

CONTRIBUȚII LA STUDIUL, IZOLAREA ȘI PURIFICAREA PIGMENTILOR CAROTENOIDICI DIN PRODUSE NATURALE

Teză destinată obținerii
titlului științific de doctor inginer
la
Universitatea "Politehnica" din Timișoara
în domeniul INGINERIE CHIMICĂ
de către

Ing. Delia-Gabriela Dumbravă

| | |
|------------------------|------------------------------------|
| Conducător științific: | prof.univ.dr.ing. Alfa-Xenia Lupea |
| Referenți științifici: | prof.univ.dr.ing. Adrian Chiriac |
| | prof.univ.dr.chim. Ioan Oprean |
| | prof.univ.dr.ing. Lucian Rusnac |

Ziua susținerii tezei: 08.12.2007

Seriile Teze de doctorat ale UPT sunt:

- | | |
|------------------------|---|
| 1. Automatică | 7. Inginerie Electronică și Telecomunicații |
| 2. Chimie | 8. Inginerie Industrială |
| 3. Energetică | 9. Inginerie Mecanică |
| 4. Ingineria Chimică | 10. Știința Calculatoarelor |
| 5. Inginerie Civilă | 11. Știința și Ingineria Materialelor |
| 6. Inginerie Electrică | |

Universitatea „Politehnica” din Timișoara a inițiat seriile de mai sus în scopul diseminării expertizei, cunoștințelor și rezultatelor cercetărilor întreprinse în cadrul școlii doctorale a universității. Seriile conțin, potrivit H.B.Ex.S Nr. 14 / 14.07.2006, tezele de doctorat susținute în universitate începând cu 1 octombrie 2006.

Copyright © Editura Politehnica – Timișoara, 2008

Această publicație este supusă prevederilor legii dreptului de autor. Multiplicarea acestei publicații, în mod integral sau în parte, traducerea, tipărirea, reutilizarea ilustrațiilor, expunerea, radiodifuzarea, reproducerea pe microfilme sau în orice altă formă este permisă numai cu respectarea prevederilor Legii române a dreptului de autor în vigoare și permisiunea pentru utilizare obținută în scris din partea Universității „Politehnica” din Timișoara. Toate încălcările acestor drepturi vor fi penalizate potrivit Legii române a drepturilor de autor.

România, 300159 Timișoara, Bd. Republicii 9,
tel. 0256 403823, fax. 0256 403221
e-mail: editura@edipol.upt.ro

Cuvânt înainte

Prezenta lucrare este rezultatul activității prestate în perioada stagiului ca doctorand fără frecvență la Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului din Timișoara.

În prezent, se poate afirma că asistăm la o adevărată „întoarcere la natură”, principiile active naturale fiind în centrul atenției cercetătorilor din întreaga lume. Universalitatea prezenței pigmentilor carotenoidici atât în regnul vegetal cât și în cel animal, precum și proprietățile lor deosebit de importante pentru viața plantelor, animalelor și omului, stau la baza interesului mereu sporit acordat acestor compuși de către oamenii de știință din diferite domenii: biochimie, chimie, botanică, zootehnie, medicină, genetică, cosmetică, farmacie, industrie alimentară. Astfel, se identifică noi compuși din această clasă, sunt aduse la lumină noi aspecte privind izolarea și purificarea carotenoidelor naturale, privind acțiunea lor antioxidantă, anticancerigenă, imunostimulatoare, fotoprotectoare, epitelizantă, etc. Simultan apar pe piață o serie de produse noi care conțin carotenoide naturale, cu diferite utilizări.

Teza de doctorat s-a polarizat asupra izolării, purificării, caracterizării și aplicării în diferite domenii a pigmentilor carotenoidici din diverse produse naturale.

Pentru realizarea actualei lucrări doresc să aduc alese mulțumiri conducătorului științific, doamnei prof. univ. dr. ing. Alfa-Xenia LUPEA pentru sprijinul și competența îndrumare acordată pe întreaga perioadă a elaborării tezei.

Îmi exprim întreaga considerație față membrii comisiei de doctorat, domnul președinte al comisiei prof. univ. dr. ing. Nicolae VASZILCZIN prodecanul Facultății de Chimie Industrială și Ingineria Mediului din Timișoara și domnii prof. univ. dr. ing. Adrian CHIRIAC de la Universitatea de Vest din Timișoara, prof. univ. dr. chim. Ioan OPREAN de la Universitatea „Babeș-Bolyai” din Cluj-Napoca, prof. univ. dr. ing. Lucian RUSNAC de la Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului din Timișoara, care au răspuns solicitării de a face parte din comisia de analiză a tezei, pentru timpul acordat lucrării și pentru observațiile făcute.

Nu în ultimul rând, doresc să mulțumesc doamnei șef de lucrări dr. ing. Nicoleta-Gabriela HĂDĂRUGĂ de la Facultatea de Tehnologie Produselor Agroalimentare din Timișoara pentru tot sprijinul acordat pe parcursul elaborării acestei teze.

Timișoara, decembrie 2007

Delia-Gabriela Dumbravă

Dumbravă, Delia-Gabriela

Contribuții la studiul, izolarea și purificarea pigmentilor carotenoidici din produse naturale

Teze de doctorat ale UPT, Seria 4, Nr. 11, Editura Politehnica, 2008, 236 pagini, 136 figuri, 65 tabele.

ISSN: 1842-8223

ISBN: 978-973-625-566-3

Cuvinte cheie:

pigmenți carotenoidici, extracția carotenoidelor, activitate antioxidantă, acțiune antimicrobiană, cromatografie de lichide de înaltă performanță, spectrometrie de absorbție atomică

Rezumat:

Tema tezei de doctorat a urmărit obținerea unor extracte carotenoidice din diferite materiale vegetale, caracterizarea acestora și valorificarea lor. Materialele vegetale luate în studiu aparțin familiilor: *Gramineae* (diferiți hibrizi noi de porumb), *Compositae* (flori de gălbenele), *Papaveraceae* (rostopască), *Elaeagnaceae* (fructe de cătină albă), *Rosaceae* (fructe de piersic) și *Rutaceae* (fructe de portocal) și au fost alese datorită conținutului lor bogat în pigmenți carotenoidici. Studiul efectuat are un caracter interdisciplinar și a făcut apel la mai multe domenii cum ar fi: biochimie, microbiologie, chimie organică, chimie analitică, statistică, reologie, farmacie, industrie alimentară, zootehnie etc.

Teza de doctorat este structurată în două părți principale:

- Prima parte: „Stadiul cunoașterii în domeniu”, în care sunt prezentate considerațiile teoretice generale cu privire la carotenoide: clasificare, structură chimică, nomenclatură, răspândirea lor în natură, proprietăți fizice și chimice generale, metode de extracție, identificare și dozare, precum și aplicațiile lor în medicină, farmacie, cosmetică, zootehnie, industria alimentară.
- Partea a doua: „Contribuții proprii”, în care sunt prezentate datele generale privind plantele studiate, metodele de extracție și de analiză a extractelor carotenoidice obținute, ca și modalitățile de aplicare în practică a acestora în domeniul farmaceutic, zootehnic și al industriei alimentare.

CUPRINS

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCERE..... | 8 |
| 2. STADIUL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU | 10 |
| 2.1. CLASIFICAREA, STRUCTURA ȘI NOMENCLATURA COMPUȘILOR CAROTENOIDICI...10 | |
| 2.1.1. Clasificarea carotenoidelor..... | 10 |
| 2.1.2. Structura chimică..... | 10 |
| 2.1.2.1. Generalități..... | 10 |
| 2.1.2.2. Carotenoide cu peste 40 atomi de carbon în moleculă | 12 |
| 2.1.2.3. Compuși carotenoidici cu 40 de atomi de carbon în moleculă | 12 |
| 2.1.2.4. Carotenoide cu mai puțin de 40 atomi de carbon în moleculă | 21 |
| 2.1.2.5. Carotenoide cu 30 atomi de carbon | 22 |
| 2.1.3. Configurația carotenoidelor | 22 |
| 2.1.3.1. Izomeria geometrică | 23 |
| 2.1.4. Nomenclatura | 24 |
| 2.1.5. Metaboliți ai carotenoidelor | 27 |
| 2.1.5.1. Metaboliți din regnul vegetal..... | 27 |
| 2.1.5.2. Metaboliți din regnul animal..... | 27 |
| 2.2. RĂSPÂNDIREA COMPUȘILOR CAROTENOIDICI | 28 |
| 2.2.1. Generalități | 28 |
| 2.2.2. Răspândirea carotenoidelor în regnul vegetal..... | 29 |
| 2.2.2.1. Organisme autotrofe..... | 29 |
| 2.2.2.2. Organisme și țesuturi vegetale nefotosintetizante..... | 32 |
| 2.2.3. Răspândirea carotenoidelor în regnul animal..... | 37 |
| 2.2.4. Distribuția metaboliților compușilor carotenoidici în plante și animale | 38 |
| 2.2.4.1. Metaboliții C ₂₀ | 38 |
| 2.2.4.2. Metaboliți C ₁₈ | 39 |
| 2.2.4.3. Metaboliți C ₁₅ | 39 |
| 2.2.4.4. Metaboliți C ₁₃ | 39 |
| 2.2.4.5. Metaboliți C ₁₁ | 40 |
| 2.3. PROPRIETĂȚI FIZICE ȘI CHIMICE GENERALE ALE CAROTENOIDELOR..... | 40 |
| 2.3.1. Proprietăți fizice generale..... | 40 |
| 2.3.2. Proprietăți chimice generale | 41 |
| 2.3.2.1. Reacția de hidrogenare | 41 |
| 2.3.2.2. Reacția de reducere cu hidruri metalice..... | 41 |
| 2.3.2.3. Reacția de halogenare..... | 43 |
| 2.3.2.4. Reacția cu tetraacetatul de plumb | 44 |
| 2.3.2.5. Formarea de complecși cu TiCl ₄ | 45 |
| 2.3.2.6. Reacția cu acizii | 45 |
| 2.3.2.7. Reacția cu baze | 46 |
| 2.3.2.8. Reacția de oxidare | 46 |
| 2.3.2.9. Reacția de autooxidare..... | 48 |
| 2.3.2.10. Reacția de esterificare | 49 |
| 2.3.2.11. Reacția de eterificare | 49 |
| 2.3.2.12. Reacția de condensare | 49 |
| 2.4. METODE DE EXTRACȚIE, IDENTIFICARE ȘI DOZARE A CAROTENOIDELOR | 50 |
| 2.4.1. Extracția carotenoidelor | 50 |
| 2.4.1.1. Extracția cu solvenți organici | 50 |
| 2.4.1.2. Extracția cu fluide supercritice | 51 |
| 2.4.2. Identificarea compușilor carotenoidici | 52 |

6 Cuprins

| | |
|--|-----|
| 2.4.2.1. Identificarea compușilor carotenoidici prin caracteristici de adsorbție | 53 |
| 2.4.2.2. Identificarea compușilor carotenoidici prin teste chimice | 56 |
| 2.4.2.3. Identificarea carotenoidelor cu ajutorul spectroscopiei I.R. | 59 |
| 2.4.2.4. Identificarea compușilor carotenoidici cu ajutorul spectrometriei de rezonanță magnetică nucleară | 61 |
| 2.4.2.5. Identificarea carotenoidelor cu ajutorul spectrometriei de masă | 62 |
| 2.4.3. Dozarea compușilor carotenoidici | 64 |
| 2.5. UTILIZAREA COMPUȘILOR CAROTENOIDICI | 65 |
| 2.5.1. Generalități | 65 |
| 2.5.2. Utilizarea compușilor carotenoidici în zootehnie | 66 |
| 2.5.2.1. Considerații generale | 66 |
| 2.5.2.2. Absorbția și depozitarea carotenoidelor în organismele animale | 67 |
| 2.5.3. Utilizarea compușilor carotenoidici în medicină | 68 |
| 2.5.3.1. Acțiunea fotoprotectivă și antioxidantă a carotenoidelor | 68 |
| 2.5.3.2. Utilizarea carotenoidelor și retinoidelor în prevenirea și tratarea cancerului | 71 |
| 2.5.4. Utilizarea pigmentilor carotenoidici în industria farmaceutică | 72 |
| 2.5.5. Utilizarea carotenoidelor în industria cosmetică | 73 |
| 2.5.6. Utilizarea carotenoidelor ca surse de provitamine A | 73 |
| 2.5.6.1. Absorbția și transformarea carotenoidelor în vitamina A | 75 |
| 2.5.6.2. Formarea pigmentilor vizuali fotosensibili | 78 |
| 2.5.7. Utilizarea carotenoidelor în industria alimentară | 79 |
| 2.5.7.1. Introducere | 79 |
| 2.5.7.2. Coloranți alimentari carotenoidici | 79 |
| 2.5.7.3. Avantajele și dezavantajele utilizării carotenoidelor ca și coloranți | 81 |
| 3. CONTRIBUȚII PROPRII | 82 |
| 3.1. INTRODUCERE | 82 |
| 3.2. PARTE EXPERIMENTALĂ | 83 |
| 3.2.1. Obținerea și analiza unor extracte carotenoidice din diferite materiale vegetale din familiile <i>Gramineae</i> , <i>Eleagnaceae</i> , <i>Papaveraceae</i> , <i>Rosaceae</i> și <i>Rutaceae</i> | 83 |
| 3.2.1.1. Descrierea plantelor folosite | 83 |
| 3.2.1.2. Izolarea pigmentilor carotenoidici din diferite materiale vegetale | 85 |
| 3.2.1.3. Analiza RP-HPLC a extractelor | 92 |
| 3.2.1.4. Determinarea spectrofotometrică a conținutului total de carotenoide din extracte | 93 |
| 3.2.1.5. Determinarea activității antioxidante a extractelor carotenoidice prin metoda cu DPPH | 94 |
| 3.2.1.6. Determinarea conținutului de elemente minerale din materiile prime și din extracte prin spectrometrie de absorbție atomică | 99 |
| 3.2.1.7. Determinarea acțiunii antimicrobiene a unor extracte carotenoidice din porumb, cătină și rostopască | 104 |
| 3.2.2. Studiul posibilităților de aplicare a unor extracte carotenoidice | 105 |
| 3.2.2.1. Obținerea unor unguente terapeutice pe bază de extracte carotenoidice | 105 |
| 3.2.2.2. Utilizarea unor furaje bogate în pigmenți carotenoidici în hrana găinilor (<i>Gallus gallus domesticus</i>) | 109 |
| 3.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII | 112 |
| 3.3.1. Caracterizarea extractelor carotenoidice | 112 |
| 3.3.1.1. Determinarea conținutului de β -caroten și carotenoide totale din extracte prin RP-HPLC | 112 |

| | |
|---|-----|
| 3.3.1.2. Analiza activității antioxidante a extractelor carotenoidice prin metoda cu DPPH | 133 |
| 3.3.1.3. Analiza conținutului de elemente minerale din materiile prime și extractele carotenoidice..... | 150 |
| 3.3.1.4. Analiza activității antimicrobiene a unor extracte carotenoidice din porumb (<i>Zea mays</i>), cătină albă (<i>Hippophae rhamnoides</i>) și rostopască (<i>Chelidonium majus</i>)..... | 172 |
| 3.3.2. Studiul posibilităților de aplicare a extractelor carotenoidice în domeniul medical, farmaceutic și zootehnic..... | 176 |
| 3.3.2.1. Efectele unor unguente terapeutice pe bază de extracte carotenoidice în afecțiuni dermatologice..... | 176 |
| 3.3.2.2. Studiul efectelor utilizării unor surse naturale bogate în pigmenți carotenoidici ca suplimente în furajele păsărilor ouătoare | 186 |
| 3.3.2.3. Aplicarea industrială a unui extract carotenoidic din fructe de cătină albă (<i>Hippophae rhamnoides</i>) la colorarea iaurtului..... | 194 |
| CONCLUZII FINALE | 198 |
| BIBLIOGRAFIE | 203 |
| ANEXA 1..... | 219 |
| ANEXA 2..... | 220 |
| ANEXA 3..... | 225 |
| ANEXA 4..... | 232 |
| ANEXA 5 | 235 |

1. INTRODUCERE

Carotenii sau carotenoidele sunt pigmenți neazotați cu structură poliizoprenică, universal răspândiți atât în țesuturile vegetale cât și în cele animale. Există două tipuri majore de pigmenți carotenoidici: *clasa hidrocarbonată* sau *carotinele* și *clasa oxigenată* sau *xantofilele*. Acești compuși imprimă culoare galbenă, roșie sau portocalie țesuturilor în care se află, datorită numărului mare de duble legături conjugate pe care le conțin [1]. Există însă și câțiva compuși necolorați care sunt incluși în clasa carotenoidelor. Denumirea de carotenoid a fost propusă de Wackenroder care în 1831 a izolat aceste substanțe din morcov. În 1837 Berzelius a denumit pigmenții galbeni din frunzele de toamnă, xantofile. Aceste date au marcat începuturile cercetărilor privind compușii carotenoidici și apoi dezvoltarea continuă care a avut loc [1-3].

În regnul vegetal, compuși carotenoidici se găsesc în toate organele plantelor superioare și inferioare atât clorofilieni, cât și neclorofilieni. Se află, de asemenea în alge, ciuperci și bacterii [1,4].

Pigmenții carotenoidici sunt sintetizați numai de către regnul vegetal. Animalele, atât cele vertebrate, cât și cele nevertebrate, precum și omul, nu au capacitatea de a sintetiza carotenoidi, acestea trebuind să fie aduse în aceste organisme prin hrană [5]. Omul și animalele au capacitatea de a absorbi, depozita și transforma carotenoidii. Depozitarea acestora are loc, în primul rând, în țesutul adipos, apoi în ovare, în sânge și lapte, precum și în gălbenușul de ou.

Pigmenții carotenoidici, în marea lor majoritate substanțe cristalizate, sunt insolubili în apă, dar solubili în solvenți organici (benzen, cloroform, eter etilic) și grăsimi. Din acest motiv, unii autori le atribuie denumirea de lipocromi. Toate carotenoidii prezintă spectre de absorbție specifice în U.V. și VIZ., care servesc la identificarea și dozarea lor. Aceste substanțe sunt sensibile la lumină, căldură, oxigen și acizi [4]. În natură, carotenoidii sunt protejați de structura celulară – distrugerea acestora determină vulnerabilitatea carotenoidilor la degradări [5].

Până în prezent au fost identificați peste 700 de compuși carotenoidici [6].

Rolul biochimic al carotenoidilor, a trezit și trezește încă interesul multor specialiști din diferite domenii. Astfel, este cunoscut rolul esențial al carotenoidilor pentru plante: în procesul fotosintezei, în respirație, în fecundație, transferul energiei absorbite la clorofile, în protecția împotriva fotooxidării distructive. Fără carotenoidi, fotosinteza într-o atmosferă oxigenată ar fi imposibilă. De asemenea, compușii carotenoidici intervin în buna desfășurare a unor procese biochimice importante din viața animalelor și a omului: în procesul vederii (provitaminele A), în creștere și reproducție; mai recent, au fost recunoscute efectele protective ale carotenoidilor împotriva unor perturbări serioase cum ar fi: cancerul, bolile de inimă, și au fost stimulate cercetările intensive privind rolul carotenoidilor ca și antioxidanți și ca regulatori ai sistemului de răspuns imunitar [2,4,7-12].

Datorită proprietăților lor deosebite, acești pigmenți sunt utilizați tot mai mult în diverse domenii: agricultură, zootehnie, farmacie, industria alimentară, medicină, cosmetică [1, 4].

Provitaminele A sunt carotenoidele care pot fi scindate oxidativ la retinoli (vitamina A). Astfel, ca și provitamine A, funcționează: α -, β -, γ -carotenul, criptoxantina și 5,6-epoxizii β -carotenului. Provitaminele A pot fi sintetizate numai de către plante și microorganisme. Animalele și omul conțin, în special la nivelul mucoasei intestinului subțire și în cantitate mai mică în ficat, mușchi și plămâni, enzime care pot converti provitaminele A ingerate, în vitamina A (figura 1). [13,14].

Rol de provitamina A mai prezintă β -apo-carotenalii și β -apo-carotenolii, metaboliți ai provitaminelor A care se află atât în regnul vegetal cât și în regnul animal.

Cea mai importantă dintre toate provitaminele A este β -carotenul.

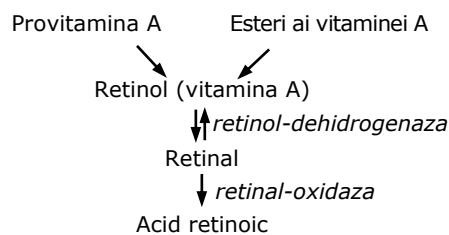


Figura 1 – Transformări "in vivo" ale provitaminelor A în organismul uman și animal [14].

În anul 1975 a fost introdusă noțiunea de retinoide [15].. Acești compuși sunt analogi structurali ai retinolului, deosebindu-se de acesta prin structura catenei polienice, ciclul ionic și gruparea funcțională.

În cadrul prezentei teze de doctorat **obiectivele urmărite** au fost:

- Obținerea unor extracte carotenoidice din diferite materiale vegetale: cereale, plante medicinale, fructe.
- Caracterizarea extractelor obținute prin:
 - determinarea conținutului de β -caroten și carotenoide totale din extracte, prin cromatografie de lichide de înaltă performanță cu fază inversă (RP-HPLC);
 - determinarea activității antioxidante a extractelor carotenoidice obținute utilizând metoda cu radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH);
 - determinarea conținutului în elemente minerale din materiile prime și extracte prin spectrofotometrie de absorbție atomică;
 - studiul comportamentului microbiologic al extractelor carotenoidice obținute în vederea determinării acțiunii lor antimicrobiene asupra unor specii de microorganisme patogene.

Ca și aplicații practice directe s-au urmărit:

- Obținerea unor unguente terapeutice prin înglobarea extractelor obținute în baze de unguent potrivite și testarea externă din punct de vedere al difuzibilității epidermice precum și al efectului epitelizant, cicatrizant și antimitotic al acestor extracte.
- Determinarea caracteristicilor reologice ale unguentelor obținute.
- Aplicarea unor furaje îmbogățite în pigmenți carotenoidici în hrana păsărilor ouătoare și studiul efectelor acestora asupra conținutului de carotenoide din gălbenușul de ou.
- Aplicarea industrială a unui extract carotenoidic la colorarea unor produse lactate acide, în vederea realizării unui sinergism de culoare și a îmbunătățirii valorii nutritive a acestora.

2. STADIUL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU

2.1. CLASIFICAREA, STRUCTURA ȘI NOMENCLATURA COMPUȘILOR CAROTENOIDICI

2.1.3. Clasificarea carotenoidelor

Pigmenții carotenoidici pot fi clasificați, în funcție de mai multe criterii [1,4]:

- a) după structura lor chimică;
- b) după numărul de atomi de carbon din moleculă;
- c) după natura sistemului polienic;

a) *În funcție de structura lor chimică, se disting:*

- hidrocarburi carotenoidice, numite carotine, alcătuite numai din atomi de carbon și hidrogen;
- derivați oxigenați ai hidrocarburilor carotenoidice, numiți și xantofile; aceasta clasă prezintă mai multe grupe:
 - derivați hidroxilici;
 - ceto- și aldocarotenoide;
 - cetohidroxi- și aldohidroxicarotenoide;
- esteri, eteri și glicozizi ai xantofilelor și epoxizi atât ai carotinelor, cât și ai xantofilelor;
- acizi carotenoidici;
- carotenoide cu cicluri aromatice.

b) *După numărul atomilor de carbon din moleculă există patru grupe de compuși carotenoidici:*

- carotenoide cu peste 40 atomi de carbon, și anume au C_{45} și C_{50} ; acestea poartă denumirea de homocarotenoide sau carotenoide superioare;
- carotenoide cu 40 atomi de carbon în molecula, numite simplu: carotenoide C_{40} ;
- carotenoide cu 20-40 atomi de carbon în moleculă, numite apocarotenoide sau carotenoide degradate, deoarece rezultă prin degradarea oxidativă a carotenoidelor C_{40} ;
- carotenoide cu 30 atomi de carbon în moleculă sau diapocarotenoide.

c) *În funcție de natura sistemului polienic, se disting:*

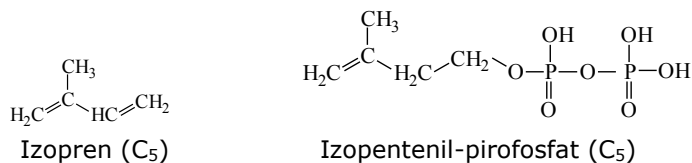
- carotenoide cu sistem polienic normal;
- carotenoide cu sistem polienic de formă retro

2.1.4. Structura chimică

2.1.4.1. Generalități

Compușii carotenoidici au o structură chimică alcătuită din resturi izoprenice, de obicei 8 unități. Acești compuși se formează în organismele vii din unități izoprenoidice C_5 și anume izopentenil-pirofosfat.

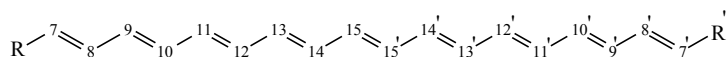
2.2. - Clasificarea, structura și nomenclatura compușilor carotenoidici 11



Prin condensarea acestor unități, se formează mai întâi unități C₂₀, care, prin condensare "coadă la coadă" conduc la formarea primelor carotenoide C₄₀.

Condensarea carotenoidelor C₄₀ cu unități C₅ conduce la formarea carotenoidelor C₄₅ și C₅₀, iar prin degradarea oxidativă a carotenoidelor C₄₀ se formează carotenoide cu mai puțin de 40 de atomi de carbon în moleculă, cu unele excepții : carotenoidele C₃₀ se formează prin condensarea a două unități C₁₅ [16].

Carotenoidele cele mai importante conțin în structura lor, la una sau la ambele extremități ale sistemului polienic, un inel β- sau α-iononic sau un sistem pseudoiononic [4,17] (figura 2).



catenă polienică

unde R, R' =

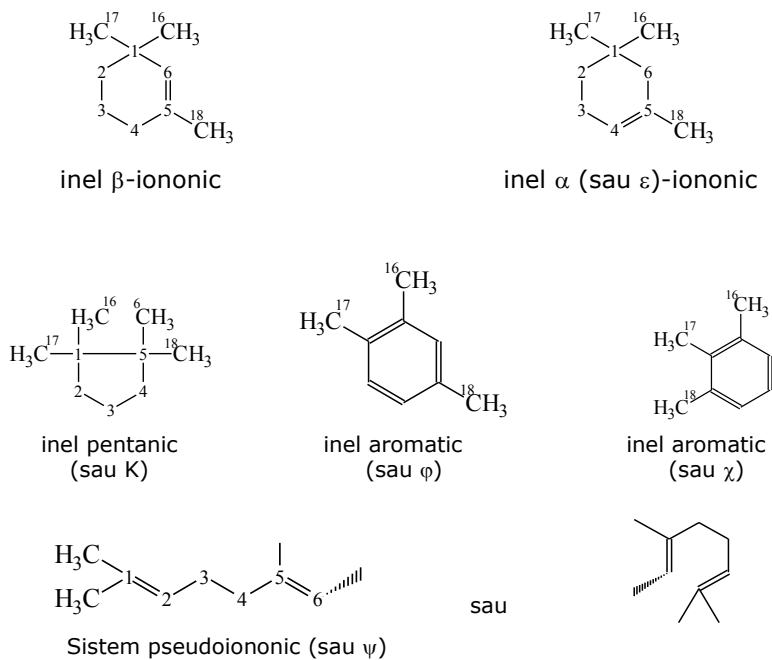


Figura 2.1. – Grupele terminale din molecula carotenoidelor și numerotarea atomilor de carbon [4].

2.1.2.2. Carotenoide cu peste 40 atomi de carbon în moleculă

Începând cu anul 1966 au fost identificate - în diferite bacterii - și caracterizate, carotenoidele cu peste 40 de atomi de carbon în moleculă, denumite carotenoide superioare. Acestea sunt formate din 9, respectiv 10 unități C₅. Prezența lor a fost identificată numai în bacterii nefotosintetizate [18]. În figura 3 sunt prezentate structurile unor carotenoide C₄₅ și C₅₀.

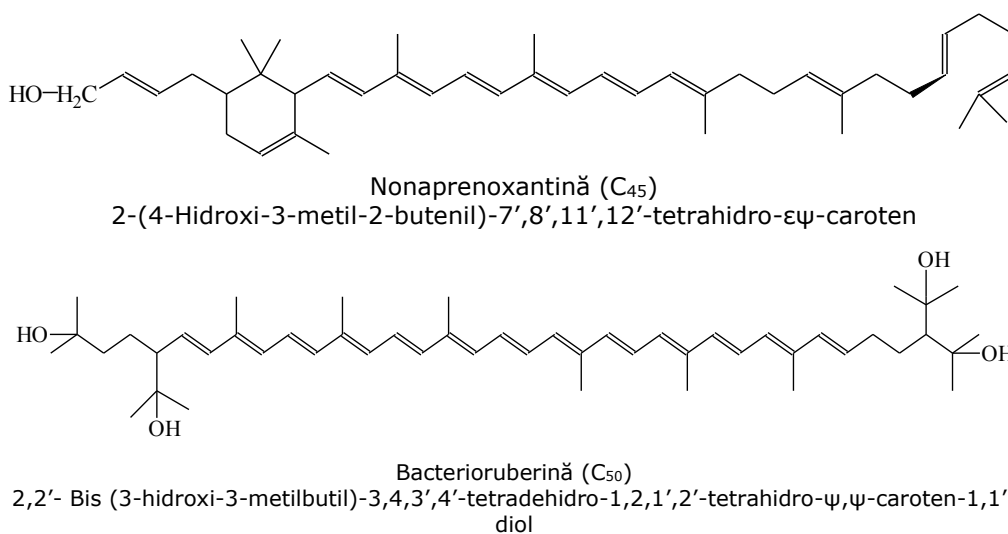


Figura 2.2. - Structurile chimice ale unor carotenoide C₄₅ și C₅₀

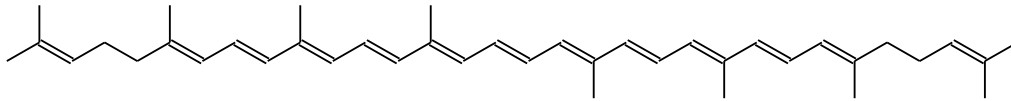
2.1.2.4. Compuși carotenoidici cu 40 de atomi de carbon în moleculă

Carotenoidele cu 40 atomi de carbon în moleculă constituie cea mai numeroasă și mai importantă clasă de carotenoide. Acestea sunt formate din 8 unități izopentenice C₅. Sistemul lor cromofor prezintă 9, 10 sau 11 legături duble conjugate. Ele pot fi atât ciclice, cu un ciclu sau cu două cicluri iononice la extremități, cât și aciclice. De asemenea, sistemul lor polienic poate prezenta diferite grade de saturare a dublelor legături C=C; carotenoidele C₄₀ cu mai puțin de 7 duble legături în moleculă se numesc carotenoide incolore.

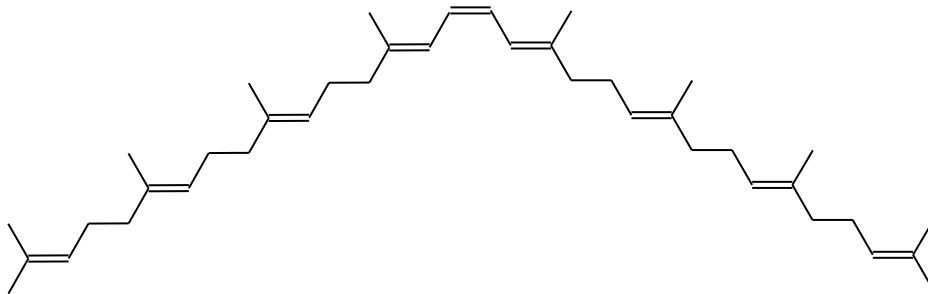
- **Hidrocarburi carotenoidice (carotine)**

- a) *Carotine aciclice*

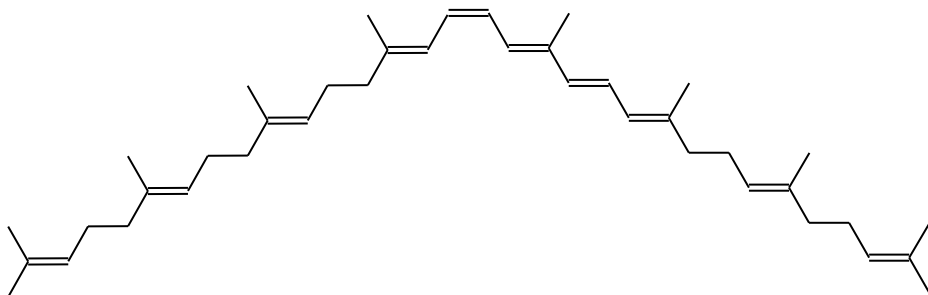
Acest tip de carotine prezintă sistem pseudoiononic, iar unele dintre ele au sistem polienic scurt. [4,5]:



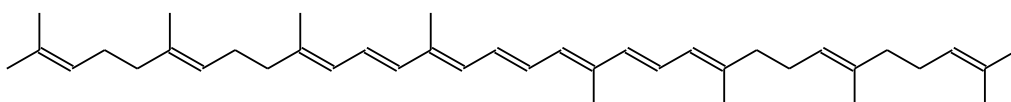
ψ, ψ -Caroten
Licopen



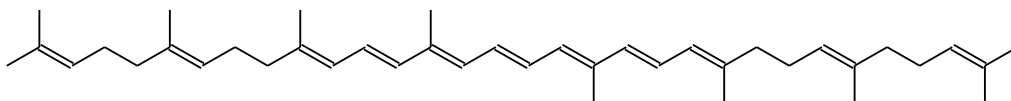
15-cis-7,8,11,12,7',8',11',12'-Octahidro- ψ, ψ -caroten
Fitoen



15-cis-7,8,11,12,7',8'-Hexahidro- ψ, ψ -caroten
Fitofluen



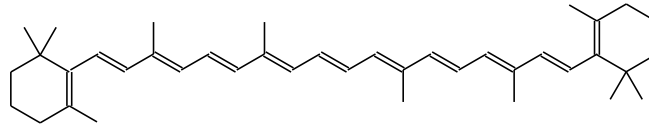
ζ -Caroten



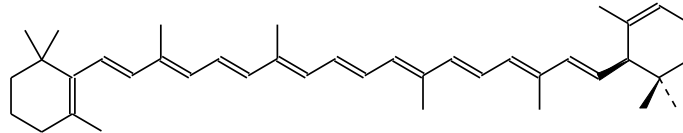
Neurosporen

b) Carotine ciclice

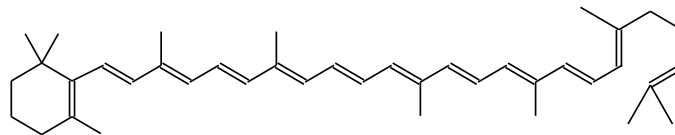
Carotinele ciclice conțin la una sau la ambele extremități ale lanțului polienic unul din ciclurile β -iononic sau α -iononic. Cele care conțin 1 sau 2 cicluri β -iononice îndeplinesc rolul de provitamină A, ceea ce le conferă importanță deosebită în special pentru organismul uman și pentru cel animal [1,5].



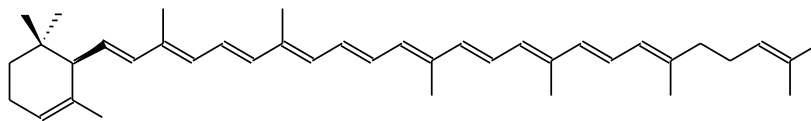
β,β -Caroten
 β -Caroten



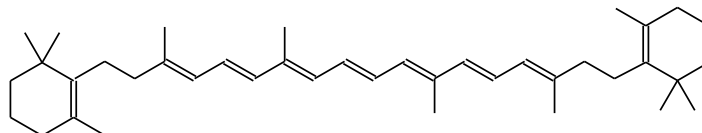
β,ϵ -Caroten
 α -Caroten



β,Ψ -Caroten
 γ -Caroten



(6R)- ϵ,Ψ -Caroten
 δ -Caroten



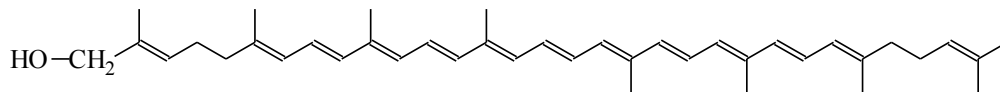
7,8,7',8'-Tetrahidro- β,β -caroten
 η -Caroten

- **Xantofile**

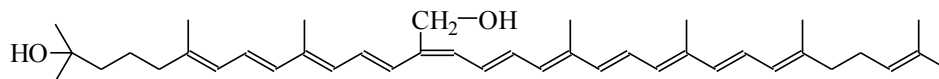
În această clasă sunt incluse atât hidroxicarotenoidele, cât și carotenoidele aldehidice, cele cetonice, aldohidroxi- și cetohidroxicarotenoidele ; acestea pot fi aciclice sau ciclice[1-3]:

a) *Hidroxicarotenoide aciclice*

Carotenoidele hidroxicarotenice aciclice, derivă de la licopină și se găsesc în special în bacterii fotosintetizante și în plante [1,5].



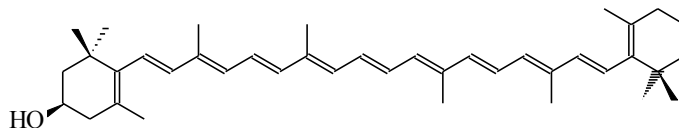
Ψ, Ψ -Caroten-16-ol
Licoxantină



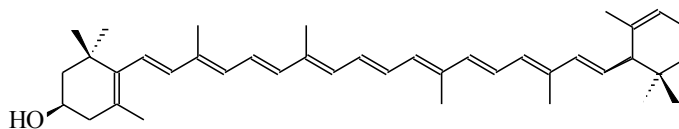
13-cis-1,2-Dihidro- Ψ, Ψ -caroten-1,20-diol
Rodopinol

b) Hidroxicarotenoide ciclice

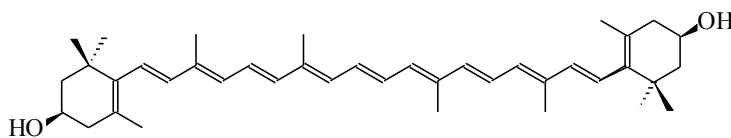
Există mai multe tipuri de hidroxicarotenoide ciclice: monociclice și biciclice, cu sistem polienic normal sau de forma retro, monohidroxicile sau polihidroxicile; cele mai importante conțin grupele -OH pe ciclurile ionice.



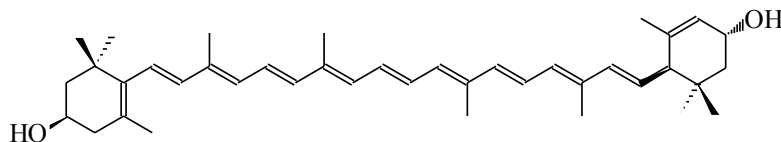
(3R) β, β -Caroten-3-ol
 β -Criptoxantină



(3R, 6'R)- β, ϵ -Caroten-3-ol
 α -Criptoxantină

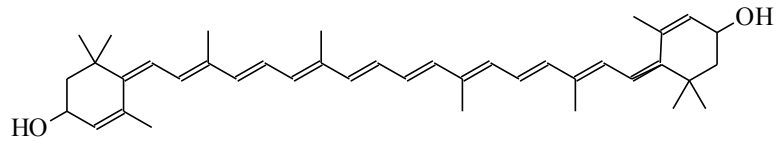


(3R, 3'R)- β, β -Caroten-3, 3'-diol
Zeaxantină



(3R, 3'R, 6'R)- β, ϵ -Caroten-3, 3'-diol

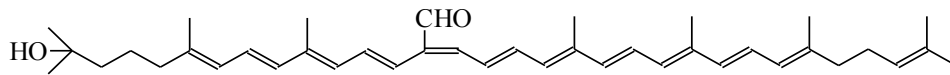
Luteină



4',5'-Didehidro-4',5'-retro- β,β -caroten-3,3'-diol
Eschscholtzxantină

c) *Carotenoide alchidice și aldohidrocarotenoide*

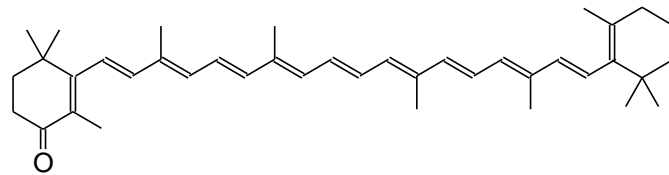
Acest tip de carotenoide sunt produși de oxidare ai hidrocarotenoidelor.



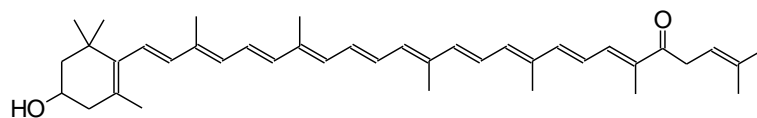
13-cis-Rodopin-20-al
Rodpinal

d) *Ceto- și cetohidrocarotenoide*

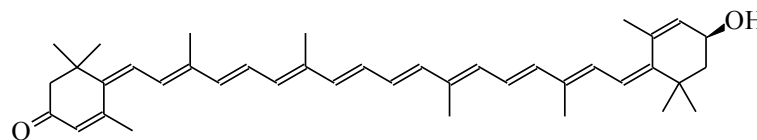
Există numeroase carotenoide cetonice și cetohidrolice, naturale și sintetice:



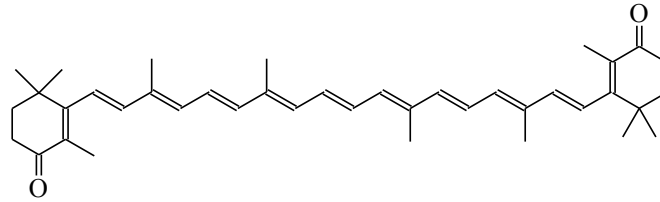
β,β -Caroten-4-onă
Echinenonă



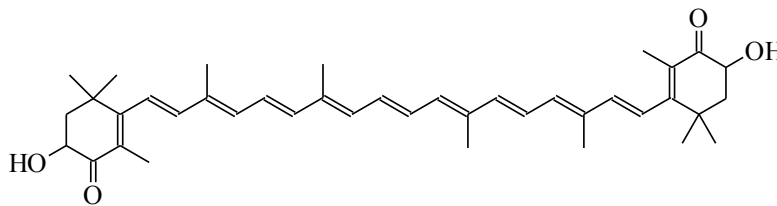
3-Hidroxi- β,ψ -caroten-4'-onă
Rubixantină



3'-Hidroxi-4',5'-didehidro-4',5'-retro- β,β -caroten-3-onă
Eschscholtzxantonă



β,β -Caroten-4,4'-dionă
Cantaxantină

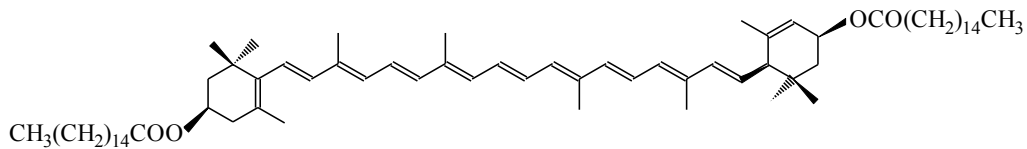


3,3'-Dihidroxi-4,4'-diceto- β,β -caroten
Astaxantină

• **Esteri, eteri și glicozizi ai xantofilelor și epoxizi ai xantofilelor și ai carotinelor**

a) *Esteri carotenoidici*

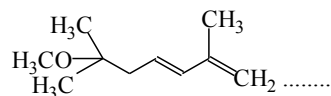
Esterii carotenoidici sunt derivați de la xantofile și acizi grași, cum ar fi acidul palmitic:



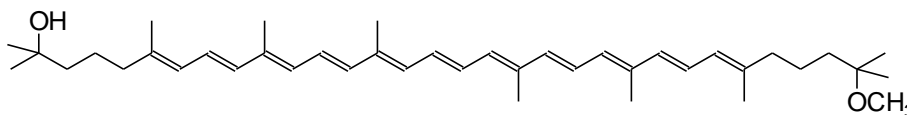
(3R,3'S,6'R)- β,ϵ -Caroten-3,3'-diol-dipalmitat
Helenien, Luteină-dipalmitat

b) *Eteri carotenoidici*

Acest tip de carotenoide provin de la hidroxi-carotenoide care au gruparea HO-eterificată sub formă de eter metilic:



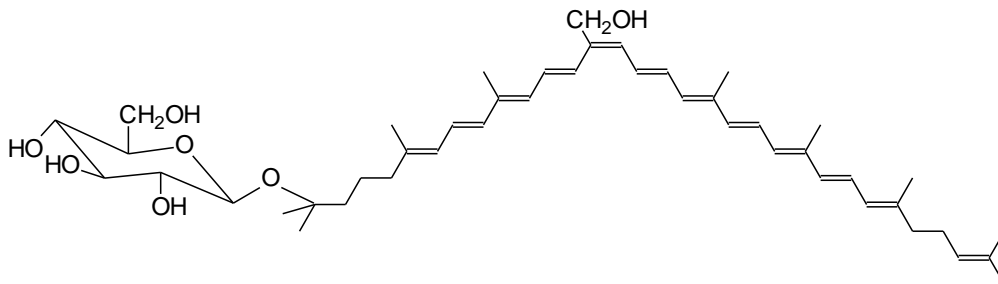
Acești compuși, denumiți și aleoxicarotenoide, sunt răspândiți în special în bacterii și au în general o structură aciclică.



1'-Metoxi-3',4'-didehidro-1,2,1',2'-tetrahidro- Ψ,Ψ -caroten-1-ol
Rodovibrină

c) *Glicozizi carotenoidici*

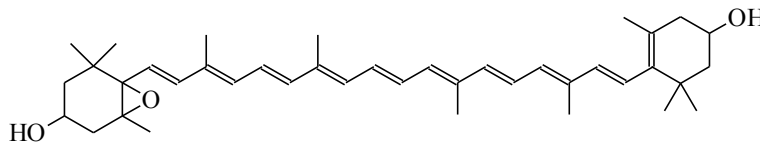
Acest tip de carotenoide derivă de la hidroxicarotenoide prin legarea grupei HO- de o monoglucidă. Cel mai adesea, restul de glucidă este glucoză sau ramnoză.



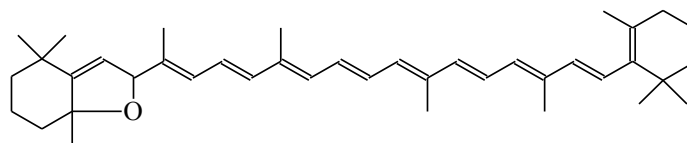
Rodopin-glicozid

d) *Epoxizi carotenoidici*

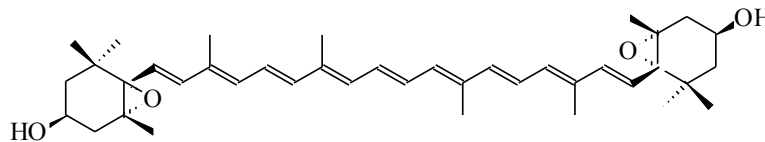
Primii produși de oxidare care rezultă din catabolizarea carotenoidelor sunt epoxicarotenoidele. Acestea pot conține oxigenul legat în diferite poziții: 1,2; 5,6 și 5,8, atât la nivelul catenei polienice, cât și la nivelul ciclului iononic. Există atât monoepoxi-, cât și diepoxicarotenoide având oxigenul legat așa cum s-a arătat anterior. 5,8-Epoxizii se mai numesc și *furanoizi*. Derivații epoxizii și furanoidici pot proveni atât de la hidrocarburile carotenoidice, cât și de la hidroxicarotenoide.



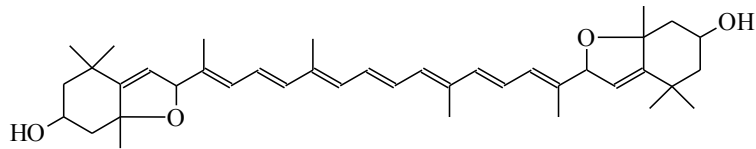
5,6-Epozi-5,6-dihidro-β,β-caroten-3,3'-diol
Anteraxantină



5,8-Epozi-5,8-dihidro-β,β-caroten
Mutatocrom



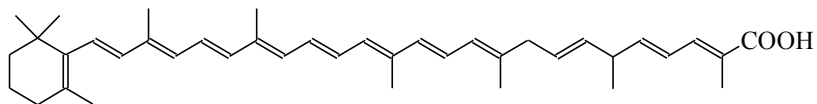
(3S,5R,6S,3'S,5'R,6'S)-5,6,5',6'-Diepozi-5,6,5',6'-tetrahidro-β,β-caroten-3,3'-diol
Violaxantină



5,8,5',8'-Diepoxi-tetrahidro- β,β -caroten-3,3'-diol
Auroxantină

- **Acizi carotenoidici**

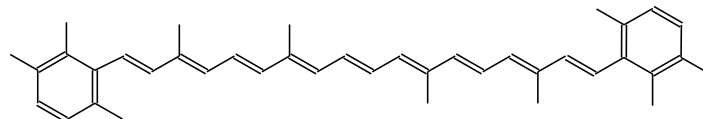
Sunt cunoscuți relativ puțini acizi carotenoidici naturali din grupa carotenoidelor C_{40} și sunt produși de oxidare ai acestora [18]. În bacterii este frecvent întâlnită torularodina.



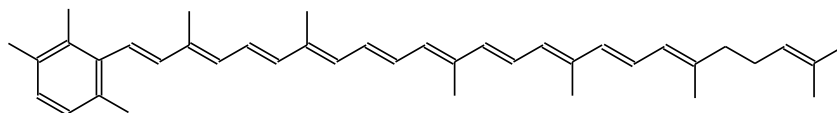
Acid 3',4'-Didehidro- β,Ψ -caroten-16'-oic
Torularodină

- **Carotenoide cu cicluri aromatice**

Acest tip de carotenoide prezintă ca și grupe terminale nu cicluri ionice, cis 1,2,5- sau 1,2,3-trimetilbenzen. Au fost izolate din bureții de mare și din bacterii [19,20]. Se formează prin aromatizarea carotenoidelor β -ionice:



ϕ,ϕ -Caroten
Izorenieraten



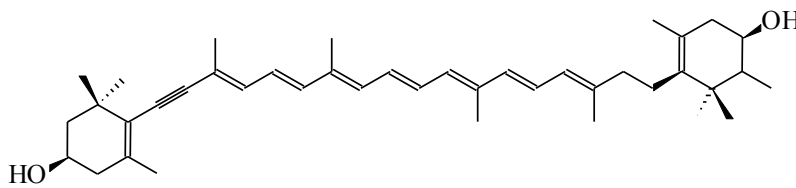
ϕ,Ψ -Caroten
Clorobacten

- **Carotenoide acetilenice**

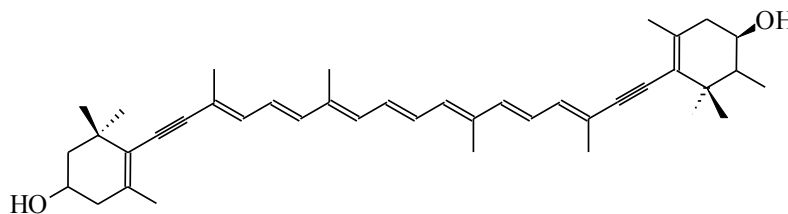
Carotenoidele acetilenice au fost identificate mai întâi în alge și apoi în animalele marine. Din punct de vedere structural, conțin în sistemul polienic una sau două triple legături, în imediata apropiere a ciclurilor ionice:



Toate aceste carotenoide sunt xantofile. În figura 16 sunt prezentate structurile chimice ale unor carotenoide acetilenice.



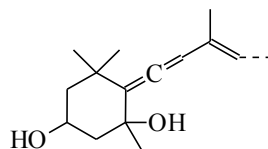
(3R,6'R)-7,8-Didehidro- β,ϵ -caroten-3-ol
Crocoxantina



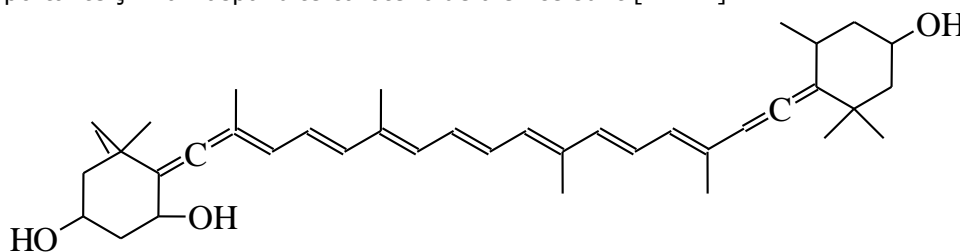
(3R,3'R)-Tetradehidro- β,β -caroten-3,3'-diol
Alloxantina

- **Carotenoide alenice**

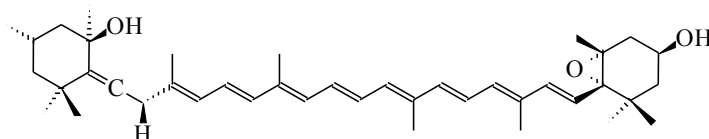
Acest tip de carotenoide se caracterizează prin prezența în sistemul polienic a uneia sau a două grupări alenice.



Au fost identificate în algele brune, în unele marine, în frunze. Cele mai importante și mai răspândite carotenoide alenice sunt [21-24]:



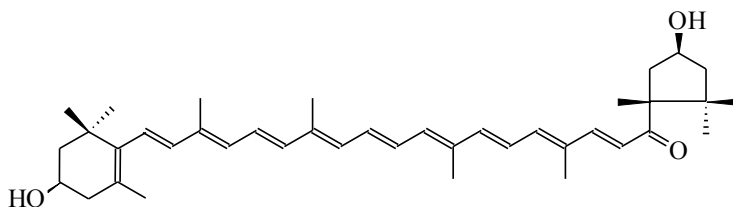
(3S,5R, 6R, 3'R) 6,7-Didehidro-6,7-dihidro- β,β -caroten-3,5,3'-triol
Deepoxineoxantina



(3S,5R,6R,3'S,5'S,6'S)-5,6-Epoxi-6,7-didehidro-5,6,5',6'-tetrahidro- β,β -caroten-3,5,3'-trioi
Neoxantină

- **Carotenoide cu pentacicluri**

Acești compuși sunt carotenoide puternic oxigenate care prezintă la capetele sistemului polienic unul sau două pentacicluri:



(3R, 3'S, 5R)-3,3'-Dihidroxi- β,κ -caroten-6'-onă
Capsantină

2.1.2.4. Carotenoide cu mai puțin de 40 atomi de carbon în moleculă

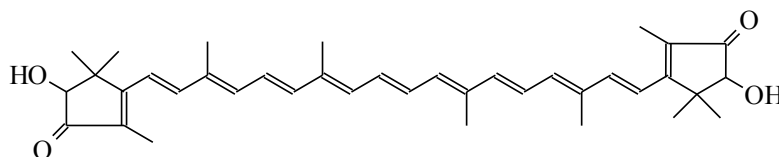
Prin degradarea oxidativă a carotenoidelor C_{40} se formează carotenoide cu mai puțin de 40 atomi de C în moleculă, denumite și carotenoide degradate. Se cunosc mai multe tipuri de carotenoide degradate:

- secocarotenoide – rezultă prin ruperea unei legături C=C și conțin oxigen, dar au tot 40 atomi de carbon;
- norcarotenoide – rezultate din pierderea prin oxidare a unora sau a două resturi metilice din carotenoidele C_{40} ;
- apocarotenoide – rezultate prin fragmentarea la nivelul catenei polienice a carotenoidelor C_{40} .

Astfel, carotenoidele degradate cu mai puțin de 40 atomi de C în moleculă se împart în două grupe: norcarotenoide și apocarotenoide [13,17].

- **Norcarotenoide**

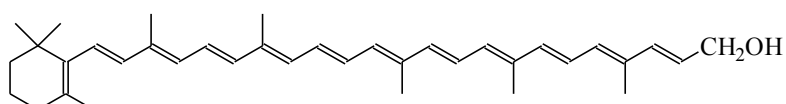
Acest tip de carotenoide au un schelet cu unul sau doi atomi de carbon mai puțin decât carotenoidele C_{40} din care se formează [17].



3,3'-Dihidroxi-2,2'-dinor- β,β -caroten-4,4'-dionă
Actinoeritrină (C_{38})

- **Apocarotenoide**

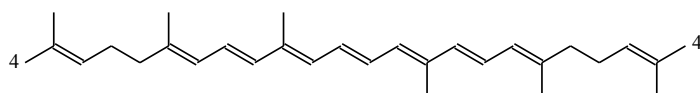
Apocarotenoidele se formează prin degradarea oxidativă a diferite carotenoide C_{40} și conțin oxigen sub formă de $-CH_2-OH$, $-CHO$, $-COOH$ [17]. Unele rezultă din carotenoide C_{40} aciclice sau ciclice, prin scindare la o extremitate sau la ambele extremități [13]; în locul unde se petrece scindarea apare gruparea alcoolică, aldehydică, cetonă, carboxilică sau esterică:



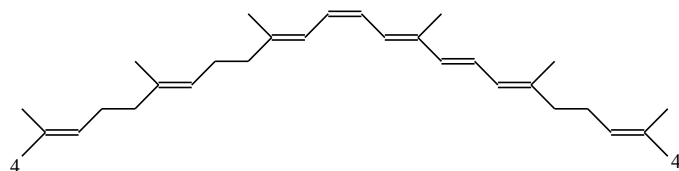
3',4'-Didehidro-2'-apo- β , ψ -caroten-2'-ol
 β -Apo-2'-carotenol

2.1.2.5. Carotenoide cu 30 atomi de carbon

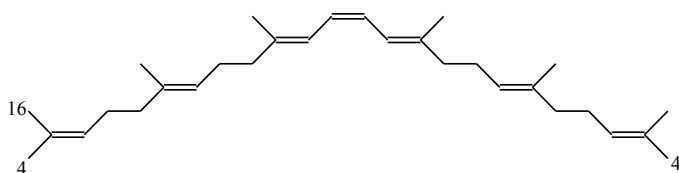
Carotenoidele C_{30} sunt diapocarotenoide: hidrocarburi, aldehide și acizi. Scheletul lor este de diaponeurosporen, diapofitoen și diapofitofluen:



Diaponeurosporen



Diapofitofluen



Diapofitoen

2.1.3. Configurația carotenoidelor

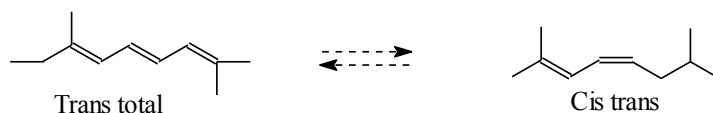
În cadrul stereochemiei carotenoidelor se iau în considerare 3 aspecte: izomeria geometrică sau cis-trans [25], față de legătura dublă $C=C$; configurația față de legătura simplă $C-C$ și configurația absolută a unor grupări.

2.1.3.1. Izomeria geometrică

Izomeria geometrică (E/Z) a legăturilor duble carbon-carbon este un aspect interesant al stereochemiei carotenoidelor, deoarece s-a demonstrat că izomerii E/Z pot avea proprietăți biologice diferite [2]. Literatura în acest domeniu este destul de vastă: prima lucrare comprehensivă despre izomeria cis-trans a carotenoidelor și vitaminelor A a fost publicată în 1962 [25]. În concordanță cu numărul de legături duble, pentru fiecare carotenoidă există un număr mare de izomeri E/Z, de exemplu: 1056 pentru licopen și 272 pentru β -caroten. Numărul de stereoizomeri (N) pentru un compus cu n duble legături este: $N=2^n$. În privința izomeriei cis-trans, dublele legături ale lanțului polienic pot fi clasificate în două grupe:

- 1) legături duble fără împiedicare sterică (legătura dublă centrală 15,15' și dublele legături legate de o grupă metilică, cum sunt legăturile duble 9,9'- și 13-, 13'-);
- 2) legături duble care prezintă împiedicare sterică (legăturile duble 7,7' și 11,11')[2].

Majoritatea carotenoidelor naturale au configurația *trans*-total, aceasta constituind forma termodinamică cea mai stabilă. Amestecuri de izomeri *cis-trans* se pot obține ușor sub acțiunea catalitică a iodului sau sub acțiunea radiațiilor ultraviolete:



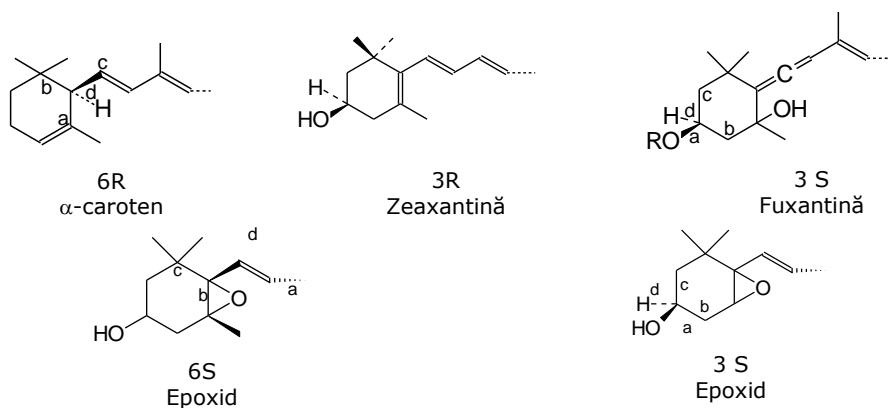
Convertirea în izomeri geometrici poartă denumirea de stereomutație. Maximele de absorbție ale izomerilor *cis-trans*, în domeniul vizibil, sunt deplasate hipsocrom cu câțiva nm față de forma *trans*-total. Spectrele în ultraviolet prezintă un maxim caracteristic denumit "*cis-peak*", situat la 330-340 nm.

• Conformația

Modul de aranjare spațială a moleculelor diferitelor carotenoide a fost cercetat prin spectre de absorbție, cristalografie cu raze x și spectrometrie r.m.p. [21, 26]. La carotenoidele aciclice, cromoforul polienic adoptă o conformație planară, iar legăturile simple C-C se află în formă s-cis sau s-trans. În acest fel se permite o bună cuplare a electronilor și o delocalizare a acestor electroni. La carotenoidele ciclice, cu un ciclu sau cu două cicluri, are loc o împiedicare sterică între poliiena liniară și ciclu, și astfel, o limitare a orbitalilor π ai dublei legături din ciclu și cei ai catenei polienice, fapt constatat prin scăderea absorbției maxime.

• Configurația absolută

Configurația absolută a carotenoidelor care prezintă atomi de carbon asimetrici a fost determinată prin măsurarea activității optice, determinarea dispersiei rotatorii optice (D.O.R), dicroism circular (D.C.), cristalografie cu raze X [1]. Configurația absolută a celor mai frecvente carotenoide este:



2.1.4. Nomenclatura

Wackenroder (1831) a izolat pentru prima oară un pigment carotenoidic sub formă cristalină, din morcov și i-a atribuit denumirea de „carotină”. Apoi s-a constatat că această hidrocarbură este alcătuită din trei izomeri: α -, β - și γ -caroten.

Regulile pentru nomenclatura carotenoidelor (denumirile semisistematice) au fost publicate de International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) și IUPAC International Union of Biochemists (IUB) Commissions on Nomenclature (1974) [17]. Denumirea uzuală a carotenoidelor provine în cea mai mare parte de la denumirea sursei naturale din care s-a extras carotenoida. Astfel s-a format *nomenclatura primară* a carotenoidelor (tabelul 1).

Tabelul 2.1.

| <i>Denumirea carotenoidului derivată din denumirea plantei [1]</i> | | |
|--|--|---------------------------------|
| Nr. crt. | Denumirea științifică a plantei | Denumirea carotenoidului |
| 1. | <i>Capsicum annuum</i> | Capsantină |
| 2. | <i>Capsicum annuum</i> | Capsorubină |
| 3. | <i>Celastrus scandens</i> | Celaxantină |
| 4. | <i>Citrus aurantium</i> | Citranaxantină |
| 5. | <i>Eschscholtzia californica</i> | Eschscholtzxantină |
| 6. | <i>Fucus vesiculosus</i> | Fucoxantină |
| 7. | <i>Gazania rigens</i> | Gazaniaxantină |
| 8. | <i>Rosa canina</i> | Rubixantină |
| 9. | <i>Taraxacum officinale</i> | Taraxantină |
| 10. | <i>Torula rubra</i> | Torulină |
| 11. | <i>Viola tricolor</i> | Violaxantină |

În prezent, nomenclatura carotenoidelor prezintă reguli care sunt în concordanță cu principiile din chimia organică, sunt deschise pentru încadrarea oricărei carotenoid și reflectă structura chimică.

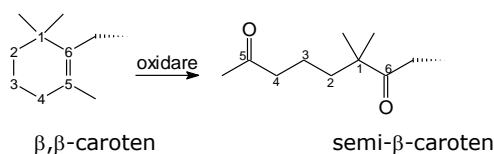
În această nomenclatură se folosesc literele grecești pentru a desemna diferitele sisteme sau grupe terminale (tabelul 2).

Tabelul 2.2.*Natura sistemelor terminale din molecula carotenoidelor și simbolizarea lor[17]*

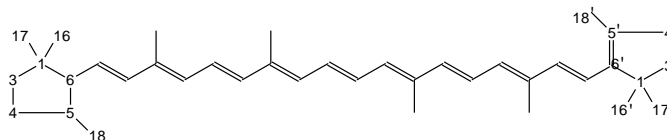
| Natura sistemului terminal | Simbolizarea cu litere grecești ca prefixe |
|---|---|
| Ciclul α -iononic (1,1,5-trimetil-4-ciclohexenă) | ϵ (epsilon) |
| Ciclul β -iononic (1,1,5-trimetil-5-ciclohexenă) | β (beta) |
| Sistem pseudoiononic | Ψ (psi) |
| Ciclul ciclopentan (1,1,5-trimetilciclopentan) | κ (kappa) |
| Ciclul aromatic (1,2,5-trimetilbenzen) | ϕ (phi) |
| Ciclul aromatic (1,2,3-trimetilbenzen) | χ (chi) |

Astfel, denumirea semisistematică a hidrocarburilor carotenoidice (carotine) se formează prin adăugarea a două litere grecești, ca prefixe, la cuvântul carotină (de exemplu: β,β -caroten; ϵ,Ψ -caroten; ϵ,χ -caroten). Aceste prefixe se citează în ordine alfabetică.

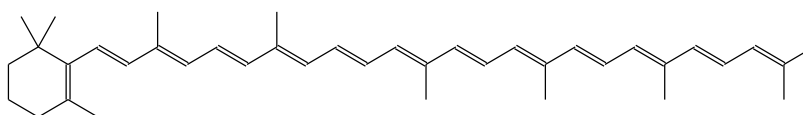
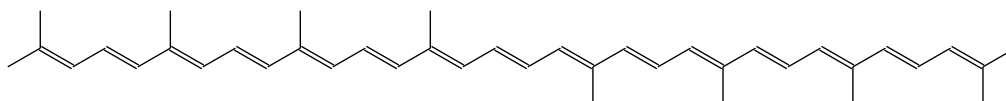
Prin ruperea unei legături dintre doi atomi de carbon vicinali din ciclul terminal al unei carotenoide rezultă *secocarotenoide* – compuși care au același număr de atomi de carbon ca și carotenoidele de la care rezultă (de exemplu β,β -carotenul trece în semi- β -caroten etc.).



Denumirea *norcarotenoide* se realizează utilizând prefixul nor, care este precedat de numărul atomului de carbon care a fost eliminat.

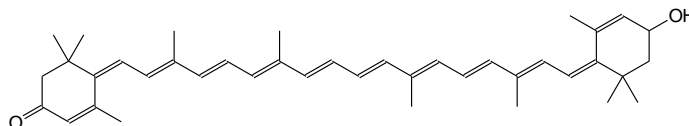
2,2'-Dinor- β,β -caroten

În cazul *hidrocarburilor carotenoidice acetilenice sau alenice* care diferă doar prin conținutul în hidrogen față de carotenoidele precursoare, nomenclatura va fi alcătuită din prefixele dehidro sau hidro cu precizarea numărului de atomi de carbon de la care au fost îndepărtați atomii de hidrogen. La îndepărtarea sau primirea unui număr mai mare de atomi de hidrogen se utilizează și prefixele di-, tri-, tetra-, penta- etc.:

3',4'-Didehidro- β,Ψ -caroten3,4,3',4'-Tetradehidro- Ψ,Ψ -caroten

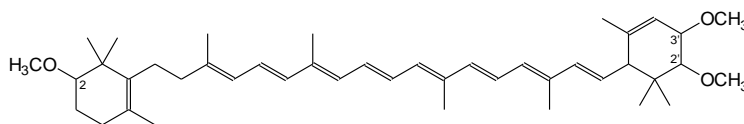
26 Stadiul cunoașterii în domeniu – 2

Nomenclatura diferiților derivați, îndeosebi cei oxigenați ai hidrocarburilor carotenoidice, se formează din denumirea carotenoidei de la care derivă în conformitate cu nomenclatura utilizată în chimia organică. Grupările funcționale sunt precizate prin sufixele sau prefixele: „ol”, „al”, „onă” și „oic”.



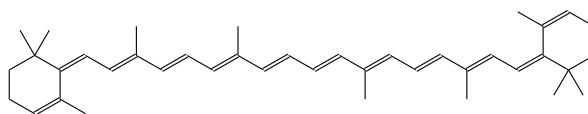
Acid 3-hidroxi-3'-ceto- β,ϵ -caroten-16-oic

Derivații epoxidici se denumesc prin prefixul „epoxi”, iar eterii prin „alcoxi” („metoxi”, „etoxi”).



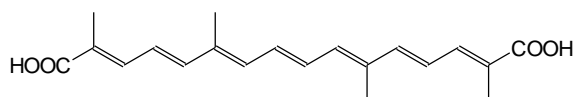
2,2',3'-Trimetoxi- β,ϵ -caroten

Carotenoidele cu sistem de duble legături inversat se desemnează prin prefixul „retro”:



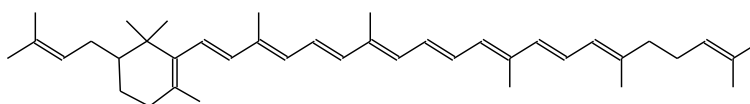
4',5'-Didehidro-4',5'-retro- β,β -caroten

Apocarotenoidele se denumesc utilizând prefixul „apo” (respectiv „diapo” dacă fragmentarea carotenoidei C_{40} este la ambele capete) urmat de numărul atomului de carbon cu gruparea oxigenată și numele fragmentului rămas.



Acid-8,8'-diapocaroten-8,8'-dioic

Denumirea carotenoidelor cu peste 40 atomi de carbon se face prin mono- sau disubstituenți ai carotenoidelor C_{40} de la care rezultă:



2-(3-Metil-2-butenil)- β,ψ -caroten(C_{45})

Pentru a arăta conformația geometrică a moleculei se utilizează prefixul cis sau trans, cu indicarea numărului atomului de carbon la care se află dubla legătură cu configurație cis sau trans.

Configurația absolută este redată prin simbolurile R și S, care se scriu după atomii care preced denumirea carotenoidei.

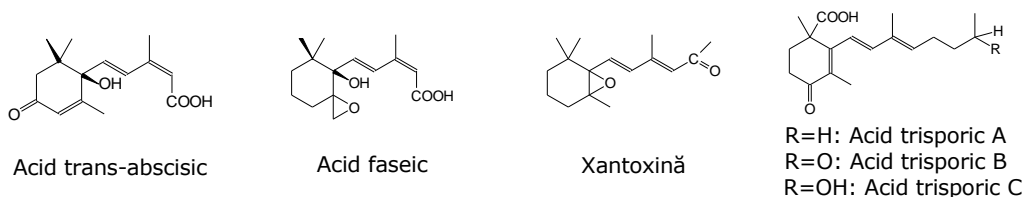
În practica curentă este utilizată atât nomenclatura obișnuită cât și cea semisistematică.

2.1.5. Metaboliți ai carotenoidelor

Ca urmare a catabolizării carotenoidelor rezultă o serie de compuși cu un schelet format din 20 atomi de carbon sau mai puțin, compuși deosebit de importanți pentru organismele vegetale și animale, având rol reglator în multe procese fiziologice ale acestora [4, 13].

2.1.5.1. Metaboliți din regnul vegetal

Din regnul vegetal s-au izolat o serie de compuși care sunt considerați metaboliți ai carotenoidelor, fiind rezultatul a numeroase biotransformări oxidative [4]. Mai importanți sunt: acidul abscisic, trisporic și faseic și diferiții lor derivați, precum și unele „xantoxine”:

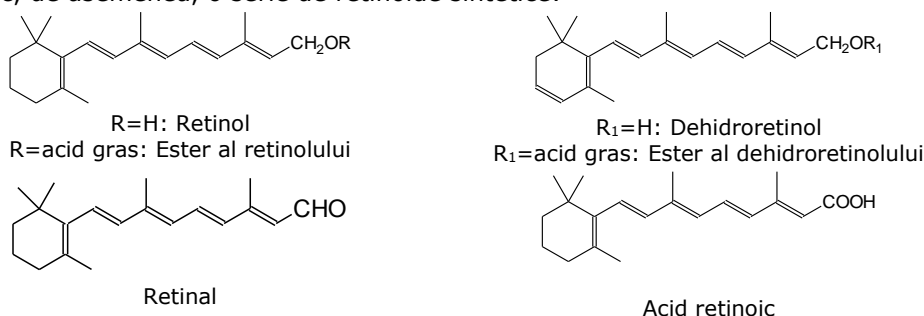


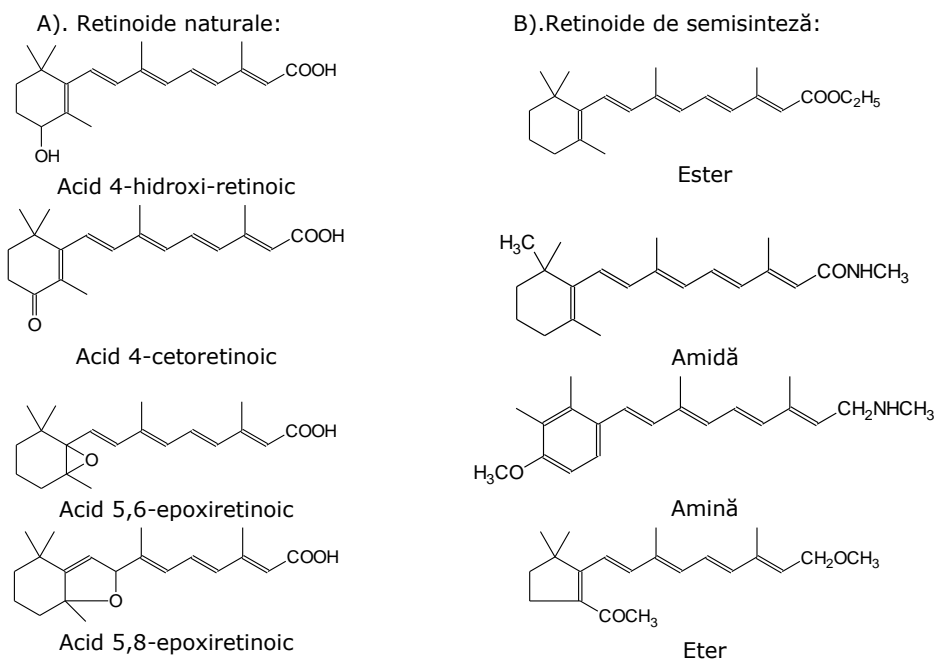
2.1.5.2. Metaboliți din regnul animal

Cei mai importanți metaboliți ai carotenoidelor care se află în regnul animal sunt retinolii (vitaminele A) și retinoidele [13].

Retinoli. Se cunosc doi retinoli: retinolul (vitamina A₁) și dehidroretinolul (vitamina A₂). De asemenea, se cunosc formele aldehydice (retinalul) și carboxilice (acidul retinoic).

Retinoide. Retinoidele sunt analogi structurali ai retinolului. Printre retinoidele naturale sunt incluse și retinolul, acidul retinoic și o serie de derivați. Se cunosc, de asemenea, o serie de retinoide sintetice:





2.2. RĂSPÂNDIREA COMPUȘILOR CAROTENOIDICI

2.2.1. Generalități

Spre deosebire de restul pigmenților naturali (calcone, aurone, flavone, antociani, chinone, pigmenți indolici, pigmenți profirinici etc.), carotenoidele sunt cei mai răspândiți pigmenți care se găsesc atât în regnul vegetal cât și în cel animal [2,5]. Astfel, carotenoidele sunt sintetizate de diverse bacterii, se găsesc în alge - de unde au fost izolate și caracterizate peste 100 de tipuri de carotenoide. Pentru oameni, cea mai importantă sursă de carotenoide sunt plantele, unde adesea culorile strălucitoare ale carotenoidelor sunt mascate de clorofilă. Carotenoidele sunt responsabile pentru minunatele culori ale multor fructe (ananas, lămâi, portocale, roșii, ardei etc.) și flori precum și pentru culorile multor păsări, insecte și animale marine. În mod normal carotenoidele apar în concentrații mici, dar acestea variază enorm de la o sursă la alta. Producția totală de carotenoide în natură a fost estimată la cca. 100.000.000 tone pe an. [2].

În diferite organisme vegetale și animale, carotenoidele se pot găsi în stare liberă sau sub formă de esteri, eteri, glicozide, complecși cromatoproteici, complecși lipoproteici etc. [1,4, 5].

2.2.2. Răspândirea carotenoidelor în regnul vegetal

2.2.2.1. Organisme autotrofe

A. Plante superioare

În țesuturile fotosintetizante (frunze, tulpini, muguri, sepale etc.) și în cele nefotosintetizante (fructe, flori, semințe, rădăcini, polen etc.) ale plantelor superioare (angiosperme și gimnosperme) au fost identificate un număr relativ mare și variat de carotenoide. Aceste substanțe se găsesc localizate predominant în cloroplastele și cromoplastele organismelor vegetale. În anumite condiții, ele pot să apară și în sucii citoplasmatic extraplastidic, mai ales toamna, când se produce degradarea plastidelor, precum și la unele alge, ceea ce imprimă toamna țesuturilor și mediului acvatic culoarea carotenoidelor [4].

În urma numeroaselor cercetări efectuate pe plante din diferite regiuni s-a constatat că în țesuturile verzi fotosintetizate se găsesc în mod constant patru carotenoide principale, în următoarele proporții [1]:

- β -carotenul: 40%;
- luteina: 40%;
- violaxantina: 18%;
- neoxantina: 12%.

Deoarece aceste carotenoide principale se găsesc în toate țesuturile fotosintetizante indiferent de natura lor, se poate presupune că toate plantele superioare derivă de la aceleași strămoș comun (ancestral). În tabelul 3 este prezentat conținutul în carotenoide al unor tipuri de frunze.

Tabelul 2.3.

Conținutul în carotenoide al unor frunze de măr, tutun și cartof ($\mu\text{g/g}$) [27]

| Tip de carotenoidă | Frunze măr | Frunze tutun | Frunze cartof |
|----------------------------------|------------|--------------|---------------|
| α -caroten | 63,3 | 7,5 | 30,0 |
| β -caroten | 378,6 | 880,0 | 800,0 |
| 5,6-Monoepoxi- α -caroten | 3,6 | 0,0 | - |
| β -Zeacarotină | - | - | 4,0 |
| Violaxantină | 194,6 | 570,0 | - |
| Luteină | 651,0 | 1476,6 | 1600,0 |
| Neoxantină | 130,6 | 663,0 | - |
| Total carotenoide | 1448,2 | 3813,6 | 2434,0 |

La țesuturile fotosintetizante, conținutul de carotenoide depinde de natura speciei, deoarece pigmentii sunt determinați genetic și de influența condițiilor de mediu. Conținutul de carotenoide hidrocarburice (α , β , γ , δ , ϵ -carotenul, α -, β -zeacarotina, licoprina, fitoenul, fitofluenul etc.) este cuprins între 5 și 36% din totalul carotenoidelor iar conținutul în α -carotina este cuprins între 0 și 40% din totalul carotenoidelor hidrocarburice. Xantofilele din acest tip de țesuturi se găsesc în stare liberă, neesterificate sau esterificate, încorporate în granele cloroplastelor. Odată cu "îmbătrânirea" cloroplastelor (de obicei toamna), xantofilele sunt eliberate în citoplasmă, unde se produce esterificarea sau eterificarea lor [1].

Neamțu și Bodea (1970) [28] au determinat conținutul în carotenoide al frunzelor de vâsc ("*Viscum album*") recoltate de pe diferite plante gazdă, pentru a cunoaște în ce măsură planta gazdă influențează natura și conținutul pigmentilor carotenoidici din plantele semiparazite (tabelul 4).

Tabelul 2.4.

Conținutul în carotenoide ($\mu\text{g/g}$ frunze proaspete) al frunzelor de "*Viscum album*", recoltate în luna mai [28]

| Carotenoida | Planta gazdă | | | |
|-------------------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| | <i>Salix fragilis</i> (salcie) | <i>Populus italia</i> (plop) | <i>Robinia pseudacacia</i> (salcâm) | <i>Acer compestre</i> (jugastru) |
| α -caroten | 0,8 | 1,2 | 0,9 | 1,5 |
| β -caroten | 21,8 | 23,2 | 24,2 | 22,3 |
| Criptoxantină | 1,9 | 2,6 | 2,3 | 1,7 |
| Luteină | 35,6 | 38,0 | 39,0 | 36,0 |
| Violaxantină | 2,6 | 3,3 | 3,0 | 3,7 |
| Heoxantină | 2,0 | 1,5 | 1,0 | 1,0 |
| Total carotenoide | 7,9 | 83,6 | 76,9 | 75,0 |

Din analizele efectuate se poate observa că natura carotenoidelor din frunzele de vâsc nu depinde de felul plantei gazdă, ceea ce demonstrează faptul că pigmentii carotenoidici sunt bine determinați genetic. Deosebirile care apar sunt nesemnificative.

B. Plante inferioare

a). Mușchi și pteridofite ("*Bryophyta* și *Pteridophyta*")

Din cercetarea a peste 60 de specii de mușchi a reieșit că și în mușchi se găsesc aceleași carotenoide principale ca și în frunzele plantelor superioare (β -carotenul, luteina, violaxantina, neoxantina), iar dintre cele secundare apar frecvent α -carotenul, zeaxantina, eloxantina și auroxantina [4,29].

În pteridofite se găsesc aceleași carotenoide ca și în mușchi și în frunzele plantelor terestre.

b). Licheni

Lichenii conțin atât carotenoide specifice algelor verzi, cât și ciupercilor care intră în constituția lor [4].

c). Alge

Pe baza a numeroase cercetări, s-a constatat că pigmentii carotenoidici din diferite încrângături, clase, ordine și specii de alge sunt mai numeroși și mai caracteristici pentru diferite grupe taxonomice decât în cazul țesuturilor fotosintetizante ale plantelor superioare. De asemenea carotenoidele secundare și cele specifice sunt mai numeroase decât în cazul plantelor superioare [4,30,31]. În alge, carotenoidele se găsesc preponderent localizate în cloroplaste și cromozomi, în organele de reproducere, în petele colorate, precum și extraplastidic, în sucii citoplasmatic (în special la algele coloniale), într-o proporție mai mare decât la plantele superioare.

- Alge verzi (*Chlorophyta*)

În cloroplastele algelor verzi se găsesc aceleași carotenoide principale (β -carotina, luteina, violaxantina, neoxantina) ca și în frunzele plantelor superioare [4].

Printre carotenoidele secundare care se găsesc aproape constant în numeroase alge verzi, se numără: zeaxantina, anteraxantina, astaxantina precum și unele carotenoide caracteristice.

Dintre carotenoidele secundare întâlnite pentru prima oară în natură, identificate în alga "*Trentapohlia iolithus*" se menționează: 2-hidroxi- β -carotenul; 2-hidroxi- β -carotenul; 2,2-dihidroxi- α -carotenul [33].

În algele verzi au fost identificate o serie de carotenoide specifice neîntâlnite în frunzele plantelor superioare, cum ar fi: loraxantina (β , ϵ -caroten-3,19,13'-triol),

sifonaxantina (3,3',19'-trihidroxi-7,8-dihidro-8- α -caroten) și sifoneina (3,19,3'-trihidroxi-7,8-dihidro- β,ϵ -caroten-8-ona-19-laurat) [4].

- *Alge roșii (Rhodophyta)*

Culoarea roșiatică specifică acestor alge este dată de un pigment necarotenoidic: ficoeritrina. Dintre carotenoidele de bază care se găsesc în majoritatea acestor alge fac parte: α - și β -carotenul, luteina și zeaxantina care sunt însoțite frecvent de β -criptoxantină. Conținutul carotenoidelor din 8 specii de alge roșii este prezentat în tabelul 5.

Majoritatea algelor roșii conțin un număr mai mic de carotenoide decât algele verzi. Ele nu sintetizează carotenoide cu structură acidică sau cu grupe alenice.

Algele roșii nu conțin carotenoide specifice cu importanță chimotaxonomică pentru aceasta grupă de alge.

- *Alge brune (Phaeophyta)*

Alături de fucoxantină, pigmentul principal și caracteristic pentru acest tip de alge, se găsesc în mod constant: β -carotenul și violaxantina. Nu s-au identificat până în prezent α -carotina și luteina. Dintre carotenoidele secundare apar în unele specii, în cantitate mică: diatoxantina și diadinoxantina [4].

Tabelul 2.5.

Conținutul carotenoidelor din alge roșii [$\mu\text{g/g}$] material uscat [34]

| Specia | α -caroten | β -caroten | β -criptoxantină | Luteină | Zeaxantină |
|-------------------------------|-------------------|------------------|------------------------|---------|------------|
| <i>Bangia fuscopurpurea</i> | - | 170 | - | 780 | 250 |
| <i>Bonnemaïsonia hamifera</i> | 40 | 20 | - | 170 | urme |
| <i>Ceramium rubrum</i> | 14 | 22 | - | 37 | 2 |
| <i>Gigartina stellata</i> | - | 1,4 | - | 8,3 | 1,4 |
| <i>Nemalion helminthoides</i> | 10 | 110 | - | 410 | - |
| <i>Polysiphonia brodiaei</i> | - | 71 | 12 | - | 87 |
| <i>Polysiphonia urceolata</i> | - | 30 | - | - | 160 |
| <i>Rhodymenia palmata</i> | 80 | 30 | - | 240 | - |

- *Alge albastre (Cyanophyta)*

Culoarea acestor alge este dată de un pigment porfirinic: ficocianina. Carotenoidele principale prezente în algele albastre sunt: β -carotenul, ochinenona și zeaxantina [35].

Algele albastre conțin un număr mult mai mare și mai variat de carotenoide decât celelalte tipuri de alge. În multe specii se găsesc carotene, cetone, epoxizi, furanoizi, xantofile, carotenoide glicozidice precum și carotenoide alenice [36].

- *Alge aurii (Chrysophyta)*

Algele aurii sunt un grup heterogen de plante cu structură celulară și nucleu bine individualizat, de culoare aurie, în diferite nuanțe, determinată de conținutul carotenoidelor continuate în cloroplaste, cromatofori și extraplastidice.

Majoritatea autorilor împart plantele din încrengătura Chrysophyta în cinci clase: *Xanthophyceae*, *Chrysophyceae*, *Bacillariophyceae*, *Haptophyceae* și *Eustagnaphyceae* în care s-au identificat în principal β -carotenul, fucoxantina, diadinoxantina(5,6-epoxi-7,8'-didehidro-5,6-dihidro- β,β -caroten-3,3-diol) și diatoxantina (7,8-didehidro- β,β -caroten). Alături de aceste carotenoide, în unele specii s-au mai identificat vouserixantina (5,6'-epoxi-6,7-didehidro-5,6,5',6'-tetrahidro- β,β -caroten-3,5,19,3'-tetrol) și neoxantina [4,37].

d) *Bacterii fotosintetice*

Spre deosebire de bacteriile heterotrofe, care conțin un număr mare și variat de carotenoide, inclusiv carotenoide cu peste 40 atomi de carbon în moleculă, bacteriile fotosintetice conțin un număr mai redus de carotenoide, unele similare cu

cele din frunzele plantelor superioare și algele verzi. De asemenea conțin carotenoide acidice, cu grupări hidroxilice la C₁, C₂, C₃, ceto-carotenoide, glicozide carotenoidice și carotenoide specifice: rodovibrina, anhidrorodovibrina, spiriloxantina, metoxicaotenoide, rodopină etc [38].

2.2.2.2. Organisme și țesuturi vegetale nefotosintetizante

Compușii carotenoidici din organismele și țesuturile nefotosintetizante sunt mult mai numeroase și mai variate sub aspect structural decât cele din organismele autotrofe. Se găsesc atât în stare liberă cât și sub formă de diferiți compuși (esteri, glicozide, complecși carotenoproteici etc) [1,4].

C. Țesuturi și organisme nefotosintetizante din plantele superioare

- *Semințe*

Semințele plantelor superioare conțin un număr foarte redus de carotenoide, în majoritatea cazurilor evidențiindu-se luteină și urme de β-carotină și violaxantină. Ca și caracteristică se menționează conținutul mai ridicat al xantofilelor decât al carotinelor.

Semințele cerealelor, cu excepția porumbului, sunt sărace în carotenoide, având ca și pigment principal (deseori unicul) luteina. Semințele plantelor tehnice, pomilor fructiferi) ierburilor etc. sunt de asemenea sărace în carotenoide. Un conținut mai variat și mai ridicat de carotenoide au semințele plantelor leguminoase; ele conțin carotenoide similare cloroplastelor. În semințele de mazăre, fasole verde, etc. s-au identificat β-carotenul, luteina, violaxantina [2].

În coaja unor semințe se găsesc carotenoide mai variate și mai specifice, neîntâlnite în celelalte părți ale seminței.

Porumbul (*Zea mays*), spre deosebire de alte plante de cultură și din flora spontană, conține în semințe un număr mare de carotenoide; tipul și conținutul în pigmenți carotenoidici determină culoarea boabelor de porumb. Carotenoide frecvent întâlnite în majoritatea soiurilor de porumb sunt: α- și β-carotenul, β-zeacarotina, α- și β-criptoxantina, zeaxantina, luteina, violaxantina, anteraxantina. Pe lângă aceste carotenoide, în unele soiuri de porumb se mai întâlnesc: γ-carotenul, flavoxantina, epoxizi de β-criptoxantina, fitoen, fitofluen, ε-carotenul, acid β-apo-8-carotenoidic etc. [1]. În tabelul 6 este prezentat conținutul în carotenoide din boabele de porumb ale unor hibrizi de diferite proveniențe.

