

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ

*O nouă metodă de analiză informațională a apelor
minerale medicinale*
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. BERTEANU MIHAI

Student-doctorand:
CÎMPEAN CRISTINA-DANIELA

ANUL 2020

Cuprinsul tezei

Cuprins	i
Lista lucrărilor științifice publicate	i
Capitol de carte	i
Articole publicate în reviste de specialitate	i
Lucrări prezentate la manifestări științifice	ii
Lista cu abrevieri și simboluri	iii
Mulțumiri	iv
Introducere	v
I. Stadiul actual al cunoașterii	1
1. Apele minerale medicinale din România	1
1.1. Definirea apelor minerale	3
1.2. Categoriile de clasificare a apelor minerale	3
1.2.1. Proveniența apelor minerale	3
1.2.2. Originea apelor minerale	4
1.2.3. Mineralizarea totală	4
1.2.4. Temperatura naturală	5
1.2.5. Presiunea osmotică	5
1.2.6. Compoziția chimică	5
1.3. Apele minerale ca factor terapeutic.....	6
1.3.1. Apele minerale alcaline și alcalino-teroase	6
1.3.2. Apele minerale clorurate-sodice	9
1.3.3. Apele minerale sulfuroase	9
1.3.4. Apele minerale sulfatate	17
1.3.5. Apele minerale feruginoase.....	17
1.3.6. Apele minerale arsenicale	18
1.3.7. Apele minerale iodurate	18
1.3.8. Apele minerale carbogazoase	19
1.3.9. Apele litinifere	19
1.3.10. Apele minerale radioactive	20
1.4. Metaplazia apelor minerale	20
1.5. Concluzii: ape minerale selectate pentru studiu	22
2. Metode de analiză informațională	23
2.1. Analize imagistice electrofotonice	23
2.2. Electronografia	23
2.3. Biocristalizarea (cristalizarea clorurii de cupru)	24
2.4. Cromatografia circulară	24
2.5. Dinamoliza capilară	25
2.6. Concluzii	25
3. Biocristalizarea	26
3.1. Scurt istoric	26
3.2. Fizica cristalizării clorurii de cupru	26
3.3. Biocristalizarea în domeniul calității alimentelor	28
3.4. Biocristalizarea în medicina umană și veterinară	29
3.5. Interpretarea biocristalizării	31
3.5.1. Evaluarea calității alimentelor	31
3.5.2. Orientarea diagnosticului medical	33
3.5.3. Diagnosticul stresului oxidativ prin biocristalizare	34

3.5.4. Diagnosticul precoce al neoplaziilor	41
3.5.5. Discuții	44
3.5.6. Concluzii	47
II. Contribuții personale	49
4. Ipoteza de lucru și obiectivele generale	49
5. Metodologia generală a cercetării	51
5.1. Probele studiate	51
5.2. Metodologia biocristalizării	53
5.3. Fotografiera amprentelor de cristalizare	54
5.4. Evaluarea și interpretarea amprentelor de cristalizare	54
5.5. Analiza statistică	54
6. Determinarea tiparelor de biocristalizare specifice apelor minerale	56
6.1. Introducere (ipoteza de lucru și obiective specifice).....	56
6.2. Material și metodă	57
6.2.1. Materiale	57
6.2.2. Protocolul de biocristalizare	57
6.2.3. Achiziția imaginilor de biocristalizare.	57
6.2.4. Evaluarea și interpretarea imaginilor de biocristalizare	57
6.2.5. Analiza statistică	58
6.3. Rezultate	58
6.3.1. Scala de evaluare a amprentelor de biocristalizare	58
6.3.2. Diferențierea tiparelor specifice de cristalizare sensibilă pentru principalele categorii de ape minerale studiate.....	73
6.3.3. Principalii indicatori de biocristalizare ce diferențiază tipurile principale de ape minerale	76
6.4. Analiza statistică	76
Analiza ANOVA în prima etapă a evaluării vizuale	77
Analiza ANOVA în a doua etapă a evaluării vizuale	78
6.5. Discuții	79
6.6. Concluzii	81
7. Corelații între tiparele de biocristalizare și analizele fizico-chimice ale apelor minerale	83
7.1. Introducere	83
7.2. Material și metodă	83
7.2.1. Probele studiate	83
7.2.2. Categorii de clasificare a apelor minerale selectate	84
7.2.3. Metodă	88
Metodă extracție ADN apă.....	89
7.3. Rezultatele comparative ale analizelor fizico-chimice	92
7.3.1. Reziduu sec	93
7.3.2. pH ape studiate	94
7.3.3. Conductivitate ape studiate	94
7.3.4. Turbiditate	95
7.3.5. Oxigen dizolvat	96
7.3.6. Anioni	96
7.3.7. Parametri generali ai apei	97
7.3.8. Elemente totale	98
7.3.9. Analiza ADN	99
7.3. Analiza statistică a parametrilor fizico-chimici	101
7.4. Discuții analize fizico-chimice	102

7.5. Concluzii analize fizico-chimice	106
7.6. Rezultate cristalizare sensibilă	107
7.6.1. Apele cloruro-sodice sulfuroase	109
7.6.2. Apele bicarbonatate cloruro-sodice.....	110
7.6.3. Apele cloruro-sodice bicarbonatate, sulfuroase	110
7.6.4. Apele oligominerale	112
7.6.5. Apele acid carbonice	112
7.7. Prelucrarea computerizată a imaginilor de cristalizare sensibilă	113
7.8. Discuții cristalizare sensibilă.....	114
7.9. Concluzii	115
8. Influența reziduului sec asupra biocristalizării.....	116
8.1. Introducere	116
8.2. Material și metodă	116
8.2.1. Probele studiate	116
8.2.2. Metodă	117
8.2.3. Analizele fizico-chimice	118
8.2.4. Biocristalizarea	118
8.2.5. Analiza statistică	118
8.3. Rezultate reziduu sec	118
8.4. Rezultate cristalizare sensibilă	119
8.4.1. Serii de concentrații specifice apelor cloruro-sodice sulfuroase	119
8.4.2. Serie de concentrație apă cloruro-sodică bicarbonată, sulfuroasă	124
8.4.3. Serie de concentrație ape bicarbonatate cloruro-sodice	124
8.4.4. Serii de concentrație pentru ape bicarbonatate, carbogazoase, cloruro-sodice	125
8.4.5. Serii de concentrație pentru ape acid carbonice, sodice, calcice, magneziene	128
8.4.6. Serii ape acid carbonice, sodice, clorurate, calcice, magneziene	130
8.4.7. Serii de concentrație pentru ape acid carbonice calcice	130
8.4.8. Serii de concentrație pentru ape acid carbonice, calcice, magneziene, sodice	131
8.4.9. Comparație Herculane 7 izvoare calde și Herculane sonda Vicol... ..	132
8.4.10. Comparație Herculane sonda Scorillo și Herculane sonda Traian.	133
8.4.11. Comparație Călimănești 5, 8 și 14	133
8.4.12. Comparație Călimănești 7 și Călimănești 14.....	134
8.4.13. Comparație Căciulata 2 și Călimănești 4	134
8.5. Discuții	135
8.6. Concluzii	137
9. Influența unor săruri de calciu și magneziu asupra biocristalizării	138
9.4. Introducere	138
9.5. Material și metodă	138
9.5.10. Probele studiate	138
9.5.11. Metodă	139
9.5.12. Biocristalizarea	139
9.3. Rezultate	139
9.3.1. Influența clorurilor asupra biocristalizării	139
9.3.2. Influența sulfatului de magneziu	140

9.3.3. Influența carbonaților asupra biocristalizării	141
9.3.4. Influența combinației de bicarbonat de sodiu și clorură de sodiu asupra cristalizării clorurii de cupru.....	143
9.3.5. Influența combinației de clorură de calciu și sodiu asupra cristalizării sensibile	144
9.3.6. Influența combinației de carbonat de calciu, magneziu și sodiu asupra cristalizării sensibile	145
9.4. Concluzii	145
9.5. Recomandări pentru cercetări viitoare	146
10. Indicatori de biocristalizare ai degradării cauzate de factorul timp la ape minerale cu reziduu sec determinat	147
10.1. Introducere	147
10.2. Material și metodă	148
10.2.1. Probele studiate	148
10.2.2. Metoda biocristalizării	149
10.3. Rezultate cristalizare sensibilă	149
10.3.1. Serii de degradare specifice apelor cloruro-sodice sulfuroase	149
10.3.2. Serie de degradare apă bicarbonată cloruro-sodică	153
10.3.3. Serii de degradare pentru ape acid carbonice	154
10.3.4. Serii de degradare pentru ape oligominerale	158
10.4. Concluzii	160
11. Indicatori de biocristalizare ai degradării cauzate de factorul timp asupra altor probe de ape minerale	161
11.1. Introducere	161
11.2. Material și metodă	161
11.2.1. Probele studiate	161
11.2.2. Metoda biocristalizării	162
11.3. Rezultate	162
11.3.1 Serii de degradare pentru ape carbogazoase, acid-carbonice	162
Balványos izvor Transilvania	162
Băile Chirui	163
Corund izvorul Diovapa	164
Covasna izvorul Elvira	165
Harghita-băi.....	166
Băile Homorod izvorul Lobogo	167
Malnaș izvorul Mioara	167
Tușnad-sat izvorul de la muzeu	168
Borsec	169
11.3.2. Serii de degradare pentru ape cloruro-sodice sulfuroase	173
Herculane. Izvorul Diana 1 (sursa hotelului Ferdinand), Neptun 1 (sursa băile Venera), Neptun 2 (izvorul de stomac), Neptun 3	173
Herculane izvor Venera.....	175
Herculane sonda Str. Vicol	176
11.3.3. Serie de degradare pentru apă oligominerală, slab sulfuroasă, cloruro-sodică	177
Herculane sonda Scorrillo	177
11.4. Concluzii	177
12. Indicatorii de biocristalizare pentru degradarea apelor minerale la lumină.....	179
12.1. Introducere	179

12.2. Material și metodă	179
12.2.1. Probele studiate	179
12.2.2. Metodă	179
12.3. Rezultate cristalizare sensibilă	180
12.3.1. Serii de degradare la lumină și întuneric pentru Balványos izvor Transilvania	180
12.3.2. Serii de degradare la lumină și întuneric pentru Malnaș izv. Mioara	180
12.3.3. Serii de degradare la lumină și întuneric pentru Tușnad-sat izvorul de la muzeu.....	182
12.3.4. Serii de degradare la lumină și întuneric pentru Herculane izvorul Neptun 2 (izvorul de stomac)	183
12.4. Concluzii	185
12.5. Recomandări de cercetare	185
13. Indicatori de biocristalizare pentru influența naturii recipientului asupra apelor minerale	186
13.1. Introducere	186
13.2. Material și metodă	186
13.2.1. Probele studiate	186
13.2.2. Metodă	186
13.3. Rezultate cristalizare sensibilă	187
13.3.1. Serii de degradare Borsec izvorul 10 păstrat în sticlă și pet	187
13.3.2. Serii de degradare Vâlcele izvorul fabricii (sonda Elisabeta) păstrat în sticlă și pet	189
13.3.3. Serii de degradare Herculane izvor Diana 1 (sursa Hotel Ferdinand) păstrat în sticlă și pet	189
13.3.4. Serii de degradare Herculane izvorul Neptun 1 păstrat în sticlă și pet	190
13.3.5. Serii de degradare Herculane izvorul Neptun 2 (de stomac) păstrat în sticlă și pet	191
13.3.6. Serii de degradare Herculane izvor Neptun 3 (izvorul de ochi) păstrat în sticlă și pet	193
13.3.7. Serii de degradare Herculane izvor Venera păstrat în sticlă și pet	194
13.3.8. Serii de degradare Herculane sonda strada Vicol păstrat în sticlă și pet	194
13.4. Discuții și concluzii	195
14. Fișa de urmărire prin biocristalizare.....	196
14.1. Introducere	196
14.2. Material și metodă	196
14.2.1. Probele studiate	196
14.2.2. Metodă	196
14.3. Rezultate cristalizare sensibilă	197
14.3.1. Seria de concentrație etalon	197
14.3.2. Comparație sezon uscat, sezon mediu-umed și sezon ploios - Vâlcele izvorul fabricii (sonda Elisabeta)	197
14.4. Discuții și concluzii	198
15. Posibile corelații între calitatea informațională a apelor minerale studiate și proprietățile lor farmacodinamice	199
15.1. Introducere și ipoteză de lucru	199
15.2. Material și metodă	199

15.3. Rezultate	200
15.3.1. Efectele digestive ale apelor carbogazoase și aspectul centrului de cristalizare	200
15.3.2. Efectele antiinflamatoare, antisclerotice și antitumorale ale apelor cloruro-sodice și formațiunile în „stea”	200
15.4. Concluzii și recomandări	201
16. Concluzii și contribuții personale	202
16.1. Concluzii finale	202
16.2. Contribuții personale	206
Bibliografie	208

Lista lucrărilor științifice publicate

Capitol de carte

1. **Cristina-Daniela Cîmpean.** *Cristalizarea sensibilă în contextul stresului psihic.* **Capitol** În Carmen-Angela Sfrângeu, Citto-Iulian Tăiescu, Cristina-Daniela Cîmpean, Ioana-Marieta Jurcău, Nicolae Alexandru Colceriu; coord.: Ramona-Niculina Jurcău. *Apiterapia, fitoterapia și aromaterapia în contextul stresului psihic.* Editura Argonaut, Cluj-Napoca. 2018. ISBN 978-973-109-765-7 (vezi anexa 2).

