

Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului
“Regele Mihai I al României” din Timișoara



Facultatea de Agricultură

MOISĂ CRISTIAN

Rezumat

TEZĂ DE DOCTORAT

**STUDIUL COMPUȘILOR BIOACTIVI EXTRAȘI DIN PATRU
PLANTE AROMATICE CULTIVATE ÎN CONDIȚIILE
PEDOCLIMATICE DE LA SCDA LOVRIN**

Conducător Științific

PROF. UNIV. DR. GEORGETA POP

Timișoara

2019

A. INTRODUCERE

Motivația în alegerea temei de cercetare

În ultimii ani, plantele medicinale au devenit „produse industrializate” cu noi concepte ca și fitoterapia, aromaterapia, nutraceutice și parafarmaceutice. Popularitatea crescândă și acceptabilitatea medicamentelor pe bază de plante este datorată convingerii că toate produsele naturale sunt sigure, ieftine și disponibile în mod obișnuit. Astfel că industria plantelor medicinale rulează aproximativ 100 de miliarde de dolari anual, cu un potențial de creștere în întreaga lume.

Alegerea temei s-a datorat necesității unei evaluări științifice a extractelor de compuși bioactivi din plantele medicinale. Pentru acestea, s-au înființat culturile a patru plante aromatice în condițiile pedoclimatice ale Stațiunii de Cercetare-Dezvoltare Agricolă (SCDA) Lovrin, situată în zona de câmpii joase a Banatului din vestul județului Timiș. Această zonă este reprezentată de suprafețe plane, pe alocuri ondulate, caracterizate de un climat temperat cu ușoare influențe subtropicale și continentale, constituind o zonă propice creșterii și cultivării plantelor medicinale producătoare de uleiuri esențiale.

Importanța și actualitatea temei

Cultura plantelor producătoare de uleiuri esențiale este în continuă creștere, iar cantitatea de deșeuri rezultate în urma procesării acestora este direct proporțională. Deoarece conținutul în ulei esențial al plantelor aromatice este foarte scăzut (0.1 – 2.6%), majoritatea materialului vegetal supus distilării reprezintă deșeuri fără un scop ulterior. Astfel, motivația alegerii temei de cercetare a fost influențată de exploatarea ulterioară a deșeurilor rezultate de la distilare, atât din punct de vedere al economiei cât și al ecologiei și farmacognoziei.

Prezentarea pe scurt a conținutului

Prezenta lucrare este structurată pe două părți.

Prima parte a tezei prezintă studiul literaturii de specialitate cu privire la stadiul cercetărilor asupra plantelor din familia *Lamiaceae*, precum și variabilitatea particularităților speciilor cultivate, compoziția chimică a metaboliților secundari și factorii de mediu și modul lor de acțiune asupra plantelor medicinale.

În **partea a doua** sunt prezentate cercetările proprii privind cultivarea celor patru plante aromatice aparținând familiei *Lamiaceae* în condițiile pedoclimatice de la Stațiunea de Cercetare și Dezvoltare Agricolă de la Lovrin. Obținerea și condiționarea materialului vegetal s-a realizat în cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului „Regele Mihai I al României” din Timișoara.

Partea experimentală de obținere și analiză a uleiurilor esențiale și a compușilor fenolici (GC-MS, ATR-FTIR, TG/DTG/DTA, UHPLC și spectrofotometrice) s-a realizat în cadrul laboratoarelor Institutului de Cercetare-Dezvoltare-Inovare în Științe Tehnice și Naturale ale Universității Aurel Vlaicu din Arad.

Gradul de încadrare a temei în preocupările internaționale, naționale, regionale, ale colectivului de cercetare

Articolele din literatura de specialitate, prezintă speciile analizate, care predominant sunt cultivate în zona mediteraneană sau în Asia. Deoarece industria uleiurilor volatile este într-o continuă expansiune, apare tot mai frecvent problema deșeurilor rezultate în urma distilării, care pe moment nu are o soluție bine definită. Dezamăgirea generală față de medicamentele convenționale (de sinteză), cuplată cu dorința pentru adoptarea unui stil de viață „natural”, a dus la o creștere a cerinței pentru medicamentele și suplimentele alimentare pe bază de plante. Aceste afirmații sunt susținute de numărul în creștere al studiilor ce fac referire la modul de obținere și la compoziția chimică a compușilor cu proprietăți bioactive.

Pentru realizarea acestui deziderat, au fost extrase și analizate uleiurile esențiale din plantele cultivate, iar deșeurile rezultate de la distilare au fost utilizate pentru obținerea și caracterizarea de extracte bogate în compuși fenolici.

Obiectivele științifice propuse pentru rezolvare în cadrul cercetării științifice

Scopul principal a fost studierea din punct de vedere al agronomiei, fiziologiei și al compoziției chimice a patru specii de plante aromatice din culturile înființate în condițiile pedoclimatice din cadrul Stațiunii de Cercetare și Dezvoltare Agricolă de la Lovrin.

Având în vedere scopul acestui studiu, **obiectivul principal** care derivă din acesta a fost propunerea de exploatare sustenabilă a întregului potențial al materialului vegetal (din cele patru plante aromatice) din punct de vedere economic și ecologic.

Obiectivele derivate din obiectivul principal sunt: (i) - caracterizarea compoziției chimice a uleiurilor esențiale obținute la momentul optim de recoltare precum și a celor obținute în timpul anumitor faze fenologice; (ii)

caracterizarea extractelor bogate în compuși bioactivi și optimizarea metodelor de extracție a acestora din deșeurile rezultate în urma distilării.

Comentarii sintetice privind nouitatea/gradul de inovare a metodei/metodologiei de cercetare

Gradul de nouitate al studiilor constă în (I) cultivarea unor specii de plante aromatice în condițiile pedoclimatice din cadrul Stațiunii de Cercetare și Dezvoltare Agricolă de la Lovrin, (II) obținerea și caracterizarea uleiurilor esențiale prin diverse metode (GC-MC, ATR-FTIR, TG/DTG/DTA), (III) valorificarea deșeurilor rezultate în urma distilării uleiurilor esențiale prin obținerea de extracte hidroalcoolice bogate în compuși fenolici cu proprietăți bioactive, (IV) caracterizarea extractelor hidroalcoolice prin metode spectrofotometrice și prin cromatografie de lichide (UHPLC-DAD).

B. CONȚINUTUL TEZEI DE DOCTORAT

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIUL SPECIILOR STUDIAȚE

Capitolul 1. Stadiul cercetărilor privind variabilitatea caracterelor plantelor studiate

1.1. Stadiul cercetărilor privind plantele cultivate din familia *Lamiaceae*

Familia Lamiaceae cuprinde un grup mare de plante ierboase, arbuști sau subarbuști, perene sau anuale, puternic aromatice. Include 236 de genuri și numără aproximativ 7173 de specii și sunt repartizate în mai multe subfamilii, produc o varietate mare de compuși secundari, fiind renumite pentru uleiurile esențiale secretate de tricomi glandulari aflați pe suprafața frunzelor și a inflorescențelor, de asemenea, un număr mare de compuși fenolici, care sunt deseori acumulați în plante în concentrații mari. Cele mai comune grupuri de fenoli din această familie sunt esterii acidului cafeic și flavonoidele.

Regiunea mediteraneană și Asia Centrală și de Sud Vest. Reprezintă unul dintre cele mai mari și diverse centre din lume, incluzând multe genuri ca: *Teucrium*, *Scutellaria*, *Phlomis*, *Stachys*, *Lamium*, *Sideritis*, *Salvia*, *Satureja*, *Thymus*, *Origanum*, *Nepeta* și multe altele.

Familia este cunoscută pentru numeroasele plante aromatice folosite pe scară largă încă din antichitate. Acestea sunt bogate în uleiuri esențiale, produse la nivelul tricomilor glandulari, în special, aflați pe suprafața frunzelor. Cele mai frecvente specii sunt: *Salvia* (salvie), *Mentha* (mentă și menta spicata), *Thymus* (cimbru și cimbrisor), *Origanum* (oregano și maiorana), *Satureja* (cimbrul de vară și cel de iarnă), *Rosmarinus* (rozmarin), *Melissa* (roinița), *Ocimum* (busuiocul), *Lavandula* (lavanda și lavandinul).

1.2. Stadiul cercetărilor privind variabilitatea particularităților la cimbru (*Thymus vulgaris* L. var. *Doone Valley*)

Genul *Thymus* face parte din familia *Lamiaceae* (*Labiatae*), subfamilia *Nepetoideae*, tribul *Mentheae*. Distribuția geografică a acestui gen poate fi descrisă ca eurasiatică și mediteraneană, în special în Peninsula Iberică și Nord Vestul Africii. Astăzi sunt cunoscute aproximativ 250 categorii (214 specii și 36 subspecii) acceptate și subdivizate în 8 secțiuni. Cimbrul este reprezentat de două clase majore de compuși secundari: uleiul esențial și polifenolii non-volatili.

Materialul vegetal uscat conține între 1 și 2.5% ulei esențial, iar gaz-cromatografic a fost determinată următoarea compoziție chimică: timol ~30 – 55% (care îi conferă mirosul specific) alături de carvacrol (~1-5%), *p*-cimen (~15-20%) și γ -terpinen (~5-10%), linalol (~1-5%), β -cariofilen (~1-3%) iar în procente mai scăzute (~0.5-1.5%) borneol, camfor, limonen, mircen, β -pinen, *trans*-sabinen hidrat, α -terpineol și terpinen-4-ol. Se pot observa până la 25 de flavonoide diferite, și sunt prezente mai ales sub forma agliconilor lor. Flavonele apigenină și luteolină sunt cele mai importante flavonoide prezente atât ca aglicone cât și ca *o*-glicozide. Taninurile din cimbru contribuie și acestea la utilizarea sa comercială. Acestea sunt reprezentate în principal de acidul rozmarinic (~0.15-2.6%), o depsidă a acidului cafeic și dehidrocafeic, precum și acizi fenolici liberi: acidul cafeic, *p*-cumaric, siringic și ferulic. Cimbrul crește în aproape orice climat care are o temperatură medie anuală de la 7 la 20 °C, și poate fi recoltat în primul an de vegetație în septembrie–octombrie, iar din al doilea an de vegetație, se pot efectua 2-3 reprize de cultivare. În general, cimbrul este cel mai aromată în perioada de înflorire sau chiar la începutul înfloririi în faza de butonizare, perioada optimă de recoltare fiind ultima decadă a lunii Mai și începutul lunii Iunie.

1.3. Stadiul cercetărilor privind variabilitatea particularităților la oregano (*Origanum vulgaris* L. var. *aureum*)

Genul *Origanum* face parte din familia *Lamiaceae*, subfamilia *Nepetoideae*, tribul *Mentheae* și cuprinde 39 specii larg răspândite în regiunea mediteraneană, dintre care predomină specia *Origanum vulgare*. Este reprezentată de cele două clase majore de compuși secundari și anume uleiurile volatile și compușii fenolici non-volatili. Materialul vegetal uscat are un conținut în ulei volatil ce variază între 0.5 și 1.5% și este bogat în carvacrol, timol, *cis* și *trans* sabinen hidrat, α -tuienă, sabinen, γ -terpinen, *p*-cimen, timol și carvacrol metil eter, timol și carvacrol acetat, *p*-cimenen, *p*-cimen-8-ol, *p*-cimen-7-ol, thimochinonă, etc.. Alte substanțe chimice frecvent detectate în speciile de *Origanum* sunt monoterpenele geraniol, linalol, acetat de linalil, mircen, camfen, camfor,

borneol, bornil, izobornil acetat; și sesquiterpenele β -cariofilen, β -bisabolen, β -burbonen, germacren-D, biciclogermacren, α -humulen, α -muurolen, γ -muurolen, γ -cadinen, allo-aromandren, α -cubeben, α -copen, α -cadinol. În plantele de *Origanum* au fost identificați acizii fenolici *p*-hidroxibenzoici (pirtocatehic, vanilic, siringic și galic) și hidroxicinamici (*p*-cumaric, cafeic, ferulic, sinapic). Plantele de oregano prezintă un conținut mai mare în acid rozmarinic decât plantele din genurile *Rosmarinus* și *Salvia*.

Oregano crește spontan în bazinul mediteranean, în special în zonele înalte cu o temperatură medie de 6-28 °C, cu precipitații medii de 500-2700 mm și un pH al solului de 4.9-8.7, fiind bine adaptat la soluri bine drenate, fertile și lutoase. Perioada optimă de recoltare este reprezentată de ultima decadă a lunii Iunie, dar se pot recolta plante până în luna Octombrie. Momentul optim de recoltare este în timpul înfloririi (40-50 % din plante înflorite), în zile cu soare și călduroase.

