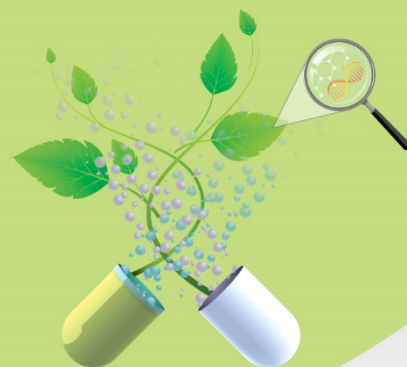




Co-funded by
the European Union



EURO-PLANT-ACT



GHID ACTIVITĂȚI EXPERIMENTALE

Cooperare pentru implementarea metodelor inovatoare de evaluare a plantelor medicinale cu roluri centrale în farmacie, agricultură și nutriție

EURO-PLANT-ACT

Proiect Erasmus+ Parteneriate pentru cooperare
Cod proiect 2022-1-RO01-KA220-HED-000088958

Editori: Dehelean Cristina Adriana, Pinzaru Iulia Andreea



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/editura

Director general: Prof. univ. dr. Sorin Ursoniu

Colecția: Ghiduri și îndrumătoare de laborator

Coordonator colecție: Prof. univ. dr. Adrian Vlad

Referent științific: Prof. univ. dr. Daliborca Vlad

Indicativ CNCSIS: 324

© 2024 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 978-606-786-414-4



Co-funded by
the European Union



GHID ACTIVITĂȚI EXPERIMENTALE

Titlul proiectului: Cooperare pentru Implementarea de Metode Inovative de Evaluare a Plantelor Medicinale cu Rol Central în Farmacie, Agricultură și Nutriție

Acronimul proiectului: EURO-PLANT-ACT

Proiect nr.: 2022-1-RO01-KA220-HED-000088958

Ghidul este adresat specialiștilor din diferite domenii precum agricultură, biotehnologie, industria alimentară, farmacie, nutriție și prezintă metodologiile legate de: (i) selecția, cultivarea, recoltarea și caracterizarea plantelor medicinale organice (ii) evaluarea compoziției chimice și analiza proprietăților farmacologice, (iii) stabilirea profilului de siguranță farmacocinetică și a metodelor de valorificare a plantelor medicinale și (iv) produse derivate din acestea (extracte, uleiuri esențiale).

Profesorii responsabili pentru partea teoretică:

Coordonator proiect (UMFVBT): Dehelean Cristina, Pînzaru Iulia, Macașoi Ioana, Drăghici George

Partener 1 (USVT): Alexa Ersilia, Negrea Monica, Cocan Ileana, Obistioiu Diana, Pop Georgeta

Partener 2 (UNIOS): Vrandencic Karolina, Cosic Jasenka, Balicevik Renata, Ravlic Marija

Partener 3 (UNICAL): Filomena Conforti, Giancarlo Statti

Partener 4 (ROMPAN): Voica Daniela, Avram Dana

Profesori responsabili pentru partea practică:

Coordonator proiect (UMFVBT): Dehelean Cristina, Pînzaru Iulia, Macașoi Ioana, Șoica Codruța

Partener 1 (USVT): Alexa Ersilia, Negrea Monica, Cocan Ileana, Obistioiu Diana, Pop Georgeta

Partener 2 (UNIOS): Vrandencic Karolina, Cosic Jasenka, Balicevik Renata, Ravlic Marija

Partener 3 (UNICAL): Filomena Conforti, Giancarlo Statti,

Partener 4 (ROMPAN): Voica Daniela, Avram Dana



Cuprins

Capitolul 1. Metode de cercetare a activității antifungice a uleiurilor esențiale împotriva fungilor fitopatogenici (P2 - UNIOS).....	6
1.1. Introducere.....	6
1.2. Testul volatil pentru evaluarea influenței uleiurilor esențiale <i>in vitro</i>	7
1.3. Test de contact pentru evaluarea efectului uleiurilor esențiale <i>in vitro</i>	12
Capitolul 2. Efectul erbicid al extractelor de plante și uleiurilor esențiale (P2 - UNIOS).....	15
2.1. Introducere.....	15
2.2. Efectul erbicid al extractelor de plante.....	16
2.3. Efectul erbicid al uleiurilor esențiale	21
Capitolul 3. Utilizarea plantelor medicinale ca ingrediente cu proprietăți îmbunătățite în industria produselor funcționale de panificație și patiserie (P1 - USVT).....	25
3.1. Introducere.....	25
3.2. Plante medicinale folosite pentru a îmbunătăți gustul, culoarea și aroma produselor de panificație.....	26
3.3. Plantele medicinale ca agenți antioxidanți în produsele de panificație.....	28
3.4. Plantele medicinale ca agenți antimicrobieni în produsele de panificație.....	39
3.5. Activitatea plantelor medicinale împotriva bacteriilor patogene predominante în industria alimentară.....	41
Capitolul 4. Tendințele și metodele actuale de evaluare <i>in vitro</i> a activității biologice (CO - UMFVBT)	44
4.1. Introducere.....	44
4.2. Pregătirea unei linii celulare pentru testele <i>in vitro</i> realizate pe celule	48
4.2.1. Reguli generale de siguranță în laboratorul de cultură celulară.....	48
4.2.2. Tabelul cu resurse esențiale pentru procedurile de dezghețare/subcultivare/crioconservare a unei linii celulare.....	49
4.2.3. Etapele protocolului de lucru descrise în detaliu	52
4.3. Teste <i>in vitro</i> pe celule 2D	63
4.3.1. Teste de viabilitate celulară.....	63
4.3.2. Metode de colorare prin imunofluorescență pentru evaluarea morfologiei celulare	71
4.3.3. Metode de evaluare a capacității de migrare a celulelor	78



4.3.4. Teste de biologie moleculară pentru studiul mecanismelor de acțiune	80
4.4. Teste <i>in vitro</i> pe modele celulare 3D (tridimensionale)	83
4.4.1. Determinarea potențialului iritant (testul EpiDerm de iritare a pielii – OECD TG 439).....	84
4.4.2. Determinarea fototoxicității (EpiDerm Phototoxicity Assay – OECD TG 498)	86
Capitolul 5. Utilizarea metodelor <i>in ovo</i> pentru evaluarea activității biologice (CO - UMFVBT)	90
5.1. Introducere.....	90
5.3. Determinarea potențialului iritant.....	94
Capitolul 6. Metode de obținere a preparatelor din plante (Extract și uleiuri esențiale) (P3 - UNICAL).....	97
6.1. Introducere.....	97
6.2. Macerarea.....	98
6.3. Extracția Soxhlet.....	100
6.4. Tehnici inovatoare de extracție	102
6.4.1. Extracție asistată cu ultrasunete	102
6.4.2. Extracția asistată de enzime	105
6.4.3. Extracție asistată cu microunde	105
6.4.4. Extracția fluidelor supercritice	107
6.4.5. Extractorul Naviglio®	107
6.5. Extracția uleiului esențial.....	110



Capitolul 1. Metode de cercetare a activității antifungice a uleiurilor esențiale împotriva fungilor fitopatogenici (P2 - UNIOS)

1.1. Introducere

Uleiurile esențiale (EO) sunt cunoscute drept o abordare biologică de combatere a dăunătorilor. Această metodă implică utilizarea organismelor și a produselor derivate din acestea pentru a gestiona direct sau indirect populațiile de dăunători. În mod similar, extractele de plante au demonstrat proprietăți antifungice împotriva unui spectru larg de ciuperci dăunătoare. Aceste extracte naturale oferă alternative ecologice pentru protejarea culturilor agricole de boli [Wilson et al., 1997].

O abordare alternativă la protecția chimică a plantelor împotriva dăunătorilor implică utilizarea a diverși compuși și extracte din plante, cum ar fi uleiurile esențiale și componentele acestora [Kishore et al., 2007]. Este de remarcat faptul că peste 1.300 de specii de plante au fost identificate pentru capacitatea lor de a sintetiza compuși cu proprietăți antimicrobiene [Wilkins and Board, 1989]. Uleiurile esențiale, în particular, prezintă compoziții complexe, acestea fiind adesea alcătuite din numeroase componente. De obicei, în compoziția uleiului predomină trei componente principale, care reprezintă aproximativ 90% din volumul său total, în timp ce restul constituenților se găsesc în proporții mai mici [Dorman and Deans, 2000]. Se depun eforturi pentru ca uleiurile esențiale și extractele de plante să devină o alternativă pentru controlul agenților patogeni care acționează asupra plantelor, deoarece acestea sunt o sursă de compuși biologic activi, care pot duce la dezvoltarea de noi modalități mai sigure de a proteja plantele de agenții care cauzează boli [Al-Reza et al., 2010; Veloz-Garcia et al., 2010].

EO apar ca amestecuri lichide, volatile, limpezi și colorate ale mai multor compuși aromatici. Sunt obținute din toate părțile plantelor, în principal din ierburi și condimente. Sunt cunoscute aproximativ 3000 de EO, dintre care 300 sunt importante din punct de vedere comercial, utilizate în principal pe piața aromelor și parfumurilor, dar astăzi există numeroase studii privind utilizarea lor în protecția plantelor. Testele *in vitro* indică faptul că sunt foarte eficiente împotriva fungilor fitopatogeni.

Pentru determinarea activității antifungice se folosesc diferite teste, dintre care se disting testul volatil și testul de contact. Uleiurile sunt folosite în diferite concentrații în cadrul acestor teste.



1.2. Testul volatil pentru evaluarea influenței uleiurilor esențiale *in vitro*

Protocolul experimental se desfășoară conform metodei disc-difuzimetrică descrisă de Edris și Farrag (2003) și Silva și colab. (2019):

Etapele protocolului de lucru

- 1) În mijlocul plăcilor Petri ($V = 65 \text{ mL}$) conținând 15 mL de mediu PDA (agar dextroză din cartofi), o secțiune circulară de miceliu (4 mm) (Figura 1.1) crescută pe PDA (vârsta miceliului - 7 zile) se pune cu un ac steril

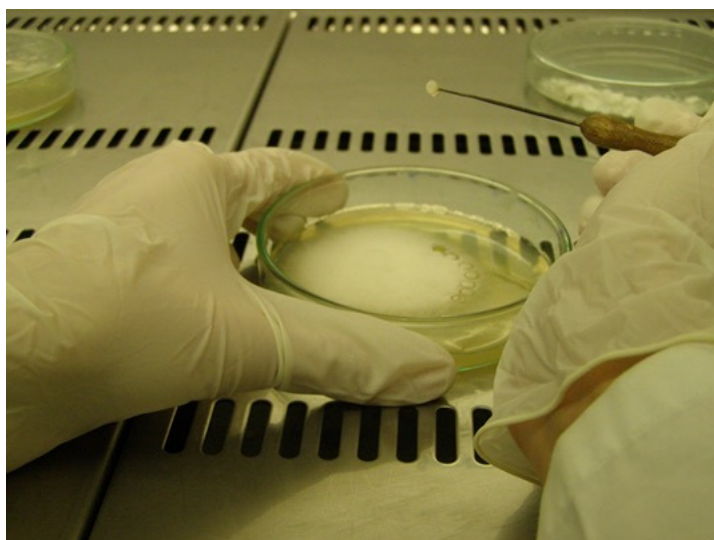


Figura 1.1. Secțiune circulară a miceliului.

- 2) În capacul vasului Petri se pune o hârtie de filtru sterilă cu diametrul de 7 mm și se adaugă uleiul esențial (Figura 1.2) pentru a obține fracția volumică de ulei în aer prevăzută experimental

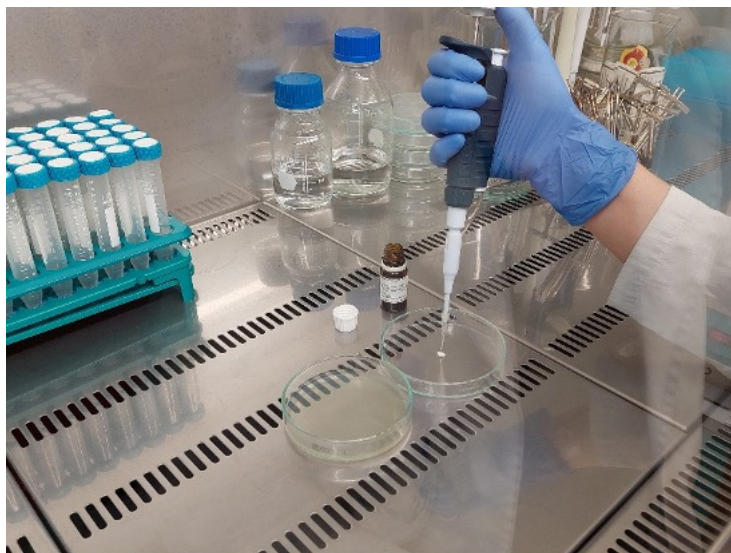


Figura 1.2. Aplicarea uleiului esențial.

- 3) plăcile Petri pregătite astfel se închid cu parafilm și se depozitează într-o cameră climatică termostată la o temperatură de 18-25°C (de obicei, temperatura depinde de tipul de agent patogen fungic) și un regim de 12 ore lumină / 12 ore întuneric (Figura 1.3)



Figura 1.3. Vase Petri depozitate într-o cameră climatică termostată.



- 4) creșterea miceliului este măsurată după 48, 72 și 168 de ore (de obicei, depinde de specia fungică) (Figurile 1.4 și 1.5). Drept control se folosește o hârtie de filtru înmuiată într-o cantitate adecvată de apă distilată sterilă. După ultima măsurare a diametrului miceliului în experimentul cu ciuperci care produc scleroți, de ex. *Sclerotinia sclerotiorum*, se numără scleroții, se determină masa lor medie, iar după 4 luni de păstrare la temperatura de 4°C se determină germinarea acestora

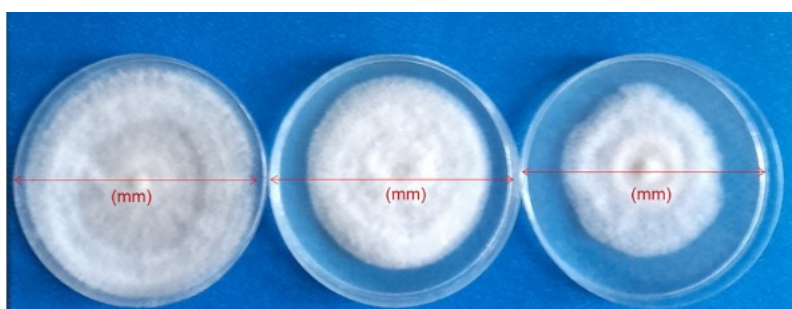


Figura 1.4. Creșterea miceliului este măsurată după 48, 72 și 168 de ore.



Figura 1.5. Efectul diferitelor uleiuri esențiale asupra creșterii miceliului ciupercii *Neofusicoccum parvum*.

- 5) în experimentul cu ciuperca care a produs conidii, după ultima măsurare a diametrului miceliului, sporularea poate fi determinată prin prepararea unei suspensii de conidii în 100 mL apă distilată sterilă și folosind un hemocitometru pentru determinarea concentrației de conidii per mL de suspensie pentru toate variantele experimentului (Figura 1.6)

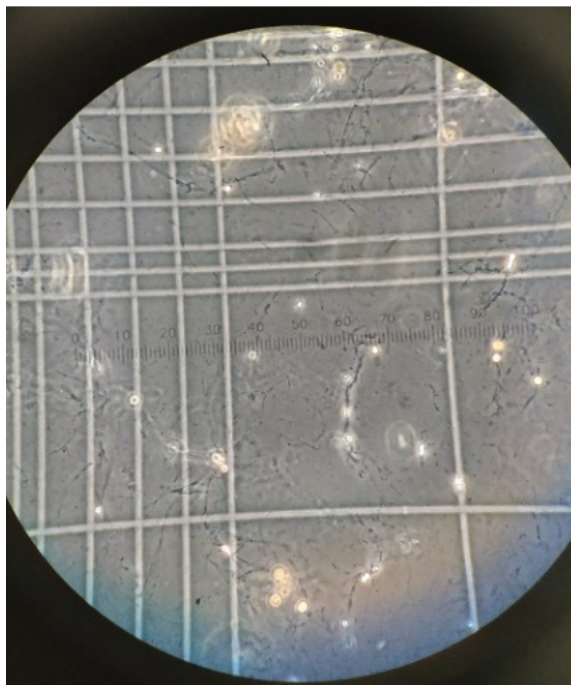


Figura 1.6. Numărarea sporilor folosind un hemocitometru.

- 6) pentru a determina germinarea conidiilor din suspensia preparată pentru fiecare variantă a experimentului, se prelevează 20 μL și se împrăștie pe substratul PDA turnat în prealabil în plăci Petri cu diametrul de 60 mm. Plăcile Petri sunt plasate într-o cameră climatică termostată la o temperatură de 18-25°C și un regim de 12 ore lumină / 12 ore întuneric. După 24 de ore se determină numărul de conidii germinate pe o probă de 3 x 20 conidii. Conidiile sunt considerate germinate dacă tubul germinativ este egal sau mai mare decât lungimea conidiilor (Figura 1.7)



Co-funded by
the European Union



Figura 1.7. Germinarea conidiilor.

7) pentru ciupercile care formează microsclerocie (de exemplu *Sclerotium cepivora* și *Macrophomina phaseolina*), după ultima măsurare a creșterii miceliului, se poate lua o secțiune circulară cu diametrul de 4 mm și se pot număra microscleroții. Secțiunea circulară luată pentru determinarea numărului de microscleroții trebuie luată la o distanță de 10 mm de marginea discului plasat în mijlocul plăcii Petri (Figura 1.8)

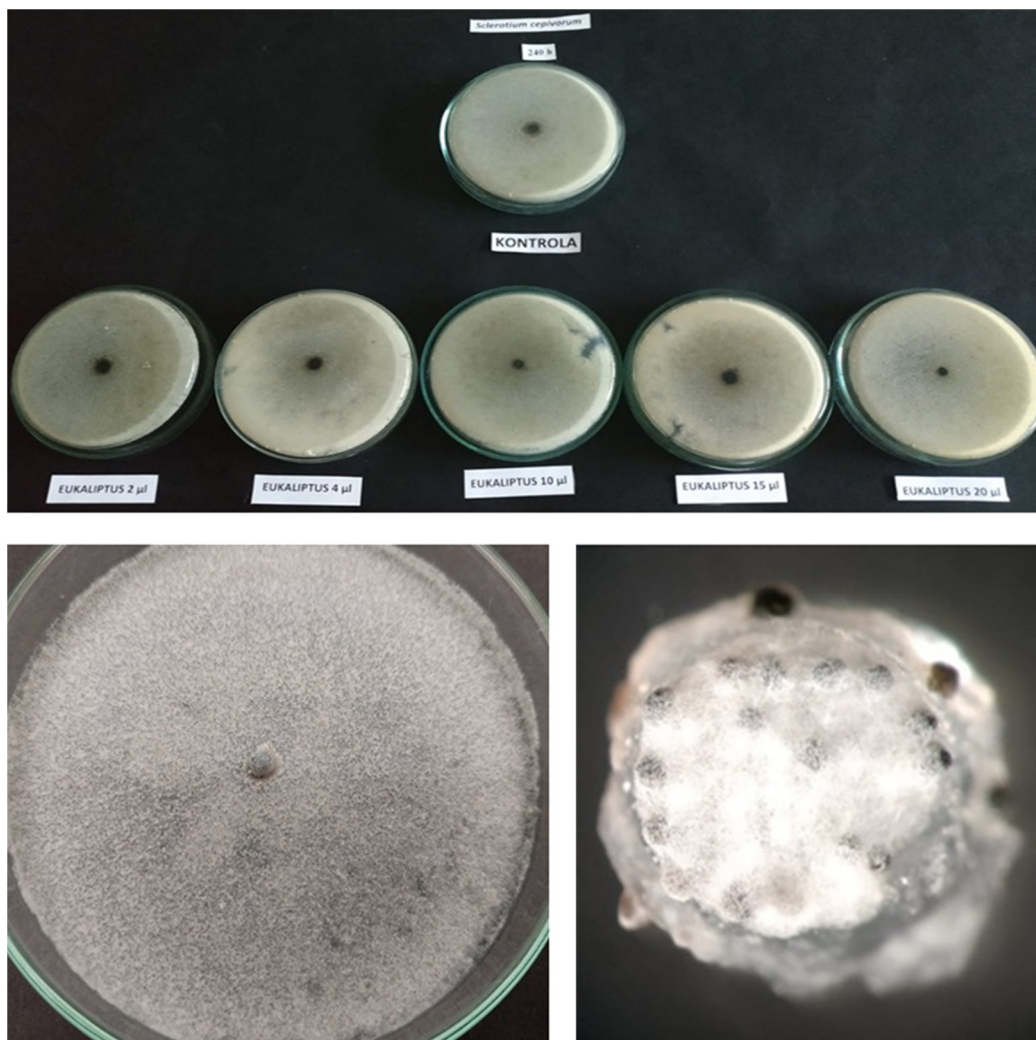


Figura 1.8. Influența a diferite uleiuri esențiale asupra *Sclerotium cepivora*.

1.3. Test de contact pentru evaluarea efectului uleiurilor esențiale *in vitro*

Procedura pentru testul de contact este foarte asemănătoare cu cea descrisă pentru testul volatil, cu diferența că uleiul este adăugat în mediul PDA.

Etapele protocolului de lucru

- 1) se toarnă 10 mL de PDA în plăci Petri cu diametrul de 90 mm, în care uleiul esențial este amestecat în prealabil pentru a obține fracția de volum de ulei prevăzută experimental în substratul PDA. Controlul negativ este apa distilată sterilă
- 2) cutiile Petri se închid cu parafilm și se depozitează într-o cameră climatică termostată la o temperatură de 18-25°C, timp în care creșterea miceliului fungilor (mm) și apariția structurii reproductive (de ex. scleroții sau conidii) sunt monitorizate



Co-funded by
the European Union



- 3) creșterea miceliului se măsoară de obicei după 62 și 168 de ore
- 4) procentul de inhibare a creșterii miceliului este calculat folosind formula lui Wu și colab. (2013):

$$I(\%) = [(C-T)/(C-0.4)] \times 100,$$

unde:

I (%) - inhibarea procentuală a creșterii miceliului de către compușii testați

C - diametrul de creștere a ciupercilor pe PDA pur,

T - diametrul de creștere a ciupercilor pe PDA tratat.

- 5) pe baza datelor obținute, pot fi calculate valorile EC50 pentru fiecare ulei esențial. Valorile EC50 arată care uleiuri esențiale au avut efectul de reducere a creșterii miceliului cu 50% (Figura 1.9)

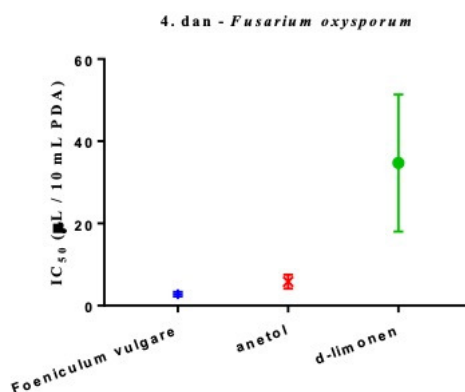


Figura 1.9. Comparația EC50 a uleiului esențial de fenicul (*Foeniculum vulgare*) și a componentelor acestuia (anetol și d-limonen) pentru *Fusarium oxysporum* utilizând analiza varianței (ANOVA) și testul Tukey. Rezultatele sunt prezentate ca limite de încredere de 95% pentru EC50

Atenție!!!

- În ambele variante ale experimentului (de contact și volatil) în care ultima măsurătoare nu a determinat nicio creștere a miceliului, se ia o secțiune circulară cu miceliu și se transferă într-o nouă placă Petri cu mediu PDA (fără ulei).
- Probele preparate astfel se păstrează timp de 48 de ore (de exemplu, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Macrophomina phaseolina*) sau 72 de ore (de exemplu, *Sclerotium cepivora*) într-o cameră climatică termostată la 25 °C.
- Dacă ciuperca a început să dezvolte miceliu după incubare, efectul uleiului este fungistatic, iar dacă nu există o dezvoltare de miceliu nou, efectul uleiului este fungicid.



- Cea mai mică concentrație (cantitate) de ulei la care a fost determinată inhibarea completă a creșterii miceliului este desemnată ca și concentrație minimă inhibitorie (CMI), iar cea mai mică concentrație (cantitate) de ulei la care a fost determinat un efect fungicid este desemnată ca fiind concentrație minimă fungică (CMF).

Bibliografie

Wilson CL, Solar JM, El-Ghaouth A, Wisniewski ME. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 1997; 81: 204-210.

Kishore GK, Pande S, Harish S. Evaluation of Essential Oils and Their Components for Broad-Spectrum Antifungal Activity and Control of Late Leaf Spot and Crown Rot Diseases in Peanut, *Plant Disease* 2007; 91(4): 375-379.

Wilkins KM, Board RG. Natural antimicrobial systems, in: *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*, G. W. Gould, ed., Elsevier, New York 1989; 285–362.

Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: Antimicrobial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 2000; 88: 308-316.

Al-Reza SM, Rahman A, Ahmed Y, Kang SC. Inhibition of Plant Pathogens In Vitro and In Vivo with Essential Oil and Organic Extracts of *Cestrum nocturnum* L. *Pestic. Biochem Physiol* 2010; 96: 86-92.

Veloz-Garcia R, Marin-Martinez R, Veloz-Rodriguez R, Rodriguez-Guerra R, Torres-Pacheco I, Monzalez-Chavira MM, et al. Antimicrobial Activities of Cascalote (*Caesalpinia cacalaco*) Phenolics- Containing Extract against Fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Ind Crops Prod* 2010; 31: 134-138.

Edris AE, Farrag ES. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their mayor aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. *Nahrung/Food* 2003; 47(2): 117-121.

Silva FFA, Alves CCF, Oliveria Filho JG, Vieira TM, Crotti AEM, Miranda MLD. Chemical constituents of essential oil form *Murraya paniculata* leaves and its application to in vitro biological control of the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Food Sci. Technol, Campinas* 2019: 39 (Supl.2): 413-417.

Wu J, Kang S, Luo L, Shi Q, Ma J, Yin J, et al. Synthesis and antifungal activities of novel nicotinamide derivatives containing 1, 3, 4-oxadiazole. *Chemistry Central Journal* 2013; 7(1):



Capitolul 2. Efectul erbicid al extractelor de plante și uleiurilor esențiale (P2 - UNIOS)

2.1. Introducere

Gestionarea buruienilor în agricultura modernă se bazează în primul rând pe utilizarea erbicidelor sintetice datorită eficienței ridicate, aplicării simple și costului redus. Cu toate acestea, aplicarea lor necorespunzătoare și excesivă duce la apariția de populații de buruieni rezistente, reziduuri de erbicide în lanțul alimentar și efecte adverse asupra mediului și asupra sănătății umane și animale [Macías et al., 2003; Singh et al., 2003]. În plus, interzicerea frecventă a ingredientelor active, lipsa produselor vegetale înregistrate și a restricțiilor în aplicarea erbicidelor sintetice în sistemele agricole ecologice, precum și în zonele protejate necesită o abordare diferită în combaterea buruienilor.

Alelopatia este un fenomen biologic, definit ca orice efect direct sau indirect, nociv sau benefic al unei plante asupra germinării și creșterii alteia prin producerea de alelochimice care sunt eliberate în mediu [Rice, 1984]. Alelopatia este considerată o metodă alternativă pentru gestionarea durabilă a buruienilor. Culturile alelopatice care au un efect erbicid puternic pot fi implementate ca erbicide naturale sub formă de extracte de plante, pulberi și uleiuri esențiale pentru a reduce sau inhiba germinarea și creșterea buruienilor [Singh et al., 2003; Ravlić et al., 2016].

Plantele medicinale din diferite familii botanice, atât cultivate, cât și sălbatice, reprezintă o sursă importantă de compuși bioactivi pentru dezvoltarea de bioerbicide noi, sigure și biodegradabile [Bhowmik et al., 2003, Fujii et al., 2003., Amini et al., 2016]. Metaboliții secundari bioactivi ai plantei (alelochimici) sunt prezenți în diferite concentrații în toate plantele și părțile acestora [Alam et al., 2001]. Potențialul fitotoxic al extractelor de plante și al uleiurilor esențiale depinde de mulți factori, cum ar fi originea geografică, condițiile de creștere, variația sezonieră și stadiul de creștere a plantelor, precum și factorii de mediu abiotici și biotici care pot crește producția de metaboliți secundari în plante și pot spori efectul inhibitor al acestora [Safdar et al., 2014; Sarić-Krsmanović et al., 2019; Medina-Villar et al., 2020; Appiah et al., 2022; Ravlić et al., 2022]. Activitatea este influențată de concentrație, metoda de extracție și dacă materialul vegetal este proaspăt sau uscat, dar depinde în mare măsură și de speciile țintă, deoarece acestea diferă prin sensibilitate [Fujii et al., 2003; Norsworthy, 2003; Souza Filho et al., 2009; Ravlić et al., 2016; Ravlić et al., 2022].



Diverse teste și tehnici sunt utilizate pentru screening-ul în laborator al plantelor în vederea evaluării potențialului lor erbicid.

2.2. Efectul erbicid al extractelor de plante

Pentru prepararea extractelor din plante primul pas este colectarea materialului vegetal. Identificarea botanică adecvată a speciilor de plante este crucială, iar toate plantele colectate sunt identificate în funcție de caracteristicile morfologice ale acestora, folosind chei dihotomice și atlase. Materialul vegetal fără simptome vizibile de boli și daune fizice este colectat în diferite locații sub diverși factori de mediu și în diferite etape de dezvoltare a plantei.



Figura 2.1. Colectarea materialului vegetal (*Solidago gigantea*) în stadiul de înflorire.

Dacă sunt testate diferite părți ale plantei, se recomandă ca înainte de uscare părțile plantei să fie separate (Figura 2.2).



Figura 2.2. Separarea materialului vegetal proaspăt în părțile plantelor (*Oenothera biennis*).