Articole publicate în reviste de specialitate

1. **Cristina-Daniela Cîmpean,** Mihai Berteanu. *The Influence of Natural Saline Solutions on Dihydrate Copper Chloride Crystallization.* Revista de Chimie (Rev. Chim.), 2020, Volume 71, Issue 2, 110-114.
<https://revistadechimie.ro> ; <https://doi.org/10.37358/R.C.20.2.7901>

Revista de chimie: Impact Factor 2018-19: 1.605; * 5-Year IF: 1.34, * CiteScore: 1.23, * SNIP: 0.710, * SJR: 0.294

2. **Cristina-Daniela Cîmpean,** Mihai Berteanu. *Biocrystallization test for early determination of oxidative stress.* Health, Sports & Rehabilitation Medicine. Vol. 21, no. 1, January-March 2020, 45–51.
<https://doi.org/10.26659/pm3.2020.21.1.45>

Health, Sports & Rehabilitation Medicine: A journal rated B+ by CNCS (Romanian National Research Council) since 2007, certified by CMR (Romanian College of Physicians) since 2003, CFR (Romanian College of Pharmacists) since 2015 and CMDR since 2018. A journal with a multidisciplinary approach in the fields of biomedical science, health, medical rehabilitation, physical exercise, social sciences. A journal indexed in international databases: EBSCO, Academic Search Complete, USA. Index Copernicus, Journals Master List, Poland. DOAJ (Directory of Open Access Journals), Sweden. CiteFactor, Canada/USA. CrossRef, Lynnfield, MA (US)/Oxford (UK).

Lucrări prezentate la manifestări științifice

1. **Cristina-Daniela Cîmpean**, Cornel Hoțiu. *Informational variations of bee-keeping products depending on the storage conditions*. The XthCongress of Apitherapy|Sibiu | Romania | 6-10thOct 2017
2. **Cristina-Daniela Cîmpean**. *Corelații între tiparele informaționale și proprietățile terapeutice ale plantelor medicinale*. Al IX-lea Congres al Asociației Române a Medicilor Fitoterapeuți. 18-19.05.2018.
3. **Cristina-Daniela Cîmpean**. *Correlations between the informational patterns and the therapeutic properties of medicinal herbs and others informational changes*. Al VII-lea Simpozion de Etnofarmacologie cu participare internațională. 23-24.06.2018
4. **Cristina-Daniela Cîmpean**, Otilia Bobiș, Daniel Dezmiorean, Victorița Bonta, Cornel Hoțiu, Mihai Berteanu. *Biocristalizarea cu clorură de cupru, o posibilă metodă de analiză informațională a produselor apicole*. ApiQuality & ApiMedica 2018. 10 - 16 octombrie 2018.
5. **Cristina-Daniela Cîmpean**. *Modificări de calitate informațională a lăptișorului de matcă crud în funcție de condițiile de păstrare*. ApiQuality & ApiMedica 2018. 10 - 16 octombrie 2018.
6. **Cristina-Daniela Cîmpean**, Mihai Berteanu. *Diagnosticul precoce al leziunilor neoplazice și preneoplazice*. Al X-lea Congres al Asociației Române a Medicilor Fitoterapeuți. 19-21.05.2019

Sinteza ideilor principale

1.1.Problema fundamentală

În ultimele decenii s-au făcut progrese importante în domeniul calității alimentelor¹ adăugându-se noi dimensiuni conceptului de calitate, așa cum este de exemplu cea informațională. *Calitatea informațională* evaluează calitatea efectului exercitat de aliment la nivel epigenetic în sensul creșterii sau descreșterii entropiei sistemului organismului viu care a consumat acel aliment². În ultimele reglementări ale Consiliului European³ apa este inclusă în categoria alimentelor.

Actualmente se consideră că toate ființele vii ale planetei, inclusiv omul sunt entități informațional-energetice-substanțiale complexe care interacționează cu mediul în care trăiesc pe toate aceste nivele. Alimentele și apa modificate și degradate din punct de vedere informațional datorită prelucrării industriale excesive sau a poluării de diverse categorii, inclusiv electromagnetică sunt considerate un important factor de risc pentru starea de sănătate atât a omului cât și a celorlalte ființe vii ale planetei⁴.

Informația apei și a alimentelor odată ingerate și prelucrate metabolic devine o parte componentă a informației specifice trupului uman care modulează ulterior fenotipul prin acțiune la nivel epigenetic. Entropia informațională ridicată a alimentelor și a apei procesate și poluate este un puternic element stresant pentru matricea informațională a omului, conducând în final la tulburări ale stării de sănătate și chiar la boală. Se poate chiar afirma că apa și alimentele furnizează pe lângă substanțele nutritive cunoscute și măsurabile și *nutrienți informaționali încrustați*⁴ care interacționează la nivel epigenetic cu ADN-ul uman. Informațiile ne-naturale provenite din apă și alimente, informațiile cu un grad mare de entropie nu pot fi procesate corect și determină dezechilibre ce pornesc de la nivelul informațional epigenetic. Interesul pentru studiul calității informaționale a apelor minerale medicinale a apărut deoarece în contextul vieții contemporane din țările industrializate s-a ajuns la conceptul de *boală informațională*¹⁰.

Apele minerale terapeutice sunt un astfel de factor exogen care prin ingerare sau prin asimilare percutană declanșează în organismul uman diferite modificări metabolice care este posibil să apară prin mecanisme epigenetice, ele datorându-se mineralelor conținute în aceste ape care pot interacționa cu transcrierea ADN-ului.

Alimentele înalt procesate și industrializate suferă modificări informaționale care stau la baza apariției unei patologii noi care are ca punct de plecare sistemul imun și se traduce în apariția de afecțiuni auto-imune neîntâlnite în secolele trecute. Ele apar ca urmare a răspunsului imun întârziat la molecule diferite de cele naturale, apărute în urma procesării industriale specifice societății actuale industrializate. Modalitățile de tratament sunt încă limitate în aceste cazuri și de aceea prevenirea lor prin dezvoltarea de instrumente care să permită analiza calității informaționale a alimentelor are o importanță în creștere. Este posibil ca apele minerale medicinale să sufere modificări informaționale datorită îmbutelierii, condițiilor de transport și de depozitare care să le modifice proprietățile terapeutice. În prezent capacitatea apei de a prelua, stoca și transmite o informație fără să își modifice propriu-zis compoziția chimică se consideră că se bazează pe proprietatea ei de a forma *clusteri* moleculari.

Mecanismele prin care factorii alimentari epigenetici pot declanșa fenomene de îmbătrânire și afecțiuni degenerative (cardiovasculare, tumorale, neurologice, metabolice etc.) sunt metilările anormale ale proteinelor histonice ce reglează și coordonează transcrierea ADN-ului în ARN. În felul acesta, fără a modifica propriu-zis ADN-ul, apar modificări la nivelul ARN-ului corespondent ceea ce conduce la blocarea sintezei unei proteine sau la sinteze de proteine denaturate. În felul acesta apare un alt fenotip.

Motivația studiului calității informaționale are mai multe aspecte. În primul rând orice sistem viu își menține funcționalitatea optimă în condiții de entropie informațională cât mai redusă. Orice factor care conduce la creșterea entropiei orientează sistemul spre tulburare, boală sau îmbătrânire. Pe de altă parte reducerea entropiei direcționează spre restabilirea funcțiilor fiziologice normale și însănătoșire. Așadar, *dincolo de compoziția fizico-chimică a unei substanțe ingerate în scop alimentar sau medicinal, este importantă cunoașterea capacității acesteia de a determina la nivel informațional reducerea sau amplificarea entropiei.*

În al doilea rând apa este un element vital pentru supraviețuire, consumul ei fiind o necesitate zilnică. Tocmai din acest motiv calitatea informațională a apei ingerate are o importanță majoră, atât pentru cei sănătoși cât și pentru cei bolnavi.

În alt treilea rând, astfel de analize pot orienta și asupra posibilelor utilizări terapeutice ale apelor medicinale și pot de asemenea servi la aprecierea stabilității și implicit a valabilității apelor, dar și la determinarea consecințelor pe care le are îmbutelierea, condițiile de transport și de depozitare asupra calității informaționale a apelor medicinale.

Evidențierea și urmărirea evoluției calității informaționale a apelor medicinale în funcție de diverși factori este importantă așadar pentru siguranța alimentului, pentru industria implicată în îmbutelierea apelor medicinale, pentru industria balneară dar și pentru beneficiarii finali, respectiv pentru consumatorii care utilizează apele minerale medicinale în scop profilactic și terapeutic și care în ultimele decenii au un interes în creștere față de calitatea oricărui produs utilizat în scop alimentar sau medicinal.

Din aceste motive am căutat o metodă de analiză a calității informaționale și a gradului de entropie informațională a apelor minerale medicinale. Am identificat astfel de metode ca fiind *analizele imagistice electrofotonice* realizate de prof. Konstantin Korotkov^{5,6,7}; *electronografia*, o metodă de analiză dezvoltată de acad. Cornelia Guja^{8,9,10}; cromatografia circulară Pfeiffer care este o metodă utilizată pentru analiza alimentelor ecologice în unele laboratoare, cum este cel al Institutului de Agricultură Organică Bonn^{11,12,13}; *dinamoliza capilară*^{14,15} și *biocristalizarea*, pe care am ales-o în final.

1.2. Biocristalizarea (cristalizarea clorurii de cupru)

Metoda este cunoscută în terminologia engleză sub numele *sensitive crystallisation*, *copper chloride crystallisation* sau *biocrystallisation*, în cea germană *Kupferchlorid-Kristallisation* iar în cea franceză *cristallisation sensible* sau *cristallisation avec additifs*. Biocristalizarea este o metodă de analiză informațională folosită în domeniul calității alimentelor ecologice și biodinamice de către profesorii Johannes Kahl^{16,17,18,19,20} (Universitatea Copenhaga), Nicolaas Busscher^{21,22} (Universitatea Kassel), cercetătorul Paul Doesburg²³ (Louis Bolk Institut, Crystal Lab Holland), Jurgen Fritz²⁴ (Institutul de Agricultură Organică Bonn) împreună cu echipele acestora, alături de alții. Are aplicații și în cadrul evaluării calității informaționale a produselor apicole^{25, 26, 27} și a plantelor medicinale²⁸. Metoda a fost de asemenea utilizată și în domeniul medical pentru evaluarea stresului oxidativ²⁹, a stresului psihic³⁰ și pentru diagnosticul precoce al neoplaziilor³¹.

Stresul oxidativ reprezintă dezechilibrul balanței oxidanți/antioxidanți în favoarea oxidanților, așa cum a fost definit de Sies în 1985³². Un nivel ridicat de oxidanți poate fi rezultatul unei expuneri exogene sau al unei producții endogene crescute de specii reactive de oxigen (reactive oxygen species = ROS)³³, de specii reactive de azot cum este oxidul nitric și peroxonitritul³⁴, specii reactive de carbonil (reactive carbonyl species = RCS), specii reactive ale sulfului (reactive sulphur species = RSS) și specii reactive ale seleniului (reactive selenium species = RSeS), care depășesc capacitatea internă a mecanismelor de apărare antioxidantă sau de reparare a leziunilor produse de speciile reactive oxidante la

nivelul proteinelor, lipidelor și ADN-ului celular. Pentru evaluarea nivelului de stres oxidativ se utilizează în prezent o serie de markeri serici standardizați sau nestandardizați cum sunt gamma-glutamyl transpeptidaza, produșii de oxidare avansată a proteinelor, substanțele reactive față de acidul tiobarbituric (TBARS, thiobarbituric acid reactive substances), albumina serică, nivelul seric al acidului uric³⁵, lipoperoxizi și aldehide³⁶, particule oxidate de lipoproteine cu densitate mică (LDL), capacitatea antioxidantă totală a serului³⁷, tiolii totali și tiolii neproteici³⁸, concentrația de proteine carbonilice³⁹, hipoxantina⁴⁰ ceruloplasmina^{41, 42}. În ultimii ani concentrația de 8-Oxo-2'-deoxiguanozină și de 8-hidroxi-guanozină intracelulară este o altă metodă de evaluare a stresului oxidativ⁴³.

