

Compuși bioactivi de origine vegetală. Abordări biotehnologice

CRISTINA MOȚA, ANA ROȘU, GH. CÂMPEANU

*Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară București, Facultatea de Biotehnologii,
Bd. Mărăști 59, sector 1, tel. 012242576, fax: 012242815, e-mail: motac@home.ro*

Introducere

Plantele sunt surse consacrate de compuși farmaceutici, aromatici și industriali, civilizația fiind indisolubil legată de lumea plantelor, acestea constituind de milenii sursa majoră de obținere a unor bio-produse esențiale pentru supraviețuirea întregului regn animal. Adevărate uzine biochimice acționate de energia solară, plantele sintetizează nu numai compușii de bază necesari supraviețuirii lor, din categoria hidraților de carbon, proteinelor și lipidelor, ci și o gamă largă de substanțe organice ce pot fi extrase în cantități suficiente pentru a prezenta importanță semnificativă ca materii prime cu variate aplicații științifice, tehnologice și comerciale. Și în prezent zestrea botanică a planetei stochează numeroase resurse încă insuficient cunoscute, care pot reprezenta alternative rentabile pentru obținerea unor materii prime deficitare în diferite domenii economice. Regnul vegetal continuă să reprezinte principalul furnizor de compuși fitochimici utilizați în diferite ramuri industriale cum sunt cele ale produselor farmaceutice, alimentare, cosmetice, agrochimice, cu valori comerciale exprimate în miliarde de dolari. Plantele constituie surse de neînlocuit pentru uleiuri industriale (volatile și fixe), arome, parfumuri, rășini, gume hidrocoloidale, saponine și alți surfactanți, coloranți, pesticide, cauciuc natural, substanțe medicamentoase și mulți alți compuși speciali.

Fitochimicalele cele mai cunoscute includ medicamente ca morfina și codeina (alcaloizi analgezici derivați din latexul de la *Papaver somniferum*), cocaina (alcaloid anestezic local, derivat din frunze de coca), chinina (alcaloid antimalaric derivat din scoarță de *Cinchona*), curare și digitalina; parfumuri și esențe ca uleiul de trandafir și jasmînul; materii prime industriale ca acizi grași, ulei de pin și cauciuc natural; pesticide ca piretrinele și nicotina (**figura 1**).

Statisticile recente evidențiază faptul că peste 1500 de compuși noi sunt identificați anual în diferite specii de plante și că aproximativ un sfert dintre medicamentele prescrise conțin substanțe de origine vegetală. Totodată rapiditatea procesului de extincție a speciilor și de îngustare a bazei genetice a resurselor vegetale în lume a stimulat atât reconsiderarea importanței vitale a resurselor genetice cât și interesul pentru obținerea metaboliților de interes prin metode neconvenționale.

Progresele înregistrate în domeniul biologiei moleculare și al manipulărilor genetice oferă perspective promițătoare pentru intensificarea biosintezei unor compuși secundari, acționând la nivelul genelor reglatoare. Prin sporirea numărului de copii ale acestora sau prin atașarea genelor respective la un promotor cu capacitate superioară de expresie, se poate realiza intensificarea activității enzimelor implicate în procesul biosintetic (M. HOLDEN, 1989). Cu toate că există adesea diferențe relevante în ce privește sinteza și acumularea metaboliților secundari în diferite țesuturi sau în faze diferite ale dezvoltării plantei, genomul fiecărei celule conține informația necesară pentru a declanșa întregul potențial al metabolismului secundar caracteristic speciei.

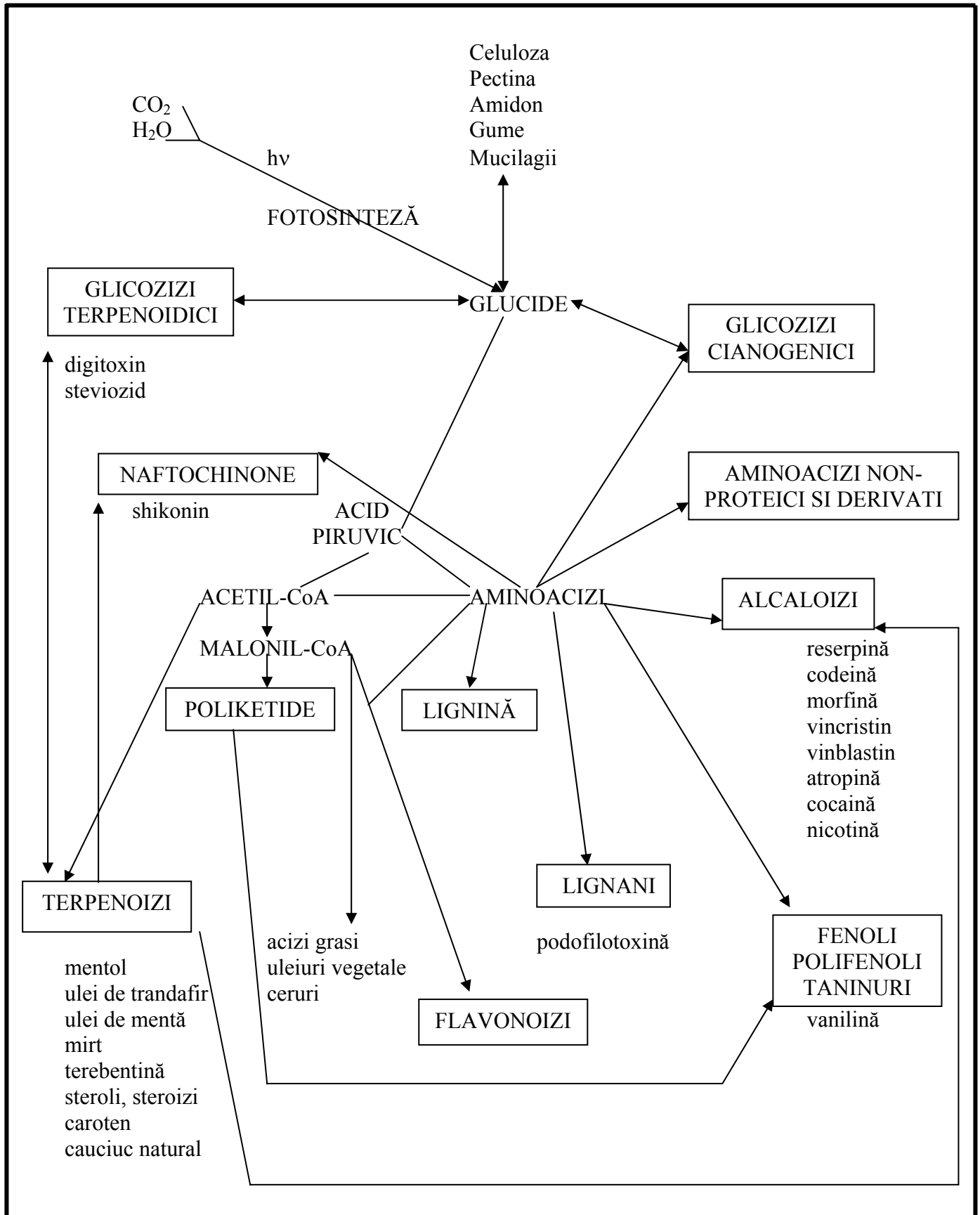


Figura 1. Originea biosintetică a unor compuși vegetali; grupele majore de metaboliți secundari sunt încadrate în chenare (după Balandrin și colab., 1985).

1. Semnificația biologică a metaboliților primari și secundari

Metabolismul constă din serii strâns coordonate de reacții chimice mediate de enzime care se desfășoară în cadrul organismului vegetal, având ca rezultat sinteza și utilizarea unei mari varietăți de molecule din categoria glucidelor, aminoacizilor, acizilor grași, nucleotidelor și a polimerilor derivați de la acestea (polizaharide, proteine, lipide, ADN, ARN, etc.). Totalitatea acestor procese este definită ca metabolism primar iar compușii respectivi, care sunt esențiali pentru supraviețuirea plantei, sunt descriși ca metaboliți primari.

Pe lângă metaboliții “primari”, cu rol major în menținerea viabilității plantei (proteine, hidrați de carbon și grăsimi), sunt sintetizați și o serie de compuși care includ terpene, steroizi, antociani, antrachinone, fenoli și polifenoli, care aparțin așa numitului metabolism “secundar”. Metaboliții secundari sunt prezenți numai la anumite specii, adesea manifestând specificitate de organ sau de țesut, pot fi identificați numai într-un anumit stadiu al creșterii și dezvoltării în cadrul unei specii, sau pot fi activați numai pe parcursul perioadelor de stres, cauzate de pildă de atacul unor microorganisme sau de sărăcirea nutrienților. Sinteza lor pare fără semnificație directă pentru celula sintetizatoare, dar poate fi decisivă pentru dezvoltarea și funcționarea organismului ca întreg. Cu toate că sinteza lor nu constituie o parte indispensabilă a programului expresiei genice și dezvoltării, acești metaboliți nu reprezintă simpli produși catabolici, deoarece au o structură foarte diversificată și pot fi adesea reincluși în procesele metabolice. De fapt delimitarea între metabolismul primar și secundar este incertă, întrucât mulți dintre intermediarii metabolismului primar îndeplinesc roluri similare și în cadrul metabolismului secundar. Astfel, unii aminoacizi obscuri sunt în mod cert metaboliți secundari, în timp ce sterolii sunt compuși structurali esențiali ai multor organisme și în consecință trebuie considerați metaboliți primari. Suprapunerea rolurilor multor compuși asigură o interrelație strânsă între metabolismul primar și secundar, iar interpretarea delimitării dintre aceste procese trebuie făcută cu prudență (**figura 2**).

Ca urmare, dată fiind conservarea lor pe parcursul evoluției regnului vegetal, este foarte plauzibilă interpretarea că metaboliții secundari oferă un avantaj selectiv speciilor. De exemplu la speciile la care polenizarea este realizată de către insecte, acestea sunt atrase de culoare, parfum sau de prezența nectarului, caracteristici datorate metaboliților secundari. Rolul pigmentilor este evident și în răspândirea fructelor și a semințelor de către păsări și alte animale atrase de culorile vii ale structurilor vegetale. Stigmatete foarte colorate de la *Crocus sativus*, utilizate drept colorant alimentar, ca și culoarea roșu intens a ardeilor iuți (*Capsicum frutescens*) și iuțeala capsaicinei, au efect atractiv sau repelent asupra animalelor. Iată deci că metaboliții secundari vegetali pot servi ca atractanți pentru polenizatori, pot reprezenta adaptări chimice la stresul factorilor de mediu sau pot constitui mijloace chimice ofensive, defensive sau protectoare împotriva microorganismelor, insectelor, animalelor ierbivore și chiar împotriva altor plante superioare (cum este cazul compușilor alelochimici, numiți și “ierbicide naturale”), fiind evident rolul lor de compuși activi în plan biologic, fiziologic și ecologic.

Sunt numeroase exemplele de compuși bioactivi din categoria metaboliților secundari, dintre care trebuie să amintim în primul rând nicotina, piretrinele și rotenona care sunt utilizate ca pesticide și anumiți steroizi și alcaloizi utilizați în industria medicamentelor.

Balandrin și Klocke (1988) au efectuat o evaluare amănunțită a efectelor terapeutice și a valorii comerciale a celor mai importante substanțe bioactive extrase din plante, care includ sapogenine steroidale (digoxin și digitoxin), alcaloizi cu efect anticancerigen (vincristin și vinblastin), alcaloizi beladonici (atropină, hiosciamină și scopolamină), și numeroși alți compuși utilizați în industria medicamentelor, ca de exemplu: cocaină, colchicină, alcaloizi de

tip opium, fitostigmină, pilocarpină, chinină, chinidină, reserpină și d-tubocurarină (**tabelul 1**).

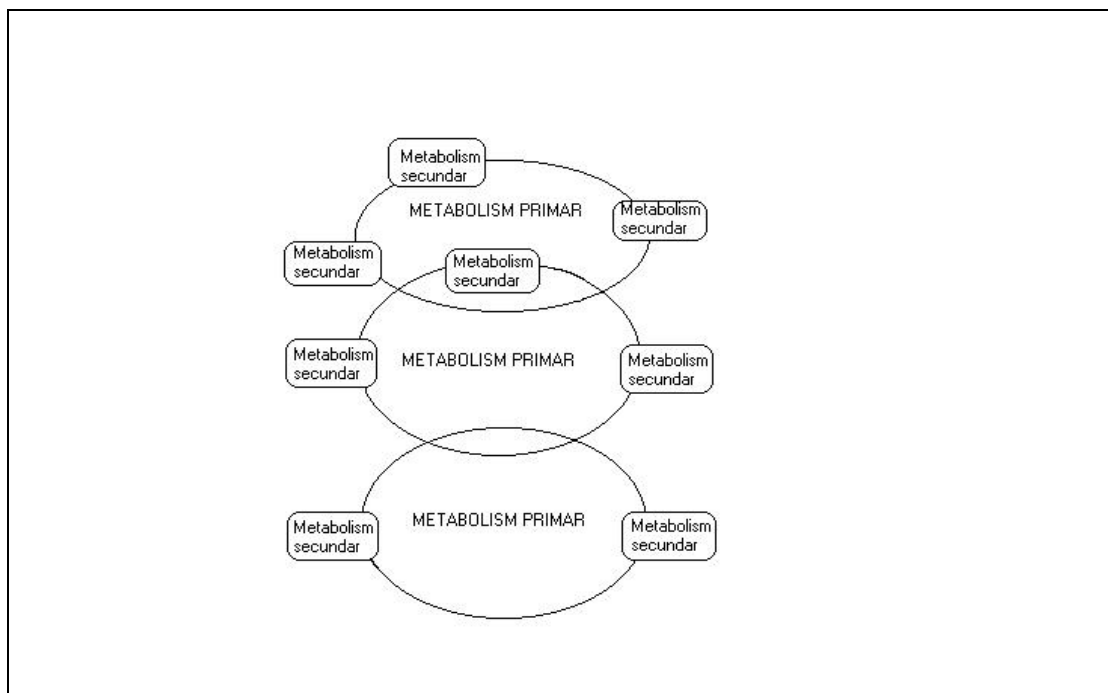


Figura 2. Diagramă ce exemplifică posibilele interacțiuni dintre metabolismul primar și metabolismul secundar (după M. M. Yeoman și C. L. Yeoman, 1996).

