



UNIVERSITATEA
DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA



Co-funded by
the European Union

Project no. 2023-1-RO01-KA220-HED-00016476



METODE EXPERIMENTALE – GHID



**Parteneriat pentru inovare privind schimbul de bune
practici și elaborarea de inițiative comune de
colaborare la nivel european, legate de conștientizarea
efectelor contaminării asupra sănătății umane**

**Proiect Erasmus+ Parteneriate pentru cooperare
Editori: Pinzaru Iulia Andreea, Dehelean Cristina Adriana**

INNO-SAFE-LIFE



SPU
Slovenská
poľnohospodárska
univerzita v Nitre





**Co-funded by
the European Union**



Editura „Victor Babeș”

Piața Eftimie Murgu Nr. 2, cam. 316, 300041 Timișoara

Tel./ Fax 0256 495 210

e-mail: evb@umft.ro

www.umft.ro/ro/organizare-evb/

Director general: Prof. univ. dr. Sorin Ursoniu

Colecția: Ghiduri și îndrumătoare de laborator

Coordonator colecție: Prof. univ. dr. Adrian Vlad

Referent științific: Prof. dr. Daliborca Vlad

Indicativ CNCSIS: 324

© 2025 Toate drepturile asupra acestei ediții sunt rezervate.

Reproducerea parțială sau integrală a textului, pe orice suport, fără acordul scris al autorilor este interzisă și se va sancționa conform legilor în vigoare.

ISBN 978-606-786-499-1



METODE EXPERIMENTALE – GHID

Titlu proiect: Parteneriat pentru inovare privind schimbul de bune practici și elaborarea de inițiative comune de colaborare la nivel european, legate de conștientizarea efectelor contaminării asupra sănătății umane

Acronim proiect: INNO-SAFE-LIFE

Proiect nr. : 2023-1-RO01-KA220-HED-000164767

Acest ghid reunește metode experimentale moderne și protocoale axate pe protecția solului, evaluarea contaminanților și a rezistenței antimicrobiene, precum și pe utilizarea durabilă a resurselor naturale. El subliniază abordările care asigură securitatea alimentară, siguranța mediului și păstrarea compușilor bioactivi din produsele naturale.

Ghidul integrează tehnici din știința solului, microbiologie, chimie și biotehnologie, evidențiind protocoale inovative și reproductibile aplicabile în cercetare și practică. Prin combinarea fundamentului teoretic cu metodologia practică, el oferă o resursă valoroasă pentru avansarea utilizării sigure și eficiente a resurselor vegetale și a produselor naturale, sprijinind în același timp obiectivele dezvoltării durabile.

Profesori responsabili de părțile teoretice:

Coordonator (UMFVBT): Iulia Andreea Pinzaru, Cristina Adriana Dehelean, Diana Simona Tchiakpe-Antal, Codruța Marinela Soica

Partener 1 (UNICAL): Filomena Conforti, Giancarlo Statti, Mary Fucile

Partener 2 (UNIOS): Vrandečić Karolina, Ćosić Jasenka, Baličević Renata, Brigita Popovic

Partener 3 (SUA): Miroslava Kačániová, Natália Čmíková

Partener 4 (UMFCD): Andreea Arsene, Bruno Velescu, Denisa Udeanu

Partener 5 (FAVISAN): Virginia Faur, Mirabela Faur Timofti, Anca Gidofalvi



**Co-funded by
the European Union**



Profesori responsabili de părțile practice:

Coordonator (UMFVBT): Oana Andrada Iftode, Daliana Ionela Minda, George Andrei Drăghici, Ștefania Dinu, Camelia Alexandrina Szuhaneck

Partener 1 (UNICAL): Filomena Conforti, Giancarlo Statti, Mary Fucile

Partener 2 (UNIOS): Vrandečić Karolina, Ćosić Jasenka, Baličević Renata, Brigita Popovic

Partener 3 (SUA): Miroslava Kačániová, Natália Čmíková

Partener 4 (UMFCD): Andreea Arsene, Bruno Velescu, Denisa Udeanu



CUPRINS

CAPITOLUL 1. PROTEJAREA SOLURILOR CU ROL ESENȚIAL ÎN PRODUCȚIA DE ALIMENTE, MEDICAMENTE, SUPLIMENTE PENTRU CONTROLUL SECURITĂȚII ALIMENTARE.....	6
1.1 Introducere.....	6
1.2 Identificarea fungilor fitopatogeni transmiși prin sol	7
1.3 Impactul pesticidelor asupra mediului	18
1.4 Fitoremedierea metalelor grele în soluri	27
1.5 Referințe	36
CAPITOLUL 2. ANALIZA CONTAMINANȚILOR, REZISTENȚA ANTIMICROBIANĂ	38
2.1 Introducere.....	38
2.2 Metodologii de laborator pentru testarea susceptibilității bacteriene la antimicrobiene	40
2.3 Referințe	68
CAPITOLUL 3. OBȚINEREA PRODUSELOR NATURALE CU ACCENT PE CONSERVAREA PRINCIPIILOR ACTIVE.....	72
3.1 Introducere.....	72
3.2 Fitocomplexul – Ansambluri sinergice de constituenți bioactivi.....	75
3.3 Ghidurile OMS pentru Formulări Standardizate de Plante Medicinale	80
3.4 Suplimente Alimentare	83
3.5 Referințe	87
CAPITOLUL 4. CAPITALIZAREA RESURSELOR VEGETALE PENTRU CONSUM SIGUR ȘI EFICIENT	89
4.1 Introducere.....	89
4.2 Selecția și Caracterizarea Resurselor Vegetale	92
4.3. Extracția și Conservarea Compușilor Bioactivi	95
4.4 Procesarea pentru Consum Sigur	99
4.5 Abordări Analitice pentru Siguranță și Eficacitate	102
4.6 Abordări Sustenabile și Inovative	106
4.7 Referințe	108



CAPITOLUL 1. PROTEJAREA SOLURILOR CU ROL ESENȚIAL ÎN PRODUCȚIA DE ALIMENTE, MEDICAMENTE, SUPLIMENTE PENTRU CONTROLUL SECURITĂȚII ALIMENTARE

1.1 Introducere

Solul reprezintă o resursă neregenerabilă de importanță fundamentală pentru ecosistemele terestre, sănătatea umană și dezvoltarea economică. El oferă baza fizică și chimică pentru creșterea plantelor, reglează ciclurile biogeochimice și funcționează ca un rezervor de biodiversitate. Solurile sănătoase asigură producția durabilă de culturi alimentare și plante medicinale și sunt prin urmare direct legate de securitatea alimentară și disponibilitatea materiilor prime utilizate în industriile farmaceutică și nutraceutică (Marcelino 2023). Degradarea progresivă a solurilor este considerată una dintre cele mai presante provocări globale, cu implicații pentru productivitatea agricolă, calitatea mediului și sănătatea publică.

De-a lungul ultimelor decenii, degradarea solului a fost accelerată de practicile agricole intensive, folosirea excesivă a pesticidelor și a îngrășămintelor chimice, poluarea industrială și consecințele schimbărilor climatice (Tudi 2021). Astfel de presiuni au dus la eroziune, salinizare, compactare și contaminare cu substanțe periculoase, incluzând poluanți organici persistenți și metale grele. Ca rezultat, solurile eșuează din ce în ce mai mult în a furniza serviciile lor ecosistemice, amenințând atât randamentele culturilor, cât și siguranța produselor vegetale destinate consumului uman (AbdelRahman 2023). Protejarea calității solului a devenit prin urmare o piatră de temelie în strategiile orientate spre asigurarea securității alimentare globale și utilizarea durabilă a resurselor.

Printre numeroasele riscuri pentru sănătatea solului, fungii fitopatogeni transmiși prin sol reprezintă o constrângere biologică majoră pentru sistemele agricole. Acești patogeni cauzează pierderi severe de recoltă la culturile de bază și medicinale, reducând nu doar cantitatea, ci și calitatea și siguranța produselor vegetale. Dezvoltarea unor metode experimentale fiabile pentru detectarea și caracterizarea lor este esențială pentru diagnostic precoce, management ținut și prevenirea epidemiilor la scară largă.

Intrările chimice, în special pesticidele, continuă să joace un rol important în protecția culturilor; totuși, impactul lor de mediu pe termen lung nu poate fi ignorat. Aplicațiile repetate s-au dovedit a afecta organismele netintă, a perturba diversitatea microbiană a solului și a conduce la acumularea de reziduuri în soluri și lanțuri alimentare (Alengebawy 2021). Echilibrarea



beneficiilor utilizării pesticidelor cu necesitatea protejării sănătății solului necesită monitorizare riguroasă, evaluarea riscurilor și implementarea unor alternative mai sigure.

În plus față de amenințările biologice și chimice, contaminarea cu metale grele este o preocupare în creștere în solurile agricole la nivel mondial. Surse precum activitățile miniere, efluenții industriali și utilizarea excesivă a îngrășămintelor fosfatice contribuie la concentrații ridicate de metale toxice incluzând cadmiu, plumb și arsen (Jaishankar 2014). Acești compuși nu sunt biodegradabili și tind să se acumuleze în soluri, reprezentând riscuri pe termen lung pentru siguranța culturilor și sănătatea umană. În acest context, fitoremedierea a apărut ca o abordare inovatoare, rentabilă și prietenoasă cu mediul. Prin utilizarea plantelor pentru a extrage, stabiliza sau detoxifica contaminanții, fitoremedierea oferă o alternativă promițătoare la tehnologiile convenționale de remediere (Sharma 2023).

Acest capitol introduce metode experimentale concepute pentru a aborda trei dimensiuni critice ale protecției solului: (i) identificarea fungilor fitopatogeni transmiși prin sol, (ii) evaluarea impactului pesticidelor asupra sănătății solului și mediului, și (iii) aplicarea tehnicilor de fitoremediere pentru eliminarea metalelor grele. Împreună, aceste abordări subliniază rolul esențial al solurilor în sprijinirea agriculturii durabile și evidențiază importanța integrării tehnicilor științifice moderne în strategiile pentru securitatea alimentară, protecția mediului și utilizarea sigură a resurselor naturale.

1.2 Identificarea fungilor fitopatogeni transmiși prin sol

Patogenii transmiși prin sol reprezintă una dintre cele mai persistente și distructive amenințări pentru sistemele agricole la nivel mondial. Bolile cauzate de acești organisme sunt responsabile de pierderi masive de recoltă la o gamă largă de specii de plante, afectând atât randamentul, cât și calitatea (Katan, 2017). O caracteristică distinctivă a patogenilor transmiși prin sol este capacitatea lor de a persista în sol pentru perioade lungi, adesea în absența unei plante gazdă. Această strategie de supraviețuire este mediată de producerea unor structuri rezistente specializate, precum spori, chisturi, clamidospori, oospori, microscleroți și scleroți, care le permit să reziste condițiilor de mediu nefavorabile (Alegbeleye et al., 2018; Jurkovič et al., 2017). Unele dintre aceste propagule sunt capabile să rămână viabile peste un deceniu, menținând astfel o sursă continuă de inocul care îngreunează gestionarea eficientă a bolilor.

Germinarea acestor structuri de repaus este adesea declanșată de semnale chimice eliberate în rizosferă, incluzând exudatele radiculare ale plantelor sensibile sau disponibilitatea unor



nutrienți specifici. Odată germinați, patogenii infectează rădăcinile plantelor și inițiază colonizarea, rezultând frecvent în infecții cronice care compromit vigoarea și productivitatea plantelor. Deoarece bolile transmise prin sol sunt dificil de eradicat odată instalate, gestionarea lor se bazează în mare măsură pe identificarea corectă, detectarea precoce și măsurile preventive.

Bolile transmise prin sol se pot manifesta în câteva sindroame majore, în special căderea plăntuțelor (damping-off), putregaiurile radiculare și ofilirile vasculare, fiecare fiind asociată cu un set caracteristic de patogeni și simptomatologie.

1.2.1 Căderea plăntuțelor pre- și post-emergență

Căderea plăntuțelor (damping-off) este una dintre cele mai răspândite și importante boli economice cauzate de fungii transmiși prin sol, afectând în special răsadurile tinere. Principalii agenți cauzali includ *Fusarium* spp., *Pythium* spp. și *Rhizoctonia* spp.

Căderea plăntuțelor pre-emergență apare atunci când semințele sau răsadurile sunt distruse înainte de a ieși la suprafața solului. Este asociată de obicei cu condiții nefavorabile pentru germinare, precum soluri excesiv de reci, fierbinți sau îmbibate cu apă, drenaj slab, compactarea solului sau prezența materiei organice nedecompose. În aceste condiții, propagulele fungice colonizează semințele, ducând la degradare, putrezire și, în final, la eșecul răsării.

Căderea plăntuțelor post-emergență se dezvoltă după ce răsadurile au ieșit, de obicei la sau imediat sub linia solului. Simptomele includ putrezirea rădăcinilor, țesuturi îmbibate cu apă și moi, și decolorări de la maro-gri la verde-gri. În cazuri mai avansate, pot apărea leziuni distincte pe rădăcini și tulpini inferioare, adesea maro-închis, roșiatic-brun sau negre, cu margini uscate și adâncite. Infecțiile severe strangulează tulpina, perturbând transportul apei, ceea ce duce la ofilire, prăbușire și, în cele din urmă, moartea răsadului.

1.2.2 Putregaiul radicular

Sindroamele de putregai radicular sunt cauzate frecvent de patogeni precum *Phytophthora* spp. și *Chalara elegans*. Spre deosebire de căderea plăntuțelor, care este în mare parte limitată la dezvoltarea timpurie a plantelor, patogenii de putregai radicular pot ataca plantele în stadii mai avansate, compromițând productivitatea generală. Acești fungi invadează țesuturile corticale și vasculare ale rădăcinilor, afectând absorbția apei și a nutrienților.

Simptomele aeriene includ de obicei vigoare redusă, cloroză, căderea prematură a frunzelor, ofilire (adesea începând de la țesuturile apicale), uscarea ramurilor și moartea bruscă a



plantei. Deoarece aceste simptome sunt nespecifice, confirmarea în laborator a patogenului cauzal este esențială pentru diagnostic corect. Putregaiul radicular poate persista de la un sezon la altul datorită capacității patogenului de a supraviețui în resturi vegetale sau sub formă de propagule rezistente în sol.

1.2.3 Ofilirea vasculară

Ofilirile vasculare reprezintă un alt grup devastator de boli transmise prin sol. Ele sunt cauzate de fungi și bacterii care colonizează sistemul vascular al plantei, perturbând translocarea apei și a nutrienților. Cei mai cunoscuți patogeni fungici din acest grup includ *Verticillium* spp. și *Fusarium* spp.

Simptomele sunt adesea sistemice și includ ofilire progresivă, îngălbenirea frunzelor și necroză, frecvent însoțite de decolorarea vasculară în tulpini, trunchiuri sau ramuri. Țesuturile infectate pot prezenta fascicule vasculare înnegrite atunci când sunt tăiate longitudinal, ceea ce constituie un element diagnostic cheie.

Dintre fungii cauzatori de ofilire, *Verticillium albo-atrum* (Reinke & Berthold) și *Verticillium dahliae* (Klebahn) au o importanță deosebită, afectând o gamă largă de culturi horticole și de câmp. Capacitatea lor de a persista în soluri prin microscleroți timp de mulți ani îi face deosebit de dificil de gestionat.

1.2.4 Implicații pentru securitatea alimentară

Persistența și potențialul distructiv al patogenilor transmiși prin sol subliniază rolul lor critic în securitatea alimentară. Prin reducerea randamentelor culturilor, modificarea calității produselor și amenințarea cultivării atât a plantelor de bază, cât și a celor medicinale, acești patogeni reprezintă un obstacol serios pentru agricultura durabilă. Gestionarea lor necesită o abordare integrată care combină tehnici rapide de identificare (morfo-logice, moleculare și serologice), practici culturale care reduc densitatea inoculului și, acolo unde este posibil, utilizarea soiurilor rezistente.

În acest context, metodele experimentale discutate în secțiunile următoare oferă instrumente esențiale pentru detectarea și caracterizarea fungilor fitopatogeni transmiși prin sol. Identificarea corectă este primul pas către conceperea unor strategii eficiente de control, care contribuie în cele din urmă la protecția solurilor și la producția sigură de alimente, medicamente și suplimente nutriționale.



Symptoms on sunflower

Mycelium: hyaline, septate, and multinucleate

Conidiophores: usually well differentiated and erect, verticillately branched over most of their length

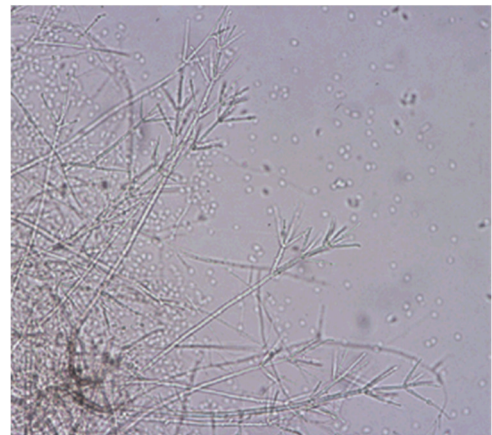
Conidia: hyaline or brightly-coloured, ovoid or ellipsoid and usually single-celled, they are borne on phialides - specialized hyphae produced in a whorl around each conidiophore

Teleomorph: not known

Resting structures:

Verticillium alboatrum – permanent mycelium in plant debris or in soil

Verticillium dahliae – small, black, thick walled microsclerotia in plant debris or in soil



Conidiophores



Fusarium wilt

Fusarium oxysporum Schl.



Symptoms of tomato Fusarium wilt

Mycelium: aerial mycelium is white, becoming purple, with discrete orange sporodochia present in some strains;

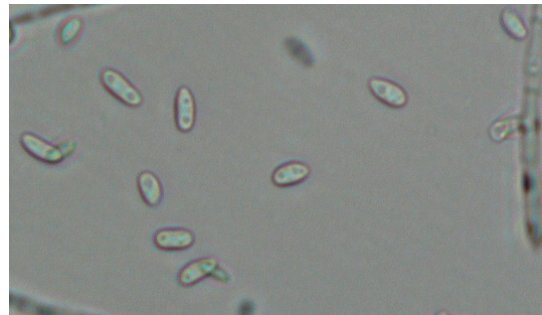
reverse hyaline to dark blue or dark purple
Conidiophores: short, single, lateral monophialides in the aerial mycelium, later arranged in densely branched clusters

Conidia: macroconidia are fusiform, slightly curved, pointed at the tip, mostly three septate, basal cells pedicellate.

Microconidia are abundant, never in chains, mostly non-septate, ellipsoidal to cylindrical, straight or often curved.

Teleomorph: not known

Resting structures: chlamydospores are terminal or intercalary, hyaline, smooth or rough walled.



Microconidia



Chlamydospores



Co-funded by
the European Union



Sclerotinia root rot

Sclerotinia sclerotiorum Lib. de Bary



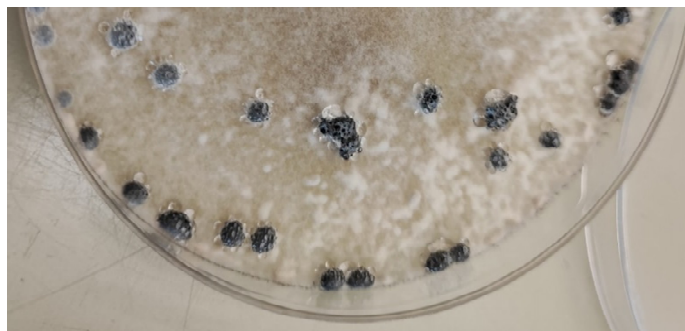
Symptoms on gerbera and carrot

Mycelium: white, cottony mycelium

Asexual spores: do not produce

Teleomorph: not known

Resting structures: sclerotia form in and on all diseased tissue, myceliogenic germination and carpogenic germination (apothecia with asci and ascospores)



S. sclerotiorum on PDA



Carpogenic germination of sclerotia



Asci with ascospores



Co-funded by
the European Union



Black root rot

Chalara elegans Nag. & Kendr.



Symptoms on carrot
(www.discoverlife.org)



Symptoms on Kalanchoe
(www.plantesygdomme.dk)

Mycelium: white, later become grey, well developed, branched, smooth, septate, hyaline

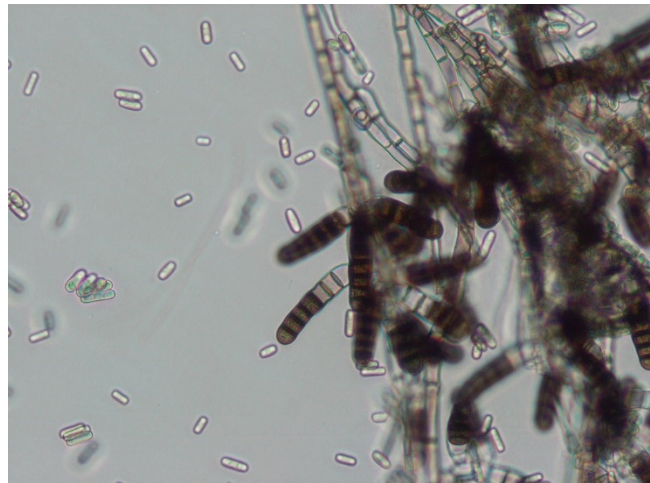
Spores:

Phialoconidia (endoconidia, microconidia) – unicellular and hyaline with thin membrane, occur within multicellular, simple and hyaline conidiophores

Aleurioconidia (chlamydospores) - unicellular with thickened, brown and smooth membrane; occur in chains, in the beginning they look like multicellular conidia, but as they matures, they turns black and separate

Teleomorph: not known

Resting structures: chlamydospores



Microconidia and chlamydospores



Damping-off

Pythium species



Isolation of *Pythium* sp. from diseased
lettuce seedlings



Isolation of *Pythium* sp. from diseased
cauliflower seedlings

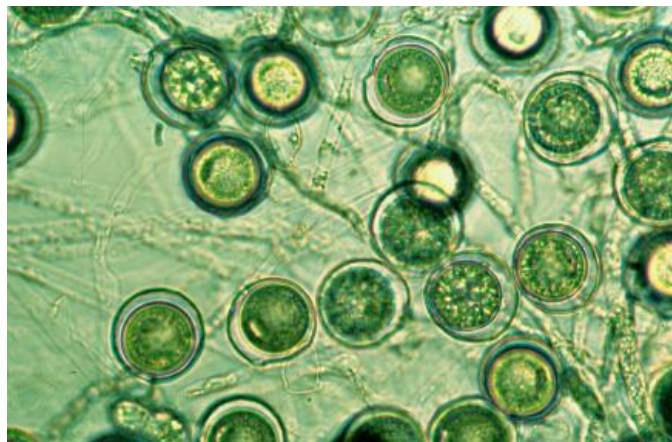
Mycelium: hyaline, colorless or pale yellowish and unicellular; septa can only be found in old hyphae or during the formation of reproductive organs.

Spores:

Zoosporangia develop asexually on the undifferentiated branches of the mycelium. Zoospores are differentiated in vesicles that are formed on the zoosporangium.

Gametes are formed on the mycelium: round oogonia and barrel-shaped antheridia. Oogonium and antheridium may belong to the same or different hyphae. After copulation, an oospore is formed.

Resting structures: oospores



Oospores (www.ag.arizona.edu)



Damping-off, crown and root rot

Rhizoctonia solani J.G. Kühn



Sugarbeet root rot caused by *R. solani*



Damping-off caused by *R. solani*
(www.barenbrug.co.nz)

Mycelium: septate, multinuclear, initially colorless, later brown; branches at 90 degree angles; constrictions at the base of the hyphal branching
Spores: *R. solani* does not produce any spores except in its teleomorph stage (*Thanatephorus cucumeris*)
Teleomorph: *Thanatephorus cucumeris* (multicellular mycelium with unicellular basidia and hyaline, unicellular, oval, slightly flattened at one end, basidiospores)
Resting structures: sclerotia



Branches at 90 degree angles
(„T“ cells)



Co-funded by
the European Union



Damping-off, root, crown and stem rot

Phytophthora species



Soybean damping-off and root rot
([www. u.osu.edu](http://www.u.osu.edu))



Phytophthora root rot of strawberry

Mycelium: elongated, wide, and aseptate,
cell walls contain cellulose

Spores: sporangia (asexual spores) are hyaline
and lemon-shaped; if they are in water or very high
relative humidity, the cytoplasm in the sporangia
divide and many zoospores emerge from each
sporangium

Resting structures: oospores (thick-walled and
generally globose)



Sporangia



Charcoal rot

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid.



Charcoal rot on parsley and carrot

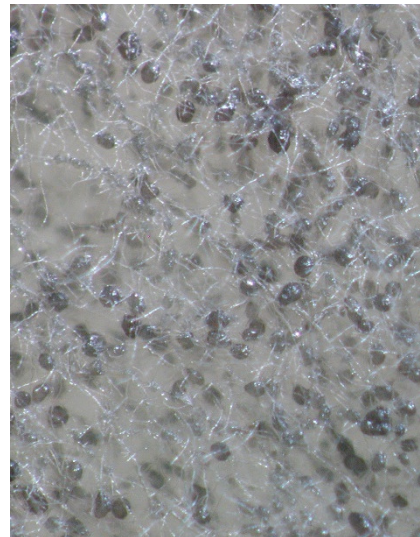
Mycelium: hyaline, septate

Spores: pycnidia (dark brown or black, rough, globose or irregular; rarely observed under natural conditions) with picnospores/conidia (unicellular, oval to egg-shaped, hyaline)

Resting structures: microsclerotia (spherical, oval or oblong, light brown becoming brown to black with ageing)



Microsclerotia in plant tissue



Microsclerotia



1.3 Impactul pesticidelor asupra mediului

Una dintre cele mai mari provocări globale ale timpului nostru este poluarea mediului, care subminează echilibrul ecologic și sănătatea umană la scară planetară. Cauzele sale principale includ deversările de ape uzate din așezările urbane și industriale, scurgerile agricole, eroziunea și spălarea de pe drumuri, gropile de gunoi prost gestionate, precipitațiile acide și deversările accidentale la scară largă. Ca o consecință, solurile și corpurile de apă au devenit rezervoare pentru metale grele, compuși organici toxici, nitrați, fosfați și alți poluanți periculoși (Đokić et al., 2012). Odată introduse în mediu, aceste substanțe persistă pentru perioade lungi în soluri și sedimente, intrând în cele din urmă în lanțul trofic. Ele migrează de asemenea în sistemele de ape de suprafață și subterane, de unde pot contamina sursele de apă potabilă, generând în final riscuri severe atât pentru oameni, cât și pentru animale. Pentru a contracara aceste amenințări, numeroase măsuri de protecție și strategii de remediere au fost introduse, vizând în special poluanții organici persistenti precum pesticidele.

Utilizarea pesticidelor ca instrumente de protecție a culturilor datează din antichitate. Totuși, producția pe scară industrială și răspândită a pesticidelor sintetice a început după anii 1940, când necesitatea unei productivități agricole ridicate a accelerat dezvoltarea și aplicarea lor. Numărul substanțelor active cu efecte pesticidale a crescut în paralel cu apariția noilor dăunători și a tulpinilor rezistente. Astăzi, pesticidele reprezintă o piatră de temelie a producției agricole globale, fiind aplicate pentru a controla o gamă largă de organisme dăunătoare care amenință randamentele culturilor (Figura 1.1).



Figura 1.1 Pesticide



Clasificarea pesticidelor

Pesticidele sunt definite ca substanțe sau amestecuri de substanțe aplicate pentru a preveni, distruge, respinge sau reduce impactul organismelor dăunătoare (Figura 1.2). Există mai multe sisteme de clasificare, dar cea mai comună abordare categorizează pesticidele în funcție de organismele-țintă (Fanda, 2022). Pe baza acesteia, pesticidele sunt grupate în 11 categorii principale:

1. **Acaricide** – controlează acarienii.
2. **Algicide** – suprimă algele.
3. **Repelenți pentru păsări** – previn pagubele culturilor cauzate de păsări.
4. **Bactericide** – inhibă sau distrug bacteriile.
5. **Fungicide** – suprimă creșterea fungilor.
6. **Ierbicide** – suprimă buruienile.
7. **Insecticide** – controlează insectele dăunătoare.
8. **Limacide (moluscicide)** – suprimă melcii și limacșii.
9. **Nematicide** – controlează nematozii.
10. **Rodenticide** – suprimă rozătoarele.
11. **Virucide** – reduc sau inactivează infecțiile virale.

O altă distincție este adesea făcută între produsele de protecție a plantelor (PPP) chimice și biologice. O clasificare larg utilizată grupează pesticidele în funcție de tipul de organism dăunător pe care îl vizează: **zoocide, fungicide și ierbicide**



Figura 1.2 Aplicarea pesticidelor zoocide

Zoocidele cuprind un grup mare și divers de produse pentru protecția plantelor (PPP), dezvoltate special pentru a controla organismele dăunătoare de origine animală. Ele sunt subdivizate astfel:

- **Insecticide** – vizează insectele, care sunt printre cei mai dăunători dăunători agricoli la nivel mondial. Efectele lor variază de la pagube directe prin hrănire până la transmiterea agenților patogeni ai plantelor.
- **Acaricide** – controlează acarienii, care cauzează pierderi semnificative de randament în multe culturi horticole.
- **Nematicide** – suprimă nematozii paraziți ai plantelor, viermi microscopici care atacă rădăcinile și reduc absorbția de nutrienți.
- **Limacide (moluscicide)** – suprimă limacșii și melcii, care deteriorează frunzele, tulpinile și fructele.
- **Rodenticide** – vizează rozătoarele precum șoarecii și șobolanii, care deteriorează alimentele depozitate, semințele și culturile de câmp.
- **Repelenți pentru păsări** – descurajează păsările să se hrănească din culturi, în special cereale și fructe.



Gruparea zoocidelor evidențiază marea diversitate a organismelor-țintă din agricultură și subliniază dependența sistemelor agricole moderne de agenți chimici de control al dăunătorilor.

Fungicide și erbicide

Alături de zoocide, două categorii suplimentare de pesticide sunt critice în agricultură:

- **Fungicidele**, care suprimă fungii patogeni și pseudofungii, iar în unele cazuri bacteriile responsabile de bolile plantelor. Aplicarea lor previne pierderile de recoltă cauzate de putregaiuri radiculare, mucegaiuri, mană și ofiliri.
- **erbicidele** (Figura 1.3), care sunt concepute pentru a suprima buruienile. Prin reducerea competiției buruienilor pentru nutrienți, lumină și apă, erbicidele joacă un rol-cheie în creșterea randamentelor culturilor și a eficienței.



