

OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA COMPUȘILOR BIOACTIVI EXTRAȘI DIN PRODUSE VEGETALE FORESTIERE

Academician **Tudor LUPAȘCU**
 Doctor în chimie **Nina ȚÎMBALIUC**
 Doctor în chimie **Lucian LUPAȘCU**
 Institutul de Chimie al AȘM

OBTAINING AND CHARACTERIZATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS EXTRACTED FROM WOOD SECONDARY PRODUCTS

Summary. The aim of the research was the establishment of the optimal conditions for the extraction of the bioactive compounds from the oak sawdust and oak bark (secondary products of wood processing enterprises) and their characterization (study of the physico-chemical and microbiological properties). The process of extraction from the investigated vegetal material has been realized by using the static method (maceration during 24 hours) and the method of ultrasound treatment in ultrasonic field (during 30 min and 60 min) from the ratio 1:10 and 1:5 of the vegetal product/solvent. The extraction has been realized at a controlled temperature in 3 consecutive steps for each method using as a solvent the 50 % and 70% of ethanol. The determination of the total contain of phenolic compounds has been realized by the Folin-Ciocalteu method with some minor modifications. Have been investigated the antioxidant and antimicrobial properties of the obtained extracts.

Keywords: sawdust of oak, bark of oak, extraction, biologically active compounds, microbiological properties.

Rezumat. Cercetările au avut scopul de a stabili condițiile optime de extragere a compușilor bioactivi din rumeguș de stejar și coajă de stejar (produse secundare ale întreprinderilor de prelucrare a lemnului) și de a-i caracteriza (studiul proprietăților fizico-chimice și microbiologice). Procesul de extracție din produsele vegetale cercetate s-a realizat prin metoda statică (macerare timp de 24 de ore) și metoda de tratare cu ultrasunet (timp de 30 de minute și 60 de minute) conform raportului produs vegetal-solvent (masă/volum) 1:10 și 1:5. Extracția s-a realizat la o temperatură controlată în trei etape consecutive pentru fiecare metodă, folosind în calitate de solvent etanolul de 50% și de 70%. Conținutul total de compuși polifenolici (CTCF) s-a determinat prin metoda Folin-Ciocalteu, parțial modificată. Au fost investigate proprietățile antioxidante și activitatea antimicrobiană a extractelor obținute.

Cuvinte-cheie: rumeguș de stejar, coajă de stejar, extracție, compuși bioactivi, proprietăți microbiologice.

INTRODUCERE

Acțiunea nefastă a factorilor nocivi din mediul înconjurător este o problemă dintre cele mai intens investigate astăzi, factorii respectivi având un impact negativ imens asupra sănătății publice și calității vieții societății moderne [1; 2; 3, pp. 330-348]. Substanțele din mediul exterior care ajung în organismul omului prin radiația ultravioletă, detergenți și produse cosmetice, legume și fructe tratate cu pesticide, alimente procesate, aer poluat etc., produc în organism o serie de compuși numiți radicali liberi, stresul oxidativ făcându-se responsabil de creșterea riscului apariției cancerului, bolilor cardiovasculare, de îmbătrânirea celulelor, degradarea organismului uman la toate nivelele – biologic, chimic, genetic, psihologic [4, pp. 311-319; 5, pp. 37-56; 6, pp. 475-488].

Radicalii liberi sunt molecule cu un electron im-
par pe orbitalul extern, fapt ce îi transformă în agenți

foarte instabili și periculoși întrucât tind să-și recapete stabilitatea prin sustragerea unui electron de la alte molecule. Reacțiile chimice declanșate de către radicalii liberi pot fi stopate prin intermediul substanțelor antioxidante care au abilitatea de a le inhiba acțiunea nefastă, protejând astfel organismul uman de efectele nocive.