Valoarea metaboliților secundari utilizați în industria farmaceutică poate ajunge la mii de dolari per kg. De exemplu alcaloizii de tip opium purificați (codeina și morfina) au valori de 650 – 1250 USD/kg iar uleiurile volatile esențiale ca cel de trandafir sunt evaluate la peste 2000 – 3000 USD/kg. Alcaloizii extrași din *Catharanthus roseus* ating valori de până la 20.000 USD/g. Aceste prețuri ridicate se datorează atât metodelor costisitoare de izolare cât și cantităților extrem de reduse ce pot fi obținute din sursele vegetale. Astfel, cantitatea de vincristin izolat din plante de *Catharanthus roseus* este de aproximativ 0,0003 – 0,0005 %, fiind necesare 500 kg de frunze pentru a produce numai 1 g de vincristin purificat, proces care durează mai multe săptămâni.

Cu toate acestea, plantele rămân singurele surse de extracție, întrucât mulți dintre metaboliții secundari de interes farmaceutic nu pot fi sintetizați pe cale chimică, fiind stereostructuri complexe cu mulți centri chirali care pot fi esențiali pentru activitatea biologică.

Metaboliții vegetali primari și secundari de interes economic au câteva caracteristici comune: majoritatea sunt compuși chimici non-proteici, pot fi extrași din materialul vegetal prin distilare cu aburi, cu solvenți organici sau apoși, iar cu excepția biopolimerilor cauciucului natural, a taninurilor condensate și a unor polizaharide precum gumele, pectinele și amidonul, sunt compuși cu greutate moleculară mică (sub 2000 Da).

Tabelul 1. Exemple de compuși de interes farmaceutic obținuți la scară comercială din surse vegetale (după Balandrin și Klocke, 1988)

| Clasa de compuși | Sursele botanice | Utilizarea terapeutică |
|---|--|--|
| A. Steroizi | | |
| Hormoni (derivați ai diosgeninei, hecogenin și stigmaterol) | Dioscorea sp., Glicine sp. | Contraceptivi orali și alți hormoni steroizi |
| Glicozizi digitalici (digoxin, digitoxin) | Digitalis purpurea, D. lanata | Cardiotonici |
| B. Alcaloizi | | |
| Alcaloizi beladonici (atropină, l-hiosciamină, scopolamină) | Atropa belladonna, Datura stramonium | Anticolinergici |
| Alcaloizi tip opium (codeină, morfină) | Papaver somniferum | Analgezici |
| Reserpină | Rauwolfia serpentina | Antihipertensivi, psihotropici |
| Vincristină, vinblastină | Catharanthus roseus | Anticancerigeni |
| Physostigmină | Physostigma venenosum | Cholinergic |
| Pilocarpină | Pilocarpus sp. | Cholinergic |
| Chinină, chinidină | Cinchona sp. | Antimalaric, anti-aritmie cardiacă |
| Colchicină | Colchicum autumnale | Gută |
| Cocaină | Erythroxylon coca | Anestezic local |
| d-Tubocurarină | Strychnos sp., Chondodendron tomentosum | Relaxant muscular |

2. Interdependența dintre plante și mediul înconjurător

Plantele în procesul dezvoltării lor filogenetice s-au adaptat la anumite condiții de viață. Răspândirea geografică a plantelor este determinată de cerințele acestora față de factorii externi și de gradul lor de adaptare la condițiile mediului înconjurător. Plantele nu cresc în mod hazardant, la întâmplare; ele sunt aranjate în asociații și comunități ecologice bine definite. În timp ce grupările sau asociațiile ecologice mai mari (păduri, stepe, mlaștini etc.) sunt determinate în mare măsură de factorii climatici și edafici, asociațiile mai intime și mai restrânse au vegetația diferită în același cadru geografic, sub influența aceluiași factori climatici și edafici. În acest ultim caz, pe lângă factorii menționați acționează și alți factori externi și interni, fapt ce determină o grupare mai restrânsă a plantelor.

Pentru ca plantele să supraviețuiască și să dea producții sporite la hectar ele trebuie să se adapteze condițiilor mereu schimbate ale mediului înconjurător. Dacă plantele nu se adaptează mediului lor de viață, creșterea și dezvoltarea este redusă foarte mult și, într-un timp relativ scurt, plantele vor dispărea. Pe măsură ce unul sau mai mulți factori de creștere nu sunt asigurați la un nivel corespunzător, omogenitatea condițiilor de viață este schimbată și determină limitarea productivității plantelor. Dacă în cursul creșterii și dezvoltării plantelor apar anumite condiții nefavorabile, plantele vor suferi anumite dereglări, în funcție de potențialul de

rezistență biochimică și fiziologică de care dispun speciile sau soiurile respective față de factorii dăunători.

Prin noțiunea de *rezistență fiziologică* se înțelege însușirea organismelor de a supraviețui sub influențele dăunătoare din mediul înconjurător și capacitatea lor de a asigura o desfășurare normală a proceselor vitale.

Prin *rezistență biochimică* se înțelege însușirea organismelor de-a se opune modificării sensibile a proceselor metabolice sub acțiunea unor factori de mediu nefavorabili. Plantele reușesc să se adapteze mediului de viață schimbat prin modificarea sistemului lor enzimatic, prin biosinteza unor anticorpi, prin biosinteza unor inhibitori sau activatori, prin acumularea de substanțe osmotice active etc. Plantele sunt considerate ca fiind produsul interacțiunii dintre constituția internă și mediul lor de viață. Adaptarea reprezintă flexibilitatea (capacitatea) organismului viu de a crește și a se dezvolta într-un mediu de viață schimbat.

Adaptarea plantelor se petrece într-o perioadă de timp mai îndelungată și se realizează complet în decursul mai multor generații.

Prin *aclimatizare* se înțelege adaptarea plantelor la mediul înconjurător în cadrul unui ciclu biologic de viață, în timpul vieții individuale a organismelor.

Factorii din mediul înconjurător care acționează asupra plantelor pot fi împărțiți în cinci grupe:

1. *Factorii climatici*, care includ temperatura, intensitatea luminii, lungimea de undă a radiațiilor absorbite, durata de iluminare, umiditatea, efectul sezonal.
2. *Factorii edafici*. Toate plantele, cu excepția epifitelor și parazitelor, își procură substanțele minerale din sol. În sol se află, de asemenea, ciupercile ce formează micorize pe rădăcinile unor copaci, microorganismele fixatoare de azot (la plantele leguminoase), ionii unor metale grele toxice, care împreună cu excesul de salinitate, excesul de umiditate sau uscăciune, determină stresarea biochimică a plantelor.
3. *Poluanții nenaturali*. În cadrul acestei categorii de factori se includ poluanții atmosferici (praf, gaze industriale, gaze de eșapament etc.), poluanții apei și ai solului, urmarea folosirii neraționale a substanțelor fitofarmaceutice, a îngrășămintelor chimice și a amplasării unor obiective industriale și zootehnice în zonele de cultură.
4. *Animalele*. Cu toate că între plante și animale există numeroase raporturi de simbioză (polenizarea, micorize, raporturile în cadrul unor fitocenoze etc.), ierbivorele sunt ostile plantelor deoarece existența lor depinde de prezența plantelor furajere. Se cunosc numeroase și diferite mijloace de apărare ale plantelor față de acțiunea animalelor ierbivore.
5. *Competiția între plante*. Competiția între plante se poate realiza atât prin intermediul unor relații interspecifice, cât și în cadrul unor relații intraspecifice.

Plantele conțin mult mai mulți compuși secundari de metabolism decât animalele. Termenul de plantă se referă în ecologie, de obicei, la plantele superioare, mai cu seamă la angiosperme, gimnosperme și ferigi. Ciupercile, bacteriile și virusurile sunt, în general, denumite ca microorganisme. Algele, mușchii și lichenii sunt mai puțin exemplificate deoarece biochimia lor ecologică nu a fost studiată în detaliu. Repartizarea în mare a compușilor secundari din plantele superioare este prezentată în **tabelul 2**.

Prezența unor compuși secundari în plante se explică prin faptul că plantele fiind fixate prin rădăcini în sol, nu se pot deplasa și deci nu pot răspunde deschis ca animalele la acțiunea factorilor de mediu. Compușii secundari de metabolism ajută plantele la o mai bună și ușoară adaptare la mediu, la stabilirea unor interrelații cât mai complexe între plante și animale. Peste 45 din compușii secundari de metabolism prezenți în animale sunt de origine vegetală. O parte din compușii secundari măresc rezistența plantelor la atacul microorganismelor. Unii compuși

sun toxici și constituie arme de apărare ale plantelor împotriva ierbivorelor, insectelor și a altor dăunători.

Tabelul 2. Principalele clase de compuși vegetali secundari implicați în interacțiunea dintre organismele vegetale și animale (după G. Neamțu, 1983)

| Clasa de compuși | Numărul aproximativ de compuși | Distribuirea compușilor chimici vegetali | Acțiunea fiziologică |
|---|---|--|---|
| a. <i>Compuși cu azot</i> Alcaloizi | 5.500 | Larg răspândiți în <i>Angiospermae</i> , în special în rădăcini, frunze și fructe | Majoritatea sunt toxici, cu gust amar |
| Amine | 100 | Larg răspândiți în <i>Angiospermae</i> , predomină în flori | Majoritatea au miros respingător. Unele sunt halucinogene |
| Aminoacizi neproteici | 400 | Sunt în general larg răspândiți. Predomină în semințele leguminoaselor | Mulți sunt toxici |
| Glicozide cianogenetice | 30 | Sporadice, în special în frunze și fructe | Otrăvitoare (ca HCN) |
| Glucozide | 75 | <i>Cruciferae</i> și alte 10 familii | Gust amar și acid |
| b. <i>Terpenoide</i> Monoterpene | 1000 | Larg răspândite în uleiuri eterice | Plăcut mirositoare |
| Lactone sesquiterpenice | 600 | Predomină în <i>Compositae</i> . Sunt prezente și în alte <i>Angiospermae</i> | Unele sunt amare, toxice și alergice |
| Diterpene | 1000 | Larg răspândite în latex și în rășinile plantelor | Unele sunt toxice |
| Saponine | 500 | Sunt identificate în peste 700 familii de plante | Produc hemoliza globulelor sanguine |
| Limonoide | 100 | Prezente mai ales în <i>Rutaceae</i> , <i>Meliaceae</i> și <i>Simaroubaceae</i> | Gust amar |
| Cucurbitacin | 50 | Predomină în <i>Cucurbitaceae</i> | Gust amar, sunt toxice |
| Cardenolide | 150 | Comune în <i>Apocynaceae</i> , <i>Aschepiadaceae</i> și <i>Scrofulariaceae</i> | Gust amar, toxice |
| Carotenoide | 400 | Universal răspândite în frunze, adesea în flori și fructe | Substanțe colorate |
| c. <i>Fenoli</i> Fenoli simpli | 200 | Universal răspândiți în frunze și alte țesuturi | Acțiune antimicrobiană |
| Flavonoide | 1000 | Universal răspândite în <i>Angiospermae</i> , <i>Gimnospermae</i> și <i>Ferigi</i> | Adesea coloranți |
| Chinone | 500 | Larg răspândite, predomină în <i>Rhamnaceae</i> | Coloranți |
| d. <i>Alți compuși</i> Poliacetilene | 650 | Larg răspândite, predomină în <i>Compositae</i> și <i>Umbeliferae</i> | Unele toxice |

Unii compuși secundari îndeplinesc rolul de inhibitori și stimulatori de creștere a plantelor, alții, cum sunt carotenoidele și flavonoidele, absorb energia luminoasă și iau parte în procesul

de fotosinteză, atât prin cedarea energiei absorbite clorofilei a, cât și prin apărarea clorofilelor și a altor substanțe biologic active de degradări fotooxidative. Unele substanțe secundare determină gustul și aroma fructelor și legumelor, iar eterii, esterii, substanțele terpenice etc., prin mirosul lor plăcut, au un rol important în polenizarea plantelor. Pigmenții, care, de asemenea, sunt produși secundari de metabolism, au un rol important în reacțiile de oxidoreducere. Ei determină culoarea florilor, fructelor, legumelor, a tuturor organelor plantelor. Au un rol însemnat în procesul de polenizare. Industria alimentară, industria farmaceutică, industria cosmetică și cea textilă se bazează, în mare parte, pe utilizarea compușilor metabolici secundari din organismele vegetale.

3. Substanțele vegetale de origine secundară

Există în corpul vegetal o serie de substanțe organice de o inepuizată diversitate și mulțime, rezultate prin biosinteză sau care reprezintă produse intermediare sau finale pe parcursul proceselor catabolice, fără nici o importanță structurală, fără rosturi fiziologice fundamentale sau chiar fără nici un rol fiziologic experimental dovedit. Ele au fost numite, de către CZAPEK, **substanțe vegetale secundare**. Așa sunt *glicozizii, acizii organici, lipide de secreție, compușii terpenici, substanțele aromatice neazotate, antocianidinele, substanțele secundare azotate (amine, betaine, alcaloizi, compuși cianici)* etc.