Figura 1.3 Buruieni de floarea soarelui

Alte PPP-uri – regulatori de creștere ai plantelor și adjuvanți

Deși pesticidele sunt extrem de eficiente, efectele lor de mediu pe termen lung sunt profunde. Pesticidele organoclorurate și organofosforice sunt notabile pentru lipofilicitatea lor, stabilitatea chimică și persistența, care le permit să se acumuleze în soluri, corpuri de apă și organisme vii. Ele se bioacumulează în țesuturile adipoase, gălbenușurile de ou și ficatul animalelor, precum și în uleiurile vegetale, intrând astfel și amplificându-se prin lanțul trofic (Frazar, 2000). Datorită utilizării lor extinse, adesea cu practici de aplicare necorespunzătoare, aceste compuși contaminatează solul, apa și aerul, reprezentând riscuri pentru culturi, animale domestice, fauna sălbatică și sănătatea umană.



Ca răspuns, guvernele au implementat cadre de reglementare pentru a controla producția, distribuția și aplicarea pesticidelor. În Uniunea Europeană, Directiva 2009/128/CE oferă un cadru legal pentru utilizarea durabilă a pesticidelor, punând accent pe managementul integrat al dăunătorilor (IPM), reducerea dependenței de substanțe chimice și promovarea unor alternative mai sigure (Figura 1.4).



Figura 1.4 Aplicarea produselor de protecție a plantelor în livadă

Factori care afectează bioremedierea pesticidelor

Eficiența bioremedierii pesticidelor depinde de o interacțiune complexă de factori biologici, chimici și de mediu, care determină dacă microorganismele pot metaboliza și mineraliza un contaminant.

O constrângere principală este absența microorganismelor adecvate în siturile contaminate. Multe pesticide, în special compușii sintetici, au structuri moleculare care sunt străine ecosistemelor naturale. Acești așa-numiți compuși xenobiotici adesea nu au analogi naturali, ceea ce înseamnă că sistemele enzimatică microbiene nu au evoluat pentru a-i recunoaște sau degrada eficient (Đokić et al., 2012). Chiar și atunci când microorganisme capabile de degradare parțială sunt prezente, căile de degradare pot fi incomplete, rezultând în acumularea de intermediari toxici sau recalcitranți.

Un alt factor este biodisponibilitatea, adică accesibilitatea moleculelor de pesticide pentru celulele microbiene. Pesticidele hidrofobe, precum organoclorurile, se leagă adesea puternic de materia organică a solului sau de particulele de argilă, reducând solubilitatea lor în soluția



solului. Această adsorbție previne transportul prin membranele microbiene, reducând efectiv potențialul de biodegradare. În plus, dimensiunea moleculară și structura pesticidelor pot influența dacă enzimele sunt capabile să le hidrolizeze sau să le oxideze. Unele molecule sunt atât de stabil structurate încât rezistă complet atacului enzimatic.

Condițiile de mediu joacă de asemenea un rol decisiv. Microorganismele necesită oxigen, umiditate, nutrienți (în special carbon, azot și fosfor) și un pH adecvat pentru a funcționa optim. În multe soluri contaminate, aceste condiții sunt suboptimale. De exemplu, solurile foarte acide sau saline pot inhiba activitatea microbiană, în timp ce condițiile anaerobe limitează procesele de degradare aerobă. Mai mult, disponibilitatea redusă a nutrienților creează un scenariu în care microbii metabolizează preferențial surse naturale de carbon, ușor degradabile, în loc să vizeze pesticidele xenobiotice.

Un alt factor critic este co-metabolismul. Multe pesticide nu sunt degradate deoarece microorganismele nu le pot utiliza ca singura lor sursă de carbon sau energie. Totuși, în prezența unui al doilea substrat mai favorabil, microbii pot co-metaboliza pesticidul ca reacție secundară. Această dependență de co-substrate înseamnă că eficiența degradării este puternic dependentă de context, iar eforturile de remediere pot necesita adăugarea de amendamente organice pentru a stimula metabolismul microbian (Figura 1.5).

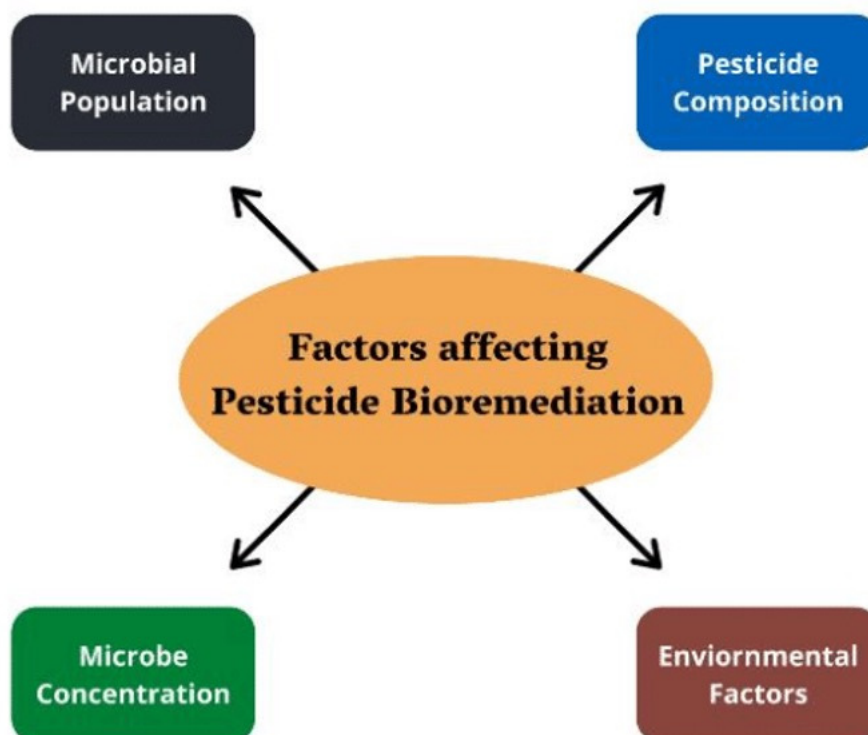


Figura 1.5. Factorii care afectează bioremedierea pesticidelor



În rezumat, persistența pesticidelor rezultă dintr-o combinație de rezistență structurală, biodisponibilitate limitată, condiții nefavorabile ale solului și adaptare microbiană insuficientă. Înțelegerea acestor constrângeri este esențială pentru conceperea unor strategii eficiente de remediere.

Metode de remediere

Pentru a depăși persistența pesticidelor în soluri și sedimente, au fost dezvoltate mai multe tehnologii de remediere. Acestea pot fi clasificate, în linii mari, ca metode termice, chimice, biologice și bazate pe fitoremediere, fiecare având avantaje și limitări specifice.

1. Dezorbția termică la temperatură scăzută (LTTD)

LTTD este o tehnologie fizico-chimică ex situ utilizată pe scară largă pentru îndepărtarea compușilor organici semivolatili și volatili, incluzând pesticidele. Solul sau sedimentul contaminat este încălzit la 150–540 °C, volatilizând poluanții organici fără a atinge oxidarea completă. Gazele volatilizate sunt ulterior captate printr-o succesiune de procese, precum post-ardere, condensare sau adsorbție pe filtre de carbon activ (Figura 1.6).

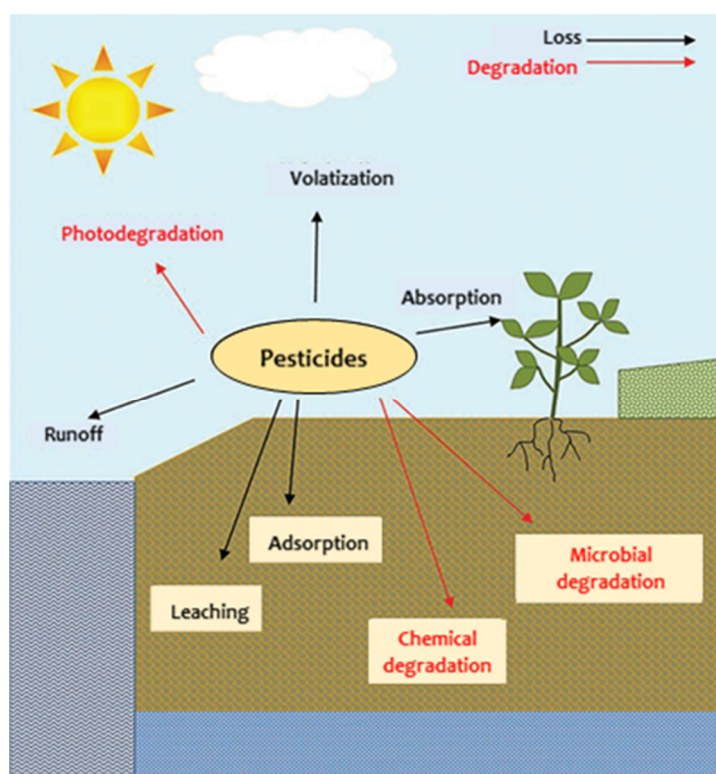


Figura 1.6 Degradarea pesticidelor în agricultură
(Baličević & Ravlić, 2014)



Deși eficientă în separarea pesticidelor de soluri, **LTTD** nu distruge chimic moleculele, ceea ce înseamnă că un tratament secundar al fazei de vapori este necesar pentru a evita re-eliberarea poluanților. Distrugerea completă poate fi obținută atunci când gazele sunt trecute prin camere de combustie la temperatură înaltă. Procesul este eficient, dar limitat de cerința ca solurile să conțină un minim de 20% fază solidă și este ineficient împotriva contaminanților anorganici precum metalele grele (Gonçalves & da Silva Delabona, 2022).

2. Incinerarea

Incinerarea este considerată una dintre cele mai fiabile metode pentru distrugerea completă a poluanților organici. Procesul implică două etape:

- **Volatilizare** la 540–990 °C, în timpul căreia compușii organici sunt eliberați în formă gazoasă.
- **Oxidare la temperatură înaltă** la 870–1200 °C, unde acești compuși sunt mineralizați în CO₂, H₂O și reziduuri anorganice (Singhvi et al., 1994).

Cenusa rezultată, dacă este conformă cu reglementările de siguranță, poate fi eliminată în condiții de siguranță. Principalul avantaj al incinerării este eliminarea ireversibilă a contaminanților. Totuși, metoda este costisitoare, necesitând facilități specializate și transportul materialelor contaminate, ceea ce ridică atât riscuri logistice, cât și riscuri de poluare secundară. Mai mult, procesul consumă cantități semnificative de energie și poate elibera poluanți secundari precum dioxinele, dacă nu este controlat corespunzător.

3. Bioremedierea

Bioremedierea valorifică activitatea metabolică a microorganismelor pentru a transforma sau mineraliza pesticidele. Ea reprezintă o alternativă cu cost redus, sustenabilă din punct de vedere al mediului, comparativ cu metodele fizico-chimice. Procesele cheie includ:

- **Oxidarea**, unde enzimele microbiene convertesc pesticidele în produse mai puțin nocive.
- **Biosinteza**, în care microorganismele încorporează fragmente derivate din pesticide în biomasa lor.



- **Autooxidarea**, implicând reacții chimice spontane catalizate de metaboliții microbieni (Raffa & Chiampo, 2021).

Ideal, produsele finale sunt CO_2 și H_2O , fără acumularea de intermediari toxici.

Strategiile de bioremediere sunt împărțite în:

- **Tehnici ex situ**: incluzând bioractoare, biofiltre și compostare. În compostare, solurile contaminate sunt amestecate cu materie organică, care servește atât ca sursă de nutrienți, cât și ca stimulent pentru activitatea microbiană (Günther et al., 2000).
- **Tehnici in situ**: incluzând bioventilarea, biospray-ul și biostimularea, unde oxigenul și nutrienții sunt furnizați direct în soluri pentru a îmbunătăți activitatea comunităților microbiene indigene (Erguven, 2018).

Succesul bioremedierii depinde în mare măsură de înțelegerea ecologiei microbiene a sitului contaminat și, în multe cazuri, poate necesita inginerie genetică a microorganismelor sau utilizarea consorțiilor microbiene pentru a lărgi capacitatea de degradare.

4. Fitoremedierea

Fitoremedierea este adesea considerată o „tehnologie verde” acceptabilă din punct de vedere ecologic, bazată pe plante și microbiota rizosferei lor pentru a degrada, stabiliza sau extrage pesticidele. Procesul operează prin mai multe mecanisme:

- **Fitoextracția** – poluanții sunt absorbiți de rădăcini și acumulați în țesuturile plantelor.
- **Rizofiltrarea** – toxinele sunt adsorbite sau absorbite de rădăcini din apa contaminată.
- **Fitodegradarea (fitotransformarea)** – activitatea enzimatică din plante sau din microbii asociați descompune contaminanții în produse mai puțin nocive.
- **Fitostabilizarea** – poluanții sunt imobilizați în rizosferă, reducând mobilitatea și biodisponibilitatea lor.

Plantele acționează ca **catalizatori**, stimulând activitatea microbiană din rizosferă prin eliberarea de exudate radiculare. Această sinergie plantă–microb accelerează procesele de degradare și îmbunătățește capacitatea de autoepurare a solului. Totuși, fitoremedierea are limitări: penetrarea rădăcinilor este de obicei limitată la primii 30–45 cm de sol, iar ratele de remediere sunt mai lente comparativ cu metodele fizico-chimice.



Specii precum **Kochia sp. (Bassia scoparia (L.) A. J. Scott)** sunt deosebit de eficiente datorită rădăcinilor adânci și capacității lor de a stimula activitatea microbiană. Studiile au arătat că plantele cu sisteme radiculare extinse realizează o absorbție și transformare mai mare a pesticidelor, reducând adesea concentrațiile biodisponibile la niveluri compatibile cu refacerea ecologică (Đokić et al., 2012).

Deși nu reprezintă o soluție de sine stătătoare pentru toți contaminanții, fitoremedierea este extrem de valoroasă în cadrele integrate de remediere, unde completează metodele microbiene, termice și chimice.

1.4 Fitoremedierea metalelor grele în soluri

Definiție

Fitoremedierea se referă la utilizarea plantelor superioare, algelor și fungilor pentru a reduce, imobiliza sau transforma poluanții prezenți în sol, apă sau aer. Prin activitatea lor metabolică și interacțiunea cu microorganismele asociate, aceste organisme absorb, degradează sau convertesc contaminanții, contribuind astfel la restaurarea ecosistemelor și la îmbunătățirea calității mediului.

Termenul **fitoremediere** provine din cuvântul grecesc *phyto* (plantă) și din latinescul *remedium* (a vindeca sau a reabilita), reflectând rolul său ca strategie de tratament biologic pentru medii contaminate (Prasad, 2003). În practică, fitoremedierea cuprinde o colecție de proceduri în care rădăcinile plantelor, enzimele și microorganismele rizosferei cooperează pentru a izola, transporta, detoxifica sau mineraliza poluanții din soluri.

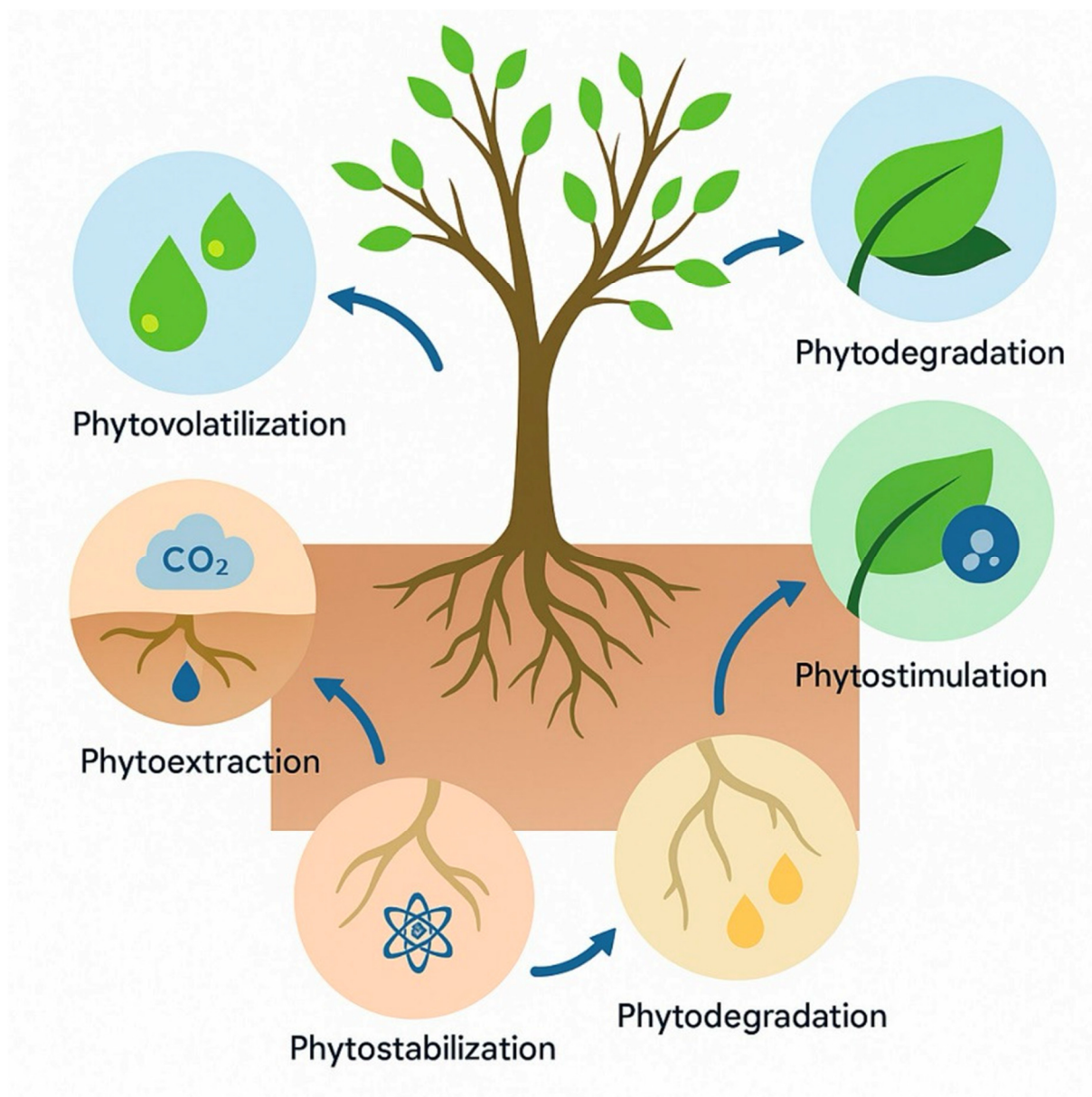


Figura 1.7 Procese de fitoremediere

Mecanismele toleranței plantelor

Plantele care prosperă în soluri contaminate au dezvoltat multiple mecanisme adaptive care le permit să tolereze concentrații ridicate de metale grele. Aceste mecanisme includ:

- sechestrarea metalelor în vacuole,
- legarea de componentele peretelui celular,
- chelatarea prin fitochelatine și metalotioneine, și
- activarea apărărilor antioxidante care atenuează stresul oxidativ.



Astfel de adaptări constituie baza aplicării lor în remediere, permițându-le să supraviețuiască și să crească în medii puternic poluate unde majoritatea altor specii nu pot.

Metode de remediere a solului

Remediarea solurilor contaminate cu metale grele poate fi realizată prin metode fizice, chimice sau biologice:

- **Metode fizice:** ex. spălarea solului, levigarea solului, excavația.
- **Metode chimice:** ex. stabilizare chimică, imobilizare, oxido-reducere.
- **Metode biologice:** ex. bioremediere, fitoremediere, remediere asistată microbian.

În cadrul strategiilor biologice, fitoremedierea a apărut ca o abordare deosebit de atractivă datorită rentabilității, sustenabilității și capacității de a îmbunătăți structura solului în timp ce reduce simultan poluarea (Tangahu et al., 2011).

Mecanismele de bază ale fitoremedierii

Fitoremedierea operează prin mai multe procese distincte, dar uneori suprapuse (Figurile 1–6):

1. **Fitoproliferarea** – Plantele se stabilesc și cresc în solurile contaminate, timp în care sistemele lor radiculare absorb și concentrează poluanții din sol sau apă.

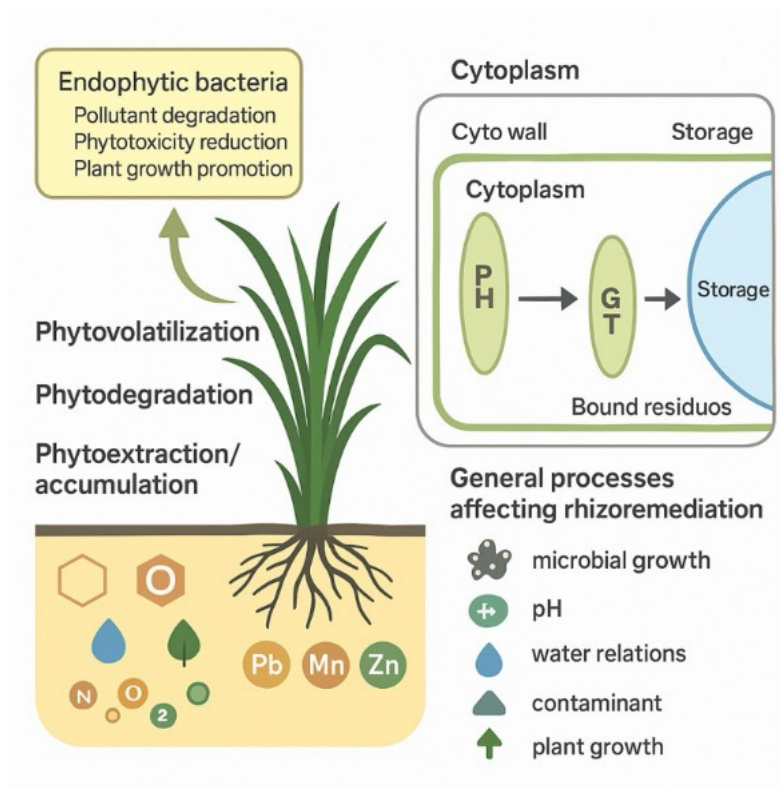


Figura 1.8 Procese de fitoremediere

2. **Fitorizostaza** – Plantele acumulează metale grele și alți contaminanți în țesuturile lor fără a suferi daune fiziologice semnificative. Acest proces permite ca poluanții să fie concentrați în biomasa recoltabile, simplificând îndepărtarea.

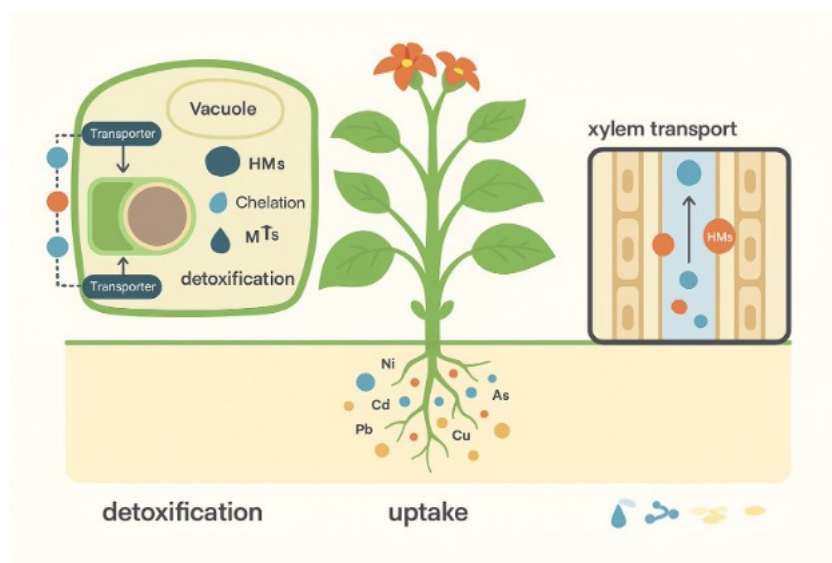


Figura 1.9 Procese de fitoremediere



3. **Fitodegradarea (sau fitotransformarea)** – Plantele produc enzime (ex. dehalogenaze, peroxidaze, laccaze) capabile să descompună poluanți organici complecși sau să transforme contaminanți anorganici în forme mai puțin toxice.

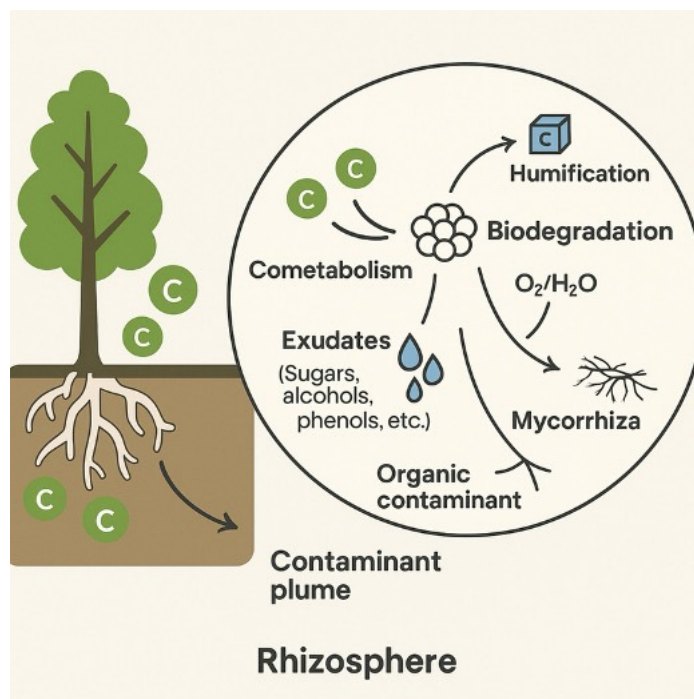


Figura 1.10 Procese de fitoremediere

4. **Fitoextrația** – Plantele absorb metale și metaloizi din soluri sau apă și îi translocă în părțile supratereane precum tulpini și frunze. Biomasa contaminată poate apoi fi recoltată și eliminată în siguranță sau procesată pentru recuperarea metalelor.

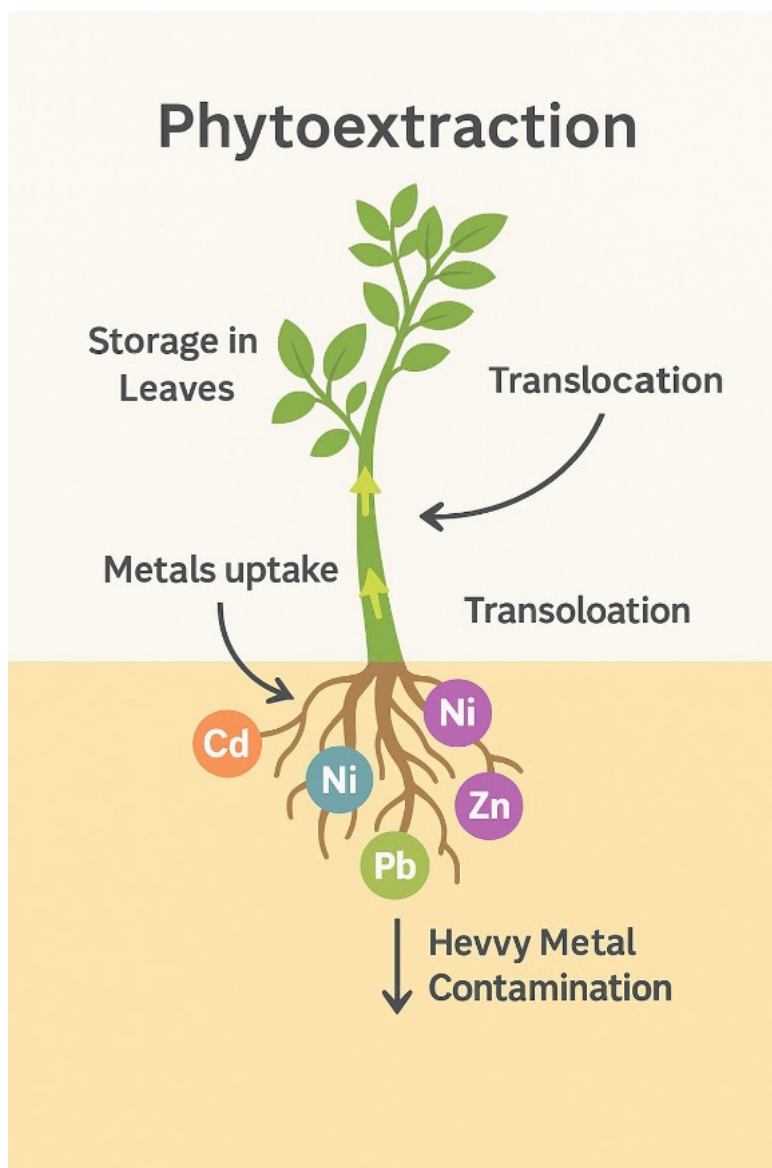


Figura 1.11 Procese de fitoextracție

5. **Rizofiltrarea (Fitorizofiltrarea)** – Rădăcinile filtrează și adsorb poluanții, în special metalele grele, din apă. Această metodă este deosebit de eficientă în zonele umede construite sau pentru tratarea efluenților industriali.

