



Școala doctorală de Științe inginerești și matematică

Domeniul de doctorat: Inginerie industrială

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

CERCETĂRI PRIVIND VALORIFICAREA UNOR PLANTE AUTOHTONE INVAZIVE PENTRU OBTINEREA DE INGREDIENTE BIOACTIVE ȘI COLORANȚI

Doctorand:

MARIA DENISA, COCÎRLEA

Conducător de doctorat:

Prof. univ. dr. habil. SIMONA, OANCEA



	Pag. teză	Pag. rezumat
SUMAR	1	
CUPRINS	4	1
LISTA DE ABREVIERI	7	
INTRODUCERE	2	3
1. ANALIZA STADIULUI ACTUAL AL CUNOAȘTERII PRIVIND POTENȚIALUL APLICATIV AL PLANTELOR INVAZIVE	5	4
1.1. Aspecte generale privind selectarea unor materii prime pe bază de plante invazive	5	4
1.2. Descrierea plantelor invazive incluse în analiză	6	4
1.2.1. Generalități și caracterul invaziv al speciilor lemnoase cenușar (<i>Ailanthus altissima</i>) și oțetar (<i>Rhus typhina</i>)	6	4
1.2.2. Compoziție chimică	10	5
1.2.3. Efecte potențial alergice sau toxice	15	5
1.2.4. Caracterul aplicativ în medicină și industrie	16	6
1.2.5. Managementul controlului	24	
1.3. Sinteza literaturii de specialitate privind aplicarea unor pre-tratamente și a extracției compușilor din materiile prime vizate	25	6
1.3.1. Colectarea și uscarea materiei prime	25	6
1.3.2. Extracția compușilor bioactivi	28	7
1.4. Valorificarea pigmentilor naturali în vopsirea ecologică a materialelor textile	31	7
1.5. Bibliografie	35	
2. CONTRIBUȚII ORIGINALE PRIVIND INFLUENȚA PARAMETRILOR ȘI A TEHNICILOR EXTRACTIVE ASUPRA CONȚINUTULUI DE COMPUȘI BIOACTIVI DIN CENUȘAR (<i>A. ALTISSIMA</i>)	50	9
Introducere	50	
2.1. Locația de colectare a probelor	51	
2.2. Materiale și metode utilizate	52	
2.2.1. Materiale	52	
2.2.2. Echipamente	52	
2.2.3. Metodologia experimentală	54	
2.3. Rezultate și discuții	61	
2.3.1. Particularități microstructurale ale materiei prime (frunze de <i>A. altissima</i>), vizualizate cu ajutorul microscopiei SEM	61	9
2.3.2. Studiu privind eficiența iradierii cu microunde asupra extracției compușilor bioactivi din frunzele de <i>A. altissima</i>	62	9
2.3.2.1. Conținutul total de polifenoli, taninuri și activitatea antioxidantă	62	9
2.3.2.2. Caracterizarea extractelor obținute prin iradiere cu microunde, utilizând tehnica ATR-FTIR	65	11
2.3.3. Studiu experimental privind impactul pre-tratamentului și sezonului de colectare a materiei prime, precum și a extracției secvențiale asupra conținutului bioactiv din frunzele de <i>A. altissima</i>	67	12
2.3.3.1. Schema experimentală a procedurii de extracție secvențială din probele de materie primă investigată	67	12
2.3.3.2. Impactul pre-tratamentului materiei prime asupra modificărilor de culoare, testate în sistemul CIELAB	68	12
2.3.3.3. Conținutul total de compuși bioactivi (polifenoli, flavonoide, taninuri, carotenoizi) din extractele obținute prin procedeul secvențial	69	13
2.3.3.4. Profilul polifenolic al extractelor etanolice, în funcție de sezonul de colectare și de pre-tratament, determinat prin analiza HPLC	73	14
2.3.3.5. Activitatea antioxidantă a extractelor obținute în urma procedurii secvențiale	76	15
2.3.3.6. Analiza statistică a datelor experimentale prin prisma eficienței tehnicii cu microunde și a celei secvențiale de extracție a compușilor bioactivi	78	16
2.3.3.7. Evaluarea activității antimicrobiene a extractelor etanolice	80	16
2.3.3.8. Cercetări experimentale privind riscurile de mediu și sănătate realizate în perspectiva aplicațiilor practice ale extractelor din frunzele de <i>A. altissima</i>	81	17
2.3.4. Concluzii parțiale	94	
2.3.5. Bibliografie	97	
3. CONTRIBUȚII ORIGINALE PRIVIND INFLUENȚA PARAMETRILOR ȘI A TEHNICILOR EXTRACTIVE ASUPRA CONȚINUTULUI DE COMPUȘI BIOACTIVI DIN OȚETAR (<i>R. TYPHINA</i>)	104	18
Introducere	104	
3.1. Locația de colectare a probelor	105	
3.2. Materiale și metode utilizate	105	

3.2.1 Materiale	105	
3.2.2. Echipamente	106	
3.2.3. Metodologia experimentală	106	
3.3. Rezultate și discuții	109	
3.3.1. Particularități microstructurale ale materiei prime (fructe de <i>R. typhina</i>) vizualizate cu ajutorul microscopiei SEM	109	19
3.3.2. Influența procedurii și a parametrilor de extracție, asistată de ultrasunete și cu bile, asupra conținutului total de compuși bioactivi și activității antioxidante din fructele de <i>R. typhina</i>	109	19
3.3.3. Profilul polifenolic al extractului etanolic BBE, determinat prin analiza HPLC	117	22
3.3.4. Activitatea antimicrobiană a extractului etanolic BBE	118	22
3.3.5. Optimizarea condițiilor de extracție prin tehnica UAE a compușilor bioactivi din fructele de <i>R. typhina</i> utilizând Metoda Suprafeței de Răspuns (MSR)	119	23
3.3.6. Analiza comparativă privind eficiența extracției compușilor bioactivi din fructele de <i>R. typhina</i> prin tehnicile UAE și BBE	125	25
3.3.7. Cercetări experimentale privind potențialul citotoxic al extractului din fructele de <i>R. typhina</i>	127	26
3.3.8. Concluzii parțiale	130	
3.3.9. Bibliografie	132	
4. CERCETĂRI APLICATIVE PRIVIND UTILIZAREA EXTRACTULUI DIN FRUCTE DE OȚETAR (<i>R. TYPHINA</i>) ÎN VOPSIREA ECOLOGICĂ A MATERIALELOR TEXTILE	136	27
Introducere	136	
4.1. Materiale și metode utilizate	137	
4.1.1. Materiale	137	
4.1.2. Echipamente	137	
4.1.3. Metodologia experimentală	138	
4.1.3.1. Prelucrarea materialului vegetal și extracția acestuia din fructele de oțetar	138	
4.1.3.2. Dozarea spectrofotometrică a compușilor coloranți (antociani) din fructele de oțetar	138	
4.1.3.3. Vopsirea materialului textil cu extractul natural	138	
4.1.3.4. Caracterizarea cromatică în sistemul CIELAB a materialului vopsit	139	
4.1.3.5. Evaluarea rezistenței probelor vopsite la apă și frecare uscată	139	
4.1.3.6. Analiza statistică	139	
4.2. Strategii clasice și moderne de vopsire a materialelor textile	140	27
4.3. Rezultate privind vopsirea ecologică a țesăturilor de bumbac cu extractul din fructe de <i>R. typhina</i>	147	28
4.3.1. Caracterizarea cromatică și testarea rezistenței la spălare și frecare uscată a probelor de bumbac vopsite cu extractul din fructe de <i>R. typhina</i>	147	28
4.3.2. Caracterizarea prin tehnica ATR-FTIR a probelor de bumbac vopsite cu extract din fructe de <i>R. typhina</i>	154	30
4.4. Concluzii parțiale	156	
4.5. Bibliografie	158	35
CONCLUZII GENERALE, CONTRIBUȚII ORIGINALE, RECOMANDĂRI ȘI DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE	164	32
LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE, REZULTATE ÎN URMA CERCETĂRII DOCTORALE	169	
LISTA FIGURILOR	171	
LISTA TABELELOR	175	

Cuvinte cheie: *Ailanthus altissima*, *Rhus typhina*, extracție, compuși biologic activi, activitate antioxidantă, proprietăți biologice și citotoxice, vopsire naturală



Importanța și necesitatea temei

Industria textilă, deși este mare consumatoare de apă și energie, reprezintă una dintre cele mai de interes și importante ramuri industriale. În ultimii ani comunitățile științifice au prezentat o preferință cu tendință de creștere asupra utilizării coloranților naturali care, deși produc culori mai șterse și dificil de reprodus adesea, sunt mai siguri pentru mediul înconjurător și sănătatea consumatorilor decât coloranții sintetici, care aduc riscuri de poluare și dezvoltarea de boli grave precum cancerul. Printre sursele de coloranți naturali se numără și diferitele specii de plante, native sau invazive, care conțin pigmenți precum antocianii, flavonoidele, carotenoizii, betalainele etc. Disponibilitatea extinsă a plantelor invazive datorată strategiilor de răspândire și metodelor limitate de control eficient, a făcut ca acestea să devină resurse importante de materie primă cu utilizări în medicină și în sinteza de nanoparticule, coloranți sau de alte produse bazate pe compuși cu bioactivitate ridicată conținuți de acestea.

Prezenta teză de doctorat a vizat două specii invazive lemnoase, regăsite în România, respectiv *Ailanthus altissima* (cenușar) și *Rhus typhina* (oțetar), sub următoarele aspecte: utilizarea de diferite tehnici clasice și moderne de extracție, dozarea compușilor bioactivi de interes, optimizarea parametrilor de proces cu scopul creșterii concentrațiilor acestor compuși, evaluarea activităților antioxidante și antimicrobiene și chiar capacitatea de vopsirea a uneia dintre aceste specii asupra unui substrat textil celulozic.

Frunzele de *A. altissima* și/sau fructele de *R. typhina* au fost implicate în procese de extracție pentru care au fost modificați următorii parametri: sezonul de colectare, solventul utilizat, secvența de extracție, frecvența, intensitatea câmpului electric incident, dimensiunea bilelor și materialul de confecționare a bilelor, raportul solvent/solid sau durata procesului, cu scopul de a limita degradarea unor compuși sensibili și a reduce consumul de resurse în creșterea randamentului de extracție.

Noutatea studiului

Caracterul original al acestei teze de doctorat constă în evaluarea eficienței extracției cu microunde (MAE) folosind frecvențe joase asupra foliolelor de *A. altissima*, întrebuintarea unei tehnici de extracție secvențială care să recomande utilizarea unui solvent ecologic, polar, optimizarea conținuturilor diferiților compuși cu activitate biologică folosind un design experimental de tip Box-Behnken, investigarea eficienței extracției cu bile asupra fructelor de *R. typhina*, evaluarea *in vitro* a citotoxicității celor două specii invazive asupra unor linii celulare nestudiate anterior pentru aceste plante și a unor membrane lipozomale, testarea ecotoxicității cenușarului, dar și de valorificarea extractului apos din fructe de oțetar în vopsirea bumbacului, prin tehnici convenționale și moderne (epuizare vs. ultrasonare) și meta-mordansarea cu mordanți mai puțin utilizați, respectiv acidul citric și un amestec de sulfat de fier și acid oxalic.

1. ANALIZA STADIULUI ACTUAL AL CUNOAȘTERII PRIVIND POTENȚIALUL APLICATIV AL PLANTELOR INVAZIVE

1.1. Aspecte generale privind selectarea unor materii prime pe bază de plante invazive

Speciile invazive de plante au devenit o amenințare considerabilă asupra sustenabilității (Ellison et al., 2017) și biodiversității ecosistemelor (Li et al., 2024), datorită strategiilor de dispersare eficiente pe care le dețin (Mounger et al., 2021), substanțelor alelopatiche pe care le secretă (Liu et al., 2021) și schimbărilor din mediu provocate de impactul antropic puternic (Argüelles & March, 2022), în România modul de gestionare a acestora realizându-se conform procedurii descrise de „Strategia UE privind biodiversitatea pentru 2030” (Comisia europeană, 2020).

Deși prezența acestor specii este asociată cu dezvoltarea de alergii (Lazzaro et al., 2018) sau bronșite alergice (Ellison et al., 2017), conținuturile ridicate în compuși bioactivi pe care le conțin (Nguyen et al., 2023), toleranța crescută la prezența metalelor grele din sol (Afzal et al., 2023) și compatibilitatea cu principiile economiei circulare (Pušić et al., 2024), au dus la implicarea materiei lor prime în numeroase cercetări care au confirmat utilitatea acestora în obținerea de produse precum nanoparticule antimicrobiene (Nguyen et al., 2023), biocombustibili (Gramauskas et al., 2023), biopesticide (Kozuharova et al., 2024) sau coloranți naturali (Flax et al., 2021).

1.2. Descrierea plantelor invazive incluse în analiză

1.2.1. Generalități și caracterul invaziv al speciilor lemnoase cenușar (*Ailanthus altissima*) și oțetar (*Rhus typhina*)

Ailanthus altissima (Mill.) Swingle (cenușarul) face parte din ordinul Sapindales, familia Simaroubaceae (EPPO, 2024), iar în România acesta este adesea confundat cu *Rhus typhina* (Crainic et al., 2019), care aparține familiei Anacardiaceae a aceluiași ordin (EPPO, 2024). Ambele plante sunt specii lemnoase de foioase (Caramelo et al., 2021), care au fost introduse în România ca specii ornamentale (Anastasiu și Negrean, 2007, Qu et al., 2020 b).

În calitate de specii invazive, cenușarul și oțetarul vor fi frecvent întâlnite în terenurile puternic antropizate precum marginile de drum (McAvoy et al. 2012), zonele din apropierea căilor ferate (Seiler et al., 2019) sau câmpurile abandonate și incendiate (Maschek et al., 2018, Seiler et al., 2019)

Cenușarul poate se poate adapta la condiții extreme de temperatură, de până la -33°C (Caramelo et al., 2021), sau la perioade îndelungate de secetă (Trošt Sedej et al., 2021).

1.2.2. Compoziție chimică

Atât *A. altissima* cât și *R. typhina* reprezintă surse bogate de compuși cu potențial bioactiv, precum flavonoidele (Lai et al., 2014, Kim et al., 2016), alcaloizii (Shao et al., 2023, Konarska et al., 2024), acizii fenolici (Pangi et al., 2022, Lai et al., 2014), cumarinele (Qiu et al., 2016, Duan et al., 2021), taninurile (Dai et al., 2020, Zazharskyi et al., 2020) etc.

Ailantona și shinjulactona reprezintă compuși specifici familiei Simaroubaceae numiți quasinoide (Pavela et al., 2014), iar altissimacumarina H este o cumarină prezentă în fructele de *A. altissima* (Ni et al., 2019).

Activitatea antioxidantă și acidul fenolic predominant în structura frunzelor de cenușar pot varia de la o zonă geografică la alta (Poljuha et al., 2017, Caramelo et al., 2021).

Fructele oțetarului conțin cantități considerabile de vitamine (Zhang et al., 2022), aminoacizi esențiali (Wang & Zhu, 2017), antociani și piranoantociani (Kirby et al., 2013, Wang & Zhu, 2017), dar și ale acizilor fenolici malic, citric și tartric (Wang & Zhu, 2017, Arlandini et al., 2021).

1.2.3. Efecte potențial alergice sau toxice

Condițiile de mediu în care o specie de plantă se dezvoltă îi pot influența potențialele efecte alergene (Martí-Garrido et al., 2020). Atât polenul indivizilor de *A. altissima* cât și cel al inflorescențelor de *R. typhina* pot produce alergii serioase (Martí-Garrido et al., 2020, Qu et al., 2020 a).

Contactul cu seva, tulpinile sau frunzele celor două plante pot determina dermatite de contact (Whiticar & Harvey, 2009, Schall & Davis, 2009, Seo et al., 2018). În cazul contactului cu seva de *A. altissima* au fost raportate situații de apariție a miocarditei (Karalija et al., 2020).

Uleiul semințelor de oțetar a fost declarat drept comestibil de către Comisia Națională de Sănătate din China (Zhang et al., 2022), însă fumul produs de arderea lemnului său este toxic (Lazzaro et al., 2018).

Frunzele de cenușar sunt toxice până la letale pentru animale, excepție făcând caprinele (Bourke, 1996). Dacă pentru cenușar au fost realizate teste cutanate pentru confirmarea alergiilor (Martí-Garrido et al., 2020), studii privind toxicitatea fructelor de oțetar la om nu au fost până în prezent realizate (Wang & Zhu, 2017).

1.2.4. Caracterul aplicativ în medicină și industrie

Atât *A. altissima* cât și *R. typhina* s-au dovedit a fi plante medicinale valoroase, utilizate tradițional în tratarea problemelor gastrointestinale (Lai et al., 2014, Wang et al., 2017), rănilor sau hemoragiilor (Zhu et al., 2020, Opiyo et al., 2021), afecțiunilor sistemului genital (Tabassum et al., 2017, Zhu et al., 2020) și ale celui respirator (Lungu et al., 2016, Liu et al., 2019). Folosit ca „nux vomica” (Pedersini et al., 2011), cenușarul a reprezentat o plantă importantă în homeopatie (Kowarik & Säumel, 2007).