Biomasa proaspătă poate fi utilizată pentru prepararea extractelor sau poate fi uscată. Materialul este uscat la umbră timp de 24 până la 72 de ore, iar după aceea este uscat în cuptor la 40 până la 50°C. Biomasa uscată este tăiată în bucăți mici, măcinată cu râșnița electronică în pulbere fină (Figura 2.3) și depozitată în pungi de hârtie într-un loc uscat și răcoros.



Figura 2.3. Aspectul materialului vegetal după procedura de măcinare.



Etapele protocolului de lucru pentru obținerea unui extract apos de plante

Extractele de apă sunt preparate urmând procedura Norsworthy (2003) cu unele modificări.

- 1) biomasa vegetală proaspătă sau uscată în cantitate de 10 g se extrage în 100 mL apă distilată la temperatura camerei $22 (\pm 2) ^\circ\text{C}$ timp de 24 ore (Figura 2.4). Alternativ, materialul vegetal poate fi extras cu apă fierbinte.



Figura 2.4. Prepararea extractelor apoase.

- 2) amestecul este apoi filtrat prin pânză de muselină pentru a îndepărta resturile și apoi prin hârtie de filtru pentru a obține 10% extract de apă. Extractele în diferite concentrații sunt obținute cu diluții ulterioare folosind apă distilată. Concentrațiile utilizate variază de la 1% la 10%.

Etapele protocolului de lucru pentru obținerea unui extract etanolic de plante

- 1) Extractele etanolice se obțin prin macerarea pulberii de plante în etanol timp de 24 până la 72 de ore (Figura 2.5).



Figura 2.5. Prepararea extractelor etanolice – macerarea materialului vegetal în etanol



- 2) după extracție, extractul este filtrat și solventul este îndepărtat sub presiune la temperaturi mai scăzute pentru a obține extract de etanol brut (Figura 2.6). Se obțin în continuare diferite concentrații prin suspendarea extractului brut în apă distilată și Tween ca dispersant [Silva et al., 2018]. Concentrațiile utilizate variază de la 0,01% la 5%.

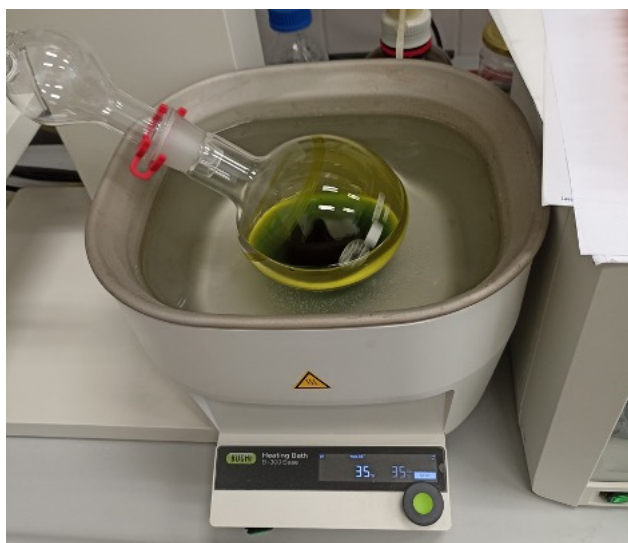


Figura 2.6. Prepararea extractelor etanolice – obținerea extractului brut

Etapele protocolului de lucru pentru obținerea unui extract de plante din semințele de iarbă

- 1) semințele speciilor de buruieni utilizate în biotest ca specii de testare sunt curățate și uscate la temperatura camerei (Figura 2.7).



Figura 2.7. Curățarea și separarea semințelor de buruieni înainte de experiment



- 2) Înainte de experiment, germinația semințelor de buruieni este evaluată pentru a determina dacă există un procent de germinare satisfăcător. Salata verde (Figura 2.8) sau semințele de ridichi sunt folosite la evaluarea unui număr mare de extracte, iar extractele cu cel mai mare efect sunt evaluate în continuare asupra speciilor de buruieni.

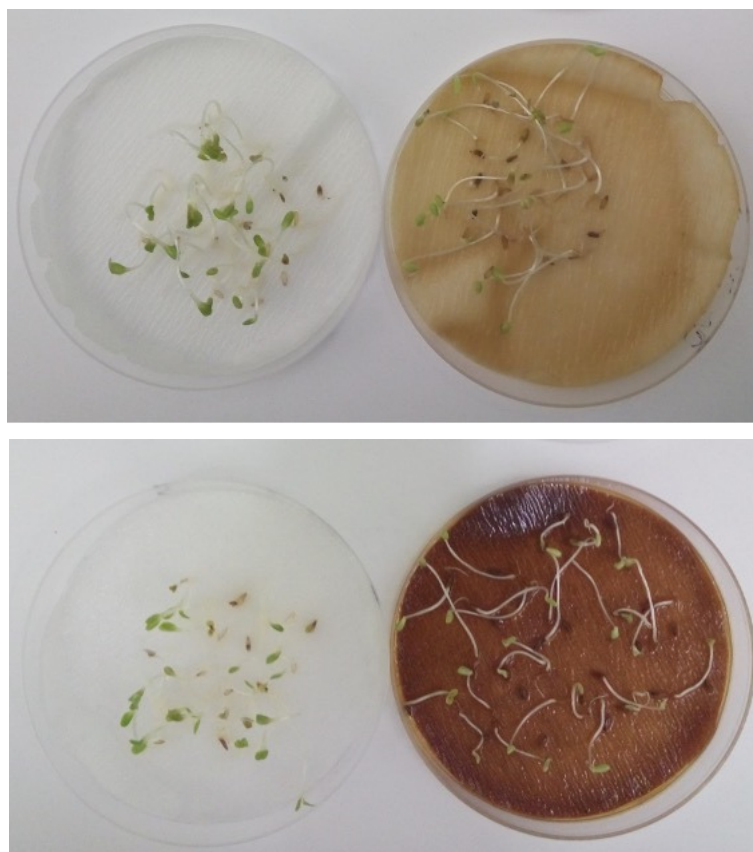


Figura 2.8. Evaluarea extractelor de *Oenothera biennis* din diferite părți ale plantelor (tulpină și frunză) folosind salata verde pentru comparație

- 3) Efectul extractelor este evaluat în biotestul cu placă Petri în condiții de laborator controlate. Semințele de buruieni se pun în plăci Petri sterilizate tapetate cu hârtie de filtru. Hârtia de filtru este umezită cu 4 până la 6 mL de extract (în funcție de specia testată) în fiecare concentrație, în timp ce apa distilată este utilizată drept control (Figura 2.9, 2.10, 2.11). Semințele sunt incubate la temperaturi alternante sau constante și în condiții de lumină/întuneric optime pentru germinarea și creșterea fiecărei specii de buruieni.



Figura 2.9. Efectul erbicid al extractului apos de *Salvia pratensis* asupra *Abutilon theophrasti*.

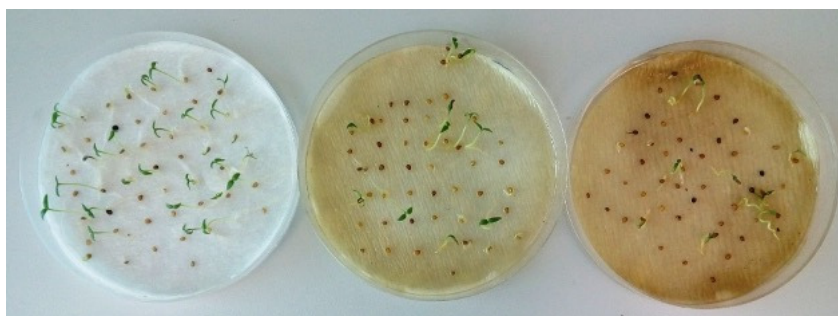


Figura 2.10. Efectul erbicid al diferitelor concentrații de extract de *Chelidonium majus* asupra *Solanum nigrum*.



Figura 2.11. Efectul erbicid al diferitelor concentrații de extract apos de busuioc asupra *Solanum nigrum*.

2.3. Efectul erbicid al uleiurilor esențiale

Efectul erbicid al uleiurilor esențiale asupra germinării și creșterii speciilor de buruieni este evaluat folosind testul volatil [Souza Filho et al., 2009] și pe cel de contact [Sarić-Krsmanović et al., 2019].



Etapele protocolului de lucru

- 1) uleiurile esențiale sunt achiziționate sau obținute din material vegetal colectat și uscat prin hidrodistilare timp de 2,5 ore într-un aparat de tip Clevenger
- 2) o soluție de uleiuri esențiale se prepară în diferite concentrații (de la 0,1 la 1%) cu apă distilată și se emulsionează cu Tween.
- 3) în experimentul cu testul volatil, semințele speciei de buruieni sunt așezate în plăci Petri pe hârtie de filtru umezită cu apă, în timp ce o soluție de ulei esențial se aplică pe hârtia de filtru atașată pe partea superioară a capacului. Drept control, se folosește apa distilată.
- 4) în experimentul cu testul de contact, semințele speciei de testat se pun în plăci Petri pe hârtie de filtru umezită cu o soluție de uleiuri esențiale. În lotul control, semințele speciei de testat sunt germinate fără uleiuri esențiale folosind doar apă distilată.
- 5) în ambele metode, semințele sunt incubate la temperaturi alternate sau constante și în condiții de lumină/întuneric optime pentru germinația și creșterea fiecărei specii de buruieni.
- 6) evaluarea potențialului erbicid al extractelor de plante și al uleiurilor esențiale.

Pentru toate metodele menționate anterior, la sfârșitul perioadei de incubație, pentru determinarea potențialului erbicid se măsoară următorii parametri: germinația, lungimea rădăcinilor și lăstarilor și greutatea proaspătă și uscată.

- Procentul de germinare este calculat pentru fiecare replicare folosind formula:
 - **G (germinare) = (semințe germinate/total semințe) × 100.**
- Perioada de incubație este diferită pentru fiecare specie testată și este în medie de la 8 la 12 zile.
- Toate datele colectate sunt analizate statistic folosind testul ANOVA și diferențele dintre mediile parametrilor mășurați pentru fiecare specie de buruieni sunt testate cu testul LSD la un nivel de probabilitate de 0,05.
- Extractele din plante și uleiurile esențiale sunt clasificate în funcție de potențialul lor de inhibiție, adică procentul de inhibiție în comparație cu controlul. Cele mai promițătoare materiale sunt testate în continuare în experimente în seră.



Co-funded by
the European Union



Bibliografie

- Macías FA, Marín D, Oliveros-Bastidas A, Varela RM, Simonet AM, Carrera C, Molinillo JMG. Allelopathy as new strategy for sustainable ecosystems development. *Biological Sciences in Space* 2003; 17(1): 18-23.
- Singh HP, Batish DR, Kohli RK. Allelopathic interactions and allelochemicals: New possibilities for sustainable weed management. *Critical Reviews in Plant Sciences* 2003; 22: 239-311.
- Rice EL. Allelopathy. 2nd edition. Academic Press, Orlando, Florida, 1984.
- Ravlić M, Baličević R, Nikolić M, Sarajlić A. Assessment of allelopathic potential of fennel, rue and sage on weed species hoary cress (*Lepidium draba*). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 2016; 44(1): 48-52.
- Bhowmik PC, Inderjit. Challenges and opportunities in implementing allelopathy for natural weed management. *Crop Protection* 2003; 22: 661–671.
- Fujii Y, Parvez SS, Parvez MM, Ohmae Y, Iida O. Screening of 239 medicinal plant species for allelopathic activity using the sandwich method. *Weed Biology and Management* 2003; 3(4): 233-241.
- Amini S, Azizi M, Joharchi MR, Moradinezhad F. Evaluation of allelopathic activity of 68 medicinal and wild plant species of Iran by Sandwich method. *International Journal of Horticultural Science and Technology* 2016; 3(2): 243-253.
- Alam SM, Ala SA, Azmi AR, Khan MA, Ansari R. Allelopathy and its Role in Agriculture. *Journal of Biological Sciences* 2001; 1(5): 308-315.
- Safdar ME, Tanveer A, Khaliq A, Naeem MS. Allelopathic action of parthenium and its rhizospheric soil on maize as influenced by growing conditions. *Planta Daninha* 2014; 32(2): 243–253.
- Sarić-Krsmanović M, Gajić Umiljendić J, Radivojević LJ, Šantrić LJ, Potočnik I, Đurović-Pejčev R. Bio-herbicidal effects of five essential oils on germination and aerly seedling growth of velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medik.). *Journal of Environmental Science and Health Part B* 2019; 54: 247-251.
- Medina-Villar S, Uscola M, Pérez-Corona ME, Jacobs DF. Environmental stress under climate change reduces plant performance, yet increases allelopathic potential of an invasive shrub. *Biological Invasions* 2020; 22: 2859–2881
- Appiah KS, Omari RA, Onwona-Agyeman S, Amoatey CA, Ofosu-Anim J, Smaoui A, et al. Seasonal Changes in the Plant Growth-Inhibitory Effects of Rosemary Leaves on Lettuce Seedlings. *Plants* 2022; 11: 673.



Co-funded by
the European Union



Ravlić M, Markulj Kulundžić A, Baličević R, Marković M, Viljevac Vuletić M, Kranjac D, Sarajlić A. Allelopathic Potential of Sunflower Genotypes at Different Growth Stages on Lettuce. *Applied Sciences* 2022; 12(24): 12568.

Norsworthy JK. Allelopathic potential of wild radish (*Raphanus raphanistrum*). *Weed Technology* 2003; 17: 307-313.

Souza Filho APS, Guilhon GMSP, Zoghbi MGB, Cunha RL. Comparative analyses of the allelopathic potential of the hydroalcoholic extract and essential oil of "Cipo-d'alho" (Bignoniaceae) leaves. *Planta Daninha* 2009; 27(4): 647-653.

Silva CGV e, Oliveira JCS de, Camara CAG da. Insecticidal activity of the ethanolic extract from *Croton* species against *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín* 2018; 71(2): 8543-8551.



Capitolul 3. Utilizarea plantelor medicinale ca ingrediente cu proprietăți îmbunătățite în industria produselor funcționale de panificație și patiserie (P1 - USVT)

3.1. Introducere

Plantele aromatice și medicinale includ un număr foarte mare de plante care aparțin unor familii botanice diferite și au o durată de viață anuală, bienală sau multianuală.

Plantele medicinale:

- au fost folosite de mii de ani în bucătărie și sunt ieftine, cu disponibilitate crescută și sănătoase
- în mese sunt privite ca o alternativă la utilizarea substanțelor chimice sintetice
- sunt utilizate în mai multe formulări medicinale, atât pentru vindecarea, cât și pentru prevenirea bolilor
- sunt utilizate în sectorul alimentar ca antioxidanți naturali pentru a preveni oxidarea lipidelor
- sporesc valoarea nutritivă a alimentelor și oferă gust la o varietate de băuturi.

Plantele medicinale pot fi adăugate ca atare sau sub formă de extracte, uleiuri esențiale în produsele de panificație cu următorul scop:

- i) pentru a îmbunătăți proprietățile senzoriale ale produselor
- ii) pentru un efect antioxidant determinat de principiile active polifenolice
- iii) pentru un rol antimicrobian datorită compușilor antifungici și antibacterieni activi biologic găsiți în plantele medicinale.

Plantele conțin compuși fenolici, glucozinolați, glicozide cianogenice, oxilipine și alcaloizi.

Alimentele bogate în metaboliți secundari și compuși bioactivi, cum ar fi flavonoidele, alcaloizii și altele, sunt recomandate pentru consum de către ghidurile alimentare pentru a preveni stresul, hipertensiunea și bolile cardiovasculare [Rivera et al., 2010].

Valoarea plantelor medicinale din familia Lamiaceae constă în producerea unei game largi de metaboliți secundari cu activități puternic antibacteriene, antioxidante, antiinflamatorii, antimicrobiene, antivirale și anticancerigene [Carović-Stanko et al., 2016].

În secțiunile următoare vor fi prezentate câteva exemple de plante medicinale utilizate în produsele de panificație pentru îmbunătățirea proprietăților senzoriale, dar și pentru efectele antioxidante și antifungice.



3.2. Plante medicinale folosite pentru a îmbunătăți gustul, culoarea și aroma produselor de panificație

Plantele medicinale adăugate în diferite forme de preparare a aluatului îmbunătățesc proprietățile senzoriale, având efecte pozitive sau negative asupra proprietăților sale reologice (*Lavandula angustifolia*, *Cichorium intybus*) (Figura 3.1).



Figura 3.1. *Cichorium intybus* și *Lavandula angustifolia* – plante medicinale folosite în industria de panificație.

Ca urmare a gamei largi de utilizare, se folosesc tot timpul anului, proaspete sau uscate. Tendința de utilizare a coloranților naturali în detrimentul celor artificiali, sintetici, este din ce în ce mai răspândită în rândul consumatorilor, iar unele plante medicinale, prin caracteristicile lor de culoare, pot reprezenta alternative sănătoase la coloranții chimici sintetici în industria alimentară, astfel:

Menta – este o plantă răcoritoare care poate fi folosită în prăjituri, fursecuri, creme, glazuri și ciocolată. Aroma sa răcoritoare și ușor dulce este perfectă pentru deserturi. Menta și menta creață sunt cele mai comune soiuri folosite în cofetărie. Se potrivește bine cu ciocolată și fructe precum fructele de pădure și citricele [Sik et al., 2023].

Busuiocul – este o plantă cu aromă dulce, ușor piperată, care poate fi folosită în produse de patiserie dulci, cum ar fi prăjiturile, brișele și înghețata, precum și în produse de copt sărate, cum ar fi pâinea focaccia sau pizza. Se potrivește bine cu fructe, precum căpșuni, piersici și zmeură [Calderón Bravo et al., 2021].

Lavanda – este o plantă aromată care este adesea folosită în deserturi precum fursecuri, prăjituri și înghețată. Aroma sa ușor dulce adaugă o culoare violet unică produselor de



patiserie. Se potrivește bine cu arome de citrice și adaugă o aromă unică produselor coapte [Valková V, et al., 2021].

Coriandrul – este o plantă populară folosită la copt pentru a adăuga produselor o aromă proaspătă, similară citricelor. Coriandrul uscat poate fi adăugat și în aluaturi, pesmet sau folosit pentru a asezona produse de patiserie savuroase. Se potrivește bine cu ciocolata și poate fi folosit pentru a da o aromă unică produselor de patiserie, pâinii, biscuiților sărați și dulci [Sriti et al., 2019].

Cimbrul – este o plantă folosită adesea în mâncăruri sărate, cum ar fi pâinea, pizza și focaccia, dar poate fi folosită și în produse dulci de copt, cum ar fi fursecurile. Aroma sa pământoasă și ușor de mentă este un adaos grozav la produsele de copt cu unt.

Salvia - are o aromă ușor amară, pământoasă și este adesea folosită în produse de copt sărate, cum ar fi pâinea, biscuiții și toppinguri. De asemenea, poate fi folosită în produse dulci de copt, cum ar fi fursecuri și biscuiți [Bassiouny et al., 1990].

Rozmarinul – este o plantă aromatică lemnoasă care poate fi folosită în produse dulci de copt, cum ar fi pâinea și biscuiții. De asemenea, poate adăuga o aromă unică produselor de copt, în special pâinii, quiche-urilor și tartelor. Pur și simplu se taie câteva frunze proaspete de rozmarin și se amestecă în aluatul de pâine sau de patiserie înainte de coacere [Valková et al., 2021].

Oregano – este o plantă aromată care funcționează bine în produsele de copt sărate, cum ar fi crusta de pizza și focaccia. Poate fi tocat fin și amestecat în aluat sau folosit ca topping cu sare și ulei de măsline.

Brioșe TPA BIO FUNCȚIONALE pe bază de făină de grâu integral, flori de lavandă și rădăcină de cicoare cu proprietăți nutritive ridicate, indice glicemic scăzut, potențial biologic ridicat și eficiență economică, a căror tehnologie de fabricație poate fi implementată în unitățile de panificație (Figura 3.2).



Co-funded by
the European Union



Figura 3.2. Brioșe TPA BIO FUNCȚIONALE.

3.3. Plantele medicinale ca agenți antioxidanți în produsele de panificație

Adăugarea a 5% extract de *Camellia sinensis*, *Asparagus racemosus* și *Curcuma longa* (Figura 3.3) a crescut capacitatea antioxidantă a pâinii fără a modifica proprietățile senzoriale. Proprietățile antioxidante ale pudrei de ceai verde care înlocuiesc o parte din făină în prăjiturile de tip pandișpan au fost, de asemenea, raportate de Sik și colab., 2023.



Figura 3.3. *Camellia sinensis*, *Asparagus racemosus* și *Curcuma longa* – plante medicinale cu proprietăți antioxidante

Acizii galic și tanic au influențat proprietățile glutenului și au produs pelicule mai rigide și mai groase, cu permeabilitate mai mică la vapori.

Următoarele secțiuni cuprind diferite rețete de produse de panificație cu plante medicinale adăugate, oferind o descriere detaliată a ingredientelor utilizate și a aspectului produsului final.



Co-funded by
the European Union



Pâine cu *Curcuma longa* L. (Figura 3.4)

Etapele rețetei - Ingrediente

- făină albă pentru pâine
- sare
- pulbere de turmeric
- drojdie cu acțiune rapidă
- ulei de măsline
- apă.



Figura 3.4. Aspectul pâinii cu turmeric.

Atenție!!!

- Pulberea de turmeric (*Curcuma longa* L.) a fost folosită pentru a înlocui 0%, 2%, 4%, 6% și 8% din făină de grâu pentru fabricarea pâinii cu turmeric.
- Un aport zilnic de 50 g sau două felii de pâine cu turmeric cu 4% înlocuire a făinii de grâu cu pulbere de turmeric poate furniza aproximativ 4,6 mg de curcumină și 40,12 mg GAE de compuși fenolici totali care pot aduce beneficii suplimentare pentru sănătatea corpului uman [Lim et al., 2011].
- Datele privind doza exactă recomandată a acestor substanțe fitochimice nu sunt disponibile, cu toate acestea, au fost efectuate diferite studii *in vitro* și *in vivo* pentru a analiza efectele lor biologice.

Prajitură dietetică cu jeleu de cătină (*Hippophae rhamnoides*) (Figura 3.5)

Etapele rețetei - Ingrediente

- Făină integrală de grâu
- Lapte
- Drojdie



- Zaharină
- Unt
- Ouă
- Jeleu de cătină (*Hippophae rhamnoides*).



Figura 3.5. Prajitură dietetică cu jeleu de cătină.

Pâine cu aluat de salvie (Figura 3.6)

Etapele rețetei - Ingrediente

- Apă - 697 g (73%)
- Drojdie - 191 g (20%)
- Făină totală - 955 g (100%)
- Făină de pâine - 859 g (90%)
- Făină integrală de grâu - 95 g (10%)
- Usturoi prăjit - 29 g (3%)
- Salvie - 10 g (1%)
- Sare - 19 g (2%)
- Total 1900 g (199%) [<https://vituperio.com/roasted-garlic-sage-sourdough-bread/>].



Co-funded by
the European Union



Figura 3.6. Pâine cu salvie

Pâine de grâu, secară și cicoare (Figura 3.7)

Etapele rețetei - Ingrediente

- Făină - 275 g
- Făină de secară - 275 g
- Sare – 1,5 lingurițe
- Zahăr – 1,5 linguri
- Drojdie – 1,5 lingurițe
- Oțet - 1/2 linguriță
- Cicoare – 1,5 linguri
- Chimen - 2 linguri
- Apa - 400...420 mL
- Ulei vegetal - 3 linguri.



Figura 3.7. Pâine de grâu, secară și cicoare.



Pâine cu păpădie (Figura 3.8)

Etapele retetei - Ingrediente

- Petale de păpădie - 1/3 cană
- Lapte - 1 Cană
- Drojdie activă uscată - 1 lingură
- Apă caldă - 1/2 cană
- Miere - 1/4 de cană
- Sare - 2 lingurițe
- Unt moale - 1/2 cană
- Ouă – 2 bucăți
- Făină de grâu - 5 căni.



Figura 3.8. Pâine cu păpădie

Pâine cu oregano (Figura 3.9)

Etapele retetei - Ingrediente

- făină de grâu
- drojdie uscată activă sau drojdie proaspătă
- zahăr
- ulei de măsline extra virgin
- miere
- sare de mare
- oregano proaspăt [<https://thegreekfoodie.com/greek-bread-with-oregano-and-olive-oil/>].



Figura 3.9. Pâine cu oregano

Atenție!!!

- ❖ Variația datelor privind parametrii de fabricare a pâinii a fost observată atunci când pâinea a fost preparată prin încorporarea de oregano uscat într-o proporție de 1, 2, 3 și 4% în făină [Dhillon and Kaur Amarjeet, 2013].
- ❖ Volumul specific (4,72 cc/g) a fost cel mai bun la proporția de 1% oregano și a scăzut la 4,22 cc/g la 4% oregano în amestec.
- ❖ Oregano a crescut, de asemenea, greutatea pâinii de la 145 g la 1 % oregano la 149 g la 4 % oregano în pâine.
- ❖ La o proporție de oregano de 2%, absorbția de apă a fost de 72.24% și a crescut la 75% la 4% oregano.
- ❖ Acest lucru a arătat că nivelul crescut de oregano a avut un efect negativ asupra volumului specific de pâine.

Chifle cu cimbru (*Satureja hortensis* L.) (Figura 3.10)

Etapetele rețetei - Ingrediente

- făină integrală de grâu - 4 căni (512 g)
- sare - 2 lingurițe (10 g)
- zahăr - 2 lingurițe (8 g)
- drojdie uscată - 2 lingurițe (8 g)
- frunze de cimbru proaspăt tocate - 2 linguri
- apă - 2 căni (454 g)

[https://www.sidechef.com/recipes/8333/no_knead_thyme_dinner_rolls/].



Figura 3.10. Chifle cu cimbru.

Atenție!!!

- ❖ Adăugarea de cimbru (substanță uscată, precum și ulei esențial) în rețeta de pâine a dus la o activitate antifungică atât împotriva *Penicillium*, cât și împotriva *Aspergillus*.
- ❖ Adăugarea de cimbru a determinat o lipsă a unei alterări fungice sau bacteriene timp de patru zile, indicând potențialul său conservant pentru pâine [Skendi et al., 2020].
- ❖ Prin încorporarea plantei aromatice în forma uscată *in vitro*, se poate obține un efect antifungic în produsele de panificație [Skendi et al., 2020].

Rulouri cu rozmarin

Etapele rețetei – Ingrediente (Figura 3.11)

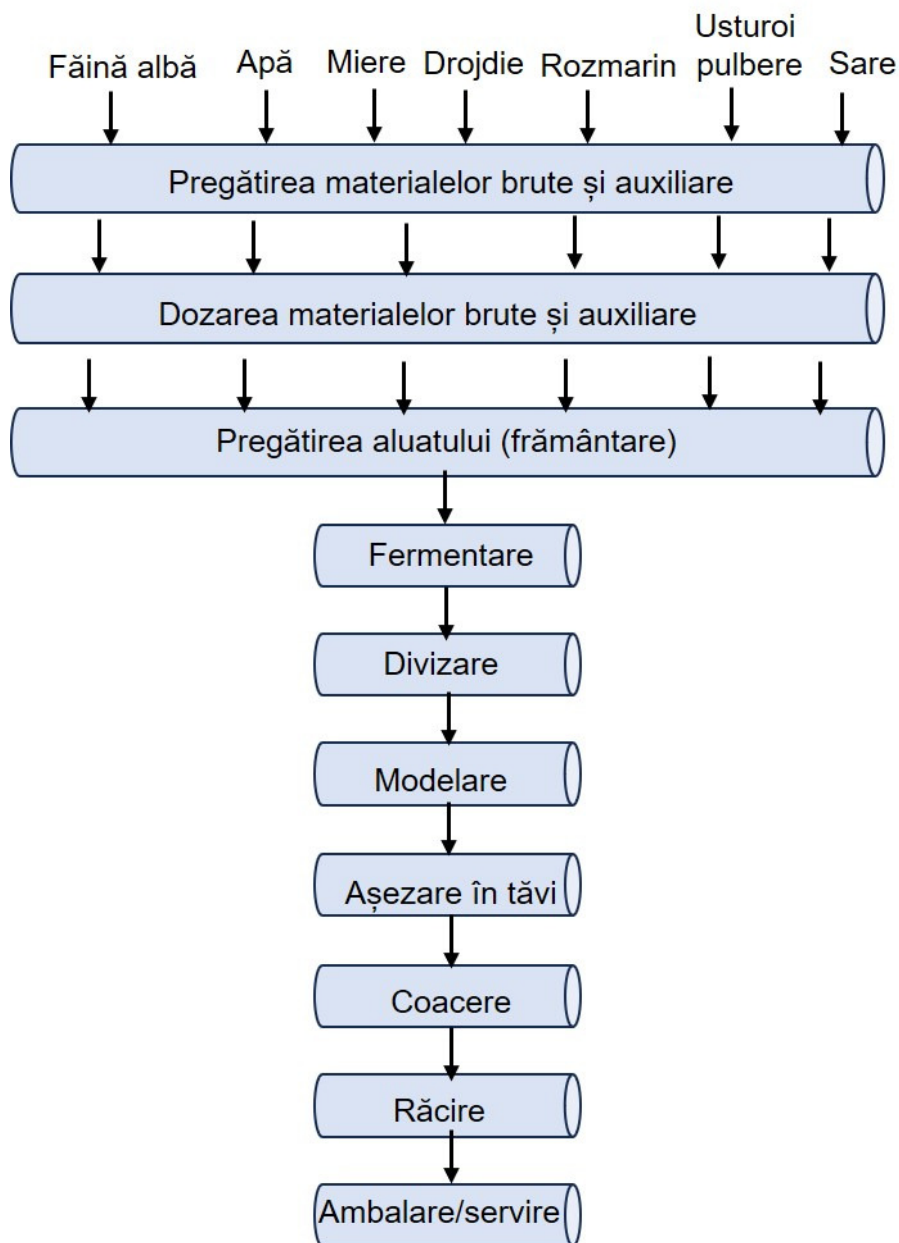


Figura 3.11. Protocol schematic de preparare a rulourilor cu rozmarin.



Co-funded by
the European Union



Figura 3.12. Rulouri cu rozmarin.