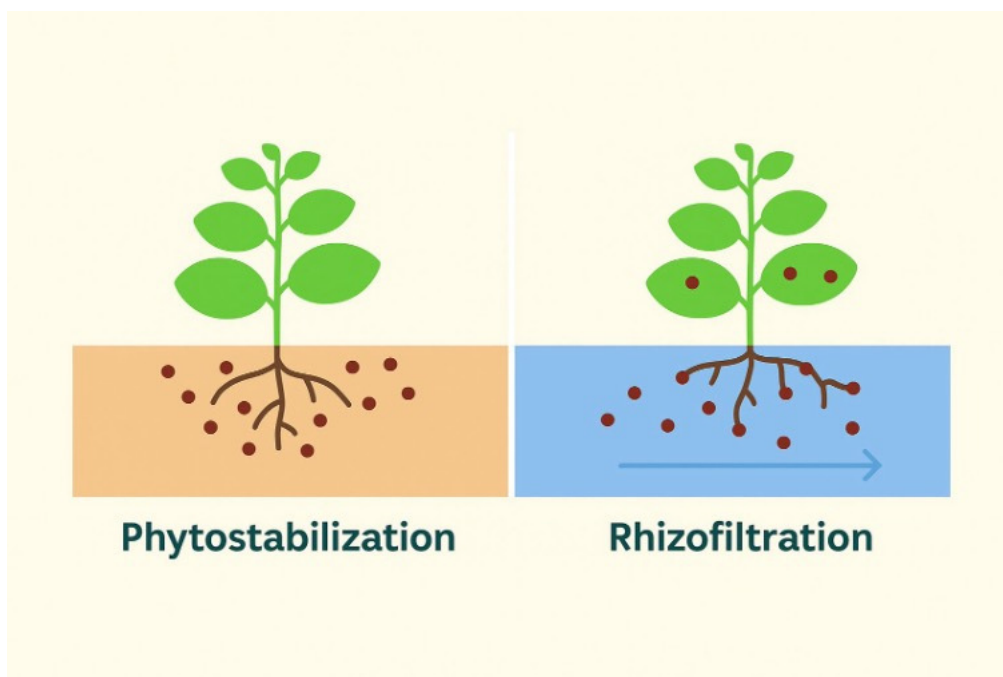


Figura 1.12 Procese de fitostabilizare și rizofiltrare

6. **Fitovolatilizarea** – Anumite plante preiau contaminanți și îi transformă în compuși volatili care sunt ulterior eliberați în atmosferă sub forme mai puțin nocive.

Avantaje și limitări

Fitoremedierea este considerată o tehnologie verde, oferind multiple avantaje ecologice și economice: este cu cost redus, neinvazivă, estetic compatibilă cu peisajele și contribuie la îmbunătățirea fertilității solului. În plus, favorizează interacțiunile din rizosferă, stimulând activitatea microbiană și promovând biodiversitatea.

Totuși, fitoremedierea are și limitări importante:

- eficiența sa este constrânsă de adâncimea rădăcinilor (de obicei 30–50 cm),
- remedierea este adesea mai lentă comparativ cu tratamentele fizico-chimice,
- absorbția poluanților variază în funcție de specie vegetală, tip de contaminant și condiții ale solului, și
- biomasa recoltată, care conține poluanți concentrați, necesită o gestionare atentă.

În ciuda acestor provocări, fitoremedierea rămâne o strategie promițătoare pentru managementul solurilor contaminate cu metale grele, mai ales atunci când este integrată cu alte tehnologii de remediere.



Absorbția și translocarea metalelor grele în plante

Absorbția și translocarea metalelor grele în plante sunt mediate de o gamă de procese fiziologice și biochimice, incluzând absorbția radiculară, transportul de la rădăcini la părțile aeriene, încărcarea xilemului și sechestrarea celulară (Yan et al., 2020). Multe metale grele se găsesc în soluri sub forme ionice solubile, ceea ce le face ușor disponibile pentru absorbția radiculară. Totuși, altele există sub forme insolubile sau slab mobile, reprezentând provocări pentru absorbția de către plante. Pentru a depăși aceasta, plantele au evoluat mai multe mecanisme adaptive care cresc biodisponibilitatea metalelor în rizosferă. Un astfel de mecanism implică secreția de agenți chelatori (ex. acizi organici, aminoacizi și compuși fenolici) de către rădăcini, care mobilizează metale altfel indisponibile, îmbunătățindu-le absorbția (Dalvi & Bhalerao, 2013).



Figura 1.13 Procese de fitostabilizare, rizofiltrare, extracție și fitovolatilizare

Căile de absorbție a metalelor grele

Absorbția metalelor grele are loc prin două căi principale: apoplastică și simplastică.

Calea apoplastică implică difuzia pasivă prin apoplast, unde metalele se deplasează de-a lungul pereților celulari și spațiilor intercelulare fără a traversa membrana plasmatică. Această cale depinde în mare măsură de gradientele de concentrație și de compoziția soluției solului.

Calea simplastică, în contrast, este un proces activ care implică trecerea metalelor prin țesuturi vii, incluzând citoplasma și membranele plasmactice, adesea mediat de proteine transportoare specifice (Peer et al., 2005).

După absorbție, ionii metalelor grele formează de obicei complexe stabile cu molecule chelatoare precum fitochelatinele și metalotioneinele în interiorul celulelor radiculare, reducându-le toxicitatea. Aceste complexe sunt sechestrate fie în vacuole (depozitare intracelulară), fie imobilizate în pereții celulari (depozitare extracelulară) (Ali et al., 2013).



Odată detoxificați și compartimentați, o parte dintre ionii metalici este transportată către stela rădăcinii și ulterior încărcată în xilem, unde sunt translocați prin fluxul de transpirație către organele supratereane ale plantei (Thakur et al., 2016; Kumar et al., 2022). Această distribuție sistemică permite anumitor specii să acumuleze cantități semnificative de metale în tulpini și frunze, formând baza fiziologică a fitoremedierii.

Fitoremedierea și hiperacumulatorii

În ultimii ani, fitoremedierea a apărut ca o tehnologie eficientă, sustenabilă din punct de vedere ecologic și relativ cu costuri reduse pentru îndepărtarea sau stabilizarea metalelor toxice din soluri. Dintre strategiile incluse în fitoremediere, fitoextracția este deosebit de relevantă pentru metalele grele, bazându-se pe capacitatea naturală a plantelor de a absorbi și acumula atât metale esențiale, cât și neesențiale în țesuturile lor.

Plantele cu o capacitate extraordinară de acumulare a metalelor sunt clasificate drept hiperacumulatori (Trapp & Legind, 2010). Aceste specii pot tolera și concentra metale precum plumbul (Pb), cadmiul (Cd), cromul (Cr), arsenul (As) și radionuclizii, care sunt în mod normal toxici pentru majoritatea plantelor. Mai mult, hiperacumulatorii sunt capabili să preia nu doar micronutrienți esențiali necesari pentru creștere (ex. Fe, Mn, Zn, Cu, Mg, Mo, Ni), ci și metale neesențiale și toxice (ex. Cd, Cr, Pb, Co, Ag, Se, Hg) care nu au nicio funcție biologică cunoscută (Vamerali et al., 2009). Această abilitate îi face instrumente extrem de valoroase pentru decontaminarea solurilor afectate de activități industriale, minerit și poluarea agricolă.

Aspecte pozitive ale fitoremedierii

Fitoremedierea oferă mai multe avantaje comparativ cu tehnologiile convenționale de remediere:

Eficiență și aplicabilitate largă – Poate reduce semnificativ nivelurile poluanților și este eficientă împotriva unui spectru larg de contaminanți, incluzând metale, compuși organici și radionuclizi.

Fezabilitate economică – Necesită mai puțină infrastructură, nu necesită personal înalt specializat și este considerabil mai ieftină decât metodele fizice sau chimice de remediere.

Adecvarea pentru suprafețe mari – Este deosebit de atractivă pentru terenuri mari, moderat contaminate, unde remedierea tradițională este imposibilă din punct de vedere economic sau tehnic.



Compatibilitate ecologică – Îmbunătățește fertilitatea solului, sporește diversitatea microbiană din rizosferă și se integrează armonios în peisaje, evitând perturbarea de mediu cauzată de excavație sau incinerare.

Raport cost-eficiență în tratarea apei – Fitoremedierea este deosebit de utilă pentru remedierea unor volume mari de apă cu concentrații scăzute de contaminanți sau pentru soluri de suprafață cu contaminare difuză, de nivel scăzut până la moderat.

Aceste avantaje au poziționat fitoremedierea ca o alternativă inovatoare la metodele tradiționale, precum depozitarea deșeurilor periculoase sau spălarea solului. Spre deosebire de abordările convenționale, ea nu necesită intrări energetice ridicate sau tehnologii complexe, făcând-o nu doar rentabilă, ci și sustenabilă pe termen lung.

1.5 Referințe

AbdelRahman, M. A. E. (2023). An overview of land degradation, desertification and sustainable land management using GIS and remote sensing applications. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*, 34, 767–808.

Alegbeleye, O. O., Singleton, I., & Sant'Ana, A. S. (2018). Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. *Food Microbiology*, 73, 177–208.

Alengebawy, A., Abdelkhalek, S. T., Qureshi, S. R., & Wang, M. Q. (2021). Heavy metals and pesticides toxicity in agricultural soil and plants: Ecological risks and human health implications. *Toxics*, 9(3), 42.

Baličević, R., & Ravlić, M. (2014). Herbicidi u zaštiti bilja. *Poljoprivreda*, 20(1), 43.

Dokić, M., Bilandžić, N., & Briški, F. (2012). Postupci uklanjanja pesticida iz okoliša. *Kemija u industriji*, 61(7–8), 341–348.

Erguven, G. O. (2018). Comparison of some soil fungi in bioremediation of herbicide acetochlor under agitated culture media. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 100(4), 570–575.

Fanda, I. (2022). Opasnosti i rizici upotrebe pesticida (Doctoral dissertation, Karlovac University of Applied Sciences, Department of Safety and Protection).

Frazar, C. (2000). The bioremediation and phytoremediation of pesticide-contaminated sites. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

Gonçalves, C. R., & da Silva Delabona, P. (2022). Strategies for bioremediation of pesticides: Challenges and perspectives of the Brazilian scenario for global application – A review. *Environmental Advances*, 8, 100220.



- Gunther, T., Kirsche, B., & Fritsche, W. (2000). Potential of plant-microbe interactions for in situ bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils. *Environmental Science and Pollution Control Series*, 3, 285–294.
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., & Beeregowda, K. N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*, 7(2), 60–72.
- Jurković, D., Ćosić, J., & Vrandečić, K. (2017). Pseudogljive i gljive ratarskih kultura (p. 288). Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera.
- Katan, J. (2017). Diseases caused by soilborne pathogens: Biology, management and challenges. *Journal of Plant Pathology*, 99(2), 305–315.
- Marcelino, S., Hamdane, S., Gaspar, P. D., & Paço, A. (2023). Sustainable agricultural practices for the production of medicinal and aromatic plants: Evidence and recommendations. *Sustainability*, 15(19), 14095.
- Prasad, M. N. V. (2003). Phytoremediation of metal-polluted ecosystems: Hype for commercialization. *Russian Journal of Plant Physiology*, 50(5), 686–701.
- Raffa, C. M., & Chiampo, F. (2021). Bioremediation of agricultural soils polluted with pesticides: A review. *Bioengineering*, 8(7), 92.
- Sharma, J. K., Kumar, N., Singh, N. P., & Santal, A. R. (2023). Phytoremediation technologies and their mechanism for removal of heavy metals from contaminated soil: An approach for a sustainable environment. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1076876.
- Singhvi, R., Koustas, R. N., & Mohn, M. (1994). Contaminants and remediation options at pesticide sites. EPA/600/R-94/202. Cincinnati, OH: U.S. Environmental Protection Agency.
- Tangahu, B. V., Sheikh Abdullah, S. R., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., & Mukhlisin, M. (2011). A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering*, 2011, 939161.
- Thakur, S., Singh, L., Wahid, Z. A., Siddiqui, M. F., Atnaw, S. M., & Din, M. F. (2016). Plant-driven removal of heavy metals from soil: Uptake, translocation, tolerance mechanism, challenges, and future perspectives. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188(4), 206.
- Tudi, M., Ruan, H. D., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., Chu, C., & Phung, D. T. (2021). Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(3), 1112.
- Vamerali, T., Bandiera, M., & Mosca, G. (2010). Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 8(1), 1–17.
- Yan, A., Wang, Y., Tan, S. N., Mohd Yusof, M. L., Ghosh, S., & Chen, Z. (2020). Phytoremediation: A promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. *Frontiers in Plant Science*, 11, 513099.



CAPITOLUL 2. ANALIZA CONTAMINANȚILOR, REZISTENȚA ANTIMICROBIANĂ

2.1 Introducere

Contaminarea mediului de către activitățile antropice a devenit una dintre provocările definitorii ale secolului XXI, cu implicații profunde pentru ecosisteme, siguranța alimentară și sănătatea publică. Dezvoltarea industrială modernă, agricultura intensivă, urbanizarea și utilizarea excesivă a substanțelor chimice au dus la eliberarea pe scară largă a poluanților în soluri, sisteme acvatice și atmosferă. Acești contaminanți includ metale grele, pesticide, produse farmaceutice, solvenți organici, reziduuri de plastic și microorganisme patogene. Dovezile tot mai numeroase sugerează că acești poluanți nu acționează izolat, ci interacționează adesea, amplificându-și impactul toxicologic și ecologic. Printre aceștia, contaminarea antimicrobiană și creșterea rezistenței antimicrobiene (AMR) reprezintă o criză globală deosebit de urgentă.

Agenții antimicrobieni, odinioară considerați instrumente revoluționare în medicină, agricultură și creșterea animalelor, sunt recunoscuți din ce în ce mai mult ca arme cu două tăișuri. Utilizarea lor extinsă și adesea necontrolată nu doar că a dus la pătrunderea reziduurilor în sisteme de mediu, dar a și favorizat apariția și răspândirea tulpinilor microbiene rezistente. Prezența antimicrobienelor în soluri, sedimente, ape de suprafață și chiar ape subterane exercită o presiune selectivă continuă asupra comunităților microbiene, permițând proliferarea genelor de rezistență și transferul acestora între specii (Martínez, 2009). Aceasta a creat ceea ce mulți cercetători numesc „dimensiunea de mediu a rezistenței antimicrobiene”, unde ecosistemele naturale devin atât rezervoare, cât și canale pentru bacterii rezistente și gene de rezistență.

Soarta antimicrobienelor în mediu este influențată de multiple procese, incluzând degradarea, adsorbția de particulele solului, levigarea în apele subterane și absorbția de către plante și animale. Persistența lor variază larg în funcție de structura chimică a compusului și de proprietățile mediului receptor. În timp ce unele antibiotice se degradează relativ rapid, altele rămân stabile pentru perioade lungi, creând expunere ecologică susținută. Reziduuri sunt detectate frecvent în soluri agricole irigate cu ape uzate, în râuri care primesc efluenți de la fabrici farmaceutice și în terenuri fertilizate cu gunoi de grajd. Aceste căi ilustrează modul în care activitățile umane sunt legate intrinsec de răspândirea în mediu a contaminanților și a AMR.



Consecințele acestor procese se extind dincolo de compartimentele de mediu. Bacteriile rezistente și genele de rezistență provenite din zonele fierbinți de mediu pot reintra în populațiile umane și animale prin alimente contaminate, apă și contact direct. Acest ciclu ilustrează conceptul One Health, care subliniază că sănătatea umană, animală și a mediului sunt interconectate și nu pot fi abordate izolat (Robinson et al., 2016). Creșterea organismelor multirezistente precum *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa* reprezintă o amenințare severă pentru medicina clinică, opțiunile de tratament pentru infecții comune devenind din ce în ce mai limitate.

O altă dimensiune care complică această problemă este interacțiunea dintre antimicrobiene și alți contaminanți de mediu. Metale grele, pesticide, dezinfectanți și microplastice pot coexista cu antimicrobiene, uneori intensificând selecția și persistența tulpinilor rezistente. De exemplu, metale grele precum cuprul și zincul, utilizate pe scară largă în agricultură, s-a demonstrat că co-selecționează gene de rezistență datorită platformelor genetice comune precum plasmidele și integronii (Seiler & Berendonk, 2012). Similar, poluanții organici pot afecta metabolismul microbial, modificând indirect dinamica rezistenței. Astfel de interacțiuni evidențiază impactul sinergic al amestecurilor complexe de contaminanți în modelarea tiparelor de rezistență.

Factorii de mediu ai rezistenței antimicrobiene sunt diverși și multifactoriali. Factori precum temperatura, pH-ul, disponibilitatea nutrienților și compoziția comunității microbiene influențează semnificativ persistența antimicrobienei și mobilitatea genelor de rezistență. Ecosistemele acvatice, în special râurile și sedimentele, sunt considerate rezervoare majore de rezistență datorită rolului lor de zone de convergență pentru apele uzate domestice, efluenții spitalicești și scurgerile agricole. Sistemele de sol sunt la fel de importante, funcționând ca rezervoare pe termen lung pentru contaminanți și ca focare pentru transferul orizontal de gene între comunitățile microbiene.

Dintr-o perspectivă de risc, AMR reprezintă o dublă amenințare: compromite sănătatea publică prin reducerea eficacității antibioticelor și subminează integritatea ecosistemului prin modificarea dinamicii comunităților microbiene. Patogenii rezistenți din mediu pot coloniza noi gazde, în timp ce schimbările în comunitățile microbiene pot perturba ciclurile de nutrienți, fertilitatea solului și serviciile ecosistemice generale. Mai mult, costul economic al AMR este estimat a fi enorm, estimările sugerând milioane de decese premature și pierderi economice globale de trilioane de dolari până în 2050 dacă problema rămâne nemitizată (O'Neill, 2016).

Având în vedere aceste preocupări, cercetarea s-a concentrat tot mai mult pe metode de detectare, monitorizare și reducere a contaminării și rezistenței antimicrobiene în mediu.



Instrumente analitice avansate precum metagenomica, secvențierea de înaltă performanță și spectrometria de masă permit evaluări detaliate ale contaminanților și genelor de rezistență. În același timp, sunt dezvoltate strategii inovatoare pentru a atenua răspândirea AMR, incluzând utilizarea zonelor umede construite, amendamentele cu biocărbune în soluri, procese avansate de oxidare în tratarea apelor uzate și politici care promovează utilizarea responsabilă a antimicrobienelelor.

Acest capitol abordează problema critică a contaminanților de mediu cu un accent special pe reziduurile și rezistența antimicrobiană. El explorează următoarele teme: soarta antimicrobienelelor în mediu, mecanismele prin care rezistența apare și se răspândește, consecințele asupra sănătății și ecologiei ale expunerii la antimicrobiene, efectele sinergice ale antimicrobienelelor cu alți poluanți și factorii de mediu care modelează dinamica rezistenței. În final, evidențiază tehnicile actuale și emergente pentru reducerea rezistenței și contaminării antimicrobiene, făcând legătura între cunoștințele din știința mediului, microbiologie, sănătate publică și politici.

Prin examinarea acestor dimensiuni, capitolul își propune să ofere o înțelegere cuprinzătoare a implicațiilor ecologice și de sănătate ale contaminanților și rezistenței antimicrobiene, situându-le în cadrul mai larg al managementului durabil al mediului și al securității globale a sănătății.

2.2 Metodologii de laborator pentru testarea susceptibilității bacteriene la antimicrobiene

Răspândirea mai multor bacterii patogene rezistente la antimicrobiene a fost recunoscută de **Organizația Mondială pentru Sănătatea Animalelor (OIE)**, **Organizația pentru Alimentație și Agricultură (FAO)** și **Organizația Mondială a Sănătății (OMS)** ca o amenințare globală serioasă atât pentru sănătatea umană, cât și pentru cea animală. Dezvoltarea rezistenței bacteriene la antimicrobiene nu este nici neașteptată, nici un fenomen nou. Totuși, a devenit o problemă din ce în ce mai îngrijorătoare din cauza apariției frecvente a unor noi fenotipuri de rezistență în rândul diferitelor bacterii patogene și chiar al organismelor comensale. Istoric, multe infecții puteau fi tratate cu succes pe baza experienței anterioare a unui clinician (adică, terapie empirică). Totuși, această abordare devine mai degrabă o excepție decât o regulă (Walker, 2007). Rezistența a fost observată împotriva aproape tuturor agenților antimicrobieni aprobați în prezent pentru utilizare atât în medicina umană, cât și în cea veterinară. Combinația dintre varietatea largă de agenți antimicrobieni disponibili și răspândirea rezistenței face



selecția unui tratament adecvat din ce în ce mai dificilă. Ca urmare, clinicienii s-au bazat tot mai mult pe datele obținute prin testarea **in vitro** a susceptibilității la antimicrobiene (AST), subliniind rolul critic al laboratoarelor de diagnostic în practica clinică.

Există mai multe metode de AST disponibile pentru a determina susceptibilitatea bacteriană la antimicrobiene. Alegerea metodei depinde de diverși factori, incluzând practicabilitatea, flexibilitatea, automatizarea, costul, reproductibilitatea, acuratețea și preferințele individuale. Standardizarea și armonizarea metodologiilor AST în supravegherea epidemiologică a rezistenței antimicrobiene este crucială pentru asigurarea comparabilității între programele de supraveghere naționale și internaționale desfășurate de țările membre OIE. Este esențial ca metodele AST să furnizeze rezultate reproductibile în utilizarea de rutină a laboratorului și ca datele să fie aliniate cu rezultatele obținute dintr-o metodă de referință recunoscută ca „standard de aur”. Fără metode standardizate sau proceduri de referință, rezultatele susceptibilității provenite din laboratoare diferite nu pot fi comparate în mod fiabil. În plus, metodele utilizate pentru selecția probelor în programele de supraveghere a rezistenței antimicrobiene, precum și cele pentru izolarea bacteriană primară, ar trebui de asemenea standardizate sau armonizate pentru a permite compararea directă a datelor între regiuni diferite. Aceste aspecte sunt abordate într-un document OIE (Dehaumont, 2004).

Pe măsură ce știința AST a avansat, există acum o înțelegere mai clară a factorilor multipli care influențează rezultatele testării susceptibilității. Acest document oferă ghiduri pentru standardizarea metodologiilor AST și pentru interpretarea rezultatelor testelor de susceptibilitate la antimicrobiene.

2.2.1 Cerințele testării

Pentru a asigura standardizarea metodelor de testare a susceptibilității la antimicrobiene (AST) și comparabilitatea rezultatelor între laboratoare, trebuie îndeplinite următoarele cerințe fundamentale:

Metodologie standardizată și armonizare

- Adoptarea metodelor AST standardizate este esențială.
- Armonizarea parametrilor de testare, incluzând selecția agenților antimicrobieni și criteriile interpretative corespunzătoare, trebuie asigurată.



Definire clară și documentare

- Toate metodele standardizate AST, împreună cu specificațiile critice și criteriile interpretative, trebuie definite explicit, documentate temeinic și aplicate uniform între laboratoare.

Acuratețe și reproductibilitate

- Metodele AST trebuie să genereze constant date corecte, reproductibile și cuantificabile pentru a menține integritatea rezultatelor.

Stabilirea laboratoarelor coordonatoare

- Laboratoare de referință naționale sau regionale ar trebui desemnate pentru a supraveghea coordonarea metodologiilor AST, pentru a asigura interpretări corecte și pentru a implementa măsuri riguroase de control al calității.

Managementul calității și acreditare

- Laboratoarele microbiologice trebuie să implementeze și să mențină un sistem formal de management al calității pentru a susține standardele de testare.
- Laboratoarele ar trebui să obțină acreditare de la o terță parte, asigurând conformitatea cu standardele recunoscute internațional de **Cooperarea pentru Acreditarea Laboratoarelor (ILAC)**.
- Participarea la programe de testare a competenței trebuie să fie obligatorie pentru a verifica competența tehnică.

Tulpini de referință și asigurarea calității

- Utilizarea unor tulpini bacteriene specifice de referință și de control al calității este esențială pentru asigurarea consistenței intra- și inter-laboratoare, pentru asigurarea calității și pentru testarea competenței.

Respectând aceste cerințe standardizate, laboratoarele pot asigura fiabilitatea, acuratețea și comparabilitatea globală a rezultatelor AST, sprijinind în final o supraveghere mai eficientă a rezistenței antimicrobiene și luarea deciziilor clinice



Figura 2.1. Testarea sensibilității antimicrobiene (AST) (URL1).

2.2.1 Selecția antimicrobienelor pentru testare și raportare

Selectarea antimicrobienelor adecvate pentru testarea susceptibilității poate fi dificilă din cauza numărului vast de agenți disponibili. Următoarele recomandări trebuie luate în considerare:

Recomandările FAO/OIE/OMS

Atelierul de experți FAO/OIE/OMS privind utilizarea antimicrobienelor non-umane și rezistența antimicrobiană recomandă crearea unei liste de antimicrobiene critice importante, veterinare și umane, pentru testarea și raportarea susceptibilității.

Consultare pentru selecție

Selecția celor mai adecvate antimicrobiene este o decizie cel mai bine luată de fiecare Membru OIE în consultare cu organismele și organizațiile relevante.

Activitate specifică pe clase

Antimicrobienele din aceeași clasă pot prezenta activități similare in vitro împotriva anumitor patogeni bacterieni. În astfel de cazuri, trebuie selectat un antimicrobian reprezentativ care să prezică susceptibilitatea la ceilalți membri ai aceleiași clase.



Rezistență intrinsecă

Anumiți microorganisme pot fi intrinsec rezistenți la anumite clase de antimicrobiene. Prin urmare, nu este necesar și este înșelător să fie testată activitatea anumitor agenți in vitro. Tipul de rezistență intrinsecă ar trebui determinat pentru acești agenți fie prin literatura științifică, fie prin testare.

Natural selection of resistant bacteria

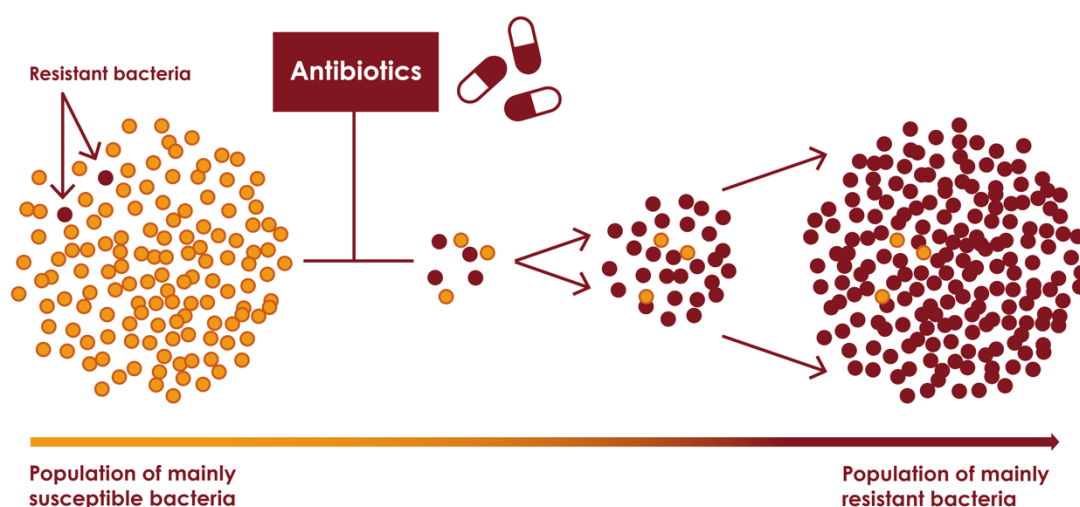


Figura 2.2. Evoluția bacteriilor rezistente la antibiotice prin selecție naturală. În acest exemplu, procesul începe cu o populație bacteriană mare, unde majoritatea bacteriilor sunt vulnerabile la antibiotice, dar câteva sunt rezistente în mod natural. Atunci când se introduce un antibiotic bactericid, acesta elimină majoritatea bacteriilor sensibile, lăsând-o pe cele rezistente să supraviețuiască. În timp, doar bacteriile rezistente vor continua să se înmulțească, ceea ce va duce la o creștere a numărului lor. În cele din urmă, populația va fi formată predominant din bacterii rezistente la antibiotice. (URL 2).

5 Limitarea numărului de antimicrobiene

Numărul antimicrobielenor care urmează a fi testate ar trebui limitat pentru a asigura relevanța și caracterul practic al AST (Testarea Susceptibilității la Antimicrobiene).

Se recomandă revizuirea periodică a microorganismelor care sunt predictibil susceptibile la anumiți agenți antimicrobieni pentru a asigura că rezistența emergentă și neașteptată este detectată. Rezistența emergentă poate fi de asemenea suspectată atunci când există un răspuns slab la un regim standard de tratament antimicrobian.



2.2.1 Metodologii de testare a susceptibilității la antimicrobiene

Următoarele cerințe trebuie respectate:

- Bacteriile supuse AST trebuie izolate în cultură pură din proba trimisă,
- Metodele standard de referință ar trebui utilizate pentru identificare astfel încât bacteriile analizate să fie identificate în mod constant și corect la nivel de gen și/sau specie,
- Izolatele bacteriene considerate cele mai importante și un eșantion din alte izolate ar trebui păstrate pentru analize viitoare (fie prin liofilizare, fie prin conservare criogenică la $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$)

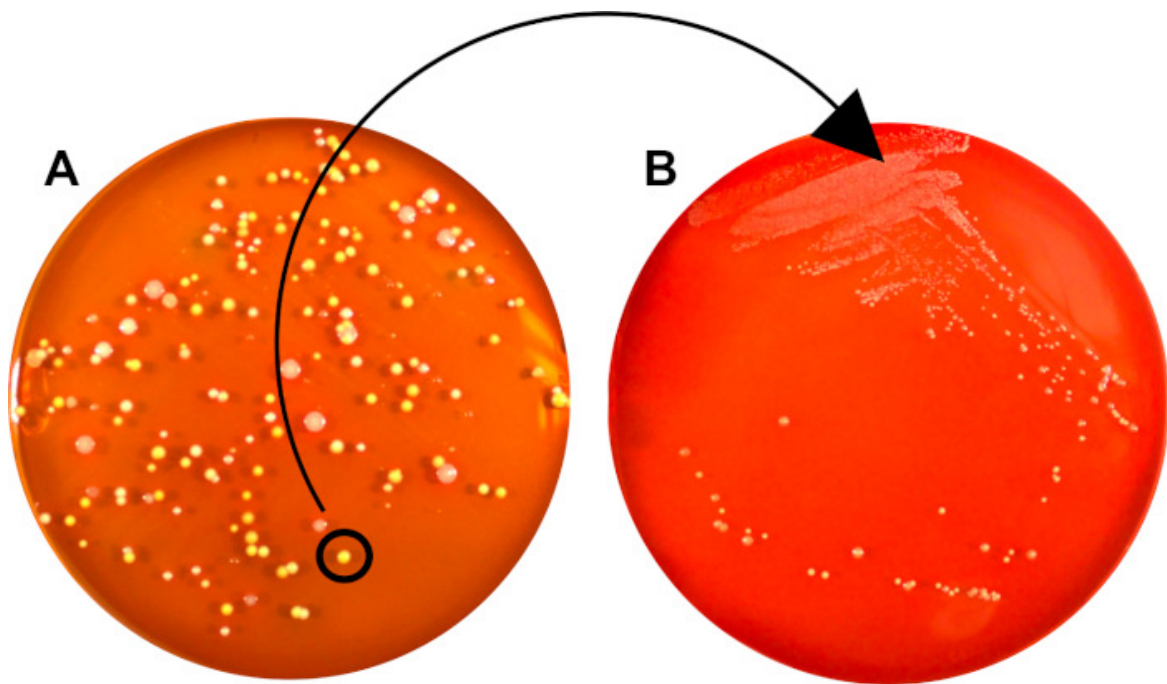


Figura 2.3. Izolarea coloniilor bacteriene individuale dintr-o probă mixtă (URL 3).