Actualmente, atenția cercetătorilor este centrată pe substanțele antioxidante de origine vegetală capabile să exercite asupra organismului viu o acțiune fiziologică cu caracter terapeutic [7, pp. 1785-1787; 8, pp. 741-747; 9, pp. 353-357; 10, pp. 1-12; 11, pp. 99-214]. Prin urmare, cercetările în domeniul identificării și studiului materiilor prime vegetale – surse de compuși bioactivi cu potențial curativ – sunt, incontestabil, oportune și de mare importanță [12; 13, pp. 236-241]. Produsele vegetale cu un conținut sporit de compuși bioactivi se utilizează tradițional în afecțiunile dermatologice, arsuri, ca antidot în intoxicații

cu metalele grele, ele posedă acțiune antiinflamatoare, antibacteriană, antidiareică. Deși compuși cu activitate biologică accentuată se conțin, practic, în majoritatea plantelor, o cantitate mai mare se atestă în scoarța, în lemnul și frunzele de stejar, de plop, nuc, salcâm, afin; în frunzele de ceai; în petalele de trandafir; în fructele, boabele și semințele unor specii de arbuști ca afinul, cătina, coacăza, socul, cornul, vița-de-vie etc. [11, pp. 99-214; 12; 13, pp. 236-241, 14, pp. 59-65; 15, pp. 2757-2768; 16, pp. 586-621].

Pornind de la cele expuse și reieșind din potențialul spațiului geografic autohton, în calitate de sursă pentru extragerea compușilor polifenolici bioactivi s-au selectat coaja de stejar și rumegușul de stejar (deșeu al întreprinderilor de prelucrare a lemnului). Scopul cercetărilor a constat în stabilirea condițiilor optime de extragere a compușilor bioactivi din materia primă selectată și caracterizarea acestora (studiul proprietăților fizico-chimice și microbiologice).

MATERIALE ȘI METODE

13,2UV/Vis 6505. Proba dată s-a examinat prin comparare cu mostra martor, aceasta din urmă utilizând soluția hidroetanolică (de 50% și de 70%). Măsurările s-au efectuat în triplicat și exprimat în mg acid galic, la g produs vegetal uscat (mg GA/g).

Determinarea activității antioxidante, cu utilizarea radicalului cation ABTS⁺, este bazată pe capacitatea compușilor antioxidanți de a anihila radicalul cationic ABTS și de a reduce radicalul la forma neutră incoloră. Acest test a fost efectuat conform metodei Re [18, pp. 1231-1237], parțial modificate. Radicalul ABTS⁺ este generat prin oxidarea ABTS (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazolină-6-acid sulfonic, C_{ABTS}, 7 mM) cu persulfat de potasiu (2,45 mM), amestecate în raportul volumetric 1:1 și plasate pentru 12-16 ore la întuneric la temperatura camerei. Soluția de ABTS⁺ obținută este diluată cu etanol de 70% până la densitatea optică Abs = 0,700 ± 0,020, la λ=734 nm, datele fiind măsurate la spectrofotometrul UV/VIS JENWAY 6505. Soluțiile stoc ale compușilor testați s-au diluat cu etanol de 70%, astfel încât la introducerea unei părți alicote de probă testată la 3,0 mL de ABTS⁺, cu citirea absorbantei exact la un minut după amestecare, să se producă o inhibiție de 20-80% față de soluția de referință. Determinările efectuate în triplicat s-au exprimat în procent de inhibiție.

Activitatea antioxidantă, cu utilizarea radicalului DPPH[·], s-a determinat conform [19, pp. 25-30; 20, pp. 609-615], cu mici ajustări. La interacțiunea radicalului DPPH[·] (2,2 difenil-1-picril hidrazil) de culoare violetă cu un antioxidant, concentrația lui se micșorează,

ceea ce produce o decolorare a soluției de la violet la galben. Concentrația radicalului DPPH[·] în soluția de lucru, precum și durata reacției sunt individuale și se determină pentru fiecare caz în parte în funcție de natura substanței antioxidante și cea a solventului utilizat. Măsurările s-au realizat în triplicat la spectrofotometrul UV/VIS JENWAY 6505 cu citirea valorilor absorbantei la λ=517 nm și s-au exprimat în procent de inhibiție, conform ecuației:

$$AA(\%) = \frac{(Abs_{t=0} - Abs_{t=X \text{ min}})}{Abs_{t=0}} \cdot 100,$$

unde Abs_{t=0} este valoarea absorbantei soluției inițiale DPPH[·] și Abs_{t=X min} – valoarea absorbantei soluției DPPH[·] după 30, 60 sau 90 de minute incubare cu probele testate.