Brioșe cu mentă (Figura 3.13)

Etapele rețetei – Ingredientele

- spanac, proaspăt - 2 căni
- ulei de cocos, topit - 1/2 cană
- sos de mere - 1 cană
- extract de mentă - 1 linguriță
- ouă – 2 bucăți
- făină de ovăz - 1 3/4 cană
- praf de copt - 1 1/2 linguriță
- bicarbonat de sodiu - 1/2 linguriță
- sare - 1/2 linguriță
- chipsuri de ciocolată - 1 cană [<https://www.milehighmitts.com/mint-chocolate-chip-oat-muffins-naturally-colored-gluten-free-dairy-free-sugar-free-option-vegan-option/>].



Figura 3.13. Brioșe cu mentă.

Pâine dulce cu lavandă (Figura 3.14)



Etapele rețetei – Ingrediente

- lapte - 3/4 cană
- flori uscate de lavandă tocate - 2 linguri
- făină de grâu - 2 căni
- praf de copt - 1 1/2 linguriță
- sare - 1/4 linguriță
- unt moale - 6 linguri
- zahăr - 1 cană
- ouă - 2
- glazură simplă
- zahăr pudră - 1 cană
- extract de vanilie - 1/2 linguriță
- suc de lămâie - 1/2 lingură
- lapte - 1 1/2 lingură [<https://www.aliikulalavender.com/lavender-tea-bread/>].



Figura 3.14. Pâine dulce de lavandă

Biscuiți cu cuișoare

Etapele rețetei – Ingrediente (Figura 3.15)

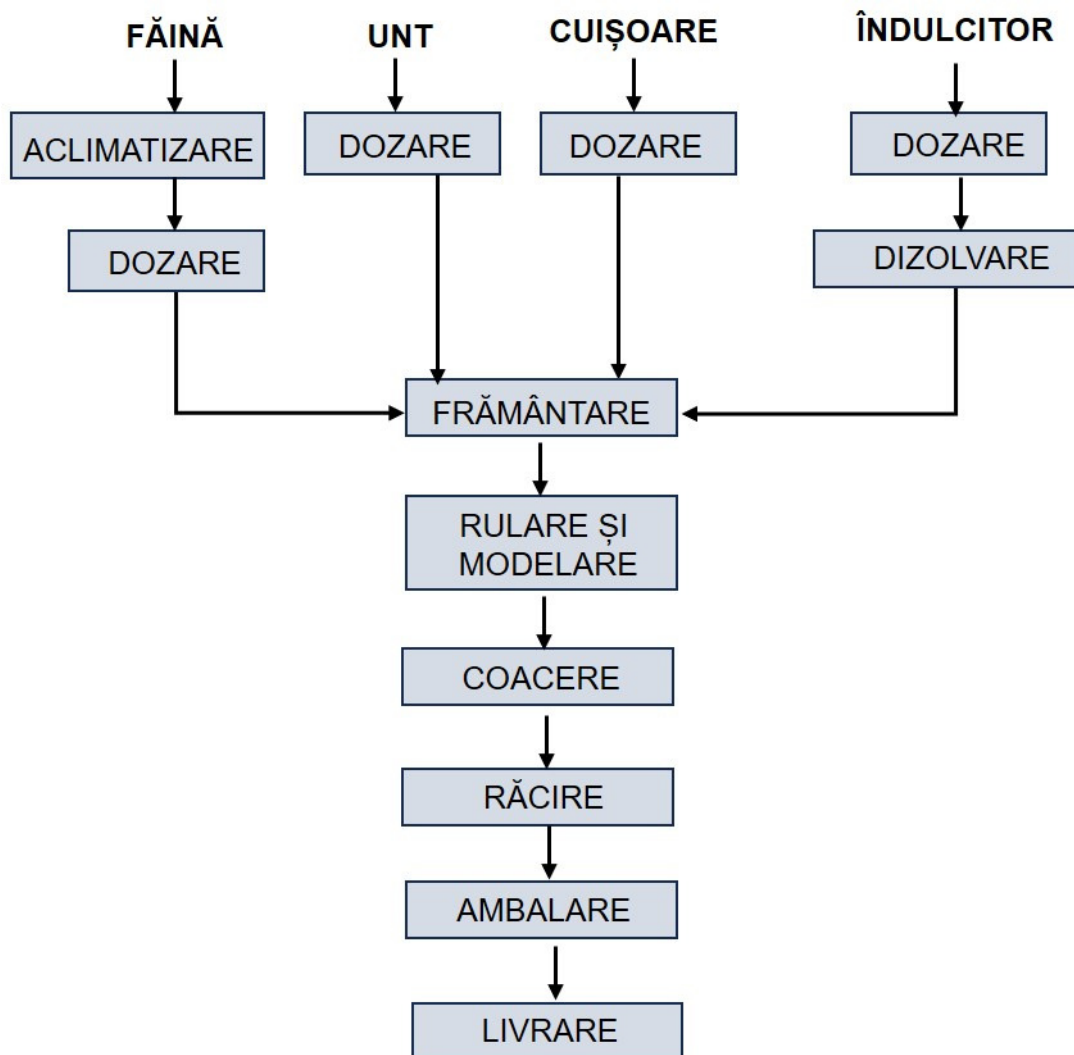


Figura 3.15. Protocol schematic al preparării biscuiților cu cuișoare.



Figura 3.16. Biscuiți cu cuișoare.



3.4. Plantele medicinale ca agenți antimicrobieni în produsele de panificație

Plantele medicinale sunt folosite în industria de panificație cu rol de condiment, pentru a îmbunătăți proprietățile gustative și aromatice ale produselor, dar și ca agent antimicrobian împotriva microorganismelor dăunătoare din produsele de panificație. Pâinea și produsele de panificație sunt predispuse la deteriorarea produselor provocată de mucegai (după câteva zile de depozitare), iar pentru a evita acest fenomen sunt necesari conservanți alimentari sau ambalaje în atmosferă modificată.

Cele mai frecvente specii de mucegai care apar în produsele de panificație sunt: *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Neurospora* și *Mucor*, *Penicillium* fiind identificat ca cea mai comună sursă de alterare a pâinii.

Mai multe tipuri de uleiuri esențiale, în special cele aparținând familiei *Lamiaceae* și *Umbellifere*, sunt menționate ca agenți antimicrobieni folosiți în industria de panificație, rezultând un produs cu termen de valabilitate extins și cu siguranță sporită.

Perioada de valabilitate a produselor de panificație depozitate la temperatura camerei este limitată la 3-4 zile și este influențată de alterarea microbiană din cauza mucegaiurilor, în principal *Penicillium* sp. și alte ciuperci (*Aspergillus*, *Monilia*, *Mucor*, *Endomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium* sau *Rhizopus*). Datorită compoziției sale chimice, *Origanum vulgare* ajută la prelungirea termenului de valabilitate, a calităților nutritive ale multor produse, precum pâinea și produsele de panificație, cerealele.

Două componente antifungice prezente în uleiurile esențiale, carvacrolul și eugenolul, ar putea fi considerate agenți antifungici puternici. Uleiurile esențiale au proprietăți antifungice. Se știe că uleiurile de cimbru, scorțișoară și cuișoare inhibă ciuperca responsabilă de procesul de alterare, în timp ce uleiurile de portocale, salvie și rozmarin au avut doar un efect neglijabil (Figura 3.17).



Co-funded by
the European Union



Figura 3.17. Cimbru, scorțișoară și cuișoare utilizate în produsele de panificație.

Riscul pentru sănătatea umană este dat de faptul că în urma contaminării cu ciuperci rezultă micotoxine cu efecte hepatotoxice, cancerigene.

Micotoxinele sunt metaboliți secundari fungici care induc efecte toxice acute și cronice la oameni și animale. Contaminarea concomitentă a produselor pe bază de cereale cu mai multe micotoxine a fost raportată din ce în ce mai mult, inclusiv în alimentele consumate în mod obișnuit de copii. Cele mai importante grupe de micotoxine sunt:

- Aflatoxine (AFLA)
- Ochratoxină A (OTA)
- Trichotecene (deoxinivalenol DON, nivalenol)
- Zearalenonă (ZEA)
- Fumonisine (FUMO).

Micotoxinele pot fi găsite în pâine, cereale pentru micul dejun, produse de patiserie.

Procesarea nu poate decât să reducă numărul de micotoxine, nu eliminarea totală a acestora. S-a demonstrat că unele plante folosite în mod tradițional prezintă proprietăți toxice asupra ciupercilor.



Plante medicinale ca: *Occimum gratissimum*, *Cymbopogon citratus*, *Xylopia aethiopica*, *Monodera myristica*, *Sizygium aromaticum*, *Cinnamomum verum* si *Piper nigrum* sunt eficiente în inhibarea formării acidului non-sorbic, precursor în procesul de sinteză a aflatoxinelor.

Preparatele naturale din emulsii pe bază de uleiuri esențiale au fost folosite ca agenți antifungici în panificație.

Sunt necesare studii suplimentare pentru dezvoltarea unor strategii comune pentru controlul și prevenirea dezvoltării fungice și a micotoxinelor în produsele de panificație și patiserie.

3.5. Activitatea plantelor medicinale împotriva bacteriilor patogene predominante în industria alimentară

Prevenirea deteriorării alimentelor și a apariției agenților patogeni care provoacă toxiiinfecții alimentare se realizează, de obicei, prin utilizarea aditivilor chimici care au o serie de efecte negative, inclusiv: pericolele pentru sănătatea umană induse de compușii chimici, apariția reziduurilor chimice în alimente și în lanțurile alimentare și dobândirea rezistenței microbiene la substanțele chimice utilizate.

Ca urmare a acestor griji, este mai important ca niciodată să găsim o alternativă naturală, sănătoasă și sigură la conservanți. De ceva timp, extractele de plante sunt folosite pentru a preveni intoxicațiile alimentare și pentru a conserva alimentele.

Unele dintre provocările cu care se confruntă producătorii de pâine includ prelungirea duratei de valabilitate prin reducerea râncezirii și scăderea deteriorării microbiene, deoarece aceste modificări duc la deteriorarea pâinii și a altor produse de panificație. Pentru a depăși aceste dificultăți și pentru a crește durata de valabilitate, sunt utilizați antioxidanți disponibili comercial și conservanți chimici, cum ar fi inhibitorii de mucegai.

O varietate de uleiuri esențiale pot opri dezvoltarea germenilor periculoși în produsele de panificație, prelungindu-le durata de valabilitate și îmbunătățind siguranța acestora, cum ar fi cimbru, scorțișoară, oregano, iarbă de lămâie etc.

Majoritatea părților comestibile ale plantelor medicinale includ urme de acizi hidroxibenzoic și hidroxicinamic, două tipuri de acizi fenolici care acționează ca sistem de apărare a plantelor.

Datorită potențialului lor de conservanți naturali ai alimentelor, agenți de aromatizare și agenți de decontaminare, uleiurile esențiale de plante atrag mult interes în industria alimentară fiind, de asemenea, recunoscute în general ca sigure – GRAS (Figura 3.18).



Co-funded by
the European Union



Figura 3.18. Acizi hidroxi benzoici și hidroxicinamici.

Bibliografie

Rivera G, Bocanegra-García V, Monge A. Traditional plants as source of functional foods: a review *Plantas tradicionales como fuente de alimentos funcionales: una revisión. CyTA - J. Food* 2010; 8:159–167.

Carović-Stanko K, Petek M, Grdiša M, Pintar J, Bedeković D, Herak Ćustić M, Satovic Z. Medicinal plants of the family Lamiaceae as functional foods - a review. *Czech J. Food Sci* 2016; 34(5):377-390.

Sik B, Kovács K, Lakatos E, Kapcsándi V, Székelyhidi R. Increasing the functionality of sponge cakes by mint, and cocoa powder addition. *Heliyon*. 2023; 9(9): e20029.

Calderón Bravo H, Vera Céspedes N, Zura-Bravo L, Muñoz LA. Basil Seeds as a Novel Food, Source of Nutrients and Functional Ingredients with Beneficial Properties: A Review. *Foods* 2021; 10(7):1467

Valková V, Ďúranová H, Galovičová L, Vukovic NL, Vukic M, Kačániová M. In Vitro Antimicrobial Activity of Lavender, Mint, and Rosemary Essential Oils and the Effect of Their Vapours on Growth of *Penicillium* spp. in a Bread Model System. *Molecules* 2021; 26(13):3859.

Sriti J, Bettaieb I, Bachrouh O, Talou T, Marzouk B. Chemical composition and antioxidant activity of the coriander cake obtained by extrusion. *Arabian Journal of Chemistry* 2019; 12(7): 1765-1773.

Bassiouny SS, Hassanien FR, Abd El-Razik Ali F, El-Kayati Sohair M. Efficiency of antioxidants from natural sources in bakery products. *Food Chemistry* 1990; 37 (4): 297-305.

Lim HS, Park SH, Ghafoor K, Hwang SY, Park J, Quality and antioxidant properties of bread containing turmeric (*Curcuma longa* L.) cultivated in South Korea. *Food Chemistry* 2011; 124(4):1577-1582.



Co-funded by
the European Union



***<https://vituperio.com/roasted-garlic-sage-sourdough-bread/>

***<https://thegreekfoodie.com/greek-bread-with-oregano-and-olive-oil/>

Dhillon G, Kaur Amarjeet. Effect of Oregano Herb on Dough Rheology and Bread Quality. International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics 2013; 40-44.

***https://www.sidechef.com/recipes/8333/no_knead_thyme_dinner_rolls/

Skendi A, Katsantonis DN, Chatzopoulou P, Irakli M, Papageorgiou M. Antifungal Activity of Aromatic Plants of the Lamiaceae Family in Bread. Foods. 2020; 9(11):1642.

***<https://www.gimmesomeoven.com/one-hour-rosemary-garlic-dinner-rolls/>

***<https://www.milehighmitts.com/mint-chocolate-chip-oat-muffins-naturally-colored-gluten-free-dairy-free-sugar-free-option-vegan-option/>

***<https://www.aliikulalavender.com/lavender-tea-bread/>

***<https://www.bbcgoodfood.com/recipes/clove-sugar-cookies>

***<https://www.swissbake.in/blog/unlocking-the-potential-role-of-herbs-in-professional-baking>



Capitolul 4. Tendințele și metodele actuale de evaluare *in vitro* a activității biologice (CO - UMFVBT)

4.1. Introducere

Testele *in vitro* realizate pe celule reprezintă primul pas în cercetarea preclinică, fiind aplicate ca instrument cheie în evaluarea activității biologice a noilor candidați cu potențial farmacologic. În plus, studiile *in vitro* oferă date relevante privind mecanismul lor potențial de acțiune (căile de semnalizare implicate), precum și aspecte despre toxicitatea lor. Au fost precizate și alte avantaje legate de utilizarea liniilor celulare ca modele *in vitro*, după cum urmează: (i) implică metode eficiente din punct de vedere al timpului și al costurilor, (ii) sunt modele „controlabile” (în special în cazul culturilor monostrat/ culturile aderente), și (iii) sunt disponibile în literatură mai multe tehnici standardizate pentru astfel de modele [Capula et al., 2019].

Pe lângă beneficiile utilizării modelelor și testelor *in vitro*, au fost identificați mai mulți factori care ar putea avea un impact asupra rezultatelor, conducând la date nesigure, de aceea trebuie luate în considerare unele principii de bază atunci când se proiectează și se efectuează experimente *in vitro* [Capula et al., 2019], precum:

1) **Selectarea liniei celulare adecvate**

Înainte de a proiecta un experiment *in vitro*, este obligatoriu să se selecteze liniile celulare considerate modele eligibile pentru scopul urmărit în studiul de cercetare.

Liniile celulare pot fi obținute: (i) *intern/ în laboratorul propriu* (necesită autentificare, informații clinice detaliate și utilizarea explicită a liniei), (ii) *prin achiziție de la alte laboratoare* (necesită carantină, autentificare și caracterizare pentru a confirma caracteristicile specifice ale celulelor) sau (iii) *prin cumpărare de la bănci de celule avizate* (pachetul include datele de autentificare, rezultatele testelor privind contaminarea cu microorganisme și informații despre stocarea liniei celulare și metoda de subkultură specifică) [Geraghty et al., 2014].

Important!!! Toate liniile celulare utilizate în experimente trebuie să fie autentificate și necontaminate!!!

Colectii de culturi celulare/bănci de celule recunoscute: American Type Culture Collection (ATCC) (www.atcc.org); CellBank Australia (www.cellbankaustralia.com); Coriell Cell Repository (<http://ccr.coriell.org>); Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (www.dsmz.de); European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) (www.phe-culturecollections.org.uk); National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition,



Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) (<https://cellbank.nibiohn.go.jp/english/>); NIH Stem Cell Unit (<https://stemcells.nih.gov/NIH-Stem-Cell-Research>); RIKEN Gene Bank (<https://web.brc.riken.jp/en/>), UK Stem Cell Bank (UKSCB) (<https://nibsc.org/ukstemcellbank>); WiCell (www.wicell.org) [Geraghty et al., 2014].

Tipuri de culturi celulare și linii celulare:

Cultura celulară este un termen folosit pentru a descrie menținerea sau cultivarea celulelor *in vitro*, inclusiv cultura celulelor individuale. Culturile celulare pot fi:

- *culturi primare* - sunt obținute direct din țesuturi excizate și culturi, sub formă cultură explant sau ca suspensie de celule unice prin digestie enzimatică

- *culturi continue* – sunt formate dintr-un singur tip de celulă care poate fi extins secvențial în cultură fie pentru un număr limitat de diviziuni celulare, fie pe termen nelimitat.

O linie celulară provine dintr-o cultură primară și este rezultatul primei subculturi de succes. Liniile celulare pot fi clasificate astfel:

- *celule primare* - sunt obținute direct din țesutul uman și sunt cunoscute ca „finite”, deoarece proliferarea lor se oprește după un număr limitat de diviziuni celulare

- *celule transformate* - pot fi dezvoltate fie natural, fie prin manipulare genetică și sunt cunoscute și sub numele de linii celulare imortalizate

- *celule cu capacitate de auto-reînnoire* – au capacitatea de a se diferenția într-o diversitate de alte tipuri de celule; exemple de acest tip de celule: celule stem embrionare, celule stem neuronale și intestinale, celule stem pluripotente [Seegeritz and Vallier, 2017; Coecke et al., 2005].

2) Selectarea unui solvent adecvat pentru compușii de testat:

- un solvent necorespunzător poate afecta stabilitatea compusului test, ducând la determinarea incorectă a concentrației

- solventul ales nu trebuie să fie toxic pentru celule la concentrația finală folosită [Capula et al., 2019].

3) Concentrația compușilor de testat

- o gamă largă de concentrații trebuie testată atunci când se efectuează un screening al compușilor noi, urmată de un interval restrâns după ce a fost identificată concentrația care a declanșat un răspuns [Capula et al., 2019].

4) Expunerea la medicamente/durata tratamentului

- durata unui tratament *in vitro* trebuie să fie corespondentul situației *in vivo*
- trebuie luat în considerare și metabolismul compusului testat [Capula et al., 2019].



5) Densitatea la cultivare și momentul analizei – este dependentă de linia celulară [Capula et al., 2019].

Înainte de a începe lucrul cu linii celulare, se recomandă cunoașterea următoarelor aspecte fundamentale:

- ❖ liniile celulare sunt formate din celule care au capacitatea de a prolifera pentru perioade îndelungate *in vitro* și pot fi păstrate prin subcultură succesivă (procedură cunoscută și sub numele de pasajul celulelor în cultură)
- ❖ *liniile celulare finite* pot fi subcultivate de mai multe ori, dar după un număr de pasaje (60-70 de dublări ale populației celulare) ating starea de senescență și încetează să se mai reproducă; pot fi menținute bine caracterizate, dar pot să apară modificări în morfologia lor pe măsură ce se apropie de senescență
- ❖ *liniile celulare continue* pot fi subcultivate la infinit; sunt derivate din tumori sau țesuturi embrionare normale; prezintă o stabilitate ridicată după pasaje pe termen lung *in vitro*, totuși pot suferi modificări considerabile și ireversibile [Coecke et al., 2005].

Atenție!!! Se recomandă ca toate tipurile de linii celulare să aibă stocuri crioconservate de celule la număr de pasaj mic!!!

- ❖ fazele de creștere ale celulelor normale sunt:
 - **faza de latență (lag)** – este faza de după cultivare când celulele nu se divid, ci doar se adaptează la condițiile de cultură; este dependentă de faza de creștere a liniei celulare la momentul subcultivării/pasajului și de densitatea de cultivare
 - **faza de creștere logaritmică (log) sau exponențială** – se caracterizează printr-o creștere exponențială a celulelor care se menține până când întreaga placă este ocupată sau concentrația celulară depășește capacitatea mediului de creștere; populația celulară este considerată a fi cea mai viabilă în acest moment; este faza potrivită pentru evaluarea funcțiilor celulare și pentru determinarea timpului de dublare a populației; de asemenea, se recomandă efectuarea procedurii de subcultivare (efectuarea pasajului celular prea târziu poate duce la supraaglomerarea celulelor, apoptoză și senescență)
 - **faza de platou sau faza staționară** – populația celulară devine confluentă și proliferarea încetinește; este faza în care celulele sunt cele mai susceptibile la leziuni
 - **faza de declin** – se caracterizează prin creșterea morții celulare și reducerea numărului de celule viabile datorită progresiei naturale a ciclului celular.



- ❖ vârsta *in vitro* a unei culturi celulare poate fi definită prin:
 - numărul de pasaje (subcultivări) – de câte ori o linie celulară a fost subcultivată
 - timpul de dublare a populației celulare (DT) – timpul necesar unei culturi pentru a-și dubla numărul

$$DT = T \ln 2 / \ln(X_e/X_b),$$

unde T este timpul de incubație în orice unitate

X_b este numărul celulelor la începutul perioadei de incubare

X_e este numărul celulelor la sfârșitul timpului de incubare [ATCC - Animal Cell Culture Guide].

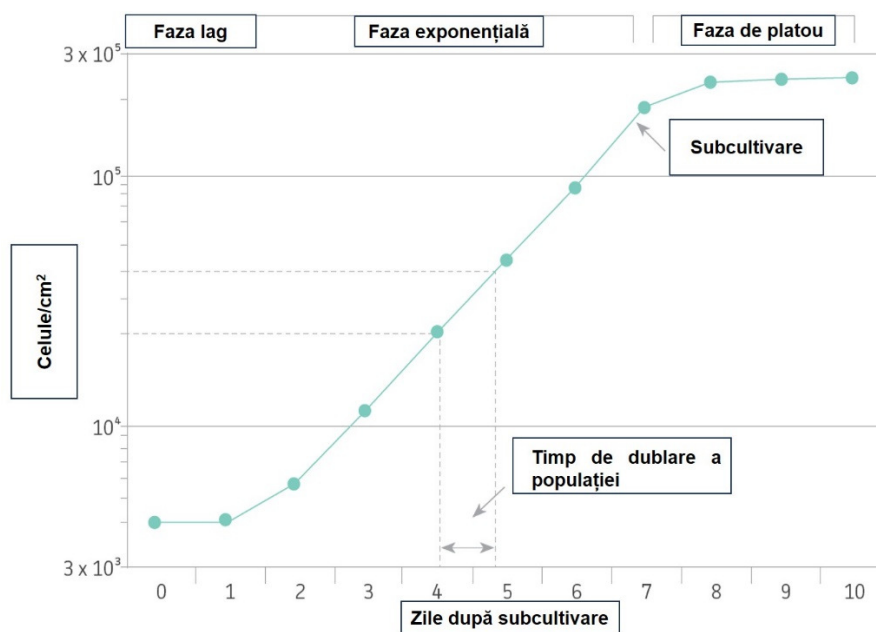


Figura 4.1. Exemplu de curbă de creștere a celulelor în cultură. Se recomandă efectuarea procedurii de subcultivare atunci când celulele sunt în faza log (exponențială) de creștere [ATCC - Animal Cell Culture Guide].

În secțiunile următoare vor fi furnizate câteva instrucțiuni de bază cu privire la etapele implicate în pregătirea unei linii celulare pentru teste *in vitro* realizate de celule bidimensionale (2D) din momentul primirii criotubului cu celule de la banca de celule până la adăugarea compușilor de testat. **Protocolul se referă la celule de mamifere aderente cultivate în monostrat.**



4.2. Pregătirea unei linii celulare pentru testele *in vitro* realizate pe celule

4.2.1. Reguli generale de siguranță în laboratorul de cultură celulară

- ❖ *Activitățile în laborator sunt efectuate doar de către personal instruit*
- ❖ *Personalul trebuie să poarte întotdeauna echipament de protecție personală (halate de laborator și halate tip pelerină de unică folosință, bonetă, botoși de unică folosință, mănuși, ochelari de protecție) la intrarea în laborator, echipament care se scoate la ieșirea din laborator.*
- ❖ *Nu este recomandată expunerea pielii în pantofi deschiși, pantaloni scurți și fuste.*
- ❖ *Consumul de alimente, băuturi, depozitarea alimentelor, fumatul, aplicarea produselor cosmetice sau manipularea lentilelor de contact sunt interzise în laboratorul de culturi celulare.*
- ❖ *Telefoanele mobile nu trebuie folosite în timpul lucrului în laboratorul de culturi celulare.*
- ❖ *Articolele de îmbrăcăminte largi (de exemplu, eșarfe, coliere atârdate) trebuie îndepărtate înainte de a începe lucrul, iar părul trebuie legat la spate.*
- ❖ *Toate suprafețele de lucru trebuie decontaminate înainte și după experimente și imediat după orice vărsare sau stropire cu material potențial infecțios cu un dezinfectant adecvat. Echipamentul de laborator trebuie curățat în mod obișnuit, chiar dacă nu este contaminat.*
- ❖ *Toate articolele de laborator care au fost în contact cu agenți potențial infecțioși sau periculoși trebuie decontaminate înainte și după lucrul cu acestea.*
- ❖ *Suprafețele de lucru trebuie dezinfectate temeinic cu etanol (EtOH) 70% înainte și după utilizare.*
- ❖ *Pentru manipularea sterilă, mâinile și zonele de lucru trebuie șterse întotdeauna cu EtOH 70%, iar toate plăcile de cultură aduse din exterior, sticlele de mediu sau alte recipiente/consumabile trebuie să fie decontaminate cu EtOH 70% înainte de a le introduce în hota cu flux laminar pentru culturi celulare.*
- ❖ *Mediile de creștere celulară și alți reactivi nu trebuie turnate direct din sticle sau plăci pentru a evita contaminarea; trebuie folosite pipete serologice sterile.*
- ❖ *Mâinile trebuie spălate înainte de a părăsi laboratorul de culturi celulare.*
- ❖ *Responsabilul de laborator trebuie să fie anunțat în cazul expunerii sau vărsării de agenți infecțioși sau periculoși pentru a oferi sfaturi cu privire la o strategie adecvată de izolare și decontaminare [Segeritz and Vallier, 2017; Gibco Cell Culture Basics, ATCC - Animal Cell Culture Guide; ECACC Handbook].*

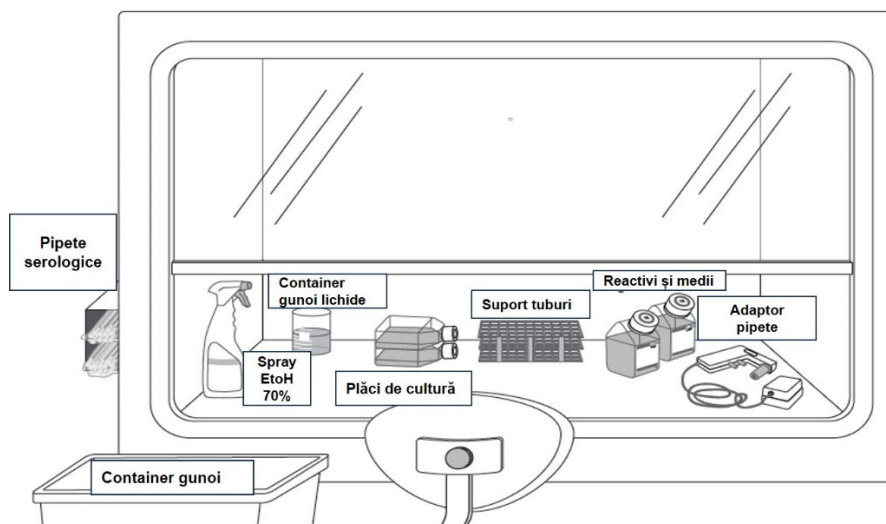


Figura 4.2. Exemplu de organizare a consumabilelor și reactivilor în hota cu flux laminar pentru culturi celulare [Gibco Cell Culture Basics].