În plante, aceste substanțe secundare sunt grupate în diferite clase pe baza structurii chimice și proprietăților asemănătoare. Denumirea de substanțe vegetale secundare a fost adaptată convențional și se referă la originea și nu la importanța lor. Substanțele secundare apar în organismul vegetal în procesele de formare sau de degradare a substanțelor plastice (glucide, lipide, protide). Ele rămân ca atare, depunându-se la nivelul țesuturilor sau se elimină. Substanțele secundare reprezintă deci produse intermediare și finale ale metabolismului. Sunt produși secundari, cu rol metabolic încă puțin cunoscut, cu repartiție foarte neregulată, dar localizați în zone anatomice bine determinate ale plantei. Rolul lor este important atât în ceea ce privește calitatea alimentară și gustativă a diferitelor produse cât și interesul tehnic, industrial, agricol, farmaceutic etc.

Datorită frecvențelor lor aplicații industriale și terapeutice, multe din ele au fost aprofundat cercetate din punct de vedere chimic, dar ele au format prea puțin obiectul unor cercetări fiziologice. La unele din ele se constată sau se bănuiesc oarecare prestații de ordin metabolic sau ecologic, cele mai multe din ele însă nici nu pot fi încă interpretate din acest punct de vedere. În ultimul timp s-a încercat să se reconstituie *geneza lor în celulă, o problemă categoric fiziologică* și fără îndoială importantă atât pentru mecanismul ei biologic, cât și pentru funcțiile de secreție și excreție, prea puțin cunoscute până acum, ale plantei.

Problema lor s-a încercat să se elucideze și în *perspectivă filogenetică*. S-a constatat de drept cuvânt că ele sunt din ce în ce mai numeroase și mai variate în procesul evolutiv al regnului vegetal. Alcaloizii de exemplu lipsesc la Talofite, cu excepția unor ciuperci puține la număr; la ferigi și Gimnosperme sunt excepționali, la monocotile rari și abia la unele familii dicotiledonate devin frecvenți. Antocianidinele atât de generalizate la Fanerogame apar întâi abia la un mușchi, ca să nu mai vorbim de varietatea specifică de antociani descoperită la indivizii masculi ai algei *Chlamydomonas*. Cele mai sărace vegetale în substanțe organice secundare sunt tocmai Cianoficeele și Cloroficeele. Garniturile enzimatice ale celulei de asemenea cresc și se diversifică pe măsură ce ne îndepărtăm de aceste grupuri, astfel că și producția substanțelor secundare crește, de îndată ce crește diversitatea calitativă a proceselor metabolice principale.

Substanțele vegetale de origine secundară pot fi grupate în: pigmenți vegetali, glicozide, lignine, taninuri, uleiuri eterice, rășini, balsamuri, alcaloizi, substanțe antibiotice, fitoncide,

insecticide vegetale etc. Dintre substanțele vegetale de origine secundară se vor prezenta în continuare cele mai importante din punctul de vedere biologic.

3.1. Pigmenții vegetali

Sunt diferiți după culoarea pe care o dau: clorofila-verde, carotenul-roșu-oranj, xantofila-galbenă, flavonele-galbene, antocianii–pigmenții vacuolari ce variază de la roșu la albastru, după pH-ul acid sau bazic al sucului celular. Pe lângă rolul lor de atragere a insectelor polenizatoare, ei ocupă un loc central ca fotoreceptori în fotosinteză și fotoperiodism. Pigmenții vegetali sunt coloranți naturali ai florilor, frunzelor, fructelor și ai țesuturilor plantelor. Unii sunt răspândiți în tot regnul vegetal, iar alții se întâlnesc numai în anumite plante sau în anumite organe ale plantelor. În plante, pigmenții se pot prezenta în stare liberă sau formă de combinații cu holoproteide și glucide, formând heteroproteide și glicozide. Pigmenții vegetali dau aroma, gustul și coloritul produselor vegetale. Pigmenții pot intra în constituția coenzimelor redox, unii sânt protectori ai enzimelor și ai activității enzimatice, reglând potențialul redox al mediului biochimic, alții participă direct sau indirect la procesul fotosintezei etc. În funcție de structura chimică, în general foarte variată, pigmenții vegetali pot fi împărțiți în mai multe grupe: pigmenții porfirinici, pigmenți carotenoidici, pigmenții chinonici, pigmenți flavonoidici, pigmenți indolici etc.

PIGMENTII PORFIRINICI (cromoproteidele cu clorofilă și hem, ca și cloroglogina, leghemoglobina, citocromii, catalază etc.), au rol biocatalitic important. Dintre pigmenții porfirinici, foarte răspândiți în regnul vegetal sunt pigmenții clorofilieni, reprezentați prin clorofila-a, clorofila-b și derivații lor de oxidare (oxiclороfile). Aceștia dau culoarea verde și galben verzuie a frunzelor și tulpinilor și participă în procesul de fotosinteză.

PIGMENTII CAROTENOIDICI reprezintă totalitatea carotenoidelor vegetale. Aceștia sunt pigmenții cei mai răspândiți din tot regnul vegetal. În regnul animal, acești pigmenți provin din alimente de natură vegetală. Carotenoidele sunt pigmenți colorați în galben, portocaliu, roșu, violet etc. În organismul vegetal se află în stare liberă sau în combinație cu holoproteidele și glucidele (carotenoproteide, glicozide carotenoidice). Pigmenții carotenoidici sunt răspândiți în toate organele plantelor cu sau fără clorofilă (frunze, fructe, tulpină, bulb, semințe etc.). Conținutul în pigmenți carotenoidici depinde de natura speciei și de influența condițiilor de mediu (**tabelul 3**).

Tabelul 3. Conținutul mediu al carotenoidelor din legume și fructe
(după G. Neamțu și Ghe. Câmpeanu, 1983)

| PRODUSUL | Carotenoide mg/100 g produs | PRODUSUL | Carotenoide mg/100 g produs |
|--------------------|--|-----------------|--|
| Morcovi | 6,0 – 24,0 | Caise | 2,0 – 2,2 |
| Spanac | 5,0 – 6,5 | Piersici | 0,76 |
| Fasole verde | 0,17 – 0,22 | Mere | 0,3 – 0,8 |
| Mazăre boabe verde | 0,4 – 1,6 | Vișine, Zmeură | 0,3 |
| Salată verde | 0,2 – 0,25 | Mure | 0,3 – 0,8 |
| Tomate | 1,5 – 2,0 | Fragi | 0,3 – 0,5 |
| Ardei verde | până la 2,5 | Lămâi | 0,4 |
| Ardei roșu | 10,0 | Prune uscate | 0,1 |

Datorită structurii de hidrocarbură, pigmentii carotenoidici sunt substanțe hidrofobe, solubile numai în solvenți organici, uleiuri și grăsimi. Din punct de vedere chimic, pigmentii carotenoidici se caracterizează printr-o structură cu legături duble conjugate, care determină caracterul nesaturat și deci posibilitatea reacțiilor de oxidare și autooxidare (în prezența aerului), capacitatea de absorbție a unor radiații luminoase etc. Rolul biochimic al pigmentilor carotenoidici este determinat de structura lor chimică și de proprietățile menționate mai sus. Carotenoidele, ca și terpenele, sterolii, fitolul, vitaminele K, vitaminele E etc., au ca unitate structurală repetitivă izoprenul activat, care poate forma catene de hidrocarburi de tip carotenoidic, steroidic etc. Carotenoidele se împart în: hidrocarburi carotenoidice și derivați oxigenați ai hidrocarburilor carotenoidice. Hidrocarburi carotenoidice sunt carotenoide cu 40 atomi de carbon, cu formula brută $C_{40}H_{56}$. Dintre acestea cele mai importante sunt : licopina, α -carotenul, β -carotenul, γ -carotenul.

Lycopina este o substanță cristalină, de culoare roșu-violet, insolubilă în apă, solubilă în solvenți organici. Este colorantul fructelor și tomatelor.

α -Carotenul este o substanță cristalină de culoarea cuprului, solubilă în solvenți organici. Prin încălzire, α -carotenul este posibil să se transforme în β -caroten. În plante se află în cantități mai mici decât β -carotenul.

β -Carotenul se prezintă sub formă de cristale violete, solubile în solvenți organici. Este foarte răspândită în tot regnul vegetal însoțind permanent clorofila. Prin hidroliză enzimatică oxidativă, β -carotenul se transformă în două molecule de vitamină A_1 . β -Carotenul este principala provitamină A.

γ -Carotenul se prezintă sub formă de cristale roșii cu reflexe albastre, solubile în solvenți organici. γ -Carotenul este puțin răspândit în regnul vegetal. Cel mai mult se găsește în morcov.

Derivații oxigenați ai carotenoidelor sunt alcoolii, cetone, acizi etc., proveniți din hidrocarburile carotenoidice. Se cunosc foarte mulți reprezentanți ai acestor derivați dintre care amintim : xantofilele, cetonele carotenoidice, acizii carotenoidici etc.

XANTOFILELE. Sunt derivați hidroxilici ai hidrocarburilor carotenoidice. Se cunosc mai multe xantofile, dintre care cele mai importante sunt luteina și zeaxantina. *Luteina* este o substanță cristalizată de culoare galbenă cu luciu violet. Însoteste β -carotenul și clorofila în toate plantele verzi. Este colorantul galben al florilor. Se găsește de asemenea în gălbenușul de ou, în țesuturile animale și în special în ovar. *Zeaxantina* se prezintă sub formă de cristale portocalii. Structural se deosebește de luteină prin poziția unei duble legături (2 cicluri β -ionice).

CETONE CAROTENOIDICE. Dintre cetonele carotenoidice menționăm rodoxantina și astacina. *Rodoxantina* este o substanță de culoare roșie-albăstruie, răspândită în plantele acvatice și în conifere. Este o dicetonă carotenoidică. *Astacina* este o substanță de culoare violetă. Din punct de vedere chimic este o tetracetonă carotenoidică.

ACIZI CAROTENOIDICI. Dintre acizii carotenoidici, cu mai puțin de 40 atomi de carbon, cei mai importanți sunt bixina și crocetina, pigmenti galbeni.

Pigmentii carotenoidici intervin în procesul de fotosinteză, având un rol atât în absorbirea energiei luminoase cât și în protejarea de autofotodistrugere a moleculelor de clorofilă sau alte substanțe active (citocromi, peroxidaze, catalaze, pigmenti flavonoidici, vitamina B_{12} , vitaminele E, vitaminele K etc.). Deoarece pot fixa oxigenul formând compuși oxigenați puțin stabili, pigmentii carotenoidici intervin în procesele de oxidoreducere. Pot forma metaboliți intermediari care să stimuleze sau să inhibe dezvoltarea plantelor. În organismul animal acești pigmenti îndeplinesc rolul de provitamine A. Sunt importanți de asemenea pentru acțiunea ce o pot avea în fototropii și fotoaxii. Carotenoidele au utilizări

numeroase în industria farmaceutică, cosmetică, industria alimentară (ca antioxidanți și coloranți naturali), zootehnie (furajarea animalelor) etc.

PIGMENTII CHINONICI sunt substanțe care conțin în moleculă, un nucleu benzochinonic, naftochinonic, antrachinonic sau fenantrenchinonic cu proprietăți cromofore. Pigmenți chinonici: p-Benzochinona, Naftochinona, Antrachinona, 3,4-Fenantrenchinona. Para-chinonele sunt coloranți galbeni, orto-chinonele sunt coloranți roșii, iar amestecul lor formează coloranți portocalii. Pigmenții chinonici combinați cu glucidele sub formă de glicozide sunt răspândiți în tot regnul vegetal, în alge, insecte și animale marine. Pigmenții fenantren chinonici se găsesc rar în natură.

Pigmenții chinonici colorați prin reducere trec reversibil în hidrochinone, care sunt substanțe incolore. În unele organisme vegetale, pigmenții chinonici apar inițial sub formă de hidrochinone incolore, iar pe măsura creșterii organismelor, pigmenții se oxidează și se formează chinone colorate. Prin faptul că se pot reduce reversibil în hidrochinonele corespunzătoare, pigmenții chinonici joacă un rol însemnat în reacțiile de oxidoreducere. Pot îndeplini rolul de transportori de hidrogen neenzimatici. Pigmenții chinonici intră în constituția unor enzime de oxido-reducere.

PIGMENTII BENZOCHINONICI. Se găsesc în cantități mai mari, sub formă de glicozide, în plantele medicinale, ciuperci și bacterii. Ca reprezentanți mai importanți sunt: ubiquinona, care intervine în procesul respirator și 2,6-dimetoxibenzochinona, colorant al florilor.

PIGMENTII NAFTOCHINONICI. Se întâlnesc în plantele superioare. Spre exemplu, juglona (5-hidroxil-1,4-naftochinona) se găsește în coaja nucilor verzi. Vitaminele K conțin de asemenea un nucleu naftochinonic, iar vitaminele E un nucleu derivat din naftochinonă (croman). Datorită structurii lor aceste vitamine formează sisteme oxidoreducătoare ce intervin în procesele respiratorii.

PIGMENTII ANTRACHINONICI. Se găsesc predominant în plantele superioare și în ciuperci sub formă de combinații (glicozide). Reprezentanții cei mai importanți sunt: alizarina, purpurina și chinalizarina, substanțe cristaline colorate în roșu portocaliu. Cu cationii unor metale formează complecși chelatici folosiți ca mordanți în vopsitorie. Datorită structurii chimice pigmenții antrachinonici pot participa la sistemele redox din plantă. Pe cale chimică, se poate trece de la alizarină și chinalizarină la purpurină.