1.4. Stadiul cercetărilor privind variabilitatea particularităților la cimbrul de vară (*Satureja hortensis* L.)

Această specie este nativă Europei de sud și Turciei, dar s-a extins și a fost cultivat și în alte zone ca și plantă aromatică. Genul *Satureja* L. cuprinzând aproximativ 14 specii de ierburi sau subarbuști, puternic aromate, anuale sau perene. Cimbrul de vară (*S. hortensis*) este o plantă anuală des cultivată prin grădini și conține între 0.2 și 3% ulei volatil având culoarea de la galben la brun închis, iar componentele majoritare ale acestuia sunt: carvacrol, *p*-cimen, α -tuien, α -pinen, mircen, γ -terpinen, timol, linalool și β -cariofilen.

Plantele de *Satureja hortensis* prezintă aromă asemănătoare plantelor de cimbru sălbatic, iar frunzele proaspete au următoarea compoziție chimică: apă (72%), proteine (4.2%), grăsimi (1.65%), zahăr (4.45%), fibre (8.60%) și cenușă (2.11%). Frunzele de asemenea mai conțin și substanțe fenolice, acid labiatic, acid ursolic, β -sitosterol și ulei volatil. Perioada de recoltare este la sfârșitul lunii iunie, până în prima decadă a lunii iulie, când florile sunt la 40-50% înflorire. Momentul optim de recoltare este pe vreme însorită, după ce roua s-a ridicat.

1.5. Stadiul cercetărilor privind variabilitatea particularităților la cimbrul de iarnă (*Satureja montana* L.)

Această specie este nativă Europei de sud și Africii de nord, dar s-a extins și a fost cultivat și în alte zone ca și plantă aromatică. Cimbrul de iarnă este o plantă perenă veșnic verde, cu tulpini mici, erecte, lignificate la bază și tetramuchiate, crescând în jur de 30-60 cm înălțime, puternic ramificate. Multe din componentele uleiului volatil din herba de *Satureja montana* L. sunt sensibile la mediul de creștere al acesteia. Prin urmare, existența unor variații de compoziție sunt așteptate. Planta conține între 0.2 și 2.5% ulei volatil având culoarea variind de la galben la brun închis, iar componentele majoritare ale acestuia sunt: carvacrol, *p*-cimen, carvacrol metil eter, α -tuien, α -pinen, mircen, γ -terpinen, timol, linalool și β -cariofilen

Perioada de recoltare este de la sfârșitul lunii iunie până în octombrie, când florile sunt la 40-50% înflorire. Prima recoltă poate avea loc în toamna primului an de vegetație. Momentul optim de recoltare este pe vreme însorită, după ce roua s-a ridicat.

Capitolul 2. Stadiul cercetărilor privind metabolizii secundari din plantele aromatice aparținând familiei *Lamiaceae*

2.1. Stadiul cercetărilor privind uleiurile volatile și compușii fenolici din familia *Lamiaceae*

Metabolizii generali reprezintă produși sau intermediari metabolici, găsiți în majoritatea sistemelor vii, esențiali pentru creștere și viață, fiind biosintetizați printr-un număr limitat de căi biochimice și clasificați în mod tradițional ca metabolizii primari și secundari. Metabolizii secundari din plante pot fi împărțiți în trei grupe majore: flavonoide (compuși fenolici și polifenoli), terpenoide și alcaloizi (compuși cu azot și sulf).

Principalele grupe de compuși fenolici din plantele medicinale sunt fenolii simpli, cumarinele, flavonoidele, taninurile, lignanii, fenilpropanoidele, etc. și subgrupele acestor mari grupe, și care joacă roluri importante în creșterea, reproducerea sau limitarea atacului microorganismelor patogene, iar în dieta umană, aceștia au o gamă largă de funcții biologice și fiziologice: antimicrobiene, antialergice, antiinflamatori, etc..

Compușii terpenici sunt derivați din două sau mai multe unități C5 (izopren) și sunt lichide aromatice obținute din materii vegetale: flori, rădăcini, scoarță, frunze, semințe, coji, fructe, lemn și plante întregi. Aplicațiile uleiurilor volatile pentru diverse scopuri variază și includ pe lângă utilizarea lor în gastronomie pentru îmbunătățirea gustului mâncărurilor și beneficiile de sănătate, și utilizarea lor în cosmetice și parfumerie.

Alcaloizii sunt compuși de bază de origine vegetală care au efecte biologice puternice și au un atom de N într-un inel heterociclic sau un sistem inelar și N provine de la unul din aminoacizii esențiali.

2.2. Factorii de mediu și modul lor de acțiune asupra plantelor aromatice

Atât în condiții naturale cât și în culturile agricole, plantele sunt frecvent expuse la stres din partea mediului înconjurător. Anumiți factori de mediu, cum sunt temperatura aerului și intensitatea luminoasă, pot deveni un

factor de stres în timp relativ scurt (minute, ore), pe când alții cum sunt conținutul de apă din sol au nevoie de câteva zile sau săptămâni, iar deficitul de minerale din sol poate să inducă stresul după câteva luni. Astfel că stresul plantelor joacă un rol major în determinarea distribuției plantelor influențate de sol și climă. Astfel că, înțelegând procesele fiziologice care subliniază stresul, aclimatizarea și adaptarea plantelor, sunt de o importanță deosebită pentru agricultură și mediul înconjurător.

Plantele trebuie să facă față la o serie de factori de stres biotici și abiotici, pe tot parcursul ciclului lor de viață. De asemenea, aproape toate speciile de plante sunt emițătoare de diverși compuși organici volatili (VOC) atât în condiții normale cât și în condiții de stres, emițând peste 100.000 de compuși chimici din care cel puțin 1700 sunt volatili.

II. CERCETĂRI PROPRII

Capitolul 3. Cultivarea plantelor aromatice în condițiile pedoclimatice de la SCDA Lovrin și analiza parametrilor fiziologici

Scopul acestui capitol a fost înființarea a patru culturi de plante aromatice în condițiile pedoclimatice din cadrul Stațiunii de Cercetare și Dezvoltare Agricolă de la Lovrin în vederea caracterizării fiziologice ale acestora.

Materialul vegetal studiat a fost cultivat în cadrul SCDA Lovrin 20° 47' longitudine E și 45° 57' latitudine N, județul Timiș. Au fost luate în studiu 3 specii de plante perene: *Thymus vulgaris* L., *Satureja montana* L. și *Origanum vulgare* L., precum și o specie de plantă anuală, *Satureja hortensis* L..

Au fost determinați parametrii de fotosinteză utilizând un sistem de măsurare a schimbului de gaze, portabil (GFS-3000, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germania). S-au analizat viteza netă de asimilație a CO₂ și conductanța stomatală. De asemenea, determinarea pigmentilor asimilatori s-a realizat cu ajutorul cromatografiei de lichide de înaltă performanță (UHPLC, Nexera X2, Shimadzu, Tokyo, Japonia) echipat cu un detector DAD (M30A, Shimadzu, Tokyo, Japonia).

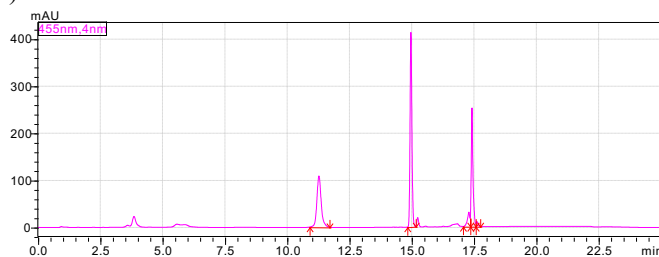


Figura 3.12. Exemplu de cromatogramă obținută pentru pigmentii asimilatori (*T. vulgaris* L. var. Doone Valley)

Tabel 3.9. Cantitatea de pigmenti asimilatori determinată în plantele studiate

Pigmenți asimilatori (mg/m ²)	Luteină	Clorofila b	Clorofila a	α-Caroten	a/b
<i>Thymus vulgaris</i> L. var. Doone Valley	96.68 ± 0.43	718.32 ± 2.31	1464.76 ± 2.50	27.75 ± 0.77	2.04
<i>Origanum vulgare</i> L. var. aureum	37.23 ± 0.37	250.13 ± 1.58	492.12 ± 6.12	8.26 ± 0.37	1.97
<i>Satureja hortensis</i> L.	17.40 ± 0.67	135.41 ± 0.45	256.64 ± 1.16	6.11 ± 1.13	1.90
<i>Satureja montana</i> L.	8.68 ± 2.1	63.30 ± 0.71	121.98 ± 4.50	26.67 ± 1.07	1.93

Pigmenții asimilatori din cele patru plante studiate, prezintă cele mai mari cantități în plantele de *T. vulgaris* (718.32 mg/m² pentru clorofila b și 1464.76 mg/m² pentru clorofila a) și cele mai mici au fost regăsite în *S. montana* (63.30 mg/m² și respectiv 121.98 mg/m²). Raportul dintre clorofila a și clorofila b a fost de aproximativ 2, corespunzând valorilor regăsite în literatura de specialitate. Datorită înălțimii reduse a plantelor de *T. vulgaris*, dezvoltarea acestora în condiții de umbră poate duce la o creștere de până la trei ori a cantității de pigmenti clorofilieni. Frunzele cu o pigmentație mai ridicată fiind mai eficiente în absorbția luminii pe unitatea de biomasă echilibrând absorbția de carbon în condiții de lumină scăzută.

Capitolul 4. Obținerea extractelor bogate în principii active, din plante aromatice aparținând familiei Lamiaceae

Scopul acestui capitol a fost obținerea materialului vegetal, a extractelor de uleiuri volatile și a extractelor hidroalcoolice din cele patru specii de plante aromatice.

Recoltarea herbei pentru plantele luate în acest studiu s-a realizat pe specificul fiecărei specii, iar conținutul umidității este îndepărtat prin folosirea temperaturilor mai joase pentru a nu degrada compușii bioactivi din plante.

Tabel 4.1. Lunile de recoltare a plantelor medicinale luate in studiu

Denumirea Name	Partea utilizata Used part	Luna când a avut loc recoltarea Month of harvesting											
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
<i>Thymus vulgaris</i> L. var. <i>Doone Valley</i>	herba (butonizare)												
<i>Origanum vulgare</i> L. var. <i>aureum</i>	herba (40 – 45%) înflorire												
<i>Satureja hortensis</i> L.	herba (40 – 50%) înflorire												
<i>Satureja montana</i> L.	herba (40 – 50%) înflorire												

Uleiurile esențiale au fost obținute prin distilare cu aburi cu ajutorul unui alambic pentru uleiuri esențiale din cupru iar separarea uleiului de hidrolat, s-a realizat utilizând o pâlnie de separare.

Amestecul de polifenoli este obținut prin extragerea acestora din deșeurile rezultate la distilare cu un amestec de solvenți (etanol și apă) și utilizarea a 1:10 g/v deșeu măcinat în soluții etanolice de concentrații (0, 40, 60, 80 și respectiv 96%) și prin utilizarea a trei metode de extracție: (i) instalație clasică prin fierbere 2 ore și 30 de min, (ii) macerare statică în condiții de refrigerare (+4°C) timp de 7 zile, și (iii) extragere la US la 35 kHz, putere 100% pentru 2 ore și 30 de min urmată de macerare statică în condiții de refrigerare (+4°C) timp de 7 zile.

Capitolul 5. Determinarea compoziției chimice a uleiurilor esențiale prin analize GC-MS

S-a urmărit caracterizarea compoziției chimice generale a uleiurilor esențiale obținute din plantele medicinale studiate atât la momentul optim de recoltare cât și pe baza a două faze fenologice, utilizând cromatografia de gaze cuplată cu spectrometrie de masă.

Constituenții uleiurilor esențiale au fost determinați cu ajutorul unui cromatograf de gaze (Shimadzu2010, Kyoto, Japonia) cuplat cu un spectrometru de masă cu triplu quadrupol (TQ 8040, Shimadzu, Kyoto, Japonia). Compușii uleiului esențial au fost identificați pe baza spectrului de masa specific, utilizând librăriile NIST 14 și Wiley 09.