4.2.2. Tabelul cu resurse esențiale pentru procedurile de dezghețare/subcultivare/crioconservare a unei linii celulare

Tabel 1. Resurse cheie pentru dezghețarea/subcultivarea/crioconservarea unei linii celulare

Linia celulară	Producător
Linia celulară testată	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, US The European Collection of Authenticated Cell Culture (ECACC), Salisbury, UK ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Reactivi	Producător
Mediu de cultură pentru liniile celulare (specific pentru fiecare linie celulară)	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, US The European Collection of Authenticated Cell Culture (ECACC), Salisbury, UK ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA PAN-Biotech GmbH, Bayern, Germany
Ser fetal bovin (FBS/FCS)	ATCC, Manassas, US ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA PAN-Biotech GmbH, Bayern, Germany



Suplimente de creștere în cultură a celulelor (dependent de fiecare linie celulară)	ATCC, Manassas, US ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Soluție de antibiotice pentru culturi celulare (dependent de linia celulară)	ATCC, Manassas, US ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Soluție tripsină/EDTA (TE)	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Soluție Tripan blue 0,4%	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Etanol 70% (ca dezinfectant)	Chimopar SA, Bucharest, Romania ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Soluție tampon fosfat (PBS), pH=7,4 pentru culturi celulare	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Dimetilsulfoxid (DMSO)	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA Merck KGaA, Darmstadt, Germany
H ₂ O (apirogen)	Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany

*** Notă: Pot fi utilizați și reactivi/substanțe chimice echivalente de la alți furnizori.**

Consumabile	Producător
Plăci de cultură (75 cm ²)	Eppendorf, Hamburg, Germany
Plăci de cultură (25 cm ²)	Eppendorf, Hamburg, Germany
Plăci de cultură cu 96 de godeuri (cu fund plat), 6, 12 și 24 de godeuri (Eppendorf, Cyto-one)	Eppendorf, Hamburg, Germany Starlab Schweiz AG, Switzerland ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tuburi Falcon pentru centrifugă (15 mL)	Eppendorf, Hamburg, Germany ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tuburi Falcon pentru centrifugă (50 mL)	Eppendorf, Hamburg, Germany ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tuburi Eppendorf (1,5 mL, 2 mL, 5 mL)	Eppendorf, Hamburg, Germany
Suport tuburi	Eppendorf, Hamburg, Germany
Criotuburi (2 mL)	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Vârfuri pipete sterile	Eppendorf, Hamburg, Germany ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pipete serologice sterile (10 mL, 25 mL)	Eppendorf, Hamburg, Germany



Co-funded by
the European Union



	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pipete Pasteur sterile	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Tăvițe reactivi pentru pipetele multicanal	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Lamele pentru camera de numărare Countess™ Cell Counting	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Lamele de sticlă pentru camera de numărare Neubauer	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Numărător pentru celule manual	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Containere pentru gunoi	
Marker permanent	
Creioane	
Manuși de nitril sterile	
Mănuși speciale pentru manipularea azotului lichid	
Echipament de protecție pentru personalul care lucrează în laborator (halat de laborator/ halat tip pelerină, botoși de unică folosință pentru încălțăminte, mască de protecție și ochelari de protecție pentru manipularea azotului lichid)	

*** Notă: Pot fi utilizate și consumabile echivalente ale altor furnizori. Toate consumabilele trebuie să fie sterile atunci când sunt utilizate pentru culturi celulare.**

Echipament/ Etichetare	Producător
Hotă cu flux laminar pentru culturi celulare (Microflow ABS Class II Cabinet ABS 1500 CLS2- MK2)	Bioquell UK LTD
Incubator pentru culturi celulare (Binder CB-170)	BINDER GmbH, Germany
Microscop inversat cu fază de contrast și fluorescență (Olympus IX73 and Cytation 1)	Olympus, Tokyo, Japan BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA
Baie de apă (Raypa)	R. Espinar, S.L., Spain
Centrifugă (Boeco S-8)	Boeco, Hamburg, Germany
Centrifugă cu modul de răcire (Hermle Centrifuge Z 326 K)	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany
Frigider (4°C)	Arctic, Romania



Congelator (-20°C)	Arctic, Romania
Congelator (-80°C) (Ultra Low Temperature Freezer MDF-U3386S)	Sanyo, Osaka, Japan
Tanc stocare azot lichid (MVE Cryosystem 750)	MVE Biological Solutions, GA 30107
Cameră de numărare celule (Neubauer chamber)	Neubauer Hemacytometer
Numărător automat de celule (Countess II FL Automated Cell Counter)	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pipete cu volum ajustabil	Eppendorf, Hamburg, Germany
Pipete multicanal	Eppendorf, Hamburg, Germany
Suport pentru pipete serologice (Easypet® 3)	Eppendorf, Hamburg, Germany
Balanță analitică (Sartorius CP 324S)	Sartorius, Göttingen, Germany
Container de înghețat criotuburile cu celule de tip Mr. Frosty	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Autoclavă (Pol-EKO SLW 53)	POL-EKO®, Wodzisław Śląski, Poland

* **Notă: Pot fi utilizate și echipamente echivalente ale altor furnizori.**

4.2.3. Etapele protocolului de lucru descrise în detaliu

Note generale!!! Pentru fiecare linie celulară achiziționată trebuie urmat protocolul recomandat de producător!!! Toate soluțiile și echipamentele care vin în contact cu celulele trebuie să fie sterile!!! Dacă nu se specifică altfel, toate procedurile trebuie efectuate în hota cu flux laminar, celulele trebuie păstrate în incubatoare umidificate la 37°C, 5 % CO₂ și 95 % umiditate, iar mediul de creștere complet trebuie preîncălzit în baia de apă la 37°C timp de 30 min!!! Toate articolele care vor fi introduse în hota cu flux laminar trebuie decontaminate cu EtOH 70%!!! Pe toată durata protocolului de lucru efectuat în laborator, personalul trebuie să poarte echipamentul individual de protecție!!!

A. Instrucțiuni pentru prima cultivare a celulelor - Procedura de dezghețare a celulelor din criotuburi după primire

🕒 **Durată 30 min – 1 oră**

- 1) se pregătește mediul de creștere complet specific liniei celulare conform fișei tehnice și se preîncălzește în baia de apă la 37°C (!!! Mediul se prepară în condiții aseptice în hota cu flux laminar!!!)



- 2) se pune un tub de centrifugă steril (tub Falcon de 15 mL) în hota cu flux laminar și se adaugă 10 mL de mediu de creștere complet cald în tub (*!!! Se scrie pe tub cu marker permanent numele liniei celulare!!!*)
- 3) se pregătește o placă de cultură sterilă adecvată (flask 25 cm²) prin adăugarea a 10 mL de mediu complet de creștere (*!!! Dacă în fișa tehnică se recomandă un volum diferit de mediu, atunci trebuie urmate instrucțiunile de la producător!!!*). Tipul de placă de cultură sau cantitatea de mediu de creștere pot fi dependente de linia celulară. Pe placă trebuie scrise cu marker permanent următoarele: data procedurii de dezghețare, numele/codul liniei celulare, numărul de pasaj și numele persoanei care a efectuat procedura.
- 4) se transferă criotubul care conține celulele înghețate achiziționate/primate din recipientul de depozitare (gheață carbonică sau azot lichid) într-o baie de apă caldă setată la 37°C (*!!! Se folosesc mănuși de protecție și o mască de protecție la manipularea azotului lichid!!!*)

Atenție!!! Criotuburile cu celule înghețate trebuie manipulate unul câte unul; nu se dezgheață două sau mai multe criotuburi deodată!!!

- 5) se ține criotubul în baia de apă < 1 minut și se dezgheață conținutul rotind ușor până când a rămas puțină gheață în criotub
- 6) se transferă criotubul în hota cu flux laminar și se dezinfectează cu EtOH 70% înainte de deschidere
- 7) se transferă celulele dezghețate din criotub picătură cu picătură în tubul de centrifugă pregătit anterior (etapa 2). Se rotește ușor tubul în timp ce se adaugă picăturile pentru a reduce șocul osmotic asupra celulelor. *!!! Acesta este un pas crucial și celulele trebuie manipulate cât mai ușor posibil!!!*
- 8) se verifică criotubul pentru a fi asigurat că tot conținutul a fost îndepărtat și, dacă nu, se clătește cu 1 mL de mediu complet de creștere specific liniei celulare
- 9) se centrifughează celulele la 1700 rpm timp de 5-10 minute (în funcție de linia celulară – informații găsite în fișa tehnică a liniei celulare)
- 10) se aruncă ușor supernatantul în recipientul pentru deșeuri plasat în hota cu flux laminar fără a perturba sedimentul de celule
- 11) se resuspendă ușor sedimentul în 1-2 mL de mediu de creștere complet și se transferă suspensia în placa de cultură pregătită anterior (etapa 3). Se mișcă placa ușor, dintr-



Co-funded by
the European Union



o parte în alta și înainte și înapoi (!!! mediul nu ar trebui să intre în dop!!!) pentru a distribui celulele uniform pe placă și se incubează la 37°C și 5 % CO₂.

Atenție!!! Se recomandă fotografiarea celulelor imediat după dezghețare, la 24 și 48 de ore și când se atinge 70-80% confluență (Figura 4.3)!!!

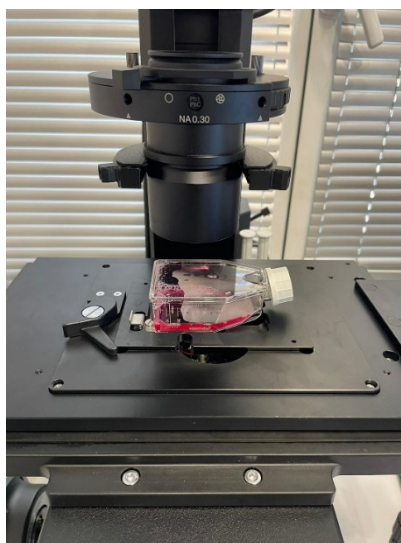


Figura 4.3. Evaluarea aspectului celulelor folosind microscopul inversat după procedura de decongelare a celulelor.

!!! Sfaturi în caz de probleme tehnice/experimentale!!!



Probleme	Cauze potențiale	Soluții
Nu există celule viabile după decongelare stoc	Celulele au fost stocate/congelate incorect	Obțineți un stoc nou și depozitați-l în azot lichid. Păstrați celulele în azot lichid până la decongelare.
	Stocul de celule congelate nu este viabil	Congelați celulele la densitatea recomandată de furnizor. Utilizați celule la pasaj mic pentru a vă face propriile stocuri de celule congelate. Urmați procedurile pentru înghețarea celulelor exact așa cum este recomandat de furnizor. Obțineți un stoc nou.
	Celulele nu au fost dezghețate corect	Urmați procedurile pentru dezghețarea celulelor exact așa cum este recomandat de furnizor. Asigurați-vă că dezghețați rapid celulele înghețate, dar diluați-le încet folosind mediu de creștere preîncălzit înainte de a le pune în placă.
	Mediu de dezghețare nu a fost preparat corect	Utilizați mediul recomandat de furnizor. Asigurați-vă că mediul este preîncălzit.
	Suspensia de celule a fost prea diluată	Cultivați celulele dezghețate la o densitate mare, conform recomandărilor furnizorului pentru a optimiza recuperarea.
	Celule nu au fost manipulate delicat	Procedurile de congelare și dezghețare sunt stresante pentru majoritatea celulelor. Nu vortexați, nu loviți plăcile pentru a desprinde celulele (cu excepția perioadei de cultură celule de insecte) și nu centrifugați celulele la viteze mari.
	Glicerolul folosit în mediul de congelare a fost păstrat la lumină	Dacă este păstrat la lumină, glicerolul este transformat în acroleină, care este toxică pentru celule. Obțineți stocuri noi.
Celulele cresc încet	Mediu de creștere este incorect	Utilizați mediu de creștere preîncălzit așa cum este recomandat de furnizor.
	Serul din mediul de creștere este de calitate redusă	Utilizați ser dintr-un lot diferit.
	Celulele au fost subcultivate de prea multe ori	Folosiți celule sănătoase la pasaj mic.
	Celulele au fost lăsate să crească după ce au atins confluența	Subcultivați celulele atunci când acestea sunt în faza exponențială înaintea de a ajunge la confluență.
	Cultura este contaminată cu mycoplasma	Aruncați celulele, mediile și reactivii. Obțineți stocuri noi de celule și utilizați cu medii proaspete și reactivi.

Figura 4.4. Soluții potențiale pentru rezolvarea problemelor întâlnite în timpul procedurii de dezghețare a unei linii celulare [Gibco Cell Culture Basics].

B. Subcultivarea liniilor celulare aderente de mamifere

🕒 **Durata 30 min – 1 oră**

Când celulele ajung la o confluență corespunzătoare (70-80%), trebuie aplicat protocolul pentru subcultivare, după cum urmează:

- 12) se pregătește un tub Falcon steril – 15 mL și numărul de plăci de cultură (flask) necesar pentru cultivare. Atât tubul Falcon, cât și plăcile de cultură trebuie să fie etichetate (data procedurii de subcultivare, numele/codul liniei celulare, numărul de pasaje, numele persoanei care a efectuat procedura)



13) se ia placa cu celule din incubator și se verifică morfologia celulelor folosind un microscop inversat

Atenție!!! Se recomandă fotografierea celulelor imediat după decongelare, la 24 și 48 de ore și când se atinge 70-80% din confluență!!!

14) se aruncă vechiul mediu de creștere din placa de cultură folosind o pompă de vid sau o pipetă serologică sterilă atașată la suportul de pipetare (Easypet 3, Eppendorf)

15) se spală celulele cu soluție salină de tampon fosfat (PBS) fără Ca^{2+}/Mg^{2+} preîncălzită – 10 mL pentru plăcile de cultură de 75 cm² (T75) și 5 mL pentru plăcile de 25 cm² (T25). **!!! Soluția de PBS trebuie adăugată ușor pe partea opusă a plăcii față de unde sunt atașate celulele pentru a preveni detașarea acestora și spălarea se face balansând placa înainte și înapoi de mai multe ori!!! Dacă se știe că celulele aderă puternic la placă, se recomandă repetarea etapei de spălare!!!**

Atenție!!! Această etapă de spălare este obligatorie pentru a elimina urmele de ser bovin și alte componente ale mediului (calciu, magneziu) care inactivează acțiunea enzimei (soluție de tripsină/EDTA) folosită pentru detașarea stratului de celule.

16) se aruncă PBS-ul

17) se adaugă 3 mL de soluție de tripsină/EDTA (TE) (concentrația soluției de TE este menționată în fișa tehnică primită de la producător) pentru placa T75 și 1,5 mL pentru placa T25 și se rotește placa pentru a răspândi uniform soluția TE

18) se reintroduce placa în incubator timp de 2-10 minute (timpul de incubare depinde de linia celulară)

19) se examinează celulele la microscopul inversat pentru a verifica dacă toate celulele sunt detașate și plutesc. Când mai puțin de 90% din celule sunt detașate, timpul de incubare ar trebui să crească cu câteva minute, cu precizarea că examinarea pentru detașarea celulelor trebuie făcută la fiecare 30 de secunde!!! *Partea laterală a plăcii poate fi lovită ușor pentru a desprinde celulele aderente rămase!!!* (Figura 4.5).

Atenție!!! O expunere prelungită a celulelor la soluția de tripsină/EDTA ar putea deteriora receptorii de suprafață celulară!!! Neutralizarea soluției de tripsină/EDTA este obligatorie înainte de cultivarea celulelor, sau celulele nu se vor atașa!!!

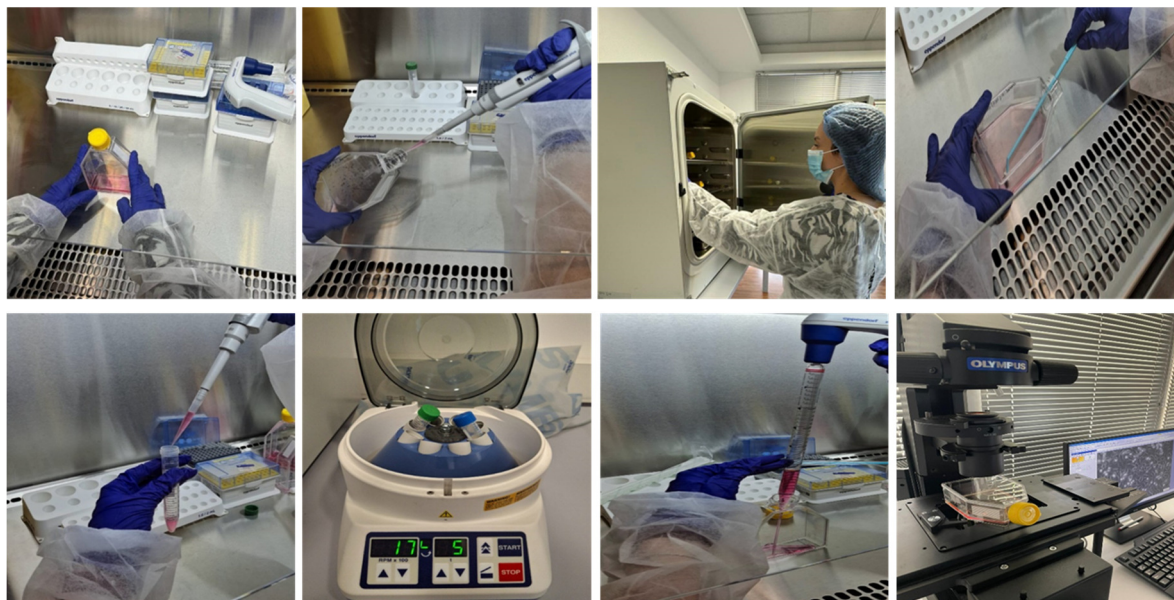


Figura 4.5. Imagini ale etapelor specifice procedurii de tripsinizare.

- 20) după detașarea celulelor $\geq 90\%$, trebuie adăugat 10 mL de mediu de creștere complet preîncălzit pentru placa T75 sau 5 mL pentru placa T25 pentru a inactiva efectul soluției TE (sau de două ori volumul soluției de TE adăugat în funcție de recomandarea producătorului) și dispersat mediul prin pipetare peste stratul celular de mai multe ori.
- 21) se transferă suspensia de celule în tubul Falcon – 15 mL pregătit anterior (etapa 12) și se centrifughează la 1700 rpm timp de 5 minute la temperatura camerei. *!!! Viteza și timpul de centrifugare sunt dependente de tipul liniei celulare!!!*
- 22) se aruncă supernatantul, se resuspendă sedimentul de celule într-un volum minim (1 mL) de mediu de creștere complet preîncălzit și se ia un volum (10 μL) de suspensie de celule pentru a efectua numărarea celulelor
- 23) determinarea numărului total de celule și a procentului de viabilitate poate fi efectuată utilizând un hemacitometru (camera Neubauer) în prezența soluției de Tripan blue sau prin numărare automată folosind Countess II FL Cell Counter.

Numărarea celulelor cu hemacitometru – camera Neubauer

- ❖ se curăță (folosind EtOH 70%) și se usucă bine hemacitometrul și lamela de acoperire înainte de utilizare
- ❖ se pregătește un tub Eppendorf (1,5 mL) etichetat cu numele liniei celulare în care se adaugă 50 μL de Tripan blue și 10 μL suspensie de celule și se amestecă prin pipetare.



- ❖ se transferă 10 μ L de amestec în camera specifică a hemacitometrului și se așează cu grijă lamela de acoperire pentru a evita formarea bulelor de aer
- ❖ se plasează hemacitometrul sub un microscop inversat și se vizualizează celulele la o rezoluție mare (40x sau 100x)
- ❖ se aduc în focus cadranele etichetate cu 1, 2, 3 și 4, așa cum se vede în Figura 4.6.

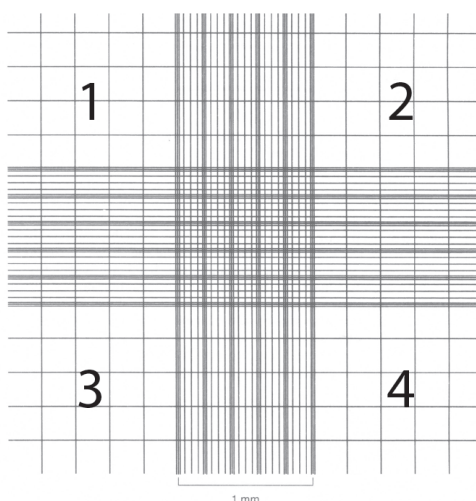


Figura 4.6. Hemacitometru (camera Neubauer) - cadranele de interes.

- ❖ se numără celulele din fiecare cadran folosind un numărător manual de celule
- ❖ numărul total de celule poate fi calculat folosind următoarea formulă:

**Numărul total de celule/mL = media numărului de celule obținute din numărarea
cadranelor X 10 000 X factor de diluție**

Numărarea celulelor folosind numărătorul automat de celule Countess II FL Cell Counter

- ❖ se pregătește un tub Eppendorf (1,5 mL) etichetat cu numele liniei celulare și se adaugă 50 μ L de Tripan blue și 10 μ L suspensie de celule și se amestecă prin pipetare.
- ❖ se transferă 10 μ L de amestec pe lamela specifică numărătorului automat
- ❖ se introduce lamela cu suspensia de celule în Countess II FL și se apasă butonul de citire
- ❖ în mai puțin de 1 minut se va obține automat numărul total de celule/mL și se va calcula în continuare numărul de celule corespunzător întregului volum de suspensie de celule prin multiplicare

De exemplu:

În 1 mL suspensie1 400 000 celule



În 3 mL suspensieX celule

X= 4 200 000 celule

- 24) se transferă numărul necesar de celule (densitatea de cultivare recomandată) într-o placă nouă etichetată pregătită anterior (etapa 12) care conține 10 mL mediu de creștere complet (T25) sau 18 mL – 20 mL mediu (T75) și se incubează celulele conform condițiilor recomandate
- 25) se repetă pașii 12-24 de fiecare dată când este necesară subcultivarea în funcție de caracteristicile de creștere ale liniei celulare
- 26) se examinează placa în ziua următoare pentru a verifica dacă celulele s-au reatașat și cresc activ
- 27) se schimbă mediul de creștere de câte ori este nevoie; de 2-3 ori pe săptămână este normal pentru majoritatea celulelor active în creștere.

Sfaturi utile!!!

- ❖ *Înainte de a începe procedura de subcultivare a unei linii celulare se verifică fișa produsului de la producător*
- ❖ *Majoritatea mediilor de creștere complete trebuie păstrate la 2°C până la 8°C timp de o lună și examinate periodic*
- ❖ *Nu se recomandă congelarea mediului complet de creștere, deoarece suplimentele adăugate pot precipita*
- ❖ *Examinarea culturilor ar trebui să includă:*
 - examinarea macroscopică a mediului pentru a verifica existența contaminării microbiene: modificări ale culorii mediului datorate modificărilor pH-ului (galben sau violet), turbiditate, particule, mici colonii fungice care plutesc
 - evaluarea microscopică a mediului: puncte mici, strălucitoare, negre în spațiile dintre celule indică o contaminare bacteriană; particule rotunjite și înmugurite – contaminare cu drojdie; și miceliu filamentos subțire - contaminare cu ciuperci
 - evaluarea microscopică a morfologiei celulelor: celulele aderente trebuie să fie ferm atașate de suprafața plăcii; unele celule sănătoase se rotunjesc și se desprind în timpul mitozei și sunt refractile, dar în urma mitozei se reatașează; celulele moarte se rotunjesc și plutesc în mediu și sunt mai mici și mai întunecate
 - ca referință, imagini ale diferitelor linii celulare pot fi găsite pe site-ul web al producătorului (de exemplu, ATCC)



- ❖ utilizarea regulată a antibioticelor pentru cultura celulară nu este recomandată decât dacă acestea sunt necesare în mod specific, datorită capacității lor de a masca contaminarea cu micoplasma și bacterii rezistente; se poate utiliza o concentrație finală de 50 până la 100 UI/mL penicilină și 50 până la 100 μg/mL streptomycină.
- ❖ serurile de origine bovină sunt utilizate în mod obișnuit pentru a susține creșterea celulelor în cultură. !!! Se utilizează ser riguros testat pentru agenți infecțioși și provenit numai din SUA!!!
- ❖ nu se permite acumularea deșeurilor în hotele cu flux laminar sau în incubatoare pentru a evita riscul de contaminare
- ❖ nu este recomandat să fie prea mulți oameni în laborator deodată
- ❖ se recomandă ca subcultivarea celulelor să se facă înainte ca acestea să devină complet confluențe (la 70-80% confluență) sau conform recomandărilor producătorului
- ❖ se evită păstrarea liniilor celulare în mod continuu în cultură fără a face stocuri la pasaj mic și nu se revine la stocurile înghețate
- ❖ se păstrează baia de apă curată
- ❖ se menține echipamentul calibrat
- ❖ *se stabilește un program regulat de testare a micoplasmei* [Geraghty et al., 2014; ATCC - Animal Cell Culture Guide; ECACC Handbook].

!!! Sfaturi în caz de probleme tehnice/experimentale!!! [ATCC - Animal Cell Culture Guide]

Tabel 2. Soluții potențiale pentru problemele întâlnite în timpul procedurii de subcultivare.

Probleme	Cauze potențiale	Soluții
Dificultate de a detașa celulele după adăugarea de soluție de tripsină/EDTA (TE).	Serul sau alte suplimente prezente în mediu inactivează TE	Spălați celulele de două ori cu soluție PBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+} înainte de a adăuga soluție TE. Utilizați soluția TE în loc de PBS pentru prima spălare.
	Soluția TE a fost prea slabă	Utilizați concentrații mai mari de enzime, concentrații mai mari de EDTA sau alte enzime. Incubarea la 37°C este, de asemenea, recomandată pentru a crește activitatea soluției TE.



	Celulele au fost prea confluențe pentru prea mult timp, iar joncțiunile celulă la celulă sunt foarte strânse	Subcultivați celulele înainte ca acestea să devină confluențe
Formarea de aglomerări de celule în urma disocierii cu soluția TE	Desprinderea a fost prea aspră și ADN-ul genomic a fost eliberat din celulele lezate	Adăugați o soluție sterilă de dezoxiribonuclează - DNază (1 mg/mL) la suspensia celulară pentru a distruge lanțurile de ADN formate
	Pipetarea a fost prea viguroasă	Efectuați etapa de pipetare mai ușor
	Soluția TE a fost prea concentrată sau prea toxică	Utilizați o soluție de TE mai puțin concentrată; se reduce perioada de incubație
	Agregarea celulelor înainte de diluare și resuspendare în mediu	Păstrați suspensia celulelor pe gheață dacă va exista o întârziere între momentul detașării celulelor și cultivarea într-o placă nouă
	Centrifugare lungă și dură	Centrifugare delicată
Probleme cu reatașarea celulelor la placă	Procedura de detașare a fost prea lungă și a afectat proteinele de atașare din membrana celulelor	Utilizați o placă acoperită cu proteine (colagen, poli-L-lizină, fibronectină, gelatină etc.).
	Ser insuficient sau alte componente cu proprietăți de atașare în mediul de creștere	Adăugarea de ser și factori de atașare în mediu.
	Soluția TE nu a fost inactivată sau aruncată după centrifugare	Adăugarea de ser sau de alți inhibitori de enzime, centrifugare și resuspendarea celulelor în mediu de creștere complet proaspăt
O viabilitate scăzută	Procedura de detașare a fost prea dură	Acționați mai ușor atunci când efectuați procedura Verificați sticla deschisă și/sau folosiți una nouă



pH-ul sau osmolalitatea soluției care conține soluția TE este greșită Păstrați celulele pe gheață

O perioadă lungă de lăsare a suspensiei de celule detașate la o concentrație celulară prea mare înainte de cultivare Pregătiți o sticlă nouă de mediu de creștere complet proaspăt

Mediul de creștere a fost specific liniei celulare în uz deteriorat

C. Protocolul de crioconservare a unei linii celulare aderente de mamifere

🕒 Durată 1 oră

!!! Pentru a efectua protocolul de crioconservare a unei linii celulare aderente, trebuie urmați pașii 12-23 descriși pentru procedura Subcultivarea unei linii celulare!!!

28) se pregătește un criotub etichetat care conține următoarele informații: data crioconservării, numele/codul liniei celulare, numărul de pasaje, numărul de celule, numele persoanei care a efectuat procedura (se utilizează un creion pentru a scrie pe criovial)

29) după numărarea celulelor și stabilirea numărului total, se centrifughează suspensia de celule la 1700 rpm timp de 5 minute. **!!!Viteza și timpul de centrifugare sunt dependente de tipul liniei celulare!!!**

30) se resuspendă celulele într-un volum adecvat de mediu de congelare (conform recomandării producătorului) și se adaugă 1710 μL de suspensie de celule în criotubul pregătit anterior (etapa 28) + 90 μL DMSO (dimetil sulfoxid – un agent crioprotector)

31) se pune criotubul în cutia Nalgene Mr. Frosty care a fost umplută cu izopropanol și se transferă Mr. Frosty în congelatorul -80°C peste noapte

32) se transferă celulele congelate în azot lichid

Atenție!!! Este obligatoriu ca celulele să fie sănătoase, lipsite de contaminanți și în faza logaritmică de creștere!!!



Sfaturi utile!!!

- ❖ *Se utilizează ca agent crioprotector DMSO – este cel mai frecvent utilizat, dacă producătorul recomandă altfel, se urmează instrucțiunile acestuia*
- ❖ *Pentru a obține celule sănătoase și în fază de creștere logaritmică, se recomandă utilizarea culturilor pre-confluente (celule care sunt sub densitatea maximă) și prin schimbarea mediului de cultură cu 24 de ore înainte de procedura de crioconservare.*
- ❖ *alternativă a mediului de congelare este: 70% mediu bazal + 20% FBS + 10% DMSO, totuși mediul de congelare este dependent de tipul liniei celulare*
- ❖ *Celulele înghețate păstrate la peste -65°C se vor deteriora rapid [ATCC - Animal Cell Culture Guide; ECACC Handbook].*

4.3. TESTE *IN VITRO* PE CELULELE 2D

4.3.1. Teste de viabilitate celulară

Screening-ul diferitelor colecții de compuși, în principal medicamente, în ceea ce privește evaluarea impactului acestora asupra proliferării celulare sau a potențialului citotoxic se realizează folosind teste *in vitro* pe celule. O varietate de metode pot fi aplicate pentru a evalua numărul de celule viabile, cum ar fi: reducerea tetrazoliului, reducerea resazurinei, detectarea ATP și, de asemenea, citometria în flux și imagistica [Riss et al., 2016].

Viabilitatea celulară este un parametru care se referă la numărul de celule viabile/sănătoase dintr-o probă de testat și cuantificarea acestuia este adesea determinat în teste de toxicitate, aplicate pentru verificarea răspunsului celulelor la diferite medicamente sau substanțe chimice, sau pentru a corela comportamentul celulelor cu numărul de celule [Kamiloglu et al., 2020]. Testele de viabilitate celulară monitorizează diferite funcții celulare, cum ar fi: permeabilitatea membranei celulare, metabolismul sau activitatea enzimatică, producția de ATP, aderența celulară sau activitatea de absorbție a nucleotidelor [Adan et al., 2016; Kamiloglu et al., 2020]. În funcție de mecanismul de acțiune, testele de viabilitate celulară sunt clasificate în: (i) teste de marcă selectivă prin colorare (Trypan blue, eozină, roșu congo și eritrozină B); (ii) teste colorimetrice (MTT, MTS, WST-1, XTT, WST-8, LDH, sulforodamină B (SRB), neutral red (NRU)); (iii) teste luminometrice (testul ATP și teste de viabilitate în timp real) și testele fluorometrice (testul Alamar blue și CFDA-AM) [Aslanturk, 2017; Adan et al., 2016; Kamiloglu et al., 2020]

În secțiunile ulterioare ale prezentului ghid vor fi prezentate în detaliu mai multe teste de viabilitate celulară, precum: Trypan blue, bromura de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil



tetrazoliu (MTT) și Alamar blue care sunt utilizate frecvent în laboratorul de culturi celulare din cadrul centrului FARMTOX al UMFVBT.