Tabelul 2.6.

Conținutul carotenoidelor din boabele unor hibrizi de porumb de diferite proveniențe (μg/g boabe uscate)[1]

| Carotenoide/ Hibrizi | I D.C. | II Oh. 45 | III Hy | IV HT 180 | V 2 DH 3649 | VI LDH 3677 |
|-------------------------|-----------|--------------|-----------|--------------|----------------|----------------|
| Fitoen | 19,3 | 25,6 | 10,7 | 6,8 | 8,3 | 6,3 |
| Fitofluen | 3,7 | 9,3 | 1,3 | 2,6 | 3,7 | 2,8 |
| β-Carotenul | 2,0 | 4,4 | 0,6 | 2,34 | 2,16 | 3,3 |
| β-Zeacarotina | 1,2 | 4,0 | 0,1 | 1,65 | 1,15 | 1,42 |
| ε-Carotenul | 1,0 | 4,2 | 0,2 | 1,06 | 0,93 | 0,76 |
| α-Criptoxantina | 2,5 | 2,2 | 0,6 | 1,23 | 1,38 | 1,45 |
| Criptoxantina | 2,1 | 3,2 | 1,0 | 2,56 | 2,53 | 3,88 |
| Esteri | 1,1 | 4,0 | 0,5 | 1,35 | 1,30 | 1,26 |
| Luteina | 14,1 | 29,2 | 10,5 | 10,37 | 21,35 | 14,72 |
| Zeaxantina | 6,8 | 5,4 | 3,9 | 14,58 | 30,78 | 31,36 |
| Epoxizi | 1,8 | 1,3 | 0,8 | 2,48 | 4,12 | 2,75 |
| Total carotenoide | 55,6 | 92,8 | 30,2 | 47,02 | 78,05 | 70,00 |

- *Rădăcini și tulpini subpământene*

Cu excepția morcovilor ("*Daucus carota*") și a batatului ("*Ipomoea batatas edulis*"), rădăcinile plantelor sunt sărace în carotenoide. În majoritatea rădăcinilor cercetate s-au evidențiat doar urme de luteină, β -carotină și eventual, violaxantină.

Rădăcinile de morcovi sunt una dintre sursele naturale cele mai bogate în carotenoide. De altfel titulatura de carotenoide provine chiar de la denumirea științifică a morcovului: *Daucus carota*.

Soiurile portocalii de morcovi, în majoritatea cazurilor conțin predominant carotină, în special β -carotină, în timp ce xantofilele reprezintă 5-10% din totalul carotenoidelor. Prin selecție s-au obținut unele varietăți și soiuri de morcovi care conțin de trei ori mai multă lycopină decât β -carotina. În varietățile galbene de morcovi, conținutul xantofilelor este mai mare decât cel al β -carotinei [1,5].

- *Flori*

În funcție de tipul de carotenoide conținute în flori, plantele superioare au fost împărțite în trei categorii [1,4]:

I - Prima grupă este formată din plante care sintetizează în principal carotenoide cu grad ridicat de oxigenare (epoxizi, furanoizi, xantofile, trihidroxilice etc);

II - A doua grupă este formată din florile care sintetizează predominant carotene, în special β -caroten și lycopina;

III - A treia grupă o constituie florile care conțin carotenoide specifice pentru o entitate taxonomică.

Din grupa I fac parte plantele cu flori galbene care cresc în regiuni montane și subalpine, precum și cele care înfloresc primăvara timpuriu. Principalele carotenoide identificate în florile acestor plante sunt: luteina, eloxantina, flavoxantina, auroxantina, anteraxantina, neoxantina, β -carotenul, α -carotenul. (tabelul 2.7.)

Tabelul 2.7.

Conținutul de carotenoide din florile unor plante din regiuni montane (1500-2000 m)
($\mu\text{g/g}$ material proaspăt) [39]

| Pigment | Specia | | | | |
|----------------------|----------------------------|----------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------|
| | <i>Genista oligosperma</i> | <i>Ranunculus flabellifolius</i> | <i>Hieracium filarzsky</i> | <i>Potentilla ternata</i> | <i>Geum montanum</i> |
| α -caroten | 0,8 | - | 0,30 | 0,6 | 0,4 |
| β -caroten | 12,0 | 7,8 | 2,6 | 12,0 | 12,0 |
| Criptoxantina | - | - | 1,8 | 2,0 | 4,0 |
| Criptoxantina-epoxid | - | - | - | 4,0 | - |
| Luteina | 27,0 | 17,3 | 10,2 | 6,3 | 7,6 |
| Zeaxantina | - | - | 25,0 | 10,0 | 8,5 |
| Eloxantina | 6,0 | 8,6 | 25,6 | 20,0 | 15,0 |
| Flavoxantina | 8,0 | 1,4 | 13,0 | 14,0 | - |
| Anteraxantina | - | 1,2 | 7,0 | 2,6 | 1,2 |
| Violaxantina | 14,0 | 2,6 | 15,8 | 8,9 | 3,4 |
| Total carotenoide | 67,8 | 35,7 | 101,3 | 80,4 | 52,1 |

În grupa a II-a sunt curpinse plante cu flori portocalii cum sunt speciile: "*Calendula officinalis*", "*Crocus sativus*", "*Gazania regens*", "*Cucurbita pepo*" etc. În florile acestor plante predomină carotenele (α -, β -, γ -carotenul, lycopina etc.) și xantofilele monohidroxilice (α -, β -criptoxantina, rubixantina, gazaniaxantina) față de xantofilele epoxidice și carotenoidele cu structură β -iononică față de cele cu structură α -iononică..

Conținutul procentual în carotenoide în florile unor soiuri de *Calendula officinalis* este prezentat în tabelul 2.8.

Plantele din grupa a III-a conțin carotenoide specifice cu importanță carotenotaxonomică: eschscholtzxantină pentru speciile "*Adonis aestivalis*" și "*Adonis annua*", capsantina și capsorubina din polenul florilor de "*Aesculus*" și din capsulele coapte de "*Capsicum annuum*", trolixantina din flori de "*Trolius europaeus*", gazaniaxantina din flori de "*Gazania rigens*" etc. O parte din acești taxoni carotenoidici se găsesc numai într-o specie sau gen de plante, fapt ce reflectă caracterul specific al acestor plante, metabolismul lor specific (escholtzxantina, crocetina, gazaniaxantina etc.), iar alții reprezintă doar carotenoida principală, caracteristică, dar care se găsește și în alte genuri sau specii de plante (astaxantina, rodoxantina, capsantina, capsorubina etc.) [1,4].

Tabelul 2.8.

Conținutul în carotenoide al unor soiuri de *Calendula officinalis*
(procente față de totalul de carotenoide) [40]

| Pigmentul / Specia | Double Esterel Orange (%) | Radio Extra Selected (%) | Bonbon Abricot (%) | Double Esterel Jaune (%) |
|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|
| Neoxantina | 0,92 | 1,71 | 2,84 | 1,74 |
| Luteoxantina și Auroxantina | 8,9 | 1,3 | 15,43 | 18,97 |
| Anteraxantina | 2,09 | 4,31 | 4,56 | 6,83 |
| Flavoxantina | 14,1 | 17,4 | 35,42 | 42,05 |
| Mutatoxantina | 0,38 | - | 2,17 | - |
| Lactuaxantina | 4,49 | 8,02 | - | 11,31 |
| Luteina | 9,18 | 11,38 | 8,27 | 12,29 |
| Zeaxantina | 0,11 | 0,23 | - | 0,15 |
| Rubixantina | 14,36 | 7,27 | 4,58 | - |
| Licopen | 14,03 | 5 | 0,57 | - |
| □-Caroten | 12,15 | 6,15 | 5,11 | - |
| □-Caroten | 0,98 | 1,15 | 1,89 | 0,2 |
| □-Caroten | 16,68 | 17,51 | 10,31 | 2,37 |

- *Fructe*

Fructele conțin un număr important de carotenoide localizate în principal în coajă.

În funcție de tipul de carotenoide pe care îl conțin, fructele se pot clasifica astfel [1,4]:

- Fructe care produc carotenoide în cantități foarte mici (greu detectabile);
- Fructe care biosintetizează carotenoide similare cu cele din cloroplaste (mai ales fructele și legumele verzi);
- Fructe care biosintetizează predominant licopină și precursorii săi;
- Fructe care biosintetizează predominant β -carotină și derivații săi oxigenați;
- fructe care biosintetizează predominant cantități mari de epoxizi și furanoizi;
- fructe care biosintetizează carotenoide total sau numai parțial;
- fructe care biosintetizează în principal poli-cis-carotenoide;
- fructe care biosintetizează în principal apacarotenoide

În tabelul 2.9. este prezentat conținutul procentual de carotenoide al capsulelor de "*Capsicum annuum*", în diferite stadii de coacere [1,41].

Carotenoidele din fructe sunt localizate predominant în cromatofori care se formează în timpul coacerii fructelor, în majoritatea cazurilor din cloroplaste, iar în unele cazuri și din proplastide incolore.

Tabelul 2.9.

Conținutul procentual de carotenoide din fructe de "*Capsicum annum*", la diferite faze de coacere

| Carotenoide | Fructe (capsule) | | | |
|----------------------|------------------|------------|---------|-------|
| | roșii | portocalii | galbene | verzi |
| β-caroten | 12,3 | - | 1,0 | 20,3 |
| β-caroten-5,6-epoxid | 3,1 | - | - | 1,7 |
| Hidroxi-α-carotină | - | - | 5,7 | - |
| Criptoxantină | 7,8 | - | - | 3,6 |
| Criptocapsină | 5,0 | 8,0 | - | - |
| Luteină | - | - | 28,1 | 39,7 |
| Zeaxantină | 6,5 | 7,3 | - | - |
| Anteraxantină | 9,2 | 10,6 | 15,9 | 5,0 |
| Violaxantină | 9,8 | 14,9 | 31,3 | 13,3 |
| Capsantină | 31,7 | 35,4 | - | - |
| Capsantin-5,6-epoxid | 4,2 | 6,1 | - | - |
| Capsorubină | 7,5 | 14,3 | - | - |
| Neoxantină | 2,0 | 2,7 | 20,0 | 15,4 |

Gil și colaboratorii [42] au determinat conținutul de carotenoide din mai multe soiuri de nectarine cu miez alb și galben, din piersici cu miez alb și galben, precum și din prune (tabelul 2.10).

Tabelul 2.10.

Conținutul în β-caroten, β-criptoxantină și totalul carotenoidelor din fructele de nectarine cu miez alb [42]

| Fructul | Soiul | Țesutul | β-Caroten (μg/kg) | β-Criptoxantină (μg/kg) | Total carotenoide (μg/ 100 g fruct) |
|--------------------------|--------------|---------|-------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| Nectarine cu miez alb | Arctic Star | pielea | 570 | - | 10 |
| | | pulpă | 40 | - | |
| Nectarine cu miez alb | Arctic Queen | pielea | 170 | 30 | 11 |
| | | pulpă | 100 | - | |
| Nectarine cu miez galben | Red Jim | pielea | 1870 | 240 | 102 |
| | | pulpă | 730 | 140 | |
| Nectarine cu miez galben | August Red | pielea | 2730 | 270 | 162 |
| | | pulpă | 1280 | 140 | |
| Piersici cu miez alb | Summer Sweet | pielea | 110 | 140 | 17 |
| | | pulpă | 40 | 120 | |
| Piersici cu miez alb | Snow King | pielea | 430 | 70 | 13 |
| | | pulpă | 80 | - | |
| Piersici cu miez galben | Flavor crest | pielea | 3240 | 200 | 95 |
| | | pulpă | 530 | 60 | |
| Piersici cu miez galben | Spring Lady | pielea | 2700 | 250 | 107 |
| | | pulpă | 700 | 100 | |
| Prune | Wickson | pielea | 3380 | 110 | 87 |
| | | pulpă | 400 | 50 | |
| Prune | Black Beaut | pielea | 4100 | 290 | 231 |
| | | pulpă | 1880 | 130 | |

Se constată un conținut mult mai mare de β-caroten și β-criptoxantină în pielea fructelor de nectarine, piersici și prune decât în pulpă precum și preponderența β-carotenului în aproape toate soiurile analizate.

Fructele de tomate conțin ca pigmenți principali: licopen, β-caroten, γ-, δ-, ε-caroten, prolicopină, pro-γ-caroten, licoxantină, licofilă, alături de care la unele soiuri se mai găsesc: luteină, eloxantină, zeaxantină, violaxantină, fitoen, fitofluen, epoxizi de licopină etc. Sub aspect cantitativ, în fructele de tomate predomină carotenele

față de xantofile. Conținutul de carotenoide colorate din diferiți mutații de tomate este cuprins între 16 și 90 mg/g material proaspăt [1,43,44].

- *Organe de reproducere și culturi de țesuturi*

Majoritatea plantelor conțin în organele de reproducere (anteră, polen, stigmat, stil, ovare, gameți, spori etc) pigmenți, carotenoidici. În trecut se credea că pigmentul caracteristic din organele de reproducere este anteraxantina. Ulterior s-a renunțat însă la această presupunere, deoarece s-a constatat că anteraxantina nu este prezentă în organele de reproducere a numeroase plante.

În polen, carotenoidele au fost identificate pentru prima oară în 1892. Sporopolenina care se găsește în membranele exterioare ale polenului, asigurându-i o mare rezistență, este un polimer carotenoidic [45]. În polenul adunat de albine se află cca 0,2-0,7 μg/g de β-caroten și cantități mai mari de xantofile (luteină, violaxantină, elaxantină, anteraxantină etc.).

Marea majoritate a plantelor superioare conțin în polen carotenoide provitaminice, în special β-caroten, care se pare ca are un rol important în procesul de fecundație a plantelor.

- *Plante superioare saprofite și parazite*

Plantele saprofite conțin un număr redus de carotenoide comune, similare celor întâlnite în cloroplaste. Pigmenții principali sunt luteina și β-carotenul, alături de care s-au identificat în diferite specii: violaxantină, neoxantină și α-caroten. În plantele parazite xantofilele se găsesc atât în stare liberă cât și sub formă de esteri [46]. La aceste plante, ca și la cele saprofite, conținutul de carotenoide oxigenate este cu mult mai mare decât al carotenoidelor hidrocarburice.

- *Ciuperci*

Ciupercile reprezintă o sursă naturală de carotenoide extrem de importantă [47]. În cele mai multe cazuri ciupercile conțin un număr mai redus de carotenoide decât plantele superioare. Există însă și unele ciuperci care nu conțin carotenoide [48].

Se poate menționa că în ciuperci predomină carotenele, în special γ-carotină, β-carotină, lycopină, torulină, fitoenul, neurosporină, asupra xantofilelor. Nu s-au identificat carotenoide cu structură α-iononică și nici epoxizi din cloroplaste. La ciuperci, în majoritatea cazurilor, predomină carotenoidele cu structură pseudoiononică, atât calitativ, cât și cantitativ [4].

- *Bacterii nefotosintetizante*

Bacteriile heterotrofe conțin un număr mare și variat de carotenoide. La bacterii, ca și la ciuperci, se semnalează ca trăsătură generală faptul că β-carotenul nu este pigmentul principal. În bacterii se găsesc numeroase xantofile sub formă de eteri metilici cu structură acidică sau pseudoiononică. Spre deosebire de ciuperci, în bacterii nu s-au evidențiat carotenoide cu grupări carboxilice. Dintre carotenoidele existente în diferitele tipuri de bacterii, γ-carotina și derivații săi au o răspândire mai mare. Carotenoidele au o largă răspândire în bacterii, fiind prezente atât în bacterii acrobe cât și în cele anaerobe. Bacteriile conțin, pe lângă carotenoidele cu 40 de atomi de carbon, și carotenoide cu peste 40 de atomi de carbon și epocarotenoide. De asemenea, sunt prezente carotenoide glicozidice, ceto- și ceto-hidroxicarotenoide. Unele bacterii conțin carotenoide specifice pentru diferite grupări sistematice. În bacterii se află atât xantofile cât și epoxizi existenți în plantele superioare. În *Sarcina lutea* s-a identificat ca pigment principal și specific: sarcinaxantina (3,4 mg/385 g material uscat) și sarcinină din care se formează primul pigment [1,4].

2.2.3. Răspândirea carotenoidelor în regnul animal

Animalele își procură pigmentii carotenoidici din hrană deoarece nu sunt capabile să sintetizeze acești compuși „*de novo*”. În organismele animale carotenoidele absorbite din hrană sunt acumulate și depozitate în diferite organe și țesuturi iar unele sunt transformate în carotenoide proprii, uneori specifice, diferite de cele existente în hrană.

Compușii carotenoidici se găsesc în întreg regnul animal, de la protozoare (unicelulare) până la mamifere. Astfel, în *protozoare* predomină β -carotenu, luteina, violaxantina, neoxantina, ceto- și cetohidroxicarotenoide [4,49,50]. La *spongieri*, spre deosebire de majoritatea organismelor animale predomină carotenele față de xantofile [4,51-53]. În *viermi* se află un număr redus de pigmenti carotenoidici, principalele carotenoide care apar sunt: β -carotina, astaxantina, echinenona, cantaxantina și luteina.

Crustaceele (crabi, raci, homari, creveți, languste etc.) prezintă un conținut ridicat și variat de pigmenti carotenoidici, fiind printre cele mai bogate animale acvatice în acești compuși [4,54]. Carotenoidele sunt localizate la *insecte* atât în elitre, organele interne, torace, ouă, cap, și mai ales în stadiul de larvă [55,56]. În diferite clase și tipuri de *echinoderme* predomină atât calitativ cât și cantitativ ceto- și cetohidroxicarotenoidele; apoi urmează xantofilele și carotenele, dintre care majoritar este β -carotenu [57].

La *pești* predomină atât calitativ, cât și cantitativ ceto- și cetohidroxicarotenoidele cu structură hexaciclică. La majoritatea peștilor, astaxantina este pigmentul principal. Alături de astaxantină, apare în mod frecvent luteina, tunaxantina (3,3'-dihidroxi- ϵ -carotenu) și taraxantina (eloxantina). Tunaxantina s-a identificat numai în peștii marini, fiind caracteristică acestora, iar taraxantina numai în peștii de apă dulce. Luteina este pigmentul predominant în numeroși pești de apă dulce, dar în peștii mari conținutul luteinei este mult scăzut [1,4].

În cazul *păsărilor*, pigmentii carotenoidici se depun în pielea corpului, în pene, cioc, în gălbenușurile ouălor, în ficat, în grăsimea din jurul țesutului subcutanat și din jurul organelor interne, în labele picioarelor etc. Păsările conțin o gamă mai variată de carotenoide decât echinodermele, crustaceele sau peștii. În corpul păsărilor predomină carotenoidele biciclice și derivații acestora. În corpul păsărilor și în gălbenușul ouălor nu s-au identificat carotenoide cu legături alenice, legături acetilenice sau cu inele aromatice. Nu s-au identificat nici glicozide [58,59]. Păsările sunt sărace în ceto- și cetohidroxicarotenoide, în carotenoide cu structură aciclică și în carotenoide incolore. Din punct de vedere structural, la păsări, ca și la pești, predomină carotenoidele cu structură β -iononică, asupra celor cu structură α -iononică [58,59]. În gălbenușul de ou al păsărilor domestice se acumulează carotenoide în cantități cuprinse între 1 și 4 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ gălbenuș, dintre care 75-80% sunt reprezentate de xantofile (luteină și zeaxantină). Conținutul carotenoidelor poate crește mult peste aceste valori la o furajare cu surse deosebit de bogate în carotenoide, cum sunt: morcovii, polenul, făina de lucernă, diferite fructe și flori etc. [60, 61].

La *mamifere*, conținutul de compuși carotenoidici este mai redus și mai puțin variat decât la crustacee, echinoderme, pești sau păsări. Mamiferele conțin, predominant carotenoide biciclice cu structură α - și β -iononică. Pigmentii principali sunt β -carotenu și luteina. La unele mamifere s-au identificat carotenoide cu legături alenice, cu legături acetilenice, cu inele benzenice, carotenoide glicozidice sau carotenoide cu grupări hidroxilice sau metoxilice la C_1 sau C_2 . La aceste animale carotenoidele sunt localizate în piele, grăsimea corpului, grăsimea din jurul

organelor interne, în lapte, ficat, în părțile cornoase (păr, coarne, unghii, copite etc.) și mai ales în sânge [62-65]. Principalele carotenoide din sânge sunt: β -carotenul, β -criptoxantina și luteina, al căror conținut reprezintă cca. 70% din totalul carotenoidelor. Ca pigmenți secundari, în sânge se mai află: α -carotenul, criptoxantina, γ -carotenul, lycopina, iar în cantitate foarte redusă unii epoxizi.

Concentrația carotenoidelor în *sânge* variază în funcție de natura alimentației, având valori mai ridicate în perioada de vară și mai scăzute în perioada de iarnă [66]. Conținutul carotenoidelor din sângele oamenilor sănătoși, este cuprins în mod frecvent între 166 și 167 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$, deși varietățile la diferiți indivizi sunt cuprinse între 87 și 227 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$. Conținutul carotenoidelor din sânge este mai ridicat la tineri, în vârstă de 16-35 ani, mai scăzut la bătrâni, la bolnavi și la femeile gravide [62]. În sânge nu au fost identificate decât foarte puține cetocarotenoide, apar însă unele apocarotenoide, în special retinoide, care rezultă ca și produși intermediari în procesul de biosinteză al vitaminei A. Formarea vitaminei A are loc în principal la nivelul mucoasei intestinale, unde carotenoidele provitaminice sunt scindate sub acțiunea carotenazei la nivelul catenei interne, formându-se una sau două molecule de retinal sau retinen. Sub acțiunea alcooldehidrogenazei (reductază), retinalul se reduce la trans-total-retinol, care este vitamina A. Această vitamină fie că ia parte imediat la formarea pigmentilor vizuali din retină, fie că se esterifică, predominant cu acidul palmitic și se depune în ficat. Esterul vitaminei A, se poate transforma reversibil în retinol și apoi în retinal, în funcție de necesitățile din organism. Oxidarea retinalului la acid retinoic este un proces ireversibil [67].

În *laptele mamiferelor* pigmentul carotenoidic preponderent este β -carotenul. Astfel laptele de vacă și de oaie conține în perioada de iarnă între 0,014 mg/100 ml și 0,015 mg/100 ml, iar vara până la 0,062 mg/100 ml. În laptele de capră, carotenoidele sunt absente, fapt ce permite diferențierea lui de cel de oaie și adesea servește drept indice pentru determinarea amestecului laptelui de capră, cu cel de oaie sau vacă [68,69]. Conținutul procentual al carotenoidelor din laptele de femeie, stabilit în Anglia, în timpul celui de-al doilea război mondial, se prezintă astfel: α - și β -carotenul 23%, luteina 47%, lycopina 9%, pigmenți neidentificați 21% [70].

2.2.4. Distribuția metaboliților compușilor carotenoidici în plante și animale

Metaboliții carotenoidelor sunt răspândiți atât în regnul vegetal cât și în cel animal, fiind produși de oxidare ai carotenoidelor, cu schelet diferit, cuprins, în general, între 20 și 11 atomi de carbon [1].

2.2.4.1. Metaboliții C₂₀

În această grupă de metaboliți sunt cuprinși retinolii (vitaminele A) și derivații lor, precum și retinoidele, care sunt metaboliți ai retinolului [71, 72].

Retinolii și dehidroretinolii se află numai în organismele animale, unde se formează din provitamina A, în special în mucoasa intestinală și în ficat.

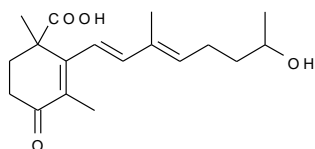
Necesarul organismului adult de retinol este de 0,7 mg/zi (1,0 mg retinol corespunde la 3333 U.I. iar o U.I. corespunde la 0,6 μg β -caroten). Necesarul este în funcție de vârstă, specia animală și de masă corporală. Retinolul din plasma sanguină se află întotdeauna legat de o proteină serică numită prealbumină. Pentru menținerea unei concentrații normale de retinol în sânge este necesar ionul de zinc.

Cei mai importanți metaboliți ai retinoidelor sunt formele lor aldehydice și anume: retinalul și dehidroretinalul, sub diferite forme izomere, dintre care all-trans-retinolul și 11-cis-retinolul sunt de importanță biochimică mai mare [73].

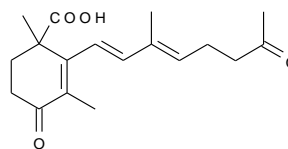
Acizii retinoidici sunt forme carboxilice ale retinolilor. Mai importanți sunt acidul trans-total retinoic și acidul 11-cis-retinoic. Acidul retinoic nu este depozitat în ficat ci este vehiculat în sânge, în mod analog acizilor grași cu catenă lungă. În plasma umană concentrația acidului retinoic variază în funcție de vârstă, sex, starea de sănătate, etc. În medie, pentru un adult sănătos este de 1,80 $\mu\text{mol/l}$ la bărbați și 1,5 $\mu\text{mol/l}$ la femei [62, 74]

2.2.4.2. Metaboliți C₁₈

În unele culturi de „*Blakeslea trispora*” s-a identificat un metabolit C₁₈: acidul trisporic: - o formă alcoolică și una cetonică [4]:



Acid trisporic - forma hidroxilică



Acid trisporic - forma cetonică

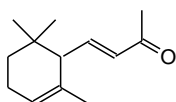
2.2.4.3. Metaboliți C₁₅

Dintre metaboliții C₁₅, de importanță mai mare și mai studiați sunt: acidul abscisic, acidul faseic și o serie de glicozizi ai lor. Se consideră că acidul abscisic se găsește în toate plantele tinere și că are o acțiune fitohormonală, reglând un număr mare de procese biochimice în regnul vegetal [75].

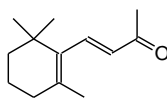
Se cunosc și o serie de metaboliți C₁₅, care sunt epoxizi sau furanoizi și sunt inhibitori ai germinăției semințelor sau ai creșterii țesuturilor plantelor.

2.2.4.4. Metaboliți C₁₃

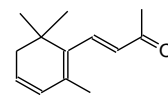
Dintre compușii cu 13 atomi de carbon se amintesc: α - și β -ionona, damascenona, care se află în numeroase produse vegetale, în esențe de trandafiri și arome, ca: aroma de ceai, zmeură, morcovi, tomate, precum și în secrețiile unor insecte [76].



α -Iononă



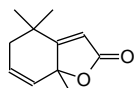
β -Iononă



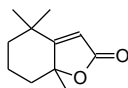
α -Damascenonă

2.2.4.5. Metaboliți C₁₁

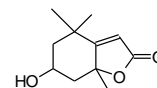
Metaboliții C₁₁ și metaboliții cu schelet superior se află împreună în plante și animale. Astfel, actinidiolida, dehidroactinidiolida și loliolida au fost izolate din diferite specii de plante și din insecte [76].



Actinidiolidă



Dihidro-actinidiolidă



Loliolidă

Metaboliții carotenoidelor, mai ales cei inferiori, sunt foarte numeroși și prezintă importanță pentru faptul că sunt componente ale diferitelor arome ale fructelor, florilor și secrețiilor animalelor și insectelor [75,76].

2.3. PROPRIETĂȚI FIZICE ȘI CHIMICE GENERALE ALE CAROTENOIDELOR

2.3.1. Proprietăți fizice generale

Marea majoritate a compușilor carotenoidici sunt substanțe colorate, posedând un cromofor alcătuit din cel puțin 8 - 9 legături duble C=C conjugate. Cele care conțin mai puțin de 8 sau 9 legături C=C conjugate sunt incolore; așa sunt de exemplu, fitoenul, fitofluenul și ξ-carotenul. Carotenoidele care conțin în moleculă un sistem polienic cu 10 duble legături au o culoare galbenă (α-carotenul, α-criptoxantina, luteina, etc.), cele cu 11 duble legături au culoare portocalie (β-carotenul, criptoxantina, zeaxantina, etc.), iar cele cu peste 11 duble legături au o culoare roșie (torulină, celaxantină, retrodehidro-β-carotină, etc.). Duplele legături neconjugate din moleculă nu influențează prea mult culoarea, iar atunci când au o influență asupra culorii, efectul este de deschidere și nu de intensificare [2,77,78].

Culoarea soluțiilor carotenoidelor este dependentă atât de natura pigmentului, cât și de concentrația soluției. Soluțiile carotenoidelor nu prezintă fluorescență. Carotenoidele carbonilice sunt de culoare roșu-violetă, cele cu grupări epoxi au culoare galbenă.

Pigmenții carotenoidici se dizolvă bine în solvenți organici (acetona, eter etilic, eter de petrol, acetat de etil, clorofom, hexan etc.) și în lipide. Carotenoidele oxigenate se dizolvă numai în solvenți organici polari [79].

Unele carotenoide au în moleculă atomi de carbon asimetrici, deci sunt optic active.

Carotenoidele prezintă un miros slab aromat, caracteristic. Nu sunt toxice și nici iritante. Punctele lor de topire sunt, în general, situate sub 250°C, marea majoritate fiind cuprinse între 170 și 200°C [79].

Datorită numărului mare de duble legături pe care le conțin în moleculă, carotenoidele au posibilitatea de a exista sub forma unui mare număr de izomeri geometrici cis-trans. Astfel β-carotenul care conține 11 duble legături conjugate poate exista, teoretic, sub formă de 272 izomeri cis-trans, iar licopina, cu 13 duble legături C = C, de 1056 izomeri. Izomerii cei mai stabili sunt cei trans-trans sau all-trans. Acești izomeri au un conținut mai mic de energie și pot fi transformați în izomeri cis-trans sub influența luminii, căldurii, iodului, acizilor, solvenților etc. [1, 5]. Aceste amestecuri de izomeri se pot separa prin cromatografie pe coloană.

Izomerii astfel separați nu se pot obține cristalizați în stare pură, deoarece prin eluare sau în decursul cristalizării se izomerizează parțial în forma all-trans. Totuși s-au determinat puncte de topire ale unor izomeri cis-trans găsindu-se valori mult mai scăzute față de forma all-trans. Se pare că există și în natură izomeri cis-trans care însoțesc forma trans-total și nu reprezintă întotdeauna rezultatul unei izomerizări produse în decursul prelucrării extractelor sau al păstrării materialului vegetal. Astfel este cazul prolicopinei care însoțește lycopina în unele soiuri de tomate [80].

Căldura, lumina, acizii și adsorbția pe o suprafață activă (de exemplu: alumină) determină izomerizarea *trans*-carotenoidelor (configurația uzuală) la forma *cis*. Aceasta conduce la unele diminuări ale culorii și ale activității provitaminice [79].

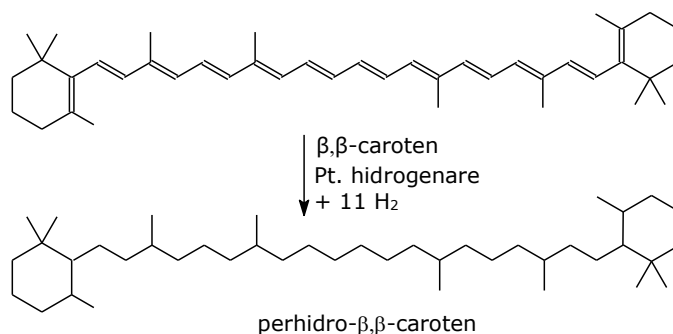
Toți pigmentii carotenoidici prezintă spectre de absorbție specifice în UV și VIZ care servesc la caracterizarea și dozarea lor.

2.3.2. Proprietăți chimice generale

Proprietățile chimice ale carotenoidelor sunt imprimate, în primul rând, de gradul ridicat de nesaturare, dar și de grupările funcționale grefate pe moleculă. Dau reacții de hidrogenare, halogenare, oxidare, esterificare, deshidratare, condensare [2,79].

2.3.2.1. Reacția de hidrogenare

Prin hidrogenarea carotenoidelor și metaboliților lor, la nivelul dublelor legături C = C, cu hidrogen, în prezența catalizatorului Pt, se obțin produși complet saturați, numiți perhidrocarotenoide. După cantitatea de hidrogen adăugată se poate stabili numărul de duble legături prezente în moleculă. La hidrogenarea în prezență de Ni se pot obține carotenoide parțial hidrogenate [1, 80]:

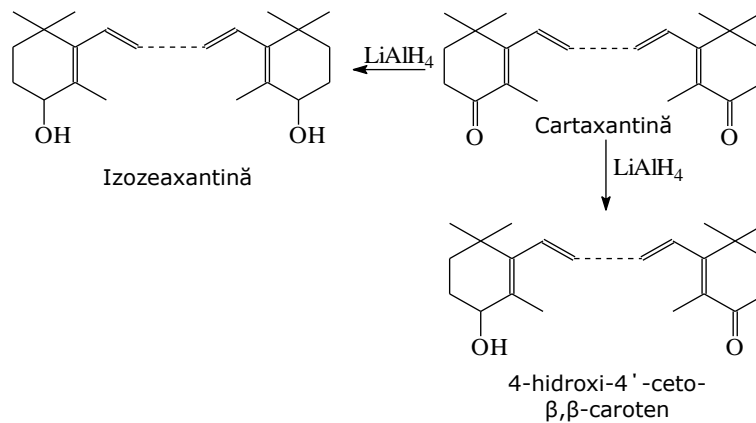


2.3.2.2. Reacția de reducere cu hidruri metalice

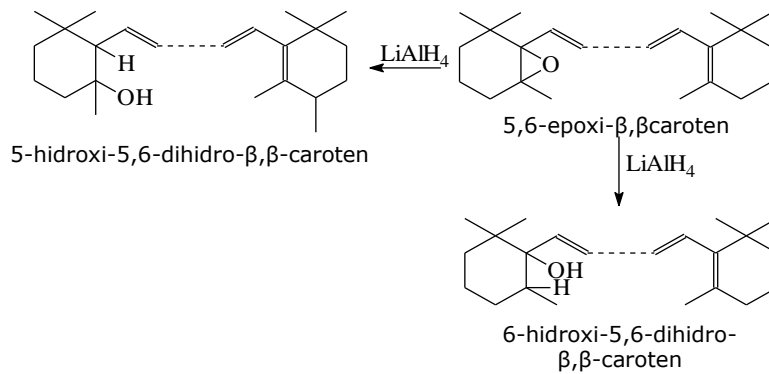
Hidrurile metalice constituie cei mai activi reactanți de reducere a carotenoidelor. Cu ajutorul lor se pot obține hidroxicarotenoide din epoxicarotenoide și din ceto- sau aldo-carotenoide, precum și dehidrocarotenoide [81]. Dintre hidrurile metalice se utilizează mai frecvent borohidruza de sodiu (NaBH_4), de potasiu (KBH_4) și de litiu și aluminiu (LiAlH_4). Aceste hidruri au acțiune de reducere numai asupra grupărilor funcționale, dar nu și asupra sistemului de duble legături [6].

La tratarea cetocarotenoidelor cu hidruri metalice se obțin, pe lângă produșii finali, și o serie de produși intermediari, în timp ce la reducerea 5, 6 – epoxicarotenoidelor se obțin 6-hidroxi- sau 5-hidroxicarotenoide [1].

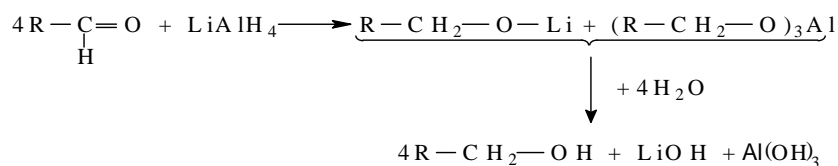
a) Reducerea cetocarotenoidelor:



b) Reducerea epoxicarotenoidelor:

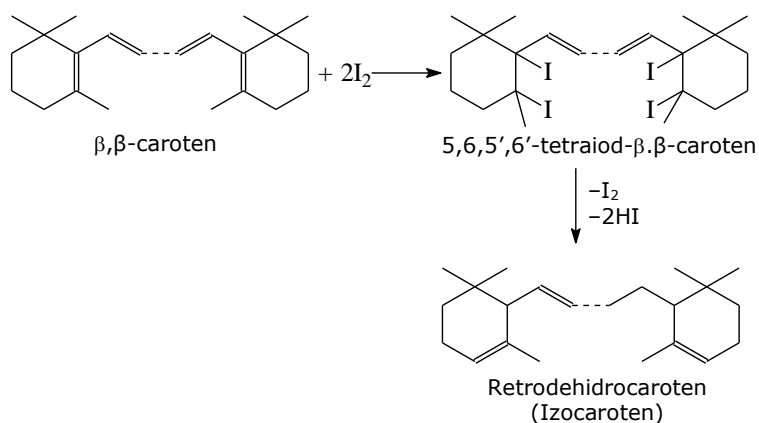


c) Reducerea aldocarotenoidelor:

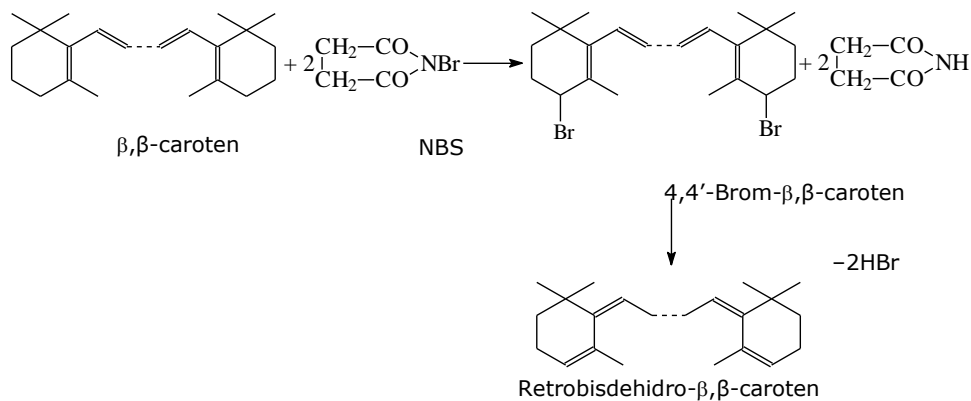


2.3.2.3. Reacția de halogenare

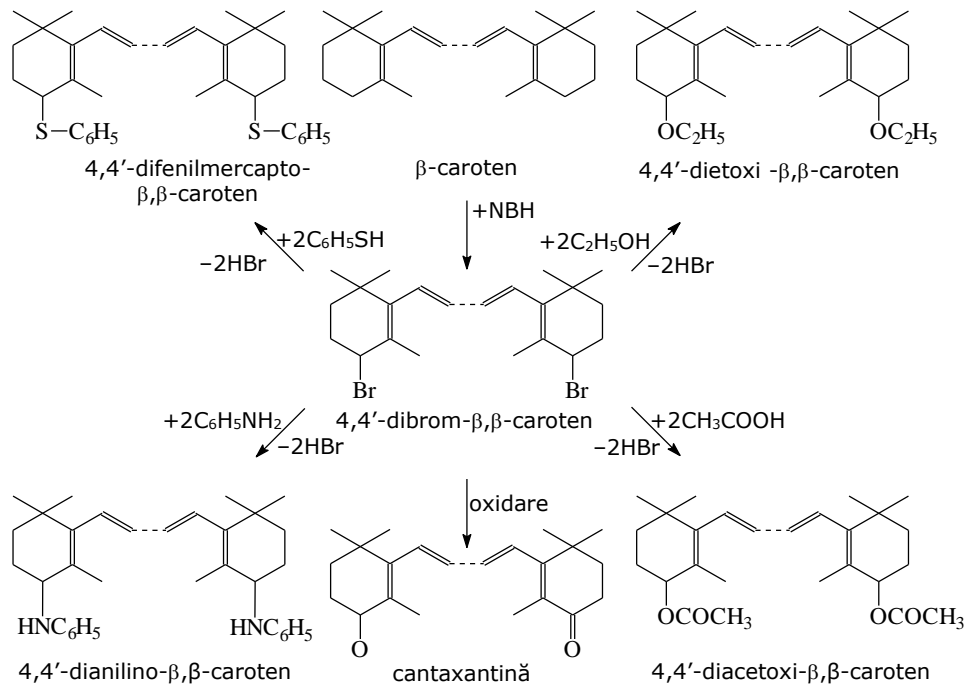
Compușii carotenoidici reacționează cu halogenii și dau naștere la derivați halogenați stabili sau instabili, care pot servi la determinarea numărului și poziției dublelor legături din moleculă. Se cunosc puțini derivați halogenați stabili ai carotenoidelor [1, 80, 82]. La acetonoliza derivaților halogenați se formează retrodehidrocarotenoide:



La tratarea β -carotenului în soluție de CCl_4 sau $CHCl_3$ cu bromsuccinimidă (NBS) se obțin dehidrocarotenoide și retrodehidro-carotenoide. În prima etapă a reacției se obține derivatul bromurat, care în etapa a doua se dehalogenează, obținându-se dehidrocarotenoide[1,80]:

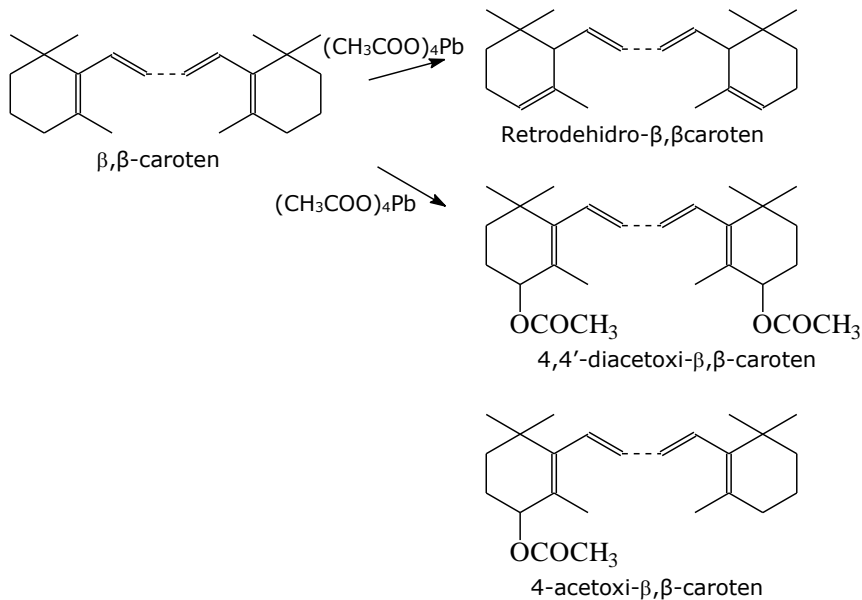


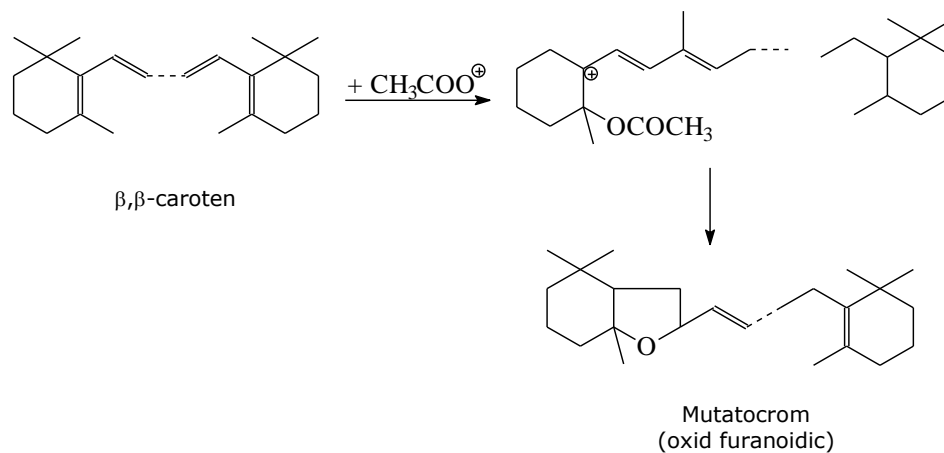
Prin tratarea β -carotenului cu NBS în prezență de etanol, anilină, fenilmercaptan, acid acetic etc. se obțin derivații de substituție ai β -carotenului la atomii de carbon C_4 și C_4' :



2.3.2.4. Reacția cu tetraacetatul de plumb

Sub acțiunea tetraacetatului de plumb, carotenoidele sau naștere atât la produși de dehidrogenare, cât și de oxidare [1,80]:





2.3.2.5. Formarea de complecși cu TiCl_4

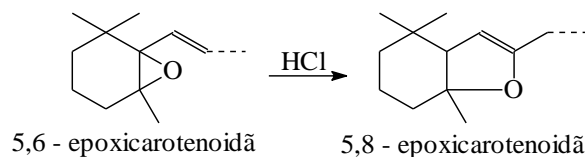
Sub acțiunea TiCl_4 , care este un reactant electrofil, diferitele carotenoide, hidrocarburi și derivați oxigenați, dau naștere la complecși cu transfer de sarcină, de tipul: $[\text{R} - \text{TiCl}_3]^+\text{Cl}^-$, cu proprietăți semiconductoare [1]. Au fost caracterizați un număr mare de complecși cu TiCl_4 atât produși de adădire, cât și de fixarea a TiCl_4 la gruparea carbonil (în cazul carotenoidelor carbonilice):



Astfel de complecși au o stabilitate deosebit de mare [1].

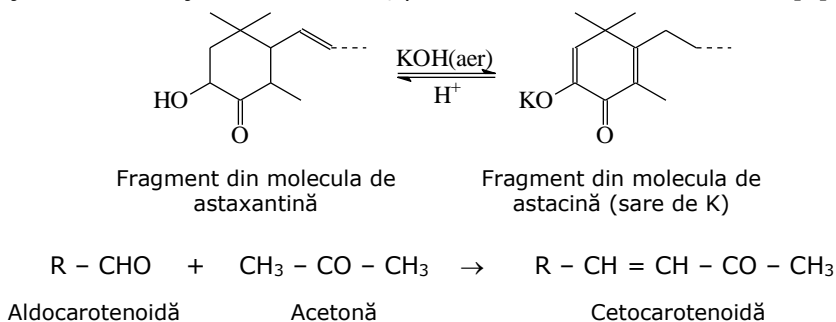
2.3.2.6. Reacția cu acizii

Epoxicarotenoidele de tipul 5,6 în prezență de HCl sunt repede izomerozate la epoxizi de tipul 5,8 (furanoid oxid). Această izomerizare implică scurtarea cromoforului, însoțită de o deplasare puternică hipocromă a maximelor de absorbție în vizibil: cu 7–22 nm pentru monoepoxizi și cu 40 nm pentru diepoxizi [1]:



2.3.2.7. Reacția cu baze

Cele mai multe carotenoide sunt stabile la baze. Fac excepție: astaxantina, care este rapid oxidată în aer la astacină, actinoeritrina este oxidată la o varietate de produși; peridinina și fucoxantina sunt instabile la baze în condiții anaerobe. Aldocarotenoidele sunt stabile față de baze, chiar și în prezență de oxigen, dar în prezență de acetonă și baze formează, prin condensare cetocarotenoide [1].

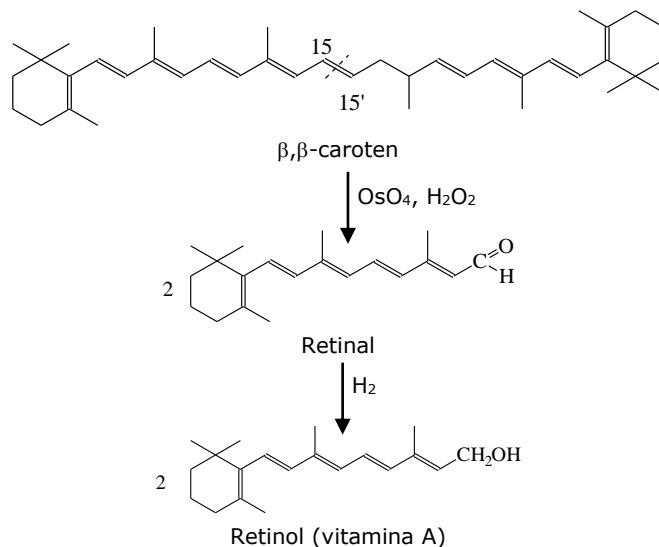


2.3.2.8. Reacția de oxidare

Sub acțiunea diferiților oxidanți (O_2 , KMnO_4 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, MnO_2 , Ag_2O , CrO_3 , H_2O_2 , OsO_4 , cloranil etc.) carotenoidele suferă numeroase reacții de oxidare. Reacțiile de oxidare sunt utilizate atât în scopuri preparative, de oxidare a hidroxicarotenoidelor la cetocarotenoide, a β -carotenului la vitamina A, cât și pentru dovedirea structurii carotenoidelor.

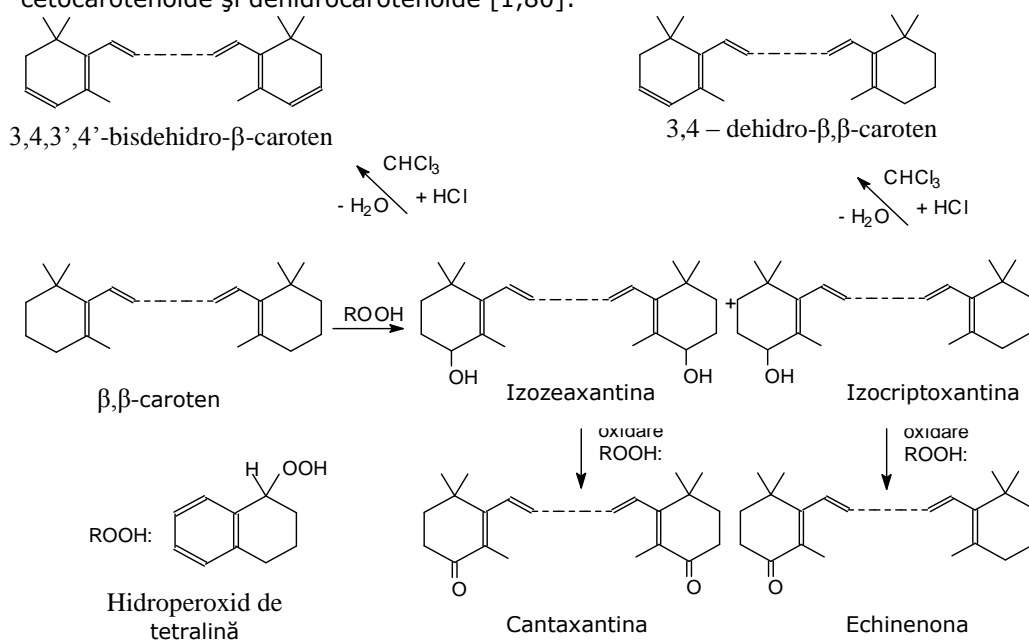
a) Oxidări pentru dovedirea structurii carotenoidelor

În scopul elucidării structurii carotenoidelor, au fost utilizați ca și oxidanți: ozonul, acidul cromic, bicromatul de potasiu, permanganatul de potasiu și alți oxidanți [1,80]. Astfel, β -carotenul poate fi transformat în retinol:

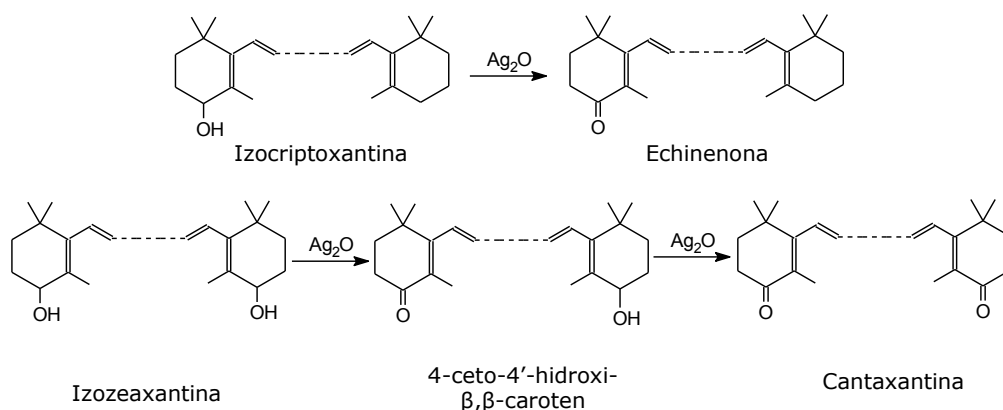


b) Oxidări cu hidroxid de tetralină

Hidroxidul de tetralină este un oxidant cu ajutorul căruia se pot grea direct grupări hidroxilice pe ciclul iononic al carotenoidelor, în poziție alilică față de dubla legătură. În acest fel, de la β -carotină se obțin hidroxicarotenoide, cetocarotenoide și dehidrocarotenoide [1,80]:

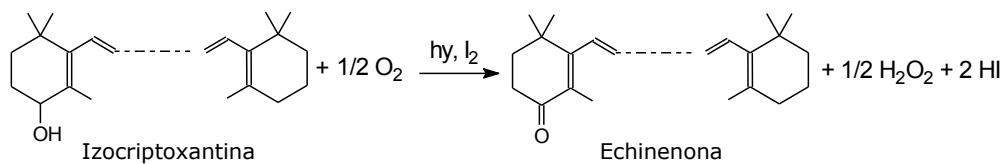
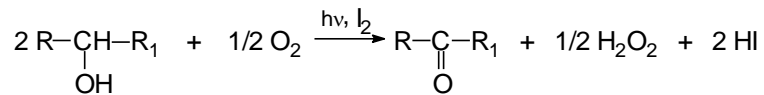
**c) Oxidări cu Ag_2O**

Oxidul de argint este utilizat pentru oxidarea hidroxicarotenoidelor cu OH alilix, la cetocarotenoide [1]. Oxidantul trebuie să fie proaspăt preparat prin descompunerea termică a Ag_2CO_3 . Randamentele cu care se obțin cetocarotenoidele sunt superioare celor în care se utilizează alți oxidanți. Solvenții cei mai adecvați sunt CCl_4 și $CHCl_3$:

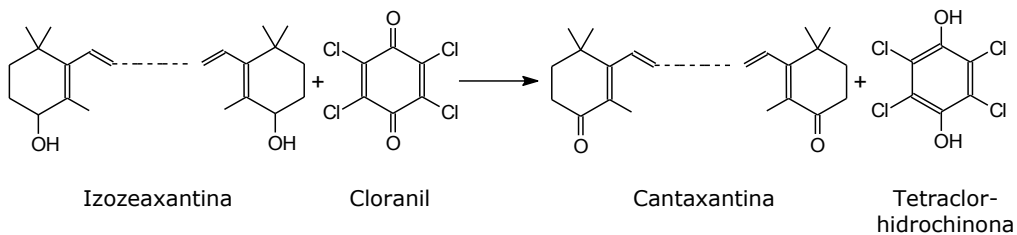


d) Oxidări cu I₂ în prezența luminii

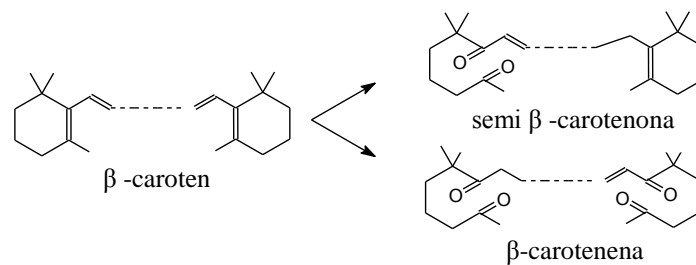
În prezența oxigenului, a iodului și a luminii, hidroxicarotenoidele se transformă în cetocarotenoide [1]:

**e) Oxidări cu cloranil**

Cloranilul, având rol de acceptor de hidrogen determină oxidarea hidroxicarotenoizilor la cetocarotenoide, randamentul în produși de reacție fiind ridicat [1]:

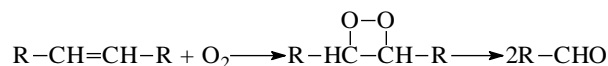
**f) Oxidări cu K₂Cr₂O₇**

La utilizarea bicromatului de potasiu, din β-caroten se obțin carotenone [1,80]:

**2.3.2.9. Reacția de autooxidare**

Carotenoidele se autooxidează în prezență de oxigen, atât în soluție cât și în stare cristalină și se transformă în produși superiori de oxidare, prin degradarea sistemului polienic. Procesul de autooxidare este stimulat de prezența luminii, temperatură, umezeală și oxigen. Autooxidarea este mai intensă în mediul acid, decât în mediul neutru sau slab bazic.

Amestecul de reacție este extrem de complex, dar predomină carotenalii [83,84]:



2.3.2.10. Reacția de esterificare

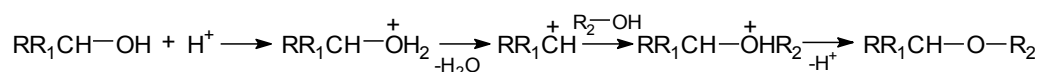
Hidroxicarotenoidele se pot esterifica prin tratarea lor cu anhidridă acetică sau clorură de acetil [1]. Reacția de esterificare decurge mai ușor și cu randamente bune la hidroxidul alilic și mai greu la cel nealilic.

Acizii carotenoidici, se esterifică relativ ușor cu alcoolii și cu glucide.

Esterificarea se realizează cu ușurință și „*in vivo*”. Astfel, este cunoscut faptul că în flori, fructe etc., hidroxicarotenoidele naturale se găsesc predominant sub formă de esteri [79]. Esterificarea se face cu hidroxidul de la C-3 al carotenoidelor și acizii grași superiori (oleic, palmitic, stearic etc.)

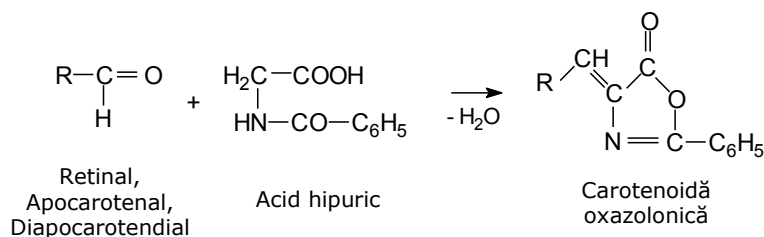
2.3.2.11. Reacția de eterificare

Cu randamente bune se obțin eterii carotenoidici prin tratarea hidroxicarotenoidelor în care s-a barbotat HCl uscat, în prezență de metanol sau etanol. Reacția de eterificare poate fi redată astfel [1]:



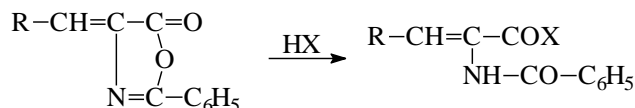
2.3.2.12. Reacția de condensare

Carotenoidele cu grupări carbonilice și în special aldocarotenoidele, condensează cu ușurință cu produșii aminați sau cu compuși ce conțin metilen activ în moleculă. La condensare cu H₂N-OH se formează aldoxime sau cetoxime carotenoidice, care servesc la identificarea grupării carbonilice din molecula carotenoidelor. Acești produși de condensare au culoare roșie. Prin condensarea carotenoidelor și metaboliților lor, care conțin grupare aldehidică, cu rodamină sau acid hipuric, rezultă produși colorați în albastru-violet. Astfel prin condensarea aldehydelor cu acid hipuric în prezență de anhidridă acetică și acetat de sodiu, rezultă carotenoid oxazolonic [1]:



Se pot forma atât monooxazolone, cât și dioxazolone, în funcție de natura carotenoidului.

În urma deschiderii ciclului oxazolonic, din carotenoidele oxazolonic rezultă o serie de apocarotenoid azotate:



X = - OH;

- OCH₃;

-NH - NH₂;

- NH - NH - C₆H₅

-N(CH₂)₃;

- N (CH₂)₄O;

- N(CH₂ - CH₂);

- N (CH₂ - CH₂ - NH₂);

- N (CH₂ - CH₂ - OH).

2.4. METODE DE EXTRAȚIE, IDENTIFICARE ȘI DOZARE A CAROTENOIDELOR

2.4.1. Extracția carotenoidelor

Principala problemă în analiza carotenoidelor derivă din instabilitatea lor. Astfel, orice metodă de analiză ar fi aleasă, măsurile de precauție pentru a preveni degradarea compușilor carotenoidici și pierderile cantitative trebuie să constituie o practică standard în laborator. Extracția și analizele carotenoidelor trebuie făcute în cel mai scurt timp posibil, la temperatura camerei, la lumină slabă, evitându-se contactul cu oxigenul și cu acizii și folosind solvenți cu un mare grad de puritate, liberi de impurități dăunătoare [4,5,79].

2.4.1.1. Extracția cu solvenți organici

Distribuția într-o mare varietate de materiale a carotenoidelor face ca nici o metodă de extracție cu solvenți organici să nu poată fi aplicată în mod universal și adoptată ca o tehnică standardizată. Alegerea metodei de extracție este determinată în principal de natura materialului, de proprietățile și de cantitatea pigmentilor prezenți [4,5].

Pentru a facilita extracția, probele trebuie foarte bine mărunțite. După mărunțire, omogenizarea și extracția trebuie realizate imediat, deoarece mărunțirea eliberează enzimele care catalizează oxidarea carotenoidelor și acizi care determină izomerizarea *trans-cis*. Compușii carotenoidici sunt în general extrași din produse biologice care conțin mari cantități de apă, cu solvenți organici miscibili cu apa (de exemplu: acetonă, etanol, metanol) sau amestecuri de solvenți. Materialele uscate pot fi extrase cu solvenți nemiscibili cu apa, dar extracția este de obicei mai eficientă dacă materialul este mai întâi rehidratat și apoi extras cu solvenți miscibili cu apa [4,5,79]. Pentru omogenizare proba mărunțită se poate introduce, împreună cu o porțiune de solvent, într-un amestecător electric potrivit, timp de 1-2 minute, sau se poate tritura, cu puțin nisip de cuarț și solvent, într-un mojar. După filtrare (de obicei folosind o pâlnie Buchner), reziduul solid se reintroduce în amestecător sau în vasul de extracție și se reextrage cu solvent proaspăt. Extracția și filtrarea se repetă până la decolorarea reziduului (trei extracții sunt, de obicei, suficiente).

Extractul conține obișnuit cantități mari de apă, care poate fi îndepărtată prin repartitia carotenoidelor în solvenți nemiscibili cu apa: hexan, eter de petrol, eter etilic, diclorometan sau amestecuri ale acestor solvenți, într-o pâlnie de

separare. Eterul etilic sau un amestec de eter etilic cu hexan sau cu eter de petrol este preferat pentru extractele cu mari cantități de xantofile [79]. Concentrarea extractelor carotenoidice la volume mai mici sau îndepărtarea solvenților se face sub vid la temperaturi între 35-45 °C, în evaporatoare rotative.

Pentru îndepărtarea clorofililor și a lipidelor nedorite care pot interfera la separarea cromatografică și pot scurta durata de viață a coloanei HPLC, se practică saponificarea extractelor carotenoidice prin tratarea extractului în eter de petrol sau hexan cu un volum egal de soluție etanolică de KOH 10% (sau mai concentrată) și lăsarea peste noapte la temperatura camerei și la întuneric, după care soluția de carotenoide este spălată de mai multe ori cu apă distilată în vederea îndepărtării complete a alcaliilor [5,79]. Saponificarea este omisă în cazul izolării esterilor carotenoidici care hidrolizează prin această procedură și în cazul izolării carotenoidelor sensibile la alcalii (fucoxantina, violaxantina etc). În cazul probelor care conțin cantități mari de steroli se recomandă ca mai înainte de saponificare să se realizeze îndepărtarea sterolilor din extract prin tratarea acestuia cu eter de petrol și lăsarea peste noapte la -10 °C [1]. Sterolii precipitați se îndepărtează apoi prin centrifugare la cca. 2000 rpm, supernatantul concentrându-se sub vid până la un volum mai mic.

2.4.1.2. Extracția cu fluide supercritice

Metodele tradiționale de extracție a carotenoidelor necesită mai mult de o treaptă de extracție cu solvenți organici care sunt interziși în procesarea aditivilor alimentari. În plus, sunt necesare noi etape de procesare pentru îndepărtarea carotenilor de clorofile. În consecință, a apărut necesitatea dezvoltării unor metode de extracție mai rapide și mai compatibile cu procesarea alimentară [30]. Motivele dezvoltării impetuoase a acestei tehnologii sunt [85]:

- creșterea bruscă a costului energiei, ceea ce a condus la creșterea costului tehnologiilor energo-intensive de izolare;
- legislații extrem de riguroase privind controlul poluării și necesitatea înlocuirii solvenților uzuali toxici și inflamabili, ceea ce a condus la considerarea solvenților supercritici (bioxidul de carbon supercritic) drept o alternativă atractivă;
- necesitatea obținerii unor principii active cu proprietăți performante, care nu se pot obține prin metode extractive clasice.

Pentru extracția carotenoidelor se folosește ca solvent supercritic bioxidul de carbon care prezintă numeroase avantaje dintre care [86,87]:

- nu este inflamabil;
- este ușor de îndepărtat din produs, fiind gaz în condiții normale;
- nu are culoare, gust și miros;
- este ieftin și ușor de obținut;
- extractele sunt libere de reziduurile caracteristice extracției cu solvenți organici.

Dioxidul de carbon este un solvent nepolar extrăgând cel mai bine compuși nepolari. Puterea sa de solvatare și selectivitatea sa se poate îmbunătăți însă prin utilizarea co-solvenților polari, cel mai des utilizați fiind etanolul și metanolul [87].

Un model de instalație pentru extracția carotenoidelor cu fluide supercritice din materiale vegetale [87] este prezentată în figura 2.3. Dioxidul de carbon lichid este furnizat de un cilindru de gaz și eliberat într-un vas de stocare. CO₂ este comprimat la presiunea dorită prin intermediul unei pompe și este încălzit la temperatura de extracție pentru a ajunge în stare supercritică mai înainte de a intra

în extractor. Extractorul utilizat (5L, Natex, Ternitz, Austria) poate funcționa până la o presiune de maximum 500 bar și o temperatură de maximum 120°C. CO₂ comprimat este apoi lăsat să curgă ascendent prin stratul montat vertical și compușii solubili sunt extrași. CO₂ părăsește extractorul și intră în primul vas de separare prin valva de presiune. Produsul uleios obținut în urma extracției supercritice se depune la fundul vasului și poate fi colectat și cântărit. Volumul total de CO₂ consumat este măsurat de gazometru. Prin deschiderea valvelor potrivite, CO₂ poate fi recirculat în vasul de stocare. Extractorul se umple cu 2,2 – 2,3 kg material vegetal mărunțit. Probele de produs acumulate se colectează și cântăresc la anumite intervale de timp. Viteza de curgere a CO₂ se reglează la aproximativ 7 kg/h. kg materie primă.

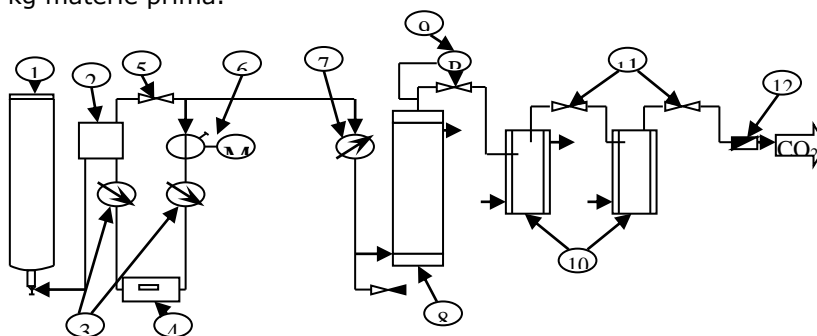


Figura 2.3 - Unitate pentru extracția cu fluide supercritice

1 – cilindru cu CO₂; 2 – rezervor tampon; 3 – răcitoare MLW. M16; 4 – detector RFT 9729; 5 – valvă; 6 – pompă Lewa EM-1; 7 – încălzitor; 8 – extractor; 9 – valvă pentru reglarea presiunii în extractor; 10 – separatoare; 11 – valve cu membrană pentru reglarea presiunii în separatoare; 12 – gazometru

2.4.2. Identificarea compușilor carotenoidici

Comportamentul cromatografic și spectrul de absorbție în UV/VIS sunt primele repere în identificarea carotenoidelor. Atât lungimea de undă a maximumului de absorbție (λ_{max}) cât și structura spectrală fină sunt caracteristice cromoforului.[5,79]. Mai multe aspecte structurale ale carotenoidelor sunt reflectate, de asemenea, în afinitatea de absorbție relativă, care variază atât cu natura scheletului cât și cu tiparul substituenților cu oxigen. Caracteristicile de absorbție pot fi cercetate prin cromatografie pe coloană sau, la o scară mai mică, prin cromatografia pe strat subțire și prin cromatografia pe hârtie. Numărul și natura funcțiilor cu oxigen ale unei carotenoide contribuie atât la repartitia lor între eter de petrol și metanol apos, cât și la repartitia lor cromatografică [4,5,79].

Dezvoltarea metodelor de cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC), a contribuit la noi progrese în analiza compușilor carotenoidici, în special în ultimii ani [5,79,88]. Astfel cunoscându-se faptul că pigmentii carotenoidici sunt ușor oxidabili, în prezent se utilizează adăugarea de antioxidanți, cum este t-butilhidroxi-toluenul, în faza mobilă și menținerea temperaturii coloanei la o valoare constantă și scăzută [89,90]. Cuplarea unui detector cu fotodiodă la sistemul HPLC permite colectarea continuă a datelor spectrofotometrice în timpul analizei [91], care în unele cazuri nu este suficientă pentru identificare.

Odată cu creșterea numărului de carotenoide cunoscute și cu accesibilitatea și dezvoltarea spectrometriei de masă, s-a ajuns ca astăzi spectrometria de masă să

devină foarte utilă în identificarea carotenoidelor. În cazul probelor suficient de pure de carotenoide, spectrometria de masă conduce la elucidarea structurii carotenoidei prin fragmentarea probei și stabilirea cu înaltă rezoluție a formulei moleculare. Pentru identificarea și dozarea carotenoidelor din matrici de probe complexe, (conținând în plus alți compuși care absorb în UV) se cuplează un sistem cromatografic cu fază inversă la un spectrometru de masă [5,79,88].

Proba necesară pentru spectrometria de masă este în cantități foarte mici, iar aplicarea ei este universală în analiza de carotenoide naturale. Cu toate acestea, metode ca spectroscopia I.R. și rezonanța magnetică protonică ($^1\text{H-RMN}$) sunt metode indispensabile în determinarea structurii carotenoidelor. Spectroscopia I.R. dă indicații asupra prezenței grupărilor funcționale, iar valorile $^1\text{H-RMN}$ sunt capabile să pună în evidență numărul și natura protonilor metililor și a altor protoni ai moleculelor carotenoidelor [79].

2.4.2.1. Identificarea compușilor carotenoidici prin caracteristici de adsorbție

Determinarea caracteristicilor de adsorbție a unei carotenoide este utilizată pentru identificarea ei. Aceasta se poate realiza prin *cromatografie pe strat subțire sau pe coloană*. Caracteristicile de adsorbție ale unei carotenoide sunt influențate de structura ei chimică. [5,79] Astfel dacă în structura carotenoidei se găsesc grupări funcționale de atracție electrostatică față de adsorbant, ea va fi mai puternic adsorbită

Multe carotenoide prezintă absorbția maximă la trei lungimi de undă rezultând un spectru cu trei picuri. Cu cât numărul de legături duble conjugate este mai mare, cu atât absorbția maximă este la o lungime de undă mai mare [5,79]. Astfel, carotenoida aciclică cea mai nesaturată: licopenul, cu 11 legături duble conjugate, are culoare roșie și absoarbe la cea mai mare lungime de undă (λ_{max} la 444, 470,502 nm). ζ - Carotenul (galben deschis), care are de asemenea o structură aciclică, prezintă tot trei picuri bine definite, dar la lungimi de undă mult mai mici (λ_{max} la 378, 400, 425 nm), având șapte legături duble conjugate.

Carotenoidele ciclice prezintă maxime de absorbție la lungimi de undă mai mici decât cele aciclice. Astfel, molecula biciclică a β -carotenului, deși prezintă același număr de duble legături conjugate ca și licopenul, are culoare galbenă-portocalie și maxime de absorbție la 425, 450 și 477 nm. γ -Carotenul, cu structură monociclică, are culoare roșie-portocalie și prezintă un spectru intermediar între licopen și β -caroten. α -Carotenul prezentând 10 duble legături conjugate în moleculă, are o culoare galben-deschisă iar spectrul său de absorbție se găsește la lungimi de undă mai mici (422, 445, 473 nm) decât în cazul β -carotenului

Introducerea substituenților hidroxilici în molecula carotenoidei nu afectează cromoforul. Astfel spectrele luteinei, zeaxantinei și α -criptoxantinei se aseamănă cu cel al α -carotenului iar cele ale β -criptoxantinei și zeaxantinei, cu cel al β -carotenului [5,79]. Izomerizarea *cis* a legăturilor duble din cromofori determină o ușoară pierdere în culoare, o mică deplasare hipsocromă (de obicei între 2 și 6 nm pentru mono-*cis*) însoțită de apariția unui pic- „*cis*” cu circa 142 nm mai înainte de lungimea de undă a maximumului de absorbție a *trans*- carotenoidei când este măsurată în hexan [5]. Intensitatea benzii *cis* este mai puternică atunci când dubla legătură este mai apropiată de mijlocul moleculei. Astfel, izomerul 15-*cis*, în care legătura dublă *cis* este la mijlocul moleculei, prezintă un pic-*cis* foarte proeminent.

Spectrele de absorbție ale carotenoidelor depind foarte mult de solvenul utilizat (tabelul 2.11.). Această caracteristică a carotenoidelor trebuie avută în

vedere când se analizează spectrele înregistrate de detectorul cu fotiododă al HPLC deoarece acestea sunt obținute în amestecuri de solvenți [5].

Tabelul 2.11.
Maximele de absorbție(nm) ale principalelor carotenoide în diferiți solvenți[5]

| Carotenoida | Solventul | λ_{\max} (nm) |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------|
| α -caroten | acetonă | 424 448 476 |
| | cloroform | 433 457 484 |
| | etanol | 423 444 473 |
| | hexan, eter de petrol | 422 445 473 |
| β -caroten | acetonă | (429) 452 478 |
| | cloroform | (435) 461 485 |
| | etanol | (425) 450 478 |
| | hexan, eter de petrol | (425) 450 477 |
| α -criptoxantină | cloroform | 435 459 487 |
| | etanol | 423 446 473 |
| | hexan | 421 445 475 |
| β -criptoxantină | cloroform | (435) 459 485 |
| | etanol | (428) 450 478 |
| | eter de petrol | (425) 449 476 |
| luteină | cloroform | 435 458 485 |
| | etanol | 422 445 474 |
| | eter de petrol | 421 445 474 |
| licopen | acetonă | 448 474 505 |
| | cloroform | 458 484 518 |
| | etanol | 446 472 503 |
| | eter de petrol | 444 470 502 |
| zeaxantină | acetonă | (430) 452 479 |
| | cloroform | (433) 462 493 |
| | etanol | (428) 450 478 |
| | eter de petrol | (424) 449 476 |

În *cromatografia pe coloană cu fază normală*, afinitatea de adsorbție depinde de: a) numărul de duble legături conjugate, b) ciclizare, c) prezența substituenților cu oxigen. Influența numărului de legături duble conjugate este cel mai bine ilustrată de afinitățile de absorbție ale carotenoidelor aciclice care sunt eluate în ordinea creșterii acestui număr: fioen, fitofluen, ζ -caroten, neurosporen și licopen. Comparând carotenoidele monociclice și biciclice, δ -carotenul este eluat înaintea γ -carotenului și α -carotenul înaintea β -carotenului [5]. Ciclizarea determină scăderea afinității de adsorbție. Astfel, β -carotenul este mult mai slab adsorbit decât γ -carotenul, care la rândul lui este eluat înaintea licopenului. Prezența substituenților cu oxigen determină creșterea afinității de adsorbție, mărimea acestei creșteri depinzând de tipul, numărul și locația funcțiilor. Acest lucru s-a demonstrat pe un strat subțire de silicagel dezvoltantul fiind un amestec de 3% metanol în benzen sau 5% metanol în toluen, în care toate carotenoidele hidrocarburice sunt eluate cu frontul solventului în timp ce xantofilele sunt distribuite de-a lungul plăcii în funcție de numărul și tipul substituenților prezenți. Grupările hidroxil influențează major comportarea la absorbție. Astfel, în cromatografia pe strat subțire carotenoidele dihidroxilice apar mai aproape de linia de start în timp ce carotenoidele monohidroxilice apar mai aproape de mijlocul plăcii [5,79].

În *cromatografia HPLC cu fază inversă*, ordinea eluării carotenoidelor este mai mult sau mai puțin inversă celei care se obține în cea cu fază normală. Xantofilele cele mai polare (neoxantina - cu trei grupări hidroxilice și una epoxidică, violaxantina - cu două grupări hidroxilice și două epoxidice, luteina și zeaxantina - cu două grupări hidroxilice) sunt eluate mult înaintea carotenoidelor hidrocarburice, în timp ce carotenoidele monohidroxilice sunt eluate între aceste două grupe

Diferențele structurale între inelele aciclice și aromatice de asemeni determină diferențe în proprietățile de adsorbție ale acestor compuși. De asemenea, modificări în ordinea de eluție pot să apară cu diferite sisteme adsorbent-solvent [4,5].

În *cromatografia pe strat subțire* sistemul fază staționară-fază mobilă se alege în funcție de natura compușilor de separat. În tabelul 2.12 sunt prezentate sistemele de dezvoltare și valorile R_f pentru unele carotenoide.

Tabelul 2.12.

Valorile R_f pentru carotenoide (distanța de migrare: 12-16 cm, interval de migrare: 40-60 min) [92]

| Adsorbant *) | S ₁ | S ₂ | S ₃ | S ₄ | S ₄ | S ₅ | S ₅ | S ₆ | S ₆ | S ₂ |
|--------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Fază mobilă **) | F ₁ | F ₂ | | F ₄ | F ₅ | F ₆ | F ₇ | F ₈ | F ₄ | F ₉ |
| ε-caroten | - | - | - | - | - | 70 | 84 | | | |
| α-caroten | - | - | - | - | - | 66 | 80 | | | |
| β-caroten | 81 | 82 | 96 | - | - | 49 | 74 | | | |
| δ-caroten | - | - | - | - | - | 20 | 55 | | | |
| γ-caroten | - | - | - | - | - | 11 | 41 | | | |
| Licopen | - | 74 | - | - | - | 1 | 13 | | | |
| Torulen | - | - | - | - | - | - | - | - | 98 | |
| β-zeaxantina | 75 | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| β-apo-12-carotenal | - | - | - | - | - | | | 70 | - | - |
| β-apo-8-carotenal | - | 15 | - | - | - | | | 64 | - | - |
| β-apo-10-carotenal | - | - | - | - | - | | | 53 | - | - |
| Licopinal | - | - | - | - | - | | | 43 | - | - |
| Cantaxantina | - | 0 | 38 | 43 | | | | | 63 | 90 |
| Criptoxantina | - | - | - | 34 | 74 | | | | 54 | 75 |
| Luteina | - | - | - | - | 55 | | | | 10 | 35 |
| Anteraxantina | - | - | - | - | - | | | 0 | 10 | 32 |
| Zeaxantina | - | - | 17 | - | 57 | | | | 5 | 24 |
| Violaxantina | - | - | - | - | | | | | 5 | 21 |
| Capsantina | - | - | - | - | | | | | 5 | 16 |
| Capsorubina | - | - | - | 16 | 94 | | | | 0 | 13 |
| Rodoxantina | - | - | - | 16 | 94 | | | | - | - |

*) Adsorbantji:
 S₁ : Silicagel G – MgO (1 : 1) activat;
 S₂ : Silicagel G activat;
 S₃ : Silicagel + amidon (98 : 2) activat;
 S₄ : Ca(OH)₂ + Silicagel G (6 : 1) activat;
 S₅ : MgO activat;

S₆ : fosfat de magneziu, activat;
 **) Faze mobile:
 F₁ : eter de petrol (40-60°C) – benzen (90 : 10, v/v);
 F₂ : eter de petrol (40-60°C) – benzen (50 : 50, v/v);
 F₃ : n-hexan : eter etilic (30 : 70, v/v);
 F₄ : benzen;
 F₅ : benzen-metanol (98 : 2, v/v);
 F₆ : eter de petrol (40-60°C) = benzen (50 : 50, v/v);
 F₇ : eter de petrol (40-60°C) = benzen (10 : 90, v/v);
 F₈ : tetraclorură de carbon;
 F₉ : clorură de metilen; acetat de etil (80 : 20, v/v);

Carotenoidele se pot separa în bune condiții și pe straturi de silicagel impregnate cu ulei de parafină, pe straturi celulozice sau poliamidice. Pe plăci de silicagel impregnate cu ulei de parafină s-au separat aldehidele carotenoidice folosind ca dezvoltant metanol saturat cu ulei de parafină [92]. Valorile R_f obținute sunt redată în tabelul 2.13.

Tabelul 2.13

Valorile R_f pentru aldocarotenoide pe silicagel impregnate cu ulei de parafină [92]

| C ₄₀ | C ₃₇ | C ₃₅ | C ₃₂ | C ₃₀ | C ₂₇ | C ₂₅ | C ₂₀ |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 28 | 34 | 38 | 47 | 49 | 63 | 69 | 85 |

Se observă că valoarea R_f scade (puterea de reținere pe silicogel impregnat cu ulei de parafină crește) pe măsură ce numărul de atomi de C din moleculă crește.

2.4.2.2. Identificarea compușilor carotenoidici prin teste chimice

Prin tratarea carotenoidelor cu $SbCl_3$, H_2SO_4 concentrat, HCl concentrat, $HClO_3$ sau BF_3 apare o colorație albastră. De asemenea, se pot utiliza clorurile metalelor ca: $AlCl_3$, $TiCl_4$, $HgCl_2$, etc. [1]

Metodele de testare chimică a compușilor carotenoidici prezintă o importanță crescândă pentru identificarea acestora.

O valoare particulară a acestora este aceea că se pot realiza rapid și necesită doar mici cantități de material. Testele chimice sunt utilizate pentru identificarea anumitor grupe funcționale și ele pot fi folosite pentru confirmarea datelor obținute prin alte metode [4].

• Identificarea aldocarotenoidelor și cetocarotenoidelor

Carotenoidele cetonice pot fi relativ ușor identificate prin reducerea lor cu $NaBH_4$ (sau KBH_4) la hidroxicarotenoide, fapt reflectat în comportarea lor prin metode de adsorbție cromatografice, metode spectroscopice și prin modificarea coeficientului de repartiție [4]:

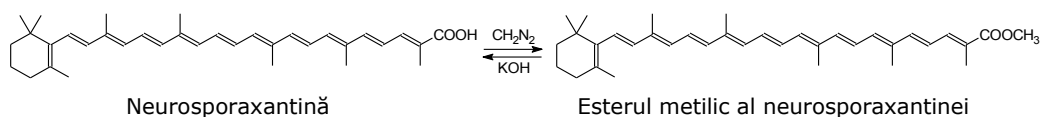
Grupările α -dicetonice (astacină, dehidroflexixantină) sunt puse în evidență prin formarea derivaților fenazinici, după condensarea cu orto-fenilendiamină [1]. Derivatul obținut prezintă același spectru de absorbție ca și carotenoida de plecare și o polaritate mai mică, dar culoarea pe coloană este albastru închis. Monocetonele, cum este echinenona, nu dau această reacție de condensare, ceea ce demonstrează specificitatea reactivului.

Carotenoidele aldehidice pot fi identificate prin reacția de reducere la hidroxicarotenoide cu $LiAlH_4$ și cu ajutorul reacțiilor de condensare specifice acestora. Dintre acestea, reacția cu 2-difenilacetil-1, 3-indandion-1-hidrazonă formează complecși stabili. Reacția are loc și cu cetocarotenoidele [1].

Aldocarotenoidele și cetocarotenoidele formează oxime la tratarea lor cu clorhidrat de hidroxilamină în mediu piridimic. Formarea oximei se poate pune în evidență prin creșterea polarității și deplasarea hipsocromă a λ_{max} .

• Identificarea carotenoidelor cu grupări carboxilice

Carotenoidele cu grupări carboxilice, cum sunt neurosporaxantina și torularodina, prin tratare cu diazometan sunt convertite în esteri metilici [47]. Esterii metilici formați se caracterizează printr-o puternică diminuare a polarității, pierderea proprietăților acide, iar din punct de vedere spectral, printr-un ușor efect hipocrom și cu un spectru mult mai fin în eteri de petrol, ceea ce nu se realizează cu acizii liberi. Esterii metilici ai carotenoidelor carboxilice pot fi cromatografiați foarte ușor.



• Identificarea hidroxicarotenoidelor

Carotenoidele cu grupare HO primară și secundară pot fi identificate prin reacția de acetilare cu anhidridă acetică în piridină, la rece. Reacția furnizează indicații asupra naturii grupării HO (primară sau secundară) [1].

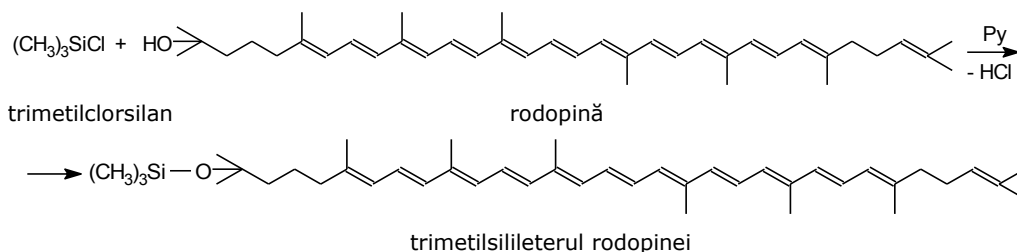
Formarea de acetat diminuează polaritatea carotenoidei și poate favoriza separarea de celelalte carotenoide din amestec sau de alți pigmenți însoțitori. Spectrul în vizibil al acetatului este același cu cel al xantofiei de origine. Spectrul RMN însă, poate furniza indicații interesante cu privire la poziția hidroxilului.

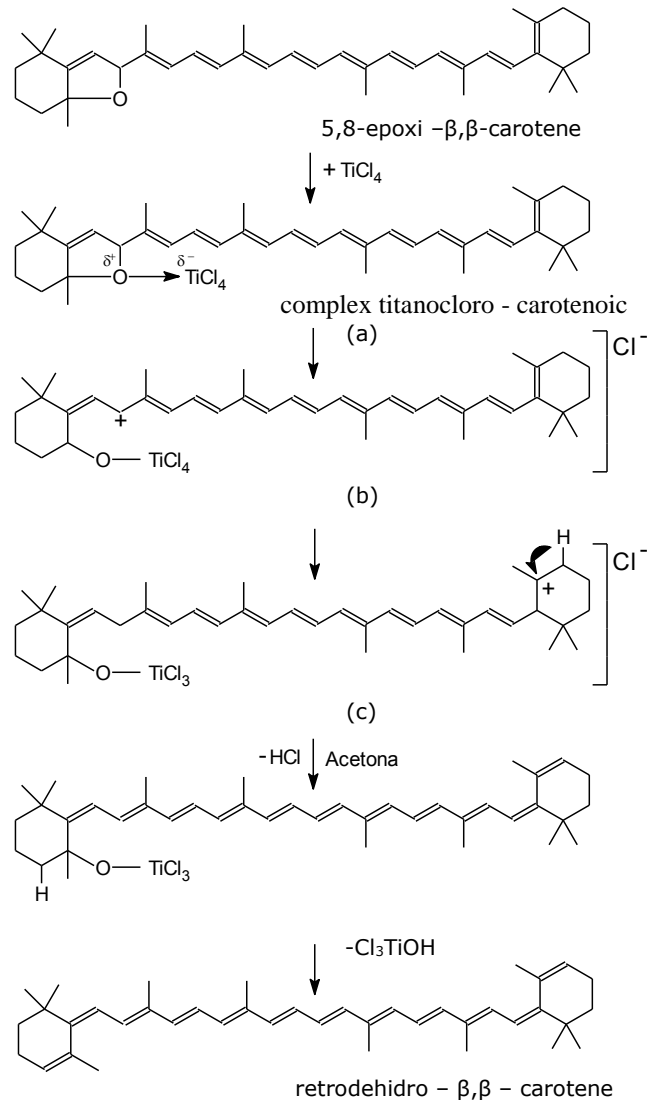
Hidroxicarotenoidele cu HO alilic secundar manifestă o mare reactivitate chimică și se pretează la un număr mare de reacții. Astfel, ele pot elimina gruparea HO prin tratare cu HCl cloroformic timp de 10-20 minute și să se transforme în retrodehidrocarotenoidă [1]. Transformarea poate fi confirmată prin valoarea λ_{max} .

Reacția este dată și de grupe etoxi și de glicozizi la tratarea lor cu cloroform acidifiat. De asemenea, carotenoidele cu HO alilic pot fi oxidate la cetocarotenoide cu Ag_2O (MnO_2 , cloranil, peroxid de nichel etc). Hidroxilul alilic poate fi metilat cu metanol în prezență de acid clorhidric [1].

Carotenoidele hidroxilice cu HO terțiar pot fi identificate pe cale chimică prin formarea de eter trimetilsililat și prin deshidratarea cu oxiclurură de fosfor.

Hidroxicarotenoidele cu HO primar, secundar sau terțiar din amestec pot fi identificate prin formare de eteri trimetilsililici în soluție de piridină [93]. Astfel, rodopina a fost cantitativ convertită în eterul ei trimetilsililic, iar 1,2,1',2' - tetrahidro 1,1' - dehidroxilicopenul în eterul său trimetilsililic prin tratare cu trimetilcloroxilan în piridină uscată.





2.4.2.3. Identificarea carotenoidelor cu ajutorul spectroscopiei I.R.

Domeniul infraroșu (IR) de la 2,5 la 15 μm este utilizat pentru a observa mișcările de vibrație ale grupărilor de atomi și ale moleculelor. Spectrele de absorbție în I.R. prezintă unele avantaje în elucidarea structurii carotenoidelor în comparație cu spectrele de absorbție în vizibil. Ele prezintă un număr mai mare de benzi și deci oferă un material informativ mai bogat [94]. Cu ajutorul spectrelor IR se poate stabili atât natura sistemului polienic, cât și prezența și poziția diferitelor grupări funcționale în moleculă. Se utilizează tehnici în care carotenoidele sunt solubilizate (în CCl_4 , CHCl_3 , CHBr_3 , CS_2 , etc), precum și tabletarea în fază solidă, în

KBr, care oferă un mare avantaj de a nu aduce benzi de absorbție parazite în spectrul IR [4].