5.3.1. Compoziția chimică a uleiurilor esențiale obținute din plante recoltate la momentul optim

Tabel 5.2. Comparația între compușii majoritari (peste 5%) din cele patru uleiuri esențiale

Nr. Crt.	Nume compus	<i>Thymus vulgaris</i> L. (%)	<i>Origanum vulgare</i> L. (%)	<i>Satureja hortensis</i> L. (%)	<i>Satureja montana</i> L. (%)
1	<i>p</i> -cimen	10.59	19.37	5.54	14.91
2	γ -terpinen	11.88	15.9	44.83	1.65
3	linalol	0.1	24.54	-	1.03
4	timol metil eter	4.94	2.56	-	-
5	carvacrol metil eter	5.13	-	0.47	10.06
6	timol	42.35	5.57	0.1	-
7	carvacrol	5.67	-	31.11	60.85
8	germacren D	0.13	8.34	-	-

p-cimen și γ -terpinen au fost identificați în toate cele patru specii cultivate în proporții diferite: *Thymus vulgaris* 10.59% și respectiv 11.88%, *Satureja montana* 14.91% și 1.65%, *Satureja hortensis* 5.54% și 44.83% precum și în *Origanum vulgare* 19.37% și 15.9%. Derivată din cimen, monoterpena timol reprezintă compusul majoritar în compoziția uleiului esențial de *T. vulgaris* (42.35%) și se regăsește în cantități mai mici în *Satureja montana* (10.06%) și în *O. vulgare* (5.57%). Rezultatele obținute sunt în concordanță cu cele publicate în literatura de specialitate care afirmă că timolul este un compus chimic majoritar în uleiul esențial obținut din *herba thymi*.

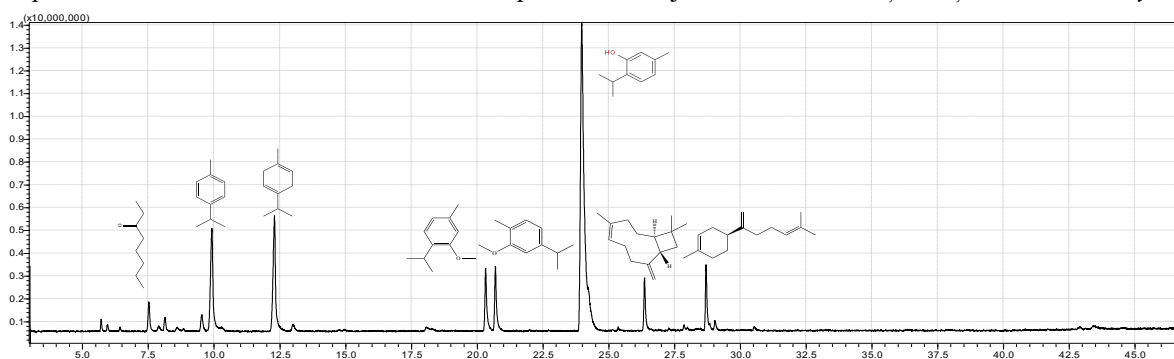


Figura 5.3. Cromatograma *Thymus vulgaris* L. var. *Doone Valley*

5.3.2. Compoziția chimică a uleiurilor studiate în cursul a două faze fenologice (la butonizare și la peste 85-90% flori deschise) și două cicluri vegetative (perioada 2017 și 2018)

Părțile aeriene de *T. vulgaris*, *O. vulgare*, *S. hortensis* și *S. montana* au fost recoltate în timpul a două faze fenologice (la butonizare și la peste 85-90% flori deschise), pe parcursul a două cicluri de vegetație (2017 și 2018) din cadrul Stațiunii de Cercetare-Dezvoltare Agricolă de la Lovrin (SCDA Lovrin), județul Timiș - 20° 47' longitudine E și 45° 57' latitudine N. Pentru obținerea uleiului esențial, plantele uscate au fost supuse procesului de hidro-distilare cu ajutorul unui alambic de cupru de 5L. Uleiul esențial obținut s-a păstrat la frigider la 4° C în sticle închise la culoare.

Tabel 5.8. Compusul majoritar al uleiurilor esențiale studiate pe parcursul a doi ani (2017 și 2018) și două faze fenologice (butonizare și peste 85-90% înflorire)

Ulei esențial	Faza fenologică	Compusul majoritar
<i>Thymus vulgaris</i> L. var. <i>Doone Valley</i> 2017	butonizare	timol
	peste 85-90% înflorire	timol
<i>Thymus vulgaris</i> L. var. <i>Doone Valley</i> 2018	butonizare	timol
	peste 85-90% înflorire	<i>p</i> -cimen
<i>Origanum vulgare</i> L. var. <i>aureum</i> 2017	butonizare	γ -terpinen
	peste 85-90% înflorire	linalol
<i>Origanum vulgare</i> L. var. <i>aureum</i> 2018	butonizare	γ -terpinen
	peste 85-90% înflorire	linalol
<i>Satureja hortensis</i> L. 2017	butonizare	carvacrol
	peste 85-90% înflorire	γ -terpinen
<i>Satureja hortensis</i> L. 2018	butonizare	γ -terpinen
	peste 85-90% înflorire	carvacrol
<i>Satureja montana</i> L. 2017	butonizare	carvacrol
	peste 85-90% înflorire	carvacrol
<i>Satureja montana</i> L. 2018	butonizare	carvacrol
	peste 85-90% înflorire	carvacrol

Analizele GC-MS au demonstrat compoziții chimice diferite, iar pentru unele din uleiuri o modificare a compusului majoritar a fost observată între cele două faze fenologice.

Pentru anul 2017, uleiul de *T. vulgaris* și *S. montana* și-au păstrat compusul majoritar, timol și respectiv carvacrol, în timp ce pentru *O. vulgare* s-a modificat compusul majoritar din γ -terpinen în linalol, iar *S. hortensis* din carvacrol în γ -terpinen.

Pentru anul 2018 doar în uleiul de *S. montana* a rămas compusul majoritar, carvacrol, în timp ce toate celelalte s-au modificat. Uleiul esențial de *T. vulgaris* a trecut de la timol la *p*-cimen, *O. vulgare* a trecut de la γ -terpinen la linalol, iar *S. hortensis* a trecut de la γ -terpinen la carvacrol.

Din cauza diferențelor de compoziție chimică între cele două faze fenologice și cicluri vegetative, este posibilă planificarea din timp a recoltării plantelor, pentru a obține uleiuri esențiale cu o compoziție chimică diferită față de cele clasice, recoltate la momentul optim.

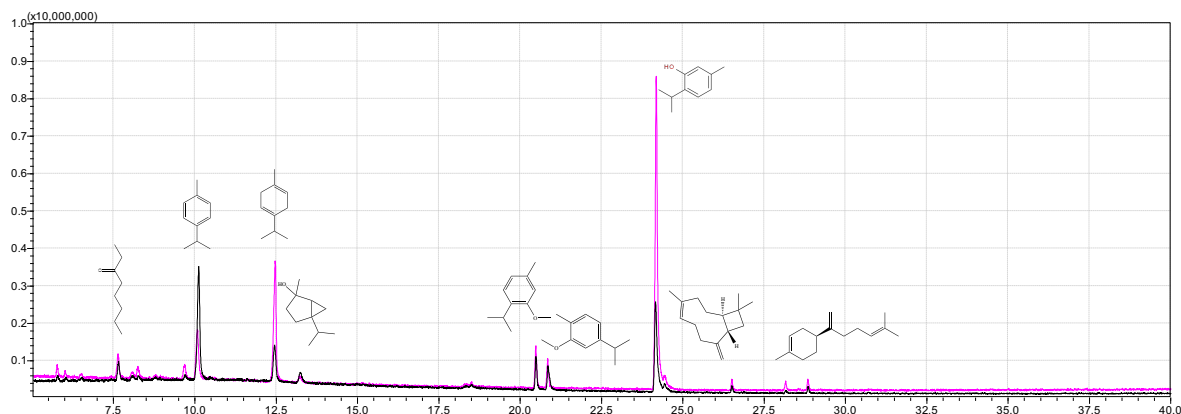


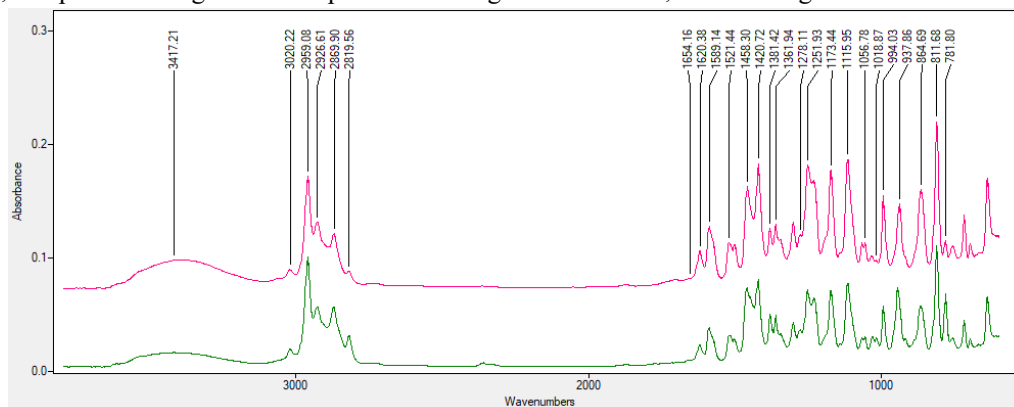
Figura 5.8. Cromatograma suprapusă a uleiurilor esențiale de *Thymus vulgaris* L. var. *Doone Valley* din anul 2018 (roz – butonizare, negru – peste 85-90% înflorire).

Capitolul 6. Analiza prin ATR-FTIR a uleiurilor esențiale studiate în cursul a două faze fenologice (înainte și după înflorire) în anul 2017

S-a efectuat caracterizarea compozițională a uleiurilor esențiale în funcție de faza fenologică în care se aflau plantele în timpul recoltării și stabilirea momentului optim de recoltare pe baza compoziției chimice urmărite, utilizând metode simple, rapide și non-destructive.

S-a observat modificarea compoziției chimice a uleiurilor esențiale, influențând componenta majoritară determinată în uleiul esențial atât prin analize gaz cromatografice (GC-MS) cât și pe baza spectrelor FTIR.

Analiza spectrală detaliată a uleiurilor analizate se bazează pe spectrele vibraționale a compușilor terpenici prezenți, iar spectrele înregistrate sunt prezentate în figurile următoare, având adăugate benzile caracteristice.



Spectrul ATR-FTIR pentru uleiul esențial de *Satureja montana* recoltat în faza de butonizare (verde) și peste 85-90 % înflorire (roz)

Pe baza compoziției chimice specifice, intensitatea următoarelor benzi a fost observată: 806-804 pentru timol, 811-807 pentru carvacrol, 811-812 pentru *p*-cimen, 781, 947 pentru γ -terpinen. Alți compuși principali identificați prin analiza GC-MS și confirmați prin prezența în spectrul ATR-FTIR au fost identificați ca α -pinen la 886 și 1658 cm^{-1} , β -pinen la 873 și 1640 cm^{-1} , linalool la 835, 919, 995 și 1640 cm^{-1} , carvacrol metil eter la 1520 cm^{-1} , α -terpinolen la 781 cm^{-1} și cariofilen la 885 cm^{-1} .

Capitolul 7. Analizarea prin TG/DTG/DTA a uleiurilor esențiale studiate

A fost efectuată caracterizarea stabilității termice a uleiurilor esențiale obținute din plantele studiate. De asemenea s-a caracterizat stabilitatea termică a uleiurilor esențiale în funcție de faza fenologică în care se aflau plantele în timpul recoltării și stabilirea momentului optim de recoltare pe baza compoziției chimice urmărite.

S-a observat corelarea compoziției chimice a compușilor majoritari determinați prin analize gaz-cromatografice (GC-MS) și analize spectroscopice (ATR-FTIR) cu stabilitatea termică a uleiurilor esențiale.

7.3.1. Analiza prin TG, DTG și DTA a uleiurilor esențiale obținute la momentul optim

În intervalul de temperatură 30 – 50°C, curbele TG sunt stabile termic, urmând ca în intervalul 50 – 220...260°C să prezinte o pierdere continuă în masă, în timp ce profilul curbelor DTA sugerează că au loc procese endoterme complexe, în unele cazuri implicând una sau mai multe etape suprapuse, lucru evidențiat și pe curbele DTG.

