

CZU: 543.4:547.9

[https://doi.org/10.59295/PRTEP2023\\_08](https://doi.org/10.59295/PRTEP2023_08)

## 8. INTERACȚIUNI ANTIOXIDANTE DINTRE UNII COMPUȘI NATURALI DIN STRUGURI

**Crina VICOL, Gheorghe DUCA**

*Institutul de Chimie, Universitatea de Stat din Moldova*

**Rezumat.** În acest studiu au fost investigate interacțiunile antioxidante dintre compușii naturali din struguri, cum ar fi catechina, resveratrolul, acidul ascorbic, acidul dihidroxifumaric, acidul tartric, acidul citric și preparatul ecologic ENOXIL. Metodele spectrometrice UV-Viz și Stopped-Flow au fost folosite pentru a evalua activitatea antioxidantă utilizând teste precum: DPPH, ABTS, Folin-Ciocalteu, FRAP, conform protocoalelor existente în literatură. De asemenea, a fost investigat modul în care solventul (apă, etanol), matricea de vin și soluția tampon fosfat influențează activitatea antioxidantă a acestor compuși și tipurile de interacțiuni antioxidante dintre ei. Rezultatele au indicat prezența unor efecte sinergice între acidul ascorbic și acizii tartric, citric, dihidroxifumaric, ENOXIL și catechina. În special, a fost stabilit că amestecul catehină – acid ascorbic prezintă o activitate antioxidantă care depinde de concentrația acidului. În schimb, combinația resveratrol - catechină prezintă efecte antagoniste, sugerând că acești doi compuși pot să se anuleze reciproc în ceea ce privește activitatea lor antioxidantă. De asemenea, a fost constatat că, în matricea de vin, compușii au o activitate antioxidantă semnificativ mai mare decât în etanol.

Preparatul ENOXIL s-a dovedit a avea proprietăți reducătoare crescute în soluția tampon fosfat. Aceste rezultate oferă o înțelegere mai bună a modului în care compușii din struguri interacționează între ei și cu mediul ambiant în ceea ce privește activitatea lor antioxidantă. Aceste constatări pot fi utile în dezvoltarea de produse antioxidante sau suplimente alimentare eficiente.

**Cuvinte-cheie:** antioxidant, acid ascorbic, acid dihidroxifumaric, catehină, resveratrol, ENOXIL, radical liber.

### **ANTIOXIDANT INTERACTIONS AMONG SOME NATURAL COMPOUNDS IN GRAPES**

**Summary.** In this study, the antioxidant interactions between natural grape compounds such as catechin, resveratrol, ascorbic acid, dihydroxyfumaric acid, tartaric acid, citric acid and the ecological preparation ENOXIL were investigated. UV-VIS and Stopped-Flow spectrometric methods were used to evaluate the antioxidant activity using tests such as: DPPH, ABTS, Folin-Ciocalteu, FRAP,

*according to existing protocols in the literature. It was also investigated how the solvent (water, ethanol), wine matrix and phosphate buffer influence the antioxidant activity of these compounds and the types of antioxidant interactions between them. The results indicated the presence of synergistic effects between ascorbic acid and tartaric, citric, dihydroxyfumaric, ENOXIL and catechin acids. In particular, it was established that the catechin – ascorbic acid mixture exhibits an antioxidant activity that depends on the concentration of the acid. In contrast, the resveratrol - catechin combination shows antagonistic effects, suggesting that these two compounds may cancel each other out in terms of their antioxidant activity. It was also found that, in the wine matrix, the compounds have a significantly higher antioxidant activity than in ethanol.*

*The preparation ENOXIL has been shown to have increased reducing properties in phosphate buffer solution. These results provide a better understanding of how compounds in grapes interact with each other and with the environment in terms of their antioxidant activity. These findings may be useful in the development of effective antioxidant products or dietary supplements.*

**Keywords:** *antioxidant, ascorbic acid, dihydroxyfumaric acid, catechin, resveratrol, ENOXIL, free radical.*

## 1. INTRODUCERE

Strugurii reprezintă un sistem complex format din substanțe bio-active și nutritive benefice pentru menținerea sănătății omului. Conform datelor, conținutul de acid ascorbic (AA), catechină (CAT), resveratrol (RES), acid dihidroxifumaric (DHF), acid tartric (AT) și acid citric (AC) în struguri este diferit, variind pe întreaga perioadă de dezvoltare și coacere a bobîțelor, astfel că, în fructele coapte se întâlnesc concentrațiile de: max. 50 mg/L AA [1], 660 – 2200 mg/kg CAT [2], 20 – 40 mg/kg RES [1], 3.5 – 11 g/L AT [1], 0.2 – 0.4 g/L AC [1] și concentrații mici de DHF [3]. Multiplele procese chimice și bio-chimice din struguri [4] fac posibilă interacțiunea dintre acești compuși, precum și existența acțiunilor comune soldate cu efecte antifungice, antibactericide, antioxidante etc [5-7].

Studiile recente arată că odată combinați, compușii naturali manifestă interacțiuni antioxidante (IA) sinergice, aditive și antagoniste [7-11]. Interacțiunile sinergice sunt mai avantajoase decât cele aditive sau antagoniste, întrucât determină efecte antioxidante crescute [12]. Conform literaturii [13], combinarea compușilor antioxidanți și non-antioxidanți este favorizantă și din punct de a activității prooxidante a compușilor bio-activi, odată ce un singur antioxidant poate manifesta caracter prooxidativ când este utilizat în concentrații mari.

Pe de altă parte, preparatul autohton ENOXIL este un produs multicomponent obținut prin oxidarea leantă a enotaninurilor din struguri [14]. În urma interacțiunii cu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are loc depolimerizarea proantocianidine și îmbogățirea structurilor rezultante cu grupări hidroxil

pentru sporirea activității antioxidante [14]. Testele antiseptice și antioxidante au demonstrat eficiența preparatului în tratarea infecțiilor de piele și a rănilor [14]. Totuși, investigații referitoare la activitatea antioxidantă a ENOXIL-ului în combinație cu alți compuși naturali, precum și posibilele IA dintre aceștia nu au fost raportate.

Studiul dat conține date despre activitatea antioxidantă a preparatului ENOXIL și a principalilor compuși din struguri și despre IA posibile dintre aceștia, la diferite concentrații și în diferite medii de reacție.

Rezultatele obținute îmbogățesc și completează studiile existente, de asemenea, permit formularea unor idei mai exacte referitoare la procesele redox în care pot fi implicate substanțele studiate – procese care au loc în struguri, vinuri, precum și în organismul uman odată ce compușii dați sunt consumați ca hrană. De asemenea, concluziile elaborate pe baza datelor experimentale pot fi utilizate pentru îmbunătățirea efectului antioxidant și a eficienței produselor farmaceutice, medicinale, cosmetice, alimentare etc., și a procedeelor tehnologice utilizate.

## 2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

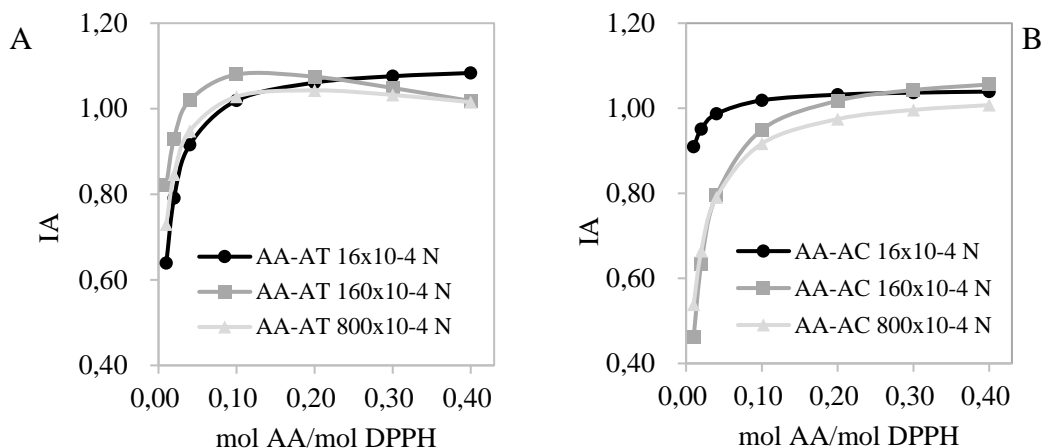
În secțiunea dată sunt prezentate rezultatele privind studiul cineticii reacțiilor dintre antioxidanții din struguri și radicalii liberi, cu implicarea acizilor organici. De asemenea, sunt raportate date privind interacțiunile antioxidante dintre AA – AT, AC sau DHF, CAT – AA, RES – CAT și ENOXIL – AA. Totodată, această secțiune conține date care demonstrează efectul solventului și a mediului de reacție asupra activității antioxidante, recurgând la diferite metode spectrometrice.

### 2.1. Interacțiunile antioxidante dintre AA și AT sau AC

Prezența acizilor naturali AT și AC în amestecul de reacție AA - DPPH\* în etanol (EtOH) a demonstrat o influență pozitivă asupra acțiunii antioxidante a AA. Concentrația Eficientă ( $CE_{50}$ ) [15], care este un parametru invers proporțional cu puterea antioxidantă a unui compus, este mai mică în probele ce conțin acizii AT și AC. Astfel,  $CE_{50} = 0.22$  mol AOX/mol DPPH este caracteristică pentru amestecurile în care este prezent AT sau AC, comparativ cu  $CE_{50} = 0.24$  mol AOX/mol DPPH în probele unde acizii AT și AC lipsesc. Date similare au fost raportate anterior [8, 10].

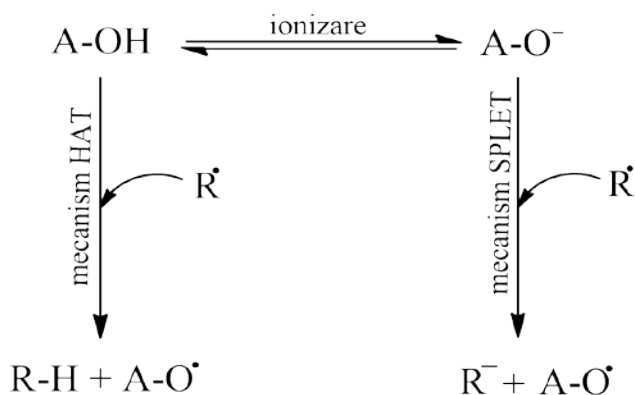
Conform Figurii 1, IA dintre AA și AT sau AC sunt dependente de concentrația compușilor naturali, precum și de raportul molar AA/DPPH. La concentrații mai mici ale AA, au fost înregistrate IA antagoniste (min. 0.64 – în prezența AT, și min. 0.46 – în prezența AC), urmate de cele aditive și sinergice odată cu creșterea concentrației de AA și, respectiv, a raportului molar AA/DPPH. Variind concentrația de acizi organici de la  $16 \times 10^{-4}$  N la  $800 \times 10^{-4}$  N, a putut fi observat faptul că probele cu concentrații mai mici de AT sau AC

posedă activitate antioxidantă mai bună, înregistrându-se efecte sinergice de max. 1.08 pentru amestecul AA – AT ( $16 \times 10^{-4}$  N) și de max. 1.06 pentru AA – AC ( $160 \times 10^{-4}$  N).