Metoda Trypan blue (Albastru tripan)

Este o tehnică de marcarea selectivă prin colorare a celulelor moarte dezvoltată din 1975 pentru a determina numărul de celule viabile și încă se aplică pentru a confirma modificările numărului de celule viabile în urma expunerii la un medicament sau la un compus toxic. Această metodă prezintă multiple avantaje precum simplitate, costuri reduse și informații privind integritatea membranelor celulare [Aslanturk, 2017; Kamiloglu et al., 2020].

Principiul metodei: Albastrul tripan este o moleculă mare încărcată negativ care nu pătrunde în membrana celulară intactă a celulelor viabile, în timp ce celulele moarte sunt permeabile și devin colorate în albastru. Celulele moarte cu citoplasma colorată în albastru sunt observate prin microscopie și pot fi numărate folosind un numărător de celule manual sau automat [Aslanturk, 2017; Kamiloglu et al., 2020].

Etapele protocolului de lucru

🕒 Durata 2-4 zile (dependent de durata tratamentului – 24/48/72 ore)

!!! Pentru a determina viabilitatea unei linii celulare aderente folosind testul Trypan blue, pașii 12-22 descriși pentru procedura de subcultivare a unei linii celulare trebuie realizați!!! Tabelul de resurse cheie descris pentru dezghețarea/subcultivarea/crioconservarea unei linii celulare este necesar pentru acest test!!!

Pe scurt, trebuie efectuați următorii pași:

- (i) se curăță (folosind EtOH 70%) și se usucă bine hemacitometrul și lamela de acoperire înainte de utilizare
- (ii) se pregătește un tub Eppendorf (1,5 mL) etichetat cu numele liniei celulare și se adaugă 50 μ L de Trypan blue și 10 μ L suspensie de celule și amestecați prin pipetare
- (iii) se transferă 10 μ L de amestec în camera specifică a hemacitometrului și se așează cu grijă lamela pentru a evita formarea bulelor de aer
- (iv) se plasează hemacitometrul sub un microscop inversat și se vizualizează celulele la o rezoluție mare (40x sau 100x)
- (v) se aduc în focus cadranele etichetate cu 1, 2, 3 și 4, așa cum se vede în Figura 4.7
- (vi) se numără toate celulele din fiecare cadran folosind un numărător manual de celule

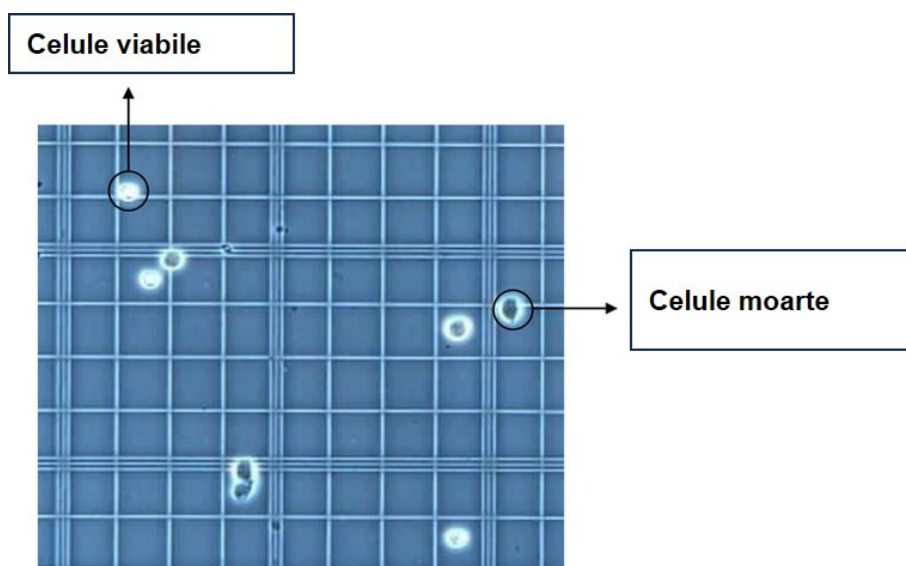


Figura 4.7. Principiul testului cu albastru tripan [Kamiloglu et al., 2020].

(vii) se numără celulele colorate cu albastru din fiecare cadran folosind un numărător manual de celule

(viii) viabilitatea celulară (%) ar trebui să fie de cel puțin 95% în cazul celulelor sănătoase în faza logaritmică de creștere.

Procentul de celule viabile poate fi calculat folosind următoarea formulă [Kamiloglu et al., 2020]:

$$\text{Celule viabile (\%)} = \frac{\text{numărul total de celule viabile per mL de probă}}{\text{numărul total de celule per mL de probă}} \times 100,$$

unde

$$\text{Numărul total de celule/mL} = \text{media numărului de celule obținute din numărarea cadranelor} \times 10\,000 \times \text{factor de diluție}.$$

Testul MTT - 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazoliu

Testul MTT reprezintă prima tehnică de viabilitate celulară dezvoltată pentru formatul cu 96 de godeuri, fiind foarte frecvent aplicat în studiile de cercetare ca test pentru evaluarea viabilității/proliferării celulare [Kamiloglu et al., 2020].

Principiul metodei: acest test se bazează pe măsurarea activității succinat dehidrogenazei (o enzimă unică cunoscută sub numele de Complex II care face parte din ciclul Krebs): sarea galbenă de tetrazoliu suferă o reacție chimică de reducere, rezultând cristale colorate în violet. Aceste cristale sunt apoi dizolvate și soluția rezultată este analizată prin măsurarea absorbantei [Aslantürk, 2017].



Reactivul MTT sau bromura de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazoliu este o sare de mono-tetrazoliu care poate trece prin membrana celulară și membrana internă mitocondrială a celulelor viabile și este redus ulterior la formazan de către celulele active metabolic. Produsul formazan se acumulează ca un precipitat insolubil care trebuie solubilizat înainte de citirea absorbției. Reacția chimică redox produsă în acest test oferă o măsurare colorimetrică a producției intracelulare de formazan și are în prezent o utilitate extinsă. [Ghasemi et al., 2021].

Materiale necesare pentru efectuarea testului în plus față de tabelul de resurse cheie descris pentru dezghețarea/subcultivarea/crioconservarea unei linii celulare:

- Kit de proliferare celulară (MTT) Roche (Merck KGaA, Darmstadt, Germania)
- Control pozitiv pentru inducerea morții celulare - SDS (0,05% în apă apirogenă, concentrație finală – 0,005%) sau Triton-X 100
- Cititor de plăci Cytation 5 (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, SUA)
- Control negativ – celule netratate
- Compuși test
- Selectarea solventului adecvat pentru solubilizarea compușilor de testat

* **Notă: Pot fi utilizați și reactivi, consumabile și echipamente echivalente ale altor furnizori.**

Etapele protocolului de lucru

🕒 Durata 2-4 zile (dependent de perioada tratamentului – 24/48/72 ore)

- (i) pregătirea mediului de creștere complet specific pentru fiecare linie celulară în conformitate cu protocolul producătorului
- (ii) subcultura liniei celulare în plăci de cultură (pașii 12-22 din protocolul de subcultivarea a unei linii celulare)
- (iii) numărarea celulelor manual utilizând hemacitometru sau automat cu Countess II FL **(pasul 23 din protocolul de subcultivare)**
- (iv) cultivarea celulelor la o densitate adecvată (specifică pentru fiecare linie celulară) - 1×10^4 celule/godeu/ 200 μ L mediu de creștere complet în plăci cu 96 de godeuri
- (v) inspecția microscopică a confluenței celulelor pentru a începe faza de stimulare/tratament
- (vi) prepararea diluțiilor compușilor de testat în tuburi Eppendorf sterile de 1,5 mL etichetate cu numele/codul compusului și concentrația



- (vii) prepararea soluției de control pozitiv (SDS sau Triton-X 100 – în funcție de recomandarea producătorului)
- (viii) realizarea unui template pentru placa corespunzătoare experimentului (evaluarea diferitelor concentrații de compuși test) care include: control negativ (celule netratate), control pozitiv (soluții SDS sau Triton-X 100), control (godeuri care conțin doar mediu de creștere), seria de diluții pentru compușii de testat și seria de diluții pentru solvent
- (ix) când celulele ating confluența corespunzătoare (70-80%), mediul vechi este aruncat și înlocuit cu mediu de creștere proaspăt care conține compușii de testat (în triplicat) și, respectiv, diluțiile de solvenți
- (x) incubarea plăcii timp de 24/48/72 ore (în funcție de scopul cercetării) la 37°C și 5 % CO₂
- (xi) după perioada de incubare, mediul este îndepărtat și se adaugă 100 μL de mediu de creștere complet în toate godeurile
- (xii) morfologia celulelor este verificată cu ajutorul microscopului inversat și sunt realizate imagini pentru a detecta modificările potențiale în urma tratamentului aplicat
- (xiii) se adaugă un volum de 10 μL de soluție MTT (kit 1 MTT) în fiecare godeu și celulele sunt incubate timp de 3 ore la 37°C și 5 % CO₂ (Figura 4.8)

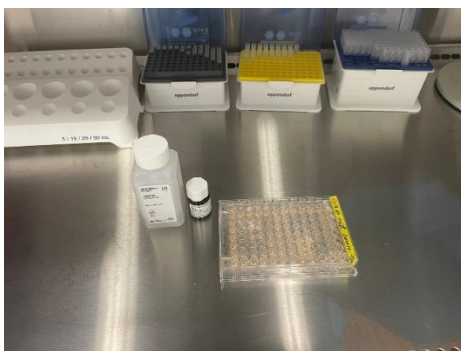


Figura 4.8. Adăugarea de kit-1 MTT în fiecare godeu (10 μl/godeu)

- (xiv) după cele 3 ore de incubare, se adaugă 100 μL de agent de solubilizare (kit 2) în fiecare godeu pentru a dizolva cristalele de formazan și placa este incubată încă 30 de minute ferită de lumină la temperatura camerei (Figura 4.9)

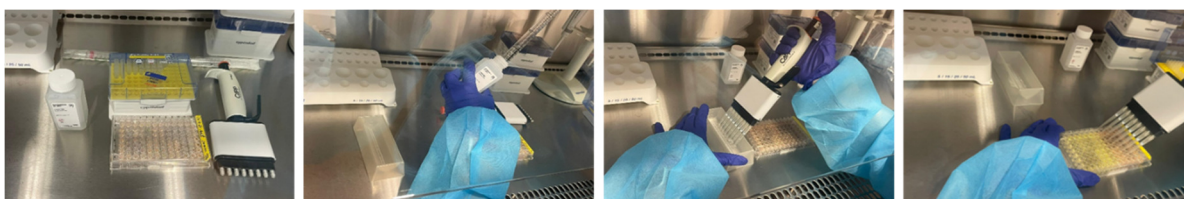


Figura 4.9. Adăugarea kit-2 MTT în fiecare godeu (100 μL/godeu)



(xv) absorbanța este citită la 570 nm folosind cititorul Cytation 5 (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, SUA) (Figura 4.10).



Figura 4.10. Citirea absorbanței la 570 nm.

(xvi) procentul de viabilitate celulară este calculat folosind următoarea formulă [Kamiloglu et al., 2020], unde OD este valoarea absorbanței măsurată:

$$\text{Viabilitatea (\%)} = \frac{\text{media valorilor absorbanței probei}}{\text{media valorilor absorbanței controlului negativ (celule netratate)}} \times 100$$

(xvii) interpretarea datelor: valorile absorbanței care sunt mai mici decât cele pentru celulele de control indică o reducere a ratei de proliferare a celulelor; invers, o rată de absorbție mai mare indică o creștere a proliferării celulare [MTT Cell Proliferation Assay ATCC® 30-1010K]

!!! Sfaturi în caz de probleme tehnice/experimentale!!! [MTT Cell Proliferation Assay ATCC® 30-1010K]



Problemă: Reactivul MTT este albastru-verde.

Cauze potențiale	Soluții
Contaminare cu un agent reducător sau cu celule/contaminare bacteriană	Aruncă. Folosiți stocuri noi de reactiv MTT folosind metode aseptice
Expunere excesivă la lumină.	A se păstra soluția la întuneric la 4°C.

Problemă: Blankurile (doar mediu) oferă citiri de absorbantă ridicată.

Cauze potențiale	Soluții
Mediul este contaminat cu celule/ bacterii/drojdii (vizibile la microscop).	Aruncă. Verificați mediul înainte de cultivare. Realizați procedura într-un mediu steril. Utilizați o placă sterilă cu 96 de godeuri.
Mediul conține acid ascorbic.	Incubează placa la întuneric. Găsește un mediu înlocuitor dacă este posibil.

Problemă: Valorile absorbantei sunt prea mari.

Cauze potențiale	Soluții
Număr prea mare de celule în godeu.	Se reduce densitatea celulelor la cultivare.
Contaminarea culturii cu bacterii sau drojdii.	Se aruncă. Se verifică godeurile înainte de adăugarea reactivului MTT.

Problemă: Valorile absorbantei sunt prea mici.

Cauze potențiale	Soluții
Număr prea mic de celule în godeu.	Se crește densitatea la cultivare.
Timpu de incubare cu MTT este prea scurt. Nicio culoare violet vizibilă în celule când sunt privite la microscop.	Măriți timpul de incubare cu reactiv MTT până când culoarea violet este evidentă în interiorul celulelor când sunt privite la microscop. Incubarea mai lungă de până la 24 de ore poate fi necesară pentru unele tipuri de celule.
Timpu de incubare pentru solubilizarea formazanului prea scurt (celule intacte cu colorant intracelular vizibil atunci când sunt privite la microscop).	Creșteți timpul de incubare cu detergent reactiv sau incubați la 37°C. Verificare la microscop pentru a se asigura că nu rămân cristale din soluție.
Celulele nu proliferază din cauza condițiilor de cultură necorespunzătoare sau timpului inadecvat de recuperare după cultivare.	Verificați dacă condițiile de cultură (mediu, temperatura, umiditatea, CO2 etc.) sunt adecvate. Vizualizați celulele periodic pentru a le verifica starea. Creșteți timpul în cultură după cultivare pentru recuperarea celulelor.

Problemă: Valori diferite în godeurile replicat.

Cauze potențiale	Soluții
Pipetare sau cultivare incorectă.	Creșterea preciziei la cultivarea celulelor, verificarea acurateții pipetei.

Figura 4.11. Sfaturi de soluționare a problemelor apătute în timpul testului MTT.

Metoda Alamar blue

Această tehnică este cunoscută și sub numele de testul de reducere a resazurinei. Resazurina este un colorant fenoxazin-3-onă și un indicator redox permeabil celular netoxic. Acest compus poate fi utilizat pentru a determina numărul de celule viabile aplicând protocoale similare cu cele care utilizează compușii de tetrazoliu [Aslanturk, 2017].

Principiul metodei: după pătrunderea în celule, resazurina este redusă la resorufin. Resorufinul are o culoare roșie și este un compus cu o fluorescență ridicată. Celulele viabile transformă continuu resazurina în resorufin, crescând fluorescența generală și culoarea mediului de cultură. Cantitatea de resorufin produsă proporțională cu numărul de celule viabile [Aslanturk, 2017].



Etapele protocolului de lucru

- 🕒 **Durata 2-4 zile (dependent de perioada de tratament – 24/48/72 ore)**
- (i) pregătirea mediului de creștere complet specific pentru fiecare linie celulară în conformitate cu protocolul producătorului
 - (ii) subcultivarea liniei celulare în plăci de cultură (pașii 12-22 din protocolul de subcultivarea a unei linii celulare)
 - (iii) numărarea celulelor manual utilizând hemacitometru sau automat cu Countess II FL **(pasul 23 din protocolul de subcultivare)**
 - (iv) cultivarea celulelor la o densitate adecvată (specifică pentru fiecare linie celulară) - 1×10^4 celule/godeu/ 200 μ L mediu de creștere complet în plăci cu 96 de godeuri
 - (v) inspecția microscopică a confluenței celulelor pentru a începe faza de stimulare/tratament
 - (vi) prepararea diluțiilor compușilor de testat în tuburi Eppendorf sterile de 1,5 mL etichetate cu numele/codul compusului și concentrația
 - (vii) prepararea soluției de control pozitiv (SDS sau Triton-X 100 – în funcție de recomandarea producătorului)
 - (viii) realizarea unui template pentru placa corespunzătoare experimentului (evaluarea diferitelor concentrații de compuși test) care include: control negativ (celule netratate), control pozitiv (soluții SDS sau Triton-X 100), control (godeuri care conțin doar mediu de creștere), seria de diluții pentru compușii de testat și seria de diluții pentru solvent
 - (ix) când celulele ating confluența corespunzătoare (70-80%), mediul vechi este aruncat și înlocuit cu mediu de creștere proaspăt care conține compușii de testat (în triplicat) și, respectiv, diluțiile de solvenți
 - (x) incubarea plăcii timp de 24/48/72 ore (în funcție de scopul cercetării) la 37°C și 5 % CO₂
 - (xi) după perioada de incubare, mediul este îndepărtat și se adaugă 200 μ L de mediu de creștere complet în toate godeurile
 - (xii) morfologia celulelor este verificată cu ajutorul microscopului inversat și sunt realizate imagini pentru a detecta modificările potențiale în urma tratamentului aplicat
 - (xiii) se adaugă în fiecare godeu un volum de 10 μ L de Alamar blue și celulele sunt incubate timp de 3 ore la 37°C și 5 % CO₂
 - (xiv) absorbanta este apoi citită la 570 și 600 nm. [<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/AlamarBluePIS.pdf>]



(xv) procentul de celule viabile este calculat folosind următoarea formulă:

$$\text{Procentul de celule viabile (\%)} = \left\{ \frac{[(\epsilon_{OX})\lambda_2 A\lambda_1 - (\epsilon_{OX})\lambda_1 A\lambda_2 \text{ a diluției compusului test}]}{[(\epsilon_{OX})\lambda_2 A^\circ\lambda_1 - (\epsilon_{OX})\lambda_1 A^\circ\lambda_2 \text{ a controlului negativ (celule netratate)}]} \right\} \times 100,$$

unde: ϵ_{OX} = coeficient molar de extincție a formei oxidate a Alamar blue (BLUE)

A = absorbanta godeurilor cu compuși test

A° = absorbanta godeurilor de control negativ (celule netratate)

$\lambda_1 = 570 \text{ nm}$ și $\lambda_2 = 600 \text{ nm}$ [Iftode et al., 2021].

4.3.2. Metode de colorare prin imunofluorescență pentru evaluarea morfologiei celulare

Imunofluorescența este o metodă de colorare cunoscută încă din anii 1950, considerată un instrument excelent în experimentele preclinice, biologia modernă și domeniile conexe ale cercetării medico-farmaceutice. De asemenea, poate fi descrisă ca o combinație de tehnologie morfologică și tehnici de imunofluorescență pentru dezvoltarea celulelor fluorescente. Această metodă permite vizualizarea mai multor componente ale unui țesut sau ale unei celule (nuclei, proteine, acizi nucleici sau alte componente celulare). Printre avantajele tehnicii de imunofluorescență se menționează amplificarea ridicată a semnalului, specificitatea țintită, rezoluția ridicată și capacitățile analitice [Im et al., 2019].

În general, principiul procedurii se bazează pe utilizarea anticorpilor fluorescenți specifici pentru a observa impactul probelor test asupra expresiei markerilor celulari.

În secțiunile ulterioare vor fi prezentate mai multe teste aplicate pentru vizualizarea prin colorare prin imunofluorescență a nucleului și a caracteristicilor citoscheletice ale celulelor cultivate aderente în prezența sau absența unui compus/tratament specific.

Colorarea nucleului

Metoda Hoechst 33342

Hoechst 33342 (2'-[4-etoxifenil]-5-[4-metil-1-piperazinil]-2,5'-bi-1H-benzimidazol triclrorhidrat trihidrat) este un colorant permeabil pentru celule care se leagă de secvențele de adenină-timină (AT) ale ADN-ului dublu catenar, fiind utilizat frecvent drept colorant nuclear cu fluorescență albastră la 460-490 nm. Este bine cunoscut, în special, pentru identificarea nucleelor condensate în celulele apoptotice. Colorantul Hoechst 33342 este utilizat pentru testele pe celule vii și este permeabil pentru celule [Thermo Fisher Scientific Hoechst 33342 protocol].



Principiul metodei: după adăugarea la celulele din cultură, colorantul Hoechst 33342 intră în celulă și se concentrează în nucleu, permițând vizualizarea acestuia în albastru; este considerat un indicator al stării nucleului și poate fi folosit și pentru a evalua starea ciclului celular sau în testele de apoptoză.

Materiale necesare pentru efectuarea testului în plus față de tabelul de resurse cheie descris pentru dezghețarea/subcultivarea/crioconservarea unei linii celulare:

- reactiv Hoechst 33342 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, SUA)
- Control pozitiv pentru inducerea apoptozei - soluție de staurosporină (5 μ M; Merck KGaA, Darmstadt, Germania) sau necroză Triton-X 100 (0,5%; Merck KGaA, Darmstadt, Germania)
- Microscop automat Lionheart FX (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, SUA)
- Control negativ – celule netratate
- Compuși test
- Selectarea solventului adecvat pentru solubilizarea compușilor de testat

* **Notă: Pot fi utilizați și reactivi, consumabile și echipamente echivalente ale altor furnizori.**

Etapele protocolului de lucru

- (i) pregătirea mediului de creștere complet specific pentru fiecare linie celulară în conformitate cu protocolul producătorului
- (ii) subcultivarea liniei celulare în plăci de cultură (pașii 12-22 din protocolul de subcultivare a unei linii celulare)
- (iii) numărarea celulelor manual utilizând hemacitometru sau automat cu Countess II FL **(pasul 23 din protocolul de subcultivare)**
- (iv) cultivarea celulelor la o densitate adecvată (specifică pentru fiecare linie celulară) - 1×10^5 celule/godeu/ 1,5 mL mediu de creștere complet în plăci cu 12 godeuri
- (v) inspecția microscopică a confluenței celulelor pentru a începe faza de stimulare/tratament
- (vi) prepararea diluțiilor compușilor de testat în tuburi Eppendorf sterile de 1,5 mL etichetate cu numele/codul compusului și concentrația
- (vii) prepararea soluției de control pozitiv (5 μ M Staurosporine și 0,5% Triton-X 100 – în funcție de recomandarea producătorului)
- (viii) realizarea unui template pentru placa corespunzătoare experimentului (evaluarea diferitelor concentrații de compuși de testat) care include: control negativ (celule



- netratate), control pozitiv (5 μM Staurosporine și 0,5% Triton-X 100), diluții ale compușilor test și seria de diluții pentru solvent
- (ix) când celulele ating confluința corespunzătoare (70-80%), mediul vechi este aruncat și înlocuit cu mediu de creștere proaspăt care conține compușii test și, respectiv, diluțiile solventului
- (x) incubarea plăcii timp de 24/48/72 ore (în funcție de scopul cercetării) la 37°C și 5 % CO_2 .
- (xi) după incubare, mediul de cultură este aruncat din fiecare godeu
- (xii) soluția de colorare preparată (soluție stoc Hoechst 20 mM diluată în PBS 1:2000) este adăugată în fiecare godeu într-un volum adecvat (300 – 500 μL) pentru a acoperi celulele
- (xiii) placa este incubată timp de 5-10 minute într-un loc ferit de lumină directă la temperatura camerei
- (xiv) după timpul de incubare, soluția Hoechst 33342 este îndepărtată
- (xv) fiecare godeu este apoi spălat de 2-3 ori cu 1,5 mL soluție PBS
- (xvi) etapa finală este fotografierea celulelor utilizând microscopul inversat sau dispozitive speciale în acest scop

[<https://www.thermofisher.com/ro/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/hoechst-33342-imaging-protocol.html>]

Atenție!!! Protocolul de colorare cu Hoechst 33342 poate fi realizat și în formate de plăci cu 96 sau 6 godeuri cu mențiunea că numărul de celulele cultivate și volumul de reactivi trebuie ajustate corespunzător.!!!

DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)

DAPI este folosit în biologia modernă, în tehnici *in vitro*, drept colorant fluorescent albastru pentru ADN. Poate fi utilizat pentru analiza nucleului celular, cuantificarea apoptozei sau analiza la nivel de ADN. Este utilizat la colorarea celulelor fixate și este impermeabil pentru celule.

Principiul metodei: colorația DAPI trece prin membrana celulelor intacte și se leagă de lanțurile de ADN situate în nucleu și emite o fluorescență albastră. Poate fi folosit pentru colorarea atât a celulelor vii, cât și a celulelor fixate (necesită fixare și permeabilizare).

Materiale necesare pentru efectuarea testului în plus față de tabelul de resurse cheie descris pentru dezghețarea/subcultivarea/crioconservarea unei linii celulare:

- Soluția DAPI (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)



Atenție!!! Soluția stoc DAPI (5 mg/mL) poate fi obținută folosind apă deionizată (diH₂O) sau dimetilformamidă (DMF) ca solvent. DAPI are o solubilitate redusă în apă, de aceea se recomandă sonicarea pentru a se dizolva. Soluția stoc DAPI de 5 mg/mL poate fi păstrată la 2–6°C timp de până la 6 luni sau la –20°C pentru perioade mai lungi!!!

- Control pozitiv pentru inducerea apoptozei - soluție de staurosporină (5 μM; Merck KGaA, Darmstadt, Germania) sau necroză Triton-X 100 (0,5%; Merck KGaA, Darmstadt, Germania)
- Microscop automat Lionheart FX (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, SUA)
- Control negativ – celule netratate
- Compuși test
- Selectarea solventului adecvat pentru solubilizarea compușilor test.

* **Notă: Pot fi utilizați și reactivi, consumabile și echipamente echivalente ale altor furnizori.**

Etapele protocolului de lucru

- (i) pregătirea mediului de creștere complet specific pentru fiecare linie celulară în conformitate cu protocolul producătorului
- (ii) subcultivarea liniei celulare în plăci de cultură (pașii 12-22 din protocolul de subcultivare a unei linii celulare)
- (iii) numărarea celulelor manual utilizând hemacitometru sau automat cu Countess II FL (**pasul 23 din protocolul de subcultivare**)
- (iv) cultivarea celulelor la o densitate adecvată (specifică pentru fiecare linie celulară) - 1x10⁵ celule/godeu/ 1,5 mL mediu de creștere complet în plăci cu 12 godeuri
- (v) inspecția microscopică a confluenței celulelor pentru a începe faza de stimulare/tratament
- (vi) prepararea diluțiilor compușilor de testat în tuburi Eppendorf sterile de 1,5 mL etichetate cu numele/codul compusului și concentrația
- (vii) prepararea soluției de control pozitiv (5 μM Staurosporine și 0,5% Triton-X 100 – în funcție de recomandarea producătorului)
- (viii) realizarea unui template pentru placa corespunzătoare experimentului (evaluarea diferitelor concentrații de compuși de testat) care include: control negativ (celule netratate), control pozitiv (5 μM Staurosporine și 0,5% Triton-X 100), diluții ale compușilor test și seria de diluții pentru solvent



- (ix) când celulele ating confluența corespunzătoare (70-80%), mediul vechi este aruncat și înlocuit cu mediu de creștere proaspăt care conține compuşii test și, respectiv, diluțiile solventului
- (x) incubarea plăcii timp de 24/48/72 ore (în funcție de scopul cercetării) la 37°C și 5 % CO₂.
- (xi) după incubare, mediul de cultură este aruncat din fiecare godeu și celulele sunt spălate de 2-3 ori cu 1,5 mL PBS
- (xii) adăugarea a 300 nM de soluție DAPI/godeu în volumul adecvat pentru a acoperi toate celulele
- (xiii) placa este incubată până la 5 minute într-un loc ferit de lumina directă
- (xiv) soluția de colorare este aspirată
- (xv) celulele sunt spălate cu PBS de 2-3 ori
- (xvi) celulele sunt fotografiate folosind un microscop cu fluorescență inversată sau Cytation 1 [<https://www.thermofisher.com/ro/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/dapi-imaging-protocol.html>]

Atenție!!! Protocolul de colorare DAPI poate fi realizat și în formate de plăci cu 96 sau 6 godeuri cu mențiunea că numărul de celule cultivate și volumul de reactivi trebuie ajustate corespunzător!!!

Colorarea citoscheletului

Citoscheletul este o matrice care susține forma și funcția celulelor care îndeplinesc roluri esențiale în transportul organitelor, în diviziune, motilitate și semnalizare, precum și în sănătatea celulară și procesele bolii.

Colorarea cu TexasRed™-X Phalloidin pe celulele fixate

Colorarea Texas Red-X phalloidin este folosită pentru cuantificarea F-actinei, colorația este compatibilă cu alți coloranți fluorescenți utilizați *in vitro*. Această metodă este utilizată pentru diferențierea cu contrast ridicat a colorării cu actină. În general, Texas Red-X phalloidin poate fi aplicată în combinație cu alți coloranți pentru observații mai ample și analize cu o mai mare specificitate.

Principiul metodei: Faloidina este o peptidă biciclică și se leagă de F-actina cu selectivitate ridicată, permițând vizualizarea fibrelor de actină în fluorescență roșie. Faloidina nu este un reactiv permeabil pentru celule, de aceea se recomandă fixarea și permeabilizarea celulelor



înainte de adăugarea colorantului Texas Red-X phalloidin
[[https://assets.thermofisher.com/TFS-](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0001777_Phalloidins_UG.pdf)

[Assets/LSG/manuals/MAN0001777_Phalloidins_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0001777_Phalloidins_UG.pdf)].

Materiale necesare pentru efectuarea testului în plus față de tabelul de resurse cheie descris pentru dezghețarea/subcultivarea/crioconservarea unei linii celulare:

- Texas Red-X phalloidin (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Microscop automat Lionheart FX (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)
- Control negativ – celule netratate
- Compuși test
- Selectarea solventului adecvat pentru solubilizarea compușilor test.

