

## **CONSIDERATIONS REGARDING THE ANTHOCYANINS IN PLANT AND HUMAN LIFE**

**Alexandra-Loredana ALMĂȘAN\***, **Marinela-Mădălina STROE**,  
**Nicoleta IANOVICI**

West University of Timisoara, Faculty of Chemistry, Biology, Geography, Department  
of Biology-Chemistry, Pestalozzi 16, Timișoara

\*Corresponding author e-mail: alexandra.almasan98@e-uvv.ro

Received 31 May 2021; accepted 5 July 2021

### **ABSTRACT**

*Anthocyanins are a group of polyphenolic pigments that are ubiquitously found in the plant kingdom. These compounds have attracted attention in recent years due to their beneficial effects. The main sources of anthocyanins include red and purple fruits & vegetables or foods containing high levels of natural colorants. In this article, we describe their chemical properties, biosynthesis & their important applications. They protect plants from abiotic & biotic stresses, having a decisive role in defense against herbivores. In terms of human health, pigments help prevent and alleviate serious diseases & in industry anthocyanins are used as natural dyes.*

**KEYWORDS:** anthocyanins, flavonoids, pigments, plant defence, polyphenols, human health, food industry, natural dyes

- 1. Surse naturale, structura chimică și biosinteza antocianinelor**
- 2. Extracția, izolarea și identificarea antocianinelor**
- 3. Antocianine ca antioxidanți**
- 4. Protecția împotriva stresului abiotic**
- 5. Protecția împotriva erbivorelor**
- 6. Antocianinele în frunzele roșii**
- 7. Beneficiile antocianinelor pentru sănătatea umană**
- 8. Utilizarea antocianinelor în industria alimentară**

Flavonoidele sunt un grup mare de compuși fenolici vegetali, incluzând aproape 10000 de compuși diferiți cu o structură chimică comună formată din două inele aromatice, unite printr-un lanț cu trei atomi de carbon formând în general un inel heterociclic (C6 – C3 – C6) (Vicente & Boscaiu, 2018). Acești metaboliți secundari sunt sintetizați de plante și au diverse activități biologice. Datorită proprietăților lor fizice și biochimice, acestea sunt capabile să participe la interacțiunile plantelor cu alte organisme (microorganisme, animale și alte plante) și la reacțiile lor la stresul din mediu (Mierziak et al., 2014; Alexan & Ianovici, 2018; Ciobanu & Ianovici, 2018).

Flavonoidele sunt antioxidanți solubili în apă și elimină radicalii liberi, prevenind deteriorarea celulelor oxidative, având o activitate puternică

împotriva cancerului și protejează împotriva tuturor stadiilor cancerigene. Aceste flavonoide din plante, au atras atenția cercetătorilor în ultimii ani, pentru că acționează ca agenți chimioprotectori (Venkatalakshmi et al., 2016). Antocianinele sunt o clasă importantă de flavonoide care reprezintă un grup mare de metaboliți secundari ai plantelor.

### **1. Surse naturale, structura chimică și biosinteza antocianinelor**

Antocianinele sunt compuși polifenolici glicozilați cu o gamă de culori care variază de la portocaliu, roșu și violet la albastru în flori, semințe, fructe și țesuturi vegetative. În general, antocianinele sunt pigmenți non-fotosintetici sintetizați în citoplasmă și depozitați în vacuolele celulelor epidermice (Andersen și Jordheim, 2006; Chemler, 2009; Grudnicki & Ianovici, 2014; Chanoca, 2015; Passeri, 2016). Deoarece antocianinele sunt pigmenți solubili în apă, nuanța lor este influențată de mediul intravacuolar. Culoarea și stabilitatea acestor pigmenți sunt influențate de pH, lumină, temperatură și structură. În stare acidă, antocianinele apar ca roșii, dar devin albastre atunci când pH-ul crește. Peste 600 de antocianine au fost identificate în natură. Sunt omniprezente la plantele superioare (apar la mai mult de 30 de familii), în mod normal sunt absente la alge și la alte plante inferioare, chiar dacă au fost identificate la unii mușchi și ferigi (Delgado-Vargas, 2000). La plante, cele mai frecvente sunt derivații a șase antocianidine răspândite, și anume pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina și malvidina (Deroles, 2009; Bueno, 2012; Usenik, 2009; Fang, 2015; Nassour et al, 2020).

- Pelargonidina apare într-o culoare somonică portocalie unică. Poate fi găsită în diferite plante, cum ar fi fructele de la căpșun, afin, bananier, ridiche roșie și cartof.
- Cianidina apare de obicei în culorile magenta și purpuriu. Principalele surse sunt fructele de măr, mur, zmeur negru, soc, dud, afin, agriș, piersic, păr, smochin, cireș, ceapă roșie, varză roșie, portocal, prun, vița de vie, cartof roșu, cartof, căpșun și morcov violet.
- Peonidina are o culoare magenta. Poate fi găsită în multe fructe, cum ar fi mango, struguri, cartofi, cartofi dulci și prune.
- Delfinidina se găsește în mod normal în diferite culori (violet, mov și albastru). Nuanța albastră a florilor se datorează acestui pigment. Principalele surse pentru aceasta sunt fructele pasiunii, vinete, fasole verde, rodie, afine și struguri.
- Petunidina are o culoare violet și se găsește în afine și struguri.
- Malvidina are o culoare violet. Este responsabilă în primul rând de culoarea afinelor și a bachelor de struguri roșii.

Antocianinele vegetale au fost studiate pe scară largă pentru valorile lor medicinale. Antocianinele au efecte antidiabetice, anticancerigene, antiinflamatorii, antimicrobiene și anti-obezitate, putând contribui la prevenirea bolilor cardiovasculare. Prin urmare, antocianinele extrase din plante comestibile sunt potențiali ingrediente farmaceutice. Studiile pe culturi celulare, modele animale și studiile clinice la om, arată că antocianidinele și antocianinele posedă activități antioxidante și antimicrobiene, îmbunătățesc sănătatea vizuală și neurologică și protejează împotriva diferitelor boli netransmisibile. Aceste studii ilustrează efectele asupra sănătății care se datorează puternicelor proprietăți antioxidante. Diferite mecanisme și căi sunt implicate în efectele de protecție, inclusiv calea de eliminare a radicalilor liberi, calea ciclooxygenazei, calea protein-kinazei activată de mitogeni și semnalizarea citokinelor inflamatorii (Khoo et al, 2017).

Antocianinele din petalele florilor atrag insecte și păsări, astfel încât ajută la polenizarea încrucișată. În mod similar, antocianinele din coajele colorate ale fructelor atrag animale erbivore care le pot mânca și dispersa semințele (Hirsch și Martins, 2015).

Conținutul de antocianină depinde de echilibrul dintre biosinteză și degradare. Biosinteza antocianinei a fost studiată pe larg, în timp ce cunoștințele privind degradarea acestui pigment sunt limitate. Factorii genetici, de dezvoltare și de mediu reglează toți metabolismul antocianinei (Liu et al., 2018).

Antocianinele reprezintă grupul cel mai mare de pigmenți vacuolari din regnul plantelor și dau colorațiile roșu, violet, portocaliu, roz și albastru. Exemple de plante care conțin pigmenți antocianici sunt următoarele: fructele (struguri, căpșuni, mure, cireșe, coacăze), legumele (roșii, porumb roșu, ceapă roșie, varză roșie, cartofi roșii, cartofi dulci mov, vinete, fenicul) precum și lalelele, trandafirii, etc (Sigurdson et al., 2017). Conținutul lor în plante variază semnificativ între diferite specii, în funcție de soi sau varietate, zona de creștere, clima, metodele de cultivare, timpul de recoltare, coacerea, variabilitatea sezonieră, prelucrarea și depozitarea, temperatura și expunerea la lumină (Mattioli et al., 2020). Concentrația de antocianine în fructe este mult mai mare decât în legume.

Din punct de vedere chimic, antocianinele posedă în primul rând o componentă principală anagliconică, la care monozaharidele sunt atașate în diferite poziții, rezultând o mare varietate de flavonoide și culori (de la galben pal până la albastru) observate în natură. Formele de aglicon ale antocianinelor sunt numite antocianidine (figura 1). Cu alte cuvinte, antocianidinele reprezintă omologii fără zahăr ai antocianinelor. Au fost descrise aproximativ 20 dintre ele, dar doar 6 sunt întâlnite în fructe și legume,

pe baza diferiților înlocuitori de hidroxil / metoxi. Antocianidina este de obicei un ion flaviliu (2-fenilbenzopiril). Cele 6 clase majore de antocianidine sunt cianidina, pelargonidina, delphinina și derivații lor metilați malvidina, peonidina și petunidina. Ele sunt prezente într-un procent de 50% la frunze, 69% la fructe și 80% la frunzele pigmentate. Aceste antocianidine diferă la grupările hidroxil / metoxi prezente în poziția 3 și 5. Cu cât numărul grupelor hidroxil este mai mare, cu atât culoarea este mai albastră. Mai mult, adăugarea la grupului metoxi, culoarea devine mai roșie. La aceste antocianidine sunt atașate la diverse zaharuri precum glucoza, galactoza, ramoza, rezultând antocianine (Ghosh & Konishi, 2007; Biswas & Mathur, 2017).