Alizarina - pigment cu structură antracenică, duhidroxilat, utilizat din antichitate drept colorant. Se găsește în cantitate mai mare în plantele din familiile *Rubiaceae*, *Ramnaceae*, *Polygonaceae* etc. cât și în ciuperci. Substanță solidă, cristalină, de culoare roșie, cu p.t. 280°C și p.f. 430°C, insolubilă în apă, dar solubilă în alcool și în soluții alcaline. Reacționează cu metalele și formează complecși (chelați) colorați, denumiți lacuri, a căror culoare depinde de ionul metalic.

Purpurina - pigment antracenic trihidroxilat, de culoare roșie-purpurie, folosit din antichitate în vopsitorie. Se află în aceleași familii de plante ca și alizarina. Cu metalele formează complecși ciclici interni (chelați), care diversifică nuanța culorii. Ca mordant se folosește $Al(OH)_3$, cu care pigmenții antrachinonici formează lacuri.

PIGMENTII FLAVONOIDICI. Flavonoidele sunt pigmenți fenolici care conțin în molecula lor un heterociclu piranic sau furanic condensat cu un inel benzenic. De heterociclu se cuplează un alt inel benzenic. Inelele au grupări hidroxilice, ceea ce determină caracterul fenolic al acestor pigmenți.

Flavonoidele sunt pigmenți vegetali care predomină în plantele superioare. Se găsesc în flori, fructe, frunze, tulpini, rădăcini, scoarța copacilor etc. În cantitate mică se găsesc în unele alge, în microorganisme și în unele insecte (flavone). Majoritatea flavonoidelor sunt colorate și

contribuie în mare parte la formarea culorii florilor și a fructelor. Se găsesc în natură în stare liberă, dar mai ales sub formă de glicozide.

Sub aspect chimic pigmentii flavonoidici sunt glicozide fenolice, solubile în apă. Se găsesc în sucii vacuolar și în cromoplaste. Se cunosc 6 tipuri de flavonoide: flavani, antocianidine, flavone, flavanone, calcone și aurone. Aceste grupe se deosebesc între ele prin felul heterocicului și prin numărul și poziția grupărilor hidroxilice și metoxilice, legate de inele benzenice.

FLAVANII (cromanii) sunt pigmenți care derivă de la flavan (2-fenil-benzopiran, croman). Ei au în moleculă un inel benzopiranic. Au tendință de polimerizare și formează catechine care intră în constituția taninurilor catechinice.

ANTOCIANIDINE ȘI ANTOCIANI. Antocianidinele sunt pigmenți care derivă de la 2-fenil-benzopirenă (2-fenil-cromenă). Ei sunt principalii pigmenți care dau culoarea roșie și albastră florilor și fructelor. Se găsesc în natură de obicei sub formă de glicozide, care poartă numele de antociani. Cele mai importante antocianide sunt: *pelargonidina*, *cianidina* și *delfinidina*, care se deosebesc între ele prin numărul și poziția grupărilor hidroxilice de pe inelul benzenic C.

Pelargonidina se află în florile de mușcată, cianidina în florile de cicoare și de centauree, delfinidina în florile de nemțisor (*Delfinum consolida*). În antociani, glucidele (monoglucidele, diglucidele) se leagă de antocianidine (aglicon), de obicei la hidroxilul de la C-3 de pe heterociclu. În natură predomină antocianii monoglicozidici, dar se cunosc și antociani diglicozidici. Prin metilarea antocianidelor menționate, se obțin noi pigmenți cu culori diferite, cum sunt: peonidina, pentunidina și malvidina.

Antocianii se găsesc în flori singuri și mai cu seamă în amestec cu alți pigmenți, formând o varietate mare de culori. Florile roz, roșii, roșu aprins conțin predominant pelargonidină, florile purpurii și vișinii conțin cianidină. Antocianii sunt solubili în apă și alcool, greu solubili în eter, benzen și cloroform. Se extrag cu apă sau alcool în mediu de acid clorhidric. Din extractul obținut, dacă se adaugă eter, precipită clorura de antocian. Cu acizii minerali antocianii formează săruri de culoare roșie, stabile la diluare (spre deosebire de flavone). Antocianidinele cu grupări hidroxilice învecinate formează cu metalele (Al, Fe) complecși de culoare albastră. Antocianii își schimbă culoarea în funcție de pH, fapt pentru care se utilizează ca indicatori acido-bazici.

FLAVONE ȘI IZOFLAVONE. Sunt pigmenți galbeni care derivă de la 2-fenil-benzopironă (2-fenil-cromonă) și respectiv de la 3-fenil-benzopironă (3-fenil-cromenă). În natură, flavonele și izoflavonele se găsesc, de obicei, sub formă de glicozide și sunt larg răspândite. Se cunosc peste o sută de flavone care se găsesc în flori, fructe, frunze, în lemn și scoarța copacilor.

Flavonele și izoflavonele conțin pe inelele A și C grupări hidroxilice și metoxilice. Dacă pe inelul heterociclic se află grupări hidroxilice, pigmentii se numesc flavanoli și izoflavanoli. Dintre flavonele mai răspândite, fac parte *apigenina*, *luteolina* și *quercitrina*.

Flavonele sunt substanțe cristaline, de culoare galbenă, solubile în apă și alcool. În mediu alcalin, inelul piranic se deschide și se formează dicetone. Flavonele au maxime de absorbție cuprinse între 335-350 nm, iar flavanolii între 360-380 nm. Cu metalele, flavonele formează complecși. Se dizolvă în acid sulfuric concentrat dând soluții galbene, datorită formării sărurilor de *flaviliu*. Flavonele prezintă în ultraviolet două sau trei benzi de absorbție caracteristice. Ele protejează în organism oxidarea vitaminei C și a adrenalinei. Absorb radiațiile ultraviolete și protejează citoplasma și clorofila de aceste radiații. Se găsesc în cantitate mai mare în plantele tropicale și în cele din regiuni montane și alpine. Flavanolii care au un număr mare de grupări hidroxilice și metoxilice pe inelul A sunt intens colorați în galben. Așa sunt *gospetina*, *quercetagetina* care imprimă culoarea galbenă florilor de bumbac,

primulelor, numeroaselor compozite. Florile albe au un conținut redus de flavone și de flavanoli.

FLAVANONE, CALCONE ȘI AURONE. Flavanonele derivă de la 2-fenil-dihidrobenzo-pironă, calconele de la benziliden - aceto - fenonă, iar auronele de la 2-benziliden-cumaranonă. Flavonele sunt pigmenți incolori (datorită întreruperii sistemului cromofornic) care însoțesc flavonele. În mediu bazic se transformă în calcone (prin ruoarea heterociclului), iar acestea în mediu acid se ciclizează și refac flavonele. Prin oxidare se transformă în aurone, care au o culoare galben-aurie intensă și se găsesc predominant în florile unor compozite.

Flavanonele, calconele și auronele au de asemenea grupări hidroxilice pe inelele A, C și chiar pe heterociclu. Ele se găsesc în natură de obicei sub formă de glicozide. Auronele și calconele apar de obicei în flori, iar flavanonele în flori, frunze, lemn etc. Prezența flavanonele în organismele vegetale mărește rezistența acestora la atacul insectelor și al microorganismelor. Ele influențează gustul, aroma și stabilitatea unor preparate extrase din plante. Unele flavonoide se utilizează ca substanțe antioxidante la conservarea grăsimilor, altele se utilizează ca produse farmaceutice.

Flavonoidele pot forma în celule sisteme de oxido-reducere, care au un rol însemnat în organism. Unele flavonoide sunt folosite ca vitamine P în terapeutică. Prin diferite reacții de oxidare, reducere, izomerizare etc., diferite grupe de flavonoide se pot transforma reciproc unele în altele, ceea ce constituie un mare avantaj pentru plante. În funcție de necesitățile din plante, unele flavonoide se pot transforma în altele, realizându-se o bună utilizare a acestor pigmenți.

PIGMENTII INDOLICI fac parte din grupa pigmentilor azotați. Ei se găsesc în regnul vegetal sub formă de cromoproteide sau glicozide.

Indigoul este un pigment care se utilizează din antichitate ca și colorant. Se găsește sub formă de glicozid numit indican, în *Indigofera tinctoria*, plantă originară din India și în *Isatis tinctoria*, plantă cultivată în Europa. Prin macerarea plantelor în mediu apos, se produce hidroliza enzimatică a indicanului și se obține indoxilul, care prin autooxidare va forma indigoul. *Indirubina* este un izomer al indigoului, numit și roșu de indigou.

Purpura antică este un derivat al indigoului (6,6'-dibrom-indigo) care se extrage din unele moluște (*Murex branderia*) și servește ca și pigment colorat încă din antichitate. Din grupa pigmentilor azotați fac parte și melaninele, care sunt pigmenți de culoare închisă, ce se formează din aminoacizi aromatici (fenilalanina și tirozina). Se găsesc în plantele superioare, la animale vertebrate și nevertebrate, în cuticula insectelor. Tot din grupa pigmentilor azotați fac parte unele cromoproteine colorate, cum sunt cloroglobulinele, hemoglobulinele, citocromii etc. Cloroglobulinele au rolul esențial în fotosinteză, cel mai important proces de biosinteză de pe pământ.

3.2. Alcaloizii

Sunt substanțe organice azotate complexe, produse doar de către organismul vegetal, ce prezintă o reacție alcalină mai mult sau mai puțin importantă. Sunt produși finali ai metabolismului azotat. Se cunosc aproximativ 5000 de alcaloizi naturali diferiți. Alcaloizii se pot localiza în frunze (ceai, coca), semințe (cafea), rădăcini și scoarță, spermodermă (brândușe), "scoarța" fructului (mac), canale secretoare, laticifere etc.

În general alcaloizii se caracterizează prin structuri heterociclice. Datorită azotului din moleculă, prezintă caracter bazic. Sunt substanțe insolubile în apă și solubile în solvenți organici. Reacționează cu acizii minerali și formează săruri solubile. În plante se găsesc sub formă de săruri ale acizilor oxalic, citric, malic, fumaric etc. Dau reacții caracteristice de

precipitare cu numeroși reactivi (iodura de potasiu, clorura de platină, acid picric, acid sulfuric etc.).

Exercită efecte fiziologice considerabile asupra omului și asupra animalelor. Alcaloizii sunt folosiți în terapeutică ca narcotice și calmante. Unii alcaloizi sunt otrăvuri puternice, spre exemplu *curara*, ce are capacitatea de a paraliza sistemul nervos. Se consideră că alcaloizii constituie mijloace de apărare ale plantelor împotriva insectelor. Unii alcaloizi, de exemplu nicotina, joacă rol în procesele enzimatice de oxido-reducere.

Plantele producătoare de alcaloizi sunt dicotiledonatele, iar în măsură mai mică monocotiledonatele și criptogamele. În general o plantă conține mai mulți alcaloizi. Conținutul în alcaloizi depinde de vârsta plantei, regiune, climă și anotimp. Algele și mușchii nu au alcaloizi. Ei sunt rari la ciuperci (ergotamina), la pteridofite (nicotina de la *Equisetum*, coniina sporilor de *Lycopodium*) și la gimnosperme (efedrina de la *Ephedra*). La angiosperme, anumite familii sunt repute prin bogăția lor în alcaloizi : *Solanaceae* (solanina, nicotina, hiosciamina, atropina ș.a.), *Rubiaceae* (cofeina, eretina, chinina), *Papaveraceae* (morfină, papaverina, codeina, narseina ș.a.). Alcaloizii mai importanți sunt : *coniina, nicotina, tropanul, atropina, cocaina, chinina, papaverina, morfină, codeina, stricnina, cofeina* etc.

CONIINA se extrage din semințele de cucută. Este o otrăvă puternică, care în doze mari produce moartea prin paralizia centrului nervos respirator. Acest alcaloid prezintă nucleu piperidinic.

NICOTINA (β - piridin - N - metilpirolidina) este principalul alcaloid din tutun. În cantități mici este excitant al nervilor centrali și periferici și provoacă contracția vaselor sanguine. În cantități mari este un toxic puternic. Nicotina este o substanță cancerigenă. Este un alcaloid care conține un nucleu piridinic legat de un heterociclu pirolidinic.

TROPANUL, ATROPINA ȘI COCAINA se extrag din solanaceae, convolvulaceae, dioscoraceae și eritroxilaceae. Din punct de vedere chimic acești alcaloizi sunt esteri ai unor alcoolii derivați de la tropan. Atropina acționează asupra sistemului nervos parasimpatic. Ea produce o relaxare a mușchilor netezi și se folosește ca medicament antispasmodic. În cantitate mică dilată pupila, în cantități mari este toxică. Cocaina, în cantități mici este anestezic local, iar în cantități mari produce paralizia nervului central.

MORFINA ȘI CODEINA se extrag din opiu. Morfină determină o insensibilitate la dureri datorită acțiunii asupra sistemului nervos central. Codeina nu posedă însușiri narcotice. În cantitate mică se folosește ca medicament contra tusei. Codeina are structură chimică similară morfinei cu deosebirea că din nucleul A este înlocuit hidroxilul cu o grupare metoxică. Morfină și codeina conțin în moleculă un inel fenantrenic parțial saturat.

CHININA se extrage din arborele de chinină. Se utilizează la combaterea malariei. Reglează temperatura corpului uman. Chinina conține în molecula ei un heterociclu chinolinic.

PAPAVERINA se extrage din sucul lăptos al capsulelor necoapte de mac (opiu). Ea acționează direct asupra musculaturii netede. Papaverina conține în moleculă heterociclu izochinolinic.

STRICNINA se extrage din semințele și frunzele plantei numită *Strychnos nux vomica* (turta lupului). Este o otrăvă puternică. În cantități mici este toxic general iar în cantități mari este insecticid. Stricnina conține în moleculă heterociclu indol.

COFEINA se extrage din boabele de cafea. Este un excitant al sistemului nervos central. Cofeina conține în moleculă ciclul purinic.