Astfel de determinări nu au o accesibilitate largă și nu sunt disponibile pe scară mare și tocmai de aceea descoperirea de metode simple și globale de monitorizare a stresului oxidativ cum este biocristalizarea pot fii binevenite.

Cristalizarea soluțiilor saline este puternic influențată din punct de vedere al formei și morfologiei rețelei cristaline de prezența impurităților în soluție, chiar dacă acestea sunt prezente în cantități extrem de mici. Această sensibilitate este extrem de ridicată în special în cazul soluției de clorură de cupru hidratată. Evaluarea se bazează pe morfologia rețelei de clorură de cupru care cristalizează într-o placă Petri ce conține un film subțire din această soluție la care s-a adăugat o cantitate redusă de substanță de analizat. La fel ca în situația electronografiei și în acest caz se generează modele morfologice arhetipale ce sunt puse în legătură cu substratul informațional propriu substanței analizate pe această cale, chiar dacă fenomenul prin care este posibil acest lucru nu este complet elucidat.

În mod obișnuit, clorura de cupru pură cristalizează ortorombic sub formă de ace fine aglomerate în depozite, spre periferia unei plăci Petri, fără a da naștere deloc unor forme curbe sau dendritice^{44, 45}.

Însă, dacă la soluția de clorură de cupru se adaugă o cantitate relativ mică de substrat biologic, este inhibată complet formarea de cristale aciculare tipice, volumul cristalelor crește de câteva mii de ori încât acoperă întreaga suprafață a plăcii Petri generând forme *curbe sau dendritice* nespecifice clorurii de cupru⁴⁶. În acest mod, în timpul cristalizării apar cristalograme reproductibile numite și *amprente specifice* de cristalizare sensibilă^{47, 48}.

Un experiment ce a analizat prin spectroscopie foto-electrică cu raze X rețeaua de clorură de cupru cristalizată dintr-o soluție ce a conținut sânge uman, a arătat că atomii specifici substratului adăugat (atomii de azot, carbon și oxigen) au fost absorbiți pe suprafața cristalelor de clorură de cupru, ceea ce arată că există un fenomen de schimb de electroni periferici cu rețeaua de clorură de cupru, dar acești atomi nu au putut fii detectați

nicăieri în cristalele de clorură de cupru. Concluzia experimentului a fost că elementele specifice substratului analizat (azot, carbon și oxigen) *influențează doar morfologia cristalizării* clorurii de cupru⁴⁹. Un alt studiu realizat în Franța a arătat că nici câmpurile electrice și magnetice nu influențează biocristalizarea⁵⁰.

Imaginile de cristalizare a clorurii de cupru sunt diferite în funcție de condițiile de experiență. Cei mai importanți parametri care influențează calitatea imaginilor sunt temperatura mediului, umiditatea mediului, diametrul plăcii de cristalizare, volumul de soluție de clorură de cupru, raportul dintre substratul adăugat și clorura de cupru, viteza de evaporare și timpul de cristalizare^{51,52}. La acești factori, Busscher adaugă și fenomenul de *dewetting* ce se referă la dezlipirea filmului soluției de clorură de cupru de placa de cristalizare, în decursul procesului de evaporare^{74,53}, fenomen care se poate datora uneori și tehnicii de spălare a plăcilor de cristalizare⁵⁴.

Formarea cristalelor este rezultatul combinării a două procese: transportul și atașarea moleculelor solubilizate la rețeaua cristalină. Patternul sau tiparul rezultat se datorează interacțiunilor moleculare cu aditivul care influențează sau chiar direcționează creșterea cristalelor⁵⁵. Remarcabila variabilitate a formelor morfologice ale cristalelor de clorură de cupru formează baza aplicațiilor sale potențiale.

Toate tipurile de aditivi, indiferent că sunt aditivi anorganici simpli sau macromoleculari sau sunt aditivi biologici de origine vegetală, animală sau umană pot influența cristalizarea clorurii de cupru. Proteinele acide influențează nucleația sau modulează morfologia cristalelor⁵⁶. Proteinele și polizaharidele au cea mai mare influență specifică. Acizii organici stimulează ramificarea și amino-acizii o inhibă. În prezența polizaharidelor cristalogramele au o structură dendritică⁵⁷. În prezența proteinelor se pot observa cristale sferulitice^{58,59,60}. Nu au fost publicate anterior cercetărilor noastre observații asupra tiparelor de biocristalizare în prezența apelor minerale.

Metoda a fost recent propusă și pentru evaluarea calității produselor alimentare la cel mai înalt nivel de integrare a conceptului de calitate, în contextul mențiunilor nutriționale (*food claims*) din Europa^{61,62}.

Datorită însemnătății ei în domeniul calității alimentelor, a fost standardizată conform cu ISO 17025, 11035 și 8587 de un consorțiu format din trei laboratoare europene: Departamentul de calitate a alimentului și cultură alimentară al Universității Kassel din Germania, Institutul Louis Bolk din Olanda și BRAD (Byodynamic Research Association) din Danemarca⁶³. Tiparele sau pattern-urile de biocristalizare specifice alimentelor pot fi evaluate prin analiză senzorială vizuală sau cu ajutorul unor mijloace

computerizate de evaluare a imaginii^{64, 65}. Evaluarea computerizată se bazează și pleacă de la criteriile utilizate pentru evaluarea senzorială vizuală. Datorită complexității tiparelor de cristalizare, evaluarea vizuală este considerată superioară pentru discriminarea diferențelor dintre imagini³³.

1.3. Ipoteza și obiectivele de lucru

Având în vedere rezultatele prezentate în literatura de specialitate cu privire la capacitatea biocristalizării de a evidenția unele dimensiuni ale calității informaționale a alimentelor ipoteza de lucru de la care plecăm este aceea că *biocristalizarea poate fi folosită în studiul calității informaționale a apelor minerale* pentru a îndeplini următoarele obiective:

1. Evidențierea diferențelor de calitate informațională specifice principalelor tipuri chimice de ape minerale;
2. Degradarea calității informaționale a apelor minerale în timp, după recoltarea de la sursă;
3. Efectele informaționale ale păstrării apelor minerale recoltate de la sursă în diferite tipuri de recipiente;
4. Influența expunerii la lumină solară asupra calității informaționale a apelor minerale recoltate de la surse;
5. Corelația dintre calitatea informațională și proprietățile farmacodinamice ale apelor minerale naturale.

1.4. Metodologia cercetării

1.4.1. Probele studiate

Deoarece teritoriul României are o alcătuire geologică complexă, prezintă și o gamă deosebit de largă de ape minerale, fiind studiate câteva mii de izvoare care includ aproape toate tipurile de ape minerale. Plinius cel bătrân observase cu înțelepciune: *Talles sunt aquae quales sunt terrae (Astfel sunt apele cum sunt pământurile prin care curg)*. Ținând cont de compoziția chimică, apele minerale din România pot fi grupate în trei tipuri predominante, strâns legate de alcătuirea geologică a solurilor din care izvorăsc: ape sărate, ape sulfuroase-sulfatate și ape acid-carbonice⁶⁶.

Din această varietate chimică deosebită de ape minerale de pe teritoriul României am ales să testăm prin biocristalizare ape acid-carbonice de origine vulcanică din Carpații

Orientali (Călimani-Gurghiu-Hargita) și ape cloruro-sodice și sulfuroase din zonele Căciulata-Călimănești și Băile Herculane.

În această lucrare au fost studiate 55 de surse de ape minerale dintre care 53 sunt izvoare naturale sau amenajate și 2 sunt ape medicinale îmbuteliate. Un număr de 36 de surse sunt carbogazoase și 19 sunt cloruro-sodice, dintre care unele sunt și sulfuroase sau sulfatate. Din aceste surse au fost recoltate și studiate în perioada 2017-2020 un număr de 93 de probe de ape, pentru care au fost realizate în total 991 de plăci de cristalizare (incluzând martorii).

1.4.2. Metodologia biocristalizării

Pentru soluția de clorură de cupru am folosit clorură de cupru dihidratată (CCD) ACS, Reag. Ph. Eur. de la Merck și apă bidistilată de uz medical, obținută comercial. În unele determinări cum este cea a AND-ului s-a folosit apă ultrapură. Substratul analizat au fost probele de ape minerale menționate în secțiunea 5.1. Pentru cristalizare au fost folosite plăci Petri din sticlă cu diametrul de 8 cm, Anumbra. Pentru curățare plăcile au fost menținute 24-48 de ore în soluție de acid fosforic 5 %, apoi spălate în mod repetat în apă caldă, apă rece și în final în apă distilată. Pentru fiecare placă de cristalizare s-a preparat o soluție din 0,07 g clorură de cupru. Volumul total per placă a fost în primele experimente de 5 ml, iar ulterior de 4 ml. Plăcile Petri conținând soluția de cristalizat au fost menținute 14-18 ore într-o incintă de cristalizare la o temperatură constantă de 30° Celsius și o umiditate relativă de 53%. Incinta de cristalizare folosită a fost un model inspirat din Andersen⁹² și Barth⁶⁷, monitorizată permanent în ceea ce privește temperatura și umiditatea. Pentru a asigura evaporarea s-a folosit un dezumidificator cu o capacitate de 250 ml pe zi.

Pentru a determina amprentele specifice de cristalizare au fost realizate serii de concentrație conform cu Andersen 2003⁶⁸ cu raporturi diferite de substrat și clorură de cupru, iar ulterior pentru a avea semnificație statistică și reproductibilitate, pentru fiecare probă s-au realizat minim 3 plăci de cristalizare la raportul optim ce permite exprimarea amprentei specifice. Cu scopul de a urmări variabilitatea tiparelor în funcție de factorii legați de depozitare, testele au fost repetate în timp periodic, păstrând probele ermetic închise, depozitate la întuneric, iar în unele teste o parte din probe au fost expuse și la lumină. După încheierea procesului de cristalizare fiecare placă a fost fotografiată cu un aparat fotografic Canon 550D, folosind un obiectiv Canon 18-55 mm IS-STM, și un obiectiv Canon Macro Lens EF 100mm f/2,8 USM cu filtre circulare de polarizare Kenko.

Toate plăcile au fost fotografiate pe un panou cu led pentru fotografie de produs, modificat și prevăzut cu filtru de polarizare vertical.

Interpretarea amprentelor de biocristalizare obținute în experimentele realizate de noi a fost realizată conform cu ISO 17025, 11035 și 8587 de un grup de lucru format din 10 membri experimentați și neexperimentați, care a realizat lista de criterii necesare, a construit o scală de interpretare și după ce s-a antrenat în utilizarea ei a realizat evaluarea în două etape la distanță de o lună între ele.

1.4.3. Analiza statistică

Centralizarea notelor de evaluare senzorială vizuală a amprentelor specifice de biocristalizare a fost realizată cu ajutorul softului Excel. Datele au fost prelucrate în Excel pentru a obține mediile aritmetice pentru fiecare criteriu de analiză și pentru fiecare probă studiată. Au fost realizate grafice folosind Excel pentru a reda capacitatea biocristalizării de a diferenția tiparele morfologice corespunzătoare tipurilor chimice principale și secundare de ape minerale studiate și s-a utilizat funcția TTEST din Excel pentru a calcula valoarea p . Au fost de asemenea realizate grafice pentru a urmări diferențele de compoziție chimică dintre datele cunoscute (afișate la surse sau ultimele date publicate în literatură) și cele determinate experimental în studiu pentru a corela cât mai corect rezultatele obținute prin biocristalizare cu compoziția chimică a probelor studiate.

1.5. Sinteza capitolelor

1.5.1. Capitolul 6. Determinarea tiparelor de biocristalizare specifice apelor minerale

Ipoteza de lucru: principalele categorii de ape minerale studiate pot avea tipare specifice de cristalizare sensibilă, în funcție de specificul geologic al izvoarelor.