Următorii factori care influențează metodele AST ar trebui determinați, optimizați și documentați într-o procedură operațională standard detaliată:



Figura 2.4. Prepararea unui mediu de cultură adecvat și incubarea corespunzătoare pentru microorganismul cultivat (URL 4).

- Odată ce bacteria a fost izolată în cultură pură, concentrația optimă a inoculului trebuie determinată pentru a obține rezultate precise ale susceptibilității. Bacteria sau alte organisme utilizate în testarea AST ar trebui să provină dintr-o cultură proaspătă.
- Compoziția și prepararea mediilor de agar și bulion utilizate (de ex., pH, cationi, timidină sau timină, utilizarea mediilor suplimentate). Performanța și testarea sterilității loturilor de medii ar trebui de asemenea determinate și documentate, împreună cu procedurile utilizate.



Figura 2.5. Creșterea bacteriilor pe mediile de cultură (URL 5).

- Conținutul antimicrobianului în purtător (de ex., antibiotice utilizate în plăci de microtitru, discuri, benzi, tablete).
- Compoziția solvenților și diluanților pentru prepararea soluțiilor stoc antimicrobiene.
- Condițiile de creștere și incubare (timp, temperatură, atmosferă, de ex., CO₂).
- Adâncimea agarului.
- Numărul de concentrații testate per diluție în bulion și agar.
- Controalele de testare care trebuie utilizate, incluzând organismele de referință utilizate.
- Criteriile interpretative ulterioare (praguri clinice, valori limită epidemiologice).



2.2.4 Selecția metodologiei de testare a susceptibilității antimicrobiene (AST)

Selecția unei metodologii AST poate fi bazată pe următorii factori:

- Ușurința de efectuare.
- Flexibilitate.
- Adaptabilitate la sisteme automatizate sau semi-automatizate.
- Cost.
- Reproducibilitate.
- Fiabilitate.
- Acuratețe.
- Organismele și antimicrobienele de interes pentru acel membru particular.
- Disponibilitatea datelor de validare adecvate pentru gama de organisme care urmează a fi testate pentru susceptibilitate.

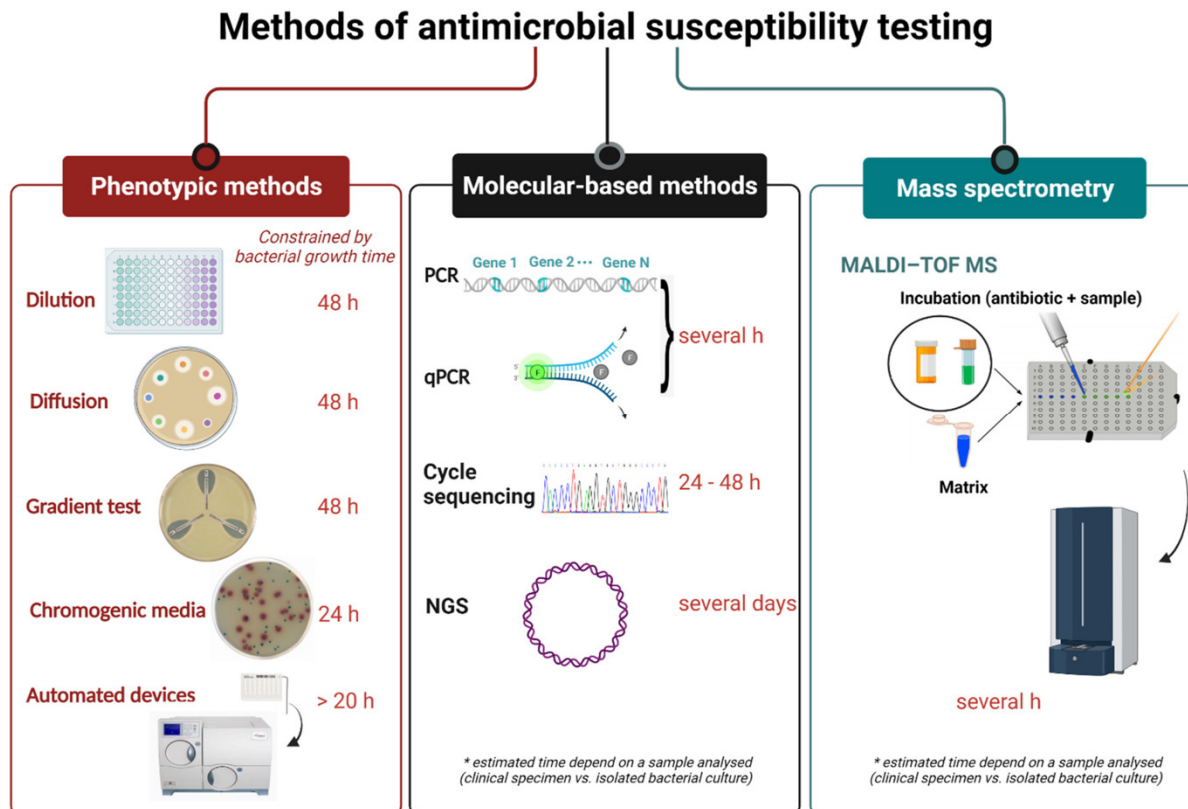


Figura 2.6. Selectarea unei metodologii AST (URL 6).



2.2.5 Metode de testare a susceptibilității antimicrobiene

Atunci când sunt urmate corect, următoarele trei metode s-au dovedit a furniza rezultate reproductibile și repetabile (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008; Walker, 2007):

- Difuzia pe disc.
- Diluția în bulion.
- Diluția pe agar.

a) Metoda difuziei pe disc

Difuzia pe disc se referă la difuzia unui agent antimicrobian, la o concentrație specificată, din discuri, tablete sau benzi într-un mediu solid de cultură inoculat cu un izolat pur selectat. Această metodă se bazează pe determinarea zonei de inhibiție, care este proporțională cu susceptibilitatea bacteriană la agentul antimicrobian prezent în disc.

Pe măsură ce agentul antimicrobian difuzează în mediul de cultură inoculat, acesta creează un gradient de concentrație. Zona de inhibiție este definită acolo unde concentrația antimicrobiană devine prea diluată pentru a suprima creșterea bacteriei testate. Diametrul acestei zone de inhibiție din jurul discului antimicrobian corelează cu concentrația minimă inhibitorie (MIC) pentru combinația specifică bacterie–antimicrobian.

În general, o zonă de inhibiție mai mare indică o MIC mai mică, ceea ce înseamnă că este necesară o cantitate mai mică de agent antimicrobian pentru a inhiba creșterea bacteriană. Totuși, această relație depinde și de concentrația antibioticului din disc **și de** proprietățile sale de difuzie.

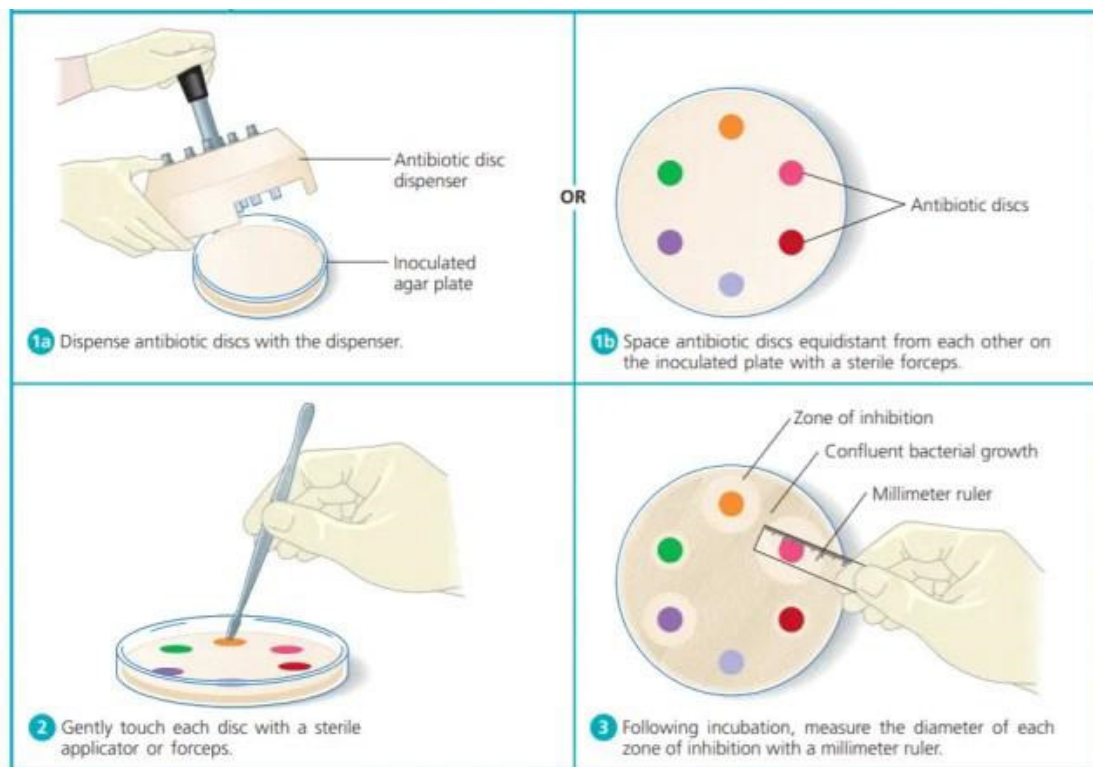


Figura 2.7. Metoda difuziei pe disc (URL 7).

Notă: Testele de difuzie pe disc bazate exclusiv pe prezența sau absența unei zone de inhibiție, fără a ține cont de dimensiunea zonei, nu sunt o metodologie AST acceptabilă.

Considerații pentru utilizarea metodologiei difuziei pe disc

Difuzia pe disc este ușor de realizat, extrem de reproductibilă și nu necesită echipamente costisitoare.

Principalele sale avantaje includ:

- Cost redus.
- Ușurința în modificarea discurilor de test antimicrobiene atunci când este necesar.
- Poate fi folosită ca test de screening pentru un număr mare de izolate.
- Poate identifica un subset de izolate pentru testări suplimentare prin alte metode, cum ar fi determinarea MIC-urilor.



Măsurarea manuală a zonelor de inhibiție poate fi consumatoare de timp. Dispozitivele automate de citire a zonelor sunt disponibile și pot fi integrate cu sistemele de raportare și de management al datelor de laborator.

Pentru a asigura o măsurare precisă, discurile antimicrobiene trebuie distribuite uniform pentru a preveni suprapunerea excesivă a zonelor de inhibiție. În general, acest lucru se poate realiza prin plasarea discurilor la cel puțin 24 mm distanță (de la centru la centru), deși spațierea necesară poate varia în funcție de concentrația discului și de proprietățile de difuzie ale agentului antimicrobian în agar.

a) Metodele diluției în bulion și pe agar

Scopul metodelor de diluție în bulion și pe agar este de a determina cea mai mică concentrație a agentului antimicrobian testat care inhibă creșterea bacteriană vizibilă (MIC), de obicei exprimată în $\mu\text{g/mL}$ sau mg/L . Totuși, MIC nu reprezintă întotdeauna o valoare absolută. „Adevăratul” MIC se situează între cea mai mică concentrație testată care inhibă creșterea bacteriană și concentrația imediat mai mică. Prin urmare, determinările MIC efectuate utilizând o serie de diluții au inerent o variație de o diluție.

Intervalul de concentrație al antimicrobianului testat ar trebui să acopere criteriile interpretative (sensibil, intermediar și rezistent) pentru o combinație specifică bacterie–antibiotic, precum și să includă organisme de control de calitate de referință adecvate.

Comparativ cu difuzia pe disc de agar, metodele de diluție pentru testarea susceptibilității antimicrobiene sunt în general mai reproductibile și mai cantitative. Totuși, deoarece antibioticele sunt de obicei testate în diluții duble, valorile MIC pot să nu fie întotdeauna exacte.

Laboratoarele care intenționează să utilizeze metodele de diluție și să își pregătească propriile reactivi și diluții de antibiotice trebuie să fie capabile să obțină, să pregătească și să mențină soluții stoc corespunzătoare de antimicrobiene de calitate reactiv și să genereze diluții de lucru în mod regulat. Pentru a asigura precizia și standardizarea, astfel de laboratoare trebuie de asemenea să utilizeze organisme de control al calității

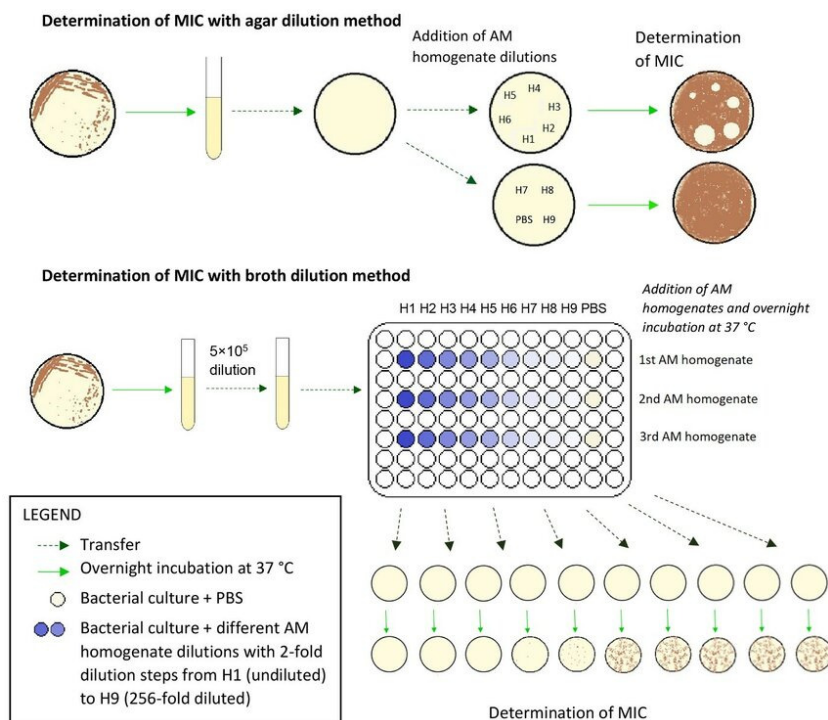


Figura 2.8. Protocol schematic pentru determinarea concentrației minime inhibitorii (CMI) cu metode de diluție în agar și în bulion (URL 8).

• Diluția în bulion

Diluția în bulion este o tehnică în care o suspensie bacteriană, pregătită la o concentrație optimă sau adecvată, este testată împotriva unor concentrații variabile ale unui agent antimicrobian (de obicei în diluții seriate duble) într-un mediu lichid cu o formulare standardizată și documentată.

Această metodă poate fi realizată utilizând tuburi cu un volum minim de 2 mL (macrodiluzie) sau volume mai mici în plăci de microtitru (microdiluzie).

Plăcile de microtitru disponibile comercial, care conțin antibiotice liofilizate, pre-diluate în godeuri, ajută la reducerea variabilității introduse prin prepararea și diluția antimicrobienilor în diferite laboratoare.

Utilizarea plăcilor standardizate de microdiluzie, împreună cu un protocol de test documentat care specifică organismele de referință corespunzătoare, îmbunătățește comparabilitatea rezultatelor între laboratoare.

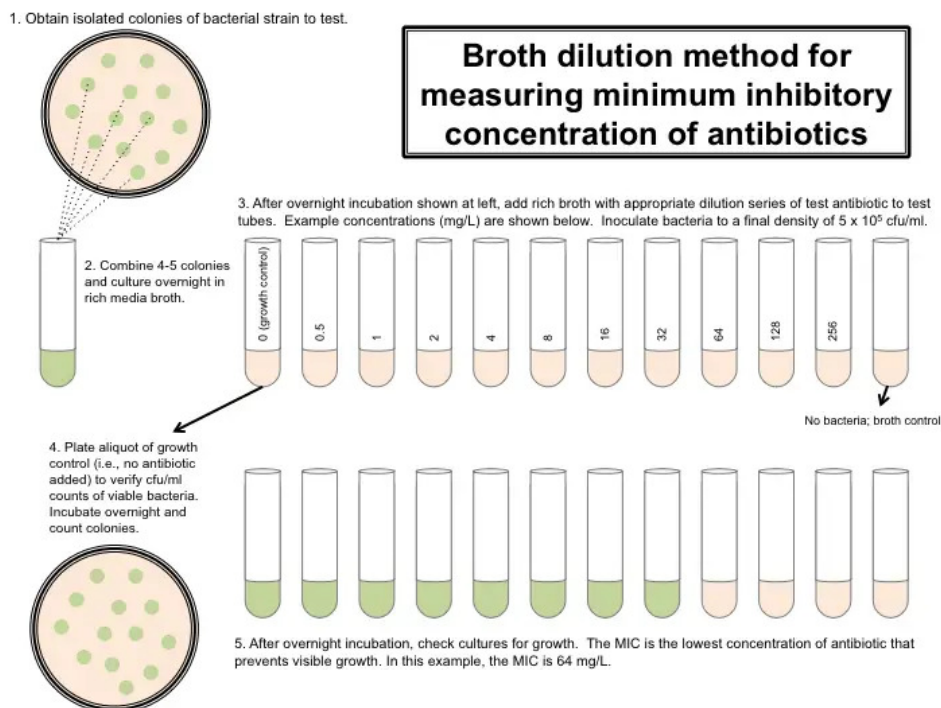


Figura 2.9. Metoda de diluare a bulionului (URL 9).

Deoarece majoritatea panourilor de testare antimicrobiană prin microdiluție în bulion sunt preparate comercial, această metodă este mai puțin flexibilă decât diluția pe agar sau difuzia pe disc în adaptarea la nevoile în schimbare ale programelor de supraveghere și monitorizare.

În plus, costul achiziționării plăcilor antimicrobiene și al echipamentelor asociate poate face ca această metodă să fie nepractică pentru unele laboratoare.



Figura 2.10. Placă cu 96 de godeuri pentru testarea concentrației inhibitorii minime (URL 10).



• Diluția pe agar

Diluția pe agar implică încorporarea unor concentrații variabile ale unui agent antimicrobian într-un mediu de agar, de obicei utilizând diluții seriate duble, urmată de aplicarea unui inocul bacterian definit pe suprafața agarului.

Această metodă este adesea considerată cea mai fiabilă pentru determinarea MIC a unei combinații specifice bacterie–antimicrobian..

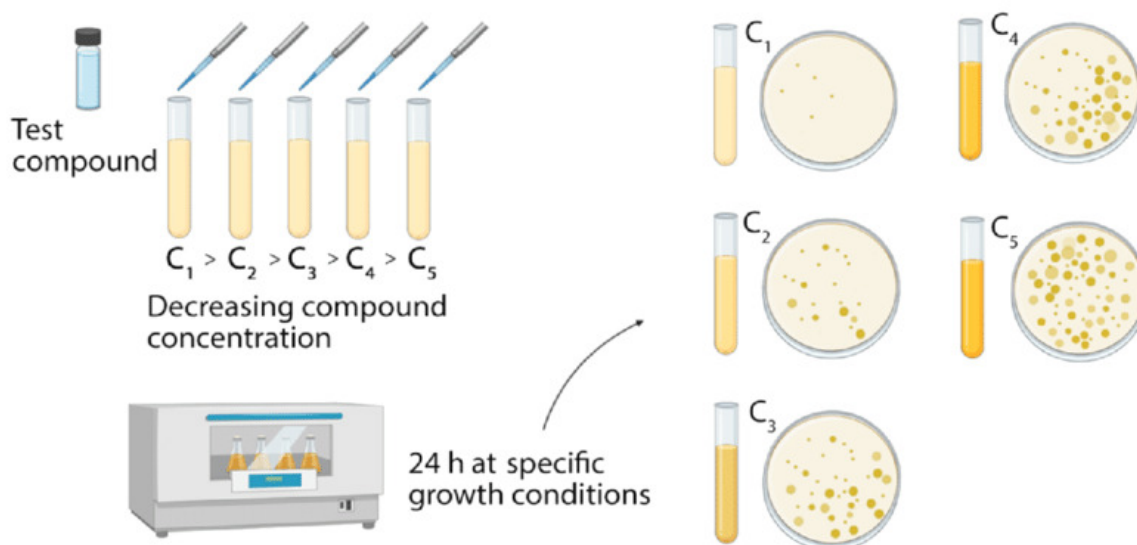


Figura 2.11. Metoda de diluare cu agar (URL 11).

Avantajele metodelor de diluție pe agar includ:

- Capacitatea de a testa mai multe bacterii, cu excepția bacteriilor care se deplasează în valuri (swarm), pe același set de plăci cu agar în același timp.
- Posibilitatea de a îmbunătăți identificarea punctelor finale ale MIC și de a extinde intervalul de concentrație al antibioticelor.
- Posibilitatea de a semi-automatiza metoda folosind un aparat de replicare a inoculului. Replicatori de inocul fabricați comercial sunt disponibili și aceștia pot transfera între 32 și 60 de inoculi bacterieni diferiți pe fiecare placă de agar.



Metodele de diluție pe agar au de asemenea anumite dezavantaje, de exemplu:

- Dacă nu sunt automatizate, sunt foarte laborioase și necesită resurse economice și tehnice considerabile.
- Odată ce plăcile au fost preparate, ele ar trebui în mod normal folosite în decurs de o săptămână (sau mai puțin, în funcție de antimicrobienii testați).
- Punctele finale nu sunt întotdeauna ușor de citit și nici puritatea inoculului nu este ușor de verificat.

Diluția pe agar este adesea recomandată ca metodă AST standardizată pentru organisme pretențioase, precum anaerobii și speciile de *Helicobacter* (CLSI, 2006c).

a) Alte teste AST bacteriene și teste specifice de rezistență antimicrobiană

MIC-urile antimicrobiene bacteriene pot fi de asemenea determinate folosind benzi gradient disponibile comercial care eliberează o concentrație predefinită de antibiotic prin difuzie. Totuși, această metodă poate fi costisitoare, iar discrepanțe ale valorilor MIC pot apărea pentru anumite combinații bacterie–antimicrobian atunci când sunt comparate cu rezultatele obținute prin metoda de diluție pe agar (Ge et al., 2002; Rathe et al., 2009).



Figura 2.12. Benzile gradient pentru testarea concentrației minime inhibitorii (URL 12).



Indiferent de metoda AST utilizată, procedurile trebuie să fie documentate în detaliu pentru a asigura acuratețea și reproductibilitatea. În plus, organismele de referință corespunzătoare ar trebui testate de fiecare dată când se efectuează AST pentru a verifica exactitatea și validitatea datelor.

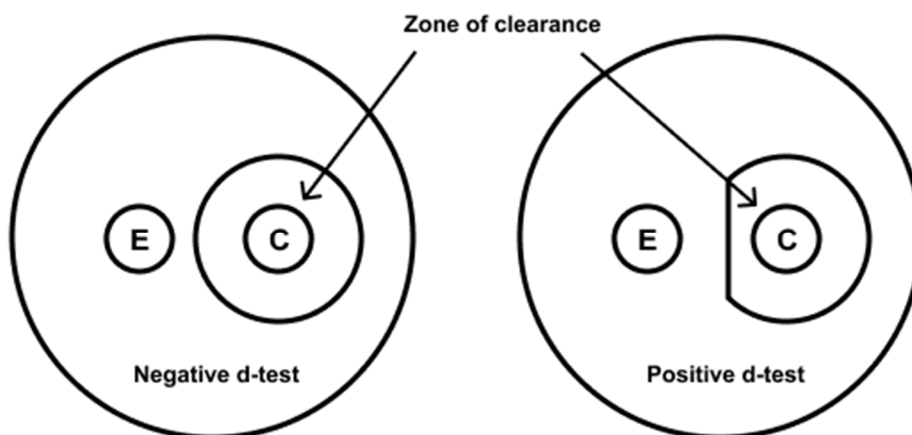


Figura 2.13. Reprezentarea AST negativă și pozitivă (URL 13).

Metoda AST adecvată va depinde, în final, de caracteristicile de creștere ale bacteriei în cauză. În anumite cazuri, metode de testare și analize noi pot fi mai potrivite pentru detectarea unor fenotipuri specifice de rezistență. De exemplu, testele cromogenice pe bază de cefalosporine (de ex., nitrocefin) pot oferi rezultate mai fiabile și mai rapide pentru detectarea beta-lactamazelor la anumite bacterii, în timp ce rezistența inducibilă la clindamicină la *Staphylococcus* spp. poate fi identificată folosind o metodă de difuzie pe disc cu discuri standard de eritromicină și clindamicină plasate în poziții adiacente pentru a măsura zonele de inhibiție rezultate (de ex., testul în „D” sau D-test) (Zelazny et al., 2005).

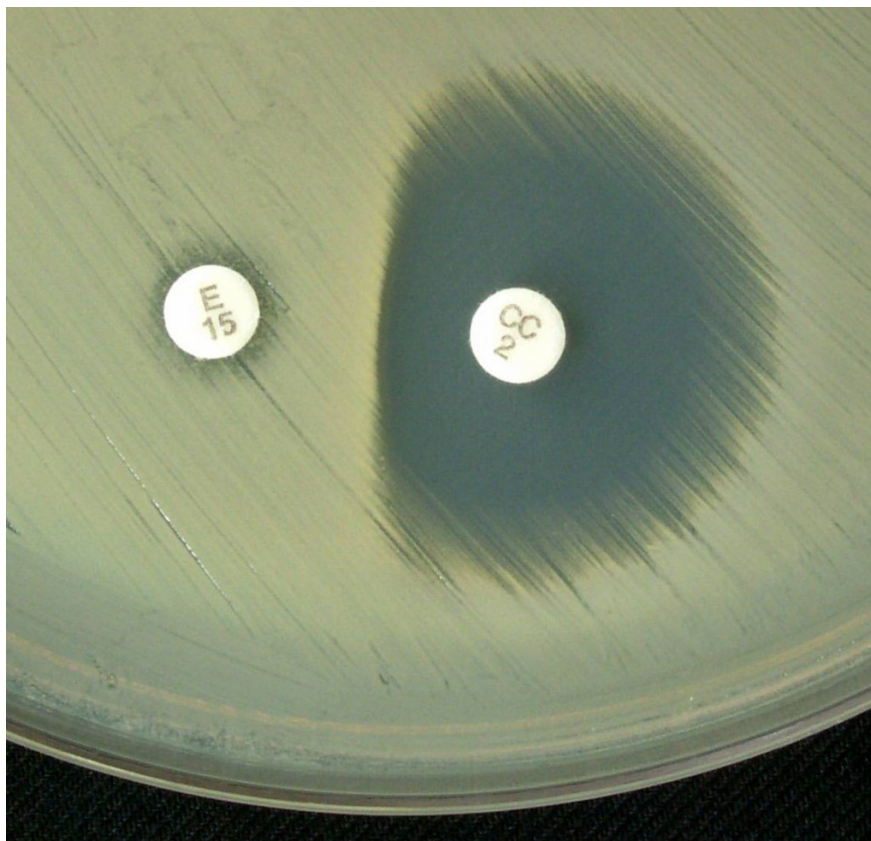


Figura 2.14. AST pozitiv (URL 14).

În mod similar, activitatea beta-lactamazelor cu spectru extins (BLSE) (CLSI, 2008) la anumite bacterii poate fi detectată utilizând testarea standard a susceptibilității prin difuzie pe disc, care include cefalosporine specifice (cefotaxim și ceftazidim) în combinație cu un inhibitor de beta-lactamază (acid clavulanic), și măsurând zonele de inhibiție rezultate. În plus, proteina de legare a penicilinei 2a (PBP 2a) poate fi detectată la stafilococii metilino-rezistenți folosind un test de aglutinare în latex (Stepanovic et al., 2006). Este esențial ca tulpini martor pozitive și negative cunoscute să fie testate alături de izolatele clinice pentru a asigura rezultate corecte.

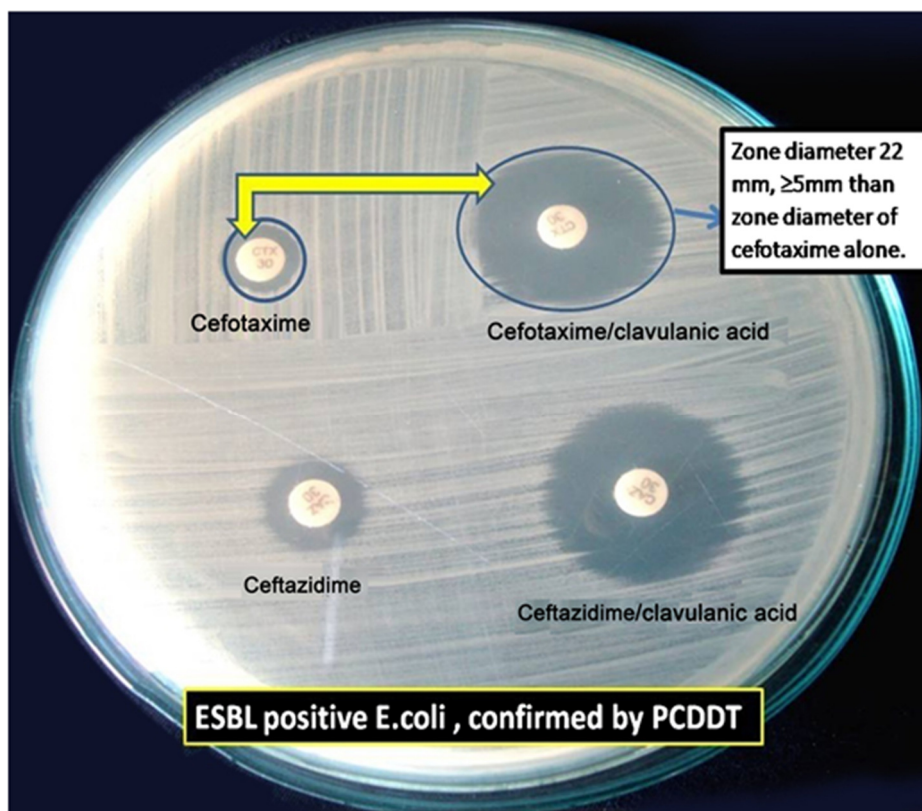


Figura 2.15. Test pozitiv pentru beta-lactamază cu spectru extins (BLSE) (URL 15).

a) Direcții viitoare în detectarea susceptibilității/rezistenței antimicrobiene

Utilizarea abordărilor genotipice pentru detectarea genelor de rezistență antimicrobiană a fost promovată pentru a îmbunătăți rapiditatea și acuratețea testării susceptibilității (Cai et al., 2003; Chen et al., 2005). Numeroase teste bazate pe ADN sunt în curs de dezvoltare pentru a detecta rezistența bacteriană la antibiotice la nivel genetic. Cea mai avansată abordare implică prezicerea fenotipurilor de rezistență antimicrobiană prin identificarea și caracterizarea genelor cunoscute care codifică mecanisme specifice de rezistență.