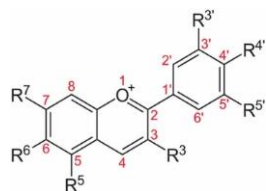


FIG. 1. Structura de bază a antocianidelor (după Zhao, 2018)

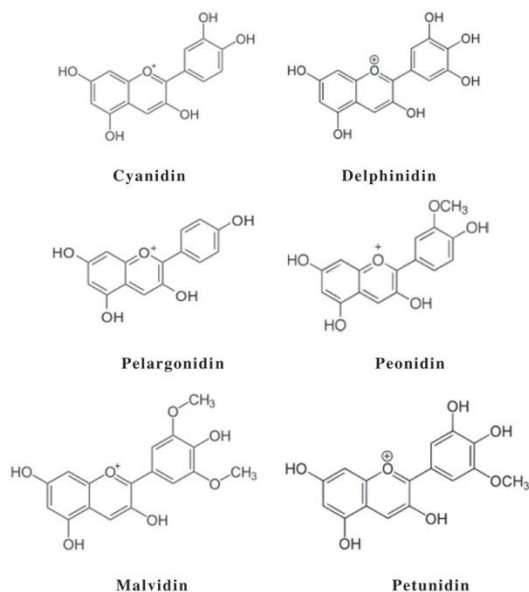


FIG. 2. Antocianidine majore din plante (din Khoo et al, 2017).

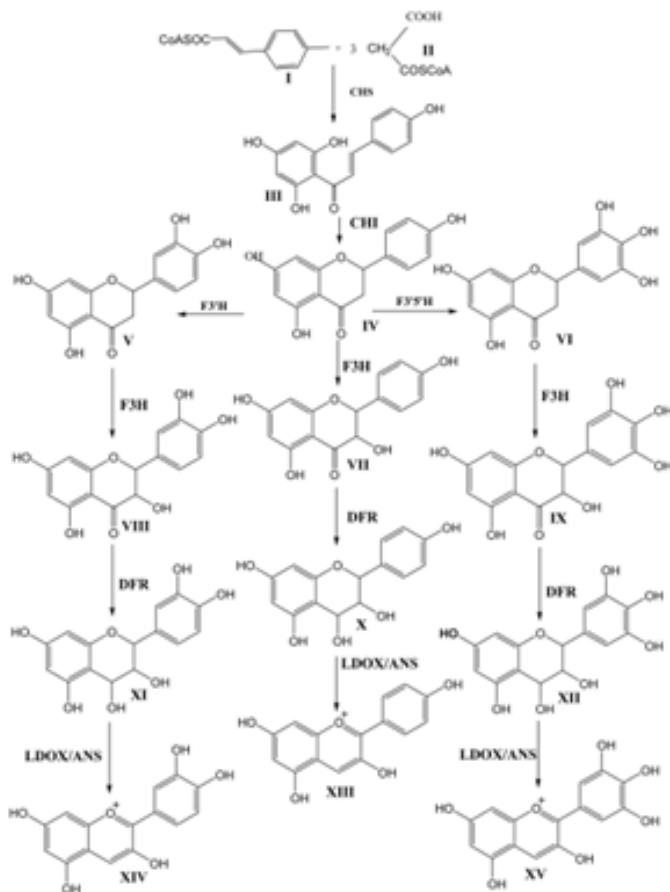


FIG. 3. Reprezentarea schematică a biosintezei antocianinei (după Alappat & Alappat, 2020)

Calea biosintetică a antocianinei (figura 3) bine caracterizată este o rețea foarte conservată la multe specii de plante. Aceasta este o extensie a căii flavonoide generale (Liu et al., 2018; Alappat & Alappat, 2020).

## 2. **Extracția, izolarea și identificarea antocianinelor**

Antocianinele sunt de natură polară (Alappat & Alappat, 2020). Există diferite strategii pentru extracția antocianinelor și antocianidinelor din matricile biologice pe baza complexității lor și a căutării selective a moleculelor specifice cu caracteristici chimice particulare. De exemplu, extracția antocianidinelor totale se realizează în general prin utilizarea amestecurilor apoase / organice cu o contribuție semnificativă a părții organice. În schimb, antocianinele sunt deseori extrase cu mai mulți solvenți hidrofilii sau cu amestecuri pe bază

apoasă mai proeminente. În toate aceste cazuri, este foarte util să se mențină starea de ionizare a compușilor sub formă de flaviliu, iar acest obiectiv poate fi atins prin adăugarea de acizi anorganici sau organici în faza apoasă (Mattioli et al., 2020). Utilizarea de solvenți polari precum metanolul și etanolul face extracția antocianinelor eficientă. Cu toate acestea, pentru aplicații de calitate alimentară, etanolul este preferat față de metanol. Adesea, la solventul de extracție se adaugă acizi organici (acizi acetici, citrici sau tartrici) sau minerali (acid clorhidric sau acid fosforic) pentru a stabiliza cationul (Alappat & Alappat, 2020; Gavrilă și colab, 2020).

După extracție, în funcție de matrice (fructe, frunze sau probe lichide), primul pas pentru procedurile de purificare este să se facă distincția între extractele bogate în pigmenți verzi și roșii. Primul caz indică clorofila care trebuie purificată preliminar, iar al doilea indică o matrice mai bogată în antocianină (fructe, flori sau probe biologice lichide). După eliminarea clorofilei, purificarea se efectuează în general prin diferite etape cromatografice care implică faze staționare diferențiale pe baza scopurilor. Pentru extractele apoase, o abordare utilă este absorbția antocianinelor pe rășinile de extracție în fază solidă, pentru a elimina subprodusele polare nereținute. Alte etape cromatografice implică, în general, faze staționare cu gel de silica în fază normală, fază inversă și cromatografie cu schimb de cationi (Mattioli et al., 2020). Metodele spectrofotometrice în ultraviolet-vizibil (UV / Vis) și metodele bazate pe cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) care utilizează standarde antocianice sunt metodele alese pentru identificarea și cuantificarea antocianinei (Alappat & Alappat, 2020). Majoritatea antocianinelor se caracterizează printr-o absorbție maximă în regiunea de ~ 520-560 nm (Merken & Beecher, 2000).

Extracția pigmentului prin metode chimice umede în solvenți organici, cuantificarea HPLC sau spectrofotometrică ulterioară sunt cele mai frecvent utilizate (Abdel - Aal & Hucl, 1999). Deși aceste metode biochimice sunt extrem de precise (Lee și colab, 2008), ele sunt, de asemenea, consumatoare de timp și costisitoare. De asemenea, consumă țesuturile măsurate, limitând investigarea altor aspecte. Unele alternative remarcabile la metodele biochimice se bazează pe reflectanța spectrală UV-Vis (Gamon și Surfus, 1999; Gitelson și colab, 2009). Analiza distribuției lungimii de undă reflectate prin spectrofotometre digitale portabile în urma utilizării indicilor adecvați pentru pigmentul specific, a devenit o metodologie utilizată pe scară largă pentru a estima concentrația relativă de pigment în frunze și fructe și chiar în petale (Merzlyak și colab, 2003; Sims și Gamon, 2002). Datorită portabilității crescânde a spectrofotometrelor și a dimensiunii mici a suprafeței măsurabile a plantei, această metodă poate fi considerată neinvazivă (Richardson și

colab., 2002). Cu toate acestea, luând reflectanța spectrală a părților delicate ale plantei, cum ar fi petalele sau frunzele mici, țesutul trebuie de obicei îndepărtat din plantă sau cel puțin este deteriorat (Bergman & Beehner, 2008).

Pe de altă parte, fotografia digitală este o alternativă rapidă, neinvazivă, care a devenit metoda de alegere pentru măsurarea culorii atât la animale, cât și la plante (Garcia și colab, 2014; Kendal și colab., 2013; Mizunuma și colab., 2014; Ianovici și colab, 2015). Cu setări relativ simple ale camerei, câteva precauții înainte de a face fotografia și procesarea ușoară a imaginii (Stevens și colab, 2007; Troscianko și Stevens, 2015; White și colab., 2015), imagistica digitală este o metodă eficientă și fiabilă pentru a cuantifica culoarea, chiar și pe teren (Macfarlane & Ogden, 2012; Stevens și colab., 2014). Recent, au existat mai multe aplicații interesante ale fotografiei digitale pentru a studia colorarea plantelor și animalelor, cum ar fi evaluarea schimbării culorii, a modelelor de pigmenți și a camuflajului (Akkaynak și colab., 2014; Gómez & Liñán - Cembrano, 2016; Strauss & Cacho, 2013; Taylor și colab, 2013). În ciuda acestor avantaje, utilizarea imaginilor digitale pentru a cuantifica fidel variația culorilor la plante este încă la început. Aplicarea imaginilor digitale la estimarea concentrației pigmentare a fost studiată doar pe câteva specii vegetale care suferă modificări dramatice, sezoniere, în compoziția pigmentului (Junker & Ensminger, 2016; del Valle și colab., 2018).