Alcaloizii sunt produși finali de metabolism ai compușilor azotați și constituie mijloace de protecție și de apărare ale plantelor. În cantități mici pot fi folosiți ca substanțe farmaceutice, iar în cantități mari acționează ca insecticide și otrăvuri.

3.3. Uleiurile, rezinele (rășinile) și oleorezinele

Uleiurile eterice și rășinile sunt produși finali ai metabolismului plantelor. Aceste substanțe sunt depuse în anumite țesuturi ale plantei, pentru a nu afecta cursul proceselor metabolice. Astfel, pot fi întâlnite în vacuole, pungi intercelulare, solzi, sub scoarță sau la suprafața scoarței copacilor.

ULEIURILE ETERICE sunt substanțe lichide, volatile, cu miros parfumat, aromat, insolubile în apă, solubile în solvenți organici sau grăsimi. Au rol de condiment, rol antiseptic, antispasmodic, stomachic etc. Uleiurile eterice se extrag din flori, frunze, fructe, coajă și uneori din partea lemnoasă (lemnul de camfor), folosind solvenți organici sau prin distilare și antrenare cu vapori de apă. Numărul uleiurilor eterice vegetale este foarte mare (peste o mie). Din punct de vedere chimic, uleiurile eterice reprezintă amestecuri de substanțe constituite din hidrocarburi terpenice, hidrocarburi aromatice, alcooli, aldehide, cetone, acizi organici, pigmenți, eteri, esterii etc. Unul și același ulei eteric poate conține până la 50 de substanțe diferite. Dintre acești compuși, cei mai importanți sunt hidrocarburile terpenice sau terpenele și derivații lor (mircenul, geraniolul, limonenul, mentolul, camforul, borneolul etc.).

Mircenul se găsește în hamei, *geraniolul* în florile de trandafiri, *limonenul* în chimion, *mentolul* în mentă, *camforul* în lemnul de *Laurus camfora* și în pelin, *borneolul* în lavandă etc.

RĂȘINILE, produse de excreție ale plantelor, apar în deosebi în țesutul lemnos, în amestec cu mici cantități de uleiuri eterice. Derivă din uleiuri prin oxidare și se pot combina, dând *oleozine*. Rășinile sunt substanțe solide sau semisolide, solubile numai în solvenți organici. Ele fierb la temperaturi ridicate (peste 300°C), nu sunt distilabile și nu au puncte fixe de topire (suferă înmuiere). Din punct de vedere chimic, rășinile sunt formate din acizi rezinici (de tipul acidului abietic) și derivații lor, substanțe policiclice cu caracter acid. Au proprietăți stupefiante, purgative, expectorante, vermifuge. Se pot acumula în celule izolate (idioblaste), în celulele epidermice, peri, buzunare și canale secretoare. Exemple de rășini sunt sacâzul și tămâia.

BALSAMURILE sunt rășini lichide sau semisolide, cu conținut ridicat în uleiuri eterice (până la 40%). În contact cu aerul, ca și rășinile, și balsamurile se solidifică deoarece o parte din uleiurile eterice din constituția lor se volatilizează. *Copalii* sunt rășini fosile aflate în sol, sub formă de depozite care provin din plante dispărute. *Lignanii* sunt tot rășini în care predomină substanțe înrudite cu elementele structurale ale ligninelor (monomeri, dimeri etc.). *Rășina de guaiac* care conține acid guajaritic se găsește în *Guaiacum officinalis* și este deosebit de bogată în lignani.

Rășinile și uleiurile eterice constituie mijloace de apărare ale plantelor față de paraziți. Mirosul lor plăcut poate atrage unele insecte favorizându-se polenizarea. Rășinile care se depun pe diferite leziuni ale organismului vegetal au rol protector, de izolare și de vindecare. Uleiurile eterice sunt importante și datorită utilizărilor practice în parfumerie, în industria farmaceutică, industria alimentară etc. Rășinile se folosesc în industria textilă, la prepararea de lacuri și vopsele, în industria farmaceutică etc.

3.4. Substanțe antibiotice

Antibioticele sunt substanțe cu acțiune bacteriostatică (împiedică înmulțirea microorganismelor) sau bactericidă (distrug microorganismele). După originea lor se deosebesc antibiotice de origine microbială și antibiotice de origine vegetală.

Antibioticele de origine microbială. Sunt substanțe sintetizate de către anumite microorganisme și mucegaiuri. Ele sunt substanțe folosite ca medicamente în cazul unor boli provocate de microorganisme patogene la om, animale sau plante. Ca reprezentanți ai antibioticelor putem menționa: *penicilina*, *streptomicina*, *cloromicetina*, *tetraciclina* etc.

Antibioticele vegetale (fitoncide). Sunt substanțe cu proprietăți antibiotice sintetizate de către plante. Fitoncidele prezintă acțiune antibiotică mult mai redusă comparativ cu cea a

antibioticelor de origine microbiană. Unele fitoncide prezintă și proprietăți insecticide față de numeroase insecte, viermi, rozătoare etc. se cunosc peste 50 de fitoncide extrase din diferite plante, dintre care cele mai importante sunt: *allicina*, *dihidroalliina*, *acidul benzoic*, *alil-senevolul* etc.

Allicina este un antibiotic volatil extras din usturoi, cu acțiune distructivă asupra bacilului difteric, holerei, stafilococilor etc. *Dihidroalliina* este un antibiotic extras din ceapă.

Acidul benzoic, *acidul p-hidroxil-benzoic*, *acidul vanilic*, *acidul cafeic*, *acidul ferulic* etc., sunt răspândiți în numeroase plante superioare (în special în morcovi), au acțiune bacteriostatică, bactericidă și antihormonală. Ei împiedică biosinteza gibberelinelor. *Alil-senevolul*, se extrage din muștar, hrean, ridichii etc.

Unii alcaloizi și taninurile prezintă de asemenea proprietăți fitoncide. Plantele medicinale, florile, rădăcinile și tuberculii unor plante (leguminoase, orhidee) reprezintă o importantă sursă de antibiotice vegetale.

3.5. Insecticide vegetale

Unele plante superioare pot sintetiza anumite substanțe cu acțiune insecticidă, care să exercite o acțiune de apărare împotriva insectelor, viermilor, rozătoarelor etc. Din punct de vedere chimic, insecticidele vegetale sunt substanțe cu structuri foarte diferite ca : cetoalcooli nesaturați (*piretrolona*), esteri ciclici nesaturați (*piretrina* și *cinerina*), benzo-pirani (*rotenona*, care este toxică pentru animale), glicozide (*scilirozida* din ceapă roșie de mare), senevoli (*senevolul* fenil-etilenic, extras din sfeclă, insecticid puternic, de același grad cu *aldrinul* și *clordanul*), amide ramificate nesaturate. Deci plantele superioare au capacitatea de a sintetiza substanțe de apărare cu proprietăți bacteriostatice, bactericide, fungicide sau insecticide.

În florile de *Chrysanthemum cinerariaefolium*, *Peonia albiflora*, *Pyrethrum carneum* etc. se găsesc esteri ciclici nesaturați. Prin hidroliza acestora, se formează un cetoalcool nesaturat, *piretrolona* sau *cinerolona* și un acid ciclopropan monocarboxilic, respectiv dicarboxilic.

În unele leguminoase din genurile *Derris*, *Jochocarpus*, *Tephrosia*, *Millelia* etc., se găsesc insecticide din grupa rotenoidelor, ce conțin în moleculă un nucleu benzopiranic sau benzopironic. Ele sunt toxice nu numai pentru insecte, dar și pentru alte animale inferioare și pentru pești.

Prezența fitoncidelor în plante, se poate remarca dacă se plantează, într-un sol ruderal, un pomișor și un băț, de aceeași grosime cu pomul. Bățul se degradează în scurt timp, sub acțiunea microorganismelor din sol, în timp ce pomul se apără de acțiunea microorganismelor, prin fitoncidele ce le conține. În timp ce bățul se degradează, pomul crește și se dezvoltă, sub acțiunea factorilor de mediu.

3.6. Lignine

Ligninele sunt substanțe macromoleculare care însoțesc celuloza în diferite organe și țesuturi ale plantelor. Sunt substanțe foarte răspândite în regnul vegetal, ocupând locul al doilea după celuloză. Se găsesc în lemnul diferitelor specii de plante în proporție de 21-30% din materia uscată. Fibrele de in și de cânepă sunt sărace în lignină, iar cele de iută conțin 19% lignină. În **tabelul 4** este dat conținutul în lignine al lemnului de conifere și foioase și al unor fibre textile.

Ligninele sunt substanțe ternare, formate din C, H și O, de natură aromatică. Caracteristic este prezența în moleculă a grupărilor metoxil și hidroxil. Substanțele constituente de bază din lignine sunt alcoolii aromatici derivați de la fenilpropan: alcoolul coniferilic, alcoolul hidroxiconiferilic și alcoolul sinapinic. Ligninele se formează prin condensarea acestor

alcooli. Ligninele din diferite plante nu sunt identice, ele diferă prin numărul și felul unităților structurale. Astfel, în ligninele de foioase predomină alcoolul sinapinic, iar în cele ale coniferelor alcoolul coniferilic. Masa moleculară a ligninelor variază între 700 – 100.000 Da. Sunt substanțe amorfe, de culoare închisă, insolubile în apă, acizi și alcalii diluate. Sunt solubile în acizi tari concentrați și alcalii concentrate.

Tabelul 4. Conținutul în lignine al lemnului de conifere și foioase și al unor fibre textile (după G. Neamțu și Gh. Câmpeanu, 1983)

| Materialul vegetal | Lignine % în material uscat | Materialul vegetal | Lignine % în material uscat |
|-------------------------|--------------------------------|----------------------|--------------------------------|
| Lemn de conifere | | Mesteacăn | 19,6-22,2 |
| Brad | 25-30 | Plop | 18,2-20,30 |
| Molid | 28-28,5 | Stejar | 27,3-29,4 |
| Pin | 26-29 | Fibre textile | |
| Lemn de foioase | | Bumbac | 0 |
| Arin | 24,3-26,5 | Câneapă | 1,4 |
| Arțar | 24,1 | In | 0,8 |
| Fag | 21-24,5 | Iută | 19,0 |

Ligninele se întrepătrund cu fibrele de celuloză prin legături fizice cât și legături chimice (eterice). Ele conferă fibrelor de celuloză o rezistență mărită la acțiunea apei deoarece reduc capacitatea de îmbibare, micșorându-le însă elasticitatea. Lignina se separă de celuloză fie prin dizolvarea celulozei și a substanțelor însoțitoare în reactivi adecvați, fie prin dizolvarea lor în hidroxizi alcalini concentrați și precipitarea ulterioară din soluție. Ligninele se pot recunoaște prin tratare cu o soluție de floroglucină în mediu de acid clorhidric când apare o colorație roșie.

Ligninele au un rol însemnat în formarea humusului cu stabilitate mare, deoarece rezistă la acțiunea agenților chimici și sunt atacate greu de microorganisme. Ele se utilizează pentru obținerea unor materii plastice sintetice, a negrului de fum și ca înlocuitori ai taninurilor vegetale.

3.7. Glicozide

Glicozidele sunt substanțe formate din două componente: o componentă glucidică și o componentă neglucidică, numită *aglicon*. Componenta glucidică se leagă de aglicon prin *legătură glicozidică*, prin intermediul hidroxilului semiacetalic. Componenta glucidică poate fi monoglucidă, diglucidă sau o oligoglucidă. Predominant se întâlnește glucoza sau oligoglucoide ce conțin glucoză. Agliconul poate aparține unor clase de substanțe extrem de diferite ca alcooli, fenoli, steroli, tioalcooli, hidroxichinone, pigmenți, substanțe cu azot etc.

Glicozidele sunt larg răspândite în regnul vegetal. Se găsesc atât în plantele superioare: în frunze, flori, fructe, semințe, rădăcini, lemn etc., cât și în cele inferioare. Sunt substanțe solide, cristaline, incolore sau colorate (în funcție de felul agliconului), cu gust în general amar. Unele au o aromă specifică. Glicozidele prezintă activitate optică. Majoritatea sunt solubile în apă, alcool, acetonă și insolubile în eter. Nu prezintă fenomenul de mutarotație și nu au proprietăți reducătoare. Se hidrolizează cu ușurință în mediu acid, bazic sau sub acțiunea enzimelor. Numeroase glicozide au acțiune fiziologică asupra organismelor animale (curativă sau nocivă) și se întrebuintează încă din antichitate ca medicamente sau ca otrăvuri. Se presupune că unele glicozide reprezintă pentru plante forme inofensive de depozitare a unor agliconi toxici. Prin hidroliză parțială plantele eliberează o parte din aglicon în doze netoxice,

exercitând asupra plantei o acțiune protectoare. Unele substanțe farmacologice active, printre care și glicozidele, în cantitate mică se utilizează ca medicamente, iar în cantitate mare sunt toxice.

Dintre diferitele tipuri de glicozide, cele mai numeroase sunt *O-glicozidele*, care se deosebesc între ele prin felul glucidei și a agliconului. Dintre *O-glicozidele* formate din β -glucopiranoză, alcooli și fenoli, menționăm *arbutina*, extrasă din *Arbutus uva ursi*, *salicina* izolată din *Salix helix* și *coniferina* identificată în diferite conifere. Agliconul acestor glicozide, în ordinea prezentată este hidrochinona, alcoolul salilic și alcoolul coniferilic.