A. Frecvența datorată scheletului moleculei

Scheletul moleculei de carotenoide produce o bandă la 870 cm^{-1} datorată vibrației de deformare în afara planului a legăturii C - H din restul - CH = CH -. Toate carotenoidele prezintă benzi de absorbție în regiunea frecvențelor înalte ($3100\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$).

Legătura dublă C = C izolată față de sistemul polienic este pusă în evidență prin banda de la 1600 cm^{-1} pentru cea din sistemul α -iononic și la 1627 cm^{-1} din sistemul pseudoiononic. Frecvența legăturii triple C α C poate fi pusă în evidență prin banda de intensitate mijlocie situată între 2150 și 2175 cm^{-1} . Gruparea alenică se poate pune în evidență prin banda de la 1930 cm^{-1} .

B. Frecvențele datorate substituenților

- *Natura și poziția grupării HO*

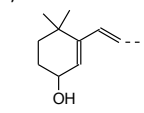
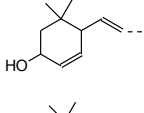
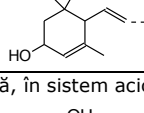
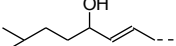
Vibrația de alungire a legăturii O - H este situată în jur de 3400 cm^{-1} . Banda este netă și puternică și constituie un indiciu pentru prezența unuia sau mai multor hidroxili [38]. Pentru elucidarea naturii și a poziției grupării HO prin spectroscopie IR se studiază regiunea $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ în care are loc vibrația de alungire a legăturii C - O care este mai sensibilă la modificările din schelet decât vibrația legăturii O - H.

- *Prezența HO primar* - este confirmată prin banda situată la $1005\text{-}1025\text{ cm}^{-1}$.

- *Prezența HO secundar*. Cea mai mare parte a carotenoidelor hidroxilice naturale cu schelet β -carotenoidic conțin gruparea HO secundar în poziție alilică, spre deosebire de cele sintetice la care gruparea HO se găsește în poziție alilică. În tabelul 2.14. sunt prezentate frecvențele caracteristice în IR ale vibrației legăturii C - O din diferiți alcooli secundari.

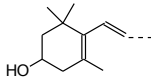
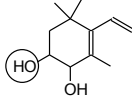
Tabelul 2.14.

Frecvențele caracteristice în IR ale vibrației C - O din alcooli secundari [1]

| Tipul de alcool secundar | ν_{C-O} (cm^{-1}) |
|---|----------------------------------|
| - grupa HO în poziție alilică, în sistem ciclic  | 1028 |
|  | 1027 |
|  | 1029 |
| - grupa HO în poziție alilică, în sistem aciclic  | 1045 |

Tabelul 2.14.

Frecvențele caracteristice în IR ale vibrației C - O din alcooli secundari - continuare

| Tipul de alcool secundar | ν_{C-O} (cm^{-1}) |
|--|----------------------------------|
| - grupa HO în poziție nealilică, în sistem cyclic  | 1048 |
|  | 1050 |

Poziția benzii cauzată de vibrația de valență C - (OH) este influențată de factorii structurali din vecinătate, ceea ce determină deplasarea ei, dar în limite relativ restrânse.

- Prezența HO terțiar determină apariția unei benzi în IR la 1140-1150 cm^{-1} și alta la 905 cm^{-1} .

- Prezența altor grupări care conțin legătura C - O care se găsesc mai frecvent în molecula carotenoidelor se poate identifica pe baza benzilor de absorbție în IR prezentate în tabelul 2.15.

Tabelul 2.15.

Frecvențe caracteristice în IR ale unor grupări oxigenate din molecula carotenoidelor (în KBr) [1]

| Gruparea | ν_{C-O} (cm^{-1}) |
|------------------------|----------------------------------|
| HO enolic | 1050 - 1060 1200 - 1240 |
| metoxil terțiar | 1070 - 1080 |
| furanoid (5,8 - epoxi) | 1070 |
| HO - acil | 1730 - 1745 |

- *Natura și poziția grupării carbonil*

Gruparea carbonilică poate fi evidențiată în spectrul IR printr-o bandă care apare între 1650 și 1690 cm^{-1} [38]. Poziția acestei benzi depinde în primul rând de natura și poziția grupării carbonil. Carotenoidele aldehydice prezintă o bandă la 1685 cm^{-1} , iar cetocarotenoidele, între 1650 și 1670 cm^{-1} și chiar valori mai joase

2.4.2.4. Identificarea compușilor carotenoidici cu ajutorul spectro-metriei de rezonanță magnetică nucleară

Folosirea spectroscopiei de rezonanță magnetică nucleară (RMN) în studiul carotenoidelor a avut loc în ultimele patru decenii. Această tehnică deosebită, nedistructivă, aduce informații decisive în elucidarea structurii carotenoidelor.

Deși marea majoritate a spectrelor RMN ale carotenoidelor au fost realizate la 60 MHz, s-au dezvoltat și instrumente care lucrează la 100 și 220 MHz [33]

Cei mai utilizați solvenți sunt: deuterocloroformul, CHCl_3 și CCl_4 cu tetrametilsilan ca martor intern. Mai multe informații utile se obțin astăzi cu ajutorul spectroscopiei de rezonanță magnetică protonică (^1H -RMN). Prin aceasta se pune în evidență prezența protonilor prin semnalele care apar în spectru. Mărimea acestor semnale este diferită în funcție de structura carotenoidei, de aranjarea atomilor

începând și de natura și numărul protonilor care se află într-o anumită grupare [1,4]. În cazul compușilor carotenoidici sursa de protoni o constituie diferitele grupări, cum sunt: CH₃, CH₂, CH, HO, OCH₃, CHO, etc, obținându-se un spectru cu semnale de mărimi diferite, ceea ce permite punerea lor în evidență. Întrucât grupările CH₃ sunt cele mai bogate în protoni, semnalele date de ele au cea mai mare intensitate. Aceasta permite în special determinarea numărului și a tipurilor de grupe CH₃, dar și a protonilor proveniți de la alte grupări.

Spectrele RMN ale carotenoidelor prezintă, în general, două grupe principale de semnale: regiunea de semnale τ : 7,7-9,2 determinate de prezența protonilor metilici, metilenici și metinici și regiunea de semnale τ : 3,0-4,6 determinate de rezonanța protonilor olefinici [1,33]. (τ – unitate pentru exprimarea deplasării chimice a unui proton, în p.p.m). Numai câteva grupe funcționale, cum ar fi alcoolii primari și secundari, aldehidele, acizii, esterii, eterii metilici și glicozidele dau naștere unor semnale în afara acestor regiuni. Folosindu-se tehnica RMN s-a putut stabili structura multor carotenoide și s-au adus date prețioase asupra grupelor terminale și a altor grupări [79,96-99].

2.4.2.5. Identificarea carotenoidelor cu ajutorul spectrometriei de masă

Spectrometria de masă a fost utilizată pentru prima oară în studiul compușilor carotenoidici în anul 1965 de către Schwieter și colaboratorii [100]. Metoda constă în fragmentarea foarte precisă și caracteristică a diferitelor tipuri de carotenoide în ioni moleculari. Deoarece compușii carotenoidici se caracterizează prin faptul că sunt nestabili și au o volatilitate redusă, pentru volatilizarea lor și realizarea de ioni moleculari sunt necesare condiții speciale (încălzire până la 300°C). De asemenea s-a propus [100] un mecanism pentru aceste fragmentări prin rearanjarea lanțului polienic și expulzarea toluenului și respectiv, xilenului, implicând ruperea unei singure legături (figura 2.4.):

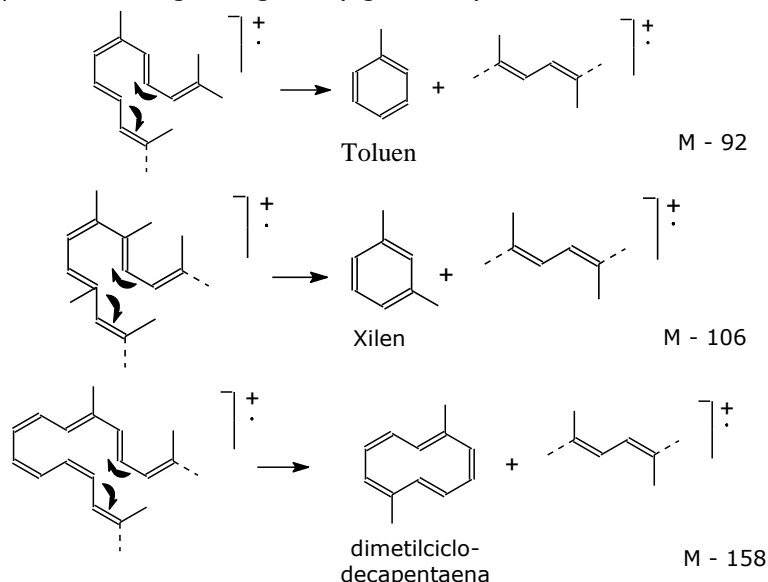
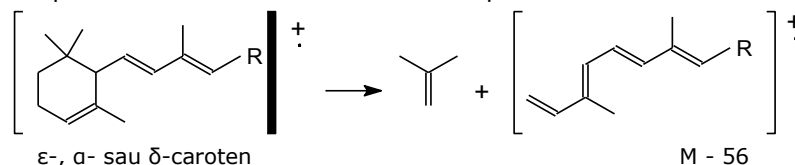


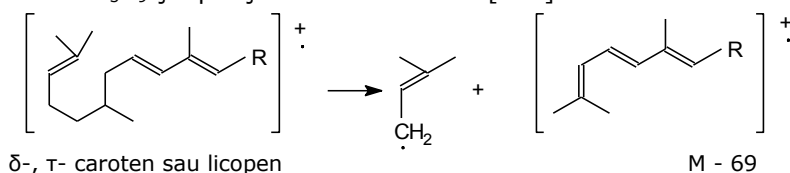
Figura 2.4.- Mecanismul fragmentării unor tipuri de carotenoide

Ionii moleculari care dau naștere la maximele M-92 și M-106 sunt cei mai abundenți și semnificativi în fragmentarea carotenoidelor, fapt pentru care acești doi ioni constituie indicatori importanți în determinări de structură și de mase moleculare. Totodată, raportul dintre intensitățile acestor maxime (M-92/M-106) este diferit, în funcție de numărul de legături duble C = C conjugate, descrescând odată cu creșterea catenei polienice. Maximele M-92 și M-106 nu apar în cazul carotenoidelor cu mai puțin de nouă duble legături conjugate [101].

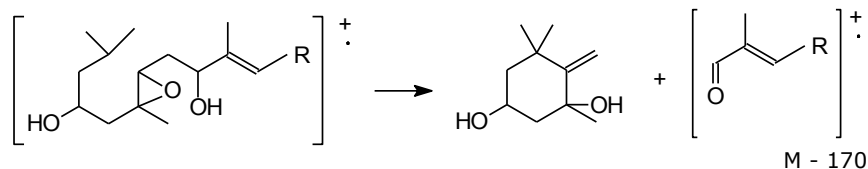
Principalele carotenoide ciclice din seria C₄₀ prezintă un maxim la M-56 [101]:



La carotenoidele aciclice are loc o fragmentare a legăturii C - C din poziția 3-4, cu pierderea de C₅H₉ și apariția maximului M-69 [102]:



5,6- și 5,8- epoxicarotenoidele se fragmentează caracteristic în ionul situat la M-170:



În ultimii ani au început să se dezvolte și să se utilizeze tot mai mult tehnicile de analiză HPLC cuplată cu MS pentru a crește precizia identificării picurilor diferitelor carotenoide [88]. Spre deosebire de interfețele de ionizare electrică (ESI) interfețele de ionizare la presiune atmosferică (APCI) facilitează ionizarea prin reacții chimice clasice cum ar fi transferul de proton. În aceste condiții, xantofilele și carotenoidele hidrocarburice formează ioni în timpul ionizării pozitive sau negative în HPLC-MS. Sensibilitatea acestei tehnici s-a dovedit a fi similară cu cea care utilizează ESI-MS.

Mecanismul formării hidrocarburilor protonate neuzuale cum sunt: xantofilele și carotenoidele hidrocarburice se află sub investigații. O explicație posibilă pentru formarea moleculelor de carotenoide hidrocarburice protonate poate fi aceea că electronii π ai lanțului polienic carotenoidic sunt promovați la variate stări excitate de-a lungul interacțiunii cu plasma APCI astfel încât una sau mai multe din aceste carotenoide în stare excitată manifestă o afinitate mai ridicată, neobișnuită pentru protoni comparativ cu molecula în stare neexcitată. Această creștere a afinității pentru protoni poate conduce la protonarea carotenoidei de către solventul APCI ca și reactiv gazos [88].

În scopul de a îmbogăți fragmentarea carotenoidelor, se utilizează disocierea indusă prin coliziune (CID) pentru a produce fragmente ionice semnificative de carotenoide. Această tehnică poate fi, de asemenea, utilizată ca "amprentă" pentru determinarea în matrici de probe foarte complexe, întrucât modul de fragmentare al carotenoidelor depinde de alegerea interfeței utilizate (tabelul 2.16.) [88]. Spectrul de masă cu ion pozitiv CID al luteinei prezintă fragmente ionice la m/z 551,459 și 429, care corespund pierderii de apă, pierderii de apă și toluen și pierderii inelului terminal. Zeaxantina prezintă același mod de fragmentare ca și luteina și a fost distinsă de luteină prin timpul său de retenție. Cele mai abundente fragmente pentru β -criptoxantina au fost pierderile de apă (m/z 535) și de toluen (m/z 459). Disocierea β -carotenului prezintă fragmente la m/z 480 (fragment ionic retro Diels-Alder), 444 (pierdere de toluen) și 388 (combinație de pierdere de toluen și fragmentare retro Diels-Alder) [88].

Tabelul 2.16.
Masa moleculară și caracteristicile fragmentelor de carotenoide [88]

| Carotenoida | Masa moleculară | Fragmentele cele mai abundente |
|------------------------|-----------------|--------------------------------|
| Luteină, zeaxantină | 569 | 551,459,429 |
| β -Criptoxantină | 553 | 535,459 |
| β -Caroten | 537 | 480,444,388 |

2.4.3. Dozarea compușilor carotenoidici

Determinarea cantitativă a carotenoidelor este în general realizată prin tehnici spectrofotometrice. În acest scop, carotenoidele trebuie să fie, în majoritatea cazurilor, de puritate cromatografică. Proba minimă necesară este în funcție numai de sensibilitatea spectrofotometrului și de mărimea cuvei. Cel mai uzual solvent pentru determinarea hidrocarburilor carotenoidice este eterul de petrol sau hexanul, iar pentru xantofile sunt solvenții polari [4,5]. Absorbanța (A) sau densitatea optică (DO) a unei soluții de carotenoidă (sau alt compus absorbant) este legată de concentrația solutului prin ecuația (legea Lambert-Beer):

$$A = \epsilon l c,$$

unde ϵ - coeficientul molar de extincție;
 l - lungimea cuvei în cm;
 c - concentrația solutului în moli/l.

Coeficientul molar de extincție este o proprietate a substanței absorbante și este definit ca absorbanța unei soluții 1 M într-o cuvă cu grosimea de 1 cm. Unitățile de măsură pentru ϵ sunt $l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [4]. Coeficientul de extincție specifică $A^{1\%}_{1 \text{ cm}}$ este absorbanța unei soluții 1% (de exemplu 1 g pigment carotenoidic la 100 μl soluție), într-o cuvă de 1 cm grosime. Valorile $A^{1\%}_{1 \text{ cm}}$ utilizate pentru cele mai multe carotenoide sunt cuprinse în tabelul 2.17. [5]. Extincția specifică este determinată la lungimea de undă maximă (λ_{max}).

Tabelul 2.17.Valorile $A^{1\%}_{1cm}$ ale principalelor carotenoide [5]

| Carotenoida | Solventul | λ_{max} (nm) | $A^{1\%}_{1cm}$ |
|-------------------------|-------------------|----------------------|-----------------|
| α -caroten | eter de petrol | 444 | 2800 |
| | hexan | 445 | 2710 |
| β -caroten | eter de petrol | 450 | 2592 |
| | etanol | 450 | 2620 |
| | cloroform | 465 | 2396 |
| α -criptoxantină | hexan | 445 | 2636 |
| β -criptoxantină | eter de petrol | 449 | 2386 |
| | hexan | 450 | 2460 |
| luteină | etanol | 445 | 2550 |
| | benzen | 458 | 2236 |
| | sulfură de carbon | 475 | 2160 |
| licopen | eter de petrol | 470 | 3450 |
| zeaxantină | eter de petrol | 452 | 2350 |
| | etanol | 450 | 2540 |
| | acetona | 452 | 2340 |

Cantitatea de carotenoidă se calculează ținând seama de volumul soluției (V , ml), de absorbanta A citită la lungimea de undă dată și de cantitatea de substanță luată în lucru (m , în g sau ml) [5,79,103]:

$$\text{Carotenoidă } (\mu\text{g/g material vegetal}) = \frac{A \cdot V \cdot 10^4}{A^{1\%}_{1cm} \cdot m}$$

unde:

A - este absorbanta la lungimea de undă dată;

V - volumul extractului analizat (ml);

$A^{1\%}_{1cm}$ - coeficient specific de absorbție al carotenoidei respective;

m - masa probei (g).

În cazul amestecurilor de pigmenți carotenoidici se calculează cantitatea totală de carotenoide cu relația de mai sus, utilizându-se coeficientul specific de absorbție al β -carotenului în solventul folosit [5,79,103].

Atunci când se dispune de carotenoide standard se pot trasa curbe de etalonare, reprezentând extincția în funcție de concentrația carotenoidei-dacă se folosește spectrofotometria, respectiv aria picului în funcție de concentrație- dacă se folosește metoda HPLC, cu ajutorul cărora se pot doza carotenoidele din diferite materiale vegetale sau animale

Determinarea cantitativă a carotenoidelor individuale este în prezent tot mai mult efectuată prin HPLC automată a unui amestec de pigmenți datele fiind procesate pe computer și convertite direct în concentrații [104].

2.5. UTILIZAREA COMPUȘILOR CAROTENOIDICI

2.5.1. Generalități

În urma a numeroase și variate cercetări efectuate în multe țări s-au stabilit domeniile și modalitățile concrete de utilizare a carotenoidelor în: medicină, cosmetică, zootehnie, industria alimentară, industria farmaceutică, etc. Variatele

proprietăți biologice și funcții ale carotenoidelor sunt motivul principal pentru importanța deosebită a acestei clase de compuși.

Carotenoidele prezintă funcții importante în viața plantelor intervenind în procesul de fotosinteză în care energia de transfer implică excitarea directă a carotenoidelor de către lumină pentru a forma prima stare singlet excitată și transferul acestei energii de excitație la clorofilă pentru a iniția procesul de fotosinteză. În același timp carotenoidele au un efect de protecție în procesele de autofotoliză împiedicând, prin absorbția energiei luminoase, biodegradarea clorofilei în cursul fotosintezei [1,4,105].

Compușii carotenoidici sunt factori deosebit de importanți pentru sănătatea umană și cea a animalelor. Rolul esențial al β -carotenului și al altor carotenoide care prezintă un inel β -iononic nesubstituit în moleculă, este de a fi principala sursă alimentară pentru biosinteza vitaminei A. De asemenea, carotenoidele intervin și în stimularea unor substanțe biologice active în organismul omului și al animalelor, de exemplu: citocromi, catalaze, vitamina B12, vitamina E (și prin aceasta, indirect în reproducție), vitamina K și altele. În toate cazurile menționate carotenoidele asigură fotoprotecția celulelor și țesuturilor. Mai recent, au fost recunoscute și au fost inițiate cercetări intensive privind efectele protective ale carotenoidelor împotriva unor afecțiuni serioase, cum sunt: cancerul, bolile de inimă, disfuncțiile degenerative oculare, studiindu-se efectul lor antioxidant și de regulatori ai sistemului imunitar [2,4,7-12,106,107].

În industria alimentară carotenoidele sunt utilizate la aditivarea unor produse alimentare, având rolul de substanțe antioxidante și coloranți naturali [1,108,109].

De asemenea, carotenoidele se utilizează în mod curent în industria farmaceutică (ca ingredient al diverselor produse chimioterapice) și în cosmetică [1,110,111].

2.5.2. Utilizarea compușilor carotenoidici în zootehnie

2.5.2.1. Considerații generale

Spre deosebire de plante, animalele nu sunt capabile să biosintetizeze carotenoide din compuși anorganici. Ele au însă capacitatea de a biotransforma și depozita în diferite țesuturi și organe, carotenoide ingerate din hrană [79]. Datorită acestui fapt unele organisme animale conțin carotenoide specifice și caracteristice, indiferent dacă în hrana ingerată se află sau nu carotenoidele respective. Carotenoidele ingerate determină colorarea unor țesuturi sau a unor organe în care sunt depozitate, așa cum sunt pielea, grăsimea corpului, ciocul și penele unor păsări, gălbenșurile ouălor, corpul și icrele peștilor etc. Atunci când hrana animalelor este săracă în pigmenți carotenoidici se impune adăugarea unor surse naturale bogate în carotenoide sau a unor pigmenți carotenoidici obținuți prin sinteză, pentru a ridica valoarea biologică a produselor alimentare de origine animală. Este cunoscut faptul că pigmenții carotenoidici reprezintă singurele surse naturale din care omul și animalele își pot sintetiza vitamina A. Astfel, introducând pigmenții carotenoidici în hrana animalelor se stimulează procesul de formare a vitaminei A, care are un rol esențial în creșterea organismelor, cicatrizarea rănilor, refacerea epitelilor, combaterea sterilității, pe lângă rolul important pe care acești pigmenți îl au în procesul vederii [1, 5, 7-10, 2].

În timpul depozitării cerealelor, a fructelor și legumelor și mai ales a furajelor, se produce o scădere treptată și accentuată a conținutului de carotenoide [1,3]. Viteza de descreștere a carotenoidelor din materialul vegetal depinde de temperatura, de timpul de expunere la aer, concentrația oxigenului, durata și intensitatea radiațiilor solare, umiditate, microelemente, prooxidanți etc [112-114].

Dintre carotenoide, cel mai repede se distruge hidrocarburile carotenoidice, epoxizii și furanoizii și mai lent xantofilele, esterii carotenoidici, precum și carotenoidele cu grupări carbonilice și carboxilice. Degradări mai accentuate se produc la furajele cu un conținut mai ridicat de microelemente și în cele păstrate în condiții necorespunzătoare [1,3]. Pentru a diminua pierderile de carotenoide în timpul păstrării și preparării furajelor se recomandă adăugarea unor antioxidanți, care au un efect stabilizator asupra carotenoidelor [79,115].

2.5.2.2. Absorbția și depozitarea carotenoidelor în organismele animale

Absorbția și depozitarea diferitelor tipuri de carotenoide, depinde de structura lor moleculară și de organismele animale care le consumă. Astfel, bovinele absorb și depozitează mai ușor în țesuturile grase din corp, în lapte și respectiv în unt: hidrocarburile carotenoidice, mai ales β -carotenul, care este principala provitamină A și mai slab xantofilele și epoxizii [116]. Cantitatea de β -carotină din laptele de vacă depinde de natura furajelor (masă verde, fân) care se administrează vacilor în cursul perioadei de lactație. Păsările și peștii absorb și depozitează mult mai ușor xantofilele esterii, carotenoidele cu grupări cetone și epoxizii decât carotenele. Păsările depozitează preferențial carotenoidele în ficat, gălbenușurile ouălor, în grăsimea corpului, piele, pene și picioare [117,118].

În prezent, în numeroase țări a intrat în practica de producție adăugarea unor surse naturale bogate în carotenoide pentru intensificarea pigmentației cărnii și a coloritului gălbenușurilor ouălor (galben, auriu, portocaliu, portocaliu roșiatic), atât pentru consumul ca atare, cât și pentru obținerea unor produse de cofetărie, paste făinoase, etc de culori mai frumoase, în funcție de cerințele consumatorilor. De asemenea, găinile pentru reproducție primesc în furaje surse de carotenoide, atât pentru creșterea fertilității ouălor, cât și pentru a asigura puilor un colorit galben mai plăcut [58,118]. Astfel de surse naturale bogate în carotenoide utilizate în hrana păsărilor pentru intensificarea coloritului gălbenușurilor de ouă sunt: polenul și mugurii floralii de „*Aesculus hippocastanum*” (castan sălbatic), făină din fructe de „*Hyppophae Rhamnoides*” (cătină), ulei din fructe de „*Hyppophae Rhamnoides*”, petale și fructe de „*Curcubita maxima*” (bostan), petale uscate de „*Calendula officinalis*”, făină de lucernă ș.a [1].

2.5.3. Utilizarea compușilor carotenoidici în medicină

Pigmenții carotenoidici nu trebuie priviți doar ca surse de provitamina A, rolul lor fiind mult mai important, dar încă insuficient elucidat [72,119,120].

Carotenoidele și derivații acestora, prin proprietățile fizice, chimice și biologice pe care le au, determinate preponderent de sistemul de duble legături conjugate din molecula lor, au numeroase întrebuințări în prevenirea și tratarea diferitelor afecțiuni. Acești compuși se utilizează în medicină ca agenți fotoprotectori, ca substanțe anticancerogene, ca pigmenți stabilizatori ai membranelor celulare, în prevenirea și tratarea bolilor de inimă, a proceselor de îmbătrânire etc. [63, 72,120-123].

Carotenoidele acționează în prevenirea unor boli cronice prin îmbunătățirea comunicării intracelulare, creșterea răspunsului imun și acțiunea ca și antioxidanți „*in vivo*” [120-123]. Prezența metabolizilor oxidativi ai luteinei și zeaxantinei în retină sugerează că aceste carotenoide acționează ca și antioxidanți în protecția maculei oculare împotriva degradărilor provocate de lumină sau oxigen [122].

2.5.3.1. Acțiunea fotoprotectivă și antioxidantă a carotenoidelor

Antioxidanții sunt definiți generic ca fiind acele substanțe care se opun oxidării sau care inhibă reacțiile inițiate de oxigen sau peroxizi [124], unele din aceste substanțe (cum sunt, de exemplu, tocoferolii) fiind utilizate ca și conservanți în diferite produse (grăsimi, uleiuri, produse alimentare, săpunuri - pentru împiedicarea râncezirii, în benzină și alte produse petroliere - pentru împiedicarea formării gumei și a altor transformări nedorite, în cauciuc - pentru împiedicarea îmbătrânirii). O definiție mai relevantă din punct de vedere biologic pentru antioxidanți este următoarea: „substanțe sintetice sau naturale ce se adaugă în produse pentru a preveni deteriorarea lor sub acțiunea oxigenului din aer” [125]. În biochimie și medicină, antioxidanții sunt enzime sau alte substanțe organice, cum ar fi vitamina E sau β -carotenul, care, prezente în concentrații reduse față de cea a unui substrat oxidabil sunt capabile să înlăture sau să prevină oxidarea aceluși substrat [126].

În industria chimică, antioxidanții adesea se referă la compușii care împiedică autooxidarea unor produse chimice cum sunt cauciucurile și masele plastice. Autooxidarea este cauzată în primul rând de reacții radicalice în lanț între oxigen și substraturi. Antioxidanții efectivi sunt inhibitori de radicali care întrerup reacțiile radicalice în lanț. În știința alimentelor, antioxidanții includ compușii care previn râncezirea grăsimilor din produsele alimentare precum și antioxidanții nutriționali, care reprezintă acele substanțe din alimente, ce diminuează în mod semnificativ efectele adverse ale speciilor reactive, cum sunt: speciile oxigenului reactiv și azotului reactiv, asupra funcțiilor fiziologice normale ale organismului uman [125].

Antioxidanții nutriționali au câștigat în ultimii ani, o atenție deosebită din partea cercetătorilor pentru efectele lor potențiale în prevenirea sau ameliorarea a peste 100 de boli cronice și degenerative, printre care se numără cancerul, bolile cardiovasculare, fenomenul îmbătrânirii [120, 126-128].

Prin structura lor puternic nesaturată, carotenoidele și retinoli joacă un rol important în protecția celulară ca și antioxidanți împotriva radicalilor liberi și a speciilor reactive ale oxigenului, așa cum este oxigenul singlet (1O_2) [129].

Acțiunea antioxidantă a compușilor carotenoidici se manifestă atât la nivel celular cât și la nivel molecular, fiind protejate proteinele, enzimele, bazele azotate etc.

Sistemele biologice sunt supuse acțiunii concomitente a luminii, oxigenului și a compușilor fotosensibili care pot fi exogeni (preluați din alimente) sau endogeni (clorofilele în plante și alge, unele porfirine, bilirubina, riboflavina etc.). Indiferent de sursa lor, substanțele fotosensibile (S) pot absorbi energia luminoasă și trece în stări energetice superioare (singlet 1S și triplet 3S) în care reacționează cu oxigenul molecular în stare fundamentală (triplet: 3O_2), formând oxigen singlet, specie chimică foarte reactivă [129-131]:



Oxigenul singlet poate reacționa cu guanina din ARN și ADN producând modificări structurale și funcționale la nivelul acizilor nucleici. El poate inactiva, de asemenea, proteine și enzime prin reacția cu metionina, histidina și triptofanul, sau lipide, prin adiția sa la dublele legături ale acizilor grași [132,133].

Până în prezent, carotenoidele sunt considerate cei mai eficienți inactivatori ai oxigenului singlet, care este răspunzător de numeroase oxidări letale în celulele vii [129-131].

Carotenoidele (Car) prezintă capacitatea de a dezactiva [130]:

a) fie oxigenul singlet 1O_2 prin reacții de tipul:



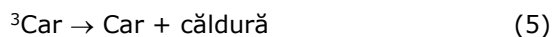
b) fie starea triplet a substanței fotosensibile 3S , prin transfer de energie triplet-triplet, conform ecuației:



Reacția (4) este accelerată de apropierea în spațiu a carotenoidelor și a moleculelor S, ca de exemplu în complexii proteici din fotosistemele membranelor tilacoide sau din retină. Prin această reacție se anulează tripletul substanței fotosensibile înainte de a transfera energia oxigenului molecular și de a forma oxigenul singlet.

Capacitatea carotenoidelor de a dezactiva oxigenul singlet este legată de numărul de duble legături conjugate din moleculă precum și de structura lor [72, 130, 131].

Prin interacțiuni rotatorii și vibraționale cu mediul, carotenoidele pot pierde excesul de energie a stării triplet (${}^3\text{Car}$) pentru a trece în starea fundamentală. În acest fel, ele pot acționa catalitic, disipând sub formă de căldură, fie energia stării triplet a substanței fotosensibile, fie energia stării singlet a oxigenului:



Această reacție constituie baza protecției oferită de carotenoide în procesele fotosensibile [129-131]. Pentru o protecție adecvată, fiecare component susceptibil atacului oxigenului singlet ar trebui să fie înconjurat de un „scut” de carotenoide [134].

Elementul esențial al fotoprotecției îl constituie faptul că tripletul carotenoidic (${}^3\text{Car}$) nu reacționează cu oxigenul molecular pentru a da oxigen singlet. Această

observație nu poate fi explicată decât termodinamic din moment ce nu există alte cauze de ordin structural sau steric [134].

Carotenoidele reacționează de asemenea cu radicalii lipidelor peroxidate [72]:



Radicalul peroxid lipidic (LOO·) reacționează cu carotenul formând un radical carotenperoxil (LOOCar·) care, în prezența unui alt radical lipoperoxil formează un carotenodiperoxid (LOO-Car-OOL) relativ stabil.

În felul acesta pigmentii carotenoidici participă la mecanismul complex de asigurare a homeostaziei potențialului redox celular. *Activitatea antioxidantă a carotenoidelor* pare a se schimba în funcție de presiunea oxigenului: de la *antioxidanți eficienți la presiuni scăzute, la pro-oxidanți, în cazul presiunilor mari.*

Modul exact în care funcționează carotenoidele în celulă nu este încă clarificat, dar se pare ca au o acțiune de protejare a materialului genetic al celulei ARN și ADN. Deoarece retinoli nu au această proprietate, *carotenoidele pot fi privite ca și antioxidanți cu proprietăți distincte de ale vitaminei A* [72].

Capacitatea carotenoidelor de a anula oxigenul singlet prin transfer de energie singlet-triplet, precum și cea de a reacționa cu radicalii liberi este dependentă și de substituenții din moleculă [130]. De exemplu, astaxantina este de zece ori mai eficientă în protejarea lipidelor de peroxidare decât zeaxantina, luteina, cantaxantina și β-carotenul și de o sută de ori decât α-tocoferolul. Activitatea antioxidantă a cantaxantinei se pare că durează mai mult decât a β-carotenului și a zeaxantinei, ceea ce sugerează că grupările oxo în pozițiile 4 și 4' măresc eficiența anulării radicalilor peroxil. Aceasta se datorează caracterului electronegativ al oxigenului ce reduce substanțial densitatea de electroni la centrul radicalic, micșorând reactivitatea radicalului carotenoidic centrat, față de oxigenul molecular [135].

De un interes medical deosebit sunt studiile legate de capacitatea carotenoidelor de a se comporta ca și agenți protectori ai lipoproteinelor LDL, deoarece oxidarea acestora este considerată a fi o cauză importantă a bolilor coronariene. De asemenea, efectul anticarcinogenic al β-carotenului poate fi cel puțin în parte, atribuit acțiunii sale antioxidante, în măsura în care radicalii oxigenului sunt implicați în procese ce duc la apariția cancerului [130].

Comparativ cu β-carotenul, α-carotenul și alte carotenoide bine studiate, licopenul este cel mai puternic antioxidant în captarea radicalilor liberi (prezintă mai multe duble legături conjugate decât β-carotenul) [136]. Licopenul nu se convertește în vitamina A, el este carotenoida majoritară din plasma sanguină umană (cantitate dublă față de β-caroten). Acesta există în ser și în țesuturi în formă trans-total precum și în formele izomere 9-, 13- și 15-cis [137].

Toți carotenoizii au efect antioxidant, dar eficiența lor crește în amestecuri de carotenoizi – aceștia prezentând probabil, efecte complementare unii față de alții [138].

Cercetări au evidențiat faptul că efectul fotoprotector și stabilizator al membranelor celulare exercitat de xantofile este mult mai pronunțat decât cel exercitat de carotenoidele hidrocarburice [121]. Pentru studii, Harvaux a încorporat carotenoide în membrane lipozomale artificiale. Orientarea carotenoidelor în interiorul bistratului și deci influența lor asupra proprietăților termodinamice și mecanice ale membranei, depinde de structura carotenoidelor individuale. β-Carotenul, de exemplu, rămâne în întregime în interiorul părții hidrocarbonate a membranei, fără vreo preferință de orientare binedefinită, și prezintă un grad ridicat de mobilitate. În cazul zeaxantinei (3,3'-dihidroxi-β-caroten), prezența grupelor

hidroxilice la inele a avut un efect puternic: zeaxantina este orientată în bistratul lipidic cu axă lungă a moleculei aproape perpendiculară pe suprafața membranei și cele două grupe terminale polare ancorate pe ambele fețe ale membranei. O consecință a acestei orientări „verticale” este scăderea fluidității lipidelor și o rigidizare a membranei .

Membranele lipozomale care conțin carotenoide sunt protejate împotriva peroxidării lipidelor. Acest efect poate fi explicat prin bine-cunoscuta acțiune a carotenoidelor de antioxidanți „preventivi”. În plus efectul de rigidizare al xantofilelor asupra membranelor lipozomale este combinat cu o scădere a penetrării oxigenului molecular (O_2) în interiorul bistratului lipidic, iar acest efect poate fi de mare importanță în protecția împotriva degradării fotodinamice a lipidelor [121].

2.5.3.2. Utilizarea carotenoidelor și retinoidelor în prevenirea și tratarea cancerului

Cercetările privind prevenirea și tratarea cancerului cu ajutorul carotenoidelor și retinoidelor s-au dezvoltat foarte mult în ultimii ani, apărând o literatură bogată în acest domeniu.

Speciile reactive ale oxigenului și azotului, cum sunt: anionul superoxid, apa oxigenată, radicalul hidroxil, oxidul de azot și metaboliții lor biologici, joacă un rol important în carcinogeneză. Speciile reactive ale oxigenului la fel și reacțiile radicalilor liberi cu ADN, induc afectarea ADN, inclusiv rupturi, modificări de bază, etc. Un exemplu de modificare de baze este formarea 8-oxoguaninei care induce transversia Guanină: Citidină la Timină: Adenină în starea de replicare a ADN, un proces important în dezvoltarea carcinogenezei și tumorii [139]

Cu ani în urmă s-a dovedit faptul că variate carotenoide, cum ar fi: licopenul, β -carotenul, α -carotenul, luteina, cantaxantina, pot diminua extinderea transformărilor maligne ale celulelor. S-a arătat că acțiunile moleculare apar prin reglarea funcțiilor genei „connexin 43” [130, 140].

În cercetări efectuate cu β -caroten, cantaxantină și fitoen s-a constatat o întârziere în apariția tumorilor induse prin iradiere UV. Aceste tumori care apar sub influența radiațiilor UV sunt numite fotocarcinogene. Cele trei carotenoide studiate pot inhiba formarea de radicali liberi implicați în inducerea tumorilor cu lumină UV precum și să anihileze oxigenul singlet [1].

Licopenul s-a dovedit a juca un rol esențial în prevenirea și tratamentul cancerului de prostată [137,141], dar s-a dovedit a fi eficient și împotriva cancerului de stomac, plămân, pancreas, colon, esofag, sân, ovare, cavitate bucală [142]. S-a constatat însă că licopenul din tomate, sau alte vegetale bogate în acest principiu activ, este mai eficient decât produsele farmaceutice de licopen pur, datorită faptului că licopenul din sursele vegetale are o acțiune potențată de prezența altor carotenoide și a altor compuși naturali anticancerigeni [142].

Numeroase studii de caz din ultimii ani au evidențiat o asociere clară între consumul de alimente bogate în carotenoide și o incidență relativ scăzută a diferitelor tipuri de cancer [119, 143-145].

Cercetările efectuate pe animale au stabilit că deficitul de vitamina A mărește sensibilitatea la agenți chimici. Administrarea retinolului cu diferiți cancerigeni, cum ar fi hidrocarburile policiclice aromatice, dimetilbenzenantracenu (DMBA), unele nitrozamine și aflatoxine, determină o scădere a frecvenței cancerului și o prelungire a duratei de inducție. Capacitatea retinoizilor de a inhiba transformările proliferative ale populațiilor celulare a fost evidențiată și în cazul cancerelor formate [119, 145].

Se apreciază că, în prima etapă, retinoizii împiedică procesul de activare chimică a cancerigenilor. În continuare, legarea cancerigenilor de ADN se face mult mai greu în prezența retinoizilor și, ca urmare, se împiedică procesul de malignizare. În această etapă, retinoizii se manifestă ca regulatori ai fenotipului celular. În concentrații mari, vitamina A exercită un puternic efect de labilizare a membranei lizozomilor eliberând din aceștia diferite enzime, în special hidrolaze. Enzimele lizozomale au un maxim de activitate în mediu acid. După cum se știe, celula canceroasă se caracterizează printr-un pH mai mic decât cea normală. Deci, vitamina A, labilizând lizozomii și eliberând hidrolaze acide, va determina o „sinucidere” a celulelor canceroase. Este însă importantă doza de care sunt labilizate la maximum membranele lizozomale ale celulelor canceroase, cu un efect minim pentru celulele normale [119].

2.5.4. Utilizarea pigmentilor carotenoidici în industria farmaceutică

Carotenoidele se utilizează în industria farmaceutică pentru colorarea unor preparate farmaceutice, pentru obținerea unor preparate tonice și dietetice regenerative, a unor suplimente alimentare, a unor unguente terapeutice etc.

Pe plan mondial, se manifestă în prezent o preocupare crescândă pentru utilizarea coloranților naturali, atât în industria farmaceutică cât și în cea alimentară și cosmetică, deoarece mulți dintre pigmentii sintetici nu îndeplinesc toate normele cerute de toxicologie, deși se pot obține în cantități mari, pe cale industrială la costuri accesibile.

Dintre pigmentii naturali, carotenoidele au o tot mai largă utilizare în industria farmaceutică, atât datorită puterii lor de colorare, diversității structurii moleculare, răspândirii lor universale în organismele vii, cât mai ales faptului că multe carotenoide îndeplinesc rolul de provitamina A [1, 80,146].

Comisia de experți FAO/WHO, pe baza unor îndelungate experimentări farmaco-toxicologice, a aprobat utilizarea carotenoidelor naturale pure și a unor carotenoide obținute prin sinteză (β -carotenul, β -apo-8'-carotenalul, esterul etilic al acidului β -apo-8'-carotenoidic, cantaxantina, citranaxantina), ca și coloranți în industria alimentară și în cea farmaceutică, acești compuși fiind cuprinși în lista 1A (deci în clasa de siguranță maximă) [146].

Carotenoidele sunt utilizate cu precădere pentru colorarea tabletelor (pilule, pastile etc.) îmbrăcate în zahăr.

În funcție de cantitatea de carotenoide utilizate se pot obține următoarele culori: β -carotenul de la galben la portocaliu intens, esterul etilic al acidului β -apo-8'-carotenoic, de la galben la portocaliu, β -apo-8'-carotenal, de la culoarea florii de piersic la roșu-brun; cantaxantina, diferite nuanțe de roșu. Carotenoidele se pot utiliza dizolvate în diferite uleiuri, sub formă de suspensii, emulsii, încorporate în gelatină, gumă arabică, șelac, sau încorporate în supozitoare pe bază de grăsimi [1].

Dipalmitatul de luteină (heleniena) este un principiu activ utilizat în tratamentul hemeralopiei, al retinitei pigmentare și, în general, pentru înlesnirea adaptării la vederea nocturnă a ochiului normal și miop. Se recomandă conducătorilor auto, mecanicilor de locomotivă, radiologilor etc. Heleniena este complet lipsită de toxicitate și nu provoacă acțiuni secundare; ea se obține prin extracție, de obicei din petalele florilor de crăițe (*Tagetes flos*) [147].

Extractele de cătină sunt utilizate pentru prevenirea și tratarea diferitelor afecțiuni: arsuri, conjunctivite, tensiune arterială, hepatită, acnee, arterită, psoriazis, ulcere gastrointestinale, instilații oculare, vindecarea rănilor și plăgilor postoperatorii, cancer, ciroză etc [148,149].

Pentru colorarea soluțiilor apoase se folosesc pulberi hidrodispersabile, rezultate prin înrobarea colorantului fin dispersat într-un suport de gelatină, zahăr sau amidon, în proporție de 100 mg/g [147].

Dintre metaboliții carotenoidelor, retinolul este cel mai frecvent utilizat atât în scopuri farmaceutice cât și în cele cosmetice.

Se poate afirma în mod cert că utilizarea carotenoidelor în industria farmaceutică prezintă largi perspective de dezvoltare.

2.5.5. Utilizarea carotenoidelor în industria cosmetică

În prezent, se utilizează tot mai mult pigmenții carotenoidici și produsele naturale bogate în carotenoide, la obținerea unor preparate cosmetice, atât datorită culorii lor variate, depozitării acestora în grăsimi și în țesutul subcutanat, dar mai cu seamă datorită rolului lor antioxidant, fotoprotector și de provitamine A. Astfel acești compuși contribuie la buna funcționare a pielii, la cicatrizarea rănilor, la refacerea țesuturilor lezate, la fotoprotecția pielii [150-155]. Carotenoidele naturale și sintetice se utilizează în cosmetică pentru obținerea unor suspensii, emulsii, loțiuni, concentrate de carotenoide date sub formă de pilule pentru bronzare, suporturi pentru pudre, creme nutritive, rujuri de buze, sprayuri etc [156-158].

2.5.6. Utilizarea carotenoidelor ca surse de provitamine A

Una dintre cele mai importante funcții ale carotenoidelor în organismele umane și animale este aceea de provitamine A. Pigmenții carotenoidici reprezintă principala sursă din care organismele umane și cele animale își pot sintetiza vitamina A, vitamină ce are un rol deosebit de important în formarea pigmentilor fotosensibili implicați în procesul vederii, în creșterea organismelor, refacerea țesuturilor epiteliale, reducerea sterilității etc. După cum s-a menționat anterior, organismele umane și animale nu sunt capabile să-și sintetizeze vitamina A din compuși anorganici. Ele pot însă absorbi și depozita vitamina A din hrană (lapte, ouă, ficat, ulei de pește etc.) s-au să și-o formeze din așa-numitele carotenoide provitaminice [5, 130,159].

Un pigment carotenoidic poate fi transformat în vitamina A dacă conține cel puțin un inel β -iononic nesubstituit, are un sistem polienic normal, prezintă configurație trans, iar catena laterală conține cel puțin 9 atomi de carbon [5].

Carotenoida provitaminică principală este β -carotenul; dintr-o moleculă de β -carotină se pot obține maximum două molecule de vitamina A. Din celelalte carotenoide provitaminice se poate obține o singură moleculă de vitamina A dintr-o moleculă de pigment. Principalele carotenoide provitaminice sunt: β -carotenul, α -carotenul, γ -carotenul, criptoxantina, echinenona, β -apo-8'-carotenalul, esterul etilic al acidului β -apo-8'-carotenoidic, β -apo-12'-carotenalul și β -zeacarotenul [5].

Numărul de carotenoide provitaminice este cu mult mai mare decât cele prezentate mai sus fiind cuprins între 50 și 60 de carotenoide și de apocarotenali. Compușii dehidrogenați la nivelul inelului iononic, în pozițiile 3 și 4 sau 3',4' au o activitate vitaminică mai mică, dar nu sunt inactivi; la fel și mono- sau di-epoxizii sau furanoizii cu oxigenul la carbonii 5-6, respectiv 7-8, au o slabă activitate vitaminică, dar nu sunt lipsiți de aceasta. Izomerii cis-trans sunt mai puțin activi decât izomerii trans-total ai carotenoidelor. Adiția de grupări metilice la carbonii 2,2'

sau înlocuirea grupelor metilice cu radicali etil la C₇, reduce dar nu distruge activitatea vitaminică [1,117].

În pești, anhidroluteina a fost convertită în vitamina A₂, dar acest lucru se petrece și în organismul uman [160]. De asemeni, s-a constatat o creștere a conținutului de vitamina A₁ și A₂ la peștii în hrana cărora s-a adăugat astaxantină, zeaxantină, luteină, cantaxantină sau β-caroten [117].

În tabelul 2.18 sunt prezentate valorile medii ale activității vitaminice a carotenoidelor, obținute de diferiți autori în testul de creștere curativă a șobolanilor [1]. O unitate internațională de vitamină A (U.I.) corespunde activității biologice a unei cantități de 0,344 μg de acetat trans-total de vitamină A. Evaluarea potențialităților cât mai exacte de vitamină A a carotenoidelor întâmpină greutăți din cauză că, în natură pigmentii carotenoidici nu sunt izolați unii de alții, ci se află împreună mai multe tipuri de carotenoide, cu potențialități diferite. Din această cauză, valoarea vitaminică a carotenoidelor este apreciată uneori diferit de la autor la autor. Pentru soluționarea aspectului științific al acestei probleme se fac testări în laborator cu carotenoide pure pe diferite animale. Pentru rezolvarea aspectului practic se stabilește potențialitatea amestecurilor de carotenoide aflate în diferite surse naturale [1,161].

Tabelul 2.18.
Activitatea vitaminică A a unor carotenoide (în UI/g)

| Carotenoide | Activitatea vitaminică A (în UI/g) |
|--------------------------|---|
| β-Carotină | 1.667.000 |
| α-Carotină | 880.000 |
| γ-Carotină | 750.000 |
| Echinenonă | 890.000 |
| Criptoxantina | 950.000 |
| β-apo-8'-carotenal | 1.100.000 |
| Acid β-apo-8'-carotenoic | 420.000 |
| β-apo-12'-carotenal | 2.000.000 |
| β-Zeacarotenul | 420.000 |

β-Carotenul este cea mai importantă carotenoidă provitaminică, atât prin faptul că dintr-o moleculă de pigment se pot obține maximum două molecule de vitamină A, cât și prin lărga sa răspândire în natură. Pentru a ușura aprecierea în practica de producție a potențialității vitaminice a carotenoidelor. Grupul de experți FAO/WHO (1967) a decis să utilizeze relația care consideră că 1μg de β-carotină este echivalent cu 0,167μg retinol sau cu 0,56 UI de vitamină A [162]. În marea majoritate a tabelelor alimentare în care se indică activitatea vitaminică A a alimentelor brute, prelucrate sau pregătite, se folosesc factori diferiți de conversiune. Potențialitatea vitaminică A a carotenoidelor la diferite organisme animale variază între anumite limite. Astfel, potențialitatea β-apo-8'-carotenalului la șoarece este de 1.100.000 U.I./g, iar la puiul de găină, abia 658.000 U.I./g. În tabelul 2.19 este prezentată potențialitatea vitaminică A a unor carotenoide provitaminice tipice, exprimată în procente [1].

Tabelul 2.19.

Activitatea provitaminică A a unor carotenoide provitaminice
tipice (în %) – valori teoretice

| Carotenoide | Activitate vitaminică A (%) |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| β -Carotină | 100 |
| α -Carotină | 50-54 |
| γ -Carotină | 42-50 |
| β -Zeaxantină | 20-40 |
| 3,4-dehidro- β -carotină | 75 |
| β -caroten-5',6'-monoepoxid | 21 |
| β -caroten-5',8'-monoepoxid | 20 |
| β -semicarotenonă | Activă |
| β -apo-8'-carotenal | 72 |
| Acid β -apo-8'-carotenoidic | Activ |
| Anhidroluteină | 21 |

În condiții practice, există mai mulți factori interni și externi care pot să influențeze transformarea carotenoidelor în vitamina A de către organismele animale, astfel încât potențialitatea vitaminică reală a carotenoidelor este mai mică decât cea teoretică.

Necesarul zilnic de vitamină A la adult este de 5000 U.I., iar la copii cu vârsta între 1-6 ani: 2500 U.I. Acest necesar crește în sarcină, lactație, pneumonie, nefrită, etc. La femeile gravide necesarul zilnic de vitamină A crește la 3000 U.I., iar la femeile care alăptează, acest necesar este de 3600 U.I. [163].

Carența în vitamina A (și a carotenoidelor) în hrană, determină leziuni oculare, micșorarea acuității vizuale, umflarea pleoapelor cu apariția de cruste și depilare, întărirea și opacitatea corneei, xeroftalmie, putând duce la orbire. Se mai observă, în plus, o oprire a creșterii și o scădere a solidității oaselor. Lipsa vitaminei A provoacă deopotrivă slăbirea prin denutriție, o stare de oboseală, o scădere a rezistenței la infecții, modificări la nivelul pielii și mucoaselor care ajung uscate, la nivelul unghiilor care se rup ușor, la nivelul părului care se închide la culoare. Se constată de asemenea tulburarea menstruațiilor la femei, cu întărirea dureroasă a sânilor, migrene, nervozitate, neliniște. Hipovitaminoza A expune, în sfârșit, la formarea calculilor [119,159,164].

Frecvent, hipovitaminoza A este însoțită de criza acută de proteine și insuficiența de calciu. Pentru o bună asimilare a vitaminei A este necesar un consum de 5g lipide pe zi. Cercetările recente au evidențiat faptul că în metabolizarea vitaminei A, un rol important îl au o serie de proteine specifice numite prealbumine, bogate în triptofan, care participă la transportul acestei vitamine sub formă de complecși retinol-proteină. Combinarea retinolului cu proteinele are o importanță fiziologică deosebită, deoarece asigură solubilizarea moleculei hidrofobe a retinolului și protejează vitamina A de degradările chimice. În condițiile lipsei de proteine în alimentație, se intensifică simptomele insuficienței vitaminei A, în timp ce o alimentație bogată în proteine poate atenua aceste efecte [119].

2.5.6.1. Absorbția și transformarea carotenoidelor în vitamina A

Fiind pigmenți liposolubili, carotenoidele se găsesc în produsele vegetale (fructe, legume, ierburi etc), în mare parte asociate cu fracțiunea lipidică din aceste produse. O bună parte din carotenoide formează cu proteinele esteri sau complexe carotenoproteice. Aceste complexe carotenoproteice pot fi distruse prin fierbere sau prin acțiunea enzimelor proteolitice. Unele carotenoide sunt „elemente” constitutive ale unor structuri mai complexe (cloroplaste, cromatofori etc.), altele, cum este lycopina din tomate se găsesc în stare cristalină [1].

În timpul digestiei, asupra carotenoidelor din hrană acționează diferite esteraze, lipaze, proteaze. În urma hidrolizei, carotenoidele obținute în stare liberă sunt solubilizate de către sărurile biliare și sunt absorbite prin membrana intestinală. În celulele mucoase ale membranei intestinale β -carotenul este activat de către o carotenoid-dehidrogenază, după care urmează o scindare oxidativă a catenei interne, rezultând două molecule de retinol. Enzima care determină scindarea oxidativă a β -carotenei este 15,15'-oxigenază, care catalizează o reacție de oxigenare în care oxigenul molecular reacționează la nivelul dublei legături centrale de la carbonii C₁₅-C_{15'}, cu formarea unui peroxid intermediar, 15-15' peroxid β -carotenul, care se scindează rapid formând două molecule de retinol. Activitatea oxigenazei de a scinda carotenoidele este dependentă, printre altele, de nivelul proteinelor din dietă. O reducere a proteinelor ingerate reduce drastic transformarea carotenoidelor în retinal, la nivelul intestinului. O mică parte din retinal este oxidat în pereții intestinali la acid retinoic, care trece în sânge, iar cea mai mare parte din retinal este redus la retinol [165,166]. Similar β -carotenei se comportă și celelalte carotenoide provitaminice, cu formarea unei singure molecule de retinol. Retinalul este redus la retinol, esterificat și transportat la ficat unde se depozitează. Dacă scindarea oxidativă a catenei interne nu se produce la mijlocul moleculei, are loc așa numita "scindare asimetrică" formându-se β -apo-carotenali care au, de asemenea, activitate vitaminică A [129,166].

Schema acestor transformări este redată în figura 2.5. [129].

Absorbția și transformarea carotenoidelor în retinal este îmbunătățită (stimulată) de acțiunea sărurilor biliare, lipidelor, proteinelor, lycopinei și zincului [166].

Unele carotenoide sunt absorbite în mod direct (fără transformări) și sunt trecute în sânge, iar conținutul carotenoidelor din sânge reflectă conținutul carotenoidelor din hrană. Ele pot fi depozitate în ficat sau în alte țesuturi și organe, în țesuturile adipoase, glandele suprarenale, cortex, în plachetele ateromatoase, în carne, în lapte, în ouă [159,166].

Retinolul existent în hrană este reesterificat înainte de absorbție, iar în timpul procesului de absorbție este hidrolizat în intestin, atât de către hidrolazele din pancreas cât și de cele existente în celulele mucoasei intestinale. Retinolul liber este reesterificat în interiorul celulelor mucoasei intestinale cu acizi grași cu catenă mare (acid palmitic, acid stearic, acid oleic). Esterul de retinol trece apoi în limfă, iar la câteva ore după masă esterul absorbit poate fi găsit în sânge, sub formă de lipoproteine. Retinolul esterificat existent în exces se depozitează în sânge. Prezența unor inhibitori metabolici sau lipsa oxigenului determină acumularea retinolului în intestin și îngreunează transportul acestuia în sânge. Retinolul ester depozitat în ficat va fi utilizat în funcție de necesități, fiind din nou hidrolizat, oxidat, etc. Datorită rezervei de retinol din ficat cantitatea de vitamină A din sânge rămâne constantă. După consumarea retinolului de rezervă din ficat, scade conținutul vitaminei A din sânge și, după o perioadă mai îndelungată, apar simptomele xeroftalmiei. Retinolul este transportat în sânge sub formă de complex retinol-proteic, care are o masă moleculară de 21.000 și conține o singură moleculă de retinol. Se pare că proteina din complex este o albumină plasmatică. Sub formă de complexe retinol-proteină vitamina A este transportată la țesuturi. Retinolul poate fi oxidat reversibil în retinol, iar acesta, prin oxidare ireversibilă formează acidul retinoic care dispare repede din sânge, deoarece contribuie la formarea unor β -glucuronide, care sunt excretate de bilă. O parte din acidul retinoic eliminat prin bilă poate fi resorbit, dar o mai mare parte este eliminat prin fecale. Unii metaboliți retinoidici se elimină și prin urină [167].

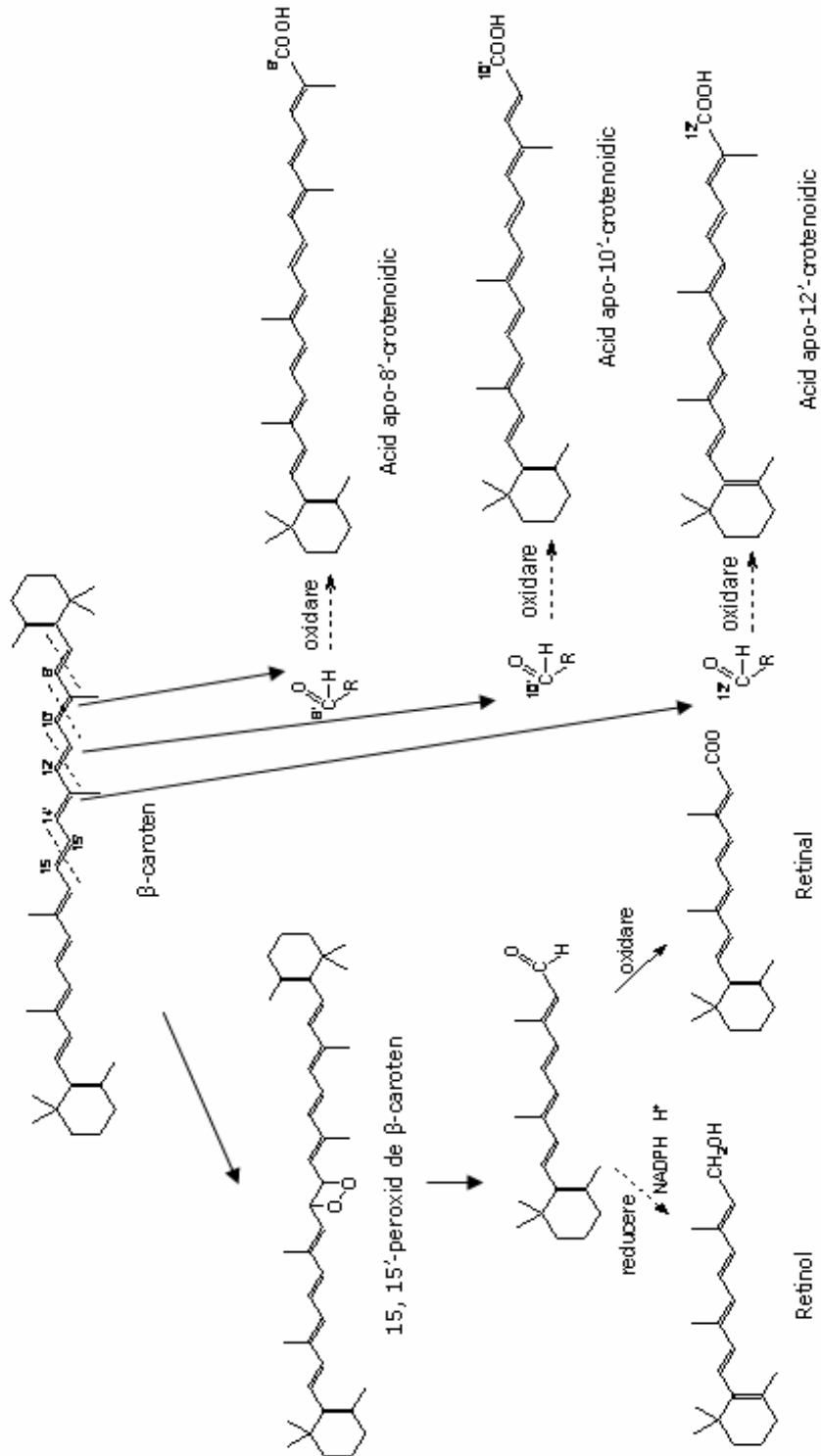


Figura 2.5.- Conversia β -carotenului în vitamina A și în carotenali

2.5.6.2. Formarea pigmentilor vizuali fotosensibili

Văzul, la om și animale este condiționat de existența unor pigmenți fotosensibili, localizați în retină, care sunt capabili să transforme energia luminoasă absorbită în impuls nervos. La baza acestui proces stau transformările biochimice care se petrec la nivelul pigmentilor fotosensibili localizați în celulele cu conuri și cele cu bastonașe, din retină.

În principiu, pigmentii vizuali sunt formați din retinen (retinal) și dintr-o proteină. Deosebirea dintre pigmentii vizuali ai diferitelor organisme se datorează în cea mai mare parte părții proteice și mai puțin cromoforului (retinalului) [167].

Din carotenoidele provitaminice se formează, la nivelul mucoasei intestinale (sub acțiunea β -carotin-15,15'-oxigenazei) trans-trans-retinalul, care ulterior, sub acțiunea 11-cis retinol-izomerazei, se transformă în 11-cis-retinol, care se combină la întuneric cu opsina (o proteină) formând rodopsina și respectiv iodopsina, pigmentii vizuali al omului și al majorității animalelor. Rodopsina este localizată în membranele exterioare ale celulelor cu bastonașe, iar iodopsina se găsește în celulele cu conuri [167]. Aceste substanțe, considerate de fiziologi ca „pigmenți fotosensibili retinieni”-din punct de vedere chimic sunt cromoproteide. Opsina, componenta proteică macromoleculară, are o structură care diferă de la un tip de celule la altul (bastonașe și conuri) și de la o specie la alta (specio-specificitatea fiind o caracteristică a proteidelor). Pe lângă rodopsină și iodopsină s-au mai decelat doi pigmenți fotosensibili la vertebratele inferioare: porfiropsina – în celulele cu bastonașe și cianopsina – în celulele cu conuri [105].

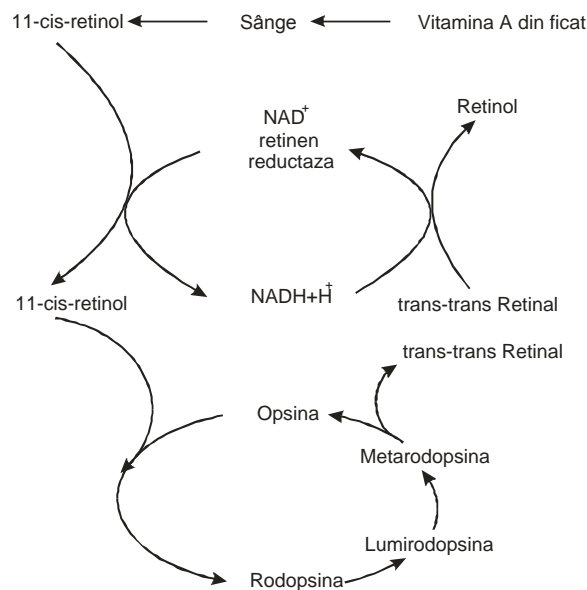


Figura 2.6. - Schema ciclului vizual

În ceea ce privește mecanismul funcționării pigmentilor vizuali („ciclul vizual”) s-a stabilit că rodopsina, care conține 11-cis-retinol, sub acțiunea energiei luminoase (a fotonilor) se transformă în lumirodopsină, de culoare roșu-portocalie, iar aceasta în metarodopsină (galbenă) care se transformă în opsină (incoloră) și trans-trans-retinol. Retinenul din rodopsină conține două duble legături în pozițiile cis, în timp ce retinenul desprins de pe rodopsină, în perioada absorbției luminii, a descompunerii rodopsinei și a

formării impulsului nervos are o configurație trans. Transformarea 11-cis-retinalului în trans-trans-retinal, este un proces ireversibil [105, 167] (figura 2.6.).

Când trans-trans-retinolul se desprinde de opsină se induce transmiterea unui impuls nervos către nervul optic. Trans-trans-retinalul este redus apoi de către o retinen-reductază ce necesită $\text{NADH}+\text{H}^+$, în trans-trans-retinol, care părăsește sfera retinei. Pentru refacerea rodopsinei este necesară oxidarea 11-cis-retinolului din sângele, care irigă retina, în 11-cis retinal. Acest compus va reacționa apoi la întuneric cu opsina și va reface rodopsina. Diferențele de potențial care apar în timpul izomerizării cromoforului determină ca impresiile vizuale percepute de pigmentii vizuali să fie înregistrate și decodificate pe creier. Celulele cu conuri, care conțin iodopsină sunt localizate în centrul retinei și percep lumina intensă a zilei, iar celulele cu bastonașe, care conțin rodopsină sunt localizate la marginea retinei și percep lumina difuză, crepusculară [167].

Vitamina A este absolut necesară omului și animalelor pentru a înlocui pierderile de retinal care se „consumă” în procesul vederii.

Omul și animalele pot să oxideze reversibil retinolul la retinal. Retinalul desprins de pe proteina purtătoare se oxidează ireversibil în acid retinoic, care nu este implicat în procesul vederii, fiind eliminat în cea mai mare parte sub formă de β -glucuronid [105].

Din datele prezentate, reiese clar rolul important pe care îl are vitamina A și indirect carotenoidele provitaminice în procesul vederii.

2.5.7. Utilizarea carotenoidelor în industria alimentară

2.5.7.1. Introducere

În industria alimentară, pigmentii carotenoidici au o utilizare largă și variată ca și coloranți ai unor produse alimentare cum sunt: margarina, untul, brânzeturile, înghețata, macaroanele, cartofii prăjiți, uleiurile vegetale, dressing-urile pentru salate, înălbitorii de cafea, ouăle praf, produsele de patiserie, bomboanele, cremele, deserturile pe bază de gelatină, sucurile de fructe, produsele din carne etc [146].

Puține proprietăți ale alimentelor sunt mai importante pentru consumator decât culoarea. Această preocupare mărită a omului pentru cromatică, nuanță, tentă și culoare a alimentelor este destul de explicabilă dacă ținem seama că „văzul” este simțul nostru cel mai important. Culoarea unui aliment este un factor semnificativ în determinarea acceptabilității sale [168]. Culoarea alimentelor influențează într-o proporție însemnată consumatorul să cumpere sau nu alimentele respective, deoarece reflectă parțial calitatea acestora .

2.5.7.2. Coloranți alimentari carotenoidici

În prezent în multe țări se utilizează ca și pigmenti alimentari carotenoidici sintetice, reducând-se an de an numărul coloranților sintetici alimentari din alte clase de compuși. Dintre carotenoidii sintetici se utilizează ca și coloranți alimentari, în special: β -carotenul, β -apo-8'-carotenalul, esterul etilic al acidului β -apo-8'-carotenoidic, cantaxantina și citranaxantina. β -Carotenul se obține pe cale sintetică din 1954, de către firma Hoffmann - La Roche and Co-Ltd., din Basel, Elveția.

Carotenoidii pure, în stare cristalină, sunt foarte sensibile la acțiunea luminii și a oxigenului, fapt pentru care trebuie păstrate la vid sau în gaze inerte.

Din această cauză, carotenoidele în stare cristalină au o utilizare mai limitată decât soluțiile. Formele sub care se aplică pigmenții carotenoidici trebuie să corespundă atât pentru alimentele liposolubile, cât și pentru cele hidrosolubile.

Alimentele care conțin grăsimi se pot colora folosind fie o suspensie lichidă formată din 20-30% carotenoide în ulei vegetal, fie o suspensie semisolidă cu 20-25% carotenoide în ulei hidrogenat [146].

Pentru colorarea alimentelor hidrosolubile se utilizează carotenoide dispersabile în apă. Utilizând carotenoide cristaline se pot obține preparate carotenoidice dispersabile în apă prin formarea unor suspensii coloidale, emulsionarea unor soluții uleioase, dispersia în coloizi corespunzători, adăugarea de agenți activi de suprafață etc. Suspensiile coloidale se obțin prin dizolvarea carotenoidelor în solvenți miscibili cu apă, alcool, acetonă), se toarnă apoi soluția de carotenoide în apă și apoi se îndepărtează solventul organic prin evaporare. Concentrația carotenoidelor în aceste suspensii este mică.

Alimentele care conțin apă se pot colora și cu ajutorul unor soluții uleioase de carotenoide emulsionate în apă. Emulsiile obținute pot fi folosite fie sub formă de lichid, fie transformate în granule uscate. Concentrația carotenoidelor poate fi mărită fie prin ridicarea temperaturii (încălzirea uleiului), fie prin folosirea unor solvenți buni cum sunt: uleiul de portocale, esterii acizilor diterpenici, acetilgliceridele, oleoalcooli aromați sau derivații lor, vitaminele A și E etc. [1].

Carotenoidele hidrosolubile se utilizează la prepararea sucurilor și băuturilor, a supelor praf, a sosurilor, a produselor lactate (brânzeturi, iaurt, înghețată), surrogate lactate, deserturi, siropuri și dulcetuuri, produse de cofetărie, patiserie și franzelărie, maioneze, produse de carne, macaroane, paste făinoase, ouă și produse cu ouă etc.

Au apărut o serie de preparate în formă dispersă uleioasă sau hidrosolubilă numite preparate „Roche”. În acest scop sunt utilizate: β -carotenu, β -apo-carotenu și cantaxantina [1]:

- ❖ *β -Carotenu 1% solubil în apă rece* (β -carotină 1% SAR) reprezintă o pudră fină de culoare oranj. Particulele acestei pudre conțin o dispersie uleioasă de β -carotină într-un coloid de clei de salcâm, zaharoză, maltodextrină și grăsimi comestibile. De asemenea conține antioxidanți: α -tocoferol și ascorbat de sodiu. β -Carotenu 1% SAR se dispersează în apă formând o soluție de culoare galbenă și se utilizează pentru colorarea diferitelor produse alimentare.
- ❖ *β -Carotenu sub formă uscată 10% hidrosolubilă*. Este o pudră fină de culoare brun-roșie. β -Carotenu este fin dispersat într-un coloid format din amidon și gelatină. Mai conține și zaharoză, α -tocoferol și ascorbil-palmitat. Produce o colorație galbenă până la oranj. Se utilizează pentru colorarea produselor alimentare și a băuturilor răcoritoare.
- ❖ *β -Carotenu 20% dispersie uleioasă* se prezintă sub formă de ulei vâcos. Conține β -carotină cristalizată și dispersată în ulei de alune. Preparatul este utilizat la colorarea margarinei, grăsimilor solide, uleiurilor și diferitelor altor produse alimentare.
- ❖ *β -Carotenu 30% dispersie uleioasă* este o suspensie uleioasă ce conține cristale de β -carotină dispersate în ulei vegetal; se folosește pentru colorarea diferitelor produse alimentare.
- ❖ *β -Apo-8'-carotenu sub formă uscată 10% hidrosolubilă* se prezintă sub formă de pudră fină gri-brună; β -apo-8'-carotenu este fin dispersat într-o matrită din amidon, gelatină și zaharoză; este stabilizat cu α -tocoferol și ascorbil-palmitat. Colorația produsă de acest pigment este de la oranj-roșu la roșu. Este utilizat

mai ales pentru colorarea băuturilor răcoritoare, dar și pentru alte produse alimentare.

- ❖ *Cantaxantina sub formă uscată 10% hidrosolubilă* se prepară analog β -apo-8'-carotenalului, produce aceeași colorație și se utilizează în același scop.

2.5.7.3. Avantajele și dezavantajele utilizării carotenoidelor ca și coloranți

Utilizarea carotenoidelor ca și coloranți alimentari prezintă următoarele *avantaje* [72,119]:

- prezintă un potențial tinctorial ridicat;
- deși sunt pigmenți liposolubili, există și forme coloidale sau de emulsii hidrosolubile;
- au o largă răspândire în natură;
- unele carotenoide au activitate vitaminică A, de unde derivă funcția lor dublă de coloranți și provitamine A (agenți de fortifiere a produselor alimentare);
- datorită proprietăților lor bioantioxidante, carotenoidele constituie adevărați factori de protecție alimentari intervenind favorabil în tratamentul și profilaxia multor afecțiuni;
- sunt stabili în alimente cu pH acid sau neutru;
- se pot folosi în amestec unii cu alții sau cu coloranți necarotenoidici, pentru a lărgi nuanțele coloristice ale alimentelor;
- nu sunt toxice

Dintre *dezavantajele* utilizării carotenoidelor în industria alimentară se pot menționa:

- acoperirea doar parțială a spectrului coloristic de la galben la roșu;
- au o solubilitate limitată atât în grăsimi, cât mai ales în apă;
- sunt mai scumpe decât ceilalți coloranți alimentari;
- culoarea produsului alimentar este influențată nu numai de tipul pigmentului carotenoidic, ci și de forma sub care se aplică.

3. CONTRIBUȚII PROPRII

3.1. INTRODUCERE

De foarte multă vreme, cercetătorii din întreaga lume se interesează, experimentează și își publică rezultatele cu privire la diferitele principii active naturale. În prezent, putem afirma că asistăm la o adevărată „întoarcere la natură”, principiile active naturale fiind în centrul atenției, după o perioadă de „umbră” determinată de „era chimică”- în prezent în ușor declin. Se constată tot mai mult cât de generoasă este natura, iar noi, oamenii, nu trebuie decât să căutăm să-i descoperim tainele, prețuindu-i cât mai mult darurile de neegalat.

Universalitatea răspândirii în natură a pigmentilor carotenoidici ca și proprietățile lor biologice deosebite stau la baza interesului sporit acordat în prezent acestor compuși, de către oamenii de știință din diferite domenii (chimie, biochimie, genetică, biologie, medicină, zootehnie, farmacie, cosmetică, industria alimentară). Astfel, se descoperă noi compuși din această clasă, sunt aduse la lumină noi și noi aspecte, privind izolarea și purificarea carotenoidelor naturale, privind acțiunea antioxidantă, anticancerigenă, fotoprotectoare, imunostimulatoare etc. a acestora [5, 54, 79, 101, 123, 144, 169-184] apărând pe piață o serie de produse noi care conțin pigmenți carotenoidici naturali.

Cercetări anterioare privind izolarea și purificarea unor principii active din plante [185-196] ne-au îndreptat atenția spre prezentul studiu privind extracția și determinarea cantitativă a pigmentilor carotenoidici naturali din diferite materii prime și posibilitățile de utilizare a acestor extracte în diferite domenii (medicină, cosmetică, farmacie, zootehnie).

Principalele aspecte studiate în cadrul prezentei teze sunt următoarele [197-206]:

- Izolarea pigmentilor carotenoidici din diferite materiale vegetale: 6 hibrizi de porumb (*Zea mays*), două soiuri de fructe de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*), flori de gălbenele (*Calendula officinalis*), portocale (*Citrus sinensis*) - flavedo, albedo și pulpă, piersici (*Persica vulgaris*) - pulpă și pericarp, rostopască (*Chelidonium majus*)- rădăcină, tulpină, flori și frunze.
- Analiza RP-HPLC a extractelor carotenoidice și determinarea conținutului de β -caroten și carotenoide totale. Compararea rezultatelor privind conținutul de carotenoide totale al probelor cu cele obținute prin metoda spectrofotometrică.
- Determinarea capacității antioxidante a extractelor carotenoidice obținute, utilizând metoda cu radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).
- Analiza conținutului de elemente minerale din materiile prime și extracte prin spectrofotometrie de absorbție atomică și prelucrarea statistică a datelor prin analiza componentelor principale-PCA, în vederea clasificării probelor.
- Studiul comportamentului microbiologic al unor extracte carotenoidice obținute din boabe de porumb (*Zea mays*), fructe de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*) și rostopască (*Chelidonium majus*), în vederea determinării acțiunii lor antimicrobiene față de câteva specii de microorganisme (*Staphy-*

lococcus aureus, Bacillus cereus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Candida albicans).

- Aplicații practice ale extractelor carotenoidice din porumb (*Zea mays*), respectiv din fructe de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*) prin obținerea unor unguente, testarea lor clinică „in vivo” în diferite afecțiuni dermatologice, studiul comportamentului reologic al unguentelor abținute.
- Studiul efectelor utilizării unor surse naturale bogate în pigmenți carotenoidici (făină din fructe de cătină albă), ca suplimente în furajele păsărilor ouătoare, în vederea îmbunătățirii valorii nutritive și a pigmentației galbenului de ou.
- Aplicarea industrială a unui extract carotenoidic din fructe de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*) la colorarea unor sortimente de iaurt.

3.2. PARTE EXPERIMENTALĂ

3.2.1. Obținerea și analiza unor extracte carotenoidice din diferite materiale vegetale din familiile *Gramineae, Compositae, Elaeagnaceae, Papaveraceae, Rosaceae și Rutaceae*

3.2.1.1. Descrierea plantelor folosite

• *Porumbul (Zea mays)*

Porumbul (*Zea mays*), familia *Gramineae*, plantă erbacee, anuală, cereală, cultivată în scopuri alimentare, industriale și furajere, din zona de stepă până la altitudinea de 530 este, după grâu și orez, cea mai importantă cereala din lume. Prezintă rădăcină pivotantă, tulpină cilindrică înaltă, frunze liniar - lanceolate, flori masculine (grupate în panicul spiciform) și femele (așa-numiții știuleți), fructe caliope golașe cu mărime și culoare variabile (albă, galbenă, portocalie, roșie, albastru-închis) [207].

Există mai multe convarietăți de porumb din care s-au obținut numeroși hibrizi cu diferite caracteristici, urmărindu-se în principal creșterea valorii nutritive a porumbului, pentru o valorificare superioară în hrana omului și animalelor. Boabele de porumb conțin: proteine (7-14%), zaharuri (66-76%) din care circa 80% reprezintă amidonul (alături de glucoză, fructoză, zaharoză), apă (9,5-12,3%), acizi grași (palmitic, stearic, oleic, linoleic, linolenic), fibre alimentare (0,8-2,9%), cenușă (1,2-2,9%), carotenoide (luteină, zeaxantină, criptoxantină, β-caroten, fitoen și altele), vitamina E, vaminele B₁, B₂, B₃, minerale [207, 208].

• *Cătina albă (Hippophae rhamnoides)*

Cătina albă (*Hippophae rhamnoides*), familia *Elaeagnaceae*, este un arbust rezistent la secetă și geruri, care crește în pâlcuri de-a lungul zonelor litorale, dar și în cele montane însorite, în special pe formațiuni salinifere. Cătina crește până la aproximativ 5 m înălțime, are ramuri cu spini, frunze lanceolate, muguri amărui, fructe portocalii cărnose, cu sâmbure tare. După 4-5 ani de dezvoltare, arbustul face fructe care pot rămâne pe ramuri și peste iarnă.

Fructele de cătină albă conțin: substanță uscată (15-20%), zaharoză (0,06-0,49%), acizi organici (1,5- 4,1%), pectină (0,14-0,5%), substanțe tanante (1,8%), celuloză (0,9%), proteine (1,2%), ulei (8-12%), carotenoide (30-40 μg/g fruct proaspăt), vitamina C (129,2-272,7 mg%), vitamina B₁, B₂, B₉, vitamina E (16 mg%), vitamina F (8 mg%), vitamina K, calciu (211,8 mg%), fosfor (194,4 mg %), magneziu (186 mg%), potasiu (165 mg%), sodiu (2,8 mg%), fier (14 mg%) [209].

• **Gălbenelele (*Calendula officinalis*)**

Gălbenelele (*Calendula officinalis*), familia Compositae, plantă ierboasă anuală, crește în sălbăticie, de la câmpie până în zona montană, dar adesea este cultivată în grădini, parcuri, în culturi sistematice, pentru utilizări industriale și medicinale. Florile (*Calendulae flox*) sunt formate din antodii uscate de culoare galben – portocalie înconjurate de bractee verzi, fără peduncul. Mirosul slab aromat, gust amarului sărat. În compoziția chimică a florilor de gălbenele se disting saponozide triterpenice având la bază derivați ai acidului glucuronil oleanolic, carotenoide (în special licopen, α și β -caroten, luteină), precum și unele poliine; flavonoizi și glicozizi flavonici: izoramnetin-3-ramnoglicozizi, rutinozizi și derivați ai cvercitolului; ulei volatil (cca. 0,02%), substanțe amare cu structură nedefinită, gumirezine, mucilagii, esterii colesterinici ai acizilor lauric, miristic, palmitic și margaric; vitamina C, acid malic substanțe proteice etc [40,207].

• **Rostopasca (*Chelidonium majus*)**

Rostopasca (*Chelidonium majus*), familia Papaveraceae, este o plantă erbacee, perenă, hemicriptofită, toxică, spontană, întâlnită prin locuri umbroase, prin păduri, tufărișuri, grădini, pe lângă garduri, ziduri, ruine, în jurul așezărilor omenești, de la câmpie, până în zona montană la 800-1000 m. Este recent introdusă în cultură [207]. Partea aeriană este formată din tuplini puțin ramificate, ușor păroase, cu frunze alterne profund penat partite, fiecare frunză fiind constituită din 5-7 lobi rotunjiți. Pe fața superioară, frunzele au o culoare verde, pe fața inferioară fiind verzi-albăstrui. Frunzele sunt grabile, moi la pipăit, foarte friabile; florile, galben-aurii sunt rare în masa de produs, fiind reunite în inflorescențe umbeliforme, așezate în vârful ramurilor. Caliciul este format din două sepale caduce, corola, din patru petale și numeroase stamine.

Rădăcina groasă, pivotată, de formă conică și cărnoasă, capătă prin uscare zbârcituri fiind friabilă; rădăcinile secundare însoțesc în număr mare rădăcina principală, de culoare brun cenușie până la brun-negricioasă.

Toate părțile plantei conțin un suc lăptos (latex) de culoare galbenă care, în contact cu aerul, se brunifică.

Compoziția chimică: alcaloizi (chelidonină, homeochelidonină, oxichelidonină, mezoxichelidonină, chelitrină, sanguinarină, coptizină, tetrahidrocoptizină, protropină, alocriptopină, berberină, sparteină), vitamina C, carotenoide, rezine, ulei volatil, flavonoide, săruri minerale, saponozide. Maximul de alcaloizi se află în rizomi și rădăcini [207,209,210].

• **Piersicul (*Persica vulgaris*)**

Piersicul (*Persica vulgaris*), familia Rosaceae, este un arbore sau arbust fructifer, fiind a treia specie pomicolă după măr și prun, ca importanță economică. Rădăcinile sunt foarte superficiale, dar depășesc zona proiecției coroanei, tulpina este înaltă (2-6 m), coroana piramidală, lujeri roșietici sau brunii, muguri înguști, alipiți., frunzele sunt eliptice sau eliptic-lanceolate, florile solitare roșii carmin până la albe. Fructele sunt globuloase, cu pulpă aromată, succulentă, galbenă-aurie, până la roșu închis. Sâmburele este tare, regulat - brăzdat de mici adâncituri, semințele sunt ușor aromate [207].

Fructele proaspete conțin: apă (85-89%), proteine (0,7%), zaharuri (5,0-12,9%), acizi organici (0,3-1,4%), vitaminele: C, B₁, B₂, B₃, carotenoide, ulei volatil ce conține: linalol, esterii, acid acetic, caprilic, aldehide etc [207].

- **Portocalul (*Citrus sinensis*)**

Portocalul (*Citrus sinensis*), familia *Rutaceae*, este un arbore sau arbust fructifer, cu tulpini înalte de 3-12 m, frunze eliptice acuminate la vârf, flori albe cu caliciu păros, foarte parfumate, solitare sau dispuse în corimbi paniciflori. Fructele sunt bace, globuoase, portocalii; conțin: apă (90%), proteine (0,7%), zaharuri (9%), acizi organici (1,5-25g%), vitamina C (35-50 mg%), vitaminele B₁, B₂, B₃, carotenoide, săruri minerale [207]. Pericarpul fructelor de portocal conține uleiuri esențiale (maxim 2,5% în care limonenul se găsește în proporție de peste 90%), polifenoli, carotenoide, fibre alimentare, proteine, cenușă, apă.

3.2.1.2. Izolarea pigmentilor carotenoidici din diferite materiale vegetale

- **Izolarea pigmentilor carotenoidici din diferiți hibrizi de porumb (*Zea mays*)**

- *Materiale utilizate*

Ca materie primă pentru obținerea extractelor carotenoidice s-au utilizat boabele a șase tipuri de hibrizi de porumb: *NSSK444*, *NSSK640*, *NSSK420*, *Lovrin 400*, *Laureat*, și *Florenția* cultivați și la Stațiunea Didactică a Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului, Timișoara, recolta septembrie 2002 (hibridul *NSSK444*), respectiv septembrie 2004 (hibrizii: *NSSK640*, *Lovrin 400*, *Laureat* și *NSSK420*). Hibrizii *NSSK444*, *NSSK420* și *NSSK640* sunt obținuți la Universitatea din Novi Sad (Institute of Field and Vegetable Crops); primii doi fac parte din grupa de maturitate convențională FAO 400-500, fiind semitardivi (perioadă de vegetație mai mică de 145 zile), iar ultimul, din clasa de maturitate FAO 600-700, fiind tardiv (perioadă de vegetație de peste 145 zile) [211,212,213]. Hibridul *Lovrin 400* este de proveniență românească (Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare Agricolă Lovrin), fiind semitardiv – grupa de maturitate convențională FAO 500-600, iar hibridul *Laureat* – produs de firma KWS din Ungaria – este semitimpuriu- grupa de maturitate convențională FAO 340-360 (perioada de vegetație 116 zile) [213]. Hibridul *Florenția* este de proveniență americană (firma *Pioneer Hi-Bred International*, USA) făcând parte din grupa de maturitate convențională FAO 500-600- hibrid semitardiv [213]. Toți hibrizii de porumb analizați sunt hibrizi simplii (HS) – obținuți prin încrucișarea a două linii consangvinizate [213,214], sunt productivi, cu o bună rezistență la boli și dăunători, cei tardivi și semitardivi fiind cultivați cu precădere în zonele calde din sudul Europei (în România în zonele de câmpie), deoarece necesită o perioadă mai îndelungată pentru a ajunge la maturitate și sunt mai rezistenți la condițiile de secetă și temperaturi ridicate [214].

Reactivii utilizați pentru izolarea pigmentilor carotenoidici din boabele de porumb au fost: etanol (solvent pentru extracție, p.a., 96%, Chimopar, București), eter de petrol (solvent pentru extracție, p.a., 40-67 °C, Chimopar, București), acetonă (solvent pentru extracție, p.a., Chimopar, București), BHT (t-butilhidroxitoluen, pentru prevenirea degradării oxidative a carotenoidelor, p.a., Merck), hidroxid de potasiu (pentru saponificarea extractelor, p.a., Merck), clorură de sodiu (p.a., Chimopar, București), sulfat de sodiu anhidru (pentru îndepărtarea urmelor de apă din extracte, p.a., Chimopar, București). Extractele purificate finale au fost reluate și dizolvate în eter de petrol de la firma Merck.

- *Mod de lucru general*
 - *Extracția carotenoidelor*

Boabele de porumb au fost înepărtate de pe știuleți, uscate la aer, la temperatura camerei și apoi măcinate până la obținerea unei pulberi fine. Pentru obținerea extractelor carotenoidice, făina de porumb cântărită (tabelul 3.1.) a fost introdusă într-un balon cu fund plat, de 1000 ml, cu dop rotat, apoi s-a umezit cu apă distilată. Mai înainte de extracție propriuzise, făina de porumb umezită s-a tratat cu etanol 96% atât cât să acopere complet făina, balonul s-a agitat energic și apoi a fost lăsat în repaus timp de 45 minute, la temperatura camerei, la întuneric, permițându-se astfel hidrolizarea amidonului și eliberarea mai completă a pigmentilor carotenoidici din materialul vegetal. Astfel, se pare că amidonul nehidrolizat, datorită structurii sale macromoleculare, „capturează” o parte din moleculele de carotenoide care nu mai pot trece în solvent. Se menționează ca extracțiile anterioare realizate conform metodologiilor descrise în literatură [1,5,79,215] și care nu prevăd această etapă au condus la randamente de extracție mai scăzute, făina de porumb nedecolorându-se complet până la finele extracției datorită faptului că nu s-a realizat eliberarea completă a carotenoidelor din celulele materialului vegetal. Pentru prevenirea degradării oxidative a carotenoidelor s-a adăugat 0,1% BHT (față de materia primă). Pigmenții carotenoidici au fost extrași cu un amestec de solvenți organici format din eter de petrol: acetonă: etanol 96% (6:3:1, v:v:v) [215]. Extracția s-a repetat de mai multe ori cu porțiuni noi de amestec de solvenți, până când acesta a rămas incolor iar făina de porumb s-a decolorat complet (epuizarea materialului vegetal). După fiecare adaos de amestec de solvenți, balonul a fost agitat energic cca. 5 minute. Extractele carotenoidice reunite au fost apoi supuse concentrării sub vid, la 35 °C, într-un evaporator rotativ (model RV-05, basic 1-B, Shimadzu Japonia), până la un volum mai mic (15-20 ml).

- *Îndepărtarea sterolilor din extract*

Extractul brut obținut a fost tratat cu 40 ml eter de petrol și lăsat peste noapte (16 ore) la temperatura de -10 °C [1]. Sterolii precipitați au fost îndepărtați prin centrifugare timp de 10 minute, la 2000 rpm (centrifugă model Universal 32 R, Hettich, Germania). Supernatantul a fost apoi concentrat sub vid, în evaporatorul rotativ, la 35 °C, până la un volum mai mic (10-15 ml).

- *Saponificarea extractului*

Extractul rămas după îndepărtarea sterolilor a fost supus în continuare saponificării în vederea îndepărtării lipidelor și esterilor, prin tratare cu 40 ml soluție alcoolică 20% de hidroxid de potasiu și lăsare peste noapte (16 ore) la temperatura camerei, sub atmosferă de azot și la întuneric [5,79]. Carotenoidele au fost apoi reextrase cu eter de petrol, într-o pâlnie de separare de 500 ml, spălate de mai multe ori cu o soluție saturată de clorură de sodiu și apoi cu apă distilată, până la completa îndepărtare a săpunurilor și a alcaliilor. Extractele eterice reunite au fost trecute peste sulfat de sodiu anhidru în vederea îndepărtării urmelor de apă și apoi concentrate sub vid, la 35 °C, în evaporatorul rotativ, până la îndepărtarea completă a solventului. Carotenoidele obținute au fost redizolvate într-un volum de eter de petrol și păstrate în sticle brune la -20 °C, în atmosferă de azot, pentru a fi ulterior supuse analizelor. Din fiecare tip de hibrid de porumb s-au realizat 3 probe paralele, pornind de la aceleași cantități de materie primă și lucrând în aceleași condiții. În tabelul 3.1. sunt prezentate cantitățile de materii prime utilizate și de extracte obținute (valorile medii pentru cele trei probe de același tip) din fiecare hibrid de porumb.