Obiective specifice: 1) deoarece aceasta este prima lucrare despre aplicarea biocristalizării în analiza apelor minerale, primul obiectiv a fost *construirea unui instrument de interpretare* a amprentelor de biocristalizare obținute pentru probele de ape minerale analizate; 2) *diferențierea tiparelor specifice* de cristalizare sensibilă pentru principalele categorii de ape minerale studiate; 3) stabilirea *indicatorilor de cristalizare* sensibilă ce pot fi utilizați în caracterizarea principalelor tipuri de ape minerale din România.

Înțelegerea influenței tuturor factorilor fizico-chimici asupra procesului cristalizării soluției de clorură de cupru este foarte important. Cu scopul de a elucidă o parte dintre aceste aspecte am analizat prin biocristalizare o serie de 55 de surse de ape minerale pentru care au fost recoltate 93 de probe de ape, pentru care au fost realizate în total 991 de plăci

de cristalizare (incluzând martorii), urmărind influența pe care aceste probe o au asupra morfologiei rețelei de clorură de cupru. Examinând aceste analize au fost observate tipare sau pattern-uri specifice corelabile cu compoziția chimică și reziduul sec al apelor analizate. Rezultatele obținute pot fi extrapolate în domeniul agro-alimentar și medical, contribuind astfel la o interpretare corectă a testului biocristalizării.

Pentru stabilirea scalei de interpretare au fost urmați pașii specifici standardizați de către Huber în 2010³³ pentru analiza alimentelor. Am constituit un grup de lucru din 10 membri experimentați și neexperimentați, condus de un coordonator conform cu ISO 11035 care prevede grupuri de minim 6 membrii. Grupul a urmat apoi prevederile ISO 11035 pentru analiza senzorială, respectiv a identificat un număr cât mai mare posibil de termeni descriptivi care au fost sortați preliminar și au fost reduși în final la o listă de 14, deoarece acest ISO prevede maximum 15 descriptori specifici. Fiecărui termen i-a fost acordat un sens după care a fost cuantificat pe o scală de la 1 la 9, unde 1 reprezintă exprimarea minimă a aceluia criteriu, iar 9 este exprimarea maximă. Sensul acordat criteriilor de analiză vizuală a fost inspirat din Meelursarn 2007⁶⁹ și Szulc 2009⁷⁰. În continuare au fost alese imagini de referință pentru scala de intensitate, atât pentru cele două extreme (1 și 9) cât și pentru valorile medii (4 și 7), iar la unele criterii care au necesitat aceasta chiar și alte valori intermediare. Grupul a fost apoi pregătit pentru a utiliza această listă redusă și în final au fost efectuate testele de evaluare. Conform cu ISO 8595 coordonatorul grupului a codificat imaginile alese pentru evaluare și le-a prezentat aleator grupului de lucru. Imaginile alese pentru evaluare și rezultatele evaluărilor au fost transmise prin e-mail.

Expresia grafică a capacității biocristalizării de a diferenția apele acid-carbonice (AC) de cele cloruro-sodice (CS), urmărind mediile notelor tuturor evaluatorilor după cele două sesiuni este redată în Figura 6.3. din care se constată o capacitate foarte bună a biocristalizării de a face diferența între ele. În tabelul 6.16. pot fi urmăriti principalii indicatori de biocristalizare ce diferențiază apele acid-carbonice de cele cloruro-sodice și sulfuroase.

Pentru analiza statistică s-a calculat folosind funcția TTEST din Excel valoarea p pentru aceste medii și s-a obținut o foarte bună semnificație statistică, în ambele etape, mai bună în a doua etapă: t-test 1: $p\text{-value (one tailed)} = 2.98501E-10 = 0.000000000299$; t-test 2. $p\text{-value (two tailed)} = 5.97002E-10 = 0.000000000597$.

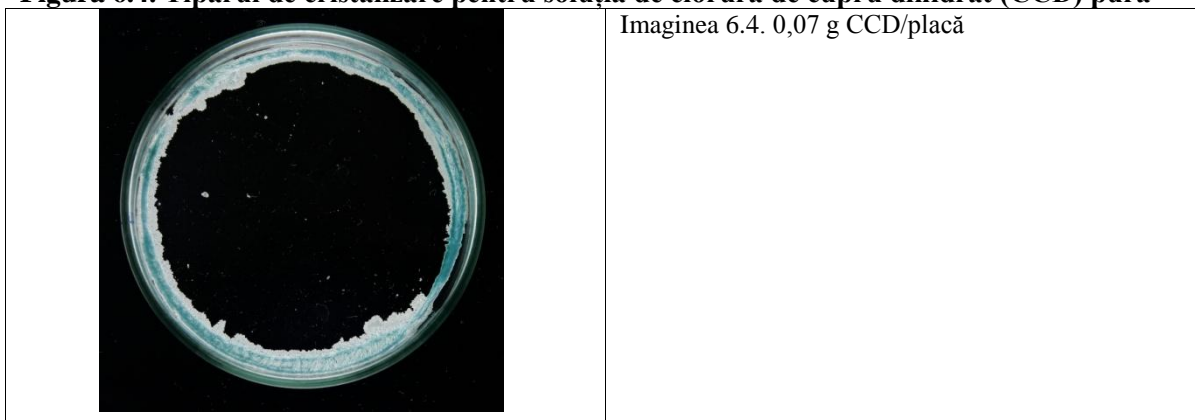
Tiparele de biocristalizare obținute pentru toate cele 93 de probe studiate sunt net diferite de tiparul specific clorurii de cupru pure (vezi figura 6.4).

Patternul specific pentru apele acid carbonice comparativ cu cel specific matorului care este soluția de clorură de cupru în apă distilată este caracterizat de o foarte bună centrare și coordonare a imaginii (figura 6.5a, b) cu ramuri dendritice (curbe) și cu o foarte bună structură și textură (figura 6.5c), motiv pentru care l-am numit *tipar specific dendritic* (TSD)⁷¹. Aceste imagini au un aspect foarte interesant și neașteptat deoarece sunt similare substanțelor organice, în mod special florilor, frunzelor și plantelor aromate, așa cum a fost observat în literatură de numeroși autori⁷². De asemenea, tendința către acest pattern a fost observată la plantele care cresc pe soluri calcaroase.




În cazul apelor sulfuroase se constată o inhibiție puternică a creșterilor dendritice cristaline. Imaginile au tendința mai ales în primele zile de la recoltarea probelor să fie multicentrice, lipsite de coordonare și tiparul principal este format din ramuri drepte de cristalizare care sunt grupate în formațiuni sub formă de „stea” (figura 6.6a, b, c). Acest aspect are unele similarități cu imaginile acizilor aminați în mod special cu aminoacizii tiolici sau cu cei sulfatați²¹. L-am numit *tipar specific multicentric* (TSM).

Pentru apele cloruro-sodice calcice analizate tiparul obținut deși este centrat este mai slab coordonat și de aceea l-am numit *tipar specific slab coordonat* (TSSC). Structura și textura sa sunt slab individualizate, ramurile principale sunt fragile și transparente. (figura 6.7a, b, c)

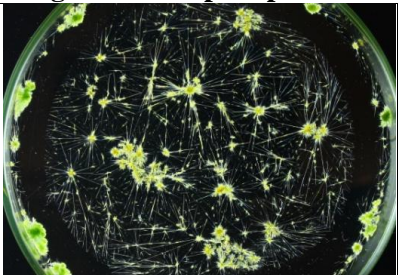
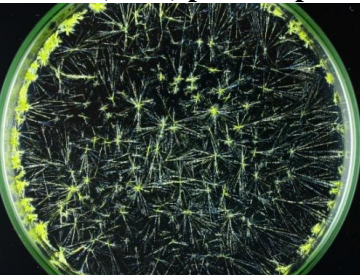
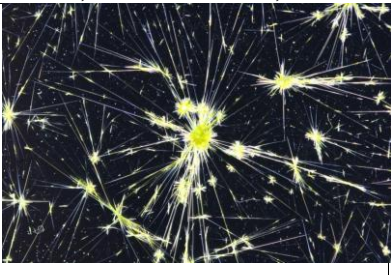
Figura 6.4. Tiparul de cristalizare pentru soluția de clorură de cupru dihidrat (CCD) pură



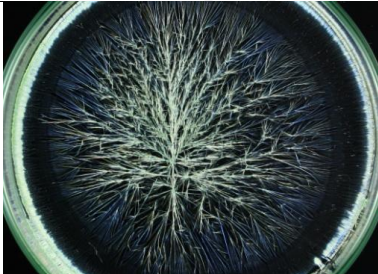
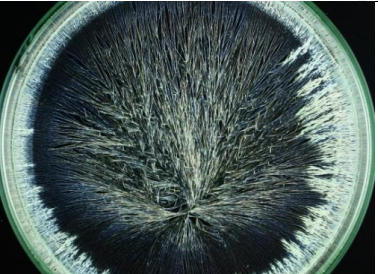

Imaginea 6.5. Tiparul dendritic specific (TSD) pentru ape minerale bicarbonatate, carbogazoase, calcice, magneziene, sodice

		
Imaginea 6. 5a. TSD pentru apa Vâlcele: 0,07 g/4,6ml/0,4 ml (CCD /apă minerală/ apă minerală per placă)	Imaginea 6.5b. TSD pentru Borsec izvor 6: 0,07 g/4,6ml/0,4 ml (CCD /apă minerală/ apă minerală per placă)	Imaginea 6. 5c. detaliu 6.5b

Imaginea 6.6. Tipar specific multicentric (TSM) pentru ape sulfuroase, cloruro-sodice, calcice

		
Imaginea 6.6a. Tipar specific multicentric (TSM) pentru izvor Herculane – Neptun 2; 0,07 g/4,6 ml/0,4 ml (CCD /apă minerală/ apă bidistilată per placă)	Imaginea 6.6b. TSM pentru Căciulata – 1; 0,07 g/4,6ml/0,4 ml (CCD /apă minerală/ apă bidistilată per placă)	Imaginea 6.6c. detail 6.6a

Imaginea 6.7. Tipar specific slab coordonat (TSSC) pentru ape cloruro-sodice calcice (CS)

		
Imagine 6.7a. tipar specific slab coordonat (TSSC) pentru Călimănești 7; 0,07 g/ 4,6ml/ 0,4 ml (CCD /apă minerală/ apă bidistilată per placă)	Imagine 6.7b. TSSC pentru Căciulata 2; 0,07 g/4,6ml/ 0,4 ml (CCD /apă minerală/ apă bidistilată per placă)	Imagine 6.7c. detaliu imagine 6.7a

Tiparele observate pot fii generate și corelate cu compoziția chimică a apelor minerale dar nu putem cunoaște în totalitate mecanismele implicate și dacă doar interacțiunile chimice pot explica acest fenomen.

1.5.2. Capitolul 7: Corelații între tiparele de biocristalizare și analizele fizico-chimice ale apelor minerale

Ipoieza de lucru: *există corelații între morfologia biocristalizării și compoziția chimică a substratului analizat.*

Obiective: observarea posibilelor corelații dintre morfologia cristalizării clorurii de cupru și compoziția chimică a apelor studiate.

În acest studiu au fost cercetate 10 surse de ape minerale din care au fost recoltate probe cu ajutorul laboratorului mobil al echipei Facultății de Științe a Universității Lucian Blaga din Sibiu. Aceste probe au fost analizate în mai multe etape.

În cadrul laboratorului Centrului de Cercetare în Ecologie Aplicată al Universității Lucian Blaga din Sibiu următorii indici au fost determinați, menționându-se pentru fiecare metoda utilizată: ADN, Azot, Calciu, Clor, Conductivitate, Fier, Magneziu, Mangan, Oxigen, pH, Potasiu, Reziduu Sec, Sodiu, Turbiditate.

Cantitatea de ADN a fost extrasă prin filtrarea a 1 litru de apă prin filtre cu porozitate de 0.45 45 μm , apoi filtrele fiind supuse extracției de ADN folosind kitul comercial Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep (Zymo)⁷³. După extracție cuantificarea s-a realizat folosind spectrofotometrul Specord 210 plus (Analytik Jena) citind absorbanta la 260 nm specifică nucleotidelor. A urmat analiza **16S metabarcoding**. Gena pentru ARN ribozomal 16S a fost amplificată utilizând amorse oligonucleotidice specifice pentru regiunea V3-V4. Au fost adăugați adaptorii pentru producția PCR pentru a crea o librărie probă specifică. Adaptorii conțin o secvență specifică ce permite secvențializarea comună a mai multor probe în același timp. Librăriile 16S au fost secvențializate utilizând platforma Illumina MySeq la LGC Group.