Pentru determinarea conținutului total de grupări funcționale acide (carboxilice și fenolice), C_{total}, a fost utilizată metoda Boehm, calculele fiind efectuate conform ecuației:

$$C_{\text{total}} = [C_n(\text{NaOH}) \times V_1 - C_n(\text{HCl}) \times V_2] / m$$

unde C_n(NaOH) – concentrația normală a soluției de hidroxid de sodiu, 0,05 mol/L; C_n(HCl) – concentrația normală a soluției de acid clorhidric 0,05 mol/L; V₁ – volumul soluției de hidroxid de sodiu 0,05 mol/L, mL; V₂ – volumul soluției de acid clorhidric 0,05 mol/L, mL; m – masa probei, g.

Pentru evaluarea activității antimicrobiene a fost utilizată metoda diluțiilor succesive duble. Astfel, în 10 eprubete s-a introdus câte 1 ml de bulion peptonat, ulterior s-a picurat 1 ml de preparat în prima eprubetă, s-a pipetat amestecul obținut, după care 1 ml din acesta s-a transferat în eprubeta următoare, procedura repetându-se până la eprubeta nr. 10 a șirului. În așa mod, concentrația preparatului inițial se micșorează de două ori în fiecare eprubetă următoare.

În același timp, se prepară culturi de 24 ore de bacterii-test. În calitate de bacterii-test au fost selectate tulpini nepatogene de *Bacillus subtilis* și *Pseudomonas aeruginosa*. S-au preparat inițial suspensii de culturi bacteriene cu densitățile optice (D.O.) de 2,0 în conformitate cu indicele McFarland. Ulterior, s-a picurat 1 ml de suspensie bacteriană obținută într-o eprubetă ce conține 9 ml de apă distilată sterilă. S-a amestecat conținutul obținut, după care s-a transferat 1 ml în eprubeta cu nr. 2 din șirul de cinci eprubete ce conțin câte 9 ml de apă distilată sterilă. Din eprubeta cu nr. 5 a șirului s-a luat câte 0,1 ml de suspensie bacteriană, ceea ce reprezintă doza de însămânțare, și s-a adăugat în fiecare eprubetă care conține preparatul titrat. Ulterior, eprubetele cu preparat titrat în care s-au introdus dozele de însămânțare a bacteriilor s-au menținut în termostat la temperatura de 35°C timp de 24 de ore. A doua zi s-au analizat preliminar rezultatele obținute.

Ultima eprubetă din șir în care nu s-a atestat o creștere vizibilă a bacteriilor se consideră a fi concentrația minimă inhibitorie (CMI) a preparatului. Pentru evaluarea concentrației minime bactericide (CMB), conținutul eprubetelor cu CMI și a eprubetelor cu concentrații mai înalte ale preparatului s-a însămânțat pe agarul solid din cutiile Petri cu ajutorul ansei bacteriologice. Cutiile însămânțate s-au plasat în termostat la temperatura de 35°C pentru 24 de ore. Concentrația de preparat care nu permite creșterea a niciunei colonii bacteriene se consideră a fi concentrația minimă bactericidă a preparatului.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Condițiile experimentale pentru obținerea extractelor vegetale au fost variate nu numai în privința metodelor de extracție, ci și sub aspectul parametrilor experimentali (raportul produs vegetal/solvent, concentrația solventului, timp de extracție). Cercetările privind metodele de extracție a compușilor bioactivi au avut ca obiectiv estimarea avantajelor și dezavantajelor metodei clasice de agitare mecanică (macerare și scurgere periodică) vizavi de metoda de extracție în prezență de ultrasunete.