Notă: pentru prevenirea degradării fotochimice a carotenoidelor, toate operațiile s-au desfășurat în încăperi cu lumină slabă, la temperatura camerei.

Tabelul 3.1

Cantitățile de materii prime și extracte carotenoidice obținute din hibridii de porumb (*Zea mays*)

| Nr. crt. | Hibridul de porumb | m _{material vegetal} (g) | m _{extract purificat} (g) (medie) |
|----------|--------------------|--------------------------------------|---|
| 1. | NSSK444 | 380,00 | 0,5423 |
| 2. | NSSK640 | 260,00 | 0,2113 |
| 3. | NSSK420 | 400,00 | 0,2554 |
| 4. | Laureat | 260,00 | 0,2912 |
| 5. | Lovrin 400 | 360,00 | 0,2115 |
| 6. | Florencia | 400,00 | 0,2456 |

• **Izolarea pigmentilor carotenoidici din fructe de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*)**

• *Materiale utilizate*

Ca materie primă pentru obținerea extractelor carotenoidice s-au utilizat fructele uscate din două soiuri de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*): *Delta 1* și *Ciuma* - cu maturare tardivă a fructelor (de formă oval-turtită, culoare portocaliu roșiatică), provenite de la Fructex S.A. Bacău. Ambele soiuri se caracterizează printr-o maturare tardivă a fructelor - care în cazul soiului *Delta 1* sunt mari, ovoidale, de culoare portocalie, iar în cazul soiului *Ciumași* sunt oval-turtite de culoare portocaliu roșiatică.

Reactivii utilizați pentru izolarea carotenoidelor din fructele de cătină albă uscate au fost: aceiași cu cei prezentați la obținerea extractelor din boabe de porumb.

• *Mod de lucru general*

Fructele de cătină albă uscate au fost măcinate cu o râșniță electrică până la obținerea unei pulberi fine. Din fiecare probă măcinată s-a cântărit o anumită cantitate (tabelul 3.2.), care a fost introdusă într-un balon de 1000 ml, cu fund plat și dop rodat. Extracția pigmentilor carotenoidici s-a realizat cu un amestec de solvenți format din eter de petrol și etanol 96% (8:2, v:v), în care s-a introdus BHT (0,1% față de materia primă). În continuare, metodologia de extracție a carotenoidelor, de îndepărtare a sterolilor din extract și de saponificare în vederea obținerii extractului final, a fost aceeași ca și cea prezentată la obținerea extractelor din boabe de porumb (vezi figura 3.1.). Din fiecare soi de cătină albă s-au realizat 3 probe paralele, pornind de la aceleași cantități de materie primă și lucrând în aceleași condiții. În tabelul 3.2. sunt prezentate cantitățile de materii prime utilizate și de extracte obținute (valorile medii pentru cele trei probe de același tip) din fiecare soi de cătină albă.

Tabelul 3.2

Cantitățile de materii prime și extracte carotenoidice obținute din cele două soiuri de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*)

| Nr. crt. | Soiul de cătină albă | m _{material vegetal} (g) | m _{extract purificat} (g) (medie) |
|----------|----------------------|--------------------------------------|---|
| 1. | <i>Delta 1</i> | 168,00 | 0,2253 |
| 2. | <i>Ciumași</i> | 200,00 | 0,3013 |

• **Izolarea pigmentilor carotenoidici din flori de gălbenele (*Calendula officinalis*)**

• *Materiale utilizate*

Materia primă folosită (flori de gălbenele uscate) a provenit de la Stațiunea Didactică a Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului Timișoara, recoltată în luna iulie 2004.

Reactivii folosiți pentru obținerea extractului carotenoidic au fost aceiași ca și cei indicați la izolarea carotenoidelor din fructele de cătină albă.

• *Mod de lucru general*

Extracția carotenoidelor din florile de gălbenele ca și purificarea extractului prin îndepărtarea sterolilor și saponificare, s-a realizat după modul de lucru prezentat la obținerea carotenoidelor din boabele de porumb. S-au realizat 3 probe paralele, pornind de la aceleași cantități de materie primă și lucrând în aceleași condiții. Cantitatea de materie primă și masa extractului obținut (valoare medie pentru cele trei probe) sunt prezentate în tabelul 3.3.

Tabelul 3.3.

*Cantitățile de materie primă și extract carotenoidic obținut din florile de gălbenele (*Calendula officinalis*)*

| Nr. crt. | Proba | m _{material vegetal} (g) | m _{extract purificat} (g) (medie) |
|----------|---------------------------|-----------------------------------|--|
| 1. | Flori de gălbenele uscate | 200,00 | 0,4228 |

• **Izolarea pigmentilor carotenoidici din fructe de piersici (*Persica vulgaris*)**

• *Materiale utilizate*

S-a utilizat ca materie primă pieliță, respectiv pulpă de piersici soiul *Red Haven*, achiziționate de pe piața autohtonă. Fructele acestui soi sunt de mărime medie, cu pericarpul roșu și miezul galben, ferm.

Reactivii folosiți pentru obținerea extractului carotenoidic au fost aceiași ca și cei prezentați la izolarea carotenoidelor din porumb.

• *Mod de lucru general*

Pielița de pe fructele de piersici spălate a fost îndepărtată cu ajutorul unui cuțit și s-a cântărit o anumită cantitate de pericarp, respectiv de pulpă (tabelul 3.4.) care apoi a fost triturată cu puțin nisip de cuarț și acetonă, într-un mojar de porțelan. Materialul vegetal bine triturat s-a introdus într-un balon de 1000 ml, cu fund plat și dop rodat, supunându-se în continuare extracției cu un amestec eter de petrol: acetonă: etanol 96% (6:2:2) în care s-a adăugat BHT (0,1% față de materia primă) pentru prevenirea oxidării carotenoidelor. În continuare modul de lucru utilizat a fost identic cu cel prezentat la izolarea carotenoidelor din boabe de porumb. S-au realizat 3 probe paralele, pornind de la aceleași cantități de materie primă și lucrând în aceleași condiții.

Tabelul 3.4. prezintă cantitățile de materii prime și extracte carotenoidice obținute din pieliță și pulpă de piersici.

Tabelul 3.4

Cantitățile de materii prime și extracte carotenoidice obținute din pielea și pericarpul de piersică (Persica vulgaris) soiul Red Haven.

| Nr. crt. | Proba | m _{material vegetal} (g) | m _{extract purificat(g)} (medie) |
|----------|-------------------|--------------------------------------|--|
| 1. | Pulpă piersică | 300,00 | 0,2001 |
| 2. | Pericarp piersică | 100,00 | 0,1852 |

• **Izolarea pigmentilor carotenoidici din fructe de portocală (Citrus sinensis)**

• *Materiale utilizate*

Materia primă utilizată au fost portocale (*Citrus sinensis*), soiul Valencia de pe piața autohtonă. Carotenoidele fiins extrase separat din pulpă, albedo (partea albă, internă a pericarpului) și flavedo (partea colorată, externă a pericarpului).

Reactivii utilizați au fost aceiași ca la izolarea carotenoidelor din boabele de porumb.

• *Mod de lucru general*

Portocalele au fost decojite și apoi s-a separat porțiunea exterioară a pericarpului (flavedo) de cea interioară (albedo) s-au mărunțit cu ajutorul unui cuțit și s-au lăsat la uscat la temperatura camerei. S-a cântărit o anumită cantitate din albedo, flavedo și din pulpă. Fiecare probă a fost apoi mojarată cu puțin nisip de cuarț și acetonă. Probele astfel pregătite au fost introduse fiecare într-un balon de 1000 ml cu fund plat și dop rodat. Extracția carotenoidelor s-a realizat cu un amestec de solvenți: eter de petrol: etanol 96%: acetonă (8:1:1) adăugându-se BHT (0,1% față de materia primă). Modul de lucru ulterior a fost același ca și la izolarea pigmentilor carotenoidici din boabele de porumb. S-au realizat 3 probe paralele, pornind de la aceleași cantități de materie primă și lucrând în aceleași condiții.

În tabelul 3.5. sunt prezentate cantitățile de materii prime și extracte carotenoidice obținute din albedo, flavedo și pulpă de portocală.

Tabelul 3.5.

Cantitățile de materii prime și extracte carotenoidice obținute din albedo, flavedo și pulpă de portocală (Citrus sinensis)

| Nr. crt. | Proba | m _{material vegetal} (g) | m _{extract purificat(g)} (medie) |
|----------|--------------------|--------------------------------------|--|
| 1. | Albedo- portocală | 380,00 | 0,1846 |
| 2. | Flavedo- portocală | 340,00 | 0,1852 |
| 3. | Pulpă portocală | 400,00 | 0,1210 |

• **Izolarea pigmentilor carotenoidici din rostopască (*Chelidonium majus*)**

• *Materiale utilizate*

Materia primă utilizată a fost rădăcina, tulpina, frunzele și inflorescența plantei de rostopască (*Chelidonium majus*), recoltată din curtea Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului Timișoara în luna iunie 2005.

Reactivii utilizați au fost aceiași cu cei prezentați la izolarea carotenoidelor din boabele de porumb.

• *Mod de lucru general*

Pentru extracția carotenoidelor din diferite părți anatomice ale plantei de rostopască a fost utilizat același mod de lucru ca și în cazul portocalelor. Se menționează că s-a utilizat planta proaspătă pentru extracție. La operația de saponificare a extractului s-a realizat, pe lângă îndepărtarea lipidelor și esterilor, îndepărtarea clorofilei din extract. [5,79] S-au realizat 3 probe paralele, pornind de la aceleași cantități de materie primă și lucrând în aceleași condiții. Tabelul 3.6. cuprinde cantitățile de materii prime și extracte carotenoidice obținute din diferite părți anatomice ale plantei de rostopască

Tabelul 3.6.

*Cantitățile de materii prime și extracte carotenoidice obținute din rădăcină, tulpină, frunze și inflorescențe de rostopască (*Chelidonium majus*)*

| Nr. crt. | Proba | mmaterial vegetal (g) | mextract purificat (g) (medie) |
|----------|---------------------|-----------------------|--------------------------------|
| 1. | Frunze rostopască | 125,00 | 0,1704 |
| 2. | Flori rostopască | 132,00 | 0,2547 |
| 3. | Tulpină rostopască | 180,00 | 0,2948 |
| 4. | Rădăcină rostopască | 125,00 | 0,1233 |

Observație: În cazul când din produsele vegetale bogate atât în pigmenți carotenoidici cât și în pigmenți clorofilieni (așa cum sunt tulpina și frunzele de rostopască) se dorește separarea ambelor tipuri de compuși, nu se mai face saponificarea ci se procedează astfel [194]: materialul vegetal se triturează cu nisip de cuarț în prezență de acetonă 80% (v/v), omogenatul se centrifughează, se colectează supernatantul iar reziduu se reia cu porțiuni noi de acetonă 80% (v/v) până la obținerea unui extract incolor. Supernatantele reunite se colectează într-o pâlnie de separare și se amestecă cu eter de petrol. Prin adăugare de apă distilată se realizează separarea în două straturi. Pigmenții trec în stratul eteric iar stratul acetonic se îndepărtează din pâlnia de separare. Pentru separarea carotenoidelor de clorofile, soluția eterică se spală cu câte 20 ml metanol 80% (v/v) și se separă stratul metanolic inferior, ce conține carotenoidele. Extracția cu metanol a compușilor carotenoidici din soluția eterică se repetă până când stratul metanolic este incolor. Metanolul rămas în stratul eteric se spală cu porțiuni mici de apă distilată, până se formează o suspensie. Pentru separarea urmelor de carotenoide se amestecă suspensia de clorofilă cu puțin talc și sulfat de sodiu anhidru, într-un vas de sticlă de culoare brună, închis etanș. Se păstrează 2-3 ore la întuneric, timp în care clorofila se absoarbe pe talc, iar urmele de carotenoide rămân în soluție. Se filtrează. Filtratul se amestecă cu extractul carotenoidic metanolic care se usucă peste sulfat de sodiu anhidru și apoi se concentrează sub vid. Clorofila se eluează de

pe talc cu eter de petrol și se îndepărtează talcul prin filtrare. Prin îndepărtarea eterului sub vid se obțin cristale de clorofilă.

Schema bloc pe operații (generală) pentru izolarea și purificarea pigmentilor carotenoidici din materialele vegetale analizate este prezentată în figura 3.1.

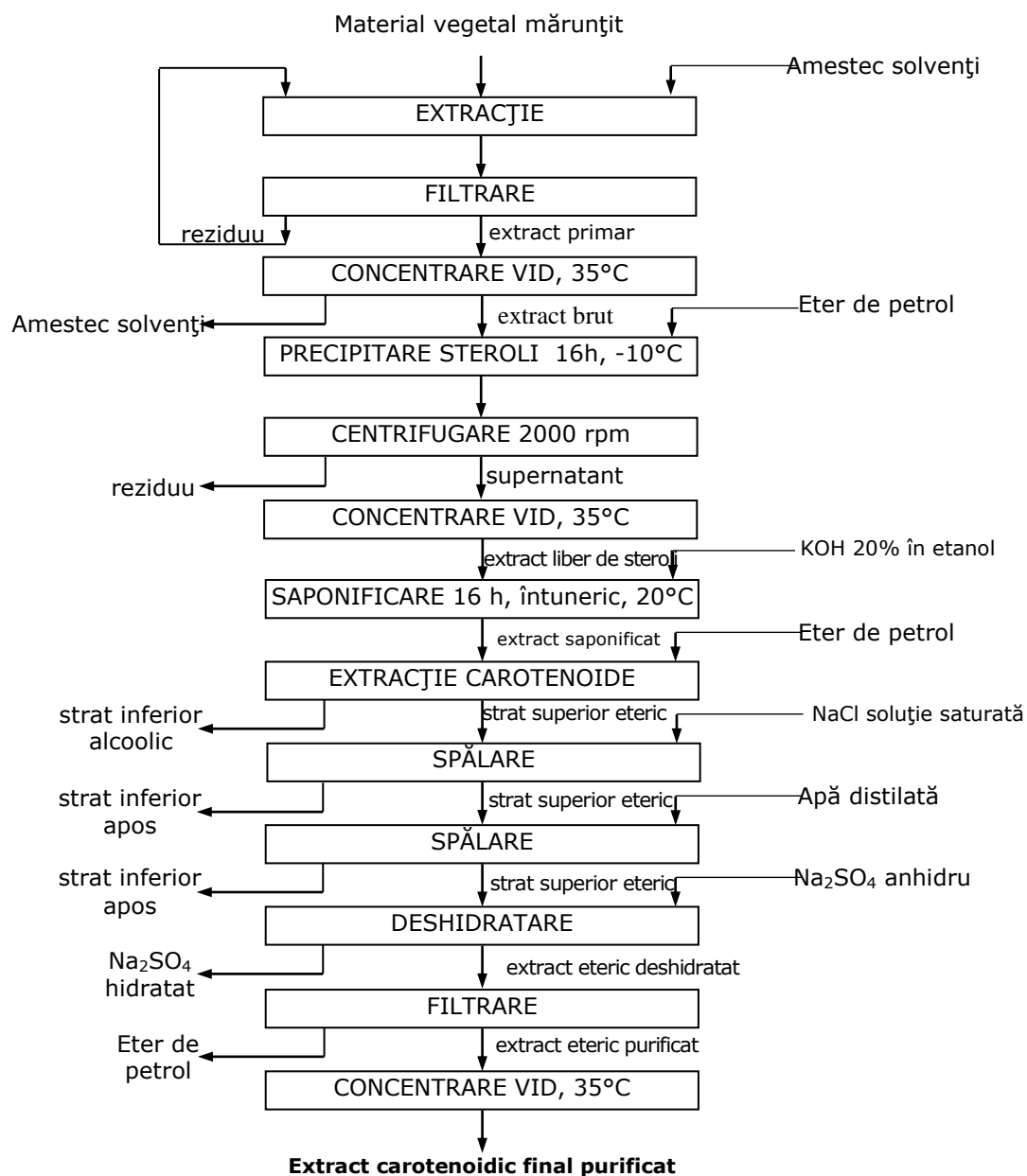


Figura 3.1.- Schema bloc pe operații pentru izolarea și purificarea carotenoidelor din materialele vegetale analizate

3.2.1.3. Analiza RP-HPLC a extractelor

În vederea determinării concentrației de β -caroten și de carotenoide totale din probe, toate extractele carotenoidice obținute au fost supuse analizei prin cromatografie de lichide de înaltă performanță, cu fază inversă (RP-HPLC). Pentru aceasta a fost utilizat un cromatograf HPLC tip Agilent 1100 (Agilent, USA), cu o coloană Zorbax SB-C18, cu dimensiuni: 250 x 4,6 mm și diametrul particulelor de 5 μ m. Ca eluent s-a folosit un amestec de acetonitril:metanol (20:80), ambii reactivi provenind de la firma Merck&Co., Inc, New Jersey. S-a lucrat la un debit al eluentului de 1 ml/minut, o temperatură a coloanei de 30°C și lungimea de undă de 450 nm. S-au injectat probe de 20 μ l iar pentru determinarea concentrației de β -caroten din probe s-a folosit o curbă de etalonare (figura 3.2.) obținută cu β -caroten standard de puritate >97%, provenind de la Sigma Chemical Company.

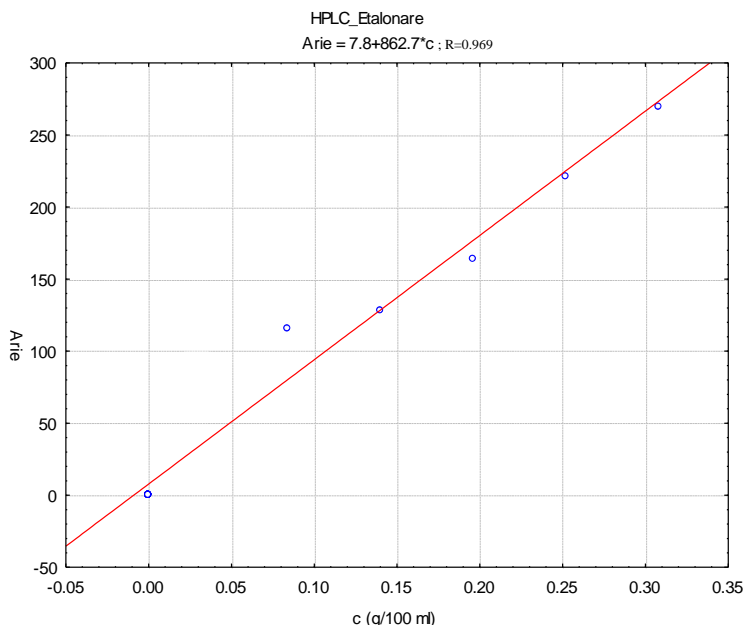


Figura 3.2. - Curba de etalonare pentru β -carotenul standard

Cromatogramele RP-HPLC suprapuse, obținute pentru β -carotenul standard sunt prezentate în figura 3.3. Fiecare probă de extract a fost analizată în duplicat. Rezultatele obținute privind conținutul de carotenoide din extracte sunt prezentate în tabelele 3.10.-3.27. iar cromatogramele RP-HPLC corespunzătoare fiecărui extract carotenidic sunt prezentate în figurile 3.11.-3.15., 3.17., 3.18., 3.20.-3.22., 3.24.-3.26., 3.28.-3.31. (vezi 3.3.1.1. - Rezultate și discuții).

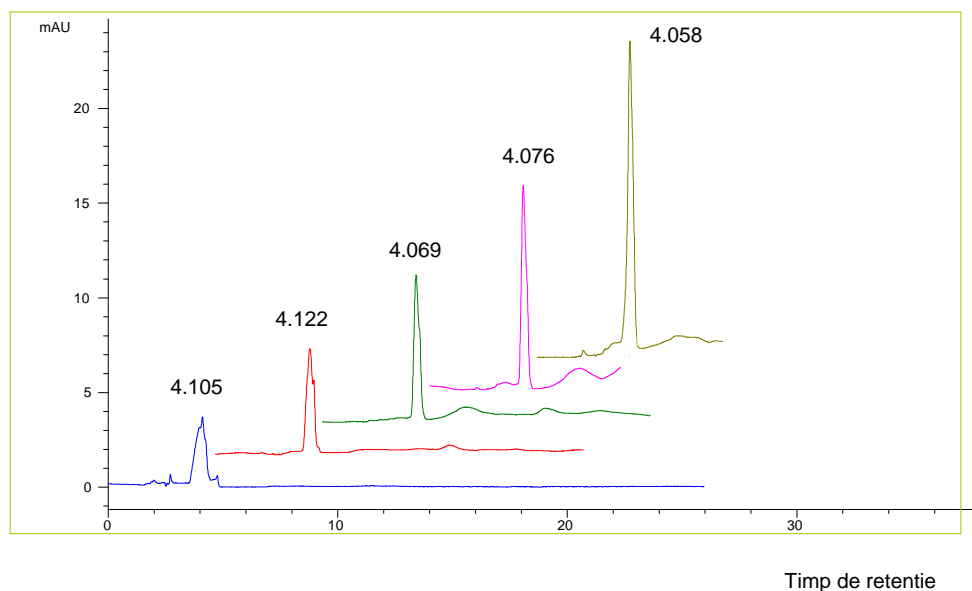


Figura 3.3.- Cromatogramele RP-HPLC obținute pentru β -carotenul etalon

3.2.1.4. Determinarea spectrofotometrică a conținutului total de carotenoide din extracte

Pentru determinarea spectrofotometrică a conținutului total de carotenoide din extractele obținute a fost utilizat un spectrofotometru UV-VIS model Specord 205 (Analytik Jena, Germania) S-a folosit cuva de 1 cm și s-au determinat absorbanțele probelor în eter de petrol, la lungimea de undă: $\lambda=450$ nm; pentru compensare a fost utilizat eterul de petrol.

Estimarea cantității totale de carotenoide din probe, prin această metodă, s-a realizat cu ajutorul formulei de calcul [1,5,79,103]:

$$\mu\text{g carotenoidă/g material vegetal} = \frac{A \cdot V \cdot 10^4}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot m}$$

unde:

A - este absorbanta la lungimea de undă dată;

V - volumul extractului analizat (ml);

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ - coeficient specific de absorbție al β -carotenului în eter de petrol

(2592);

m - masa probei (g).

Rezultatele obținute în urma acestor determinări sunt prezentate în tabelul A1.1. (Anexa 1.)

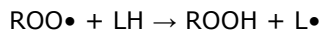
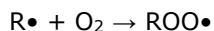
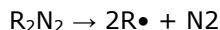
În figura 3.33. (vezi 3.3.1.1. - Rezultate și discuții), respectiv tabelul 3.28. sunt prezentate comparativ rezultatele privind conținutul total de carotenoide obținute prin RP-HPLC și prin metoda spectrofotometrică.

3.2.1.5. Determinarea activității antioxidante a extractelor carotenoidice prin metoda cu DPPH

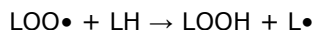
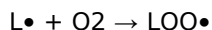
În funcție de reacțiile chimice pe care le implică, majoritatea metodelor de determinare a capacității antioxidante pot fi împărțite în două categorii: analize bazate pe reacții de transfer de atom de hidrogen (HAT) și analize bazate pe reacții de transfer de electron (ET). Majoritatea analizelor bazate pe HAT monitorizează cinetica reacției și determinarea cantitativă se face pe baza curbelor cinetice. Aceste analize cuprind inhibiția autooxidării lipoproteinelor de densitate joasă, capacitatea de absorbție a radicalului de oxigen (ORAC) și parametrul de captare a radicalului antioxidant (TRAP). Metodele bazate pe ET măsoară capacitatea unui antioxidant de a reduce un oxidant, care își schimbă culoarea atunci când este redus. Gradul în care se schimbă culoarea este corelat cu concentrația probei de antioxidant. Acestea includ analiza fenolilor cu reactiv Folin-Ciocalteu (FCR), capacitatea antioxidantă a echivalentului Trolox (TEAC), puterea antioxidantă a ionului feric reducător (FRAP), analizarea potențialului antioxidant total folosind complex de Cu(II) ca oxidant, și DPPH. Ambele categorii de analize intenționează să măsoare capacitatea eliminării oxidantului, în locul capacității antioxidante preventive a unei probe [125].

Deoarece vitezele relative de reacție ale antioxidantilor împotriva oxidanților, mai ales radicali peroxil, reprezintă parametrii cheie ai capacității antioxidante, se analizează autooxidarea și inhibiția sa cinetică. Autooxidarea, inițiată de un compus azo, și acțiunea inhibitorilor săi include următorii pași elementari (se consideră un antioxidant, doi radicali și oxigenul în exces, unde AH = antioxidant, LH = substrat, R₂N₂ = compus azo) [125]:

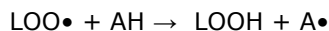
Inițiere:



Propagare:



Inhibiție:



Încheiere:



Viteza de formare a peroxidului inhibat (R_{inh}) și cel neinhibat (R_{neinh}) sunt exprimate prin următoarele ecuații:

$$R_{neinh} = \{ k_3 / (2k_8)^{1/2} \} [LH] R_i^{1/2}$$

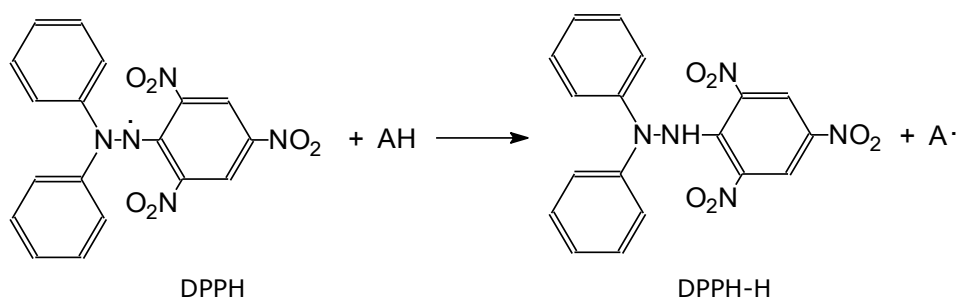
$$R_{inh} = \{ k_3 [LH] R_i \} / nk_6 [AH]$$

Unde:

- k_3 , k_8 și k_6 reprezintă constantele de viteză pentru propagare, încheiere și inhibiție.

Un radical care rupe catena ar trebui să reacționeze mai repede cu radicalii ($k_6 \gg k_3$), pe când un radical antioxidant ($A\cdot$) nu reacționează sau reacționează foarte încet cu LH (constanta de viteză $\ll k_3$) [125].

DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) este unul dintre radicalii organici cu azot cei mai stabili și disponibili comercial și are absorbanta maximă în UV-VIS la 517 nm, prezentând o culoare violetă. În momentul reducerii, soluția se decolorează de la violetă la galben, electronul liber al DPPH împerechindu-se cu un hidrogen de la un antioxidant inhibitor de radical liber trecând în DPPH-H redus:



Desfășurarea reacției este monitorizată spectrofotometric [125, 212].

A fost determinată activitatea antioxidantă a extractelor carotenoidice din frunze, flori și tulpină de rostopască (*Chelidonium majus*), din trei hibrizi de porumb (*Zea mays*): *NSSK444*, *NSSK640* și *Lovrin 400*, din fructe de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*), din pericarp de piersică (*Persica vulgaris*), din albedo și flavedo de portocală (*Citrus sinensis*).

• **Materiale utilizate**

- soluție 1mM DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil-radical liber, MP Biomedicals, LLC-Germania în eter de petrol;
- acid ascorbic (ca și antioxidant etalon, p.a., Merck) soluții 0,1 mM, 0,01 mM și 0,001 mM în alcool etilic 96% (Merck);
- eter de petrol (p.a., 40-67 °C, Chimopar, București).

• **Mod de lucru**

Din fiecare extract analizat s-au luat probe care au fost diluate cu eter de petrol 1:100. La diluții mai mici ale probelor soluția s-a decolorat imediat după adăugarea de DPPH. Într-o eprubetă prevăzută cu dop s-au introdus: 0,3 ml probă diluată, 2,6 ml eter de petrol și apoi 0,3 ml soluție DPPH 1mM, după care amestecul s-a introdus în cuva spectrofotometrului, pentru compensare folosindu-se eter de petrol. A fost înregistrată absorbanta la 517 nm și variația acesteia în timp. Pentru probele de vitamină C și cele de rostopască, înregistrările au fost efectuate cu spectrofotometrul Perkin Elmer, Lambda EZ Series, datele achiziționate fiind prelucrate cu ajutorul programului PESSW, versiunea 1.2, Revision E [216]. Pentru înregistrarea celorlalte probe a fost utilizat un spectrofotometru Specord 205 (firma Analytik Jena, Germania), utilizându-se programul winASPECT, versiunea 2.0.3.0; spectrele de absorbție în vizibil înregistrate cu acest aparat sunt prezentate în Anexa 2.

- *Curba de etalonare DPPH*

Pe baza spectrelor de absorbție în VIS ale soluțiilor de DPPH de diferite concentrații (figura 3.4.) s-a obținut curba de etalonare: *Absorbantă* (517 nm) = $f(c, \text{mM})$ (figura 3.5.).

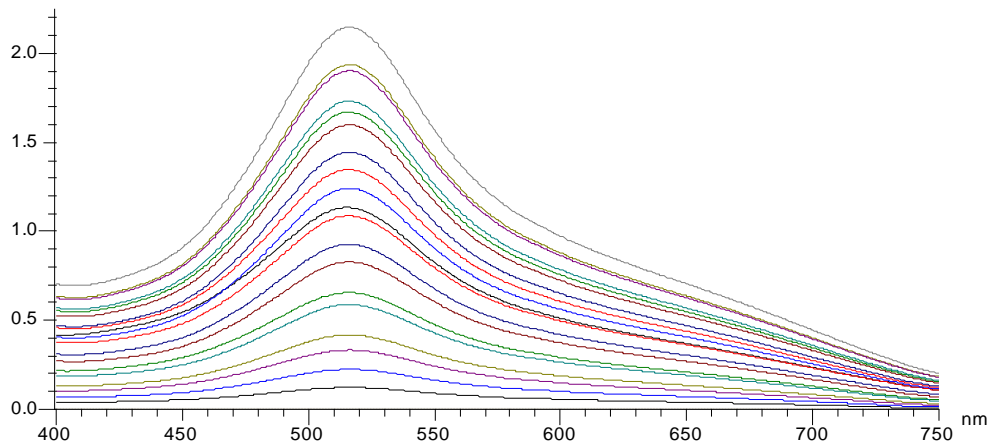


Figura 3.4. - Spectrele în VIS ale soluțiilor de DPPH etalon

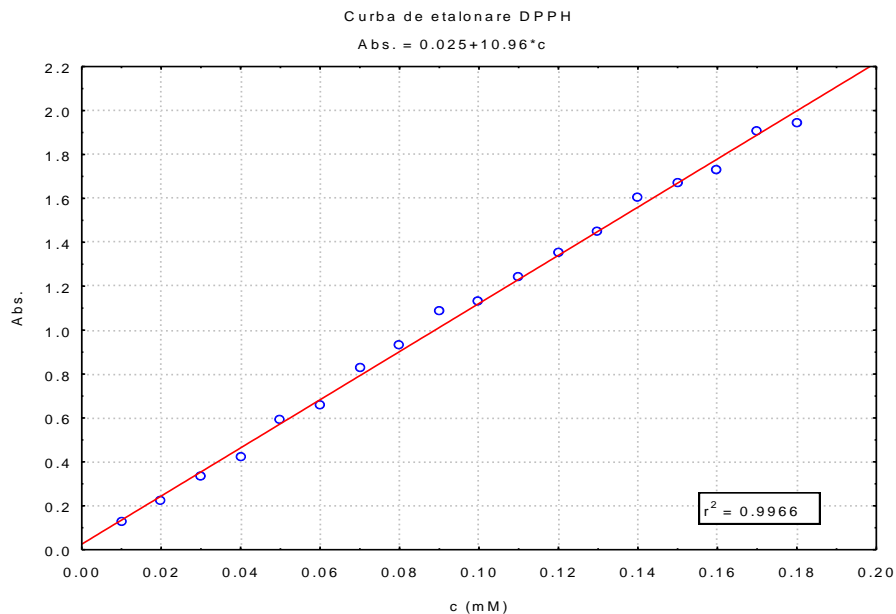


Figura 3.5.- Curba de etalonare pentru DPPH: $Abs = f(c, \text{mM})$

- *Activitatea antioxidantă a vitaminei C*

Pentru soluțiile de vitamină C de concentrație 0,1 mM, 0,01 mM, respectiv 0,001 mM, s-au calculat absorbantele relative ($A\%$) ca raport dintre absorbanta la timpul t și absorbanta inițială ($t = 0$):

$$A\%(t) = \frac{A_{517\text{ nm}}(t)}{A_{517\text{ nm}}(t=0)} \cdot 100$$

Cu cât A% este mai mică, activitatea antioxidantă a probei studiate este mai mare.

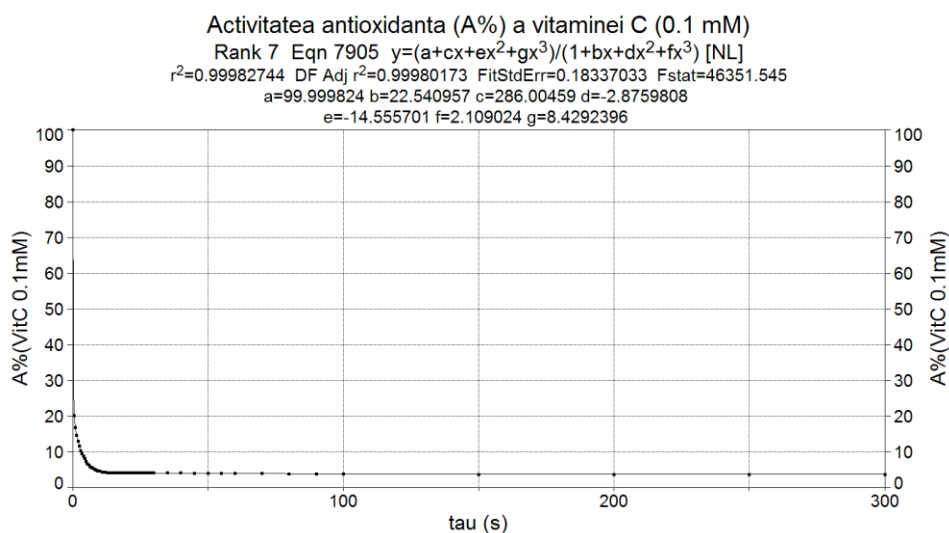


Figura 3.6. - Variația în timp a absorbanței relative a soluției de DPPH în prezența soluției de vitamina C de 0,1 mM

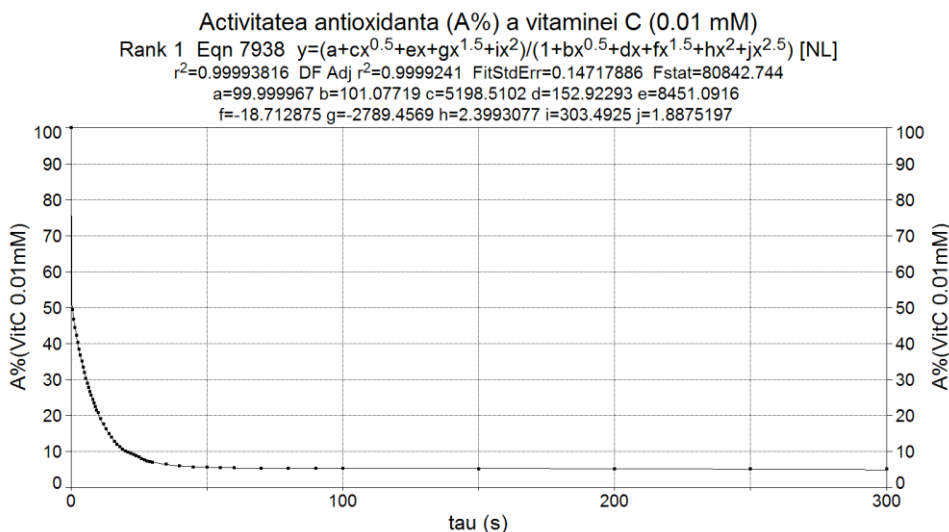


Figura 3.7. - Variația în timp a absorbanței relative a soluției de DPPH în prezența soluției de vitamina C de 0,01 mM

Activități antioxidante apropiate (A% între 3 și 5,5%) foarte bune au prezentat probele de concentrații 0,1 mM (A%= 3%) și 0,01 mM (A%= 5,5%) - figurile 3.6. și. 3.7. Proba de concentrație 0.001 mM a condus numai la o activitate

antioxidantă redusă (A%= 76%), așa cum se poate observa din figura 3.8. - curbă necorespunzătoare, prezentată doar pentru comparație.

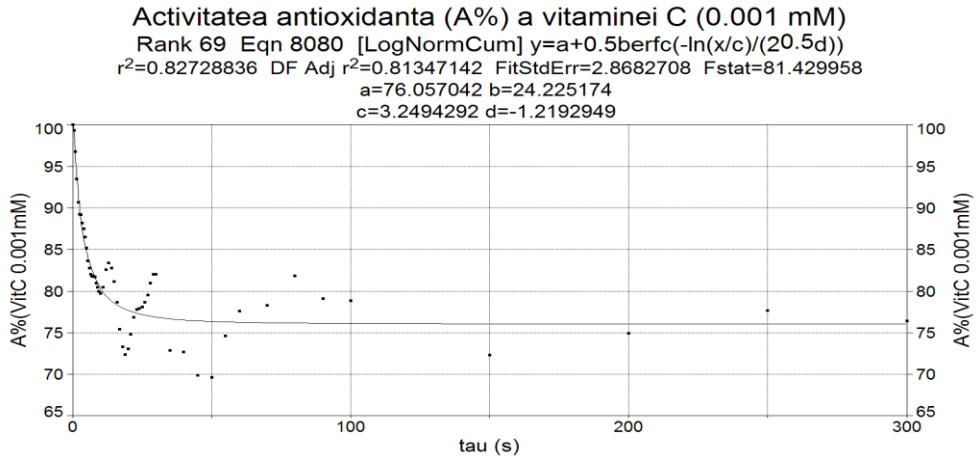


Figura 3.8. - Variația în timp a absorbanței relative a soluției de DPPH în prezența soluției de vitamina C de 0,001 mM

Evaluarea activității antioxidante a probelor de vitamina C a condus la viteze medii de reacție (calculate pe porțiunea cvasiliniară a curbei, ca derivata de ordinul întâi a dependenței liniare a concentrației, exprimată în mM, de timpul de reacție: $c \text{ (mM)} = f(t, s)$) între 2,5 și 3,6 $\mu\text{M/s}$. Astfel, în cazul soluției concentrate de 0,1 mM, viteza medie a fost de 3,6 $\mu\text{M/s}$ iar pentru soluția de concentrație 0,01 mM aceasta a fost 2,5 $\mu\text{M/s}$ (figura 3.9.).

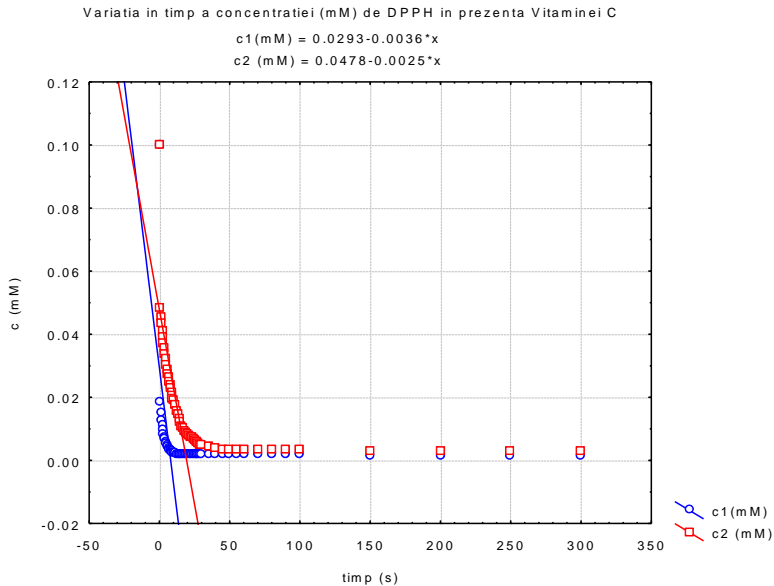


Figura 3.9.- Dependența concentrației de DPPH (mM) de timpul de reacție (în reacția cu vitamina C)

Rezultatele privind activitatea antioxidantă a extractelor carotenoidice obținute sunt prezentate în figurile 3.34.-3.55. (vezi 3.3.1.2.- Rezultate și discuții).

3.2.1.6. Determinarea conținutului de elemente minerale din materiile prime și din extracte prin spectrometrie de absorbție atomică

• *Principiul metodei*

Metoda se bazează pe măsurarea, prin spectrometrie de absorbție atomică a concentrației elementelor minerale din extractul acid obținut din cenușa eșantionului de produs vegetal. Procesul analitic cuprinde două etape: mineralizarea, pe cale uscată și dozarea, prin spectrometrie de absorbție atomică, respectiv prin spectrometrie de emisie în flacără (în cazul elementelor Na și K) [217,218].

• *Mod de lucru*

➤ *Mineralizarea uscată*

Substanța organică din materialul vegetal sau din extract este oxidată de către oxigenul din aer într-un cuptor de calcinare, încălzit progresiv până la temperatura de 500°C, unde se menține timp de 6-8 ore. Metoda folosită a fost cea descrisă în STAS 5954/1-86, adaptată la condițiile specifice analizelor produselor vegetale.

În capsule de porțelan, în prealabil bine curățate și aduse la masă constantă, prin uscare la 105°C, s-au cântărit aproximativ 1,000 g materie primă, respectiv 0,200g extract carotenoidic. Capsulele cu probă se introduc în etuvă la 50-60 °C unde se mențin cca 8 ore. Se ridică apoi temperatura la 105 °C și se menține timp de 5-6 ore. După expirarea acestui interval de timp, se scot capsulele cu probe din etuvă și se introduc într-un cuptor de calcinare termoreglabil, la rece. Se ridică progresiv temperatura la 200-250 °C și se menține până la carbonizare completă. Se ridică apoi temperatura cuptorului până la 500 °C și se calcinează timp de 6-8 ore până se obține o cenușă de culoare albă. Probele a căror cenușă mai prezentau puncte negre, reprezentând urme de substanță organică, s-au tratat cu 1 ml de acid azotic concentrat, s-au uscat pe baie de nisip, după care s-au calcinat la 500 °C încă 2 ore. După răcire, cenușa se tratează cu 0,5 ml apă bidistilată și 1 ml acid clorhidric 6N și se evaporă la sec, pe baie de nisip; operația se repetă de două ori. În continuare, reziduul se dizolvă în porțiuni mici de câte 5 ml HCl 0,5 N, trecându-se cantitativ într-un balon cotat de 50 ml, care se aduce la semn cu HCl 0,5 N. În final, conținutul balonului se filtrează într-un vas perfect uscat, printr-o hârtie de filtru neumectată și fără urme de metale grele. În paralel se prepară și o probă martor, pentru verificare.

➤ *Determinarea elementelor minerale prin spectrometrie de absorbție atomică*

Elementele minerale se dozează din soluția hidroclorică obținută la mineralizare prin pulverizare în flacăra de aer-acetilenă și măsurarea absorbției, respectiv a emisiei, la lungimea de undă caracteristică fiecărui element analizat. Pentru calibrarea aparatului se prepară seturi de etaloane, de diferite concentrații, în soluție de HCl 0,5 N. A fost utilizat un spectrometru monofascicul de absorbție atomică Varian tip Spectra AA 110 (Mulgrave, Australia), controlat prin PC.

- Componenta optică a aparatului cuprinde, în principal următoarele:
 - Domeniile lungimilor de undă: 185-900 nm;
 - Monocromator Czerni Turner 0,25m;

- Fantă cu selecție automată, cu setări de: 0,2 nm; 0,5 nm și 1 nm;
- Rețea de difracție holografică cu 1200 linii/mm.
- Componentele hard ale aparatului:
 - Corector de fond de deuteriu de înaltă intensitate în domeniul: 125-425 nm;
 - Sisteme de atomizare-pulverizare de tip Universal Mark 7;
 - Lămpi cu catod cavitat (HCL), pentru fiecare element analizat.

Caracteristica de performanță a aparatului este: pentru o absorbantă mai mare de 0,75, precizia este mai mică de 0,5 % RDS, pentru soluția cu un conținut în cupru de 5 mg/l.

- Soft, în versiunea 2.10 – Windows 1998 .

Aparatul măsoară absorbanta sau emisia în flacără prin PROMT (Precision Optimised Measurement Time), integrare, integrare repetată, înălțimea picului, sau suprafață. Variabila de întârziere la precizie este de 0-999 secunde. Aparatul efectuează peste 20 de replici de citire, între 0,1 și 30 de secunde, după care afișează valoarea medie a replicilor; după cinci replici consecutive apropiate aparatul permite sistarea celorlalte replici, scurtând astfel timpul de lucru.

Pentru fiecare probă s-au determinat următoarele elemente minerale: Na, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, Pb, Co, Cr, Ni.

Conținutul final al elementului mineral determinat se calculează cu ajutorul relației:

$$C \text{ (mg/kg sau ppm)} = a \times f / m$$

unde: f – factor de diluție,
a – conținutul elementului citit de aparat în mg/l
m – masa de probă luată în lucru.

Prepararea soluțiilor de calibrare. Înaintea fiecărei serii de determinări au fost preparate din soluția etalon concentrată a elementului determinat câte 5 seturi de soluții de calibrare care să acopere intervalul de concentrație ce urmează a fi determinat. Soluțiile de calibrare au fost preparate o dată cu efectuarea determinărilor spectrofotometrice.

Măsurătorile propriu-zise. Cu excepția fazei de aspirare a probelor în flacără, efectuată manual, restul operațiilor au fost comandate prin PC. Condițiile concrete de lucru sunt prezentate sintetic în tabelul A.3.1, și în figurile A.3.1.-A.3.12. (Anexa 3.).

Rezultatele obținute, privind conținutul de elemente minerale din materiile prime și din extractele carotenoidice, sunt prezentate în figurile 3.56.- 3.69. (vezi 3.3.1.3.- Rezultate și discuții), respectiv tabelele 3.29.-3.35.

• **Analiza componentelor principale (PCA) pentru elementele minerale din materiile prime și din extracte**

Analiza componentelor principale (PCA – Principal Component Analysis) formează baza pentru analiza multivariată a datelor [219-223]. PCA presupune o aproximare a tabelului de date, matricea de date X , printr-un produs de două matrici de dimensiuni mai reduse, T și P , ce rețin doar informația utilă din X . Reprezentarea grafică a coloanelor lui T dă o imagine privind "forme obiectului"

pentru X și, în mod analog, reprezentarea liniilor matricii P conduce la "formele variabilelor".

Această metodă de analiză lucrează în modul următor:

- se caută o direcție în spațiul proprietăților după care datele au varianță maximă; direcția respectivă se numește prima componentă principală ($PC1$) și fiecare formă se proiectează pe această direcție, rezultând astfel o reprezentare monodimensională a datelor (figura 3.10.).
- se poate căuta și o a doua componentă principală ($PC2$), a cărei direcție este perpendiculară pe prima și respectă condiția de varianță maximă.

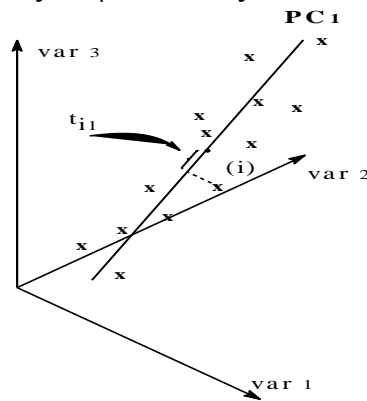


Figura 3.10. - Matricea $X(N,K)$ a datelor, cu N puncte în spațiul K -dimensional. În figură se prezintă un spațiu tridimensional și prima componentă principală ($PC1$). "Scorul" unui obiect, (t_i), este proiecția sa ortogonală pe această direcție, iar coeficienții direcționali ai liniei formează vectorul "loading", p_k .

Fundamentul matematic al analizei PCA pornește de la centrarea coloanelor matricii X față de medii [219,221]:

$$x_{cent,ij} = x_{ij} - \bar{x}_j; \quad \bar{x}_j = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_{ij}$$

Găsirea noilor axe PC reprezintă, de fapt, rotirea axelor sistemului de coordonate original, astfel că:

$$T = X \cdot P$$

unde:

$X(N,K)$ - matricea variabilelor independente;

$P(K,K)$ - matricea de rotație (cosinusurile directe de rotație).

Determinarea matricii de rotație P se poate face prin mai multe metode: manipularea relației matriciale de mai sus pentru a obține o problemă de vectori proprii - valori proprii, metode iterative ($NIPALS$), descompunere în valori singulare (SDV).

Matricea T va conține coloanele t_{ij} cu varianță din ce în ce mai mică, la deplasarea $1 \rightarrow K$, astfel încât conținutul de informație se va modifica în același mod. Se poate scrie:

$$t_1^T \cdot t_1 > t_2^T \cdot t_2 > \dots$$

Matricea P conține coloane ortogonale (din principiul metodei), astfel că inversa și transpusa acesteia sunt identice. Prin calcule simple, relația matricială de mai sus devine:

$$X = T \cdot P^{-1} = T \cdot P^T$$

cu X conținând atât informație utilă, cât și zgomot. Din considerentele prezentate mai sus rezultă că se poate stabili un număr de componente principale, A , ce posedă informația utilă, restul fiind doar zgomot ce se acumulează în așa-numita matrice a erorilor, E . Ecuația de mai sus devine:

$$X(N, K) = {}^*T(N, A) \cdot {}^*P^T(A, K) + E(N, K) = {}^*X(N, K) + E(N, K)$$

unde matricea *T reprezintă matricea înregistrărilor (scores), iar ${}^*P^T$ este matricea încărcărilor (loadings). Ținând cont de centrarea valorilor x_{ij} în jurul valorilor medii, relația devine:

$$X(N, K) = I(N, I) \cdot \bar{x}^T(I, K) + {}^*T(N, A) \cdot {}^*P^T(A, K) + E(N, K)$$

unde I este un vector cu elemente 1, iar \bar{x} este vectorul având ca elemente valorile medii.

Există mai multe metode de stabilire a numărului de componente principale, A , cele mai utilizate fiind procedeele care folosesc valorile proprii ale componentelor principale (descompunere în valori singulare), metodele de reprezentare grafică a varianțelor funcție de numărul de componente principale sau procedeele de validare încrucișată.

Reprezentarea vectorilor t unul față de altul ($t_p = f(t_q)$) poate da informații referitoare la similarități și posibila grupare a obiectelor studiate. În același mod, reprezentarea vectorilor $p_r = f(p_s)$ scoate în evidență similaritățile dintre proprietățile studiate, dar și importanța relativă a anumitor variabile (proprietăți) în construirea modelului.

Analiza multivariată în general și analiza componentelor principale (PCA) în special sunt instrumente de analiză statistică foarte puternice, care permit extragerea informațiilor utile din cantități mari de date, care pot fi doar mărimi mai mult sau mai puțin independente. În domeniul alimentar, analiza multivariată este foarte mult utilizată în special în analiza senzorială (unde nu există variabile dependente bine definite) [220-222], dar și în clasificarea și evidențierea importanței unor caracteristici în cazul falsificării unor alimente, a stabilirii zonelor de proveniență sau găsirea similarităților între diferite sorturi alimentare [224, 225, 227-231].

În această parte a studiului privind concentrația elementelor minerale în materia primă și extractele carotenoidice obținute s-a realizat o analiză a componentelor principale (PCA) în scopul stabilirii grupelor de probe similare și a variabilelor cu importanță semnificativă în discriminarea cazurilor studiate.

Analiza PCA pentru elementele minerale din materiile prime și extractele carotenoidice obținute din acestea s-a realizat în următoarele condiții:

- număr total de variabile pentru toate probele de materii prime și extracte carotenoidice: 28 (figura 3.70. - Rezultate și discuții);
- număr total de cazuri pentru toate probele de materii prime și extracte carotenoidice: 12 (toate elementele minerale determinate în fiecare probă) – figura 3,71. - Rezultate și discuții;
- număr total de variabile pentru florile de gălbenele, albedo-portocale, flavedo-portocale, miez de piersică, pericarp de piersică, cătină, rostopască și extractele carotenoidice din aceste materiale vegetale: 15 (figura 3 73.- Rezultate și discuții);
- număr total de cazuri pentru florile de gălbenele, albedo-portocale, flavedo-portocale, miez de piersică, pericarp de piersică, cătină, rostopască și extractele carotenoidice din aceste materiale vegetale: 12 (toate elementele minerale determinate în fiecare probă) –figura 3.74.- Rezultate și discuții;
- număr total de variabile pentru probele de diferite tipuri de hibrizi de porumb: 13 (toate tipurile de făină de porumb din diferiți hibrizi, extractele carotenoidice saponificate obținute din acestea și un extract nesaponificat) – figura 3.76.- Rezultate și discuții;
- număr total de cazuri pentru probele de diferite tipuri de hibrizi de porumb: 12 (toate elementele minerale determinate în fiecare probă) – figura 3.77.- Rezultate și discuții;

3.2.1.7. Determinarea acțiunii antimicrobiene a unor extracte carotenoidice din porumb, cătină și rostopască

• Modul de lucru general

A fost evaluată activitatea antimicrobiană a extractelor carotenoidice din porumb (*Zea mays*), hibridii *NSSK444* și *NSSK640*, cătină albă (*Hippophae rhamnoides*), soiurile *Delta 1* și *Ciumași*, precum și din frunze și flori de rostopască (*Chelidonium majus*), la două concentrații diferite ale acestora în eter de petrol: 0,2 g/ml, respective 0,02 g/ml.

Extractele luate în studiu au fost testate individual pentru activitatea antimicrobiană, prin metoda discurilor, conform Normelor Standard pentru Testarea Sensibilității Antimicrobiene a Discurilor Impregnate [232]. În acest sens s-au ales o serie de bacterii Gram pozitiv (*Staphylococcus aureus* - ATCC 29213, *Bacillus cereus* - ATCC 11778) și Gram negativ (*Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 27853; *Escherichia coli* - ATCC 25822) și o specie de ciupercă microscopică (*Candida albicans* - ATCC 10239).

Din fiecare specie bacteriană s-au preparat culturi proaspete de 24 de ore, prin însămânțate în bulion nutritiv și incubare timp de 24 de ore la 37°C Ciupercă microscopică a fost însămânțată pe mediul *Sabouraud* cu adaos de antibiotic și au fost incubate de 25°C.

În paralel cu testarea efectului antimicrobian al extractelor s-a efectuat și sensibilitatea la antibiotice a tulpinilor bacteriene folosind ciprofloxacina.

Din fiecare cultură microbiană s-au făcut diluții în ser fiziologic steril pentru obținerea unei densități bacteriene de 10^8 unități formatoare de colonii la un mililitru. (u.f.c./ml)

Pentru testarea efectului antimicrobian, mediul de cultură folosit (geloza nutritivă) s-a turnat în plăci Petri sterile. După solidificarea mediului, pe suprafața acestuia s-a însămânțat prin inundare câte 1 ml din fiecare cultură bacteriană pregătită. După dispersia uniformă a acesteia excesul s-a îndepărtat. Plăcile astfel însămânțate s-au menținut la termostat la 37°C pentru zvântare.

În paralel au fost pregătite rondelele de hârtie de filtru, care au avut diametrul de 6 mm. Din fiecare extract a fost depus pe fiecare rondea câte 50 μ l, pentru fiecare tip de cultură bacteriană.

Rondelele au fost depuse în mod steril pe suprafața mediului de cultură, înscriindu-se pe fiecare placă denumirea culturii și a extractelor corespunzătoare rondelilor și menținute timp de două ore la 5°C, după care au fost incubate la 37°C timp de 24 de ore.

Același lucru s-a realizat și pentru testarea extractelor asupra ciupercii microscopice, doar că, în plăcile Petri s-a turnat mediul *Sabouraud* cu adaos de antibiotice.

În final s-a măsurat diametrul zonelor de inhibiție (mm), incluzându-se și diametrul discului [233].

Rezultatele obținute în urma acestor teste microbiologice sunt prezentate la 3.3.1.4. (Rezultate și discuții).

3.2.2. Studiul posibilităților de aplicare a unor extracte carotenoidice

3.2.2.1. Obținerea unor unguente terapeutice pe bază de extracte carotenoidice

• **Introducere**

Unguentele sunt preparate farmaceutice de consistență semisolidă (moale), obținute prin încorporarea substanțelor active în excipienți (care formează baza unguentului) și destinate a fi aplicate pe piele sau pe mucoase [234]. Din punct de vedere fizico-chimic, unguentele sunt definite ca fiind geluri plastice pentru aplicație cutanată [235]. Natura gelică a unguentelor este necesară pentru a-și menține o formă constantă la ambalare, depozitare și la locul aplicării; în același timp, unguentele trebuie să fie plastice pentru ca să-și poată schimba forma la exercitarea unor acțiuni mecanice slabe: apăsare, forfecare, ungere etc; în acest fel se etalează corespunzător pe suprafețele tegumentelor pe care sunt aplicate.

Baza de unguent este o componentă principală a acestuia, constituită din una sau mai multe substanțe ce prezintă o consistență moale și o vâscozitate destul de mare, pentru ca să se poată întinde pe epiderm și să adere pe el, să se înmoaie la temperatura corpului, fără să curgă. Alegerea bazei de unguent se face în funcție de proprietățile substanțelor active care urmează a fi încorporate, de locul unde unguentul trebuie să-și manifeste acțiunea și în funcție de scopul terapeutic urmărit. Bazele de unguent fac parte din corpurile plastice, ușor deformabile, care au o limită de curgere, fiind constituite dintr-un schelet solid lax în interiorul căruia lichidul este reținut prin sorbție [235].

În funcție de afinitatea lor față de apă, bazele de unguent se clasifică astfel [235]:

1. *Baze liposolubile sau hidrofobe*, care, de obicei sunt alcătuite din grăsimi animale, vegetale, hidrocarburi sau amestecul acestora și care pot conține sau nu emulgatori. În cantități mici ele pot încorpora apă, prin acțiune mecanică, formând pseudoemulsii.

2. *Baze hidrosolubile sau hidrofile* care sunt miscibile cu apa, sau formează cu apa hidrogeluri coloidale. Astfel de baze sunt: polimeri ai oxidului de etilenă, coloizi hidrofili de natură organică și de natură anorganică.

În compoziția unguentelor se folosesc o serie de agenți conservanți, care sunt substanțe biocide (ce omorâă microorganismele și sporii acestora) sau biostatice (care inhibă dezvoltarea microorganismelor). Prezența microorganismelor poate duce la alterarea structurii chimice a substanțelor active cu inactivarea rapidă a acestora, poate modifica caracteristicile organoleptice (aspect, gust, miros) sau fizice (consistența, omogenitatea) făcând astfel unguentul de neutilizat [236].

Alegerea conservanților se va face în funcție de tipul unguentului fiind recomandați în special derivații acidului p-hidroxibenzoic: p-hidroxibenzoatul de metil (nipagin M), p-hidroxibenzoatul de etil (nipagin A), p-hidroxibenzoatul de propil (nipagin P) etc [234], care se folosesc în concentrații relativ scăzute.

La prepararea unguentelor se deosebesc două faze de lucru [234]:

- pregătirea bazei de unguent;
- dispersarea sau încorporarea substanțelor active și ajutoare.

• **Unguent terapeutic pe bază de extract carotenoidic din boabe de porumb (*Zea mays*)**

➤ *Procedeu de obținere a unguentului*

Pentru obținerea unguentului s-a utilizat extractul carotenoidic din hibridul de porumb NSSK444, obținut conform metodologiei de lucru prezentată la 3.2.1.1., care a fost înglobat într-o bază de unguent formată dintr-un amestec de vaselină și lanolină (90:10), potrivită pentru extractul carotenoidic liposolubil. La 100g bază de unguent s-a adăugat 0,015 g p-hidroxibenzoat de metil (nipagin M - Merck), pentru conservare și 1,00g extract carotenoidic (liber de solvent), amestecându-se bine. Unguentul astfel preparat a fost introdus în cutii de plastic cu capac și a fost păstrat la rece în frigider.

Obținerea acestui unguent face obiectul unei cereri de brevet înregistrată la OSIM [237].

➤ *Testarea clinică „in vivo” a unguentului*

Testarea clinică *in vivo* a unguentului cu extract carotenoidic din porumb s-a efectuat la Spitalul Clinic Municipal, Clinica de Dermato-Venerologie- serviciul ambulator, Timișoara, în perioada 15.06.2003-30.03.2004, cu respectarea principiilor de etică profesională, pe subiecți umani voluntari (52 bărbați și 74 femei, cu vârste cuprinse între 18 și 83 ani), cu următoarele afecțiuni dermatologice:

- ulcer de gambă: 38 cazuri;
- leziuni postelectrocauterizare: 43 cazuri;
- epiteliom bazocelular: 7 cazuri;
- lupus eritematos: 3 cazuri;
- intertrigo mixt: 5 cazuri;
- impetigo: 4 cazuri;
- psoriazis: 12 cazuri;
- eczeme cronice: 8 cazuri;
- fotodermatoze: 6 cazuri.

Subiecții umani au fost folosiți în activitatea de cercetare în condițiile în care:

- au fost respectate drepturile individuale și a fost garantată protecția împotriva eventualelor efecte negative;
- au fost corect informați asupra naturii experimentului;
- consimt liber și în deplină cunoștință pentru a servi ca subiecți în activitatea de cercetare.

Prin specialiștii în domeniu (medici umani) s-au dezvoltat și aplicat procedee proprii care s-au bazat pe respectarea criteriilor prezentate mai sus.

Unguentul a fost aplicat pe leziuni de două ori pe zi (dimineața și seara).

Rezultatele obținute la testarea clinică a unguentului sunt prezentate la 3.3.2.1. (vezi Rezultate și discuții).

• **Unguent terapeutic pe bază de extract carotenoidic din fructe de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*)**

➤ *Procedeu de obținere a unguentului*

Rentru obținerea acestui unguent s-a utilizat extractul carotenoidic din făină de fructe de cătină albă, soiul *Delta 1*, folosindu-se aceeași bază de unguent și aceleași cantități ca și la obținerea unguentului pe bază de extract carotenoidic din porumb.

Menționăm faptul că și obținerea acestui unguent face obiectul unei cereri de brevet înregistrată la OSIM [238].

➤ *Testarea clinică „in vivo” a unguentului*

Testarea clinică *in vivo* a unguentului cu extract carotenoidic din porumb s-a efectuat la Spitalul Clinic Municipal, Clinica de Dermato-Venerologie- serviciul ambulator, Timișoara, în perioada: 01.04.2004-30.11.2004, pe un lot de 160 de subiecți umani (90 bărbați și 68 femei) cu vârste cuprinse între 18-70 ani, respectându-se principiile de etică profesională prezentate anterior.

A fost urmărită eficiența unguentului cu extract carotenoidic din făină de fructe de cătină albă, comparativ cu tratamentele uzuale, în următoarele afecțiuni:

- | | |
|--|------------------------------|
| - ulcere de gambă atone: 48 cazuri; | - impetigo: 12 cazuri; |
| - plăgi postelectrocauterizare: 52 cazuri; | - fotodermatoze: 16 cazuri; |
| - lupus eritematos cronic localizat: 4 cazuri; | - psoriazis: 10 cazuri; |
| - epiteliom bazocelular: 3 cazuri; | - eczeme cronice: 22 cazuri. |
| - intertrigo mixt: 3 cazuri; | |

Unguentul a fost aplicat pe leziuni de două ori pe zi (dimineața și seara).

Rezultatele obținute la testarea clinică a unguentului sunt prezentate la 3.3.2.1. (vezi Rezultate și discuții).

• **Analiza comportamentului reologic al unguentelor obținute**

➤ *Generalități*

Majoritatea materialelor farmaceutice sunt unguente, creme, paste și geluri, care sunt semisolide. Produsele semisolide sunt materialele cel mai greu de caracterizat din punct de vedere reologic, deoarece ele combină atât proprietățile solidelor cât și ale lichidelor în același material [239,240].

Proprietățile reologice caracteristice ale unguentelor derivă din structura lor gelică. Dacă într-un sistem dispers eterogen, solid/lichid, faza solidă ajunge la o asemenea concentrație încât particulele solide se ating unele de altele, prinzându-se într-o rețea, datorită unor legături secundare, atunci se formează sisteme plastice. Când asupra unor astfel de sisteme încep să acționeze forțe mecanice slabe, punctele sau suprafețele de contact încep să se depărteze unele de altele, în funcție de mărimea și viteza forței mecanice [241].

Un fluid se numește tixotrop când, la aplicarea unei forțe de forfecare constante, are loc o scădere în timp a viscozității aparente, reversibilă. Fenomenul invers, de creștere izotermică, reversibilă a viscozității aparente prin prelucrare mecanică - este denumit reopexie [239,240]. Cel mai bun tip de comportament reologic pentru produsele farmaceutice și cosmetice este curgerea tixotropă. Fenomenele de tixotropie sunt datorate microstructurii probei și pot fi explicate ca o consecință a aglomerării particulelor. Astfel, particulele interacționează ca rezultat al forțelor de atracție van der Waals, pe de o parte, iar pe de altă parte, ca urmare a repulsiei electrostatice și a repulsiei sterice. Stabilitatea sistemului depinde de

existența unei bariere de energie potențială care previne atingerea particulelor, adică lipirea lor [241].

Dacă sistemul este în repaus, prin aglomerare particulele pot forma o rețea spațială și suspensia dezvoltă astfel o structură internă. Bineînțeles, rețeaua trebuie să fie suficient de puternică pentru a nu fi distrusă de către mișcarea termică. Atunci când suspensia este forfecată, legăturile fizice slabe sunt rupte, iar rețeaua se desface în agregate individuale ce se pot dezintegra în continuare în fragmente mărunte numite unități de curgere. În consecință, viscozitatea probei scade la creșterea vitezei de forfecare, fenomen numit pseudoplasticitate. Pe de altă parte, mișcarea termică determină ciocnirea unităților de curgere și în consecință, creșterea numărului de agregate. După un anumit timp, la o viteză de forfecare $\dot{\gamma}$ dată, se stabilește un echilibru dinamic între distrugerea și refacerea agregatelor, iar la $\dot{\gamma}$ mari, echilibrul este schimbat în direcția unei dispersări mai intense [241].

➤ *Condițiile de investigare*

Testele reologice au fost realizate în cadrul Laboratorului de Reologie al Centrului Național pentru Ingineria Sistemelor cu Fluide Complexe al Universității Politehnica din Timișoara, utilizând un reometru MCR-300 (GmbH, Germania). Celula de investigare folosită a fost cea cu plăci paralele, cu diametrul de 20 mm și interstițiul fixat la 1mm. Au fost determinate: curbele de viscozitate (η - $\dot{\gamma}$), curbele „Creep” (γ -t), testele „Amplitude Sweep”, testele „Frequency Sweep”, curbele viscozitate dinamică- temperatură (η -t).

Investigațiile au fost realizate în următoarele condiții:

- Curbele de viscozitate (η - $\dot{\gamma}$) au fost obținute pentru temperatura $t = 20^\circ\text{C}$ și $\dot{\gamma} = [0,01 \div 500]\text{s}^{-1}$. Aceste măsurători de viscozitate au fost realizate cu testul „Loop” (dus- întors) crescând monoton viteza de forfecare până la valoarea maximă, revenind apoi monoton la valoarea inițială. Atunci când revenirea are loc cu aceeași valoare a viscozității, constantă la variația vitezei de forfecare, spunem că proba se comportă newtonian, iar dacă viscozitatea variază cu viteza de forfecare, iar valorile viscozității dinamice diferă la întoarcere în testul „Loop” (apare o buclă de histererezis), proba prezintă pseudoplasticitate și tixotropie [240,241,242,243]. Pentru caracterizarea unei astfel de probe este necesară efectuarea unor teste suplimentare față de o probă cu comportare newtoniană.
- Curbele „Creep” (γ -t) s-au efectuat la $t = 20^\circ\text{C}$, aplicând succesiv o tensiune de forfecare $\tau = 15\text{ Pa}$, apoi 0 Pa , urmată de 20 Pa și din nou 0 Pa , urmărind evoluția în timp a deformației γ . Atunci când la îndepărtarea tensiunii de forfecare deformația se recuperează total, proba se comportă ca un solid elastic ideal, dacă nu se recuperează nimic comportarea este complexă, vâscoelastică [241, 242].
- Testele „Amplitude Sweep” au fost efectuate pe intervalul deformațiilor cuprinse între $[0,01- 1]\%$, la o temperatură $t = 20^\circ\text{C}$ și o frecvență de oscilație $\omega = 10\text{ s}^{-1}$.
- Pentru testele „Frequency Sweep” s-a fixat valoarea deformației la cea critică, obținută din testul „Amplitude Sweep”, iar frecvența de oscilație a fost variată logaritmic în intervalul $[0,01- 100]\text{ s}^{-1}$.
- Curbele viscozitate dinamică- temperatură (η -t) au fost măsurate la temperaturi cuprinse în intervalul $[20- 60]^\circ\text{C}$, cu o viteză de forfecare $\dot{\gamma} = 1\text{ s}^{-1}$.
- Toate testele au fost efectuate în condiții normale de presiune.

Datele η -t au fost fitate utilizând programul Origin 6.0 (metoda celor mai mici pătrate) cu formula:

$$\eta = \eta_{\infty} + c \dot{\gamma}^{-n},$$

în care: η_{∞} , c și n reprezintă parametrii de fit; constanta η_{∞} are semnificația viscozității la viteze de forfecare infinit de mari, iar constantele c și n nu au semnificație fizică.

Figura 3.87. (vezi 3.3.2.1. Rezultate și discuții) prezintă fitarea datelor experimentale cu formula de mai sus, iar valorile obținute pentru parametrii de fit η_{∞} , c și n sunt cele din tabelul 3.38. (vezi 3.3.2.1. Rezultate și discuții).

Rezultatele tuturor testelor reologice efectuate asupra celor două unguente sunt prezentate în figurile 3.86., 3.88.-3.93. (vezi 3.3.2.1. Rezultate și discuții).

3.2.2.2. Utilizarea unor furaje bogate în pigmenți carotenoidici în hrana găinilor (*Gallus gallus domesticus*)

• Introducere

Păsările, ca și toate celelalte animale, nu au capacitatea de a sintetiza carotenoide *de novo*. Ele sunt capabile însă, să transforme și să depoziteze carotenoidele ingerate. Acestea determină colorarea unor țesuturi sau organe în care sunt depozitate, așa cum sunt: pielea, grăsimea corpului și a picioarelor, ciocul, penele, gălbenușul ouălor [59].

Atunci când hrana găinilor este săracă în carotenoide sau în perioadele când absorbția și depozitarea carotenoidelor este deficitară (în verile caniculare și în iernile geroase, când această scădere ajunge până la 33%, odată cu micșorarea accentuată a producției de ouă [1]), se impune adăugarea unor surse naturale bogate în carotenoide, pentru a asigura o bună producție de ouă cu o valoare biologică mai ridicată și o pigmentație mai intensă a gălbenușului. Făina de fructe de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*) este o sursă bogată de pigmenți carotenoidici, dar și de vitamine, acizi grași superiori, glicozide, alcaloizi, uleiuri eterice [244].

Ne-am propus să urmărim gradul de acumulare al carotenoidelor în gălbenușul ouălor de găină, precum și producția de ouă, în funcție de furajarea cu sau fără adaus de făină de fructe de cătină albă în hrana acestora.

• Loturile experimentale și furajarea lor

Cercetările s-au efectuat pe trei loturi, a câte 20 de găini, rasa Italiană, în vârstă de 27 săptămâni, crescute în condiții strict experimentale de la vârsta de pui de o zi, la o fermă avicolă particulară din Dumbrăvița, județul Timiș. Toate loturile de găini au primit același furaj concentrat de bază. Lotul 1 a servit drept martor, iar la celelalte două loturi s-a adăugat făină din fructe coapte de cătină albă, în proporție de 2,5%, respectiv 4%. Experiența a fost precedată de o perioadă preexperimentală de două săptămâni. În tabelul 3.7. este prezentată componența hranei administrate găinilor pe perioada experienței.

Tabelul 3.7.*Componența furajului administrat găinilor în timpul experimentului (%)*

| Denumirea componentei din furaj | Lotul de găini | | |
|---------------------------------|----------------|--------|--------|
| | I | II | III |
| Făină de porumb | 69,00 | 66,50 | 65,00 |
| Șrot de floarea soarelui | 13,00 | 13,00 | 13,00 |
| Șrot de soia | 6,00 | 6,00 | 6,00 |
| Premix vitamino-mineral | 11,70 | 11,70 | 11,70 |
| Sare de bucătărie | 0,30 | 0,30 | 0,30 |
| Făină din fructe de cătină albă | - | 2,50 | 4,00 |
| Total | 100,00 | 100,00 | 100,00 |

Loturile de găini au fost ținute în padocuri închise, asigurându-se condiții optime de hrană, apă, microclimat și igienă.

Analiza pigmentilor carotenoidici din gălbenușurile ouălor s-a făcut din 5 în 5 zile de la începerea experienței, timp de 40 de zile de furajare diferențiată și a continuat încă 15 zile după încetarea hrănirii găinilor cu furaj diferențiat, pentru a se stabili timpul în care pigmentii ingerați se elimină din organism.

• **Determinarea carotenoidelor din furaje și ouă**

➤ *Extracția*

Pentru extracția pigmentilor carotenoidici din furaj, făină de cătină albă și gălbenuș de ou s-au folosit metode adecvate, astfel:

- *extracția din furaj:* la 50,00g furaj măcinat s-au adăugat 75 ml soluție etanolică de KOH 8% și s-a lăsat la temperatura camerei, la întuneric, timp de 16 ore, în vederea saponificării. După aceea s-au extras carotenoidele cu 100 ml eter de petrol și apoi cu încă 200 ml amestec eter de petrol: benzen (5:1). Extractele au fost apoi spălate cu o soluție saturată de NaCl și apoi cu apă distilată, până la îndepărtarea completă a săpunurilor și alcaliilor. După deshidratare peste Na₂SO₄ anhidru, s-a îndepărtat solvenul sub vid, la 35 °C, într-un evaporator rotativ. Carotenoidele au fost apoi redizolvate în eter de petrol în vederea cromatografierii și spectrofotometrării.
- *Extracția din făina de fructe de cătină albă:* o cantitate de 5,00g făină de fructe de cătină albă (soiul *Serpeni 11*) a fost supusă extracției repetate cu un amestec eter de petrol: etanol 96% (8:1), la temperatura camerei, într-un balon de 500 ml cu fund plat și dop rodat, până la epuizarea materialului vegetal. Apoi, extractele reunite au fost concentrate sub vid, la 35 °C, până la un volum mai mic, după care s-au adăugat 25 ml soluție etanolică de KOH 18% și s-a lăsat 16 ore la temperatura camerei și la întuneric, sub atmosferă de azot în vederea saponificării. După saponificare, carotenoidele au fost reextrase cu eter de petrol și apoi spălate de mai multe ori cu o soluție saturată de NaCl și în final cu apă distilată, într-o pâlnie de separare de 500 ml. Extractul eteric a fost uscat peste Na₂SO₄ anhidru și apoi concentrat sub vid, la 35 °C, până la îndepărtarea solvenului.
- *Extracția din gălbenușul de ou:* din fiecare lot s-au luat 8 ouă, s-au separat gălbenușurile, s-au amestecat bine și apoi s-au cântărit 20,00 g care s-au introdus într-un pahar Berzelius de 500 ml și s-au tratat cu 75 ml acetonă (p.a., Chimopar, București) agitându-se bine cu o baghetă de sticlă. S-au adăugat porțiuni de 100 ml dintr-un amestec de solvenți format din 850 ml eter de petrol și 50 ml etanol 96% (agitându-se bine după fiecare adaus și filtrând extractul obținut) până la decolorarea materialului (solvenul de

extracție nu se mai colorează) [103]. Extractele reunite au fost în continuare supuse concentrării sub vid și apoi saponificării, ca și în cazul făinii de cătină.

➤ *Separarea.*

Extractele obținute au fost trecute preintr-o coloană cromatografică umplută cu amestec de oxid de magneziu și nisip fin (în raport de 1:2), pentru fiecare tip de extract obținându-se trei fracții, corespunzătoare eluenților folosiți (eter de petrol, eter de petrol : eter etilic = 1:1, eter etilic). Aceste fracții au fost recromatografiate pe strat subțire pentru separarea carotenoidelor majore prezente. Pentru separarea α -carotenului, β -carotenului, ϵ -carotenului, δ -carotenului, γ -carotenului și licope-nului s-au folosit plăci de MgO activat (Merck) și un amestec de solvenți de dezvoltare format din eter de petrol: benzen (Chimopar, București) (50: 50, v:v), iar pentru separarea criptoxantinei, luteinei, zeaxantinei și violaxantinei s-au folosit plăci de silicagel activat (Merck), iar ca dezvoltant, un amestec de clorură de metilen (Merck): acetat de etil (Chimopar, București) (80:20, v:v) [92]. Valorile R_f obținute au fost comparate cu cele din datele de literatură pentru aceleași condiții de lucru (tabelul 3.8). Benzile rezultate au fost gratate, carotenoidele au fost desorbite cu solvenți potriviți, iar soluțiile obținute au fost concentrate în vederea spectrofotometrării.

Tabelul 3.8.

Valorile R_f pentru carotenoide (distanța de migrare: 12-16 cm, interval de migrare: 40-60 mm) [92]

| Carotenoida | Suportul | Sistemul dezvoltant | R_f |
|---------------------|-------------------|--|-------|
| α -caroten | MgO activat | Eter de petrol: benzen (50:50, v/v) | 0,66 |
| β -caroten | | | 0,49 |
| ϵ -caroten | | | 0,70 |
| δ -caroten | | | 0,20 |
| γ -caroten | | | 0,11 |
| licopen | | | 0,01 |
| criptoxantină | Silicagel activat | Clorură de metilen: acetat de etil (80:20, v/v) | 0,75 |
| luteină | | | 0,35 |
| zeaxantină | | | 0,24 |
| violaxantină | | | 0,21 |

➤ *Identificarea*

Compușii carotenoidici izolați au fost identificați prin maximele lor de absorbție în domeniul vizibil, în diferiți solvenți, iar în cazul violaxantinei (carotenoidă epoxidică) s-a efectuat și reacția de culoare cu HCl în eter etilic [245] (când aceasta produce o colorație albastră).

➤ *Dozarea.*

Carotenoidele au fost dozate folosind metoda spectrofotometrică, utilizând un spectrofotometru UV-VIS model Shimadzu 1240, Japonia. Calculul conținutului de pigmenți carotenoidici s-a făcut cu următoarea relație [1,5,79,103]:

$$\mu\text{g carotenoidă/g material vegetal} = \frac{A \cdot V \cdot 10^4}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot m}$$

unde: A este absorbanța;
V – volumul extractului analizat (ml);
 $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ - coeficient specific de absorbție al carotenoidei respective (tabelul 3.9.);
m – masa probei (g).

Tabelul 3.9.Coeficienții specifici de absorbție $A_{1cm}^{1\%}$ ai diferitelor carotenoide [1,5,79]

| Carotenoida | λ_{max} (nm) | Solvent | $A_{1cm}^{1\%}$ |
|-------------------------|----------------------|----------------|-----------------|
| α -Caroten | 444 | Eter de petrol | 2800 |
| β -Caroten | 453 | Eter de petrol | 2592 |
| ϵ -Caroten | 440 | Eter de petrol | 3120 |
| δ -Caroten | 456 | Eter de petrol | 3290 |
| γ -Caroten | 462 | Eter de petrol | 3100 |
| α -Criptoxantină | 446 | Hexan | 2636 |
| β -Criptoxantină | 452 | Eter de petrol | 2386 |
| Luteină | 445 | Etanol | 2550 |
| Zeaxantină | 450 | Etanol | 2540 |
| Licopen | 487 | Benzen | 3370 |
| Violaxantină | 454 | Benzen | 2240 |

Rezultatele obținute privind conținutul de carotenoide majore prezente în furajul de bază și făina de cătină sunt cuprinse în tabelul 3.41. (Rezultate și discuții). Variația conținutului de pigmenți carotenoidici din gălbenșurile ouălor de-a lungul desfășurării experimentului este prezentată în figurile 3.94.-3.103. (tabelul A.4.1. - Anexa 4.), iar variația colorației gălbenșurilor, în tabelul 3.42. (Rezultate și discuții).

3.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

3.3.1. Caracterizarea extractelor carotenoidice

3.3.1.1. Determinarea conținutului de β -caroten și carotenoide totale din extracte prin RP-HPLC

Pe baza curbei de etalonare obținută pentru β -carotenul standard (vezi Partea experimentală, figura 3.1. și metodologia 3.2.1.3.), s-au determinat concentrațiile de β -caroten și conținutul total de pigmenți carotenoidici din probele analizate. Printr-o coloană C18 cu fază inversă se eluează mai întâi carotenoidele cele mai polare (xantofilele dihidroxilice: luteina și zeaxantina, apoi cele monohidroxilice: α - și β -criptoxantina), carotenoidele hidrocarburice (γ -, α -, β -carotenul, fitofluenul, fitoenul) fiind ultimele eluate din coloană [5,124,246,247]. De asemenea, pe baza conținutului total de carotenoide din extracte și a cantității de extract carotenoidic final obținut din fiecare materie primă (vezi tabelele 3.1.-3.6, Partea experimentală), s-a calculat și concentrația procentuală a pigmenților carotenoidici din fiecare extract final obținut.

• Conținutul de β -caroten și carotenoide totale din extractele din boabe de porumb (*Zea mays*)

În urma analizei RP-HPLC a extractelor carotenoidice obținute din cele cinci tipuri de hibridi de porumb analizați (vezi 3.2.1.2.), s-au obținut cromatogramele prezentate în figurile 3.11.-3.15., respectiv cantitățile de carotenoide specificate în tabelele 3.10.-3.15.

Tabelul 3.10.
 Concentrația de β -caroten și carotenoide totale din făina de porumb NSSK444

| Nr. pic | Timp de retenție (min) | Aria (mAU) | A% | Compus identificat cu etalon | Conținutul în materia primă ($\mu\text{g/g}$) |
|---|------------------------|------------|-------|------------------------------|---|
| 1 | 2,074 | 117,27 | 0,61 | - | 7,16 |
| 2 | 2,884 | 2144,18 | 11,13 | - | 130,70 |
| 3 | 3,359 | 3339,42 | 17,33 | - | 203,51 |
| 4 | 3,644 | 772,46 | 4,01 | - | 47,09 |
| 5 | 3,726 | 517,90 | 2,69 | - | 31,59 |
| 6 | 3,844 | 10996,41 | 57,08 | β -Caroten | 670,30 |
| 7 | 4,205 | 1381,29 | 7,17 | - | 84,20 |
| Total carotenoide | | | | | 1174,55 |
| Concentrație carotenoide în extractul final: 82,30% | | | | | |

Din tabelul 3.10., respectiv din figura 3.11., se poate observa un conținut foarte ridicat de β -caroten în făina de porumb NSSK444 (670,30 $\mu\text{g/g}$). În acest tip de hibrid, acesta este carotenoida cea mai abundentă (57,08% din totalul carotenoidelor).

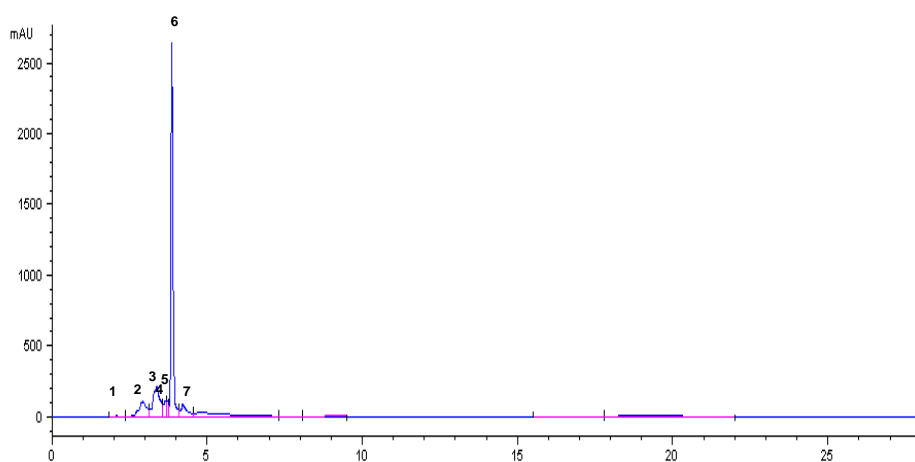


Figura 3.11. - Cromatograma RP_HPLC a extractului carotenoidic din boabe de porumb hibridul NSSK444

În hibridul de porumb NSSK444 (grupa de maturitate convențională FAO 400-500, semitardiv, de proveniență sârbească) se remarcă un conținut total de carotenoide deosebit de ridicat (1174,55 $\mu\text{g/g}$). Concentrația procentuală de pigmenți carotenoidici din extractul final obținut este relativ ridicată: 82,30%.

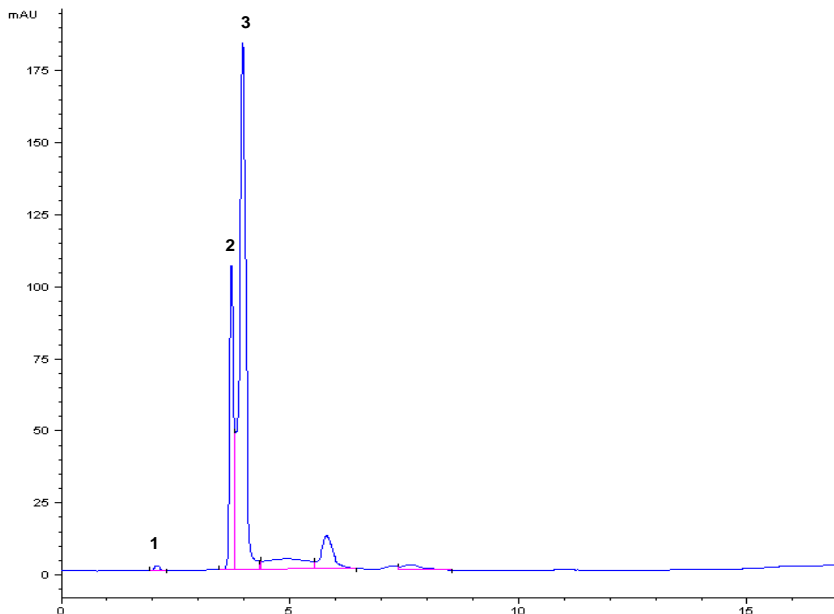


Figura 3.12. -Cromatograma RP_HPLC a extractului carotenoidic din boabe de porumb hibridul NSSK640

Tabelul 3.11.
Carotenoidele identificate în extractul din boabe de porumb NSSK640 și concentrația lor în materia primă

| Nr. pic | Timp de retenție (min) | Aria (mAU) | A% | Compus identificat cu etalon | Conținutul în materia primă (μg/g) |
|---|------------------------|------------|-------|------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 2,083 | 14,90 | 0,62 | - | 3,94 |
| 2 | 3,695 | 703,20 | 29,44 | - | 187,14 |
| 3 | 3,955 | 1670,80 | 69,94 | β-caroten | 444,60 |
| Total carotenoide | | | | | 635,68 |
| Concentrație carotenoide în extractul final: 78,22% | | | | | |

În cazul hibridului NSSK640 (grupa de maturitate convențională FAO peste 600, tardiv, de proveniență sârbească) se remarcă de asemeni un conținut ridicat de β-caroten (444,60 μg/g) și de carotenoide totale (635,687 μg/g). β-carotenul este și în acest tip de hibrid pigmentul majoritar (69,94%). Concentrația procentuală de carotenoide în extractul final obținut este relativ ridicată: 78,22%, ceva mai scăzută decât în cazul extractului din porumb NSSK444.

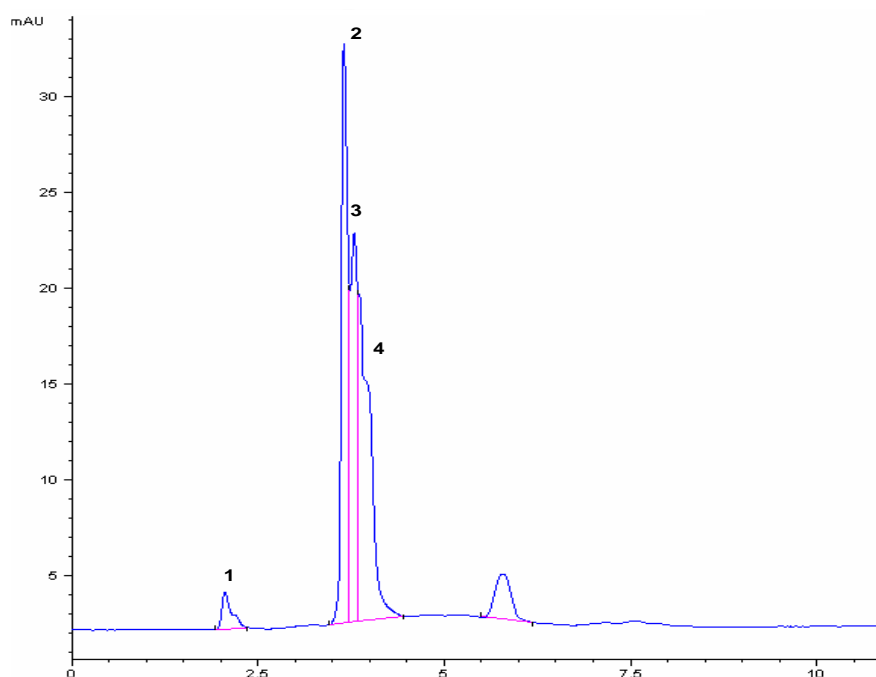


Figura 3.13. –Cromatograma RP_HPLC a extractului carotenoidic din boabe de porumb hibridul Lovrin 400

Tabelul 3.12.

