cunoștințelor generale ale studenților asupra antioxidantilor și importanței acestora pentru sănătatea umană.

1. Care considerați că este impactul consumului regulat de vitamine/antioxidanți?

<input type="checkbox"/> pozitiv	<input type="checkbox"/> negativ	<input type="checkbox"/> nu cunosc
----------------------------------	----------------------------------	------------------------------------

2. Antioxidanții sunt obținuți din produsele alimentare sau sunt produși în organismul uman?

<input type="checkbox"/> sunt obținuți din produsele alimentare	<input type="checkbox"/> sunt produși în organismul uman	<input type="checkbox"/> ambele variante sunt corecte
---	--	---

3. Care dintre acestea este o substanța antioxidantă?

<input type="checkbox"/> vitamina C	<input type="checkbox"/> <i>beta</i> -carotenu	<input type="checkbox"/> nici una
-------------------------------------	--	-----------------------------------

4. Cum mai este numită vitamina E?

<input type="checkbox"/> <i>alfa</i> -tocoferol	<input type="checkbox"/> <i>beta</i> -caroten	<input type="checkbox"/> acid folic
---	---	-------------------------------------

5. Care antioxidant se conține în cantități mari în lămâie?

<input type="checkbox"/> vitamina C	<input type="checkbox"/> vitamina E	<input type="checkbox"/> vitamina B
-------------------------------------	-------------------------------------	-------------------------------------

6. Care sunt alimentele consumate zilnic cu cel mai mare aport de antioxidanți?

<input type="checkbox"/> laptele și produsele lactate	<input type="checkbox"/> fructe și legume	<input type="checkbox"/> produsele de panificație
---	---	---

7. Care din următoarele băutori au cel mai mare conținut de antioxidanți?

<input type="checkbox"/> apa	<input type="checkbox"/> suc de fructe proaspăt stors	<input type="checkbox"/> ceaiul
------------------------------	---	---------------------------------

8. Care din următoarele produse alimentare nu conțin antioxidanți?

<input type="checkbox"/> produsele de panificație	<input type="checkbox"/> nucile și produsele de nuci	<input type="checkbox"/> ambele conțin
---	--	--

9. Care considerați că este cel mai bun mod de a consuma alimentele pentru a păstra cel mai mare conținut de antioxidanți?

<input type="checkbox"/> consumate crude	<input type="checkbox"/> tratate la temperatură	<input type="checkbox"/> tratate cu microunde
--	---	---

10. Într-o reacție redox ce schimbări suferă un antioxidant?

<input type="checkbox"/> se reduce	<input type="checkbox"/> se oxidează	<input type="checkbox"/> nu știu
------------------------------------	--------------------------------------	----------------------------------

11. Ce este un radical liber?

<input type="checkbox"/> un nutrient necesar organismelor vii	<input type="checkbox"/> o specie reactivă ce provoacă daune	<input type="checkbox"/> nu știu
---	--	----------------------------------

12. Care considerați că sunt cauzele formării radicalilor liberi în organism?

<input type="checkbox"/> radiatia solară	<input type="checkbox"/> fumul de țigară	<input type="checkbox"/> ambele
--	--	---------------------------------

13. Preferați sa consumați vitamine/antioxidanți din surse naturale (fructe, legume, condimente etc.) sau din comerț (aditivi alimentari, vitamine comercializate în farmacii)?

<input type="checkbox"/> surse naturale	<input type="checkbox"/> aditivi	<input type="checkbox"/> altele
---	----------------------------------	---------------------------------

14. Este mai eficient de a consuma antioxidanți sub formă de pastile și suplimente alimentare?

<input type="checkbox"/> da	<input type="checkbox"/> nu	<input type="checkbox"/> nu știu
-----------------------------	-----------------------------	----------------------------------

15. Care considerați că este impactul consumului de suplimente alimentare?

<input type="checkbox"/> pozitiv	<input type="checkbox"/> negativ	<input type="checkbox"/> nici unul
----------------------------------	----------------------------------	------------------------------------

16. Care considerați că este efectul consumului unei concentrații mari de un singur antioxidant/vitamină?

<input type="checkbox"/> menține sănătatea	<input type="checkbox"/> este periculos pentru sănătate	<input type="checkbox"/> nu știu
--	---	----------------------------------