Conținutul de compuși polifenolici totali s-a determinat prin metoda spectrofotometrică utilizând reactivul Folin-Ciocalteu. Conținutul total de compuși polifenolici (CTCF), exprimat ca *mg acid galic/g* de produs vegetal (*mg GA/g*), extrași din rumeguș de stejar utilizând metoda de agitare mecanică și metoda de tratare cu ultrasunet este prezentat în figura 1.

Analiza datelor obținute ne permite să constatăm că rezultate superioare în conținut de polifenoli extrași sunt asigurate de metoda de agitare mecanică fiind urmate de valori destul de apropiate ale CTCF, obținute prin metoda asistată de ultrasunet, cea din urmă având avantajul unei durate mult mai reduse a procesului de extracție (trei cicluri a câte 30 de mi-

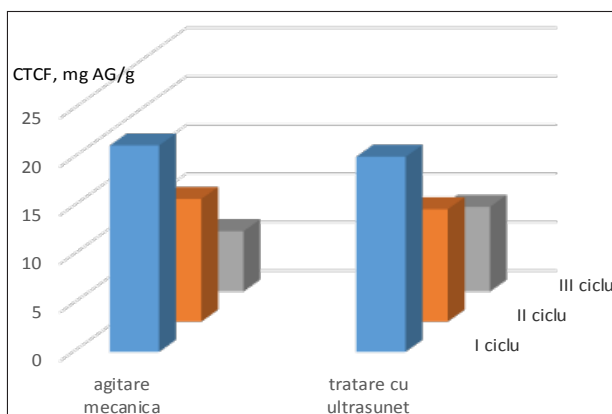


Figura 1. Conținutul total de compuși polifenolici extrași din rumeguș de stejar cu soluție de alcool (70%) prin metodă de agitare mecanică și tratare cu ultrasunet.

nute vizavi de trei cicluri a câte 24 de ore). Pentru extractul provenit din coajă de stejar, avantajul utilizării metodei de agitare mecanică este mai evident și asigură un conținut total de polifenoli extrași cu peste 20% mai mare în raport cu metoda asistată de ultrasunet (tabelul 1). În cadrul investigațiilor referitoare la influența duratei de tratare cu ultrasunet a materiei vegetale asupra conținutului total de compuși extrași, s-a constatat că intervalul de timp de 30 de minute este suficient pentru extragerea, practic integrală, a compușilor fenolici prezenți în probele cercetate (tabelul 1).

Cercetările centrate pe influența concentrației solventului asupra randamentului procesului de extragere au rezumat la concluzia că, pentru produsele vegetale cercetate, utilizarea solventului cu concentrația de 70% asigură o ușoară sporire (2-4% pentru metoda statică și 4-6% la tratarea cu ultrasunet) a conținutului total de compuși extrași, vizavi de solventul cu concentrația de 50%. Studiul influenței raportului masa (g) de produs vegetal și volum (mL) de solvent utilizat pentru extragerea unui conținut maxim de compuși polifenolici a cuprins

Tabelul 1
Conținutul total de compuși polifenolici (mg GA/g) în funcție de metoda de extragere, durata procesului, concentrația solventului

Mostră, raport masă/volum	Agitare mecanică		Tratare cu ultrasunet			
	Etanol, 70 %	Etanol, 50 %	Etanol, 70% 30 min	Etanol, 70% 60 min	Etanol, 50 % 30 min	Etanol, 50% 60 min
Rumeguș de stejar, 1:5	21,15	20,65	19,71	20,09	18,65	19,55
Rumeguș de stejar, 1:10	21,88	21,01	21,17	21,54	20,38	21,08
Coajă de stejar, 1:5	14,91	14,15	11,06	11,52	10,41	10,97
Coajă de stejar, 1:10	16,15	15,71	11,82	11,89	11,23	11,31