În migdalele amare, sâmburii de caise, piersici, prune, cireșe etc., se găsește *amigdalina*, care prin hidroliză sub acțiunea emulsiei formează două molecule de glucoză, aldehidă benzoică și acid cianhidric. Glicozidele care conțin acid cianhidric sunt substanțe toxice și se numesc glicozide cionogenice. Unele plante furajere conțin glicozide cianogenetice care prin hidroliză eliberează acid cianhidric. Aceste plante consumate în cantitate mare în stare proaspătă produc intoxicații la animale. Prin uscarea sau murarea acestor furaje acidul cianhidric se elimină în mod treptat, în urma reacțiilor de hidroliză enzimatică sau acidă și astfel crește calitatea acestor furaje. În amigdalina, componenta glucidică se află sub formă de gentiobioză, o diglucidă formată din două molecule de glucoză unite prin legătură 1,6- β -glicozidică. Dintre *O-glicozidele* steroidice, care au ca aglicon steroli, mai importante sunt glicozidele cardiotonice și saponinele.

GLICOZIDELE CARDIOTONICE în cantitate mică întăresc mușchiul inimii și produc o mărire a amplitudinii contracțiilor. Acestea, administrate în cantitate mare determină oprirea inimii în sistolă. Cele mai utilizate glicozide cardiotonice în medicină sunt *digitalina* și *strofantina*. Aceste glicozide se găsesc în *Digitalis lanata*, *D. purpurea*, *Strophantus kombi*, *Scilla maritima* etc. Agliconul strofantinei se numește strofantiolină, iar componenta glucidică este o triglucidă.

SAPONINELE sunt glicozide *steroidice*, identificate în peste 80 familii de plante. Agliconul lor poartă numele general de *sapogenină*. Saponidele sunt glicozide cu proprietăți specifice. Injectate intravenos la om și la animale produc hemoliză. Au acțiune iritantă asupra mucoaselor și sunt extrem de toxice pentru pești. Au proprietăți tensioactive și emulsionează grăsimile. Prin agitare cu apă formează o spumă abundentă și persistentă.

Datorită proprietăților lor, saponidele au numeroase utilizări practice. Sunt folosite ca agenți de spumare (în extincătoare), detergenți, coloizi protectori etc. Unele saponide se utilizează ca materie primă pentru sinteza hormonilor sexuali și în general a hormonilor steroidici.

O altă grupă de *O-glicozide* o formează *glicoalcaloidele*, care au ca aglicon un alcaloid, de regulă cu structură steroidică. Dintre acestea se menționează *solanina* și *tomatina*. Solanina se găsește în *Solanum tuberosum*. Ea este formată dintr-o triglucidă și din solanidină, ca aglicon. Triglicida se numește solatrioză și este formată din glucoză, galactoză și ramnoză. Tomatina se găsește în *Solanum lycopersicum*. Agliconul se numește tomatidină, iar componenta glucidică este o tetraglucidă.

Tot din grupa *O-glicozidelor* fac parte unele glicozide flavonoidice, carotenoglicozide, glicozide xantonice, glicozide indolice etc.

S-glicozidele sunt mai puțin răspândite în natură. Ele se găsesc, predominant, în plante din familia cruciferelor. Dintre *S-glicozidele*, importanță alimentară mai mare o are *sinigrina*, care se găsește în semințele de muștar negru (*Sinapis nigra*), în hrean, ridichii, rapiță. Prin hidroliza sinigrinei, sub acțiunea mirozinazei, se obțin ca produși finali, glucoza, aliilsenevolul și KHSO_4 . Senevolii sunt substanțe cu miros caracteristic înțepător, uneori lacrimogeni, irită pielea și mucoasele. În doze mici, stimulează secreția gastrică, în doze mari determină paralizia

sistemului nervos. În muștarul alb se găsește *sinalbina*. S-glicozidele se pot forma și din tioglucoză, ce are hidroxilul semiacetalic substituit printr-o grupare tiolică.

N-glicozidele sunt substanțe larg răspândite în natură. Din această grupă fac parte nucleozidele și nucleotidele. Dintre glicozidele cu azot fac parte și glicozidele cianogenice și glicoalcaloidele, dar la aceste substanțe legătura glicozidică nu se stabilește la nivelul atomului de azot, de aceea s-au prezentat la O-glicozide.

3. 8. Taninurile

Taninurile vegetale sunt substanțe foarte cunoscute pentru multiplele lor aplicații practice, în special în medicina tradițională și în industria tăbăcăritului. Literatura de specialitate amintește de vechi triburi din America de Nord care foloseau decocturile și cataplasmele preparate din rădăcinile unor plante (cunoscute în prezent ca având un conținut ridicat în taninuri, precum crinul de apă canadian – *Nuphar variegatum*) pentru a trata durerile de gât, leucoreea, răceala, rănilor, durerile interne sau alte infecții ale pielii. Tăbăcirea pielii cu ajutorul taninurilor vagatale este cunoscută încă din antichitate și ea era realizată folosindu-se coaja diferitelor specii de copaci, în special specii de stejar.

Stabilirea structurii lor moleculare a permis de asemenea stabilirea unor diferențe, în ceea ce privește utilitatea practică, între diferitele tipuri de taninuri. S-a ajuns astfel la concluzia că în special galotaninurile, dar și elagotaninurile, ambele aparținând clasei de taninuri hidrolizabile, au aplicații practice mult mai numeroase decât taninurile condensate.

Din punct de vedere chimic taninurile sunt substanțe polifenolice (derivați ai 3-hidroxi-flavanului sau poliesteri ai acidului galic) solubile în apă, cu gust astringent, care prezintă reacții caracteristice fenolilor și care precipită cu alcaloizii și cu proteinele, formând combinații impermeabile și imputrescibile (caracteristice procesului de tăbăcire a pielii).

Taninurile sunt mult răspândite în natură. Se întâlnesc în cantități foarte mici la majoritatea plantelor, iar în cantități mari se găsesc în scoarța, lemnul și frunzele de stejar, în scoarța de arin, molid, plop, nuc, afin, coroniște, mangrove, în fructele unor specii ca *Terminalia chebula*, *Caesalpinia brevifolia* etc. Sunt substanțe astringente, utilizate ca antidiareice. După tipul de legătură dintre polifenoli și acizi fenolici se deosebesc : taninuri hidrolizabile și taninuri nehidrolizabile sau condensate.

TANINURI HIDROLIZABILE. Prin hidroliză acidă sau în prezența tanazelor, pun în libertate o oză, de obicei glucoză și acid galic sau un derivat al acidului galic, ca acid m-digalic sau acid elagic. Taninurile care conțin acid galic se numesc *galotaninuri*, iar cele care conțin acid elagic se numesc *elagotaninuri*. Din categoria galotaninurilor fac parte taninul turcesc și taninul chinezesc. O moleculă de tannin turcesc eliberează prin hidroliză cinci molecule de acid galic și o moleculă de glucoză, iar o moleculă de tannin chinezesc eliberează prin hidroliză nouă molecule de acid galic și o moleculă de glucoză. Prin hidroliza elagotaninurilor rezultă acid elagic și glucoză sau acid elagic, acid galic și glucoză. Prin încălzirea galotaninurilor la temperaturi ridicate se formează *pirogalol*.

TANINURI NEHIDROLIZABILE (CONDENSATE). Nu pot fi descompuse în părțile lor componente decât prin topire alcalină. Ele nu conțin glucoză. Taninurile nehidrolizabile rezultă prin condensarea derivaților catechinici și au o structură necunoscută până în prezent. Prin încălzire în prezență de hidroxizi alcalini eliberează pirocatechină (ortodifenol).

Taninurile catechinice sunt foarte răspândite în natură și prezintă o mare importanță practică. Pe cale industrială, acestea se extrag din scoarța de stejar, salcâm, mestecân, salcie etc. Spre deosebire de galotaninuri, taninurile catechinice precipită numai gelatina din piele și nu au proprietăți de tăbăcire. Prin încălzire sau pe cale enzimatică, mai multe molecule de catechine se condensează și formează tanin condensat, cu proprietățile taninului natural.

În organismul vegetal, taninurile joacă un rol biochimic important. Ele măresc rezistența plantelor față de virusuri și microorganisme. De asemenea dau gustul și aroma unor produse vegetale (ceai, cafea, vin etc.). Practic, taninurile se folosesc la tăbăcirea pieilor, fabricarea cernelurilor, limpezirea vinului etc. Tăbăcirea pieilor cu taninuri este un procedeu cunoscut din vechime. În procedeele moderne de tăbăcire soluția de tanin, obținută din coaja de stejar, este înlocuită de alte substanțe ca aldehida formică, săruri de crom etc.

Taninurile au largi utilizări în medicină, în industria pielăriei, în medicina tradițională. În medicină pot fi administrate intern și cu acțiune antidiareică, antimicotică și antiseptică, ca urmare a precipitării proteinelor bacteriene și fungice. Administrarea internă se face mai ales sub formă de decocturi, în tratamentul diareei, ulcerului, colitelor și ca antidot în intoxicații cu alcaloizi.

Administrarea pe cale externă se face prin aplicări locale, pentru tratarea stomatitelor (sub formă de caluton și gargarisme), a arsurilor și a hemoroizilor.

De asemenea, taninurile acționează ca: inhibitori ai peroxidării lipidelor, captatori de radicali liberi, inhibitori ai formării de ion superoxid. Au fost descrise efectele inhibitoare asupra implicării virusurilor. Acestea se datorează denaturării proteinelor virale.

Taninurile au efect inhibitor enzimatic manifestat asupra: 5-lipoxigenazei, enzimei de conversie a angiotensinei și activează hialuronidaza, glucoziltransferazele microorganismelor implicate în cariogeneză. Monomerii și dimerii au proprietăți de vitamină P (cresc rezistența și scad permeabilitatea capilarelor, cresc tonusul venos, stabilizează colagenul).

Taninurile elagice acționează asupra mecanismelor imunitare (stimulează fagocitoza), efect evidențiat și pentru galatul de epicatechol și galatul de epigallocatechol.

Din punct de vedere fiziologic, taninurile sunt considerate factori de apărare ai plantelor împotriva infecțiilor bacteriene și virale (precipită proteinele microorganismelor), antioxidanți (sunt puternic reducători), transportori de hidrogen (participă la sisteme redox celulare); unii autori consideră taninurile substanțe de rezervă pentru organismele vegetale întrucât dispar din semințe în perioada încolțirii.

4. Producerea de metaboliți în culturi de celule și țesuturi vegetale și potențialul lor aplicativ

În ultimii ani, interesul pentru metaboliții secundari de origine vegetală a crescut, dat fiind, pe de o parte efectul lor terapeutic, iar pe de altă parte, caracterul lor natural, în prezent aproximativ 60% dintre medicamentele utilizate pentru oameni fiind de natură vegetală. Dar utilizarea plantelor nu se rezumă numai la domeniul farmaceutic sau agroalimentar, ci ea se poate extinde la cosmetică și parfumerie.

Se apreciază că un număr mare de compuși noi sunt identificați anual în diferite specii de plante, dar este totodată semnalată și rapiditatea procesului de extincție a speciilor și de îngustare a bazei genetice a resurselor vegetale în lume. De exemplu, planta *Pilocarpus pabonadi* utilizată pentru producerea medicamentului pilocarpin, datorită colectării neraționale este în prezent declarată specie amenințată cu dispariția în Himalaia și a fost înlocuită cu *Pilocarpus microphyllus* ca sursă de principii farmacologic active (R. GUPTA, 1991). Acest fenomen a stimulat atât reconsiderarea importanței vitale a resurselor genetice cât și interesul pentru obținerea metaboliților secundari prin metode neconvenționale. Încă din 1952 J.B. ROUTIEN și L.G. NICKEL au obținut un brevet cu titlul "Cultivarea celulelor vegetale" demonstrând cu acest prilej că celulele vegetale pot să crească în medii lichide și că aceste celule pot fi utilizate pentru obținerea de compuși chimici utili. Dar abia 30 de ani mai târziu în 1982 Y. FUJITA și colab. au raportat producerea primului produs natural la scară comercială - shikoninul din culturi celulare de *Lithospermum erythrorhizon*.

În ultimii ani numeroase cercetări au fost dedicate producerii de compuși utili prin culturi de țesuturi vegetale. Ca urmare s-au înregistrat progrese tehnologice remarcabile, astfel că în prezent studiile bazate pe culturi de celule și țesuturi se desfășoară atât la nivel fundamental cât și sub forma cercetărilor aplicative care utilizează culturi la scară largă, industrială, pentru producerea comercială a metaboliților secundari.

Deoarece sinteza lor nu constituie o parte indispensabilă a programului expresiei genice și dezvoltării, aceasta poate fi modelată atât prin modificări ale materialului genetic cât și prin modificări ale mediului sau prin utilizarea unor substanțe cu rol de semnal pentru declanșarea căii biosintetice respective (M. LUCKNER, 1982; K. LINDSAY și M.G.K. JONES, 1989).