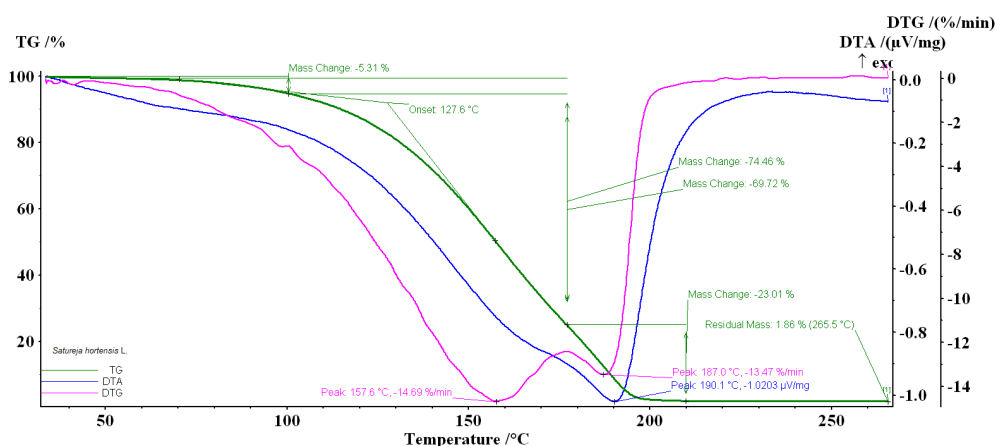


Figura 7.4. Curbele TG/DTG/DTA - ulei esențial de *S. hortensis* înregistrată în aer dinamic (100 mlmin⁻¹, 20%O₂)

Pentru uleiul de *S. hortensis* au fost înregistrate două etape. Prima etapă a fost înregistrată în intervalul de temperatură 50-175 °C cu o pierdere de masă de 74.46%. Viteza maximă DTG a fost atinsă la $T_{DTG} = 157.6$ °C.

A doua etapă a fost înregistrată între intervalul de temperatură de 175-220 °C, cu o valoare a pierderii în masă de ~ 23.01% și un $T_{DTG} = 187$ °C. Pentru această etapă, curbele DTG prezintă un profil abrupt, revenind de la punctul maxim la valoarea inițială. Rezultatele evidențiază faptul că pentru uleiurile esențiale etapele pierderii de masă înregistrate pe curbele TG/DTG/DTA apar datorită proceselor de evaporare.

7.3.2. Analiza prin TG și DTG a uleiurilor esențiale obținute în funcție de faza fenologică urmărită pentru anul 2017

Între cele două faze fenologice, compoziția chimică a uleiurilor esențiale s-a modificat, influențând componenta majoritară determinată în uleiul esențial atât prin analize GC-MS cât și pe baza spectrelor FTIR. Astfel că, și profilul curbelor TG/DTG se modifică în funcție de volatilitatea compușilor majoritari.

Pentru uleiul esențial de cimbru de vară, obținut atât la butonizare cât și peste 85-90% înflorire, având compoziția chimică similară între cele două faze fenologice (γ -terpinen 40.14 – 44.9%, carvacrol 43.03 – 31.02%), în intervalul de temperatură 30-50 °C curbele TG/DTG prezintă stabilitatea probei urmând ca între de 50-220 °C, să apară o pierdere continuă de masă, în timp ce curbele profilului DTG sugerează că procesele endoterme care au loc sunt complexe și implică cel puțin două etape suprapuse. Acești pași sunt mai bine evidențiați pe curbele DTG.

Pentru uleiul obținut la butonizare, prima etapă a fost înregistrată în intervalul de temperatură 50-160 °C cu o pierdere de masă de 74.81%. Viteza maximă DTG a fost atinsă la $T_{DTG} = 159.1$ °C. A doua etapă a fost înregistrată între intervalul de temperatură de 160-220 °C, cu o valoare a pierderii de masă de ~ 22.6% și un $T_{DTG} = 186.5$ °C. Pentru această etapă, curbele DTG prezintă un profil abrupt, revenind de la punctul maxim la valoarea inițială, fiind atribuită unui proces de vaporizare de ordin zero.

Pentru uleiul obținut după 85-90% înflorire, prima etapă a fost înregistrată în intervalul de temperatură 50-160 °C cu o pierdere de masă de 73.52%. Viteza maximă DTG a fost atinsă la $T_{DTG} = 158.1$ °C. A doua etapă a fost înregistrată între intervalul de temperatură de 160-220 °C, cu o valoare a pierderii în masă de ~ 24.11% și un $T_{DTG} = 187.1$ °C. Pentru această etapă, curbele DTG prezintă un profil abrupt, revenind de la punctul maxim la valoarea inițială, fiind atribuită tot unui proces de vaporizare cu ordin zero.

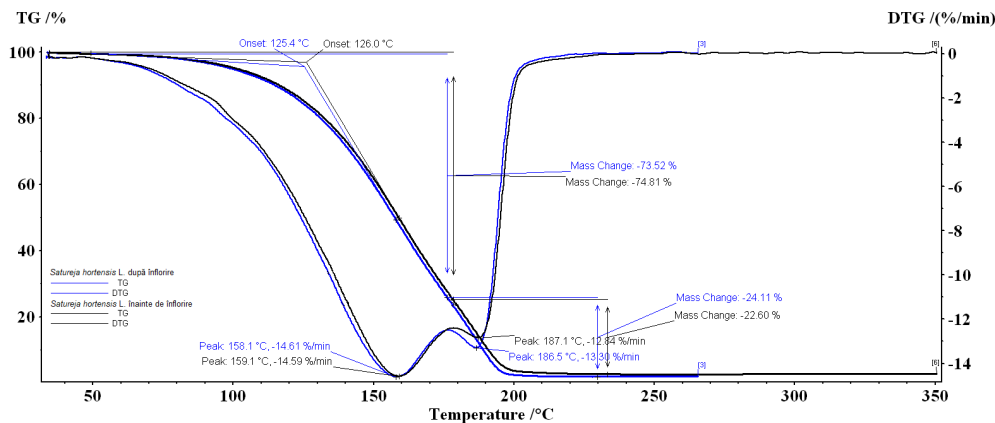


Figura 7.8. Curbele TG/DTG suprapuse pentru probele de ulei esențial de *S. hortensis* (la butonizare și peste 85-90% înflorire) înregistrate în aer dinamic (100 mlmin^{-1} , 20% O_2)

Capitolul 8. Caracterizarea extractelor hidroalcoolice din deșeurile rezultate în urma distilării plantelor aromatice

S-a propus valorificarea materialului vegetal epuizat rezultat în urma obținerii uleiurilor esențiale și optimizarea metodelor de extracție a principiilor active (compuși fenolici, flavonoide, vitamine).

S-a efectuat caracterizarea extractelor bogate în principii active prin metode cromatografice (UHPLC), s-au determinat compușii fenolici totali prin metoda Folin-Ciocalteu și capacitatea antioxidantă prin metoda DPPH.

8.2.2. Determinarea compoziției chimice a extractelor de polifenoli prin analize HPLC

Extractele obținute din deșeurile rezultate în urma distilării plantelor aromatice DD1, sunt bogate în polifenoli, după cum se arată în datele cantitative din analiza cromatografică prezentată în tabelele 8.2 și 8.3. Componente ca: rutin, quercetin, camferol, catechin, pirogalol, pirocatecol, acid *p*-cumaric, galic, cafeic, vanilic, siringic, ascorbic și riboflavina au fost identificate și cuantificate.

Compușii fenolici majoritari determinați în extractele hidro-alcoolice au fost: pirocatecol, acid galic, acid *p*-cumaric, acid cafeic, acid vanilic, rutin și acidul siringic. Din totalul compușilor fenolici, acidul galic a fost detectat în intervalul 5.3 (TVDV DD1 40) - 2175 (OVA DD1) mg /L și pirocatecol în 12 (SH DD1 96 FUS) - 2177 (OVA DD1 96) mg/L. Vitamine precum acidul ascorbic și riboflavina au fost de asemenea prezente în cantități mari în toate extractele cu cea mai mare cantitate de riboflavină de 10531,71 mg / l, determinată în OVA DD1 60.

Concentrațiile etanolice utilizate pentru extracție au influențat diferit cantitatea de compuși fenolici. De exemplu, în cazul catechinei (un flavonoid) se obține o extracție maximă cu o soluție de etanol 40%, rezultând 104-930 mg/L, în timp ce pentru acidul galic (acid hidroxibenzoic) extracția cea mai eficientă a fost cu apă, 454-2175 mg / L. S-a observat creșterea concentrației compușilor de interes cu scăderea concentrației de etanol. O astfel de afinitate pentru apă și concentrații scăzute de etanol au fost regăsite și în literatura de specialitate, astfel că cele mai eficiente concentrații au fost 45 și 60%.

8.3.2. Conținutul total de polifenoli

Conținutul total de fenoli examinat din extractele hidroalcoolice a variat de la 262 (SH DD1 95% FUS) la 6926 (OVA DD1 0%) mg GAE/L (Tabelul 8.4). Extracția clasică Soxhlet a dus la cele mai bune randamente, urmată de extracția cu ultrasunete (US) și apoi macerarea statică. O temperatură ridicată combinată cu agitarea are un randament de extracție mai bun comparativ cu extracția statică la temperaturi mai scăzute. În cazul extracției cu ultrasunete, deși matricea celulară a fost deteriorată, oferind o șansă mai mare de contact cu solventul, lipsa temperaturii înalte reduce randamentul de extracție în unele cazuri aproape la jumătate: 2057 și 1309 mg GAE/L pentru TVDV DD1 96 și TVDV DD1 96 US, de asemenea, 1590 și 875 mg GAE/L SH DD1 96 și SH DD1 96 US. Macerarea statică este consumatoare de timp și spațiu. În toate cazurile, extracția cu soluție de etanol 60% oferă cele mai bune rezultate pentru obținerea de compuși bioactivi cu valoare nutrițională și funcțională.

8.3.3. Determinarea activității antioxidante

Din punct de vedere al activității antioxidante, pentru deșeurile de *T. vulgaris*, *O. vulgare* și *S. montana*, pentru toate cele trei metode de extracție efectuate, nu există diferențe, sau dacă există, acestea sunt minore. Pentru deșeurile de *S. hortensis*, diferențele între metodele de extracție sunt mai mari, activitatea antioxidantă a extractelor obținute prin metoda Soxhlet și cea cu ultrasunete au valori aproape duble față de macerarea statică.

Inhibiția a variat între 93,557 -...- 36,319 %, între 47,165 -...- 18,431 mg GAE/L și între 4,0277 -...- 1,4529 mmol TEAC/L pentru OVA DD1 96 US și pentru SH DD1 96 FUS. Cu toate acestea, toate extractele obținute au prezentat o activitate antioxidantă remarcabilă, rezultate comparabile cu cele din literatura de specialitate.

II. CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

După primul an de vegetație, parcelele cu plante cultivate în condițiile pedoclimatice de la SCDA Lovrin prezentau plante puternic înrădăcinate, fără prezența golurilor datorate plantelor uscate sau atacate de dăunători.

Din anul doi de vegetație, plantele au fost monitorizate în cadrul experimentelor unde: (i) au fost urmărite fazele fenologice pentru stabilirea momentului optim pentru recoltarea plantelor; (ii) au fost determinați parametrii de fotosinteză și au fost efectuate corelații între parametrii fotosintetici în funcție de activitatea fotosintetică radiantă; (iii) au fost analizați pigmentii asimilatori pentru cele patru specii studiate, iar cele mai mari cantități au fost determinate în plantele de *Thymus vulgaris* (718.32 mg/m² pentru clorofila b și 1464.76 mg/m² pentru clorofila a) și cele mai mici au fost regăsite în *Satureja montana* (63.30 mg/m² și respectiv 121.98 mg/m²).

Recoltarea a fost efectuată la momentul optim când conținutul în ulei esențial atinge maximul, dar și în cadrul a două faze fenologice stabilite anterior: la butonizare și peste 85-90% înflorire.

Uscarea a avut loc în aer ambiental fiind calculate randamentele de uscare, cu cele mai bune valori obținute pentru plantele de *Origanum vulgare*.

Uleiul esențial a fost extras utilizând un alambic de cupru iar randamentele de obținere a uleiului esențial au fost calculate, astfel că cele mai bune valori au fost obținute pentru plantele de *Satureja hortensis* 1.7%.

Pentru toate uleiurile esențiale obținute au fost efectuate analize gaz-cromatografice unde s-a determinat compoziția chimică. Rezultatele obținute corespund cu valorile descrise de literatura de specialitate.

Au fost observate diferențele de compoziție chimică a uleiurilor esențiale obținute din plante recoltate la butonizare și din plante recoltate după 85-90% înflorire în cadrul a două cicluri vegetative în anul 2017 și 2018. De exemplu, pentru uleiul esențial *Origanum vulgare* compusul majoritar s-a modificat din γ -terpinen în linalol, iar pentru *Satureja hortensis* din carvacrol în γ -terpinen. Datorită acestor modificări de compoziție chimică între cele două faze fenologice și cicluri vegetative, este posibilă planificarea din timp a recoltării plantelor, pentru a obține uleiuri esențiale cu o compoziție chimică diferită față de cele clasice, recoltate la momentul optim.