Tabelul 2

Randamentul substanțelor extrase din rumeguș de stejar și din coajă de stejar cu soluții hidroalcoolice de 50 % și de 70 %

	Produs vegetal masă/volum	Ciclu I, randament, %	Ciclu II, randament, %	Ciclu III, randament, %	Total randament, %
Agitare mecanică	Rumeguș de stejar, alc. 50%	4,27	2,85	1,12	8,24
	Rumeguș de stejar, alc. 70%	4,39	2,92	1,11	8,42
	Coajă de stejar, alc. 50%	3,76	2,13	0,52	6,41
	Coajă de stejar, alc. 70%	3,82	2,31	0,45	6,58
Tratare cu ultrasunet	Rumeguș de stejar, alc. 50%	4,72	2,85	0,52	8,09
	Rumeguș de stejar, alc. 70%	4,81	2,85	0,56	8,22
	Coajă de stejar, alc. 50%	3,09	1,09	0,31	4,49
	Coajă de stejar, alc. 70%	3,18	1,14	0,32	4,64

raporturile 1:5 și 1:10. Raportul masă/volum 1:10 generează un conținut total de compuși polifenolici extrași mai înalt față de raportul 1:5, această sporire fiind semnificativă pentru extractul obținut din coaja de stejar prin metoda de agitare mecanică (tabelul 1).

Rezultatele analizei datelor referitoare la randamentul procesului de extragere (tabelul 2) denotă că totalul de substanțe extrase în mostrele analizate variază de la 8,42% (rumeguș de stejar) până la 6,58 % (coajă de stejar) pentru metoda de agitare mecanică, și de la 8,22% (rumeguș din stejar) până la 4,64 % (coajă de stejar) pentru metoda de tratare cu ultrasunet. Este de menționat faptul că, în cazul metodei de tratare cu ultrasunet, aproape 60% (rumeguș de stejar) și aproximativ 70 % (coajă de stejar) din totalul de substanțe extrase se obțin la finele primului ciclu al procesului de extracție.

Metoda de testare a capacității antiradicalice cu aplicarea ABTS (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazolină-6-acid sulfonic) sau DPPH (2,2 difenil-1-picril hidrazil) este bine cunoscută și pe larg mediatizată în majoritatea lucrărilor de specialitate pentru determinarea capacității antioxidante totale a substanțelor, independent de natura lor. Rezultatele obținute în procesul de

determinare a activității antioxidante pentru compușii extrași prin ambele metode din produsele vegetale cercetate (tabelul 3), certifică o activitate antioxidantă sporită în cazul ambelor teste (ABTS și DPPH). Valorile activității antioxidante (AA,%) a extractelor obținute din rumeguș de stejar sunt mai pronunțate cu ~ 35-40 % (testul DPPH) și cu ~ 28-31 % (testul ABTS) decât cele înregistrate pentru extractele care au ca sursă de proveniență coaja de stejar.

Analiza curbelor cinetice de reducere a radicalului DPPH^{*} permite să constatăm că influența metodei de obținere a extractelor asupra proprietăților antioxidante este nesemnificativă, deși se observă o ușoară sporire a valorilor AA,% (curbele 2 și 4) pentru compușii obținuți prin metoda de tratare cu ultrasunet (figura 2).