Carotenoidele identificate în extractul din boabe de porumb Lovrin 400 și concentrația lor în materia primă

| Nr. pic | Timp de retenție (min) | Aria (mAU) | A% | Compus identificat cu etalon | Conținutul în materia primă (μg/g) |
|---|------------------------|------------|-------|------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 2,047 | 17,60 | 3,47 | - | 10,84 |
| 2 | 3,644 | 182,50 | 36,03 | - | 112,83 |
| 3 | 3,777 | 119,10 | 23,51 | - | 73,43 |
| 4 | 3,841 | 187,30 | 36,98 | β-caroten | 115,50 |
| Total carotenoide | | | | | 312,30 |
| Concentrație carotenoide în extractul final: 53,15% | | | | | |

Porumbul *Lovrin 400* (grupa de maturitate FAO 500-600, semitardiv, de proveniență românească) se caracterizează printr-un conținut ridicat de β-caroten (115,5 μg/g), însă un conținut mai mic de carotenoide totale decât hibridii NSSK444 și NSSK640 (tabelul 3.12., figura 3.13.). În cazul acestui extract s-a obținut o concentrație procentuală de pigmenți carotenoidici mai scăzută: 53,15%.

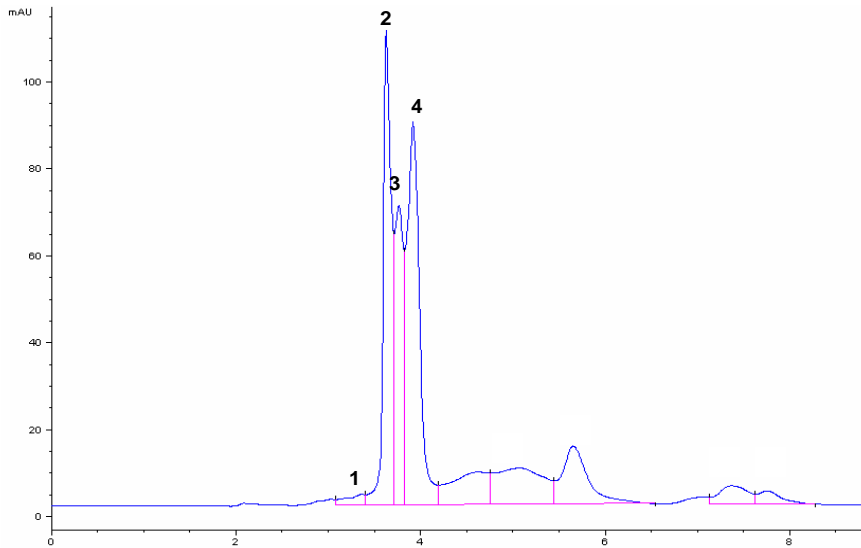


Figura 3.14.- Cromatograma RP_HPLC a extractului carotenoidic din boabe de porumb hibridul Laureat

Tabelul 3.13.

Carotenoidele identificate în extractul din boabe de porumb Laureat și concentrația lor în materia primă

| Nr. pic | Timp de retenție (min) | Aria (mAU) | A% | Compus identificat cu etalon | Conținutul în materia primă (μg/g) |
|---|------------------------|------------|-------|------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 3,357 | 32,70 | 1,64 | - | 14,43 |
| 2 | 3,623 | 684,90 | 34,38 | - | 302,46 |
| 3 | 3,761 | 427,80 | 21,48 | - | 188,97 |
| 4 | 3,913 | 846,60 | 42,50 | β-caroten | 373,90 |
| Total carotenoide | | | | | 879,76 |
| Concentrație carotenoide în extractul final: 78,55% | | | | | |

La hibridul de porumb Laureat (grupa de maturitate FAO 340-360, semitim-puriu, de proveniență românească) se constată de asemeni un conținut ridicat de β-caroten (373,90 μg/g), ca și de carotenoide totale (879,76 μg/g) - tabelul 3.13., figura 3.14. Concentrația procentuală de carotenoide în extractul final obținut este de asemenea destul de ridicată: 78,55%.

Tabelul 3.14.

Carotenoidele identificate în extractul din boabe de porumb NSSK420 și concentrația lor în materia primă

| Nr. pic | Timp de retenție (min) | Aria (mAU) | A% | Compus identificat cu etalon | Conținutul în materia primă (μg/g) |
|---|------------------------|------------|-------|------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 2,666 | 192,50 | 16,66 | - | 82,66 |
| 2 | 4,023 | 703,60 | 60,91 | β-caroten | 302,20 |
| 3 | 4,434 | 259,10 | 22,43 | - | 111,28 |
| Total carotenoide | | | | | 496,14 |
| Concentrație carotenoide în extractul final: 70,31% | | | | | |

Porumbul *NSSK420* (grupa de maturitate convențională FAO 400-500, semitardiv, de proveniență sârbească) se remarcă de asemeni printr-un conținut ridicat în β -caroten (302,20 $\mu\text{g/g}$) și carotenoide totale (879,76 $\mu\text{g/g}$). Concentrația procentuală de carotenoide în extractul final obținut este mai redusă: 70,31% (tabelul 3.14.).

Tabelul 3.15.

Carotenoidele identificate în extractul din boabe de porumb Florencia și concentrația lor în materia primă

| Nr. pic | Timp de retenție (min) | Aria (mAU) | A% | Compus identificat cu etalon | Conținutul în materia primă ($\mu\text{g/g}$) |
|---|------------------------|------------|-------|------------------------------|---|
| 1 | 3,565 | 3347 | 68,83 | - | 289,27 |
| 2 | 3.952 | 1515,7 | 31,17 | β -caroten | 131,00 |
| Total carotenoide | | | | | 420,27 |
| Concentrație carotenoide în extractul final: : 67,95% | | | | | |

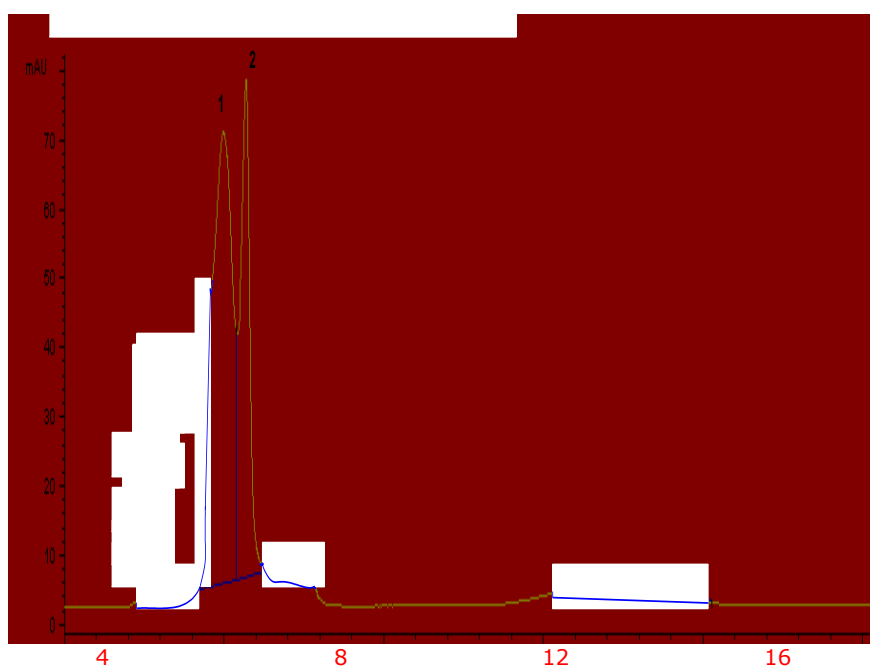


Figura 3.15.- Cromatograma RP_HPLC a extractului carotenoidic din boabe de porumb hibridul Florencia

În extractul carotenoidic din hibridul *Florencia* (grupa de maturitate convențională FAO 500-600, semitardiv, de proveniență americană) β -carotenul se află într-o proporție de 31,17%, concentrația sa în materia primă fiind de 131,00 $\mu\text{g/g}$ (tabelul 3.15., figura 3.15.). Conținutul total de pigmenți carotenoidici din acest hibrid de porumb (420,21 $\mu\text{g/g}$) este ceva mai ridicat decât cel din hibridul *Lovrin 400* și puțin mai scăzut decât cel din hibridul *NSSK420*. Concentrația procentuală de carotenoide în extractul final obținut este de 67,95%.

Rezultatele experimentale obținute de noi conduc la următoarele concluzii:

- Conținutul de β -caroten și de carotenoide totale din toți hibridii de porumb analizați este foarte ridicat în comparație cu datele de literatură privind alte tipuri de hibridi de porumb (2-18 μg β -caroten/g făină, respectiv 30-100 μg carotenoide totale/ g făină) [1,5,79, 248,249,250]. Aceasta se poate explica prin orientarea cercetărilor genetice din ultimele decenii spre obținerea unor noi hibridi de porumb cu un conținut ridicat de pigmenți carotenoidici, în special de β -caroten și alte carotenoide provitaminice (așa-numitul porumb biofortificat), în scopul măririi valorii nutritive a porumbului [251,252].
 - Asupra rezultatelor a avut influență mare și metoda de extracție a compușilor carotenoidici propusă de noi, metodă care a condus la decolorarea completă a făinii de porumb (în cazul metodelor descrise în literatură făina nu se decolorează complet iar solventul rămâne incolor).
 - În metoda aplicată de noi, prin macerarea făinii de porumb cu apă și etanol 96%, înaintea extracției propriuzise, s-a asigurat hidrolizarea amidonului și eliberarea carotenoidelor din celule.
- În figura 3.16. este prezentat comparativ conținutul de β -caroten și respectiv, carotenoide totale din hibridii de porumb luați în studiu.

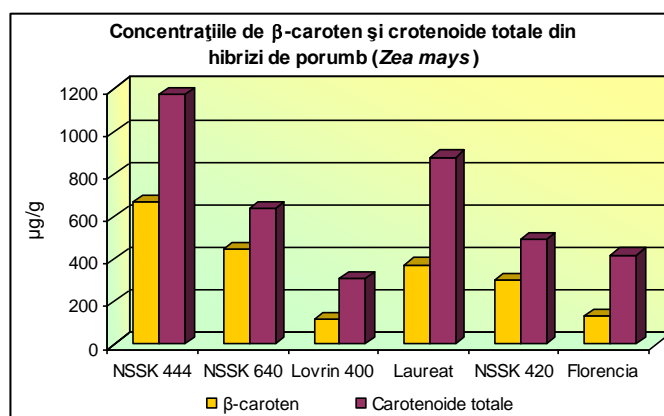


Figura 3.16. - Conținutul de β -caroten și carotenoide totale din hibridii de porumb

- **Conținutul de β -caroten și carotenoide totale din extractele obținute din fructele de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*)**

Prin analiza RP-HPLC a extractelor carotenoidice din fructe de cătină albă, obținute conform 3.2.1.2., s-au obținut rezultatele prezentate în figurile 3.17 și 3.18, tabelele 3.16 și 3.17.

Tabelul 3.16.

Carotenoidele identificate în extractul din fructe de cătină albă soiul Delta 1 și concentrația lor în materia primă

| Nr. pic | Timp de retenție (min) | Aria (mAU) | A% | Compus identificat cu etalon | Conținutul în materia primă (μg/g) |
|---|------------------------|------------|-------|------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 3,558 | 209,00 | 40,64 | - | 391,13 |
| 2 | 3,711 | 226,10 | 43,96 | - | 423,08 |
| 3 | 3,882 | 79,20 | 15,40 | β-caroten | 184,21 |
| Total carotenoide | | | | | 962,42 |
| Concentrație carotenoide în extractul final: 71,76% | | | | | |

Tabelul 3.17.

Carotenoidele identificate în extractul din fructe de cătină albă soiul Ciumași și concentrația lor în materia primă

| Nr. pic | Timp de retenție (min) | Aria (mAU) | A% | Compus identificat cu etalon | Conținutul în materia primă (μg/g) |
|---|------------------------|------------|-----|------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 3,957 | 1570,40 | 100 | β-caroten | 1086,60 |
| Total carotenoide | | | | | 1086,60 |
| Concentrație carotenoide în extractul final: 72,12% | | | | | |

Analizând datele din tabelul 3.16. se constată un conținut ridicat de carotenoide totale (962,42 μg/g) și de β-caroten (184,21 μg/g) în extractul din fructe de cătină albă, soiul *Delta 1*. Valorile obținute privind conținutul total de carotenoide sunt apropiate de cele din datele de literatură (314-2139 μg/g) [253-255]. Concentrația procentuală de carotenoide în extractul final obținut este relativ ridicată: 71,76%.

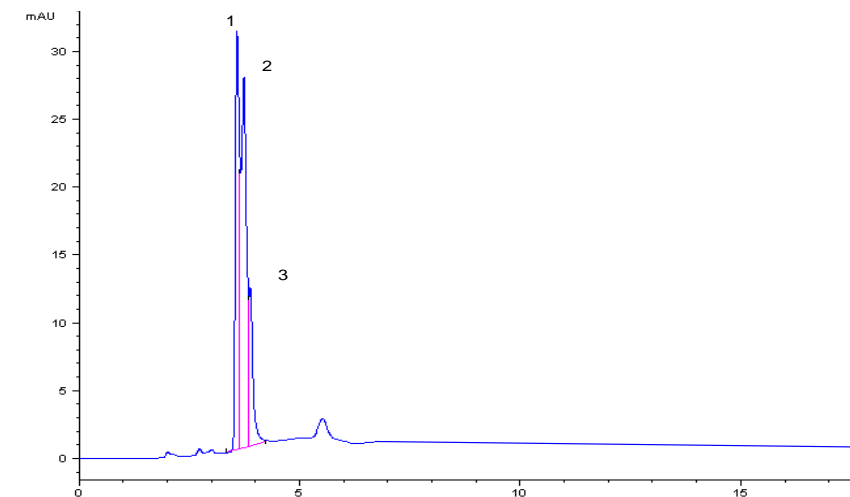


Figura 3.17.- Cromatograma RP_HPLC a extractului carotenoidic din fructe de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*) soiul Delta 1

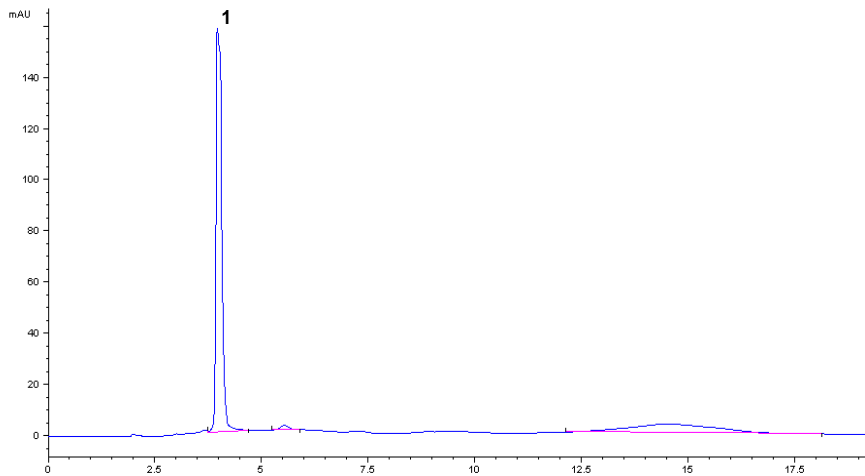


Figura 3.18.- Cromatograma RP_HPLC a extractului carotenoidic din fructe de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*) soiul Ciumași

În soiul *Ciumași* β -carotenul a fost singura carotenoidă identificată prin RP-HPLC, fiind prezentă în cantitate foarte mare (1086,60 $\mu\text{g/g}$). Concentrația procentuală de carotenoide în extractul final obținut este de 72,12%.

Comparând conținutul total de carotenoide pentru cele două soiuri de cătină albă luate în studiu (figura 3.19.) valorile sunt apropiate.

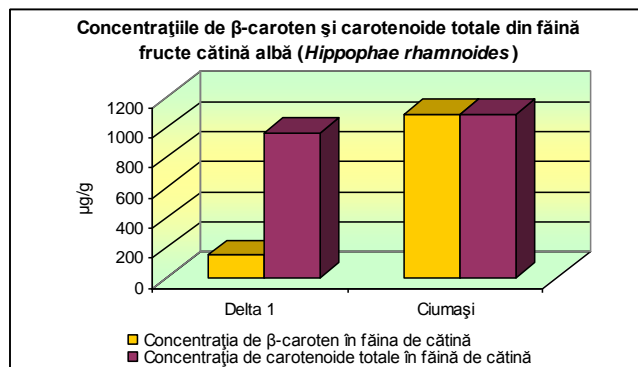


Figura 3.19.- Conținutul de β -caroten și carotenoide totale din făină fructe cătină albă (*Hippophae rhamnoides*)

• **Conținutul de β -caroten și carotenoide totale din extractul obținut din flori de gălbenele (*Calendula officinalis*)**

Prin analiza RP-HPLC a extractului carotenoidic din flori de gălbenele (vezi 3.2.1.2.), s-au obținut rezultatele prezentate în figura 3.20., respectiv tabelul 3.18.

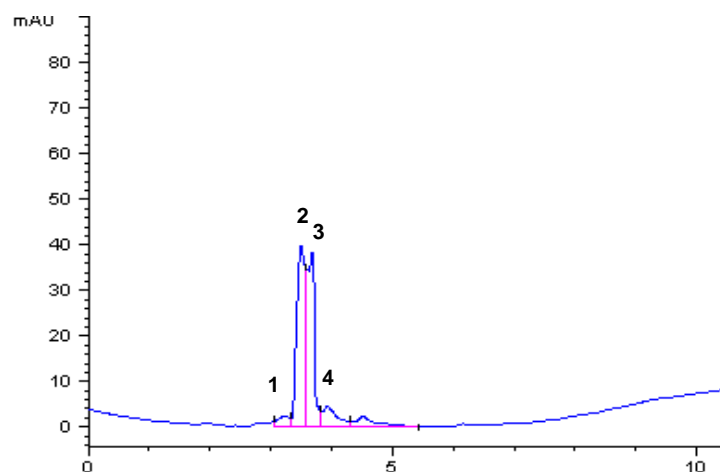


Figura 3.20. - Cromatograma RP_HPLC a extractului carotenoidic din flori de gălbenele (*Calendula officinalis*)

Tabelul 3.18.

Carotenoidele identificate în extractul din flori de gălbenele și concentrația lor în materia primă

| Nr. pic | Timp de retenție (min) | Aria (mAU) | A% | Compus identificat cu etalon | Conținutul în materia primă (μg/g) |
|---|------------------------|------------|-------|------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 3,206 | 29,95 | 3,70 | - | 61,69 |
| 2 | 3,477 | 424,4 | 52,46 | - | 874,73 |
| 3 | 3,654 | 284,14 | 35,12 | - | 585,60 |
| 4 | 3,922 | 70,54 | 8,72 | β- Caroten | 145,40 |
| Total carotenoide | | | | | 1667,42 |
| Concentrație carotenoide în extractul final: 78,87% | | | | | |

Se remarcă un conținut foarte ridicat de carotenoide totale în florile de gălbenele (1667,42 μg/g), β-carotenul fiind în cantitate de 145,40 μg/g. Valorile se încadrează în limitele găsite în datele de literatură (482-2760 μg/g) [1,40].

Concentrația procentuală de carotenoide în extractul final obținut este relativ ridicată: 78,87%.

• **Conținutul de β-caroten și carotenoide totale din extractele obținute din fructe de piersici (*Persica vulgaris*)**

Rezultatele analizelor RP-HPLC pentru extractele carotenoidice din fructe de piersici, soiul *Red Haven*, pulpă și pericarp, obținute conform 3.2.1.2. sunt prezentate în figurile 3.21. și 3.22., tabelele 3.19 și 3.20.

Tabelul 3.19.

Carotenoidele identificate în extractul din pulpă de piersică, soiul Red Haven și concentrația lor în materia primă

| Nr. pic | Timp de retenție (min) | Aria (mAU) | A% | Compus identificat cu etalon | Conținutul în materia primă (μg/g) |
|---|------------------------|------------|-------|------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 2,509 | 1740,70 | 73,03 | - | 151,49 |
| 2 | 3,336 | 343,30 | 14,40 | - | 29,85 |
| 3 | 3,852 | 131,00 | 5,50 | β- Caroten | 11,40 |
| 4 | 4,202 | 93,50 | 3,92 | - | 8,16 |
| 5 | 4,598 | 74,90 | 3,14 | - | 6,51 |
| Total carotenoide | | | | | 207,38 |
| Concentrație carotenoide în extractul final: 51,79% | | | | | |

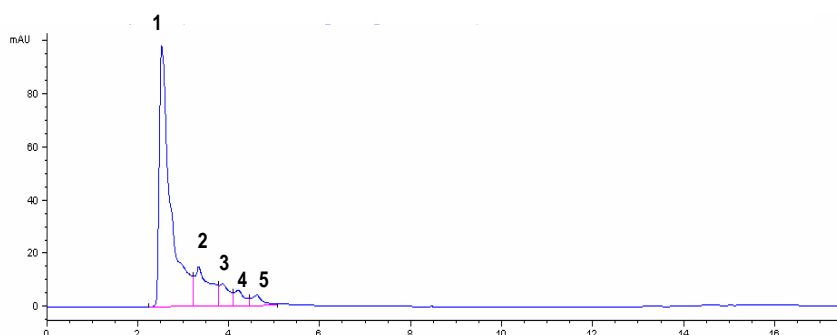


Figura 3.21.- Cromatograma RP_HPLC a extractului carotenoidic din pulpă de piersici (*Persica vulgaris*)soiul Red Haven

Din tabelul 3.19. se poate observa că pulpa de piersică soiul Red Haven, prezintă un conținut ridicat de carotenoide totale (151,49 μg/g), în care β-carotenul se află în proporție de 5,5% (11,40 μg/g). Valorile obținute sunt mai ridicate decât datele de literatură privitoare la alte soiuri de piersici [5,42]. Concentrația procentuală de carotenoide în extract este mai scăzută: 51,79%.

Tabelul 3.20.

Carotenoidele identificate în extractul din pericarp de piersică, soiul Red Haven și concentrația lor în materia primă

| Nr. pic | Timp de retenție (min) | Aria (mAU) | A% | Compus identificat cu etalon | Conținutul în materia primă (μg/g) |
|---|------------------------|------------|-------|------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 2.523 | 1062.5 | 67.74 | - | 338,70 |
| 2 | 3.335 | 280.8 | 17.90 | - | 89,50 |
| 3 | 3.842 | 96.3 | 6.14 | β- Caroten | 30,70 |
| 4 | 4.203 | 67.1 | 4.28 | - | 21,40 |
| 5 | 4.563 | 61.9 | 3.95 | - | 19,75 |
| Total carotenoide | | | | | 500,05 |
| Concentrație carotenoide în extractul final: 52,47% | | | | | |

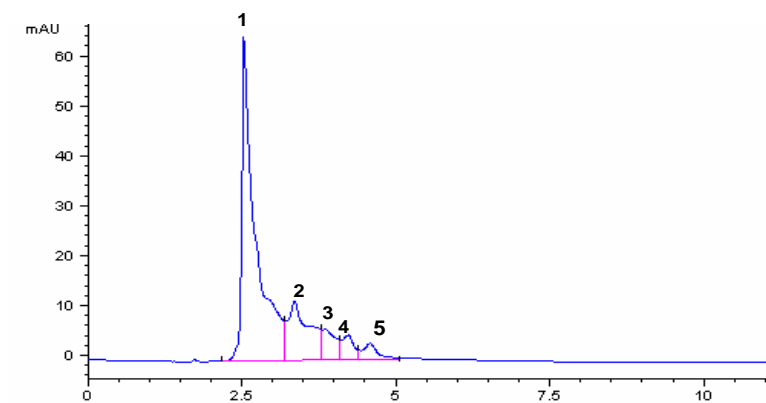


Figura 3.22. - Cromatograma RP_HPLC a extractului carotenoidic din pericarp de piersici (*Persica vulgaris*) soiul Red Haven

Deși s-au identificat aceleași carotenoide în pulpa și în pericarpul de piersică soiul *Red Haven*, pericarpul are un conținut aproape dublu de carotenoide totale (500,05 $\mu\text{g/g}$) față de pulpă. β -Carotenul se găsește în proporție de 6,14 % (30,70 $\mu\text{g/g}$). Concentrația procentuală de carotenoide în extractul final obținut este apropiată de cea din extractul din pulpă de piersică: 52,47%.

Figura 3.23. prezintă comparativ conținutul de carotenoide totale, respectiv de β -caroten din pulpa și pericarpul de piersică, soiul *Red Haven*

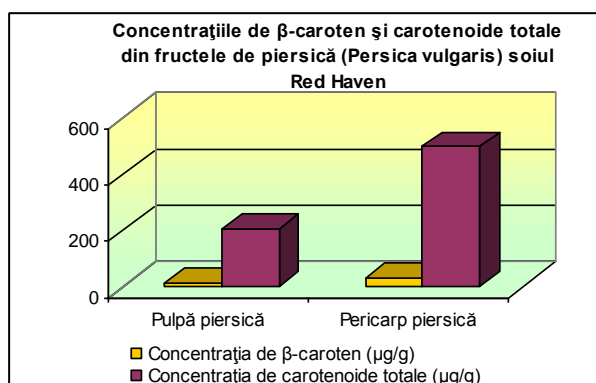


Figura 3.23.-Conținutul de β -caroten și carotenoide totale din pulpă și pericarp de piersică (*Persica vulgaris*), soiul Red haven

• **Conținutul de β -caroten și carotenoide totale din extractele obținute din fructe de portocale (*Citrus sinensis*)**

Rezultatele analizelor RP-HPLC ale extractelor carotenoidice din pulpă de portocală, flavedo de portocală și albedo de portocală, obținute conform 3.2.1.2. sunt prezentate în tabelele 3.21.-3.23., figurile 3.24.-3.26.

Tabelul 3.21.

Carotenoidele identificate în extractul din pulpă de portocală, soiul Valencia și concentrația lor în materia primă

| Nr. pic | Timp de retenție (min) | Aria (mAU) | A% | Compus identificat cu etalon | Conținutul în materia primă (μg/g) |
|---|------------------------|------------|-------|------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 3,006 | 40,59 | 8,88 | - | 6,90 |
| 2 | 3,595 | 29,53 | 6,46 | - | 5,02 |
| 3 | 3,831 | 386,98 | 84,66 | β-caroten | 65,80 |
| Total carotenoide | | | | | 77,72 |
| Concentrație carotenoide în extractul final: 25,69% | | | | | |

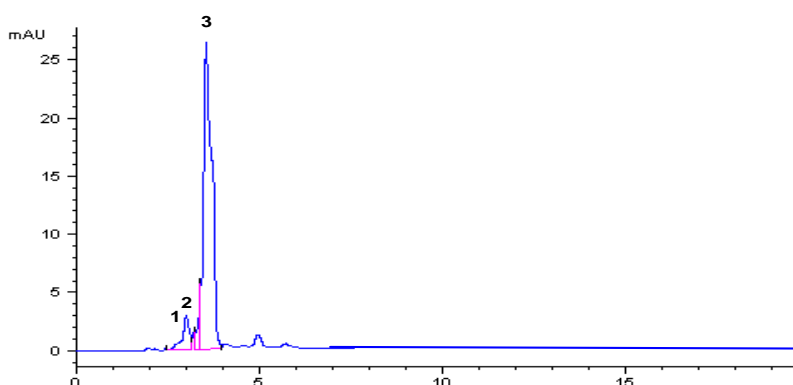


Figura 3.24. - Cromatograma RP_HPLC a extractului carotenoidic din pulpă de portocală (*Citrus sinensis*) soiul Valencia

Pulpa de portocale, soiul *Valencia*, prezintă un conținut de carotenoide totale de 77,72 μg/g, din care 84,66% este β-caroten, acesta fiind compusul carotenoidic majoritar. Rezultatele obținute sunt mai mari decât datele de literatură studiate (carotenoide totale: 20-30 μg/g) [256,257], datorită folosirii unor condiții de lucru diferite precum și datorită variației conținutului de pigmenți carotenoidici din plante cu factorii pedoclimatici. Concentrația procentuală de carotenoide în extractul final obținut este însă scăzută: 25,69%.

Tabelul 3.22.

Carotenoidele identificate în extractul din flavedo de portocală, soiul Valencia și concentrația lor în materia primă

| Nr. pic | Timp de retenție (min) | Aria (mAU) | A% | Compus identificat cu etalon | Conținutul în materia primă (μg/g) |
|--|------------------------|------------|-------|------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 2,995 | 25,95 | 6,31 | - | 16,12 |
| 2 | 3,202 | 21,33 | 5,19 | - | 13,25 |
| 3 | 3,614 | 275,84 | 67,05 | - | 171,29 |
| 4 | 3,873 | 88,25 | 21,45 | β-caroten | 54,80 |
| Total carotenoide | | | | | 255,46 |
| Concentrație carotenoide în extractul final (%):46,90% | | | | | |

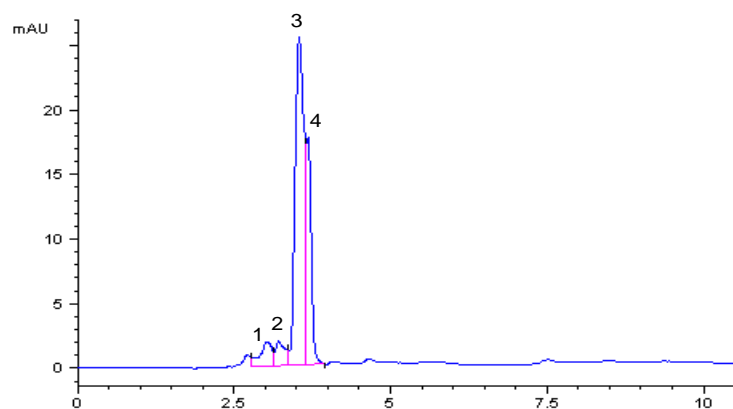


Figura 3.25.- Cromatograma RP_HPLC a extractului carotenoidic din flavedo de portocală (*Citrus sinensis*) soiul Valencia

În flavedo de portocală se remarcă un conținut de carotenoide totale (255,46 $\mu\text{g/g}$) de peste trei ori mai mare decât în pulpă. β -carotenul se găsește în cantitate mai mică decât în pulpă, respectiv 54,80 $\mu\text{g/g}$ (21,45%). Concentrația procentuală de carotenoide în extractul final obținut este de 46,90%.

Tabelul 3.23.

Carotenoidele identificate în extractul din albedo de portocală, soiul Valencia și concentrația lor în materia primă

| Nr. pic | Timp de retenție (min) | Aria (mAU) | A% | Compus identificat cu etalon | Conținutul în materia primă ($\mu\text{g/g}$) |
|---|------------------------|------------|-------|------------------------------|---|
| 1 | 2.943 | 21.2 | 5.40 | - | 12,64 |
| 2 | 3.236 | 24.5 | 6.25 | - | 14,63 |
| 3 | 3.856 | 346.6 | 88.35 | β -caroten | 206,80 |
| Total carotenoide | | | | | 234,07 |
| Concentrație carotenoide în extractul final (%): 48,18% | | | | | |

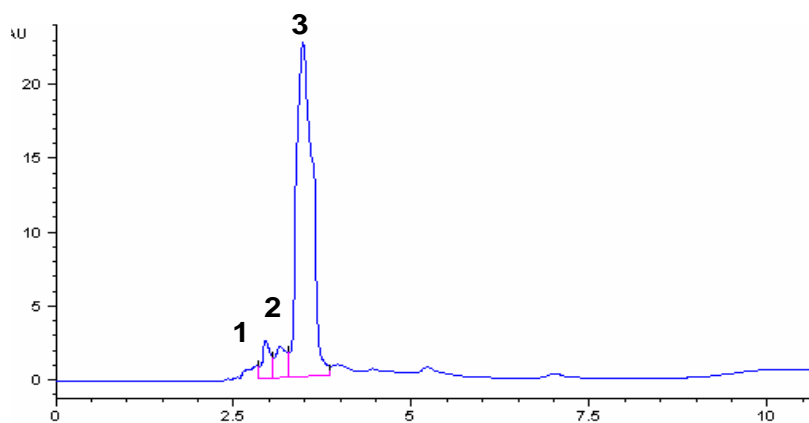


Figura 3.26.- Cromatograma RP_HPLC a extractului carotenoidic din albedo de portocală (*Citrus sinensis*) soiul Valencia

Conținutul de carotenoide totale din albedo de portocală (234,07 $\mu\text{g/g}$) este foarte apropiat de cel din flavedo, carotenoida majoritară în albedo fiind β -carotenul (88,35%). Concentrația procentuală de carotenoide în extractul final obținut este de 48,18%, foarte apropiată de cea din extractul din flavedo de portocale (46,90%).

Se constată că cel mai ridicat conținut de pigmenți carotenoidici se găsește în flavedo de portocală (255,66 $\mu\text{g/g}$), iar cel mai ridicat conținut de β -caroten se află în albedo de portocală (206,80 $\mu\text{g/g}$).

Valorile obținute privind conținutul de carotenoide totale și de β -caroten din flavedo și albedo de portocală, sunt mai mari decât datele de literatură studiate (β -caroten: 8-30 $\mu\text{g/g}$ material proaspăt, carotenoide totale: 100-120 $\mu\text{g/g}$ material proaspăt) [5, 250, 256, 257], datorită utilizării pericarpului de portocală în prealabil uscat, folosirii unor condiții de lucru diferite precum și datorită variației conținutului de pigmenți carotenoidici din plante cu factorii pedoclimatici.

În figura 3.27. se prezintă comparativ conținutul de carotenoide totale și respectiv cel de β -caroten, pentru pulpa de portocale (soiul *Valencia*), flavedo și albedo.

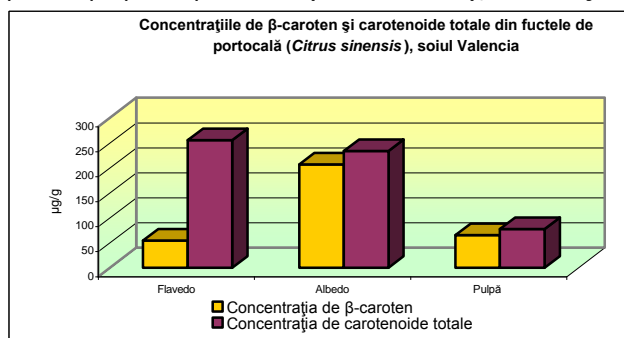


Figura 3.27. - Conținutul de β -caroten și carotenoide totale din flavedo, albedo și pulpă de portocală (*Citrus sinensis*), soiul Valencia

- **Conținutul de β -caroten și carotenoide totale din extractele obținute din rostopască (*Chelidonium majus*)**

Analizele RP-HPLC ale extractelor carotenoidice obținute din diferite părți anatomice ale plantei de rostopască (vezi 3.2.1.2.) au condus la rezultatele prezentate în figurile 3.28- 3.31., tabelele 3.24.- 3.27.

Tabelul 3.24.

Carotenoidele identificate în extractul din tulpină de rostopască și concentrația lor în materia primă

| Nr. pic | Timp de retenție (min) | Aria (mAU) | A% | Compus identificat cu etalon | Conținutul în materia primă ($\mu\text{g/g}$) |
|---|------------------------|------------|-------|------------------------------|---|
| 1 | 2,15 | 792,25 | 82,27 | - | 856,44 |
| 2 | 3,561 | 63,18 | 6,56 | - | 68,29 |
| 3 | 3,737 | 58,31 | 6,06 | - | 63,08 |
| 4 | 3,918 | 49,28 | 5,12 | β -caroten | 53,30 |
| Total carotenoide | | | | | 1041,11 |
| Concentrație carotenoide în extractul final: 63,57% | | | | | |

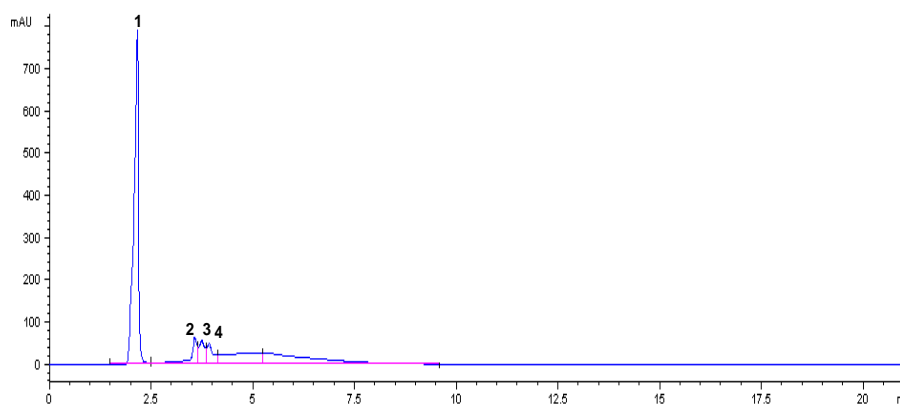


Figura 3.28.- Cromatograma RP_HPLC a extractului carotenoidic din tulpină de rostopască (*Chelidonium majus*)

Tulpina de rostopască prezintă un conținut foarte ridicat de carotenoide totale (1041,11 $\mu\text{g/g}$), comparabil cu datele de literatură [210], conținutul de β -caroten fiind de 53,30 $\mu\text{g/g}$. Concentrația procentuală de carotenoide în extractul final obținut este de 63,57%.

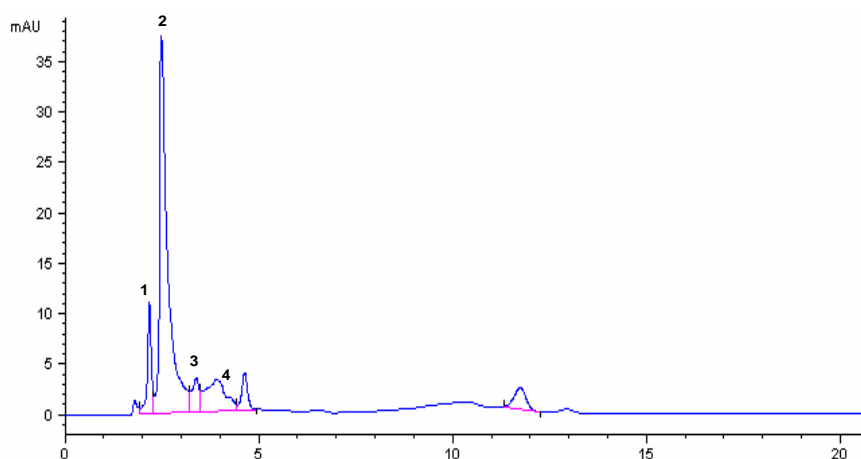


Figura 3.29.- Cromatograma RP_HPLC a extractului carotenoidic din frunze de rostopască (*Chelidonium majus*)

Tabelul 3.23.

Carotenoidele identificate în extractul din frunze de rostopască și concentrația lor în materia primă

| Nr. pic | Timp de retenție (min) | Aria (mAU) | A% | Compus identificat cu etalon | Conținutul în materia primă ($\mu\text{g/g}$) |
|---|------------------------|------------|-------|------------------------------|---|
| 1 | 2,146 | 80,10 | 9,64 | - | 97,07 |
| 2 | 2,481 | 585,50 | 70,45 | - | 709,42 |
| 3 | 3,363 | 46,60 | 5,61 | - | 56,49 |
| 4 | 3,884 | 118,90 | 14,31 | β -caroten | 144,10 |
| Total carotenoide | | | | | 1007,06 |
| Concentrație carotenoide în extractul final: 73,87% | | | | | |

În cazul frunzelor de rostopască, conținutul total de carotenoide (1007,06 $\mu\text{g/g}$), este foarte apropiat de cel al tulpinii. β -Carotenul se află în proporție de 14,31% (144,10 $\mu\text{g/g}$) - figura 3.29., tabelul 3.25. Concentrația procentuală de carotenoide în extractul final obținut este de 73,87%, mai ridicată decât în cazul extractului din tulpină de rostopască (63,57%)

Tabelul 3.26.

Carotenoidele identificate în extractul din flori de rostopască și concentrația lor în materia primă

| Nr. pic | Timp de retenție (min) | Aria (mAU) | A% | Compus identificat cu etalon | Conținutul în materia primă ($\mu\text{g/g}$) |
|---|------------------------|------------|-------|------------------------------|---|
| 1 | 2,514 | 1205,10 | 52,84 | - | 727,98 |
| 2 | 2,91 | 159,30 | 6,98 | - | 96,16 |
| 3 | 3,365 | 304,60 | 13,36 | - | 184,06 |
| 4 | 3,925 | 611,70 | 26,82 | β -caroten | 369,50 |
| Total carotenoide | | | | | 1377,70 |
| Concentrație carotenoide în extractul final: 71,72% | | | | | |

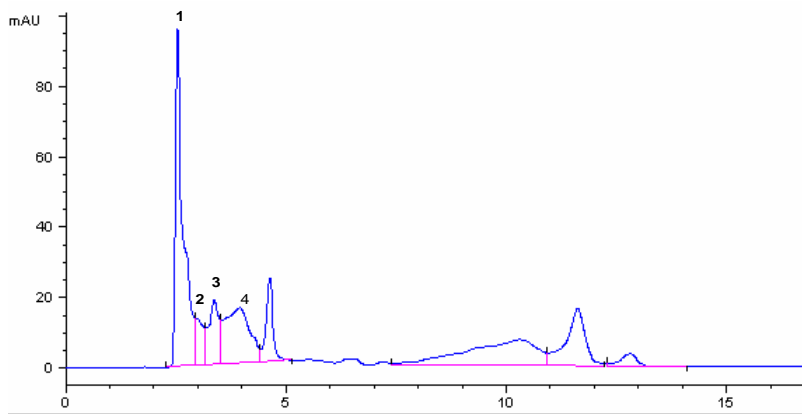


Figura 3.30.- Cromatograma RP_HPLC a extractului carotenoidic din flori de rostopască (*Chelidonium majus*)

Florile de rostopască prezintă un conținut total de carotenoide (1377,70 $\mu\text{g/g}$) mai mare decât tulpina și frunzele (figura 3.30., tabelul 3.26.), comparabil cu datele de literatură [210], β -carotenul aflându-se în cantitate de 369,5 $\mu\text{g/g}$ (26,82%). Concentrația procentuală de carotenoide în extractul final obținut este de 71,72%.

Tabelul 3.27.

Carotenoidele identificate în extractul din rădăcină de rostopască și concentrația lor în materia primă

| Nr. pic | Timp de retenție (min) | Aria (mAU) | A% | Compus identificat cu etalon | Conținutul în materia primă (μg/g) |
|---|------------------------|------------|-------|------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 2,497 | 206,1 | 59,79 | - | 245,06 |
| 2 | 3,36 | 45,1 | 13,08 | - | 56,61 |
| 3 | 3,864 | 93,5 | 27,13 | β-caroten | 111,20 |
| Total carotenoide | | | | | 409,86 |
| Concentrație carotenoide în extractul final: 41,55% | | | | | |

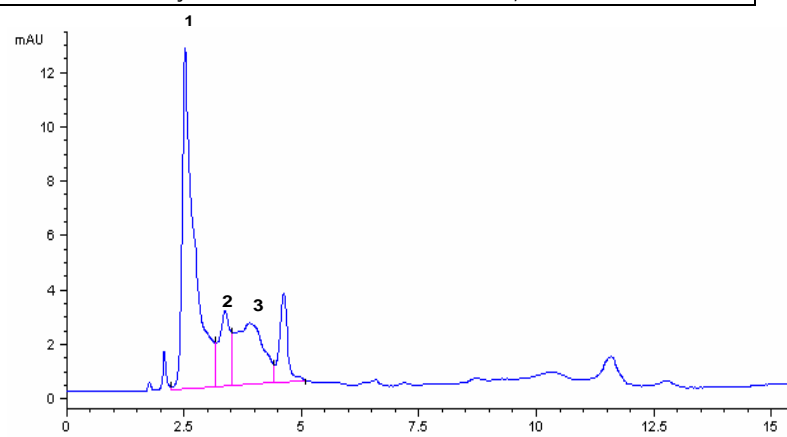


Figura 3.31.- Cromatograma RP_HPLC a extractului carotenoidic din rădăcină de rostopască (*Chelidonium majus*)

Rădăcina de rostopască se constată a fi mai săracă în carotenoide totale (409,86 μg/g), decât celelalte părți anatomice ale plantei, probabil datorită conținutului de alcaloizi mai ridicat al acesteia. β-Carotenul se află în cantitate de 111,20 μg/g (27,13 %) - mai puțin decât în frunze și flori, dar mai mult decât în tulpină. Concentrația procentuală de carotenoide în extractul final obținut este în jur de 41,55%, mai mică decât în cazul extractelor carotenoidice obținute din celelalte părți anatomice ale plantei de rostopască.

În figura 3.32. sunt prezentate comparativ valorile conținutului total de carotenoide și valorile conținutului de β-caroten din diferitele părți anatomice ale plantei de rostopască studiate.

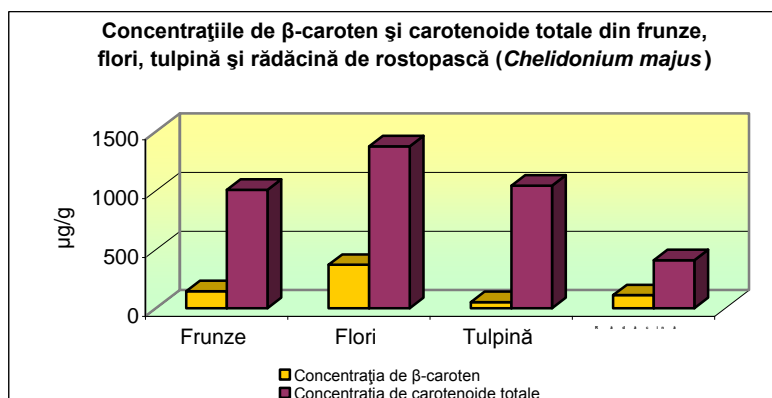


Figura 3.32. - Conținutul de β-caroten și carotenoide totale din frunze, flori, tulpină și rădăcină de rostopască (*Chelidonium majus*)

Se poate observa din figura 3.32. că cel mai ridicat conținut de carotenoide totale se înregistrează în florile de rostopască (1377,70 µg/g), apoi în tulpină (1041,11 µg/g), în frunze (1007,06 µg/g), și cel mai mic în rădăcină (409,86 µg/g). Din figura 3.33. reiese că cea mai mare cantitate de β-caroten se găsește tot în florile de rostopască (369,50 µg/g), apoi în frunză (144,10 µg/g), în rădăcină (111,20 µg/g) și cel mai puțin în tulpină (53,30 µg/g), unde predomină luteina și zeaxantina. De remarcat este faptul că rădăcina de rostopască, deși are un conținut de carotenoide totale mult mai mic decât celelalte părți ale plantei, conține totuși o cantitate însemnată de β-caroten, aproape de conținutul de β-caroten al frunzelor. Acest lucru este important pentru valorificarea β-carotenului din rădăcina de rostopască. Valorile ce corespund conținutului total de carotenoide din frunzele și florile de rostopască sunt apropiate de cele prezentate în datele de literatură (1223 µg/g - pentru frunze, respectiv 1566 µg/g - pentru flori) [210].

În figura 3.33. sunt prezentate comparativ valorile conținutului de carotenoide totale obținute prin RP-HPLC și prin metoda spectrofotometrică (vezi 3.2.1.4. și tabelul 3.28.). Se observă că valorile determinate prin cele două metode sunt apropiate, cea mai mare diferență obținându-se pentru extractul de cătină, soiul *Ciumași* (1086,60 µg/g - prin metoda RP-HPLC, respectiv 929,60 µg/g - prin metoda spectrofotometrică), iar cea mai mică, pentru extractul din porumb *Florencia* (420,27 µg/g - prin metoda RP-HPLC, respectiv 417,20 µg/g - prin metoda spectrofotometrică).

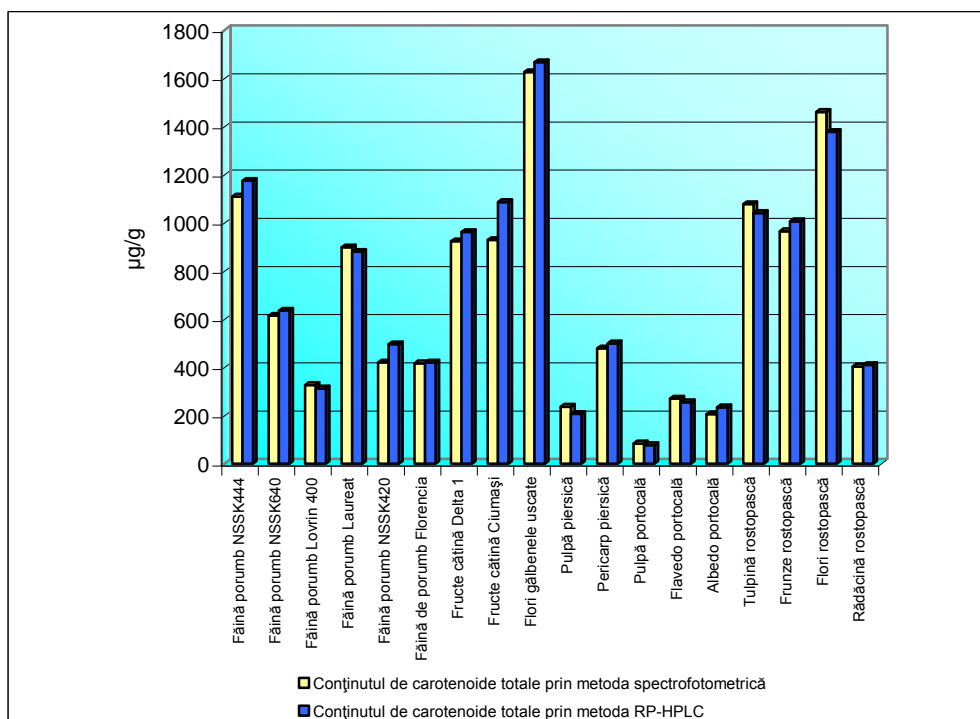


Figura 3.33. – Prezentare comparativă a conținutului de carotenoide totale determinat prin metoda spectrofotometrică și prin metoda RP-HPLC

Tabelul 3.28.

Rezultatele comparative privind conținutul total de carotenoide din materiile prime determinat prin metoda spectrofotometrică* și prin metoda RP-HPLC

| Nr. Crt | Materialul analizat | Conținutul de carotenoide totale (µg/g material) prin metoda spectrofotometrică | Conținutul de carotenoide totale (µg/g material) prin metoda RP-HPLC |
|---------|--------------------------|---|--|
| 1. | Făină porumb NSSK444 | 1109,00 | 1174,55 |
| 2. | Făină porumb NSSK640 | 614,40 | 635,68 |
| 3. | Făină porumb Lovrin 400 | 327,10 | 312,30 |
| 4. | Făină porumb Laureat | 898,40 | 879,76 |
| 5. | Făină porumb NSSK420 | 420,80 | 496,14 |
| 6. | Făină de porumb Florența | 417,20 | 420,27 |
| 7. | Fructe cătină Delta 1 | 923,55 | 962,43 |
| 8. | Fructe cătină Ciumași | 929,60 | 1086,60 |
| 9. | Fructe gălbenele uscate | 1626,40 | 1667,42 |
| 10. | Pulpă piersică | 237,00 | 207,38 |
| 11. | Pericarp piersică | 479,20 | 500,05 |
| 12. | Pulpă portocală | 84,00 | 77,72 |
| 13. | Flavedo portocală | 270,84 | 255,46 |
| 14. | Albedo portocală | 205,40 | 234,07 |
| 15. | Tulpină rostopască | 1078,20 | 1041,11 |
| 16. | Frunze rostopască | 965,50 | 1007,06 |
| 17. | Flori rostopască | 1460,80 | 1377,70 |
| 18. | Rădăcină rostopască | 403,90 | 409,86 |

* Vezi partea experimentală: 3.2.1.4.

• **Concluzii**

În urma analizei conținutului de carotenoide totale și β -caroten în extractele obținute din diferite surse vegetale se pot trage următoarele concluzii parțiale:

1. În toate extractele analizate prin RP-HPLC s-a identificat prezența β -carotenului, ceea ce subliniază încă o dată faptul că acesta este pigmentul carotenoidic cel mai răspândit în natură.
2. Dintre materialelor vegetale luate în studiu, cel mai ridicat conținut de β -caroten a fost evidențiat în fructele de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*), soiul *Ciumași*: 1086,60 $\mu\text{g/g}$ fructe uscate, cel mai scăzut fiind în pulpa de piersică (*Persica vulgaris*), soiul *Red Haven*: 11,40 $\mu\text{g/g}$ pulpă proaspătă. Conținutul cel mai mare de carotenoide totale a fost găsit în florile de gălbenele (*Calendula officinalis*): 1667,42 $\mu\text{g/g}$ flori uscate, iar cel mai mic, în pulpa de portocale (*Citrus sinensis*): 77,72 $\mu\text{g/g}$ pulpă proaspătă.
3. S-au obținut extracte carotenoidice din șase hibridi noi de porumb (*Zea mays*) cu un conținut de β -caroten și carotenoide totale mult mai ridicat față de datele de literatură privitoare la alte tipuri de hibridi, îmbunătățindu-se metoda de extracție în vederea izolării cât mai complete a pigmentilor carotenoidici din materia primă. Dintre hibridii de porumb analizați, cel mai ridicat conținut de β -caroten și carotenoide totale s-a înregistrat la hibridul *NSSK444* (670,30 $\mu\text{g/g}$ făină, respectiv carotenoide totale: 1174,55 $\mu\text{g/g}$ făină) - hibrid de proveniență sârbească, făcând parte din grupa de maturitate convențională FAO 400-500, semitardiv. Cel mai scăzut conținut de β -caroten și carotenoide totale a fost găsit în hibridul *Lovrin 400* (115,5 $\mu\text{g/g}$ făină, respectiv carotenoide totale: 312,30 $\mu\text{g/g}$ făină) - hibrid de proveniență românească, făcând parte din grupa de maturitate FAO 500-600.
4. Analizele realizate pentru fructele de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*) au condus la rezultate apropiate de valorile din datele de literatură studiate. Cele două soiuri de cătină albă studiate (*Delta 1* și *Ciumași*) prezintă concentrații foarte apropiate de carotenoide totale (962,43 $\mu\text{g/g}$ făină, pentru *Delta 1*, respectiv 1086,60 $\mu\text{g/g}$ făină, pentru *Ciumași*), însă în soiul *Ciumași* a fost identificat numai β -carotenul, pe când în soiul *Delta 1* s-au mai evidențiat și alte carotenoide.
5. Rezultatele obținute pentru florile de gălbenele (*Calendula officinalis*) analizate se încadrează în valorile găsite în datele de literatură, florile de gălbenele caracterizându-se, pe lângă valoarea ridicată a conținutului de carotenoide totale (1667,42 $\mu\text{g/g}$ flori uscate), printr-un conținut foarte mare de β -caroten (145,40 $\mu\text{g/g}$ flori uscate).
6. La fructele de piersici (*Persica vulgaris*), soiul *Red Haven*, se remarcă faptul că pericarpul este mult mai bogat în carotenoide totale (500,05 $\mu\text{g/g}$ material proaspăt) și β -caroten (30,70 $\mu\text{g/g}$ material proaspăt) decât pulpa (207,00 $\mu\text{g/g}$ material proaspăt, respectiv 11,40 $\mu\text{g/g}$ material proaspăt). Valorile obținute sunt mai ridicate decât cele din datele de literatură studiate, privitoare la alte soiuri de piersici
7. Fructele de portocale (*Citrus sinensis*), soiul *Valencia* analizate, prezintă conținutul cel mai ridicat de carotenoide totale în flavedo (255,46 $\mu\text{g/g}$ material uscat), foarte apropiat de cel din albedo (234,07 $\mu\text{g/g}$ material uscat) și cel mai scăzut - în pulpă (77,72 $\mu\text{g/g}$ material proaspăt). Cel mai mare conținut de β -caroten a fost evidențiat în albedo (206,80 $\mu\text{g/g}$ material uscat), iar cel mai mic în flavedo (54,80 $\mu\text{g/g}$ material uscat). Pulpa de portocale, deși are un conținut mult mai mic de carotenoide totale decât

flavedo, prezintă un conținut mai ridicat de β -caroten (65,80 $\mu\text{g/g}$ material proaspăt), acest pigment reprezentând 84,66 % din totalul carotenoidelor din pulpa de portocală.

8. Diferitele părți anatomice ale plantei de rostopască (*Chelidonium majus*), prezintă conținuturi diferite de pigmenți carotenoidici totali și de β -caroten. Valorile cele mai ridicate ale conținutului de carotenoide totale și β -caroten au fost obținute pentru florile de rostopască (1377,70 $\mu\text{g/g}$ material proaspăt, respectiv 369,50 $\mu\text{g/g}$ material proaspăt). Cel mai scăzut conținut de carotenoide totale s-a înregistrat la rădăcina de rostopască (409,86 $\mu\text{g/g}$ material proaspăt), iar cel mai mic conținut de β -caroten, în tulpină (53,30 $\mu\text{g/g}$ material proaspăt).

3.3.1.2. Analiza activității antioxidante a extractelor carotenoidice prin metoda cu DPPH

• Activitatea antioxidantă a extractelor carotenoidice din rostopască (*Chelidonium majus*)

Au fost determinate activitățile antioxidante ale extractelor din flori, tulpină și frunze de rostopască prin metoda descrisă la 3.2.1.5. (vezi Partea experimentală). Pentru extractele de rostopască, înregistrările au fost efectuate cu spectrofotometrul Perkin Elmer, Lambda EZ Series, datele achiziționate fiind prelucrate cu ajutorul programului PESSW, versiunea 1.2, Revision E [216].

În cazul extractelor de rostopască, diluate 1 :100, urmărind spectrofotometric variația în timp a absorbantei la 517 nm (figura 3.34.) s-a remarcat faptul că cea mai bună activitate antioxidantă o au extractele obținute din frunze și inflorescență (absorbantele relative: $A\% = 36\%$) – figurile 3.35.-3.36.; în cazul extractului obținut din tulpină de rostopască s-a obținut o valoare a absorbantei relative $A\% = 50\%$ - figura 3.37.

Determinarea vitezelor medii de reacție pentru porțiunea cvasiliniară a curbei $c(\mu\text{M}) = f(t, s)$, a indicat o valoare maximă pentru extractul din frunze (2,6 $\mu\text{M/s}$), mai mare decât pentru soluția de vitamină C de concentrație 0,01 mM, urmată de viteza medie a extractului din flori (2,2 $\mu\text{M/s}$), cea mai mică viteză de reacție prezentând-o extractul din tulpină de rostopască (0,7 $\mu\text{M/s}$), figura 3.38. Valoarea puțin mai ridicată a vitezei medii de reacție pentru extractul din frunze de rostopască, față de cel din flori, se datorează concentrației procentuale de carotenoide (73,87%) mai mare în extractul din frunze decât în extractul din flori de rostopască (71,72%), în cazul extractului din tulpină de rostopască, această concentrație fiind și mai mică (63,57%). Prin urmare, activitatea antioxidantă a extractelor din diferite părți anatomice ale plantei de rostopască este direct proporțională cu valoarea concentrației de carotenoide din extract.

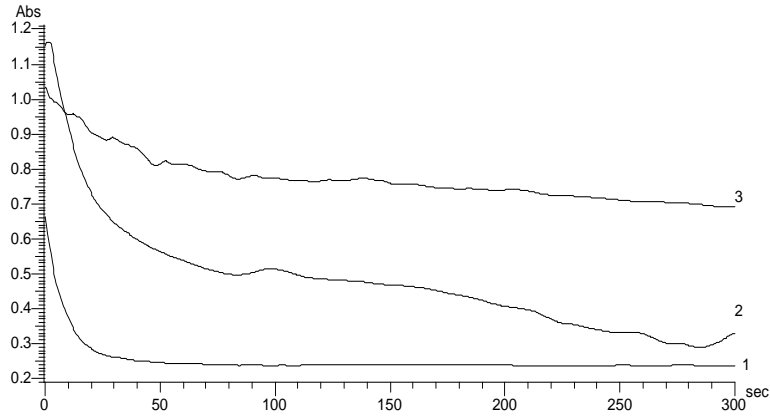


Figura 3.34. - Variația absorbanței soluției de DPPH în timp la 517 nm, în prezența extractelor de rostopască (1-frunză, 2- inflorescență și 3- tulpină)

Rank 10 Eqn 7909 $y=(a+cx+ex^2+gx^3+ix^4+kx^5)/(1+bx+dx^2+fx^3+hx^4+jx^5)$ [NL]
 $r^2=0.99995199$ DF Adj $r^2=0.99987655$ FitStdErr=0.2185255 Fstat=16662.91
 $a=99.998955$ $b=0.13166256$ $c=0.2098371$ $d=-0.07501002$ $e=0.53232608$ $f=0.1093406$
 $g=6.8596103$ $h=-0.0045782569$ $i=-0.17685171$ $j=0.00095057525$ $k=0.034194215$

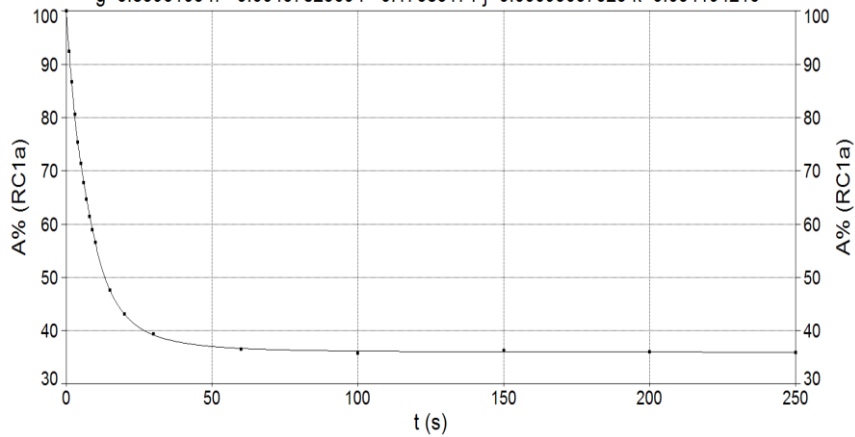


Figura 3.35. - Variația în timp a absorbanței relative a soluției de DPPH în prezența extractului de rostopască (frunză), diluat 1:100

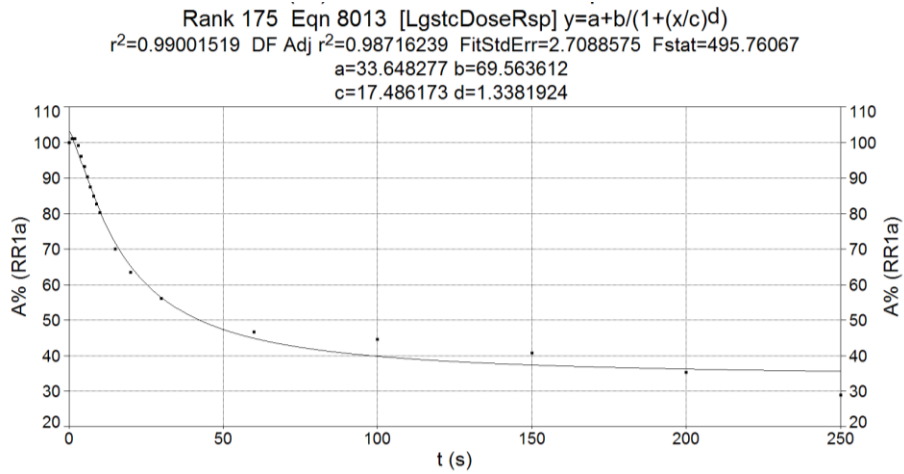


Figura 3.36.- Variația în timp a absorbanței relative a soluției de DPPH în prezența extractului de rostopască (inflorescență), diluat 1:100

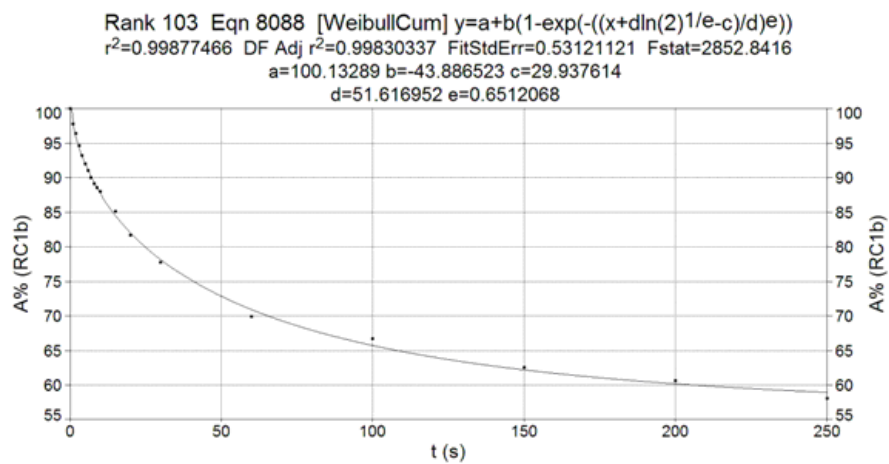


Figura 3.37. - Variația în timp a absorbanței relative a soluției de DPPH în prezența extractului de rostopască (tulpină) diluat 1:100

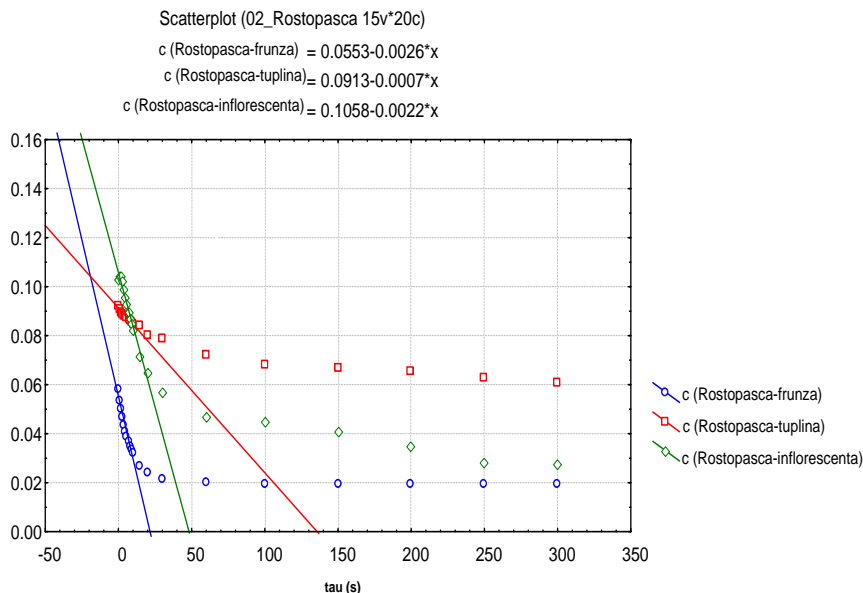


Figura 3.38.- Dependența concentrației de DPPH (mM) de timpul de reacție (în reacția cu extractele de rostopască)

• Activitatea antioxidantă a extractelor carotenoidice din boabe de porumb (*Zea mays*)

A fost determinată activitatea antioxidantă a extractelor carotenoidice din trei hibridi de porumb (*Zea mays*): *Lovrin 400*, *NSSK444* și *NSSK640*, urmând metoda de lucru prezentată la 3.2.1.5. (vezi Partea experimentală). Pentru înregistrarea absorbanțelor probelor a fost utilizat un spectrofotometru Specord 205 (firma Analytik Jena, Germania), folosindu-se programul winASPECT, versiunea 2.0.3.0.

Variația în timp a absorbanțelor soluțiilor de DPPH și variația concentrației de DPPH în timp, în prezența extractelor carotenoidice studiate, este prezentată în figurile 3.39.-3.42.

Evaluarea activității antioxidante a probelor a condus la viteze medii de reacție (calculate ca derivata de ordinul întâi a dependenței liniare a concentrației, exprimată în mM, de timpul de reacție, $c(\text{mM}) = f(t, s)$) având următoarele valori (figura 3.43.): 0,0130 $\mu\text{M/s}$ - pentru proba de porumb *Lovrin 400*, 0,0134 $\mu\text{M/s}$ - pentru proba de porumb *NSSK640* și 0,024 $\mu\text{M/s}$ - pentru proba de porumb *NSSK444*, valorile fiind mai mici decât cele obținute pentru soluțiile de vitamină C (vezi 3.2.1.5. - Partea experimentală)

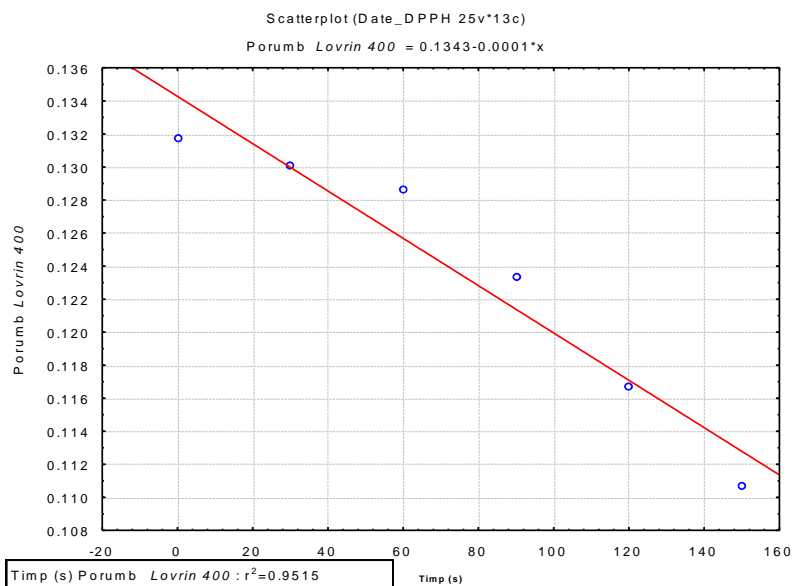


Figura 3.39.-Variația absorbanței soluției de DPPH în funcție de timp, la 517 nm, în prezența extractului carotenoidic din porumb Lovrin 400, diluție 1:100

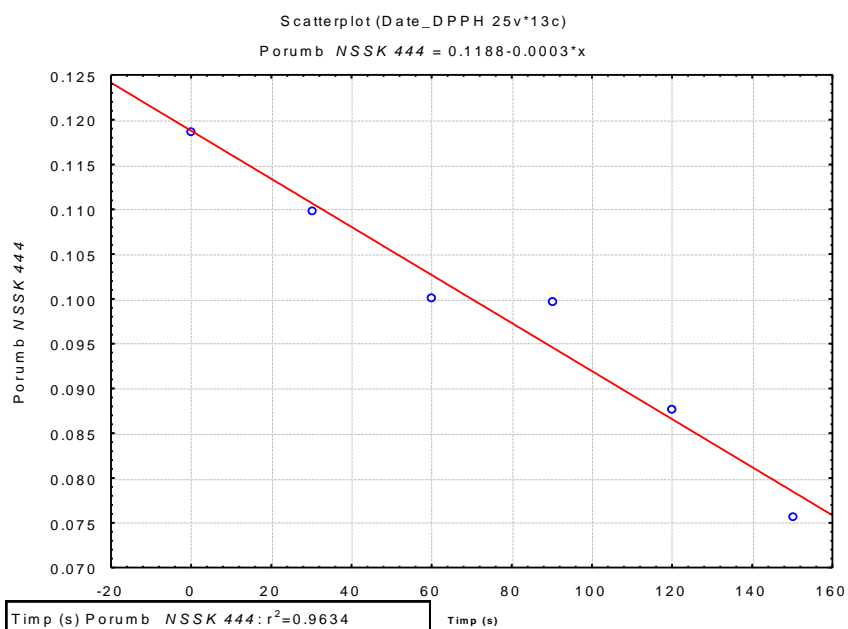


Figura 3.40.-Variația absorbanței soluției de DPPH în funcție de timp, la 517 nm, în prezența extractului carotenoidic din porumb NSSK444, diluție 1:100

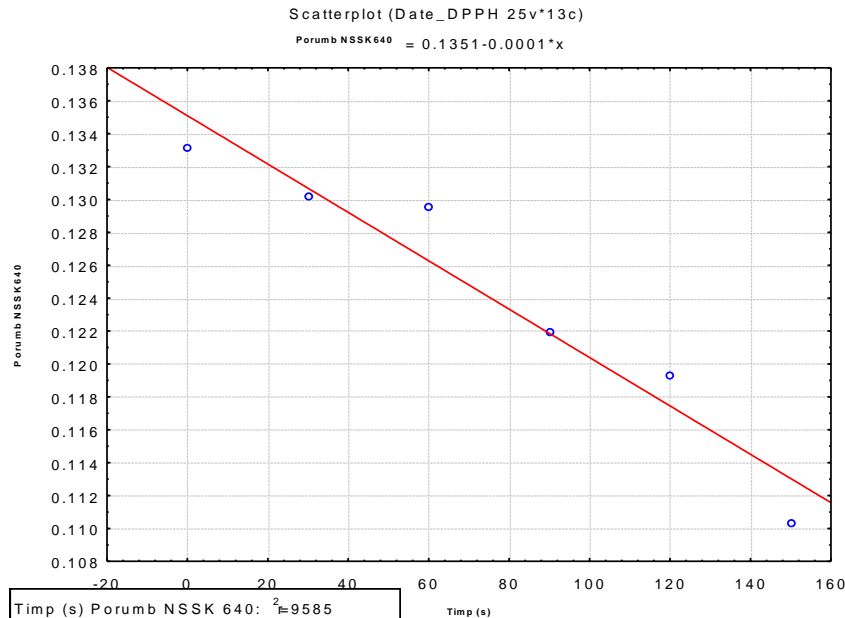


Figura 3.41.-Variația absorbanței soluției de DPPH în funcție de timp, la 517 nm, în prezența extractului carotenoidic din porumb NSSK640, diluție 1:100

Având în vedere că s-au folosit diluții 1:100 ale probelor, putem deduce că activitatea antioxidantă a extractelor nediluate va fi mult superioară față de cea a probelor diluate, ceea ce s-a putut observa prin faptul că la diluții mai mici ale extractelor, acestea se decolorau imediat după adăosul de soluție de DPPH. Se poate observa că cea mai mare capacitate antioxidantă (viteza medie de reacție cea mai mare) o are extractul din porumb *NSSK444*- care prezintă și cea mai mare concentrație procentuală de pigmenți carotenoidici (82,30%) și cel mai ridicat conținut de β -caroten (670,30 $\mu\text{g/g}$); de asemenea în acest hibrid s-a evidențiat prezența a 7 tipuri de compuși carotenoidici, compuși care își potențează reciproc activitatea antioxidantă, acționând sinergic [131]. Cea mai mică activitate antioxidantă o are extractul de porumb *Lovrin 400* - cu cel mai mic conținut procentual de carotenoide (53,15%) și cel mai scăzut conținut de β -caroten (115,50 $\mu\text{g/g}$) dintre toți hibridii de porumb analizați. Astfel, putem spune, în cazul extractelor carotenoidice din boabe de porumb, că activitatea antioxidantă este direct proporțională cu cantitatea de compuși carotenoidici din proba analizată, important fiind numărul și tipul carotenoidelor conținute, dat fiind faptul că pigmenții carotenoidici au acțiune antioxidantă cu atât mai puternică, cu cât numărul de duble legături conjugate din molecula lor este mai mare și că aceștia acționează sinergic [131].

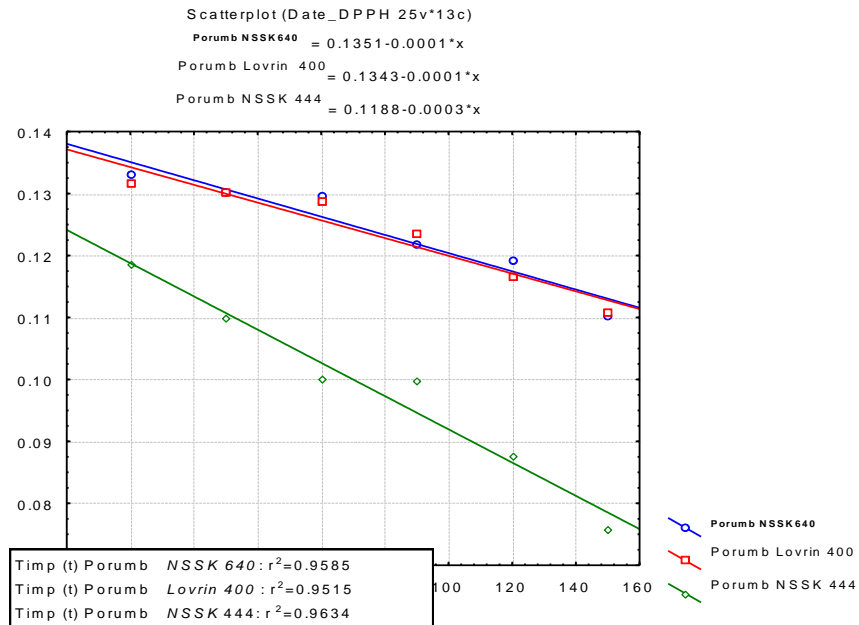


Figura 3.42. - Variația absorbanței soluției de DPPH în funcție de timp, la 517 nm, în prezența extractelor carotenoidice din boabe de porumb - curbele suprapuse

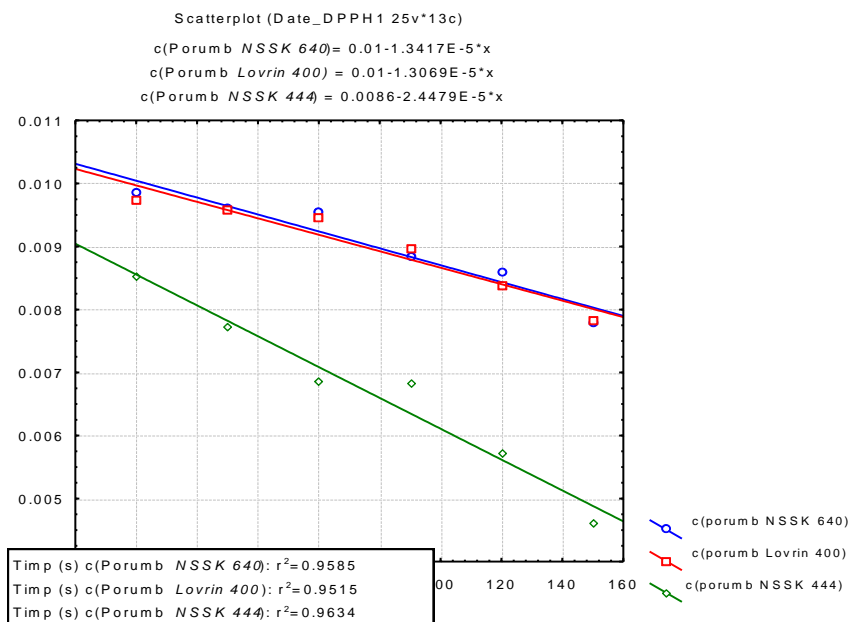


Figura 3.43.- Dependența concentrației de DPPH (mM) de timpul de reacție (în reacția cu extractele carotenoidice din boabe de porumb) - curbele suprapuse

• **Activitatea antioxidantă a extractelor carotenoidice din fructe de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*)**

A fost determinată activitatea antioxidantă a extractelor carotenoidice din fructele a două soiuri de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*): *Delta 1* și *Ciumași*, urmând metoda de lucru prezentată la 3.2.1.5. (vezi Partea experimentală).

Variația absorbanțelor soluțiilor de DPPH în funcție de timp și variația concentrației de DPPH în timp, în prezența extractelor carotenoidice din fructe de cătină albă, este prezentată în figurile 3.44.- 3.47.

Evaluarea activității antioxidante a probelor a condus la viteze medii de reacție (figura 3.47.) având următoarele valori: 0,0198 $\mu\text{M/s}$ - pentru extractul din fructe de cătină albă soiul *Delta 1* (diluție 1:100), respectiv: 0,0155 $\mu\text{M/s}$ - pentru extractul din fructe de cătină albă, soiul *Ciumași*. Chiar dacă valorile vitezelor medii de reacție pentru cele două extracte carotenoidice din cătină albă sunt mai mici decât cele corespunzătoare soluțiilor de vitamină C (vezi Partea experimentală), ținând cont de faptul că probele au fost diluate 1:100, activitatea antioxidantă a extractelor carotenoidice nediluate sau la diluții mai mici este superioară celor analizate (la diluții mai mici ale probelor după adăugarea soluției de DPPH decolorarea este foarte rapidă). Valorile obținute pentru vitezele medii de reacție sunt apropiate de cele pentru extractele din porumb, viteza corespunzătoare extractului din porumb *NSSK444* fiind puțin mai ridicată decât cea pentru extractele din cătină, iar vitezele obținute pentru ceilalți doi hibrizi de porumb fiind ceva mai mici decât cele corespunzătoare extractelor de cătină albă. Extractul carotenoidic din fructe de cătină albă, soiul *Delta 1*, prezintă o activitate antioxidantă ceva mai ridicată decât extractul obținut din soiul *Ciumași*, deși extractul din soiul *Delta 1* are un conținut procentual de carotenoide (71,76%) ceva mai scăzut decât soiul *Ciumași* (72,12%). Aceasta se poate explica prin faptul că deși toți compușii carotenoidici au efect antioxidant, eficiența lor crește în amestecuri de carotenoide [133]. Cum în extractul

carotenoidic din soiul *Ciumași*, nu a fost evidențiat decât un compus carotenoidic: β -carotenul, iar în extractul din soiul *Delta 1*, pe lângă β -caroten au mai fost identificate încă două tipuri de carotenoide, aceasta constituie o explicație pentru faptul că activitatea antioxidantă a acestui extract este mai mare decât cea a extractului din soiul *Ciumași*.

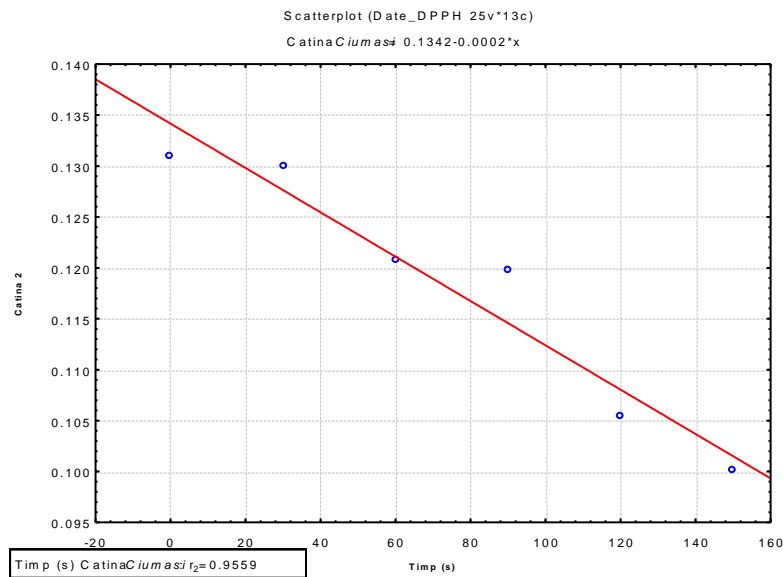


Figura 3.44. - Variația absorbanței soluției de DPPH în funcție de timp, la 517 nm, în prezența extractului carotenoidic din fructe de cătină albă, soiul *Ciumași*, diluție 1:100

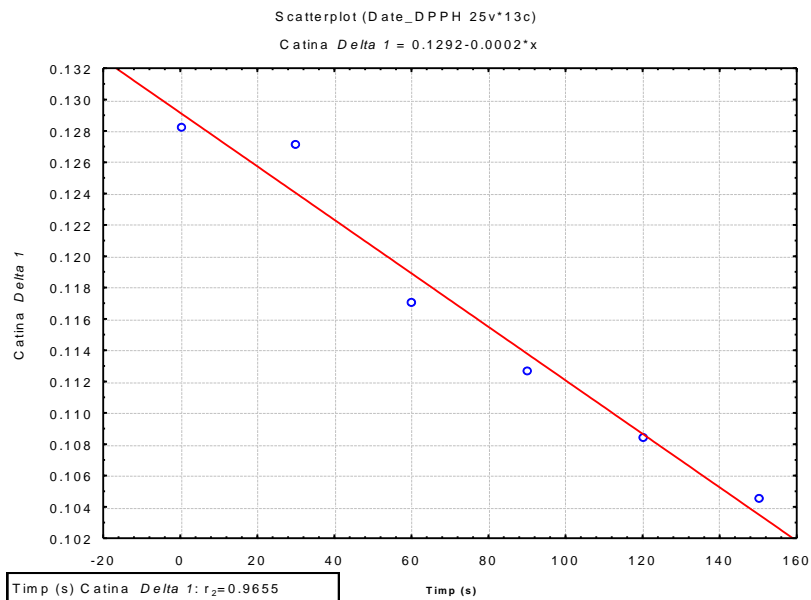


Figura 3.45. - Variația absorbanței soluției de DPPH în funcție de timp, la 517 nm, în prezența extractului carotenoidic din fructe de cătină albă, soiul *Delta 1*, diluție 1:100

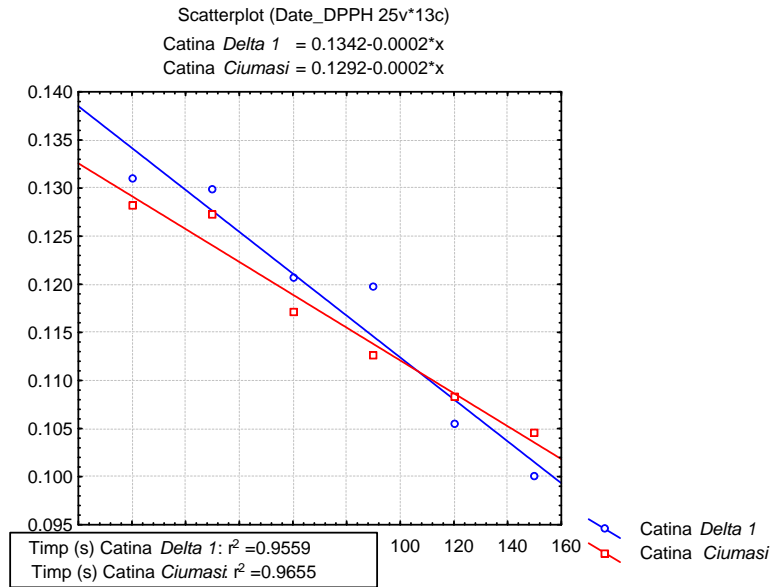


Figura 3.46. - Variația absorbanței soluției de DPPH în funcție de timp, la 517 nm, în prezența extractelor carotenoidice din fructe de cătină albă - curbele suprapuse

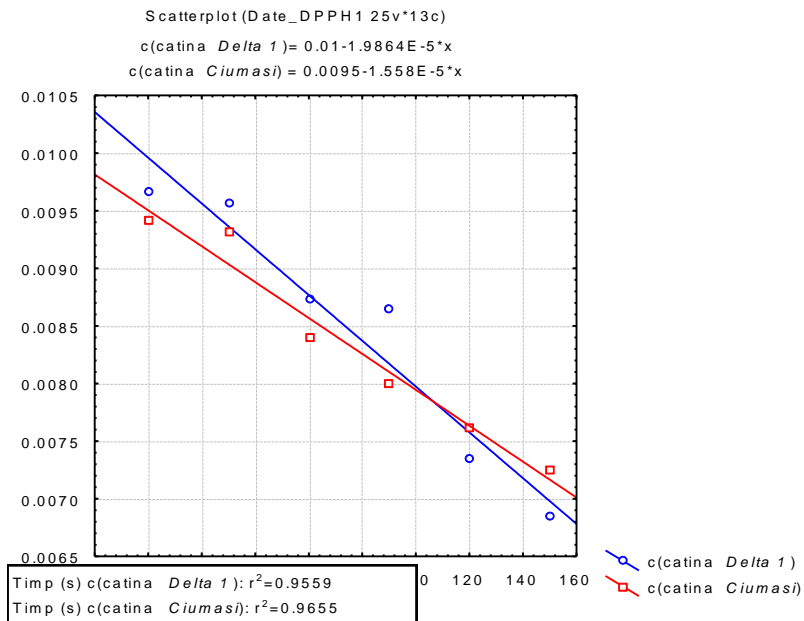


Figura 3.47. - Dependența concentrației de DPPH (mM) de timpul de reacție (în reacția cu extractele carotenoidice din fructe de cătină albă) - curbele suprapuse

• **Activitatea antioxidantă a extractului carotenoidic din pericarp de piersică (*Persica vulgaris*)**

A fost analizată activitatea antioxidantă a extractului carotenoidic din pericarp de piersică (*Persica vulgaris*), soiul *Valencia*, urmând metoda de lucru prezentată la 3.2.1.5. (vezi Partea experimentală).

Variația în timp a absorbantei soluțiilor de DPPH în prezența extractului carotenoidic (diluții 1:100) din pericarp de piersică este prezentată în figura 3.48.

Viteza medie de reacție a extractului din pericarp de piersică, diluție 1:100, determinată din curba de variație a concentrației DPPH în funcție de timp - figura 3.49., are valoarea de 0,0107 $\mu\text{M/s}$. Prezența în cantitate mai mică a β -carotenului (6,14%) în acest extract face ca activitatea antioxidantă să fie ceva mai redusă decât la extractele carotenoidice din porumb și din cătină albă; de asemeni, acest lucru este dat tot și concentrației procentuale de pigmenți carotenoidici (52,47%) mai redusă decât în cazul extractelor din porumb și cătină albă.