**Fig. 1.** IA dintre AA în combinație cu diferite concentrații de A) AT și B) AC. DPPH a fost utilizat în calitate de radical liber, solventul – 96% etanol, timpul reacției – 30 min. IA au fost calculate conform metodei descrise anterior [7, 13]

Îmbunătățirea activității antioxidante a AA în prezența acizilor organici se poate datora mecanismului de acțiune al acestui captator de radicali liberi. În acest mediu de reacție, ionizarea AA este blocată din cauza cantității mari de ioni de AT sau AC prezenți în soluție (Schema 1).



**Schema 1.** Ilustrare a dependenței mecanismului de acțiune a antioxidantului de prezența acizilor organici AT sau AC și ionizarea moleculei. În Schemă, A-OH reprezintă antioxidantul în forma redusă, iar R<sup>•</sup> este specia radicalică, în cazul de față – DPPH<sup>•</sup>

Inhibarea mecanismului SPLET (deprotonarea moleculei și transferul electronului), care presupune cedarea protonului apoi transferul electronului către specia radicalică, determină antioxidantul să acționeze prin mecanismul HAT (transferul atomului de hidrogen) pentru anihilarea DPPH<sup>•</sup>, prin care are loc transferul întregului atom de hidrogen către radicalul

liber. Se știe că AA acționează eficient prin mecanismul HAT donând doi atomi de hidrogen speciilor radicalice [16].

## **2.2. Interacțiunile antioxidante dintre AA și DHF**

Compușii naturali AA și DHF, din punct de vedere a chimiei antioxidantilor, sunt niște substanțe cu proprietăți reducătoare puternice, fiind capabili să anihileze rapid radicalii liberi precum DPPH<sup>\*</sup> [7, 17]. Ambii antioxidanți se găsesc în concentrații mici în struguri, AA fiind obținut din D-manoză și L-galactoză [18] și utilizat apoi ca precursor pentru sinteza acizilor oxalic și tartric [19]; DHF este un constituent al ciclului acizilor dicarbonici – ciclul Baround al transformării acidului tartric și a intermediarilor acestuia în acid oxalic [20]. De asemenea, ambii acizi organici se găsesc în vinuri, AA fiind adăugat pentru menținerea calității și pentru împiedicarea oxidării compușilor fenolici [21], iar DHF este obținut prin oxidarea lentă a AT în prezența radicalilor liberi [22].

Spectroscopiile Stopped-Flow și UV-Viz au fost utilizate cu succes pentru investigarea tipului de IA dintre AA și DHF, și pentru studiul influenței mediului de reacție asupra activității antioxidante a compușilor.

## **2.3. Investigații utilizând spectroscopia Stopped-Flow**

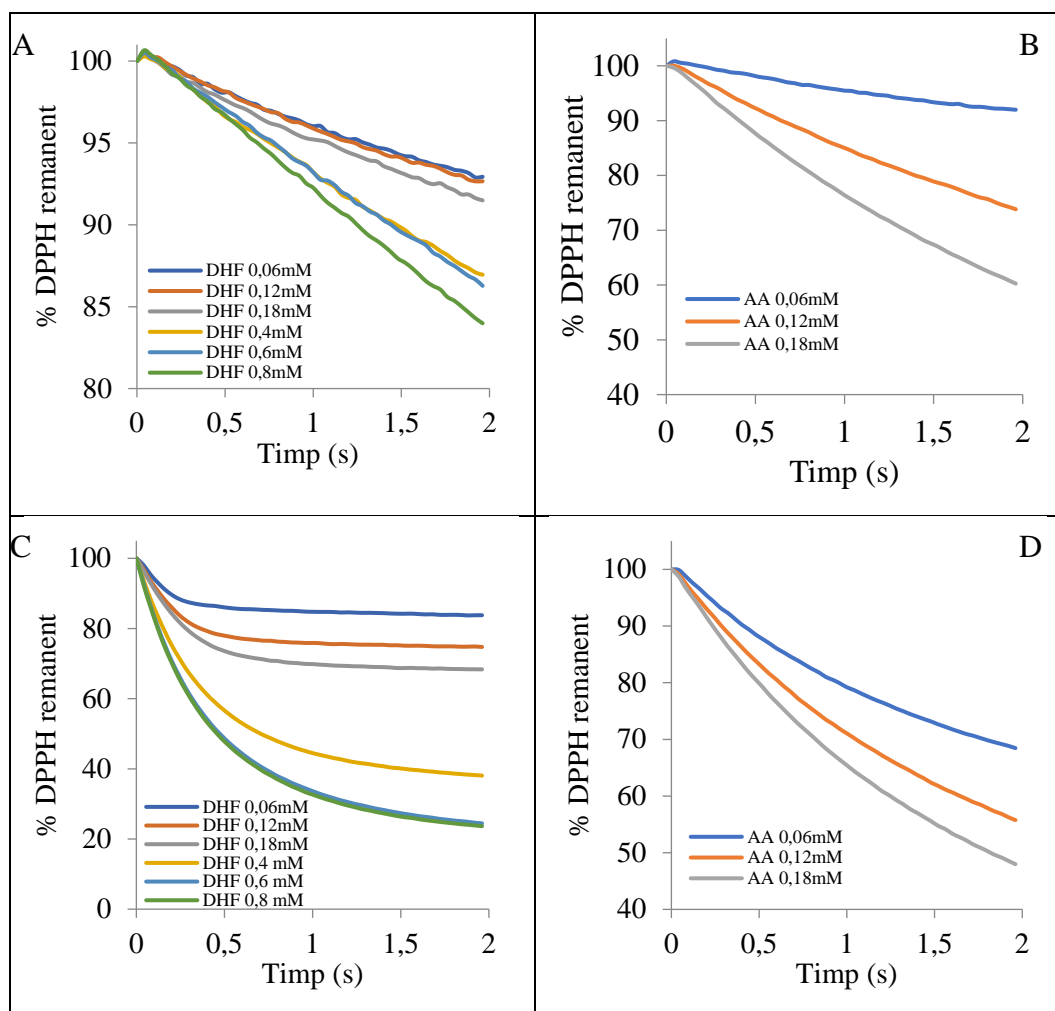
Utilizarea spectroscopiei Stopped-Flow a permis investigarea cineticii reacțiilor redox dintre AA, DHF și DPPH<sup>\*</sup> în primele 2 sec după amestecarea reactanților. Influența mediului de reacție asupra activității antioxidante a DHF și AA și a combinațiilor AA – DHF a fost investigată prin utilizarea a doi solvenți: 98% EtOH și matricea de vin (5 g/L acid tartric într-un amestec apă – etanol (12% v/v); pH-ul stabilit la 3.2 prin adăugarea de hidroxid de sodiu), utilizând metoda DPPH [7].

Deși amestecul din care a fost formată matricea de vin nu a demonstrat activitate antioxidantă împotriva DPPH<sup>\*</sup>, matricea de vin s-a dovedit a avea o influență semnificativă asupra activității antioxidante și vitezei de reacție a compușilor testați. Conform Figurii 2, soluția de DPPH<sup>\*</sup> de 0.25 mM este mult mai eficient anihilată în matricea de vin decât în 98% etanol.

Eficiența maximă a 0.8 mM de DHF este de 80% în matricea de vin, pe când în alcool de doar 16%. Similar cazului DHF, activitatea antioxidantă a AA este mai bună în matricea de vin, 0.18 mM AA eliminând 40% din DPPH<sup>\*</sup> și circa 45% în matricea de vin. O modificare considerabilă a activității antioxidante se înregistrează pentru cea mai mică concentrație de AA (0.06 mM), a cărei eficiență crește de la 10% în etanol la 30% în matricea vinului (Figura 2).

Rezultatele din Figura 2 sunt confirmate de datele din Tabelul 1, unde sunt reprezentate constantele de viteză observate ( $k_{obs}$ ) pentru ambii antioxidanți, utilizați în diferite concentrații, în 98% etanol și în matricea de vin. Valorile  $k_{obs}$  pentru DHF sunt de 10 ori

mai mari în matricea de vin, comparativ cu cele în 98% etanol, iar  $k_{obs}$  pentru AA sunt de două ori mai mari în matricea de vin.



**Fig.2.** Ilustrarea interacțiunii DPPH<sup>\*</sup> cu diferite concentrații de DHF și AA în (A, B) etanol și în (C, D) matricea de vin. Preluată [7]

Creșterea activității antioxidante și a vitezei de reacție a antioxidanților în matricea de vin poate fi favorizată de prezența unei concentrații mari de acid tartric prezent în soluția de matrice de vin, deoarece influența acizilor organici asupra activității antioxidante totale a unor compuși naturali a fost raportată în literatură [8-11]. Datele din Tabelul 1 sunt în concordanță cu rezultatele obținute la interacțiunea AA – AT (Figura 1) și susține ideea că concentrația mare de ioni de acid tartric din matricea de vin ar putea suprima ionizarea AA sau a DHF și, prin urmare, ar inhiba mecanismul SPLET care, dimpotrivă, pare să fie operativ în mediul de 98% EtOH. Prin urmare, ipoteza conform căreia, în matricea de vin, antioxidanții elimină DPPH<sup>\*</sup> prin mecanismul HAT capătă credibilitate la această etapă. Pe

de altă parte, reacția poate fi afectată considerabil și de conținutul mare de apă din matricea de vin.