S-a efectuat analiza uleiurilor esențiale prin ATR-FTIR. Uleiurile esențiale fiind mixturi complexe de compuși determină suprapunerea spectrelor de absorbție, dar pe baza compoziției chimice specifice, intensitatea următoarelor benzi a fost observată: 806-804 pentru timol, 811-807 pentru carvacrol, 811-812 pentru *p*-cimen, 781, 947 pentru γ -terpinen.

S-a analizat pierderea de masă în funcție de temperatură și rezistența termică a probelor de ulei esențial, iar rezultatele au fost corelate cu compoziția lor chimică, determinată prin GC-MS. Rezultatele obținute evidențiază faptul că majoritatea probelor de uleiuri esențiale au prezentat stabilitate termică până la temperatura de ~50 °C, iar etapele pierderii de masă înregistrate pe curbele TG/DTG/DTA apar datorită proceselor de evaporare.

S-au obținut și caracterizat extracte hidroalcoolice de compuși fenolici recuperați din produsele reziduale, fiind bogate în polifenoli ca: rutin, quercetin, camferol, catechin, pirogalol, pirocatecol, acid *p*-cumaric, acid galic, acid cafeic, acid vanilic, acid siringic, acid ascorbic și riboflavină. S-a optimizat o metodă, stabilind concentrația solventului, temperatura, durata etc., în funcție de compușii care trebuie extrași. Toate extractele au arătat un conținut ridicat de compuși bioactivi de interes care ar putea fi utilizați ca antioxidanți sau aditivi naturali în conservarea alimentelor și, de asemenea, în industria farmaceutică și medicina veterinară.

Măsura în care au fost atinse obiectivele cercetării:

Atingerea obiectivelor cercetării au fost îndeplinite realizându-se studierea din punct de vedere al agronomiei, fiziologiei și al compoziției chimice a patru specii de plante aromatice din culturile înființate în condițiile pedoclimatice din cadrul Stațiunii de Cercetare și Dezvoltare Agricolă de la Lovrin.

Direcțiile în care trebuie continuată cercetarea:

Monitorizarea și analizarea continuă a factorilor de mediu care pot avea un impact asupra compoziției chimice a compușilor cu caracter bioactiv. Noile practici ecologice, impun folosirea materiilor prime integral, cu cât mai puține deșeuri posibil, cerând o extracție mai eficientă a compușilor de interes sau utilizarea în continuare a deșeurilor generate. Astfel, având tehnologia necesară, se pot obține peleți sau brichete de combustibil din biomasa epuizată în uleiuri esențiale și compuși fenolici. Peleții obținuți din deșeurile de distilare DD2 pot fi echivalenți cu combustibilii tradiționali. Peleții pe bază de biomasă sunt mai ieftini de produs, sunt considerați un biocombustibil solid și, prin urmare, au un "impact zero" în ceea ce privește calcularea cotelor de gaze poluante.

Avantajele și dezavantajele înregistrate:

În cadrul experimentelor efectuate s-au obținut informații utile cu privire la cultivarea plantelor aromatice în condițiile pedoclimatice de la SCDA Lovrin, compușii bioactivi obținuți din acestea având un potențial crescut de utilizare atât în medicina alternativă cât și în cadrul industriei alimentare. Pentru realizarea extractelor de compuși bioactivi nu s-au întâmpinat dificultăți, experimentele desfășurându-se fără probleme.

Contribuții proprii ale autorului:

Pentru efectuarea cercetărilor a fost necesară studierea amănunțită a literaturii de specialitate specifice privind cultivarea, îngrijirea și monitorizarea culturilor de plante aromatice, precum și metodele de extracție a uleiurilor esențiale și a compușilor bioactivi. Cele patru specii de plante aromatice cultivate au fost monitorizate de-a lungul a mai multor cicluri de vegetație pentru urmărirea stării generale a plantelor și pentru observarea fazelor fenologice, care au influențat momentul de recoltare și de obținere a uleiurilor esențiale.

Pentru analiza uleiurilor esențiale obținute la momentul optim sau în diverse etape fenologice, au fost utilizate metode complementare de analiză, GC-MS, ATR-FTIR și TG/DTG/DTA.

Pentru obținerea compușilor fenolici din deșeurile rezultate în urma obținerii uleiurilor esențiale au fost optimizate metode de extracție, iar caracterizarea a fost efectuată prin analize spectrofotometrice (conținut total fenoli și activitate antioxidantă) și prin cromatografie utilizând un UHPLC-DAD calibrat cu standarde externe.

IV. ELEMENTE DE ORIGINALITATE

Elementele de originalitate a cercetărilor desfășurate în cadrul acestei teze se datorează mai multor aspecte:

- obținerea de uleiuri esențiale din plante recoltate la momentul optim și în cadrul a două faze fenologice prestabilite (la butonizare și la peste 85-90% înflorire) cultivate în condițiile pedoclimatice de la SCDA Lovrin
- analizarea și compararea compoziției chimice a acestora atât între ele cât și cu rezultatele prezentate în literatura de specialitate
- utilizarea deșeurilor rezultate în urma distilării plantelor aromatice cu scopul obținerii de compuși bioactivi
- analizarea extractelor hidroalcoolice și încorporarea acestora în produse alimentare (brevet în curs de realizare).

Bibliografie

Bibliografia cuprinde 177 de titluri bibliografice.

Banat's University of Agricultural Sciences and Veterinary
"King Michael I of Romania" from Timișoara



Faculty of Agriculture

MOISĂ CRISTIAN

Summary

Ph.D THESIS

**THE STUDY OF BIOACTIVE COMPOUNDS EXTRACTED
FROM FOUR AROMATIC PLANTS CULTIVATED IN THE
PEDOCLIMATIC CONDITIONS OF SCDA LOVRIN**

Scientific Coordinator:

PROF. UNIV. DR. GEORGETA POP

Timișoara

2019

A. INTRODUCTION

Motivation in choosing the research theme

In recent years, medicinal plants tend to become "industrialized products" with new concepts such as phytotherapy, aromatherapy, nutraceuticals and parapharmaceuticals. The increasing popularity and acceptability of herbal medicines is due to the belief that all-natural products are safe, cheap and available in the usual way. So, the medicinal herb industry budget is around \$ 100 billion annually.

The topic of choice was due to the need for a scientific evaluation of bioactive compound extracted from medicinal plants. For these, the culture of four aromatic plants have been established in the pedoclimatic conditions of the Lovrin Agricultural Research and Development Resort (SCDA), located in the Banat lowland area on the western part of Timiș county. This area is represented by flat, corrugated surfaces, characterized by a temperate climate with slight subtropical and continental influences, constituting an area conducive to the growth and cultivation of essential oils bearing medicinal plants.

The importance and timeliness of the theme

The harvesting of essential oils bearing plants is continuously growing and the amount of waste resulting from processing is directly proportional. Since the essential oil content aromatic plants is very low (0.1 - 2.6%), most of the vegetal material subjected to distillation is waste without a subsequent purpose. Thus, the motivation for choosing the research topic was influenced by the subsequent exploitation of the waste resulting from distillation, both in terms of economy, ecology and pharmacognosy.

Brief presentation of the content

This paper is structured in two parts.

The **first part** of the thesis presents the study of scientific literature on the stage of *Lamiaceae* family research, as well as the variability of the peculiarities of the cultivated species, the chemical composition of the secondary metabolites and the environmental factors and their mode of action on the medicinal plants.

In the **second part** we present our own research on the cultivation of the four aromatic plants belonging to the *Lamiaceae* family under the pedoclimatic conditions at the Lovrin Agricultural Research and Development Station. The production and conditioning of the plant material was carried out at the "King Mihai I of Romania" University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine of Banat in Timisoara.

The experimental part, production and analysis of essential oils and phenolic compounds (GC-MS, ATR-FTIR, TG / DTG / DTA, UHPLC and spectrophotometry) was carried out in the laboratories of the Institute for Research, Development and Innovation in Technical and Natural Sciences Aurel Vlaicu University in Arad.

Degree of assignment of the topic to the international, national, regional, research team

Articles in the literature present the analyzed species, which are predominantly grown in the Mediterranean basin or Asia. As the volatile oil industry is constantly expanding, the problem of wastes resulting from distillation, which at present does not have a well-defined solution, is becoming more common. The general disappointment with conventional (synthetic) drugs coupled with the desire to adopt a "natural" lifestyle has led to an increase in the requirement for herbal medicines and herbal supplements. These assertions are supported by the growing number of studies that relate to obtaining and analyzing the chemical composition of bioactive compounds.

In order to achieve this goal, the essential oils were extracted and analyzed, and the waste from the distillation was used to obtain and characterize extracts rich in phenolic compounds.

Scientific objectives proposed for resolution in scientific research

The **main purpose** was to study from the agronomy, physiology and chemical composition point of view, the four species of aromatic plants established under the pedoclimatic conditions of the Lovrin Agricultural Research and Development Station.

Considering the purpose of this study, the **main objective** derived from it was the proposal to exploit the full potential of the plant material (of the four harvested aromatic plants) economically and ecologically.

The **derived objectives** from the main objective are: (i) characterization of the chemical composition of the essential oils obtained at the optimal harvest time as well as those obtained during certain phenological phases; (ii) characterization of the extracts rich in bioactive compounds and optimization of the methods of extraction from the waste resulting from the distillation.

Synthetic comments on the novelty/degree of innovation of the research method/methodology

The novelty of the studies consists in (I) the cultivation of some aromatic plant species under the pedoclimatic conditions at Lovrin Agricultural Research and Development Station, (II) obtaining and

characterization of essential oils by various methods (GC-MC, ATR-FTIR , TG/DTG/DTA), (III) recovery of wastes resulting from the distillation of essential oils by obtaining hydroalcoholic extracts rich in phenolic compounds with bioactive properties, (IV) characterization of hydroalcoholic extracts by spectrophotometric methods and by liquid chromatography (UHPLC-DAD).

B. THE Ph.D THESIS CONTENT

I. CURRENT STATE OF KNOWLEDGE REGARDING STUDIED PLANTS VARIABILITY

Chapter 1. The state of research on the variability of the studied plant characters

1.1. The state of research on cultivated plants of the *Lamiaceae* family

The *Lamiaceae* family comprises a large group of herbaceous, shrubs and subshrubs, perennial or annual plants, strongly aromatic. It includes 236 genres and numbers about 7,173 species, divided into several subfamilies. They produce a wide variety of secondary compounds, being famous for essential oils secreted by glandular trichomes present on the surface of leaves and inflorescences, as well as a large number of phenolic compounds, which are often accumulated in plants at high concentrations. The most common phenolics in this family are caffeic acid esters and flavonoids.

Mediterranean region alongside Central and South West Asia are one of the largest and most diverse centers in the world, including many genres such as *Teucrium*, *Scutellaria*, *Phlomis*, *Stachys*, *Lamium*, *Sideritis*, *Salvia*, *Satureja*, *Thymus*, *Origanum*, *Nepeta* and many others.

The family is known for the many aromatic plants that have been widely used since antiquity. They are rich in essential oils, produced in the glandular trichomes, especially on the surface of the leaves. The most common species are *Salvia*, *Mentha*, *Thymus*, *Origanum* (oregano and marjoram), *Satureja* (summer and winter savory), *Rosmarinus* (Rosemary), *Melissa* (rosin), *Ocimum* (basil), *Lavandula* (lavender and lavender).

1.2. The state of research on the variability of the particularities of the thyme (*Thymus vulgaris* L. var. *Doone Valley*)

The genus *Thymus* belongs to the *Lamiaceae* family (*Labiatae*), the subfamily *Nepetoideae*, the tribe *Mentheae*. The geographical distribution of this genus can be described as Eurasian and Mediterranean, especially in the Iberian Peninsula and North West Africa. Today, approximately 250 categories (214 species and 36 subspecies) are known and subdivided into 8 sections. Thyme is represented by two major classes of secondary compounds: essential oil and non-volatile polyphenols.