Proprietățile antiproliferative, antimalarice ale cenușarului (Yan et al., 2018, Knüsel et al., 2019) și cele antiseptice și neuroprotective ale oțetarului (Liu et al., 2019, Naik et al., 2021) sunt în prezent demonstrate prin cercetări științifice.

Cenușarul și oțetarul au demonstrat puternice efecte fitotoxice (Trošt Sedej et al., 2021, McCoy et al., 2022) și insecticide (Kozuharova et al., 2022), fiind potrivite pentru obținerea pesticidelor ecologice.

Diferitele extracte ale acestor specii pot fi utilizate în sintetizarea de nanoparticule cu proprietăți antimicrobiene (Ivanușa et al., 2022), anti-diabetice (Samad et al., 2024) sau de creștere a protecției UV (Čuk et al., 2021).

1.3. Sinteza literaturii de specialitate privind aplicarea unor pre-tratamente și a extracției compușilor din materiile prime vizate

1.3.1. Colectarea și uscarea materiei prime

În urma documentării pe baza a 60 de articole publicate în reviste cotate ISI (Clarivate-Web of Science) despre *A. altissima*, respectiv 26 de astfel de lucrări pentru *R. typhina*, căutate utilizând cuvinte cheie precum „applications”, „bioactive compounds”, „biofuels”, „allergens”, etc., au fost conturate următoarele observații:

- ❖ Cele mai multe studii cu privire la potențialul aplicativ al celor două specii invazive au fost desfășurate în Asia și Europa (inclusiv România);

- ❖ Materialul vegetal a fost cu precădere colectat toamna și vara (în luna septembrie pentru frunzele și semințele de cenușar și în lunile octombrie și august pentru frunzele, fructele și semințele de oțetar);
- ❖ Cea mai studiată componentă a celor două plante a fost reprezentată de frunze;
- ❖ Cele mai multe studii au utilizat materia uscată la temperatura camerei sau în stare proaspătă, depozitată la – 20°C până la momentul extracției;
- ❖ Adesea materialul uscat a fost măcinat și sitat înainte de depozitare;

1.3.2. Extracția compușilor bioactivi

În ceea ce privește extracția compușilor bioactivi, au fost constatate următoarele aspecte:

- ❖ Dintre studiile analizate, cea mai mare parte a lor a fost centrată pe identificarea și izolarea de compuși bioactivi ai celor două specii invazive;
- ❖ Macerarea a fost cea mai frecvent utilizată metodă de extracție pentru cenușar și oțetar, cu o durată de 30 min–10 zile, iar ca metodă modernă populară în studii a fost folosită extracția asistată de ultrasunete, pentru un interval de timp de 30 min– 4 h;
- ❖ S-a preferat prepararea amestecurilor de extracție în raportul de 1:10 (substrat:solvent);
- ❖ Materialul vegetal a fost extras de regulă o singură dată, însă au existat cazuri în care procesul a fost repetat de 2-3 ori;
- ❖ În diferite studii, la finalul extracției, supernatantul a fost concentrat și resuspendat în diferiți solvenți precum apa distilată sau DMSO;
- ❖ Solvenții polari au fost preferați în extracțiile cenușarului și oțetarului, în special metanolul, etanolul și apa distilată, însă rar au fost utilizați și solvenți nepolari precum hexanul, eterul de petrol sau cloroformul;
- ❖ Separarea supernatanților s-a realizat adesea prin utilizarea hârtiei de filtru, centrifugare sau cu filtre de seringă;

1.4. Valorificarea pigmentilor naturali în vopsirea ecologică a materialelor textile

Cele mai importante aspecte de urmărit în vopsirea textilelor vizează siguranța utilizării produselor obținute și impactul procesului de vopsire asupra mediului înconjurător. Aceste cerințe sunt mai bine îndeplinite de coloranții naturali care, deși nu au o capacitate la fel de bună de colorare comparativ cu cei sintetici și consumă mai multe resurse (umane, de timp), sunt biodegradabili, regenerabili și reduc riscurile de apariție a alergiilor sau altor boli grave.

Coloranții naturali au origini diverse, de la organisme simple precum bacteriile și până la nevertebrate precum moluștele și insectele. Aceștia pot proveni și din surse anorganice precum argilele sau sărurile de sulf.

Vopsirea tradițională cu plante a fost populară în Europa din cele mai vechi vremuri și aceasta se bazează pe prezența diferiților compuși de culoare găsiți în structura acestora: antociani, betalaine, carotenoizi, flavonoide, taninuri etc.

Cum nu au fost elaborate standarde care să reglementeze vopsirea naturală a textilelor și caracterul său durabil, diferite surse de substanțe colorante și mordante au fost incluse în criteriile NODS („Natural Organic Dye Standard”) ([Karadag, 2023](#)).

Coloranții naturali nu prezintă utilitate doar în domeniul textil, ci și în cel medical, în cercetare sau în industria alimentară.

Există în prezent o tendință tot mai accentuată de încurajare a dezvoltării domeniului vopsirii textilelor spre o direcție mai ecologică, durabilă, care să susțină principiile economiei circulare, utilizând resurse naturale regenerabile precum resturile agricole, deșeurile vegetale și materia organică a diferitelor plante invazive.

2. CONTRIBUȚII ORIGINALE PRIVIND INFLUENȚA PARAMETRILOR ȘI A TEHNICILOR EXTRACTIVE ASUPRA CONȚINUTULUI DE COMPUȘI BIOACTIVI DIN CENUȘAR (*A. ALTISSIMA*)

2.3.1. Particularități microstructurale ale materiei prime (frunze de *A. altissima*), vizualizate cu ajutorul microscopiei SEM

Tehnica SEM a fost utilizată pentru a obține imagini ale microstructurilor frunzelor de cenușar, proaspete sau uscate la 50°C (probe de vară și de toamnă). În probele analizate au fost puse în evidență elemente epidermice precum perii protectori (tectori) (Figurile 1a,b,c și 2a) și stomatele (Figurile 1c, 2a), găsite într-un număr mai mare pe fața inferioară a foliolelor. O perspectivă de ansamblu asupra glandelor nectarifere găsite la baza feței abaxiale a foliolelor a fost surprinsă, mai multe detalii cu privire la acestea fiind cuprinse în studiul lui [Poljuha et al. \(2023\)](#). Uscarea și măcinarea probelor a dus la deteriorarea pereților celulari, cu apariția de fisuri și scăderea în volum a perilor protectori, iar ceara epicuticulară slab reprezentată a fost dificil de observat în probele examinate.

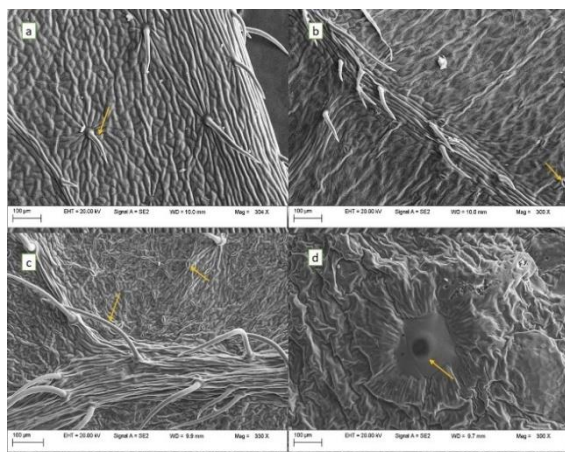


Figura 1: Imagini SEM (300 ×) ale frunzelor proaspete de *A. altissima*: (a) – peri tectori pe epiderma superioară; (b) – stomate și peri de protecție situați pe o nervură din epiderma superioară; (c) – stomate și peri de protecție situați pe nervura principală, vizualizată pe fața abaxială a foliolei; și (d) – nectarie extraflorală situată la baza foliolei (vizualizată pe fața inferioară).

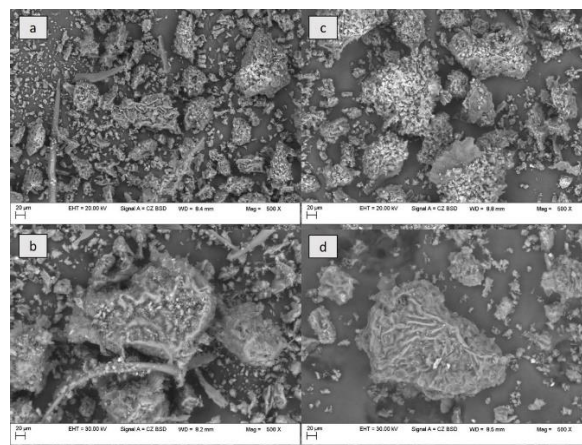


Figura 2: Imagini SEM (500 ×) ale pulberilor frunzelor de *A. altissima*: (a,b) – pulberea din frunze de vară; (c,d) – pulbere din frunze de toamnă. Sunt surprinse elemente precum: (a,b) – peri de protecție; (a) – stomate; (b,d) – fragmente mari din suprafața foliară.

2.3.2. Studiu privind eficiența iradierii cu microunde asupra extracției compușilor bioactivi din frunzele de *A. altissima*

2.3.2.1. Conținutul total de polifenoli, taninuri și activitatea antioxidantă

În urma iradierii probelor, temperatura lor finală nu a depășit 43°C. Rezultatele privind cantitățile dozate de compuși bioactivi din extractele foliolelor congelate și uscate la 60°C, obținute la diferiți parametri de proces, și activitatea lor antioxidantă, au fost incluse în Tabelul 1, fiind anterior publicate în [Cocîrlea, M. D., Miclăuș, S., Oancea, S. \(2022\)](#).

Tabelul 1: Activitatea antioxidantă (FRAP) și conținutul în polifenoli totali (TPC) și taninuri (TTC) ale extractelor etanolice din frunze congelate și uscate de *A. altissima*, obținute prin tehnica MAE

Parametrii experimentali	Control (proba neiradiată)	Durata expunerii (h)	Frecvența (GHz)	Intensitatea câmpului electric incident (V/m)	Valori pentru probele iradiate
Extract din frunze congelate de <i>A. altissima</i>					
TPC (mg GAE/ 100 g s.u.)	1652,47±26,51	0,5	1,74	660	1741,39±21,16
		1	1,74	660	1684,86±42,85
		3	1,74	660	1744,86±22,73
		0,5	2,3	950	1690,89±35,73
		1	2,3	950	1768,01±34,26
		3	2,3	950	1880,18±15,41
TTC (mg CE/ 100 g s.u.)	401,43±5,71	0,5	1,74	660	464,50±2,74
		1	1,74	660	439,89±7,44
		3	1,74	660	448,12±9,06
		0,5	2,3	950	403,93±1,96
		1	2,3	950	469,11±9,55
		3	2,3	950	424,89±4,94
FRAP (mg AAE/ 100 g s.u.)	1566,21±28,95	0,5	1,74	660	1647,05±28,90
		1	1,74	660	1391,25±55,81
		3	1,74	660	1518,17±43,28
		0,5	2,3	950	1506,40±29,41
		1	2,3	950	1583,65±20,84
		3	2,3	950	1694,75±31,28
Extract din frunze uscate de <i>A. altissima</i>					
TPC (mg GAE/ 100 g s.u.)	1158,35±19,55	0,5	1,74	660	1143,37±16,47
		1	1,74	660	1178,64±13,07
		3	1,74	660	1152,19±21,45
		0,5	2,3	950	1138,83±18,35
		1	2,3	950	1196,86±9,49
		3	2,3	950	1161,55±18,09
TTC (mg CE/ 100 g s.u.)	447,41±8,71	0,5	1,74	660	437,66±6,33
		1	1,74	660	442,81±6,41
		3	1,74	660	440,26±7,63
		0,5	2,3	950	463,23±6,62
		1	2,3	950	428,27±6,64
		3	2,3	950	432,94±8,97
FRAP (mg AAE/ 100 g s.u.)	857,96±21,31	0,5	1,74	660	847,65±26,81
		1	1,74	660	842,97±28,71
		3	1,74	660	871,46±19,27
		0,5	2,3	950	841,66±29,22
		1	2,3	950	877,86±21,23
		3	2,3	950	864,85±23,19

Toate extractele obținute au prezentat o activitate antioxidantă considerabilă, susținută de un conținut ridicat în compuși polifenolici, dar o cantitate redusă de taninuri condensate.

Tipul materialului (congelat sau uscat), prin analiza Kruskal-Wallis, a arătat o influență semnificativă asupra mediei conținutului în polifenoli ($p = 0,001725$) și cea a activității

antioxidante FRAP ($p = 0,001745$), cu valori mai mari pentru materia congelată ($p = 0,0009^*$), conform testului lui Dunn.

Valori mai mari ale răspunsurilor TPC, TTC și activității FRAP au fost obținute pentru probele congelate prin iradiere, în special la frecvența de 2,3 GHz, raportat la valorile probelor neiradiate.

2.3.2.2. Caracterizarea extractelor obținute prin iradiere cu microunde, utilizând tehnica ATR-FTIR

Folosindu-se literatura de specialitate (Deepika et al., 2017, Nandiyanto et al., 2019, Awwad & Amer, 2020), au fost identificate benzile de absorbție ale spectrelor FTIR obținute pentru materialul congelat (Figura 3A) și cel uscat (Figura 3B).

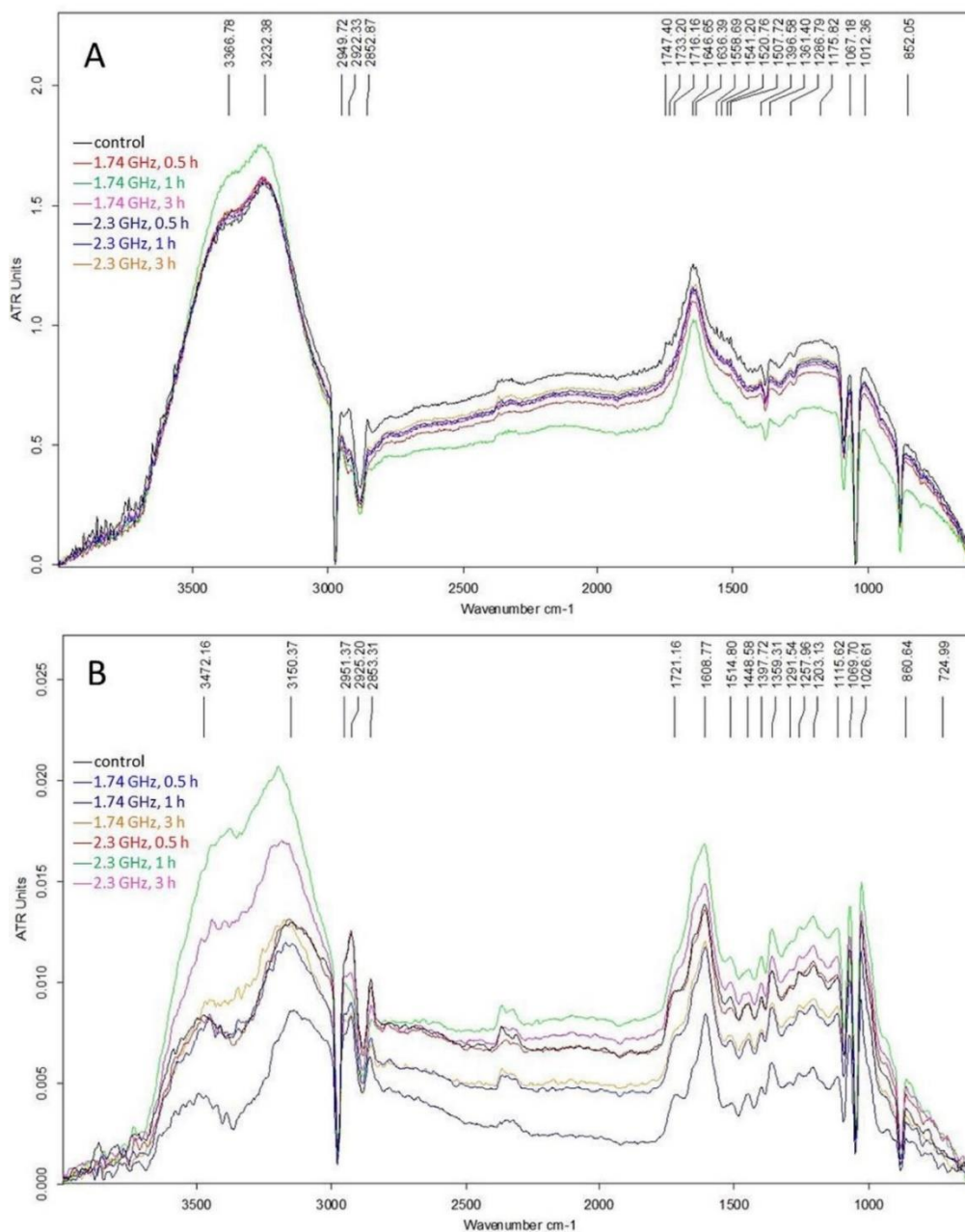


Figura 3: Spectrele ATR-FTIR ale extractelor etanolice din frunze de *Ailanthus altissima*, iradiate și neiradiate (control) cu microunde, preparate din probe congelate (A) și uscate în etuvă (B)

În general spectrele rezultate pentru cele două tipuri de probe au fost asemănătoare. A fost semnalată o decalare și o delimitare mai clară a benzilor de la 3472 și 3150 cm^{-1} din spectrul frunzelor uscate raportat la benzile intense de la 3366 și 3232 cm^{-1} din materialul congelat,

având drept posibilă cauză modificarea unor compuși fenolici (observație în acord cu rezultatele analizei de dozare a TPC) sau obținerea unor extracte mai concentrate din materialul uscat, pentru același raport solvent/solid ca în cazul probelor congelate.