**Tabelul 1**

Constantele de viteză observate pentru DHF și AA în reacție cu DPPH<sup>\*</sup> determinate în 98% etanol și în matricea de vin. Preluat [7]

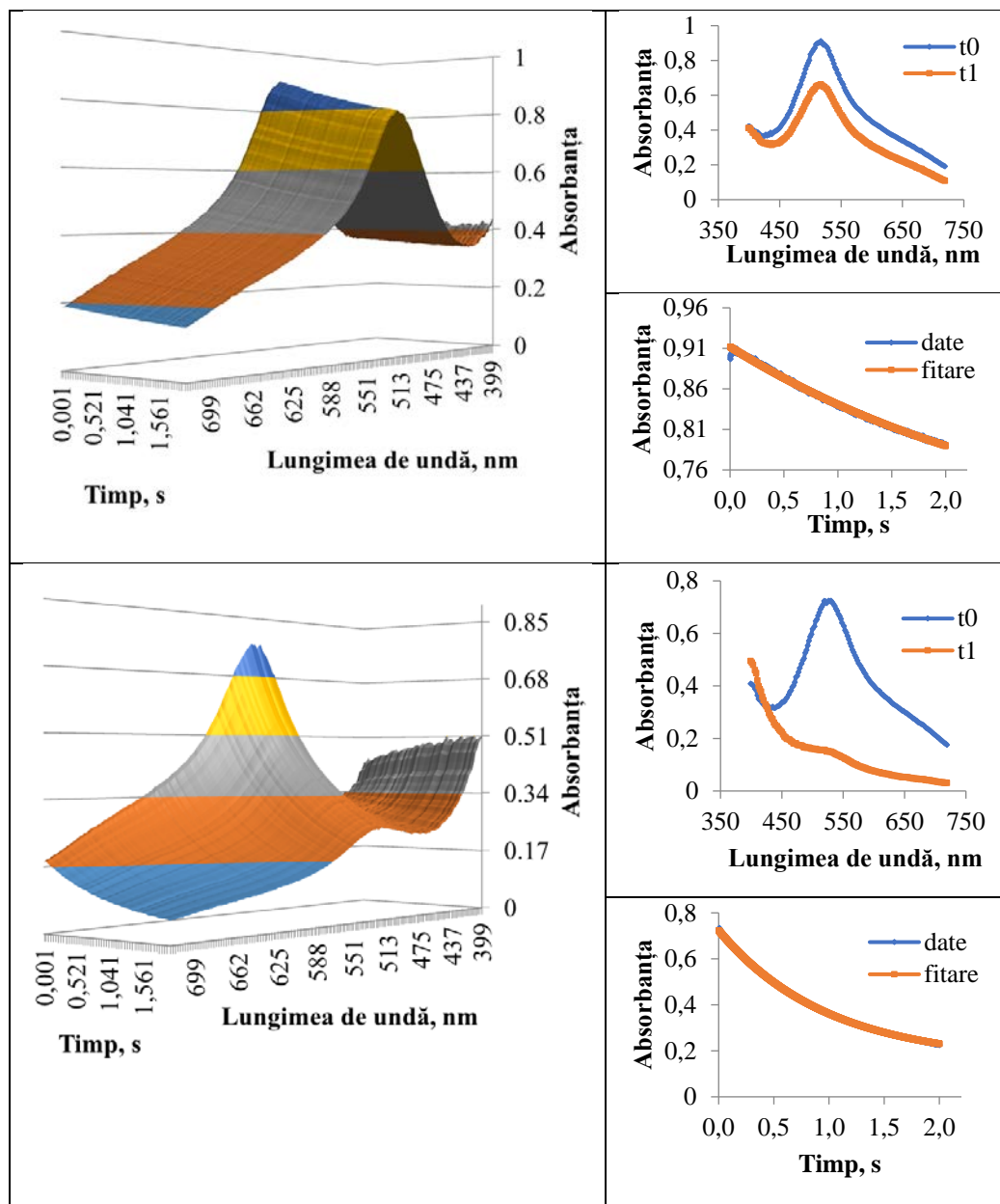
Proba	Concentrația, mM	$k_{obs}, s^{-1}$	
		98% Etanol	Matricea de vin
DHF	0.06	$0.368 \pm 0.049$	$3.656 \pm 0.496$
	0.12	$0.350 \pm 0.030$	$3.863 \pm 0.155$
	0.18	$0.383 \pm 0.054$	$3.371 \pm 0.091$
	0.40	$0.167 \pm 0.024$	$2.277 \pm 0,049$
	0.60	$0.107 \pm 0.076$	$2.122 \pm 0.032$
	0.80	$0.040 \pm 0.016$	$2.181 \pm 0.057$
AA	0.06	$0.328 \pm 0.036$	$0.654 \pm 0.021$
	0.12	$0.327 \pm 0.017$	$0.653 \pm 0.006$
	0.18	$0.385 \pm 0.020$	$0.681 \pm 0.015$

Pentru a determina tipul IA dintre DHF și AA în 98% etanol și în matricea de vin, a fost efectuată o serie de experimente folosind șase concentrații de DHF (de la 0.06 mM până la 0.80 mM) amestecate cu fiecare dintre cele trei concentrații de AA – 0.06, 0.12 și 0.18 (mM), după cum este prezentat și în Tabelul 1 [7]. Aceeași tendință caracterizată prin îmbunătățirea activității antioxidante în matricea de vin este urmărită și în cazul amestecurilor AA – DHF.

Figura 3 demonstrează prezența unei activități antiradicalice semnificativ mai mare a amestecurilor de antioxidanți în matricea de vin, unde DPPH<sup>\*</sup> este neutralizat în proporție de 85%, comparativ cu datele în etanol care ilustrează o scădere a absorbanței cu doar 0.2 unități, echivalentul unei eficiențe de numai 20%.

Valorile  $k_{obs}$  pentru toate combinațiile DHF – AA sunt prezentate în Tabelul 2. Similar cu datele din Tabelul 1, valorile  $k_{obs}$  pentru amestecurile de antioxidanți sunt mai mari în matricea de vin decât în 98% EtOH [7]. Cea mai mare constantă înregistrată în EtOH de  $0.35 s^{-1}$  corespunde amestecului DHF (0.06 mM) – AA (0.12 mM), această valoare fiind mai mică decât  $k_{obs}$  pentru reacția DPPH<sup>\*</sup> - DHF în etanol (Tabelul 1).

În matricea de vin, valorile  $k_{obs}$  variază în diapazonul  $0.9 \text{ s}^{-1}$  -  $1.1 \text{ s}^{-1}$ , aceste valori fiind de trei ori mai mari decât  $k_{obs}$  determinate în 98% EtOH [7]. Deși viteza de reacție în amestecurile DPPH<sup>•</sup> – DHF – AA este sporită în matricea de vin, valorile date nu depășesc  $k_{obs}$  pentru cazurile când antioxidanții au fost testați separat (Tabelul 1).



**Fig. 3.** Scăderea absorbanței după interacțiunea DPPH<sup>•</sup> cu amestecul de DHF (0.18 mM) și AA (0.18 mM) în (a) etanol 98% și (d) matrice de vin. Spectrele de absorbție pentru reacția dintre DPPH<sup>•</sup> și amestecul DHF – AA la 0.001s și 2s în (b) etanol și (e) matrice de vin. Fitarea modelul cinetic A→B la 529 nm modelul (c) și (f). Preluată [7]



**Tabelul 2**

Constantele de viteză observate în 98% etanol și matricea de vin pentru reacția dintre DPPH' cu amestecuri de DHF – AA luate în diferite concentrații. Preluat [7]

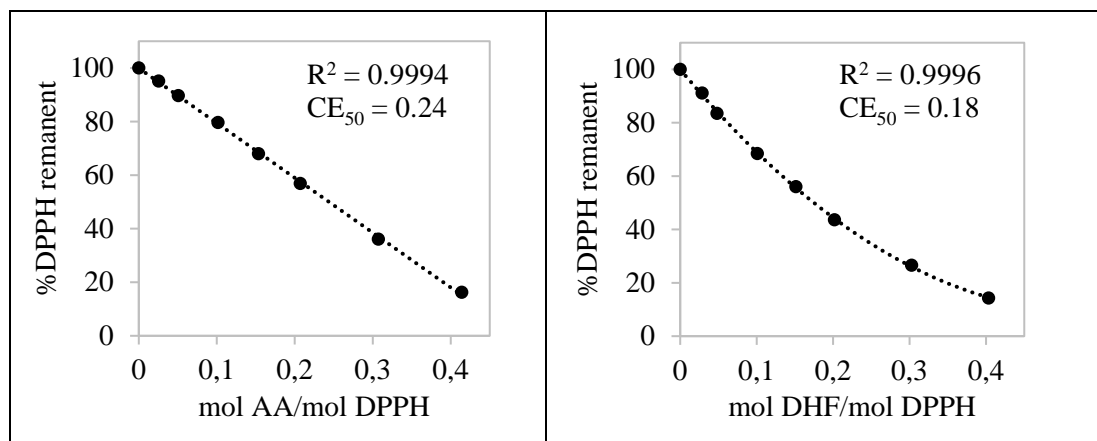
Concentrația de AA, mM	Concentrația de DHF, mM	$k_{obs}, s^{-1}$	
		Etanol	Matricea de vin
0.06	0.06	$0.303 \pm 0.040$	$0.914 \pm 0.035$
	0.12	$0.310 \pm 0.032$	$0.962 \pm 0.026$
	0.18	$0.311 \pm 0.021$	$1.029 \pm 0.048$
	0.40	$0.184 \pm 0.015$	$1.174 \pm 0.130$
	0.60	$0.117 \pm 0.008$	$1.159 \pm 0.134$
	0.80	$0.047 \pm 0.011$	$1.103 \pm 0.092$
0.12	0.06	$0.354 \pm 0.010$	$0.734 \pm 0.043$
	0.12	$0.347 \pm 0.022$	$0.873 \pm 0.014$
	0.18	$0.322 \pm 0.035$	$0.950 \pm 0.029$
	0.40	$0.004 \pm 0.000$	$0.997 \pm 0.009$
	0.60	$0.130 \pm 0.007$	$0.882 \pm 0.021$
	0.80	$0.048 \pm 0.008$	$0.984 \pm 0.028$
0.18	0.06	$0.347 \pm 0.016$	$0.874 \pm 0.014$
	0.12	$0.326 \pm 0.009$	$0.946 \pm 0.008$
	0.18	$0.333 \pm 0.017$	$1.009 \pm 0.009$
	0.40	$0.199 \pm 0.018$	$1.034 \pm 0.039$
	0.60	$0.131 \pm 0.011$	$1.044 \pm 0.021$
	0.80	$0.042 \pm 0.030$	$1.077 \pm 0.010$

Astfel, comparând rezultatele prezentate în Tabelele 1 și 2, se observă că  $k_{obs}$  pentru reacțiile de anihilare a DPPH' în matricea de vin scad de la aproximativ  $3 s^{-1}$ , în cazul utilizării unui singur antioxidant, la  $1 s^{-1}$  atunci când în reacție sunt ambii antioxidanți. Faptul dat demonstrează că, odată amestecați, DHF și AA captează mai lent speciile radicalice, ceea ce ar putea semnala asupra unor procese secundare, precum este decarboxilarea DHF în medii mai acide. Totuși, după 2 s de interacțiune, reacția nu este

completă, respectiv concluzii clare asupra tipului de interacțiune antioxidantă dintre AA și DHF nu pot fi formulate la această etapă.