17. Afirmatia: „Antioxidanții joaca un rol important în încetinirea procesului de îmbărnire” este adevarata sau falsa?

<input type="checkbox"/> adevărat	<input type="checkbox"/> fals	<input type="checkbox"/> nu știu
-----------------------------------	-------------------------------	----------------------------------

18. Considerați că este necesară studierea antioxidantilor și a influenței acestora asupra stării de sănătate a omului?

<input type="checkbox"/> da	<input type="checkbox"/> nu	<input type="checkbox"/> nu știu
-----------------------------	-----------------------------	----------------------------------

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnata, VICOL Crina, studentă-doctorandă a Școlii Doctorale Științe Biologice, Geonomice, Chimice și Tehnologice din cadrul Universitatea de Stat din Moldova, declar pe răspundere personală că teza de doctorat este elaborată doar de mine, pe baza efortului personal de cercetare și redactare. În cadrul lucrării precizez sursa tuturor ideilor, datelor și formulărilor care nu îmi aparțin, conform normelor de citare a surselor și a respectării legislației privind drepturile de autor. Declar că toate afirmațiile din lucrare referitoare la datele și informațiile analizate, la metodele prin care acestea au fost obținute și la sursele din care le-am obținut sunt adevărate.

Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

VICOL Crina

Semnătura



Data 20.08.2024

CV-UL AUTOAREI



Informații personale

Nume, Prenume	VICOL CRINA
Data nașterii:	11.08.1994
Sex:	Feminin
Naționalitate:	MDA
Adresă:	Str. Academiei 3, Chișinău
Telefon:	+37368341528
E-mail(uri):	crina.vicol@ichem.md crina.vicol@sti.usm.md

EDUCAȚIE

2018 - 2024 *Studii de Doctorat*

Universitatea de Stat din Moldova, Chișinău, Moldova

Titlul tezei: Interacțiuni antioxidante dintre unii compuși fenolici și acizi organici din struguri – contribuție la formarea ecovaleologică a tinerilor specialiști

16 – 27 mai 2022 *Stagiu practic*

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”, Iași, România

Lucru experimental asupra determinării interacțiunilor antioxidante dintre acizii ascorbic și dihidroxifumaric prin metoda Rezonanței Electronice de Spin

Mart. – Mai 2021 *Programul Erasmus+ de Mobilitate Academică*

Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, România

Lucru experimental asupra determinării interacțiunilor sinergice/anti-sinergice dintre acidul ascorbic și acidul dihidroxifumaric în diferite medii de reacție

2015 – 2017 *Studii de Masterat*

Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, Chișinău, Moldova

Titlul tezei: Sinteza compușilor tetra-norlabdanici biologic active cu fragmente fragmente oxo-diazolice

2012 – 2015 *Studii de Licență*

Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, Chișinău, Moldova

Titlul tezei: Sinteza aminelor drimanice și homodrimanice

EXPERIENȚĂ PROFESIONALĂ

Sept. 2023 - prezent - *Traducător*

Revista Științifică „Chemistry Journal of Moldova”

2018- prezent - *Cercetător științific*

Institutul de Chimie al USM, Chișinău, Republica Moldova

2015 - 2017 - *Cercetător științific stagiar*

Institutul de Chimie al USM, Chișinău, Republica Moldova

2015 - 2017 - *Asistentă de Laborator*

Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, Chișinău, Republica Moldova

DOMENIILE DE ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ

Chimia ecologică, chimia analitică, antioxidanții naturali, reacțiile redox antioxidant – radical liber, mecanismele de reacție, antioxidanți din struguri, metode spectrale de analiză, interacțiuni antioxidante, efecte sinergice dintre antioxidanți.

PARTICIPĂRI ÎN PROIECTE ȘTIINȚIFICE NAȚIONALE ȘI INTERNAȚIONALE

2024 - 2027 - Executor în proiectul național ”Cercetări avansate în chimia computațională și ecologică, identificarea procedeelelor tehnologice de tratare, formare a calității și cantității apelor (ECOAQUA)”, Codul: 010603.

2024 - 2025 - Executor în proiectul bilateral ”Cuști organice și metal-organice redox-active cu derivați ai azulei pentru inginerie cristalină (AZMETCA)”, Codul: PN-IV-P8-8.3-ROMD-2023-0045.