Structura chimică a compușilor nu a fost influențată semnificativ de iradierea cu radiații microunde la frecvențele testate (1,74 și 2,30 GHz), însă acțiunea mecanică pe care aceasta a produs-o asupra pereților celulari, a îmbunătățit randamentul de extracție.

2.3.3. Studiu experimental privind impactul pre-tratamentului și sezonului de colectare a materiei prime, precum și a extracției secvențiale asupra conținutului bioactiv din frunzele de *A. altissima*

2.3.3.2. Impactul pre-tratamentului materiei prime asupra modificărilor de culoare, testate în sistemul CIELAB

Modificările de culoare au fost observate pentru foliolele de cenușar congelate și uscate la temperatura camerei (t.c.), 30°C și 50°C. În general, diferențele pronunțate de culoare au fost rezultatul degradării clorofilei în urma proceselor de uscare. Extractele probelor congelate, situate în gama de culori galben–galben-verzui, au prezentat o luminozitate mai crescută (L^*).

Nuanța roșiatică a pulberilor uscate poate fi asociată cu prezența antocianilor (ex. cianidina) (Vidović et al., 2015), iar cea galbenă – cu a flavonoidelor și carotenoizilor (Carradori et al., 2020, Andonova et al., 2023). Nu au fost raportate modificări semnificative ale diferenței generale de culoare (Tabelul 2) pentru nici una dintre temperaturile de uscare testate în raport cu probele congelate (ΔE fiind >3) (Pathare et al., 2013). Probele uscate au fost mai colorate (mai puțin albe) și au prezentat o notă mai subtilă de galben. Rezultatele obținute, incluse în Tabelul 2, au fost publicate în Cocîrlea, M. D., Soare, A., Petrovici, A. R., Sillion, M., Călin, T., Oancea, S. (2024).

Tabelul 2: Modificarea parametrilor de culoare ai extractelor din probele uscate (t.c., 30°C sau 50°C), comparativ cu cei ai extractelor din probele congelate, folosind sistemul CIELAB (luminozitatea L^* ; roșu-verde a^* ; galben-albastru b^* ; diferențele de culoare ΔE).

Proba	Procesarea materialului	L^*	a^*	b^*	ΔE	Indice de alb	Indice de galben
Extract acetonic din frunze de <i>A. altissima</i>	Câmp vizual de 2°						
	Congelare	27,68 ± 0,82	-43,90 ± 0,05	44,01 ± 0,07	-	-14,81	96,01
	Uscare (t. c.)	0,65 ± 0,11	0,46 ± 0,04	0,83 ± 0,16	67,54	-0,14	74,19
	Uscare (30°C)	1,26 ± 0,05	-0,58 ± 0,07	1,80 ± 0,04	66,00	-0,32	83,86
	Uscare (50°C)	0,38 ± 0,05	0,09 ± 0,04	0,41 ± 0,05	67,68	-0,06	63,04
	Câmp vizual de 10°						
	Congelare	26,63 ± 2,66	-35,05 ± 1,46	43,32 ± 2,83	-	-14,81	96,01
	Uscare (t. c.)	0,60 ± 0,10	0,42 ± 0,06	0,73 ± 0,13	61,23	-0,14	74,19
	Uscare (30°C)	1,16 ± 0,28	-0,40 ± 0,05	1,63 ± 0,42	59,90	-0,32	83,86
	Uscare (50°C)	0,36 ± 0,17	0,15 ± 0,06	0,36 ± 0,07	61,44	-0,06	63,04

2.3.3.3. Conținutul total de compuși bioactivi (polifenoli, flavonoide, taninuri, carotenoizi) din extractele obținute prin procedeul secvențial

În urma realizării extracției secvențiate și dozării compușilor bioactivi s-a observat că etanolul a fost cel mai potrivit solvent pentru obținerea de extracte cu bioactivitate ridicată, indiferent de tipul probelor (congelate, uscate, de vară sau de toamnă).

Rezultatele privind conținutul total de compuși bioactivi sunt prezentate în Tabelul 3.

În timp ce probele congelate de toamnă au prezentat cel mai mare conținut în polifenoli totali (7256,92 ± 13,65 mg GAE/ 100 g s.u.), foliolele congelate de vară au dat cea mai mare

cantitate de flavonoide ($9197,65 \pm 53,43$ mg QE/ 100 g s.u.). Probele uscate de vară au fost cea mai bună sursă de taninuri condensate ($990,35 \pm 0,48$ mg CE/ 100 g s.u.) și carotenoizi ($108,18 \pm 0,64$ mg beta-caroten/ 100 g s.u.).

Tabelul 3: Conținutul în compuși bioactivi din extractele etanolice și hexanice din frunze de *A. altissima*, obținute prin procedeul secvențial

Tipul de pre-tratament și sezonul de colectare	Tipul extractului	TPC (mg GAE/ 100 g s.u.)	TTC (mg CE/ 100 g s.u.)	TFC (mg QE/ 100 g s.u.)	Carotenoizi (mg beta-caroten/ 100 g s.u.)
Congelat (vară)	extract hexanic 1	$18,42 \pm 0,13$	$9,37 \pm 1,51$	$1611,23 \pm 30,00$	$2,62 \pm 0,04$
	extract etanolic 2	$3791,43 \pm 4,76$	$233,68 \pm 3,39$	$6169,3 \pm 16,03$	$75,67 \pm 0,58$
	extract etanolic 1	$5272,62 \pm 11,99$	$347,84 \pm 1,01$	$9197,65 \pm 53,43$	$57,11 \pm 0,09$
	extract hexanic 2	$6,45 \pm 0,15$	$33,54 \pm 3,45$	$410,47 \pm 12,90$	$33,83 \pm 0,14$
Congelat (toamnă)	extract hexanic 1	$9,91 \pm 0,22$	$6,47 \pm 0,59$	$298,59 \pm 28,97$	$1,74 \pm 0,01$
	extract etanolic 2	$5789,12 \pm 3,14$	$285,37 \pm 7,59$	$6020,88 \pm 35,90$	$84,98 \pm 0,29$
	extract etanolic 1	$7256,92 \pm 13,65$	$485,89 \pm 1,80$	$7998,83 \pm 55,38$	$71,59 \pm 0,14$
	extract hexanic 2	$34,41 \pm 0,12$	$23,76 \pm 0,13$	$619,93 \pm 7,20$	$29,64 \pm 0,06$
Uscat (vară)	extract hexanic 1	$64,48 \pm 0,15$	$123,76 \pm 0,03$	$119,37 \pm 0,75$	$70,33 \pm 0,43$
	extract etanolic 2	$5578,37 \pm 0,37$	$990,35 \pm 0,48$	$9176,74 \pm 26,06$	$105,65 \pm 0,54$
	extract etanolic 1	$5378,42 \pm 1,18$	$943,26 \pm 0,90$	$7557,66 \pm 26,29$	$108,18 \pm 0,64$
	extract hexanic 2	$34,70 \pm 0,02$	$36,45 \pm 0,04$	$169,19 \pm 8,02$	$61,32 \pm 0,05$
Uscat (toamnă)	extract hexanic 1	$52,55 \pm 0,08$	$58,59 \pm 0,25$	$90,62 \pm 1,18$	$50,92 \pm 1,39$
	extract etanolic 2	$6180,00 \pm 15,83$	$598,42 \pm 0,93$	$6565,38 \pm 33,38$	$69,69 \pm 0,23$
	extract etanolic 1	$6026,31 \pm 4,89$	$575,50 \pm 0,10$	$7012,84 \pm 21,08$	$55,60 \pm 0,11$
	extract hexanic 2	$14,12 \pm 0,02$	$43,90 \pm 0,09$	$302,68 \pm 23,34$	$44,84 \pm 0,07$

În ceea ce privește extractele etanolice, a fost observată o medie semnificativ statistic mai mare pentru TPC în cazul probelor de vară raportat la cele de toamnă ($p < 0,05$), dar o medie semnificativ mai mică a conținutului în taninuri condensate pentru probele congelate, față de cele uscate ($p = 0,02$). În cazul flavonoidelor și carotenoizilor, diferențele dintre medii nu au fost semnificative între categoriile de material vegetal (de vară vs. de toamnă, respectiv congelat vs. uscat).

Corelațiile dintre variabilele de răspuns analizate au fost semnificative și pozitive ($p < 0,05$), cu excepția celei dintre conținuturile în flavonoide și carotenoizi ($p = 0,0517$).

Rezultatele obținute, publicate în lucrarea [Cocîrlea, M.D., Soare, A., Petrovici, A. R., Sillion, M., Călin, T., Oancea, S. \(2024\)](#) au adus noutate în ceea ce privește variația conținutului

de compuși bioactivi din foliolele de *A. altissima* raportată la sezonul de colectare (vară vs. toamnă) și la pre-tratamentul materiei prime (congelare vs. uscare), completând totodată lacunele privind conținutul de taninuri, mai puțin evaluat în studii.

2.3.3.4. Profilul polifenolic al extractelor etanolice, în funcție de sezonul de colectare și de pre-tratament, determinat prin analiza HPLC

Profilul polifenolic pentru patru extracte etanolice de *A. altissima* (ordine de extracție polar-nepolar), obținute prin tehnica macerării, din foliole congelate și uscate, de vară și de toamnă, a fost investigat prin tehnica HPLC-DAD, utilizând 15 standarde de referință. Timpii de retenție (RT) pentru standardele injectate individual sau în amestec, dar și pentru polifenolii identificați în probele analizate, au fost incluși în Tabelul 4. Cu toate că atunci când amestecul a fost injectat s-au observat suprapuneri ale vârfurilor acidului vanilic și epicatechinei, respectiv ale acizilor siringic și cafeic, în cromatogramele extractelor delimitarea lor a fost bine evidențiată.

Tabelul 4: Timpii de retenție (RT) pentru compuși polifenolici identificați în extractele etanolice din frunze de *A. altissima*

Polifenoli \ Probă	Polifenoli injectați individual	Polifenoli injectați în amestec	Probe			
			Congelat (vară)	Congelat (toamnă)	Uscat (vară)	Uscat (toamnă)
	Timp de retenție (RT) (min)					
Acid galic	10,97	10,84	10,73	10,97	10,71	10,71
Acid protocateuic	13,98	13,90	–	14,04	13,97	13,99
Catechină	15,63	15,91	–	–	–	15,79
Acid vanilic	16,74	suprapus cu epicatechina	16,64	16,79	16,6	16,65
Epicatechină	17,28	17,38	–	–	17,34	–
Acid cafeic	17,49	17,96	–	–	–	–
Acid siringic	18,09	suprapus cu acidul cafeic	–	–	–	–
Rutină	20,42	20,63	20,68	–	20,66	20,70
Acid ferulic	22,38	22,35	22,12	22,32	–	22,38
Acid <i>p</i> -cumaric	23,10	23,46	23,42	23,61	23,49	23,48
Hesperidină	24,01	24,03	24,32	–	24,36	24,38
Acid rozmarinic	26,33	26,69	26,46	–	26,57	26,53
Acid salicilic	29,31	29,61	–	–	–	–
Quercetină	34,72	34,65	–	–	35,07	35,22
Kaempferol	39,71	41,00	–	–	–	–

Nota: "–" compus nedetectat

Compoziția probelor uscate a fost în general asemănătoare pentru cele două sezoane de colectare, diferența fiind reprezentată de înlocuirea catechinei din extractele de toamnă cu epicatechina în extractele de vară. În cazul foliolelor congelate, în probele de vară au fost identificați mai mulți compuși bioactivi decât în cele de toamnă, între care rutina, hesperidina și acidul rozmarinic. Quercetina a fost găsită doar în probele uscate. Rezultatele incluse în Tabelul 4 au fost publicate în [Cocîrlea, M. D., Soare, A., Petrovici, A. R., Sillion, M., Călin, T., Oancea, S. \(2024\)](#).

2.3.3.5. Activitatea antioxidantă a extractelor obținute în urma procedurii secvențială

Activitatea antioxidantă FRAP a extractelor etanolice rezultate din macerarea secvențială a prezentat valori cuprinse între 5043,59–8522,58 mg AAE/100 g s.u., în timp ce pentru activitatea DPPH, rezultatele au fost situate în intervalul 79,11% – 94,50%. Valorile pentru extractele hexanice au fost mult mai reduse, activitatea FRAP situându-se între 0,79–79,95 mg AAE/100 g s.u., iar activitatea antioxidantă DPPH – între 1,85% și 44,45%.

Cea mai puternică activitate pentru fiecare dintre metodele de analiză efectuate, a fost înregistrată la extracte etanolice obținute din reziduu: congelate de toamnă pentru FRAP ($8522,58 \pm 73,86$ mg AAE/ 100 g s.u.) și uscate de vară pentru DPPH ($94,50 \pm 0,02\%$).

Testul Wilcoxon a confirmat prezenta unor medii semnificativ mai mari ale activităților antioxidante analizate la utilizarea etanolului față de hexan ($p = 0,00016$) (Figura 4). Nu au fost raportate diferențe semnificative ale mediilor acestor variabile de răspuns în funcție de tipul de material vegetal utilizat (de vară vs. de toamnă, congelat vs. uscat).

Rezultatele pentru cele două activități antioxidante FRAP și DPPH au fost legate printr-o corelație pozitivă puternică ($p = 0,0006$, $r = 0,76$).

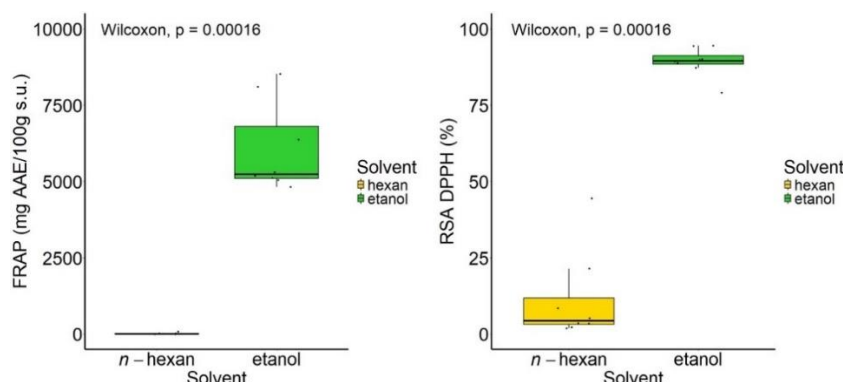


Figura 4: Reprezentare prin boxploturi a activității antioxidante totale (FRAP and DPPH) în funcție de tipul solventului

2.3.3.6. Analiza statistică a datelor experimentale prin prisma eficienței tehnicii cu microunde și a celei secvențiale de extracție a compușilor bioactivi

În cazul activității antioxidante FRAP, analiza modelului GLM a pus în evidență conținutul total în polifenoli ca predictor semnificativ ($p = 9,61 \times 10^{-11}$, $t = 20,65$) pentru extractele obținute prin tehnica MAE, iar în cazul extractelor obținute prin macerarea secvențială, predictorii semnificativi determinați ai acestora au fost: TFC (pentru extractele din probe de vară, congelate sau folosite în a doua etapă de extracție), TPC (pentru extractele din probe de toamnă, uscate sau folosite în prima etapă de extracție). Pentru activitatea DPPH însă, predictorii semnificativi ai extractelor obținute prin tehnica secvențială au fost: TPC (pentru extractele din foliole de vară, uscate sau implicate în a doua etapă de extracție), conținutul în carotenoizi (pentru extractele din foliole de vară sau implicate în prima etapă de extracție) și TFC (pentru extractele din probe congelate).

Eficiența extracției foliolelor de vară sau a celor congelate a crescut când etanolul a fost utilizat ca prin solvent în tehnica secvențială, însă pentru cea a probelor de toamnă sau uscate utilizarea solventului polar în cea de-a doua secvență a fost recomandată.