Extractele obținute din produsele vegetale selectate au un grad scăzut de solubilitate în apă, fapt ce reduce esențial potențialul lor de utilizare. În Laboratorul Chimia ecologică al Institutului de Chimie al AȘM a fost elaborat un procedeu de solubilizare a taninurilor în apă, descris în invenția MD 3125 [21]. Ca rezultat al modificării prin oxidare a extractelor

Tabelul 3

Activitatea antioxidantă a extractelor din rumeguș și coajă de stejar determinată prin metoda DPPH și ABTS din soluții 0,5 %

Mostră	Agitare mecanică		Tratare cu ultrasunet	
	DPPH AA (%)	ABTS AA (%)	DPPH AA (%)	ABTS AA (%)
Extract din rumeguș de stejar	91,27	76,5	93,26	81,97
Extract din coajă de stejar	54,1	52,68	61,37	59,43

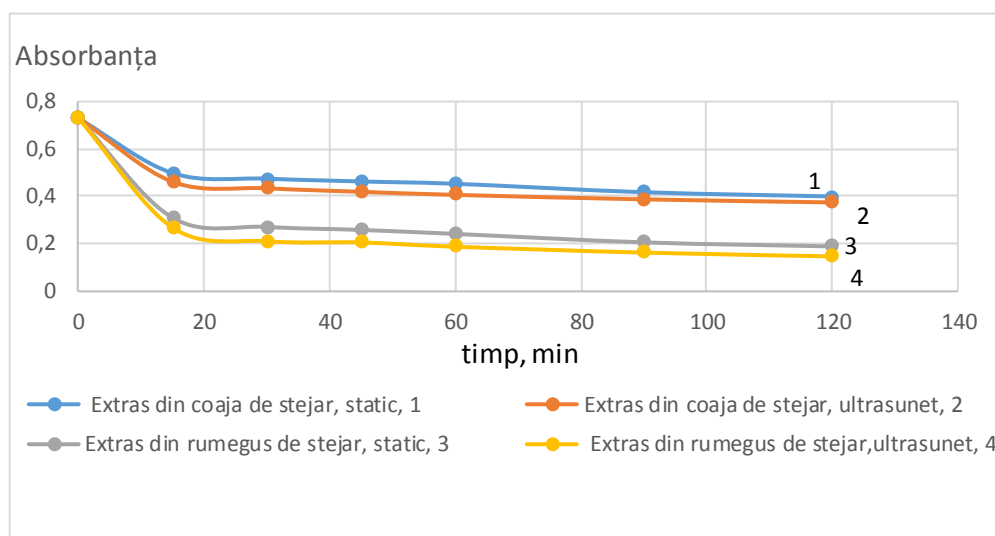


Figura 2. Curbele cinetice de reducere a radicalului DPPH* cu extractele din coajă de stejar (1, 2) și din rumeguș de stejar (3, 4) obținute prin metoda statică și metoda de tratare cu ultrasunet.

obținute are loc solubilizarea acestora, însoțită de formarea compușilor organici noi care conțin grupări funcționale carboxilice, peroxidice, alcoolice, fenolice etc.

În tabelul 4 este prezentat conținutul total de grupări funcționale acide (C_{total}), obținut în urma efectuării titrărilor acido-bazice (metoda Boehm) a soluțiilor compușilor modificați (raportate la datele obținute pentru preparatul Enoxil). Analiza rezultatelor obținute ne permite să constatăm că valoarea conținutului total de grupări funcționale acide ale mostrelor supuse modificării prin oxidare sporește esențial în raport cu valorile C_{total} determinate pentru extractele nemodificate, fapt confirmat și de datele spectrelor IR ale compușilor cercetați. Procedura de modificare prin oxidare a extractelor obținute din produsele vegetale cercetate a permis reducerea cantității substanțelor insolubile de la 59,89 % până la 6,81% (calculat pentru soluția apoasă de 5% a mostrei oxidate de rumeguș din stejar). Raportate la valorile C_{total} ale preparatului Enoxil, obținut din semințe de struguri Cabernet, roada anului 2016 (cât și

ale preparatului Enoxil comercializat în farmaciile din Republica Moldova), valorile C_{total} ale compușilor noi oxidați sunt aproximativ de același ordin.