#### 2.4. Investigații utilizând spectroscopia UV-Viz

Datele din literatură arată că AA anihilează DPPH<sup>•</sup> în 1 – 3 min [23], iar DHF cedează electroni speciilor de DPPH<sup>•</sup> în aproximativ 1 min, partea cinetică fiind caracterizată de o etapă rapidă și una lentă de interacțiune cu radicalul liber [17]. Conform literaturii [15, 17] valoarea CE<sub>50</sub> pentru AA corespunde cu cea pentru DHF și este de 0.24 mol AOX/mol DPPH. Repetarea acestor experimente a confirmat valoarea CE<sub>50</sub> pentru AA de 0.24, iar în cazul DHF a fost obținută CE<sub>50</sub> = 0.18 (Figura 4) – diferență care se poate datora utilizării diferiților solvenți.

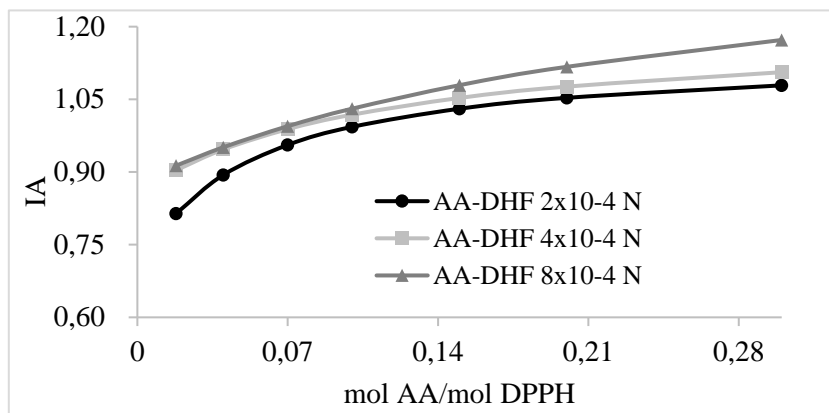


**Fig. 4.** Reprezentarea grafică a dependenței %DPPH remanent de raportul molar antioxidant/DPPH pentru reacția AA - DPPH<sup>•</sup> (A) și DHF - DPPH<sup>•</sup> (B). Date obținute la spectroscopia UV-Viz

Pentru determinarea tipului de IA dintre antioxidanți, diferite concentrații de AA au fost combinate cu trei concentrații de DHF ( $2 \times 10^{-4}$  N,  $4 \times 10^{-4}$  N,  $8 \times 10^{-4}$  N), și la amestecul dat a fost adăugat DPPH<sup>•</sup> (Figura 5). Reacția a decurs 30 min pentru a fi asigurată stabilirea stării de echilibru.

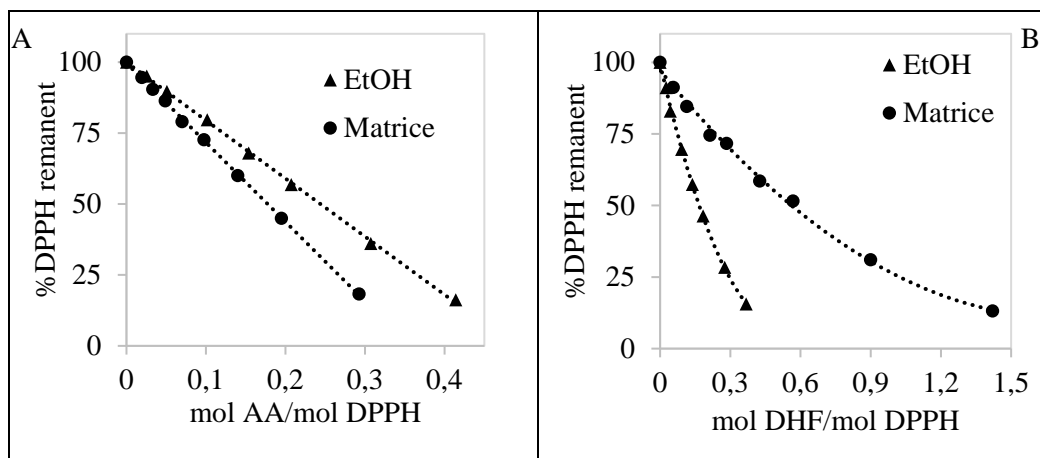
Valorile IA dintre AA – DHF determinate prin metoda UV-Viz evoluează de la antagoniste la sinergice ca o consecință a creșterii concentrațiilor ambilor antioxidanți. Prin urmare, cea mai mare valoare sinergică de 1.17 a fost obținută pentru raportul molar AA/DPPH de 0.30 în combinație cu  $8 \times 10^{-4}$  N de DHF (Figura 5), care reprezintă cele mai mari concentrații de AA și DHF utilizate în acest experiment.

După cum a fost presupus, odată cu mărirea timpului de interacțiune a amestecului AA – DHF cu radicalul liber, valorile care descriu activitatea antioxidantă totală cresc, respectiv, și procentul de anihilare a DPPH<sup>•</sup> devine mai mare.



**Fig. 5.** IA dintre AA și DHF la diferite concentrații ale compușilor. În calitate de solvent a fost utilizat 96% EtOH

Antioxidanții AA și DHF se comportă diferit în matricea de vin. Conform Figurii 6, AA posedă activitate antioxidantă sporită în matricea de vin, indicatorul CE<sub>50</sub> diminuându-se de la 0.24 până la valoarea de 0.18 mol AA/mol DPPH (Figura 6A).



**Fig. 6.** Dreapta de calibrare a AA (A) și DHF (B) în reacția cu DPPH în mediu de 96% EtOH și matricea de vin.

Pe de altă parte, compusul DHF demonstrează activitate antioxidantă redusă în matricea de vin, comparativ cu datele obținute în EtOH (Figura 6B). Faptul dat este confirmat de creșterea semnificativă a valorii CE<sub>50</sub> de la 0.18 până la 0.56, ceea ce indică necesitatea unei concentrații mai mari de DHF pentru anihilarea aceleiași concentrații de radical liber.

Rezultatele obținute în 96% EtOH și în matricea de vin la spectroscopia UV-Viz confirmă datele obținute prin spectroscopia Stopped-Flow în aceiași solvenți. Activitatea antioxidantă sporită a AA se poate datora prezenței în matricea de vin a apei – solvent în care AA se dizolvă foarte rapid. Faptul dat poate influența viteza de cedare a electronilor sau atomilor de hidrogen de la AA, precum și activitatea antioxidantă a compusului dat. De

asemenea, prezența ionilor de AT în mediu afectează pozitiv puterea reducătoare a AA [8, 11]. Pe de altă parte, DHF se dizolva ușor în mediu de 96% EtOH și mult mai greu în matricea simulată de vin care conține doar 12% EtOH.

De asemenea, în prezența concentrației mari de AT din matrice, pot surveni unele procese de decarboxilare a DHF după cum a fost demonstrat anterior [24, 25]. Aceste observații justifică activitatea antioxidantă redusă a DHF în matricea de vin, precum și micșorarea valorilor  $k_{obs}$  (vezi subcapitolul 2.3) ale DHF și combinațiilor AA – DHF în matricea de vin.

### **2.5. Studiul cineticii reacțiilor CAT - radicali liberi, interacțiunile antioxidante cu AA și efectul solventului.**

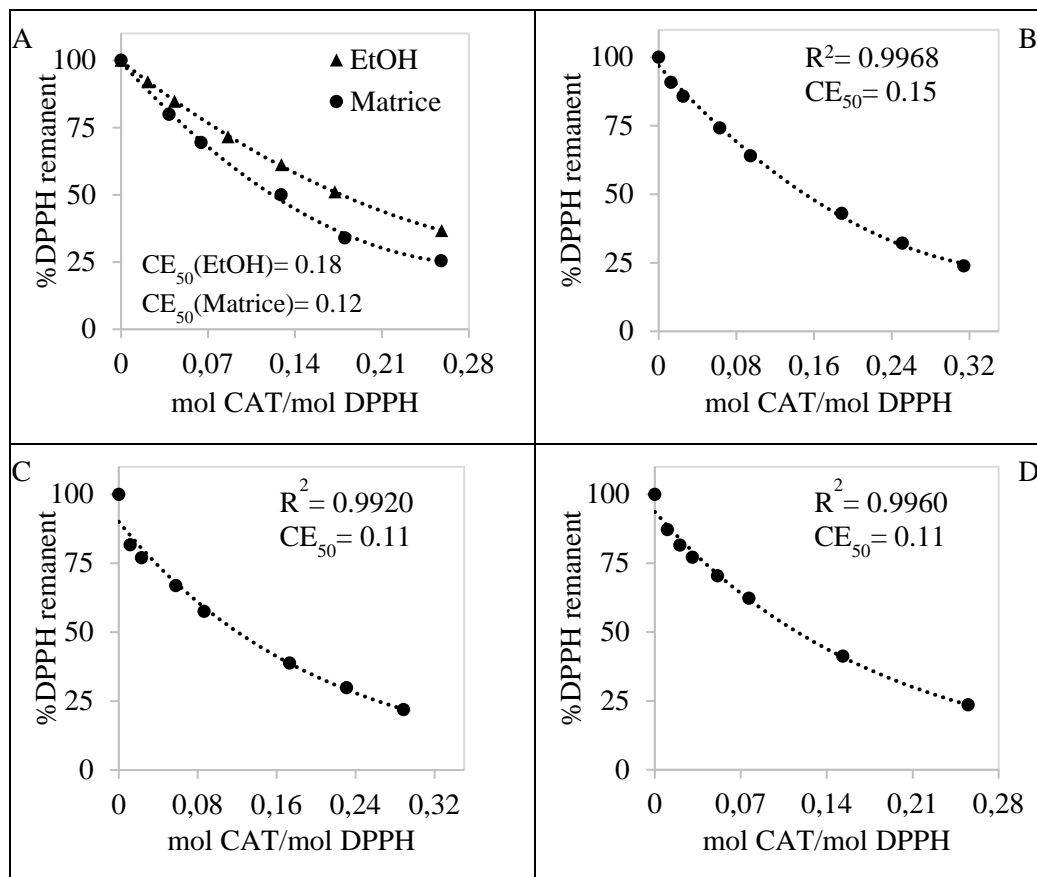
Polifenolul CAT aparține subgrupului de compuși naturali numiți flavonoide, și este un tip de metabolit secundar care, datorită proprietăților antioxidante, joacă rol protectiv în plante. Activitatea antioxidantă a CAT se datorează prezenței grupelor funcționale hidroxil în structura antioxidantului, care au capacitatea de a reduce radicalii liberi prin donarea de electroni sau atomi de hidrogen; totodată, structura aromatică a compusului permite stabilizarea radicalilor aroxil formați [26].

În studiul dat, activitatea antioxidantă a CAT a fost determinată în 96% EtOH și în matricea de vin. De asemenea, a fost stabilită influența AA asupra activității antioxidante a CAT în matricea de vin. Experimentele au fost efectuate prin metoda spectrofotometrică UV-Viz, utilizând radicalul DPPH.