Analiza imaginilor de cristalizare și a datelor fizico-chimice a fost realizată cu programul R 3.6.3⁷⁴ în care au fost utilizate următoarele pachete: magick⁷⁵ și EBImage⁷⁶ pentru a importa imaginile și a construi un set de vectori reprezentativi pentru fiecare imagine; Hmisc⁷⁷ și pvclust⁷⁸ au fost utilizate pentru generarea de distanțe Euclidiene și pentru obținerea dendrogramelor bazate pe aglomerare de tip Nearest Neighbor din cazul valorilor fizico-chimice; pachetul corrplot⁷⁹ a fost utilizat pentru obținerea corelogramelor bazate pe metoda Spearman din cazul valorilor fizico-chimice, fiind prezentate valorile rho și p ; optCluster⁸⁰, fpc⁸¹, dendextend⁸² ce au fost utilizate în obținerea dendrogramelor din cazul imaginilor de cristalizare prin gruparea imaginilor (vectorilor reprezentativi) folosind metoda de aglomerare ierarhică implementată în optCluster și metoda Nearest Neighbor pentru construirea dendrogramelor.

Datele obținute pentru ADN comunități bacteriene din apă au fost analizate pentru diferiți indici de alfa diversitate și pentru diverse analize după cum urmează: 1) OTU observate (unități taxonomice operaționale)⁸³; 2) Shannon⁸⁴. 3) Simpson și Simpson Evenness⁸⁵. 4) Distanțe Euclidiene folosind metode de grupare Nearest Neighbour⁸⁶.

Este pentru prima dată când se realizează în literatura națională și internațională determinări cantitative ale AND-ului în apele minerale.

În urma analizelor realizate la Universitatea Lucian Blaga din Sibiu am constatat la probele studiate diferențe de compoziție chimică față de datele prezentate în literatură.

Concluzii analize fizico-chimice

1. În ceea ce privește parametri generali ai apei turbiditatea și oxigenul dizolvat nu apar în literatura națională și internațională conform cu analiza bibliografică făcută de noi. Aluminiul, arsenul și manganul sunt microelemente care nu apar în literatura analizată în bibliografie și nu sunt afișați la cele 10 surse.

2. Litiul nu a fost determinat anterior pentru niciuna din probele studiate. Însă niciuna nu se încadrează în categoria apelor litinifere, care prevede un minim de 3 mg litiu la litru, însă avem ape care se apropie de aceasta: respectiv Tușnad izvorul Apor cu 1,72 mg/l, Vâlcele izvorul de la școală cu 1,4 mg/l și Vâlcele izvorul fabricii cu 1,28 mg/l.

3. Mineralizarea oricărui izvor poate prezenta variații în limitele definitorii ale grupei din care face parte respectivul izvor, legate de factorii meteorologici și seismicitate. Din observațiile din literatură aceste variații pot fi de 15-25%. În urma studiului nostru am constatat variații mai mari de 25% în următoarele situații: conținutul de nitrați la Căciulata 1 și 2, Călimănești 14, 4 și 8; conținutul de sulfati la Căciulata 1 și 2, Călimănești 14, 4, 5, 7, și 8, Tușnad Apor; reziduu sec la Căciulata 1, Călimănești 7 și 8, Tușnad Apor și Vâlcele școală și fabrică; conductivitate Căciulata 1; oxigen dizolvat la Călimănești 14 și 7; Creștere a conținutului de sodiu la Căciulata 1 cu 61,37%, scăderea cu 93,01 % la Călimănești 7, cu 40,35 % la Călimănești 14, cu 27,27 % la Călimănești 4 și cu 25, 44 % la Călimănești 5; Creștere deosebit de mare a conținutului de potasiu la Călimănești 5 cu 1625,71%, creștere cu 250% la Căciulata 1, cu 171,92 % la Călimănești 8, cu 156% la Căciulata 2, cu 146,67 % la Călimănești 14, cu 105% la Călimănești 7, cu 92,8% la Călimănești 4, cu 54% la Vâlcele școală și o reducere de 37,37% la Tușnad Apor; Creștere a conținutului de magneziu cu 223.64% la Căciulata 1 și o reducere de 25,2 % la Vâlcele școală; Creștere a conținutului de calciu în toate apele studiate dar mai ales la Căciulata 1 cu 389.08%, Călimănești 8 cu 80,45%, Călimănești 7 cu 65,47%, Călimănești 5 cu 43,87%, Călimănești 14 cu 33,88%; Reducere a conținutului de fier cu 83, 86% la apa

Căciulata 1, cu 79,6 % la Călimănești 5, cu 98,55 % la Vâlcele izvorul fabricii, cu 80,45 % la Călimănești 8, cu 41,62% la Tușnad Apor, cu 97,9 % la Vâlcele școală și o creștere cu 575% la Călimănești 14. Diferențele cele mai mari le avem la probele Căciulata 1 și Vâlcele.

Biocristalizarea celor 10 probe analizate

În urma procesului de evaluare vizuală a imaginilor de cristalizare sensibilă obținute pentru cele 10 probe de ape analizate, am constatat următoarele: 1) Biocristalizarea poate diferenția cele două categorii principale de ape minerale, respectiv apele acid carbonice de cele cloruro-sodice. 2) Reziduul sec minim la care testul a format imagini în acest studiu este de 370 mg/l (1, 332 mg RS/70 mg clorură/placă) pentru proba Călimănești 7, dar este posibil să permită și la un RS mai mic, 3) Se disting tipare specifice corelate cu compoziția chimică predominantă a apelor minerale studiate. Testul face diferența între apele cloruro-sodice sulfuroase, apele bicarbonatate cloruro-sodice, apele cloruro-sodice bicarbonatate, apele oligominerale și apele acid carbonice care au fost analizate în acest studiu. 4) Rezultatele evaluării senzoriale vizuale se corelează cu cei 14 indici fizico-chimici determinați ADN, Azot, Calciu, Clor, Conductivitate, Fier, Magneziu, Mangan, Oxigen, pH, Potasiu, Reziduu Sec, Sodiu, Turbiditate. 5) Rezultatele evaluării vizuale senzoriale se corelează cu evaluarea computerizată a imaginilor de cristalizare sensibilă care a fost realizată în programul R 3.6.1. cu următoarele pachete: magick, EBImage, optCluster, fpc, dendextend, chiar și în condițiile în care datorită limitării capacității de calcul ale procesoarelor folosite s-au folosit imagini la o rezoluție mică. Dacă s-ar fi putut folosi pentru interpretarea computerizată sisteme de calcul mai performante, precizia ar fi putut fi și mai mare.

1.5.3. Capitolul 8: Influența reziduuului sec asupra biocristalizării

Ipoteza de lucru de la care am plecat în acest studiu este aceea că *reziduuul sec al apelor minerale influențează morfologia biocristalizării.*

Obiectivul specific este observarea tiparelor de biocristalizare generate la variații ale reziduuului sec.

În acest studiu au fost analizate 24 probe de ape minerale pentru care s-au realizat 57 de serii de cristalizare. Pentru a urmări legătura dintre reziduuul sec și morfologia amprentelor de cristalizare sensibilă este importantă realizarea *seriilor de concentrație*, respectiv efectuarea de experimente în care se realizează în aceeași zi, în aceleași condiții

de laborator, serii de minim 3 plăci cu un raport diferit între substratul analizat și clorura de cupru.

Din studiul seriilor de concentrație putem deosebi 5 categorii principale de amprente:

- 1) *Amprenta de supraconcentrație*: indiferent de tipul chimic al apei este o imagine multicentrică. Putem observa un pattern diferit la apele cloruro-sodice de cele acid carbonice.
- 2) *Amprenta specifică*: la apele bicarbonatate este unicentrică și prezintă gradul maxim de ordonare și simetrie specific sursei respective.
- 3) *Amprenta de subconcentrație*: sunt diferite tipuri de imagini cu diverse grade de dezorganizare față de amprenta specifică.
- 4) *Amprenta nespecifică*: o categorie de amprentă morfologică ce apare la apele oligominerale indiferent de subtipul lor chimic.
- 5) *Amprenta similară martorului*: imagine morfologică caracteristică soluției de clorură de cupru pură în apă distilată.

Seriile de concentrație observate au fost diferite ca și tipar în funcție de tipul chimic al apei minerale.

Reziduul sec influențează cristalizarea sensibilă. În paralel cu reducerea sa se reduce ordonarea, centrarea și radiația amprentei de cristalizare în cazul apelor acid-carbonice și al unora cloruro-sodice simple sulfuroase, iar în cazul apelor cloruro-sodice sulfuroase de la Călimănești apar arii de *dewetting* respectiv se reduce suprafața acoperită cu cristale.

Apele cloruro-sodice sulfuroase Călimănești 5 și 8 nu formează imagini centrate și ordonate, indiferent de RS. Prezența bicarbonatului într-un raport minim permite apariția de imagini centrate și ordonate tipice pentru amprentele specifice care apar și la organismele vii animale sau vegetale. Apele bicarbonatate formează imagini ordonate și centrate la un RS mult mai mic decât cele cloruro-sodice. Amprenta de cristalizare sensibilă este specifică tipului și subtipului chimic al apei. Variațiile de reziduu sec și de raporturi ionice din apele minerale pot fi urmărite cu ajutorul cristalizării sensibile, prin comparație cu imaginea standard aleasă drept etalon pentru fiecare tip sau subtip chimic.

Fenomenul prin care sub un anumit prag de diluare cu apă distilată nu mai apar amprente specifice, chiar și dezorganizate, este inexplicabil din punct de vedere al RS. Practic o apă oligominerală cum este Herculane 7 izvoare calde, deși are un reziduu sec extrem de mic este capabilă să impresioneze clorura de cupru și să genereze amprente de cristalizare la o concentrație de zece ori mai mică decât proba Vicol diluată. Este oare vorba despre informația pe care o conține apa oligominerală?

1.5.4. Capitolul 9: Influența unor săruri de calciu și magneziu asupra biocristalizării clorurii de cupru

Ipoteza de lucru: *sărurile de calciu și magneziu prezente în apele minerale pot influența cristalizarea clorurii de cupru dihidrat.*

Obiective specifice: observarea morfologiei generate de sărurile de calciu și magneziu la concentrațiile specifice unor ape minerale cuprinse în studiu în capitolele anterioare.

Sărurile testate au fost clorură de calciu, clorură de magneziu, clorură de sodiu, sulfat de magneziu, carbonat de magneziu, carbonat de calciu, bicarbonat de sodiu. Concentrațiile alese au fost similare cu cele întâlnite în probele Căciulata 1, Călimănești 5, 7 și 8, Herculane Neptun 1, Herculane Diana 1, Herculane sonda strada Vicol, Vâlcele izvorul fabricii și Borsec 10. Practic am ales pentru studiu aceste ape deoarece ele prezintă cele mai mari concentrații din sărurile selectate.

Pentru fiecare soluție au fost realizate minim 3 plăci de cristalizare omoloage, în aceleași condiții experimentale (zi, temperatură, umiditate, durată de timp, diametrul plăcii, volumul soluției testate, soluții folosite).

Concluzii: Prezența carbonaților chiar și într-un raport minim permite apariția de imagini centrate și ordonate tipice pentru amprente specifice care apar și la organismele vii animale sau vegetale. Posibil din acest motiv apele bicarbonatate formează imagini centrate și ordonate la un RS mult mai mic decât cele cloruro-sodice în timp ce unele ape cloruro-sodice nu formează astfel de imagini indiferent de RS. Clorurile de calciu și magneziu, precum și sulfatul de magneziu nu influențează semnificativ biocristalizarea la concentrațiile specifice apelor minerale.

1.5.5. Capitolul 10: Indicatori de biocristalizare ai degradării cauzate de factorul timp la ape minerale cu reziduu sec determinat

Se cunoaște faptul că apele minerale recoltate suferă un așa-numit proces de metaplazie după recoltarea de la sursă termen care definește modificările fizico-chimice și farmacodinamice ale apelor minerale cauzate de factorul timp, de contactul cu aerul atmosferic după recoltare, de procesele specifice îmbutelierii și transportului. Acest proces în cazul unor ape este mai rapid, iar la altele este mai lent. Urmărirea metaplaziei apelor se realizează în mod obișnuit tot prin analize fizico-chimice și farmacodinamice. Am urmărit în acest capitol capacitatea biocristalizării de a observa metaplazia apelor minerale.