Metodele care utilizează genomica comparativă, sonde genetice, microaraje, tehnici de amplificare a acizilor nucleici (de exemplu, reacția de polimerizare în lanț, PCR) și secvențierea ADN oferă potențial pentru sensibilitate, specificitate și viteză crescute în detectarea anumitor gene de rezistență cunoscute (Cai et al., 2003; Chen et al., 2005; Perreten et al., 2005). Metodele genotipice au fost aplicate cu succes pentru a suplimenta metodele tradiționale fenotipice AST pentru diferite organisme, incluzând stafilococi metilino-rezistenți, enterococi rezistenți la vancomicină și detectarea mutațiilor de rezistență la fluoroquinolone (Cai et al., 2003; Chen et al., 2005; Perreten et al., 2005). Metodele PCR au fost de asemenea descrise



pentru detectarea beta-lactamazelor, enzimelor inactivatoare de aminoglicozide și genelor de eflux pentru tetraciline (Cai et al., 2003; Chen et al., 2005; Frye et al., 2010; Perreten et al., 2005).

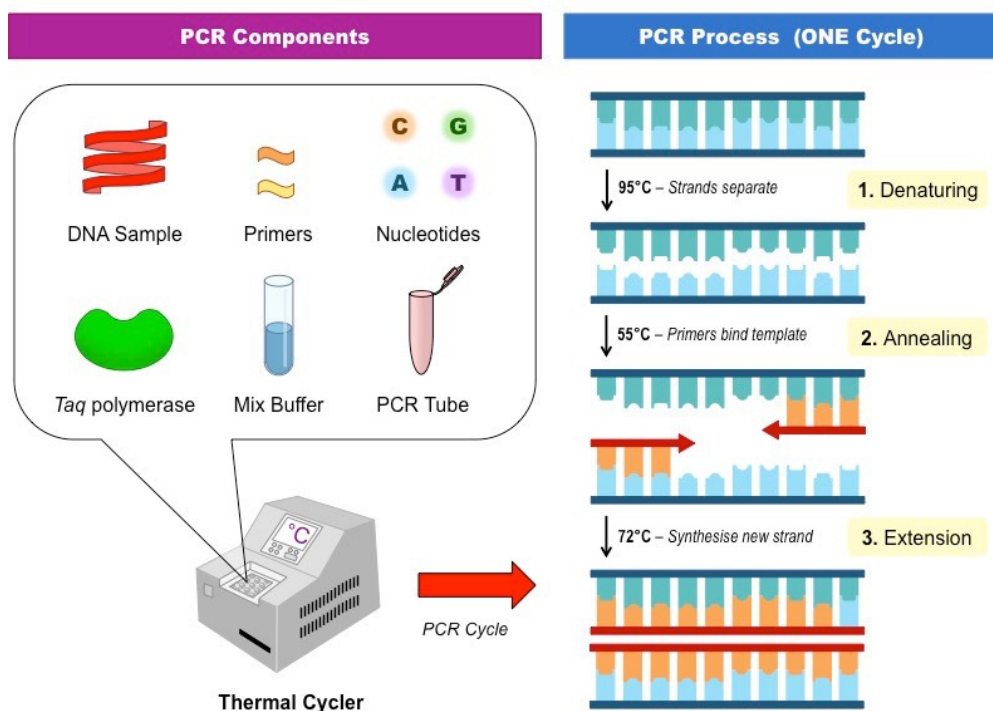
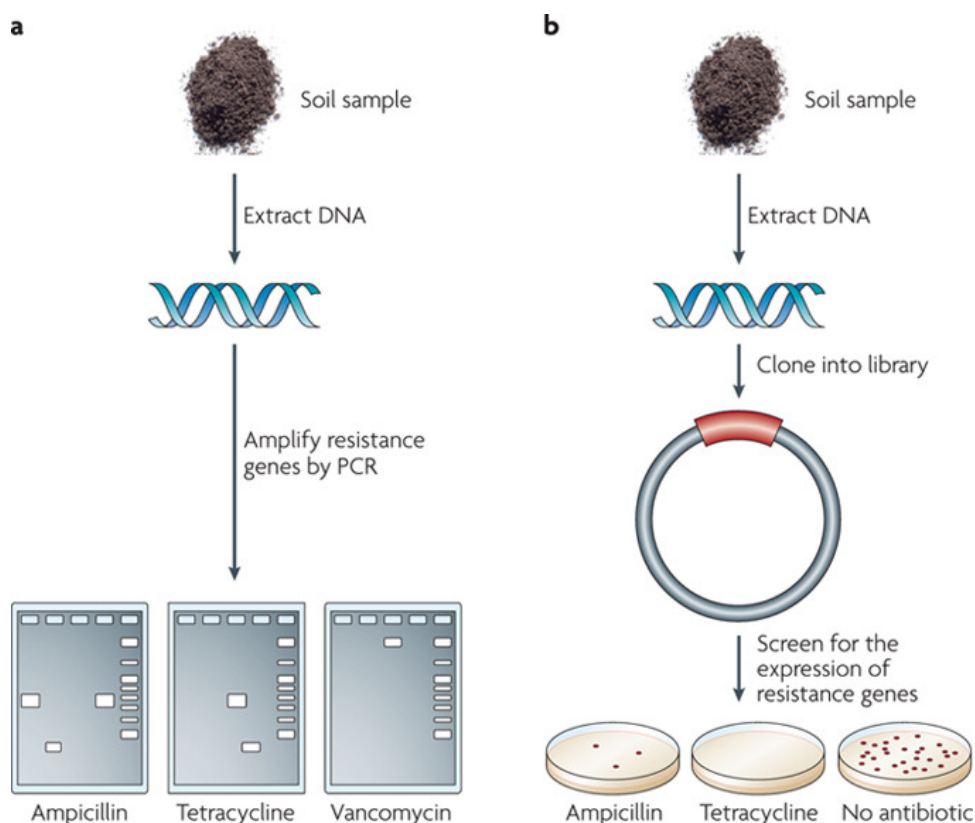


Figura 2.16. Principiul analizei PCR (URL 16).

Inovațiile tehnologice în diagnosticul bazat pe ADN ar trebui să permită detectarea mai multor gene de rezistență și/sau variante într-un singur test. Dezvoltarea metodelor rapide de identificare diagnostică și a testării genotipice a rezistenței este de așteptat să contribuie la reducerea apariției rezistenței antimicrobiene prin facilitarea utilizării celei mai adecvate terapii antimicrobiene la începutul tratamentului. Totuși, tehnicile ADN trebuie să fie demonstrate ca complementare metodelor și rezultatelor AST.



Nature Reviews | Microbiology

Figura 2.17. Diagnosticarea bazată pe ADN ar trebui să permită detectarea rezistenței (URL 17).

În plus, noile progrese tehnologice pot permite detectarea rapidă și eficientă din punct de vedere al costurilor a unui număr mare de gene de rezistență antimicrobiană la speciile bacteriene, furnizând date valoroase pentru programele de supraveghere și monitorizare (Frye et al., 2010). Cu toate acestea, în ciuda afluxului de noi teste genotipice, metodele AST fenotipice documentate și standardizate vor fi în continuare necesare în viitorul apropiat pentru a detecta mecanismele de rezistență emergente la agenții patogeni bacterieni.

- **2.2.6 Puncte limită (breakpoints) pentru susceptibilitatea antimicrobiană și criterii pentru zona de inhibiție**

Obiectivul AST in vitro este de a prezice modul în care un agent patogen bacterian poate răspunde la un agent antimicrobian in vivo. Rezultatele testelor bacteriene in vitro de susceptibilitate antimicrobiană, fie utilizând metoda difuziei pe disc, fie metode de diluție, sunt în general interpretate și raportate ca rezistente, susceptibile sau intermediare la acțiunea unui anumit antimicrobian. Nu a fost stabilită o formulă unică pentru selectarea punctelor limită optime. Procesul implică revizuirea datelor existente și este influențat de subiectivitatea persoanelor însărcinate cu determinarea punctelor limită adecvate. În general, punctele limită pentru susceptibilitatea antimicrobiană sunt stabilite de organizații naționale de standardizare,



societăți profesionale sau agenții de reglementare. Documentele relevante trebuie consultate pentru ghidare. Totuși, pot exista diferențe semnificative în punctele limită pentru același agent antimicrobian în cadrul și între țări, datorită variațiilor între organizațiile de standardizare și agențiile de reglementare, precum și deciziilor regionale sau naționale privind regimurile de dozare (Brown și MacGowan, 2010; De Jong et al., 2009; Kahlmeter et al., 2006).

Așa cum s-a menționat anterior, rezultatele testării susceptibilității antimicrobiene trebuie înregistrate cantitativ:

- Sub forma distribuției MIC în miligrame pe litru sau $\mu\text{g/mL}$.
- Sau ca diametre ale zonelor de inhibiție în milimetri.

Următorii doi factori principali permit ca o bacterie să fie interpretată ca susceptibilă sau rezistentă la un agent antimicrobian:

- Dezvoltarea și stabilirea intervalelor de control al calității (CLSI, 2006c), utilizând difuzia când este posibil și testarea prin diluție, pentru microorganisme de referință pentru controlul calității.
- Stabilirea intervalelor de control al calității este esențială pentru validarea rezultatelor testelor obținute folosind o metodă AST specifică. Intervalele permise ale categoriilor interpretative pentru organismele de referință ar trebui stabilite înainte de determinarea punctelor limită pentru susceptibilitate sau rezistență. Utilizarea organismelor de referință este o activitate de control și asigurare a calității. Totuși, este necesară doar cerința utilizării organismelor de referință.
- Determinarea criteriilor interpretative adecvate privind stabilirea punctelor limită (CLSI, 2006c).

Aceasta implică generarea a trei tipuri distincte de date:

- Distribuțiile populaționale MIC ale microorganismelor relevante.
- Parametrii farmacocinetici și indicii farmacodinamici ai agentului antimicrobian.
- Rezultatele studiilor clinice și experiența.

Interpretarea datelor implică crearea unui scattergram din distribuția populației bacteriene (specii bacteriene reprezentative) prin trasarea zonei de inhibiție în raport cu logaritmul în baza 2 al MIC pentru fiecare agent patogen bacterian. Selectarea punctelor limită se bazează apoi pe mai mulți factori, incluzând analiza liniei de regresie ce corelează MIC-urile cu diametrele



zonelor de inhibiție, distribuțiile populațiilor bacteriene, delimitarea ratei de eroare, farmacocinetica și, în cele din urmă, verificarea clinică.

Conceptul de „puncte limită microbiologice” sau „valori limită epidemiologice” („epidemiological cut-off values”), care se bazează pe distribuțiile populațiilor speciilor bacteriene testate, poate fi mai adecvat pentru unele programe de supraveghere antimicrobiană. În acest caz, izolatele bacteriene care se abat de la populația normală de tip sălbatic susceptibil ar fi desemnate ca rezistente, iar schimbările în susceptibilitate pentru combinația antimicrobian/bacterie specifică ar putea fi monitorizate (Kahlmeter et al., 2006; Turnidge et al., 2006). Un avantaj semnificativ al înregistrării datelor cantitative de susceptibilitate este că aceste date pot fi analizate atât conform punctelor limită clinice, cât și valorilor limită epidemiologice.

2.2.7 Ghiduri pentru testarea susceptibilității antimicrobiene

Un număr de standarde și ghiduri sunt în prezent disponibile pentru testarea susceptibilității antimicrobiene și criteriile interpretative ulterioare în întreaga lume (CLSI, 2008; Kahlmeter et al., 2006). Printre altele, acestea includ standarde și ghiduri publicate de:

- British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC, UK).
- Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI, SUA).
- Comité de l'Antibiogramme de la Société française de Microbiologie (CASFM, Franța).
- Commissie richtlijnen gevoeligheidsbepalingen (CRG, Țările de Jos).
- Deutsches Institut für Normung (DIN, Germania).
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).
- Japanese Society for Chemotherapy (JSC, Japonia), Swedish Reference Group for Antibiotics (SRGA, Suedia).



Co-funded by
the European Union



Figura 2.18. Institutul pentru Standarde Clinice și de Laborator anunță publicarea noilor documente CLSI M100-Ed34, M02-Ed14 și M07-Ed12 privind testarea sensibilității antimicrobiene (URL 18).

În prezent, doar CLSI (fost NCCLS) a dezvoltat protocoale pentru testarea susceptibilității bacteriilor de origine animală și pentru determinarea criteriilor interpretative (CLSI, 2008). Totuși, protocoale și ghiduri sunt de asemenea disponibile din partea diferitelor organizații de standardizare și societăți profesionale, incluzându-le pe cele menționate mai sus, pentru testarea susceptibilității unor specii bacteriene similare care cauzează infecții la oameni. Este posibil ca aceste ghiduri să poată fi adaptate pentru testarea susceptibilității bacteriilor de la animale, dar fiecare țară trebuie să își evalueze propriile standarde și ghiduri AST. În plus, eforturi vizând atât standardizarea cât și armonizarea punctelor limită de susceptibilitate/rezistență la scară internațională sunt în desfășurare. Aceste eforturi s-au concentrat în principal pe adoptarea standardelor CLSI și EUCAST, care oferă laboratoarelor metode și valori de control al calității pentru a permite comparații ale metodelor AST și ale datelor generate (CLSI, 2008; Kahlmeter et al., 2006). Pentru Membrii OIE fără metode AST standardizate, adoptarea unuia dintre aceste seturi de standarde ar reprezenta un prim pas adecvat către metode acceptabile și armonizare.

Multe bacterii care cauzează boală la animalele acvatice necesită condiții specifice de creștere, cum ar fi temperaturi mai scăzute sau medii suplimentate ori semisolide, care pot



diferi semnificativ de cele ale patogenilor bacterieni terestri. Aceasta a dus la dezvoltarea unor metode de testare antimicrobiană adaptate pentru bacterii izolate din specii acvatice. Pentru metode legate de difuzia pe disc sau diluția în bulion pentru testarea susceptibilității antimicrobiene a bacteriilor de la animale acvatice, două documente CLSI oferă ghidare (CLSI, 2006a; 2006b). De asemenea, documentul CLSI M45-A oferă metode pentru testarea bacteriilor izolate rar sau fastidioase, cum ar fi *Campylobacter* și *Pasteurella* (CLSI, 2006c).

Ca prim pas spre asigurarea comparabilității datelor de monitorizare și supraveghere, este important să se încurajeze un design armonizat și standardizat al programelor între Membri (Brown și MacGowan, 2010; Kahlmeter et al., 2006; White et al., 2001). Datele provenite din țări care folosesc metode și designuri de programe diferite pot să nu fie direct comparabile (Brown și MacGowan, 2010). Totuși, datele pe termen lung dintr-o singură țară pot ajuta totuși la identificarea tendințelor în rezistența sau susceptibilitatea antimicrobiană (Petersen et al., 2003). Dacă rezultatele din metode AST diferite sunt prezentate una lângă alta, este crucial să se demonstreze comparabilitatea lor și să se ajungă la consens în interpretare. Acest lucru se realizează cel mai bine prin utilizarea unor metode AST precise, fiabile și prin monitorizarea performanței AST cu microorganisme de referință bine caracterizate în laboratoarele participante.

2.2.8 Comparabilitatea rezultatelor

Pentru a evalua comparabilitatea rezultatelor din sisteme diferite de supraveghere, este esențial ca constatările să fie raportate cantitativ, incluzând detalii despre performanța metodei, organismele de referință și agenții antimicrobieni. Datele de testare a susceptibilității antimicrobiene (AST) ar trebui să conștie într-un rezumat cumulativ, continuu, al tiparelor de susceptibilitate (antibiograme) pentru microorganisme relevante clinic și pentru supraveghere (CLSI, 2009). Aceste date trebuie create, înregistrate și analizate periodic la intervale regulate. Pentru a asigura claritatea și consistența, datele trebuie prezentate într-un mod care să permită identificarea noilor tipare de rezistență și verificarea sau infirmarea constatărilor atipice. Această informație trebuie stocată într-o bază de date centrală și publicată anual. Datele AST cumulative vor fi esențiale în monitorizarea tendințelor de susceptibilitate și rezistență în timp într-o regiune, precum și în evaluarea eficacității intervențiilor destinate reducerii rezistenței antimicrobiene.

2.2.9 Controlul calității (QC) și asigurarea calității (QA)



Managementul calității în laboratoarele veterinare de testare, în laboratoarele care efectuează AST (Hendriksen et al., 2009):

- Controlul calității se referă la tehnicile operaționale utilizate pentru a asigura acuratețea și reproductibilitatea AST.
- Asigurarea calității include, dar nu se limitează la, monitorizare, păstrarea înregistrărilor, evaluare, luarea acțiunilor corective potențiale dacă este necesar, calibrarea și întreținerea echipamentului, testarea competenței, instruirea și QC. Un program QA ajută la asigurarea faptului că materialele și procesele de testare furnizează rezultate de calitate constantă.

Componentele următoare trebuie determinate și monitorizate:

- Precizia procedurii AST.
- Acuratețea procedurii AST.
- Calificările, competența și pregătirea personalului de laborator, precum și a personalului care interpretează rezultatele și a celor implicați în monitorizarea rezistenței antimicrobiene.
- Performanța reactivilor adecvați.

Cerințele următoare trebuie respectate:

- Aderență strictă la tehnicile specificate și documentate împreună cu controlul calității (adică asigurarea performanței și alte criterii critice) al mediilor și reactivilor.
- Păstrarea înregistrărilor despre: numerele loturilor tuturor materialelor și reactivilor adecvați,
- Datele de expirare ale tuturor materialelor și reactivilor adecvați, calibrarea și monitorizarea echipamentului, specificațiile critice pentru performanța AST (rezultate de referință, timp, temperatură etc.).
- Microorganismul(le) de referință adecvat(e) trebuie folosit întotdeauna indiferent de metoda AST utilizată.
- Microorganismele de referință trebuie obținute dintr-o sursă de încredere, de exemplu din American Type Culture Collection (ATCC®), surse comerciale fiabile sau instituții cu fiabilitate demonstrată pentru stocarea și utilizarea corectă a organismelor.
- Microorganismele de referință trebuie catalogate și bine caracterizate, incluzând fenotipuri stabile definite de susceptibilitate antimicrobiană. Înregistrările referitoare la aceste



organisme de referință trebuie să includă intervalele stabilite de rezistență și susceptibilitate ale antimicrobienelor care urmează să fie testate și referința la metoda(ele) prin care acestea au fost determinate.

- Laboratoarele implicate în AST trebuie să folosească microorganismele de referință adecvate în toate testele AST.
- Tulpinile de referință trebuie păstrate ca culturi de stoc din care se derivă culturile de lucru și trebuie obținute din colecții de culturi naționale sau internaționale. Tulpinile bacteriene de referință trebuie stocate în laboratoare centralizate sau regionale desemnate. Culturile de lucru nu trebuie subcultivate zi de zi deoarece acest lucru introduce contaminare, iar metoda de producere a culturilor de lucru trebuie să asigure că culturile de stoc sunt rareori folosite. Aceasta poate fi realizată prin producerea unui stoc intermediar de culturi derivat din culturile originale, utilizat pentru a crea culturile de lucru zilnice.
- Metoda preferată pentru analizarea performanței generale a fiecărui laborator ar trebui să testeze stocul de lucru al microorganismelor de referință adecvate în fiecare zi în care se efectuează teste de susceptibilitate.

Deoarece acest lucru poate să nu fie întotdeauna practic sau economic, frecvența unor astfel de teste poate fi redusă dacă laboratorul poate demonstra că rezultatele testării microorganismelor de referință folosind metoda selectată sunt reproductibile. Dacă un laborator poate documenta reproductibilitatea metodelor de testare a susceptibilității utilizate, testarea poate fi efectuată săptămânal. Dacă apar preocupări privind acuratețea, reproductibilitatea sau validitatea metodei, laboratorul are responsabilitatea de a determina cauza(ele) și de a repeta testele folosind materialele de referință. În funcție de cauză(ele), utilizarea zilnică a materialului de referință și orice altă acțiune corectivă pot fi reinițiate.

- Microorganismele de referință trebuie testate de fiecare dată când este utilizat un nou lot de mediu sau plăci și periodic în paralel cu microorganismele care urmează să fie testate.
- Problemele adecvate de biosecuritate trebuie abordate în obținerea și distribuirea microorganismelor către laboratoarele participante.

2.2.10 Testarea externă a competenței

Laboratoarele sunt de asemenea încurajate să participe la comparații internaționale inter-laboratoare (de exemplu, WHO External Quality Assurance System). Toate speciile bacteriene supuse AST ar trebui incluse.



Laboratoarele naționale de referință ar trebui desemnate cu responsabilitatea pentru:

- Monitorizarea programelor de asigurare a calității ale laboratoarelor participante la supravegherea și monitorizarea rezistenței antimicrobiene.
- Caracterizarea și furnizarea către acele laboratoare a unui set de microorganisme de referință.
- Crearea, gestionarea și distribuirea de probe care să fie utilizate în testarea externă a competenței.
- Crearea unei baze de date centrale disponibile pe internet (de exemplu, European Antimicrobial Resistance Surveillance System, EARSS) care să conțină diferitele profiluri de susceptibilitate/rezistență pentru fiecare specie bacteriană aflată sub supravegher.

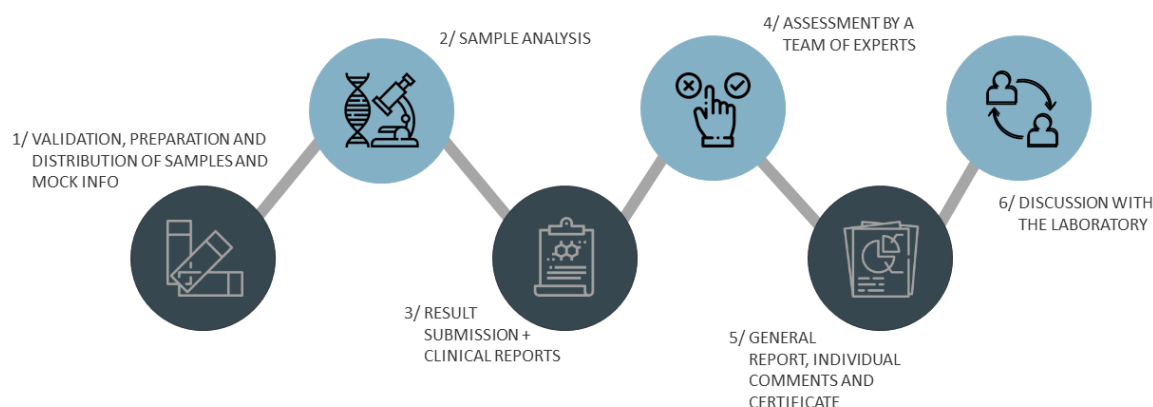


Figura 2.19. Evaluarea externă a calității (URL 19).

Deși există mai multe metode, obiectivul principal al testării in vitro a susceptibilității antimicrobiene (AST) rămâne același: de a furniza o predicție fiabilă despre modul în care un microorganism este probabil să răspundă la terapia antimicrobiană într-un gazdă infectată (World Organisation for Animal Health, 2010). Această informație ajută clinicienii în selectarea agentului antimicrobian adecvat, sprijină eforturile de supraveghere și contribuie la dezvoltarea politicilor de utilizare rațională a antimicrobienelelor.

AST in vitro poate fi realizat folosind diverse tehnici, incluzând difuzia pe disc, diluția în agar, macrodiluția în bulion, microdiluția în bulion și testele cu gradient de concentrație. Fiecare dintre aceste metode necesită condiții specifice de testare, cum ar fi medii de cultură, timpi de incubare și identificarea organismelor de control al calității împreună cu intervalele lor QC



corespunzătoare. Asigurarea reproductibilității și comparabilității rezultatelor AST cu cele obținute printr-o metodă de referință recunoscută ca „standard de aur” este esențială. Fără metode standardizate sau proceduri de referință, rezultatele susceptibilității/rezistenței antimicrobiene provenite din laboratoare diferite nu pot fi comparate în mod fiabil.

Utilizarea abordărilor genotipice pentru a detecta genele de rezistență antimicrobiană a fost promovată pentru a crește viteza și acuratețea testării susceptibilității. În plus, progresele în tehnicile moleculare, cum ar fi microarajele, pot permite o testare rapidă și rentabilă pentru o gamă largă de gene de rezistență antimicrobiană, furnizând date valoroase pentru programele de supraveghere și monitorizare (Ojha și Kostrzynska, 2008; Poxton, 2005). În ciuda acestor inovații, metodele fenotipice standardizate AST vor fi totuși necesare în viitorul apropiat pentru a detecta mecanisme noi de rezistență emergente la agenții patogeni bacterieni.

2.3 Referințe

Brown, D. F. J., & MacGowan, A. P. (2010). Harmonization of antimicrobial susceptibility testing breakpoints in Europe: Implications for reporting intermediate susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(2), 183–185.

Cai, H. Y., Archambault, M., Gyles, C. L., & Prescott, J. F. (2003). Molecular genetic methods in the veterinary clinical bacteriology laboratory: Current usage and future applications. *Animal Health Research Reviews*, 4(2), 73–93.

Chen, S., Zhao, S., McDermott, P. F., Schroeder, C. M., White, D. G., & Meng, J. (2005). A DNA microarray for identification of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* serovars and *Escherichia coli*. *Molecular and Cellular Probes*, 19(3), 195–201.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2006a). Document M42-A: Methods for antimicrobial disk susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; Approved guideline. Wayne, PA: CLSI.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2006b). Document M49-A: Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; Approved guideline. Wayne, PA: CLSI.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2006c). Document M45-A: Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility of infrequently isolated or fastidious bacteria; Approved guideline. Wayne, PA: CLSI.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2008). Document M31-A3: Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved standard (3rd ed.). Wayne, PA: CLSI.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2009). Document M39-A3: Analysis and presentation of cumulative antimicrobial susceptibility test data; Approved guideline (3rd ed.). Wayne, PA: CLSI.



Dehaumont, P. (2004). OIE international standards on antimicrobial resistance. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 51(8–9), 411–414.

De Jong, A., Bywater, R., Butty, P., Deroover, E., Godinho, K., Klein, U., Marion, H., Simjee, S., Smets, K., Thomas, V., Valle, M., & Wheadon, A. (2009). A pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards human-use antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(4), 733–744.

Frye, J. G., Lindsey, R. L., Rondeau, G., Porwollik, S., Long, G., McClelland, M., Jackson, C. R., Englen, M. D., Meinersmann, R. J., Berrang, M. E., Davis, J. A., Barrett, J. B., Turpin, J. B., Thitaram, S. N., & Fedorka-Cray, P. J. (2010). Development of a DNA microarray to detect antimicrobial resistance genes identified in the National Center for Biotechnology Information database. *Microbial Drug Resistance*, 16(1), 9–19.

Ge, B., Bodeis, S., Walker, R. D., White, D. G., Zhao, S., McDermott, P. F., & Meng, J. (2002). Comparison of Etest and agar dilution for in vitro antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(3), 487–493.

Hendriksen, R. S., Seyfarth, A. M., Jensen, A. B., Whichard, J., Karlsmose, S., Joyce, K., Mikoleit, M., DeLong, S. M., Weill, F. X., Aïdara-Kane, A., Lo Fo Wong, D. M., Angulo, F. J., Wegener, H. C., & Aarestrup, F. M. (2009). Results of the WHO Global Salm-Surv external quality assurance system for antimicrobial susceptibility testing of *Salmonella* isolates from 2000 to 2007. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(1), 79–85.

Kahlmeter, G., Brown, D. F., Goldstein, F. W., Macgowan, A. P., Mouton, J. W., Odenholt, I., Rodloff, A., Soussy, C. J., Steinbakk, M., Soriano, F., & Stetsiouk, O. (2006). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) technical notes on antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(6), 501–503.

Martínez, J. L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*, 157(11), 2893–2902.

O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. Review on Antimicrobial Resistance.

Ojha, S., & Kostrzynska, M. (2008). Examination of animal and zoonotic pathogens using microarrays. *Veterinary Research*, 39(4), 26.

Perreten, V., Vorlet-Fawer, L., Slickers, P., Ehricht, R., Kuhnert, P., & Frey, J. (2005). Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of Gram-positive bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), 2291–2302.

Petersen, A., Aarestrup, F. M., Hofshagen, M., Sipila, H., Franklin, A., & Gunnarsson, E. (2003). Harmonization of antimicrobial susceptibility testing among veterinary diagnostic laboratories in five Nordic countries. *Microbial Drug Resistance*, 9(4), 381–388.

Poxton, I. R. (2005). Molecular techniques in the diagnosis and management of infectious diseases: Do they have a role in bacteriology? *Medical Principles and Practice*, 14(Suppl. 1), 20–26.

Rathe, M., Kristensen, L., Ellermann-Eriksen, S., Thomsen, M. K., & Schumacher, H. (2009). Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp.: Validation of susceptibility testing and in vitro activity of vancomycin, linezolid, tigecycline and daptomycin. *APMIS*, 118(1), 66–73.