2020 - 2023 - Executor în proiectul instituțional ”Mecanisme fizico-chimice a proceselor redox cu transfer de electroni implicate în sistemele vitale, tehnologice și de mediu”, Codul: 20.80009.5007.27.

2018 - 2020 - Executor în proiectul instituțional ”Studierea mecanismelor reacțiilor chimice, structurii electronice și proprietăților fizicochimice ale unor compuși coordinați ai metalelor de tranziție și a nanoparticulelor A₂B₆”, Codul: 15.817.02.02F.

2015 - 2018 - Executor în proiectul instituțional ”Design-ul, sinteza dirijată și studiul activității antibacteriene și antitumorale a unor compuși terpenici chirali și a combinațiilor coordinative ale acestora cu metalele de tranziție”, Codul: 16.00353.50.04A.

2016 - 2018 Executor în proiectul bilateral „Sinteza dirijată și studiul unor complecși chirali conținând liganzi terpeno-heterociclici (CHIRCOMPTEPHET)”, Codul: 16.80013.16.02.06/Ro

PREMII

2021 Bursa de excelență a Guvernului
2021 Medalia de Bronz la Expoziția Internațională Specializată ”INFOINVENT”, Ediția a XVII-a
2020 Bursa pentru doctoranzi oferită de World Federation of Science, Elveția

PARTICIPĂRI LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE

2024 International Scientific Conference ”Science And Education: New Approaches And Perspectives”, Chișinău, Republic of Moldova. **Articol publicat.**
2023 The Central European NMR Symposium & Bruker Users Meeting Solid State NMR Workshop, Prague, Czech Republic. **Comunicare poster.**
2023, 2022 The National Conference with International Participation Natural Sciences In The Dialogue Of Generations, Chisinau, Republic of Moldova. **Comunicare orală.**
2022 The National Conference of Chemistry 2022, Ed. XXXVI, Calimanesti-Caciulata, Ramnicul Valcea, Romania. **Comunicare poster.**
2022, 2020 14th Green Chemistry Postgraduate Summer School (online/in-person), Venice, Italy. **Comunicare orală și poster.**
2022 7th International Conference of Ecological and Environmental Chemistry, Chisinau, Republic of Moldova. **Comunicare orală și poster.**
2021 23rd International Conference “New Cryogenic and Isotope Technologies for Energy and Environment”- EnergEn 2021, Băile Govora, Romania. **Comunicare poster.**
2021 Expoziția Internațională Specializată „INFOINVENT”, Ediția a XVII-a. **Comunicare poster.**
2021 The XII International Conference on Chemistry for Young Scientists, Saint Petersburg, Russia. **Comunicare poster.**
2021 Researchers' International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (YRICCCE III), Babeș – Bolyai University, Cluj-Napoca, Romania. **Comunicare poster.**

- 2020** Simpozionul Național de Chimie „Contribuții la Creșterea Calității Învățământului și Cercetării în Domeniul Chimiei” Ediția a XII-a, Craiova, România. **Comunicare poster.**
- 2020** Conferința științifică studentescă online ”Chimia ecologică și a mediului”, Chișinău, Republica Moldova. **Comunicare orală.**
- 2020** 12th International Conference «Electronic Processes in Organic and Inorganic Materials (ICEPOM-12), Ucraina. **Comunicare poster.**
- 2020** International Conference ”Achievements and Perspectives of modern Chemistry”, Chisinau, Republic of Moldova. **Comunicare poster.**

LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE ȘI ȘTIINȚIFICO-METODICE PUBLICATE

18 Participări la conferințe, școli de vară, saloane de inventică, simpozioane științifice naționale și internaționale;

2 publicații în reviste cu factor de impact:

- Acta Chimica Slovenica (Factor de impact 1.524);

- Studia Chemia UBB (Factor de impact 0.300);

1 publicație în revista națională Chemistry Journal of Moldova (Categorია A)

2 publicații în revista națională Akademos – Revistă de știință, inovare, cultură și artă (Categorია B);

3 capitole de carte în monografiile naționale și internaționale;

COMPETENȚE PERSONALE

Limbă maternă	Română	
Limbi străine cunoscute	Engleză	C1
	Rusă	C1
	Franceză	B1

Orina Vicol