*** Notă: Pot fi utilizați și reactivi, consumabile și echipamente echivalente ale altor furnizori.**

Etapele protocolului de lucru

- (i) pregătirea mediului de creștere complet specific pentru fiecare linie celulară în conformitate cu protocolul producătorului
- (ii) subcultivarea liniei celulare în plăci de cultură (pașii 12-22 din protocolul de subcultivare a unei linii celulare)
- (iii) numărarea celulelor manual utilizând hemacitometru sau automat cu Countess II FL **(pasul 23 din protocolul de subcultivare)**
- (iv) cultivarea celulelor (1×10^4 celule/godeu/ 200 μ L) în plăci negre cu 96 de godeuri transparente cu fund plat de sticlă
- (v) inspecția microscopică a confluenței celulelor pentru a începe faza de stimulare/tratament
- (vi) prepararea diluțiilor compușilor de testat în tuburi Eppendorf sterile de 1,5 mL etichetate cu numele/codul compusului și concentrația
- (vii) realizarea unui template pentru placa corespunzătoare experimentului (evaluarea diferitelor concentrații de compuși de testat) care include: control negativ (celule netratate), serii de diluții pentru compușii test și serii de diluții pentru solvent
- (viii) când celulele ating confluența corespunzătoare (70-80%), mediul vechi este aruncat și înlocuit cu mediu de creștere proaspăt care conține compușii test și, respectiv, diluțiile solventului
- (ix) incubarea plăcii timp de 24/48/72h (în funcție de scopul cercetării) la 37°C și 5 % CO₂



- (x) după perioada de incubare, mediul de cultură este îndepărtat și celulele sunt spălate cu PBS de două ori
- (xi) proba este fixată cu soluție de formaldehidă fără metanol 3,7% în PBS timp de 15 minute la temperatura camerei - 100 μ L/godeu
- (xii) se spală de 2x cu PBS
- (xiii) se incubează placa cu soluție de blocare care conține 1% BSA în PBS timp de aproximativ 45 de minute la temperatura camerei într-un volum de 100 μ L/godeu
- (xiv) apoi placa este incubată în soluția de colorare timp de 30-60 de minute la temperatura camerei
- (xv) se spală de 2x cu PBS
- (xvi) dacă este necesar, adăugați un colorant ADN (pentru analiza nucleului). De exemplu, se poate adăuga **DAPI** (colorarea efectuată conform pașilor descriși mai sus în secțiunea - **Colorarea DAPI**)
- (xvii) se fotografiază celulele (depozitarea adecvată a plăcilor timp de aproximativ o lună pentru imagini concludente)

Atenție!!! Plăcile se pot păstra la 4°C Celsius și se poate adăuga un conservant; plăcile depozitate se sigilează cu un adeziv specific și apoi se împachetează cu folie de aluminiu!!!

Protocol de colorare cu tubulină CellLight™ GFP pe celule vii

Principiul metodei: Reactivii CellLight conțin fuziuni proteină-peptidă cu semnal fluorescent care vizează structuri celulare specifice, în cazul de față, fibre de tubulină, pentru aplicații de imagistică cu celule vii. Se poate aplica și pe celule fixate [<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp10582.pdf>].

Materiale necesare pentru efectuarea testului în plus față de tabelul de resurse cheie descris pentru dezghețarea/subcultivarea/crioconservarea unei linii celulare:

- CellLight™ Tubulin-GFP, reactiv BacMam 2.0 (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, SUA)
- Microscop automat Lionheart FX (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, SUA)
- Control negativ – celule netratate
- Compuși test
- Selectarea solventului adecvat pentru solubilizarea compușilor test

* **Notă:** Pot fi utilizați și reactivi, consumabile și echipamente echivalente ale altor furnizori.



Etapele protocolului de lucru

- (i) se urmează pașii (i) – (ix) descriși anterior pentru colorarea TexasRed™-X Phalloidin
- (ii) se calculează volumul de reactiv CellLight® pentru numărul de celule cu formula dată în protocolul producătorului [<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp10582.pdf>]

$$\text{Volumul de reactiv CellLight® (mL)} = \frac{\text{numărul de celule} \times \text{PPC dorit}}{1 \times 10^8 \text{ particule CellLight® per mL}}$$

Unde: numărul de celule este numărul total estimat de celule la momentul marcării; PPC este numărul de particule per celulă; iar 1×10^8 este numărul de particule per mL de reactiv.

De exemplu, pentru a marca 40000 celule cu un PPC de 30,

$$\text{Volumul de reactiv CellLight® (mL)} = 40000 \times 30 / 1 \times 10^8 = 0,012 \text{ mL (12 } \mu\text{L)}$$

- (iii) reactivul CellLight® este amestecat prin agitare ușoară sus-jos pentru a forma o soluție omogenă
- (iv) volumul de reactiv calculat anterior este amestecat ușor cu mediul complet de creștere și adăugat în godeurile cu celule
- (v) celulele sunt incubate peste noapte
- (vi) se fotografiază celulele folosind echipamentul adecvat (microscop automat Cytation 1/ Lionheart FX)

Atenție!!! Dacă este necesar, nucleul celulelor poate fi colorat și cu Hoechst 33342 (colorarea efectuată conform pașilor descriși mai sus în secțiunea – Colorarea Hoechst 33342).

4.3.3. Metode de evaluare a capacității de migrare a celulelor

Metoda Scratch

Migrarea celulelor joacă un rol central în diferite procese biologice fundamentale, cum ar fi: dezvoltarea embrionară, apărarea imună, formarea țesuturilor, repararea rănilor, inflamația și, de asemenea, în progresia cancerului. Capacitatea celulelor de a migra evidențiază capacitatea lor de a se adapta la un mediu dat în ceea ce privește recâștigarea unei poziții adecvate și îndeplinirea funcțiilor lor; cu toate acestea, o migrare celulară afectată este frecvent întâlnită în mai multe patologii (inflamație, faza de progresie a cancerului, invazie și metastază) sau în urma expunerii la diferiți compuși [Pijuan et al., 2019].



Testele 2D *in vitro* de tip vindecare a rănilor (wound healing), precum testul scratch, reprezintă abordări excelente și de încredere pentru studiul/monitorizarea comportamentului migrator al celulelor ca răspuns la diferiți stimuli (substanțe de interes) sau în diferite patologii [Pijuan et al., 2019]. Pentru celulele sănătoase, acest test este folosit pentru a observa comportamentul migrator al celulelor după tratarea celulelor cu compuși de interes. Pentru celulele bolnave, în special celulele canceroase, metoda vizează evaluarea impactului tratamentului asupra capacității celulelor de a invada și de a dezvolta metastaze.

Principiul metodei: această metodă este utilizată pentru a măsura capacitatea celulelor de a migra într-un interval de timp dat (24 h) după expunerea la diferiți stimuli (compuși analizați pentru efecte biologice sau nocive).

Materiale necesare pentru efectuarea testului în plus față de tabelul de resurse cheie descris pentru dezghețarea/subcultivarea/crioconservarea unei linii celulare:

- Microscop automat Lionheart FX (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, SUA)
- Instrument pentru realizare incizii în placa de cultură - BioTek AutoScratch (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, SUA)
- Compuși test
- Selectarea solventului adecvat pentru solubilizarea compușilor test.

Notă: Pot fi utilizați și reactivi, consumabile și echipamente echivalente ale altor furnizori.

Etapele protocolului de lucru

- (i) cultivarea celulelor în funcție de linia celulară conform protocoalelor producătorului (**a se vedea pașii 12-22 din protocolul de subcultivare**)
- (ii) celulele într-un număr adecvat (în funcție de linia celulară) sunt crescute în plăci cu 96 de godeuri sau 24 de godeuri până la confluența dorită (în general 90-95%)
- (iii) realizarea unui template pentru placa corespunzătoare experimentului (evaluarea diferitelor concentrații de compuși test) care include: control negativ (celule netratate), serii de diluții pentru compușii de testat și serii de diluții pentru solvent
- (iv) când se ajunge la confluența dorită, mediul vechi este aruncat și incizia este trasă manual (folosind un vârf de pipetă steril) sau automat folosind instrumentul BioTek AutoScratch pentru a face incizii în mijlocul fiecărui godeu.
- (v) se îndepărtează resturile de celule și celulele neatașate prin spălare de 2x cu PBS preîncălzit



- (vi) se înlocuiește PBS cu mediu de creștere complet proaspăt care conține compușii de interes și, respectiv, diluțiile de solvenți
- (vii) se incubează placa timp de 24 de ore la 37°C și 5 % CO₂.
- (viii) pe toată durata procedurii se urmărește evoluția celulelor și se realizează poze pentru ca la sfârșitul timpului alocat experimentului rezultatele să poată fi analizate
- (ix) analiza datelor folosind instrumente bioinformatiche specifice.

Atenție!!!

- ❖ Metoda are ca scop evaluarea efectului diferiților compuși de interes sau substanțe asupra liniilor celulare, acest efect putând fi stimulator sau inhibitor asupra procesului de migrare/invazie a celulelor cultivate.
- ❖ Pentru o mai bună analiză a datelor, godeurile sunt fotografiate la diferite intervale de timp (0h, 3h, 8h și 24h) până la sfârșitul perioadei de tratament.
- ❖ Incizia pe placă poate fi efectuată manual sau automat folosind dispozitive speciale în acest scop (auto-zgâriere) (Figura 4.12).



Figura 4.12. Instrument BioTek AutoScratch folosit pentru a face incizii.

4.3.4. Teste de biologie moleculară pentru studiul mecanismelor de acțiune

Reacția de polimerizare în lanț a transcripției inversă (RT-PCR)

RT-PCR este o tehnică de laborator care presupune realizarea mai multor copii ale unei secvențe genetice pentru a o analiza. Este cunoscută și sub denumirea de reacție în lanț a polimerazei-transcripție inversă [<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/rt-pcr>].

Principiul metodei: procedura determină efectul indus de probele ce urmează a fi analizate asupra expresiilor genelor, la nivel de ARN mesager, a unor markeri specifici în funcție de experimentul propus. Această tehnică evaluează modificările care pot apărea într-o genă, un cromozom sau pentru activarea genelor, ceea ce duce adesea la diagnosticul unei patologii.



Materiale necesare pentru efectuarea testului în plus față de tabelul de resurse cheie descris pentru dezghețarea/subcultivarea/crioconservarea unei linii celulare:

- Sistem PCR în timp real QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, SUA)
- Tadvanced Biometra (Analytik Jena AG, Göttingen, Germania)
- Spectrofotometru DS-11 (DeNovix, Wilmington, DE, SUA)
- ThermoMixer C (Eppendorf, Hamburg, Germania)
- Pachetul peqGold RNAPure™ (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Germania) pentru izolare de ARN
- Kit de sinteză Maxima® First Strand cADN (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, SUA)
- Power SYBR-Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, SUA)
- Perechi de amorse de interes (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, SUA)
- Plăci cu 96 de godeuri sau tuburi specifice pentru PCR (Eppendorf, Hamburg, Germania, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, SUA)
- Compuși test
- Selectarea solventului adecvat pentru solubilizarea compușilor test.

* **Notă: Pot fi utilizați și reactivi, consumabile și echipamente echivalente ale altor furnizori.**

Etapele protocolului de lucru

- (i) cultivarea celulelor în funcție de linia celulară conform protocoalelor producătorului (**a se vedea pașii 12-22 din protocolul de subcultivare**)
- (ii) celulele într-un număr adecvat (în funcție de linia celulară) sunt crescute în plăci cu 6 godeuri până la confluența dorită
- (iii) realizarea unui template pentru placa corespunzătoare experimentului (evaluarea diferitelor concentrații de compuși test) care include: control negativ (celule netratate), serii de diluții pentru compușii test și serii de diluții pentru solvent
- (iv) celulele sunt stimulate cu compușii test și apoi sunt incubate în condiții optime pentru timpul dorit - 24, 48 sau 72 de ore
- (v) Etapa de izolare a ARN, această etapă se efectuează pe gheață după cum urmează:
 - a. vechiul mediu de cultură este îndepărtat și celulele sunt spălate cu 2 mL de PBS



- b. celulele sunt desprinse de pe placă folosind racleta specifică (cell scraper) în 1 mL PBS (Figura 4.13)

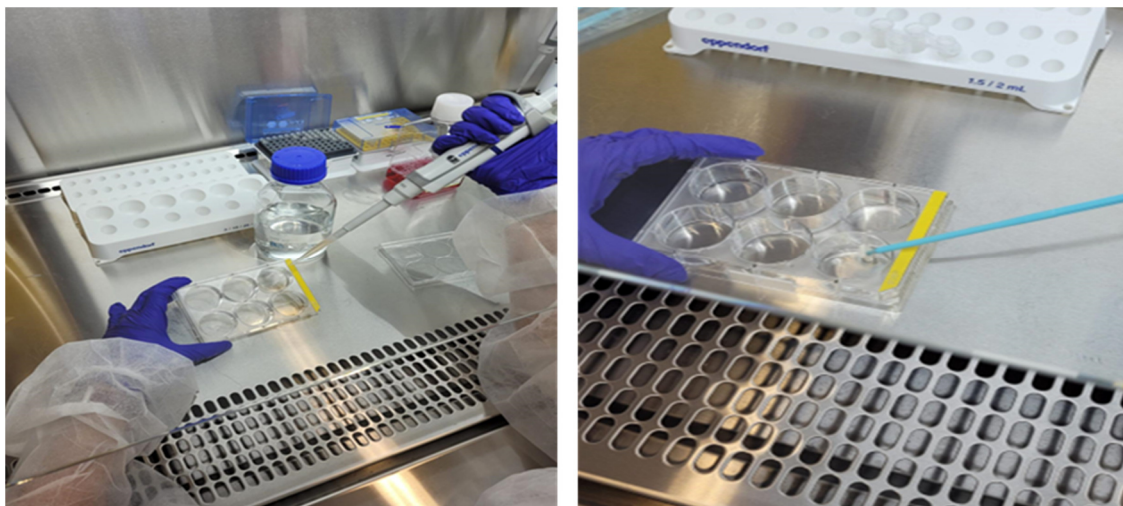


Figura 4.13. Pregătirea celulelor pentru etapa de izolare a ARN.

- c. suspensia formată în fiecare godeu este transferată în tuburi Eppendorf de 1,5 mL pregătite anterior (tuburile sunt etichetate cu numele/codul probei și data procedurii și învelite cu bandă scotch) și ținute în gheață până la adăugarea suspensiei (Figura 4.14)

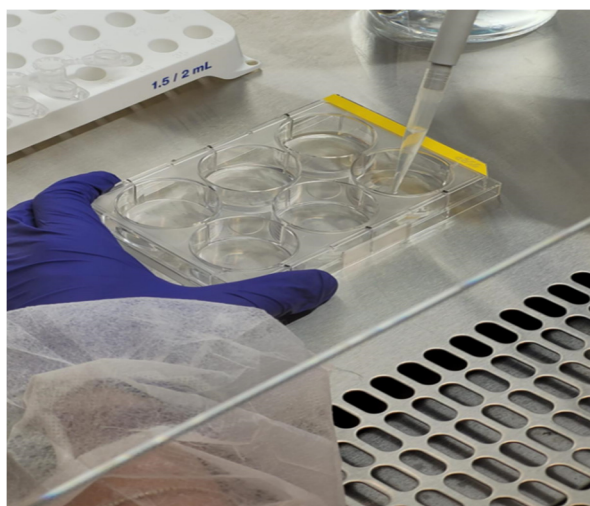


Figura 4.14. Aspirarea suspensiei celulare.

- d. suspensia este centrifugată la 12.000xg timp de 5 minute la 4°C
e. supernatantul este îndepărtat și sedimentul este menținut la -20°C în cazul în care izolarea ARN nu se realizează în acel moment
f. izolarea ARN se realizează folosind pachetul peqGold RNAPure™ (sau alt kit echivalent), iar protocoalele urmează instrucțiunile producătorului



- g. sedimentul obținut după izolarea ARN este resuspendat în 50 μ L DEPC-Water, este încălzit timp de 30 de minute la 55°C (pentru a crește solubilitatea ARN) și apoi se măsoară concentrația de ARN cu ajutorul spectrofotometrului DS-11
- (vi) următorul pas este sinteza ADN-ului complementar utilizând un kit specific (Kit de sinteză a cDNA First Strand Maxima®)
- (vii) etapa RT-PCR implică următorii pași:
 - a. Selectarea perechilor de amorse (primeri) de interes
 - b. Prepararea amestecului care conține amorse sens și antisens, ADN-ul complementar rezultate și SYBR-Green Master Mix
 - c. Se pipetează amestecul obținut la punctul anterior în placa PCR
 - d. Reacția PCR utilizând sistemul QuantStudio 5 Real-Time PCR
- (viii) Analiza datelor.

4.4. Test *in vitro* folosind modele celulare 3D (tridimensionale)

Modelele 2D *in vitro*, care reprezintă culturi celulare aderente monostrat, sunt cele mai utilizate modele *in vitro*. Cu toate acestea, din cauza limitelor impuse de geometria plană, acest tip de model prezice slab comportamentul *in vivo*. Prin urmare, modelele 3D *in vitro* nou formulate sunt o punte între modelele *in vitro* și *in vivo* și reproduc caracteristicile fiziologice și patofiziologice ale țesuturilor originale, simulând structura 3D *in vivo*. Structurile 3D, datorită configurației spațiale, posedă o mai bună reprezentare a contactului celulă-celulă și celulă-matrice în micromediul nativ *in vivo*. Aceste modele produc o impresie realistă a transportului de gaze, nutrienți sau molecule de semnalizare. În plus, modelele 3D *in vitro* pot recrea structura complexă a tumorii și pot menține caracteristicile genotipice și fenotipice împreună cu eterogenitatea tumorii [Leonard and Godin, 2016; Jubelin et al, 2022; Mu et al., 2023].

Modelele 3D folosite în laboratorul de studii *in vitro* din cadrul centrului FARMTOX al UMFVBT ca instrumente pentru a efectua studii farmaco-toxicologice au fost țesuturi EpiDerm 3D - Reconstructed Human Epidermis (RHE) achiziționate de la MatTek Corporation (Slovacia). Aceste țesuturi EpiDerm 3D reconstruite sunt sisteme gata de utilizare constând din keratinocite epidermice normale, derivate de la om (NHEK) cultivate pe inserții de cultură de țesut special pregătite [<https://www.mattek.com/mattekproduct/epiderm/>]. Țesuturile EpiDerm 3D prezintă structura epidermică umană, inclusiv stratul bazal proliferativ, straturile spinos și granular și, de asemenea, straturile epidermice cornificate. [<https://www.mattek.com/mattekproduct/epiderm/>]. Acest model 3D *in vitro* a fost validat de



către ECVAM (Centrul European pentru Validarea Metodelor Alternative) și OECD (Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică) ca un sistem model *in vitro* pentru testarea produselor chimice, farmaceutice și de îngrijire a pielii.

4.4.1. Determinarea potențialului iritant (testul EpiDerm de iritare a pielii – OECD TG 439)

Principiul metodei: testul constă în expunere topică a compușilor test puri la un model de țesut EpiDerm 3D, urmată de un test de viabilitate celulară. Reducerea viabilității țesuturilor expuse la substanțe chimice în comparație cu controlul negativi (țesuturi tratate cu apă) este utilizată pentru a prezice potențialul iritant asupra pielii [<https://www.mattek.com/wp-content/uploads/EPI-200-SIT-Skin-Irritation-MK-24-007-0023.pdf>].

Materiale necesare pentru efectuarea testului în plus față de tabelul de resurse cheie descris pentru dezghețarea/subcultivarea/crioconservarea unei linii celulare:

- Componente kit EPI-200-SIT (MatTek Corporation)
- Componente kit MTT-100 (MatTek Corporation)
- Compuși test
- Selectarea solventului adecvat pentru solubilizarea compușilor test.

*** Notă: Pot fi utilizate, de asemenea, consumabile și echipamente echivalente ale altor furnizori.**

Etapele protocolului de lucru (conform recomandărilor producătorului)

🕒 Durata 4 zile

- (i) după primirea țesuturilor, inserturile care conțin țesuturile sunt scoase din agaroză și transferate pe o placă cu 6 godeuri în care s-au adăugat 900 μL mediu de testare/godeu, timp de 4 ore, în condiții specifice (37°C și 5% CO_2)
- (ii) după perioada de 4 ore, mediul adăugat inițial este înlocuit cu 900 μL mediu proaspăt preîncălzit/godeu și incubat până a doua zi
- (iii) a doua zi, mediul este schimbat și probele de testat sunt aplicate pe partea superioară a inserturilor care conțin țesuturile; inițial, suprafața țesutului este umezită (25 μL de soluție salină tamponată cu DPBS), după care se adaugă 100 mg de probă/insert și se incubează timp de 18 ore (Figura 4.15)

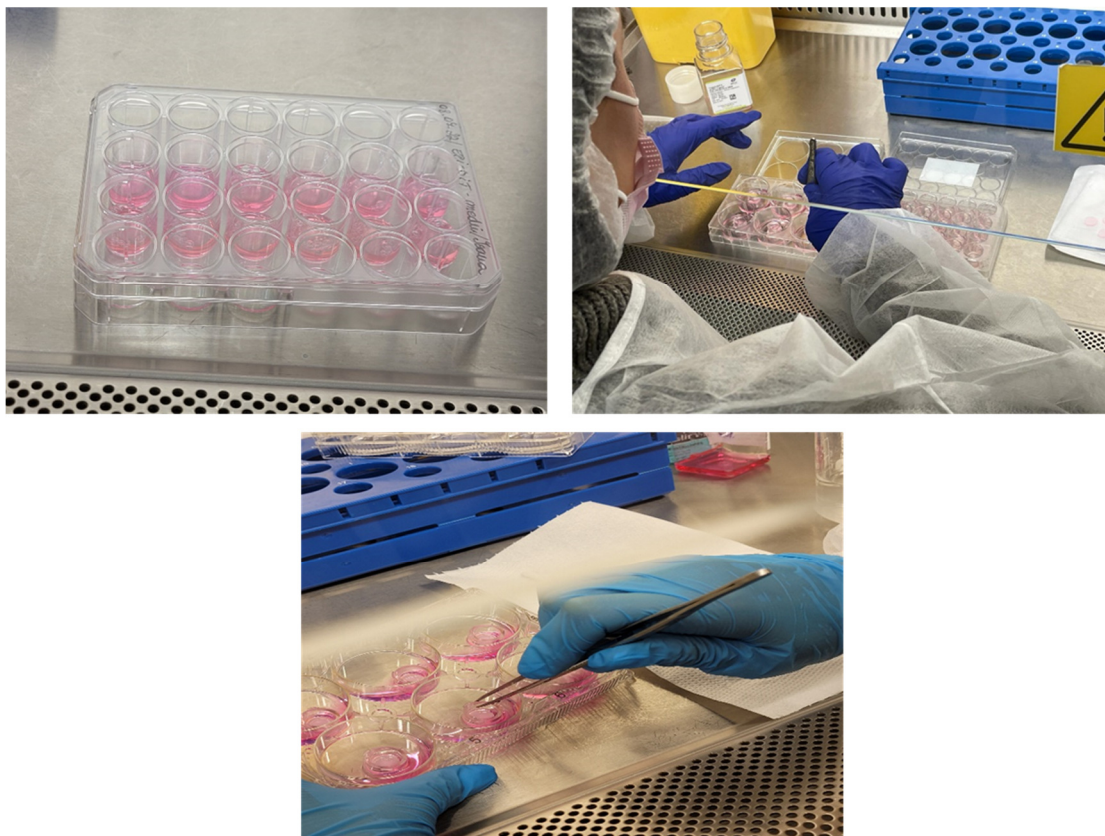


Figura 4.15. Manipularea țesuturilor EpiDerm reconstruite 3D la primire.

- (iv) controlul pozitiv (PC) - Triton X-100 1% și controlul negativ (NC) - apă ultrapură, sunt de asemenea adăugate în partea superioară a inserturilor cu țesuturi și incubate timp de 18 ore
- (v) testul MTT se efectuează după cum urmează:
- după perioada de stimulare de 18 ore, inserturile sunt spălate cu DPBS și transferate pe o placă cu 24 de godeuri care conține 300 μ L/godeu de MTT (1 mg/mL) și sunt incubate timp de 3 ore.
 - după cele 3 ore de incubare, inserturile sunt îndepărtate și plasate în 2 mL de soluție extractantă într-o nouă placă cu 24 de godeuri timp de 2 ore la temperatura camerei, ferită de lumină.
 - apoi, se adaugă 200 μ L soluție de extracție//godeu pe o nouă placă cu 96 de godeuri, iar absorbanțele sunt măsurate spectrofotometric la lungimile de undă corespunzătoare (570 nm și 650 nm)
 - Viabilitatea probelor este calculată folosind formula [Pinzaru et al., 2021]:



$$\text{Viabilitate \%} = \text{OD}_{\text{probă}} / \text{OD}_{\text{NC}} \times 100$$

$$\text{Viabilitate relativă TS \%} = \text{OD}_{\text{TS}} / \text{Media OD}_{\text{NC}} \times 100$$

$$\text{Viabilitate relativă NC \%} = \text{OD}_{\text{NC}} / \text{Media OD}_{\text{NC}} \times 100$$

$$\text{Viabilitate relativă PC \%} = \text{OD}_{\text{PC}} / \text{Media OD}_{\text{NC}} \times 100$$

unde: TS = substanță test, NC = control negativ, PC = control pozitiv, OD = absorbanță.

4.4.2. Determinarea fototoxicității (EpiDerm Phototoxicity Assay – OECD TG 498)

Principiul metodei: măsoară răspunsul toxic acut după expunerea pielii la anumite substanțe chimice și expunerea ulterioară la lumină sau care este indus în mod similar de iradierea pielii după administrarea sistemică a unei substanțe chimice [<https://www.mattek.com/application/phototoxicity/>].

Materiale necesare pentru efectuarea testului în plus față de tabelul de resurse cheie descris pentru dezghețarea/subcultivarea/crioconservarea unei linii celulare:

- Componente kit EPI-200 (MatTek Corporation)
- Componente kit MTT-100 (MatTek Corporation)
- Echipamente de iradiere UVA-vis - Biospectre
- Compuși test
- Selectarea solventului adecvat pentru solubilizarea compușilor test.

*** Notă: Pot fi utilizate, de asemenea, consumabile și echipamente echivalente ale altor furnizori.**

Etapele protocolului de lucru (conform recomandărilor producătorului)

🕒 Durata 4 zile

- (i) după primire, inserturile care conțin țesuturile sunt scoase din agaroză și transferate pe o placă cu 6 godeuri care conține 900 μL mediu de testare /godeu, timp de 1 oră, în condiții specifice (37 °C și 5% CO_2)
- (ii) după perioada de 1 oră, mediul adăugat inițial este înlocuit cu 900 μL mediu proaspăt preîncălzit /godeu și se incubează până a doua zi
- (iii) a doua zi, mediul este schimbat și probele de testat sunt aplicate pe partea superioară a inserturilor care conțin țesuturile; inițial, suprafața țesutului este umezită (25 μL de soluție salină tamponată cu - DPBS), după care se adaugă 100 mg de probă/insert și se incubează timp de 18 ore



- (iv) plăcile acoperite sunt expuse la UVA la 6 J/cm², iar în paralel plăcile fără expunere sunt ținute la temperatura camerei în întuneric. Etichetați capacele plăcilor pentru a identifica țesuturile expuse la UVA.
- (v) după această etapă, fiecare insert este spălat cu DPBS și transferat în plăci noi care conțin 900 μL mediu/godeu și se incubează timp de 18-24 ore la 37 °C și 5% CO₂.
- (vi) în a treia zi, inserturile sunt spălate cu DPBS și transferate pe o placă cu 24 de godeuri preumplută 300 uL MTT/godeu, după care sunt analizate conform protocolului de mai sus.

$$\text{RTV \%} = \text{OD}_{\text{probă}} / \text{OD}_{\text{solvent control}} \times 100$$

$$\text{RTV control \%} = \text{OD}_{\text{solvent control}} / \text{OD}_{\text{media solventului control}} \times 100,$$

unde: RTV = viabilitatea relativă a țesutului, OD = absorbantă.

Bibliografie

Capula M, Corno C, El Hassouni B, Li Petri G, Arandelović S; EORTC PAMM Group. A Brief Guide to Performing Pharmacological Studies In Vitro: Reflections from the EORTC-PAMM Course "Preclinical and Early-phase Clinical Pharmacology". *Anticancer Res* 2019; 39(7): 3413-3418.

Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I, et al. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer* 2014; 111(6): 1021-46.

Segeritz CP, Vallier L. Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. *Basic Science Methods for Clinical Researchers* 2017:151–72.

Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hartung T, et al. Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Altern Lab Anim*. 2005; 33(3): 261-87.

American Type Culture Collection (ATCC) Animal Cell Culture Guide. <https://www.atcc.org/resources/culture-guides/animal-cell-culture-guide>

ThermoFisher Scientific. Gibco Cell Culture Basics. <https://www.thermofisher.com/ro/en/home/references/gibco-cell-culture-basics.html>

Merck. ECACC Handbook - Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook – 4th Edition. <https://www.sigmaaldrich.com/RO/en/campaigns/ecacc-handbook-download>



- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell Viability Assays. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Markossian S, Grossman A, Arkin M, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. Food Frontiers 2020; 1(3) :332-349.
- Adan A, Kiraz Y, Baran Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. Curr Pharm Biotechnol 2016; 17(14): 1213-1221.
- Aslantürk ÖS. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World, Larramendy ML, Soloneski S (Eds). InTechOpen, Rijeka, 2017.
- Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. Int J Mol Sci. 2021; 22(23): 12827.
- MTT Cell Proliferation Assay ATCC® 30-1010K. <https://www.atcc.org/products/30-1010k>
<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/AlamarBluePIS.pdf>
- Iftode A, Drăghici GA, Macașoi I, Marcovici I, Coricovac DE, Dragoi R, et al. Exposure to cadmium and copper triggers cytotoxic effects and epigenetic changes in human colorectal carcinoma HT-29 cells. Exp Ther Med. 2021; 21(1): 100.
- Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. Methods Mol Biol. 2019; 1897: 299-311.
https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011717_Hoechst_33342_UG.pdf
<https://www.thermofisher.com/ro/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/dapi-imaging-protocol.html>
https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0001777_Phalloidins_UG.pdf
<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp10582.pdf>
- Pijuan J, Barceló C, Moreno DF, Maiques O, Sisó P, Marti RM, et al. In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. Front Cell Dev Biol 2019; 7: 107.
<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/rt-pcr>
- Leonard F, Godin B. 3D In Vitro Model for Breast Cancer Research Using Magnetic Levitation and Bioprinting Method. Methods Mol Biol. 2016; 1406: 239-51.