The dry plant material contains between 1 and 2.5% essential oil, and the following chemical composition was determined by gas chromatography: thymol ~ 30-55% (which gives the specific smell) along with carvacrol (~ 1-5%), *p*-cymene (~ 15-20%) and γ -terpinene (~ 5-10%), linalool (~ 1-5%), β -caryophyllene (~ 1-3% borneol, camphor, limonene, myrcene, β -pinene, trans-sabinene hydrate, β -terpineol and terpinen-4-ol. Up to 25 different flavonoids can be observed and are especially present in the form of their aglycons. Apigenin and luteolin flavonoids are the most important flavonoids present both as aglycone and as o-glycosides. Tannin also contributes to its commercial use. They are predominantly rosmarinic acid (~ 0.15-2.6%), caffeic acid and dehydrocaffeic acid as well as free phenolic acids: caffeic, *p*-cumaric, syringic and ferulic acid. Thyme grows in almost any climate that has an annual average temperature of 7 to 20 °C and can be harvested in the first year of vegetation in September-October, and from the second year of vegetation, 2-3 harvesting rounds. Generally, thyme is the most aromatic in the flowering period or even at the beginning of the flowering phase, the optimal harvesting period being the last decade of May and the beginning of June.

1.3. The state of research on the variability of peculiarities of oregano (*Origanum vulgare* L. var. *aureum*)

The *Origanum* genus is part of the *Lamiaceae* family, the *Nepetoideae* subfamily, the *Mentheae* tribe and comprises 39 species widespread in the Mediterranean region, predominantly *Origanum vulgare*. It is represented by the two major classes of secondary compounds, namely volatile oils and non-volatile phenolic compounds. The dry plant material has a volatile oil content ranging from 0.5 to 1.5% and is rich in carvacrol, thymol, cis and trans-sabinene hydrate, α -thujene, sabinen, γ -terpinene, *p*-cymene, thymol and carvacrol methyl ether, thymol and carvacrol acetate, *p*-cymenene, *p*-cimen-8-ol, *p*-cimen-7-ol, thymoquinone, etc. Other substances commonly found in *Origanum* species are geraniol monoterpenes, linalool, camphene, camphor, borneol, bornyl, isobornyl acetate; and sesquiterpenes β -caryophyllene, β -bisabolene, β -bubonen, germacren-D, bicyclogermacrene, β -humulene, β -muurolene, γ -muurolene, γ -cadinene, alloaromandren, cadinol. In the *Origanum* plants, *p*-hydroxybenzoic acids (pirtocatechic, vanilic, syringic and gallic) and hydroxycinnamic (*p*-coumaric, caffeic, ferulic, synaptic) have been identified. Oregano plants have a higher content of rosmarinic acid than *Rosmarinus* and *Salvia*.

Oregano grows spontaneously in the Mediterranean basin, especially in high areas with an average temperature of 6-28 ° C, with average precipitation of 500-2700 mm and a soil pH of 4.9-8.7, being well adapted to well-drained, fertile soils and clay. The optimum harvest period is the last decade of June, but it can be harvested till October. The optimum harvest time is during blooming (40-50% of flowering plants) on warm sunny days.

1.4. The state of research on the variability of particularities in summer savory (*Satureja hortensis* L.)

This species is native to southern Europe and Turkey, but it has expanded and was cultivated in other areas as an aromatic plant. The genus *Satureja*, is consisting of approximately 14 species of herbs or subshrubs, strongly aromatic, annual or perennial. The summer savory (*S. hortensis*) is an annual plant often cultivated in gardens and contains between 0.2 and 3% of volatile oil in yellow to dark brown color, and its major components are: carvacrol, *p*-cymene, α -thujene, α -pinene, myrcene, γ -terpinen, thymol, linalool and β -caryophyllene.

Plants of *Satureja hortensis* have a wild-type aroma, and fresh leaves have the following chemical composition: water (72%), protein (4.2%), fat (1.65%), sugar (4.45%), ash (2.11%). The leaves also contain phenolic substances, labiatic acid, ursolic acid, β -sitosterol and volatile oil. The harvest period is at the end of June, until the first decade of July, when the flowers are at 40-50% flowering. The optimum harvest time is in sunny weather, after the dew has risen.

1.5. The state of research on the variability of particularities in winter savory (*Satureja montana* L.)

This species is native to southern Europe and northern Africa but has expanded and was cultivated in other areas as an aromatic plant. Winter savory is an evergreen perennial plant with small erect stems, lignified at base and tetramuchiata, growing about 30-60 cm high, strongly branched. Many of the volatile oil components of *Satureja montana* L. are susceptible to its growth medium. Consequently, the existence of variations in composition is expected. The plant contains between 0.2 and 2.5% volatile oil having the color ranging from yellow to dark brown, and its major components are: carvacrol, *p*-cymene, carvacrol methyl ether, α -thujene, α -pinene, myrcene, thymol, linalool and β -caryophyllene

The harvest period is from the end of June to October, when the flowers are at 40-50% flowering. The first harvest can take place in the autumn of the first year of vegetation. The optimum harvest time is in sunny weather, after the dew has risen.

Chapter 2. The state of the art regarding secondary metabolites from aromatic plants belonging to the *Lamiaceae* family

2.1. Stadiul cercetărilor privind uleiurile volatile și compușii fenolici din familia *Lamiaceae*

Generic metabolites are metabolic products or intermediates found in most living systems that are essential for growth and life, being biosynthesized through a limited number of biochemical pathways and traditionally classified as primary and secondary metabolites. Secondary herbal metabolites can be divided into three major groups: flavonoids (phenolic compounds and polyphenols), terpenoids and alkaloids (nitrogen and sulfur containing compounds).

The main groups of phenolic compounds in medicinal and aromatic plants are simple phenols, coumarins, flavonoids, tannins, lignans, phenylpropanoids, etc. and subgroups of these large groups, which play important roles in the growth, reproduction or limitation of the pathogenic attack, and in the human diet they have a wide range of biological and physiological functions: antimicrobial, antiallergic, anti-inflammatory, etc.

Terpenic compounds are derived from two or more C5 units (isoprene) and are aromatic fluids derived from plant material: flowers, roots, bark, leaves, seeds, husks, fruits, wood and whole plants. Applications of volatile oils for various purposes vary and include in addition to their use in gastronomy to improve the taste of dishes and health benefits, and their use in cosmetics and perfumery.

Alkaloids are basic compounds of plant origin which have strong biological effects and have an N atom in a heterocyclic ring or ring system and N originates from one of the essential amino acids.

2.2. Environmental factors and their effect on aromatic plants

Both under natural conditions and in agricultural crops, plants are frequently exposed to stress from the environment. Certain environmental factors, such as air temperature and luminous intensity, can become a stress factor in relatively short time (minutes, hours), while others such as water content in soil, need a few days or weeks, and mineral deficiency in the soil can induce stress after a few months. So, plant stress plays a major role in determining the distribution of plants affected by soil and climate. Thus, understanding the physiological processes underlying stress, acclimatization and adaptation of plants are of particular importance to agriculture and the environment.

Plants have to deal with a number of biotic and abiotic stressors throughout their life cycle. Also, almost all plant species are emitting various volatile organic compounds (VOC) under both normal and stress conditions, emitting over 100,000 chemical compounds of which at least 1700 are volatile.

II. Personal contributions

Chapter 3. Growing aromatic plants in the pedoclimatic conditions from SCDA LOVRIN and analyzing physiological parameters

The purpose of this chapter was to establish four crops of aromatic plants under the pedoclimatic conditions of the Lovrin Agricultural Research and Development Station for their physiological characterization.

The studied plant material was grown in SCDA Lovrin 20° 47 'longitude E and 45° 57' latitude N, Timis county. Three perennial plant species were studied: *Thymus vulgaris* L., *Satureja montana* L. and *Origanum vulgare* L., as well as an annual plant species, *Satureja hortensis* L..

Photosynthesis parameters were determined using a portable gas exchange system (GFS-3000, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany). The net rate of CO₂ assimilation and stomatal conductance were analyzed. Also, determination of assimilation pigments was performed using high performance liquid chromatography (UHPLC, Nexera X2, Shimadzu, Tokyo, Japan) equipped with a DAD detector (M30A, Shimadzu, Tokyo, Japan).

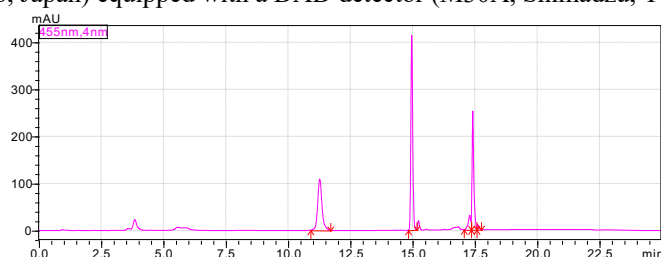


Figure 3.12. Example of assimilation pigments chromatogram (*Thymus vulgaris* L. var. Doone Valley)

Table 3.9. Assimilatory pigments quantity determined in the studied plants

Assimilatory pigments (mg/m ²)	Lutein	Chlorophyll b	Chlorophyll a	α-Carotene	a/b
<i>Thymus vulgaris</i> L. var. Doone Valley	96.68 ± 0.43	718.32 ± 2.31	1464.76 ± 2.50	27.75 ± 0.77	2.04
<i>Origanum vulgare</i> L. var. aureum	37.23 ± 0.37	250.13 ± 1.58	492.12 ± 6.12	8.26 ± 0.37	1.97
<i>Satureja hortensis</i> L.	17.40 ± 0.67	135.41 ± 0.45	256.64 ± 1.16	6.11 ± 1.13	1.90
<i>Satureja montana</i> L.	8.68 ± 2.1	63.30 ± 0.71	121.98 ± 4.50	26.67 ± 1.07	1.93

The assimilatory pigments in the four studied plants present the highest amounts in *T. vulgaris* plants (718.32 mg/m² for chlorophyll b and 1464.76 mg/m² for chlorophyll a), and the smallest were found in *S. montana* (63.30 mg / m² and 121.98 mg / m² respectively). The ratio of chlorophyll a chlorophyll b was about 2, corresponding to the values found in the literature. Due to the low height of *T. vulgaris* plants, their development under shady conditions can lead to an increase of up to three times the amount of chlorophyll pigments. Leaves with higher pigmentation are more effective in absorbing light on the biomass unit by balancing carbon absorption under low light conditions.

Chapter 4. Obtaining extracts rich in active principles from aromatic plants belonging to the Lamiaceae family

The purpose of this chapter was to obtain plant material, volatile oil extracts and hydroalcoholic extracts from the four aromatic plant species. Harvesting the herb for the plants taken in this study was performed on the specificity of each species, and the moisture content was removed by using lower temperatures to not degrade the bioactive compounds in the plants.

Essential oils were obtained by steam distillation using a copper alembic for essential oils and the separation of the hydrolat from the oil was made using a separating funnel.

The mixture of polyphenols is obtained by extracting them from the distillation waste with a mixture of solvents (ethanol and water) and the use of 1:10 w/v ground waste in concentrated ethanol solutions (0, 40, 60, 80 and 96% respectively) and by using three extraction methods: (i) 2 hours and 30 minutes boiling, (ii) static maceration under refrigeration conditions (+ 4°C) for 7 days, and (iii) extraction at US at 35 kHz, 100% power for 2 hours and 30 minutes followed by static maceration under refrigeration conditions (+4 °C) for 7 days.

Table 4.1. Months of harvest for studied medicinal plants

Name	Used part	Month of harvesting											
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
<i>Thymus vulgaris</i> L. var. <i>Doone Valley</i>	herba (butonizare)												
<i>Origanum vulgare</i> L. var. <i>aureum</i>	herba (40 – 45%) in florire												
<i>Satureja hortensis</i> L.	herba (40 – 50%) in florire												
<i>Satureja montana</i> L.	herba (40 – 50%) in florire												

Chapter 5. The chemical composition of essential oils determined by GC-MS analysis

The characterization of the general chemical composition of the essential oils obtained from the medicinal plants studied at both the optimal harvesting time and the two phenological phases, was made using gas chromatography coupled with mass spectrometry.