Figura 7 arată că CAT, în reacția cu DPPH<sup>\*</sup>, manifestă activitate antioxidantă mai bună în matricea de vin decât în 96% EtOH. Astfel că, indicele  $CE_{50}$  determinat în EtOH este de 0.18, iar în matricea de vin – de 0.12 (Figura 7A). Acest efect poate fi datorat prezenței apei în matricea de vin, care susține mecanismul SET-PT (sequential electron transfer – proton transfer) de acțiune în cazul flavonoidelor [27] – mecanism prin care CAT poate anihila eficient specia radicalică.

Odată adăugate diferite concentrații de AA la reacția CAT - DPPH<sup>\*</sup> în matricea de vin, valoarea  $CE_{50}$  dat se modifică (Figura 7, cazurile B, C și D). În cazul prezenței a 0.06mM AA, valoarea  $CE_{50}$  crește de la 0.12 (fără AA) la 0.15, ceea ce înseamnă că activitatea antioxidantă a amestecului de compuși scade. Totuși, la adăugarea a 0.08mM și 0.12mM de AA, valoarea  $CE_{50}$  scade până la 0.11 mol CAT/mol DPPH. Faptul dat indică creșterea activității antioxidante a amestecului dintre CAT - AA în matricea de vin.

Rezultate similare, unde activitatea antioxidantă totală a amestecului AA – CAT este dependentă de concentrația AA au fost raportate anterior [28]. Autorii au demonstrat că la anumite concentrații de AA, în structura CAT se produc schimbări, care rezultă cu scăderea activității antioxidante totale în prezența concentrațiilor mici de AA, pe când la concentrații mai mari de AA, CAT polimerizează și formează proantocianidine cu putere antioxidantă sporită [28].



**Fig. 7.** Curbele de calibrare a reacției dintre CAT și DPPH în (A) 96% EtOH și în matricea de vin; și în prezența diferitor concentrații de AA: (B) 0.06 mM, (C) 0.08 mM, (D) 0.12 mM

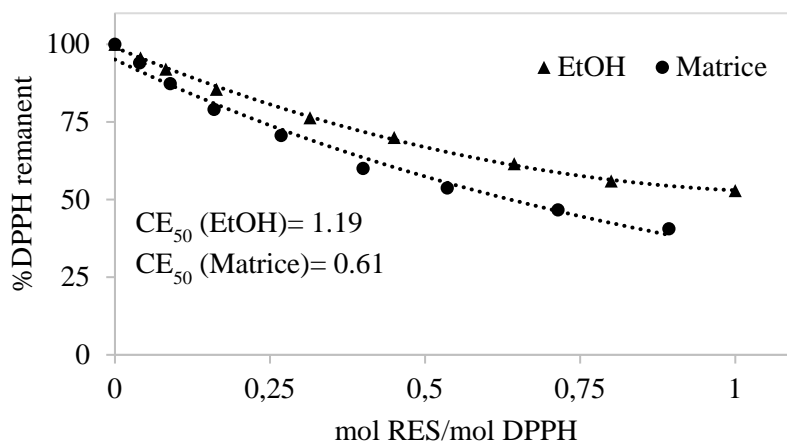
Cunoscând faptul că valorile  $CE_{50}$  ale interacțiunilor AA – DPPH\* ( $CE_{50} = 0.18$ ) și a CAT – DPPH\* ( $CE_{50} = 0.12$ ) analizate în matricea de vin, sunt mai mari comparativ cu valoarea  $CE_{50}$  a amestecului CAT – AA – DPPH\* ( $CE_{50} = 0.11$ ), prezența sinergismului în condițiile date este justificată.

### 2.6. Studiul cineticii reacțiilor RES - radicali liberi, interacțiunile antioxidante cu CAT și efectul solventului.

Compusul RES este un stilben natural și o fitoalexină produsă de mai multe plante ca răspuns la răni sau la atacul agenților patogeni, cum ar fi bacterii sau ciuperci. Datorită bioactivității pronunțate, RES capătă popularitate sporită în calitate de ingredient în suplimentele alimentare și formulele de vitamine [29].

Analizele asupra activității antioxidante a RES în reacția cu DPPH\* în mediu de 96% EtOH și în matricea de vin au demonstrat diferențe semnificative la nivel de activitate antioxidantă. Conform Figurii 8, în matricea de vin, puterea reducătoare a RES este

considerabil mai mare, indicatorul CE50 în acest mediu de reacție fiind egal cu 0.61, comparativ cu valoarea CE50= 1.19 în 96% EtOH. Similar reacției CAT – DPPH<sup>\*</sup> în matricea de vin, înjumătățirea valorii CE50 pentru RES poate fi cauzată de efectul solventului, care este unul determinant în cazul RES [30, 31].



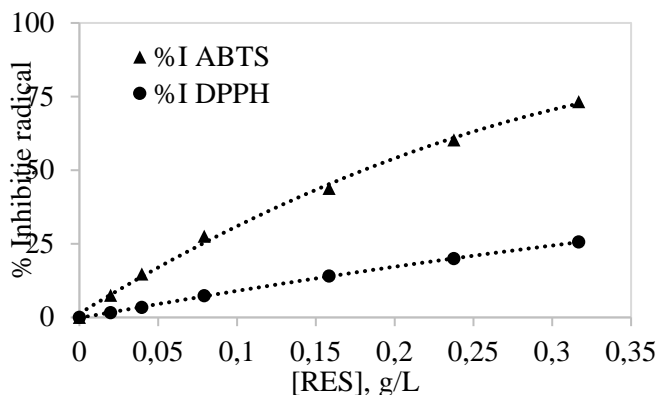
**Fig. 8.** Curbele de calibrare a reacției dintre RES și DPPH în 96% EtOH și în matricea de vin, cu indicarea valorilor CE<sub>50</sub>

Compusul natural RES a demonstrat activitatea antioxidantă atât contra radicalului liber DPPH, cât și contra radicalului cation ABTS (ABTS<sup>+</sup>) (Figura 9). În reacția cu radicalul ABTS procentul de inhibiție este semnificativ mai mare, de aproximativ 80% pentru [RES] ≈ 0.3 g/L. Aceeași concentrație de antioxidant în reacția cu DPPH<sup>\*</sup> produce o inhibiție de aproximativ 25%.

Diferența mare dintre activitatea antioxidantă a RES în reacțiile cu DPPH<sup>\*</sup> sau cu ABTS<sup>+</sup> poate fi cauzată de utilizarea solventului diferit (96% etanol – în cazul metodei DPPH și apa – în cazul testului ABTS), precum și diferitor mecanisme de acțiune implicate în reacțiile redox cu fiecare dintre cei doi radicali liberi.

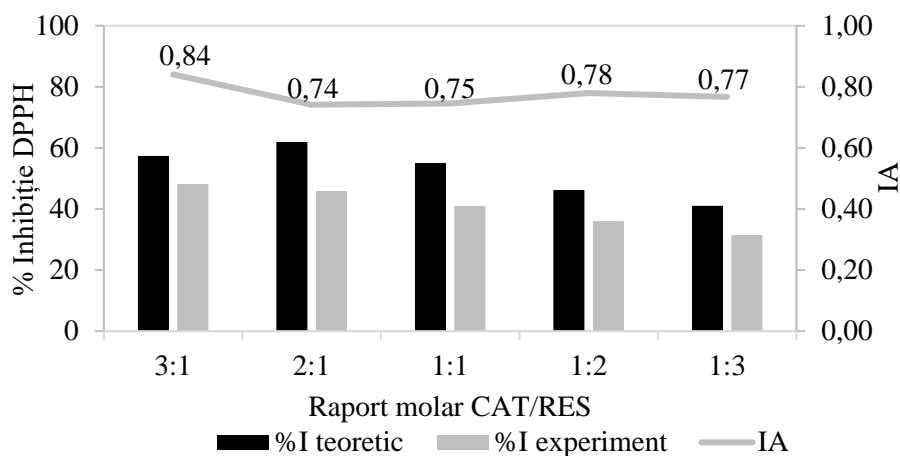
Rezultate similare au fost obținute anterior [32], autorul investigației demonstrând că testul ABTS oferă rezultate mai bune în ceea ce privește activitatea antioxidantă a RES. Gulcin I. [32] menționează că spre deosebire de reacțiile cu radicalii DPPH, care implică transferul atomului de hidrogen, reacțiile cu ABTS<sup>+</sup> implică transferul de electronilor către specia radicalică.

Pe de altă parte, Prior și col. [33] afirmă că ambii radicali liberi – DPPH și ABTS, sunt anihilați prin ambele mecanisme HAT și SPLET. Respectiv, doar în baza acestor date este dificil de formulat o concluzie obiectivă referitor la cauză acțiunii antioxidante sporite a RES contra ABTS<sup>+</sup>, din motivul variației mai multor parametri caracteristici fiecărei metode de determinare a activității antioxidante.



**Fig. 9.** Ilustrarea dependenței %Inhibiție a radicalilor DPPH și ABTS de concentrația RES

Investigarea IA dintre RES și CAT este o altă direcție de cercetare de interes științific, studiul dat fiind efectuat prin utilizarea metodei DPPH, în 96% EtOH. Rezultatele au arătat că amestecarea polifenolilor RES și CAT în diferite raporturi molare, produceo activitatea antioxidantă totală moderată (Figura 10).



**Fig. 10.** Reprezentarea %Inhibiție a DPPH• a diferitor raporturi molare de CAT/RES (axa verticală dreapta) și a IA dintre CAT și RES (axa verticală stânga)

Raporturile molare de CAT/RES (3:1, 2:1, 1:1, 1:2 și 3:1) analizate au demonstrat doar efecte antioxidante antagoniste. Din Figura 10, se observă clar că procentul de inhibiție calculat teoretic este mai mare decât cel calculat în baza datelor experimentale, ceea ce denotă prezența antagonismului. Cel mai puternic antagonism de 0.74 este prezent în amestecul RES – CAT 2:1, iar cel mai mic efect antagonis – în amestecul RES – CAT 3:1.

Combinând acești doi antioxidanți, efectul antagonist poate fi provocat de posibilele interacțiuni dintre RES și CAT care rezultă cu formare de aducți, complecși intermoleculari

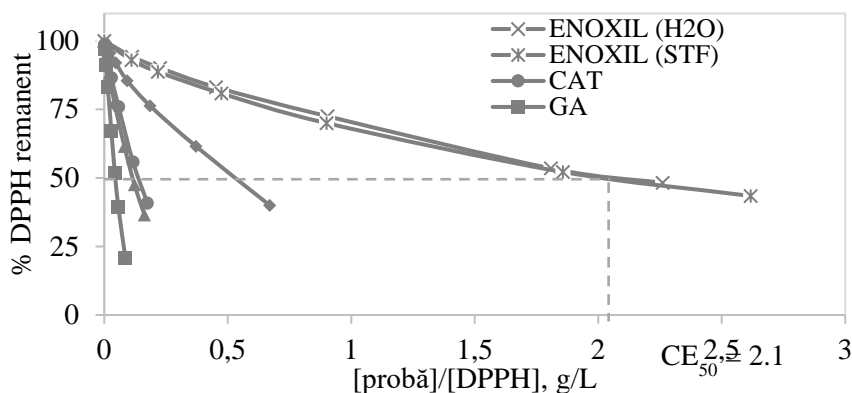
sau polimeri, după cum a fost raportat anterior [34]. Fenomenul dat provoacă reducerea numărului de grupări donoare de electroni, respectiv a activității antioxidante totale.