### 3. **Antocianine ca antioxidanți**

Antocianinele protejează plantele împotriva diferitelor stresuri biotice și abiotice, parțial datorită proprietăților lor puternice antioxidante (Liu et al., 2018). Celulele vii produc subproduse în timpul metabolismului sub formă de specii reactive de oxigen (ROS) și radicali liberi, în condiții normale și de stres. ROS sunt un grup de molecule reactive derivate din oxigen molecular, cum ar fi superoxidul ( $O_2^-$ ), oxigen ( $^1O_2$ ), peroxid de hidrogen ( $H_2O_2$ ) și radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ). Ele pot induce leziuni celulare atunci când sunt produse excesiv (Martin și colab, 2017). Antocianinele și antocianidinele au o proprietate antioxidantă mai mare comparativ cu alte flavonoide, datorită structurii lor chimice speciale. Capacitatea antioxidantă a acestor compuși poate fi atribuită ionilor metalici chelați implicați în producția de radicali liberi, reducând astfel peroxidarea indusă de metal (Dai, 2012). În plus, sarcina lor pozitivă, numărul și poziția grupărilor hidroxil și metoxil, prezența substituenților donatori de electroni și retragerea electronilor au făcut din antociani donatori de hidrogen foarte eficienți pentru ROS și radicalii liberi, detoxificându-i astfel și prevenind formarea ulterioară de radicali. Acest efect protejează biomoleculele importante (proteine, lipide și ADN) de daunele oxidative care duc la îmbătrânire și la diverse boli (Pojer, 2013; Batalu & Ianovici, 2018). Activitatea antioxidantă a antocianinelor crește odată cu numărul de grupări hidroxil din

inelul B (Liu et al, 2018). Pe de altă parte, glicozilarea antocianinelor scade activitatea “scavenger” în comparație cu agliconii lor, deoarece reduce la minimum capacitățile de donare ale hidrogenului și de chelare a metalelor (Wang și Stoner 2008). Mai mult, diferite zaharuri atașate influențează în mod diferit activitatea antioxidantă (Sadilova, 2006; Liu, 2018).

Antocianinele pot elimina radicalii liberi prin două căi ipotetice. Prima cale este atacul grupelor OH ale inelului B, iar al doilea este atacul ionului oxonium asupra inelului C. Unii dintre ei sunt considerați printre cei mai puternici antioxidanți prin adoptarea ambelor căi (Gaulejac, 1999; Khoo, 2017). Majoritatea antocianidinelor și antocianinelor distribuite pe scară largă prezintă mai multă activitate de eliminare decât cea a antioxidanților puternici. De exemplu, cianidina are o capacitate antioxidantă de până la 4,4 ori mai mare decât a acidului ascorbic și a analogului vitaminei E (Gould, 2002).

#### **4. Protecția împotriva stresului abiotic**

Există dovezi că antocianinele au un rol de jucat în supraviețuirea fiziologică a plantelor sub acțiunea diferitelor stresuri abiotice, în special atunci când sunt situate la suprafața superioară a frunzei sau în celulele epidermice (Andersen și Jordheim, 2006; Manetas, 2006; Ianovici et al, 2011; Passeri, 2016). Acești pigmenți sunt asociați cu o rezistență sporită la efectele de răcire și îngheț, la contaminarea cu metale grele, la desicare și la rănire (Gould, 2004).

Temperaturile scăzute reduc fluiditatea membranei, activitățile enzimelor (inclusiv cea mai importantă din fotosinteză; RubisCO) și conductanța stomatală. În consecință, rata fotosintetică scade, ceea ce induce generarea ROS. Ca substanțe toxice, ROS atacă biomoleculele celulare, distrug bio-membranele și accelerează deteriorarea celulelor (Schulz, 2016; Zhang, 2019). Temperatura scăzută stimulează biosinteza antocianinei prin reglarea în sus a expresiei genelor biosintetice ale antocianinei care, la rândul său, măresc acumularea de antociani (Ahmed, 2015; Schulz, 2015; He, 2020). Scopul principal al acestei acumulări este creșterea capacității antioxidante și reducerea stresului oxidativ (Ubi, 2006).

Conținutul de antocianine crește sub stres de sare la multe plante (Eryilmaz, 2006; Chakovari, 2015; Kovicich, 2015; Kielkowska, 2019). Această creștere ajută plantele să mențină turgescența și absorbția apei, care este esențială pentru osmoprotecție (Close și Beadle, 2003; Iseri, 2015). În plus, prezența grupărilor fenil în acești compuși induce toleranța la sare prin legarea cu ioni toxici, protejând astfel celulele de deteriorarea oxidativă (Chunthaburee, 2016).

Antocianinele pot atenua stresul apei (secetă) la diferite plante (Sperdouli și Moustakas, 2012; Nakabayashi, 2014; Shoeva, 2017). Acești



compuși ar putea juca un rol dublu sub stresul secetei ca osmoregulatori și antioxidanți, care permit frunzelor să tolereze nivelurile de apă suboptimale (Chalker-Scott, 2002; Kebbas, 2018).

Concentrațiile de antocianine foliare cresc în multe plante în condiții de lumină excesivă, acționând ca fotoprotectori (Zhang, 2010; Kovinich, 2015; Trojak și Skowron, 2017; Zhu, 2018). În general, captarea energiei luminoase este mult mai rapidă decât transportul electronilor în membranele tilacoidale; prin urmare, excitarea excesivă a aparatului fotosintetic este o amenințare constantă (Steyn, 2002).

Antocianinele foliare au fost incluse cu alți flavonoizi în protecția solară împotriva radiațiilor UV-B potențial dăunătoare. În concordanță cu această ipoteză, antocianinele, în special atunci când sunt acilate, absorb puternic în regiunea UV, sunt induse sau reglate ascendent în țesuturile plantelor ca răspuns la iradiere și atenuează deteriorarea ADN-ului în culturile de celule iradiate cu UV-B. Mai mult, anumiți mutanți de *Arabidopsis* cu deficit de antocianină sunt hipersensibili la UV-B, iar soiurile *Coleus* cu frunze roșii păstrează eficiențe fotosintetice mai mari după iradiere UV decât soiurile cu frunze verzi.

UV-B provoacă producerea ROS în celulele vii, ceea ce este foarte toxic deoarece reacționează cu biomolecule vitale, modificându-și activitățile biologice și provocând daune oxidative. Antocianinele, ca și alte flavonoide, sunt bine cunoscute pentru proprietățile lor de eliminare a ROS (Mahdavian, 2008). Mai mult, deoarece antocianinele se acumulează în țesuturile epidermice ale plantelor, ele pot contribui parțial la prevenirea pătrunderii UV-B în mezofilul fotosintetic (Landi, 2015). Numeroase studii au indicat creșterea antocianinelor sub stres UV-B (Close și Beadle, 2003; Tsurunaga, 2013). UV-B induce o scădere a activității antocianidin reductazei (ANR), care mută fluxul metabolic către biosinteza antocianinei (Li, 2020). Glicozidele antocianice obișnuite au absorbție neglijabilă în regiunea UV, dar după acilarea cu acizi fenolici, acestea capătă capacitatea de a absorbi părți ale spectrelor UV (UV-A: 315-400 nm și UV-B: 280-315 nm) la lumina vizibilă. Cu toate acestea, filtrarea UV nu este probabil rolul principal al antocianinelor, deoarece antocianinele acilate nu sunt la fel de comune ca formele neacilate în țesuturile plantelor (Hatier și Gould, 2009).

##### 5. **Protecția împotriva erbivorelor**

Flavonoidele joacă un rol important în protecția plantelor împotriva insectelor și erbivorelor. Prezența lor poate modifica gustul plantelor și le poate reduce valoarea nutritivă, poate reduce digestibilitatea sau compușii pot acționa ca toxine (Mierziak et al., 2014). Mamiferele și păsările sunt, fără îndoială, cele mai dăunătoare plantelor. În mediul lor natural, plantele riscă să

fie atacate de multe specii diferite de erbivore și agenți patogeni (Ianovici, 2011; Ciobanu & Ianovici, 2018).

Într-o colecție de păduri germane, s-au identificat numeroase specii de erbivore: ciocănituri, insecte consumatoare de frunze, gândaci de lemn, consumatoare de răsaduri, consumatoare de muguri, excavatoare. Daunele pe care le provoacă aceste erbivore plantelor sunt următoarele: se hrănesc cu coronament, parazitează zaharurile și azotul care curge prin nervurile frunzelor, mănâncă țesuturile laminare care înconjoară nervurile, fac ca plantele să dezvolte gale în care animalele trăiesc și se hrănesc (Lev-Yadun & Gould, 2008; Ianovici et al, 2010; Ianovici et al, 2012). Plantele folosesc diferite strategii pentru a se apăra împotriva diferitelor obstacole, cum sunt de exemplu, erbivorele.

Una dintre strategiile folosite este culoarea aposematică care sugerează faptul că dacă o plantă este viu colorată, de exemplu în roșu, este otrăvitoare sau dăunătoare, astfel plantele reușesc să se apere de erbivore (Ruxton et al., 2004). Mulți autori au observat o asociere între colorarea vizibilă și toxicitatea la plante. Un astfel de exemplu a fost prezentat la planetele otrăvitoare. Un exemplu de plantă otrăvitoare care este viu colorată este specia *Atropa belladonna*, având bacele violet-negre, iar culoarea aprinsă avertizează mamiferele care pășunează asupra pericolului de a le consuma (Lev-Yadun & Gould, 2008).