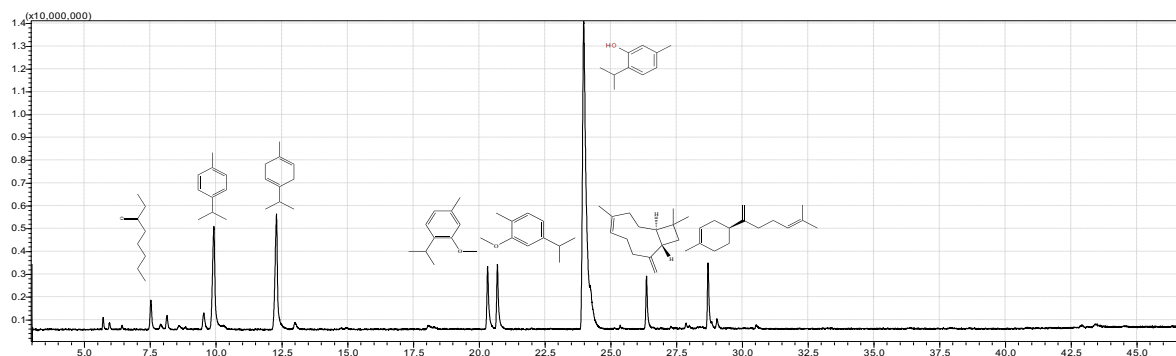
The essential oil constituents were determined using a gas chromatograph (Shimadzu2010, Kyoto, Japan) coupled to a triple quadrupol mass spectrometer (TQ 8040, Shimadzu, Kyoto, Japan). Essential oil compounds were identified based on the specific mass spectrum, using the NIST 14 and Wiley 09 libraries.

5.3.1. Chemical composition of the essential oils obtained from plants harvested at the optimum time

Table 5.2. Comparison of major compounds (above 5%) from the four studied essential oils

Nr. Crt.	Compound name	<i>Thymus vulgaris</i> L. (%)	<i>Origanum vulgare</i> L. (%)	<i>Satureja hortensis</i> L. (%)	<i>Satureja montana</i> L. (%)
1	<i>p</i> -cymene	10.59	19.37	5.54	14.91
2	γ -terpinene	11.88	15.9	44.83	1.65
3	linalool	0.1	24.54	-	1.03
4	thymol methyl ether	4.94	2.56	-	-
5	carvacrol methyl ether	5.13	-	0.47	10.06
6	thymol	42.35	5.57	0.1	-
7	carvacrol	5.67	-	31.11	60.85
8	germacrene D	0.13	8.34	-	-

p-cymene and γ -terpinene were identified in all four cultivated species in different proportions: *Thymus vulgaris* 10.59% and 11.88%, *Satureja montana* 14.91% and 1.65%, *Satureja hortensis* 5.54% and 44.83%, and in *Origanum vulgare* 19.37 % and 15.9%. Derived from cymene, the monoterpene thymol is the major component in the composition of the *T. vulgaris* essential oil (42.35%) and is found in smaller amounts in *S. montana* (10.06%) and *O. vulgare* (5.57%). The results obtained are consistent with those published in the literature which state that thymol is a major chemical compound in essential oil obtained from herba thymi.

Figure 5.3. *Thymus vulgaris* L. var. *Doone Valley* chromatogram

5.3.2. The chemical composition of the studied essential oils during two phenological phases (in bud stage and over 85-90% open flowers) and two vegetative cycles (2017 and 2018)

The aerial parts of *T. vulgaris*, *O. vulgare*, *S. hortensis* and *S. montana* were harvested during two phenological phases (in buds and over 85-90% open flowers) during two cycles of vegetation (2017 and 2018) at the Lovrin Agricultural Research and Development Station (SCDA Lovrin), Timiș County - 20 ° 47 'E longitude and 45 ° 57' N latitude. To obtain the essential oils, dried plants have undergone hydro- distillation using a 5L copper alembic. The essential oil obtained was stored in the refrigerator at 4 ° C in dark bottles.

Table 5.8. The major compound for the studied essential oils over a two years period (2017 and 2018) and two phenological phases (in bud stage and over 85-90% flowering)

Essential oil	Phenological stage	Major compound
<i>Thymus vulgaris</i> L. var. <i>Doone Valley</i> 2017	buds	thymol
	over 85-90% flowering	thymol
<i>Thymus vulgaris</i> L. var. <i>Doone Valley</i> 2018	buds	thymol
	over 85-90% flowering	<i>p</i> -cymene
<i>Origanum vulgare</i> L. var. <i>aureum</i> 2017	buds	γ -terpinene
	over 85-90% flowering	linalool
<i>Origanum vulgare</i> L. var. <i>aureum</i> 2018	buds	γ -terpinene
	over 85-90% flowering	linalool
<i>Satureja hortensis</i> L. 2017	buds	carvacrol
	over 85-90% flowering	γ -terpinene
<i>Satureja hortensis</i> L. 2018	buds	γ -terpinene
	over 85-90% flowering	carvacrol
<i>Satureja montana</i> L. 2017	buds	carvacrol
	over 85-90% flowering	carvacrol
<i>Satureja montana</i> L. 2018	buds	carvacrol
	over 85-90% flowering	carvacrol

GC-MS analyzes demonstrated different chemical compositions, and for some of the oils a change in the major compound was observed between the two phenological phases.

For the year 2017, *T. vulgaris* and *S. montana* oil maintained their major compound, thymol and carvacrol respectively, while for *O. vulgare* the major compound changed from γ -terpinene to linalool, and for *S. hortensis* from carvacrol to γ -terpinene.

For the year 2018, only the oil obtained from *S. montana* maintained its major compound, carvacrol, while all the others changed. The essential oil from *T. vulgaris* switched from thymol to *p*-cymene, *O. vulgare* switched from γ -terpinene to linalool, and *S. hortensis* switched from γ -terpinene to carvacrol.

Because of the differences in chemical composition between the two phenological phases and vegetative cycles, it is possible to plan ahead plant harvest in order to obtain essential oils with a different chemical composition than the classical ones harvested at the optimum time.

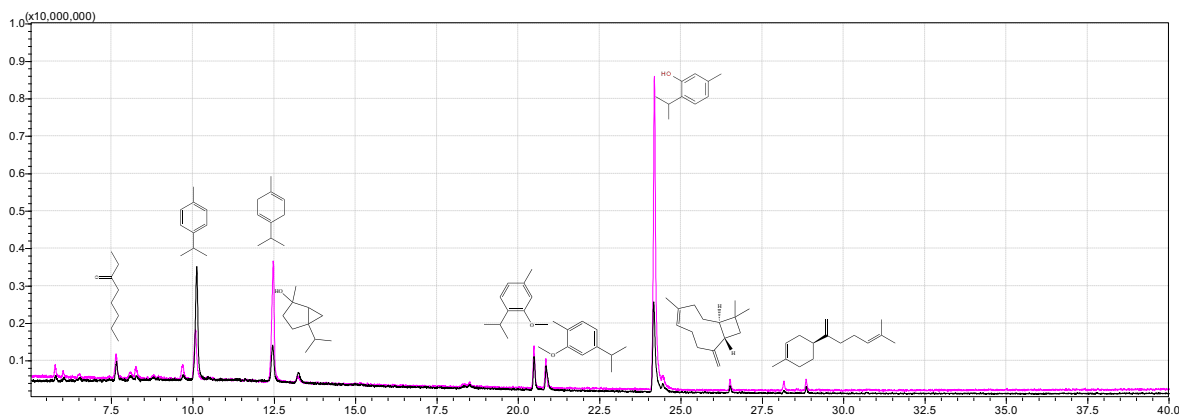


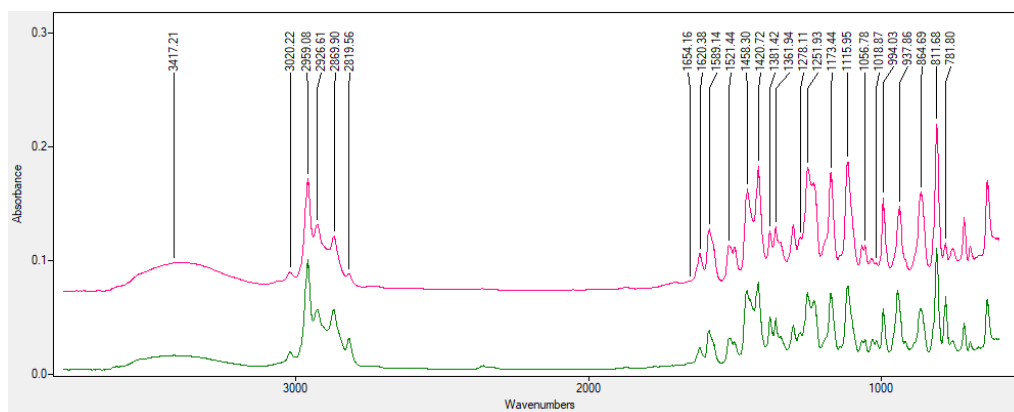
Figure 5.8. Overlapped chromatogram of Thymus vulgaris L. var. *Doone Valley* essential oils from 2018 (pink – in bud stage, black – over 85-90% bloomed flowers)

Chapter 6. ATR-FTIR analysis of studied essential oils within different phenological stages (before and after flowering) for the year 2017

The compositional characterization of essential oils was performed according to the phenological phases in which the plants were found during harvesting and choosing the optimal harvesting time was determined based on the desired chemical composition, using simple, fast and non-destructive methods.

Changes in chemical composition of essential oils have been observed, influencing the major component determined in essential oil by both gas chromatographic (GC-MS) and FTIR spectra analysis.

The detailed spectral analysis of the analyzed oils is based on the vibrational spectra of the terpenic compounds present, and the recorded spectra are shown in the following figures, with the addition of the characteristic bands.



ATR-FTIR spectra for *Satureja montana* essential oil obtained from plants harvested in buds (green) and over 85-90% flowering (pink)

Based on the specific chemical composition, the intensity of the following bands was observed: 806-804 for thymol, 811-807 for carvacrol, 811-812 for p-cymene, 781, 947 for γ -terpinene. Other principal compounds identified by GC-MS analysis and confirmed by presence in the ATR-FTIR spectrum were identified as α -pinene at 886 and 1658 cm^{-1} , β -pinene at 873 and 1640 cm^{-1} , linalool at 835, 919, 995 and 1640 cm^{-1} , carvacrol methyl ether at 1520 cm^{-1} , β -terpinolene at 781 cm^{-1} and caryophyllene at 885 cm^{-1} .

Chapter 7. TG/DTG/DTA analysis of the studied essential oils

A characterization of the thermal stability of essential oils obtained from the studied plants was carried out. It also characterized the thermal stability of essential oils according to the phenological phase in which the plants were found during harvesting and establishing the optimal harvesting time based on the desired chemical composition.

Correlation of the chemical composition of the majority compounds determined by gas chromatographic (GC-MS) and spectroscopic (ATR-FTIR) analysis with the thermal stability of essential oils was observed.

7.3.1. TG/DTG/DTA analysis of essential oils obtained from plants harvested at the optimum time

In the 30-50 °C temperature range, the TG curves are thermally stable, with a continuous mass loss between 50 - 220 ... 260 °C, while the profile of the DTA curves suggests that complex endothermic processes take place, and in some cases involving one or more overlapped stages, as evidenced by the DTG curves.

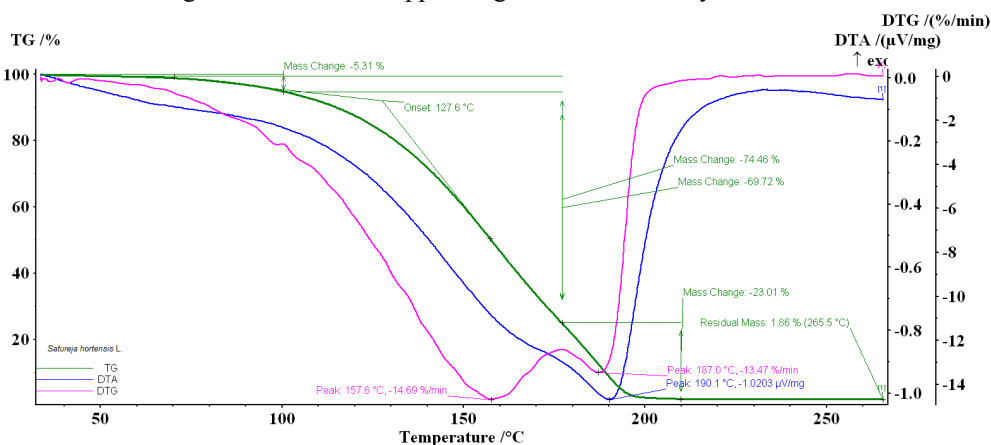


Figure 7.4. TG/DTG/DTA - *S. hortensis* essential oils, registered in dynamic air (100 mlmin^{-1} , 20% O_2)

Two stages have been recorded for *S. hortensis* oil. The first step was recorded in the temperature range of 50-175 °C with a mass loss of 74.46%. The maximum DTG speed was reached at $T_{\text{DTG}} = 157.6$ °C.

The second step was recorded between the temperature range of 175-220 °C with a mass loss of ~23.01% and a $T_{\text{DTG}} = 187$ °C. For this stage, the DTG curves have a steep profile, returning from the maximum point to

the initial value. The results highlight that for essential oils the mass loss steps recorded on the TG/DTG/DTA curves occur due to evaporation processes.