În acest studiu au fost urmărite 10 probe de ape minerale analizate în 35 de serii.

Concluzii: 1) Constatăm din experimentele realizate faptul că cele două tipuri chimice principale de ape minerale studiate, respectiv apele cloruro-sodice sulfuroase și cele acid-carbonice se degradează rapid și semnificativ în primele zile după recoltare, fapt care poate fi pus în evidență prin biocristalizare. 2) Apa Căciulata 2 prezintă cea mai bună stabilitate în timp din punct de vedere al amprentei de cristalizare sensibilă. Ca indicatori de degradare prezintă o ușoară reducere a radiației și a densității ramurilor periferice, precum și apariția de agregate cristaline amorfe în periferie. 3) Indicatorii de degradare sunt diferiți în funcție de tipul chimic al apei. 4) La apele cloruro-sodice sulfuroase indicatorii de degradare sunt: reducerea numărului centrilor de cristalizare cu aspect tipic de *steluță*, specifici sulfurii, formarea în periferie a unei benzi tot mai late de ramuri fine ce se pot datora bicarbonatului prezent într-un raport mic în aceste ape și care devine tot mai evident o dată cu trecerea timpului, pe măsură ce sulfurul liber se pierde, reducerea treptată a suprafeței plăcii acoperite de cristale. 5) În cazul apelor acid-carbonice indicatorii de degradare observați sunt reducerea treptată a delimitării trunchiurilor și ramurilor de cristalizare, reducerea umplerii cu ramificații secundare, reducerea radiației, a centrării, a coordonării, a entropiei de ansamblu. 6) Apele oligominerale prezintă și ele fenomene de degradare, principalii indicatori fiind reducerea coordonării și a radiației (suprafața acoperită cu tiparul imprimat de centru), reducerea densității ramificațiilor secundare la nivelul ramurilor centrale și periferice, în banda marginală apar condensări, pot apărea fenomene de *dewetting*.

1.5.6. Capitolul 11: Indicatori de biocristalizare ai degradării cauzate de factorul timp asupra altor probe de ape minerale

În acest studiu am urmărit indicatorii de degradare în cazul unor ape minerale la care din motive tehnice nu au fost posibile realizarea de analize fizico-chimice în paralel. Am considerat important acest studiu pentru a extinde rezultatele obținute în capitolul 10 la un număr suplimentar de probe. Ipoteza de lucru și obiectivele specifice sunt aceleași cu cele din capitolul 10.

În acest studiu au fost cuprinse 24 probe de ape minerale 67 de serii.

Concluzii: Biocristalizarea permite evaluarea stabilității apelor minerale în timp. Dintre apele studiate în această lucrare cele mai stabile în timp și care din acest motiv pot fi îmbuteliate sunt izvoarele Borsec, izvoarele Vâlcele, Căciulata 2, Neptun 2 (păstrate în sticlă ermetică, fără aer, la întuneric). Ape foarte instabile, care pot fi așadar folosite doar la sursă, sunt majoritatea apelor sulfuroase, iar dintre cele carbogazoase Corund și Harghita, chiar dacă sunt păstrate în sticle ermetice închise, la întuneric.

1.5.7. Capitolul 12: Indicatorii de biocristalizare pentru efectele expunerii apelor minerale la lumină

Adeseori în procesul de transport și de depozitare, apa minerală poate fii expusă la lumină. Pentru a verifica **ipoteza** conform căreia *cristalizarea sensibilă poate evidenția metaplazii ale apelor minerale expuse la lumină solară* am realizat următorul studiu în care obiectivul specific a fost urmărirea indicatorilor de degradare oferți de biocristalizare în cazul unor ape minerale.

Au fost analizate 4 probe de ape minerale pentru care s-au realizat 21 de serii de lucru ce au totalizat un număr de 84 de plăci de cristalizare, excluzând martorii.

Rezultate: 1) Cristalizarea sensibilă poate evidenția o accentuare a degradării la probele expuse la lumină solară față de cele păstrate la întuneric în cazul apelor studiate. 2) La apele carbogazoase studiate (Balványos, Malnaș Mioara, Tușnad-sat) constatăm accentuarea următorilor indicatori de degradare după expunerea la lumină solară: reducerea radiației, a delimitării și densității tulpinilor precum și apariția de ace transversale, cel mai important indicator fiind reducerea densității ramurilor de cristalizare. 3) În cazul probei de apă cloruro-sodică sulfuroasă Neptun 2, după expunerea la lumină solară se reduce considerabil radiația și integritatea, apare o scădere importantă a delimitării și densității ramurilor de cristalizare.

1.5.8. Capitolul 13: Indicatori de biocristalizare pentru influența naturii recipientului asupra apelor minerale

În aceste experimente am plecat de la **ipoteza** că *apa poate reacționa diferit în sensul unei degradări diferite dacă este păstrată la întuneric în recipient de sticlă sau de plastic.*

Obiective: stabilirea indicatorilor de biocristalizare specifici degradării ce apare în cazul apelor minerale păstrate în pet față de cele păstrate în sticlă.

Au fost studiate 8 probe de ape minerale, pentru care s-au realizat în total 27 de serii de cristalizare ce au cuprins 144 de plăci de cristalizare, excluzând martorii. Pentru a testa ipoteza de studiu probele studiate au fost recoltate direct de la sursă atât în recipiente de sticlă cât și în recipiente de plastic. Toate aceste mostre au fost păstrate la întuneric și analizate ulterior în aceeași zi, în aceleași condiții experimentale.

Rezultate: Degradarea observată în timp este mai importantă în cazul păstrării în pet

1.5.9. Capitolul 14: Fișa de urmărire prin biocristalizare

Ipoteza de lucru în acest studiu este că *biocristalizarea poate pune în evidență variații de reziduu sec și compoziție chimică predominantă.*

Obiectiv specific: realizarea unui model de fișă de urmărire a unei surse naturale de apă minerală.

Material și metodă: sursa Vâlcele, sonda Elisabeta (izvorul fabricii) din care au fost recoltate mai multe probe în condiții de climat ploios și în climat uscat, pentru a urmări variațiile de reziduu sec date de climat. Probele au fost analizate cât mai curând posibil după recoltare.

Rezultat: Cristalizarea sensibilă permite urmărirea variațiilor determinate de climat în cazul apei Vâlcele. Indicatorii în cazul apei Vâlcele sonda Elisabeta sunt densitatea tiparului specific ramurilor centrale și periferice și umplerea cu ramuri secundare, care scad în climat ploios și umed față de climat uscat.

1.5.10. Capitolul 15: Posibile corelații între calitatea informațională a apelor minerale studiate și proprietățile lor farmacodinamice

Ipoteza de lucru: *amprentele de biocristalizare specifice apelor minerale se pot corela cu proprietățile lor farmacodinamice.*

Obiective: urmărirea unor posibili indicatori de biocristalizare corelați cu proprietățile farmacodinamice ale apelor minerale.

Rezultate: Pot exista corelații între efectele digestive ale apelor carbogazoase și amprenta de biocristalizare precum și între efectul antiinflamator, antisclerotic, antifibros și antitumoral al apelor cloruro-sodice și amprenta de biocristalizare.

Din observațiile noastre, un tipar întâlnit frecvent în cazul apelor sulfuroase sunt acele transverse, grupate sau nu în formă de stea. Acele transverse sunt specifice și formațiunilor tumorale. Cercetările recente au arătat efecte antioxidante și antitumorale ale hidrogenului sulfurat, care este principalul element terapeutic al apelor sulfuroase. Hidrogenul sulfurat este o prezență instabilă în aceste ape, fapt arătat și de modificarea rapidă a amprentelor de cristalizare specifice acestor ape, așadar pentru a beneficia de efectele terapeutice conexe prezenței de hidrogen sulfurat este important ca aceste ape să fie utilizată la sursă.

Concluzii și contribuții personale

Cercetarea calității informaționale a apelor minerale realizată în cadrul acestei lucrări a fost una **interdisciplinară** deoarece a cuprins mai multe puncte de vedere: al *chimistului-laborant* care privește apele minerale din punctul de vedere al compoziției lor fizico-chimice, al *geologului* care le evaluează ținând cont de straturile geologice din care provin, al *biologului* care le privește ca parte integrantă a ecosistemului în care se încadrează, al *medicului* de medicină fizică și reabilitare cu interes în balneologie pentru care apele minerale sunt factori de cură cu efecte farmacodinamice și al *cercetătorului* care urmărește să adauge latura informațională evaluării calitative a apelor minerale.

Instrumentul folosit pentru a alătura toate aceste viziuni a fost biocristalizarea, un test calitativ morfologic ce se bazează pe formele ce apar în timpul evaporării soluției de clorură de cupru pusă în contact cu substratul de analizat.

Reziduul sec și compoziția chimică specifică apelor minerale influențează cristalizarea sensibilă. În paralel cu reducerea RS sub raportul corespunzător amprentei specifice, se reduce ordonarea, centrarea și radiația imaginii (*capitolul 8*). Cu toate acestea **RS nu poate explica în totalitate formarea imaginilor** de biocristalizare deoarece diluând ape cu un RS foarte mare până la un RS specific apelor oligominerale nu se mai obțin imagini specifice. O apă oligominerală nediluată formează amprente specifice la un RS de 10 ori mai mic decât apele izotone, dar își pierde și ea această capacitate dacă este diluată. Aceste rezultate sugerează faptul că amprenta de biocristalizare se poate datora și altor factori necunoscuți care pot fi informaționali.

Atingerea obiectivelor de cercetare științifică ale prezentei lucrări a fost realizată după cum urmează:

1. *Evidențierea diferențelor de calitate informațională specifice principalelor tipuri chimice de ape minerale* a fost realizată în cadrul capitolului 6 prin studiul celor 55 de surse de ape minerale. Au fost identificați principalii indicatori de biocristalizare ce diferențiază tipul acid-carbonic de cel cloruro-sodic și de cel sulfuros. Capacitatea biocristalizării de a diferenția aceste tipuri principale de ape a fost evaluată obținându-se o foarte bună semnificație statistică (vezi *capitolul 6. Determinarea tiparelor de biocristalizare specifice apelor minerale*).
2. *Degradarea calității informaționale a apelor minerale în timp*, după recoltarea de la sursă a fost observată în *capitolele 10 și 11*, atât în cazul unor probe cu

reziduu sec determinat, dar și în cazul probelor analizate doar prin biocristalizare.

3. *Efectele informaționale ale păstrării apelor minerale recoltate de la sursă în diferite tipuri de recipiente* au fost puse în evidență în cadrul *capitolului 13*, unde au fost comparate probe păstrate în sticlă ermetic închisă cu probe similare păstrate în pet, la întuneric.
4. *Influența expunerii la lumină solară asupra calității informaționale* a apelor minerale recoltate de la surse a fost evaluată în *capitolul 12*.
5. *Corelația dintre calitatea informațională și proprietățile farmacodinamice* ale apelor minerale naturale a fost realizată în cadrul *capitolului 15*.

Avantajele și dezavantajele tehnico-economice ale utilizării biocristalizării în studiul apelor minerale:

Avantaje:

1. Are o mare sensibilitate la variații de factori chimici și de reziduu sec (*capitolul 6, 7, 8, 9*).
2. Este o metodă rapidă și economică, putând furniza date în 24 de ore.
3. Metoda permite o supraveghere globală a unor factori diverși ce pot influența calitatea și compoziția apelor minerale, atât la sursă (variațiile datorate condițiilor meteo-climatice – *capitolul 14*) cât și de-a lungul drumului parcurs de ape de la sursă la consumator (degradarea datorată expunerii la lumină – *capitolul 12*, folosirii anumitor tipuri de recipiente – *capitolul 13*, degradarea în timp – *capitolul 10 și 11*).
4. Poate fi utilizată ca un indicator de calitate, poate certifica stabilitatea apei și capacitatea ei de a determina efecte terapeutice sau chiar nutritive și alimentare. (*capitolul 14 și 15*).
5. Este ușor de aplicat într-un laborator simplu și nu necesită condiții complicate de lucru sau cunoștințe tehnice speciale (*capitolul 5*).
6. Rezultatele pot fi interpretate computerizat (*capitolul 6*).
7. Poate fii un instrument bun de evaluare a stabilității apelor minerale propuse pentru îmbuteliere (*capitolul 10*), ajută la alegerea recipientului potrivit (*capitolul 13*) și la evaluarea condițiilor de depozitare (*capitolul 12*), evitarea îmbutelierii apelor în condiții meteo-climatice particulare care au influențe mai importante asupra reziduuului sec sau al raporturilor ionice (*capitolul 14*).