### 2.7. Studiul cineticii reacțiilor preparatului ENOXIL - radicali liberi, interacțiunile antioxidante cu AA și efectul solventului.

Preparatul ENOXIL este un produs medicinal autohton obținut din enotaninurile din struguri prin procese de oxidare lentă [14]. Preparatul dat constă din compuși fenolici și carboxilici, cetone, aldehide și esteri [14], fiind un produs foarte higroscopic și instabil la temperaturi mai mari de 70°C. Preparatul ENOXIL posedă activități antiseptice și antioxidante, de asemenea, este un produs medicinal non-toxic și eficient contra infecțiilor de piele [14].

Activitatea antioxidantă a preparatului autohton ENOXIL a fost studiată prin intermediul metodelor spectrale descrise în literatură, cu utilizarea compușilor cromofori: DPPH, ABTS, Folin-Ciocalteu, FRAP (puterea de reducere a FeIII), în apă distilată și în soluție tampon fosfat (STF) (pH = 7.4).

Conform Figurii 11, preparatul ENOXIL posedă activitate antioxidantă în reacția cu DPPH<sup>\*</sup>, comparabilă cu cea a compușilor polifenolici naturali. Valoarea CE<sub>50</sub> atât pentru proba dizolvată în apă, cât și pentru cea din STF este de 2.1, ENOXUL-ul având proprietăți antioxidante mai puțin pronunțate decât restul compușilor testați (Figura 11).

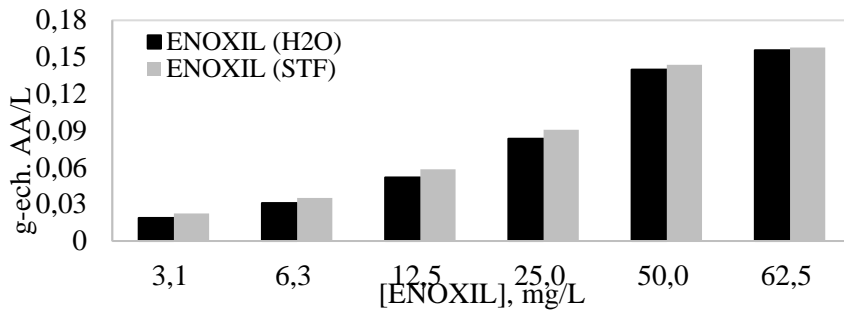


**Fig. 11.** Représentarea comparativă a activității antioxidante a preparatului ENOXIL dizolvat în apă și în STF, a catechinei (CAT), quercetinei (QUE), acidului galic (GA) și a resveratrolului (RES) în reacția cu DPPH

Faptul dat demonstrează că 2.1 g/L ENOXIL anihilează în proporție de 50% 1 g/L DPPH<sup>\*</sup>, iar pentru a anihila 100% radicalul de aceeași concentrație, este nevoie de 4.2 g/L ENOXIL. Comparând aceste date cu activitatea antioxidantă a compușilor naturali din struguri – CAT, QUE, GA, RES, se observă că preparatul ENOXIL posedă activitate antioxidantă mai slabă, întrucât este nevoie de mai mult compus pentru a neutraliza aceeași concentrație de radical liber.



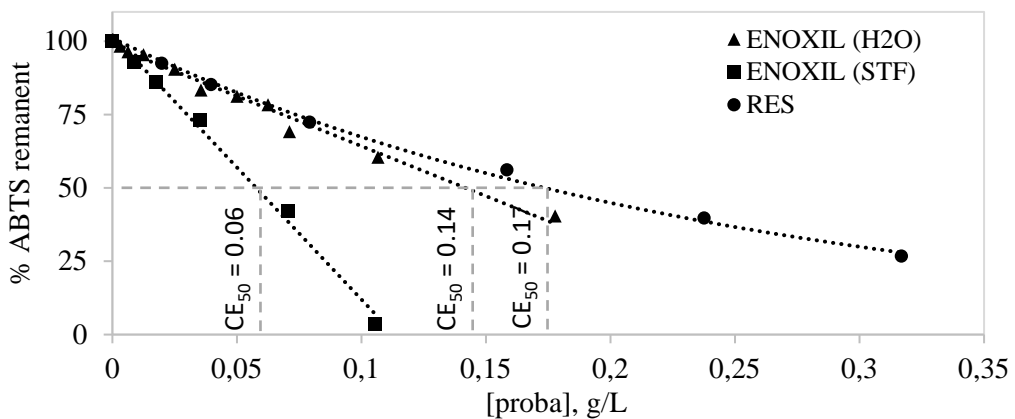
Exprimând rezultatele în g-echivalenți de acid ascorbic per L (g-ech. AA/L), devine posibilă compararea activităților antioxidante a probelor de ENOXIL în apă și în STF:



**Fig. 12.** Reprezentarea activității antioxidante a preparatului ENOXIL în apă și în STF ca g-ech. AA/L în reacția cu 0.03 g/L DPPH

Figura 12 ilustrează dependența activității antioxidante a ENOXIL-ului de concentrația acestuia, demonstrând că 25.00 mg/L ENOXIL acționează ca 0.08 g-ech. AA/L, 62.50 mg/L ENOXIL acționează ca 0.16 g-ech. AA/L etc. Diferența dintre datele obținute în apă și în STF este nesemnificativă, cu un mic avantaj al rezultatelor în STF, ceea ce s-ar putea fi o consecință a specificului metodei DPPH utilizate.

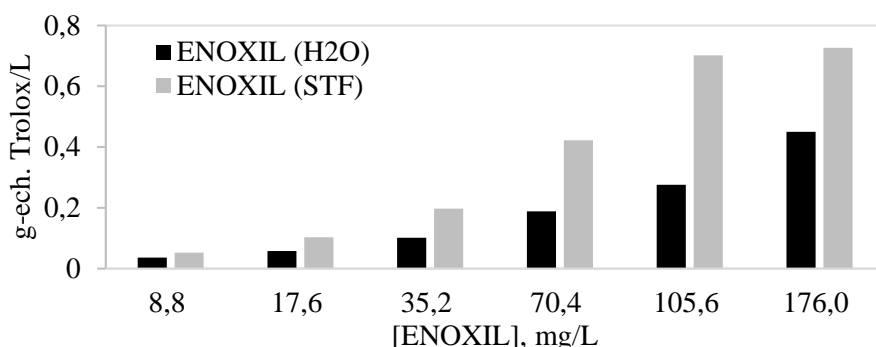
În reacția cu  $ABTS^{+}$ , preparatul ENOXIL prezintă activitate antioxidantă sporită (Figura 13).



**Fig. 13.** Reprezentarea  $CE_{50}$  pentru probele de ENOXIL în apă, în STF și pentru RES în reacția cu  $ABTS^{+}$

Cele două probe de ENOXIL demonstrează activitate antioxidantă mai mare decât compusul natural din struguri – RES. Comparând cele două probe de ENOXIL (în apă și în STF), se observa că proba dizolvată în STF posedă activitate antioxidantă semnificativ mai mare, având indicele  $CE_{50} = 0.06$ , comparativ cu  $CE_{50} = 0.14$  pentru proba în apă. Faptul dat arată că în STF este nevoie de mai puțin ENOXIL pentru anihilarea aceleiași

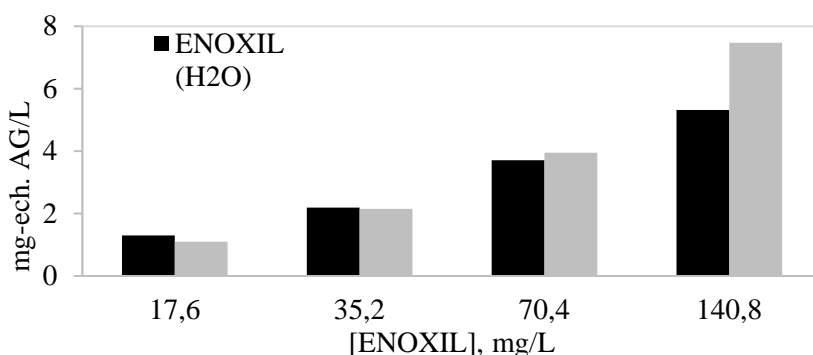
cantității de radical liber, respectiv, în acest mediu captarea radicalilor liberi de preparatul ENOXIL este mai eficientă.



**Fig.14.** Exprimarea în g-ech. Trolox/L a activității antioxidante a ENOXIL-ului în apă și în STF în urma testului ABTS

În Figura 14 este reprezentată diferența în g-ech. Trolox/L dintre activitatea antioxidantă a ENOXIL-ului în apă și în STF în reacția cu ABTS<sup>+</sup>. Se observa clar că în STF activitatea antioxidantă a preparatului este de două ori mai mare decât în apă, spre exemplu, pentru concentrația de 105.60 mg/L ENOXIL activitatea antioxidantă este de 0.28 g-ech. Trolox/L pentru proba în apă, iar pentru proba în STF este de 0.70 g-ech. Trolox/L.

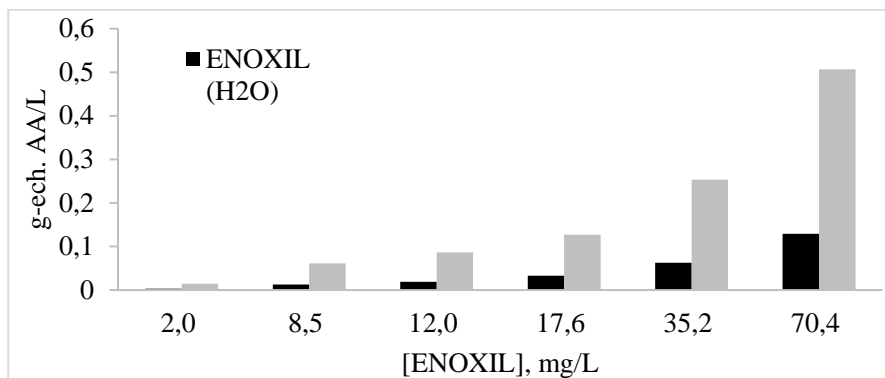
Testul Folin-Ciocalteu (Figura 15) a confirmat activitatea antioxidantă a preparatului ENOXIL și a întărit ideea că în STF preparatul dat este mai activ decât în apă, spre exemplu, pentru concentrația 140.80 mg/L de probă a fost înregistrată o activitate antioxidantă de 5.30 mg-ech. AG/L în apă și de 7.50 mg-ech. AG/L în STF. De asemenea, odată cu creșterea concentrației de ENOXIL se mărește și diferența dintre activitatea antioxidantă a probelor dizolvate în apă și în STF.