7.3.2. TG/DTG analysis of essential oils obtained from plants harvested during different phenological stages in the year 2017

Between the two phenological phases, the chemical composition of the essential oils changed, influencing the major component determined in the essential oil by both GC-MS and FTIR spectra. Thus, the profile of the TG/DTG curves changes according to the volatility of the major compounds.

For the summer savory essential oil, obtained both in buds, and over 85-90% flowering, having the similar chemical composition between the two phenological phases (γ -terpinene 40.14 - 44.9%, carvacrol 43.03 - 31.02%), in the temperature range 30-50 °C the TG/DTG curves show the samples thermal stability following a continuous mass loss between 50-220 °C, while the curves of the DTG profile suggest that the endothermic processes taking place are complex and involve at least two overlapping stages. These steps are better emphasized on the DTG curves.

For the essential oil obtained in bud stage, the first step was recorded in the temperature range of 50-160 °C with a mass loss of 74.81%. The maximum DTG speed was reached at $T_{DTG} = 159.1$ °C. The second step was recorded between the temperature range of 160-220 °C, with a mass loss value of ~ 22.6% and a $T_{DTG} = 186.5$ °C. For this stage, the DTG curves have a steep profile, returning from the maximum point to the initial value, being assigned to a zero-order evaporation process.

For the essential oil obtained after 85-90% flowering, the first step was recorded in the temperature range of 50-160 °C with a mass loss of 73.52%. The maximum DTG speed was reached at $T_{DTG} = 158.1$ °C. The second step was recorded between the temperature range of 160-220 °C, with a mass loss value of ~ 24.11% and a $T_{DTG} = 187.1$ °C. For this stage, the DTG curves exhibit a steep profile, coming back from the maximum point to the initial value, being attributed to a zero-order evaporation process.

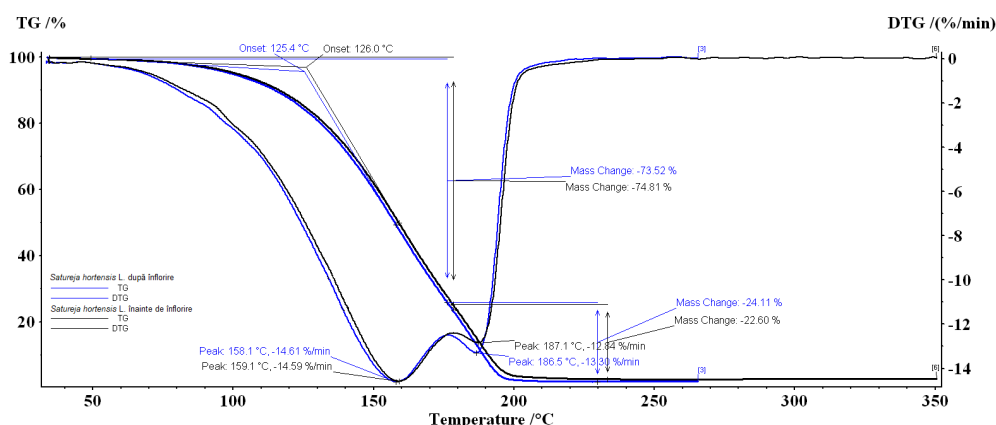


Figure 7.8. TG/DTG overlapped curves for *S. hortensis* essential oils samples (in bud stage and after 85-90% flowering) registered in dynamic air (100 mlmin^{-1} , 20% O_2)

Chapter 8. Characterization of hydroalcoholic extracts obtained from wastes resulting from distillation of aromatic plants

It has been proposed to valorize the wasted plant material resulting from the production of essential oils and to optimize the methods of extracting the active principles (phenolic compounds, flavonoids, vitamins).

Characterization of the extracts rich in active principles was performed by chromatographic methods (UHPLC), the total phenolic compounds by the Folin-Ciocalteu method and the antioxidant capacity was determined using the DPPH method.

8.2.2. Determination of the chemical composition of the phenolic extracts by HPLC analysis

Extracts obtained from the distillation wastes DD1 of aromatic plants are rich in polyphenols, as shown in the chromatographic data presented in Tables 8.2 and 8.3. Components such as rutin, quercetin, kaempferol, catechin, pyrogallol, pyrocatechol, *p*-coumaric, gallic, caffeic, vanilic, syringic, ascorbic acids and riboflavin have been identified and quantified.

The majority of phenolic compounds found in hydroalcoholic extracts were pyrocatechol, gallic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, vanilic acid, rutin and syringic acid. Of the total phenolic compounds, gallic acid was detected in the range 5.3 (TVDV DD1 40) - 2175 (OVA DD1) mg/L and pyrocatechol in 12 (SH DD1 96

FUS) - 2177 (OVA DD1 96) mg/L. Vitamins such as ascorbic acid and riboflavin were also present in large amounts in all extracts with the highest riboflavin of 10531.71 mg/L, determined in OVA DD1 60.

The ethanol concentrations used for the extraction has differently influenced the quantity of phenolic compounds. For example, for catechin (a flavonoid), a maximum of extraction was obtained with a 40% ethanol solution, resulting in 104-930 mg/L, while for gallic acid (hydroxybenzoic acid) the most efficient extraction was with water, 454-2175 mg/L. Increased concentration of compounds of interest with decreasing ethanol concentration was observed. Such affinity for water and low ethanol concentrations was also found in the literature, so the most effective concentrations were 45 and 60%.

8.3.2. Total phenolic content

The total phenolic content of examined from hydroalcoholic extracts ranged from 262 (SH DD1 95% FUS) to 6926 (OVA DD1 0%) mg GAE/L (Table 8.4). Soxhlet's classic extraction gave the best yield, followed by ultrasonic extraction (US) and then static maceration. A high temperature combined with agitation has a better extraction yield compared to static extraction at lower temperatures. In the case of ultrasonic extraction, although the cellular matrix was damaged, giving a greater chance of contact with the solvent, the lack of high temperature reduces in some cases too almost half the yield: 2057 and 1309 mg GAE/L for TVDV DD1 96 and TVDV DD1 96 US also 1590 and 875 mg GAE/L SH DD1 96 and SH DD1 96 US. Static maceration is time and space-consuming. In all cases, extraction with 60% ethanol gives the best results for obtaining bioactive compounds with nutritional and functional value.

8.3.3. Antioxidant activity assays

From the antioxidant activity point of view, hydroalcoholic extracts obtained from *T. vulgaris*, *O. vulgare* and *S. montana* post distillation wastes, there are little or no differences for all three extraction methods. For *S. hortensis* post distillation waste, the differences between the extraction methods are higher, the antioxidant activity of Soxhlet and ultrasound extracts have almost double values relative to static maceration.

The inhibition ranged from 93,557 to 36,319%, between 47,165 -18,431 mg GAE/L and between 4,0277- ... 1,4529 mmol TEAC/L for OVA DD1 96 US and for SH DD1 96 FUS. However, all the extracts obtained showed remarkable antioxidant activity, comparable to those in the literature.

II. GENERAL CONCLUSIONS AND RECOMANDATIONS

After the first year of vegetation, the plots of cultivated plants under pedoclimatic conditions at SCDA Lovrin presented plants that were heavily rooted, with no gaps due to dry or pest-infested plants.

From the second year of vegetation, the plants were monitored in experiments where: (i) the phenological phases were followed to determine the optimal moment for plant harvesting; (ii) photosynthesis parameters were determined and correlations between photosynthetic parameters were made depending on photosynthetic active radiation; (iii) the assimilating pigments for the four studied species were analyzed, and the largest amounts were determined in *Thymus vulgaris* plants (718.32 mg/m² for chlorophyll b and 1464.76 mg/m² for chlorophyll a) and the smallest were found in *Satureja montana* (63.30 mg/m² and 121.98 mg/m² respectively).

Harvesting was performed at the optimum time when the essential oils content reaches the maximum, but also in two phenological phases previously set: in buds and over 85-90% flowering.

Drying took place in ambient air, in well ventilated rooms. The drying yields were calculated and the best values were obtained for *Origanum vulgare* plants.

The essential oils were extracted using a 5 L copper alembic and the yields were calculated, with the best values obtained for *Satureja hortensis* plants 1.7%.

For all the obtained essential oils, gas chromatographic analyzes were carried out where the chemical composition was determined. The results obtained correspond to the values described by the literature.

Differences in chemical composition of essential oils obtained from plants harvested in bud stage and plants harvested after 85-90% flowering in two vegetative cycles in 2017 and 2018 were observed. For example, for *Origanum vulgare* essential oil the major compound γ -terpinene was replaced with linalol, and for *Satureja hortensis* from carvacrol to γ -terpinen. Due to these chemical compositional changes between the two phenological phases and vegetative cycles, it is possible to plan plant harvesting ahead to obtain essential oils with a chemical composition different from the classical ones harvested at the optimum time.

Essential oils were analyzed by ATR-FTIR. Essential oils are complex mixtures of compounds, which determine the overlap of the absorption spectra, but based on the specific chemical composition, the intensity of the following bands was observed: 806-804 for thymol, 811-807 for carvacrol, 811-812 for p-cymene, 781, 947 for γ -terpinene.

The mass loss according to temperature and thermal resistance of the essential oil samples was analyzed and the results were correlated with their chemical composition determined by GC-MS. The results show that most samples of essential oils exhibited thermal stability up to ~50 °C, and the mass loss steps recorded on the TG/DTG/DTA curves appear due to evaporation processes.

Hydroalcoholic extracts of phenolic compounds recovered from residual waste products have been obtained and characterized. They are rich in polyphenols such as rutin, quercetin, kaempferol, catechin, pyrogallol, pyrocatechol, p-coumaric acid, gallic acid, caffeic acid, vanilic acid, , ascorbic acid and riboflavin. A method has been optimized to determine the solvent concentration, temperature, duration, etc., depending on the compounds to be extracted. All extracts showed a high content of bioactive compounds of interest that could be used as antioxidants or natural additives in food preservation as well as in the pharmaceutical and veterinary industry.

The extent to which the research objectives were met:

The achievement of the research objectives was accomplished by studying from the point of view of agronomy, physiology and chemical composition of four species of aromatic plants cultures established under the pedoclimatic conditions of the Lovrin Agricultural Research and Development Station.

Directions for further research:

Continuous monitoring and analysis of environmental factors that may have an impact on the chemical composition of bioactive compounds. New green practices call for the use of raw materials, with as little waste as possible, requiring a more efficient extraction of compounds of interest or the continued use of generated waste. Thus, with the necessary technology, pellets or fuel briquettes from essential oils and phenolic compounds biomass wastes can be obtained. Pellets obtained from DD2 distillation waste can be equivalent to traditional fuels. Biomass pellets are cheaper to produce, they are considered to be a solid biofuel and therefore have a "zero impact" on the calculation of pollutant gas emissions.

Advantages and disadvantages:

During the performed experiments, useful information was obtained regarding the cultivation of aromatic plants under pedoclimatic conditions from SCDA Lovrin. The bioactive compounds obtained from them having an increased potential for use both in alternative medicine and in the food industry. There were no difficulties in making extracts of bioactive compounds, and the experiments unfolded smoothly.

Author's own contributions:

To carry out the research it was necessary to study in detail the specific literature on the cultivation, care and monitoring of aromatic plant cultures, as well as the methods of extraction of essential oils and bioactive compounds. The four cultivated plant species were monitored over several cycles of vegetation to track the general plant status and to observe the phenological phases that influence the time of harvesting and the production of essential oils.

For the analysis of essential oils obtained at the optimum time or at different phenological stages, complementary methods of analysis have been used: GC-MS, ATR-FTIR and TG/DTG/DTA.

To obtain the phenolic compounds from the waste resulting from the production of essential oils, extraction methods were optimized, and the characterization was performed by spectrophotometric analysis (total phenols and antioxidant activity) and by chromatography using a UHPLC-DAD calibrated with external standards.

IV. ORIGINALITY ELEMENTS

The elements of originality for the research carried out within this thesis are due to several aspects:

- obtaining essential oils from plants harvested at the optimum time and within two pre-established phenological phases (at buds stage and over 85-90% flowering) cultivated under pedoclimatic conditions from SCDA Lovrin
- analyzing and comparing their chemical composition both with each other and with the results presented in the literature
- the use of waste resulting from the distillation of aromatic plants in order to obtain bioactive compounds
- analysis of hydroalcoholic extracts and their incorporation in foodstuffs (patent in progress).

Bibliography

The bibliography contains 177 bibliographic titles.