Tehnicile "in vitro" își propun stimularea exprimării complete a unor secvențe metabolice care au ca rezultat sinteza unui metabolit dorit, fapt ce oferă importante avantaje economice prin posibilitatea realizării sintezei la scară industrială, în bioreactoare, ca și prin dirijarea selectivă a unor anumite secvențe biosintetice, în funcție de scopul urmărit (B.E. ELLIS, 1982). De regulă speciile vegetale producătoare de compuși secundari cresc numai în anumite zone climatice, iar sinteza acestor metaboliți cu structură complexă pe cale artificială este neeconomică, dificultăți care conduc la fluctuații considerabile ale materiei prime și implicit ale prețului de cost. În plus o serie de reglementări elaborate în multe țări limitează utilizarea produselor sintetice în special ca aditivi alimentari sau medicamente. Intensa concentrare a cercetărilor efectuate în diferite laboratoare din lume în scopul utilizării culturilor de țesuturi și celule vegetale ca surse potențiale de metaboliți utili poate fi explicată prin avantajele importante oferite de acestea, ca de pildă:

- metaboliții utili pot fi obținuți în condiții controlate de mediu, în flux continuu, indiferent de factorii climatici sau de însușirile solului;
- culturile celulare sunt necontaminate cu microbi și insecte;
- celulele oricărei plante, tropicale sau alpine, pot fi ușor multiplicare în scopul producerii metaboliților specifici;
- controlul automat al creșterii celulare și reglarea proceselor metabolice contribuie la reducerea costului forței de muncă și la îmbunătățirea productivității;
- ciclurile biosintetice ale culturilor celulare în bioreactoare sunt mult mai rapide decât cele ale plantei în condiții naturale. De exemplu în cazul sikoninului un ciclu de producție în bioreactoare durează câteva săptămâni, în timp ce numai plantele în vârstă de 5 ani sunt recomandate pentru extracția produsului farmaceutic (A.W. ALFERMANN și M. PETERSEN, 1995);
- prin selecție clonală și mutageneză se pot izola linii celulare care sintetizează metaboliții secundari în cantități chiar mai mari decât cele prezente în organele specializate ale plantei intacte (M. TABATA, 1977);
- culturile celulare în suspensie pot fi utilizate și pentru biotransformarea unor substraturi pentru obținerea unor noi compuși neidentificați în natură sau pentru producerea unor enzime utilizabile în sinteza chimică a compușilor naturali (K. HERBERS și colab., 1995).

O analiză efectuată de specialiștii japonezi privind metodele brevetate, începând cu anul 1975 pentru producerea de compuși utili prin culturi de țesuturi și celulele vegetale, au evidențiat o creștere semnificativă a numărului acestora, în special în domeniul produselor farmaceutice.

În 1977 M. H. ZENK și colab. au publicat o strategie menită să contribuie la obținerea în cantități crescute a compușilor chimici naturali prin culturi de celule vegetale care în esență stabilește parcurgerea următoarelor etape:

1. - testarea și selecția unor plante inițiale caracterizate prin capacitate crescută de acumulare a compusului natural urmărit;
2. - stabilirea culturilor de calus de la plantele donor selectate;

3. - analize chimice pentru stabilirea concentrației produsului natural în culturile de calus;
4. - stabilirea de culturi celulare în suspensie;
5. - analize chimice la nivelul liniilor celulare în suspensie;
6. - selecția de linii celulare înalt producătoare prin clonări unicelulare ca rezultat al variabilității somaclonale sau al unor tratamente mutagene;
7. - obținerea de linii celulare înalt producătoare stabile în bioreactor;
8. - ameliorarea producerii de metaboliți secundari prin optimizarea parametrilor de cultură fizici și chimici.

Cu toate că această strategie a fost adoptată și utilizată de numeroși specialiști, obținerea la scară comercială a unor astfel de compuși prin culturi de celule și țesuturi se limitează la câteva produse.

O dificultate majoră se semnalează de diverși autori constă în instabilitatea liniilor celulare în ce privește acumularea de metaboliți secundari și faptul că parametri optimizați individual în faza de laborator nu acționează sinergic și nu conduc la rezultate reproductibile în bioreactoare cu volum mare (A.W. ALFERMAN și M. PETERSEN, 1995). Utilizarea eficientă a culturilor celulare în scopul producerii de compuși secundari, implică satisfacerea următoarelor condiții:

- rata creșterii celulare și a biosintezei trebuie să fie suficient de ridicată pentru a se obține o cantitate semnificativă de produs final într-o perioadă de timp;
- culturile trebuie să fie stabile genetic pentru a produce cantități ridicate de metaboliți secundari în mod constant;
- metaboliții să se acumuleze în celule fără a fi catabolizați rapid sau, preferabil, să fie eliberați în mediu lichid;
- prețul producției, incluzând costul mediului de cultură, precursorii și extracția chimică, să fie suficient de scăzut pentru a fi profitabil (M. TABATA, 1977).

Pentru rentabilizarea acestor tehnologii în sensul reducerii cheltuielilor de producție, se au în vedere două obiective: creșterea productivității culturilor celulare și creșterea producției pe unitatea de volum a culturilor din bioreactoare. În acest scop se procedează la selecția de linii celulare înalt producătoare de la nivelul micilor agregate celulare sau la clonare unicelulară, corelate cu optimizarea compoziției mediului de cultură pentru a stimula capacitatea maximă a celulei de a produce metabolitul de interes.

O contribuție importantă la depășirea limitelor prezente în acest domeniu este așteptată de la experimentarea unor strategii recente dintre care deosebit de promițătoare par a fi: tehnica de cultură a țesuturilor și organelor diferențiate (ca de exemplu a lăstarilor multipli sau a rădăcinilor transformate cu *Agrobacterium*), biotransformarea precursorilor în compuși de bază și stimularea biosintezei prin utilizarea unor elicitori (Y. FUJITA, 1990).

Deși celulele din culturi posedă întregul potențial biochimic al genomului plantei întregi, adesea noile condiții de mediu determină modificări ale metabolismului, exprimate prin tipul și cantitatea metaboliților sintetizați, până la dispariția totală a unora dintre aceștia sau la formarea unui compus cu totul nou. Trebuie deci precizat că incapacitatea unor culturi de a sintetiza anumite substanțe nu este rezultatul pierderii potențialului biochimic, ci a faptului că acesta nu se poate exprima în anumite condiții, pe parcursul diferențierii biochimice și citochimice (L. MERAVY, 1987). Instabilitatea capacității biosintetice caracteristică culturilor celulare poate fi și consecința unor modificări la nivelul materialului genetic, atât intercromozomale, exprimate prin aneuploidie și poliploidie, cât și restructurări intracromozomale, care au ca rezultat modificări ale tipului de expresie genică (M. J. C. RHODES și colab., 1987). Dar tocmai heterogenitatea caracteristică sistemelor celulare "in vitro" a făcut posibilă selecția unor linii celulare de un deosebit interes practic ca de pildă celule fotoautotrofe (HUESEMANN și BARZ, 1977; YAMADA și SATO, 1978; YASUDA și colab., 1980); celule rezistente la factori

de stress (PALMER și WIDHOLM, 1975; MALIGA și colab., 1976; NABORS și colab., 1980); celule înalt producătoare de vitamine (YAMADA și WATANABE, 1980; NATSUMOTO și colab., 1980; WATANABE și YAMADA, 1982) celule înalt producătoare de pigmenți (KINERSLY și DOUGALL, 1980; YAMAMOTO și colab., 1982); celule producătoare de alcaloizi (ZENK și colab., 1977; OGINO și colab., 1978; YAMADA și HASHIMOTO, 1982).

Menținerea unor linii celulare caracterizate printr-o productivitate ridicată și stabilă de metaboliți secundari poate fi realizată prin modificarea compoziției mediului de cultură, a parametrilor fizici, prin inducerea, identificarea și selecția unor clone derivate de la celule cu capacitate sintetică ridicată. În acest mod s-a reușit de pildă producerea unor cantități ridicate de ajmalicină, folosită ca medicament antihipertensiv, din culturi celulare de *Chatarantus roseus*, ca și cultivarea la scară comercială a celulelor de *Lithospermum erythrorhizon*, pentru producerea pigmentului roșu ca acțiune antiinflamatoare shikonin, obținându-se o creștere a productivității de la 0,4 la 23% substanță uscată.

Tot în acest scop s-a experimentat suplimentarea mediului de cultură ca anumiți precursori (compuși intermediari ai procesului biosintetic), fapt ce are ca rezultat în final producerea metabolitului secundar specific, în situația în care cultura celulară posedă competența bioconversiei intermediarului respectiv și deci reactivarea activității biosintetice.

Pe de altă parte încă din anul 1974 COSTABEL și colab. au sesizat că sinteza și acumularea metaboliților secundari sunt dependente de unele procese biochimice și structurale care se petrec la nivelul țesuturilor cultivate "in vitro". Este bine cunoscut faptul că o serie de compuși secundari se acumulează în anumite țesuturi și organe specializate, cum sunt rădăcini, fructe, lăstari, saci glandulari, canale pentru uleiuri eterice, etc. De exemplu nicotina și alcaloizii înrudiți sunt sintetizați în sistemul radicular al plantelor de tutun, dar sunt transportați și se pot acumula predominant în părțile aeriene ale plantei. Capsaicina este sintetizată și se acumulează într-o anumită fază a dezvoltării fructelor de *Capsicum frutescens*, enzima-cheie fiind activă numai în țesutul placentar. Uleiul eteric al mentei se acumulează în celulele glandulare din frunze, iar cel de mușetel în capitule. La *Datura ferox hiosciamina* este sintetizată în rădăcini de unde este transportată în frunze. Pe traseul parcurs spre situsul de depozitare hiosciamina este apoi oxidată în scopolamină.

Este deci evident că în multe cazuri biosinteza și biotransformarea metaboliților secundari sunt corelate cu diferențierea morfologică și că aceste fenomene sunt înscrise în genomul speciilor.

S-a constatat că și în cazul culturilor de țesuturi și celule de la unele specii, biosinteza metaboliților specifici este în mod obligatoriu corelată cu un anumit nivel al diferențierii celulare și tisulare (H. A. COLLIN și M. WATTS, 1984).

Se cunosc numeroase exemple când celulele aglomerate în agregate sintetizează produsul caracteristic speciei în timp ce suspensiile celulare fine nu realizează sinteza.

În alte sisteme de culturi celulare organizarea multicelulară sub formă de embrioni somatici, lăstari sau rădăcini, favorizează sinteza și acumularea metaboliților secundari, probabil datorită limitelor impuse diviziunilor celulare de condiția multicelulară, în care există gradienti ai nutrienților, oxigenului și presiunii mecanice. Din această categorie fac parte de pildă speciile la care în condiții naturale acumularea metaboliților secundari se realizează în rădăcini, între care și *Rubia tinctorum*.

O tehnică apreciată ca având un potențial superior pentru producerea anumitor metaboliți secundari "in vitro", bazată pe corelația dintre organizarea structurală și acumularea produșilor secundari utilizează sistemul de transformare cu *Agrobacterium rhizogenes*. Răspunsul fenotipic determinat de inserția ADN-T al plasmidei Ri în genomul plantei constă în proliferarea rapidă de rădăcini la situsul de infecție, care pot fi detașate și cultivate pe perioade nelimitate, în scopul producerii metaboliților specifici. Aceste rădăcini păstrează caracteristicile biosintetice ale plantei de origine, la care metaboliții secundari se sintetizează și se acumulează în rădăcini.

În **figura 3** sunt prezentate diferite modalități de obținere a metaboliților secundari, dar ele trebuie să țină cont de:

- aprovizionarea cu plante, în vederea unei eventuale extracții;
- facilitatea sintezei sau a hemisintezei chimice;
- capacitatea microorganismelor de a produce compuși de interes.

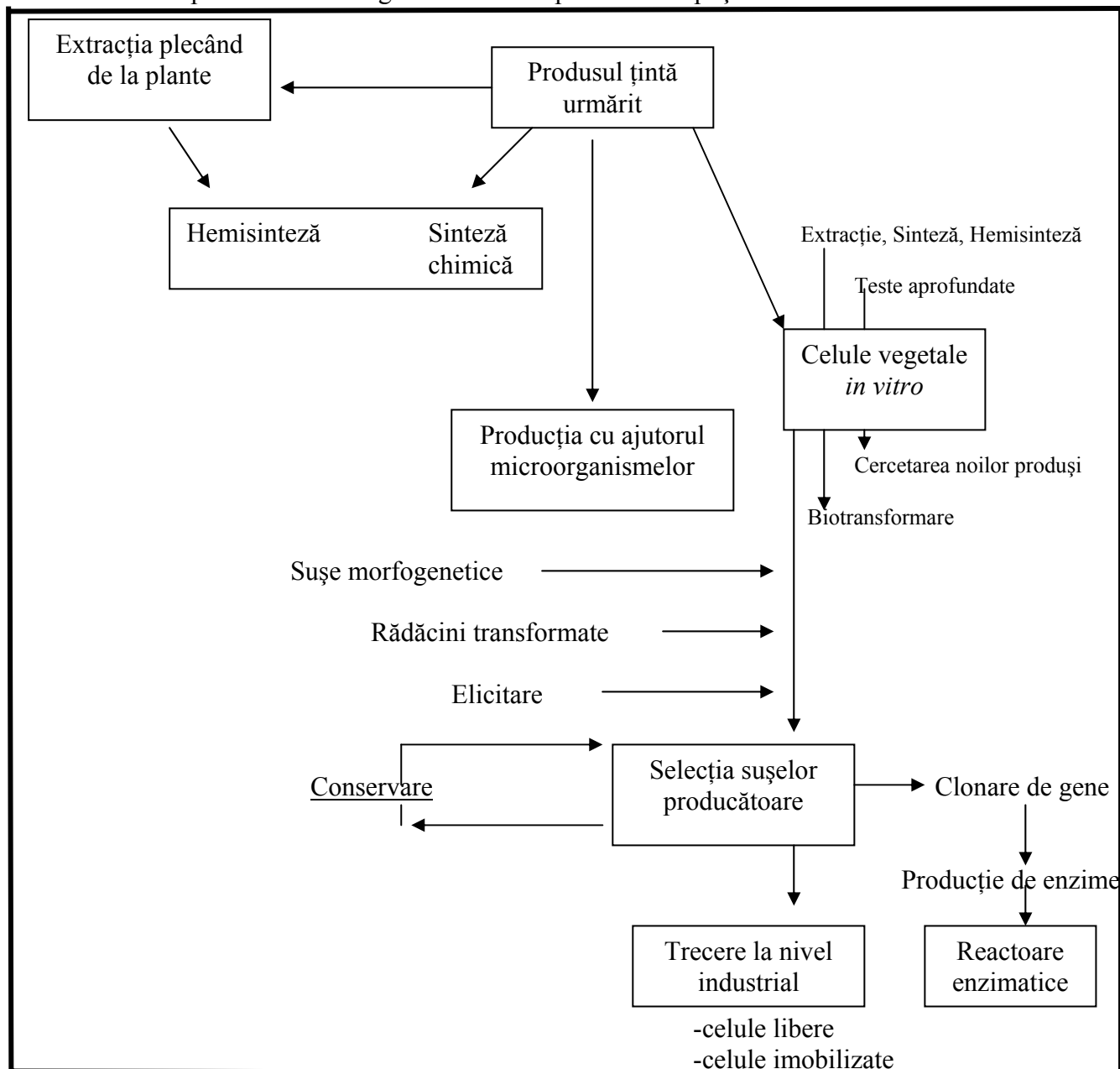


Figura 3. Posibilități de producere a metaboliților secundari (după G. Freyssinet, M. Lebrun, B. Pelissier și T. Hardy, 1993).