Activitatea antimicrobiană a mostrelor cercetate (intacte și modificate prin oxidare) asupra bacteriilor gram-pozitive și gram-negative (patru specii de bacterii: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* și fungul *Candida albicans*) a fost evaluată utilizând metoda diluțiilor în cadrul Centrului Național de Medicină Preventivă (CNMP) și în Laboratorul de Chimie ecologică (LChE) al Institutului de Chimie. Au fost determinate concentrațiile minime bactericide (CMB) și fungicide (CMF) pentru ambele extracte. Rezultatele testărilor sunt prezentate în tabelul 5.

Din datele prezentate putem constata că extractele din rumeguș de stejar, atât în forma intactă cât și în cea oxidată, manifestă valoroase proprietăți antimicrobiene. În cazul extractului din coajă de stejar în forma oxidată se constată proprietăți antimicrobiene mai accentuate pentru toate speciile de microorganisme luate în studiu, cu excepția fungului *C. albicans*.

Tabelul 4

Conținutul total de grupări funcționale acide (C_{total}) determinat în soluții apoase de 5%, recalculat per g de preparat solid

Mostră	C_{total} mg-ech/g soluție 5%	C_{total} mg-ech/g preparat solid
Extract intact din rumeguș de stejar	0,0233±0,0013	0,47±0,02
Extract intact din coajă de stejar	0,0182±0,0011	0,36±0,02
Extract oxidat din rumeguș de stejar	0,2342±0,0018	4,68±0,22
Extract oxidat din coajă de stejar	0,1697±0,0016	3,39±0,16
Enoxil (obținut din semințe de struguri Cabernet, 2016)	0,2028±0,0017	4,06±0,21

Activitatea microbiologică a extractelor din rumeguș și coajă de stejar (intacte și oxidate), determinată din soluții de 2%, asupra bacteriilor nepatogene gram pozitive și negative

Locul testării	Specii de bacterii	Extract din rumeguș de stejar, intact (CMB)%	Extract din rumeguș de stejar oxidat, (CMB)%	Extract din coajă de stejar, intact (CMB)%	Extract din coajă de stejar oxidat, (CMB)%
CNMP	<i>Ps. aeruginosa</i>	0,06	0,12	–	0,5
	<i>E. coli</i>	0,5	0,25	1,0	0,5
	<i>S. aureus</i>	0,06	0,25	–	0,5
	<i>C. albicans</i>	0,12	0,5	0,12	–
LChE	<i>Ps. aeruginosa</i>	0,06	0,12	0,5	0,25
	<i>B. subtilis</i>	0,06	0,12	0,25	0,12

Datele testelor activității microbiologice obținute arată că materiile vegetale cercetate oferă un potențial relevant de aplicabilitate în domeniile ce vizează obținerea produselor cu efect antimicrobian.

CONCLUZII

Metoda de agitare mecanică asigură un randament maximal de extracție a compușilor polifenolici (CTCF) din rumegușul și din coaja de stejar. Valori destul de apropiate ale CTCF extrași se obțin și prin metoda de tratare cu ultrasunet, metoda respectivă avantajând o durată mult mai redusă a procesului de extracție (trei cicluri a câte 30 de minute vizavi de trei cicluri a câte 24 de ore).

Condițiile optime pentru extragerea unui conținut maximal de compuși polifenolici din materialul vegetal selectat sunt: metoda de agitare mecanică la temperatura controlată a produsului vegetal/solvent

în raport 1:10, utilizând în calitate de solvent alcoolul etilic cu o concentrație de 70%.

Valorile activității antioxidante (AA,%) a extractelor obținute din rumeguș de stejar sunt mai mari cu ~ 35-40% (testul DPPH) și cu ~ 28-31% (testul ABTS) față de datele înregistrate pentru extractele provenite din coaja de stejar. Influența metodei de obținere a extractelor asupra proprietăților antioxidante este nesemnificativă, deși se observă o ușoară sporire a valorilor AA,% pentru extractele obținute prin metoda de tratare cu ultrasunet.