Robinson, T. P., Bu, D. P., Carrique-Mas, J., Fèvre, E. M., Gilbert, M., Grace, D., Hay, S. I., Jiwakanon, J., Kakkar, M., Kariuki, S., Laxminarayan, R., Lubroth, J., Magnusson, U., Thi



Ngoc, P., Van Boeckel, T. P., & Woolhouse, M. E. J. (2016). Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 110(7), 377–380.

Seiler, C., & Berendonk, T. U. (2012). Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Frontiers in Microbiology*, 3, 399.

Stepanovic, S., Hauschild, T., Dakic, I., Al-Doori, Z., Svabic-Vlahovic, M., Ranin, L., & Morrison, D. (2006). Evaluation of phenotypic and molecular methods for detection of oxacillin resistance in members of the *Staphylococcus sciuri* group. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 934–937.

Turnidge, J., Kahlmeter, G., & Kronvall, G. (2006). Statistical characterization of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(5), 418–425.

Walker, R. D. (2007). Antimicrobial susceptibility testing and interpretation of results. In Giguere, S., Prescott, J. F., Baggot, J. D., Walker, R. D., & Dowling, P. M. (Eds.), *Antimicrobial therapy in veterinary medicine* (pp. 39–54). Ames, IA: Blackwell Publishing.

White, D. G., Acar, J., Anthony, F., Franklin, A., Gupta, R., Nicholls, T., Tamura, Y., Thompson, S., Threlfall, J. E., Vose, D., Van Vuuren, M., Wegener, H., & Costarrica, L. (2001). Standardisation and harmonisation of laboratory methodologies for the detection and quantification of antimicrobial resistance. *Revue Scientifique et Technique*, 20(3), 849–858.

World Organisation for Animal Health (OIE). (2010). Chapter 6.9. Responsible and prudent use of antimicrobial agents in veterinary medicine. In *OIE terrestrial animal health code* (Vol. 1). Paris: OIE.

Zelazny, A. M., Ferraro, M. J., Glennen, A., Hindler, J. F., Mann, L. M., Munro, S., Murray, P. R., Reller, L. B., Tenover, F. C., & Jorgensen, J. H. (2005). Selection of strains for quality assessment of the disk induction method for detection of inducible clindamycin resistance in staphylococci: A CLSI collaborative study. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6), 2613–2615.



Referințele figurilor

- URL 1: <https://microbenotes.com/antimicrobial-susceptibility-testing-ast-types-and-limitations/>
- URL 2: <https://www.reactgroup.org/toolbox/understand/antibiotic-resistance/mutation-and-selection/>
- URL 3: <https://www.jove.com/v/10509/pure-cultures-and-streak-plating-isolation-of-bacterial-colonies>
- URL 4: <https://www.the-scientist.com/exploring-the-landscape-of-bacterial-culture-media-72052>
- URL 5: <https://sciencephotogallery.com/featured/bacterial-growth-on-culture-media-daniela-beckmann.html?product=poster>
- URL 6: <https://www.mdpi.com/2079-6382/11/4/427>
- URL 7: <https://microbeonline.com/antimicrobial-susceptibility-testing-procedure-modified-kirby-bauer-method/>
- URL 8: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-protocol-for-the-determination-of-MIC-with-agar-dilution-and-broth-dilution_fig2_364118411
- URL 9: <https://microbeonline.com/minimum-inhibitory-concentration-mic-broth-dilution-method-procedure-interpretation/>
- URL 10: <https://shop.brand.de/en/brandplatesr-microtitration-plate-96-well-cellgradetm-plus-ps-f-bottom-bio-certr-cell-culture-quality-sterile-p462.html>
- URL 11: https://www.researchgate.net/figure/Scheme-of-the-agar-dilution-method-Created-with-BioRendercom-Reproduction-of-this_fig3_344400025
- URL 12: <https://www.rapidmicrobiology.com/news/fda-cleared-lifofilchem-mts-mic-test-strip-azithromycin-azm>
- URL 13: <https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/biological-sciences-practice/x04f6bc56:mcats-bio-biochem-foundation-2-passages/e/clindamycin-resistance-in-staphylococcus-aureus>
- URL 14: <https://microbeonline.com/inducible-clindamycin-resistance-d-test-principle-procedure-and-interpretation/>
- URL 15: <https://www.scirp.org/journal/paperinformation?paperid=92599>
- URL 16: <https://old-ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3-genetics/35-genetic-modification-and/pcr.html>
- URL 17: https://www.researchgate.net/figure/Detecting-antibiotic-genes-in-natural-samples-A-PCR-based-approach-DNA-is-extracted_fig1_41623404
- URL 18: <https://clsi.org/about/press-releases/the-clinical-and-laboratory-standards-institute-announces-the-publication-of-new-antimicrobial-susceptibility-testing-documents-clsi-m100-ed34-m02-ed14-and-m07-ed12/>
- URL 19: <https://eqascheme.org/>



CAPITOLUL 3. OBTINEREA PRODUSELOR NATURALE CU ACCENT PE CONSERVAREA PRINCIPIILOR ACTIVE

3.1 Introducere

Produsele naturale au jucat un rol central în cultura și supraviețuirea umană de milenii, servind drept surse de hrană, medicamente, coloranți și conservanți. Astăzi, ele rămân indispensabile ca materii prime pentru produse farmaceutice, nutraceutice, cosmetice și alimente funcționale. O singură plantă poate conține sute de constituenți chimici, variind de la nutrienți vitali pentru sănătatea umană până la compuși cu activitate farmacologică sau chiar proprietăți toxice. Diversitatea acestor clase chimice și interacțiunile sinergice dintre ele formează baza atât a efectelor benefice, cât și a celor potențial dăunătoare ale produselor naturale asupra sănătății umane.

În linii mari, substanțele prezente în produsele naturale pot fi clasificate în șase categorii: (1) nutrienți, (2) antinutrienți, (3) non-nutrienți, (4) substanțe nou formate (generate, de exemplu, în timpul procesării sau depozitării), (5) contaminanți și (6) substanțe adăugate, cum ar fi aditivii. Fiecare categorie are implicații distincte pentru siguranța, calitatea și funcționalitatea produselor de origine vegetală.

Nutrienții în sine sunt de obicei împărțiți în macronutrienți — carbohidrați, proteine și grăsimi — și micronutrienți precum vitamine și minerale. Deși sunt esențiali pentru procesele metabolice și sănătatea generală, prezența și biodisponibilitatea lor în sursele naturale pot fi afectate de alți compuși. De exemplu, substanțele antinutriționale interferează cu absorbția sau metabolismul nutrienților. Acidul oxalic ($H_2C_2O_4$), întâlnit frecvent în spanac, sfeclă elvețiană și rubarbă, împiedică absorbția calciului și fierului și, în cantități mari, poate prezenta riscuri de formare a pietrelor la rinichi. Avidina, o proteină din albușurile crude de ou, se leagă puternic de biotină (vitamina B8), reducându-i disponibilitatea. Similar, izotiocianații din legumele crucifere pot interfera cu absorbția iodului, ducând potențial la gușă. Aceste exemple evidențiază natura duală a produselor naturale, unde compuși cu beneficii pentru sănătate pot prezenta și riscuri nutriționale dacă sunt consumați în cantități nepotrivite.

Dincolo de nutrienți și antinutrienți, plantele conțin și o gamă largă de substanțe non-nutriționale — compuși care nu sunt necesari pentru nutriția umană, dar care exercită adesea efecte biologice semnificative. Fibrele alimentare, precum celuloza și pectina, reglează sănătatea intestinală și reduc colesterolul; metilxantinele precum cofeina acționează ca



stimulente; compușii sulfurați din usturoi oferă beneficii antimicrobiene și cardioprotectoare; iar fitochimicalele precum polifenolii, terpenele și alcaloizii contribuie cu proprietăți antioxidante, antiinflamatoare și anticancerigene. Acest domeniu, numit uneori farmacologie nutrițională, subliniază granița fină dintre hrană și medicament.

În acest context, conceptul de fitocomplex a devenit din ce în ce mai important. Un fitocomplex se referă la întregul spectru de constituenți naturali prezenți într-un extract vegetal — principii active împreună cu compuși suportivi precum flavonoizi, taninuri, rășini și uleiuri esențiale — care, împreună, determină efectul terapeutic. Spre deosebire de medicamentele sintetice izolate, eficacitatea medicamentelor pe bază de plante derivă adesea din acțiunea sinergică a acestor multiple componente, mai degrabă decât dintr-un singur ingredient activ. Această complexitate, însă, prezintă provocări semnificative pentru standardizare, controlul calității și conservarea bioactivității în timpul procesării.

Organizația Mondială a Sănătății (OMS) a subliniat importanța unor standarde riguroase în prepararea medicamentelor pe bază de plante. Acestea includ identificarea corectă a plantei sursă, selectarea momentului optim al recoltării, manipularea corespunzătoare după recoltare și luarea în considerare a factorilor precum ustensilele de gătit sau tehnicile de procesare care pot modifica profilul chimic al constituenților vegetali. Produsele medicamentoase naturale pot fi obținute printr-o varietate de abordări: recoltarea speciilor sălbatice, cultivarea plantelor medicinale, fermentație, transformare microbiană și chiar tehnici avansate precum cultura de celule sau organe vegetale. Fiecare abordare influențează randamentul, puritatea și reproductibilitatea principiilor active, făcând selecția sursei și strategia de recoltare critice pentru maximizarea conținutului fitochimic.

O provocare majoră în lucrul cu produsele naturale este extracția și conservarea principiilor active. Extracția reprezintă primul pas critic în separarea constituenților bioactivi din materialul vegetal brut. Metodele tradiționale includ macerarea, percolarea și extracția prin reflux, folosind de obicei volume mari de solvenți organici și necesitând timp îndelungat de procesare. Procesul progresează, în general, prin patru etape: (1) pătrunderea solventului în matricea vegetală, (2) dizolvarea solutului în solvent, (3) difuzia solutului din matrice, și (4) colectarea extractului. Eficiența depinde de mai mulți factori: polaritatea solventului, dimensiunea particulelor materiei prime, raportul solvent-solid, temperatura și durata extracției. Alegerea solventului este deosebit de importantă, deoarece trebuie să echilibreze selectivitatea, solubilitatea, costul și considerațiile de siguranță.



Metodele convenționale, deși aplicate pe scară largă, sunt din ce în ce mai des suplimentate sau înlocuite de tehnologii moderne și ecologice de extracție. Acestea includ extracția cu fluide supercritice (SFE), care utilizează CO_2 supercritic pentru a obține extracte cu puritate ridicată și reziduu minim de solvent; extracția lichidă presurizată (PLE), care reduce consumul de solvent și timpul de procesare; și extracția asistată de microunde (MAE), care îmbunătățește eficiența prin încălzire rapidă și transfer de masă sporit. Astfel de abordări nu doar că cresc randamentul și selectivitatea, dar reduc și degradarea compușilor termolabili, conservând mai bine integritatea principiilor active (Zhang et al., 2018).

Conservarea compușilor activi pe tot parcursul etapelor — de la creșterea și recoltarea plantelor până la extracție și formulare — este crucială pentru asigurarea eficacității și siguranței produselor naturale. Multe molecule bioactive sunt sensibile la căldură, lumină, oxigen sau modificări de pH, iar procesarea necorespunzătoare poate duce la degradarea sau transformarea lor în derivați mai puțin activi sau chiar dăunători. Din acest motiv, cercetările recente pun accent pe dezvoltarea unor metode de extracție selective și blânde, precum și pe tehnici de stabilizare cum ar fi încapsularea, liofilizarea și nanoformularea.

În concluzie, produsele naturale reprezintă un vast rezervor de compuși bioactivi cu un potențial enorm pentru sănătate și industrie. Totuși, valorificarea acestui potențial necesită un echilibru atent între cunoștințele tradiționale și inovația științifică modernă. Acest capitol se concentrează pe metodologiile de obținere a produselor naturale, cu un accent deosebit pe conservarea principiilor active în timpul cultivării, recoltării, extracției și procesării. Prin explorarea atât a abordărilor convenționale, cât și a celor avansate, discuția evidențiază strategii pentru maximizarea randamentului, menținerea bioactivității și asigurarea siguranței și calității produselor naturale pentru utilizarea umană.



From Plant Material to Bioactive Extract

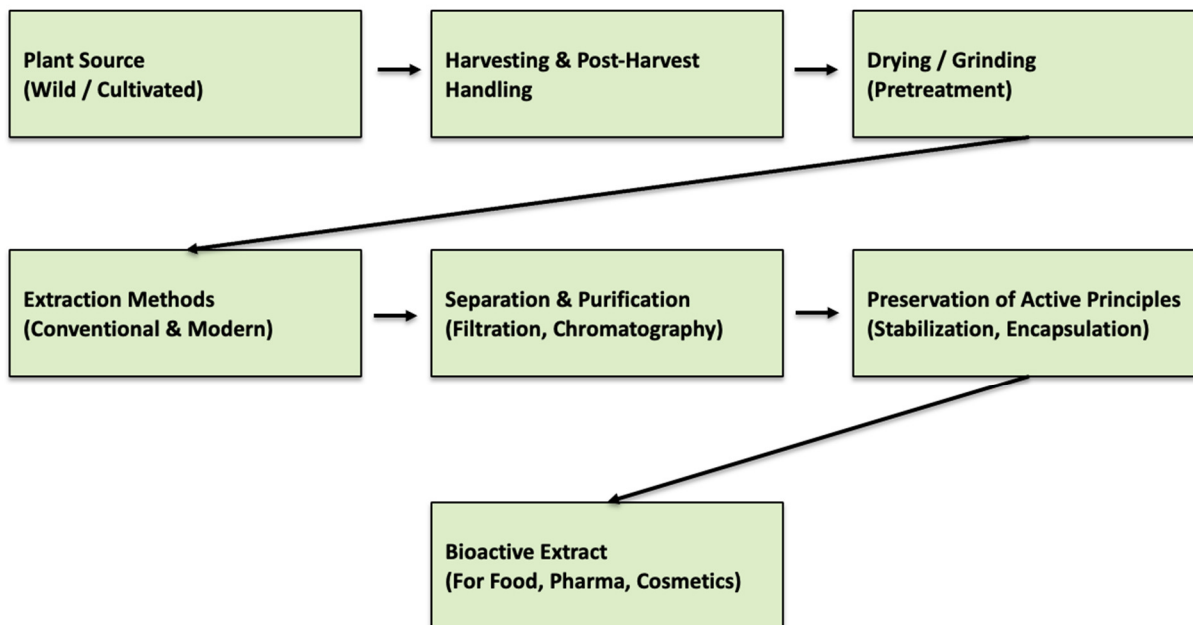


Figura 3.1 Reprezentare schematică a evoluției de la materialul vegetal la extractul bioactiv

3.2 Fitocomplexul – Ansambluri sinergice de constituenți bioactivi

Plantele medicinale au fost recunoscute de mult timp nu doar pentru compușii lor bioactivi izolați, ci și pentru amestecurile complexe de constituenți care contribuie colectiv la efectele terapeutice. Această combinație, cunoscută sub denumirea de **fitocomplex**, reprezintă întregul spectru de molecule naturale prezente într-o plantă sau extract. Spre deosebire de produsele farmaceutice pe bază de un singur compus, activitatea unui fitocomplex rezultă dintr-o interacțiune dinamică a metaboliților primari și secundari, incluzând alcaloizi, flavonoizi, taninuri, terpenoide, uleiuri esențiale, polizaharide și alte substanțe accesorii.

Conceptul de fitocomplex subliniază faptul că eficacitatea terapeutică a remediilor pe bază de plante nu poate fi atribuită întotdeauna unui singur principiu activ major, ci mai degrabă interacțiunilor sinergice și uneori antagonice dintre mai mulți constituenți. Aceste interacțiuni pot spori biodisponibilitatea, pot reduce toxicitatea sau pot extinde spectrul de activitate. Înțelegerea și conservarea acestei complexități este esențială pentru fitoterapia modernă, dezvoltarea de nutraceutice și formularea alimentelor funcționale (Heinrich et al., 2022).



Diversitatea chimică și organizarea structurală a fitocomplexelor

Fitocomplexele se caracterizează prin heterogenitatea lor chimică. Ele includ:

- Metaboliți primari, precum carbohidrați, proteine și lipide, care oferă suport nutrițional și servesc drept purtători sau stabilizatori pentru metaboliți secundari.
- Metaboliți secundari, inclusiv alcaloizi, flavonoizi, terpeni, acizi fenolici, saponine și compuși cu sulf, mulți dintre aceștia prezentând acțiuni farmacologice specifice.
- Substanțe accesorii, precum rășini, ceruri, uleiuri esențiale, pigmenți și enzime, care pot să nu aibă activitate farmacologică directă, dar pot îmbunătăți solubilitatea, stabilitatea sau calitățile organoleptice.

Într-un fitocomplex, acești compuși nu sunt prezenți la întâmplare, ci sunt adesea organizați într-un mod care reflectă mecanismele de apărare ale plantei. De exemplu, polifenolii acționează ca antioxidanți și agenți antimicrobieni, în timp ce terpenoidele contribuie la semnalizarea chimică și interacțiunile ecologice. Această organizare naturală este esențială pentru activitatea generală a plantei și nu poate fi reprodusă prin amestecuri sintetice de compuși izolați (Wink, 2015).

Mecanismele sinergice din fitocomplexe

Sinergia din cadrul fitocomplexelor se manifestă în mai multe moduri:

- i) Sinergie farmacodinamică – mai mulți constituenți pot acționa asupra unor ținte diferite dintr-un sistem biologic, producând un efect mai amplu sau mai intens. De exemplu, activitatea antimicrobiană a uleiului esențial de cimbru este mai puternică atunci când timolul și carvacrolul sunt combinați decât atunci când sunt utilizați individual.
- ii) Sinergie farmacocinetică – anumiți compuși sporesc absorbția sau biodisponibilitatea altora. Un exemplu clasic este piperina din *Piper nigrum*, care crește biodisponibilitatea curcuminei din *Curcuma longa* prin inhibarea degradării sale metabolice (Shoba et al., 1998).
- iii) Detoxifiere și modularea siguranței – compușii minori pot reduce toxicitatea celor majori, permițând o administrare mai sigură. De exemplu, unii flavonoizi contracarează stresul oxidativ potențial indus de alcaloizi.



iv) Stabilizarea moleculelor active – polizaharidele, taninurile sau proteinele pot stabiliza compușii volatili sau metaboliții secundari sensibili, asigurându-le integritatea în timpul depozitării și procesării.

Astfel de efecte sinergice subliniază de ce izolarea unui singur compus activ nu reproduce întotdeauna activitatea terapeutică a unui extract întreg (Ekor, 2014).

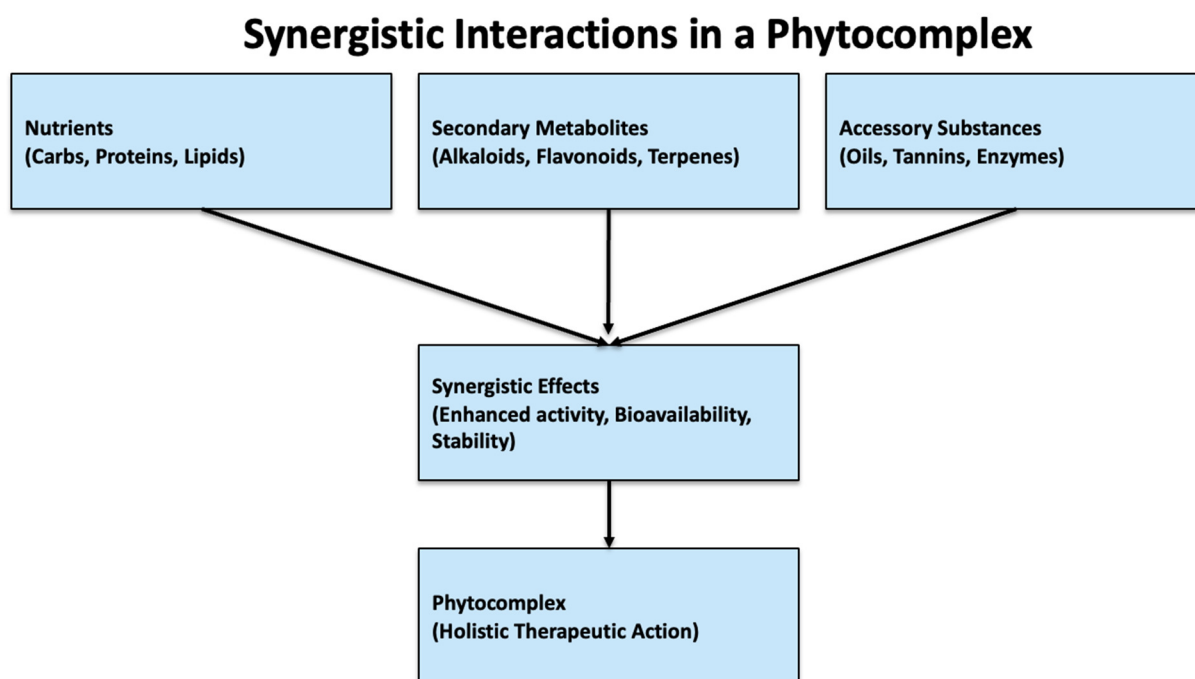


Figura 3.2 Reprezentare schematică a interacțiunilor sinergice într-un fitocomplex

Provocări tehnologice în conservarea fitocomplexelor

Una dintre dificultățile centrale în dezvoltarea produselor pe bază de plante constă în menținerea integrității fitocomplexului pe parcursul etapelor de recoltare, procesare, extracție și depozitare. Factorii care influențează stabilitatea includ:

- i) Condițiile de recoltare – Factorii de mediu, precum lumina, temperatura și compoziția solului, influențează profilul fitochimic al plantei. Momentul recoltării determină adesea concentrația principiilor bioactive (Khoddami et al., 2013).
- ii) Manipularea post-recoltare – Uscarea, măcinarea și condițiile de depozitare pot duce la degradarea uleiurilor volatile, oxidarea polifenolilor și hidroliza glicozidelor.



iii) Metodele de extracție – Extracția convențională cu solvenți poate izola anumite substanțe, dar poate conduce la pierderea constituenților volatili sau termolabili. Metodele moderne, precum extracția cu fluide supercritice (SFE), extracția asistată de microunde (MAE) și extracția cu lichide presurizate (PLE), oferă o selectivitate și o eficiență mai ridicate, păstrând totodată moleculele delicate (Zhang et al., 2018).

iv) Formulare și stabilizare – Tehnici precum încapsularea, liofilizarea și nanoformularea sunt utilizate din ce în ce mai mult pentru protejarea compușilor instabili și pentru livrarea fitocomplexelor sub forme funcționale și biodisponibile (Patra et al., 2021).

Provocarea pentru fitochimia modernă este optimizarea tehnicilor de extracție și conservare, menținând în același timp integritatea holistică a fitocomplexului.

Aplicații în medicină, nutriție și alimente funcționale

Fitocomplexele joacă roluri semnificative în diverse domenii:

- Medicină tradițională și modernă – Remedii pe bază de plante precum ginsengul, echinacea și valeriana se bazează pe interacțiunea mai multor constituenți pentru efecte adaptogene, imunostimulatoare sau sedative. Companiile farmaceutice explorează din ce în ce mai mult extracte standardizate ca alternative la medicamentele pe bază de un singur compus (Ekor, 2014).
- Alimente funcționale și nutraceutice – Extractele bogate în polifenoli din struguri, ceai verde și fructe de pădure sunt promovate pentru beneficiile antioxidante și cardioprotectoare. Aceste efecte se datorează unui spectru larg de compuși interactivi, nu unui singur antioxidant.
- Cosmeceutice – Complexele vegetale bogate în flavonoizi, terpene și uleiuri sunt utilizate în formulări cu efect anti-îmbătrânire, antiinflamator și fotoprotector.
- Nutriție animală și agricultură – Fitocomplexele sunt integrate în furaje ca promotori naturali ai creșterii și agenți preventivi împotriva bolilor, oferind o alternativă la antibioticele sintetice.



Perspective de viitor

Studiul fitocomplexelor evoluează rapid, sprijinit de progresele în metabolomică, biologie a sistemelor și bioinformatică. Aceste instrumente permit cartografierea interacțiunilor complexe dintre constituenții vegetali și căile biologice, oferind perspective mai profunde asupra mecanismelor sinergice.

Cercetările viitoare trebuie să se concentreze pe:

- Dezvoltarea unor protocoale analitice standardizate pentru caracterizarea completă a fitocomplexelor.
- Proiectarea unor tehnologii de extracție ecologice („green extraction”) care reduc impactul asupra mediului și maximizează bioactivitatea.
- Explorarea fitoterapiei personalizate, unde anumite fitocomplexe sunt adaptate la profilul metabolic și genetic individual.
- Integrarea unor cadre de reglementare care să recunoască proprietățile unice ale fitocomplexelor, diferențiindu-le de compuși activi izolați.

Prin îmbinarea cunoștințelor tradiționale cu inovațiile moderne analitice și tehnologice, fitocomplexele pot fi valorificate mai eficient ca resurse sustenabile și sigure pentru sănătate și bunăstare.

Metodă	Solvent	Temperatură	Presiune	Timp	Volumul de solvent organic consumat	Polaritatea produselor naturale extrase
Macerare	Apă, solvenți apoși și neapoși	Temperatura camerei	Atmosferică	Lung	Mare	Depinde de solventul de extracție
Percolare	Apă, solvenți apoși și neapoși	Temperatura camerei, ocazional încălzire	Atmosferică	Lung	Mare	Depinde de solventul de extracție
Decoct	Apă	Încălzire	Atmosferică	Moderat	Niciunul	Compuși polari
Extracție de reflux	Solvenți apoși și neapoși	Încălzire	Atmosferică	Moderat	Moderat	Depinde de solventul de extracție
Extracție Soxhlet	Solvenți organici	Încălzire	Atmosferică	Lung	Moderat	Depinde de solventul de extracție
Extracție lichidă sub presiune	Apă, solvenți apoși și neapoși	Încălzire	Crescută	Scurt	Mic	Depinde de solventul de extracție



Extracție cu fluide supercritice	Fluid supercritic (de obicei S-CO ₂), uneori cu modificador	Aproape de temperatura camerei	Crescută	Scurt	Niciunul sau mic	Compuși nepolari până la moderat polari
Extracție asistată de ultrasunete	Apă, solvenți apoși și neapoși	Temperatura camerei, sau încălzire	Atmosferică	Scurt	Moderat	Depinde de solventul de extracție
Extracție asistată de microunde	Apă, solvenți apoși și neapoși	Temperatura camerei	Atmosferică	Scurt	Niciunul sau mic	Depinde de solventul de extracție
Extracția în câmp electric pulsat	Apă, solvenți apoși și neapoși	Temperatura camerei, sau încălzire	Atmosferică	Scurt	Moderat	Depinde de solventul de extracție
Extracție asistată de enzime	Apă, solvenți apoși și neapoși	Temperatura camerei, sau încălzire după tratament enzimatic	Atmosferică	Moderat	Moderat	Depinde de solventul de extracție
Hidrodistilare și distilare cu abur	Apă	Încălzire	Atmosferică	Lung	Niciunul	Ulei esențial (de obicei nepolar)

3.3 Ghidurile OMS pentru Formulări Standardizate de Plante Medicinale

Medicamentele pe bază de plante reprezintă una dintre cele mai utilizate forme de îngrijire a sănătății la nivel mondial și rămân o opțiune terapeutică primară pentru milioane de oameni, în special în țările în curs de dezvoltare (OMS, 2013). În ciuda istoriei lor îndelungate de utilizare, siguranța, eficacitatea și calitatea formulărilor din plante continuă să reprezinte o preocupare din cauza variabilității inerente surselor naturale. Ca răspuns, Organizația Mondială a Sănătății (OMS) a elaborat ghiduri cuprinzătoare care oferă un cadru pentru standardizarea, asigurarea calității și controlul reglementar al medicamentelor pe bază de plante (OMS, 2007). Aceste ghiduri subliniază faptul că formulările din plante ar trebui să îndeplinească aceleași standarde de siguranță, calitate și eficacitate ca produsele farmaceutice convenționale, recunoscând în același timp provocările specifice asociate materialelor de origine vegetală.

Parametrii-cheie în ghidurile OMS

Controlul calității materiilor prime vegetale și al produselor finite



Identificarea corectă a speciei de plante este esențială pentru a preveni erorile de identificare sau substituirea. Se utilizează examinarea macroscopică, analiza microscopică și, tot mai mult, tehnici de codificare ADN (DNA barcoding) (Raclariu et al., 2017).

Condițiile de mediu (tip de sol, altitudine, expunere la lumină, sezon de recoltare) influențează semnificativ compoziția fitochimică.

Diferitele părți ale plantei (rădăcini, frunze, semințe) prezintă profile chimice distincte, complicând procesul de standardizare.

Riscurile de adulterare includ contaminarea cu alte specii vegetale, metale grele, pesticide sau toxine microbiene.

OMS recomandă o abordare analitică pe mai multe niveluri, combinând cromatografia (HPLC, TLC, GC-MS), spectroscopia (NMR, IR, UV-Vis) și, tot mai mult, metabolomica și chimiometria pentru autentificare și testarea purității (Kunle et al., 2012).

Evaluarea stabilității și a termenului de valabilitate

Produsele din plante conțin mai mulți compuși susceptibili la degradare (ex.: oxidarea polifenolilor, pierderea uleiurilor volatile).

Termenul de valabilitate trebuie stabilit prin studii de stabilitate validate, inclusiv teste în timp real și accelerate.

Evaluările acoperă aspecte fizice (culoare, miros, umiditate), chimice (nivelul compușilor marker) și microbiologice.

Se recomandă ambalaje protectoare (sticlă brună, blistere, tehnici de încapsulare) pentru a conserva principiile active (Zhang et al., 2018).

Evaluarea siguranței

Utilizarea tradițională nu garantează siguranța — sunt necesare studii toxicologice (acute, cronice, genotoxice, de reproducere, carcinogenitate).

Interacțiunile plante–medicamente sunt o preocupare majoră. De exemplu, Sunătoarea (*Hypericum perforatum*) reduce semnificativ concentrațiile plasmatice ale unor medicamente antiretrovirale și imunosupresoare (Izzo & Ernst, 2009).



OMS solicită dezvoltarea unor sisteme de farmacovigilență, inclusiv documentarea evenimentelor adverse și centre naționale de monitorizare.

Evaluarea eficacității

Tradițional, eficacitatea era bazată pe cunoștințe etnomedicale, dar standardele moderne cer validare științifică.