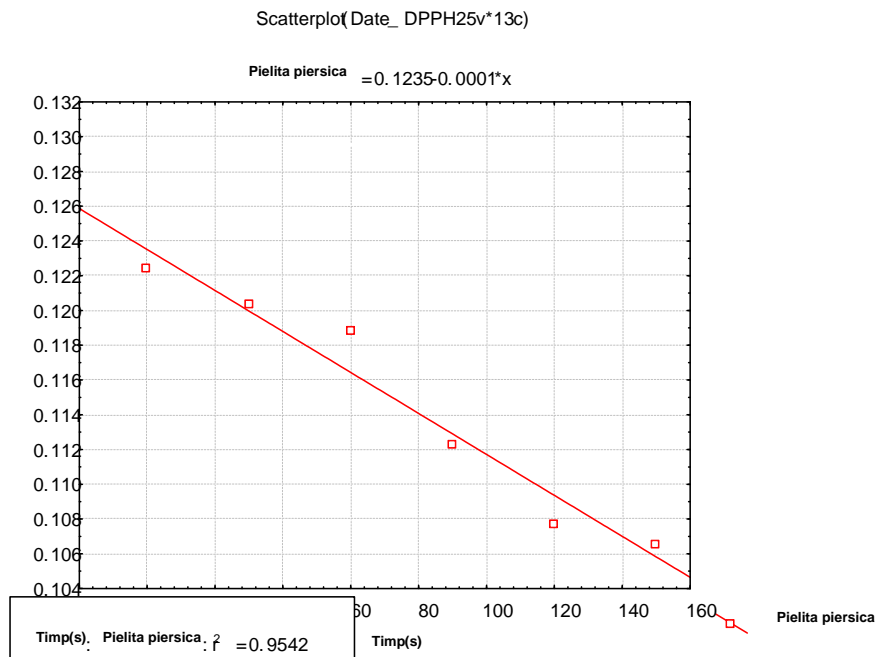


Figura 3.48. - Variația absorbantei soluției de DPPH în funcție de timp, la 517 nm, în prezența extractului carotenoidic din pericarp de piersică

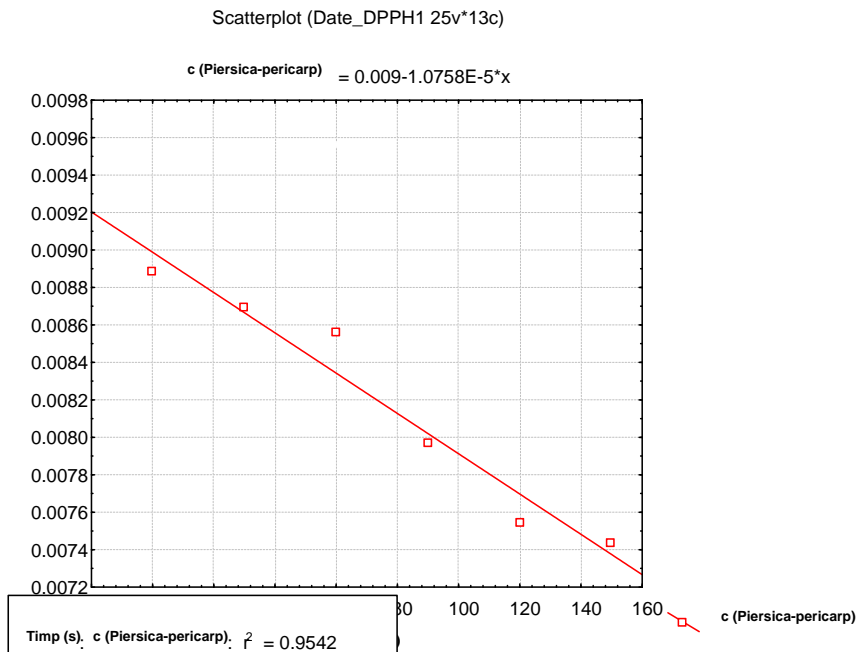


Figura 3.49. - Dependența concentrației de DPPH (mM) de timpul de reacție (în reacția cu extractul carotenoidic din pericarp de piersică)

• **Activitatea antioxidantă a extractelor carotenoidice din fructe de portocale (*Citrus sinensis*)**

Activitatea antioxidantă a extractelor carotenoidice din albedo și flavedo de portocale (*Citrus sinensis*), soiul *Valencia*, a fost evaluată tot prin metoda descrisă la 3.2.1.5. (vezi Partea experimentală).

În figurile 3.50. și 3.51. este prezentată variația în funcție de timp a absorbanțelor soluției de DPPH în prezența extractelor carotenoidice din albedo și flavedo de portocale, la diluție de 1:100.

Variația concentrației de DPPH în timp, în prezența extractelor din portocale este evidențiată prin curbele din figura 3.52., de unde s-au obținut vitezele medii de reacție de 0,090 $\mu\text{M/s}$ - pentru extractul carotenoidic din albedo, respectiv de 0,100 $\mu\text{M/s}$ - pentru extractul din flavedo de portocală. Valorile ridicate ale vitezelor medii de reacție (respectiv ale activității antioxidante) pentru extractele din flavedo și albedo de portocală, comparativ cu celelalte probe analizate, nu se datorează conținutului mai ridicat de pigmenți carotenoidici din aceste probe, concentrația procentuală de carotenoide în aceste extracte fiind mai mică decât în celelalte (respectiv 46,90% - pentru flavedo și 48,18% - pentru albedo). În aceste extracte pe lângă carotenoide este prezent și limonenul (componentul principal al uleiului volatil din pericarp de portocală, peste 90%), care prezintă o activitate antioxidantă foarte puternică [258-262]. Limonenul nu este complet îndepărtat în procedeul de extracție la rece a carotenoidelor din flavedo, respectiv albedo de portocală, prezența lui putând fi semnalată clar și prin mirosul caracteristic regăsit la aceste extracte carotenoidice. Macromoleculele carotenoidelor favorizează probabil „capturarea” moleculelor de limonen între ele.

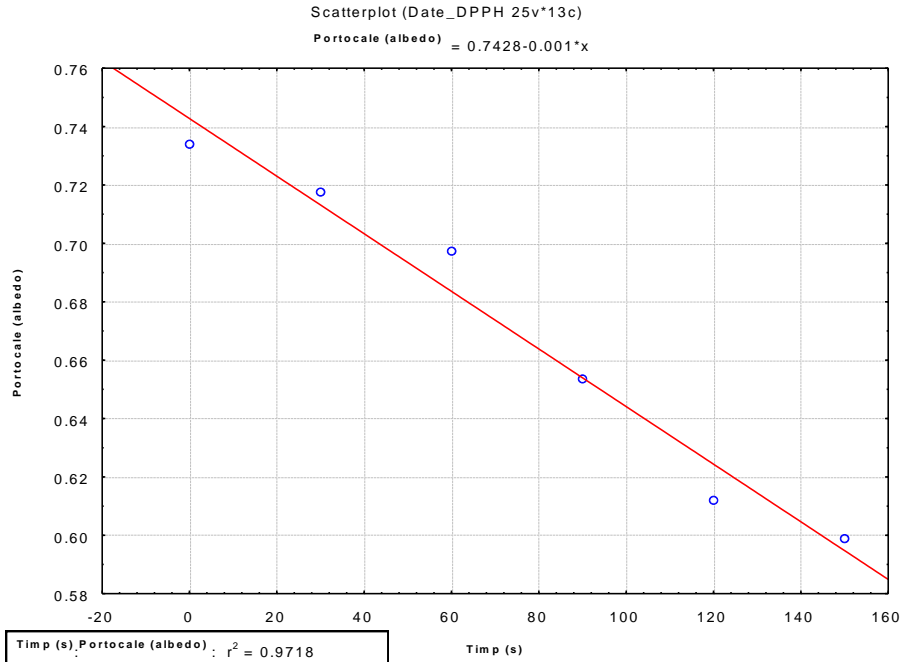


Figura 3.50. - Variația absorbanței soluției de DPPH în funcție de timp, la 517 nm, în prezența extractului carotenoidic din albedo de portocală

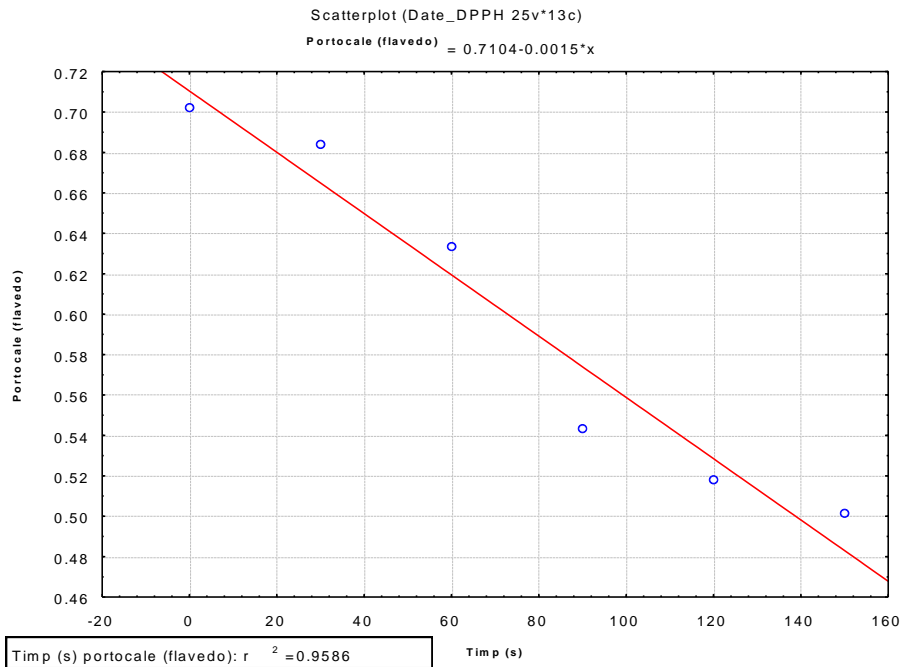


Figura 3.51. - Variația absorbanței soluției de DPPH în funcție de timp, la 517 nm, în prezența extractului carotenoidic din flavado de portocală

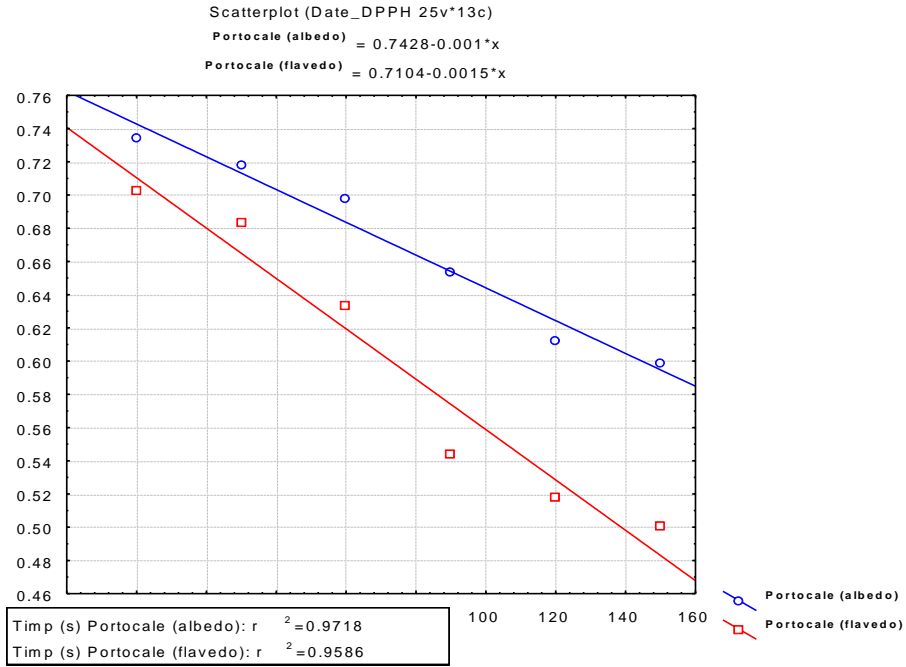


Figura 3.52. - Variația absorbanței soluției de DPPH în funcție de timp, la 517 nm, în prezența extractelor carotenoidice din albedo și flavedo de portocală - curbele suprapuse

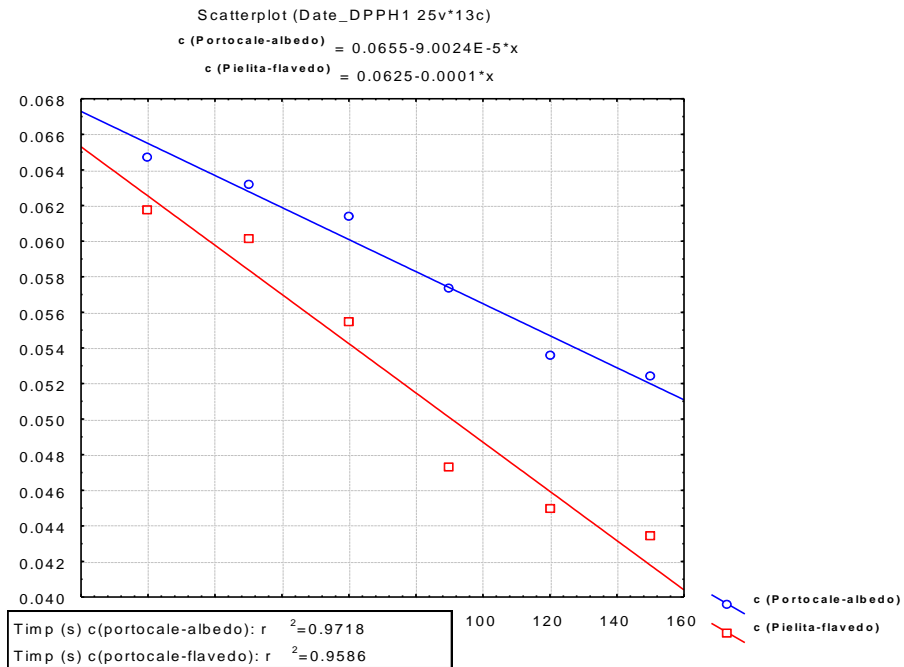


Figura 3.53. - Dependența concentrației de DPPH (mM) de timpul de reacție - în reacția cu extractele carotenoidice din albedo și flavedo de portocală - curbele suprapuse

Figurile 3.54. și 3.55. prezintă variația absorbanței soluției de DPPH în timp, pentru toate probele analizate, respectiv, variația concentrației soluției de DPPH în timp, pentru toate extractele analizate, curbele suprapuse.

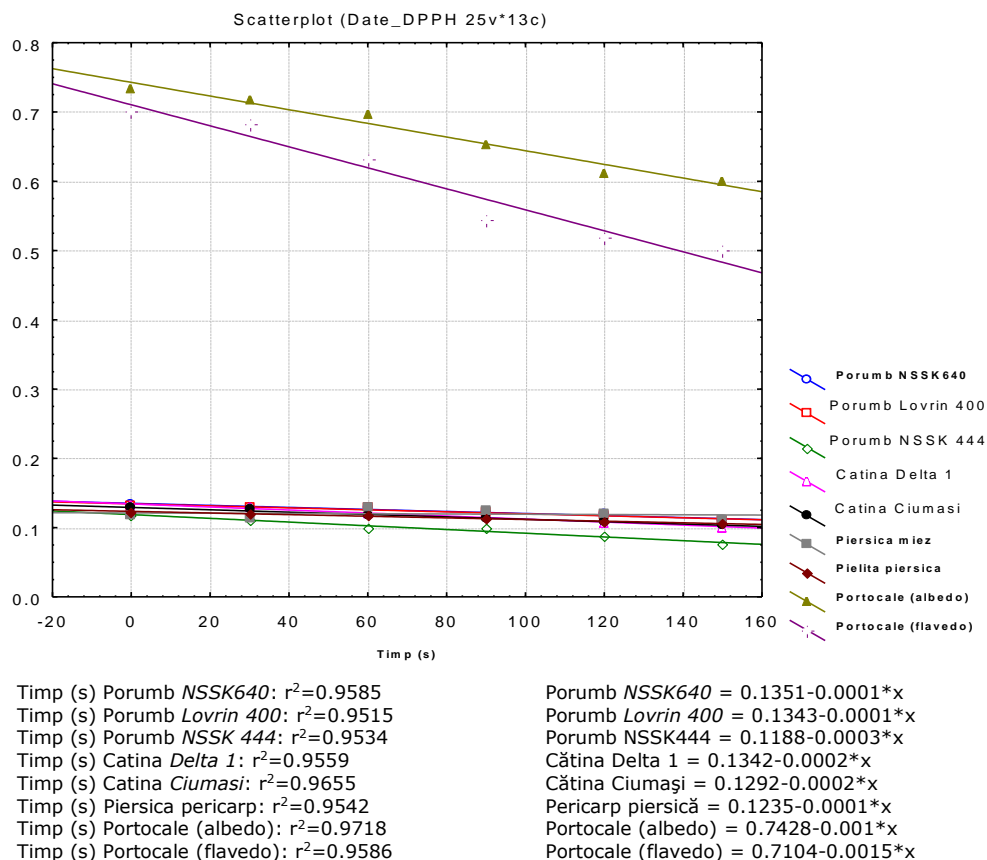
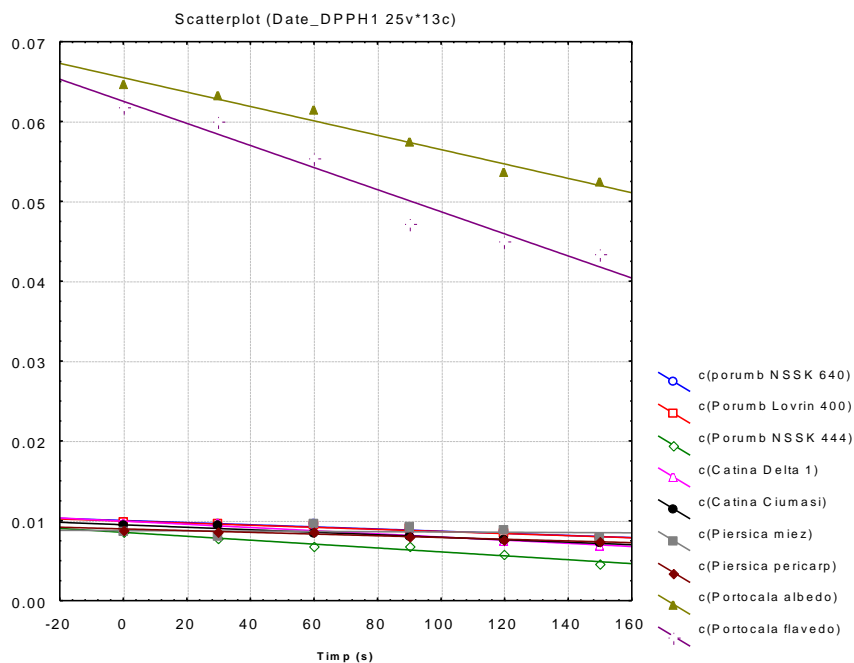


Figura 3.54. - Variația absorbantei soluției de DPPH în funcție de timp, la 517 nm, în prezența extractelor carotenoidice- curbele suprapuse pentru toate probele



Timp (s) c(Porumb NSSK 640): $r^2=0.9585$
 Timp (s) c(Porumb Lovrin 400): $r^2=0.9515$
 Timp (s) c(Porumb NSSK 444): $r^2=0.9634$
 Timp (s) c(Catina Delta 1): $r^2=0.9559$
 Timp (s) c(Catina Ciumasi): $r^2=0.9655$
 Timp (s) c(Piersica pericarp): $r^2=0.9542$
 Timp (s) c(Portocale albedo): $r^2=0.9718$
 Timp (s) c(Portocale flavedo): $r^2=0.9586$

$c(\text{Porumb NSSK640}) = 0.01 - 1.3417E-5 * x$
 $c(\text{Porumb Lovrin 400}) = 0.01 - 1.3069E-5 * x$
 $c(\text{Porumb NSSK 444}) = 0.0086 - 2.4479E-5 * x$
 $c(\text{catina Delta 1}) = 0.01 - 1.9864E-5 * x$
 $c(\text{catina Ciumasi}) = 0.0095 - 1.558E-5 * x$
 $c(\text{Piersica pericarp}) = 0.009 - 1.0758E-5 * x$
 $c(\text{Portocale albedo}) = 0.0655 - 9.0024E-5 * x$
 $c(\text{Portocale flavedo}) = 0.0625 - 0.0001 * x$

Figura 3.55. - Dependența concentrației de DPPH (mM) de timpul de reacție - în reacția cu extractele carotenoidice - curbele suprapuse

• Concluzii

În urma analizelor privind activitatea antioxidantă a unor extracte carotenoidice, determinată prin metoda cu DPPH, se pot desprinde următoarele concluzii:

1. Au fost evaluate din punct de vedere al activității antioxidante, câteva dintre extractele carotenoidice obținute, și anume: extractele din frunze, flori și tulpină de rostopască (*Chelidonium majus*), extractele din făină de porumb (*Zea mays*) hibridii: NSSK444, Lovrin 400 și NSSK640, extractele din fructe uscate de cătină (*Hippophae rhamnoides*) soiurile Delta 1 și Ciumași, extractul din pericarp de piersică (*Persica vulgaris*), extractele din albedo și flavedo de portocală (*Citrus sinensis*), toate prezentând activitate antioxidantă.
2. În cazul extractelor carotenoidice obținute din frunze și flori de rostopască, diluate 1:100, s-au obținut viteze medii de reacție (respectiv activități antioxidante) apropiate: 2,6 $\mu\text{M/s}$ - pentru extractul din frunze, mai mare decât pentru soluția de vitamină C de concentrație 0,01 mM, respectiv 2,2 $\mu\text{M/s}$ - pentru extractul din flori. Cea mai mică viteză de reacție (respectiv activitate antioxidantă) a prezentat-o extractul din tulpină de

- rostopască (0,7 $\mu\text{M/s}$). Activitatea antioxidantă a extractelor carotenoidice din diferite părți anatomice ale plantei de rostopască este direct proporțională cu valoarea concentrației de compuși carotenoidici din extract.
3. Pentru extractele din făina de porumb, diluate 1 :100, s-au obținut activități antioxidante (viteze medii de reacție) mai mici decât cele corespunzătoare soluțiilor de vitamina C. Cea mai mare activitate antioxidantă (viteza medie de reacție cea mai mare) o prezintă extractul din hibridul *NSSK444* - care are și cea mai mare concentrație procentuală de pigmenți carotenoidici (82,30%) și cel mai ridicat conținut de β -caroten (carotenoidă cu 11 legături duble conjugate). Cea mai mică activitate antioxidantă a fost găsită la extractul obținut din hibridul *Lovrin 400* - cu cel mai mic conținut de β -caroten și cel mai mic procent de carotenoide (53,15%).
 4. Extractele din cele două soiuri de cătină albă analizate au prezentat, la diluția de 1:100, activități antioxidante (viteze medii de reacție) mai mici decât cele corespunzătoare soluțiilor etalon de vitamină C. Activitatea antioxidantă cea mai ridicată o are extractul carotenoidic din fructe de cătină albă, soiul *Delta 1*, deși acest extract are un conținut procentual de carotenoide (71,76%) ceva mai scăzut decât soiul *Ciumași* (72,12%). Activitatea antioxidantă mai redusă se datorează faptului că extractul din soiul *Delta 1* conține mai multe tipuri de carotenoide - care își amplifică reciproc acțiunea antioxidantă - comparativ cu extractul din soiul *Ciumași*, în care a fost evidențiat numai β -carotenul.
 5. În cazul extractelor carotenoidice din fructe de cătină albă, activitățile antioxidante sunt apropiate de cele ale extractelor din porumb, viteza corespunzătoare extractului din porumb *NSSK444* fiind puțin mai ridicată decât cea pentru extractele din cătină, iar vitezele obținute pentru ceilalți doi hibridi de porumb fiind ceva mai mici decât cele corespunzătoare extractelor de cătină albă.
 6. La extractul din pericarp de piersică (diluție 1:100), prezența în cantitate mai mică a compușilor carotenoidici cu 11 legături conjugate (β -carotenul), face ca activitatea antioxidantă (viteza medie de reacție = 0,0107 $\mu\text{M/s}$) să fie ceva mai redusă decât la extractele carotenoidice din porumb și din cătină albă; de asemeni, acest fapt este datorat și concentrației procentuale de pigmenți carotenoidici (52,47%) mai redusă decât în cazul extractelor din porumb și cătină albă.
 7. Extractele din flavedo și albedo de portocală (diluție 1:100), au prezentat o activitate antioxidantă mai mare decât extractele din făină de porumb, fructe de cătină albă, și pericarp de piersică (viteze medii de reacție de 0,090 $\mu\text{M/s}$ - pentru extractul carotenoidic din albedo, respectiv de 0,100 $\mu\text{M/s}$ - pentru extractul din flavedo de portocală), deși concentrația procentuală de pigmenți carotenoidici din aceste extracte este mai mică decât în celelalte extracte obținute. În aceste cazuri, activitatea antioxidantă ridicată se datorează prezenței în extracte a limonenului, componentul majoritar din uleiul volatil prezent în pericarpul de portocale, compus cunoscut ca fiind un puternic antioxidant. Acesta nu se îndepărtează complet în procesul de extracție a carotenoidelor, ci rămâne „captat” între moleculele de carotenoide.

3.3.1.3. Analiza conținutului de elemente minerale din materiile prime și extractele carotenoidice

• Elementele minerale analizate și implicațiile lor în organismul uman

Conținutul de substanțe minerale din vegetale este caracteristic fiecărei specii și variază în limite destul de largi în funcție de factorii pedoclimatici, tehnologiile de cultură etc.

Diversitatea mare a elementelor minerale existente în plante și faptul că acestea se găsesc în toate organele plantelor, le recomandă pe acestea ca fiind cele mai importante surse de macro- și microelemente necesare acoperirii nevoilor umane [119].

▪ Macroelemente

a) Potasiul

Potasiul este un element mineral de mare importanță pentru organism. El se găsește, la un organism adult, în cantități variind între 140 și 160 g, ceea ce reprezintă 0,5% din greutatea corporală [261]. În organism, potasiul este necesar pentru buna desfășurare a tuturor metabolismelor. El permite transformarea glucozei în glicogen, în metabolismul lipidelor și proteinelor intervine ca activator al unor enzime importante. Reducerea cantității de potasiu din organism este însoțită de apariția unor manifestări caracteristice: iritabilitate, lipsa poftei de mâncare, grețuri, vărsături, sete, astenie marcată, slăbiciune musculară până la paralizie insuficientă cardiacă, palpitații, hipotensiune arterială [261-264].

Potasiul se găsește în numeroase legume (morcovi, castraveți, ridichi, cartofi, tomate, ciuperci, salată verde, mazăre, fasole etc), fructe (mere, portocale, coacăze, cătină, stafide, prune, smochine, curmale, banane, piersici, caise, struguri, etc), drojdie albă etc.

b) Sodiul

Foarte răspândit în regnul vegetal, sodiul se găsește sub multiple combinații: cloruri, citrați, ioduri, fosfați, bicarbonați. Cele mai importante funcții ale sodiului în organismul uman sunt strâns legate de păstrarea principalelor funcții biologice. Sodiul participă la reglarea distribuției apei în organism, contribuie la păstrarea echilibrului ionic și la menținerea excitabilității neuromusculare. El determină totodată o creștere a rezistenței la efort fizic și nervos [186,261].

Produse vegetale bogate în sodiu sunt: spanacul, țelina, păpădia, napii, varza roșie, sfecla, ridichile, castraveții, fructele, în special sub formă de siropuri [261].

În cazurile de scădere a concentrației sodiului în organism apare scăderea tensiunii arteriale, astenia marcată, tulburări de vedere și echilibru, contracturi musculare și iritabilitate. Semnele nervoase apar când concentrația de sare este sub necesarul fiziologic minim de 0,6 g/zi. De asemenea, în absența unor cantități suficiente de sodiu, se îngreunează transformarea glucidelor în grăsimi și scade absorbția glucozei [263,264]

c) Calciul

Este cel mai abundent element mineral din organism. Din cantitatea totală aflată în corpul uman, aproape 90% este fixată în schelet și dinți, iar restul este distribuit în țesuturi și în lichide biologice [261].

Principala funcție a calciului în organism este ca, împreună cu fosforul, să consolideze și să mențină în stare de bună funcționare scheletul și dinții. Calciul intervine în procesul de coagulare a sângelui și asigură nivelul de excitabilitate neuromusculară. Prin intermediul calciului se facilitează transmiterea influxului nervos între fibrele nervoase, sau între acestea și organele la nivelul cărora ajung

comenzile nervoase. Calciul micșorează amploarea proceselor alergice, ameliorează capacitatea de distrugere a microbilor de către leucocite, activează un număr important de procese metabolice, stimulează echipamentul enzimatic al organismului, reglează unele procese energetice și de refacere tisulară, participă la stimularea secreției gastrice, la stimularea ritmului cardiac, la utilizarea fierului și la absorbția vitaminei B₁₂.

Vegetalele cele mai bogate în calciu sunt: legume- fasole, mazăre, varză, gulii, conopidă, țelină, morcovi, castraveți, pătrunjel, dovlecei, ridichi- fructe: mere, alune, portocale, caise, piersici, cătină albă, piersici, smochine, fragi, zmeură, căpșuni, stafide, nuci etc [262-264].

d) Magneziul

Magneziul este un element plastic și totodată și catalitic; de asemenea constituie un factor de creștere, un tonic general, un regenerador celular, un echilibrant psihic, un drenor hepatic, un antiseptic, pe cale internă și externă [186,261]. El contribuie la reglementarea echilibrului calcic, luptă împotriva anafilaxiei, a îmbătrânirii, a cancerozei, se opune trombozelor și aterosclerozei [186].

Magneziul se găsește în: grâu, ovăz, orz, porumb, curmale, spanac, cartofi, sfeclă roșie, polen și în alte multe vegetale. El reprezintă aproximativ 2,4% din masa terestră [262].

▪ Microelemente

a) Fierul

Fierul joacă un rol deosebit de important în organismul uman și animal, fiind un component al hemoglobinei precum și al unor numeroase sisteme enzimatice din lanțul respirator. Aceste sisteme joacă un rol cheie în respirația celulară. De asemenea, fierul participă în calitate de cofactor la structura a o serie de enzime: aconitaza, catalaza, citocromoxidaza, succindehidrogenaza, peroxidaza și influențează sinteza ADN-ului [186].

Este cel mai abundent dintre microelemente, concentrația fierului în organism putând ajunge până la 4-5 g [261].

Cantitățile cele mai mari de fier se găsesc în: fructe uscate, pătrunjel, varză albă, morcov, conopidă, varză roșie, mazăre, spanac, urzici, ciuperci, portocale, tomate, piersici, caise etc [262-264].

b) Manganul

În pofida slabei sale prezențe în organism (0,00005% din masa corporală), manganul este un element capital. Constituent al diferitelor sisteme enzimatice, reglator glandular important în creștere, activ în metabolismul zaharurilor, grăsimilor, proteinelor, el favorizează funcțiile ficatului și rinichilor, accelerează arderile, ajută la fixarea mineralelor, a fierului și a vitaminelor [186].

Aportul alimentar de mangan este asigurat în special de cereale, varză, țelină, cresson, morcov, ceapă, păpădie, cartof, polen [186].

c) Cuprul

Cuprul a fost detectat în toate țesuturile, găsindu-se în organism în proporție de 0,0004%. Este indispensabil vieții celulare și formării oaselor. Condiționează fixarea fierului și concurează la formarea hemoglobinei. Se opune la coagularea excesivă a sângelui. De asemenea a fost găsit un paralelism între secreția tiroidiană și procentul de cupru din sânge. Este un element dinamic, antiinfecțios, antiviral, antiinflamator [261].

Sursele vegetale cele mai bogate în cupru sunt: nucile, migdalele, strugurii, legumele uscate, alunele, grâul, portocalele, cireșele, merele, spanacul etc [262].

d) Zincul

Zincul este nominalizat ca metal greu cu potențial toxic, concentrația acestuia în alimentele de origine vegetală fiind limitată de legislație [265,266].

Cantitatea de zinc dintr-un organism uman adult de 70 kg este de 2,5g, din care 30% se găsește în oase și 60% în mușchi. Necesarul zilnic este de 8-10 mg.

Acest element intervine în stimularea și reglarea hipofizei, a glandelor genitale, joacă un rol important în funcționarea pancreasului și în anumite procese enzimatice. Se cunosc până în prezent peste 80 de enzime care au în constituția lor acest mineral. Zincul are o acțiune deosebită în metabolismul acizilor nucleici, sinteza proteinelor, diviziunea celulară, are o acțiune protectoare împotriva fenomenului de îmbătrânire, împiedicând acțiunea de uzură a unor substanțe toxice asupra echipamentului biologic celular.

Vegetalele cele mai bogate în zinc sunt: cerealele și semințele de dovleac. Prezența în alimentație a vegetalelor cu un conținut mare de acid fitic ihibă asimilarea zincului în intestin și favorizează instalarea deficitului [263,264].

e) Plumbul

Plumbul, metal greu cu caracter toxic pronunțat, în condiții normale de mediu, se găsește în sângele uman (copii și adulți) în concentrație de 15-40 $\mu\text{g}/100\text{ml}$. Concentrațiile de 50-80 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ sunt considerate toxice. Gradul tot mai ridicat de industrializare duce la o încărcare tot mai mare a mediului cu plumb, acest microelement figurând pe lista elementelor cancerigene.

Excesul de plumb provoacă la om: encefalopatie saturnică, neuropatie periferică, neuropatie acută și cronică. De asemeni prezintă efecte dăunătoare asupra fertilității, a sistemului endocrin, miocardului și asupra mecanismelor imune [261].

f) Cobaltul

Cobaltul este microelementul care se găsește în organism în cantitatea cea mai redusă (0,000004%) dar are o activitate extrem de intensă. Se găsește peste tot în organism dar concentrațiile cele mai ridicate se află în ficat, rinichi, cord și oase [261]. Acest element intră în componența vitaminei B₁₂, este activator al multor enzime și este capabil să ia locul altor ioni în activarea unor reacții enzimatice. Reglează sistemul vago-simpatic și este un vasodilatator.

Reducerea aportului acestui mineral sub limita de 5 g/zi, un timp mai îndelungat, determină apariția manifestărilor anemiei pernicioase. [261,264].

g) Cromul

Acest microelement se găsește în numeroase țesuturi. El activează unele enzime implicate în metabolismul glucozei, în sinteza acizilor grași, în cea a colesterolului. Efectul major al cromului îl constituie însă activarea funcției insulinei. De asemenea cromul asigură protecție parțială împotriva aterosclerozei, permite menținerea integrității sistemului nervos.

Necesarul de crom la om este situat între 300-400 $\mu\text{g}/\text{zi}$, necesitățile fiind mai mari la femeile gravide și la diabetici.

Sărurile de crom sunt toxice, doza letală fiind de 0,5 g pentru un om adult.

Sursa vegetală cea mai bogată în crom este uleiul de porumb [261].

h) Nichelul

Acest microelement se pretează pentru diferite funcții biologice, deoarece:

- are greutate moleculară mică și este un element de tranziție care formează chelați;
- este răspândit în scoarța terestră și în apa mărilor;
- este netoxic pentru om cu excepția dozelor astringente;
- nu se acumulează excesiv în organism.

Nichelul este implicat în conservarea integrității membranelor celulare. Unele cercetări arată capacitatea nichelului de a se substitui calciului în anumite secvențe de excitație și contracție a mușchilor scheletici. Este posibil ca nichelul să aibe un rol structural în acizii nucleici pe care îi stabilizează.

Necesitățile de nichel nu sunt cunoscute. Dintre alimente, o cantitate destul de mare de nichel conține ceaiul, vegetalele verzi cu frunze, tuberculii, fructele și semințele [261].

• **Analiza datelor obținute prin spectrofotometrie de absorbție atomică**

Determinările conținutului de elemente minerale din extractele carotenoidice obținute și din materiile prime utilizate, realizate prin spectrofotometrie de absorbție atomică, potrivit modului de lucru descris la 3.2.1.6. au condus la rezultatele prezentate mai jos:

- *Elementele minerale prezente în extractele din porumb (Zea mays) și în făina de porumb*

Au fost determinate mai multe elemente minerale din materiile prime și din extractele carotenoidice obținute din mai multe tipuri de hibrizi de porumb (*Zea mays*) *NSSK444*, *NSSK640*, *NSSK420*, *Lovrin 400*, *Laureat*, *Florenzia* (3.2.1.2.). Rezultatele obținute sunt prezentate în figurile 3.56.-3.61., respectiv tablele 3.29. și 3.30.

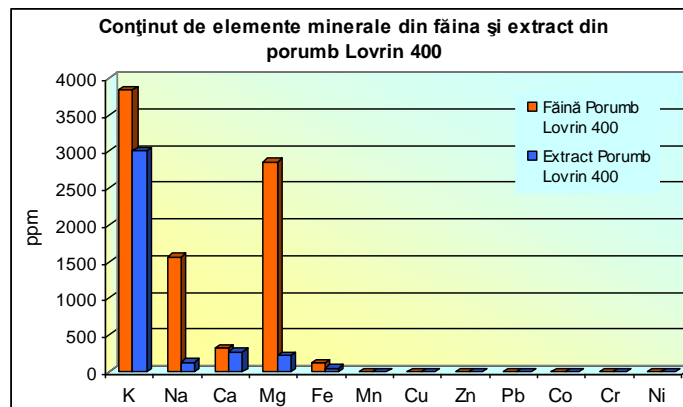


Figura 3.56.- Reprezentarea grafică a conținutului de elemente minerale (ppm) din făina de porumb Lovrin 400 și extractul carotenoidic din porumb Lovrin 400

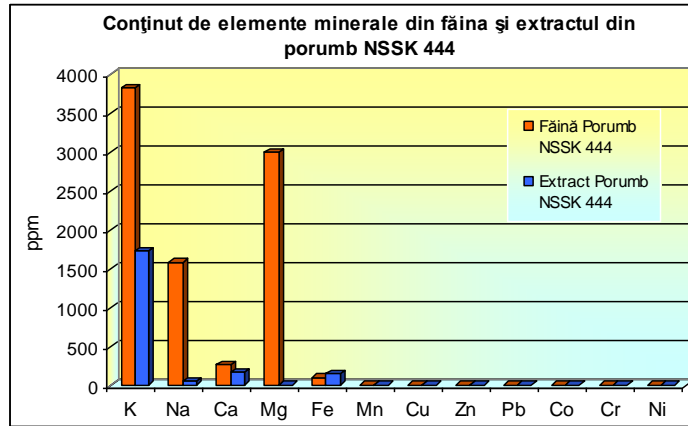


Figura 3.57. - Reprezentarea grafică a conținutului de elemente minerale (ppm) din făina de porumb NSSK 444 și extractul carotenoidic din porumb NSSK 444

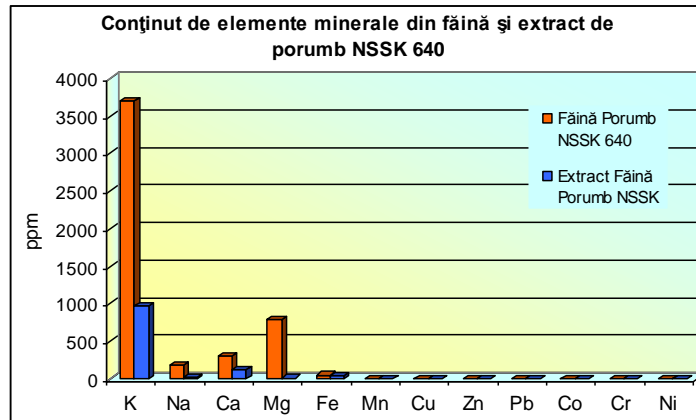


Figura 3.58. - Reprezentarea grafică a conținutului de elemente minerale (ppm) din făina de porumb NSSK 640 și extractul carotenoidic din porumb NSSK 640

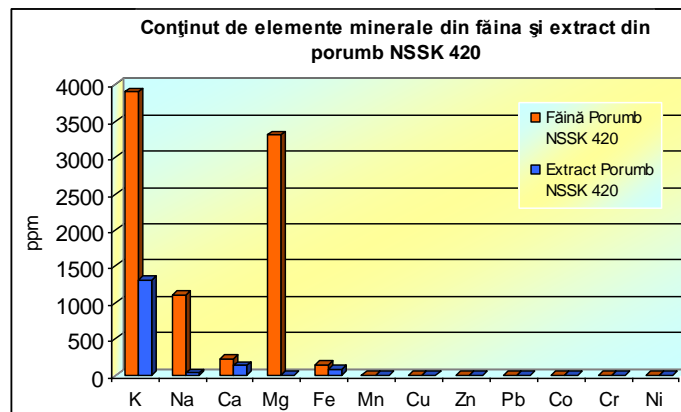


Figura 3.59. - Reprezentarea grafică a conținutului de elemente minerale (ppm) din făina de porumb NSSK420 și extractul carotenoidic din porumb NSSK420

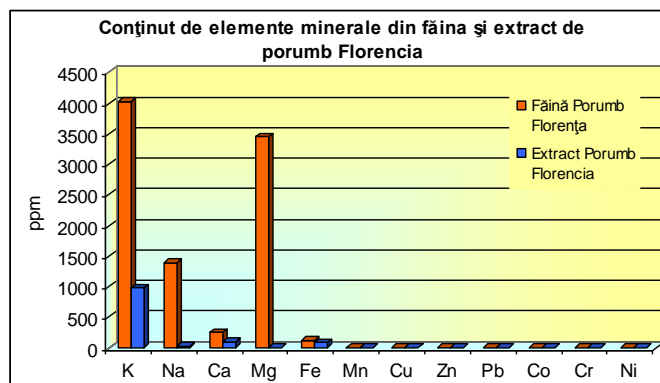


Figura 3.60. - Reprezentarea grafică a conținutului de elemente minerale (ppm) din făina de porumb Florența și extractul carotenoidic din porumb Florența

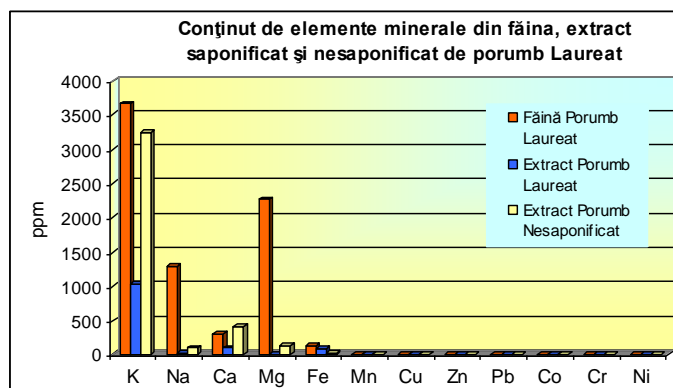


Figura 3.61. - Reprezentarea grafică a conținutului de elemente minerale (ppm) din făina de porumb Laureat, din extractul carotenoidic din porumb Laureat și din extractul de porumb Laureat nesaponificat

Tabelul 3.29.

Conținutul de elemente minerale (ppm) din hibridii de porumb Lovrin 400, NSSK444, NSSK640 și extractele carotenoidice obținute din aceștia

| Material | Extract porumb Lovrin 400 | Făină porumb Lovrin 400 | Făină porumb NSSK444 | Extract porumb NSSK444 | Făină porumb NSSK640 | Extract porumb NSSK640 |
|----------|---------------------------|-------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| Cod | ExP_L | FP_L | FP_444 | ExP_444 | FP_640 | ExFP_640 |
| K | 3006 | 3841 | 3833 | 1734 | 3698 | 969,75 |
| Na | 131,2 | 1569,56 | 1586,81 | 49,06 | 176,28 | 23,72 |
| Ca | 275 | 319,8 | 266,5 | 166,85 | 309,2 | 120,9 |
| Mg | 224,56 | 2858 | 2999 | 0 | 785,28 | 12,61 |
| Fe | 49,1 | 116,9 | 99,5 | 141,7 | 52,3 | 41,04 |
| Mn | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cu | 0,349 | 2,512 | 0,407 | 0,1985 | 0,091 | 0,2676 |
| Zn | 0,5889 | 2,378 | 2,007 | 1,455 | 0,268 | 0,8561 |
| Pb | 0,33 | 0,38 | 0,35 | 0,185 | 0,28 | 0,102 |
| Co | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cr | 0,065 | 0,086 | 0,119 | 0,086 | 0,098 | 0,297 |
| Ni | 0,124 | 0,159 | 0,169 | 0,1625 | 0,136 | 0,0762 |

Tabelul 3.30.
 Conținutul de elemente minerale (ppm) din hibrizii de porumb NSSK420, Florencia, Laureat și extractele carotenoidice obținute din aceștia

| Material | Extract porumb NSSK420 | | Făină porumb NSSK420 | | Făină porumb Florencia | | Extract porumb Florencia | | Făină porumb Laureat | | Extract porumb Laureat | | Extract porumb Laureat nesaponificat | |
|----------|------------------------|---------|----------------------|--------|------------------------|---------|--------------------------|--------|----------------------|--------|------------------------|-----------|--------------------------------------|--|
| | Exp420 | FP_420 | FP_F | Exp_F | FP_F | Exp_F | FP-La | Exp_La | FP-La | Exp_La | FP_Nesap | Exp_Nesap | | |
| K | 1315 | 3908 | 4028,9 | 972,6 | 3663 | 1027,89 | | | | | 3241,6 | | | |
| Na | 31,3 | 1110,92 | 1393,86 | 26,56 | 1284,95 | 27,65 | | | | | 100,61 | | | |
| Ca | 129,76 | 229,4 | 241,1 | 97,02 | 302,9 | 102,3 | | | | | 412,1 | | | |
| Mg | 0 | 3317 | 3454 | 0 | 2267 | 0 | | | | | 131,7 | | | |
| Fe | 86,64 | 141,7 | 117,4 | 80,58 | 139,9 | 93 | | | | | 22,3 | | | |
| Mn | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | 0 | | | |
| Cu | 0,0196 | 2,72 | 0,348 | 0,0753 | 6,53 | 0,1938 | | | | | 0,015 | | | |
| Zn | 0,844 | 2,729 | 1,75 | 0,704 | 2,826 | 0,873 | | | | | 0,1764 | | | |
| Pb | 0,108 | 0,34 | 0,33 | 0,069 | 0,53 | 0,123 | | | | | 0,23 | | | |
| Co | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | 0 | | | |
| Cr | 0,0748 | 0,087 | 0,081 | 0,049 | 0,104 | 0,043 | | | | | 0,003 | | | |
| Ni | 0,068 | 0,236 | 0,178 | 0,0687 | 0,273 | 0,1176 | | | | | 0,097 | | | |

Se poate constata că în cazul metalelor grele cu potențial toxic, nu sunt depășite limitele legale admisibile [265,266], nici pentru materiile prime, nici pentru extracte, cu o singură excepție: în făina de porumb *Laureat*, conținutul de Cu este de 6,53 ppm, limita admisă de lege fiind de 5,00 ppm. Conținutul celorlalte elemente minerale din materiile prime se încadrează în limitele indicate de datele de literatură [207,208].

Potasiul este macroelementul cel mai bine reprezentat atât în făina de porumb cât și în extractele carotenoidice. Conținutul de K în făina hibrizilor de porumb analizați variază între 4028,90 ppm - pentru hibridul *Florența* și 3663,00 ppm - pentru hibridul *Laureat*. În extractele carotenoidice, conținutul de potasiu variază între 3006,00 ppm- pentru extractul din hibridul *Lovrin 400* și 969,75 ppm - pentru extractul din hibridul *NSSK640*. În cazul extractului nesaponificat din porumb *Laureat*, concentrația de potasiu (3241,60 ppm) este mai mică decât în făină (3663,00 ppm), dar mai mare decât în extractul final saponificat (1027,89 ppm).

Sodiul se găsește în cantitate mult mai mică decât potasiul, atât în făina de porumb, cât și în extracte. În făina de porumb, conținutul de sodiu variază între 176,28 ppm- în cazul hibridului *NSSK640* și 1586,81 ppm- pentru hibridul *NSSK444*. Conținutul de Na din extractele carotenoidice finale este mult mai mic decât cel din materiile prime din care provin, fiind cuprins între 23,72 ppm - în cazul extractului din porumb *NSSK640* și 131,20 ppm - pentru extractul din porumb *Lovrin 400*. În extractul nesaponificat din porumb *Laureat*, conținutul de Na (100,61 ppm) este mult mai mic decât în făină (1284,95 ppm), dar mai ridicat decât în extrcaul final saponificat (27,65 ppm), sărurile de sodiu fiind în mare măsură eliminate din acesta.

Calciul, macroelement foarte important pentru organism se află și el în cantitate destul de ridicată în făina de porumb și în extractele carotenoidice, conținutul de calciu variind la făină între 229,40 ppm - pentru hibridul *NSSK420* și 319,80 ppm - pentru hibridul *Lovrin 400*, iar la extracte, între 97,02 ppm- pentru extractul din hibridul *Florența* și 275,00 ppm - în extractul din porumbul *Lovrin 400*. În extractul nesaponificat din porumb *Laureat*, conținutul de Ca este (așa cum am menționat anterior) mai ridicat decât în făină și decât în extractul saponificat, ceea ce arată că acest element se îndepărtează din extract în special după saponificare.

Magneziul este prezent în cantități mai ridicate decât Ca în făina de porumb, variind între 3454,00 ppm - pentru hibridul *Florența* și 783,28 ppm - pentru hibridul *NSSK640*. Extractele carotenoidice sunt mult mai sărace în magneziu, acest element fiind chiar absent în extractele din porumb *NSSK444*, *NSSK420*, *Florența* și *Laureat*; în cazul hibrizilor *Lovrin 400* și *NSSK640*, conținutul de magneziu din extractele carotenoidice este de 224,56 ppm, respectiv 12,61 ppm, iar în extractul nesaponificat din hibridul *Laureat* conținutul este de 131,70 ppm (mai mare decât în extractul final saponificat, în care nu s-a indentificat magneziul). Deși în făina de porumb magneziul este în cantitate mai mare decât calciul, se observă faptul că magneziul lipsește din multe extracte carotenoidice, fiind eliminat complet în procesul de extracție, pe când calciul se regăsește în toate extractele, compușii carotenoidici reținând acest macroelement.

Fierul, metal esențial pentru organism, este bine reprezentat în făina de porumb, variind între 52,30 ppm - pentru porumbul *NSSK640* și 141,70 ppm - pentru porumbul *NSSK420*. În extractele carotenoidice, concentrația de fier este numai puțin mai scăzută decât în materia primă, variind între 41,04 ppm - pentru hibridul *NSSK640* și 141,70 ppm - pentru hibridul *NSSK444*. Se observă în cazul acestui element, că extractul din porumb *NSSK444* este mai bogat în fier decât materia primă, acest extract având aceeași concentrație de fier ca și făina din porumb *NSSK640*, care este cea mai bogată în acest metal dintre toate tipurile de

făină de porumb analizate. De asemeni se poate constata că fierul nu se îndepărtează prin procesul de saponificare a extractelor, concentrația în extractul nesaponificat din porumb *Laureat*, fiind mai mică (22,30 ppm) decât concentrația din extractul final saponificat (93,00 ppm).

Manganul nu a fost decelat în nici unul din tipurile de făină de porumb și nici în extractele carotenoidice din făina de porumb.

Cuprul, microelement esențial pentru organism, dar care peste anumite limite de concentrație devine toxic (limita maximă legală de concentrație pentru făina de porumb: 5,00 ppm [265]), se află în concentrații reduse în făina de porumb, cu excepția făinii din hibridul *Laureat*, în care este depășită concentrația maximă stabilită de legislație cu 1,53 ppm. În extractele carotenoidice, concentrațiile de Cu sunt mai mici decât în materiile prime, cu excepția extractului din porumb *NSSK640*, unde cantitatea de Cu (0,26 ppm) este puțin mai mare decât în materia primă (0,09 ppm). Cuprul nu se îndepărtează din extracte prin saponificare, concentrația acestui element în extractul nesaponificat fiind mai mică (0,015 ppm) decât în extractul saponificat (0,19 ppm).

Zincul, ca și cuprul, este un microelement esențial pentru organism dar care în anumite concentrații poate deveni toxic. Acesta se află în făina de porumb în cantități variind între 0,26 ppm – pentru hibridul *NSSK640* și 2,82 ppm - pentru hibridul *Laureat*. Valorile se găsesc mult sub limita maximă legală care, pentru făina de porumb, este de 15 ppm [265]. În extracte, conținutul de Zn este mai mic decât în materiile prime, cu excepția extractului din porumb *NSSK640*, unde zincul se găsește în concentrație mai mare (0,85 ppm), decât în materia primă (0,26 ppm). Ca și cuprul, nici zincul nu se îndepărtează prin saponificare, concentrația acestui metal în extractul final saponificat fiind mai mare (0,87 ppm) decât în extractul nesaponificat (0,17 ppm - hibridul *Laureat*).

Plumbul, metal greu cu un caracter toxic pronunțat, se află în făina de porumb în cantități mai mici decât limita maximă legală (1,00 ppm – pentru făina de porumb [265] variind între 0,28 ppm – pentru hibridul *NSSK640* și 0,53 ppm – pentru hibridul *Laureat*. În extractele carotenoidice, plumbul se găsește în concentrații mai mici decât în făină (între 0,069 ppm – pentru extractul din porumb *Florența* și 0,33 ppm - pentru extractul din porumb *Lovrin 400*. Plumbul se îndepărtează din extracte în urma saponificării acestora, conținutul în acest metal fiind mai mare în extractul nesaponificat din porumb *Laureat* (0,23 ppm), decât în extractul saponificat (0,12 ppm).

Cobaltul nu a fost evidențiat nici în făina de porumb, nici în extractele carotenoidice din făina de porumb.

Cromul se găsește în cantități foarte mici în făina de porumb (între 0,081 ppm – pentru hibridul *Florența* și 0,119 ppm – pentru hibridul *NSSK444*) și în extractele carotenoidice din făina de porumb (între 0,049 ppm – pentru extractele din porumb *Florența* și *Laureat*, 0,29 ppm – pentru extractul din porumb *NSSK640*). Se constată că, în cazul porumbului *NSSK640*, concentrația de crom este mai mare în extractul carotenoidic (0,29 ppm) decât în făină (0,098 ppm). Urmele de crom nu se îndepărtează în urma saponificării extractului, conținutul de crom din extractul saponificat fiind mai ridicat (0,049 ppm) decât în extractul nesaponificat (0,003 ppm).

Nichelul a fost determinat în concentrații mici în făina de porumb (între 0,136 ppm – pentru hibridul *NSSK640* și 0,273 ppm – pentru hibridul *Laureat*), în extractele carotenoidice, acest conținut fiind și mai mic (0,068 ppm – pentru extractele din porumb *NSSK420* și *Florența*, 0,162 ppm – pentru extractul din porumb *NSSK444*). Urmele de nichel din extracte nu se îndepărtează prin

saponificarea acestora, conținutul în acest metal fiind mai mare în extractul saponificat (0,117 ppm) decât în cel nesaponificat (0,097 ppm).

- *Elementele minerale prezente în extractele carotenoidice din fructe de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*) și în făina de cătină albă*

Au fost determinate elementele minerale prezente în extractul carotenoidic final din fructe de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*), soiul *Delta 1* (vezi 3.2.1.2.- Partea experimentală), din extractul nesaponificat, precum și din materia primă utilizată (figura 3.62., tabelul 3.31.)

În cazul făinii din fructe de cătină, soiul *Delta 1*, se poate observa că toate elementele minerale se află în cantitate mai mare în materia primă și mult mai mică în extractul carotenoidic; de asemeni, extractul nesaponificat conține mai multe minerale decât cel saponificat.

Dintre macroelemente, cel mai bine reprezentat este potasiul - atât în material primă cât și în extracte (4313,30 ppm - în făina de cătină, 3384,00 ppm - în extractul nesaponificat, 3002,00 ppm - în extractul saponificat). După potasiu, cel mai bine reprezentat element în făina de cătină albă este magneziul (3403,10 ppm) și apoi sodiul (2814,00 ppm), iar în extracte- calciul (235,10 ppm - în extractul saponificat, respectiv 295,10 ppm - în extractul nesaponificat), urmat de sodiu și magneziu care se găsesc în cantități aproape identice (Na: 173,30 ppm - în extractul saponificat, respectiv 197,57 ppm - în cel nesaponificat; Mg: 171,67 ppm - în extractul saponificat, respectiv 191,63 ppm - în cel nesaponificat)

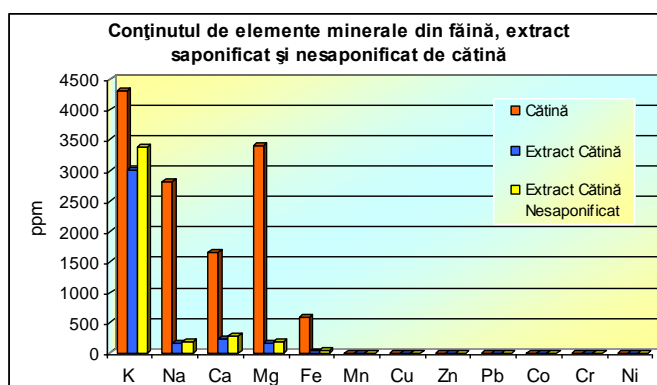


Figura 3.62. - Reprezentarea grafică conținutului de elemente minerale (ppm) din făina de fructe de cătină albă, din extractul carotenoidic din fructe de cătină albă și din extractul de cătină nesaponificat

Dintre metale, cel mai bine reprezentat este fierul (605,30 ppm - în făina de cătină albă, 42,10 ppm - în extractul saponificat, 61,80 ppm - în extractul nesaponificat), manganul și cobaltul nu se regăsesc nici în făină, nici în extracte, iar celelalte metale se află în cantități foarte reduse, sub limita maximă impusă de lege [265].

Comparativ cu făina de porumb, se remarcă faptul că făina de cătină este mai bogată în K, Na, Ca, Mg (cu excepția hibidului de porumb *Florența* - mai bogat în magneziu), iar extractul saponificat din cătină albă este mai bogat decât extractele din porumb în: K, Ca, Mg (cu excepția hibidului *Lovrin 400*) și Na.

Tabelul 3.31.

Conținutul de elemente minerale (ppm) din făina de fructe de cătină albă și din extractul carotenoidic saponificat și cel nesaponificat obținute din aceasta

| Material | Făină catină Delta 1 | Extract catină Delta 1 | Extract catină Delta 1 nesaponificat |
|----------|----------------------|------------------------|--------------------------------------|
| Cod | C | ExC | ExC_nesap. |
| K | 4313,3 | 3002 | 3384 |
| Na | 2814 | 173,3 | 197,57 |
| Ca | 1657,3 | 235,1 | 295,1 |
| Mg | 3403,1 | 171,67 | 191,63 |
| Fe | 605,3 | 42,1 | 61,8 |
| Mn | 0 | 0 | 0 |
| Cu | 1,295 | 0,039 | 0,055 |
| Zn | 3,139 | 0,296 | 0,3554 |
| Pb | 0,61 | 0,25 | 0,3 |
| Co | 0 | 0 | 0 |
| Cr | 0,125 | 0,018 | 0,045 |
| Ni | 0,191 | 0,109 | 0,112 |

- Elementele minerale prezente în extractele carotenoidice din flori de gălbenele (*Calendula officinalis*) și în materia primă

Elementele minerale prezente în florile uscate de gălbenele (*Calendula officinalis*) și în extractul final obținut (vezi 3.2.1.2. - Partea experimentală), sunt prezentate în figura 3.63., respectiv tabelul 3.32.

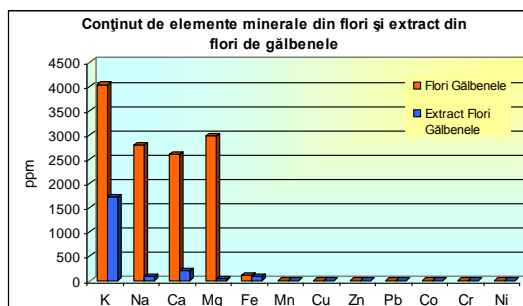


Figura 3.63. - Reprezentarea grafică a conținutului de elemente minerale (ppm) din flori gălbenele și extractul carotenoidic din flori de gălbenele

Tabelul 3.32.

Conținutul de elemente minerale (ppm) din flori gălbenele și extractul carotenoidic din flori de gălbenele

| Material | Flori gălbenele | Extract flori gălbenele |
|----------|-----------------|-------------------------|
| Cod | FIG | ExFIG |
| K | 4047 | 1732 |
| Na | 2795 | 82,3 |
| Ca | 2613,3 | 211,4 |
| Mg | 2992 | 31,14 |
| Fe | 1050,4 | 87,5 |
| Mn | 0,339 | 0 |
| Cu | 0,282 | 0,068 |
| Zn | 2,61 | 1,715 |
| Pb | 0,08 | 0 |
| Co | 0,007 | 0 |
| Cr | 0 | 0 |
| Ni | 0,069 | 0,006 |

Florile de gălbenele au un conținut ridicat de macroelemente esențiale pentru organism: K - 4047,00 ppm, Mg - 2992,00 ppm, Na - 2795,00 ppm, Ca - 2613,30 ppm, precum și de fier - 1050,40 ppm. Cantitățile de elemente minerale din extractul carotenoidic sunt mult mai reduse decât în marea primă, acestea eliminându-se în mare măsură în cadrul procesului de extracție.

În florile de gălbenele au fost identificate manganul (0,339 ppm) și cobaltul (0,007 ppm), metale grele ce nu au fost evidențiate în făina de porumb sau în cea de cătină albă; în extractul carotenoidic însă, aceste metale nu se mai regăsesc. De asemenea, nu a fost identificat cromul, nici în făina din fructe de cătină albă, nici în extract. Concentrația metalelor grele în florile de gălbenele este sub limita maximă legală.

Calciul și fierul se află în florile de gălbenele în concentrații net superioare față de făina de porumb și cea de cătină albă, însă extractele carotenoidice conțin cantități apropiate din aceste elemente.

- *Elementele minerale prezente în extractele carotenoidice din fructe de piersică (Persica vulgaris) și materia primă*

Conținutul de elemente minerale din miezul (pulpa) și pericarpul de piersică (*Persica vulgaris*), soiul *Red Haven* ca și din extractele carotenoidice obținute din acestea (vezi 3.2.1.2. - Partea experimentală), sunt prezentate în figurile 3.64., 3.65. (tabelul 3.33.).

Analizând datele obținute se constată că pericarpul de piersică prezintă un conținut de elemente minerale mult mai ridicat decât extractul carotenoidic obținut din acesta, macro- și microelementele îndepărtându-se în mare măsură în timpul procesului de extracție. Și în acest caz, macroelementul cel mai bine reprezentat, atât în materia primă cât și în extract, este potasiul (3472,80 ppm – în pericarpul de piersică, respectiv 1465,00 ppm – în extractul din pericarp de piersică).

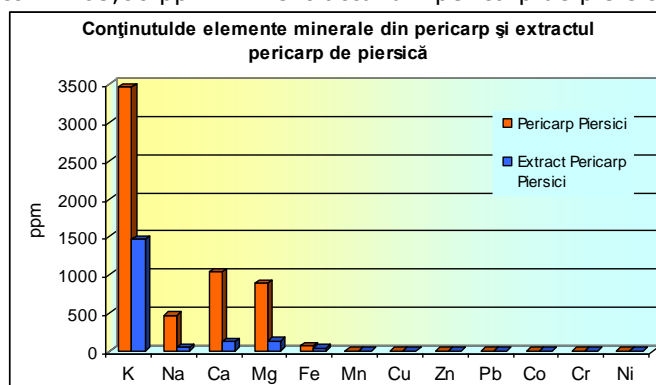


Figura 3.64.- Reprezentarea grafică a conținutului de elemente minerale (ppm) din pericarp de piersică și extractul carotenoidic din pericarp de piersică

După potasiu, elementele cele mai abundente în pericarpul de piersică și în extractul carotenoidic din acesta sunt calciul (1033,80 ppm- în pericarp, respectiv 125,40 ppm - în extract) și magneziul (886,75 ppm - în pericarp, respectiv 132,30 ppm - în extract). Metalele grele se găsesc în pericarpul de piersică în concentrații mai mici decât limitele maxime prevăzute de lege [265], iar prezența manganului și a cobaltului nu a fost identificată.

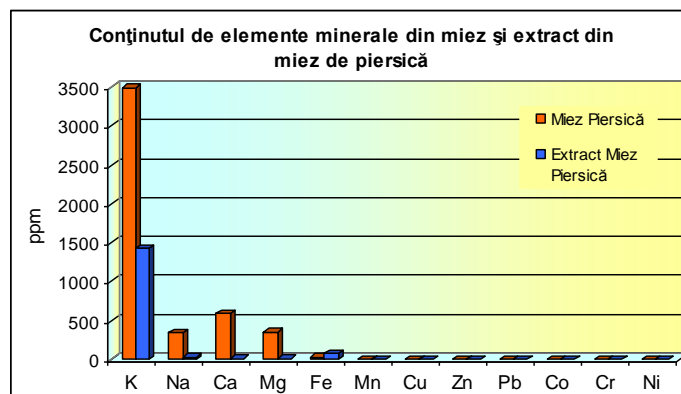


Figura 3.65.- Reprezentarea grafică a conținutului de elemente minerale (ppm) din miez de piersică și extractul carotenoidic din miez de piersică

Tabelul 3.33.

Conținutul de elemente minerale (ppm) din pericarp și miez de piersică și din extractele carotenoidice obținute din acestea

| Material | Pericarp piersică | Extract pericarp piersică | Miez piersică | Extract miez piersică |
|----------|-------------------|---------------------------|---------------|-----------------------|
| Cod | PP | ExPP | MP | ExMP |
| K | 3472,8 | 1465,2 | 3490 | 1423 |
| Na | 472 | 45,8 | 343,9 | 31,2 |
| Ca | 1033,8 | 125,4 | 586,5 | 10,2 |
| Mg | 886,75 | 132,3 | 354,79 | 12,23 |
| Fe | 71,5 | 35,4 | 28,33 | 81 |
| Mn | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cu | 0,096 | 0,028 | 0,178 | 0,103 |
| Zn | 2,26 | 0,984 | 1,49 | 0,82 |
| Pb | 0,29 | 0,248 | 0,27 | 0,23 |
| Co | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cr | 0,067 | 0,008 | 0,261 | 0,013 |
| Ni | 0,167 | 0,098 | 0,184 | 0,1 |

Datele referitoare la mineralele din miezul de piersică și extractul carotenoidic din miez de piersică ne relevă faptul că extractul este mult mai sărac, în toate elementele minerale, comparativ cu materia primă, elementul predominant cantitativ, și în acest caz, atât în pulpă cât și în extract, fiind tot potasiul. Cantitățile de potasiu din pulpa de piersică (3490,00 ppm) și din extractul carotenoidic obținut din aceasta (1423,00 ppm) sunt foarte apropiate de concentrațiile acestui element în pericarp, respectiv în extractul carotenoidic din pericarp. Concentrațiile de Na, Ca, Mg, Zn și Pb din miezul de piersică și din extractul din miez de piersică sunt mai scăzute decât concentrațiile acestor elemente din pericarpul de piersică, respectiv din extractul carotenoidic din acesta. Fierul, cuprul, cromul și nichelul, sunt însă mai bine reprezentate în pulpa de piersică, respectiv în extractul carotenoidic din aceasta, decât în pericarpul de piersică și în extractul carotenoidic din acesta.

- Elementele minerale prezente în extractele carotenoidice din flavedo și albedo de portocală (*Citrus sinensis*) și în materia primă

Concentrațiile elementelor minerale din flavedo și albedo de portocală (*Citrus sinensis*) soiul *Valencia* și din extractele carotenoidice obținute din acestea (vezi 3.2.1.2. - Partea experimentală) sunt prezentate în figurile 3.66., 3.67. (tabelul 3.34.)

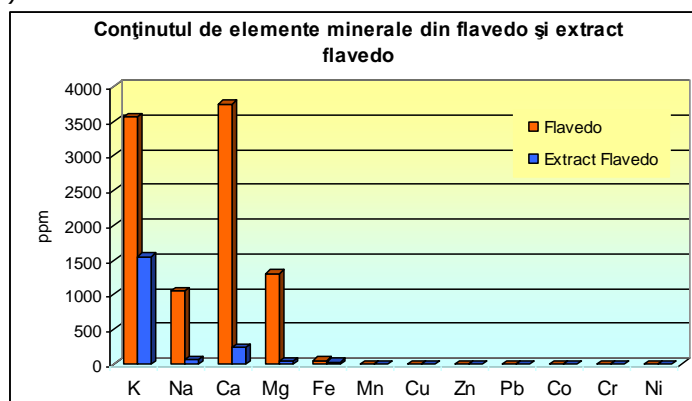


Figura 3.66. - Reprezentarea grafică a conținutului de elemente minerale (ppm) din flavedo-portocale și extractul carotenoidic din flavedo-portocale

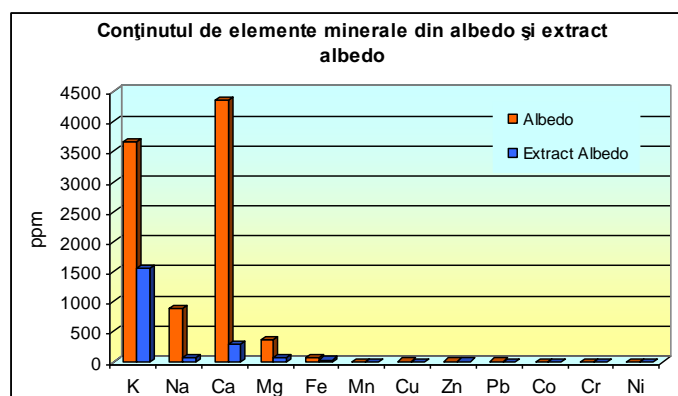


Figura 3.67. - Reprezentarea grafică conținutului de elemente minerale (ppm) din albedo-portocale și extractul carotenoidic din albedo-portocale

Datele obținute pentru flavedo de portocală ne indică un conținut de elemente minerale mai ridicat în materia primă decât în extractul carotenoidic, cu excepția cuprului (0,222 ppm – în extract, respectiv 0,154 ppm – în materia primă). Elementul cel mai bine reprezentat și în material primă și în extract este tot potasiul (3563,00 ppm - în materia primă, 1547,00 ppm - în extract), urmat de calciu (3743,00 ppm – în material primă, 251,30 ppm – în extract). Dintre metalele grele, în materia primă nu a fost identificat manganul, iar în extract- manganul și cobaltul; celelalte metale grele se găsesc sub limita maximă admisă de lege [265].

Tabelul 3.34.

Conținutul de elemente minerale (ppm) din flavedo și albedo de portocală și din extractele carotenoidice obținute din acestea

| Material | Flavedo portocală | Extract flavedo | Albedo portocală | Extract albedo |
|----------|-------------------|-----------------|------------------|----------------|
| Cod | FI | ExFI | AI | ExAI |
| K | 3563 | 1547 | 3661 | 1557 |
| Na | 1048,76 | 67,21 | 881,72 | 64,18 |
| Ca | 3743 | 251,3 | 4361 | 283,15 |
| Mg | 1308,25 | 52,26 | 357,85 | 58,15 |
| Fe | 56,1 | 35,8 | 69,3 | 26,55 |
| Mn | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cu | 0,154 | 0,222 | 0,287 | 0,072 |
| Zn | 2,195 | 1,515 | 2,279 | 1,255 |
| Pb | 0,25 | 0,25 | 0,3 | 0,2 |
| Co | 0,009 | 0 | 0,002 | 0 |
| Cr | 0,075 | 0,01 | 0,146 | 0,0055 |
| Ni | 0,161 | 0,1 | 0,2 | 0,069 |

Conținutul de potasiu în albedo de portocală (3661,00 ppm) și în extractul din albedo de portocală (1557,00 ppm) este puțin mai ridicat decât cel din flavedo și extractul din flavedo, acest element fiind cel majoritar și în acest caz. De asemenea, se poate observa că și concentrația de calciu este mai mare în albedo (4361,00 ppm) și în extractul din albedo (283,15 ppm) decât în flavedo și extractul obținut din acesta. Dintre metalele grele, manganul nu a fost identificat în albedo de portocală, iar în extractul din albedo nu s-a evidențiat nici manganul, nici cobaltul. În ceea ce privește celelalte metale grele determinate, concentrația acestora este sub limita maximă legală [265].

- Elementele minerale prezente în extractele carotenoidice din tulpina de rostopască (*Chelidonium majus*) și în material primă

Au fost determinate elementele minerale din tulpina de rostopască (*Chelidonium majus*) și în extractul carotenoidic obținut din aceasta, datele obținute fiind reprezentate în figura 3.68., respectiv tabelul 3.35.

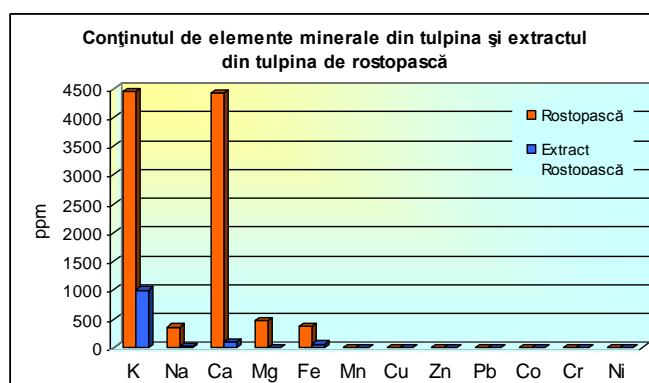


Figura 3.69. - Reprezentarea grafică a conținutului de elemente minerale (ppm) din tulpina de rostopască și extractul carotenoidic din tulpina de rostopască

Tabelul 3.35.

Conținutul de elemente minerale (ppm) din tulpina de rostopască și extractul carotenoidic din tulpina de rostopască

| Material | Rostopască | Extract rostopască |
|----------|------------|--------------------|
| Cod | R | ExR |
| K | 4441 | 1004 |
| Na | 357,97 | 29,6 |
| Ca | 4420 | 96,42 |
| Mg | 472,26 | 0 |
| Fe | 379 | 65,22 |
| Mn | 0,076 | 0 |
| Cu | 0,21 | 0,0171 |
| Zn | 2,135 | 0,463 |
| Pb | 0,26 | 0,066 |
| Co | 0 | 0 |
| Cr | 0,176 | 0,036 |
| Ni | 0,234 | 0,048 |

Și în cazul tulpinii de rostopască, se poate observa că extractul carotenoidic este mult mai sărac în elemente minerale decât materia primă. Elementul cel mai răspândit atât în materia primă cât și în extract este tot potasiul (4441 ppm - în materia primă, respectiv 1004 ppm - în extract), urmat de calciu (4420 ppm - în materia primă, respectiv 96,42 ppm - în extract). Se constată că magneziul, deși este bine reprezentat în materia primă (472,26 ppm), nu se mai regăsește de loc în extractul carotenoidic, fiind îndepărtat complet în timpul procesului de extracție. Fierul se găsește în cantități apreciabile în tulpina de rostopască (379 ppm) și în extractul carotenoidic obținut din aceasta (65,22 ppm). În ceea ce privește metalele grele, în materia primă nu a fost identificat cobaltul, iar în extract: magneziul, manganul și cobaltul. Toate celelalte metale grele se găsesc sub limita maximă admisă de lege [265], atât în materia primă cât și în extract.

• **Analiza multivariată (PCA) a datelor privind elementele minerale din materiile prime și din extracte**

Pentru analiza multivariată s-au utilizat ca date de intrare concentrațiile elementelor minerale (ppm) din diverse probe de materii prime vegetale și extracte carotenoidice supuse analizelor. Cazurile au fost codificate în funcție de tipul probelor (conform tabelelor 3.29.-3.35.).

Prelucrarea multivariată a întregii cantități de date a condus la clasificarea foarte bună a cazurilor, prima componentă principală explicând variația datelor. Din graficul scorurilor (figura 3.70.) se poate observa că toate probele prelevate din materiile prime vegetale sunt separate în partea dreaptă, cele provenite din extractele carotenoidice fiind separate în partea stângă a graficului, aceasta indicând faptul că materiile prime prezintă concentrații mai mari de minerale decât extractele carotenoidice. Se observă o separare a extractului din porumb nesaponificat și a extractului din porumb *Lovrin 400*, către zona centrală a graficului, față de celelalte extracte care sunt toate grupate în partea stângă, ceea ce indică faptul că aceste probe sunt mai bogate în elemente minerale decât celelalte extracte. Variabilele importante pentru aceste grupări au fost: K, Mg, Ca și Na, în cazul primei componente principale, așa cum se observă și din graficul înregistrărilor (figura 3.71.).

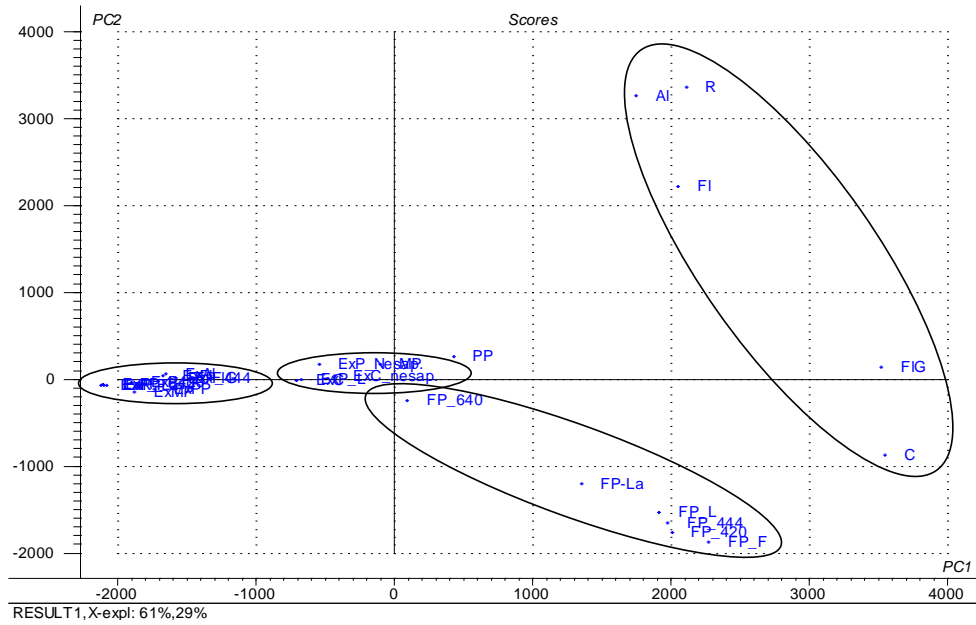


Figura 3.70. – Graficul scorurilor PC2 vs PC1 la utilizarea în analiză a întregii cantități de date

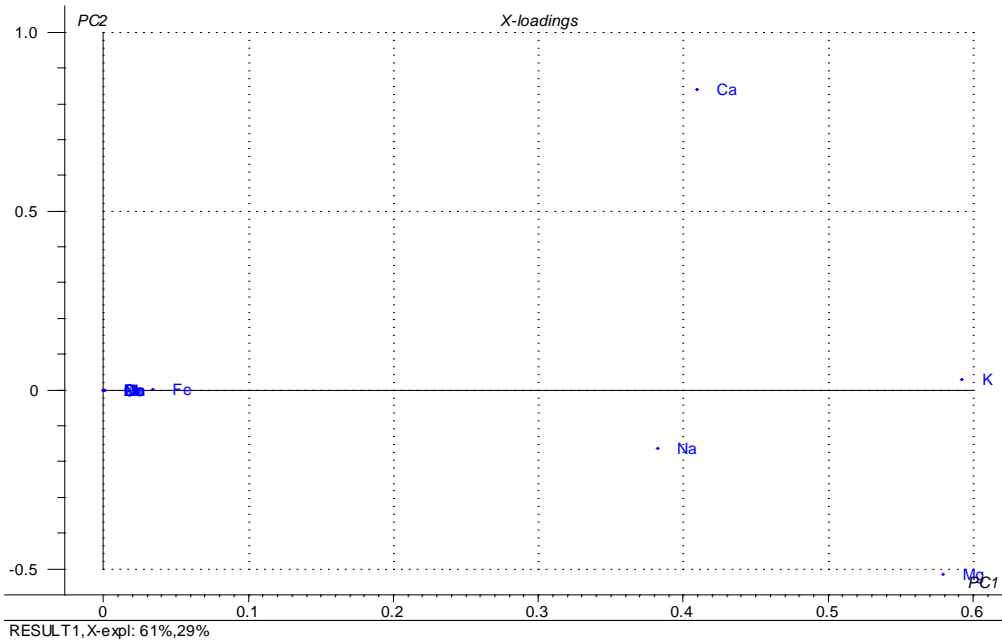


Figura 3.71. - Graficul înregistrărilor PC2 vs PC1 la utilizarea în analiză a întregii cantități de date.

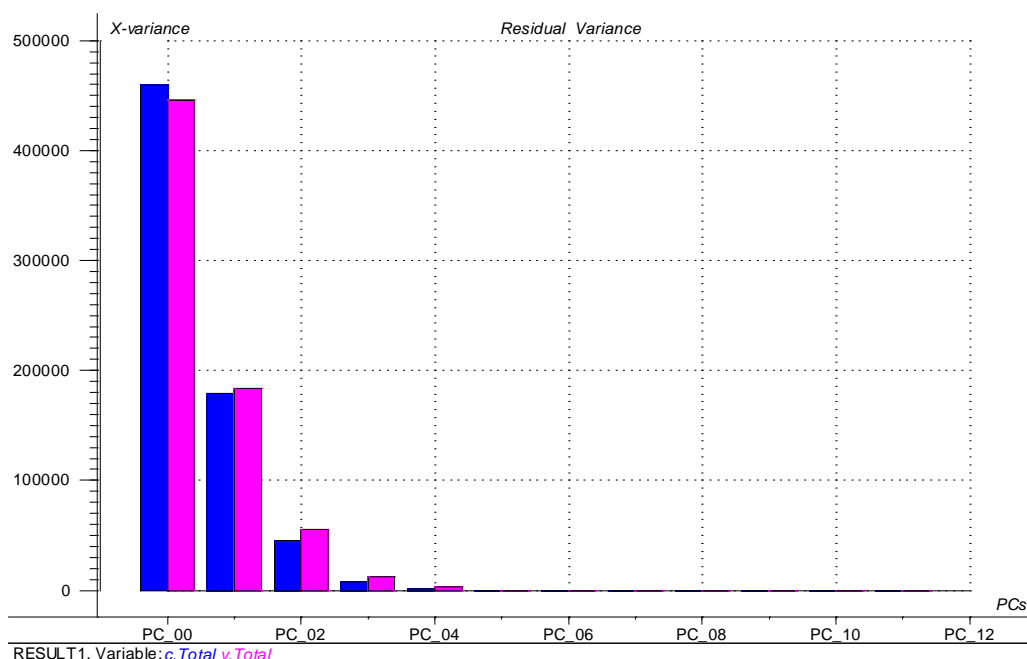


Figura 3.72. - Variația reziduală ce furnizează numărul de componente principale reprezentative în cazul analizei PCA pentru toate probele analizate

La analiza multivariată a datelor privitoare la florile de gălbenele, fructele de cătină, albedo-portocale, flavedo-portocale, rostopască, miez și pielită de piersică, precum și a extractelor carotenoidice obținute din aceste materiale vegetale, se observă că toate probele provenite din extractele carotenoidice sunt separate în partea stângă a graficului, probele corespunzătoare materiilor prime fiind în dreapta graficului, ceea ce are semnificația unei încărcături mai mari cu elemente minerale în materiile prime decât în extracte (figura 3.73.). Probele corespunzătoare extractului de cătină nesaponificat și saponificat sunt mai apropiate de zona centrală a graficului, indicând o încărcătură minerală mai mare decât a celorlalte extracte care sunt toate grupate în partea stângă. Variabilele importante pentru aceste grupări au fost: Ca și K, în cazul primei componente principale (figura 3.74.).

Analizând numai datele privitoare la diferiții hibrizi de porumb studiați, se poate observa că toate probele corespunzătoare extractelor carotenoidice sunt grupate în stânga graficului, iar cele corespunzătoare materiilor prime sunt grupate în dreapta graficului (figura 3.76.), principalele elemente responsabile pentru prima clasificare fiind: Mg și K (figura 3.77.). Din figura 3.76. se poate observa că extractul din porumb nesaponificat și cel din porumb *Lovrin 400* sunt mai bogate în elemente minerale decât celelalte extracte din porumb, fiind mai apropiate de porțiunea centrală a graficului.