Co-funded by
the European Union



Jubelin C, Muñoz-García J, Griscom L, Cochonneau D, Ollivier E, Heymann MF, et al. Three-dimensional in vitro culture models in oncology research. *Cell Biosci* 2022; 12(1): 155.

Mu P, Zhou S, Lv T, Xia F, Shen L, Wan J, et al. Newly developed 3D in vitro models to study tumor-immune interaction. *J Exp Clin Cancer Res* 2023; 42(1): 81.

<https://www.mattek.com/mattekproduct/epiderm/>

<https://www.mattek.com/wp-content/uploads/EPI-200-SIT-Skin-Irritation-MK-24-007-0023.pdf>

Pinzaru I, Tanase A, Enatescu V, Coricovac D, Bociort F, Marcovici I, et al. Proniosomal Gel for Topical Delivery of Rutin: Preparation, Physicochemical Characterization and In Vitro Toxicological Profile Using 3D Reconstructed Human Epidermis Tissue and 2D Cells. *Antioxidants (Basel)* 2021; 10(1): 85.

<https://www.mattek.com/application/phototoxicity/>

Capitolul 5. Utilizarea metodelor *in ovo* pentru evaluarea activității biologice (CO - UMFVBT)

5.1. Introducere

Angiogeneza, formarea de noi vase de sânge din cele preexistente, joacă un rol crucial în diferite procese fiziologice și patologice, inclusiv creșterea tumorii și metastazare. Evaluarea potențialului antiangiogenic al compușilor este esențială în dezvoltarea de noi strategii terapeutice. În acest context, testul *in ovo* pe membrana corioalantoidiană (CAM) a apărut ca un instrument valoros pentru evaluarea activității biologice a substanțelor asupra angiogenezei [Moreno-Jiménez et al., 2016].

Testul CAM implică utilizarea membranei corioalantoice a embrionilor de pui în curs de dezvoltare, care este foarte vascularizată și sensibilă la stimuli angiogeni. Acest model permite observarea directă a formării vaselor de sânge și oferă o alternativă rentabilă și acceptabilă din punct de vedere etic la testele tradiționale *in vivo*. Testul CAM a fost utilizat pe scară largă în studiul angiogenezei datorită simplității, reproductibilității și relevanței sale pentru fiziologia umană [Moreno-Jiménez et al., 2016].

Cercetătorii au folosit testul CAM pentru a evalua potențialul antiangiogenic al diferiți compuși. De exemplu, s-a demonstrat că bioconjugatul derivat al acidului B-oleanolic cu rodamină B prezintă efect antiangiogenic, demonstrând un efect inhibitori semnificativ asupra formării vaselor de sânge [Mangir et al., 2019]. În mod similar, compușii naturali precum cei izolați din părțile aeriene ale *Salvia officinalis* au fost investigați pentru activitatea lor antiangiogenică folosind testul CAM, arătând rezultate promițătoare în inhibarea formării vaselor de sânge necesare creșterii embrionare [Reichling et al., 2006].

Mai mult decât atât, testul CAM a fost esențial în evaluarea proprietăților antiangiogenice a diverși compuși, inclusiv complecși organometalici [Fathalla et al., 2017], dendrimeri [Kluge et al., 2016] și fracții de venin [Coelho et al., 2019]. Aceste studii evidențiază versatilitatea testului CAM în evaluarea efectelor diferitelor substanțe asupra angiogenezei, oferind perspective valoroase asupra potențialelor intervenții terapeutice care vizează formarea aberantă a vaselor de sânge.

În plus, testul CAM a fost utilizat nu numai în domeniul oncologiei, ci și în domeniul ingineriei țesuturilor, demonstrând aplicabilitatea sa în studiul regenerării osoase și al biocompatibilității biomaterialelor [Butt et al., 2018]. Capacitatea testului de a evalua atât biocompatibilitatea, cât și răspunsul angiogenic al biomaterialelor subliniază utilitatea acestuia în diferite domenii de



cercetare dincolo de studiile de angiogeneză. Testul CAM *in ovo* servește ca un instrument valoros și versatil pentru evaluarea potențialului antiangiogenic al compușilor. Simplitatea sa, rentabilitatea și relevanța pentru fiziologia umană îl transformă într-o alegere preferată pentru cercetătorii care investighează angiogeneza și dezvoltă noi agenți terapeutici care vizează formarea vaselor de sânge.

5.2. Determinarea potențialului antiangiogenic folosind testul CAM

Etapele protocolului de lucru

Notă !!! Acest protocol este o versiune ușor modificată a protocolului pentru metoda de testare recomandată de ICCVAM!!!

1) Pregătirea ouălor:

- incubatorul este pregătit cu câteva ore înainte de incubarea ouălor. Întreaga suprafață a incubatorului este dezinfectată cu șervețele și etanol 70%. Temperatura este setată la **37,5°C**, iar umiditatea este de 60 %.
- pentru clocire se folosesc ouă proaspete, fertile, cu greutatea cuprinsă între 50-60 g de la găini (Figura 5.1) crescute în condiții optime. Înainte de a fi introduse în incubator, ouăle se spală cu apă caldă și cu un burete, sau se pot șterge cu șervețele și etanol 70% fără agitare.

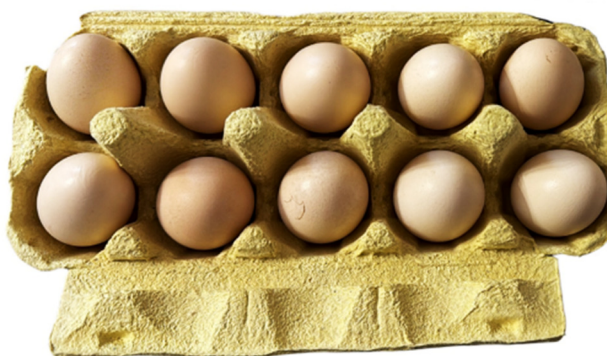


Figura 5.1. Ouă fertile de găină cu o greutate între 50-60 g.

- Se folosește un creion pentru a marca pe ouă data la care sunt introduse în incubator (Figura 5.2).



Figura 5.2. Ouăle sunt date și dezinfectate.

- Ouăle sunt așezate în tava incubatorului în poziție orizontală (Figura 5.3).



Figura 5.3. Ouăle introduse în incubator (a 1-a zi).

- În a 4-a zi de incubație, se fac două găuri la cele două capete ale oului cu ajutorul unei foarfeci, iar din partea superioară a oului se extrag 5-8 mL de albuș (albumen) cu ajutorul unei seringi și se decantează într-un recipient de colectare. Cele două găuri sunt apoi acoperite cu bandă adezivă medicală și plasate înapoi în incubator (Figurile 5.4 și 5.5).

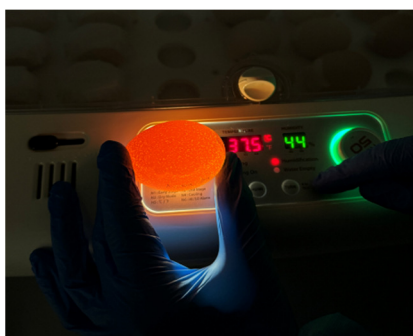


Figura 5.4. Verificarea cu o sursă de lumină dacă embrionii se dezvoltă sau nu (a 4-a zi).



Figura 5.5. Ouăle introduse în incubator după o extracție de albumenă (a 4-a zi).

- În a 5-a zi de incubație, o bucată mare de bandă adezivă este lipită de oul ținut orizontal pentru a decupa o fereastră mare cu foarfeca pentru a expune membrana corioalantoică și vasele de sânge. Fereastra decupată prin care sunt vizibili embrionii viabili este apoi acoperită cu o bucată mare de bandă adezivă pentru a evita deshidratarea și ouăle sunt reintroduse în incubator până la efectuarea testelor experimentale (Figurile 5.6 - 5.8).

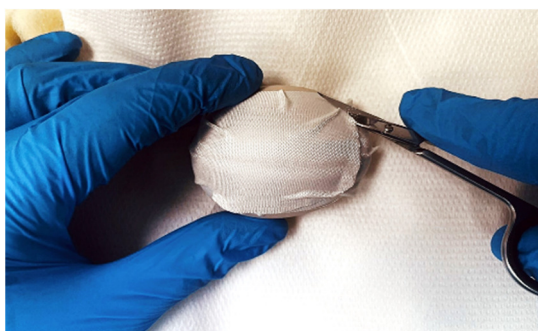


Figura 5.6. Tăierea unei ferestre mari cu foarfeca pentru a expune membrana corioalantoică și vasele de sânge (a 5-a zi).



Figura 5.7. Ouă acoperite cu bandă adezivă pentru a evita deshidratarea (a 5-a zi).

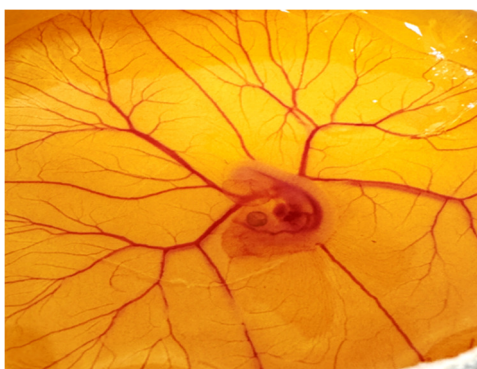


Figura 5.8. Embrion de pui înconjurat de vase de sânge (a 5-a zi).



- În fiecare zi se verifică ca parametrii de temperatură și umiditate să fie menținuți la valorile setate pentru dezvoltarea optimă a embrionului [Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), ICCVAM Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test–Chorioallantoic Membrane. 2010. Available online: <http://iccvam.niehs.nih.gov/>].
- 2) aplicarea unui inel pe o zonă vascularizată în ziua a 8-a de incubare a ouălor, în care se aplică 10 μ L din proba de testat (Figura 5.9)

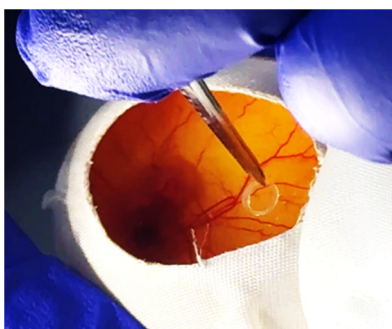


Figura 5.9. Aplicarea inelului pe CAM pentru a aplica probe pentru testarea angiogenezei (a 8-a zi).

- 3) probele se aplică timp de 5 zile în inel, făcându-se poze înainte și după de fiecare aplicare a probelor
- 4) pe tot parcursul experimentului, ouăle sunt păstrate în incubator la parametrii optimi setați.

5.3. Determinarea potențialului iritant

Testul HET-CAM (Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane) este o metodă utilizată pe scară largă pentru evaluarea potențialului iritant al diferitelor substanțe. Acest test implică observarea membranei corioalantoide a ouălor de găină fertilizate pentru a evalua efectele substanțelor test. Testul CAM a fost recunoscut ca un model de încredere pentru studiul răspunsurilor tisulare, angiogeneză și biocompatibilitate [Moreno-Jiménez et al., 2016, Mangir et al., 2019].

Cercetătorii au adaptat testul HET-CAM pentru a determina potențialul iritant al unor substanțe, precum uleiurile esențiale și componentele acestora, oferind un instrument valoros pentru evaluarea iritanților non-severi pentru ochi și mucoase [Reichling et al., 2006]. În plus, s-a utilizat testul HET-CAM pentru a confirma efect non-iritant al unor formulări, cum ar fi gelurile *in situ*, demonstrând capacitatea acestora de a proteja împotriva substanțelor puternic iritante [Fathalla et al., 2017].



Testul HET-CAM a fost, de asemenea, folosit în diferite domenii dincolo de evaluările de biocompatibilitate. De exemplu, a fost folosit pentru a evalua mutagenitatea tratamentelor cu jet de plasmă și pentru a evalua citotoxicitatea nanohidroxiapatitei în produsele cosmetice de îngrijire orală [Kluge et al., 2016; Coelho et al., 2019]. Mai mult decât atât, testul a fost esențial în studiul potențialului de iritare conjunctivală al microemulsiilor concepute pentru a combate oftalmia neonatorum cauzată de agenți patogeni precum *Neisseria gonorrhoeae* și *Staphylococcus aureus* [Butt et al., 2018].

În plus, testul HET-CAM a fost recunoscut ca un instrument valoros pentru anticiparea potențialului iritant oftalmic, prezentând o bună corelație cu situațiile *in vivo* [McKenzie et al., 2015]. Acest lucru evidențiază importanța sa în industria farmaceutică pentru evaluarea efectului iritant a diferite formulări destinate utilizării oculare.

Etapele protocolului de lucru

Notă!!! Pregătirea ouălor se face așa cum este descris în pasul 1 al protocolului pentru determinarea potențialului antiangiogenic!!!

- 1) în a opta zi de incubație, se aplică 600 μ L din proba de testat pe membrana corioalantoică a embrionilor, iar modificările plexului vascular sunt observate stereomicroscopic timp de 300 de secunde (Figura 5.10).



Figura 5.10. O fereastră deschisă care dezvăluie CAM și vasele de sânge ale embrionului de pui (a 8-a zi).

- 2) se monitorizează apariția unor semne de liză, hemoragie sau coagulare, iar timpul de apariție a acestor procese este notat într-un tabel
- 3) pe baza valorilor obținute se calculează un scor de iritabilitate din care se estimează potențialul iritant al probelor test.

În concluzie, testul HET-CAM este o metodă versatilă și fiabilă pentru evaluarea potențialului iritant în diverse aplicații. Capacitatea sa de a oferi informații valoroase asupra răspunsurilor țesuturilor, biocompatibilității și iritației îl face un instrument valoros pentru cercetători și industriile implicate în dezvoltarea de produse, de la cosmetice la produse farmaceutice.



Bibliografie

Moreno-Jiménez I, Hulsart-Billström G, Lanham S, Janeczek A, Kontouli N, Kanczler J et al. The Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay For The Study Of Human Bone Regeneration: A Refinement Animal Model For Tissue Engineering. *Scientific Reports* 2016; 6(1).

Mangır N, Dikici S, Claeysens F, MacNeil S. Using Ex Ovo Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay To Evaluate The Biocompatibility And Angiogenic Response To Biomaterials. *ACS Biomaterials Science & Engineering* 2019; 5(7): 3190-3200.

Reichling J, Suschke U, Schneele J, Geiss H. Antibacterial Activity And Irritation Potential Of Selected Essential Oil Components – Structure-Activity Relationship. *Natural Product Communications* 2006; 1(11): 1934578X0600101.

Fathalla Z, Vangala A, Longman M, Khaled K, Hussein A, El-Garhy O, et al. Poloxamer-Based Thermoresponsive Ketorolac Tromethamine In Situ Gel Preparations: Design, Characterisation, Toxicity, And Transcorneal Permeation Studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2017; 114: 119-134.

Kluge S, Bekeschus S, Bender C, Benkhail H, Sckell A, Below H, et al. Investigating The Mutagenicity Of A Cold Argon-Plasma Jet In An HET-MN Model. *Plos One* 2016; 11(9):

Coelho C, Grenho L, Gomes P, Quadros P, Fernandes M. Nano-Hydroxyapatite In Oral Care Cosmetics: Characterization And Cytotoxicity Assessment. *Scientific Reports* 2019; 9(1).

Butt U, ElShaer A, Snyder L, Al-Kinani A, Gresley A, Alany R. Fatty Acid Based Microemulsions To Combat Ophthalmia Neonatorum Caused By Neisseria gonorrhoeae And Staphylococcus aureus. *Nanomaterials* 2018; 8(1): 51.

Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), ICCVAM Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test–Chorioallantoic Membrane. 2010. Available online: <http://iccvam.niehs.nih.gov/>

McKenzie B, Kay G, Matthews K, Knott R, Cairns D. The Hen's Egg Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test To Predict The Ophthalmic Irritation Potential Of A Cysteamine-Containing Gel: Quantification Using Photoshop® And ImageJ. *International Journal of Pharmaceutics* 2015; 490(1-2): 1-8.



Capitolul 6. Metode de obținere a preparatelor din plante (Extract și uleiuri esențiale) (P3 - UNICAL)

6.1. Introducere

Industria care se bazează pe plante sunt dependente de prepararea produselor din plante. Extracția este primul pas al oricărui studiu care implică plantele medicinale și joacă un rol semnificativ și crucial asupra rezultatului final și al efectului plantei (Figura 6.1).

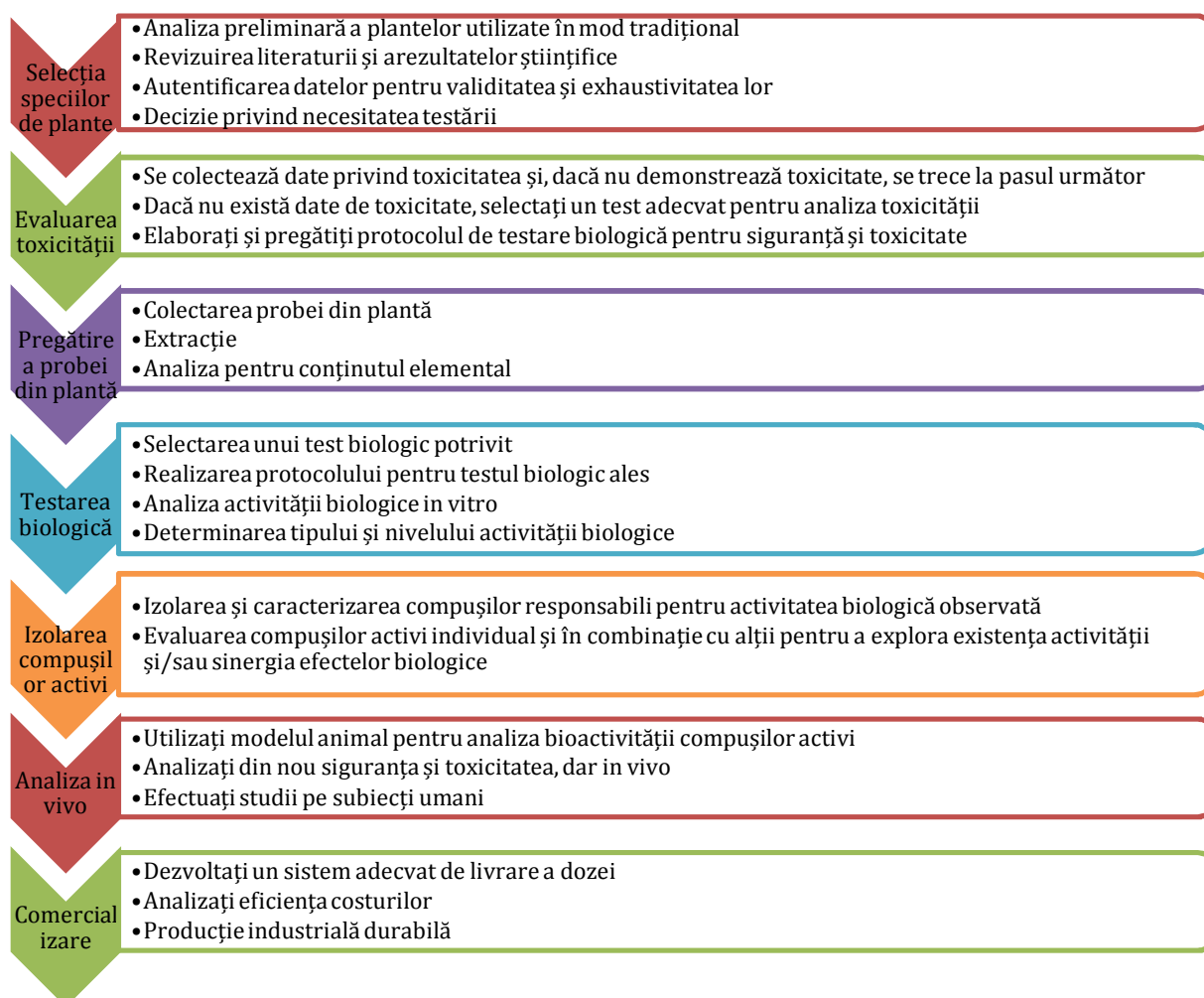


Figura 6.1. Organigrama studiului plantelor medicinale și poziția tehnicilor de extracție [Azmir et al., 2013].

Compușii bioactivi din materiale vegetale pot fi extrași prin diferite procedee de extracție (Figura 6.2).



Co-funded by
the European Union

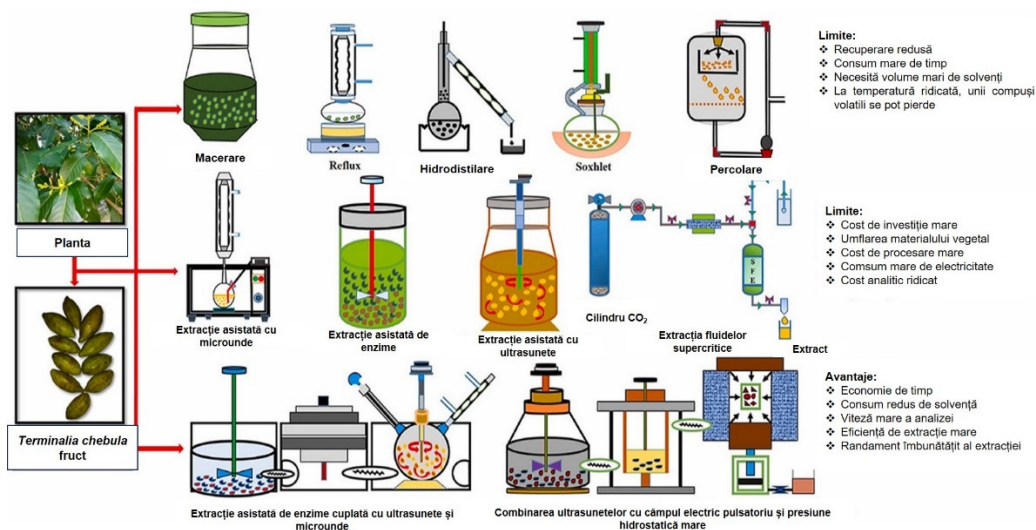


Figura 6.2. Tehnici de extracție a compușilor bioactivi [Jha and Sit, 2022].

6.2. Macerarea

Majoritatea tehnicilor de extracție se bazează pe puterea de extracție a diferiților solvenți utilizați, cum ar fi macerarea (Figura 6.3-6.4).



Figura 6.3. Macerarea *Pinus nigra* subsp. *laricio* Poiret (Imagini originale).



Figura 6.4. Macerarea *Capsicum baccatum*. (Imagini originale).



Extracția înseamnă separarea uneia sau mai multor substanțe dintr-o matrice, prin tratare cu mijloace mecanice, chimice și termice.

Macerarea are loc în recipiente de oțel care pot avea atât capacitate mică, cât și mare (1.000–10.000 litri) sau alt material inert atât față de matricea solidă, cât și față de solventul de extracție. Solidul care va fi supus extracției este introdus în recipientul acoperit complet de solvent, pentru a se obține o extracție cât mai completă. Procesul de extracție este de obicei destul de lung și necesită zile sau chiar săptămâni pentru a ajunge la final. În acest proces de extracție intervin atât fenomene de difuzie, cât și de osmoză, care sunt puternic dependente de temperatură.

De obicei, utilizarea căldurii modifică componenta termolabilă a medicamentului; prin urmare, în majoritatea cazurilor este necesară utilizarea de reactivi chimici, în general solvenți organici care fac structura chimică a membranei celulare permeabilă.

Macerarea, efectuată la temperatura camerei, reduce riscul de degradare termică a probei.

Etapele protocolului de lucru

- 1) Planta este inițial separată de materialele străine, cum ar fi solul și părți nepotrivite pentru extracție.

Pentru a crește contactul dintre proba de extras și solvent, planta a fost tocată corespunzător. Particulele nu trebuie să fie prea mari, altfel solventul nu poate pătrunde în celulele cele mai profunde, dar nu trebuie aduse în stare de pulbere; aceasta ar duce la pierderea ingredientelor active volatile conținute în plantă și la dificila separare prin filtrare a materialului vegetal de lichidul folosit, odată ce timpul de macerare s-a încheiat.

- 2) Ulterior, fiecare probă este scufundată în solvent organic timp de 48 de ore, în interiorul unui recipient etanș, repetând procedura de 3 ori.

Solvenții indicați de Farmacopee pentru extracția ingredientelor active din plantele medicinale sunt: apa, alcoolul etilic și eterul etilic. Industrial se pot folosi alți solvenți precum alcoolul izopropilic și toluenul, care pot avea caracteristici avantajoase din punct de vedere comercial sau pentru puterea lor extractivă. Solventul trebuie ales pe baza naturii chimice a compușilor conținuți în probă. Alcoolul este, în general, solventul cel mai utilizat, deoarece este capabil să extragă majoritatea moleculelor conținute în plantă (ingrediente active), fie că sunt hidrofile, adică solubile în apă, sau lipofile și, prin urmare, solubile în ulei sau alți solvenți organici.

- 3) Ulterior proba este filtrată și uscată cu ajutorul rotavaporului prevăzut cu o baie de apă la 37 °C, a cărei particularitate este evaporarea la presiune joasă cu o pompă de vid



care permite puncte de fierbere mult mai mici decât cele la presiunea ambiantă pentru a scădea temperatura de fierbere a solventului și favorizează evaporarea acestuia. Combinația dintre temperatura băii și presiunea de vid permite distilarea precisă a fracțiilor de solvent (Figura 6.5).



Figura 6.5. Extract uscat (Imagini originale).

Tehnica de macerare privind extracția în fază apoasă prezintă unele variații: infuzia, care poate fi considerată ca o macerare într-un timp foarte scurt în apă clocotită. În acest caz, extracția este cu siguranță mai rapidă, dar și fenomenul de degradare care afectează substanțele labile termic devine mai rapid. O altă variantă a macerării clasice este decoctul. Se realizează prin punerea matricei în contact cu solventul, funcționează la temperatura de fierbere, pentru un timp variabil de până la 30 de minute sau mai mult.

Această tehnică este deci rezervată materialelor compacte care au ingrediente active rezistente la căldură, a căror extracție necesită intervenția căldurii. Decocturile, ca și infuziile, se alterează ușor și au o valabilitate limitată.

6.3. Extracția Soxhlet

Extractorul Soxhlet (Figura 6.6) este un dispozitiv capabil să separe continuu, adică poate separa dintr-un amestec solid componentele slab solubile de cele insolubile folosind un solvent volatil.

Dispozitivul preia numele de la Franz von Soxhlet (1848-1926), cel care l-a inventat în 1879 pentru extracția lipidelor dintr-un material solid, folosind eterul etilic ca solvent; complexul componentelor chimice separate a luat denumirea de extract eteric.



Figura 6.6. Extractor Soxhlet (Imagini originale).

Extractorul Soxhlet constă din 3 părți: a) un balon care conține solventul; b) extractorul propriu-zis; c) condensator de reflux, răcit cu apă. De asemenea, în extractor un braț lateral (1) permite trecerea vaporilor de solvent în condensator, în timp ce sifonul (2) permite golirea periodică a extractorului. Materialul solid care conține compusul din extract, este plasat într-un degetar, adesea realizat din celuloză poroasă (3), care este introdus în camera principală a extractorului. Avantajele cheie ale extracției Soxhlet sunt: i) simplitatea, ii) aplicabilitatea la temperaturi ridicate, ceea ce mărește cinetica procesului, iii) costuri scăzute de pornire, iv) nu este necesară filtrarea, v) prezența constantă a solventului și a probei pe tot parcursul extracției.

Una dintre problemele majore asociate cu această metodă de extracție este că aceasta este limitată din cauza eficienței sale slabe de extracție, durata lungă de timp a procedurii și a utilizării de mulți solvenți.

Preparatele care se pot obține din plante sunt numeroase. Extractele sunt preparate care pot fi lichide, semisolide sau solide în consistență, în funcție de tehnica de extracție [Azwanida 2015]. Prin procedeele de macerare sau percolare, extractele obținute pot fi clasificate astfel: (i) extracte fluide: aceste extracte conțin aceeași cantitate de ingredient activ care se găsește în planta medicinală inițială; (ii) extracte moi: în timpul procesului de concentrare, se obține o



consistență asemănătoare mierii și sunt de 2 până la 6 ori mai concentrate decât extractele fluide; (iii) extracte uscate: acestea sunt pulberi solide obținute prin evaporarea completă a solventului utilizat pentru extracție [Abubakar and Haque, 2020].

Un alt preparat obținut prin macerare sau percolare este tinctura. Tincturile sunt soluții lichide obținute prin prelucrarea plantelor medicinale cu un solvent adecvat. În mod obișnuit, se folosește o soluție hidroalcoolică (un amestec de apă și alcool), al cărei conținut de alcool este ales în funcție de solubilitatea ingredientelor active care urmează să fie extrase. Principala distincție între extracte și tincturi constă în faptul că, în primele, se realizează un proces de evaporare pentru a crește concentrația ingredientelor active din preparat. În schimb, tincturile pot fi obținute și prin simpla diluare a extractului fluid corespunzător. O altă substanță extrasă din materiale vegetale este oleorezina, care conține un amestec de uleiuri esențiale (componente aromatice volatile) și rășini (componente nevolatile). Această extracție se face de obicei prin procese de extracție cu solvenți sau la presiune înaltă [Hudz et al., 2020].

6.4. Tehnici inovatoare de extracție

Aplicarea metodelor inovatoare de extracție în industria alimentară a fost investigată intens, datorită așteptărilor crescute ale consumatorilor pentru opțiuni mai ecologice. Aceste metode, sunt mai prietenoase cu mediul, datorită utilizării reduse a substanțelor chimice sintetice și organice, a timpului de funcționare redus, a randamentului și a calității mai bune a extractului. Unele dintre cele mai promițătoare tehnici sunt extracția asistată cu ultrasunete, extracția asistată cu enzime, extracția asistată cu microunde, extracția asistată cu câmp electric pulsat, extracția fluidului supercritic și extracția lichidului sub presiune. Utilizarea tehnologiilor noi și combinate noi crește capacitatea de extracție, rezultând randamente cu rate de extracție mai mari.