2.3.3.7. Evaluarea activității antimicrobiene a extractelor etanolice

Cele patru extracte etanolice de foliole de *Ailanthus altissima* obținute prin tehnica secvențială (ordine de extracție polar-nepolar), au prezentat în urma efectuării testelor antimicrobiene *in vitro* efecte de inhibare asupra tulpinilor bacteriene de *Staphylococcus aureus* (izolat clinic) (8-10 mm) și *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) (8-10 mm). Rezultatele privind activitatea microbiană, prezentate în Tabelul 5, au fost publicate în [Cocîrlea, M. D., Soare, A., Petrovici, A. R., Silion, M., Călin, T., Oancea, S. \(2024\)](#).

În ceea ce privește probele congelate, extractele foliolelor de vară au inhibat mai multe tulpini bacteriene. În cazul probelor uscate, extractele foliolelor de toamnă au inhibat șase tulpini bacteriene din zece, fiind numărul maxim de tulpini patogene sensibilizate în studiul de față pentru această plantă.

Activitatea antifungică testată asupra unei tulpini de *Candida albicans* a fost absentă.

Diametrele zonelor de inhibare determinate de cele patru extracte testate pentru tulpinile de *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* și *S. pyogenes* au fost situate sub limita inferioară a diametrelor determinate de antibiotice standard precum ampicilina, gentamicina sau penicilina (CLSI, 2022, EUCAST, 2023).

Tabelul 5: Diametrul de inhibare (mm) a creșterii microorganismelor în prezența diferitelor extracte etanolice din frunze de *A. altissima*

Tulpină microbiană \ Probă	Diametrul de inhibare (mm)			
	Congelat (vară)	Congelat (toamnă)	Uscat (vară)	Uscat (toamnă)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	—	—	8,0 ± 0,1	8,0 ± 0,1
<i>Staphylococcus aureus</i> (izolat clinic)	8,0 ± 0,1	8,0 ± 0,1	10,0 ± 0,2	10,0 ± 0,2
<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC 19615)	—	—	—	8,0 ± 0,1
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	8,0 ± 0,1	9,0 ± 0,2	9,0 ± 0,2	10,0 ± 0,3
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	—	—	—	8,0 ± 0,1
<i>Salmonella enterica</i> (ATCC 13076)	—	—	—	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	—	—	—	—
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	9,0 ± 0,2	—	—	10,0 ± 0,2
<i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC13084)	—	—	—	—
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	—	—	—	—

“—” = lipsa activității inhibitorii

2.3.3.8. Cercetări experimentale privind riscurile de mediu și sănătate realizate în perspectiva aplicațiilor practice ale extractelor din frunzele de *A. altissima*

Testele de toxicitate efectuate *in vitro* asupra extractului etanolic din foliole de toamnă uscate au indicat un efect ecotoxic și citotoxic cu tendința generală de creștere pe măsură ce doza aplicată a extractului analizat a fost crescută. Astfel, indicii de creștere și germinare ai cariopselor de grâu și tomate au fost cel mai puternic afectați de concentrația de 1000 µg/mL, efectul toxic asupra larvelor de *Artemia salina* s-a instalat la 3h distanță de la expunerea la concentrația de 2000 µg/mL, rata cea mai mare a hemolizei (6,95 ± 1,04%) a fost observată pentru concentrația maximă analizată de 1000 µg/mL, testul MTS a indicat pentru celulele HGF, HepG2 și MeWo un nivel scăzut de citotoxicitate pentru cea mai mare cantitate de extract la care au fost supuse (500 µg/mL), iar cea mai mare cantitate de carboxifluoresceină eliberată prin ruperea membranei lipozomale a fost de 6,83% pentru o fracție de 200 µg de extract.

3. CONTRIBUȚII ORIGINALE PRIVIND INFLUENȚA PARAMETRILOR ȘI A TEHNICILOR EXTRACTIVE ASUPRA CONȚINUTULUI DE COMPUȘI BIOACTIVI DIN OȚETAR (*R. TYPHINA*)

În ceea ce privește bioactivitatea fructelor de *R. typhina*, un prin experiment a vizat construirea unui design experimental de tip Box-Behnken în cadrul căruia să fie optimizate valorile a trei parametri de extracție astfel încât răspunsurile unor compuși bioactivi de interes să fie crescute. Nivelurile parametrilor (inferior, superior și central) au fost incluse în Tabelul 6, iar condițiile rezultate din design pentru un număr de 15 extracții sunt prezentate în Tabelul 7. Aceste date au fost publicate în [Cocîrlea, M. D., Simionescu, N., Călin, T., Gatea, F., Badea, G. I., Vamanu, E., Oancea, S. \(2024\)](#).

Tabelul 6: Nivelurile parametrilor de proces selectați pentru designul Box-Behnken

Variabila [unitatea]	Simbol	Nivelul		
		Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
Concentrația solventului [%]	X1	40	55	70
Timpul extracției cu ultrasunete [min]	X2	10	20	30
Raportul solvent/solid [v/w]	X3	10/1	15/1	20/1

Tabelul 7: Condițiile experimentale de extracție a compușilor bioactivi din fructele de *R. typhina*, conform modelului Box-Behnken creat

Nr. experimente	Concentrația solventului (%)	Timpul extracției cu ultrasunete (min)	Raportul solvent/solid (v/w)
1	40	10	15/1
2	70	10	15/1
3	40	30	15/1
4	70	30	15/1
5	40	20	10/1
6	70	20	10/1
7	40	20	20/1
8	70	20	20/1
9	55	10	10/1
10	55	30	10/1
11	55	10	20/1
12	55	30	20/1
13	55	20	15/1
14	55	20	15/1
15	55	20	15/1

3.3.1. Particularități microstructurale ale materiei prime (fructe de *R. typhina*) vizualizate cu ajutorul microscopiei SEM

Microstructura drupelor proaspete și uscate, întregi sau măcinate, de *R. typhina* a fost vizualizată utilizând microscopia SEM și au fost puși în evidență numeroșii peri tectori aciculari pe suprafața exterioară a fructelor (Figura 5e) și locurile lor de inserție pe particulele de dimensiuni mai mari din pulberea mărunțită și sitată (Figura 5b). Pulberea alcătuită din particule neuniforme include fragmente din învelișul semințelor. Imaginea SEM a unei semințe de oțetar este redată în Figura 5f, iar o secțiune transversală prin învelișul acesteia poate fi observată în Figura 5c. Autori precum [Ali & Al-Hemaid \(2011\)](#) au explicat că ornamentația și compoziția microstructurală a diferitelor semințe poate ajuta la determinarea diferitelor specii de plante sau familii.

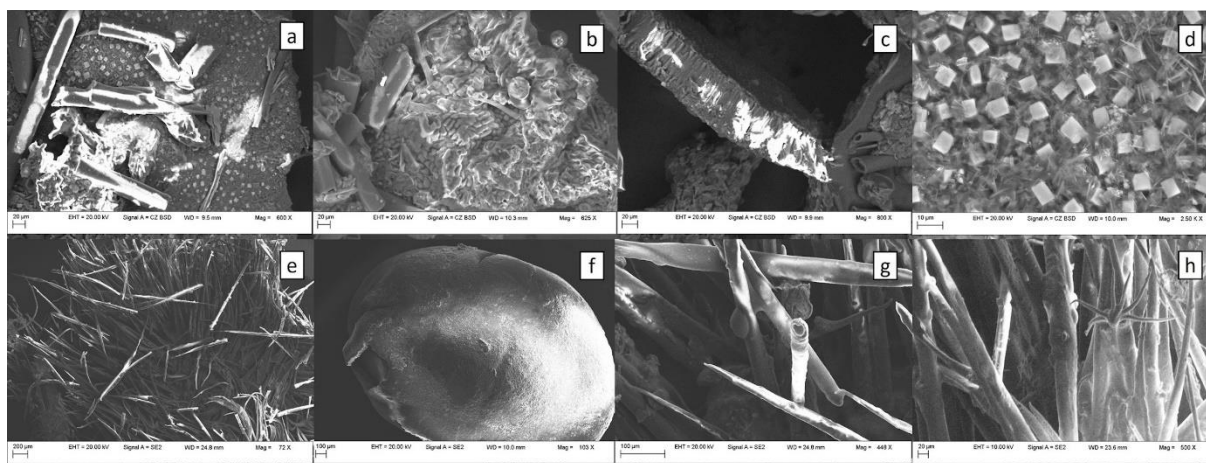


Figura 5: Imagini SEM ale fructelor de *R. typhina*, realizate la diferite mărimi (72 ×, 2,5 K ×): (a,b) omogenat din fructe proaspete; (c) fructe uscate măcinate; (d,f) sămânță; (e, g, h) fruct uscat (întreg).

3.3.2. Influența procedurii și a parametrilor de extracție, asistată de ultrasunete și cu bile, asupra conținutului total de compuși bioactivi și activității antioxidante din fructele de *R. typhina*

Două tehnici moderne de extracție, respectiv extracția asistată de ultrasunete (UAE) și extracția prin agitare cu bile (BBE), au fost utilizate cu scopul obținerii de produse cu activitate biologică puternică. Au fost dozate conținuturile următoarelor categorii de compuși: antociani (TAC), polifenoli totali (TPC), taninuri condensate (TTC), flavonoide (TFC) și carotenoizi, fiind ulterior analizate activitățile antioxidante măsurate prin analizele FRAP și DPPH.

Extracția asistată de ultrasunete (UAE)

a. Conținutul în compuși bioactivi

Extracțiile realizate utilizând tehnica UAE au fost desfășurate conform condițiilor prezentate în Tabelul 7. Concentrația de 55% a solventului a prezentat cele mai bune rezultate pentru majoritatea compușilor bioactivi analizați, atunci când extracția a durat 30 min. Majoritatea compușilor au fost extrași în cantități mai mari din amestecurile mai diluate (raport solvent/solid de 20/1 (v/w)), însă antocianii au fost mult mai bine izolați din amestecurile mai concentrate (10/1 (v/w)). Valorile TAC au fost singurele crescute pentru timpul cel mai scurt de extracție utilizat (10 min).

Aplicarea testului Kruskal-Wallis și testului lui Dunn au pus în evidență observații precum: mediile TAC și TFC au fost semnificativ mai mari la concentrația solventului de 55% decât la 70% ($p = 0,0032^*$, respectiv $0,0440$), conținutul în polifenoli, flavonoide și carotenoizi

a fost mai mare la raportul de 20/1 (v/w) decât la cel de 10/1 (v/w) ($p = 0,0008^*$, $p = 0,0171^*$, $p = 0,0085^*$). Valoarea medie a TTC a fost semnificativ mai mare când extracția a durat 30 de min față de extracția de 10 min ($p = 0,0136^*$) (Figura 6).

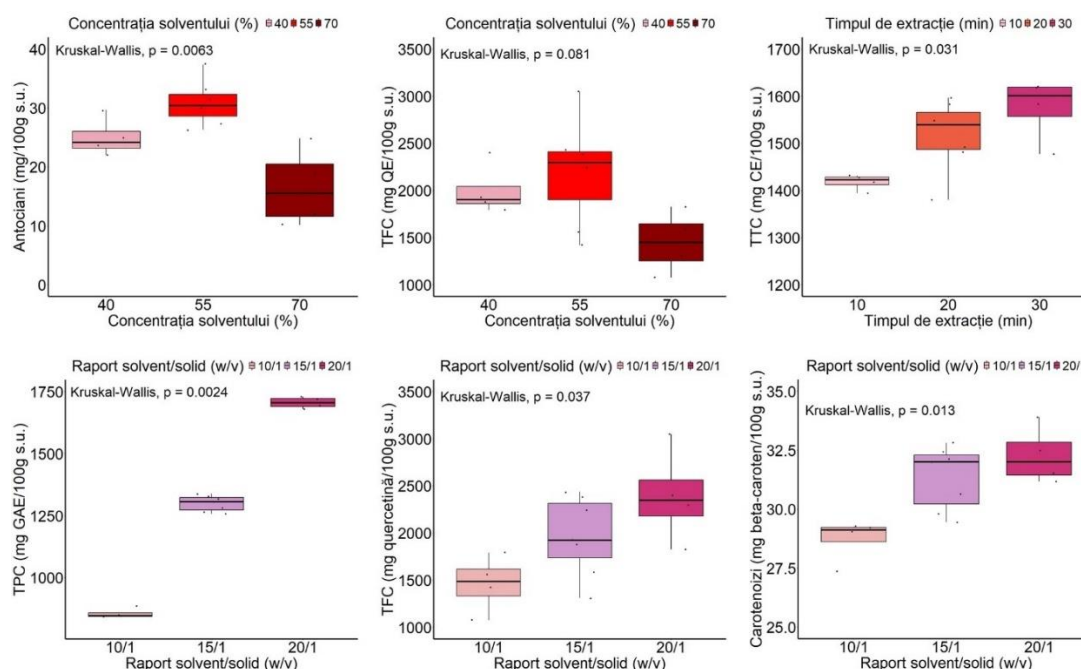


Figura 6: Reprezentări boxplot ale TAC, TPC, TTC, TFC din fructele de oțetar în funcție de parametrii UAE (concentrația solventului, timpul de extracție și raportul solvent/solid)

b. Evaluarea activității antioxidante

Rezultatele activității antioxidante FRAP pentru cele 15 extracții realizate prin tehnica UAE au fost cuprinse în intervalul $106,817 \pm 2,687$ - $910,749 \pm 4,572$ (mg AAE/ 100 g s.u.), în timp ce valorile activității DPPH s-au situat între $84,422 \pm 0,089$ - $91,257 \pm 0,059$ %. Pentru ambele metode de investigare a activității antioxidante totale, raportul solvent/solid de 20/1 a oferit cele mai bune rezultate, indiferent de durata extracției. Analiza Kruskal-Wallis și testul lui Dunn au indicat medii mult mai crescute la raportul de 20/1 (v/w) față de cel de 10/1 (v/w) ($p = 0,0008^*$) (Figura 7).

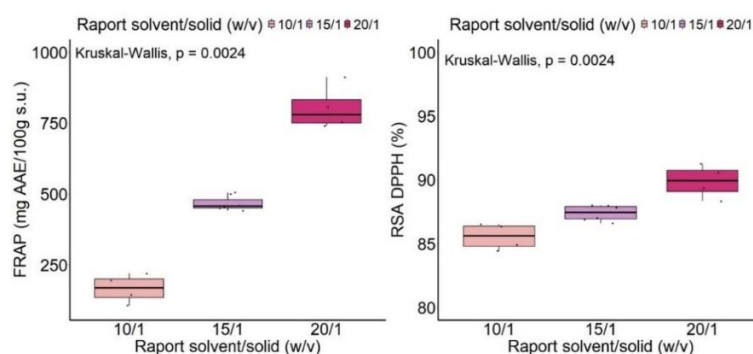


Figura 7: Reprezentare boxplot a activității antioxidante a fructelor de *R. typhina* extrase prin tehnica UAE, în funcție de raportul solvent/solid

Extracția prin agitare cu bile (BBE)

a. Conținutul în compuși bioactivi

Condițiile de extracție optime identificate pentru tehnica UAE, utilizând un design de tip Box-Behnken, au indicat o concentrație a solventului de 61,51% și un raport solvent/solid de

20/1 (v/w), acestea fiind apoi utilizate în tehnica extracției BBE. În cadrul acestora parametrii variați au fost: timpul de extracție (5 min vs. 10 min), dimensiunea bilei în mm (1,4, 2,4 vs. 2,8) și tipul de material al bilei (ceramică vs. metal).

Cele mai mari valori TAC au fost găsite la utilizarea bilelor de ceramică de 2,8 mm, în timp ce conținutul în taninuri a crescut în extracția cu bile de metal de 2,4 mm.

Aplicarea testului Kruskal-Wallis alături de testul lui Dunn a dus la următoarele observații: media TAC a fost mult mai mică la utilizarea bilelor de 2,4 mm decât la folosirea celor de 2,8 mm ($p = 0,0428$), media TTC a crescut în probele unde au fost utilizate bilele de metal și de 2,4 mm, raportat la probele control ($p = 0,045^*$, respectiv $0,0089^*$), iar media conținutului în carotenoizi a fost mai mare la utilizarea bilelor de metal ($p = 0,0057^*$), cu dimensiunea de 2,4 mm și 2,8 mm ($p = 0,0113^*$, respectiv $p = 0,0280$), decât în control (Figura 8).