O altă metodă de apărare a plantelor împotriva erbivorelor este evidențiată și la plantele spinoase, deoarece acestea au 3 tipuri de organe specializate pentru apărare împotriva prădătorilor. Aceste organe specifice sunt: spinii (reprezintă frunzele modificate), ghimpii (ramurile modificate) și țepii (care cuprind țesuturi corticale, de exemplu la trandafiri) (Rebollo et al., 2002; Ianovici, 2010).

Mimetismul defensiv reprezintă o altă metodă de apărare a plantelor împotriva erbivorelor și semnifică faptul că se aseamănă cu o specie care este dăunătoare sau neplăcută. Wiens (1978) a estimat faptul că aproximativ 5% din plantele terestre sunt mimetice. Au fost propuse mai multe tipuri de mimică defensivă legată de antocianină (Lev-Yadun & Gould, 2008). Mimetismul frunzelor moarte constă în faptul că frunzele tinere ale subarboretului imită frunzele senescente sau moarte. Stone (1979) a observat că amestecul dintre clorofile și antocianine în frunzele în curs de dezvoltare a produs o culoare maro a frunzelor ce imita uscarea lor. Camuflajul reprezintă o altă metodă de apărare a plantelor împotriva erbivorelor și a fost luat în considerare atât pentru plante și semințe întregi, cât și pentru varietatea ierburilor subarboretului (Lev-Yadun & Gould, 2008).

## 6. **Antocianinele în frunzele roșii**

La multe specii lemnoase, frunzele tinere de primăvară și / sau frunzele senescente de toamnă sau iarnă sunt roșii de la început, sau devin roșii. Culoarea roșie a frunzelor poate rezulta fie din sinteza întârziată a clorofilei, dezvoltarea întârziată a cloroplastelor, fie din sinteza activă a antocianinelor în anumite etape. Multe studii recente sugerează că această roșeață comună reprezintă un tip de adaptare împotriva factorilor abiotici sau biotici (Maskato et al., 2014; Gould et al., 2018; Renner & Zohner, 2019) mai degrabă decât un produs secundar metabolic neadaptativ. După cum a fost revizuit de Archetti (2009), există cel puțin 16 ipoteze diferite care au fost propuse pentru a putea explica semnificația adaptativă a frunzelor roșii de toamnă, sugerând că nuanța frunzelor roșii ar putea juca o funcție fotoprotectoare (Renner & Zohner, 2019) sau este implicată în apărarea antiherbivore (Pena-Novas & Archetti, 2020).

Cu toate acestea, niciuna dintre ipotezele actuale pentru explicarea semnificației adaptative a colorației roșii a frunzelor de toamnă nu a fost acceptată fără controverse. „Ipoteza coevoluției” a primit mai mult sprijin (Pena-Novas & Archetti, 2020). Această ipoteză consideră că nuanța strălucitoare a frunzelor de toamnă servește ca un semnal de avertizare pentru insecte (de exemplu afide) care indică că frunzele conțin niveluri ridicate de substanțe chimice de apărare sau sunt mai slabe din punct de vedere nutrițional și, astfel, ar reduce erbivorele. Cu toate acestea, dovezile în favoarea acestei ipoteze provin în mare parte din studii pe afide, în timp ce coleopterele și lepidopterele sunt cele mai frecvente tipuri de erbivore atât în zonele tropicale, cât și în zonele temperate. Rămâne neclar dacă această ipoteză se aplică și cazurilor în care plantele interacționează cu acele insecte. Mai mult, sensibilitatea vizuală la insecte este mult diferită în comparație cu cea a oamenilor. Frunzele verzi sau roșii ar putea fi interpretate diferit de către insecte. Insectele cu nișe ecologice complet diferite posedă seturi foarte asemănătoare de receptori UV, pentru culoarea albastră și verde fără receptor pentru roșu, ceea ce indică faptul că nu pot detecta frunzele roșii (Chen et al., 2021).

Conform ipotezei fotoprotecției, carotenoidele galbene și antocianinele roșii funcționează în fotoprotecție, ceea ce este benefic deoarece ajută la extinderea perioadei de resorbție a nutrienților, în special azot și fosfor. Resorbția din frunzele senescente necesită sintetizarea a numeroase enzime și elemente reglatoare implicate în degradarea și remobilizarea nutrienților frunzelor. Reflectând acest lucru, respirația frunzelor continuă neschimbată sau cu o rată crescută în timpul senescenței, deoarece pe măsură ce cloroplastele se deteriorează, celelalte organite dobândesc funcții noi, în

special mitocondriile (Renner & Zohner, 2019). Atât frunzele tinere, cât și frunzele senescente sunt expuse riscului de deteriorare al fotooxidării, deoarece aparatele lor fotosintetice sunt incomplete și nu pot face față radiațiilor (Juvany et al., 2013). La frunzele tinere în creștere, leziunile pot apărea din cauza generării intense de specii reactive de oxigen (ROS) datorită activității scăzute a ascorbat peroxidazei. La frunzele senescente apare deoarece primul pas în senescență este o creștere rapidă a ROS după degradarea clororofilei, ceea ce duce la oxidarea pigmentilor, proteinelor și lipidelor (Boboescu & Ianovici, 2018; Renner & Zohner, 2019). Antocianinele ar proteja clorofila degradată de nivelurile de lumină dăunătoare, restrângând astfel formarea de oxigen reactiv care ar putea pune în pericol procesul de resorbție (Gould, 2004).

#### 7. **Beneficiile antocianinelor pentru sănătatea umană**

În ultima perioadă, flavonoidele care se găsesc în plante au atras foarte mult atenția cercetătorilor, fiind un potențial supliment alimentar important pentru pacienții care suferă de cancer, deoarece ele acționează ca agenți protectori (Elangovan et al., 1994).

**Tabel 1. Prevenirea bolilor cronice și alte beneficii pentru sănătate prin folosirea antocianinelor vegetale**

<p><b>Boli cardiovasculare</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Proprietăți de vasorelaxare ale arterelor coronare de la femelele mature de porci [Bell &amp; Gochenaur, 2006]</li><li>• Scăderea susceptibilității la leziuni de ischemie și dimensiunea infarctului cu creșterea enzimelor antioxidante miocardice [Toufektsian et al, 2008]</li><li>• Îmbunătățirea profilului lipidic și a funcției trombocitelor la voluntarii sănătoși [Alvarez-Suarez et al, 2014]</li><li>• Agregarea plachetară inhibată (proprietăți antitrombotice in vitro) [Rechner &amp; Kroner, 2005.]</li></ul>
<p><b>Efecte anticancerigene</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Supresia proliferării celulelor, inflamației, angiogeneza și apoptoza indusă în țesutul esofagian al șobolanilor [Wang et al, 2009]</li><li>• Potențial antiinvaziv semnificativ demonstrat în liniile celulare de cancer de sân (MDA-MB-231 și MCF7) [Faria et al, 2010]</li><li>• Efect anticancerigen demonstrat asupra șoarecilor nuzi BALB / c care poartă xenogrefe celulare MDA-MB-453 și linii celulare de cancer mamar (MCF-7, MDA-MB-231, și MDA-MB-453) prin inducerea apoptozei și suprimarea angiogenezei [Hui et al, 2010]</li><li>• Inhibarea migrației și invaziei celulare, suprimarea activării fibrosarcomului accelerat rapid (RAF), a protein kinazei activate cu mitogen (MEK) și a kinazei N-terminale c-Jun (JNK) și a secreției metaloproteinazei matrice 2 (MMP2) și MMP9 a celulelor MDAMB-453 (HER2 +) [Chen et al, 2015]</li><li>• Creșterea inhibată a celulelor umane de cancer de colon HT-29, expresia crescută a genelor de supresie tumorală (p21WAF1 și p27KIP1) și scăderea expresiei genei ciclooxygenazei-2 [Malik et al, 2003]</li><li>• Reducerea focarelor criptice aberante ale colonului, proliferarea celulară a colonului și expresia ARNm COX-2 la șobolani. [Lala et al, 2006]</li><li>• Suprimarea formării focarelor de criptă aberante în colonul șoarecilor CF-1 [Lim et al, 2013]</li><li>• Promovarea apoptozei în hiperplazia benignă de prostată la șobolani [Jang et al, 2010]</li><li>• Efect antiinvaziv asupra celulelor Hep3B de hepatom uman și inhibarea expresiei genelor metaloproteinazei MMP-2 și MMP-9 [Shin et al, 2009]</li><li>• Semnalizarea Akt-mTOR inhibată, inducând astfel maturarea celulelor leucemiei mieloide acute, pe lângă inducerea unor jucători apoptotici, cum ar fi TRAIL, în sistemele de cancer [Bontempo et al, 2015]</li></ul>