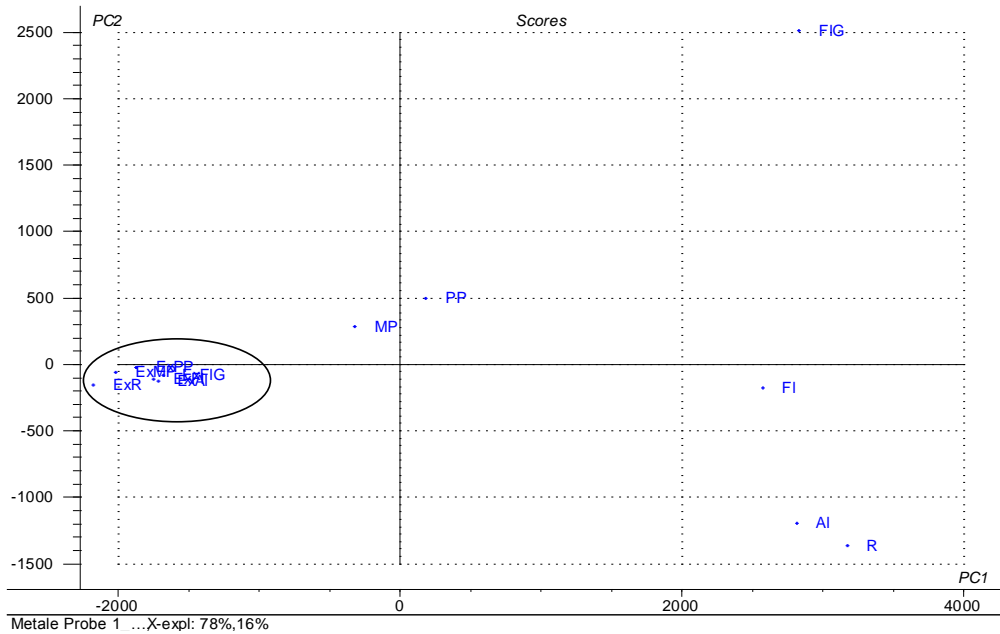


Figura 3.73.- Graficul scorurilor PC2 vs PC1 luând în analiză datele pentru: flori gălbenele, albedo portocală, flavedo portocală, piersică, tulpină rostopască, cătină albă

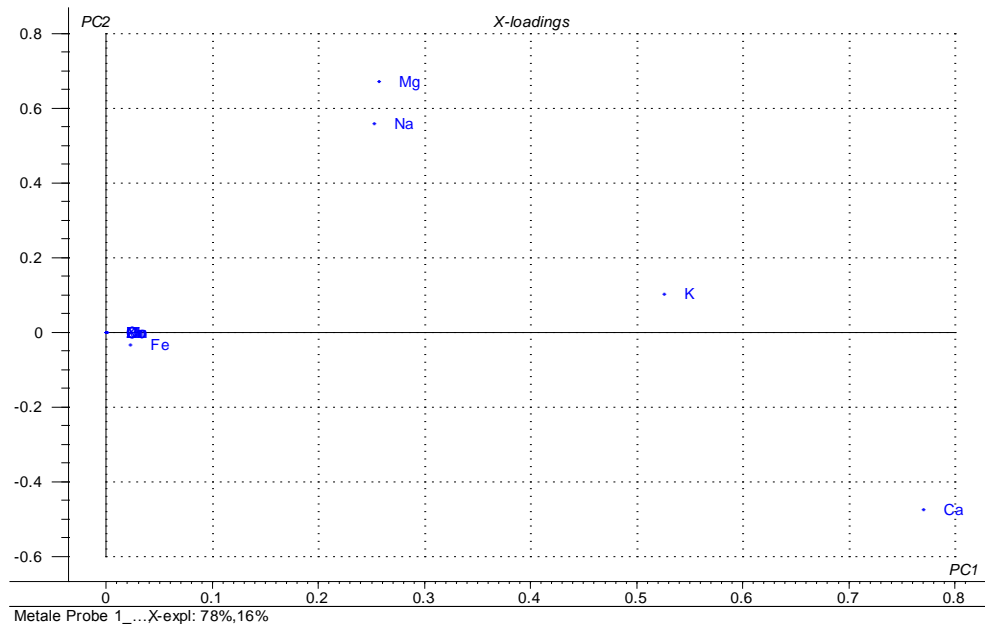


Figura 3.74.- Graficul înregistrărilor PC2 vs PC1 la utilizarea în analiză a datelor pentru: flori gălbenele, albedo portocală, flavedo portocală, piersică, tulpină rostopască, cătină albă

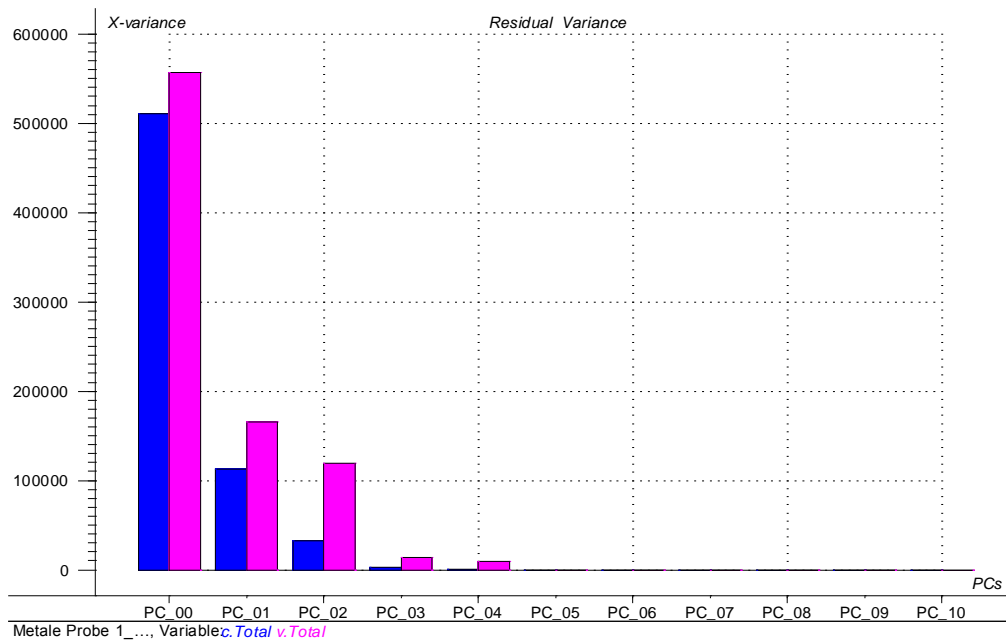


Figura 3.75. Varianța reziduală ce furnizează numărul de componente principale reprezentative în cazul analizei PCA pentru probele de flori gălbenele, albedo portocală, flavedo portocală, piersică, tulpină rostopască, cătină albă

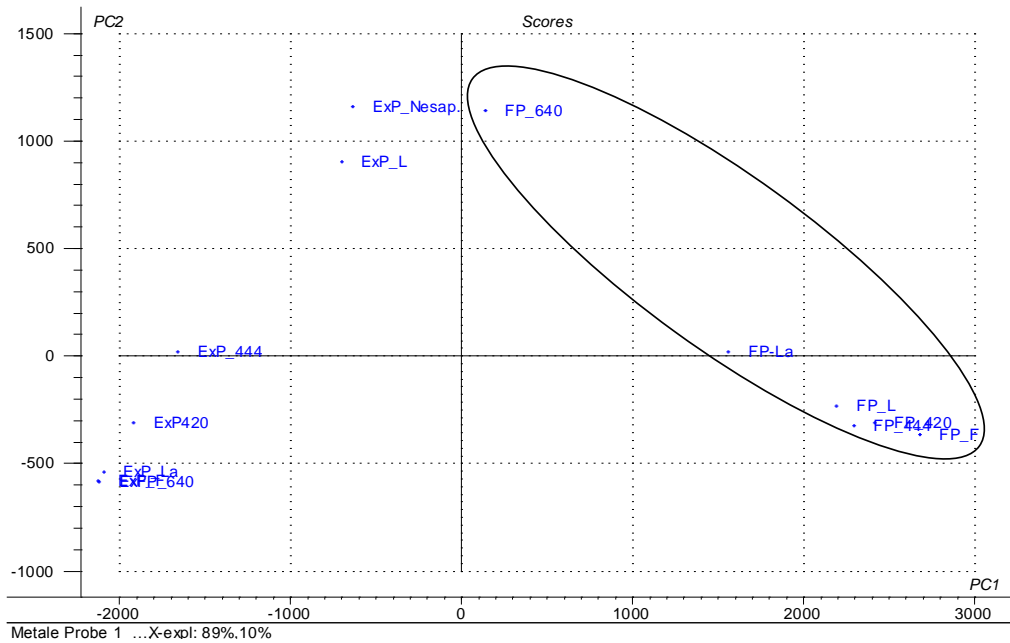


Figura 3.76. - Graficul scorurilor PC2 vs PC1 luând în analiză datele pentru hibridii de porumb

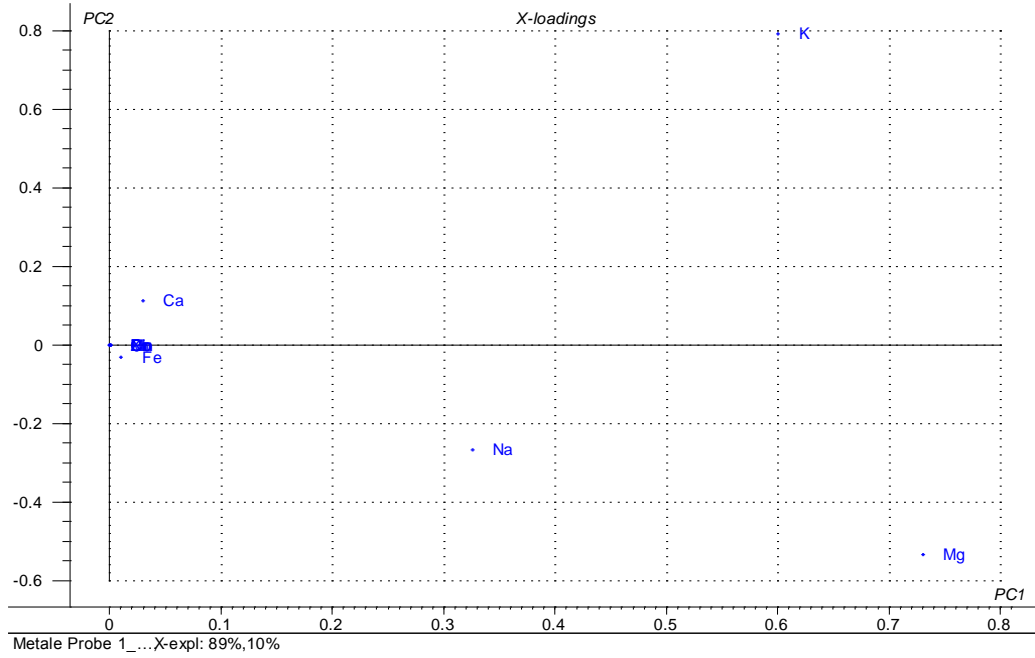


Figura 3.77.- Graficul înregistrărilor PC2 vs PC1 la utilizarea în analiză a datelor pentru hibridii de porumb

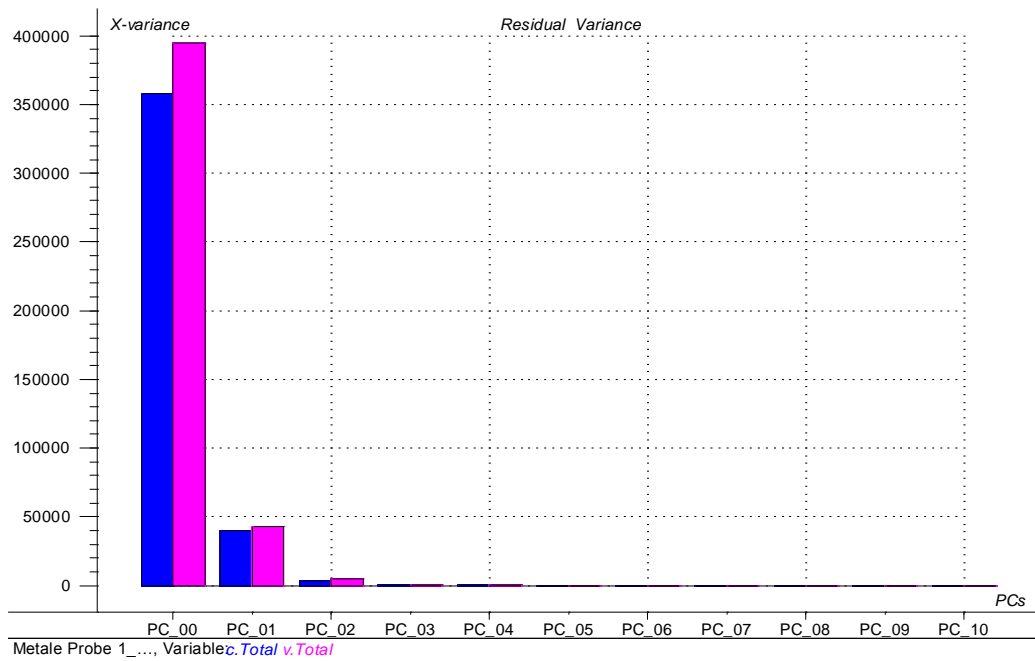


Figura 3.78.- Varianța reziduală ce furnizează numărul de componente principale reprezentative în cazul analizei PCA pentru hibridii de porumb

• Concluzii

În urma analizei datelor referitoare la conținutul în elemente minerale din materiile prime și extractele carotenoidice analizate, se pot desprinde următoarele concluzii:

1. Au fost determinate, prin spectrofotometrie de absorbție atomică, 12 elemente minerale (K, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, Pb, Co, Cr, Ni) din materiile prime și din extractele carotenoidice obținute din: mai mulți hibridi de porumb (*Zea mays*): *NSSK444*, *NSSK640*, *NSSK420*, *Lovrin 400*, *Laureat*, *Florența*, fructe de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*), soiul *Delta 1*, flori de gălbenele (*Calendula officinalis*), pulpă și pericarp de piersică (*Persica vulgaris*), soiul *Red Haven*, flavedo și albedo de portocală (*Citrus sinensis*), soiul *Valencia*, tulpină de rostopască (*Chelidonium majus*).
2. Toate macroelementele din materiile prime, se află în concentrații care se încadrează în limitele prevăzute de literatură. Macroelementele din extractele carotenoidice se găsesc în concentrații mult mai mici decât în materiile prime, acestea eliminându-se în mare măsură în urma procesului de extracție.
3. Potasiul este elementul mineral cel mai bine reprezentat în toate probele, atât în materiile prime, cât și în extracte.
4. Cea mai mare concentrație de potasiu din materiile prime analizate se găsește în tulpina de rostopască (4441,00 ppm), iar cea mai mică în pielea de piersică (3472,80 ppm); în cadrul extractelor carotenoidice, potasiul se află în cantitatea cea mai mare în extractul din porumb *Lovrin 400* (3006,00 ppm) și în cea mai mică în extractul din porumb *NSSK640* (969,75 ppm).
5. Sodiu este cel mai bine reprezentat în florile de gălbenele (2795,00 ppm) și în extractul carotenoidic din porumb *Lovrin 400* (131,20 ppm), iar cel mai puțin, în făina de porumb *NSSK640* (176,28 ppm) și în extractul din făina de porumb *NSSK640* (23,72 ppm).
6. Concentrația cea mai mare de calciu se află în tulpina de rostopască (4420,00 ppm) și în extractul carotenoidic din albedo de portocală (283,15 ppm), iar cea mai mică în făina de porumb *NSSK420* (229,40 ppm) și în extractul carotenoidic din miez de piersică (10,20 ppm).
7. Magneziul se găsește în cantitatea cea mai mare în făina de porumb *Florența* (3454,00 ppm) și în extractul din porumb *Lovrin 400* (223,56 ppm), iar cea mai mică, în miezul de piersică (354,79 ppm) și în extractul carotenoidic din miez de piersică (12,23 ppm). Se constată că magneziul este absent în extractul din tulpină de rostopască, în extractul din porumb *NSSK444*, în extractul din porumb *Florența* și în extractul din porumb *Laureat*, acest element îndepărtându-se complet ca urmare a procesului de extracție, deși materiile prime corespunzătoare sunt bogate în acest element.
8. Fierul este cel mai bine reprezentat în florile de gălbenele (1050,40 ppm) și în extractul carotenoidic din porumb *NSSK444* (141,70 ppm), cel mai puțin găsindu-se în făina de porumb *NSSK640* (52,30 ppm) și în extractul din albedo de portocală (26,55 ppm).
9. Dintre metalele grele manganul și cobaltul se găsesc numai în câteva materii prime și în cantități foarte mici: Mn – în florile de gălbenele (0,339 ppm) și în tulpina de rostopască (0,076 ppm), Co – în flavedo (0,009 ppm) și albedo (0,002 ppm) de portocală, precum și în florile de gălbenele (0,007 ppm). Celelalte metale grele se găsesc sub limita maximă admisă de lege, cu o singură excepție: Cu din făina de porumb *Laureat*, a cărui concentrație (6,53 ppm) depășește limita maximă legală (5,00 ppm).

10. Analiza multivariată (PCA) a întregii cantități de date referitoare la concentrația de elemente minerale din probele analizate, a dus la o bună grupare a materiilor prime, respectiv a extractelor, variabilele responsabile pentru această clasificare fiind: K, Mg, Ca și Na. O bună clasificare a cazurilor s-a obținut și la analiza multivariată a datelor privitoare la florile de gălbenele, fructele de cătină, albedo-portocale, flavedo-portocale, rostopască, miez și pericarp de piersică, elementele importante pentru aceste grupări fiind Ca și K., în cazul primei componente principale. Analizând numai datele privitoare la diferiții hibrizi de porumb studiați, s-a obținut de asemenea o bună grupare a cazurilor, principalele elemente responsabile pentru prima clasificare fiind: Mg și K

3.3.1.4. Determinarea activității antimicrobiene a unor extracte carotenoidice din porumb (*Zea mays*), cătină albă (*Hippophae rhamnoides*) și rostopască (*Chelidonium majus*)

A fost testat efectul antimicrobian al unor extracte carotenoidice obținute (conform 3.2.1.2.- Partea experimentală) din: porumb (*Zea mays*), hibridii *NSSK444* și *NSSK640*, cătină albă (*Hippophae rhamnoides*) - soiurile *Delta 1* și *Ciumași* și rostopască (*Chelidonium majus*), comparativ cu cel al antibioticului *Ciprofloxacina* (antibiotic sintetic, cu spectru larg, din grupa fluorochinolonei). S-a utilizat metoda de lucru și 5 specii de microorganisme, dintre care 4 bacterii și o ciupercă microscopică, prezentate la 3.2.1.7. (Partea experimentală).

Rezultatele testelor microbiologice efectuate sunt următoarele (tabelul 3.36., figurile 3.79.-3.85.):

Tabelul 3.36.
Efectul antimicrobian al unor extracte carotenoidice, comparativ cu cel al antibioticului *Ciprofloxacina*

| Specia microbiană | Diametrul zonei de inhibiție (mm) al extractelor de caroten din: | | | | | | | | | | | Diametrul zonei de inhibiție (mm) al <i>ciprofloxacinei</i> | | | | | |
|-------------------------------|--|--------|--------|--------|-----------------------|--------|--------|--------|----------------------|--------|--------|---|------------|--------|--------|--------|--|
| | Porumb <i>NSSK444</i> | | | | Porumb <i>NSSK640</i> | | | | Cătină <i>Delta1</i> | | | | Rostopască | | | | |
| | Fr *) | | Fr *) | | Fl *) | | Fl *) | | Fr *) | | Fr *) | | Fl *) | | Fl *) | | |
| C1 **) | C2 **) | C1 **) | C2 **) | C1 **) | C1 **) | C2 **) | C1 **) | C2 **) | C1 **) | C2 **) | C1 **) | C2 **) | C1 **) | C2 **) | C1 **) | C2 **) | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 16 | 12 | 32 | 12 | 12 | 20 | 10 | 10 | 8 | 10 | 8 | 30 | | | | | |
| <i>Bacillus cereus</i> | 28 | 10 | 26 | 10 | 10 | 10 | 10 | 12 | 10 | 10 | 6 | 30 | | | | | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 32 | 10 | 30 | 10 | 6 | 10 | 6 | 20 | 6 | 6 | 6 | 6 | | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | 32 | 10 | 18 | 10 | 14 | 15 | 10 | 10 | 10 | 10 | 6 | 20 | | | | | |
| <i>Candida albicans</i> | 22 | 8 | 18 | 8 | 12 | 14 | 8 | 10 | 8 | 8 | 6 | 6 | | | | | |

*) Fr- frunză; Fl- flori;

**) C1- concentrația extractului carotenoidic în eter de petrol = 0,2 g/ml; C2 - concentrația extractului carotenoidic în eter de petrol = 0,02 g/ml.

În paralel s-a efectuat și probă martor cu eter de petrol, care nu a prezentat nici un fel de efect antimicrobian.

Pe ansamblu, s-a constatat că extractele din porumb au un efect antimicrobian mult mai bun (la ambele concentrații) comparativ cu cele din cătină și rostopască, atât față de bacteriile Gram negative, cât și față de cele Gram positive. Acest lucru se poate explica prin prezența în aceste extracte a β -carotenului și a altor carotenoide cu activitate antimicrobiană puternică [267,268], ca și prin concentrația ridicată de carotenoide din aceste extracte (82,30 % - pentru *NSSK444* și 78,22% - pentru *NSSK640*). La concentrația de 0,02 g/ml, efectele extractelor carotenoidice din cei doi hibridi de porumb studiați au fost identice (aceleași dimensiuni ale zonelor de inhibiție pentru fiecare tip de microorganism).

Efecte antimicrobiene bune prezintă și extractul din frunze de rostopască la concentrația de 0,2 g/ml. Extractul carotenoidic din flori de rostopască are o activitate antioxidantă mai scăzută decât cel din frunze, concentrația de carotenoide din acest extract fiind mai redusă (71,72%) decât cea din extractul din frunze (73,67%) - vezi 3.3.1.1.

Extractul din fructe de cătină albă, soiul *Delta 1*, prezintă și el efecte antimicrobiene remarcabile, deși nu au fost evidențiate în componența sa luteina și zeaxantina. Acest extract, cu toate că are o concentrație de carotenoide mai mică (71,76%) decât cel din soiul *Ciumași* (72,12%), prezintă în componența sa mai multe tipuri de pigmenți carotenoidici care alături de uleiurile esențiale existente determină o acțiune antimicrobiană mai puternică decât extractul din soiul *Ciumași*, în care a fost identificat numai β -carotenul (vezi 3.3.1.1.)

De remarcat este faptul că *Pseudomonas aeruginosa* s-a dovedit relativ rezistentă la antibiotic, dar a fost distrusă de extractele carotenoidice din ambii hibridi de porumb (figurile 3.79., 3.80.) atât la concentrația de 0,2 g/ml, cât și la 0,02 g/ml. De asemeni, asupra acestei specii prezintă efect antimicrobian puternic și extractul carotenoidic din frunze de rostopască, dar numai la concentrația de 0,2 g/ml și, un efect mai modest, extractul din cătină albă soiul *Delta 1*, numai la concentrația de 0,2 g/ml.



Figura 3.79. - Efectul bactericid al extractelor carotenoidice din porumb *NSSK444* (C1), *NSSK640* (C1), cătină *Ciumași* (C1), flori de rostopască (C2) și a antibioticului, asupra speciei *Ps. aeruginosa*



Figura 3.80.- Efectul bactericid al extractelor carotenoidice din porumb *NSSK444* (C2), *NSSK640* (C2), cătină *Delta 1* (C1) și frunze de rostopască (C2) asupra speciei *Ps. aeruginosa*

Dintre microorganismele testate cel mai sensibil s-a dovedit a fi *Staphylococcus aureus*, urmat de specia *Bacillus cereus* (figurile 3.81.-3.83.).

Astfel, în cazul speciei *S. aureus* extractul carotenoidic cu cel mai puternic efect a fost cel din porumb *NSSK640*, la concentrația de 0,2 g/ml, urmat de extractul din cătină albă, soiul *Delta 1*, la aceeași concentrație. De remarcat este faptul că extractul din porumb *NSSK640*, la concentrația de 0,2 g/ml, prezintă un efect antimicrobian mai

puternic asupra acestei specii, decât ciprofloxacina. Dintre extractele analizate, cele din rostopască prezintă cel mai slab efect antibacterian asupra *S. aureus*. Chiar la concentrația de 0,2 g/ml efectul este mai slab decât al extractelor din porumb la concentrația de 0,02 g/ml.

Asupra speciei *Bacillus cereus* cel mai puternic efect antimicrobian îl prezintă extractul din porumb *NSSK444* (0,2 g/ml), urmat de cel din porumb *NSSK640* (0,2 g/ml) și cel din frunze de rostopască (0,2 g/ml). Nu a avut eficiență asupra acestei specii extractul din flori de rostopască de concentrație 0,02 g/ml.

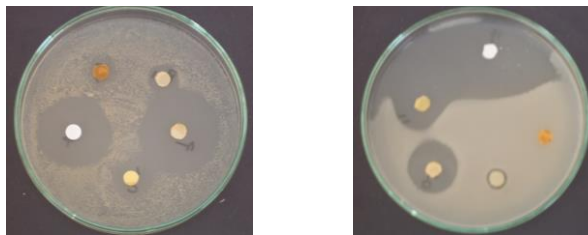


Figura 3.81. - Efectul bactericid al extractelor carotenoidice din porumb *NSSK444* (C1), *NSSK640* (C1), cătină Ciumași (C1), flori de rostopască (C2) și a antibioticului, asupra speciei *Staphylococcus aureus* (stânga) și *Bacillus cereus* (dreapta)

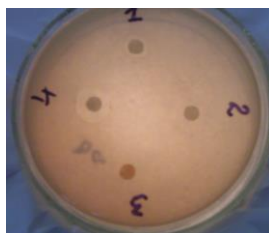


Figura 3.82. - Efectul bactericid al extractelor carotenoidice din porumb *NSSK444* (C2), *NSSK640* (C2), cătină Delta 1 (C1) și frunze de rostopască (C2) asupra speciei *Bacillus cereus*



Figura 3.83.-Efectul bactericid al extractelor carotenoidice din porumb *NSSK444* (C2), *NSSK640* (C2), cătină Delta 1 (C1) și frunze de rostopască (C2) asupra speciei *Staphylococcus aureus*

Extractul din porumb *NSSK444* (0,2 g/ml) are o acțiune antimicrobiană asupra speciei *Escherichia coli* mai puternică decât antibioticul testat (figurile 3.84., 3.85.). Efecte microbicide moderate asupra acestei specii prezintă și celelalte extracte carotenoidice, cel mai slab efect fiind cel al extractului din flori de rostopască.

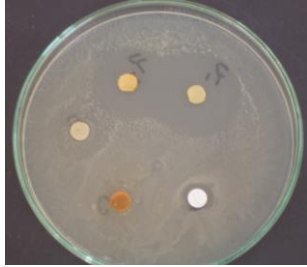


Figura 3.84. - Efectul bactericid al extractelor de carotenoide din porumb NSSK444 (C1), NSSK640 (C1), cătină Ciumași (C1), flori de rostopască (C2) și a antibioticului, asupra speciei *E. coli*

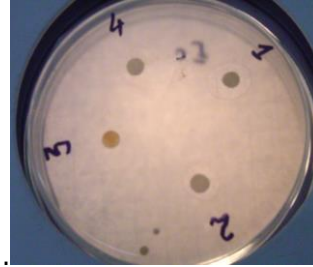


Figura 3.85. - Efectul bactericid al extractelor carotenoidice din porumb NSSK444 (C2), NSSK640 (C2), cătină Delta 1 (C1) și frunze de rostopască (C2) asupra speciei *E.coli*

Ciuperca microscopică testată (*Candida albicans*) a prezentat rezistență la antibiotic, dar a fost cel mai bine inhibată de extractul carotenoidic din porumb NSSK444, asupra acesteia având efecte antimicrobiene și celelalte extracte carotenoidice testate.

• Concluzii

Analizând rezultatele testelor privind acțiunea antimicrobiană a extractelor carotenoidice studiate se pot concluziona următoarele:

1. A fost analizat efectul antimicrobian al extractelor carotenoidice din doi hibridi de porumb (*Zea mays*): NSSK444 și NSSK640, din două soiuri de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*): Delta 1 și Ciumași, din frunze și din flori de rostopască (*Chelidonium majus*), asupra speciilor *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* și *Candida albicans* și s-a constatat că toate extractele analizate au prezentat o activitate antimicrobiană mai mică sau mai mare.
2. Cel mai puternic efect antimicrobian l-au prezentat extractele carotenoidice din porumb, acestea acționând chiar și asupra speciilor rezistente la ciprofloxacina (*Pseudomonas aeruginosa* și *Candida albicans*). Acest lucru se datorează conținutului ridicat de pigmenți carotenoidici din aceste extracte.
3. Extractul din porumb NSSK640 a prezentat un efect antimicrobian asupra speciei *Staphylococcus aureus* mai puternic decât antibioticul testat, iar extractul din porumb NSSK444, o acțiune mai puternică asupra speciei *Escherichia coli* decât ciprofloxacina.
4. Acțiune antimicrobiană bună, inclusiv asupra speciilor rezistente la antibiotic, l-au avut și extractele din fructe de cătină albă, soiul Delta 1 și din frunze de rostopască, însă numai la concentrația de 0,2 g/ml.
5. Extractele carotenoidice din fructe de cătină albă, soiul Ciumași și din flori de rostopască nu au inhibat *Pseudomonas aeruginosa*.
6. Singurul extract carotenoidic care nu a avut acțiune inhibitoare asupra *Candida albicans*, a fost cel din flori de rostopască, la concentrația de 0,02 g/ml.

3.3.2. Studiul posibilităților de aplicare a extractelor carotenoidice în domeniul medical, farmaceutic, zootehnic și alimentar

3.3.2.1. Efectele unor unguente terpeutice pe bază de extracte carotenoidice în afecțiuni dermatologice

- ***Efectele unguentului pe bază de extract carotenoidic din boabe de porumb (*Zea mays*) în tratamentul unor afecțiuni dermatologice***

Unguentul terapeutic pe bază de extract carotenoidic din boabe de porumb (*Zea mays*), hibridul *NSSK444*, obținut potrivit modului de lucru descris la 3.2.2.1. (vezi Partea experimentală), a fost testat clinic *in vivo*, la Spitalul Clinic Municipal, Clinica de Dermato-Venerologie, serviciul ambulator, Timișoara, în perioada 15.06.2003 - 30.03.2004, pe 126 subiecți umani, având afecțiunile specificate la 3.2.2.1. Unguentul s-a dovedit a fi un excelent cicatrizant, epitelizant, antimitotic, având o eficiență ridicată în tratamentul ulcerelor de gambă, al leziunilor postelectrocauterizare, al lupusului eritematos cronic, al cazurilor de intertrigo mixt, de impetigo, psoriazis, eczeme cronice, fotodermatoze, epiteliom bazocelular (o formă de cancer de piele). Spre deosebire de tratamentele clasice pe bază de corticoizi, folosirea acestui unguent nu determină apariția de efecte secundare nedorite, cum sunt: atrofii, telangectazii și altele.

Pentru obținerea unguentului a fost ales extractul din hibridul de porumb *NSSK444*, deoarece acest hibrid este mai bogat în pigmenți carotenoidici decât ceilalți hibridi de porumb analizați (vezi 3.3.1.1.), activitatea antioxidantă a extractului carotenoidic este superioară extractelor din ceilalți hibridi (vezi 3.3.1.2.), iar acțiunea antimicrobiană este foarte bună, chiar asupra unor specii de microorganisme rezistente la antibiotic (vezi 3.3.1.4.).

Unguentul terapeutic este omogen și prezintă aderență pe piele și mucoase. Consistența la temperaturi cuprinse între 20-37°C asigură o stabilitate fizică a unguentului și permite aplicarea lui pe piele și mucoase. De asemenea, unguentul prezintă o bună penetrație în piele. Mirosul este caracteristic, specific lanolinei din compoziția bazei, iar culoarea este galben-aurie.

Unguentul cu extract carotenoidic din porumb, a fost aplicat de două ori pe zi pe leziunile existente. După 3-4 zile s-a observat dispariția eritemului, a pruritului, leziunile evoluând favorabil în 1-2 săptămâni. S-a remarcat acțiunea deosebit de favorabilă a acestui unguent în vindecarea leziunilor eritematoscuamoase caracteristice lupusului eritematos cronic și psoriazisului.

Cunoscuta acțiune anticancerigenă a pigmentilor carotenoidici a fost dovedită și în acest caz, unguentul cu extract carotenoidic din boabe de porumb prezentând o eficiență deosebită în tratamentul cancerului de piele (epiteliom bazocelular).

Din cazuistica studiată, s-au remarcat cazurile de mai jos ca având o evoluție deosebit de favorabilă:

Tabelul 3.37.

Rezultate mai reprezentative ale testării unguentului terapeutic pe bază de extract carotenoidic din boabe de porumb (*Zea mays*)

| Nr. crt. | Subiect | Diagnostic | Rezultate |
|----------|---------------|---|---|
| 1. | V. M., 83 ani | epiteliom bazocelular frontal | vindecare aproape completă după 20 zile de tratament, fără efecte secundare |
| 2. | T. I., 68 ani | lupus eritematos cronic al feței | vindecare după 10 zile de tratament, fără efecte secundare |
| 3. | P. M., 50 ani | dermită eczematiformă la gamba stângă | vindecare după 12 zile de tratament, fără efecte secundare |
| 4. | P. L., 12 ani | rezemă cronică | evoluție favorabilă după 7 zile de tratament, fără efecte secundare |
| 5. | C. I., 68 ani | insuficiență venoasă cronică a membrelor inferioare și angiodermită pigmentară | evoluție deosebit de favorabilă după 8 zile de tratament, fără efecte secundare |
| 6. | F. N., 65 ani | eczemă cronică impetiginată a gambelor | vindecare după 15 zile, fără efecte secundare |
| 7. | B. A., 61 ani | psoriazis | vindecarea leziunilor după 10 zile, fără efecte secundare |
| 8. | P. D., 60 ani | insuficiență venoasă cronică a membrelor inferioare, ulcere cronice ale gambelor, cu leziuni de sensibilizare | evoluție deosebit de favorabilă după 7 zile de tratament, fără efecte secundare |
| 9. | M. I., 53 ani | eczemă cronică a feței | vindecare după 7 zile de tratament, fără efecte secundare |
| 10. | T. S., 36 ani | porfirie cutanată tardivă | vindecare după 22 zile de tratament, fără efecte secundare |
| 11. | R. M., 50 ani | psoriazis palmo plantar | vindecarea leziunilor după 8 zile de tratament, fără efecte secundare |
| 12. | N. C., 52 ani | melanoză facială, keratoze solare | evoluție deosebit de favorabilă după 9 zile de tratament, fără efecte secundare |
| 13. | T. M., 75 ani | insuficiență venoasă cronică a membrelor inferioare și ulcere cronice ale gambelor | vindecare după 24 zile de tratament, fără efecte secundare |
| 14. | B. A., 22 ani | eczemă cronică palmară | vindecare după 7 zile de tratament, fără efecte secundare |
| 15. | P. A., 56 ani | eczemă cronică la glezna stângă | vindecare după 10 zile de tratament, fără efecte secundare |
| 16. | I. I., 48 ani | eczemă cronică a feței | vindecare după 8 zile de tratament, fără efecte secundare |

O evoluție mai lentă au avut pacienții cu insuficiență venoasă cronică a membrelor inferioare, angiodermită pigmentară și porfirie cutanată tardivă, unde este necesară utilizarea un timp mai îndelungat a unguentului, alături de folosirea tratamentului cu venotonice și antiinflamatoare pe cale generală (uz intern).

Începând cu luna iulie 2006 unguentul pe bază de extract carotenoidic din porumb se află în studiu la Spitalul Clinic Municipal, Clinica de Chirurgie Oncologică, Timișoara (în baza contractului de cercetare nr. GR 179/17.05.2006, pe următoarele tipuri de afecțiuni: epiteliom bazocelular, nevi melanici, papiloame cutanate, observându-se efecte clare antimitotice care urmează a fi studiate în amănunțime).

Acest unguent a fost distins cu medalia de aur la Salonul Internațional de Invenții, Geneva, aprilie 2006 [205], cu medalia de aur „Genius” la Salonul Internațional de Invenții „Genius”-Budapesta, septembrie 2006 [269], cu medalia de bronz la Salonul Internațional de Invenții și Tehnologii Noi, București, octombrie 2006 [270], cu medalia de aur și Premiul Special al Juriului acordate de delegația de inventatori ARCA de la Zagreb [271], octombrie 2006 și cu medalia de aur la Salonul Internațional de Invenții, Cercetări și Noi Tehnologii, Brussels, noiembrie 2006 [272].

• **Efectele unguentului pe bază de extract carotenoidic din fructe de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*) în tratamentul unor afecțiuni dermatologice**

Unguentul terapeutic pe bază de extract carotenoidic din fructe uscate de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*), soiul *Delta 1*, obținut potrivit metodologiei de lucru descrise la 3.2.2.1. (vezi Partea experimentală) și testat clinic *in vivo*, în condițiile respectării principiilor de etică profesională, la Spitalul Clinic Municipal, Clinica de Dermato-Venerologie, serviciul ambulator, Timișoara, în perioada 01.05.2004-30.10.2004, pe un număr de 160 pacienți având afecțiunile dermatologice de tipul celor specificate anterior (3.2.2.1.).

Unguentul pe bază de extract carotenoidic din fructe de cătină albă, prezintă o bună aderență pe piele și mucoase, este omogen, are o culoare portocalie și un miros caracteristic de lanolină. Consistența la temperaturi cuprinse între 20-37°C asigură o stabilitate fizică a unguentului și permite aplicarea lui pe piele și mucoase, penetrația acestuia în piele fiind foarte bună.

S-au remarcat cu precădere următoarele efecte:

1. Eficiența deosebită ca epitelizant în leziunile postelectrocauterizare (veruci și tumori) și în ulcerile de gambă atone, rezistente la tratamentul obișnuit.
2. Efect fotoprotector și de vindecare a leziunilor în lupusul eritematos cronic, mai rapid cu peste 30% comparativ cu utilizarea locală a corticoizilor.
3. În eczemele cronice și în psoriazis, unguentul cu extract carotenoidic din fructe de cătină albă a determinat dispariția în 2 zile a scuamelor și vindecarea leziunilor în 10-12 zile, comparativ cu 15-20 zile tratamentului cu cortizon al acestor leziuni.
4. În tratamentul epiteliomului bazocelular, eficiența acestui unguent a fost ceva mai redusă decât cea a unguentului cu extract carotenoidic boabe de porumb, fiind necesar un timp ceva mai lung de tratament.
5. Utilizând unguentul cu extract carotenoidic din fructe de cătină albă nu s-au observat nici un fel de efecte secundare nedorite (atrofii, telangectazii etc.), așa cum se observă în tratamentul local cu corticoizi.

A fost ales extractul carotenoidic din fructe de cătină albă soiul *Delta 1*, pentru obținerea acestui unguent, deoarece acest extract prezintă mai multe tipuri de pigmenți carotenoidici decât extractul din fructe soiul *Ciumași* (vezi 3.3.1.1.), activitatea antioxidantă este mai mare (vezi 3.3.1.2.), activitatea antimicrobiană este de asemenea mai puternică (vezi 3.3.1.4.).

Dintre cazurile cu o evoluție deosebit de bună, care nu au răspuns la tratamentele clasice, prezentăm două:

- Cazul 1: J. Ș., 57 ani, cu diagnosticul: ulcerație cronică submamară stânga. Intertrigo submamar. Leziunile submamară nu au prezentat tendință de epitelizare în timpul tratamentului cu antiseptice și antimicotice locale efectuat pe o perioadă de două săptămâni în Clinica de Dermato-Venerologie Timișoara. După întreruperea acestui tratament și aplicarea unguentului cu extract carotenoidic din fructe de cătină albă, de două ori pe zi, leziunile s-au vindecat în 7 zile.

- Cazul 2: H. F., 56 ani, cu diagnosticul: sindrom posttrombotic, ulcer cronic gamba stângă - a fost tratată luni de zile cu antibiotice, vasotonice, antiinflamatoare, fără ca leziunea ulceroasă să aibe tendința de vindecare. După întreruperea tratamentului clasic și aplicarea unguentului cu extract carotenoidic din fructe de cătină albă de două ori pe zi, în 10 zile, ulcerul cronic al gambei stângi s-a epitelizat complet (vindecat) și a dispărut edemul gambei.

În prezent acest unguent se află în testare clinică la Spitalul Clinic Municipal, Clinica de Chirurgie Oncologică, Timișoara, pe următoarele tipuri de afecțiuni dermatologice: epitelioame bazocelulare, nevi melanici, papiloame cutanate, constându-se efecte antimitotice nete ce urmează a fi studiate în amănunțime.

Acest unguent a fost medaliat cu bronz la Salonul Internațional de Invenții și Tehnologii Noi, București, octombrie 2006 [273], cu argint la Salonul Internațional de Invenții, Cercetări și Noi Tehnologii. Brussels, noiembrie 2006 [274] și tot cu argint la Salonul Internațional de Invenții, Geneva, aprilie 2007 [275].

• **Concluzii**

Ca urmare a testărilor clinice *in vivo* ale celor două unguente pe bază de extracte carotenoidice obținute, se pot desprinde următoarele concluzii:

1. Atât unguentul cu extract carotenoidic din boabe de porumb (*Zea mays*), hibridul NSSK444, cât și cel cu extract carotenoidic din fructe de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*), soiul *Delta 1*, au dovedit o acțiune epitelizantă, cicatrizantă, antimitotică deosebită, având o eficiență ridicată în tratamentul ulcerelor de gambă, al leziunilor postelectrocauterizare (veruci și tumori), al lupusului eritematos cronic, al cazurilor de intertrigo mixt, de impetigo, psoriazis, eczeme cronice, fotodermatoze, epiteliom bazocelular.
2. Eficiența celor două unguente în tratamentul afecțiunilor dermatologice amintite s-a dovedit a fi mai bună decât în cazul utilizării tratamentelor clasice, vindecarea afecțiunilor având loc mai repede și fără apariția de efecte secundare nedorite, cum se întâmplă în tratamentele locale obișnuite pe bază de corticoizi.
3. De remarcat acțiunea deosebit de favorabilă a celor două unguente în tratamentul cancerului de piele (epiteliom bazocelular), ca și în tratamentul psoriazisului și a lupusului eritematos cronic, afecțiuni în care tratamentele clasice nu prea dau rezultate.

• **Aspecte privind comportamentul reologic al unguentelor pe bază de extracte carotenoidice din porumb (*Zea mays*), respectiv fructe de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*)**

Pentru ambele unguente preparate - cel cu extract carotenoidic din boabe de porumb (UCP) și cel cu extract carotenoidic din fructe de cătină albă (UCC) - au fost investigate câteva proprietăți reologice funcție de temperatură și viteza de forfecare. Au fost măsurate și interpretate curbele de viscozitate la temperatura de 20 °C, viscozitate-temperatură în domeniul 20÷60°C, curbele "Creep", "Amplitude Sweep" și "Frequency Sweep", acestea constituind un instrument de analiză calitativă a acestor unguente (vezi 3.2.2.1. Partea experimentală).

Figura 3.86. conține curbele "Loop" de viscozitate ($\eta-\dot{\gamma}$) la temperatura $t=20^{\circ}\text{C}$ pentru probele investigate. Se observă că toate probele prezintă pseudo-plasticitate, "subțindu-se" cu creșterea vitezei de forfecare, precum și tixotropie, fiind mai puțin vâscoase atunci când viteza de forfecare revine monoton spre valoarea minimă inițială.

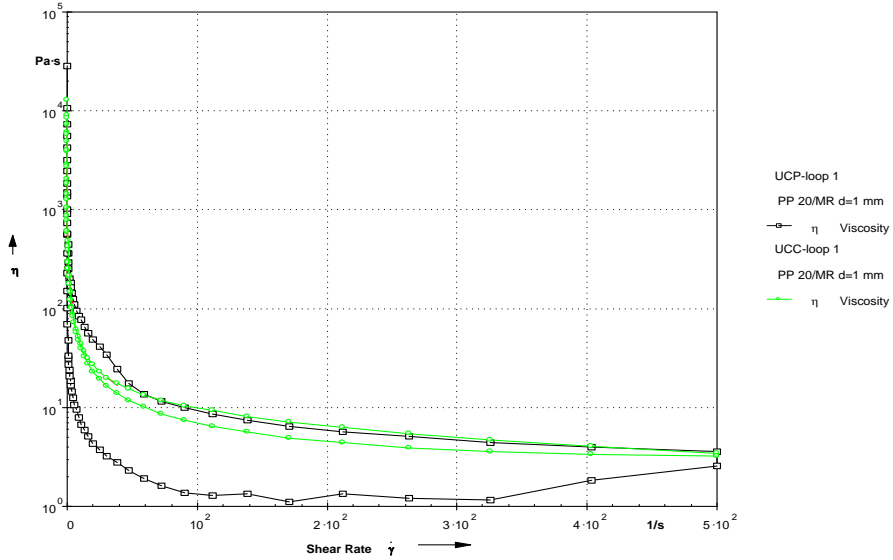


Figura 3.86.-. Testul "Loop" pentru probele UCC, UCP, la t=20°C.

În figura 3.87. se prezintă fitarea datelor experimentale (vezi 3.2.2.1. Partea experimentală) iar valorile obținute pentru parametrii de fit η_{∞} , c , n sunt cele din tabelul 3.38.

Tabelul 3.38.

Valorile parametrilor de fit.

| Proba | η_{∞} [Pa s] | c [Pa s ¹⁻ⁿ] | n [-] |
|-------|---------------------------|-------------------------------|------------|
| UCC | 1.1 | 286.81 | 0.76 |
| UCP | 0.9 | 289.28 | 0.72 |

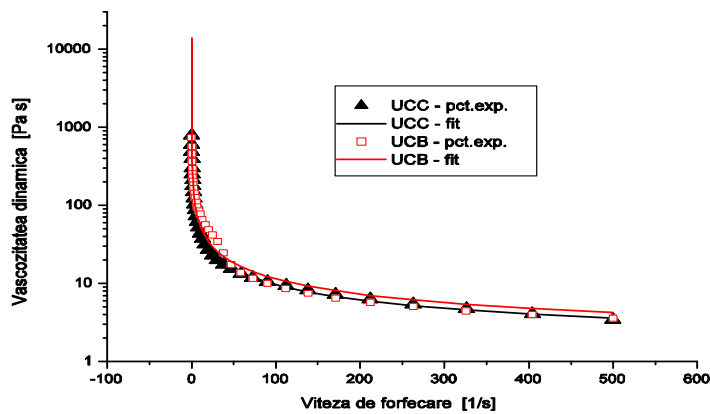


Figura 3.87.- Curbele de vâscozitate (fituri) ale probelor UCC, UCP

Curbele "Creep" denotă comportarea vâscoelastică a tuturor probelor (figurile 3.88, 3.89.): la aplicarea unei tensiuni de forfecare deformația γ crește monoton, iar la îndepărtarea solicitării, deformația se recuperează parțial.

Figura 3.90. conține rezultatele testului "Amplitude Sweep" la temperatura $t = 20^\circ\text{C}$ pentru cele două probe. Acest test permite precizarea deformației critice, aflată pe diagramă la capătul intervalului (palierului) în care modulele elastic G' , respectiv vâscos G'' rămân constante la variația deformației probei. Dacă proba este deformată în continuare, la o anumită valoare a deformației, ea își schimbă comportarea reologică, de la predominant elastică ($G' > G''$) la predominant vâscoasă ($G'' > G'$). Tabelul 3.39. prezintă valorile deformației critice γ_c , precum și a deformației γ_s la care se observă schimbarea comportării probelor.

Tabelul 3.39.

Valorile deformațiilor γ_c și γ_s pentru cele două probe

| Proba | γ_c [%] | γ_s [%] |
|-------|-------------------|-------------------|
| UCC | 0.10 | >1 |
| UCP | 0.04 | 0.10 |

Figura 3.88. - Testul "Creep" pentru proba UCP, la $t=20^\circ\text{C}$.

Figura 3. 89. - Testul "Creep" pentru proba UCC, la $t=20^{\circ}\text{C}$.

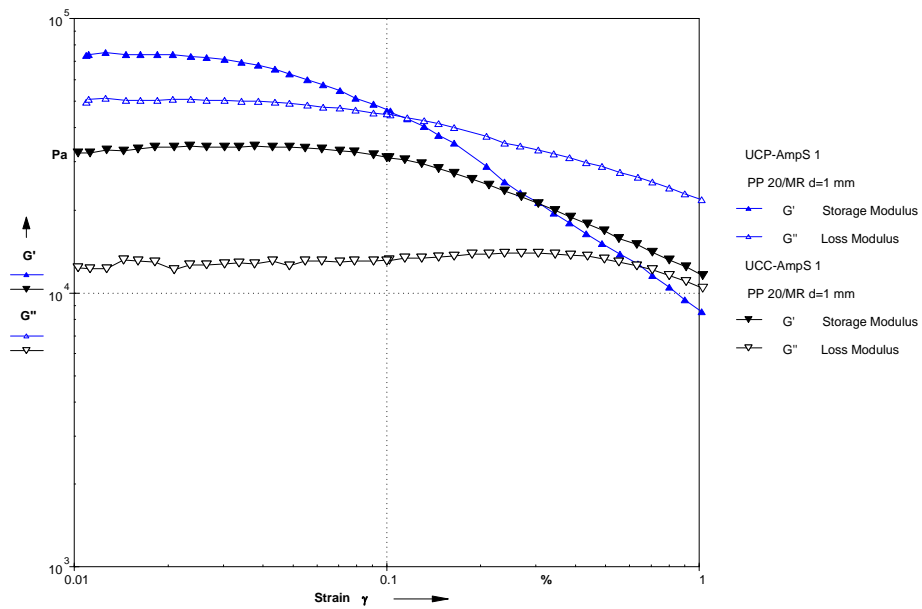


Figura 3.90.-Rezultatele testului "Amplitude Sweep" pentru cele doua probe la $t = 20^{\circ}\text{C}$.

Testele „Frecvency Sweep” au evidențiat comportarea „shear-thinning” (pseudoplastică) a tuturor probelor, așa cum se vede în figura 3.91. pentru proba UCC.

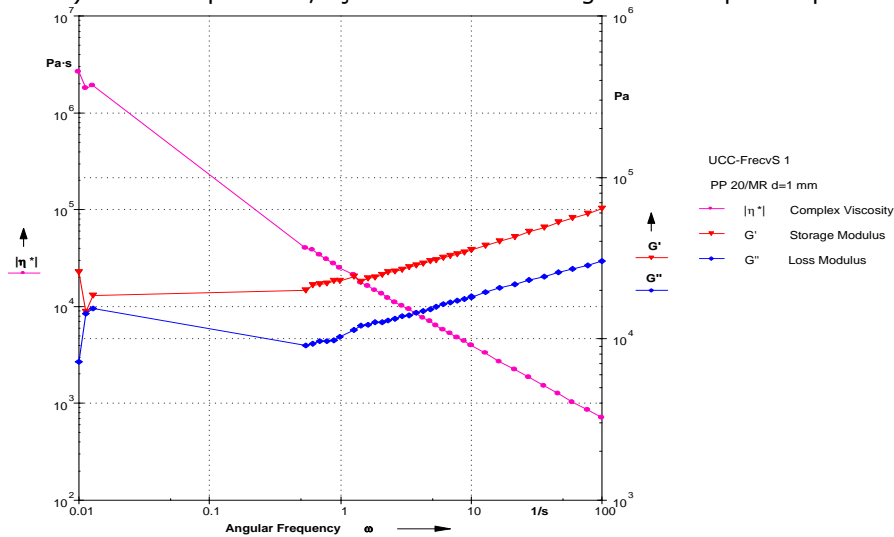


Figura 3.91. - Testul „Frecvency Sweep” pentru proba UCC, la $t = 20^\circ\text{C}$

Figura 3.92. ilustrează dependența viscozității probelor de temperatură, măsurătorile fiind efectuate la o viteză de forfecare $\dot{\gamma} = 1 \text{ s}^{-1}$. Modificarea viscozității cu temperatura este complexă pentru ambele probe. La proba UCP viscozitatea scade exponențial (dependență de tip Arrhenius) cu temperatura, în intervalul 20°C - 42.5°C , apoi crește puțin până la 45°C , după care din nou scade exponențial. Această creștere a viscozității pe un anumit interval de temperatură este asemănătoare cu a gelurilor, fiind probabil datorată agregatelor ce se formează în probă în apropierea temperaturii de $42,5^\circ\text{C}$, agregate care se desfac când proba este încălzită în continuare, datorită intensificării mișcării browniene. Vâscozitatea probei UCC scade continuu cu temperatura în intervalul investigat, însă dependența η - t nu este una de tip Arrhenius.

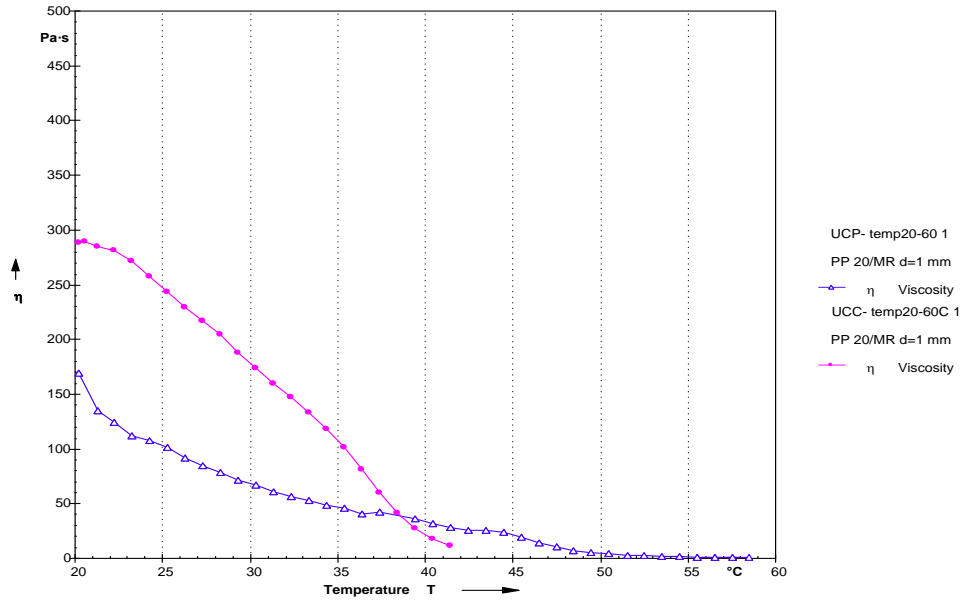


Figura 3.92.-. Testul "Temperature test" pentru cele două probe, la $\dot{\gamma} = 1 \text{ s}^{-1}$.

Pentru proba UCP datele η -t au fost corelate pe fiecare din cele două intervale de temperatură unde viscozitatea scade funcție de temperatură după o ecuație de tip Arrhenius [241,242]:

$$\eta = A \exp \frac{E_a}{kT} ,$$

unde

- A reprezintă o constantă multiplicativă fără semnificație fizică,
- E_a - energia de activare a curgerii vâscoase,
- $k=1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$ constanta lui Boltzmann,
- T - temperatura absolută.

Fitarea pe porțiuni a datelor η -t pentru proba UCP este prezentată în figura 3.93. Această probă suferă un salt al energiei de activare a curgerii vâscoase E_a . Valorile obținute din fitare pentru energia de activare E_a a probei, pentru fiecare din cele două intervale de temperatură, sunt cele din tabelul 3.40.

Tabelul 3.40.

Valorile fitate ale energiei de activare a curgerii vâscoase.

| Proba | E_a [J] |
|-------|---|
| UCP | I). $12.22 \cdot 10^{-20}$ II). $28.48 \cdot 10^{-20}$ |

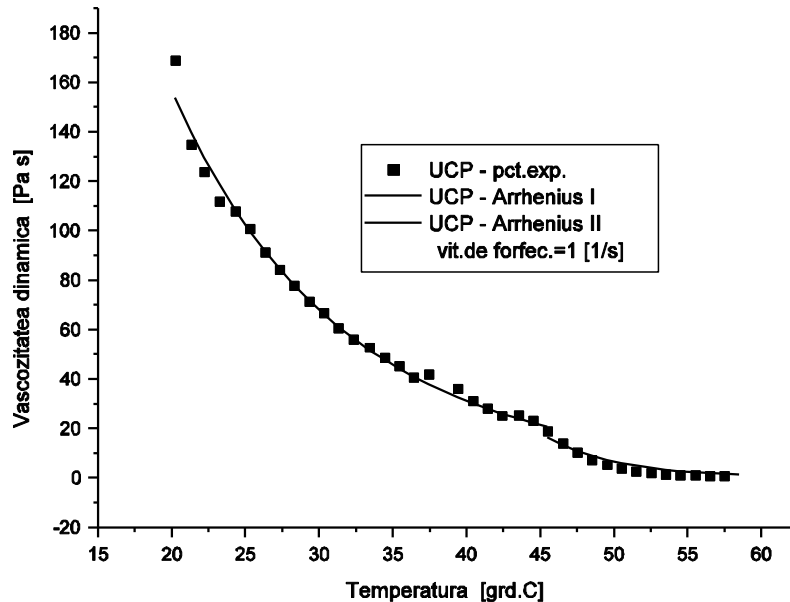


Figura 3.93.- Fitarea pe porțiuni a datelor η - t cu formula lui Arrhenius pentru proba UCP

Rezultatele de mai sus fac parte dintr-un ansamblu de cercetări reologice realizate asupra mai multor tipuri de unguente pe bază de extracte naturale din plante [276].

• Concluzii

În urma testelor reologice efectuate asupra unguentelor cu extracte carotenoidice, se pot desprinde următoarele concluzii:

1. Cunoașterea proprietăților reologice ale materialelor este deosebit de importantă pentru stabilirea domeniilor de aplicabilitate, respectiv a condițiilor optime (temperatură, viteză de forfecare) de utilizare ale acestora.
2. Unguentele analizate au un comportament reologic complex, vâscoelastic. Ele își schimbă semnificativ proprietățile reologice atât la modificarea temperaturii, cât și a tensiunii, respectiv a vitezei de forfecare la care sunt supuse.
3. Din punct de vedere reologic, unguentele analizate sunt fluide complexe, care prezintă *pseudoplasticitate și tixotropie*, așa cum denotă rezultatele testelor "Loop", precum și *vâscoelasticitate*, așa cum rezultă din testele "Creep", "Amplitude Sweep" și "Frequency Sweep". Din curbele de vâscozitate s-au obținut valorile viscozității η_{∞} la viteze de

- forfecare infinit de mari, pentru fiecare probă. Din diagramele "Amplitude Sweep" s-au obținut valorile deformațiilor critice ale acestora.
4. Și comportarea probelor funcție de temperatură este complexă. Vâscozitatea unguentului cu extract carotenoidic din porumb "ascultă" de o dependență de tip Arrhenius doar pe anumite intervale de temperatură, iar cea a unguentului cu extract carotenoidic din fructe de cătină albă scăzând continuu cu creșterea temperaturii, însă nu după o ecuație de tip Arrhenius.
 5. La unguentul cu extract carotenoidic din porumb, corelând datele experimentale η -t pentru intervalele unde este respectată o ecuație de tip Arrhenius, au fost obținute valorile energiei de activare a curgerii vâscoase. Proba își schimbă, la o anumită temperatură, valoarea energiei de activare a curgerii vâscoase.
 6. Comportamentul reologic al unguentelor terapeutice analizate se încadrează între limitele impuse unguentelor folosite în industria farmaceutică și cosmetică [239,240].

3.3.2.2. Studiul efectelor utilizării unor surse naturale bogate în pigmenți carotenoidici ca suplimente în furajele păsărilor ouătoare

În urma experimentului realizat conform 3.2.2.2. (vezi Partea experimentală), asupra unor loturi de găini (*Gallus gallus domesticus*), s-au observat următoarele rezultate (tabelul 3.41.) privind conținutul de compuși carotenoidici din furajul combinat de bază și din făina de fructe de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*), determinat la începutul experienței (potrivit modului de lucru descris la 3.2.2.2.).

Variația conținutului de carotenoide din gălbenușurile ouălor de-a lungul desfășurării experimentului (conținut determinat conform 3.2.2.2. - Partea experimentală), precum și variația numărului de ouă produse, este prezentată în figurile 3.94.-3.104. (tabelul A.4.1.-Anexa 4.)

Tabelul 3.41.

Conținutul de compuși carotenoidici din furajul combinat de bază și din făina de fructe de cătină albă

| Carotenoida | Conținutul în furajul combinat de bază ($\mu\text{g/g}$) | Conținutul în făina de cătină albă, soiul <i>Serpeni 11</i> ($\mu\text{g/g}$) | R_f * |
|-------------------------|--|---|---------|
| α -Caroten | 0.98 | 1.82 | 0.65 |
| β -Caroten | 3.02 | 49.01 | 0.50 |
| ϵ -Caroten | - | 10.84 | 0.71 |
| δ -Caroten | - | 7.11 | 0.22 |
| γ -Caroten | - | 24.02 | 0.12 |
| α -Criptoxantină | 0.86 | - | 0.75 |
| β - Criptoxantină | 1.75 | 89.17 | 0.69 |
| Luteină | 5.33 | 19.03 | 0.36 |
| Zeaxantină | 4.12 | 34.17 | 0.25 |
| Licopen | - | 6.11 | 0.02 |
| Violaxantină | 0.61 | 9.05 | 0.18 |
| Total carotenoide | 16,67 | 250,33 | |

* A se vedea figura A.4. .din Anexa 4

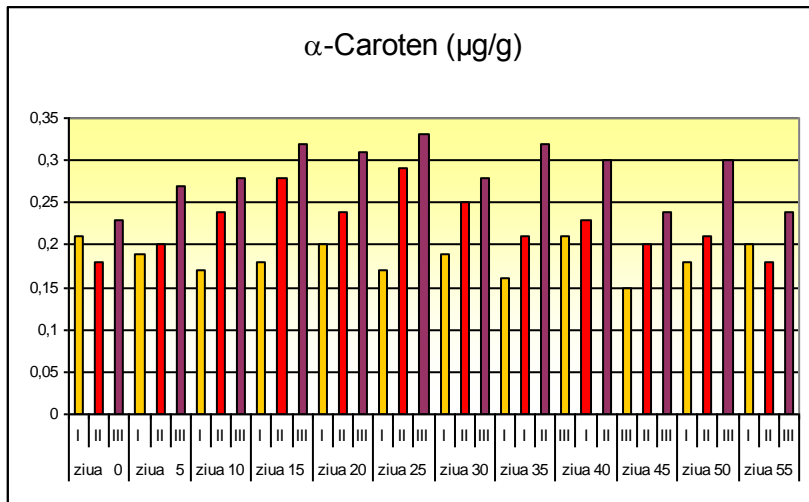


Figura 3.94.-Variația conținutului de α -caroten din gălbenușurile ouălor din loturile I (martor), II (lot hrănit cu furaj ce conține 2,5 % adaus de făină din fructe de cătină albă) și III (lot hrănit cu furaj ce conține 4 % adaus de făină din fructe de cătină albă) de-a lungul desfășurării experimentului

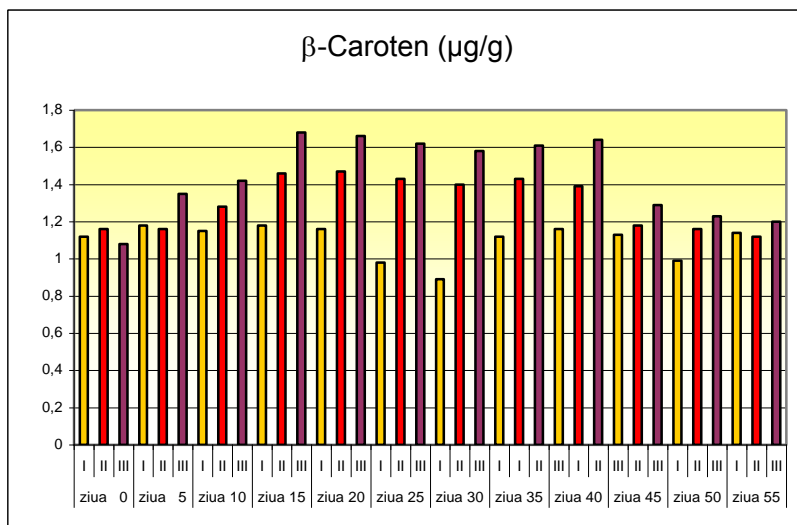


Figura 3.95.-Variația conținutului de β -caroten din gălbenușurile ouălor din loturile I (martor),II (lot hrănit cu furaj ce conține 2,5 % adaus de făină din fructe de cătină albă) și III (lot hrănit cu furaj ce conține 4% adaus de făină din fructe de cătină albă) de-a lungul desfășurării experimentului

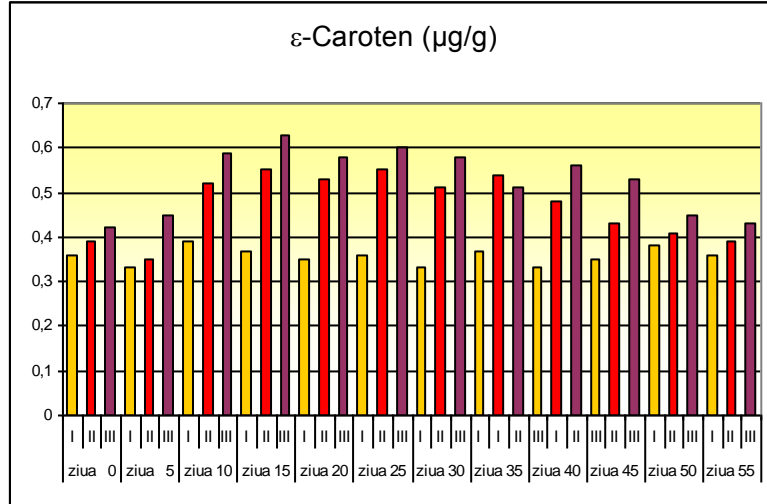


Figura 3.96.-Variația conținutului de ε-caroten din gălbenușurile ouălor din loturile I (martor),II (lot hrănit cu furaj ce conține 2,5 % adaus de făină din fructe de cătină albă) și III (lot hrănit cu furaj ce conține 4 % adaus de făină din fructe de cătină albă) de-a lungul desfășurării experimentului

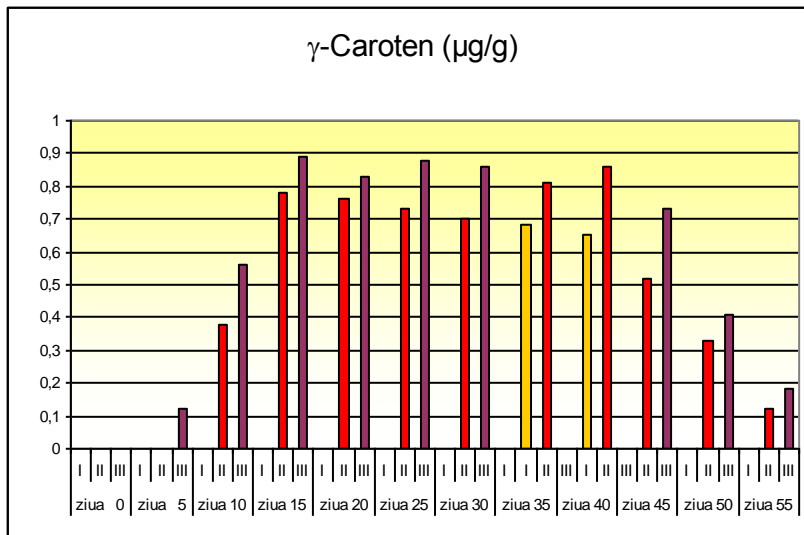


Figura 3.97.-Variația conținutului de γ-caroten din gălbenușurile ouălor din loturile I (martor),II (lot hrănit cu furaj ce conține 2,5 % adaus de făină din fructe de cătină albă) și III (lot hrănit cu furaj ce conține 4 % adaus de făină din fructe de cătină albă) de-a lungul desfășurării experimentului

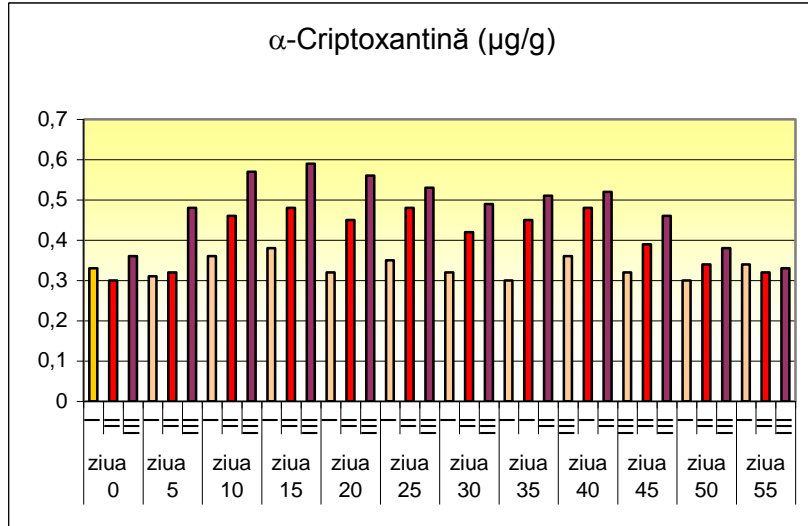


Figura 3.98.-Variația conținutului de α -criptoxantină din gălbenușurile ouălor din loturile I (martor),II (lot hrănit cu furaj ce conține 2,5 % adaus de făină din fructe de cătină albă) și III (lot hrănit cu furaj ce conține 4 % adaus de făină din fructe de cătină albă) de-a lungul desfășurării experimentului

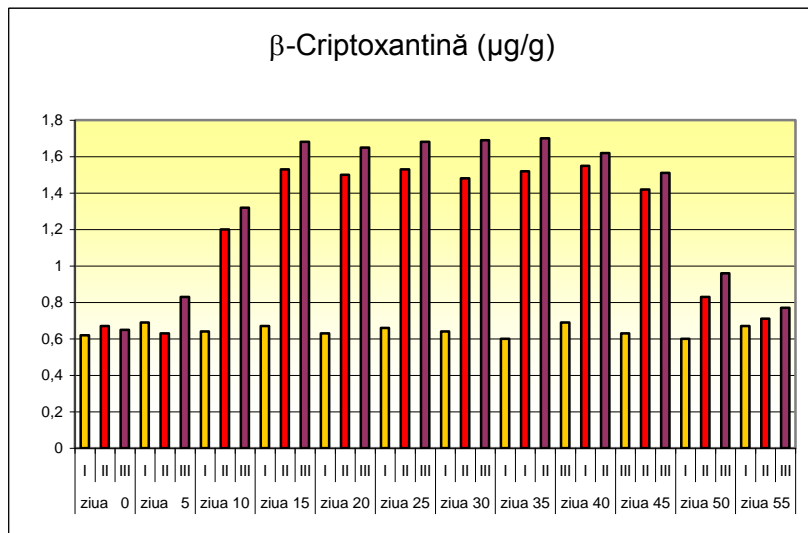


Figura 3.99.-Variația conținutului de β -criptoxantină din gălbenușurile ouălor din loturile I(martor),II (lot hrănit cu furaj ce conține 2,5 % adaus de făină din fructe de cătină albă) și III (lot hrănit cu furaj ce conține 4 % adaus de făină din fructe de cătină albă) de-a lungul desfășurării experimentului

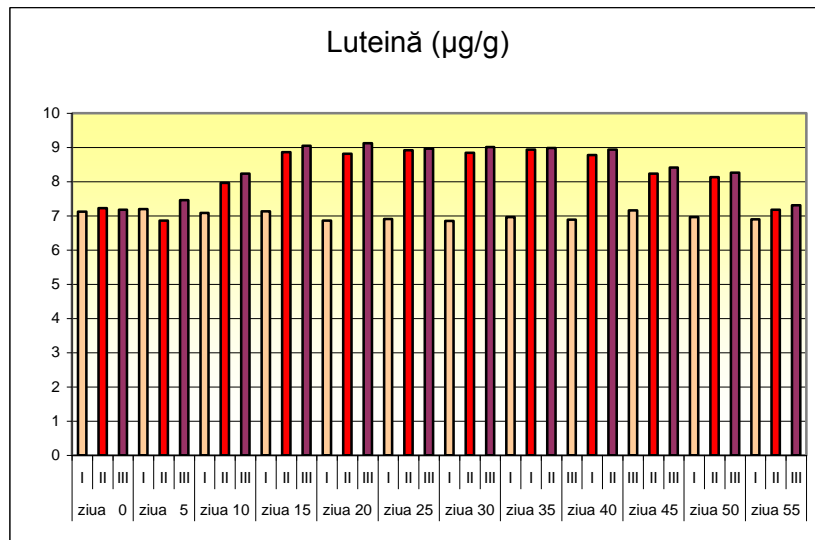


Figura 3.100.-Variația conținutului de luteină din gălbenușurile ouălor din loturile I (martor),II (lot hrănit cu furaj ce conține 2,5 % adaus de făină din fructe de cătină albă) și III (lot hrănit cu furaj ce conține 4 % adaus de făină din fructe de cătină albă) de-a lungul desfășurării experimentului

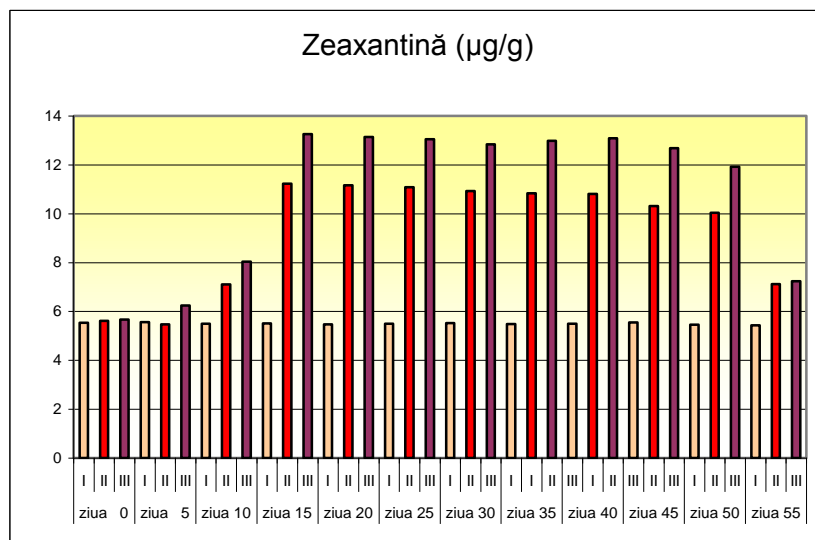


Figura 3.101.-Variația conținutului de zeaxantină din gălbenușurile ouălor din loturile I (martor),II (lot hrănit cu furaj ce conține 2,5 % adaus de făină din fructe de cătină albă) și III (lot hrănit cu furaj ce conține 4 % adaus de făină din fructe de cătină albă) de-a lungul desfășurării experimentului

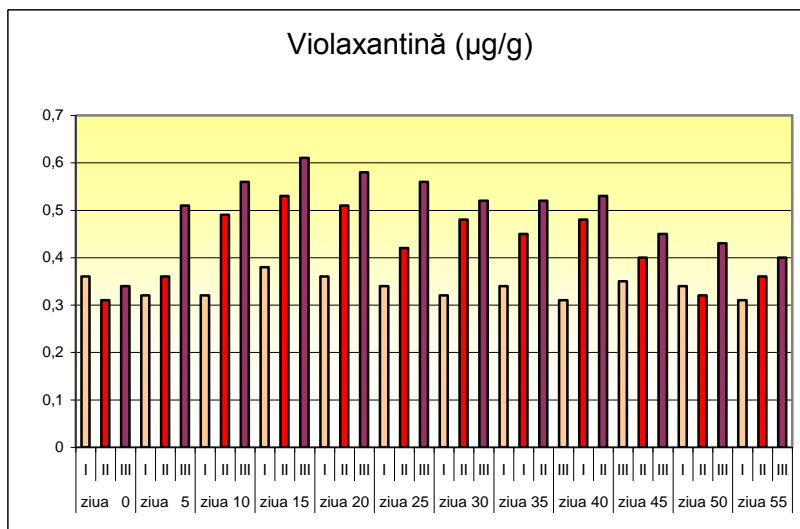


Figura 3.102.-Variația conținutului de violaxantină din gălbenușurile ouălor din loturile I (martor),II (lot hrănit cu furaj ce conține 2,5 % adaus de făină din fructe de cătină albă) și III (lot hrănit cu furaj ce conține 4 % adaus de făină din fructe de cătină albă) de-a lungul desfășurării experimentului

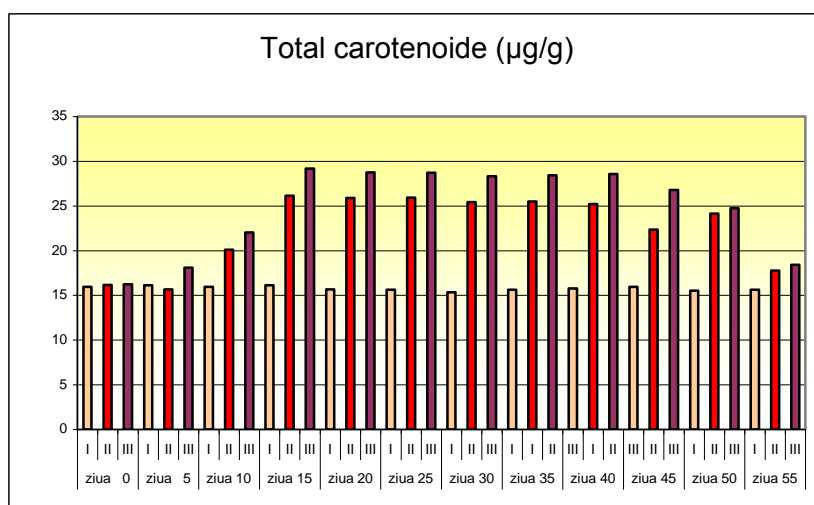


Figura 3.103.-Variația conținutului de carotenoide totale din gălbenușurile ouălor din loturile I (martor),II (lot hrănit cu furaj ce conține 2,5 % adaus de făină din fructe de cătină albă) și III (lot hrănit cu furaj ce conține 4 % adaus de făină din fructe de cătină albă) de-a lungul desfășurării experimentului

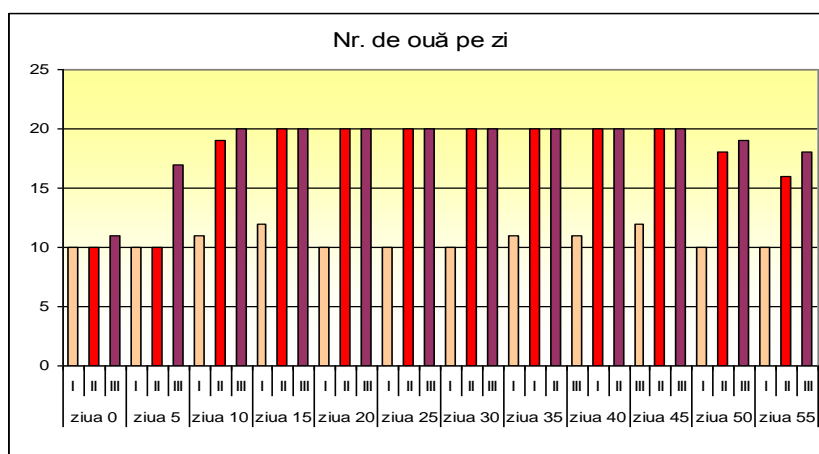


Figura 3.104.-Variația producției de ouă de-a lungul desfășurării experimentului, pentru loturile I (martor), II (lot hrănit cu furaj ce conține 2,5 % adaus de făină din fructe de cătină albă) și III (lot hrănit cu furaj ce conține 4 % adaus de făină din fructe de cătină albă)

Analizând datele din figurile 3.94.-3.103. (tabelul A.4.1.-Anexa 4.), se poate constata faptul că găinile absorb și depozitează în gălbenușuri, într-o măsură mai mare sau mai mică, aproape toate carotenoidele existente în hrană. Absorbția și depozitarea compușilor carotenoidici se face selectiv, în funcție de structura moleculară a acestora. Cel mai ușor sunt absorbite și depozitate în ouă xantofilele dihidroxilice (zeaxantina și luteina), apoi cele monohidroxilice (α -criptoxantina, β -criptoxantina) și mai greu carotenoidul hidrocarburic α - și β -iononice (α -carotenul, β -carotenul, ϵ -carotenul) și cele pseudoiononice (γ -caroten). Într-o proporție mică se depozitează în ouă violaxantina (carotenoidă epoxidică). Nu s-au găsit în gălbenușurile ouălor: licopenul (cu structură aciclică) și δ -carotenul (cu structură pseudoiononică).

Carotenoidul principal din gălbenușurile tuturor ouălor sunt luteina și zeaxantina. În gălbenușurile ouălor din lotul I (martor), luteina se află în cantitate mai mare decât zeaxantina. După 15 zile de furajare diferențiată a loturilor se observă că în cazul gălbenușurilor ouălor din loturile II (lot hrănit cu furaj ce conține adaus de 2,5 % făină din fructe de cătină albă) și III (lot hrănit cu furaj ce conține adaus de 4% făină din fructe de cătină albă), zeaxantina se acumulează în cantitate mai mare decât luteina.

Conținutul total de compuși carotenoidici din gălbenușurile ouălor din loturile II și III este mai mare decât al celor din lotul I (martor), ceea ce dovedește că adausul de făină din fructe de cătină albă în hrana găinilor, în procente relativ mici, are efecte favorabile asupra caumulării de carotenoidi în gălbenuș. Randamentul cel mai bun de absorbție și depozitare a carotenoidelor în ouă s-a produs în cazul lotului III, care a primit în hrană o cantitate mai mare de făină de cătină albă. De asemenea, se constată o creștere importantă a producției de ouă în cazul loturilor II și III, față de lotul I, într-o perioadă a anului când, obișnuit, producția de ouă scade. S-a constatat că în primele cinci zile de furajare diferențiată a găinilor nu au apărut deosebiri importante în ceea ce privește conținutul de pigmenți carotenoidici din gălbenușurile ouălor celor trei loturi experimentale. Cantitatea maximă de carotenoidi s-a acumulat în gălbenuș, după circa 15 zile de la începerea experimentului, apoi cantitatea de pigmenți carotenoidici a suferit oscilații la toate loturile.

Perioada de remanență a carotenoidelor în gălbenuș, după încetarea furajării diferențiate a găinilor, este de circa 5-10 zile.

Pentru a determina culoarea gălbenușelor de-a lungul desfășurării experimentului a fost utilizată scala de culori Roche Fan, cu 15 puncte [277,278,279]. Pentru fiecare lot a fost analizată culoarea a câte 4 gălbenușe. Pentru aceasta, cele patru ouă au fost sparte într-o farfurie plată de culoare albă și s-a determinat culoarea, cu ajutorul scalei Roche Fan, pentru fiecare gălbenuș în parte, calculându-se apoi media aritmetică. Culoarea gălbenușurilor este determinată de raportul dintre conținutul pigmentilor portocalii (β -caroten, γ -caroten, licopen, β -criptoxantină, zeaxantină) și conținutul de pigmenți galbeni (α -caroten, α -criptoxantină, ϵ -caroten, violaxantină, luteină). Cu cât acest raport este mai mare, cu atât culoarea gălbenușului este mai intensă, așa cum se reiese din tabelul 3.42.

Tabelul 3.42.

Culoarea gălbenușurilor ouălor de-a lungul experimentului în funcție de raportul conținutului de pigmenți portocalii (P_p) și galbeni (P_g)

| Nr. de zile de la începerea experimentului | Lot | P_p/P_g | Punctaj scala Roche | Nr. de zile de la începerea experimentului | Lot | P_p/P_g | Punctaj scala Roche |
|--|-----|-----------|---------------------|--|-----|-----------|---------------------|
| 0 | I | 0.86 | 8 | 30 | I | 0.85 | 8 |
| | II | 0.85 | 7,75 | | II | 1.33 | 12 |
| | III | 0.85 | 7,75 | | III | 1.49 | 13,75 |
| 5 | I | 0.86 | 8 | 35 | I | 0.85 | 7,75 |
| | II | 0.86 | 8 | | II | 1.31 | 11,75 |
| | III | 0.89 | 8,5 | | III | 1.51 | 14,25 |
| 10 | I | 0.84 | 7,75 | 40 | I | 0.87 | 8,25 |
| | II | 0.98 | 9,75 | | II | 1.33 | 12 |
| | III | 1.06 | 11 | | III | 1.51 | 14 |
| 15 | I | 0.84 | 7,5 | 45 | I | 0.85 | 8 |
| | II | 1.34 | 12,25 | | II | 1.33 | 11,75 |
| | III | 1.49 | 14 | | III | 1.54 | 14,25 |
| 20 | I | 0.86 | 8 | 50 | I | 0.83 | 7,5 |
| | II | 1.35 | 12,50 | | II | 1.27 | 11,75 |
| | III | 1.50 | 14,25 | | III | 1.42 | 13,5 |
| 25 | I | 0.84 | 7,75 | 55 | I | 0.86 | 8 |
| | II | 1.33 | 12,25 | | II | 1.04 | 10,75 |
| | III | 1.49 | 14 | | III | 1.03 | 11 |

• Concluzii

Ca urmare a cercetărilor privind efectele adausului de făină din fructe de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*) din hrana găinilor (*Gallus gallus domesticus*), asupra calității ouălor, se pot desprinde următoarele concluzii:

1. Făina din fructe de cătină albă constituie o sursă bogată de carotenoide pentru hrana găinilor ouătoare.
2. Carotenoidele din făina fructelor de cătină albă contribuie la mărirea valorii biologice a gălbenușurilor ouălor, la pigmentația corespunzătoare, la creșterea producției de ouă, chiar la adausuri în procente relativ mici în hrana păsărilor.
3. Cel mai mult se acumulează în gălbenușurile ouălor de găină xantofilele dihidroxilice: zeaxantina și luteina, apoi cele monohidroxilice: α -criptoxantina, β -criptoxantina, pigmenți cu o valoare biologică deosebit de ridicată. Licopenul (cu structură aciclică) și δ -carotenul (cu

structură pseudoiononică) nu au fost identificați în gălbenușurile ouălor, deși se găsesc în făina de cătină albă, aceste carotenoide nefiind absorbite de către găini.

4. Cantitatea maximă de carotenoide se acumulează în gălbenușuri după circa 15 zile de furajare diferențiată, după care această cantitate suferă oscilații la toate loturile.
5. Randamentul cel mai bun de absorbție și depozitare a carotenoidelor în ouă s-a produs în cazul lotului III care a beneficiat de cel mai mare adaus de făină din cătină albă (4%).

3.3.2.3. Aplicarea industrială a unui extract carotenoidic din fructe de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*) la colorarea iaurtului

• **Materiale și metode**

În vederea realizării unui sinergism de culoare, respectiv pentru îmbunătățirea valorii nutritive a unor sortimente de iaurt, extractul carotenoidic liber de solvent, obținut din fructe de cătină albă, soiul *Delta 1*, conform 3.2.1.2., a fost aplicat la colorarea iaurtului de fructe „Ispita fructelor” și a iaurtului „natur” de băut, produse de firma „Friesland Romania SA” (fabrica Deta, jud. Timiș). Extractul a fost adăugat în masa de iaurt în cantitate de 0,30 g/ kg, la finalul procesului tehnologic (vezi schema fluxului tehnologic din Anexa 5.), înaintea termostatării la 45 °C. Toate probele au fost realizate în duplicat.

Prin adăugarea extractului carotenoidic din fructe de cătină albă în cele două sortimente de iaurt amintite, s-a urmărit, pe lângă o ameliorare a culorii, creșterea valorii nutritive datorită creșterii conținutului de β -caroten și carotenoide totale din produse. Astfel, produsele au fost îmbogățite cu o cantitate medie de 215,28 $\mu\text{g/g}$ carotenoide totale, respectiv 33,15 $\mu\text{g/g}$ β -caroten.

• **Analiza componentelor principale (PCA) pentru analiza senzorială a iaurturilor**

Analiza multivariată PCA pentru produsele lactate acide tip iaurt s-a realizat utilizând ca date de intrare rezultatele obținute la analiza senzorială standard [280,281] a produselor, pe un panel format din 15 consumatori (60% femei și 40% bărbați) cu vârste cuprinse între 22 și 39 de ani. Probele analizate au fost următoarele:

- iaurt de băut natur, martor cod: A;
- iaurt de băut natur cu adaus de extract carotenoidic din fructe de cătină albă (0,3 g/kg)..... cod: B;
- iaurt de fructe „Ispita fructelor”, martor..... cod: C;
- iaurt de fructe „Ispita fructelor” cu adaus de extract carotenoidic din fructe de cătină albă (0,3 g/kg)..... cod: D.

Prin această analiză statistică multivariată s-a urmărit stabilirea importanței parametrilor (caracteristicilor) considerați în evaluarea senzorială a produsului, precum și clasificarea sorturilor de produse în funcție de aceste caracteristici.

Rezultatele analizei senzoriale pentru cele 4 sortimente de iaurt sunt prezentate în tabelul A5. (Anexa 5.).

- Analiza PCA a datelor analizei senzoriale s-a realizat în următoarele condiții:
- număr total de variabile: 5 (caracteristicile organoleptice: aspect, consistență, culoare, aromă, gust);
 - număr total de cazuri: 60.

În figura 3.105. se prezintă graficul scorurilor pentru sorturile de iaurt, iar figura 3.106. prezintă graficul înregistrărilor pentru primele două componente principale PC1 și PC2

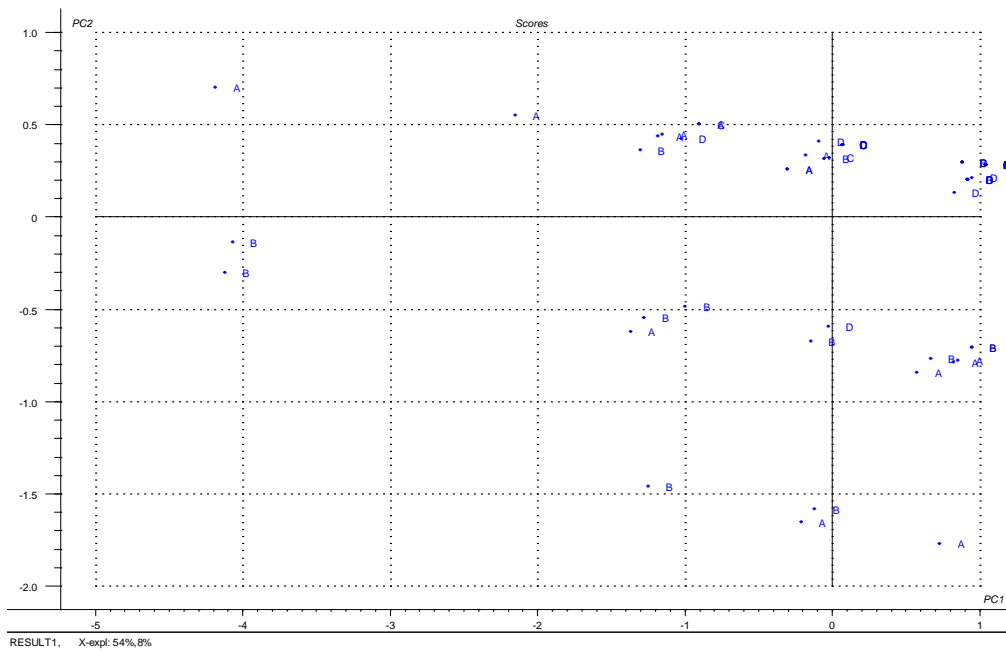


Figura 3.105. - Graficul scorurilor PC2 vs PC1 pentru sortimentele de iaurt

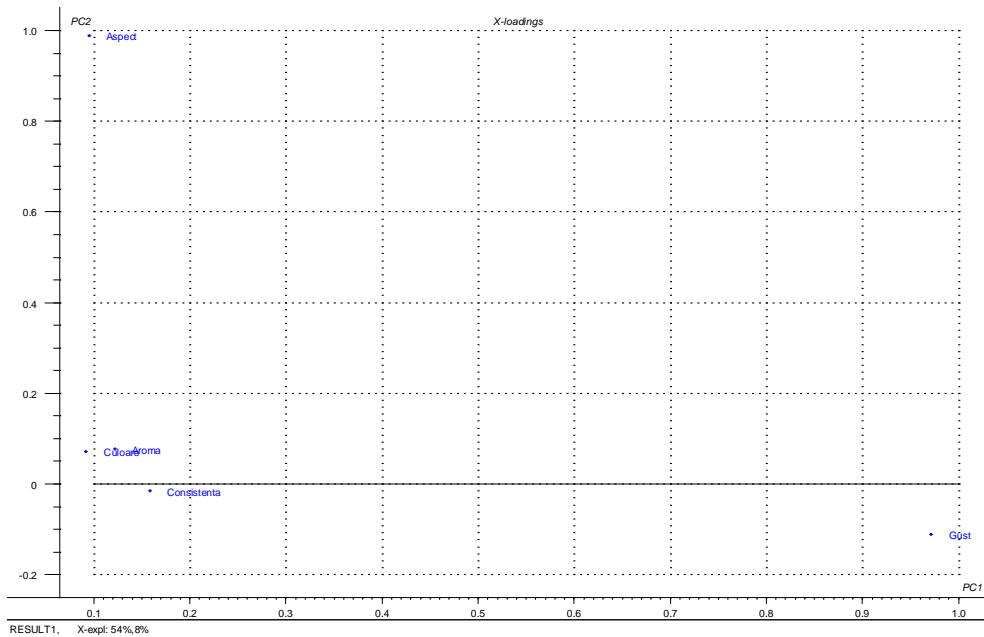


Figura 3.106.- Graficul înregistrărilor PC2 vs PC1 pentru sortimentele de iaurt

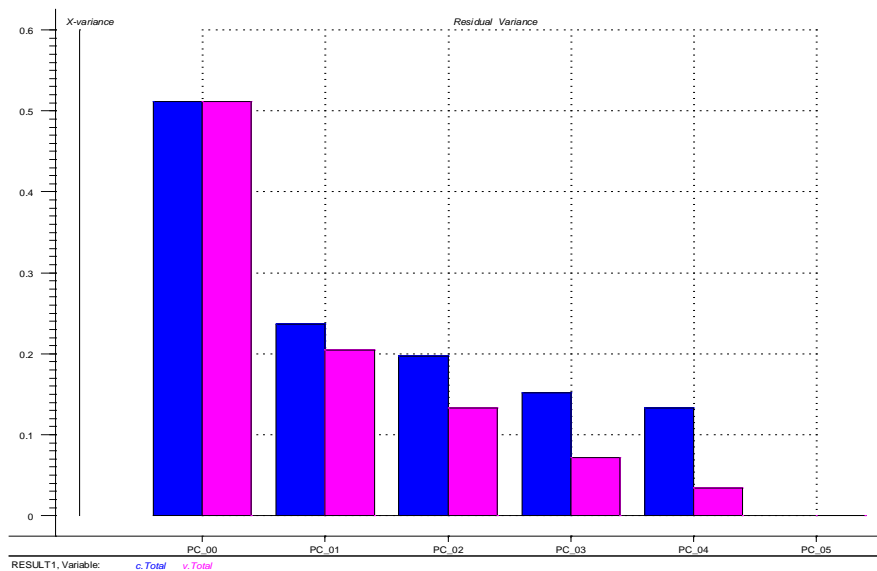


Figura 3.107.- Variația reziduală ce furnizează numărul de componente principale reprezentative în cazul analizei PCA pentru probele analizate

Numărul optim de componente principale este $A = 4$, care sunt relevante pentru variația datelor analizei senzoriale obținute pentru sorturile de iaurt. În

urma acestei analize s-a constatat că primele trei componente principale explică 54% din variația datelor (figura 3.107.).

Din graficul înregistrărilor se observă că gustul iaurtului explică cel mai bine variația datelor în special pentru prima componentă principală (PC1), iar culoarea-aroma-consistența pentru primele două componente principale (PC1 și PC2). Din graficul scorurilor rezultă că sorturile de iaurt C și D sunt similare ca proprietăți (se grupează foarte bine), însă sorturile A și B sunt mult mai dispersate în spațiul componentelor principale, ceea ce relevă faptul că aceste sortimente de iaurt au fost mai dificil de caracterizat.

• **Concluzii**

În acest studiu s-a realizat analiza în paralel a rezultatelor senzoriale, după procedurile indicate de normele curente, proprii industriei alimentare, a unor produse de pe piața românească (iaurt) și a unor „produse noi” (iaurt cu adaos de extract carotenoidic din fructe de cătină albă) și s-au prelucrat prin metode de analiză multivariată rezultatele obținute. Concluziile care se pot desprinde sunt următoarele:

- metodele de analiză senzorială oficiale folosite pot condiționa acceptabilitatea produsului pe piață;
- pentru caracterizarea datelor rezultate la analiza senzorială, clasificarea produselor analizate și predicția caracteristicilor unor produse noi, am demonstrat că sunt potrivite metodele statistice de analiză multivariată a datelor (PCA);
- modalitatea de abordare a problematicii acceptabilității unor produse pe piață este una reală și care dă rezultate viabile în domeniul alimentar.