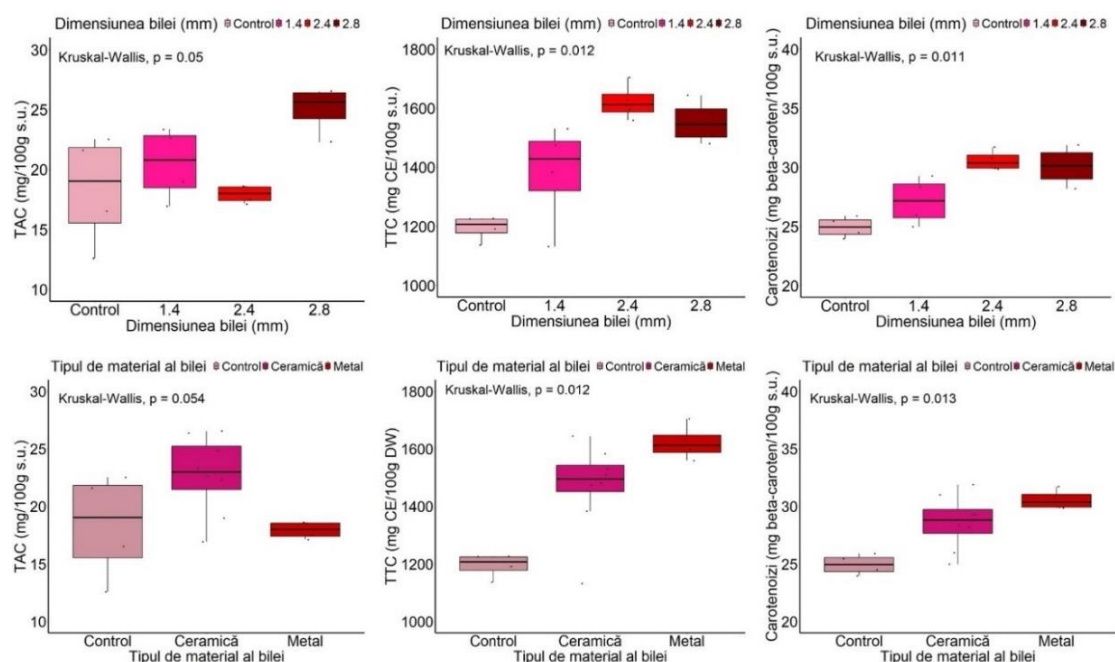


Figura 8: Reprezentări boxplot ale TAC, TPC, TTC, TFC din fructele de oțetar, în funcție de parametrii BBE (dimensiunea bilei, tipul de material al bilei)

b. Evaluarea activității antioxidante

Valorile activității antioxidante FRAP măsurată pentru extractele obținute prin tehnica BBE au fost situate între $702,25 \pm 0,75$ și $885,03 \pm 1,64$ mg AAE/ 100 g s.u., în timp ce activitatea DPPH măsurată a fost găsită în intervalul $83,26 \pm 0,42$ - $93,32 \pm 0,04$ (%).

Activitatea antioxidantă FRAP a fost mai mare în extractele pentru care s-au utilizat bilele de 1,4 mm, în timp ce pentru activitatea DPPH, bilele de 2,8 mm au fost mult mai eficiente.

Analizele Kruskal-Wallis și testul lui Dunn au pus în evidență o medie mai mare a activității FRAP la durată extracției de 5 min ($p = 0,0230^*$) comparativ cu cea de 10 min, și la utilizarea bilelor de 1,4 mm față de cele de 2,4 mm ($p = 0,0180^*$), respectiv a celor de ceramică față de cele de metal ($p = 0,0432$). În schimb, activitatea DPPH a fost semnificativ mai mare în urma extracției cu bile de 2,8 mm decât cu cele de 2,4 mm ($p = 0,0347$) (Figura 9).

Deoarece timpul de 5 min a influențat semnificativ doar media activității antioxidante totale FRAP, a fost folosită această valoare a parametrului ca fiind optimă pentru prepararea extractului suspus ulterior analizei antimicrobiene și testelor de toxicitate *in vitro*.

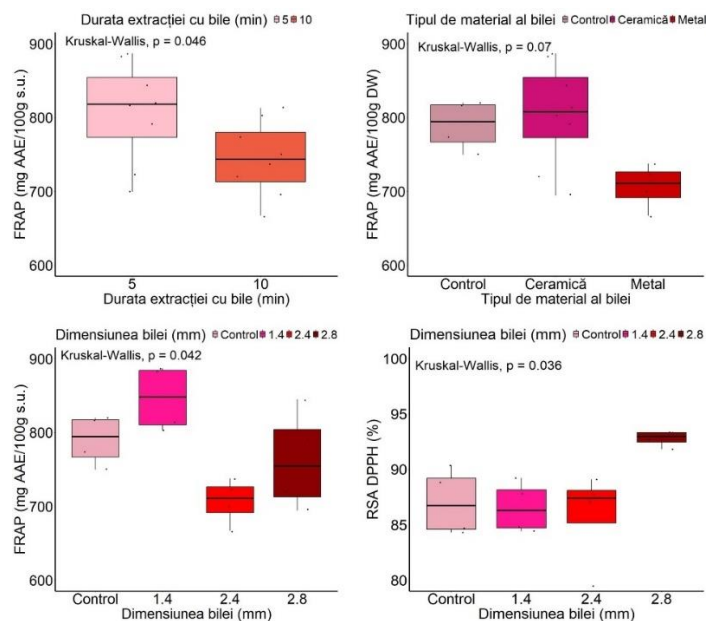


Figura 9: Reprezentare boxplot a activității antioxidante a fructelor de *R. typhina* extrase prin tehnica BBE, în funcție de durata extracției, dimensiunea bilei și tipul de material al bilei

3.3.3. Profilul polifenolic al extractului etanolic BBE, determinat prin analiza HPLC

Analizarea profilului polifenolic al extractului BBE din fructe de *R. typhina*, obținut în condiții optimizate (soluție hidro-alcoolică 61,51%, bile ceramice de 2,8 mm, raport solvent/solid de 20/1, durata de 5 min), prin tehnica HPLC-DAD a permis evidențierea prezenței și cuantificarea a doi acizi fenolici și a unui flavonoid de însemnătate biologică ridicată (Tabelul 8).

Compusul predominant în extractul obținut a fost acidul *p*-cumaric ($17,62 \pm 0,59 \mu\text{g/mL}$), urmat de acidul ferulic ($8,91 \pm 0,74 \mu\text{g/mL}$) și miricetină ($8,89 \pm 0,23 \mu\text{g/mL}$), cu valori apropiate ale concentrațiilor.

Tabelul 8: Compuși polifenolici identificați prin analiza HPLC în extractul etanolic din fructe de *R. typhina*

Compus polifenolic	Concentrație ($\mu\text{g/mL}$)
Acid <i>p</i> -cumaric	$17,62 \pm 0,59$
Acid ferulic	$8,91 \pm 0,74$
Miricetină	$8,89 \pm 0,23$

3.3.4. Activitatea antimicrobiană a extractului etanolic BBE

Extractul din drupe de oțetar obținut prin tehnica BBE (concentrația solventului de 61,51%, raport solvent/solid de 20/1 (v/w), durata de 5 min, bile ceramice de 2,8 mm, concentrat până la jumătate din volumul inițial) a prezentat efecte de inhibare a creșterii a șase tulpini bacteriene testate (trei specii Gram-pozitive și trei specii Gram-negative). Rezultatele incluse în Tabelul 9 au fost publicate în [Cocîrlea, M. D., Simionescu, N., Călin, T., Gatea, F., Badea, G. I., Vamanu, E., Oancea, S. \(2024\)](#).

Cele mai mari diametre pentru zonele de inhibare produse de prezența extractului, au fost identificate în cazul tulpinilor de *Streptococcus pyogenes* (20 mm) și *Salmonella enterica* (12 mm). Diametrele observate pentru celelalte specii patogene afectate (*Bacillus subtilis*,

Enterococcus faecalis, *Klebsiella pneumoniae* și *Salmonella* group D (izolat clinic)) nu au depășit 8 mm. Efectul antifungic asupra tulpinilor de *C. albicans* și *Saccharomyces cerevisiae* a fost absent.

Tabelul 9: Zonele de inhibare (mm) a microorganismelor patogene în prezența extractului etanolic din fructe de *R. typhina*

Categoria	Tulpina microbiană	Zona de inhibare (mm)
Bacterii gram-pozitive	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	8
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	8
	<i>Enterococcus faecalis</i> VRE ATCC 51299	–
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	–
	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	20
Bacterii gram-negative	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	–
	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC13316	–
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	–
	<i>Klebsiella aerogenes</i> ATCC 13048	–
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	8
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	–
	<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13076	12
Fungi	<i>Candida albicans</i> ATCC10231	–
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC9763	–
Izolate bacteriene clinice sau din alimente		
Bacterii gram-pozitive	<i>Staphylococcus aureus</i> (izolat clinic)	–
	<i>Staphylococcus aureus</i> (izolat din alimente)	–
	<i>Streptococcus anginosus</i> (izolat clinic)	–
	<i>Streptococcus anginosus</i> group F (izolat clinic)	–
	<i>Streptococcus mutans</i> (izolat clinic)	–
Bacterii gram-negative	<i>Salmonella</i> group D (izolat clinic)	8

3.3.5. Optimizarea condițiilor de extracție prin tehnica UAE a compușilor bioactivi din fructele de *R. typhina* utilizând Metoda Suprafeței de Răspuns (MSR)

În cadrul acestei secțiuni s-a urmărit optimizarea parametrilor de extracție pentru tehnica UAE (concentrația solventului (X_{Sc}), timpul de extracție (X_T) și raportul solvent/solid (X_R)), folosind designul de tip Box-Behnken, astfel încât valorile TAC (Y1), TPC (Y2) și activităților antioxidante FRAP (Y6) și DPPH (Y7) să fie cât mai mari, iar valoarea TTC (Y3) – cât mai scăzută. Rezultatele obținute, incluse în Tabelul 10, au fost publicate în [Cocîrlea, M. D., Simionescu, N., Călin, T., Gatea, F., Badea, G. I., Vamanu, E., Oancea, S. \(2024\)](#).

Analiza de optimizare a indicat ca valori potrivite pentru variabilele independente incluse în studiu, raportat la cerințele de maximizare și minimizare a unor compuși bioactivi și a activităților antioxidante totale, următoarele: concentrația solventului de 61.51%, timpul de extracție de 10 min și raportul solvent/solid de 20/1 (v/w).

Dezirabilitatea compozită de 0,7719 încadrează rezultatele analizei de optimizare ca fiind acceptabile pentru răspunsurile urmărite, luate ca un tot, sau separat.

Tabelul 10: Valorile optime de extracție UAE rezultate din optimizarea pentru parametrii analizați

Răspunsul	Scopul	Răspunsul prezis	Dezirabilitatea	Dezirabilitatea compozită	Valorile optime pentru factori
Y1	Maximizare	29,2151	0,7010	0,7719	$X_{Sc} = 61,5152 \%$; $X_T = 10 \text{ min}$; $X_R = 20/1 \text{ (v/w)}$;
Y2	Maximizare	1698,0266	0,9547		
Y3	Minimizare	1430,4662	0,7896		
Y6	Maximizare	848,0085	0,9220		
Y7	Maximizare	88,2253	0,5565		

Graficele de perspectivă, realizate cu scopul observării influenței simultane a doi parametri de extracție (al treilea parametru se consideră a fi constant) asupra variabilelor de răspuns măsurate, au evidențiat o tendință de creștere a conținuturilor în antociani și taninuri în extractele preparate în raport 20/1 (v/w), pentru concentrații medii sau scăzute ale solventului (Figura 10 (I, III a)). Scăderea timpului de extracție și creșterea gradului de concentrare al extractului (10/1 (v/w)) au provocat creșteri ale rezultatelor TAC (Figura 10 (I b)). Odată cu mărirea raportului de extracție (diluarea amestecului), conținutul în polifenoli totali și taninuri a crescut odată cu mărirea timpului de proces (Figura 10 (II–III b)). Tot în contextul unei extracții mai îndelungate, rezultate mai scăzute pentru TAC, TPC și TTC au fost observate utilizarea unei soluții hidro-alcoolice mai concentrate (Figura 10 (I–III c)).

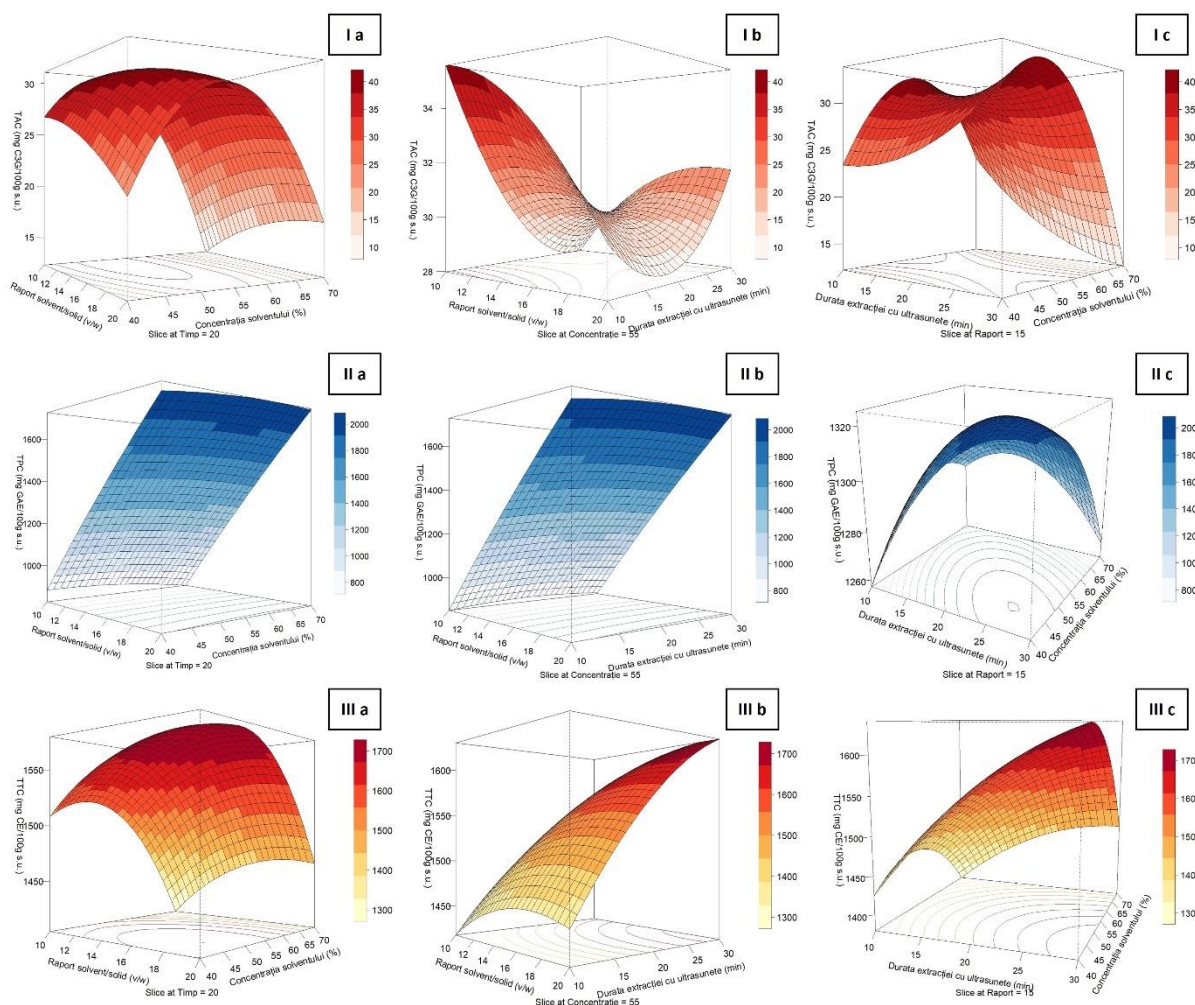


Figura 10: Graficele 3D ale suprafeței de răspuns arătând efectele: raportului solvent/solid și concentrației solventului (I–III a), raportului solvent/solid și duratei de extracție (I–III b), duratei de extracție și concentrației solventului (I–III c), asupra I – TAC, II – TPC, III – TTC.

Activitatea antioxidantă FRAP a scăzut odată cu prelungirea duratei de extracție a unui amestecat preparat cu solvent mai concentrat, în timp ce pentru activitatea DPPH efectul acestor condiții a fost opus, determinând creșterea sa (Figura 11 (I–II c)). Odată cu creșterea raportului solvent/solid, aplicarea unor timpuri mai lungi de extracție au produs valori mai mari ale activității DPPH, în timp ce aplicarea acestor condiții a dus la reducerea activității FRAP (Figura 11 (I–II b)).