<p><b>Diabet</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dislipidemie îmbunătățită, capacitate antioxidantă îmbunătățită și prevenirea rezistenței la insulină la subiecții umani cu diabet de tip 2 [Li et al, 2015]</li> <li>• Ameliorarea hiperglicemiei și sensibilității la insulină prin activarea proteinei kinazei activate de AMP la șoarecii diabetici [Takikawa et al, 2010]</li> <li>• Angiogeneza glomerulară ameliorată a rinichilor diabetici prin atenuarea inducției VEGF și HIF-1α la șoarecii studiați [Kang et al, 2013]</li> <li>• Apoptoza renală ameliorată la șoarecii nefropatici diabetici prin activarea protein kinazei AMP-activate (AMPK) care inhibă în cele din urmă stresul oxidativ și lipotoxicitatea. [Koh et al, 2015]</li> <li>• Activarea adiponektinei derivate din țesutul adipos pentru apărarea împotriva disfuncției endoteliale legate de diabet la șoareci [Liu et al, 2014]</li> </ul>
<p><b>Sănătate vizuală</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Funcția vizuală îmbunătățită la pacienții cu glaucom cu tensiune normală [Shim et al, 2012]</li> <li>• Prevenirea afectării funcției celulelor fotoreceptoare în timpul inflamației retinei [Miyake et al, 2012]</li> <li>• Scăderea opacității lentilelor împreună cu scăderea nivelului MDA [Thiraphatthanavong et al, 2014]</li> <li>• Moartea celulară suprimată a HLE-B3 (linia celulară epitelială a lentilei) sub stres oxidativ indus de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Mok et al, 2014]</li> <li>• Prevenirea degenerescenței retiniene indusă de N-metil-N-nitrozourea [Paik et al, 2012]</li> <li>• Creșterea fluxurilor de sânge ocular, dar fără modificări semnificative ale presiunii intraoculare [Ohguro et al, 2012]</li> </ul>
<p><b>Efecte anti-obezitate</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Creșterea în greutate îmbunătățită și profilul lipidic la șobolani obezi. [Kwon et al, 2007]</li> <li>• Creșterea greutatei corporale suprimate și îmbunătățirea profilului lipidic din sânge în cazul dietei bogată în grăsimi la șobolani [Wu et al, 2013]</li> <li>• Obezitate ameliorată la șoarecii C57BL / 6 hrăniți cu grăsimi [Jayaprakasam et al, 2005]</li> <li>• Reglează în sus secreția de adipocitokine și expresia genelor în adipocitele izolate de șobolan [Tsuda et al, 2004]</li> <li>• Suprimarea creșterii în greutate, creșterii țesutului adipos și altor tulburări metabolice [Tsuda et al, 2003]</li> </ul>
<p><b>Efecte antimicrobiene</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Activitate antimicrobiană prin deteriorarea și distrugerea peretelui celular, a membranei și a matricei intercelulare [Pojer et al, 2013]</li> <li>• Activitate antibacteriană cu cea mai mare sensibilitate la <i>Aeromonas hydrophilia</i> și <i>Listeria innocua</i> [Genskowsky et al, 2016]</li> <li>• Efecte antibacteriene asupra <i>Enterococcus faecium</i> rezistent la vancomicină, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> și <i>Escherichia coli</i> [Côté et al, 2011]</li> <li>• Bacterii gram-negative inhibate, dar nu și bacterii gram-pozitive [Puupponen-Pimiä et al, 2001]</li> </ul>

Izolatele și amestecurile bogate în antocianine oferă protecție împotriva clivajului ADN-ului, peroxidarea lipidelor, inhibarea enzimelor, creșterea producției de citokine (astfel reglând răspunsurile imune), activitatea antiinflamatorie (Acquaviva et al., 2003). În ceea ce privește activitatea antimicrobiană a acestor pigmenți, aceasta este atribuită distrugerii peretelui celular, a membranei celulare și a matricei intercelulare. Activitatea antimicrobiană a fost, de asemenea, atribuită capacității antocianinelor de a elibera molecule de polizaharide din membrana exterioră a bacteriilor Gram-negative. Antocianinele pot, totodată, afecta metabolismul microbial, privând organismul de substraturile necesare creșterii sale (Alappat & Alappat, 2020).

În urma mai multor studii, s-a demonstrat că antocianinele ajută împotriva diabetului și obezității. S-a demonstrat că ele îmbunătățesc

metabolismul lipidic prevenind acumularea de țesut adipos (Lee et al., 2016). Alte studii au arătat că antocianinele sunt eficiente în inhibarea inițierii, promovării și progresiei cancerului de ficat, precum și cancerului la sân, de prostată, de col uterin, cancerul pulmonar (Li et al., 2017). Mai sunt și alte studii care arată că antocianinele pot opri tulburările de sănătate legate de declinul cognitiv și de vârstă. Studiile au arătat că polifenolii îmbunătățesc memoria, cât și performanțele motorii și cognitive. Aceste antocianine s-au dovedit a fi folositoare chiar și la boala Parkinson, scleroza laterală amiotrofică și boala Alzheimer (Winter & Bickford, 2019). Antocianinele au devenit acum un subiect de interes ca strategie naturală preventivă/terapeutică, deoarece au capacitatea de a proteja neuronii împotriva stresului oxidativ, de a suprima neuroinflamarea și de a modula căile de semnalizare celulară (Mattioli et al., 2020).

Antocianinele au fost asociate cu reducerea inflamației vasculare și prevenirea trombozei. De asemenea, pot proteja pielea umană de iradiere UV-B prin inhibarea apoptozei keratinocitelor (Liu et al., 2018). Activitatea antioxidantă reprezintă cel mai important rol al antocianinelor, fiind strâns legată de structura chimică a compușilor, anume de poziția și gradul de hidroxilare a ambelor inele ale structurii de bază (caracter polifenolic). Un rol central al activității antioxidante este oxidarea grupărilor hidroxil fenolice ale antocianinelor; în special, grupurile para- și orto-fenolice sunt importante pentru formarea semiquinonelor și pentru stabilizarea produselor de oxidare cu un singur electron (Mattioli et al., 2020). Studiile desfășurate s-au bazat pe rezultate in vitro și in vivo, și au demonstrat că hiperlipidemia și bolile cardiovasculare pot fi prevenite cu alimente care conțin antocianine (Oancea & Oprean, 2011).

#### **8. Utilizarea antocianinelor în industria alimentară**

Industria alimentară folosește multe substanțe chimice ca și coloranți alimentari. Cu toate acestea, această utilizare pune o serie de probleme, în principal din cauza riscurilor pentru sănătate. Într-adevăr, coloranții sintetici au fost suspecți de a provoca efecte adverse comportamentale și neurologice (McCann et al., 2007). Antocianinele sunt utilizate în produsele din industria alimentară ca și coloranți, în special coloranții roșii naturali. Cei mai studiați coloranți alimentari au ajuns să fie aceștia, fiind studiați pe scară largă în ultimii ani, numiți ca și aditiv E163. Acest E163 face referire la aditivul alimentar care conține atât glicozide (antocianine), cât și aglicone (antocianidine). Antocianinele comerciale și anume pelargonidin-3-glucozidă, peonidin-3-glucozidă și cianidin-3-glucozidă sunt utilizate, iar eficiența lor a fost testată în mare măsură (Martins et al., 2016).

Produsele care ar putea beneficia de adăugarea antocianinei includ băuturi răcoritoare, siropuri, gemuri, jeleuri, dulciuri, produse de panificație sau lactate și pulberi. Pe lângă furnizarea de culoare alimentelor, antocianinele pot oferi un avantaj dublu suplimentar. Acești pigmenți pot acționa ca antioxidanți care protejează alimentele la care sunt adăugați, dar pot furniza, de asemenea, o calitate distinctă alimentelor, deoarece pot crește potențialul nutrițional, exercitând efecte de promovare a sănătății pentru consumatori. Cu toate acestea, utilizarea antocianinelor pe post de coloranți naturali pentru alimente pune mai multe probleme. Stabilitatea lor nu este optimă, deoarece tind să se degradeze rapid, în principal datorită luminii, oxigenului, enzimelor, metalelor, prezenței altor oxidanți, pH-ului și temperaturii. Pe de altă parte, sunt destul de scumpe în comparație cu moleculele sintetice. În plus, acestea ar putea da arome neplăcute produselor alimentare, ca în cazul antocianinelor extrase din ridiche roșie (Mattioli et al., 2020).

## CONCLUZII

Antocianinele sunt pigmenți foarte răspândiți în natură, fiind întâlniți adesea în frunze, flori, fructe, legume. Pe lângă faptul că acești compuși polifenolici dau culoare plantelor și atrag insectele, ajutând la polenizare, ei au multiple alte roluri. Prin proprietățile lor antioxidante, datorate structurii chimice caracteristice, antocianinele sunt buni agenți de protecție împotriva diferitelor boli care sunt legate de vârstă, ca de exemplu boli neurologice, boli cardiovasculare, procese inflamatorii. Pe de altă parte, compușii apără plantele de diferitele stresuri abiotice și biotice și totodată sunt utilizați ca și coloranți naturali în industria alimentară.

## REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- Abdel-Aal, E.-S., Hucl, P. 1999. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chemistry*, 76, 350–354. <https://doi.org/10.1094/CHEM.1999.76.3.350>
- Acquaviva R, Russo A, Galvano F, Galvano G, Barcellona ML, Li Volti G, et al. 2003. Cyanidin and cyanidin 3-O-beta-D -glucoside as DNA cleavage protectors and antioxidants. *Cell Biol Toxicol*. 19: 243-252
- Ahmed NU, Park JI, Jung HJ, Hur Y, Nou IS. 2015. Anthocyanin biosynthesis for cold and freezing stress tolerance and desirable colour in *Brassica rapa*, Functional and Integrative Genomics, 15 (4), 383 - 394.
- Akkaynak, D., Treibitz, T., Xiao, B., Gürkan, U. A., Allen, J. J., Demirci, U., Hanlon, R. T. 2014. Use of commercial off-the-shelf digital cameras for scientific data acquisition and scene-specific color calibration. *Journal of the Optical Society of America A*, 31, 312–321. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.31.000312>
- Alappat B. Alappat J. 2020. Anthocyanin Pigments: Beyond Aesthetics. *Molecules*. 25: 5500.
- Alexan D.I., Ianovici N. 2018. Defensive mechanisms of plants based on secondary metabolites. *BIOSTUDENT*, vol. 1 (2), pp. 51-58
- Alvarez-Suarez JM, Giampieri F, Tulipani S, et al. 2014. Onemonth strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. *J Nutr Biochem*. 25(3):289–294.
- Andersen OM, Jordheim M, 2006. Anthocyanins, In: *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, Andersen OM, Markham KR, CRC Press, Taylor & Francis Group, 471 - 552.
- Archetti M. 2009. Classification of hypotheses on the evolution of autumn colours. *Oikos*. 118(3): 328–333
- Batalu A., Ianovici N. 2018. Aspects regarding the influence of psychosocial factors on immunity. *BIOSTUDENT* 1 (2), 69-80

**ALMĀŞAN et al:** Considerations regarding the anthocyanins in plant and human life

- Bell DR, Gochenaur K. 2006. Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. *J Appl Physiol.* 100(4):1164–1170.
- Bergman, T. J., Beehner, J. C. 2008. A simple method for measuring colour in wild animals: Validation and use on chest patch colour in geladas (*Theropithecus gelada*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 94,231–240. [https://doi.org/10.1111/\(ISSN\)1095-8312](https://doi.org/10.1111/(ISSN)1095-8312)
- Bisvas T., Mathur A. 2017. Plant Anthocyanins: Biosynthesis, Bioactivity and in vitro Production for tissue cultures. *Adv Biotech & Micro.* 5(5): 555672
- Boboescu NT, Ianovici N. 2018. Several aspects regarding plant senescence. *BIOSTUDENT*, vol. 1 (2), pp. 107-113
- Bontempo P, de Masi L, Carafa V, et al. 2015. Anticancer activities of anthocyanin extract from genotyped *Solanum tuberosum* L. "Vitelotte". *J Funct Foods.* 19:584–593.
- Bueno MJ, Saez-Plaza P, Ramos-Escudero F, Jiménez AM, Fett R, Asuero AG. 2012. Analysis and antioxidant capacity of anthocyanin pigments, Part II: chemical structure, color and intake of anthocyanins, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42, 126 – 151.
- Chakovari SZ, Enteshari S, Qasimov N. 2015. Effect of salinity stress on biochemical parameters and growth of borage (*Borago officinalis* L.), *Iranian Journal of Plant Physiology*, 6 (2), 1673 – 1685.
- Chanoca A, Kovinich N, Burkel B, Stecha S, Bohorquez-Restrepo A, Ueda T, Eliceiri KW, Grotewold E, Otegui MS. 2015. Anthocyanin vacuolar inclusions form by a micro autophagy mechanism, *The Plant Cell*, 27, 2545 – 2559.
- Chemler JA, Leonard E, Koffas MAG. 2009. Flavonoid Bio transformations in Microorganisms, In *Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications*, Gould K, Davies K, Winefield C, Springer, 191 – 238.
- Chen XY, Zhou J, Luo LP, et al. 2015. Black rice anthocyanins suppress metastasis of breast cancer cells by targeting RAS/RAF/MAPK pathway. *BioMed Res Int.* 2015:414250.
- Chen Y., Huang Z., Tang L. 2021. Invisible red in young leaves: Anthocyanin likely plays a defensive role in some other way beyond visual warning. *Flora.* 280: 151833.
- Chunthaburee S, Sakuanrungsirikul S, Wongwarat T, Sanitchon J, Pattanagul W, Theerakulpisut P. 2016. Changes in anthocyanin content and expression of anthocyanin synthesis genes in seedlings of black glutinous rice in response to salt stress, *Asian Journal of Plant Science*, 15 (3-4), 56 - 65.
- Ciobanu D G, Ianovici N. 2018. Considerations regarding the mechanisms involved in regulating plant immunity to pathogen attack. *BIOSTUDENT*, vol. 1 (2), pp. 93-98
- Close DC, Beadle CL. 2003. The Eco physiology of foliar anthocyanin, *The Botanical Review*, 69 (2), 149 – 161.
- Côté J, Caillet S, Doyon G, et al. 2011. Antimicrobial effect of cranberry juice and extracts. *Food Cont.* 22(8):1413–1418.
- Dai LP, Dong XJ, Ma HH. 2012. Antioxidative and chelating properties of anthocyanins in *Azolla imbricate* induced by cadmium, *Polish Journal of Environmental Studies.* 21 (4), 837- 844.
- del Valle J C, Gallardo-López A., Buide ML, Whittall JB, Narbona E. 2018. Digital photography provides a fast, reliable, and noninvasive method to estimate anthocyanin pigment concentration in reproductive and vegetative plant tissues. *Ecol Evol.* 8(6): 3064–3076.
- Delgado-Vargas F, Jimenez AR, Paredes-Lopez O. 2000. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40 (3), 173 – 289.
- Deroles S. 2009. Anthocyanin Biosynthesis in Plant Cell Cultures: A Potential Source of Natural Colourants, In *Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications*, Gould K, Davies K, Winefield C, Springer, 107 – 167.
- Elangovan V, Sekar N, Govindasamy S. 1994. Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20-methylcholanthrene-induced tumorigenesis. *Cancer Lett.* 87:107-113.
- Eryilmaz F. 2006. The relationships between salt stress and anthocyanin content in higher plants, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 20 (1), 47 - 52.
- Fang J. 2015. Classification of fruits based on anthocyanin types and relevance to their health effects, *Nutrition*, 31, 1301 – 1306.
- Faria A, Pestana D, Teixeira D, et al. 2010. Blueberry anthocyanins and pyruvic acid adducts: anticancer properties in breast cancer cell lines. *Phytother Res.* 24 (12):1862–1869.
- Gamon, J. A., Surfus, J. S. 1999. Assessing leaf pigment content and activity with a reflectometer. *New Phytologist*, 143, 105–117. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00424.x>
- Garcia, J. E., Greentree, A. D., Shrestha, M., Dorin, A., Dyer, A. G. 2014. Flower colours through the lens: Quantitative measurement with visible and ultraviolet digital photography. *PLoS ONE*, 9, e96646. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096646>
- Gaulejac NS, Glories Y, Vivas N, 1999. Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines, *Food Research International*, 32, 327 - 333.
- Gavrilă L.D., Rădoi E., Ianovici N. 2020. Aspects on improving the quality of plant biomass for bioethanol production. *BIOSTUDENT*, vol. 3 (1), pp. 55-68
- Genskowsky E, Puente LA, Perez-Alvarez JA, et al. 2016. Determination of polyphenolic profile, antioxidant activity and antibacterial properties of maqui [*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz] a Chilean blackberry. *J Sci Food Agr.* 96(12):4235–4242.