Instrumente de evaluare:

Testări in vitro (antioxidant, antimicrobian, inhibiția enzimelor).

Studii in vivo pe animale.

Studii clinice controlate, unde este posibil (Heinrich, 2015).

Compușii marker sunt adesea utilizați pentru monitorizarea eficacității, deși efectul terapeutic provine de obicei din fitocomplexul sinergic, nu dintr-o singură moleculă.

Metode analitice și armonizare reglementară

OMS subliniază necesitatea armonizării internaționale pentru siguranță, eficacitate și comerț global.

Tehnici recomandate:

Microscopie – autentificarea drogurilor vegetale brute.

Cromatografie – amprentare chimică.

Spectroscopie & metabolomică – profilarea amestecurilor complexe.

Spectrometria de masă de înaltă rezoluție (MS) și rezonanța magnetică nucleară (NMR) oferă perspective avansate asupra diversității fitochimice (Li et al., 2022).

Persistă diversitatea reglementărilor: produsele din plante pot fi clasificate ca suplimente alimentare (SUA), medicamente tradiționale pe bază de plante (UE) sau medicamente



ayurvedice (India). Ghidurile OMS funcționează ca referință de armonizare, promovând convergența fără a elimina particularitățile culturale.

Ghidurile OMS oferă un cadru global pentru a asigura că medicamentele pe bază de plante îndeplinesc standardele moderne de calitate, siguranță și eficacitate. Prin abordarea variabilității surselor vegetale, stabilității chimice, riscurilor toxicologice și validării eficacității, aceste ghiduri creează o punte între cunoștințele tradiționale și rigoarea științifică modernă. Adoptarea lor consolidează protecția sănătății publice și crește credibilitatea și acceptarea internațională a medicinei pe bază de plante.

3.4 Suplimente Alimentare

Suplimentele alimentare sunt definite ca surse concentrate de nutrienți sau alte substanțe bioactive cu efect nutrițional sau fiziologic, comercializate de obicei în forme de dozare precum capsule, tablete, pulberi și lichide dozate (Comisia Europeană, 2002). Aceste produse fac legătura între dietă și medicină, oferind surse suplimentare de vitamine, minerale, aminoacizi, acizi grași, fibre sau extracte vegetale pentru a sprijini sănătatea generală și a preveni deficiențele.

În ultimele două decenii, suplimentele alimentare au trecut de la produse de nișă la componente mainstream ale piețelor de sănătate pentru consumatori. Această schimbare reflectă transformări sociale mai largi, inclusiv îmbătrânirea populației, creșterea bolilor cronice și accentul sporit pe îngrijirea preventivă. Relația medic–pacient s-a modificat, indivizii căutând mai multă autonomie în alegerile lor de sănătate. Consumatorii moderni devin din ce în ce mai proactivi, solicitând îndrumări pentru menținerea stării de bine, în loc să se bazeze exclusiv pe tratamente reactive.

Piața globală a suplimentelor alimentare înregistrează o creștere susținută. De exemplu, în Europa, piața a înregistrat o creștere a valorii de 4,3%, corespunzând la aproximativ 3,5 miliarde € și 256 milioane de pachete vândute anual. Categoriile precum sănătatea cardiovasculară, reglarea microbiotei intestinale și sănătatea urogenitală domină cererea, în timp ce formulările specifice de gen și produsele specifice vârstei (pentru copii și seniori) reprezintă nișe în expansiune.



Componente nutriționale și funcționale ale suplimentelor alimentare

Suplimentele alimentare includ o gamă diversă de substanțe, clasificate astfel:

Vitamine și minerale: micronutrienți esențiali care susțin funcțiile metabolice, creșterea, imunitatea și prevenirea bolilor.

Aminoacizi și proteine: elemente de bază ale mușchilor și țesuturilor, tot mai populare în nutriția sportivă și recuperare.

Acizi grași esențiali (EFA): acizi grași omega-3 și omega-6, cruciali pentru sănătatea cardiovasculară și cognitivă.

Fibre: benefice pentru sănătatea digestivă și controlul greutateii.

Produse botanice și extracte din plante: cum ar fi ginseng, echinacea, turmeric și ceai verde, promovate adesea pentru proprietăți antioxidante, antiinflamatoare sau adaptogene.

Probiotice și prebiotice: microorganisme vii și fibre alimentare care promovează echilibrul microbiomului intestinal.

Totuși, biodisponibilitatea acestor compuși este un factor major al eficacității lor. Nutrienții care sunt slab absorbiți sau rapid metabolizați nu oferă beneficii terapeutice sau nutriționale. Pentru a aborda această problemă, se dezvoltă strategii avansate de formulare, inclusiv nanoîncapsulare, livrare liposomală și co-administrare cu potențiatori ai absorbției (de exemplu, piperina cu curcumina) (McClements, 2020).

Siguranță, calitate și probleme ale lanțului de aprovizionare

În ciuda popularității lor, suplimentele alimentare se confruntă cu provocări legate de controlul calității și transparența lanțului de aprovizionare. Adulterarea, contaminarea și variabilitatea materiilor prime rămân probleme presante, în special în produsele derivate din plante. Internaționalizarea lanțurilor de aprovizionare duce adesea la variații de calitate, deoarece diferențele de sol, climă, moment al recoltării, depozitare și procesare pot modifica profilurile fitochimice (Zhang et al., 2018).

Impuritățile, cum ar fi reziduurile de pesticide, metalele grele sau contaminarea microbiană, pot compromite siguranța și eficacitatea. În plus, cazurile de adulterare deliberată cu substanțe farmaceutice (de exemplu, steroizi sau stimulanti) subliniază necesitatea unui control și reglementare riguroasă (Teschke et al., 2013).



Pentru a reduce aceste riscuri, unele companii de top și-au integrat vertical lanțurile de aprovizionare, cultivând și procesând direct plantele pentru a asigura consistența calității. Monitorizarea constantă, programele de certificare (ex.: GACP – Good Agricultural and Collection Practices) și testarea în laboratoare independente sunt din ce în ce mai considerate standarde de industrie.

Inovație și cercetare în suplimentele alimentare

Inovația este esențială pentru menținerea încrederii consumatorilor și a creșterii pieței, în special în contextul restricțiilor de reglementare impuse de EFSA și FDA privind afirmațiile de sănătate. Companiile investesc masiv în cercetare fundamentală, tehnologii de formulare și validare clinică pentru a sprijini eficacitatea produselor lor.

Domenii-cheie de inovație:

Cercetare fundamentală: identificarea de compuși bioactivi noi, explorarea sistemelor funcționale, studii mecanistice la nivel molecular și celular.

Cercetare în formulare: dezvoltarea de sisteme avansate de livrare (nanoparticule, emulsii, hidrogeluri) care îmbunătățesc biodisponibilitatea și stabilitatea compușilor sensibili (ex.: polifenoli, probiotice, acizi grași omega-3).

Validare clinică: studii in vivo și clinice pe oameni pentru dovezi de siguranță și eficacitate. Acestea pot confirma utilizările tradiționale etnobotanice sau valida afirmații noi de sănătate (de ex., modularea microbiomului intestinal, reducerea riscului cardiovascular).

Gen, vârstă și nutriție personalizată

O tendință emergentă pe piața suplimentelor este nutriția personalizată, condusă de progresele în genomică, metabolomică și cercetarea microbiomului. Produsele sunt tot mai mult adaptate pentru:

- Nevoi specifice de gen: ex. suplimente pentru simptomele menopauzei la femei sau sănătatea prostatei la bărbați.
- Formulări specifice vârstei: ex. calciu și vitamina D pentru sănătatea oaselor la vârstnici, omega-3 pentru dezvoltarea cognitivă a copiilor.



- Produse specifice stilului de viață: ex. formule pentru recuperare sportivă, adaptogeni pentru reducerea stresului la profesioniști, combinații pentru imunitate destinate călătorilor frecvenți.

Această evoluție reflectă trecerea de la suplimentarea generală la nutraceutice de precizie, aliniate cu tendințele mai largi din medicina personalizată (Afman & Müller, 2012).

Cadru de reglementare și încrederea consumatorilor

Suplimentele alimentare ocupă un spațiu reglementar între alimente și medicamente, cerințele variind la nivel global.

În Uniunea Europeană, ele sunt reglementate prin Directiva Suplimentelor Alimentare (2002/46/EC).

În Statele Unite, prin DSHEA (Dietary Supplement Health and Education Act, 1994).

Deși aceste cadre cer etichetare corectă și interzic afirmațiile înșelătoare, nu impun întotdeauna autorizare pre-market, responsabilitatea revenind producătorilor pentru siguranță și calitate.

Încrederea consumatorilor depinde astfel de transparență, certificări independente și dovezi științifice. Integrarea instrumentelor digitale, cum ar fi sistemele blockchain pentru trasabilitate, este așteptată să îmbunătățească responsabilitatea și să asigure consumatorii de autenticitatea produselor.

Suplimentele alimentare reprezintă un sector din ce în ce mai important al îngrijirii preventive a sănătății, situat la intersecția dintre dietă, medicină și wellness-ul consumatorului. Ele furnizează surse concentrate de nutrienți esențiali și compuși bioactivi, dar se confruntă cu provocări continue privind asigurarea calității, biodisponibilitatea și armonizarea reglementărilor.

Viitorul acestui sector depinde de:

- inovație,
- validare științifică riguroasă,
- personalizare,
- sprijinite de sisteme solide de calitate și lanțuri de aprovizionare transparente.



Respectând aceste principii, industria suplimentelor alimentare poate continua să se extindă, menținând siguranța, eficacitatea și încrederea consumatorilor.

3.5 Referințe

Afman, L., & Müller, M. (2012). Nutrigenomics: From molecular nutrition to prevention of disease. *Journal of the American Dietetic Association*, 112(4), 566–571.

Bauer, R. (2018). Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: Can acceptable drug standards be achieved? *Drugs of the Future*, 43(9), 623–632.

Ekor, M. (2014). The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in Pharmacology*, 4, 177.

European Commission. (2002). Directive 2002/46/EC of the European Parliament and of the Council on the approximation of the laws of the Member States relating to food supplements.

Heinrich, M. (2015). Quality standards for herbal medicines: The significance of ethnopharmacological context. *Drug Discovery Today*, 20(2), 179–185.

Heinrich, M., Appendino, G., Efferth, T., Fürst, R., Izzo, A. A., Kayser, O., ... & Viljoen, A. (2022). Best practice in research: Consensus statement on ethnopharmacological field studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 284, 114797.

Izzo, A. A., & Ernst, E. (2009). Interactions between herbal medicines and prescribed drugs: An updated systematic review. *Drugs*, 69(13), 1777–1798.

Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328–2375.

Kunle, O. F., Egharevba, H. O., & Ahmadu, P. O. (2012). Standardization of herbal medicines – A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 4(3), 101–112.

Li, S., Zhang, B., & Jiang, D. (2022). Advances in metabolomics and analytical techniques for quality evaluation of herbal medicines. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 12(3), 235–248.

McClements, D. J. (2020). Advances in oral bioavailability of nutraceuticals. *Annual Review of Food Science and Technology*, 11, 141–168.

Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. D. P., Acosta-Torres, L. S., ... & Shin, H. S. (2021). Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, 19, 48.

Raclariu, A. C., et al. (2017). DNA barcoding for authentication of botanicals. *Phytomedicine*, 23(11), 1103–1109.

Shinde, V. M., Dhalwal, K., Potdar, M., & Mahadik, K. R. (2009). Application of quality control principles to herbal drugs. *International Journal of Phytomedicine*, 1(1), 4–8.



Shoba, G., Joy, D., Joseph, T., Majeed, M., Rajendran, R., & Srinivas, P. S. (1998). Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Medica*, 64(4), 353–356.

Teschke, R., Schwarzenboeck, A., & Hennermann, K. H. (2013). The mystery of herbal hepatotoxicity: Case characteristics, clinical features and causality assessment. *Annals of Hepatology*, 12(1), 19–32.

WHO. (2007). WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. Geneva: World Health Organization.

WHO. (2013). WHO Traditional Medicine Strategy 2014–2023. Geneva: World Health Organization.

Williamson, E. M., Driver, S., & Baxter, K. (2013). *Stockley's Herbal Medicines Interactions*. Pharmaceutical Press.

Wink, M. (2015). Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. *Medicines*, 2(3), 251–286.

Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13, 20.



CAPITOLUL 4. CAPITALIZAREA RESURSELOR VEGETALE PENTRU CONSUM SIGUR ȘI EFICIENT

4.1 Introducere

Plantele au fost, istoric, printre cele mai importante resurse pentru nutriția umană, îngrijirea sănătății și practicile culturale. De la culturile alimentare de bază până la formulările medicinale sofisticate, materialele derivate din plante furnizează nutrienți esențiali, agenți terapeutici și compuși funcționali **care** susțin viața și promovează bunăstarea.

În context contemporan, capitalizarea resurselor vegetale se referă la utilizarea strategică a materialelor derivate din plante în sisteme alimentare, suplimente dietetice și produse farmaceutice, cu accent pe siguranță, eficiență și sustenabilitate. Acest concept integrează practici agricole, inovații biotehnologice și cadre de reglementare pentru a maximiza beneficiile resurselor vegetale, reducând în același timp riscurile asociate cu contaminanți, toxine și variabilitatea compușilor bioactivi.

Definirea capitalizării resurselor vegetale

Capitalizarea resurselor vegetale cuprinde identificarea, extracția, procesarea și formularea materialelor derivate din plante în produse sigure și eficiente.

- În sistemele alimentare, aceasta implică optimizarea calităților nutriționale și funcționale ale culturilor, asigurând în același timp siguranța alimentară.
- În suplimente, capitalizarea se referă la izolarea moleculelor bioactive (ex.: flavonoide, alcaloizi, terpene, polizaharide) și stabilizarea acestora pentru beneficii fiziologice țintite.
- În medicină, ea presupune adesea standardizarea fitochimicalelor pentru a produce formulări cu eficacitate terapeutică reproductibilă.

Dincolo de domeniul biomedical, capitalizarea include și valorificarea produselor secundare agricole (tărâțe, coji, semințe, tescovină) în compuși valoroși precum fibre alimentare, antioxidanți sau biocombustibili. Această abordare sustenabilă nu doar sprijină modele de economie circulară, dar și reduce deșeurile de mediu (Lange & Ahlemeyer, 2019).



Importanța siguranței și eficienței

Creșterea cererii pentru produse naturale a dus la provocări sporite privind siguranța și eficiența. Spre deosebire de farmaceuticele sintetice, plantele prezintă profiluri fitochimice complexe, influențate de factori genetici, de mediu și de procesare. Această complexitate poate genera variabilitate în calitatea și eficacitatea produselor.

Considerații de siguranță includ:

- Prezența toxinelor naturale (ex.: alcaloizi, glicozide cianogenice).
- Contaminanți din inputurile agricole (pesticide, metale grele).
- Riscuri microbiologice în timpul depozitării și procesării.
- Compuși alergeni în anumite produse vegetale.

Considerații de eficiență includ:

- Retenția compușilor bioactivi în timpul procesării și depozitării.
- Maximizarea randamentului din extracția materiilor prime.
- Rentabilitatea în producția la scară mare.
- Asigurarea biodisponibilității principiilor active în organismul uman.

Asigurarea atât a siguranței, cât și a eficienței necesită protocoale standardizate, măsuri de control al calității și tehnologii analitice avansate (cromatografie, spectrometrie, metabolomică) pentru identificarea și cuantificarea fitochimicalelor și a contaminanților (Zhou et al., 2019).

Acest capitol își propune să ofere un ghid cuprinzător de strategii experimentale și aplicate pentru capitalizarea resurselor vegetale, cu accent pe:

- Asigurarea siguranței – abordarea toxinelor, contaminanților, alergenilor și aspectelor de reglementare.
- Optimizarea eficienței – păstrarea bioactivității, îmbunătățirea randamentului și reducerea costurilor de producție.



- Standardizarea metodologică – prezentarea tehnicilor moderne de extracție, procesare și stabilizare.
- Perspective aplicate – demonstrarea modului în care plantele pot fi integrate în alimente, suplimente și produse farmaceutice pentru a maximiza beneficiile pentru sănătatea publică.

Prin legarea metodologiilor experimentale de studii de caz aplicate, acest capitol evidențiază atât oportunitățile, cât și provocările transformării resurselor vegetale în produse sigure, eficiente și sustenabile pentru consumul uman.

De ce contează siguranța și eficiența

- Protejează consumatorii de toxine, contaminanți și alergeni.
- Menține bioactivitatea compușilor funcționali și terapeutici.
- Reduce deșeurile și maximizează valoarea economică a resurselor vegetale.
- Îmbunătățește încrederea consumatorilor și conformitatea cu standardele internaționale.
- Susține sustenabilitatea și modelele de economie circulară.

Capitalizarea resurselor vegetale reprezintă o intersecție critică între agricultură, biotehnologie, știința alimentară și medicină. Utilizarea sigură și eficientă a produselor derivate din plante contribuie nu doar la securitatea alimentară și îngrijirea sănătății, dar și la alinierea cu obiectivele globale de sustenabilitate, inovație și protecția consumatorilor.

Odată cu creșterea interesului consumatorilor pentru produse naturale, combinată cu avansurile în extracție și tehnologii analitice, viitorul constă în dezvoltarea unor strategii standardizate, bazate pe dovezi, care să deblocheze întregul potențial al resurselor vegetale pentru consum uman sigur și eficient.

Conceptual Diagram: Capitalization of Plant Resources

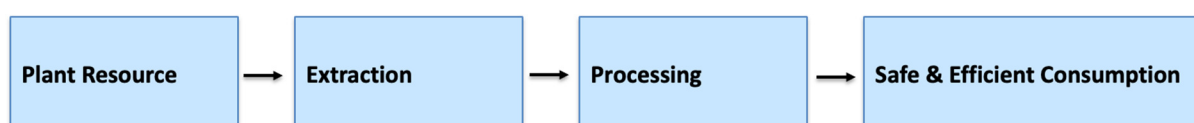


Figura 4.1 Reprezentare schematică a valorificării resurselor vegetale



4.2 Selecția și Caracterizarea Resurselor Vegetale

Selecția sistematică și caracterizarea resurselor vegetale reprezintă o piatră de temelie în dezvoltarea unor produse sigure și eficiente derivate din surse naturale. Fie că sunt destinate utilizării ca alimente, suplimente dietetice sau preparate medicinale, materialele vegetale trebuie să treacă printr-o evaluare riguroasă pentru a le asigura siguranța, eficacitatea și reproductibilitatea.

Deși plantele au servit istoric drept rezervoare esențiale de nutriție și medicină, complexitatea crescândă a piețelor globale moderne necesită abordări mai structurate pentru a le valida utilizarea. Acest capitol introduce principiile fundamentale pentru selecția și caracterizarea resurselor vegetale, subliniind criterii de comestibilitate, potențial bioactiv, sustenabilitate, verificarea cunoștințelor tradiționale, precum și evaluări botanice, chimice și de siguranță.

Integrarea cunoștințelor tradiționale cu instrumentele analitice moderne oferă o oportunitate unică de a descoperi noi compuși bioactivi, protejând în același timp împotriva riscurilor potențiale. Această perspectivă holistică recunoaște plantele nu doar ca materii prime, ci și ca sisteme biologice dinamice ale căror proprietăți sunt influențate de factori genetici, de mediu și culturali.

Criterii de selecție

Primul pas în capitalizarea resurselor vegetale este stabilirea unor criterii riguroase pentru selecția acestora. Acestea includ:

- i) Comestibilitate și utilizare istorică: Plantele consumate tradițional ca alimente sau medicamente dețin un avantaj comparativ în selecție, deoarece siguranța lor este adesea susținută de înregistrări etnobotanice. Utilizarea istorică oferă dovezi preliminare valoroase, dar necesită validare prin metode științifice moderne (Heinrich & Jäger, 2015).
- ii) Potențial bioactiv: Plantele trebuie evaluate pentru prezența metaboliților secundari precum alcaloizi, flavonoide, terpeni, polifenoli și saponine, care contribuie la proprietăți terapeutice sau funcționale. Progresele recente în profilarea metabolomică permit cercetătorilor să prezică bioactivitatea pe baza semnăturilor fitochimice (Dai & Mumper, 2010).



iii) **Sustenabilitate:** Supraproducția populațiilor de plante sălbatice poate amenința biodiversitatea. Prin urmare, plantele trebuie selectate ținând cont de practici de recoltare durabile, fezabilitatea cultivării și statutul de conservare (Schippmann et al., 2002).

iv) **Verificarea cunoștințelor tradiționale:** Afirmările etnofarmacologice trebuie validate prin studii experimentale. Cunoștințele tradiționale oferă ipoteze care pot direcționa cercetarea științifică, dar reproductibilitatea necesită confirmare empirică (Fabricant & Farnsworth, 2001).

Caracterizare botanică și chimică

După selecție, caracterizarea riguroasă asigură identificarea corectă și utilizarea fiabilă a resurselor vegetale.

Identificare morfologică și taxonomică: Clasificarea taxonomică corectă, bazată pe caracteristici macroscopice și microscopice, este fundamentul autenticității. Evaluarea morfologică trebuie să țină cont de variațiile determinate de localizare geografică, stadiu de creștere și condiții de mediu (WHO, 2011).

Profilare chimică: Plantele conțin amestecuri complexe de compuși ale căror concentrații variază în funcție de compoziția solului, climă și condiții de recoltare. Tehnici analitice precum cromatografia (HPLC, GC), spectrometria (MS, NMR) și metabolomica sunt acum centrale în caracterizarea extractelor vegetale (Wolfender et al., 2015). Aceste abordări asigură consistența lot-cu-lot și furnizează amprente moleculare pentru conformitatea reglementară.

Metabolomica în caracterizarea plantelor: Platformele moderne de metabolomică permit detectarea simultană a sute de metaboliți, facilitând diferențierea chemotipurilor și identificarea de noi compuși bioactivi. Acest lucru oferă o înțelegere cuprinzătoare a variabilității fitochimice (Roessner & Dias, 2013).

Evaluarea siguranței

În ciuda percepției generale că produsele naturale sunt inerent sigure, plantele pot conține compuși toxici, alergeni sau factori antinutriționali care necesită evaluare atentă.

Screening toxicologic: Studiile de toxicitate acută, sub-cronică și cronică, atât in vitro, cât și in vivo, sunt esențiale pentru a asigura siguranța umană. O atenție deosebită este necesară pentru alcaloizi, glicozide și alți metaboliți potențial toxici (Ekor, 2014).



Alergenicitate: Anumite plante sau proteine derivate din plante pot declanșa răspunsuri imune. Analizele proteomice avansate, combinate cu teste imunologice, sunt utilizate pentru a evalua potențialul alergen.

Factori antinutriționali: Compuși precum oxalații, fitații și taninurile pot interfera cu absorbția nutrienților. Determinarea cantitativă a acestor substanțe este esențială înainte ca o plantă să poată fi recomandată pentru utilizare pe scară largă (Gupta et al., 2015).

Conformitate reglementară: Ghidurile internaționale (ex.: WHO și EMA) subliniază necesitatea documentației toxicologice și a unei analize risc–beneficiu înainte de aprobarea pe piață a produselor derivate din plante.

Strategii de prioritizare

Având în vedere marea diversitate a speciilor de plante, prioritizarea este esențială pentru direcționarea eforturilor de cercetare și dezvoltare către cei mai promițători candidați.

Conținut bioactiv ridicat: Plantele cu concentrații mari de compuși bioactivi bine caracterizați sunt prioritizate pentru dezvoltare. De exemplu, speciile bogate în polifenoli sunt adesea vizate pentru proprietățile lor antioxidante și antiinflamatorii.

Profil de risc scăzut: Speciile cu un profil de siguranță favorabil și dovezi minime de toxicitate au mai multe șanse de a obține aprobare reglementară și acceptare din partea consumatorilor.

Disponibilitate scalabilă: Se acordă prioritate plantelor care pot fi cultivate la scară mare, în condiții sustenabile, reducând astfel dependența de populațiile sălbatice pe cale de dispariție (Cunningham, 2001).

Integrarea datelor etnobotanice și farmacologice: Combinarea datelor de utilizare tradițională cu validarea farmacologică oferă un cadru rațional pentru prioritizare, ajutând la conectarea patrimoniului cultural cu dovezile științifice (Balick & Cox, 2022).

Selecția și caracterizarea sistematică a resurselor vegetale furnizează baza științifică și reglementară pentru utilizarea lor sigură și eficientă în alimente, suplimente și medicamente. Prin integrarea cunoștințelor etnobotanice, a profilării chimice avansate și a evaluărilor riguroase de siguranță, cercetătorii și actorii din industrie pot prioritiza speciile vegetale cu cel



mai mare potențial pentru beneficii asupra sănătății umane, asigurând în același timp sustenabilitate și siguranță.

Adoptarea unor criterii și metodologii standardizate nu doar îmbunătățește calitatea produselor, dar și consolidează încrederea consumatorilor și conformitatea globală cu reglementările.

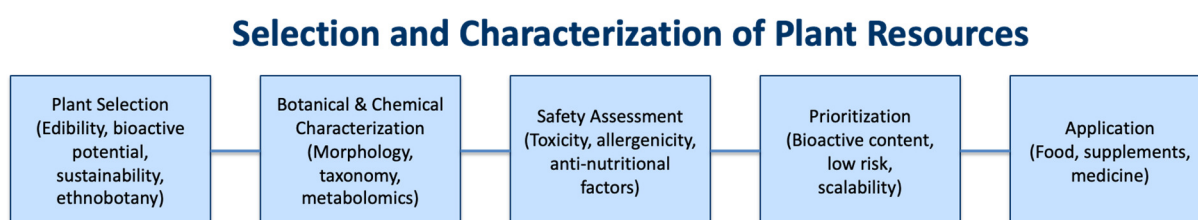


Figura 4.2 Reprezentare schematică a selecției și caracterizării resurselor vegetale

4.3. Extracția și Conservarea Compușilor Bioactivi

Extracția și conservarea compușilor bioactivi din resurse vegetale reprezintă un pas critic în transformarea materialelor botanice brute în produse alimentare sigure și eficiente, suplimente dietetice și preparate medicinale. Moleculele bioactive precum polifenolii, flavonoizii, carotenoizii, vitaminele, uleiurile esențiale și alcaloizii sunt adesea foarte sensibile la condițiile de mediu și de procesare. Prin urmare, metodele utilizate trebuie să fie optimizate nu numai pentru eficiență și randament, ci și pentru protejarea integrității chimice a acestor molecule. Această secțiune examinează abordările moderne de extracție, strategiile de conservare și mecanismele pentru a asigura că bioactivitatea este menținută pe tot parcursul lanțului de producție.

Metode de extracție

Extracția cu solvent

Extracția tradițională cu solvent rămâne una dintre cele mai utilizate metode pentru recuperarea compușilor bioactivi din matricile vegetale. Apa și etanolul sunt considerate în general solvenți siguri și sunt aplicate frecvent în contexte alimentare și farmaceutice. Amestecurile etanol-apă sunt deosebit de eficiente în extracția compușilor fenolici, alcaloizilor și glicozidelor, fiind în același timp mai puțin toxice și acceptabile ecologic comparativ cu solvenții clorurați (Azwanida, 2015). Totuși, dezavantajele includ timpi lungi de extracție,



necesitatea unor volume mari de solvent și selectivitate limitată pentru compușii foarte specifici.

Extracția cu fluide supercritice (SFE)

Extracția cu fluide supercritice, folosind cel mai adesea dioxid de carbon (CO_2), este o tehnică mai ecologică și mai selectivă. CO_2 supercritic prezintă proprietăți unice, acționând atât ca gaz, cât și ca lichid, ceea ce îi permite să pătrundă eficient în țesuturile vegetale în timp ce dizolvă compuși nepolari precum uleiuri esențiale, carotenoizi și steroli (Herrero et al., 2010). Avantajele sale includ absența reziduurilor toxice, utilizarea redusă de solvent și capacitatea de a regla fin selectivitatea prin ajustarea temperaturii și presiunii. Totuși, necesitatea echipamentelor specializate și costurile ridicate pot limita aplicarea sa în operațiuni de mică scară.

Extracția enzimatică

Metodele enzimatică se bazează pe enzime hidrolitice specifice (de exemplu, celulaze, pectinaze, proteaze) pentru a degrada pereții celulari vegetali, eliberând astfel compuși bioactivi încorporați. Această tehnică este deosebit de utilă pentru polizaharide, compuși fenolici și proteine (Puri et al., 2012). Extracția enzimatică este blândă, păstrând compușii termolabili, și îmbunătățește adesea randamentul comparativ cu abordările convenționale. Principalele limitări sunt costul ridicat al enzimelor și necesitatea de a optimiza condițiile pentru fiecare matrice vegetală.

Perspectivă comparativă

Fiecare metodă de extracție prezintă un compromis între randament, selectivitate, sustenabilitate și cost. Extracția cu solvent este ieftină, dar împovărătoare ecologic, în timp ce CO_2 supercritic este sustenabil, dar costisitor. Abordările enzimatică reprezintă un compromis, oferind selectivitate ridicată și păstrarea activității, dar necesitând investiții în biocatalizatori. Din ce în ce mai mult, tehnici hibride, precum extracția asistată de ultrasunete sau extracția asistată de microunde, sunt adoptate pentru a crește eficiența reducând în același timp utilizarea de solvent și durata (Chemat et al., 2017).

Strategii de conservare

După extracție, compușii bioactivi trebuie conservați într-o formă care îi protejează de degradare în timpul procesării, depozitării și consumului final. Conservarea este deosebit de



critică pentru polifenoli, vitamine și uleiuri volatile care sunt predispuse la oxidare, hidroliză sau volatilizare.

Tehnici de uscare

Uscarea reduce activitatea apei, stabilizând astfel extractele și prevenind creșterea microbiană. Uscarea convențională cu aer cald este rentabilă, dar conduce adesea la degradare termică semnificativă a compușilor sensibili la căldură. Liofilizarea (uscare prin congelare) este considerată superioară pentru păstrarea moleculelor termolabile precum vitamina C și flavonoizii, deoarece elimină apa la temperatură și presiune scăzută, minimizând astfel schimbările chimice (Ratti, 2001). Totuși, liofilizarea este intensivă energetic și costisitoare, limitând scalabilitatea sa industrială.