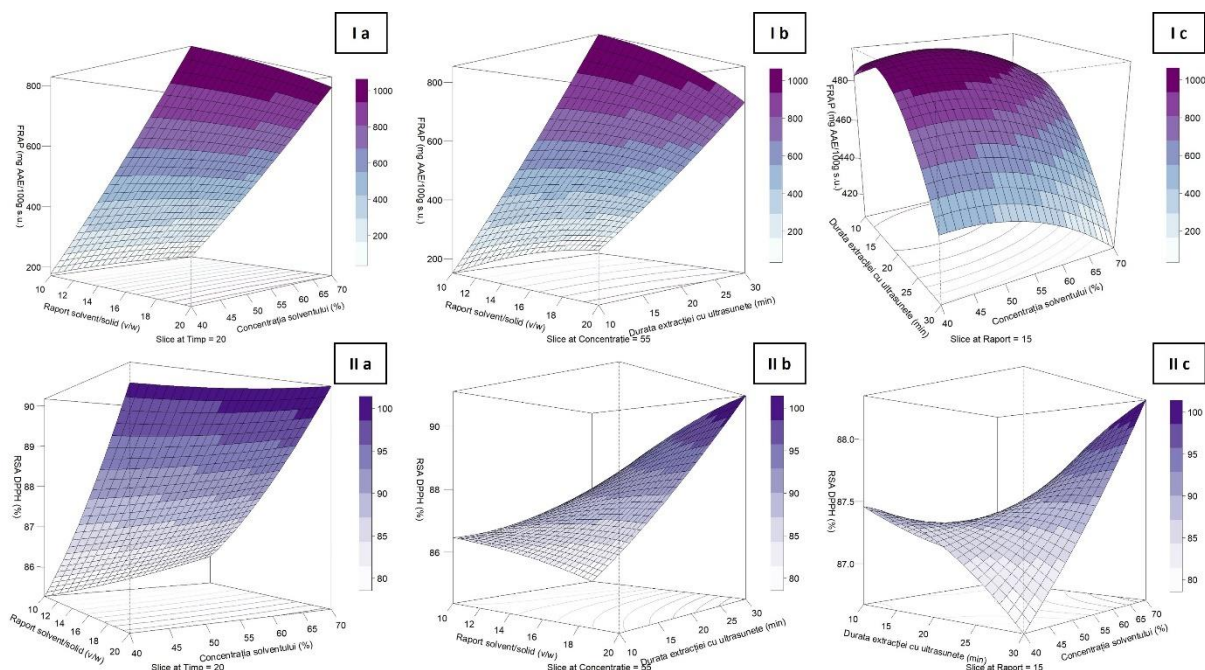


Figura 11: Graficele 3D ale suprafeței de răspuns arătând efectele: raportului solvent/solid și concentrației solventului (I–III a), raportului solvent/solid și duratei de extracție (I–III b), duratei de extracție și concentrației solventului (I–III c), asupra I – TAC, II – TPC, III – TTC.

3.3.6. Analiza comparativă privind eficiența extracției compușilor bioactivi din fructele de *R. typhina* prin tehnicile UAE și BBE

Utilizând separat rezultatele obținute în extracțiile fructelor de oțetar prin tehnicile UAE și BBE, au fost calculate două tipuri de valori medii: una generală, cuprinzând toate valorile, indiferent de condițiile experimentale aplicate, și o a doua medie, mai specifică, incluzând doar valorile extractelor obținute la o durată a procesului de 10 min. Observarea mediei generale a indicat că cele mai bune rezultate pentru TAC, TFC și conținutul în carotenoizi au fost date de extracția UAE, în timp ce valorile medii ale TPC, TTC și FRAP au crescut în extracția BBE. În ceea ce privește media calculată folosind valorile obținute la 10 min de extracție, tehnica BBE a produs valori mai mari pentru patru din cele șase variabile de răspuns: TPC, TTC, FRAP, DPPH, iar conținutul în carotenoizi a fost similar cu cel al extractelor obținute prin metoda UAE. Astfel, tehnica agitării cu bile a fost preferată deoarece în cazul ambelor tehnici de extracție a furnizat cel mai mare conținut în polifenoli totali și cea mai ridicată activitate antioxidantă FRAP, și aducând avantajul unei mai mari stabilități termice a amestecului și limitarea riscului de contaminare între probe, comparativ cu metoda extracției cu ultrasunete.

Analizarea relației dintre datele experimentale obținute pentru extractele de *R. typhina* prin modele liniare GLM

Analiza modelelor liniare GLM pentru extracția cu ultrasunete a evidențiat variabila TPC ca fiind predictorul semnificativ în modelul activităților antioxidante totale FRAP și DPPH ($t = 10,389$; $p = 2,37 \times 10^{-7}$ ***, respectiv $t = 6,594$; $p = 1,73 \times 10^{-5}$ ***). În cazul extracției cu bile, predictorul semnificativ al activității FRAP a fost conținutul în carotenoizi ($t = -4,647$; p

= 0,00046 ***), în timp ce TAC a fost predictorul semnificativ pentru activitatea DPPH ($t = 1,999$; $p = 0,0655$).

3.3.7. Cercetări experimentale privind potențialul citotoxic al extractului din fructele de *R. typhina*

Analizarea *in vitro* a efectelor potențial toxice ale fructelor de oțetar (extract obținut prin tehnica BBE realizată în condițiile: soluție etanolică 61,51%, bile de ceramică de 2,8 mm, raport solvent/solid de 20/1 (v/w), durata extracției de 5 min) a arătat o creștere a efectului toxic în contextul măririi concentrației de extract testate. Cea mai puternică rată a hemolizei a fost înregistrată la cea mai mare concentrație testată (1000 $\mu\text{g/mL}$), cu valoarea de $19,85 \pm 1,30\%$, în timp ce cea mai mare citotoxicitate a fost observată pentru concentrația de 500 $\mu\text{g/mL}$ (cea mai mare dintre cele testate) asupra celulelor HepG2, cu un procent de viabilitate de 62% după 24 h de incubare.

4. CERCETĂRI APLICATIVE PRIVIND UTILIZAREA EXTRACTULUI DIN FRUCTE DE OȚETAR (*R. TYPHINA*) ÎN VOPSIREA ECOLOGICĂ A MATERIALELOR TEXTILE

4.2. Strategii clasice și moderne de vopsire a materialelor textile

Mordanții chimici pot fi împărțiți în două categorii: care închid culoarea și respectiv, care o deschid (Singh et Singh, 2018). Acidul tanic și acidul citric, prin prezența mai multor grupări hidroxil sau carboxil, joacă rolul unor bio-mordanți, capabili să crească afinitatea substratului textil celulozic pentru particulele colorante (Ontiveros-Ortega et al., 1998, Darmawan et al., 2024). A fost observat că sulfatul de fier poate oferi materialului tratat umbre verzui (Singh & Singh, 2018).

Ca tehnici de vopsire care se utilizează în prezent în studii, pot fi enumerate: metoda sonicării (Periyasamy, 2022), vopsirea prin fierbere (cea mai comună) (Hossain, 2023), vopsirea cu aparate/mașinării specifice (Ain et al., 2024), vopsirea asistată de microunde (Yameen et al., 2023), etc.

4.3. Rezultate privind vopsirea ecologică a țesăturilor de bumbac cu extractul din fructe de *R. typhina*

În extractul apos din drupe de *R. typhina* preparat pentru vopsirea eşantioanelor textile de bumbac (macerare la temperatura camerei, timp de 24 h, la întuneric, în apă distilată adusă inițial la 40 °C), a fost identificată prezența unui conținut de antociani de $18,29 \pm 1,35$ mg cianidin-3-O-glucozidă/ 100 g s.u.

4.3.1. Caracterizarea cromatică și testarea rezistenței la spălare și frecare uscată a probelor de bumbac vopsite cu extractul din fructe de *R. typhina*

Probele de bumbac au fost supuse vopsirii în extractul din fructe de *R. typhina* prin tehnica clasică a epuizării și tehnica modernă a ultrasonării, în prezența soluțiilor mordanților chimici și ecologici de concentrație 3% sau 5% (meta-mordansare). Ca probe de referință au fost folosite eşantioane de bumbac nevopsite și eşantioane de bumbac vopsite în absența mordansării. Rezultatele unui număr de 22 de variante experimentale de vopsire ecologice cu extractul natural obținut din fructele de oțetar, privind parametrii de culoare specifici și rezistența culorii la apă și frecare uscată, au fost publicate în Cocîrlea, M.D., Coman, A., Popovici L.F., Oancea S., Coman D (2024).

Luminozitatea probelor vopsite a fost redusă de tratarea substratului textil cu mordanți, raportat la probele netratate, indiferent de tipul mordantului (clasic, ecologic) sau concentrația soluției sale. În cazul epuizării, pentru cei mai mulți dintre mordanții testați, concentrația de 3% a scăzut cel mai puternic luminozitatea (în cazul sulfatului de fier (II) și a sulfatului de cupru, concentrația de 5% a dat cea mai scăzută luminozitate). În ceea ce privește tehnica ultrasonării, concentrația mai mare (5%) a dat cele mai mici valori pentru parametrul ΔL^* , excepție făcând

În general, apropierea culorii de regiunea roșie a spectrului colorimetric a scăzut față de probele netratate prin utilizarea acidului tanic și a mordanților chimici, însă a crescut ușor prin tratarea eșantioanelor cu acid citric. Probele tratate cu FeSO_4 au prezentat valori ale coordonatei b^* cu tendință spre regiunea albastră.

Eșantioanele albe de bumbac au prezentat în urma vopsirii cu extract din fructe oțetar nuanțe în zona roz-violet-deschis, variate în funcție de soluția de mordant utilizată pentru fixarea culorii.

Diferențele generale de culoare, acestea au fost mici în cazul vopsirii US, temperatura procesului de 40°C contribuind la acest aspect. Analizând valorile diferenței de nuanță (ΔH^*) s-a observat că eșantioanele tratate cu bio-mordanți (3-5%) au prezentat nuanțe roz-portocalii, asemănătoare probelor netratate, în timp ce tonul culorii a fost îndreptat spre verzui-albastru în cazul utilizării sulfatului de fier. În ceea ce privește saturația probelor, aceasta a prezentat o valoare medie mai mare în cazul vopsirii prin tehnica ultrasonării.

Tratarea materialului textil celulozic cu mordanți ecologici a scăzut cu 1-2 unități rezistența la apă față de cea a probelor mordansate cu mordanții clasici. În ceea ce privește rezistența la frecare, nu au fost constatate diferențe vizibile pentru cele două categorii de mordanți utilizați. Dintre mordanții ecologici, soluția de acid citric 5% a oferit cea mai bună rezistență la frecare bumbacului vopsit, apropiată de cea obținută pentru sulfatul de fier (5%) și amestecul de FeSO_4 (3-5%) cu acid oxalic.

În Figurile 14–15 sunt redată spectrele de absorbantă ATR-FTIR pentru probele de bumbac control (nevopsite) și vopsite cu extract de *R. typhina* (mordansate sau netratate), delimitate în funcție de metoda de vopsire folosită: epuizare sau ultrasonare, care să aducă în prim plan grupările funcționale din extractul de oțetar care au fost imprimate în structura fibrei celulozice.

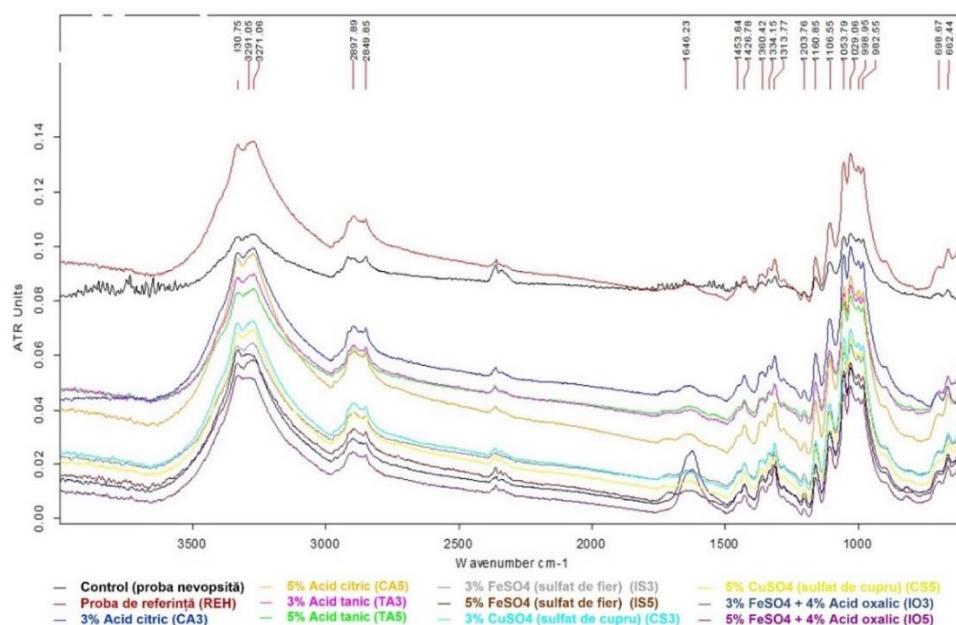


Figura 14: Spectrele ATR-FTIR ale probelor de bumbac vopsite prin epuizare, cu extract apos din fructe de *R. typhina*, în prezența și absența tratamentului cu mordanți

Prezența vibrațiilor de întindere a unei grupe hidroxil ($-OH$) fenolice/alcoolice, specifice structurii celulozice a fibrei de bumbac sau posibilei prezențe a unor taninuri provenite din extractul de oțetar, a fost indicată de benzile de absorbție găsite la $3271,06\text{ cm}^{-1}$ (EH) și $3270,06\text{ cm}^{-1}$ (US). O altă bandă de absorbție specifică celulozei a fost observată la 1028 cm^{-1} , corespunzând unui inel de piranoză $C-O-C$. Regiunea spectrului de sub 1000 cm^{-1} a fost considerată zona unică a probei („fingerprint area”) (Zhang et al., 2023). Structura chimică a probelor vopsite nu a variat considerabil în funcție de tehnica utilizată (epuizare vs. ultrasonare), însă ultrasonarea a păstrat mult mai asemănător cu proba de control structura materialului celulozic. Cel mai puternic impact asupra structurii eşantioanelor l-a determinat tratarea cu amestecurile de sulfat de fier (3-5%) și acid oxalic 4%.

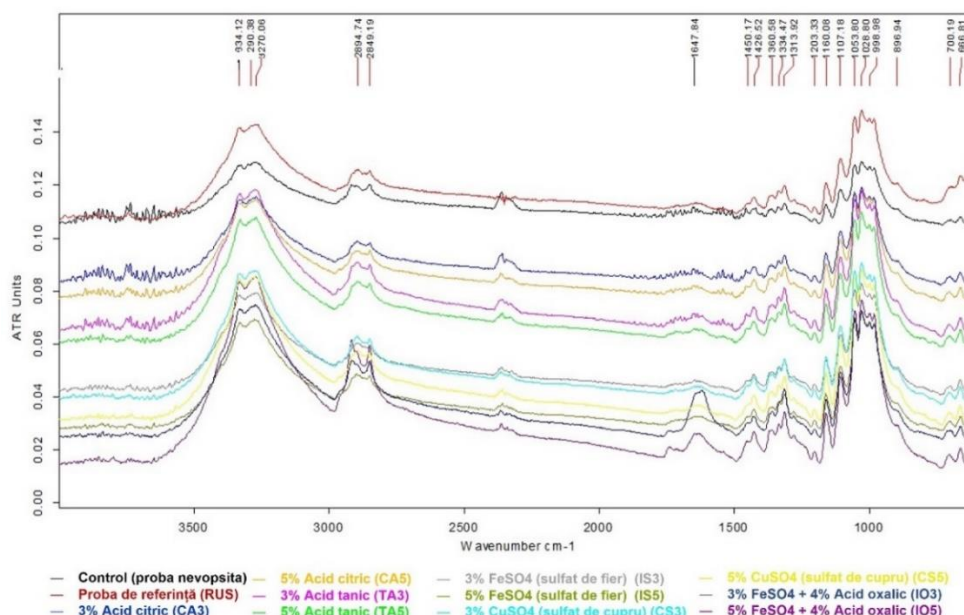


Figura 15: Spectrele ATR-FTIR ale probelor de bumbac vopsite prin ultrasonare, cu extract apos din fructe de *R. typhina*, în prezența și absența tratamentului cu mordanți

CONCLUZII GENERALE, CONTRIBUȚII ORIGINALE, RECOMANDĂRI ȘI DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE

În urma studiilor analizate, a metodologiei experimentale efectuate și a interpretării statistice a datelor obținute, au fost creionate mai multe concluzii finale, redate pe scurt după cum urmează:

- ❖ Conform documentării pe baza literaturii de specialitate, frunzele de *A. altissima* și fructele de *R. typhina* au prezentat o utilitate vastă pentru mai multe domenii industriale (cosmetic, medical, al producției de pesticide etc.), datorată conținutului acestora în compuși bioactivi valoroși, proprietățile lor biologice fiind confirmate de rezultatele testelor efectuate în partea de cercetare experimentală a lucrării de doctorat.
- ❖ Imaginile SEM au surprins elemente morfologice specifice frunzelor (stomate, peri de acoperire) în probele proaspete și uscate de *A. altissima*, dar și fisuri și scăderi în volum a perilor tectori, rezultate din procesele de uscare la 50°C și măcinare; pe suprafața fructelor de oțetar s-a observat prezența a numeroși peri de acoperire, cu vizibilitatea unor locuri de inserție ale acestora pe particulele mai voluminoase ale pulberilor sitate.
- ❖ Extracțiile compușilor bioactivi au fost realizate utilizând tehnici clasice (macerare simplă sau cu agitare magnetică) și neconvenționale (extracția asistată de microunde (MAE), extracția asistată de ultrasunete (UAE), și extracția prin agitare cu bile (BBE)).
- ❖ Iradierea cu microunde a frunzelor de cenușar congelate, expuse la radiații cu frecvența de 2,3 GHz, a dat un randament de extracție mai bun pentru TPC ($1690,89 \pm 35,73$ – $1880,18 \pm 15,41$ mg GAE/100g s.u.) și activitatea antioxidantă FRAP ($1506,40 \pm 29,41$ – $1694,75 \pm 31,28$ mg AAE/100g s.u.) față de cel obținut prin macerarea simplă ($1652,47 \pm 26,51$ mg GAE/100g s.u., respectiv $1566,21 \pm 28,95$ mg AAE/100g s.u.), analiza ATR-FTIR confirmând absența modificărilor structurale importante. Totuși, uscarea foliolelor la 60°C a produs scăderea valorilor acestor variabile de răspuns față de probele cu material congelat.
- ❖ Aplicarea unei extracții secvențiale (polar-nepolar, nepolar-polar), a arătat că substanțele bioactive din foliolele congelate de *A. altissima* sunt mai bine concentrate atunci când etanolul este utilizat ca prim solvent de extracție (pentru pulberile uscate, o pre-extracție în hexan poate îmbunătăți randamentul extracției).
- ❖ Analiza CIELAB a indicat absența modificărilor importante de culoare (ΔE) între materialul congelat și cel uscat la temperatura camerei, la 30°C și respectiv 50°C, însă probele uscate au prezentat nuanțe mai roșiatice și scăderi ale indicelui de galben.
- ❖ Etanolul s-a dovedit a fi un solvent mult mai potrivit decât hexanul pentru extracția frunzelor de *A. altissima*, indiferent de tipul probei și de pre-tratamentul aplicat (de vară sau de toamnă, congelate sau uscate).
- ❖ Cea mai mare valoare a TPC și a activității antioxidante FRAP au fost identificate pentru materialul congelat, de toamnă, iar cel mai mare conținut în taninuri, flavonoide și carotenoizi– pentru cel uscat, de vară (extracte în care etanolul a fost utilizat ca prim solvent). Activitatea antioxidantă DPPH a fost mai ridicată în extractele din frunze colectate vara și uscate la 50°C.
- ❖ Analiza HPLC a raportat prezența a zece compuși fenolici în extractul etanolic din foliole de cenușar uscate, de toamnă, iar acizii fenolici galic, *p*-cumaric și vanilic au fost identificați în toate cele patru extracte testate (extracte etanolice din frunze de vară și de toamnă, uscate sau congelate). În cazul fructelor de *R. typhina* acidul *p*-cumaric a fost identificat și dozat ($17,62 \pm 0,59$ μg/mL), alături de acidul ferulic ($8,91 \pm 0,74$ μg/mL) și miricetină ($8,89 \pm 0,23$ μg/mL).

- ❖ Extractul din frunze uscate de toamnă ale *A. altissima* a inhibat dezvoltarea a șase din zece tulpini microbiene testate, determinând un diametru al zonei de inhibare de $10,0 \pm 0,2$ – $10,0 \pm 0,3$ mm pentru patogenii *S. aureus* (izolat clinic), *E. coli* (ATCC 25922) și *E. faecalis* (ATCC 29212). Extractul din fructe de *R. typhina* (BBE, 5 min, 20/1 (v/w), 61,51%, bile ceramică 2,8 mm, concentrat până la jumătate) a prezentat cel mai puternic efect de inhibare asupra dezvoltării tulpinilor *S. pyogenes* (ATCC 19615) (20 mm) și *S. enterica* (ATCC 13076) (12 mm). În cazul ambelor plante, efectul potențial antifungic a fost absent.
- ❖ Cea mai mare activitate hemolitică a extractelor de cenușar și de oțetar testate a fost înregistrată pentru concentrația de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (6,95%, respectiv 19,85%). Singurul efect ușor toxic a fost regăsit în cazul concentrației de 500 $\mu\text{g/mL}$ de extract de oțetar, pentru linia celulară HepG2 (viabilitate de 62% după 24 h).
- ❖ Cu privire la extracția cu ultrasunete a compușilor fructelor de oțetar, desfășurată conform unui design de tip Box-Behnken, s-a constatat că cea mai mare valoare TAC a fost prezentă la o durată de extracție de 10 min, pentru raportul de 10/1 (v/w) și concentrația solventului de 55%, în timp ce pentru celelalte variabile de răspuns (TPC, TTC, TFC și carotenoizii) a fost mai potrivită extracția timp de 30 min, pentru un raport de 20/1 (v/w) și o concentrație a solventului de 55%. Activitatea antioxidantă FRAP a fost mai puternică la timpuri mai mici de extracție (10 min), iar cea DPPH, la timpuri mai îndelungate (30 min).
- ❖ În ceea ce privește extracția drupelor de oțetar prin tehnica BBE, media activității antioxidante FRAP a fost semnificativ mai mare la bilele cu diametru de 1,4 mm decât la cele de 2,4 mm, în timp ce bilele de metal au favorizat semnificativ extracția carotenoizilor față de probele fără bile.
- ❖ Tehnica extracției cu bile (BBE) este recomandată în cazul fructelor de oțetar, producând la un timp de extracție similar tehnicii UAE, valori medii apropiate sau chiar mai mari pentru compușii bioactivi dozați și activitățile antioxidante măsurate, fără a ridica problema degradării termice a compușilor sensibili sau de contaminare între probe.
- ❖ Vopsirea bumbacului cu extract din fructe de oțetar, conținând o cantitate de antociani de $18,29 \pm 1,35$ mg cianidin-3-O-glucozidă/ 100g s.u., au dus la obținerea de nuanțe roz-violet, în general.
- ❖ În cazul fructelor de oțetar, mordanții ecologici testați (acizii tanic și citric) au prezentat o capacitate bună de fixare a compușilor coloranți extrași în țesăturile de bumbac, fără a modifica puternic nuanțele pânzelor, dar mărinde rezistența culorii în raport cu cea a probelor netratate cu mordant.
- ❖ Indiferent că vopsirea a fost realizată prin epuizare sau ultrasonare, sulfatul de fier a închis culoarea până la obținerea de nuanțe albastre-verzi. Cea mai mare diferență de culoare generală ($\Delta E > 6$ unități) și cea mai scăzută luminozitate au fost identificate la proba vopsită în prezența soluției combinate de Fe_2SO_4 5% și acid oxalic 4%, prin tehnica ultrasonării.
- ❖ Acidul citric a conservat cel mai bine nuanțele roz-violet ale eșantioanelor vopsite; acidul tanic modificat ușor nuanțele spre roz-galben.
- ❖ Concentrațiile soluțiilor de bio-mordanți de 5% au fost mult mai eficiente în creșterea rezistenței la apă și frecare a probelor vopsite față de cele tratate cu soluții de concentrație 3%, însă nu la fel de puternic precum au făcut-o soluțiile de mordanți clasici;
- ❖ Corelații pozitive semnificative au fost identificate între Δa^* și ΔC^* (pozitivă) și ΔE^* și ΔL^* (negativă).
- ❖ Frunzele de *A. altissima* și fructele de *R. typhina* au demonstrat un potențial aplicativ important, prin compușii polifenolici pe care îi conțin, activitățile antioxidante și antimicrobiene demonstrate și efectele citotoxice și/ sau ecotoxice reduse, capacitatea bună de colorare în prezența mordanților ecologici a drupelor de oțetar și eficiența

crescută a extracției în etanol a compușilor cu activitate biologică pentru frunzele de cenușar, solvent „prietenos” cu mediul.

ELEMENTE DE ORIGINALITATE (CONTRIBUȚII ORIGINALE)

Prezenta teză de doctorat a adus contribuții în plan teoretic, experimental și aplicativ, în privința extractelor din frunze sau fructe a unor specii invazive de interes global, dar și pentru România, care dețin caracteristici care le recomandă pentru utilizarea lor în diferite sectoare industriale, și în special, pentru cel al prelucrării sustenabile a textilelor. Printre elementele de originalitate dezvoltate se numără:

- ❖ Îmbogățirea bazei de informații privind caracterul bioactiv și condițiile optime de extracție ale materiei organice colectate pentru plantele investigate;
- ❖ Identificarea eficienței tehnicilor de extracție clasice și moderne pentru speciile selecționate asupra conținutului lor în substanțe cu activitate biologică, proprietăților antioxidante și capacității de vopsire a materialelor textile (bumbac);
- ❖ Aplicarea tehnicii neconvenționale de extracție cu microunde (MAE), cu frecvențe joase, asupra foliolelor de cenușar, cu scopul identificării celor mai potrivite condiții experimentale;
- ❖ Evaluarea influenței, în cadrul unei extracții secvențiale, a sezonului de colectare și solventului (polar vs. nepolar), pentru a defini cele mai bune condiții de preparare a extractului din frunze de cenușar;
- ❖ Folosirea unui design experimental de tip Box-Behnken pentru a optimiza simultan conținutul în diferite categorii de compuși antioxidanți, pentru extracția asistată de ultrasunete a fructelor de *R. typhina*;
- ❖ Evaluarea eficienței extracției cu bile (BBE) în obținerea de extracte bogate în polifenoli din fructele de oțetar și identificarea celor mai bune condiții de extracție;
- ❖ Investigarea prin tehnica ATR-FTIR a diferențelor în compoziție pentru extracte din frunze de cenușar obținute prin două tehnici distincte: convențional vs. neconvențional;
- ❖ Contribuții privind folosirea extractului din drupe de *R. typhina* în vopsirea țesăturilor de bumbac, întrebuițând tehnici clasice (epuizare) și moderne (ultrasonare), cu prezența sau absența meta-mordansării tradiționale (cu mordanți chimici) sau cu mordanți ecologici, evaluate prin determinarea caracteristicilor CIELAB și a rezistenței la apă și frecare uscată, în conformitate cu testele standard specifice.

RECOMANDĂRI ȘI DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE

Principalele direcții de studiu menite să completeze informațiile dobândite prin cercetarea relatată în prezenta teză de doctorat fac referire la:

- Utilizarea altor resurse sustenabile de compuși bioactivi (alte specii de plante invazive, resturi alimentare sau reziduuri ale unor procese tehnologice), care să fie supuse procedurii experimentale dezvoltate;
- Întrebuițarea extractelor obținute în condițiile optimizate în realizarea de produse calitative, ecologice;
- Aprofundarea cercetării aplicative privind extractul din fructe de *R. typhina* asupra altor materiale textile sau cu utilizarea altor mordanți ecologici, și chiar implicarea extractului de cenușar în acest proces, simplu sau în amestec cu extractul de oțetar;

4.5. Bibliografie

1. Afzal, M. R., Naz, M., Wan, J., Dai, Z., Ullah, R., Rehman, S. U., Du, D. (2023): Insights into the mechanisms involved in lead (Pb) tolerance in invasive plants—the current status of understanding, *Plants*, 12(11), 2084.
2. Ain, Q. U., Nazli, Z. I. H., Aslam, M., Zafar, I., Afridi, H. I., Unar, A., Jamshaid, M., Rehman, R. U., Shoukat, W., Mouada, H., Dabiellil, F., Bourhia, M., Alsahli, A. A. (2024): Multifunctional analysis of banana leaves extracts for dyeing properties of pima cotton fabric using different mordants, *Nat. Prod. Commun.*, 19(2), 1934578X241231463.
3. Ali, M. A., Al-Hemaid, F. M. (2011): Taxonomic significance of trichomes micromorphology in cucurbits, *Saudi J. Biol. Sci.*, 18(1), 87-92.
4. Anastasiu, P., Negrean, G. (2007): *Invadatori vegetali în România*, Ed. Universității din București, 20.
5. Andonova, T., Muhovski, Y., Slavov, I., Vrancheva, R., Georgiev, V., Apostolova, E., Naimov, S., Mladenov, R., Pavlov, A., Dimitrova-Dyulgerova, I. (2023): Phenolic profile, antioxidant and DNA-protective capacity, and microscopic characters of *Ailanthus altissima* aerial substances, *Plants*, 12(4), 920.
6. Argüelles, L., March, H. (2022): Weeds in action: Vegetal political ecology of unwanted plants, *Prog. Hum. Geogr.*, 46(1), 44-66.
7. Arlandini, E., Gelmini, F., Testa, C., Angioletti, S., Beretta, G. (2021): GC-MS analysis and biological activity of hydroalcoholic extracts and essential oils of *Rhus typhina* L. wood (Anacardiaceae) in comparison with leaves and fruits, *Nat. Prod. Res.*, 35(22), 4764-4768.
8. Awwad, A., Amer, M. (2020): Biosynthesis of copper oxide nanoparticles using *Ailanthus altissima* leaf extract and antibacterial activity, *Chem. Int.*, 6(4), 210-217.
9. Bourke, C. A. (1996): Lack of toxicity of *Ailanthus altissima* (tree-of-heaven) for goats, *Aust. Vet. J.*, 74(6), 465.
10. Caramelo, D., Pedro, S. I., Marques, H., Simão, A. Y., Rosado, T., Barroca, C., Gominho, J., Anjos, O., Gallardo, E. (2021): Insights into the bioactivities and chemical analysis of *Ailanthus Altissima* (Mill.) swingle, *Appl. Sci.*, 11(23), 11331.
11. Carradori, S., Cairone, F., Garzoli, S., Fabrizi, G., Iazzetti, A., Giusti, A. M., Menghini, L., Uysal, S., Ak, G., Zengin, G., Cesa, S. (2020): Phytocomplex characterization and biological evaluation of powdered fruits and leaves from *Elaeagnus angustifolia*, *Molecules*, 25(9), 2021.
12. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2022): *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, 32nd ed., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
13. **Cocîrlea, M. D.**, Miclăuș, S., Oancea, S. (2022): The effect of 1.74 and 2.3 GHz microwave exposure of *Ailanthus altissima* leaf extracts on their antioxidant content and activity. În *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, IOP Publishing, 1254(1), p. 012021.
14. **Cocîrlea, M. D.**, Simionescu, N., Călin, T., Gatea, F., Badea, G. I., Vamanu, E., Oancea, S. (2024): Box–Behnken Design-based optimization of extraction parameters of phenolics, antioxidant activity, and in vitro bioactive and cytotoxic properties of *Rhus typhina* fruits, *Appl. Sci.*, 14(23), 11096.
15. **Cocîrlea, M. D.**, Soare, A., Petrovici, A. R., Silion, M., Călin, T., Oancea, S. (2024): Phenolic composition and bioactivities of invasive *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle leaf extracts obtained by two-step sequential extraction, *Antioxidants*, 13(7), 824.
16. **Cocîrlea, M.D.**, Coman, A., Popovici, L.F., Oancea, S., Coman, D. (2024): Potential use of bio-dyes for green coloring of medical textiles. În Ed. Indrie, L., Gherghel, S., Tripa, S., *Annals of the University of Oradea. Fascicle of Textiles, Leatherwork*, Editura Universității din Oradea, 25(1), 17-26.
17. Comisia Europeană (2020): Strategia UE privind biodiversitatea pentru 2030 în ceea ce privește readucerea naturii în viețile noastre. Comunicare a Comisiei către Parlamentul European, Consiliu, Comitetul Economic și Social European și Comitetul Regiunilor. Disponibil online: <https://eur-lex.europa.eu/RO/legal-content/summary/eu-biodiversity-strategy-for-2030.html> (accesat în 8 ianuarie 2025)
18. Crainic, B. L., Arsene, G. G., Nicolin, A. L. (2019): Inventory and mapping of invasive species *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle in urban and peri-urban areas: a new method of study and interpretation, *Res. J. Agric. Sci.*, 51(3), 76-85.
19. Čuk, N., Šala, M., Gorjanc, M. (2021): Development of antibacterial and UV protective cotton fabrics using plant food waste and alien invasive plant extracts as reducing agents for the in-situ synthesis of silver nanoparticles, *Cellulose*, 28(5), 3215-3233.
20. Dai, X., Liu, Y., Zhuang, J., Yao, S., Liu, L., Jiang, X., Zhou, K., Wang, Y., Xie, Y., Bennetzen, J. L., Gao, L., Xia, T. (2020): Discovery and characterization of tannase genes in plants: roles in hydrolysis of tannins, *New Phytol.*, 226(4), 1104-1116.
21. Darmawan, A., Riyadi, A., Muhtar, H., Adhy, S. (2024): Enhancing cotton fabric dyeing: optimizing mordanting with natural dyes and citric acid, *Int. J. Biol. Macromol.*, 276, 134017.
22. Deepika, S., Harishkumar, R., Dinesh, M., Abarna, R., Anbalagan, M., Roopan, S. M., & Selvaraj, C. I. (2017): Photocatalytic degradation of synthetic food dye, sunset yellow FCF (FD&C yellow no. 6) by *Ailanthus excelsa* Roxb. possessing antioxidant and cytotoxic activity, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 177, 44-55.
23. Duan, Z. K., Lin, B., Du, Y. Q., Li, C., Yu, X. Q., Xue, X. B., Liu, Q. B., Song, S. J., Huang, X. X. (2021): Monoterpenoid coumarins and monoterpenoid phenylpropanoids from the root bark of *Ailanthus altissima*, *New J. Chem.*, 45(2), 1100-1108.
24. Ellison, C. A., Sankaran, K. V., Murphy, S. T. (2017): Invasive alien plants: impacts on development and options for management. CABI, pp. 2-80.
25. EPPO (2024): EPPO Global Database. Disponibil online: <https://gd.eppo.int> (Accesat în: 6 Decembrie 2024).
26. Flax, B., Bower, A. H., Wagner-Graham, M. A., Bright, M., Cooper, I., Nguyen, W., Purdy, B., Wahba, N., Savage, T., D'Souza, I., LaCour, A., Akelaitis, E. (2021): Natural dyes from three invasive plant species in the United States, *J. Nat. Fibers.*, 19(15), 1-15.
27. Gramauskas, G., Jasinskas, A., Kleiza, V., Mioldažys, R., Blažauskas, E., Souček, J. (2023): Evaluation of invasive herbaceous plants utilization for the production of pressed biofuel, *Processes*, 11(7), 2097.