**Fig. 15.** Rezultatele testului Folin-Ciocalteu pentru ENOXIL în apă și în STF exprimate în mg-ech. AG/L

Activitatea prooxidantă a compușilor naturali constă în capacitatea acestora de reducere a ionul de Fe<sup>3+</sup> până la Fe<sup>2+</sup> urmată de formarea compusului cromofor Albastru de Berlin

[35]. Figura 16 confirmă capacitatea sporită a ENOXIL-ului de a reduce Fe(III). În special, activitate semnificativă manifestă probei dizolvată în STF, care prezintă capacitate prooxidantă de trei ori mai mare decât proba în apă: pentru concentrația maximă analizată de 70,40 mg/L ENOXIL– 0.13 g-ech. AA/L în apă, și 0.51 g-ech. AA/L în STF.



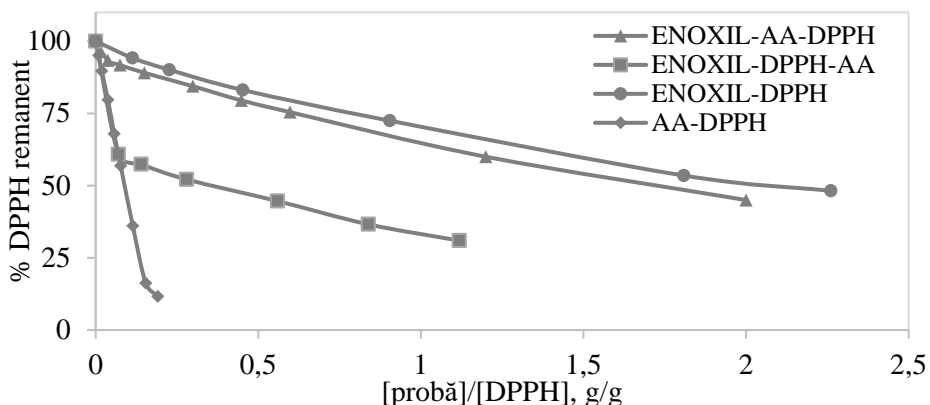
**Fig. 16.** Activitatea prooxidantă a ENOXIL-ului în apă și în STF exprimată în g-ech. AA/L

Activitatea antioxidantă sporită a preparatului ENOXIL în STF se poate datora faptului că compușii polifenolici sunt mai susceptibili la oxidare la pH bazic [36], iar în studiul dat, cele două medii de reacție au avut pH diferit: apă distilată – 7.0, iar STF – 7.4. În mediul bazic, compușii polifenolici anihilează speciile radicalice prin mecanismul SPLET, care presupune inițial cedarea protonului, apoi transferul electronului, astfel că, eficiența mecanismului dat este direct proporțională cu posibilitatea moleculelor antioxidante de a ceda protonii. În STF, acest mecanism este susținut prin neutralizarea protonilor cedați de către soluția tampon, urmată de cedarea electronului de la speciile deprotonate.

În prezența AA, preparatul ENOXIL prezintă activitatea antioxidantă îmbunătățită contra radicalului DPPH (Figura 17). Studiile realizate în baza AA și RES sau AA și DHF [37, 38] au demonstrat că consecutivitatea adăugării compușilor în reacție este decisivă pentru activitatea antioxidantă și, de asemenea, determină tipul de IA. Pentru a stabili importanța consecutivității adăugării compușilor în reacție în cazul combinațiilor ENOXIL - AA, au fost analizate 2 abordări care se diferențiază prin ordinea adăugării compușilor în reacție: I. 0.1 mL soluție de ENOXIL de diferite concentrații se amestecă cu 0.1 mL soluție AA (0.0002 N), după care se adaugă 3.8 mL DPPH<sup>\*</sup>, timp de reacție – 2.5 h; și II. la 0.1 mL soluție de ENOXIL de diferite concentrații se adaugă 3.8 mL DPPH<sup>\*</sup>, după 2 h la amestecul de reacție de adaugă 0.1 mL soluție AA (0.0002 N) și se lasă la întuneric încă 30 min.

Figura 17 demonstrează că ordinea adăugării compușilor în reacție este esențială. Astfel, pentru abordarea I valoarea EC<sub>50</sub> este de 1.7 – mai mică decât pentru interacțiunea ENOXIL – DPPH (EC<sub>50</sub>= 2.1), totuși, mai mare comparativ cu cea de-a II-a abordare. În cazul abordării II, a fost stabilită o valoare EC<sub>50</sub> de aproximativ 0.4 – un indice de 4.25 ori

mai mic decât cel pentru abordarea I. Faptul dat semnifică că, într-un proces chimic sau bio-chimic, urmând abordarea II se poate obține un efect antioxidant de 4.25 ori mai mare decât prin I-a abordare.

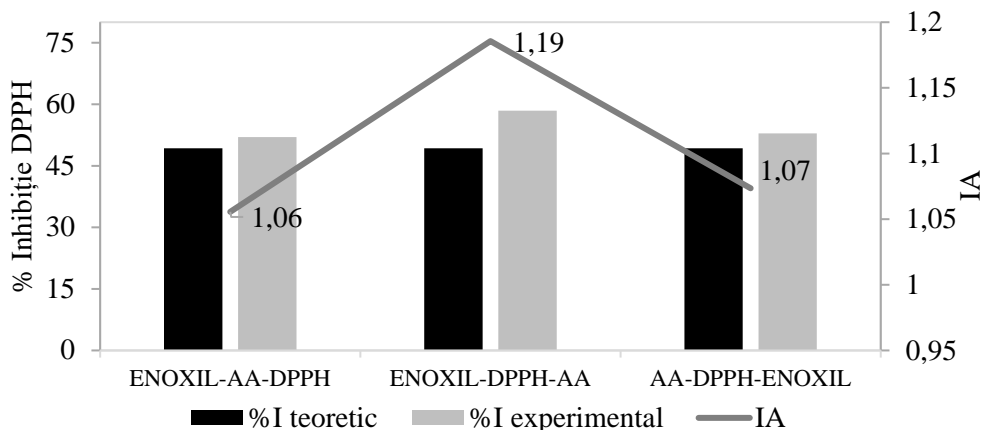


**Fig. 17.** Activitatea antioxidantă a combinațiilor ENOXIL – AA (0.0002N) în apă: abordarea I (ENOXIL-AA-DPPH) și abordarea II (ENOXIL-DPPH-AA); și activitatea antioxidantă a AA și a preparatului ENOXIL testați individual prin metoda DPPH

Activitatea antioxidantă distinctă pentru fiecare dintre cele două abordări se poate datora mecanismului de acțiune diferit. În cazul I-ei abordări, primul compus care interacționează cu DPPH<sup>\*</sup> este AA, întrucât acesta este un antioxidant rapid și puternic [7], apoi, ENOXIL anihilează DPPH<sup>\*</sup> conform puterii antioxidante a preparatului dat (Figura 17). În cea de-a II-a abordare, după interacțiunea ENOXIL – DPPH<sup>\*</sup> și consumarea ENOXIL-ului, conținutul de AA adăugat poate provoca unele reacții de regenerare a speciilor oxidate sau unele procese de polimerizare și formare a structurilor cu proprietăți antioxidante, după cum a fost raportat pentru cazul AA – CAT [28].

În ceea ce privește IA dintre ENOXIL și AA, acestea au fost determinate respectând trei moduri de realizare a experimentului (Figura 18): abordările I. și II. sunt identice cu cele din Figura 17, abordarea III presupune amestecarea 0.1 mL soluție de AA (0.0002 N) și 3.8 mL soluție DPPH<sup>\*</sup>, timp de reacție – 30 min; după care se adaugă 0.1 mL soluție de ENOXIL de diferite concentrații și se lasă reacția la întuneric timp de 2 h.

Datele din Figura 18 arată că toate cele trei abordări manifestă efect sinergic, totuși abordarea II posedă cea mai puternică interacțiune sinergică de 1.19. Abordările I și III posedă efect sinergic similar de 1.06 și, respectiv, 1.07, de asemenea, valorile %I experimentale ale DPPH sunt asemănătoare – aproximativ 52%. Faptul dat poate fi cauzat de urmarea aceluiși mecanism de acțiune în ambele abordări: inițial interacționează AA cu DPPH<sup>\*</sup>, apoi ENOXIL anihilează speciile radicalice rămase.



**Fig. 18.** Activitatea antioxidantă a combinațiilor ENOXIL – AA (0.0002N) în apă: abordarea I (ENOXIL-AA-DPPH), abordarea II (ENOXIL-DPPH-AA) și abordarea III (AA-DPPH-ENOXIL)

Testele efectuate confirmă și completează studiile anterioare realizate în cadrul Institutului de Chimie și a USM asupra preparatului ENOXIL. Datele obținute demonstrează activitatea antioxidantă a ENOXIL-ului și susține utilitatea și eficacitatea acestuia în calitate de preparat medicinal, de asemenea, propune ideea utilizării preparatului ENOXIL în combinație cu un antioxidant natural, după cum este AA.

## CONCLUZII

- Activitatea antioxidantă a compușilor naturali din struguri este puternic influențată de concentrația componentelor reacției, de solventul utilizat, de radicalul liber etc. Similar, interacțiunile antioxidante dintre compușii antioxidanți și non-antioxidanți sunt dependente de condițiile de reacție, astfel, combinațiile dintre compușii naturali din struguri pot genera efecte antagoniste, aditive sau sinergice, mecanismele de anihilare a radicalilor liberi fiind diferite.
- Amestecul dintre acidul ascorbic și acizii organici tartric sau citric a demonstrat efecte antioxidante antagoniste, aditive și sinergice (max. 1.08), interacțiunea antioxidantă sinergică datorându-se concentrației mari de ioni de acid tartric sau citric în reacție, care susține mecanismul HAT de acțiune a acidului ascorbic. Combinația dintre acizii ascorbic și dihidroxifumaric a fost studiată prin două metode spectrometrice, ambele demonstrând prezența unui efect sinergic puternic (1.17). Activitatea antioxidantă a compușilor s-a dovedit a fi semnificativ mai bună în matricea de vin, unde  $k_{obs}$  obținute la tehnică Stopped-Flow au fost de 10 mai mari decât în 98% EtOH. Datele au fost confirmate și prin metoda UV-Viz.