Dezavantaje:

1. Metoda a fost standardizată în domeniul calității alimentelor și este la început în domeniul calității apelor minerale.
2. Biocristalizarea este aplicată în mediu universitar și în agricultura biodinamică și din păcate nu este folosită pe scară largă pentru a aduce o serie de avantaje.
3. Necesită adaptarea programelor de interpretare computerizată existente în acest moment doar pentru analiza calității alimentelor.
4. Indicatorii de degradare în funcție de timp, recipient și expunere la lumină sunt asemănători în cazul apelor carbogazoase, ceea ce diferă este viteza degradării.

Direcțiile în care trebuie continuată cercetarea:

1. Dezvoltarea unui algoritm cât mai simplu de interpretare, inclusiv computerizată.
2. Realizarea de fișe-etalon pentru apele minerale de interes pentru a ușura supravegherea surselor.
3. Realizarea de teste sistematice, cel puțin săptămânal, cât mai aproape de sursa de apă minerală de interes, pentru a confirma rezultatele primare obținute în acest studiu.
4. Sunt necesare mai multe studii cu privire la indicatorii de degradare deoarece numărul probelor din studiile noastre a fost redus.
5. Pot continua studiile legate de factorii de bază care pot influența cristalizarea, în plus față de RS, clorurile și carbonații de calciu și magneziu, ADN-ul specific comunităților bacteriene.

Contribuții personale

1. Această serie de studii marchează începutul utilizării biocristalizării în evaluarea calității apelor minerale. Este pentru prima dată conform cu literatura națională și internațională parcursă de noi, când biocristalizarea este utilizată pentru a caracteriza apele minerale medicinale. (*capitolul 6 paragraf 6.5.*)
2. Conform cu ISO 11035, 8595 și 8587 a fost concepută pentru prima dată o scală de evaluare a biocristalizării apelor minerale (*capitolul 6 paragraf 6.3.1.*)
3. În ceea ce privește parametri generali ai apei turbiditatea și oxigenul dizolvat nu au fost determinați anterior pentru aceste probe. Litiul, aluminiul, arsenul și manganul sunt microelemente care nu au fost determinate anterior pentru aceste probe, conform cu literatura consultată de noi și cu datele afișate (*capitolul 7 paragraf 7.3.4-7.3.8.*)
4. Au fost realizate pentru prima dată determinări ale ADN-ului specific comunităților bacteriene din apele minerale (*capitolul 7 paragraf 7.3.9.*)

5. S-au observat indicatori de biocristalizare pentru degradarea apelor minerale cauzate de factorul timp (*capitolul 10 paragraf 10.3, capitolul 11 paragraf 11.3.*), expunerea la lumină (*capitolul 12 paragraful 12.3.*) și păstrarea în pet (*capitolul 13 paragraf 13.3.*).
6. Au fost observate unele posibile corelații între morfologia amprentelor de biocristalizare și efectele farmacodinamice ale apelor minerale (*capitolul 15 paragraf 15.3.*).
7. Au fost observate influențele unor săruri simple și amestecuri de săruri asupra morfologiei cristalizării clorurii de cupru (*capitolul 9 paragraful 9.3.*).
8. Apariția de forme arhetipale (florale, centrate, fractale etc.), armonia, ordinea, integrarea, centrarea și simetria unor amprente precum și degradarea lor invariabilă în timp sau sub acțiunea altor factori (lumină, recipient de pet) nu poate fi explicată doar prin compoziția chimică sau nivelul RS. Presupunem implicarea altor factori informaționali care nu au putut fi măsurați în studiile realizate de noi.

Astfel de forme arhetipale sunt prezente în natură, și sunt puse în evidență și prin alte metode morfologice cum este electronografia dezvoltată de Cornelia Guja⁹, sunt vizibile și în fractali de tip Mandelbrot⁸⁷, în ramificațiile prezente de la plante la râuri, în formele de relief așa cum arată Fleury Vincent⁸⁸. Ce anume le face să apară atât în mediul natural cât și în biocristalizare rămâne în continuare un mister incomplet elucidat.

Bibliografie selectivă

- 1 Ciocîrlie, N., Alecu, E. – Aportul științei și tehnologiei asupra calității și siguranței alimentelor , Buletinul AGIR, nr.1/2010
- 2 Mencinicopschi, Gh. – Calitatea alimentului o abordare holistică – Revista Certind, nr. 1/2014 pg. 20-28
- 3 *** - Regulamentul Consiliului Europei CEE nr. 178/2002
- 4 Menicinopschi, Gh., Mencinicopschi, I.-C., Cîmpean, C.-D. – *Adevărul despre alimente, nutriție sănătoasă și diete: ortodietoterapie* – Editura Medicală, București, 2012, pg 125-127, 145-150, 199-202, 246-252.
- 5 Konstantin G Korotkov. Review of EPI papers on medicine and psychophysiology published in 2008-2018. International Journal of Complementary & Alternative Medicine. (2018) DOI:10.15406/ijcam.2018.11.00417
- 6 Korotkov, K., Voeikov, V. - *The Emerging Science of Water*. 2016
- 7 Lewis, D., Lewis S.E, Lewis M.-M, Bell, I.R., Schwartz, G.E. - *Gas Discharge Visualisation Measurements of the Effect of Intent on Water*. The journal of alternative and complementary medicine, Volume 10, Number 4. 2004.
- 8 Guja Cornelia. Aura corpului uman. Introducere în Antropologia individului. Editura polirom. Iași. 2000
- 9 Guja, C., Iliescu E. Complexitate și diversitate informațională în imagini electrografice. Ed. Charme-Scott, București, 2001
- 10 Guja Cornelia. Aurele corpurilor. Interfețe cu cosmosul. Ed. Enciclopedică, București, 1993; reeditare Ed. Polirom, Iași. 2000
- 11 Fritz J, Athmann M, Meissner G, Kauer R, Köpke U (2017) Quality characterisation via image forming methods differentiates grape juice produced from integrated, organic or biodynamic vineyards in the first year after conversion, BAH, 33, 2017, p.195-213. doi: 10.1080/01448765.2017.1322003
- 12 Athmann M. 2011. Produktqualität von Salatruke (*Eruca sativa* L.) und Weizen (*Triticum aestivum* L.): Einfluss von Einstrahlungsintensität, Stickstoffangebot, Düngungsart und Hornkieselapplikation auf Wachstum und Differenzierung [Product quality of rocket (*Eruca sativa* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.): influence of solar radiation, nitrogen supply, fertilizer type and horn silica application on growth and differentiation] [dissertation]. Bonn: University Bonn.
- 13 Hassold-Piezunka N. 2003. Eignung des Chroma-Boden-Tests zur Bestimmung von Kompostqualität und Rottegrad [Suitability of the circular-chromatography-soil-test to determinate compost quality] [dissertation]. Oldenburg: Universität Oldenburg.
- 14 Zalecka, A., Skjerbaek, K., Doesburg, P., Pyskow, B., Huber, M., Kahl, J., Ploeger, A. - *The capillary dynamolysis method as a characterized tool for crop quality determination*. Poster at: Joint Organic Congress, Odense, Denmark, May 30-31, 2006.
- 15 Zalecka, A., J. Kahl, P. Doesburg, B. Pyskow, M. Huber, K. Skjerbaek, A. Ploeger (2010): *Standardization of the Capillary dynamolysis method*. BAH, 27 (1), 41-57.
- 16 Kahl, J., Busscher, N., Hoffmann, W., Mergardt, G., Clawin-Raedeker, I., Kiesner, C., & Ploeger, A. (2014). *Development and Performance of Crystallization with Additives Applied on Different Milk Samples*. Food Analytical Methods, 1-8. DOI 10.1007/s12161-013-9759-5
- 17 Kahl J, Busscher N, Mergardt G, Andersen JO, Doesburg P, Arlai A, Ploeger A (2015) Standardization and Performance Test of Crystallisation with Additives Applied to Wheat Samples. Food Anal. Methods 8 (4) <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0142-6>
- 18 Kahl Johannes, Busscher Nicolaas, Mergardt Gaby, Mäder Paul, Torp Torfinn, Ploeger Angelika: *Differentiation of organic and non-organic winter wheat cultivars from a controlled field trial by crystallization patterns*. (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.6818.
- 19 Kahl J, Busscher N, Doesburg P, Mergardt G, Will F, Schulzova V, Hajslova J, Ploeger A (2016) Application of Crystallisation with Additives to Cloudy and Clear Apple Juice. Food Anal. Methods, doi 10.1007/s12161-016-0575-6
- 20 Kahl J, Busscher N, Doesburg P, Mergardt G, Huber M, Ploeger A (2009) First tests of standardized biocrystallisation on milk and milk products. Eur. Food Res. Technol. 229, 175–178. doi: 10.1007/s00217-009-1039-7
- 21 Busscher, N., Kahl, J., Andersen, J.-O., Huber, M., Mergardt, G., Doesburg, P., Paulsen, M., Ploeger, A. - *Standardization of the Biocrystallization Method for Carrot Samples*. Biological Agriculture and Horticulture, 2010, Vol. 27, pp. 1–23.
- 22 Busscher N, Kahl J, Doesburg P, Mergardt G, Ploeger A (2010b) Evaporation influences on the crystallisation of an aqueous dihydrate cupric chloride solution with additives. J. Colloid Interface Sci. 334, 556–562. DOI: 10.1016/j.jcis.2009.12.045
- 23 Doesburg P, Nierop AF (2013) Development of a structure analysis algorithm on structures from CuCl₂ x 2H₂O crystallization with agricultural products. Computers and Electronics in Agriculture, 90, 63–67 <http://dx.doi.org/10.1016/j.compag.2012.11.003>