Încapsulare

Tehnologiile de încapsulare precum uscarea prin pulverizare, încapsularea liposomală sau încapsularea în nanoparticule sunt din ce în ce mai utilizate pentru a proteja compușii bioactivi de oxidare, lumină sau fluctuații de pH. Încapsularea îmbunătățește de asemenea solubilitatea și biodisponibilitatea compușilor precum polifenolii și carotenoizii (Gharsallaoui et al., 2007). Această tehnică permite eliberare controlată și livrare țintită în alimente funcționale sau nutraceutice, deși complexitatea formulării și etapele suplimentare de procesare pot crește costurile de producție.

Condiții controlate de depozitare

Condițiile adecvate de depozitare, incluzând reducerea expunerii la oxigen, protecția împotriva luminii și controlul temperaturii, sunt esențiale pentru a conserva compușii bioactivi. De exemplu, compușii polifenolici sunt susceptibili la oxidare atunci când sunt expuși la aer, în timp ce carotenoizii se degradează sub expunere la lumină. Utilizarea gazelor inerte de ambalare (de exemplu, spălare cu azot), a recipientelor opace și a refrigerării poate prelungi semnificativ durata de viață pe raft (Shahidi & Ambigaipalan, 2015)..

Menținerea bioactivității

Conservarea bioactivității se referă la menținerea integrității structurale și a capacității funcționale a compușilor sensibili pe parcursul procesării. Multe molecule derivate din plante, precum vitaminele, flavonoizii și uleiurile esențiale, sunt instabile la temperaturi ridicate, expunere la oxigen sau stres mecanic.

Protecția polifenolilor și vitaminelor



Polifenolii, deși abundenți în multe plante, sunt sensibili la oxidare, în special în condiții alcaline. Similar, vitamine precum vitamina C și vitamina E se degradează rapid ca răspuns la căldură și oxigen. Metodele avansate de conservare, incluzând încapsularea în biopolimeri sau emulsii, pot atenua aceste pierderi și asigura o biodisponibilitate mai ridicată (Biesalski et al., 2009).

Conservarea uleiurilor volatile

Uleiurile esențiale și alți compuși volatili sunt predispuși la evaporare și oxidare în timpul depozitării. Microîncapsularea și utilizarea recipientelor întunecate, ermetice, sunt strategii eficiente pentru a minimiza aceste pierderi. În plus, combinarea extracției cu metode de conservare — precum liofilizarea imediată după extracția cu solvent sau enzimatică — poate reduce substanțial degradarea (Burt, 2004).

Integrarea extracției și conservării

Abordările industriale moderne pun accentul pe integrarea strategiilor de extracție și conservare într-un flux de lucru continuu. De exemplu, extracția cu CO₂ supercritic poate fi cuplată direct cu încapsularea, reducând astfel expunerea compușilor la aer și lumină în timpul procesării. Astfel de sisteme integrative nu doar îmbunătățesc eficiența generală a recuperării bioactive, dar și minimizează riscul de degradare a compușilor înainte de formularea finală a produsului.

Extracția și conservarea compușilor bioactivi sunt centrale pentru dezvoltarea unor produse sigure, eficiente și sustenabile pe bază de plante pentru aplicații alimentare, farmaceutice și nutraceutice. Alegerea metodei de extracție și a strategiei de conservare afectează direct randamentul, selectivitatea și stabilitatea compușilor. Deși extracția tradițională cu solvent rămâne predominantă, tehnologiile emergente precum extracția cu fluide supercritice, metodele enzimatice și încapsularea modelează viitorul procesării produselor naturale. Pentru a asigura bioactivitatea maximă, sistemele integrate care combină extracția eficientă cu conservarea robustă devin din ce în ce mai necesare. Echilibrarea eficienței, impactului asupra mediului și costului va rămâne principiul călăuzitor în avansarea acestui domeniu.



Extraction and Preservation of Bioactive Compounds



Figura 4.3 Reprezentare schematică a extracției sau conservării compușilor bioactivi

4.4 Procesarea pentru Consum Sigur

Asigurarea faptului că resursele derivate din plante sunt sigure și eficiente pentru consumul uman necesită o abordare multidisciplinară care integrează știința alimentară, farmacognozia și toxicologia. Procesarea nu înseamnă doar transformarea materialului vegetal brut în forme utilizabile, ci și eliminarea sau reducerea sistematică a componentelor toxice, alergene sau altfel nedorite, păstrând în același timp compușii bioactivi care conferă beneficii pentru sănătate. Utilizarea sigură a produselor vegetale depinde, prin urmare, de metode robuste de detoxifiere, strategii de formulare care îmbunătățesc livrarea și eficacitatea, și cadre riguroase de asigurare a calității care garantează uniformitatea și reproductibilitatea pe parcursul ciclurilor de producție.

Metode de detoxifiere

Multe specii de plante acumulează în mod natural factori anti-nutriționali, metaboliți toxici sau contaminanți de mediu precum reziduuri de pesticide și metale grele. În consecință, metodele de detoxifiere sunt o condiție prealabilă esențială pentru consumul sigur.

Procesarea termică este una dintre cele mai vechi și mai larg aplicate tehnici. Încălzirea controlată poate denatura proteine toxice (de exemplu, lectine din leguminoase), inactiva contaminanții microbieni și reduce activitatea enzimatică care altfel ar putea duce la degradarea bioactivelor (Martínez et al., 2020). Totuși, expunerea termică excesivă riscă degradarea compușilor termolabili precum vitamina C, carotenoizii și polifenolii, necesitând optimizarea combinațiilor temperatură–timp.

Detoxifierea chimică implică aplicarea de agenți siguri (soluții alcaline, cărbune activ sau acizi organici) pentru a reduce alcaloizii toxici, glicozidele cianogenice și reziduurile de pesticide (Awuchi et al., 2020). Deși eficiente, metodele chimice necesită reglementare atentă pentru a



evita introducerea de noi contaminanți sau modificarea calității senzoriale și nutriționale a produsului.

Fermentația oferă o abordare biologic sustenabilă pentru detoxifiere. Prin activitatea microbilor benefici, fermentația poate reduce factorii anti-nutriționali precum fitatele și oxalații, îmbogățind în același timp matricea cu probiotice și metaboliți care îmbunătățesc digestibilitatea (Tamang et al., 2020). Alimentele tradiționale fermentate ilustrează avantajul dublu al detoxifierii și al îmbogățirii funcționale, o caracteristică utilizată din ce în ce mai mult în dezvoltarea produselor nutraceutice.

Strategii de formulare

Dincolo de detoxifiere, procesarea implică de asemenea proiectarea de formulări care maximizează eficacitatea, stabilitatea și acceptarea de către consumatori. Integrarea extractelor vegetale în alimente funcționale, suplimente dietetice și băuturi necesită o selecție atentă a excipienților și purtătorilor pentru a menține bioactivitatea asigurând în același timp palatabilitatea și complianța.

Micronizarea este adesea aplicată pentru a crește suprafața pudrelor bioactive, îmbunătățind astfel solubilitatea și vitezele de dizolvare în fluidele gastrointestinale (Liu et al., 2019). Aceasta este deosebit de valoroasă pentru fitochimicale slab solubile în apă precum curcumina și resveratrolul.

Tehnologiile de încapsulare (de exemplu, liposomi, nanoemulsii, complexe de ciclodextrine și nanoparticule polimerice) sunt larg adoptate pentru a proteja compușii sensibili de oxidare, extreme de pH și degradare enzimatică în timpul depozitării și digestiei (Ganesan et al., 2018). Încapsularea permite de asemenea eliberare controlată și livrare țintită a bioactivelor în segmente specifice ale tractului gastrointestinal, îmbunătățind atât biodisponibilitatea cât și eficacitatea terapeutică.

În plus, strategiile de formulare trebuie să se adapteze nevoilor specifice ale consumatorilor, incluzând formulări bazate pe gen, suplimente pediatrice și geriatrice, și intervenții specifice pentru afecțiuni precum produse pentru sănătate cardiovasculară sau cognitivă (Shahidi & Ambigaipalan, 2015).



Îmbunătățirea biodisponibilității

Una dintre provocările persistente în nutraceuticele pe bază de plante este biodisponibilitatea scăzută a multor fitochimicale, în special polifenoli, flavonoizi și terpenoizi. Diverse tehnici de procesare sunt prin urmare utilizate pentru a spori absorbția și circulația sistemică.

- Pretratarea enzimatică poate hidroliza legăturile glicozidice din flavonoizi, eliberând forme agliconice mai absorbabile (Scalbert et al., 2011).
- Sistemele de livrare nanostructurate îmbunătățesc solubilitatea și protejează compușii de degradarea prematură.
- Formulările sinergice — precum combinarea piperinei cu curcumina — pot inhiba enzimele metabolice și astfel pot spori concentrația plasmatică a compușilor bioactivi (Shoba et al., 1998).

Aceste abordări ilustrează importanța de a privi procesarea nu doar ca o măsură de conservare, ci ca un facilitator al eficienței terapeutice.

Asigurarea calității

Asigurarea calității (QA) susține credibilitatea și siguranța produselor pe bază de plante. Uniformitatea, stabilitatea și reproductibilitatea sunt trăsăturile distinctive ale unei formulări de încredere.

- Uniformitatea asigură distribuția constantă a compușilor bioactivi între loturi, reducând variabilitatea în dozare și eficacitate.
- Testarea stabilității este critică pentru a evalua degradarea fitochimicalelor în timp, în condiții variate de depozitare (lumină, temperatură, umiditate) și pentru a stabili declarații fiabile privind durata de valabilitate (EMA, 2016).
- Reproducibilitatea asigură faptul că rezultatele observate în producția la scară de laborator sunt menținute în procesarea la scară industrială, o provocare frecventă dată fiind complexitatea matricelor vegetale și variabilitatea sezonieră.

Cadrul modern de QA încorporează amprentarea cromatografică, analize spectroscopice și bioanalize pentru a valida identitatea, puritatea și potența produselor pe bază de plante. În



plus, respectarea Bunelor Practici de Fabricație (GMP) și a standardelor farmaceutice internaționale asigură conformitatea reglementară și siguranța consumatorilor.

Procesarea pentru consum sigur reprezintă o etapă pivotală în lanțul valoric al resurselor pe bază de plante, făcând legătura între materialul botanic brut și produsele gata de consum. Prin integrarea metodelor de detoxifiere, strategiilor avansate de formulare, îmbunătățirii biodisponibilității și practicilor solide de asigurare a calității, cercetătorii și producătorii pot proteja atât eficacitatea, cât și siguranța. Procedând astfel, ei abordează nu doar obiectivele nutriționale și terapeutice imediate, ci și imperativele mai ample ale încrederii consumatorilor și conformității reglementare.

4.5 Abordări Analitice pentru Siguranță și Eficacitate

Evaluarea siguranței și eficacității resurselor pe bază de plante, fie consumate ca alimente, suplimente sau preparate terapeutice, depinde critic de metodologii analitice robuste. Aceste abordări servesc două scopuri primare: primul, de a asigura că contaminanți precum metale grele, reziduuri de pesticide și micotoxine sunt fie absenți, fie în limite sigure; al doilea, de a cuantifica compușii bioactivi care contribuie la proprietățile nutriționale sau farmacologice ale produsului. Dincolo de testarea de laborator, rezultatele analitice trebuie de asemenea să se alinieze cu cadrele reglementare internaționale, care stabilesc praguri de siguranță, definesc cerințe de etichetare și standardizează parametrii de calitate pentru protecția consumatorului.

Detectarea contaminanților

Metale grele

Contaminarea cu metale grele este o preocupare semnificativă datorită persistenței și potențialului bioacumulativ. Metale precum plumbul (Pb), cadmiul (Cd), mercurul (Hg) și arsenul (As) sunt toxice chiar și la concentrații scăzute și pot compromite sănătatea umană prin expunere cronică (Jaishankar et al., 2014). Prezența lor în produsele pe bază de plante poate rezulta din poluarea mediului, calitatea apei de irigație sau contaminarea în timpul procesării.

Metodele analitice utilizate în mod obișnuit pentru detecție includ Spectroscopia de Absorbție Atomică (AAS), Spectrometria de Masă cu Plasma Cuplată Inductiv (ICP-MS) și Spectroscopia de Emisie Optică cu Plasma Cuplată Inductiv (ICP-OES). ICP-MS este adesea considerat



standardul de aur datorită sensibilității ridicate și capacității de detecție multi-element, permițând cuantificarea până la niveluri de părți pe miliard (ppb) (Sarmanová et al., 2016).

Pesticide

Resursele vegetale cultivate în sisteme agricole intensive sunt predispuse la reziduuri de pesticide. Evaluarea siguranței acestor reziduuri necesită conformitatea cu limitele maxime de reziduuri (MRLs) stabilite de agenții de reglementare precum Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară (EFSA) și Administrația pentru Alimente și Medicamente din SUA (FDA). Cromatografia de Gaz–Spectrometria de Masă (GC-MS) și Cromatografia Lichidă–Spectrometria de Masă (LC-MS) sunt utilizate pe scară largă pentru analiza multi-reziduu, permițând detecția simultană a sute de molecule de pesticide la niveluri de urme (Fernandes et al., 2020).

Micotoxine

Micotoxinele, produse de ciuperci precum *Aspergillus* și *Fusarium*, se numără printre cei mai periculoși contaminanți din alimentele și suplimentele pe bază de plante. Aflatoxinele, ocratoxina A și fumonisinele sunt deosebit de îngrijorătoare datorită proprietăților lor cancerigene, hepatotoxice și nefrotoxice (Eskola et al., 2020). Detecția se bazează pe Cromatografia Lichidă de Înaltă Performanță (HPLC) cu detecție fluorescentă sau spectrometrică de masă, adesea cuplată cu etape de curățare prin imunocaptură. Metodele rapide de screening precum kiturile bazate pe ELISA sunt de asemenea utilizate pentru monitorizare de rutină, deși necesită metode cromatografice confirmatorii pentru scopuri reglementare.

Cuantificarea compușilor bioactivi

Siguranța produselor vegetale nu poate fi separată de eficacitate, care depinde de prezența și concentrația constituenților bioactivi. Cuantificarea este prin urmare esențială pentru a asigura consistența produsului, potențialul terapeutic și etichetarea corectă.

Tehnici cromatografice

Cromatografia Lichidă de Înaltă Performanță (HPLC) rămâne piatra de temelie a analizei fitochimice datorită capacității sale de a separa, identifica și cuantifica o gamă largă de compuși, de la polifenoli la alcaloizi. Atunci când este cuplată cu Detecție cu Diode Array (DAD) sau Spectrometrie de Masă (LC-MS), HPLC oferă amprente moleculare extrem de specifice ale extractelor vegetale complexe (Cuyckens & Claeys, 2004).



Cromatografia de Gaz (GC) este deosebit de potrivită pentru compuși volatili precum uleiurile esențiale și terpenele, adesea cuplată cu detecție prin ionizare în flacără (FID) sau MS.

Teste spectrofotometrice

Deși mai puțin specifice decât metodele cromatografice, testele spectrofotometrice rămân valoroase pentru controlul de calitate de rutină. Exemple includ testul Folin–Ciocalteu pentru conținutul total de fenoli, metoda clorurii de aluminiu pentru flavonoizi și testele DPPH sau ABTS pentru capacitatea antioxidantă (Singleton et al., 1999). Aceste teste oferă estimări rapide și rentabile ale bioactivității, deși necesită adesea validare împotriva unor tehnici mai specifice.

Metabolomică

Progresele recente în metabolomică folosind spectroscopia de Rezonanță Magnetică Nucleară (NMR) și LC-MS de înaltă rezoluție permit profilarea holistică a metabolomelor vegetale. Astfel de abordări nu doar cuantifică bioactivele cunoscute, dar și dezvăluie compuși noi, facilitând descoperirea de ingrediente funcționale noi (Patti et al., 2012).

Conformitate reglementară

Metodele analitice trebuie în cele din urmă să se alinieze cu cadrele reglementare care guvernează suplimentele alimentare, medicamentele pe bază de plante și alimentele funcționale.

Standarde de siguranță alimentară

Organizații precum EFSA, FDA și Comisia Codex Alimentarius stabilesc praguri stricte de siguranță pentru contaminanți, incluzând aporturile zilnice admisibile (PDIs) pentru metale grele, MRLs pentru pesticide și niveluri maxime tolerate pentru micotoxine. Produsele care depășesc aceste limite sunt considerate nesigure și nu pot intra pe piață.

Reglementări pentru suplimente

Suplimentele alimentare trebuie să respecte reglementări suplimentare care abordează compoziția, formele de dozare și etichetarea. Uniunea Europeană, de exemplu, solicită specificații detaliate ale vitaminelor, mineralelor și extractelor botanice utilizate în suplimente (Directiva 2002/46/CE). Similar, în Statele Unite, Dietary Supplement Health and Education



Act (DSHEA, 1994) guvernează cerințele de etichetare, subliniind că suplimentele nu pot pretinde că diagnostichează, tratează sau vindecă boli fără aprobarea FDA.

Etichetare și transparență pentru consumatori

Etichetarea precisă, bazată pe date analitice validate, este crucială pentru siguranța și încrederea consumatorilor. Etichetele trebuie să specifice identitatea, concentrația și doza recomandată a ingredientelor active, dezvăluind în același timp alergeni, excipienți și potențiali contaminanți. Etichetarea incorectă sau adulterarea nu doar încalcă standardele reglementare, dar poate reprezenta și riscuri majore pentru sănătate, subliniind importanța verificării analitice (Gafner & Bergeron, 2005).

Abordările analitice servesc drept coloană vertebrală a eforturilor de a asigura siguranța și eficacitatea resurselor derivate din plante. De la detecția sensibilă a contaminanților precum metale grele, pesticide și micotoxine până la cuantificarea precisă a compușilor bioactivi, aceste metode asigură atât protecția consumatorilor, cât și fiabilitatea terapeutică. Mai mult, prin respectarea cadrelor reglementare riguroase și a practicilor transparente de etichetare, producătorii pot asigura că produsele lor îndeplinesc standardele internaționale, reduc riscurile de contaminare și adulterare și favorizează încrederea consumatorilor pe piețele globale de nutraceutice și produse pe bază de plante.

Analytical Approaches for Safety and Efficacy

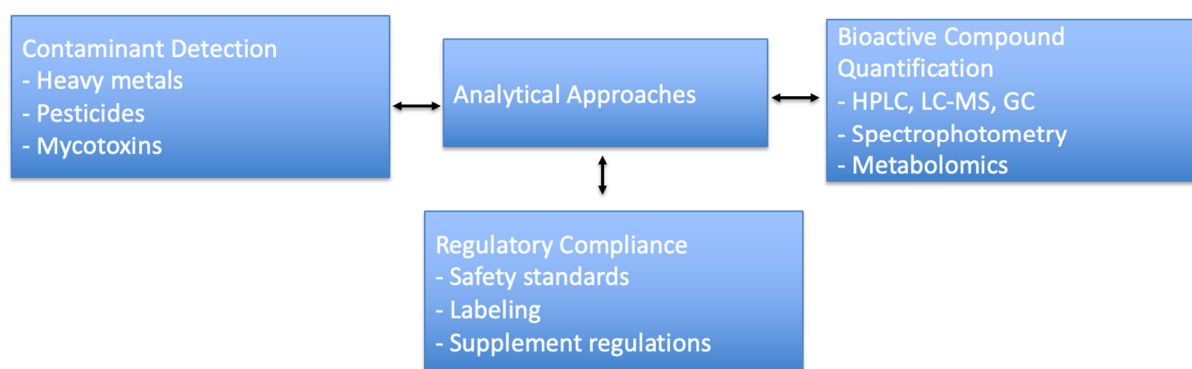


Figura 4.4 Reprezentare schematică a abordărilor analitice pentru siguranță și eficacitate



4.6 Abordări Sustenabile și Inovative

Creșterea rapidă a cererii pentru produse derivate din plante — variind de la alimente și suplimente dietetice până la produse farmaceutice și cosmetice — a intensificat necesitatea practicilor sustenabile și inovatoare în dezvoltarea și utilizarea acestora. Abordările tradiționale de aprovizionare și procesare a resurselor vegetale sunt din ce în ce mai recunoscute ca fiind insuficiente pentru a asigura echilibrul ecologic pe termen lung, siguranța consumatorilor și utilizarea eficientă a materialelor naturale. În același timp, noile tehnologii remodelează modul în care compușii bioactivi sunt extrași, conservați și livrați, asigurând o eficacitate mai mare cu costuri de mediu reduse. Acest capitol explorează abordările sustenabile și inovatoare în valorificarea resurselor vegetale, urmate de un rezumat al celor mai importante lecții.

Sustenabilitatea în utilizarea resurselor vegetale

Aprovizionarea responsabilă începe cu selectarea speciilor de plante pe baza amprentei lor ecologice și a disponibilității. Recoltarea excesivă a plantelor medicinale sălbatice poate duce la pierderea biodiversității și la periclitarea speciilor, așa cum se observă în declinul anumitor plante botanice cu cerere ridicată, precum *Panax ginseng* și *Echinacea purpurea* (Hamilton, 2004). Cultivarea plantelor medicinale și nutraceutice în conformitate cu bune practici agricole și de recoltare (GACP) este prin urmare esențială. Standardele stabilite de Organizația Mondială a Sănătății subliniază transparența în aprovizionare și trasabilitatea pe tot parcursul lanțului de aprovizionare (WHO, 2018).

Minimizarea deșeurilor. Industria procesării plantelor generează cantități substanțiale de produse secundare, precum coji, coajă, tulpini și biomasă epuizată. Acestea sunt adesea aruncate, deși conțin compuși bioactivi valoroși precum polifenoli, fibre și uleiuri esențiale (Ayala-Zavala et al., 2011). Strategiile de valorizare includ recuperarea metaboliților secundari din aceste reziduuri, ceea ce susține un model de economie circulară și reduce impactul asupra mediului.

Abordări de economie circulară. Aplicarea principiilor economiei circulare în industriile pe bază de plante încurajează reintegrarea deșeurilor în ciclurile de producție. De exemplu, tescovina de struguri din vinificație poate fi reprocesată pentru polifenoli antioxidanți, în timp ce deșeurile de coajă de citrice pot fi exploatate pentru recuperarea de pectină și flavonoizi (Reis et al., 2017). Astfel de abordări contribuie la modele de afaceri sustenabile, reduc dependența de aditivi sintetici și maximizează valoarea completă a resurselor vegetale.



Inovația în dezvoltarea produselor pe bază de plante

Nanotehnologie și sisteme avansate de livrare. Una dintre cele mai semnificative provocări în utilizarea bioactivelor din plante este biodisponibilitatea lor scăzută, în special a polifenolilor, carotenoizilor și flavonoizilor. Sistemele de livrare pe bază de nanoparticule, precum liposomi, nanoemulsii și nanoparticule polimerice, pot îmbunătăți solubilitatea, proteja bioactivele de degradare și spori eliberarea controlată (Wong et al., 2019). Astfel de inovații extind potențialul clinic al produselor naturale.

Formulare asistată de inteligență artificială și perspective bazate pe date. Inteligența artificială (IA) și învățarea automată sunt aplicate din ce în ce mai mult pentru a prezice interacțiunile metabolitelor vegetale, a optimiza formulările și a analiza profilurile de siguranță. Prin integrarea cunoștințelor etnofarmacologice cu modelele computaționale, IA poate accelera identificarea plantelor candidate promițătoare și poate ghida strategiile de formulare cu o precizie mai mare (Jiang et al., 2020).

Tehnologii verzi de extracție. Metodele tradiționale de extracție se bazează adesea pe volume mari de solvenți organici, timpi lungi de procesare și consum ridicat de energie. Tehnologiile inovatoare de extracție verde, incluzând extracția cu CO₂ supercritic, extracția asistată de microunde și extracția cu lichide presurizate, oferă o selectivitate mai mare, timpi mai scurți de procesare și un impact redus asupra mediului (Chemat et al., 2019). Aceste tehnologii nu doar îmbunătățesc eficiența, ci se aliniază și cu sustenabilitatea și cererea consumatorilor pentru produse ecologice.

Rezumat și concluzii esențiale

Perspective cheie

- Sustenabilitatea este nenegociabilă: aprovizionarea responsabilă, valorizarea deșeurilor și modelele de economie circulară sunt vitale pentru a echilibra protecția ecologică cu cererea în creștere pentru produse pe bază de plante.
- Inovația impulsionează eficiența: nanotehnologia, formularea bazată pe IA și metodele verzi de extracție sporesc stabilitatea bioactivelor, biodisponibilitatea și eficacitatea generală.



- Integrarea sustenabilității și inovației: strategiile viitoare ar trebui să combine practicile ecologice cu tehnologiile avansate pentru a asigura atât siguranța, cât și încrederea consumatorilor.
- Cadrul reglementar: ghidurile internaționale (de exemplu, WHO, EFSA, FDA) joacă un rol critic în modelarea practicilor sustenabile și asigurarea standardizării.

De ce contează aceste abordări

Metodele sustenabile și inovatoare asigură că resursele vegetale rămân disponibile pentru generațiile viitoare, oferind în același timp produse sigure, eficiente și de înaltă calitate consumatorilor de astăzi. Sinergia dintre sustenabilitate și inovația tehnologică reprezintă calea de urmat pentru fitomedicina modernă, nutraceutice și alimente funcționale.

4.7 Referințe

Ayala-Zavala, J. F., Rosas-Domínguez, C., Vega-Vega, V., & González-Aguilar, G. A. (2011).

Agro-industrial potential of by-products from fruit and vegetable processing. *Food Research International*, 44(7), 1866–1874.

Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 4(3), 196.

Awuchi, C. G., Igwe, V. S., & Amagwula, I. O. (2020). Nutritional value, phytochemistry, and toxicity of some leafy vegetables consumed in Africa. *Journal of Food Quality*, 2020, 1–15.

Balick, M. J., & Cox, P. A. (2022). *Plants, People, and Culture: The Science of Ethnobotany*. CRC Press.

Biesalski, H. K., Dragsted, L. O., Elmadfa, I., et al. (2009). Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*, 25(11–12), 1202–1205.

Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.

Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2017). Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615–8627.



Chemat, F., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Strube, J., Uhlenbrock, L., Gunjevic, V., & Cravotto, G. (2019). Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2005.

Cunningham, A. B. (2001). *Applied Ethnobotany: People, Wild Plant Use and Conservation*. Earthscan.

Cuyckens, F., & Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(1), 1–15.

Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313–7352.

Directive 2002/46/EC of the European Parliament and of the Council on food supplements. (2002). *Official Journal of the European Communities*.

Ekor, M. (2014). The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in Pharmacology*, 4, 177.

Eskola, M., Kos, G., Elliott, C. T., Hajšlová, J., Mayar, S., & Krska, R. (2020). Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate'. *World Mycotoxin Journal*, 13(2), 139–151.

Fabricant, D. S., & Farnsworth, N. R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, 109(Suppl 1), 69–75.

Fernandes, V. C., Lehotay, S. J., Mol, H. G., van der Kamp, H., & Stolker, A. A. (2020). Development of a multi-residue method for pesticide analysis in plants. *Food Chemistry*, 310, 125–164.

Gafner, S., & Bergeron, C. (2005). The challenges of chemical analysis of botanicals and dietary supplements. *HerbalGram*, 67, 46–57.

Ganesan, K., Xu, B., & Karthivashan, G. (2018). Bioactive encapsulation and controlled release: Trends and challenges. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(2), 170–193.

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107–1121.

Gupta, R. K., Gangoliya, S. S., & Singh, N. K. (2015). Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains. *Journal of Food Science and Technology*, 52(2), 676–684.

Hamilton, A. C. (2004). Medicinal plants, conservation and livelihoods. *Biodiversity & Conservation*, 13(8), 1477–1517.

Heinrich, M., & Jäger, A. K. (2015). *Ethnopharmacology*. John Wiley & Sons.

Herrero, M., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2010). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. *Food Chemistry*, 98(1), 136–148.



- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., & Beeregowda, K. N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*, 7(2), 60–72.
- Jiang, J., Zhao, Y., He, S., & Liu, Y. (2020). Artificial intelligence in natural products research: Trends and perspectives. *Phytomedicine*, 79, 153337.
- Lange, B. M., & Ahlemeyer, J. (2019). Plant-based value chains for sustainable bioeconomy development. *Planta Medica*, 85(9–10), 733–746.
- Liu, W., et al. (2019). Micronization and nanonization techniques for enhancing bioavailability of poorly soluble phytochemicals. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 52, 642–651.
- Martínez, R., Torres, P., & Meneses, M. (2020). Impact of thermal processing on plant bioactives. *Food Chemistry*, 307, 125–138.
- Patti, G. J., Yanes, O., & Siuzdak, G. (2012). Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(4), 263–269.
- Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, 30(1), 37–44.
- Ratti, C. (2001). Hot air and freeze-drying of high-value foods: A review. *Journal of Food Engineering*, 49(4), 311–319.
- Reis, S. F., Rai, D. K., & Abu-Ghannam, N. (2017). Valorization of agro-industrial residues for bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 63, 32–42.
- Roessner, U., & Dias, D. A. (2013). Metabolomics tools for natural product discovery. *Metabolites*, 3(2), 255–272.
- Sarmanová, J., et al. (2016). ICP-MS methods for trace elements in food. *Food Additives & Contaminants*, 33(4), 553–564.
- Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2011). Polyphenols: Antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition*, 93(1), 1–5.
- Schippmann, U., Leaman, D. J., & Cunningham, A. B. (2002). Impact of cultivation and gathering of medicinal plants on biodiversity: Global trends and issues. *FAO*.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects. *Journal of Functional Foods*, 18, 820–897.
- Shoba, G., Joy, D., Joseph, T., Majeed, M., Rajendran, R., & Srinivas, P. S. (1998). Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Medica*, 64(4), 353–356.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.



Tamang, J. P., Watanabe, K., & Holzapfel, W. H. (2020). Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, 11, 377.

WHO. (2011). Quality control methods for herbal materials. Geneva: World Health Organization.

WHO. (2018). WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. Geneva: World Health Organization.

Wolfender, J. L., Marti, G., Thomas, A., & Bertrand, S. (2015). Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *Journal of Chromatography A*, 1382, 136–164.

Wong, K. H., Abdul Kadir, H., & Ling, S. K. (2019). Nanotechnology in herbal medicine: Implications for clinical practice. *Phytomedicine*, 54, 1–9.

Zhou, Y., Zhang, Y., & Shi, H. (2019). Advances in safety assessment of plant-based natural products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(18), 2992–3007.



Co-funded by
the European Union



ISBN 978-606-786-499-1