Dacă nici una dintre aceste căi nu este posibilă sau dacă ele sunt limitate, se va putea realiza producția substanțelor cercetate de către culturile celulare vegetale *in vitro*, evitându-se concepția conform căreia acest procedeu poate fi lung și riscant. Numeroasele avantaje ale aplicațiilor culturilor celulare vegetale *in vitro* contrazic această concepție:

- Prin valorificarea potențialului de biosinteză sau de biotransformare se pot obține produși noi (domeniul farmaceutic);
- Eticheta „produs natural” permite cucerirea unei părți rentabile de piață, față de produșii de sinteză.

5. Manipularea genomului prin aplicarea tehnologiei ADN recombinat

Perfecționarea tehnicilor moleculare fac posibilă modificarea genomului celulelor vegetale și în scopul dirijării anumitor procese metabolice responsabile de sinteza unor metaboliți secundari de interes. În acest context, manipulările genetice vizează trei aspecte:

- reglarea acțiunii genelor codificatoare pentru enzime-cheie pe parcursul procesului dezvoltării;
- introducerea de gene noi;
- reglarea acțiunii unor gene specifice prin utilizarea tehnologiei ARN antisens.

Este cunoscut faptul că metabolismul secundar este puternic influențat de factori ai mediului, precum lumina, elicitorii sau rănirea mecanică. Totodată s-a demonstrat că mulți metaboliți secundari prezintă specificitate de organ, de țesut sau chiar pentru un anumit tip de celulă, care poate constitui situsul sintezei sau al depozitării compusului respectiv. Identificarea unei gene reglatoare specifice creează posibilitatea activării acesteia pentru a realiza sinteza unui metabolit care nu este produs în condiții normale în populația celulară în cauză.

Fezabilitatea acestei abordări a fost demonstrată în 1995 de către Facchini și de Luca, în urma cercetărilor întreprinse pentru studiul corelației dintre dezvoltarea plantelor de *Papaver*, diferențierea celulară, expresia genelor pentru biosinteza de alcaloizi și acumularea alcaloizilor specifici. S-a demonstrat astfel că expresia diferențiată a genelor TYDC (tirozin/dopa decarboxilază) și acumularea de alcaloizi cu specificitate de organ sugerează o reglare coordonată a genelor care controlează biosinteza alcaloizilor în concordanță cu procesele dezvoltării, fapt ce reliefează posibilitatea reglării metabolismului secundar prin intermediul enzimelor cheie.

Introducerea unor noi gene sau utilizarea unui promotor puternic pentru supra-expresia genelor care controlează producerea unor enzime de tip „sălbatic” reprezintă o altă modalitate de manipulare a metabolismului secundar. Această idee a fost dezvoltată de către Meyer și colaboratorii (1987) pentru a studia biosinteza antocianilor, prin introducerea în celulele de *Petunia hybrida* a unei gene de la porumb, codificatoare pentru DQR (dihidroquercitin-4-reductaza), o enzimă care nu este în mod normal implicată în biosinteza flavonoizilor la *Petunia*.

Această enzimă a utilizat metabolitul endogen dihidrokaempferol într-un proces biosintetic nou care a avut ca rezultat producerea de leucopelargonidin. Acesta a fost la rândul lui convertit în pigmentul roșu pelargonidin, care nu se acumulează în condiții normale în *Petunia*.

Supra-expresia unor activități enzimatică poate conduce la un flux crescut de precursori și în consecință la acumularea în cantități sporite a unor compuși. Această ipoteză a fost verificată de către Napoli și colaboratorii (1990), prin introducerea în *Petunia* a unor extra-copii ale genelor codificatoare pentru CHS (chalcon-sintază) și DFR (dihidroflavonol-4-reductază), sub controlul transcripțional al unui promotor puternic CaMV35S.

În mod surprinzător, au constatat că un număr crescut al copiilor genelor nu a condus la accentuarea pigmentației, ci dimpotrivă la reducerea acesteia, datorită unui nivel redus al transcrierii atât al genelor străine cât și al celor native („chs” și „dfr”).

Studii similare au întreprins și Eikind și colaboratorii (1990), încercând să inducă supra-expresia unei gene PAL de la fasole într-o plantă transgenică de tutun, sperând că în acest fel acestea vor acumula un conținut crescut în lignină. În realitate, s-a constatat însă o reducere a cantității de lignină și de fenoli solubili, și în consecință a devenit evident faptul că sunt necesare mai întâi cercetări aprofundate în domeniul reglărilor metabolice pentru ca această

abordare să poată fi utilizată cu succes pentru a stimula acumularea unor compuși secundari în culturile de celule vegetale.

Prima încercare de a manipula metabolismul secundar prin utilizarea tehnologiei ARN-antisens pentru reglarea activității unor gene specifice aparține lui Krol și colaboratorii (1988) care au experimentat manipularea genetică a culorii la *Petunia hybrida*. În acest caz, pigmentii aparțin grupului flavonoizilor, și un număr de gene codificatoare ale enzimelor implicate în biosinteza flavonoizilor au fost izolate și caracterizate.

În mod special, CHS (chalcon-sintază), prima enzimă a căii fenilpropanoidice care conduce la biosinteza autocianilor, a fost identificată ca o țintă pentru manipulări genetice. Prin transformarea plantelor de *Petunia* cu gene antisens „chs” (menită să blocheze expresia completă a genei) s-a constatat că pigmentația de tip sălbatic a fost perturbată și a rezultat o gamă de transformanți cu diferite niveluri și tipuri de pigmentație, fapt ce demonstrează potențialul important al acestei abordări.

Progresele înregistrate în ultimii ani în domeniul tehnicilor moleculare și ingineriei biochimice dau garanția obținerii unor succese remarcabile în producerea de compuși utili în culturi de celule vegetale, cu atât mai mult cu cât identificarea unor compuși deosebiți de valoroși (cum este de exemplu Taxolul), care pot fi produși la parametrii optimi numai în culturi celulare, a dat un nou impuls reconsiderării importanței culturilor celulare vegetale, ca surse eficiente de compuși de interes practic deosebit.

Concluzii

În secolul următor, caracterizat drept « era biotehnologiilor », strategiile biotehnologice vor determina schimbări ample, prin noi dimensiuni ale eficienței și productivității în numeroase domenii economice.

În cadrul noilor biotehnologii, tehnicile moderne de culturi de celule și țesuturi vegetale oferă potențiale relevante de aplicabilitate în unele domenii biotehnologice competitive, vizând obținerea unor medicamente, produse alimentare, pigmenți naturali alimentari sau industriali, arome alimentare sau cosmetice etc.

Interesul pentru obținerea metaboliților secundari prin metode neconvenționale este stimulat de pronunțata descreștere a resurselor vegetale consacrate, ca urmare a perturbării echilibrului mediului natural, a exploatării nelimitate a acestor resurse, a creșterii costului forței de muncă și dificultăților tehnice și economice în cultivarea plantelor din flora spontană.

Ca impact socio-economic, înmulțirea prin culturi « in vitro » permite adaptarea rapidă la cerințele pieții, aplicarea biotehnologiei respective oferind posibilitatea începerii unei activități profitabile prin obținerea unor venituri substanțiale în urma aclimatizării și certificării materialului săditor propus în condiții aseptice, în timp scurt, pe suprafețe de teren restrânse.

Cercetările întreprinse au adus un plus substanțial de informație științifică privind valorificarea pe căi neconvenționale a potențialului regenerativ al celulei vegetale, ca expresie a totipotenței morfogenetice și biochimice.

Acestea s-au concretizat în tehnologii reproductibile și eficiente de regenerare „in vitro” de la diferite explante somatice atât în scopul microclonării unor genotipuri, cât și în scopul stabilirii de culturi celulare producătoare de metaboliți secundari de interes industrial.

Obținerea unor rezultate pozitive reprezintă primul pas în elaborarea unor metode aplicabile la scară industrială, necesare în industria alimentară, farmaceutică, textilă sau cosmetică.

Bibliografie selectivă

1. Alfermann A. W., Bergmann W., Figur C., Helmbold U., Schwantag D., Schuller I., Reinhard E., 1983. *Bitransformation of O-methyl digitoxin to p-methyl digoxin by cell cultures of Digitalis lanata*. In: Mantell SH, Smith H., eds. *Plant Biotechnology*. Cambridge University Press, p. 67-74.
2. Alfermann A. W., Reinhard E., 1980. *Biotransformation by plant tissue cultures*. Bull. Soc. Chim. Fr., **2**, p. 35-45.
3. Balandrin M. F., Klocke J. A., 1988. *Medicinal, Aromatic, and Industrial Materials from Plants*. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry 4, Medicinal and Aromatic Plants I*, Ed. by Y. P. S. Bajaj, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, p. 191-199.
4. Berlin J., Slag S., Strack D., Bokem M., Harms H., 1986. *Production of betalains by suspension cultures of Chenopodium rubrum L.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture **5**, p. 163-174.
5. Bohlmann J., Eilert U., 1994. *Elicitor induced secondary metabolism in Ruta graveolens L.* Role of chorismate utilising enzymes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **38**, p. 189-198.
6. Boulter M.E., Croy E., Simpson P., Schields R., Croyand R.R.D., Shirsat A.H., 1990. *Transformation of Brassica napus L. (oilseed rape) using Agrobacterium tumefaciens and Agrobacterium rhizogenes – a comparison*. Plant Sci., **70**, p. 91-99.
7. Boyd M. G., 1991. *Studies on carotenoid production in cultures of Bixa orellana*. Ph. D. thesis, University of Edinburgh, UK.
8. Buitelaar R. M., Tramper J., 1992. *Strategies to improve the production of secondary metabolites with plant cell cultures: a literature review*. Journal of Biotechnology **23**, p. 111-141.
9. Constantin Toma, Mihaela Niță, 1995. *Celula vegetală*. Editura Universității „Al. I. Cuza”, Iași, p. 39.
10. Croes A. F., Jacobs J. JMR, Arroo RRJ, Wullems GJ., 1994. *Thiophene biosynthesis in Tagetes roots: molecular versus metabolic regulation*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **38**, p. 159-165.
11. Dekeyser R., Inze D., Van Montagu M., 1990. *Transgenic plants*. In: Gene manipulation in plant improvement II. Ed. P. Gustafson. Plenum Press, New-York, p. 237-250.
12. Dore C., 1990. *Cinquantenaire de la culture „in vitro” chez les végétaux*. Les Colloques de l'INRA, 51. INRA PARIS.
13. Emil Pop, St. Peterfi, N. Sălăgeanu, H. Chirilei, 1960. *Manual de fiziologia plantelor*. Editura de Stat Didactică și Pedagogică, București, vol. II, p. 54.
14. Fleurentin J. R., Pelt J. M., 1990. *Les plantes médicinales*. La Recherche, **21**, p. 811-818.
15. Gavril Neamțu, 1983. *Biochimie ecologică*. Editura Dacia, Cluj-Napoca, p. 13-54.
16. Gavril Neamțu, Câmpeanu Gheorghe, Enache Aurelia, 1989. *Dicționar de Biochimie vegetală*. Editura Ceres, București, p. 46-246.
17. Gavril Neamțu, Ionela Popescu, Șt. Lazăr, I. Burnea, I. Brad, Gh. Câmpeanu, T. Galben, 1983. *Chimie și biochimie vegetală*. Editura Didactică și Pedagogică, București, p. 260-282.
18. Hamill J. D., Parr A. J., Rhodes M. J. C., Robins R. J., Walton N. J., 1987. *New routes to plant secondary products*. Bio/Technology, **5**, p. 800-804.
19. Meyer P., Heidmann I., Forkmann G., Saedler H., 1987. *A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene*. Nature, **330**, p. 677-678.
20. Richard A. Dixon, Christopher J. Lamb, 1990. *Regulation of secondary metabolism at the biochemical and genetic levels*. In *Secondary Products from Plant Tissue Culture*, Ed. by Barry V. Charlwood and M. J. C. Rhodes.

21. Schmauder H. P., Doerel P., 1990. *Plant cell cultivation as a biotechnological method*. Acta Biotechnol., **6**, p. 501-516.
22. Wink M., 1986. *Production of plant secondary metabolites by plant cell culture in relation to the site and mechanism of their accumulation*. In: Plant vacuoles: their importance in solute compartmentation in cells and their applications in plant biotechnology. Ed. Marin B. Plenum Press, NATO ASI serie, vol. 134, p. 477-484.
23. Wink M., 1988. *Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores*. Theor. Appl. Genet., **75**, p. 225-233.
24. Yeoman M. M., Yeoman C. L., 1996. *Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells*. In Phytol., **134**, p. 553-569.
25. Zryd J. P., 1988. *Cultures „in vitro” et production de métabolites secondaires*. Dans: Cultures de cellules, tissus et organes végétaux. Ed. Zryd J. P., Presses Polytechniques Romandes, p. 227-234.