Investigarea activității antimicrobiene a mostrelor (intacte și modificate prin oxidare) asupra bacteriilor testate (nepatogene gram pozitive și negative) oferă dovezi concludente că materiile vegetale cercetate au un potențial relevant de aplicare în cosmetologie și farmacologie.

BIBLIOGRAFIE

- Duca Gh. Management of Water Quality in Moldova. Water Science and Technology Library. Springer, vol. 69, 2014, 241 p.
- Prüss-Üstün A., Corvalán C. Preventing disease through healthy environments. Towards an estimate of the environmental burden of disease. Publications of the World Health Organization. 2006, 104 p. http://www.who.int/quantifying_ehimpacts/publications/preventingdisease.pdf
- Abbasi T. and Abbasi S. A. Water quality indices based on bioassessment: the biotic indices. Journal of Water and Health, 2011, vol. 9, (2).
- Kelishadi R., Mirghaffari N., Poursafa P. and Gidding S. S. Lifestyle and environmental factors associated with inflammation, oxidative stress and insulin resistance in children. Atherosclerosis. 2009, vol. 203, (1).

- Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C. J., Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Mol. Cell. Biochem. 2004, 266 (1-2).

- Mezzetti A., Cipollone F., Cuccurullo F. Oxidative stress and cardiovascular complications in diabetes: isoprostanines as new markers on an old paradigm. Cardiovasc. Res. 2000, (47).

- Banso A., Adeyemo S.O. Evaluation of antibacterial properties of tannins isolated from *Dichrostachys cinerea*. Afr. J. Biotechnol. 2007, 6 15).

- Sabir S. M., Ahmad S. D., Hamid A., Khan M. Q., Athayde M. L. et al. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds. Food. Chem. 2012, (131).

- Ram A. J., Bhakshu L. M., Raju R. V. In vitro antimicrobial activity of certain medicinal plants from Eastern

Ghats, India, used for skin diseases. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003 (90).

10. Manolaraki F, Sotiraki S., Stefanakis A., Skampardonis V., Volanis M., Hoste H. Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitology*, 2009.

11. Moța Cristina, Roșu Ana, Câmpeanu Gh. Compuși bioactivi de origine vegetală. Abordări biotehnologice. *Progrese în biotehnologie*, vol. II, 2002.

12. Lupașcu T., Duca Gh., Gonciar V. Enoxil preparat ecologic pentru sănătatea omului. Monografie, Editura „Știința”, Chișinău, 2012, 256 p.

13. Meigy Nelce Mailoa, Meta Mahendradatta, Amran Laga, Natsir Djide. Antimicrobial activities of tannins extract from Guava leaves (*Psidium Guajava* L) on pathogen microbial. *International Journal of scientific&technology research*. 2014, vol. 3(1).

14. Lim S. H., Darah I., Jain K. Antimicrobial activities of tannins extracted from *Rhizophora apiculata* barks. *Journal of Tropical Forest Science*. 2006, 18(1).

15. Flávio A. S. Politi, João C. P. de Mello, Ketylin F. Migliato, Andréa L. A. Nepomuceno, Raquel R. D. Moreira and Rosemeire C. L. R. Pietro. Antimicrobial, Cytotoxic and Antioxidant Activities and Determi-

nation of the Total Tannin Content of Bark Extracts *Endopleurauchi*. *Int. J. Mol. Sci*. 2011 (12).

16. Quideau S., Deffieux D., Douat-Casassus C., Pouységu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities and synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. 2011, 50(3).

17. Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method. Enzymol*. 1999, (299).

18. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999, vol. 26.

19. Brand-Williams W., Cuvelier M. E. and Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 1995, vol. 28.

20. Bondet V., Brand-Williams W. and Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH* free radical method. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 1997, vol. 30.

21. Lupașcu T., Lupașcu L. Procedeu de obținere al eno-taninurilor solubile. Patent of the Republic of Moldova, B.I. 3125 G2 MD.



Vasile Ivanciuc. *De mâine*. 2007, batik, mătase, 92 × 100 cm