6.4.1. Extracție asistată cu ultrasunete

Extracția asistată cu ultrasunete utilizează energia ultrasunetelor și solvenți pentru a extrage compușii țintă din diferite materiale vegetale [Kumar et al., 2021]. Este un proces care permite extracția compușilor bioactivi conținuți în plantă prin exploatarea acțiunii mecanice a ultrasunetelor asupra pereților plantei.

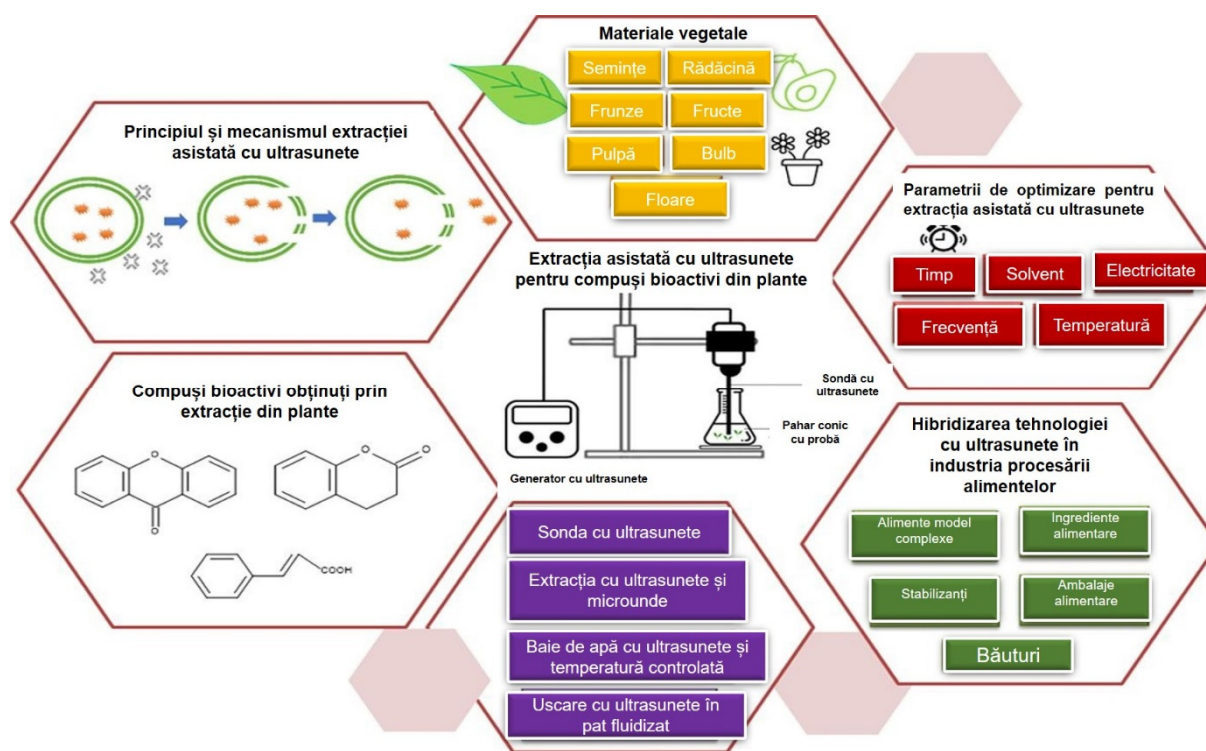


Figura 6.7. Extracția asistată cu ultrasunete [Yusoff et al., 2022].

Extracția cu ultrasunete folosește, în general, un interval de frecvență mai mic (16 KHz – 100 KHz), deoarece frecvențele mai mari ar produce prea multă energie care ar putea degrada ingredientele active din materialele vegetale. Aceste unde constă dintr-o serie de cicluri de compresie și rarefiere care pot fi propagate prin mediu solid, lichid sau gazos inducând deplasarea și dislocarea moleculelor din pozițiile lor originale. Tehnologia cu ultrasunete permite extracția completă a materialului vegetal, păstrând integritatea tuturor moleculelor conținute în plantă, fie că sunt termolabile (proteine, aminoacizi, vitamine, enzime etc.), termostabile, hidrosolubile sau liposolubile.

Acest lucru este posibil datorită undei de șoc produsă de ultrasunete care provoacă ruperea mecanică a pereților celulari.

Tabelul 1. Avantajele și dezavantajele extracției cu ultrasunete în comparație cu macerarea convențională.

Principalele avantaje ale extracției cu ultrasunete în comparație cu macerarea convențională	Dezavantajele extracției cu ultrasunete în comparație cu macerarea convențională
--	--



Reducerea semnificativă a timpilor de producție, deoarece ultrasunetele sparg pereții celulari și reduc timpul de transfer al ingredientelor active din materialul vegetal în solvent.

Este posibil să obțineți un litru de macerat în doar 15 minute.

Este o tehnică de extracție care a primit acreditarea Bio, deoarece această extracție este un proces pur fizic în care nu se utilizează și nu se adaugă produse chimice.

De fapt, se folosesc solvenți naturali (ulei, apă și alcool), indiferent de solubilitatea ingredientelor active.

Se obțin randamente foarte satisfăcătoare în ceea ce privește ingredientele active, deoarece există o epuizare aproape totală a legumelor.

Cu extracția cu ultrasunete nu se poate efectua o extracție selectivă deoarece există o evadare totală a tuturor moleculelor conținute în materialul vegetal, indiferent de afinitatea pentru solventul utilizat.

Dacă se dorește să se obțină separarea ingredientelor active conținute în masa vegetală, trebuie efectuate metode ulterioare.

Etapele protocolului de lucru

- 1) materialul vegetal este măcinat sau tocat în bucăți mici pentru a crește suprafața de extracție
- 2) materialul vegetal este apoi amestecat cu un solvent (cum ar fi etanolul sau apa)
- 3) ultrasunetele sunt folosite pentru a ajuta procesul de extracție prin aplicarea undelor de mare intensitate și frecvență joasă la aproximativ 20 kHz amestecului. Acest lucru determină formarea cavitației acustice și vibrația rapidă a solventului, ceea ce favorizează dezintegrarea și ruperea celulelor vegetale și eliberarea de substanțe bioactive precum polifenoli, flavonoide și vitamine.
- 4) amestecul este apoi filtrat pentru a separa materialul vegetal solid de lichidul care conține compușii bioactivi extrași
- 5) lichidul este apoi evaporat sau supus unui tratament suplimentar pentru a îndepărta solventul și pentru a concentra moleculele bioactive
- 6) produsul final este un extract bogat în compuși bioactivi care poate fi utilizat în diverse aplicații, cum ar fi suplimentele alimentare, alimentele funcționale și cosmeticele.



6.4.2. Extracția asistată de enzime

Substanțele fitochimice, care sunt prezente în matrice specifice care conțin polizaharidă-lignină stabilizată prin legături de hidrogen și interacțiuni hidrofobe, rămân dispersate în citoplasma celulară și sunt inaccesibile prin procesul de extracție cu solvent. Substanțele fitochimice complexate în astfel de probe sunt eliberate efectiv la randamente ridicate prin pre-tratarea materialului vegetal cu enzime specifice (celuloză, pectinază și amilază) care sunt adăugate în timpul extracției pentru a spori randamentul fitochimic prin distrugerea pereților celulari. Mai mult, aceste enzime hidrolizează carbohidrații, cum ar fi celuloza și corpii lipidici [Bitwell et al., 2023].

Etapele protocolului de lucru

- 1) pulverizarea materialului vegetal
- 2) formarea unei suspensii în apă
- 3) utilizarea unor enzime hidrolitice specifice care au sarcina de a elibera toate moleculele prezente în fitocomplex
- 4) adăugarea de glicerină
- 5) filtrare
- 6) adăugarea de acid citric pentru a stabiliza și a face produsul stabil în timp
- 7) ambalare.

Avantajele utilizării extractelor hidroenzimatică față de remediile fitoterapeutice clasice precum tincturile mamă sau maceratele de glicerină sunt în primul rând eficacitatea, biodisponibilitatea ridicată datorită utilizării enzimelor hidrolitice, acțiunea promptă și siguranța produsului deoarece nu conțin nici alcool, nici zahăr.

6.4.3. Extracție asistată cu microunde

Microundele sunt unde neionizante de natură electromagnetică cu frecvența între 300 MHz și 300 GHz. Aceste unde sunt poziționate în spectrul undei electromagnetice între razele infraroșii și razele X. Acțiunea directă a acestor unde asupra substanței constă în transformarea energiei electromagnetice în energie termică. Microundele sunt constituite din două câmpuri oscilante perpendiculare: cel magnetic și cel electric, responsabil de încălzire. Extracția cu microunde (MAE) (Figura 6.8) depinde de procesul de încălzire a solventului și a probei. În plus, este guvernată de două fenomene: rotația dipolului și conducerea ionică. Rotația dipolului înseamnă realinierea dipolilor moleculei cu schimbarea rapidă a câmpului



electric; aceasta face ca atât materialul dielectric, cât și solvenții cu dipoli persistenti să fie încălziți prin acțiunea microundelor. Prin conducție ionică înțelegem în schimb transferul de ioni cauzat de modificarea câmpului electric. Ca urmare, migrarea generează frecare (datorită rezistenței oferite de soluție) responsabilă cu încălzirea soluției.

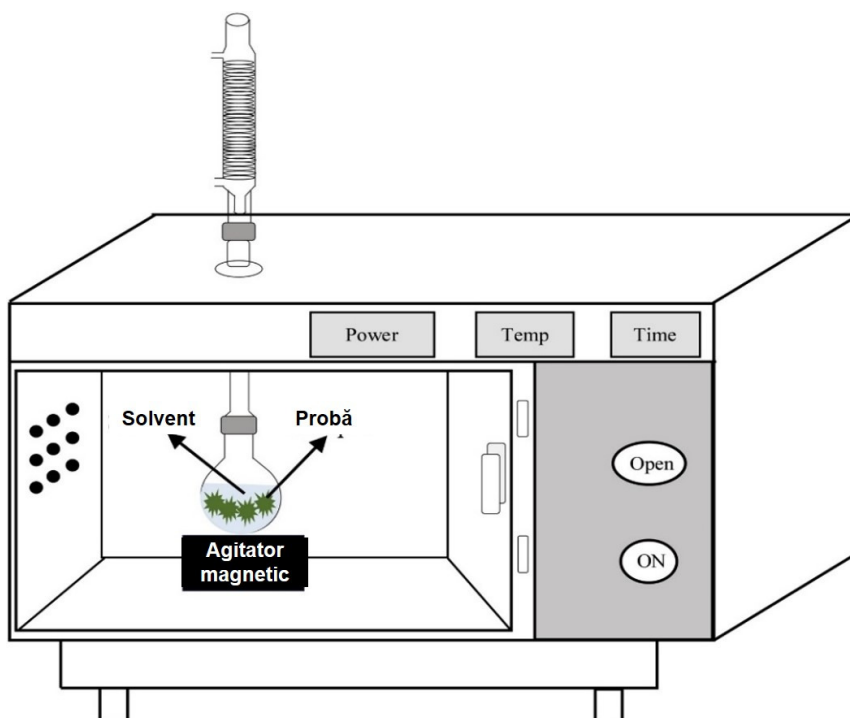


Figura 6.8. O reprezentare schematică a sistemului de extracție asistată cu microunde
[Mirzadeh et al., 2020].

Extracția poate fi efectuată atât pe matrice umedă, cât și pe matrice uscată, exploatând urmele de umiditate prezente în eșantion care sunt încălzite (de exemplu, apă conținută în celulele vegetale de biomasă). Evaporarea rezultată creează presiuni extrem de ridicate în interiorul celulelor care în cele din urmă provoacă ruperea peretelui celular, crescând randamentele de recuperare a fitocondensatelor în mediu.

Alvarez și colab. (2017) au demonstrat modul în care utilizarea microundelor ca pretratament pentru tescovină crește atât randamentele de extracție, cât și polifenolii totali extrași. Caldas și colab. (2018) observă în schimb modul în care randamentele de polifenoli sunt mai mari utilizând metode care implică utilizarea microundelor ca mediu de extracție în comparație cu metodele convenționale de extracție.



6.4.4. Extracția fluidelor supercritice

Extracția fluidului supercritic este o tehnică de separare importantă utilizată în sectoarele alimentară, nutraceutic și farmaceutic prin care unele ingrediente active sunt izolate prin supunerea materialului la presiune ridicată în prezența unui gaz, în principal CO₂.

Extracția cu fluide supercritice este o tehnologie verde care garantează durabilitatea mediului în urma procesului și un grad ridicat de calitate și puritate a produsului extras. Este o tehnologie curată, selectivă, nu necesită temperaturi ridicate și reprezintă o alternativă la extracția comună cu solvenți organici.

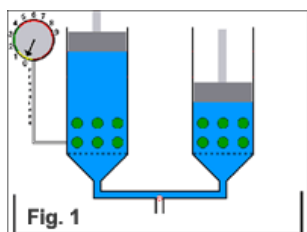
Această tehnică permite extragerea compușilor sensibili la căldură și oxidare precum acizii grași polinesaturați (ω 3, ω 6), vitaminele, canabinoizii, flavonoidele, sterolii, tocoferolii și alți compuși cu valoare adăugată mare cu certitudinea de a nu îi deteriora. Rezultatul constă în obținerea de extracte de o puritate extremă și caracteristici organoleptice foarte rafinate.

6.4.5. Extractorul Naviglio®

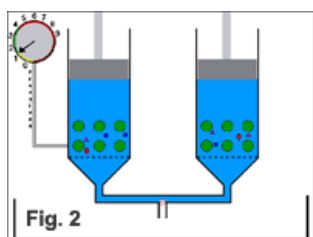
Extractorul dinamic rapid solid-lichid (Naviglio extractor®) (Figura 6.9) reprezintă o tehnologie inovatoare de extracție solid-lichid care permite ca matricele solide care conțin substanțe extractibile într-un solvent organic sau anorganic și în amestecurile acestora să fie epuizate într-un timp scurt, comparativ cu alte tehnici de extracție existente în prezent. Noutatea extractorului constă în faptul că modalitatea de extracție se schimbă pe măsură ce tendința metodelor actuale care vizează încălzirea sistemului de extracție pentru a crește randamentul și a accelera timpii de extracție se inversează; extractorul Naviglio® efectuează extracția la temperatura camerei sau sub această temperatură și utilizează creșterea presiunii lichidului de extracție pe matricea solidă care urmează să fie extrasă. Importanța extracției la temperaturi scăzute rezidă în faptul că în acest fel se evită stresul termic asupra substanțelor termolabile.



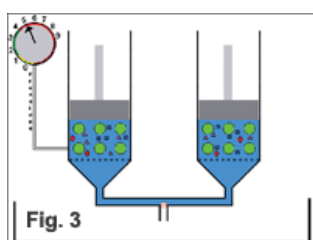
Reprezentarea schematică a funcționării extractorului Naviglio®



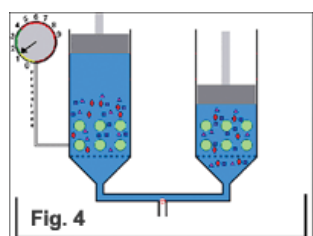
Etapa 1. Camerele de extracție sunt umplute cu materialul solid de extras și solventul de extracție, la presiune atmosferică. În partea inferioară a celor două camere cilindrice de extracție se află două compartimente poroase care permit trecerea lichidului și blochează materialul solid.



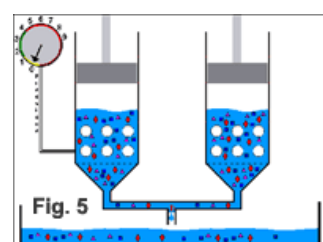
Etapa 2. După umplere sistemul se închide și se pune sub presiune (între 7 și 9 bari, în general). Presiunea exercitată de pistoane este transferată în lichid pe măsură ce cele două camere de extracție sunt conectate printr-o conductă.



Etapa 3. Odată ce a fost atinsă presiunea stabilă, sistemul rămâne nemișcat pentru timpul necesar stabilirii unui echilibru între interiorul și exteriorul matricei solide. Aceasta este faza statică.



Etapa 4. După această perioadă, pistoanele sunt puse în mișcare, generând o scădere imediată a presiunii sistemului. În acest fel începe faza dinamică în care se realizează principiul extractiv; substanțele de extras sunt transferate în solventul de extracție datorită efectului de aspirație ca urmare a gradientului de presiune negativ creat între interiorul și exteriorul matricei solide.



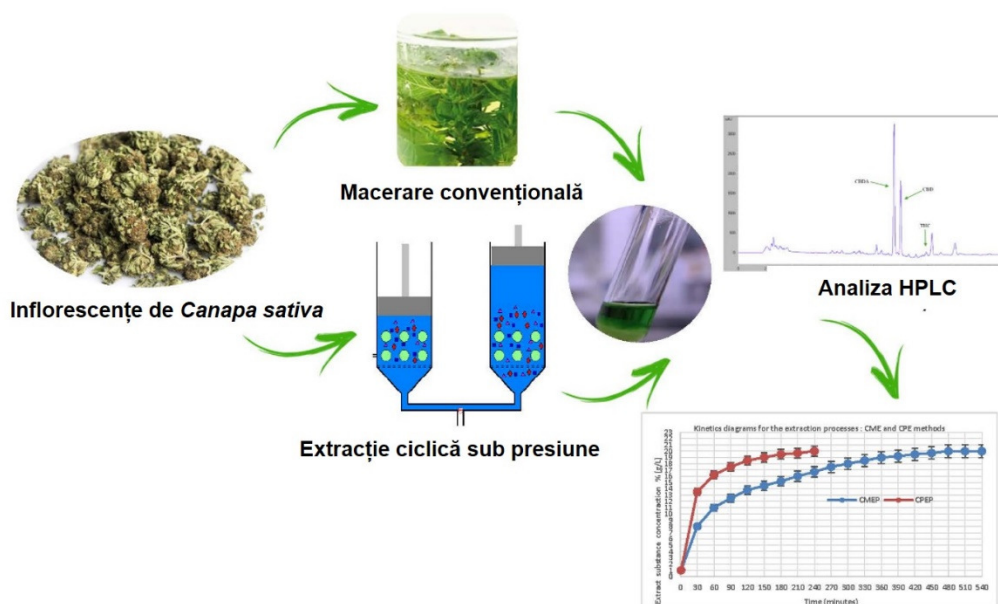
Etapa 5. Faza dinamică are printre funcțiile sale și pe aceea de a amesteca lichidul extractiv evitând formarea gradientilor de concentrație în imediata apropiere a suprafeței expuse a solidului. Alternarea unei faze statice cu una dinamică constituie un ciclu de extracție; repetarea mai multor cicluri duce la epuizarea completă a matricei solide.

La sfârșitul extracției, solventul de extracție este expulzat printr-o supapă solenoidală și colectat într-un recipient special.



Figure 6.9. Extractorul Naviglio®.

Gallo și colab. (2020) au evaluat cinetica procesului de extracție din inflorescențe feminine de *Canapa sativa* subsp. *sativa* var. *sativa*, pe baza determinării conținutului de canabinoizi: acid canabidiolic (CBDA), acid Δ^9 -tetrahydrocanabinolic (THCA), canabidiol (CBD) și Δ^9 -tetrahydrocanabinol (THC), înainte și după decarboxilare în cuptor, pentru a evalua posibila utilizare a extractului de cânepă obținut în sectorul alimentar. Randamentul de extracție a fost același în cele două cazuri examinate și calitățile finale aproape identice. Cu toate acestea, timpii de extracție au fost semnificativ diferiți: macerarea a fost finalizată în 24 de ore, în timp ce cu extractorul Naviglio extracția a fost finalizată în doar 4 ore (Figura 6.10).



Diagrame cinetice ale proceselor de extracție

Figura 6.10. Proces de extracție pentru producția de extracte de inflorescențe de cânepă prin macerare convențională și extracție dinamică solid-lichid rapidă (extractor Naviglio) [Gallo et al., 2020].

6.5. Extracția uleiului esențial

Uleiurile esențiale pot fi obținute din material vegetal prin metode de tip distilare cu abur, hidrodistilare sau presare la rece, în funcție de plantă și de tipul de ulei care urmează să fie obținut. Conținutul de ulei esențial din materialul vegetal este scăzut, de obicei 1 până la 3% din greutatea plantei. Uleiurile sunt alcătuite dintr-un amestec complex de compuși chimici, inclusiv terpene, aldehide, cetone, alcooli și altele, care le conferă atât aroma lor distinctivă, cât și potențialele proprietăți terapeutice [Aziz et al., 2018].

Uleiurile esențiale sunt un amestec complex de substanțe organice volatile și parfumate de natură chimică variată.

Câteva componente ale uleiurilor esențiale:

- MONOTERPENE - proprietăți antifungice, antimicrobiene, antiflogistice și curative (de ex. lavandă, cimbru, chiparos, salvie, lămâie...);
- SESQUITERPENE - proprietăți calmante, antifungice și dezinfectante (de exemplu, melisa, ylang-ylang, cedru, ienupăr...);



- FENOLI - proprietăți antifungice și antimicrobiene (de exemplu, cimbru, oregano, cimbru, garoafa...);
- ALDEHIDE - proprietăți antibacteriene, antiinflamatorii și sunt, în principal, responsabile pentru parfum (de exemplu, lămâie, melisa, scorțișoară, eucalipt...);
- CETONE - proprietăți balsamice și colagog-coleretice (pot fi, de asemenea, constituenți toxici) (de ex. mugwort, pelin, rozmarin, tuia, mentă, salvie...);
- ESTERI - proprietăți echilibrante, decongestionante, antispastice și calmante (de exemplu, dafin, lavandă, mușețel, mușcata roz...).

Caracteristicile uleiurilor esențiale

1. compuse dintr-un amestec complex de hidrocarburi mono- și sesquiterpene și compuși oxigenați, propanoide derivate din fenil, compuși ai metabolismului acid al grăsimilor și aminoacizilor, compuși azotați și sulfurați;
2. pot fi mono-, bi- sau trimoleculare, dar de cele mai multe ori sunt polimoleculare (>250);
3. sunt puternice, plăcute, în mare parte incolore sau ușor inodore și colorate;
4. sunt formate din molecule extrem de volatile;
5. sunt insolubile sau ușor solubile în apă;
6. foarte solubile în alcool, grăsimi, acid acetic, eter, cloroform...;
7. greutate specifică mai mică decât a apei (EXCEPȚII: uleiul esențial de scorțișoară, de garoafă, de muștar...).

Metoda cea mai utilizată pentru extracția uleiurilor esențiale este distilarea cu abur (Figura 6.11). Este folosită în diferite sectoare ca furnizare de materii prime pentru cosmetice, produse farmaceutice, aromaterapie, arome alimentare, conservare și afaceri de îngrijire la domiciliu [Machado et al., 2022].

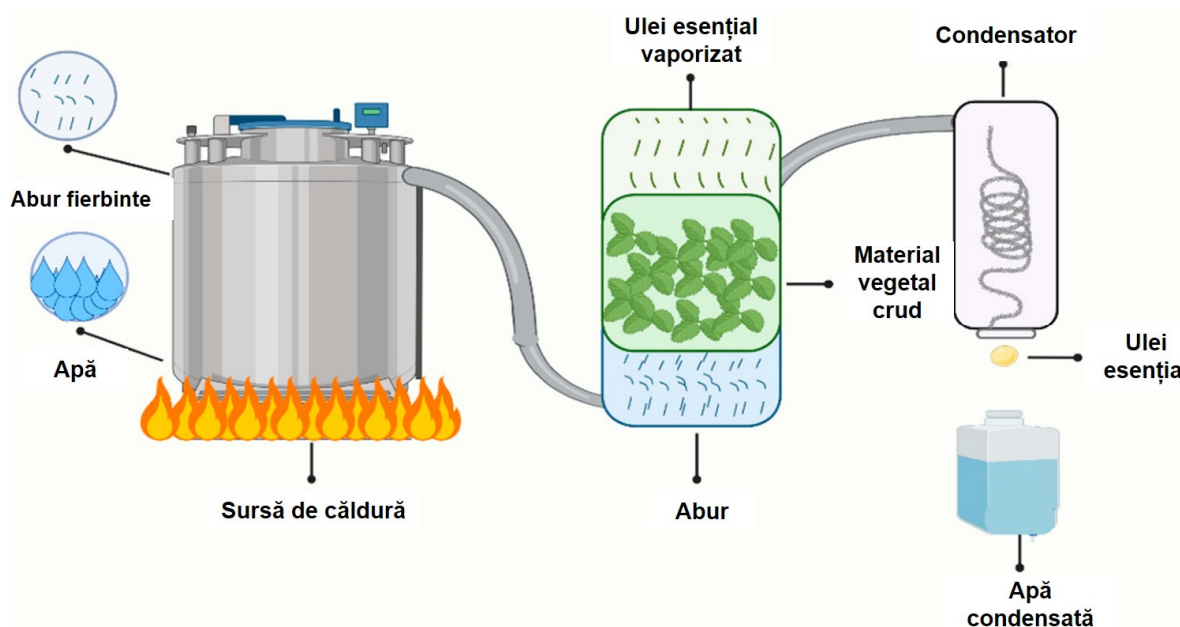


Figura 6.11. Prezentare generală a etapelor implicate în procesul de distilare cu abur [Machado et al., 2022].

Această metodă se bazează pe unele dintre proprietățile fizice ale uleiurilor esențiale raportate anterior. Mai exact cele care privesc: volatilitatea, solubilitatea în apă și densitatea. Distilarea este, de fapt, un proces prin care uleiurile esențiale sunt separate de țesuturile plantei care le conține, prin „transportul” lor prin vapori de apă. O proprietate fizică a uleiurilor esențiale este volatilitatea, adică capacitatea de a fi ușor transportat (vaporizat) de vaporii de apă, în ciuda punctului lor de fierbere ridicat. Odată vaporizate, uleiurile esențiale sunt ușor transportate de fluxul de vapori de apă.

Materialul vegetal, pregătit corespunzător, este plasat într-o „cameră de distilare”, în care se introduc apoi vapori de apă. Vaporii de apă transportă uleiurile esențiale, formează un amestec de Ulei Esențial + Vapori de Apă care, trecând printr-o coloană frigorifică, se condensează și se separă rapid apa de Uleiul Esențial. Această separare are loc deoarece apa și uleiurile esențiale sunt nemiscibile între ele și au, de asemenea, densități diferite. Se separă prin simpla decantare. Acest tip de extracție este cea mai folosită metodă de extracție a uleiurilor esențiale deoarece oferă o serie de avantaje:

- A. Temperatura de fierbere a amestecului de abur/Ulei esențial este aproape de 100 °C, încă departe de temperatura de fierbere a Uleiurilor esențiale. Nu crește pe toată durata



- procesării și astfel se evită riscurile de deteriorare a Uleiurilor Esențiale și asigură o bună volatilitate a acestora.
- B. Vaporii de apă umflă țesuturile plantelor, dilată porii, sparge celulele esențiale, facilitând evacuarea Uleiurilor Esențiale.
 - C. Uleiul esențial astfel obținut este ușor separat de apa condensată prin decantare datorită faptului ca cei doi componenți ai amestecului sunt nemiscibili între ei și au densități diferite.
 - D. Există o pierdere minimă de ulei esențial datorită solubilității sale foarte scăzute în apă. Această pierdere poate fi controlată în continuare prin utilizarea apei aromatice, care tocmai s-a separat de uleiurile esențiale, pentru a regenera aburul.
 - E. Procesul are un cost foarte mic (se folosește apa potabilă de la robinet) și nu creează probleme deosebite pentru siguranța la locul de muncă.
 - F. Fluxul de vapori de apă nu conține oxigen; prin urmare, uleiurile esențiale nu sunt supuse oxidării. Singurul dezavantaj este riscul de a experimenta o posibilă degradare termică și procese hidrolitice.

Bibliografie

Azmir J, Zaidul, ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* 2013; 117(4): 426-436.

Jha AK and Sit N. Extraction of bioactive compounds from plant materials using combination of various novel methods: A review. *Trends in Food Science & Technology* 2022; 119: 579-591.

Azwanida NN. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants*. 2015; 4(196): 2167-0412.

Abubakar AR, Haque M. Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy & Bioapplied Sciences* 2020;12(1):1.

Hudz N, Makowicz E, Shanaida M, et al. Phytochemical Evaluation of Tinctures and Essential Oil Obtained from *Satureja montana* Herb. *Molecules*. 2020; 25(20): 4763.

Kumar K, Srivastav S, Sharanagat VS. Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry* 2021; 70: 105325.



Yusoff IM, Taher ZM, Rahmat Z, Chua LS. A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds: Phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins. *Food Research International* 2022; 157: 111268.

Bitwell C, Indra SS, Luke C, Kakoma MK. A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Scientific African* 2023; 19: e01585.

Mirzadeh M, Arianejad MR, Khedmat L. Antioxidant, antiradical, and antimicrobial activities of polysaccharides obtained by microwave-assisted extraction method: A review. *Carbohydrate Polymers* 2020; 229: 115421.

Álvarez A, Poejo J, Matias AA, Duarte CM, Cocero MJ, Mato RB. Microwave pretreatment to improve extraction efficiency and polyphenol extract richness from grape pomace. Effect on antioxidant bioactivity. *Food and Bioproducts Processing* 2017; 106: 162-170.

Caldas TW, Mazza KE, Teles AS, Mattos GN, Brígida AIS, Conte-Junior CA, et al. Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. *Industrial Crops and Products* 2018; 111: 86-91.

Gallo M, Formato A, Ciaravolo M, Formato G, Naviglio D. Study of the kinetics of extraction process for the production of hemp inflorescences extracts by means of conventional maceration (CM) and rapid solid-liquid dynamic extraction (RSLDE). *Separations* 2020; 7(2): 20.

Aziz ZAA, Ahmad A, Setapar SHM, Karakucuk A, Azim MM, Lokhat D, et al. Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical and Therapeutic Potential - A Review *Curr Drug Metab.* 2018; 19(13): 1100-1110.

Machado CA, Oliveira FO, de Andrade MA, Hodel KVS, Lepikson H, Machado BAS. Steam distillation for essential oil extraction: An evaluation of technological advances based on an analysis of patent documents. *Sustainability* 2022; 14(12): 7119.