- Ghosh D., Konishi T. 2007. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 16: 200–208
- Grudnicki M., Ianovici N.. 2014. Noțiuni teoretice și practice de Fiziologie vegetală, Ed. Mirton, Timișoara, 289 p.
- Gitelson, A. A., Chivkunova, O. B., Merzlyak, M. N. 2009. Nondestructive estimation of anthocyanins and chlorophylls in anthocyanic leaves. *American Journal of Botany*, 96, 1861–1868. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800395>
- Gómez, J., Liñán-Cembrano, G. 2016. SpotEgg: An image-processing tool for automatized analysis of colouration and spottiness. *Journal of Avian Biology*, 47, 1–11.
- Gould K.S. 2004. Nature's Swiss Army Knife: The Diverse Protective Roles of Anthocyanins in Leaves. *J Biomed Biotechnol.* 2004(5): 314-320.
- Gould K.S., Jay-Allemand C., Logan B.A., Baissac Y., Bidel L. P.R. 2018. When are foliar anthocyanins useful to plants? Re-evaluation of the photoprotection hypothesis using *Arabidopsis thaliana* mutants that differ in anthocyanin accumulation. *Environmental and Experimental Botany.* 154: 11-22.
- Gould KS, Neill SO, Vogelmann TC. 2002. A unified explanation for anthocyanins in leaves? *Advances in Botanical Research*, 37, 167 – 192
- He Q, Ren Y, Zhao W, Li R, Zhang L. 2020. Low temperature promotes anthocyanin biosynthesis and related gene expression in the seedlings of purple head Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.). *Genes*, 11, 81.
- Hui C, Bin Y, Xiaoping Y, et al. 2010. Anticancer activities of an anthocyanin-rich extract from black rice against breast cancer cells in vitro and in vivo. *Nutr Cancer.* 62(8):1128–1136.
- Ianovici N. 2010. Citohistologie și morfoanatomia organelor vegetative, Ed. Mirton, Timișoara, 385 p.
- Ianovici N., Andrei M., Ferioiu B., Muntean H.E., Danciu R., Pupăză E. 2011. Particularități anatomice și adaptări ecologice ale frunzelor speciilor genului *Plantago*. *NATURA. Biologie, seria III*, 53 (2): 163-194
- Ianovici N. 2011. Histoanatomical and ecophysiological studies on some halophytes from Romania - *Plantago schwarzenbergiana*, *Annals of West University of Timișoara, ser. Biology*, 14: 53-64
- Ianovici N., Ciocan G.V., Matica A., Scurtu M., Șesan T.E. 2012. Study on the infestation by *Cameraria ohriddella* on *Aesculus hippocastanum* foliage from Timișoara, Romania, *Annals of West University of Timișoara, ser. Biology*, XV (1): 67-80
- Ianovici N., Matica A., Scurtu M. 2010. Contribution to the knowledge of leaf galls from Western Romania, *Annals of West University of Timișoara, ser. Biology*, 13: 135-144
- Ianovici N, Vereș M., Catrina R.G., Pîrvulescu A.M., Tănase R.M., Datcu D.A 2015. Methods of biomonitoring in urban environment: leaf area and fractal dimension. *Annals of West University of Timișoara, ser. Biology*, 18 (2):169-178
- Iseri OD, Korpe DA, Sahin FI, Haberal M. 2015. High salt-induced oxidative damage and antioxidant response in tomato grafted on tobacco, *Chilean Journal of Agricultural Research*, 75 (2), 192 – 201.
- Jang H, Ha US, Kim SJ, et al. 2010. Anthocyanin extracted from black soybean reduces prostate weight and promotes apoptosis in the prostatic hyperplasia-induced rat model. *J Agric Food Chem.* 58:12686–12691.
- Jayaprakasam B, Vareed SK, Olson LK, et al. 2005. Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. *J Agric Food Chem.* 53(1):28–31.
- Junker, L. V., Ensminger, I. 2016. Relationship between leaf optical properties, chlorophyll fluorescence and pigment changes in senescing *Acer saccharum* leaves. *Tree Physiology*, 36, 694–711. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpv148>
- Juvany M, Müller M, Munné-Bosch S. 2013. Photo-oxidative stress in emerging and senescing leaves: a mirror image? *Journal of Experimental Botany* 64: 3087-3098.
- Kang MK, Lim SS, Lee JY, et al. 2013. Anthocyanin-rich purple corn extract inhibit diabetes-associated glomerular angiogenesis. *Plos One.* 8(11):e79823.
- Kebbas S, Benseddik T, Makhloufi H, Aid F. 2018. Physiological and biochemical behaviour of *Gleditsia triacanthos* L. young seedlings under drought stress conditions, *Not Bot Horti Agrobo*, 46 (2), 585-592.
- Kendal, D., Hauser, C. E., Garrard, G. E., Jellinek, S., Giljohann, K. M., Moore, J. L. 2013. Quantifying plant colour and colour difference as perceived by humans using digital images. *PLoS ONE*, 8, e72296. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072296>
- Khoo HE, Azlan A, Tang ST, Lim SM. 2017. Anthocyanidins and anthocyanins: coloured pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits, *Food & Nutrition Research*, 61 (1), 1361779.
- Kielkowska A, Grzebelus E, Lis-Krzyszcin A, Mackowska K. 2019. Application of the salt stress to the protoplast cultures of the carrot (*Daucus carota* L.) and evaluation of the response of regenerants to soil salinity, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 137, 379 – 395.
- Koh ES, Lim JH, Kim MY, et al. 2015. Anthocyanin-rich *Seoritae* extract ameliorates renal lipotoxicity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *J Transl Med.* 13:203.
- Kovinich N, Kayanja G, Chanoca A, Otegui MS, Grotewold E. 2015. Abiotic stresses induce different localizations of anthocyanins in *Arabidopsis*, *Plant Signaling & Behavior*, 10, 7.
- Kwon SH, Ahn IS, Kim SO, et al. 2007. Anti-obesity and hypolipidemic effects of black soybean anthocyanins. *J Med Food.* 10(3):552–556
- Lala G, Malik M, Zhao C, et al. 2006. Anthocyanin-rich extracts inhibit multiple biomarkers of colon cancer in rats. *Nutr Cancer.* 54(1):84–93.
- Landi M, Tattini M, Gould KS. 2015. Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions, *Environmental and Experimental Botany*, 119, 4 – 17.

**ALMĀŞAN et al:** Considerations regarding the anthocyanins in plant and human life

- Lee M., Sorn S. R., Park Y., Park H. K. 2016. Anthocyanin Rich-Black Soybean Testa Improved Visceral Fat and Plasma Lipid Profiles in Overweight/Obese Korean Adults: A Randomized Controlled Trial ; J. Med. Food, 19, 995–1003.
- Lee, J., Rennaker, C., Wrolstad, R. E. 2008. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, 110, 782–786. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.010>
- Lev-Yadun., Gould K. 2008. Role of Anthocyanins in Plant Defence, pp 23-28. In: Anthocyanins. Gould K., Davies K.M.(eds).Springer, Berlin, Germany
- Li D, Zhang Y, Liu Y, et al. 2015. Purified anthocyanin supplementation reduces dyslipidemia, enhances antioxidant capacity, and prevents insulin resistance in diabetic patients. *J Nutr*. 145(4):742–748.
- Li S., Zhu Z., Pinto C. A, Barba F. J., He J., Montesano D., Saraiva J. A. 2017. Evaluation of gliadins-diglycosylated cyanidins interaction from litchi pericarp through ultraviolet and fluorescence measurements; *Int. J. Food Prop*. 20: 2418-2428
- Lim S, Xu J, Kim J, et al. 2013. Role of anthocyanin-enriched purple-fleshed sweet potato p40 in colorectal cancer prevention. *Mol Nutr Food Res*. 57(11):1908–1917.
- Liu Y, Li D, Zhang Y, et al. 2014. Anthocyanin increases adiponectin secretion and protects against diabetes-related endothelial dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 306(8): E975–E988.
- Liu Y., Tikunov Y., Schouten R.E., Marcelis L.F.M., Visser R.G.F., Bovy A. 2018. Anthocyanin Biosynthesis and Degradation Mechanisms in *Solanaceous* Vegetables: A Review. *Front. Chem*. 6: 52.
- Macfarlane, C., Ogden, G. N. 2012. Automated estimation of foliage cover in forest understorey from digital nadir images. *Methods in Ecology and Evolution*, 3, 405–415. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00151.x>
- Mahdavian K, Ghorbanli M, Kalantari KM. 2008. The effects of ultraviolet radiation on the contents of chlorophyll, flavonoid, anthocyanin and proline in *Capsicum annuum* L, *Turkish Journal of Botany*, 32, 25 – 33.
- Malik M, Zhao C, Schoene N, et al. 2003. Anthocyanin-rich extract from *Aronia meloncarpa* E. induces a cell cycle block in colon cancer but not normal colonic cells. *Nutr Cancer*. 46(2):186–196.
- Manetas Y. 2006. Why some leaves are anthocyanins and why most anthocyanins leaves are red?, *Flora*, 201 (3), 163–177.
- Martin J, Navas MJ, Jimenez-Moreno AM, Asuero AG. 2017. Anthocyanin Pigments: Importance, Sample Preparation and Extraction, In *Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications*, Soto- Hernandez M, Palma-Tenango M, Garcia-Mateos R, Books on Demand, 117 – 152.
- Martins N., Roriz C. L., Morales P., Barros L., Ferreira I. C. F. R. 2016. Food colorants: challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends Food Sci. Technol*. 52: 1-15
- Maskato Y., Talal S., Keasar T., Gefen, E. 2014. Red foliage color reliably indicates low host quality and increased metabolic load for development of an herbivorous insect. *Arthropod-Plant Interactions*. 8(4): 285-292.
- Mattioli R., Francioso A., Mosca L., Silva P. 2020. Anthocyanins: A Comprehensive Review of Their Chemical Properties and Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. *Molecules*. 25(17): 3809.
- McCann D., Barrett A., Cooper A., Crumpler D., Dalen L., Grimshaw K., Kitchin E., Lok K., Porteous L., Prince E., et al. 2007. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: A randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet*. 370:1560–1567.
- Merken, H. M., Beecher, G. R. 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 577–599. <https://doi.org/10.1021/jf990872o>
- Merzlyak, M. N., Solo, A. E., Gitelson, A. A. 2003. Reflectance spectral features and non-destructive estimation of chlorophyll, carotenoid and anthocyanin content in apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 197–211. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00066-2](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00066-2)
- Mierziak J., Kostyn K., Kulma A. 2014. Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. *Molecules*. 19(10): 16240-16265.
- Miyake S, Takahashi N, Sasaki M, et al. 2012. Vision preservation during retinal inflammation by anthocyanin-rich bilberry extract: cellular and molecular mechanism. *Lab Invest*. 92(1):102–109.
- Mizunuma, T., Mencuccini, M., Wingate, L., Ogée, J., Nichol, C., Grace, J. 2014. Sensitivity of colour indices for discriminating leaf colours from digital photographs. *Methods in Ecology and Evolution*, 5, 1078–1085. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12260>
- Mok JW, Chang DJ, Joo CK. 2014. Antiapoptotic effects of anthocyanin from the seed coat of black soybean against oxidative damage of human lens epithelial cell induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Curr Eye Res*. 39(11):1090–1098.
- Nakabayashi R, Mori T, Saito K. 2014. Alternation of flavonoid accumulation under drought stress in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Signaling and Behavior*, 9 (8), e29518.
- Nassour R., Ayash A., Al-Tameemi K. 2020. Anthocyanin pigments: Structure and biological importance. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*. 13 (4): 45-57
- Oancea S., Oprean L. 2011. Anthocyanins, from biosynthesis in plants to human health benefits. *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology*. 15:1.
- Ohguro H, Ohguro I, Katai M, et al. 2012. Two-year randomized, placebo-controlled study of black currant anthocyanins on visual field in glaucoma. *Ophthalmol*. 228(1):26–35.