- ²⁴ Fritz J, Athmann M, Kautz T, Köpke U (2011) Grouping and classification of wheat from organic and conventional production systems by combining three image forming methods, *BAH*, 27:3-4, 320-336 DOI: 10.1080/01448765.2011.648918
- ²⁵ **Cîmpean CD**, Cornel Hoțiu. *Informational variations of bee-keeping products depending on the storage conditions*. The Xth Congress of Apitherapy | Sibiu | Romania | 6-10th Oct 2017
- ²⁶ **Cîmpean CD**, Otilia Bobiș, Daniel Dezmirean, Victorița Bonta, Cornel Hoțiu, Mihai Berteanu. *Biocrystalizarea cu clorură de cupru, o posibilă metodă de analiză informațională a produselor apicole*. *ApiQuality & ApiMedica* 2018. 10 - 16 octombrie 2018.
- ²⁷ **Cîmpean CD** Modificări de calitate informațională a lăptișorului de matcă crud în funcție de condițiile de păstrare. *ApiQuality & ApiMedica* 2018. 10 - 16 octombrie 2018.
- ²⁸ **Cîmpean CD** Correlations between the informational patterns and the therapeutic properties of medicinal herbs and others informational changes. Al VII-lea Simpozion de Etnofarmacologie cu participare internațională. 23-24.06.2018
- ²⁹ **Cîmpean CD**, Mihai Berteanu. *Biocrystallization test for early determination of oxidative stress*. *Health, Sports & Rehabilitation Medicine*. Vol. 21, no. 1, January-March 2020, 45–51. <https://doi.org/10.26659/pm3.2020.21.1.45>
- ³⁰ **Cîmpean CD**. *Cristalizarea sensibilă în contextul stresului psihic*. **Capitol** În Carmen-Angela Sfrângeu, Citto-Iulian Tăiescu, Cristina-Daniela Cîmpean, Ioana-Marieta Jurcău, Nicolae Alexandru Colceriu; coord.: Ramona-Niculina Jurcău. *Apiterapia, fitoterapia și aromaterapia în contextul stresului psihic*. Editura Argonaut, Cluj-Napoca. 2018. ISBN 978-973-109-765-7 (vezi anexa 2).
- ³¹ **Cîmpean CD**, Mihai Berteanu. *Diagnosticul precoce al leziunilor neoplazice și preneoplazice*. Al X-lea Congres al Asociației Române a Medicilor Fitoterapeuți. 19-21.05.2019
- ³² Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. *Oxidative Stress*, ed. H Siess. London Academic. 1985. 1-8.
- ³³ Tache S. Speciile reactive ale oxigenului și azotului: formare și consecințe (cap. 1). Stresul oxidativ (cap. 2). În: *Stresul oxidativ în bolile interne*. Casa Cărții de Știință, Cluj-Napoca, 2000, p. 15-136.
- ³⁴ Sies H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experim Physiol*. 1997;82(2):291-295
- ³⁵ Manolescu BN, Berteanu M, Oprea E, Chiriac N, Dumitru L, Vladoiu S, Popa O, Ianas O (2011) Dynamic of oxidative and nitrosative stress markers during the convalescent period of stroke patients undergoing rehabilitation. *Ann Clin Biochem*, doi: 10.1258/acb.2011.010243
- ³⁶ Mureșan A, Tache S, Orăsan R. Stresul oxidativ în procesele fiziologice și patologice. Ed. Toderescu. Cluj-napoca, 2006, 28-35
- ³⁷ Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cationic decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999;26:1231–37
- ³⁸ Himmelfarb J, McMonagle E, McMenamin E. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int* 2000;58:2571–8. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2000.00443.x
- ³⁹ Hawkins CL, Morgan PE, Davies MJ. Quantification of protein modification by oxidants. *Free Radical Biol Med* 2009;46:965–88 PMID: 19439229 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.01.007
- ⁴⁰ Tache S. Stresul oxidativ și antioxidanții în efortul fizic. Dejica D. (sub red.) *Antioxidanți și terapie antioxidantă*. Editura Casa Cărții de Știință, Cluj-Napoca 2001, Cap.6 : 198-237
- ⁴¹ Sunderman FW, Nomoto S. Measurement of human serum ceruloplasmin by its p-phenylenediamine oxidase activity. *Clin Chem* 1970;16:903–10. PMID: 5473551
- ⁴² Tache S. Stresul oxidativ în condiții fiziologice. Dejica D. (sub red.) *Stresul Oxidativ în bolile interne*. editura Casa Cărții de Știință, Cluj-Napoca 2000, Cap.2 :103-104.
- ⁴³ Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, Loidas S (2013). Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *Int J Environ Res Public Health*. 10 (9): 3886–907. doi:10.3390/ijerph10093886. PMC 3799517. PMID 23985773
- ⁴⁴ Fleury, Vincent - Branched fractal patterns in non-equilibrium electro-chemical deposition from oscillatory nucleation and growth, *NATURE* vol 390 13 Nov 97 (p 145-148) . FLEURY, V., *Nature*, 390, 13,1997, p. 145-148
- ⁴⁵ **Cîmpean CD** în Mencinicopschi Gh., Mencinicopschi, I.C., Cîmpean, C.D., 2013. *The Truth about Food, Healthy Nutrition and Diet*. (in Romanian). Medical Publishing Company, Bucharest. Mencinicopschi G, Mencinicopschi IC, Cîmpean CD (2013) *The Truth about Food, Healthy Nutrition and Diet*. (in Romanian). Medical Publishing Company, Bucharest
- ⁴⁶ **Cîmpean CD**, Hoțiu C. Mierea – un aliment viu, *Analiza calității mierii prin cristalizare sensibilă*. *Hofigal* 2013; 38, 20-22.

- ⁴⁷ Andersen, JO, Henriksen C, Laursen J, Nielsen A (1999) Computerised image analysis of biocrystallograms originating from agricultural products. *Comput. Electron. Agric.* 22, 51–69. DOI: 10.1016/S0168-1699(98)00043-X
- ⁴⁸ Nickel E. Die Reproduzierbarkeit der Sogenannten Empfindlichen Kupferchloridkristallisation. *Bull Soc fib Sci Nat* 1967-68; 57, 65-179.
- ⁴⁹ Shibata T, Takakuwa Y., Tanaka A. et al - Crystal structure of blue and green hydrated cupric chloride grown from aqueous solutions with and without human blood addition : single crystal X-ray diffraction analysis and differential scanning calorimetry (DSC). *J. Tokyo Wom Med Univ* 6-7 :358-369, 1998.
- ⁵⁰ Charpentier D, Barth JG, Cocude M. *Influence of electric and magnetic fields on sensitive crystallisation.* In: *Colloque cristallisations sensibles* (1998): p. 29-34.
<http://www.admi.net/industrie/corss/ccs/PDF/EV.pdf>
- ⁵¹ Barth J.G.(1997) - *Image de cristallisation du chlorure cuivrique et Nature de l'additif.* *Elemente der Naturwissenschaft* nr. 66, p.16-42. DOI: 10.18756/edn.66.16
- ⁵² Barth JG, Roussaux J, Suppan K, Rosa dos Santos S. Crystallisation of a film of copper chloride in the presence of additives. *Elemente d. N.* 2011; 94, 69-99. DOI: 10.18756/edn.94.69
- ⁵³ Busscher N, Doesburg P, Mergardt G, Sokol A, Kahl J, Ploeger A. (2018) Influence of dewetting on the crystallisation behavior of CuCl₂ in the presence of BSA during evaporation in a Petri dish. *Heliyon* 4; e01102. doi: 10.1016/j.heliyon.2018. e01102
- ⁵⁴ Barth, Jean-Georges; Roussaux, Jean; Wilkens, Andreas; Jacobi, Michael (2013): Techniques for washing the supports used for copper chloride crystallisation with additive. *Elemente der Naturwissenschaft* 98, P. 5 - 19. doi:10.18756/edn.98.5
- ⁵⁵ Reiter G, Barth JG. Some general remarks on crystallisation in the presence of additives. *Elemente d. N.* 2010; 92, 30–61.
- ⁵⁶ Barth J.G., 2004, - Cupric chloride crystallisation with additives and its applications. *Elemente d. N.*, 81, 2004, p.23-39
- ⁵⁷ Fritz J, Athmann M, Andersen JO, Doesburg P, Geier U, Mergardt G (2019) Advanced panel training on visual Gestalt evaluation of biocrystallisation images: ranking wheat samples from different extract decomposition stages and different production systems, *BAH*, doi: 10.1080/01448765.2018.1492457
- ⁵⁸ Marszałek K, Doesburg P, Starzonek S, Szczepańska J, Woźniak Ł , Lorenzo JM, Skąpska S, Rzoska S, Barba FJ (2018) Comparative effect of supercritical carbon dioxide and high pressure processing on structural changes and activity loss of oxidoreductive enzymes. *Journal of CO2 Utilization.*
<https://doi.org/10.1016/j.jcou.2018.11.007>
- ⁵⁹ Popović-Vranješ A, Lopičić-Vasić T, Grubješić G, Krstović S, Lukač D, Kralj A, Geier U (2016) Biocrystallisation as a method for distinguishing between organically and conventionally produced milk. *Mljekarstvo* 66 (4), 262. doi: 10.15567/mljekarstvo.2016.0402
- ⁶⁰ **Cîmpean CD**, Balint L, Mencinicopschi G, Balint R, Mencinicopschi CI, Kiss C, Hoțiu C. *Aprecierea calității biologice a oului de găină prin metoda cristalizării sensibile.* *Agro Buletin AGIR* 2011,
- ⁶¹ Kahl J, Busscher N, Ploeger A (2010a) Questions on the Validation of Holistic Methods of Testing Organic Food Quality. *BAH* 27, 81–94. doi: 10.1080/01448765.2010.10510431
- ⁶² Kahl J, van der Burgt GJ, Kusche D, Bügel S, Busscher N, Hallmann E, Kretschmar U, Ploeger A, Rembalkowska E, Huber M (2010) Organic Food Claims in Europe. *Food Technology.*
- ⁶³ Huber, M., Andersen, J.-O., Kahl, J., Busscher, N., Doesburg, P., Mergardt, G., Kretschmer, S., Zalecka, A., Meelursarn, A., Ploeger, A., Nierop, D., van de Vijver, L., Baars, E., 2010. *Validation of the visual evaluation of biocrystallizations. Development of a reliable and valid instrument for visual evaluation according to ISO-Norms for sensory analyses.* *BAH* 27, 25–40. doi: 10.1080/01448765.2010.10510428
- ⁶⁴ Kahl, J. *Entwicklung, in-house Validierung und Anwendung des ganzheitlichen Verfahrens Biokristallisation für die Unterscheidung von Weizen-, Möhren- und Apfelproben aus unterschiedlichem Anbau und Verarbeitungsschritten.* *Habilitationsschrift, Universität Kassel, 2007*
- ⁶⁵ Doesburg, P., Huber, M., Andersen, J.-O., Athmann, M., Van Der Bie, G., Fritz, J., Geier, U., Hoekman, J., Kahl, J., Mergardt G., Busscher, N. Standardization and performance of a visual Gestalt evaluation of biocrystallization patterns reflecting ripening and decomposition processes in food samples, *BAH*, 31 (2), 2015, p.128-145 doi: 10.1080/01448765.2014.993705
- ⁶⁶ Pricăjan, Artemiu – *Apele minerale și termale din România.* Editura Tehnică. 1973
- ⁶⁷ Andersen, J.O. Laursen, J., Kølster P. - *A refined biocrystallization method applied in a pictomorphological investigation of a polymer.* *Elemente der Naturwissenschaft*, nr.68; 1998. p. 3-15 DOI: 10.18756/edn.68.1
- ⁶⁸ Andersen JO, Huber M, Kahl J, Busscher N, Meier-Ploeger A (2003) A concentration matrix procedure for determining optimal combinations of concentrations in biocrystallization. *Elemente d. n.* 79 (2) 97-114. doi: 10.18756/edn.79.97

-
- ⁶⁹ Meelursarn, A. 2007. Statistical evaluation of texture analysis from the biocrystallization method: Effect of image parameters to differentiate samples from different farming systems. PhD thesis, University of Kassel. Witzenhausen, Germany. <https://kobra.bibliothek.uni-kassel.de/handle/urn:nbn:de:hebis:34-2007041017616>.
- ⁷⁰ Szulc M. Discrimination between organically and conventionally grown winter wheat by means of holistic and selected analytical methods. 2009. Dissertation. University of Kassel. Germany
- ⁷¹ **Cimpean CD, Berteau M. The Influence of Natural Saline Solutions on Dihydrate Copper Chloride Crystallization. Rev. Chim.[internet]. 2020 Feb;71(2):110-114.** Available from: <https://doi.org/10.37358/RC.20.2.7901>
- ⁷² Pelikan W. Omul și plantele medicinale (volumul III). Ed. Triade, Cluj Napoca, 2008
- ⁷³ https://files.zymoresearch.com/protocols/_d6010_quickdna_fecalsoil_microbe_miniprep_kit.pdf
- ⁷⁴ <https://cran.r-project.org/>
- ⁷⁵ <https://docs.ropensci.org/magick/>
- ⁷⁶ Pau G, Fuchs F, Sklyar O, Boutros M, Huber W (2010). EBImage—an R package for image processing with applications to cellular phenotypes. *Bioinformatics*, 26(7), 979–981. doi: 10.1093/bioinformatics/btq046.
- ⁷⁷ <https://cran.r-project.org/web/packages/Hmisc/index.html>
- ⁷⁸ <https://cran.r-project.org/web/packages/pvclust/index.html>
- ⁷⁹ Wei T, Simko V (2017). R package "corrplot": Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.84). Available from <https://github.com/taiyun/corrplot>.
- ⁸⁰ <https://cran.r-project.org/web/packages/optCluster/index.html>
- ⁸¹ <https://cran.r-project.org/web/packages/fpc/index.html>
- ⁸² Galili T (2015). “dendextend: an R package for visualizing, adjusting, and comparing trees of hierarchical clustering.” *Bioinformatics*. doi: 10.1093/bioinformatics/btv428; <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-pdf/31/22/3718/17122682/btv428.pdf>; <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/31/22/3718/240978/dendextend-an-package-for-visualizing-adjusting>
- ⁸³ DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P. and Andersen, G.L., 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(7), pp.5069-5072.
- ⁸⁴ Shannon, C.E. and Weaver, W., 1949. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Champaign, Illinois.
- ⁸⁵ Simpson, E.H., 1949. Measurement of diversity. *Nature*, 163(4148), p.688.
- ⁸⁶ Cover, T. and Hart, P., 1967. Nearest neighbor pattern classification. *IEEE transactions on information theory*, 13(1), pp.21-27.
- ⁸⁷ Peitgen HO, Richter PH. *The Beauty of Fractals*. Springer – Verlag, Berlin Heidelberg, 1986
- ⁸⁸ Fleury V., Gouyet J-F., Marc L. (2013). *Branching in Nature: Dynamics and Morphogenesis of Branching Structures, from Cell to River Networks*. Springer Science & Business Media DOI: 10.1007/978-3-662-06162-6.