- Catechina posedă activitate antioxidantă de 1.5 ori mai mare în matricea de vin decât în 96% EtOH. În combinație cu diferite concentrații de acid ascorbic, amestecul catechină – acid ascorbic demonstrează un efect antioxidant dependent de conținutul de acid din probă, ceea ce poate fi datorat formării proantocianidinelor cu acțiune antioxidantă sporită.
- În mod similar, resveratrolul manifestă activitate antioxidantă mai puternică (aproape dublă) în matricea de vin comparativ cu rezultatele în 96% EtOH. Totodată, stilbenul se dovedește a fi un compus antiradicalic mai eficient contra radicalului ABTS decât contra DPPH<sup>\*</sup>, fapt care poate fi cauzat de acțiunea resveratrolului prin diferite mecanisme de reacție. Combinația resveratrol – catechină, testată la diferite raporturi molare, a arătat doar efecte antioxidante antagoniste, ceea ce poate fi cauzat de reacțiile de polimerizare dintre acești doi compuși, care rezultă cu mișorarea numărului de grupări donoare de electroni sau atomi de hidrogen.
- Preparatul ENOXIL posedă activitate antioxidantă mai mică decât compuși naturali din struguri. Totuși, în mediu de STF, la pH= 7.4, ENOXIL a demonstrat activitate antioxidantă semnificativ mai mare comparativ cu datele în apă. Adăugând acid ascorbic (0.0002 N) la soluția de ENOXIL, rezultatele demonstrează prezența sinergismului în toate probele analizate. De asemenea, a fost stabilit că activitatea antioxidantă totală și amploarea efectului sinergic depinde mult de ordinea adăugării compușilor în reacție, astfel că cel mai mare efect sinergic – 1.19, a fost obținut în proba unde inițial interacționează ENOXIL-ul cu DPPH<sup>\*</sup>, apoi se adaugă acidul ascorbic.

#### NOTA DE APRECIERE

Această lucrare a fost realizată în cadrul proiectului național de cercetare **Nr. 20.80009.5007.27** „Mecanisme fizico-chimice ale proceselor redox cu transfer de electroni implicate în sistemele vitale, tehnologice și de mediu”.

*Autorii își exprimă recunoștința profundă față de Dna Dr. Claudia CIMPOIU de la Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, România, pentru propunerea inovatoare de a investiga interacțiunile dintre antioxidanți în contextul simulării unei matrice de vin și pentru sprijinul acordat în analiza și diseminarea rezultatelor cercetării noastre.*

#### REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. COTEA, V. D.; ZĂNOAGĂ, C. V.; COTEA, V. V. *Tratat de Oenochimie* (Vol 1). București: Editura Academiei Române, 2009. ISBN 978-973-27-1756-1.
2. MIKEŠ, O.; VRCHOTOVÁ, N.; TRÍSKA, J.; KYSELÁKOVÁ, M.; ŠMIDRKAL, J. Distribution of major polyphenolic compounds in vine grapes of different cultivars growing in south Moravian vineyards. *Czech Journal of Food Sciences*. 2008, 26(3),

- 182-189.
3. BOLOCAN, N.; DUCA, G.; VLAD, L.; MACAEV, F. Occurrence and chemistry of dihydroxyfumaric acid. *Chemistry Journal of Moldova*. 2011, 6(1), 29-44.
  4. RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. (Eds.). *Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications* (Vol. 1). England: John Wiley & Sons, 2006. ISBN-13: 978-0-470-01034-1.
  5. PURKAIT, S.; BHATTACHARYA, A.; BAG, A.; CHATTOPADHYAY, R. R. Synergistic antibacterial, antifungal and antioxidant efficacy of cinnamon and clove essential oils in combination. *Archives of microbiology*. 2020, 202, 1439-1448.
  6. XU, D.; YU, G.; XI, P.; KONG, X.; WANG, Q.; GAO, L.; JIANG, Z. Synergistic effects of resveratrol and pyrimethanil against *Botrytis cinerea* on grape. *Molecules*. 2018, 23(6), 1455.
  7. VICOL, C.; CIMPOIU, C.; DUCA, G. Investigation of synergic/anti-synergic interactions of dihydroxyfumaric acid and ascorbic acid with DPPH. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Chemia*. 2021, 66(2), 49-58.
  8. SCALZO, R. L. Organic acids influence on DPPH scavenging by ascorbic acid. *Food Chemistry*. 2008, 107(1), 40-43.
  9. QUIROGA, P.R.; NEPOTE, V.; BAUMGARTNER, M.T. Contribution of organic acids to  $\alpha$ -terpinene antioxidant activity. *Food chemistry*. 2019, 277, 267-272.
  10. PIANG-SIONG, W.; DE CARO, P.; MARVILLIERS, A.; CHASSERAY, X.; PAYET, B.; SING, A.S.C.; ILLIEN, B. Contribution of trans-aconitic acid to DPPH scavenging ability in different media. *Food Chemistry*. 2017, 214, 447-452.
  11. VICOL, C., DUCA, G. Influența acidului tartric asupra procesului de anihilare a radicalilor liberi de către acidul ascorbic. *Revista de Știință, Inovare, Cultură și Artă „Akademos”*. 2020, 56(1), 39-43.
  12. TSAO, R. Synergistic interactions between antioxidants used in food preservation. In: *Handbook of antioxidants for food preservation*. Woodhead Publishing, 2015, 335-347.
  13. VICOL, C.; DUCA, G. Synergistic, Additive, Antagonistic Effects and the Prooxidant Character of Antioxidants: Interactions in Natural Compounds. In: *Fundamental and Biomedical Aspects of Redox Processes*. IGI Global, 2023, 224-249.
  14. LUPAȘCU, T.; DUCA, Gh.; GONEAR, V. *ENOXIL – preparat ecologic pentru sănătatea omului*. Chișinău: Tipografia AȘM, 2012. ISBN 978-9975-62-304-9.
  15. BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C.L.W.T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *ILWT-Food science and Technology*.

- 1995, 28(1), 25-30.
16. BOULEBD, H. Comparative study of the radical scavenging behavior of ascorbic acid, BHT, BHA and Trolox: Experimental and theoretical study. *Journal of Molecular Structure*. 2020, 1201, 127210.
  17. BOLOCAN, N. Stopped-flow spectrophotometric studies of the kinetics of interaction of dihydroxyfumaric acid with the DPPH free radical. *Chemistry Journal of Moldova*. 2010, 5(2), 83-87.
  18. MELINO, V.J.; SOOLE, K.L.; FORD, C.M. Ascorbate metabolism and the developmental demand for tartaric and oxalic acids in ripening grape berries. *BMC Plant Biology*. 2009, 9(1), 1-14.
  19. IRIMIA, L.M. *Biologia, ecologia și fiziologia viței de vie*. Iași: Editura „Ion Ionescu de la Brad”, 2012. ISBN 978-973-147-106-8.
  20. DUCA, Gh. *Homogeneous catalysis with metal complexes: fundamentals and applications* Springer Science & Business Media, (Vol. 102), 2012. ISBN 978-3-642-24629-6.
  21. BADEA, G.A.; ANTOCE, A.O. Glutathione as a possible replacement of sulfur dioxide in winemaking technologies: A review. *Scientific Papers Series B Horticulture*. 2015, 59, 123-40.
  22. FENTON, H.J.H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*. 1894, 65, 899-910.
  23. VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; MOYÁ, M L.; TRONCOSO, A.M.; GARCÍA-PARRILLA, M.C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*. 2007, 71(1), 230-235.
  24. SAZOU, D.; KARABINAS, P.; JANNAKOUDAKIS, D. Cyclic voltammetric study of the homogeneous decarboxylation kinetics of dihydroxyfumaric acid in acid solutions. *Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry*. 1984, 176(1-2), 225-234.
  25. WARD, G.; LIOTTA, C.L.; KRISHNAMURTHY, R.; FRANCE, S. Base-mediated cascade aldol addition and fragmentation reactions of dihydroxyfumaric acid and aromatic aldehydes: Controlling chemodivergence via choice of base, solvent, and substituents. *The Journal of Organic Chemistry*. 2018, 83(23), 14219-14233.
  26. FLORA, S.J. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2009, 2, 191-206.
  27. WANG, L.; YANG, Q.; LI, Y.; WANG, S.; YANG, F.; ZHAO, X. How the functional group substitution and solvent effects affect the antioxidant activity of (+)-catechin?. *Journal of Molecular Liquids*. 2021, 327, 114818.



28. MAHMOUD, M.A.A.; CHEDEA, V.S.; DETSI, A.; KEFALAS, P. Ascorbic acid modifies the free radical scavenging behaviour of catechin: An insight into the mechanism. *Food research international*. 2013, 51(2), 907-913.
29. LI, Z.; CHEN, X.; LIU, G.; LI, J.; ZHANG, J.; CAO, Y.; MIAO, J. Antioxidant activity and mechanism of resveratrol and polydatin isolated from mulberry (*Morus alba* L.). *Molecules*. 2021, 26(24), 7574.
30. ZUPANČIČ, Š.; LAVRIČ, Z.; KRISTL, J. Stability and solubility of trans-resveratrol are strongly influenced by pH and temperature. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015, 93, 196-204.
31. TOSATO, M.G.; VICENDO, P.; THOMAS, A.H.; LORENTE, C. Clearing up the photochemistry of resveratrol: Effect of the solvent. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2018, 367, 327-331.
32. GÜLÇİN, İ. Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innovative food science & emerging technologies*. 2010, 11(1), 210-218.
33. PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005, 53(10), 4290-4302.
34. IACOPINI, P.; BALDI, M.; STORCHI, P.; SEBASTIANI, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2008, 21(8), 589-598.
35. SECK, I.; HOSU, A.; CIMPOIU, C.; NDOYE, S.F.; BA, L.A.; SALL, C.; SECK, M. Phytochemicals content, screening and antioxidant/pro-oxidant activities of *Carapaprocera* (barks)(Meliaceae). *South African Journal of Botany*. 2021, 137, 369-376.
36. ABRAMOVIČ, H.; GROBIN, B.; ULRIH, N. P.; CIGIĆ, B. The methodology applied in DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu assays has a large influence on the determined antioxidant potential. *ActaChimicaSlovenica*. 2017, 64(2), 491-499.
37. VICOL, C.; GORINCIOI, E.; DUCA, Gh. <sup>13</sup>C NMR Investigations Of Radical Scavenging Activities Of Ascorbic Acid And Resveratrol Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. In: *XXIIIrd International Conference “New Cryogenic and Isotope Technologies for Energy and Environment” – EnergEn 2021*, Băile Govora, România, October26-29, 2021, 312-316. ISSN: 2810-3203
38. VICOL, C.; IACOBESCU, I.; FIFERE, A.; DUCA, Gh. Study of the synergic interactions of ascorbic and dihydroxyfumaric acids by EPR spectroscopy. In: *14<sup>th</sup> Green Chemistry Postgraduate Summer School (online/in-person)*, Venice, Italy, July 3-8, 2022, p. 90. ISBN: 978-88-945537-2-7