- Paik SS, Jeong E, Jung SW, et al. 2012. Anthocyanins from the seed coat of black soybean reduce retinal degeneration induced by N-methyl-N-nitrosourea. *Exp Eye Res.* 97(1):55–62.
- Passeri V, Koes R, Quattrocchio FM. 2016. New challenges for the design of high-value plant products: Stabilization of anthocyanins in plant vacuoles. *Frontiers in Plant Science*, 7, 153.
- Pena-Novas I., Archetti M. 2020. Biogeography and evidence for adaptive explanations of autumn colors. *New Phytologist*. 228(3): 809-813.
- Pojer E, Mattivi F, Johnson D, Stockley CS. 2013. The case for anthocyanin consumption to promote human health: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12, 483 - 508.
- Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Meier C, et al. 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J Appl Microbiol.* 90(4):494–507.
- Rebollo, S., Milchunas, D.G., Noy-Meir I., Chapman, P.L. (2002) The role of spiny plant refuge in structuring grazed shortgrass steppe plant communities. *Oikos* 98, 53–64
- Rechner AR, Kroner C. 2005. Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function. *Thromb Res.* 116(4):327–334.
- Renner S.S., Zohner C.M. 2019. The occurrence of red and yellow autumn leaves explained by regional differences in insolation and temperature. *New Phytologist*. 224: 1464-1471.
- Richardson, A. D., Duigan, S. P., Berlyn, G. P. 2002. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist*, 153, 185–194. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646X.2001.00289.x>
- Ruxton, G.D., Sherratt, T.N., Speed M.P. 2004. Avoiding Attack. The Evolutionary Ecology of Crypsis, Warning Signals and Mimicry. Oxford University Press, Oxford.
- Sadilova E, Stintzing FC, Carle R. 2006. Anthocyanins, colour and antioxidant properties of eggplant (*Solanum melongena* L.) and violet pepper (*Capsicum annuum* L.) peel extracts. *Z. Naturforsch. C*, 61, 527–535.
- Schulz E, Tohge T, Zuther E, Fernie AR, Hincha DK 2016. Flavonoids are determinants of freezing tolerance and cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*, 6, 34027
- Schulz E, Tohge T, Zuther E, Fernie AR, Hincha DK, 2015. Natural variation in flavonol and anthocyanin metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* accessions. *Plant, Cell and Environment*, 38, 1658–1672.
- Shim SH, Kim JM, Choi CY, et al. 2012. Ginkgo biloba extract and bilberry anthocyanins improve visual function in patients with normal tension glaucoma. *J Med Food.* 15(9):818–823.
- Shin DY, Lee WS, Kim SH, et al. 2009. Anti-invasive activity of anthocyanins isolated from *Vitis coignetiae* in human hepatocarcinoma cells. *J Med Food.* 12(5):967–972.
- Shoeva OY, Gordeeva EI, Arbutova VS, Khlestkina EK. 2017. Anthocyanins participate in the protection of wheat seedlings from osmotic stress. *Cereal Research Communications*, 45 (1), 47–56.
- Sigurdson G. T., Tang P., Giusti M. M. 2017. Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources . *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 8:261-280.
- Sims, D., Gamon, J. 2002. Relationship between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range species, leaf structures and development stages. *Remote Sensing of Environment*, 81, 337–354. [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(02\)00010-X](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(02)00010-X)
- Sperdoui I, Moustakas M. 2012. Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of *Arabidopsis thaliana* to drought stress. *Journal of Plant Physiology*, 169, 577– 585.
- Stevens, M., Lown, A. E., Wood, L. E. 2014. Color change and camouflage in juvenile shore crabs *Carcinus maenas*. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2, 14.
- Stevens, M., Párraga, C. A., Cuthill, I. C., Partridge, J. C., Troscianko, T. S. 2007. Using digital photography to study animal coloration. *Biological Journal of the Linnean Society*, 90, 211–237. [https://doi.org/10.1111/\(ISSN\)1095-8312](https://doi.org/10.1111/(ISSN)1095-8312)
- Steyn WJ, Wand SJE, Holcroft DM, Jacobs G. 2002. Anthocyanins in vegetative tissues: A proposed unified function in photo protection. *New Phytologist*, 155, 349 – 361.
- Stone, B.C. (1979) Protective coloration of young leaves in certain Malaysian palms. *Biotropica* 11: 126.
- Strauss, S. Y., Cacho, N. I. 2013. Nowhere to run, nowhere to hide: The importance of enemies and apparency in adaptation to harsh soil environments. *The American Naturalist*, 182, E1–E14. <https://doi.org/10.1086/670754>
- Takikawa M, Inoue S, Horio F, et al. 2010. Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *J Nutr.* 140 (3):527–533.
- Taylor, C. H., Gilbert, F., Reader, T. 2013. Distance transform: A tool for the study of animal colour patterns. *Methods in Ecology and Evolution*, 4, 771–781. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12063>
- Thiraphatthanavong P, Wattanathorn J, Muchimapura S, et al. 2014. Preventive effect of Zea mays L. (purple waxy corn) on experimental diabetic cataract. *BioMed Res Int.* 2014:507435.
- Toufektsian MC, De Lorgeril M, Nagy N, et al. 2008. Chronic dietary intake of plant-derived anthocyanins protects the rat heart against ischemia-reperfusion injury. *J Nutr.* 138(4):747–752.
- Trojak M, Skowron E. 2017. Role of anthocyanins in high-light stress response. *World Science News*, 81 (2), 150-168.
- Troscianko, J., Stevens, M. 2015. Image calibration and analysis toolbox—a free software suite for objectively measuring reflectance, colour and pattern. *Methods in Ecology and Evolution*, 6, 1320–1331. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12439>
- Tsuda T, Horio F, Uchida K, et al. 2003. Dietary cyanidin 3-O-β-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *J Nutr.* 133(7):2125–2130.

**ALMÄŞAN et al:** Considerations regarding the anthocyanins in plant and human life

- Tsuda T, Ueno Y, Aoki H, et al. 2004. Anthocyanin enhances adipocytokine secretion and adipocyte-specific gene expression in isolated rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 316(1):149–157.
- Tsurunaga Y, Takahashi T, Katsube T, Kudo A, Kuramitsu O, Ishiwata M, Matsumoto S. 2013. Effects of UV-B irradiation on the levels of anthocyanin, rutin and radical scavenging activity of buckwheat sprouts, *Food Chemistry*, 141, 552–556.
- Ubi BE, Honda C, Bessho H, Kondo S, Wada M, Kobayashi S, Moriguchi T. 2006. Expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in apple skin: effect of UV-B and temperature, *Plant Science*, 170, 571–578.
- Usenik V, Stampar F, Veberic R. 2009. Anthocyanins and fruit colour in plums (*Prunus domestica* L.) during ripening, *Food Chemistry*, 114, 529–534.
- Venkatalakshmi P., Vadivel V., Brindha P. 2016. Role of phytochemicals as immunomodulatory agents. *International Journal of Green Pharmacy* 10 (1): 2
- Vicente O., Boscaiu M. 2018. Flavonoids: Antioxidant Compounds for Plant Defence... and for a Healthy Human Diet. *Not Bot Horti Agrobo.* 46(1):14-21
- Wang LS, Hecht SS, Carmella SG, et al. 2009. Anthocyanins in black raspberries prevent esophageal tumors in rats. *Cancer Prev Res.* 2(1):84–93.
- Wang LS, Stoner GD. 2008. Anthocyanins and their role in cancer prevention, *Cancer Lett.*, 269 (2), 281–290.
- White, T. E., Dalrymple, R. L., Noble, D. W. A., O'Hanlon, J. C., Zurek, D. B., Umbers, K. D. L. 2015. Reproducible research in the study of biological coloration. *Animal Behaviour*, 106, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2015.05.007>
- Winter A. N., Bickford P. C. 2019. Anthocyanins and Their Metabolites as Therapeutic Agents for Neurodegenerative Disease. *Antioxidants.* 8: 333.
- Wu T, Yu Z, Tang Q, et al. 2013. Honeysuckle anthocyanin supplementation prevents diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Food Funct.* 4:1654–1661.
- Zhang O, Zhai J, Shao L, Lin W, Peng C. 2019. Accumulation of anthocyanins: An adaptation strategy of *Mikania micrantha* to low temperature in winter, *Frontiers in Plant Science*, 10.
- Zhu H, Zhang TJ, Zheng J, Huang XD, Yu ZC, Peng CL, Chow WS. 2018. Anthocyanins function as a light attenuator to compensate for insufficient photo protection mediated by non-photochemical quenching in young leaves of *Acmena acuminatissima* in winter, *Photosynthetica*, 56 (1), 445-454.