28. Hossain, M. A. (2023): UV–Visible–NIR camouflage textiles with natural plant based natural dyes on natural fibre against woodland combat background for defence protection, *Sci. Rep.*, 13(1), 5021.
29. Ivanuša, M., Kumer, B., Petrovčič, E., Štular, D., Zorc, M., Jerman, I., Gorjanc, M., Tomšič, B., Simončič, B. (2022): Eco-friendly approach to produce durable multifunctional cotton fibres using TiO₂, ZnO and Ag NPs, *Nanomaterials*, 12(18), 3140.
30. Karadag, R. (2023): Establishing a new international standard for natural dyed textile goods [Natural Organic Dye Standard (NODS)], *J. Nat. Fibers*, 20(1), 2162187.
31. Karalija, E., Dahija, S., Parić, A., Zeljković, S. Č. (2020): Phytotoxic potential of selected essential oils against *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle, an invasive tree, *Sustain. Chem. Pharm.*, 15, 100219.
32. Kim, H. M., Lee, J. S., Choi, J. H., Jang, D. S. (2016): Constituents of the stem barks of *Ailanthus altissima* and their anti-inflammatory activity, *Planta Med.*, 82(S 01), 279.
33. Kirby, C. W., Wu, T., Tsao, R., McCallum, J. L. (2013): Isolation and structural characterization of unusual pyranoanthocyanins and related anthocyanins from Staghorn sumac (*Rhus typhina* L.) via UPLC–ESI-MS, 1H, 13C, and 2D NMR spectroscopy, *Phytochemistry*, 94, 284–293.
34. Knüsel, S., Liu, J., Conedera, M., Gärtner, H., Bugmann, H., Li, M. H., Stoffel, M., Wunder, J. (2019): Comparative dendroecological characterisation of *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle in its native and introduced range, *Dendrochronologia*, 57, 125608.
35. Konarska, A. (2024): New insight in secretory structures and secretion composition in *Rhus typhina* L.–Anatomical, histochemical, and ultrastructural studies. *Micron*, 186, 103692.
36. Kowarik, I., Säuml, I. (2007): Biological flora of central Europe: *Ailanthus altissima* (Mill.) swingle, *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.*, 8(4), 207–237.
37. Kozuharova, E., Al Tawaha, A. R., Malfa, G. A., Aquaviva, R., Pasdaran, A., Zdraveva, P., Ionkova, I. (2024): Biopesticides from *Amorpha fruticosa*, can we turn the dice and use this aggressive invasive arboreal as economically prospective source of compounds capable to control pests on crops?, *Res. J. Pharmacogn.*, 12(1), 45–61.
38. Kozuharova, E., Pasdaran, A., Al Tawaha, A. R., Todorova, T., Naychov, Z., Ionkova, I. (2022): Assessment of the potential of the invasive arboreal plant *Ailanthus altissima* (Simaroubaceae) as an economically prospective source of natural pesticides, *Diversity*, 14(8), 680.
39. Lai, J., Wang, H., Wang, D., Fang, F., Wang, F., Wu, T. (2014): Ultrasonic extraction of antioxidants from Chinese sumac (*Rhus typhina* L.) fruit using response surface methodology and their characterization, *Molecules*, 19(7), 9019–9032.
40. Lazzaro, L., Essl, F., Lugliè, A., Padedda, B. M., Pyšek, P., Brundu, G. (2018): Invasive alien plant impacts on human health and well-being. In *Invasive Species and Human Health*, CAB International, Wallingford, UK, pp. 16–33.
41. Li, J., He, J. Z., Liu, M., Yan, Z. Q., Xu, X. L., Kuzyakov, Y. (2024): Invasive plant competitiveness is mediated by nitrogen use strategies and rhizosphere microbiome. *Soil Biol. Biochem.*, 192, 109361.
42. Liu, T., Li, Z., Li, R., Cui, Y., Zhao, Y., Yu, Z. (2019): Composition analysis and antioxidant activities of the *Rhus typhina* L. stem, *J. Pharm. Anal.*, 9(5), 332–338.
43. Liu, Y., Oduor, A. M., Dai, Z. C., Gao, F. L., Li, J., Zhang, X., Yu, F. H. (2021): Suppression of a plant hormone gibberellin reduces growth of invasive plants more than native plants, *Oikos*, 130(5), 781–789.
44. Lungu, L., Savoiu, M. R., Manolescu, B. N., Farcasanu, I. C., Popa, C. V. (2016): Phytotoxic and antioxidant activities of leaf extracts of *Ailanthus altissima* Swingle, *Rev. Chim.*, 67, 1928–1931.
45. Martí-Garrido, J., Corominas, M., Castillo-Fernández, M., Belmonte, J., Pineda, F., Lleónart, R. (2020): Allergy to *Ailanthus altissima* pollen: A local allergen to consider, *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 30(6), 452–454.
46. Maschek, O., Halmschlager, E. (2018): Effects of *Verticillium nonalfalfae* on *Ailanthus altissima* and associated indigenous and invasive tree species in eastern Austria, *Eur. J. For. Res.*, 137(2), 197–209.
47. McAvoy, T. J., Snyder, A. L., Johnson, N., Salom, S. M., Kok, L. T. (2012): Road survey of the invasive tree-of-heaven (*Ailanthus altissima*) in Virginia, *Invasive. Plant. Sci. Manag.*, 5(4), 506–512.
48. McCoy, R. M., Widhalm, J. R., McNickle, G. G. (2022): Allelopathy as an evolutionary game, *Plant direct*, 6(2), e382.
49. Mounger, J., Ainouche, M. L., Bossdorf, O., Cavé-Radet, A., Li, B., Parepa, M., Salmon, A., Yang, J., Richards, C. L. (2021): Epigenetics and the success of invasive plants, *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B*, 376(1826), 20200117.
50. Naik, R. R., Shakya, A. K., Ferri, B., Oriquat, G. A., Pistelli, L., Numan, N. A. (2021): Volatile composition and biological activity of jordanian commercial samples of *R. coriaria* L. Fruits, *Molecules*, 26(18), 5691.
51. Nandiyanto, A. B. D., Oktiani, R., & Ragadhita, R. (2019): How to read and interpret FTIR spectroscopy of organic material, *Indones. J. Sci. Technol.*, 4(1), 97–118.
52. Nguyen, D. T. C., Van Tran, T., Nguyen, T. T. T., Nguyen, D. H., Alhassan, M., Lee, T. (2023): New frontiers of invasive plants for biosynthesis of nanoparticles towards biomedical applications: A review., *Sci. Total Environ.*, 857, 159278.
53. Ni, J. C., Shi, J. T., Tan, Q. W., Chen, Q. J. (2019): Two new compounds from the fruit of *Ailanthus altissima*, *Nat. Prod. Res.*, 33(1), 101–107.
54. Ontiveros-Ortega, A., Espinosa-Jiménez, M., Chibowski, E., & González-Caballero, F. (1998): Effect of tannic acid on the surface free energy of cotton fabric dyed with a cationic dye, *J. Colloid Interface Sci.*, 202(1), 189–194.
55. Opiyo, S. A., Njoroge, P. W., Ndirangu, E. G., Kuria, K. M. (2021): A review of biological activities and phytochemistry of *Rhus* Species, *Am. J. Chem.*, 11(2), 28–36.
56. Pangi, V. N., Prasad, P. R. G. N. V., Reddy, A. M., Marukurti, A., Babu, K., Joseph, S., Farhana, S. (2022): Extraction of phytochemicals through sequential cold maceration and evaluation of total polyphenol content and antioxidant properties in *Ailanthus altissima* of Simaroubaceae family, *J. Pharm. Negat. Results.*, 13(10), 5609–5615.
57. Pathare, P. B., Opara, U. L., Al-Said, F. A. J. (2013): Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: A review, *Food Bioprocess Technol.*, 6, 36–60.
58. Pavela, R., Zabka, M., Tylova, T., Kresinova, Z. (2014): Insecticidal activity of compounds from *Ailanthus altissima* against *Spodoptera littoralis* larvae, *Pak. J. Agric. Sci.*, 51(1), 101–112.

59. Pedersini, C., Bergamin, M., Aroulmoji, V., Baldini, S., Picchio, R., Pesce, P. G., Ballarind, L., Murano, E. (2011): Herbicide activity of extracts from *Ailanthus altissima* (Simaroubaceae), *Nat. Prod. Commun.*, 6(5), 1934578X1100600504.
60. Periyasamy, A. P. (2022): Natural dyeing of cellulose fibers using syzygium cumini fruit extracts and a bio-mordant: A step toward sustainable dyeing, *SM&T*, 33, e00472.
61. Poljuha, D., Sladonja, B., Šola, I., Dudaš, S., Bilić, J., Rusak, G., Motlhatlegoe, K. E., Eloff, J. N. (2017): Phenolic composition of leaf extracts of *Ailanthus altissima* (Simaroubaceae) with antibacterial and antifungal activity equivalent to standard antibiotics, *Nat. Prod. Commun.*, 12(10), 1934578X1701201021.
62. Poljuha, D., Uzelac, M., Ferri, T. Z., Damijanić, D., Šimunić, M., Korovljević, H., Weber, T., Sladonja, B. (2023): Morphology of extrafloral nectaries of *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle (Simaroubaceae), *Period. Biol.*, 125(1-2), 27-34.
63. Pušić, M., Ljubojević, M., Prvulović, D., Kolarov, R., Tomić, M., Simikić, M., Vejnović, S., Narandžić, T. (2024): Bioenergy and biopesticides production in Serbia—could invasive alien species contribute to sustainability?, *Processes*, 12(2), 407.
64. Qiu, D. R., Wang, D. C., Yang, S. X., Zhang, Y. M., Wei, D. S., Zhang, M. Z., Sun J. Z., Cong J., Guo, J., He, S-L., Qin, J. C. (2016): Chemical constituents from the fruits of *Rhus typhina* L. and their chemotaxonomic significance, *Biochem. Syst. Ecol.*, 69, 261-265.
65. Qu, T., Peng, Y., Yang, C., Du, X., Guo, W., Zhang, J. (2020a): Single and combined effects of cadmium and lead on seed germination and early seedling growth in *Rhus typhina*. *Pol. J. Environ. Stud.*, 30(1), 823-831.
66. Qu, X. J., Wang, H. Y., Zhang, N. N. (2020 b): Plastome structure and phylogenetic position of *Rhus typhina* (Anacardiaceae), *Mitochondrial DNA Part B*, 5(2), 1794-1795.
67. Samad, N., Ejaz, U., Kousar, S., Al-Mutairi, A. A., Khalid, A., Amin, Z. S., Bashir, S., Al-Hussain, S., Irfan, A., Zaki, M. E. (2024): A novel approach to assessing the antioxidant and anti-diabetic potential of synthesized calcium carbonate nanoparticles using various extracts of *Ailanthus altissima*, *Front. Chem.*, 12, 1345950.
68. Schall, M. J., Davis, D. D. (2009): *Ailanthus altissima* wilt and mortality: etiology, *Plant dis.*, 93(7), 747-751.
69. Seiler, L. K., Decoteau, D. R., Marini, R. P., Davis, D. D. (2019): Staghorn Sumac (*Rhus typhina*): A new bioindicator to detect phytotoxic levels of ambient ozone in the Eastern United States, *Northeast. Nat.*, 26(4), 807-816.
70. Seo, D., Kim, K., Choi, H. D., Yoo, M., Ha, J., Lee, K. W. (2018): Development and method validation of analysis of urushiol in sumac and food ingredients in Korea, *J. of AOAC Int.*, 101(3), 793-797.
71. Shao, Q., Li, T. Y., Quan, W., Wang, H., Yan, K. Y., Qiu, P. C., Tang, H. F., Lu, Y. Y. (2023): The alkaloids with neuroprotective effect from the root bark of *Ailanthus altissima*, *Nat. Prod. Res.*, 37(22), 3751-3757.
72. Singh, S., Singh, D. R. (2018): Application of natural mordants on textile, *Int. j. appl. home sci.*, 5(1), 252-260.
73. Tabassum, S., Ahmed, M., Mirza, B., Naeem, M., Zia, M., Shanwari, Z. K., Khan, G. M. (2017): Appraisal of phytochemical and in vitro biological attributes of an unexplored folklore: *Rhus punjabensis* Stewart, *BMC Complement Altern. Med.*, 17(1), 1-13.
74. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2023): *Routine and extended internal quality control for mic determination and disk diffusion as recommended by EUCAST*, The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; Växjö, Sweden, Versiunea 13.1. Disponibil online: <http://www.eucast.org> (accesat în 13 decembrie 2023).
75. Trošt Sedej, T., Humar, M., Gaberščik, A. (2021): Cohabiting native *Fraxinus ornus* and alien *Ailanthus altissima* differ in their ecophysiological responses and functional traits, *Trees*, 35(6), 1875-1887.
76. Vidović, M., Morina, F., Milić Komić, S., Jovanović, S. V. (2015): An improved HPLC-DAD method for simultaneously measuring phenolics in the leaves of *Tilia platyphyllos* and *Ailanthus altissima*, *Bot. Serbica*, 39(2), 177-186.
77. Wang, R. X., Mao, X. X., Zhou, J., Zhang, M. L., Wu, Y. B., Huo, C. H., Shi, Q. W., Sauriol, F., Gu, Y. C. (2017): Antitumor activities of six quassinoids from *Ailanthus altissima*, *Chem. Nat. Compd.*, 53(1), 28-32.
78. Wang, S., Zhu, F. (2017): Chemical composition and biological activity of staghorn sumac (*Rhus typhina*), *Food Chem.*, 237, 431-443.
79. Whiticar, R., Harvey, C. (2009): Beware the tree of Heaven! (*Ailanthus altissima*), *EMJ*, 26(6), 451.
80. Yameen, M., Asghar, F., Adeel, S., Haider, M. Z., Özomay, M., Aftab, M., Mia, R. (2023): Enhancing wool dyeing with clove bud (*Syzygium aromaticum*) based natural dye via microwave treatment using a central composite design, *Sci. Prog.*, 106(4), 00368504231215593.
81. Yan, Z. Y., Chen, J. J., Duan, Z. K., Yao, G. D., Lin, B., Wang, X. B., Huang, X. X., Song, S. J. (2018): Racemic phenylpropanoids from the root barks of *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle with cytotoxicity against hepatoma cells, *Fitoterapia*, 130, 234-240.
82. Zazharskyi, V. V., Davydenko, P. O., Kulishenko, O. M., Borovik, I. V., Brygadyrenko, V. V. (2020): Antibacterial and fungicidal activities of ethanol extracts from *Cotinus coggygria*, *Rhus typhina*, *R. trilobata*, *Toxicodendron orientale*, *Hedera helix*, *Aralia elata*, *Leptopus chinensis* and *Mahonia aquifolium*, *Regul. Mech. Biosyst.*, 11(2), 305-309.
83. Zhang, S., Qi, Y., Tan, S. P. H., Bi, R., Olivo, M. (2023): Molecular fingerprint detection using Raman and infrared spectroscopy technologies for cancer detection: a progress review, *Biosensors*, 13(5), 557.
84. Zhang, T., Jiang, Z., Tao, G., Liu, R., Chang, M., Jin, Q., Wang, X. (2022): Analysis of triacylglycerols in sumac (*Rhus typhina* L.) seed oil from different origins by UPLC-Q-TOF-MS, *Food Anal. Methods*, 15(1), 26-33.
85. Zhu, T. H., Wang, Y. F., Dong, M., Sauriol, F., Huo, C. H., Gu, Y. C., Ni, Z. Y. (2020): A new tetracyclic triterpenoid from the fresh bark of *Ailanthus altissima*, *Chem. Nat. Compd.*, 56(3), 477-480.