CONCLUZII FINALE

Ca urmare a cercetărilor privind obținerea și caracterizarea unor extracte carotenoidice din diferite materiale vegetale cu aplicații în medicină, farmacie și zootehnie s-au realizat următoarele:

1. S-au obținut 18 tipuri de extracte carotenoidice din diferite materiale vegetale: 6 hibrizi de porumb (*Zea mays*), două soiuri de fructe de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*), portocale (*Citrus sinensis*) - flavedo, albedo și pulpă, piersici (*Persica vulgaris*) - pulpă și pericarp, rostopască (*Chelidonium majus*) - rădăcină, tulpină, flori și frunze, prin extracție la temperatura camerei, cu amestecuri potrivite de solvenți organici. Toate extractele primare obținute au fost purificate prin îndepărtarea sterolilor și saponificare, concentrația procentuală de carotenoide din extractul final cea mai ridicată fiind în extractul din porumb hibridul *NSSK444* (82,30 %), iar cea mai mică în extractul din pulpă de portocale, soiul *Valencia* (25.69 %).
2. A fost determinat conținutul de β -caroten (prin RP-HPLC) și carotenoide totale (prin RP-HPLC și prin metoda spectrofotometrică) din toate cele 18 tipuri de extracte carotenoidice obținute, β -carotenul fiind evidențiat în toate extractele analizate. Cel mai ridicat conținut de β -caroten a fost determinat în fructele de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*), soiul *Ciumași*: 1086,60 $\mu\text{g/g}$ fructe uscate, cel mai scăzut fiind în pulpa de piersică (*Persica vulgaris*), soiul *Red Haven*: 11,40 $\mu\text{g/g}$ pulpă proaspătă. Cantitatea de carotenoide totale cea mai mare este în florile de gălbenele (*Calendula officinalis*): 1667,42 $\mu\text{g/g}$ flori uscate, cea mai scăzută fiind în pulpa de portocale (*Citrus sinensis*): 77,72 $\mu\text{g/g}$ pulpă proaspătă.
3. Pentru obținerea extractelor carotenoidice din boabele de porumb s-a utilizat o metodă de **extracție îmbunătățită**, care să permită o eliberare mai completă a pigmentilor carotenoidici din materialul vegetal. Cei șase hibrizi de porumb (*Zea mays*) analizați -*NSSK444*, *NSSK640*, *Lovrin 400*, *Laureat*, *NSSK420* și *Florența*, prezintă un conținut bogat de β -caroten și carotenoide totale, mult mai mare decât cel corespunzător altor hibrizi de porumb specificați în datele de literatură studiate. Dintre hibrizii de porumb cercetați, cel mai ridicat conținut de β -caroten și carotenoide totale s-a înregistrat la hibridul *NSSK444* (670,30 $\mu\text{g/g}$ făină, respectiv 1174,55 $\mu\text{g/g}$ făină). Cel mai scăzut conținut de β -caroten și carotenoide totale se găsește în hibridul *Lovrin 400* (115,5 $\mu\text{g/g}$ făină, respectiv 312,30 $\mu\text{g/g}$ făină).
4. Fructele de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*) analizate au concentrațiile de β -caroten și carotenoide totale apropiate de valorile din datele de literatură. Cele două soiuri de cătină albă studiate (*Delta 1* și *Ciumași*) prezintă concentrații foarte apropiate de carotenoide totale (962,43 $\mu\text{g/g}$ făină, pentru *Delta 1*, respectiv 1086,60 $\mu\text{g/g}$ făină, pentru *Ciumași*), însă soiul *Delta1* conține mai multe tipuri de carotenoide decât soiul *Ciumași*, în care a fost identificat numai β -carotenul.
5. Conținutul de carotenoide din florile de gălbenele (*Calendula officinalis*) analizate s-a încadrat în valorile specificate în datele de literatură, aceste flori caracterizându-se printr-un conținut foarte ridicat de carotenoide totale (1667,42 $\mu\text{g/g}$ flori uscate).

6. Fructele de piersici (*Persica vulgaris*), soiul *Red Haven*, au în pericarp un conținut mult mai mare de carotenoide totale (500,05 $\mu\text{g/g}$ material proaspăt) și β -caroten (30,70 $\mu\text{g/g}$ material proaspăt) decât în pulpă (207,00 $\mu\text{g/g}$ material proaspăt, respectiv 11,40 $\mu\text{g/g}$ material proaspăt). Valorile obținute sunt mai ridicate decât cele din datele de literatură studiate, date care însă privesc alte soiuri de piersici.
7. Pentru portocale (*Citrus sinensis*), soiul *Valencia*, conținutul cel mai ridicat de carotenoide totale (255,46 $\mu\text{g/g}$ material uscat) a fost găsit în flavedo, foarte apropiat de cel din albedo (234,07 $\mu\text{g/g}$ material uscat) și cel mai scăzut în pulpă (77,72 $\mu\text{g/g}$ material proaspăt). În schimb, conținutul de β -caroten cel mai ridicat a fost evidențiat în albedo (206,80 $\mu\text{g/g}$ material uscat), iar cel mai mic în flavedo (54,80 $\mu\text{g/g}$ material uscat). Pulpa de portocale, deși are un conținut mult mai mic de carotenoide totale decât flavedo, prezintă un conținut mai ridicat de β -caroten (65,80 $\mu\text{g/g}$ material proaspăt), acest pigment reprezentând 84,66 % din totalul carotenoidelor din pulpa de portocală.
8. În cazul plantei de rostopască (*Chelidonium majus*), au fost evidențiate conținuturi diferite de carotenoide totale și de β -caroten în diferitele ei părți anatomice. Florile de rostopască sunt cele mai bogate în carotenoide totale și β -caroten (1377,70 $\mu\text{g/g}$ material proaspăt, respectiv 369,50 $\mu\text{g/g}$ material proaspăt). Cel mai scăzut conținut de carotenoide totale a fost determinat în rădăcina de rostopască (409,86 $\mu\text{g/g}$ material proaspăt), iar cel mai mic conținut de β -caroten, în tulpină (53,30 $\mu\text{g/g}$ material proaspăt).
9. S-a determinat activitatea antioxidantă, prin metoda cu DPPH, a câtorva dintre extractele carotenoidice obținute, și anume: extractele din frunze, flori și tulpină de rostopască (*Chelidonium majus*), extractele din făină de porumb (*Zea mays*) hibridii: *NSSK444*, *Lovrin 400* și *NSSK640*, extractele din fructe uscate de cătină (*Hippophae rhamnoides*) soiurile *Delta 1* și *Ciumași*, extractele din pericarp de piersică (*Persica vulgaris*), extractele din albedo și flavedo de portocală (*Citrus sinensis*). Toate extractele analizate au prezentat activitate antioxidantă.
10. Pentru extractele carotenoidice obținute din frunze și flori de rostopască, diluate 1:100, s-au obținut activități antioxidante apropiate, mai mari chiar decât cele obținute pentru soluțiile etalon de vitamină C. Cea mai mică activitate antioxidantă a prezentat-o extractul din tulpină de rostopască. Se constată că activitatea antioxidantă a extractelor carotenoidice din diferite părți anatomice ale plantei de rostopască este direct proporțională cu valoarea concentrației de compuși carotenoidici din extract.
11. În cazul extractelor din făină de porumb, diluate 1:100, s-au obținut activități antioxidante mai mici decât cele corespunzătoare soluțiilor de vitamină C. Cea mai mare activitate antioxidantă o prezintă extractul din hibridul *NSSK444* iar cea mai mică, extractul obținut din hibridul *Lovrin 400*. În cazul extractelor carotenoidice din boabe de porumb, s-a constatat că activitatea antioxidantă este direct proporțională cu mărimea concentrației de compuși carotenoidici din proba analizată, important fiind și tipul carotenoidelor conținute, dat fiind faptul că pigmentii carotenoidici au acțiune antioxidantă cu atât mai puternică, cu cât numărul de duble legături conjugate din molecula lor este mai mare.
12. Activitățile antioxidante ale extractelor carotenoidice din cele două soiuri de cătină albă analizate, la diluția de 1:100, au prezentat valori mai mici decât cele corespunzătoare soluțiilor etalon de vitamină C. Cea mai mare activitate

antioxidantă a manifestat-o extractul carotenoidic din fructe de cătină albă, soiul *Delta 1*, deși acest extract are un conținut procentual de carotenoide (71,76%) ceva mai scăzut decât soiul *Ciumași* (72,12%), datorită faptului că extractul din soiul *Delta 1* conține mai multe tipuri de carotenoide -care își amplifică reciproc acțiunea antioxidantă- față de extractul din soiul *Ciumași*, în care a fost evidențiat numai β -carotenul. Aceste extracte prezintă activități antioxidante apropiate cu cele ale extractelor din făină de porumb.

13. Prezența în cantitate mai mică a compușilor carotenoidici cu 11 legături conjugate, în extractul din pericarp de piersică face ca activitatea antioxidantă a acestuia (diluția 1:100) să fie ceva mai redusă decât la extractele carotenoidice din porumb și din cătină albă; de asemeni, acest fapt este datorat și concentrației procentuale de pigmenți carotenoidici (52,47%) mai redusă decât în cazul extractelor din porumb și cătină albă.
14. Activitate antioxidantă mai mare decât extractele din porumb, fructe de cătină albă și pericarp de piersică au prezentat cele obținute din albedo și flavedo de portocală (diluție 1:100), deși concentrația procentuală de pigmenți carotenoidici din aceste extracte este mai mică decât în celelalte extracte obținute. Activitatea antioxidantă ridicată, în acest caz, se datorează prezenței în extracte a limonenului, componentul majoritar din uleiul volatil prezent în pericarpul de portocale, compus cunoscut ca fiind un puternic antioxidant. Acesta nu se îndepărtează complet în procesul de extracție a carotenoidelor, o parte rămânând „captată „ între macromoleculele de carotenoide.
15. Prin spectrofotometrie de absorbție atomică au fost determinate un număr de 12 elemente minerale (K, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, Pb, Co, Cr, Ni) din materiile prime și din extractele obținute. S-a observat că macroelementele din materiile prime, se află în concentrații care se încadrează în limitele precizate de literatură. În extractele carotenoidice, macroelementele se găsesc în concentrații mult mai mici decât în materiile prime, aceste minerale eliminându-se în mare măsură în urma procesului de extracție. Cel mai bine reprezentat element este potasiul, atât în materiile prime cât și în extractele obținute. Dintre metalele grele manganul și cobaltul se găsesc numai în câteva materii prime și în cantități foarte mici: Mn – în florile de gălbenele (0,339 ppm) și în tulpina de rostopască (0,076 ppm), Co – în flavedo (0,009 ppm) și albedo (0,002 ppm) de portocală, precum și în florile de gălbenele (0,007 ppm). Celelalte metale grele se găsesc sub limita maximă admisă de lege, cu o singură excepție: Cu din făina de porumb *Laureat*, a cărui concentrație (6,53 ppm) depășește limita maximă legală (5,00 ppm).
16. Prin analiza statistică multivariată (PCA) a întregii cantități de date referitoare la concentrația de elemente minerale din probele analizate, s-a obținut o bună grupare a cazurilor (materiile prime, respectiv extractele carotenoidice), variabilele responsabile pentru această clasificare fiind: K, Mg, Ca și Na. La analiza multivariată numai a datelor privitoare la florile de gălbenele, fructele de cătină, albedo-portocale, flavedo-portocale, rostopască, miez și pericarp de piersică, de asemeni s-a obținut o bună clasificare a cazurilor, elementele minerale importante pentru aceste grupări fiind Ca și K., în cazul primei componente principale. Analizându-se numai datele privitoare la conținutul de minerale din diferiții hibridi de porumb studiați și din extractele carotenoidice obținute din aceștia, s-a obținut de asemenea o bună grupare a cazurilor, principalele elemente responsabile pentru prima clasificare fiind: Mg și K

17. O parte din extractele carotenoidice obținute (porumb *NSSK444* și *NSSK640*, cătină albă soiurile *Delta 1* și *Ciumași*, fructe și flori de rostopască) au fost testate și în ceea ce privește efectul antimicrobian asupra speciilor *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* și *Candida albicans* și s-a constatat că toate extractele analizate au prezentat o activitate antimicrobiană mai mică sau mai mare. Efectul antimicrobian cel mai puternic l-au manifestat extractele carotenoidice din porumb, acestea acționând chiar și asupra speciilor rezistente la antibiotic (*Pseudomonas aeruginosa* și *Candida albicans*). Acest lucru se datorează conținutului ridicat de pigmenți carotenoidici din aceste extracte.
18. Ca și aplicații ale extratelor carotenoidice au fost obținute două unguente terapeutice: unul având ca și principiu activ extractul din făină de porumb hibridul *NSSK444*, iar celălalt, extractul din făină de fructe de cătină albă, soiul *Delta 1*. Ambele unguente, testate *in vivo* la Spitalul Clinic Municipal, Clinica de Dermato-Venerologie, serviciul ambulator, ca și la Clinica de Chirurgie Oncologică, Timișoara, au dovedit o acțiune epitelizantă, cicatrizantă, antimitotică deosebită, având o eficiență ridicată în tratamentul ulcerelor de gambă, al leziunilor postelectrocauterizare (veruci și tumori), al lupusului eritematos cronic, al cazurilor de intertrigo mixt, de impetigo, psoriazis, eczeme cronice, fotodermatoze, epiteliom bazocelular. Spre deosebire de tratamentele clasice utilizate în cazul acestor afecțiuni, folosirea celor două unguente obținute nu a determinat apariția de efecte secundare nedorite, iar timpul de refacere a leziunilor a fost mai scurt.
19. Unguentele cu extracte carotenoidice obținute au fost supuse unor teste reologice, acestea dovedind un comportament reologic complex, vâscoelastic. Ele își schimbă semnificativ proprietățile reologice atât la modificarea temperaturii, cât și a tensiunii, respectiv a vitezei de forfecare la care sunt supuse.
20. Din punct de vedere reologic, unguentele analizate sunt fluide complexe, care prezintă *pseudoplasticitate și tixotropie*, așa cum denotă rezultatele testelor "Loop", precum și *vâscoelasticitate*, așa cum rezultă din testele "Creep", "Amplitude Sweep" și "Frequency Sweep". Viscositatea probelor scade cu temperatura în cazul ambelor unguente, însă această scădere este descrisă de o ecuație de tip Arrhenius numai pentru unguentul cu extract carotenoidic din boabe de porumb. De asemeni, la acest unguent se constată o ușoară creștere a viscozității în intervalul 42,5 °C -45 °C, după care scăderea viscozității cu temperatura are loc din nou după o curbă de tip Arrhenius. La unguentul cu extract carotenoidic din porumb, corelând datele experimentale η -t pentru intervalele unde este respectată o ecuație de tip Arrhenius, au fost obținute valorile energiei de activare a curgerii vâscoase. Proba își schimbă, la o anumită temperatură, valoarea energiei de activare a curgerii vâscoase. Viscositatea unguentului cu extract carotenoidic din fructe de cătină albă scade continuu cu creșterea temperaturii însă nu după o ecuație de tip Arrhenius. Ambele produse prezintă un comportament reologic care se încadrează în limitele impuse unguentelor folosite în industria cosmetică și farmaceutică.
21. O altă aplicație urmărită în acest studiu a fost evaluarea efectelor adausului de făină din fructe de cătină albă din hrana găinilor, asupra calității ouălor. S-a constatat că la adausuri relativ mici de făină din fructe de cătină albă în furaj (2,5% pentru un lot experimental, 4,0% pentru alt lot), conținutul de

pigmenți carotenoidici din gălbenușurile ouălor crește considerabil, concentrația maximă de carotenoide obținându-se după circa 15 zile de furajare diferențiată a păsărilor. Astfel, făina din fructe de cătină albă (sursă deosebit de bogată de carotenoide) determină creșterea valorii nutritive a ouălor de găină, îmbunătățirea pigmentației gălbenușurilor, creșterea producției de ouă. Cel mai mult se acumulează în gălbenușurile ouălor de găină xantofilele dihidroxilice: zeaxantina și luteina, apoi cele monohidroxilice: α -criptoxantina, β -criptoxantina, pigmenți cu o valoare biologică deosebit de ridicată. Licopenul și δ -carotenul nu au fost identificați în gălbenușurile ouălor, deși se găsesc în făina de cătină albă, aceste carotenoide nefiind absorbite de către găini.

22. A fost realizată analiza în paralel a rezultatelor senzoriale, după procedurile indicate de normele curente, proprii industriei alimentare, a unor produse de pe piața românească (iaurt) și a unor „produse noi” (iaurt cu adaos de extract carotenoidic din fructe de cătină albă) și s-au prelucrat prin metode de analiză multivariată rezultatele obținute. S-a demonstrat că metoda analizei componentelor principale (PCA) este potrivită pentru caracterizarea datelor rezultate la analiza senzorială, clasificarea produselor analizate și predicția caracteristicilor unor produse noi.

Rezultatele cercetărilor experimentale care au stat la baza elaborării acestei teze de doctorat au fost valorificate după cum urmează: prin o lucrare trimisă spre publicare [282] (la *Chemical Paper*, cu impact ISI) și 13 publicate, dintre care: 3 lucrări în *Revista de Chimie*, cu impact ISI [193,194,276], 1 lucrare publicată în volumul electronic al celui de-al 8-lea *Simpozion Internațional de Cercetare Interdisciplinară Regională Ungaria-România-Serbia și Muntenegru* la Szeged, ISBN: 973-8359-10-4 [200], 1 lucrare publicată în volumul celui de-al IV-lea *Simpozion Internațional Tinerii și Cercetarea Multidisciplinară România-Iugoslavia-Ungaria*, ISBN: 973-8359-10-4 [197], 1 lucrare publicată în *Analele Universității din Craiova* cu ISSN: 1435-1275, revistă cotate CNCSIS tip B [202], 1 în volumul de *Lucrări Științifice, Seria Horticultură*, al Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară „Ion Ionescu de la Brad”, cu ISSN 1454-7376, cotate CNCSIS tip B+ [204], 1 în volumul de *Lucrări Științifice, Seria Agricultură*, al Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară „Ion Ionescu de la Brad”, cu ISSN 1454-7414, cotate CNCSIS tip B+ [283], 1 în volumul *Scientific and Technical Bulletin, Series Chemistry, Food Science and Engineering*, Universitatea Aurel Vlaicu din Arad, ISSN 1582-1021, publicație cotate CNCSIS tip B+[284], 3 lucrări publicate în volumele *Cercetări Științifice Procese și Tehnologii Agroalimentare*, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Timișoara, publicație cotate CNCSIS tip C [198,199,201], 1 lucrare prezentată ca poster la al 14-lea Congres European de Dermato-Venerologie [203], 2 brevete de invenție înregistrate la OSIM [237,238], primul fiind medaliat cu 4 medalii de aur la Saloanele Internaționale de Inventică de la Geneva, Budapesta, Zagreb și Brussels [205,269,271,272] și cu medalie de bronz la *Salonul Internațional de Inventicii și Tehnologii Noi* București [270], iar cel de-al doilea cu medalie de argint la Saloanele Internaționale de Inventică de la Geneva și Brussels [274,275] și cu bronz la *Salonul Internațional de Inventicii și Tehnologii Noi*, București [273].

BIBLIOGRAFIE

1. Tămaș, V; Neamțu, G., *Pigmenți carotenoidici și metaboliti*, vol. 1 și 2, Ed. Ceres, București, 1986.
2. Britton, G.; *The carotenoid page*, <http://dcb-carot.unibe.ch/members.htm>
3. Rodriguez Amaya, D. B., *Carotenoids and Food Preparation: The Retention of Provitamin A Carotenoids in Prepared, Processed and Stored Foods*, Opportunities for Micronutrient Intervention, (OMNI), Arlington, 1997.
4. Spurgeon, S. L.; Porter, J. N., *The Biochemistry of Plants*, Vol. 4, Academic Press, 1980, 420-469.
5. Rodriguez Amaya, D. B.; Kimura, M. *Harvestplus Handbook for Carotenoid Analysis*, HarvestPlus Technical Monograph 2, Washington DC, 2004.
6. Ernst, H., "Recent advances in industrial carotenoid synthesis", *Pure Appl. Chem.*, **2002**, 74(8) 1369-1382.
7. Astrog, P., "Food carotenoids and cancer prevention. An overview of current research", *Trends Food Sci-Technol.* **1997**, 81, 406-413.
8. Bendich, A., "Recent advances in clinical research involving carotenoids", *Pure Appl Chem.*, **1994**, 66, 1017-1024.
9. Burri, B., "Beta carotene and human health: An review of current research", *Nutr. Res.*, **1997**, 17, 547-580.
10. Krinsky, N.I., "Actions of carotenoids in biological systems", *Annu Rev. Nutr.*, **1993**, 13, 561-587.
11. Palozza, P.; Krinsky, N.I., "Antioxidant effect of carotenoids *in vitro* and *in vivo*. An overview", *Meth. Enzymol.*, **1992**, 213, 403-420.
12. Olson, J.A., "Carotenoids and human health", *Arch Latinoamer. Nutr.*, **1999**, 49, 75-115.
13. Singh, H; Cana R., *J. Sci. Ind. Res.* **1975**, 34, 219, CA. 82; 69641v
14. Klvanova, J.; Brtko, J., Selected retinoids determination by isocratic normal-phase HPLC", *Endocrine regulations*, **2002**, 36, 133-137.
15. Sporn, M. B.; Dunlop, N. M.; Newton, D. L.; Smith, J. M., *Federation Proc.* **1976**, 35, 1332, CA, 85, 98728w.
16. Barnes, F.B.; Qureski, A.A.; Semmler, E.J.; Poter, J.W. "Prelycopersene Pyrophosphate and Lycopersene Intermediates in carotene Biosynthesis", *J. Biol. Chem.*, **1973**, 248, 2768-2773.
17. *** IUPAC and IUPAC-IUB, "Nomenclature of Carotenoids", (Rules approved 1974), World Wide Web version, Prepared by G.P. Moss, www.chem.qmul.ac.uk/iupac/carot
18. Weeks, O. B.; Andrewes, A. G., *Arch. Biochem. Biophys.* **1970**, 137, 284; C.A. 72, 52018t
19. Moshier, S.E.; Chapman, D. J., Biosynthetic studies on aromatic carotenoids. Biosynthesis of chlorobactene, *Biochem. J.*, **1973**, 136(2), 395-404.
20. Liaaen-Jensen, S., "Selected examples of structure determination of natural carotenoids", *Pure Appl. Chem.* **1969**, 20(4), 421-448.
21. Weedon, B. C. L., *Fortschr. Chem. Org, Naturst.* **1969**, 27, 81, CA. 70; 8799 r.
22. Asai, A; Terasaki, M; Nagao, A., "An epoxide furanoid rearrangement of spinach neoxanthin occurs in the gastrointestinal tract of mice and *in vitro*

- formation and cytostatic activity of neochrome stereoisomers", *J. Nutr.*, **2004**, 134, 2237-2243.
23. Nitche, H., "The structure of vaucherixanthin", *J.Naturforsch*, **1973**, 28(11), 641-645.
 24. Loll, B.; Kern J.; Zouni, A; Saeger, W.; Biesadka, J.; Irrgang, K.D., "The antenna system of photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* at 3,2 Å resolution", *Photosynthesis Res.*, **2005**, 86, 175-784.
 25. Zechmeister, L.; *Cis-trans Isomeric Carotenoids, Vitamins A and Arylpoliene*, Springer Verlag Vienna, **1962**, CA: 57, 17168a.
 26. Patel, J. D., "220 MHz proton nuclear magnetic resonance spectra of retinals", *Nature*, **1969**, 221 (183), 825-828.
 27. Neamțu, G., Ilyes Gh., "Cercetări chemotaxonomice la plante superioare XIV. Pigmenți carotenoidici și clorofilieni din patru specii ale genului *Euphorbica*", *St. cerc. Biochim.* **1980**, 23, 63.
 28. Neamțu, G; Bodea, C., "Pigmenți carotenoidici din plante recoltate din regiuni montane și submontane și subalpine", *St. cerc. biochim.*, **1970**, 13, 59.
 29. Czczuga, B.; Kantvilas, G., "Carotenoids in Lichens from Tasmanian Forests", *Australian J. Bot.*, **1980**, 38(5), 517-522.
 30. Macias-Sánchez, M.D.; Mantell, C.; Rodriguez, M; Martinez de la Ossa, E; Lubian, L.; Montero, O., "Supercritical Fluid Extraction of Carotenoids from *Nannochloropsis Gaditana*", University of Cadiz, 2001, www.aidic.it/venicehp/vhpwebpapers.
 31. *** "HPLC and spectrophotometric analysis of carotenoids from *Haematococcus* algae oleoresin", nov. 2001, www.cyanotech.com
 32. Masojidek, J.; Torzillo, G., Kopecky, J.; Koblížek, M; Nidiaci, L; Komenda, J; Lukavska, A; Sacchi, A. "Changes in Chlorophyll fluorescence quenching and pigment composition in the green alga *Chlorococcum* sp. Grown under nitrogen deficiency and salinity stress", *J. Appl. Phycol.*, **2000**, 12, 417-426.
 33. Kjosén, H; Arpin N.; Jensen, L. S., "Algal carotenoids VI. The carotenoids of *Trentepohlia idithus*. Isolation of -carotene-ol, and -carotene-2,2'-diol", *Acta Chem. Scand*, **1972**, 26, , 3053-3067.
 34. Bjornland, T.; Martinez, M. A., "Carotenoids in red algae", *Phytochemistry*, **1976**, 15, 291.
 35. Liaaen-Jensen, S., "Studies on algal carotenoids", *Pure Appl. Chem.*, **1989**, 61(3), 369-372.
 36. Mamuro, M.; Katoh, T., "Carotenoids in photosynthesis: absorption, transfer and dissipation of light energy", *Pure Appl. Chem.*, **1991**, 63(1), 123-130.
 37. Eonseon, J.; Polle, J.W.; Lee, H.K; Hyun, S.M.; Chang, M., "Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application.", *J. Microbiol. Biotechnol*, **2003**, 13(2), 165-174.
 38. Aasen, A.J.; Liaaen-Jensen, S., "Bacterial carotenoids XXIV", *Acta Chem. Scand.*, **1967**, 21, 2185-2204.
 39. Bodea, C., "Cyclization reactions of carotenoids", *Pure Appl. Chem.*, **1969**, 20, 517,
 40. Pinteá, A.; Bele, C.; Andrei, S.; Socaciu, C., "HPLC analyses of carotenoids in four varieties of *Calendula officinalis* flowers", *Acta Biol. Szegediensis*, **2003**, 47 (1-4): 37-40.

41. Hornero-Mendez, D.; Minguez-Mosquera, M.J., "Isolation and identification of the carotenoid capsolutein from *Caspicum annum* as *Cucurbita xanthin*", *Food Chem.*, **1998**, 46(10), 4087-4090.
42. Gil, M.I.; Tomas-Barberan, F.A.; Hess-Pierce, B.; Kader A.A., "Antioxidant capacity phenolic compounds, carotenoids and vitamin C of nectarine, peach and plum cultivars from California", *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 4976-4982.
43. Sommerburg, O; Keunen, J.E.E.; Bird, A.C.; van Kuijk F.J.G.M., "Fruits and vegetable that are sources of lutein and zeaxanthin: the macular pigment in human eyes", *Brit. J. Ophthalmol.*, **1998**, 82, 907-910.
44. George, B.; Kaur, C.; Kurdiya, D.S.; Kapoor, H.C., "Antioxidants in tomato", *Food Chem.*, **2004**, 84, 45-51.
45. Brooks, J.; Shaw, G., "Identity of sporopollenin with older kerogen and new evidence for the possible source of biological chemicals in sedimentary rocks" *Nature*, **1968**, 220, 678-679.
46. Neamțu, Gh.; Bodea, C. Cercetări chemotaxonomice la plantele superioare", *Șt cerc. Biochim.*, **1970**, 13(4), 405-410.
47. Aasen, A.; Liaaen-Jensen, S. "Fungal Carotenoids II. The Structure of the carotenoid Acid Neurosporaxanthin", *Acta Chem. Scand.*, **1965**, 19, 1843-1853.
48. Hodisan, I.; Pop, I., *Botanica sistematică*, Ed. Didactică și pedagogică, București, 1976, 47.
49. Czeeczuga, B., *Mar. Biol.*, **1970**, 6, 117, CA. 72; 10293 y.
50. Czeeczuga, B.; Czepak, R. *Comp. Biochem. Physiol.*, **1968**, 25, 247, CA. 68, 37107 v.
51. Yamajuchi, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1960**, 33, 1560, CA. 54, 19543d.
52. Czeeczuga, B.; Ktyszejko, B. *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol.* **1977**, 43, 767, CA 87; 130791 r.
53. Matsuno, T.; "New structures of carotenoids in marine animals", *Pure Appl. Chem.*, 1985, 57(5), 659.
54. Armenta-Lopez, R.; Guerrero, I.; Hueria, S., "Astaxanthin extraction from shrimp waste by lactic-fermentation and enzymatic hydrolysis of the Carotenoprotein complex", *J. Food Sci.*, **2002**, 67(3), 1002-1006.
55. Tămaș, V.; Ciuraru, V.; Perju, T., "Carotenoide din insecte. II. Carotenoide din ouă, larve, elitre și insecte de *Phytodecta fornicata Brúgg*", *Șt. Cerc. Biochim.*, **1976**, 19(2), 209-214.
56. Andrewes, A. G., "Animal carotenoids 7. Carotenes of two colour variants of the applied *Macrosiphum lirioidendri* - identification of natural γ , γ - carotene", *Acta Chem. Scand*, **1971**, 25, 3878.
57. Francis, G. W.; Upadhyay, R. P.; Jensen, S. J. "Animal Carotenoids 4. The carotenoids of *Astriarubens* - *Asterinsaur*", *Acta Chem. Scand.*, **1970**, 24, 3050.
58. Koutsos, E.A.; Clifford, A.J.; Calvert, C.C; Klasing, K.C., "Maternal carotenoids status modifies the incorporation of dietary carotenoids into immune tissues of growing chickens (*Gallus, gallus domesticus*)", *J. Nutr.*, **2003**, 133, 1132-1138.
59. Karadas, F.; Grammenidis, E.; Surai, P.; Acamovic, T.; Sparks, N.H.C.; "Effects of carotenoids from Lucerne, marigold and tomato on egg zolk pigmentation and carotenoid composition", *Brit. Poultry Sci.*, **2006**, 47(5), 561-566.

60. Blount, J.D.; Surai, P.F.; Houston, D.C.; Moller, A.P. "Patterns of yolk enrichment with dietary carotenoids: the role of pigment acquisition and utilization", *Functional Ecology*, **2002**, 16, 445-453.
61. Santos-Bocanegra, E.; Ospina-Osario, X.; Oveido-Rondon, E.O.; "Evaluation of xanthophylls extracted from *Tagetes erectus* (Marigold flower) and *Capsicum Sp.* (Red Pepper Paprika) as a pigment for egg-yolks compare with synthetic pigments", *Int. J. Poultry Sci.*, **2004**, 3(11), 685-689.
62. Barua, A.B.; Olson, J.A., "Xanthophyll epoxides, unlike β -carotene monoepoxides, are not detectibly absorbed by humans", *J. Nutr.*, **2001**, 131, 3212-3215.
63. Hata, T.R.; Scholz, T.A.; Ermakov, J.V.; McClane, R.W.; Khachik, F.; Gellermann, W; Pershing, L., "Non-invasive Raman Spectroscopy. Detection of Carotenoids in Human Skin", *The J. Investigative Dermatol.*, **2000**, 115(3), 441-448.
64. Olmedilla, B.; Granada, F.; Gil-Martinez, E.; Blanco, J; Rofas-Hidalgo, E., "Reference values for retinol, to copherol, and main carotenoids in serum of control and insulin-dependent diabetics Spanish subjects", in *Clin. Chem.*, **1997**, 43, 1066-1071.
65. Marova J.; Slovak, B.; Bilkova, H.; Ocenaskova, J.; Cvancarova, P., "Physiologically Significant Carotenoids and their common sources in Czech population", *Chem. Pap.*, **1999**, 53(3), 174-183.
66. Kachik, F.; Beecher, G.; Goli, M.B.; Lusby, W.R., "Separation, identification and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by HPLC", *Pure Apl. Chem.*, **1991**, 63, 71-80.
67. Klavanova, J.; Brtko, J., "Selected retinoids: determination by isocratic normal-phase HPLC", *Endocrine Regulations*, **2002**, 36, 133-137.
68. Ciupercescu-Matache, V., *Vitaminele în industria alimentară*, București, Ed. Tehnică, 1964.
69. Jensen, S.K.; Johannsen, A.K.; Hermansen, J.E., "Quantitative secretion and maximal secretion capacity of retinol, β -carotene and α -tocopherol into cows milk", *J. Dairy Res.*, **1999**, 66(4), 511-522.
70. Macicas, C.; Schweigert, F.J., "Changes in the concentration of carotenoids, vitamin A, alpha-tocopherol and total lipids in human milk, throughout early lactation", *Annals Nutr. & Metab.*, **2001**, 45, 82-85.
71. *** IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). *Nomenclature of Retinoids*, **1981**.
72. Costin, G.M.; Segal, R., *Alimente funcționale*, Ed. Academică, Galați, 58-59, 1999.
73. Tămaș, V. "Biochimie animală", București, Ed. Did. și Ped., 1975.
74. Tee, E.S.; Lin, C.L.; Chong, Y.H., "Carotenoid profile and retinol content in human serum – simultaneous determination by high-pressure liquid chromatography (HPLC)", *Int. J. Food. Sci. Nutr.*, **1994**, 45, 147-157.
75. Zaiyanudin, S.R.; Awang, K., "Abscisic acid (ABA) and the regulation of seeding growth under stress", *J. of Arboriculture*, Jul. **2004**, www.findarticles.com/p/articles/mi_qa4107/is_200407/ai_9445535/pg_4.
76. Karioti, A.; Skaltsa, H.; Lazari, D.; Sakovici, M.; Garcia, B.; Harvala, C., "Secondary metabolites from *centaurea deusta* with antimicrobial activity", *Z. Naturforsch*, **2002**, 57 c, 75-80.
77. Britton, G., "Structure and properties of carotenoids in relation to function", *The FASEB J.*, **1995**, 9, 1551-1558.

78. Haila, K., "Effects of carotenoids and Carotenoi-Tocopherol Interaction on Lipid Oxidation *in vitro* 1) Scavenging of Free Radicals. 2) Formation and Decomposition of Hydroperoxides", (Diss).T-series 1165. University of Helsinki, 1999.
79. Rodriguez Amaya, D. B., *A guide to carotenoid analysis in foods*, OMNI Research, ILSI Press, Washington D.C., 2001.
80. Bodea, C. *Tratat de bicochimie vegetală*, vol I, Ed. Academiei RPR, 548-595 1964.
81. Ito, M.; Yaharo, Y.; Sumiya, S.; Wada, A., "Recent progress in carotenoid and retinoid synthesis", *Pure Appl. Chem.*, **1994**, 66(5), 939-945.
82. Giger, A., "Chemical Synthesis project. A new yellow carotenoid", *Pure Appl. Chem.*, **2002**, 74(8), 1383-1390.
83. Bonnie, Ty,P.; Choo, Y.M., "Oxidation and thermal degradation of carotenoids", *J. Oil Palm Res.*, **1999**, vol. II, No. 1, 62-78.
84. Martin, H.D.; Ruck, C.; Schmidt, M.; Sell, S.; Beutner, S.; Mayer, B.; Walsh, R., "Chemistry of carotenoid oxidation and free radical reactions", *Pure Appl. Chem.*, **1999**, 74(12), 2253-2262.
85. Raț, V.; "Aplicații ale fluidelor supercritice în chimia organică", *Teză de doctorat*, USAMVB Timișoara, 1997.
86. Andras, Cs.; Simándi, B.; Domokos, J.; Rónyai, E.; Prechi, A.; Deak, A.; "Supercritical fluid extraction of hiprose (*Rosa canina L*), pseudo-fruit with carbon-dioxide", Budapest University of Technology and Economics, Department of Chemical Engineering, Budapest, Hungary, 2001, www.aidic.it/venice.hp/vhpwebpaper.
87. Takahashi, H.; Watanabe, H.; Kikkawa, J.; Ota, M.; Watanabe, M.; Sato, Y.; Inomata, H.; Sato, N.; "Carotenoids Extraction from Japanese Persimmon (Hachiyakaki) Peels, by Supercritical CO₂ with Ethanol", *Analyt. Sci.*, **2006**, 22, 1441-1447.
88. Huck, C.W.; Popp, M.; Scherz, H.; Bonn, G.K.; "Development and evaluation of a new method for the determination of the carotenoid content in selected vegetables by HPLC and HPLC-MS-MS", *J. Chromatogr. Sci.*, **2000**, 38, 441-449.
89. Hart, D.J.; Scott, K.J.; "Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of selected vegetables and fruits commonly consumed in the U.K.", *Food Chem.*, **1995**, 54, 101-111.
90. Scott, K.J.; Hart, D.J.; "Further observation on problems, associated with the analysis of carotenoids by HPLC. 2-Column temperature", *Food Chem.*, **1993**, 47, 403-405.
91. Ng, J.H.; Tar, B.; "Analysis of palm oil carotenoids by HPLC with diode-array detection", *J. Chromatogr. Sci.*, **1988**, 26(10). 463-469.
92. Stahl, E.; *Dunnschicht-Chromatographie, ein Laboratoriumshandbuch*, Springer-Verlag Berlin, 1967, 267-270.
93. Mc Cornick, A.; Liaaen-Jensen, S.; "Silylation as a Method for Establishment of Tertiary Hydroxyl Groups in Carotenoids", *Acta Chem. Scand.*, **1966**, 20(7), 1989-2011.
94. Pietrzik, D.J.; Frank, C.W.; "Chimie Analitică", Ed Tehnică, București, 1989.
95. Englert, G.; "NMR of carotenoids- new experimental technique", *Pure Appl. Chem.*, **1985**, 57(5), 801-821.

96. Lutnaes, B.F.; Krave, J.; Liaaen-Jensen, S.; "On the structure of the carotenoid iodine complexes", *Org. Biomol. Chem*, **2004**, 2, 2821-2828.
97. Liaaen-Jensen, S.; "New Structures", *Pure Appl. Chem.*, **1976**, 47, 129-145.
98. Chauton, M.S.; Stokseth, T.R.; Johnsen, G., "High- resolution magic angle spinning ^1H NMR analysis of whole cells of *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). Broad range analysis of metabolic composition and nutritional value", *J. Appl. Phycology*, **2003**, 15(6), 533-542.
99. Martins, D.L.; de A. Epifanio, R.; A New Germacrane Sesquiterpene from the Brazilian Endemic Gorgonian *Phyllogorgia dilatata Esper*", *J. Braz. Chem. Soc.*, **1998**, 9(6), www.scielo.br.
100. Schwieter, U.; Bolliger, H.R.; Chopard-Dit-Jean, L.H.; Euglert, W.; Kofler, M.; Konig, A.; Planta, C.V.; Rüegg, W.V., Isler, O.; "Physical properties of carotenes", *Chimia*, **1965**, 19(5), 294-302.
101. Enzell, C.R.; Francis, C.N.; Liaaen-Jensen, S.; "Mass spectrometric Studies of Carotenoids. 1. Occurrence and Intensity Ratios of M-92 and M-106 Peaks", *Acta Chem. Scand.*, **1968**, 22(3), 1054-1055.
102. Hertzberg, S.; Liaaen-Jensen, S.; "Bacterial Carotenoids. XX. The Carotenoids of *Mycobacterium phlei* strain Vera. 2. The structure of the Phlei-xanthophyls -two Novel Tertiary Glucosides", *Acta Chem. Scand.*, **1967**, 21, 15-41.
103. Tămaş, V.; Sălăjan, Gh.; Bodea, C.; "Efectul polenului de porumb din hrana găinilor asupra pigmentației gălbenuşului de ou", *Şt. Cerc. Biocim.*, **1970**, 13(4), 423-429.
104. Tee, E.S.; Lim, C.L.; "The Carotenoid composition and content of Malaysian vegetables, and fruits by the AOAC and HPLC methods", *Food Chem.*, **1991**, 3, 309-339.
105. Gârban, Z. *Tratat Elementar de Biochimie*, vol. 1, partea 2, Ed. Mirton, Timișoara, 240-242, 1996.
106. Sa, X.; Zhong, L.; Shengheea, Z., "Antioxidative activity and synergistic effect of carotenoids", *International Conference of Agricultural Engeneering*, Beijing, China, IV 80-IV 85, Dec. **1999**.
107. Katsumura, N.; Okuno, M.; Onogi, N.; Moriwaki, H.; Muto, Y.; Kojima, S., "Suppression of mouse skin papilloma by canthaxanthin and beta-carotene *in vivo*: possibility of the regression of tumorigenesis by carotenoids without conversion of retinoic acid", *Nutr. Cancer*, **1996**, 26(2), 203-208.
108. Gordon, H.T.; Bauernfeind, J.C., "Carotenoids as food colorants", *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, **1982**, 18(1), 59-97.
109. Giger, A., "Chemical synthesis project. A new yellow carotenoid", *Pure Appl Chem.*, **2002**, 74(8), 1383-1350.
110. Myers, S., "The carotenoid palette. An array of colors, researched health benefits and formulation challenges highlight the future of carotenoids", *Nat. Prod. Insider*, **2005**, www.naturalproductsinsider.com
111. Bezbradica, D.; Akrabi, J.; Petrovij, S.D.; Iler-Marinkovi, S., "An investigation of influence of solvent on degradation kinetics of carotenoids in oil extracts of *Calendula officinalis*", *J. Serb. Chem. Soc.*, **2005**, 70(1), 115-124.
112. Ezell, B.D.; Wilcox, M.S., "Loss of carotene in fresh vegetables as related to witting and temperature", *J. Agric. Food Chem.*, **1962**, 10, 124-126.

113. Mercadante, A.Z.; Rodriguez-Amaya, D.B., "Effects of ripening cultivar differences and processing on the carotenoid composition of mango", *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, 46, 128-130.
114. Kopas-Lang, L.M.; Warthesen, J.J., "Carotenoid photostability in raw spinach and carrots during cold storage", *J. Food Sci.*, **1995**, 60, 773-776.
115. Biacs, P.A.; Daood, A.G., "Lipoxygenase-catalysed degradation of carotenoids from tomato in presence of antioxidant vitamins", *Biochem Soc. Trans.*, **2000**, 28, 839-845.
116. Izaguirra, O.M.; Miyasaka, A.S., "Causas del color Amarillo de la grasa del canales de bovinos finalizados en pastoreo", *Vet Med.*, **2001**, 32, 1 63-71.
117. Davies, B.H., "Carotenoid metabolism as a preparation for function", *Pure & Appl Chem.*, **1991**, 63(1), 131-140.
118. Bartolotti, G.R.; Negro, J.J.; Surai, P.F.; Prieto, P., "Carotenoids in eggs and plasma of red-legged partridges: Effects of diet and reproductive output", *Physiol. and Biochem. Zool.*, **2003**, 76(3), 367-374.
119. Faur, V.; Goian, M., *Fitoterapie și fitoprotecție alimentară*, Ed. Dacia, Europa Nova, Lugoj, 74-75, **1998**.
120. Safta, M., *Superoxidantii naturali în alimentație și medicină. Secretul sănătății și longevității!*, Ed. Sudura, Timișoara, 2002, 39-46.
121. Havaux, M., "Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts" *Trends in Plant Sci.*, **1998**, 3(4), 147-151.
122. Deming, D.M.; Erdman, J.W. "Mammalian carotenoid absorption and metabolism", in *Pure Appl. Chem.*, **1999**, 71, 12, 2213-2223.
123. George, B.; Kaur, C.; Khurdiya, D.S.; Kapoor, H.C., "Antioxidants in tomato (*Lycopersium esculentum*) as a function of genotype", *Food Chem.*, **2004**, 84, 45-51.
124. Sies, H.; Stahl, W.; „ Vitamins E and C, beta-carotene and other carotenoids as antioxidants", *Am. J. Clin. Nutr.*, **1995**, 62, 1315S-1321S.
125. Huang, D.; Gu, B.; Prior, R.L. „The chemistry behind antioxidant capacity assays", *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 1841-1856.
126. Nälsén, C., *Measurement and Evaluation of Antioxidant Status and Relation on Oxidative Stress in Humans*, Ed. Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala, 2006.
127. Tsao, R.; Akhtar, M.H.; „Nutraceuticals and functional foods: I Current trend in phytochemical antioxidant research", *J. Food Agric. Environ.*, **2005**, 3(1), 10-17.
128. Young, I.S.; Woodside, J.V. „Antioxidant in health and disease", *J. Clin. Pathol.*, **2001**, 54, 176-186
129. Montenegro, M.A.; Nazareno, M.A.; Durantini, E.N.; Borsarelli, C.D., "Singlet molecular oxygen quenching ability of carotenoids a reverse-micelle membrane mimetic system", *Photochem. Photobiol.*, **2002**, 75(4), 353-361.
130. Crăpățureanu, S.; Neamțu, G., "Activitatea carotenoidelor in sistemele biologice", *Șt. Cerc. Biochim.*, **1997**, 40(1-2), 61-79.
131. Krinsky, N.I., "The biological properties of carotenoids", *Pure Appl. Chem.*, **1994**, 66(5), 1003-1010.
132. Op den Camp, R.G.L.; Przyby la, D.; Ochsenein, C; Laboi, C.; Kin, C.; Danon, A.; Wagner, D.; Hideg, E.; Gäbel, C.; Feussner, J.I.; Nater, M; Apel, K. "Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in Arabidopses", *The Plant Cell*, **2003**, 15, 2320-2332.

133. Rokitskaya, T.I.; Block, M.; Antomenko, Y.N.; Kotova, E.A.; Pohl, P., "Photosensitizer binding to lipid bilayers as a precondition for the photoinactivation of membrane channels", *Biophys. J.*, **2000**, 78(5), 2572-2580.
134. Moore, T.A.; Gust, D.; Moore, A.L., "Carotenoids: nature's unique pigments for light and energy processing", *Pure Appl. Chem.*, **1994**, 66(5), 1033-1040.
135. Miki, W., "Biological function and activities of animal carotenoids", *Pure Appl. Chem.*, **1991**, 63(1), 141-146.
136. Heber, D.; Lu, Q-Y.; "Overview of mechanisms of action of lycopene", *Experim. Biol. and Med.*, **2002**, 227, 920-923
137. Khachik, F.; Carcalho, L.; Bernstein, P.S.; Muir, G.J.; Zhao, D.Y.; Katz, N.B., "Chemistry, distribution and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health", *Experim. Biol. and Med.*, **2002**, 227, 845-851.
138. Carughi, A; Hooper, F. "Concentrations before and after supplementation with a carotenoid mixture" New Life Company of America, Fremont, CA, USA, *American J. Clin. Nutr.*, **1994**, 59, 896-899
139. Vaya, J.; Aviram, M., "Nutritional Antioxidants: Mechanism of action, Analysis of Activities and Medical Applications", *Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine & Metabol. Agents*, **2001**, 1(1), 99-107.
140. Bertran, J.S., "The Chemoprevention of cancer by dietary carotenoids: studies in mouse and human cells", *Pure Appl. Chem.*, **1994**, 66(5), 1026-1032.
141. Campbell, J.K.; Canene-adams, K.; Lindshield, B.L.; Boileau, T.W.M.; Clinton, S.K.; Erdman, J.W., "Tomato phytochemicals and Prostate Cancer Risk", *J. Nutr.*, **2004**, 134(12), 34865-34925.
142. Giovannucci, E., "Tomatoes, tomato - based products, lycopene and cancer: review of the epidemiologic literature", *J. of National Cancer Institute*, **1999**, 91(4), 317-331.
143. Schabath, M.B.; Grossman, H.B.; Delclos, G.L.; Hernandez, L.M.; Day, R.S.; Davis, B.R.; Lerner, S.P.; Spitz, M.R.; Wu, X., "Dietary carotenoids and genetic instability modify bladder cancer risk", *J. Nutr.*, **2004**, 134, 3362-3369.
144. Palozza, P.; Serini, S.; DiNiacolo, F.; Boninsegno, A.; Torsello, A.; Maggiano, N.; Ranelletti, F.O.; Wolf, F.C.; Calviello, G.; Cittadini, A., "β-Carotene exacerbates DNA oxidative damage and modifies p 53 related pathways of cell proliferation and apoptosis in cultured cells exposed to tobacco smoke condensate", *Carcinogenesis*, **2004**, 25(8), 1315-1325.
145. Prasad, K.N.; Kumar, A.; Kochupillai, V.; Cole, W.C., "High doses of multiple antioxidant vitamins: essential ingredients in improving the efficacy of standard cancer therapy", *J. of the American Coll. of Nutr.*, **1999**, 18(1), 13-21.
146. Banu, C., *Aditivi și ingrediente pentru industria alimentară*, Ed. Tehnică, București, 1999.
147. Ciulei, I; Grigorescu, E; Stănescu, U., *Plante medicinale. Fitochimie și fitoterapie*, Vol.2, Ed. Medicală, București, 1993, 340-347.
148. Zeb, A., "Important therapeutic uses of sea buckthorn (Hippophae): A review", *J. Biol. Sci.*, **2004**, 4(5), 687-693.
149. *** "Canada: seabuckthorn" in *Bi-weekly Buletin*, **2003**, 16(13), 1-10.

150. Kanga, V., "Novel Active Cosmetic Ingredients", *Happi.com*, iunie **2004**, www.happi.com.
151. Bejot, M., „Beauty through nutrition. A new vision”, *In-Cosmetics*, **2005**, Berlin, www.in-cosmetics.com
152. *** *Capsivit. A new natural paprika carotenoids product (Red pepper, Capsicum Annuum)*, **2005**, www.capsivit.co.il.
153. Moores, S., *Beta-carotene's role in promoting good health*, **2003**, www.cognis.com.
154. Jez, J.M.; Noel, J.P. "A kaleidoscope of carotenoids", *Nature Biotechnol.*, **2000**, 18, 825-826.
155. Veiga-Crespo, P.; Blasco, L.; dos Santos, F.R.; Poza, M; Vlla, T.G., "Influence of culture conditions of *Gordonia jacobaea* MV-26 on canthaxanthin production", *Internat. Microbiol.*, **2005**, 8, 55-58.
156. Sairanen, S., "Beauty through arctic berries", *Virtual Finland*, Apr. **2005**, <http://virtual.finland.fi>.
157. Quirin, K.W. "Herbal CO₂ extracts for skin care cosmetics", *Business Briefing: Global Cosmetics Manufacturing*, **2004**, www.touchbriefings.com.
158. Bezbradica, D.; Milić- Aškračić, J.; Petrović, S.D.; Šiler- Marinković, S.; „An investigation of influence of solvent on the degradation kinetics of carotenoids in oil extracts of *Calendula officinalis*„, *J. Serb. Chem. Soc.*, **2005**, 70(1), 115-124.
159. Siong, T.E. „ The medical importance and carotenoids (with particular reference to developing countries) and their determination”, *Mal. J. Nutr.*, **1995**, 1, 179-230.
160. Gross, J.; Budovsky, P., „Conversion of carotenoids to 3-dehidro-retinol (vitamin A₂) in the mouse”, *Nature*, **1965**, 206, 1254-1259.
161. *** *The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Vitamin A*, EMEA, **2001**, www.emea.eu.int.
162. *** *Requirements of vitamin A, thiamine and niacin. FAO/WHO report*, Ser. No. 41, 1967.
163. Banu, C.; Preda, N.; Vasu, S.S., *Produsele alimentare și inocuitatea lor*, Ed. Tehnică, București, 1982, 54-55.
164. Valnet, J., *Tratamentul bolilor prin legume, fructe și cereale*, Ed. Ceres, București, 1987, 19.
165. Nagao, A.; „Oxidative conversion of carotenoids to retinoids and other products”, *J. Nutr.*, **2004**, 134, 237S-240S.
166. Olson, J.A., „Absorbtion, transport and metabolism of carotenoids in humans”, *Pure and Appl. Chem.*, **1994**, 66(5), 1011-1016.
167. Dumitru, J.F., *Biochimie*, Ed. Did. și Ped., București, 1980, 744.
168. Ponsano, E.H.G.; Pinto, M.F.; Garcia-Neto, M.; Lacava, P.M., „Performance and color of broilers fed diets containing *Rhodocyclus gelatinosus* biomass”, *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, **2004**, 6(4), www.scielo.br.
169. Seo, J.S.; Burri, B.J.; Quan, Z.; Neidhlinger, T. „Extraction and chromatography of carotenoids from pumpkin”, *Journal of Chromatography*, **2005**, A, 1073, 371-375.
170. Ambrogi, A.; Cardarelli, D.A.; Eggers, R. "Separation of natural colorants using a combined high pressure extraction adsorbtion process", *Lat. An. Appl. Res.*, **2003**, 33, 3.
171. Rozzi, N.L.; Singh, R.K.; Vierling, R.a.; Watkins, B.A. "Supercritical fluid extraction of lycopene from tomato processing byproducts", *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 2638-2643.

172. Nassar, N.; Vizzotto, C.S.; da Silva, H.L.; Schwartz, C.A.; Pires, O.R.jr. "Potentiality of cassava cultivars a source of carotenoids", *J. Food Agric. Environ*, **2005**, 3(3&4), 33-35.
173. Dutta, D.; Chauchuri, U.R.; Chakraborty, R. "Structure health benefits, antioxidant property and processing and storage of carotenoids", *African J. Biotechnol.*, **2005**, 4(13), 1510-1520.
174. Beutner, S.; Bloedorn, B.; Frixel, S.; Blanco, J.H.; Hoffmann, T.; Martin, H-D.; Mayer, B.; Noack, P.; Ruck, C.; Schmidt, M.; Schülke, J.; Sell, S.; Ernst, H.; Harenza, S.; Seybold, T.; Sies, H.; Stahl, W.; Walsh, R. "Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of β -carotene in antioxidant functions", *J. Sci. Food Agric.*, **2001**, 81, 559-568.
175. Paiva, S.A.R.; Russel, R. M. „ β -Carotene and other carotenoids as antioxidants", *J. Am. Coll. Nutr.*, **1999**, 18(5), 426-433.
176. Mozaffarieh, M.; Sacu, S.; Wedrich, A. "The role of the carotenoids, lutein and zeaxanthin, in protecting against age-related macular degradation: A review based on controversial evidence", *Nutr. J.*, **2003**, 2, www.nutritionj.com.
177. Moeller, S.M.; Jacques, P.F.; Blumberg, J.B. "The potential role of dietary xanthophylls in cataract and age-related macular degradation", *J. Am. Coll. Nutr.*, **2000**, 19(90005), 522S-527S.
178. The Alpha Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group, "The effect of vitamin E and beta-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers", *N. Engl. J. Med.*, **1994**, 330, 1029-1035.
179. Frank, H.A., Josue, J.S.; Bautista, J.A.; van der Hoef, J.; Jansen, F.J.; Lugtenburg, J.; Wiederrecht, H.; Christensen, R.L. "Spectroscopic and photochemical properties of open-chain carotenoids", *J. Phys. Chem.*, **2002**, B 106(8), 2083-2092.
180. Chew, B.P.; Park, J.S. "Carotenoid action on the immune response", *J. Nutr.*, **2004**, 134, 257S-261S.
181. Zeb, A.; Memood, S. "Carotenoids contents from various sources and their potential health applications", *Pakistan J. Nutr.*, **2004**, 3(3), 199-204.
182. Subczynski, W. K.; Wisniewska, A., "Physical properties of lipid bilayers membranes: relevance to membrane biological function", *Acta Biochimica Polonica*, **2003**, 47(3), 613-625.
183. Rao, A.V.; Agarwal, S. "Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease" *J. Am. Coll. Nutr.*, **2006**, 19 (5), 563-569.
184. Suwalsy, M.; Hidalgo, P.; Strzalka, K.; KostECKA-Gugale, A. "Comparative X-ray studies on the interaction of carotenoids with a model phosphatidylcholine membrane" , *Z. Naturfosch*, **2002**, 57c, 129-134.
185. Jianu, I.; **Dumbravă, D.** "Extracte și aditivi agroalimentari", Ed. Eurobit, Timișoara, 1997.
186. Jianu, I.; **Dumbravă, D.** „Factori de protecție alimentari", Ed. Mirton, Timișoara, 2001.
187. Nistor. M.; Rusănescu, N.; Alexa, E.; **Dumbravă, D.**; Ianculov, I. „The technology of obtaining the extracts from weath, barley, rye and maize" Simpozion *SIPA Oportunities of Integrates Systems for Agrofood Production*, **1999**, 135-139.

188. **Dumbravă, D.**; Butnariu, M.; Ianculov, I. "Procedura de obținere a vitminei C totale din plante", *Lucrările celui de-al IV-lea Simpozion Internațional Cercetarea Multidisciplinară Regională*, 16-18 nov. **2000**, Timișoara, 673-675.
189. Butnariu, M.; **Dumbravă, D.**; Ianulov, I.; Putin A. "Compoziții medicamentoase cu extracte din plante", *Lucrările celui de-al IV-lea Simpozion Internațional Cercetarea Multidisciplinară Regională*, 16-18 nov. **2000**, Timișoara, 276-278.
190. Ianculov, I.; Goian, M.; **Dumbravă, D.**; Butnariu, M. "The obtaining and determination of proteins with selenium from white cabbage" – Simpozionul Internațional *The biological essentiality of macro- and trace elements*, 1-2 dec, **2000**, Jena, Germania, 847-853.
191. Ianculov, I.; Goian, M.; Bumb, G.; Butnariu, M.; **Dumbravă, D.**; Filimon, M.; Mucete D. "A colourimetric method for determination of vitamin U", *Annals of West University of Timișoara, Series Chemistry*, **2002**, 10 (2), 807-812.
192. Ianculov, I.; Goian, M.; **Dumbravă, D.**; Butnariu, M. "Separarea cromatografică a alcaloizilor" – *Lucrările celui de-al IV-lea Simpozion Internațional Tinerii și Cercetarea Multidisciplinară Romania-Jugoslavia-Ungaria*, 14-15 nov., **2002** Timișoara, 482-485.
193. Ianculov, I.; Gergen, I.; Palicica, R.; Butnariu, M.; **Dumbravă, D.**; Gabor, L. "**Determinarea alcaloizilor totali din Atropa belladonna și Lupinus spp. Prin metode spectrofotometrice și gravimetrice**", *Revista de Chimie*, **2004**, 55(11), 835-838.
194. Ianculov, I.; Palicica, R.; Butnariu, M.; **Dumbravă, D.**; Gergen, I. "**Obținerea în stare cristalină a clorofilei din cetina de brad (Abies alba) și de pin (Pinus sylvestry)**", *Revista de chimie*, **2005**, 56(4), 441-443.
195. Palicica, R.; Ianculov, I.; Moisuc, A.; Butnariu, M.; Gergen, I.; **Dumbravă, D.**; Widmann, N. "**Procédé d'obtention d'un complexe bioactif de matières végétales**", *Salon Mondial de l'Innovation de la Recherche et des Nouvelles Technologies – Eureka!*, Brussels, 19.11.2005, **Medalie de aur.**
196. Ianculov, I.; Putin, A.; Palicica, R.; Moisuc, A.; Wiedmann, N.; Butnariu, M.; Gergen, I.; **Dumbravă, D.** "**Compositions médicamenteuses aux extraits de plantes**", *Salon Mondial de l'Innovation de la Recherche et des Nouvelles Technologies- Eureka!*, Brussels, 19.11.2005, **Medalie de aur.**
197. **Dumbravă, D.**; Ianculov, I.; Lupea, A-X. "Izolarea și dozarea carotenoidelor din făină de porumb (Zea mays)", *Lucrările celui de-al IV-lea Simpozion Internațional Tinerii și Cercetarea Multidisciplinară Romania-Jugoslavia-Ungaria*, 14-15 nov., **2002**, Timișoara, Ed. Sudura, 452-458.
198. **Dumbravă, D.**; Ianculov, I.; Butnariu, M. "Extraction and measurement of β -carotene from Calendula officinalis flowers" – *Cercetări științifice Procese și Tehnologii agroalimentare*, **2004**, vol X, nr. 2, Ed. Agroprint, Timișoara, 271-275.
199. **Dumbravă, D.**; Ghiulai, M.; Ianculov, I.; Raba, D. "Measurement of β -carotene from fruit kernels oils" – *Cercetări științifice Procese și Tehnologii agroalimentare*, **2004**, vol X, nr. 2, Ed. Agroprint, Timișoara, 276-279.

200. **Dumbravaă, D.**; Matiuți, M.; Drugă, M.; Lupea, A. X.; Ianculov, I.; Clep, C. "Effect of seabuckthorn berry flour from hens food on egg yolk carotenoidic pigments content" - *8th International Symposium Intedisciplinary Regional Research Hungary - Romania - Serbia and Montenegro* - Szeged, 19-21 apr. **2005**.
201. **Dumbravă, D.G.**; Bogdan, F.; Ianculov, I.; Clep, C.; Istodor, P. "Obtaining and dermatological utilization of a maize carotenoidic extract" - *Cercetări Științifice Procese și tehnologii agroalimentare*, **2005**, vol. XI, nr. 2, 425-428.
202. **Dumbravă, D.G.**; Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.; Lupea A.X.; Clep, C. "Identification and determination of β -carotene concentration from seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berry flour and celandine stens (*Chelidonium majus*) by HPLC", *Analele Universității din Craiova*, **2005**, vol. X (XLVI), 307-310.
203. Bogdan, F., **Dumbravă, D.**; Istodor, P, Solovan, C, Lupea A.X. "The efficiency of a maize carotenoidic extract ointment on skin diseases", *EADV 14th Congress*, London, **2005**, poster no. P08.83.
204. **Dumbravă, D.G.**; Lupea A.X.; Hădărugă, N.G.; Ianculov, I.; Clep, C. "Obținerea și analiza HPLC a unui extract carotenoidic din fructe de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*) cu utilizare dermatologică" - *Societatea Română a Horticultorilor - lucrările Științifice*, **2006**, anul XLVII, vol. I (49), Seria Horticultură, Ed. Ion Ionescu de la Brad, Iași, 415-420.
205. **Dumbravă, D.**; Ianculov, I.; Palicica, R.; Moisuc, A.; Butnariu, M. "**Onguent thérapeutique à extrait carotenoidique de maïs**", *Gold Medal, Salon international des Inventions, Geneve*, 7 apr, **2006**.
206. Palicica, R.; Ianculov, I; Moisuc, A.; Butnariu, M.; **Dumbravă, D.**; Widmann, N.; Gegen, I. **Societatea Inventatorilor din România - Diploma de excelență cu medalia „Inventica 2006”** - *Salonul Internațional al Invențiilor Științifice și Transferului Tehnologic*, ediția a XII-a, 5-9 iulie, **2006**, România.
207. Pârvu, C. „Enciclopedia Plantelor. Plante din flora României”, vol. IV, Ed. Tehnică, București, 2005.
208. *** „Maize in human nutrition”, FAO Corporate Document Repository, No. 25, 1992, www.fao.org/documents.
209. Pârvu, C. "Universul plantelor. Mică Enciclopedie", Ed. Enciclopedică, București, 1997, 109-110.
210. Neamțu, G.; Illyes, Gh.; Lászlo, T., "Cercetări chemotaxonomice la plante superioare. XIII. Pigmenți carotenoidici și clorofilieni din *Chelidonium majus* L" *Studii și cercetări de biochimie*, **1979**, 22(2), 175-179.
211. Husic, I.; Trifunovic, S.; Rosulj, M.; Filipovic, M.; „Genetic divergence of maize hybrids at the final stage of evaluation", *Plant Breed. and Seed Prod.*, **1999**, 6(1-2), 25-33.
212. Brikić, M.; Kovacević, S.; "Damaged seed of maize at shelling of ear with different moisture content", *Plant Breed. and Seed Prod.*, **1999**, 6(1-2), 79-83.
213. Institutul de Stat pentru Testarea și Înregistrarea Soiurilor, România, *Catalogul Oficial al soiurilor de plante de cultură din România, pe anul 2006*.
214. Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale, *Resurse de produse agricole-producția internă. Date generale despre produs. Porumbul*, 20.01.2005.

215. Neamțu, G.; Căbulea, I.; Tăbăcaru, C.; Socaciu, C.; Crăpătoreanu, S.; „Carotenoid pigments from different genotypes of maize kernels”, *Rev. Roum. Biochim.*, **1993**, 30(3-4), 127-132.
216. Medeleanu, M.; Milea, M.; *Metode spectroscopice în chimia organică*, Univ. Politehnica Timișoara, 1998.
217. *** „Fruits and fruit products”, Official Methods of Analysis of AOAC International, Cunniff, P. (Ed.), AOAC International Gaithersburg, 1998, p. 29.
218. Vogel, A., *Vogel's textbook of quantitative chemical analysis*, Pearson Education Ltd, Essex, 2000.
219. Esbensen, K.; Schonkopf, S.; Midtgaard, T., *Multivariate Analysis in Practice*, CAMO Computer-AIDED Modeling AS, Trendheim, 1996.
220. Gordon, A.D., *Classification Methods for the Exploratory Analysis of Multivariate Data*, Chapman&Hall, London-New York, 1981.
221. Kurunczi, L., *Proiectarea Medicamentelor Asistată de Computer. QSAR-Relații Cantitative Structură-Activitate*, Lito UMF, Timișoara, 1998.
222. Livingstone, D.J., „Quantitative Structure-Activity Relationships. Corelation and Similarity Methods”, *Analytical Proc. Including Analytical Communications*, **1994**, 31, 107-108.
223. Van der Waterbeend, H.; Kansy, M.; Livingstone, D.J.; Blankley, C.J.; Lajiness, M.S.; *Structure-Property Correlations in Drug Research*, Academic Press, Ltd, San Diego, 1996.
224. *** *Food authenticity. Issues and Methodologies*, Eurofins Scientific, Nantes, 1998.
225. Dijksterhuis, G., „Multivariate Data Analysis in Sensory and Consumer Science: An Overview of Developments”, *Trends Food Sci&Technol*, **1995**, 6, 206-211.
226. Meilgard, M.; Civille, G.V.; Carr, B.T., *Sensory Evaluation Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton – Ann Arbor-Boston-London, 1991.
227. Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Negrea, P.; Alexa, E.C.; Ciopec, M.P., „The quality of parsley (*Petroselinum sativum Hoffm*) from the West side of Romania”. *Proceedings of the 5th International Symposium Young People and the Multidisciplinary Research – Timișoara*, **2003**, 502-509.
228. Hădărugă, N.G.; Mișcă, C.D.; Drugă, M.; Hădărugă, D.I. „Sensory evaluation of yoghurt products and multivariate analysis of the data” – *Proceedings of the 3th International Symposium Young People and the Multidisciplinary Research – Timișoara*, **2001**, 203-208.
229. Page, S.W., „Patern recognition methods for the determination of food composition”, *Food Technology*, **1986**, 40, 104-109.
230. Sahni, N.S.; Isakkson, T.; Nacs, T.; „The use of Experimental Design Methodology and Multivariate Analysis to Determine Critical Control Points in a Process”, *Chimometric& Intelligent Lab. Syst.*, **2001**, 56, 105-121.
231. Wyrzykowska, B.; Szymezyk, K.; Ichichaschi, H.; Falandysz, I.; Skwarzec, B.; Yamasaki, S.I., „Application of ICP Sector Field MS and Principal Component analysis for Studying Interdependences among 23 Trace Elements in Polish Beers”, *J. Agric. Food. Chem.*, **2001**, 49, 3425-3431.
232. NCCLS (National Commitee for Clinical Laboratory Standards), 1997, „Performance standards for antimicrobial susceptibility test „ (6th ed.), Wayne, P.A.; Approved Standards, M2-A6.
233. Tepe, B.; Donmez, E.; Unlu, M.; Candon, F.; Daferere, D.; Vardor-Unlu, G.; Polissiou, M.; Sokmen, A., „Antimicrobial and antioxidative activities

- of the essential oils menthol extracts of *Salvia criptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl.)", *Food Chem*, **2004**, 84, 519-525.
234. Popovici, A., *Unguente farmaceutice*, Ed. Medicală, București, 1992.
235. Ionescu, S.; Ciocănelea, V.; Adam, L.; Ban, L.; Rub Saidac, A.; Georgescu, E.; Savopol, E.; *Tehnica farmaceutică*, Ediția a II-a revizuită, Ed. Didactică și pedagogică, București, 1974, 444-447.
236. Stănescu, V. *Tehnica farmaceutică*, Ed. Medicală, București, 1983.
- 237. Dumbravă, D.**; Ianculov, I.; Palicica, R.; Moisuc, A.; Butnariu, M.; **„Unguent terapeutic pe bază de extract carotenoidic din boabe de porumb (*Zea mays*) și procedeu de obținere a acestuia”, Cerere de brevet de invenție OSIM, nr. A/01028, 14.12.2005.**
- 238. Dumbravă, D.-G.**; Lupea, A.-X.; Ianculov, I.; Palicica, R.-D.; Moisuc, A.; Butnariu, M.; **„Procedeu de obținere a unui unguent terapeutic pe bază de extract carotenoidic din fructe de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*)”, Cerere de brevet de invenție OSIM, nr. A/00300, 10.05.2006.**
- 239.** Colo, S.M.; Herh, P.K.W.; Roye, N.; Larsson, M.; „Rheology and the texture of pharmaceutical and cosmetic semisolids”, *American Laboratory*, Nov. **2004**.
- 240.** Leucuța, S.; *Tehnologie farmaceutică industrială*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 2001.
241. Mezger, T.Z., *The Rheology Handbook*, Curt R. Vincentz Verlag, Hannover, 2002.
242. Ferguson, J.; Kemblowski, Z., *Applied fluid rheology*, Elsevier Applied Science, London, 1991.
243. Korhonen, M.; *Rheological properties of pharmaceutical creams containing sorbitan fatty ester surfactants*, Accademic Dissertation, Helsinki, 2003.
244. Pârvu, C., *Universul plantelor. Mică enciclopedie*, Ed. Enciclopedică București, 1997.
245. Barua, A.B., „Intestinal absorption of epoxy- β -carotenes by humans”, *Biochem. J.*, **1999**, 339, 359-362.
246. Jodłowska, S.; Latala, A.; „Simultaneous separation of chlorophylls and carotenoids by RP-HPLC in some algae and cyanobacteria from the Southern Baltic”, *Oceanological and Hydrological Studies*, **2003**, Vol XXXII, No. 2, 81-89.
247. Tee, E.S.; Goh, A.H.; Khor, S.C.; „Carotenoid composition and content of legumes, tubers and starchy roots by HPLC”, *Mal. J. Nutr.*, **1995**, 1, 63-74.
248. *** „Identification and quantification of trace carotenoids contained within a commercial marigold extract product, corn gluten meal and alfalfa meal”, **2000**, www.kwmin.co.
249. Pfander, H.; Riesen, R.; Niggli, U., „HPLC and SFC of carotenoids – scope and limitations”, *Pure Appl. Chem*, **1994**, 66(5), 947-954.
250. Khachik, F.; Beecher, G.R.; Goli, M.B.; „Separation, identification and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography”, *Pure Appl. Chem.*, **1991**, 63(1), 71-80.
251. Howe, J.A.; Tanumihardjo, S.A. „Carotenoid-Biofortified Maize Maintains Adequate Vitamin A Status in Mongolian Gerbils”, *J. Nutr.*, **2006**, 136, 2562-2567.

252. Howe, J.A.; Tanumihardjo, S.A. "Evaluation of Analytical Methods for Carotenoids Extraction from Biofortified Maize (*Zea Mais* sp.)", *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54(21), 7992-7997.
253. Zeb. A.; „Important therapeutic uses of seabuckthorn (*Hippophae*) : A review", *J. Biol. Sci*, **2004**, 4(5), 687-693.
254. Lobatheva, I.I.; Letchamo, W.; Huszar, I.; Muchortoo, S.A.; Malkova, N.N.; Panteleeva, E.I. *Trends in new crops and new uses*, J. Janick&A. Whipkey (eds.), ASHS Press, Alexandria, VA, 2002, 402-404.
255. Dharmanadara, S.; "Sea Buckthorn", **2004**, www.itmoline.org/arts/seabuckthorn.htm.
256. Kato, M.; Ikoma, Y.; Matsumoto, H.; Sugiura, M.; Hiodo, H.; Yano, M.; "Accumulation of Carotenoids and Expression of Carotenoid Biosynthetic Genes during Maturation in Citrus Fruit", *Plant Physiol.*, **2004**, 134, 824-837.
257. Rodrigo, M.J.; Marcos, J.F.; Alferez, F.; Mallent, M.D.; Zacarias, L.J.; Characterization of Pinalate, a novel *Citrus sinensis* mutant with a fruit specific alteration than results in yellow pigmentation and decreased ABA content", *Experim. Bot.*, **2003**, 50 (383), 727-738.
258. Jukić, M.; Milos, M.; "Catalytic Oxidation and Antioxidant Properties of Thyme Essential Oils (*Thymus vulgaris* L)", *Croatica Chemica Acta*, CCACAA, **2005**, 78(1), 105-110.
259. Elviña, R.O.Jr.; Mojica, E.-R, E.; "Orange Peel Essential Oil as Component of a Metal Sensor for Lead (II). Ion determination in Aqueous Solutions", *J Appl. Sci. & Envirom. Management*, **2005**, 9(2), 23-27.
260. "Essential Oil Info ", www.essentialoilinfo.com.
261. Saragea, M.; *Fiziopatologie*, vol I și II, Ed. Academiei, București, 1982.
262. Valnet, J.; *Tratamentul bolilor prin legume, fructe și cereale*, Ed. Ceres, București, 1987.
263. Mogoș, T.V.; *Sănătatea și substanțele minerale*, Ed. Albatros, București, 1991.
264. Mogoș, T.V.; *Vitamino-mileralo-terapia*, Ed. Militară, București, 1992.
265. Ordinul Ministerului Sănătății, nr. 975/1998, „Limite maxime admise de arsen și metale grele în alimente”.
266. Ordinul Ministerului Agriculturii Alimentației și Pădurilor, 223, reactualizat. Monitorul Oficial al României, 598/13 aug. 2002.
267. Largo, G.; Rideout, J.A.; Ragasa, C.Y.; „A bioactive carotenoid from *Mimosa -invisia*”, *P.J.S.*, **1997**, 126, 1, www.stii.dost.gov.ph/pjsweb/data/mimosa-invisia.htm.
268. Ragasa, C.Y.; Nacpil, Z.D.; Peñalosa, B.A.; Coll, J.C.; Rideout, J.C.; "Antimutagen and antifungal comounds from *Cosmos caudatus*" *P.J.S.*, **1997**, 126, 3, www.stii.dost.gov.ph/pjsweb/data/cosmos-caudatus.htm.
269. **Dumbravă, D.**; Ianculov, I.; Palicica, R.; Moisuc, A.; Butnariu M.; „**Procedure for obtaining of a therapeutic ointment based on an carotenoidic extract from maize grains (*Zea mays*)**”, *Genius-Budapest International Inventions*, **Genius Gold Medal**, 11 sept. **2006**.
270. **Dumbravă, D.**; Ianculov, I.; Palicica, R.; Moisuc, A.; Butnariu, M.; „**Procedeu de obținere a unui unguent terapeuic pe bază de extract carotenoidic din boabe de porumb (*Zea mays*)**”, *Medalie de bronz*, *Salonul Internațional de Invenții și Tehnologii Noi- INVENTIKA*, București, 3-7 octombrie **2006**.

271. **Dumbravă D.**, Ianculov, I; Palicica, R.; Moisuc, A.; Butnariu, M; „**Procedeu de obținere a unui unguent terapeutic pe bază de extract carotenoidic din boabe de porumb (*Zea mays*)**”, **Medalie de aur și Premiul Special al Juriului**, ARCA Međunarodna Izoložba Inovacija Proizoda i Tehnologija, Zagreb, 19-24 sept. **2006**.
272. **Dumbravă D.**, Ianculov, I; Palicica, R.; Moisuc, A.; Butnariu, M; „**Therapy ointment with carotenoidic from maize beans**”, **Gold Medal**, 55^{eme} Salon Mondial de l’Inovation, de la Recherche et des Nouvelles Technologies- Eureka!, Brussels, **2006**.
273. **Dumbravă, D.**; Lupea A.X.; Ianculov, I; Palicica R.; Moisuc A.; Butnariu M.; „**Procedeu de obținere a unui unguent terapeutic pe bază de extract carotenoidic din fructe de cătină albă (*hipopphae rhamnoides*)**”, **Medalie de bronz**, Salonul Internațional de Invenții și Tehnologii Noi- INVENTIKA, București, 3-7 octombrie **2006**.
274. **Dumbravă, D.**; Lupea A.X.; Ianculov, I; Palicica R.; Moisuc A.; Butnariu M.; „**Procedure to obtain a therapeutic based on an carotenoidic extract from *hipopphae rhamnoides***”, **Silver Medal**, 55^{eme} Salon Mondial de l’Inovation, de la Recherche et des Nouvelles Technologies- Eureka!, Brussels, **2006**.
275. **Dumbravă, D.**; Lupea A.X.; Ianculov, I; Palicica R.; Moisuc A.; Butnariu, M.; „**Procédé d’obtention d’un onguent thérapeutique**”, **Silver Medal**, Salon International des Inventions, Genève, **2007**.
276. Hădărugă, D.I.; Hădărugă, N.G.; Resiga, D.; Pode, V.; Lupea A.X.; **Dumbravă, D.**; „**Obtaining and characterization of sage (*Salvia Sclarea L.*) essential oil/ β -cyclodextrin supramolecular system**”, *Rev. Chim.* **2007**, 58(6), 566-573.
277. Leeson, S.; Caston, L.; „Enrichment of eggs with lutein”, *Poultry Sci.*, **2004**, 83, 1709-1712.
278. Hernández H.M.; Seehawer, J.; Hamelin, C.; Bruni, M.; Wakeman, W.; *Egg quality. The European consumer`s perception*, Roche Vitamins Europe Ltd, 1999.
279. Hasin, B.M.; Ferdaus, A.J.M.; Islam, M.A.; Uddin, M.J.; Islam, M.S.; „Marigold and orange skin as egg yolk color promoting agents”, *Int. J. Poultry Sci.*, **2006**, 5(10), 979-987.
280. SR 3665:1999. Iaurt. Condiții tehnice de calitate. Institutul Român de Standardizare, București, 1999.
281. SR 6345 :1995. Lapte și produse lactate. Analiza senzorială. Institutul Român de Standardizare, București, 1995.
282. **Dumbravă, D.G.**; Lupea, A.X.; Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Gruia, A.; Tatu, C.; Păunescu, V.; Riviș A.; „**Antioxidant activity of some celandine (*Chelidonium majus*) carotenoidic extracts**”, *Chem. Pap.*, **2007**, nr. înregistrare #204/07- in press.
283. **Dumbravă, D.G.**; Lupea, A.X.; Hădărugă, N.G.; Ianculov, I.; Moldovan, C.; „RP-HPLC determination of β -carotene from three maize hybrids”, *Lucrări Științifice. Seria Agronomie*, Ed. Ion-Ionescu de la Brad, Iași, **2007**, 50, volum electronic.
284. **Dumbravă, D.G.**; Lupea, A.X.; Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.; Nichita, I.; „RP-HPLC determination of β -carotene from orange (*Citrus sinensis L.*) fruits”, *Scientific and Technical Bulletin, Series Chemistry, Food Science & Engineering*, **2007**, Year XIII, vol. 12 (confirmare de acceptare nr. 1682, 07.11.2007).

ANEXA 1.

Tabelul A.1.1.

Conținutul de carotenoide totale din probele luate în studiu, determinat prin metoda spectrofotometrică

| Nr. crt. | Materialul analizat | Absorbanța $A_{450\text{ nm}}$ | Conținutul de carotenoide Totale ($\mu\text{g/g}$ material) |
|----------|--------------------------------|--------------------------------|--|
| 1. | Făină porumb <i>NSSK444</i> | 3,4138 | 1109,00 |
| 2. | Făină porumb <i>NSSK640</i> | 4,1407 | 614,40 |
| 3. | Făină porumb <i>Lovrin 400</i> | 2,1807 | 327,10 |
| 4. | Făină porumb <i>Laureat</i> | 3,7841 | 898,40 |
| 5. | Făină porumb <i>NSSK420</i> | 2,1817 | 420,80 |
| 6. | Făină porumb <i>Florența</i> | 4,3256 | 417,20 |
| 7. | Fructe cătină <i>Delta 1</i> | 4,0159 | 923,55 |
| 8. | Fructe cătină <i>Ciumași</i> | 4,0160 | 929,60 |
| 9. | Flori gălbenele uscate | 4,2150 | 1626,40 |
| 10. | Pulpă piersică | 3,8398 | 237,00 |
| 11. | Pericarp piersică | 4,1407 | 479,20 |
| 12. | Pulpă portocală | 0,5515 | 84,00 |
| 13. | Flavedo portocală | 3,9785 | 270,84 |
| 14. | Albedo portocală | 1,6864 | 205,40 |
| 15. | Tulpină rostopască | 4,1924 | 1078,20 |
| 16. | Frunze rostopască | 3,9105 | 965,50 |
| 17. | Flori rostopască | 4,1803 | 1460,80 |
| 18. | Rădăcină rostopască | 2,6178 | 403,90 |

ANEXA 2.

Spectrele de absorbție în vizibil pentru extractele carotenoidice în prezența soluției de DPPH 0,1 mM

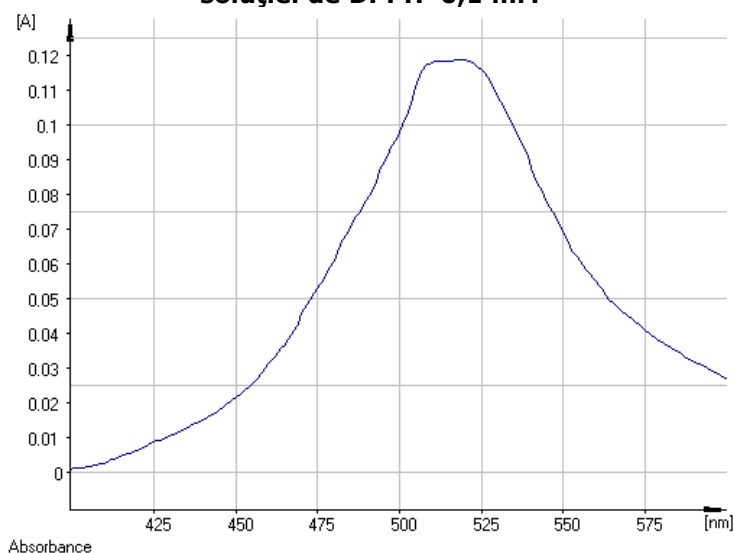


Figura A.2.1.- Spectrul de absorbție pentru extractul carotenoidic din porumb hibridul Lovrin 400

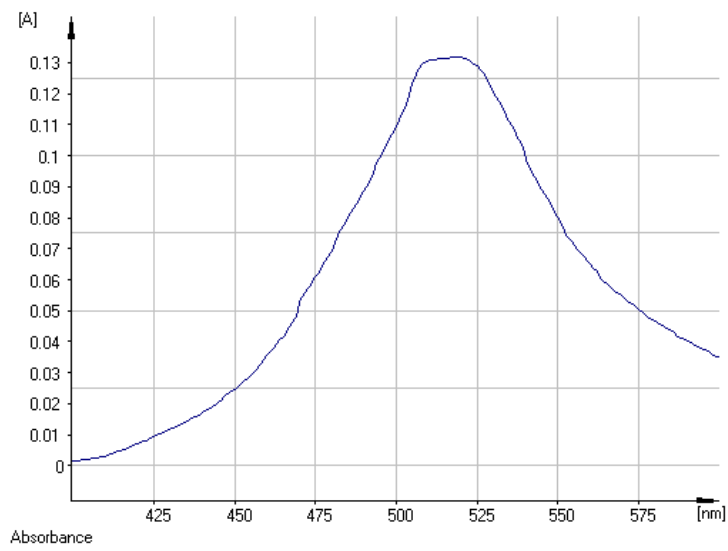


Figura A.2.2.- Spectrul de absorbție pentru extractul carotenoidic din porumb hibridul NSSK444

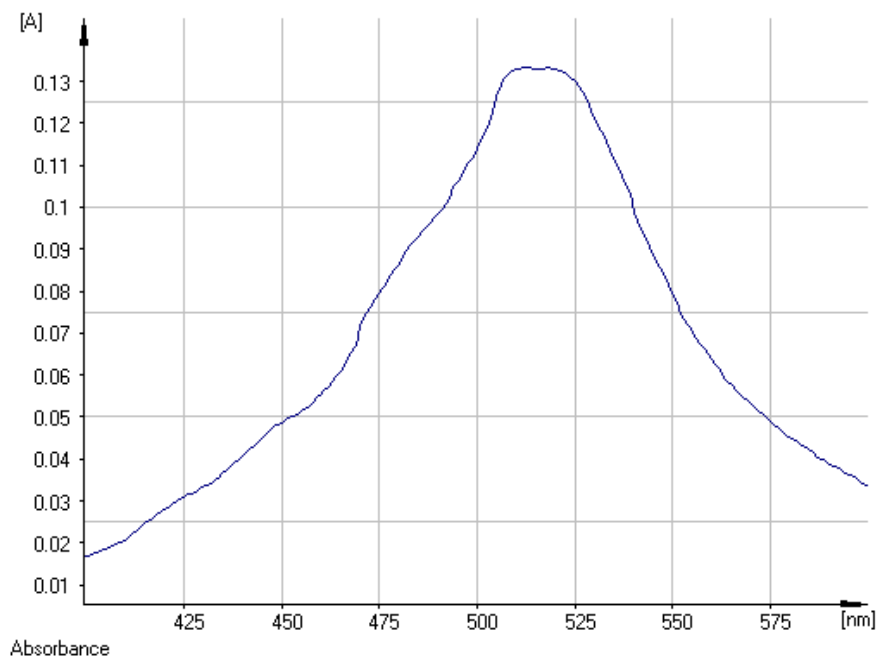


Figura A.2.3.- Spectrul de absorbție pentru extractul carotenoidic din porumb hibridul NSSK640

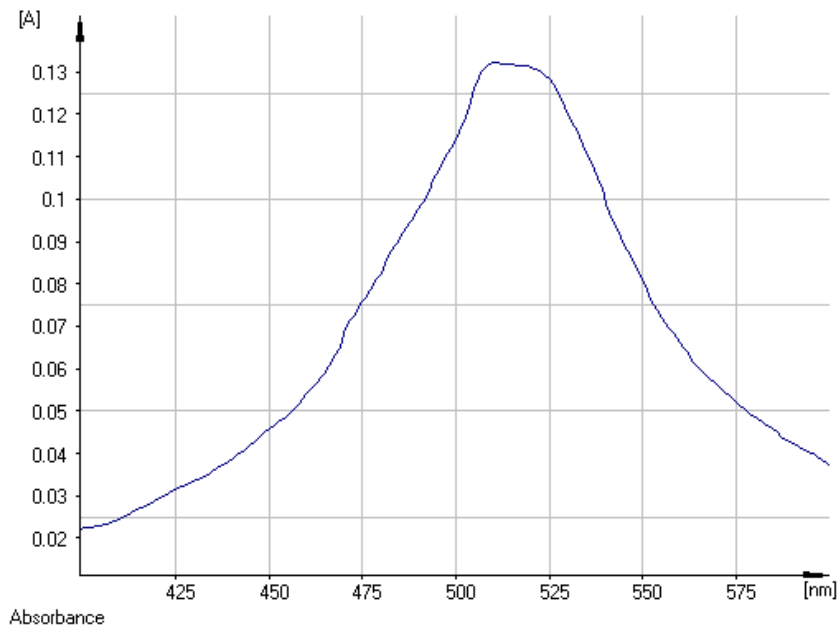


Figura A.2.4.- Spectrul de absorbție pentru extractul carotenoidic din cătină albă soiul Delta 1

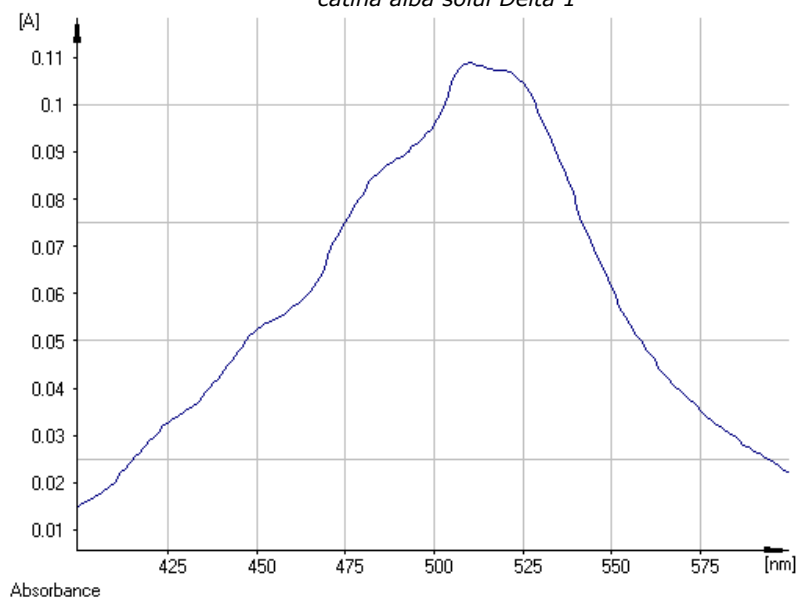


Figura A.2.5.- Spectrul de absorbție pentru extractul carotenoidic din cătină albă soiul Ciumași

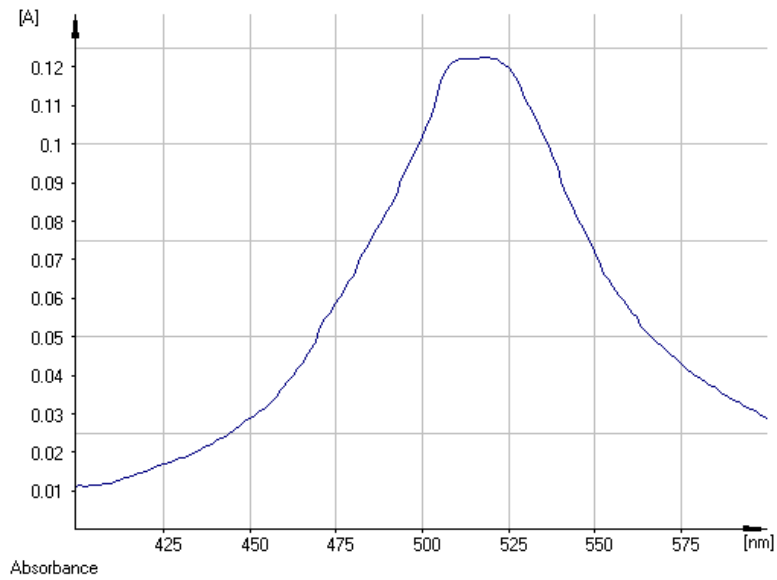


Figura A.2.6.- Spectrul de absorbție pentru extractul carotenoidic din pericarp de piersică

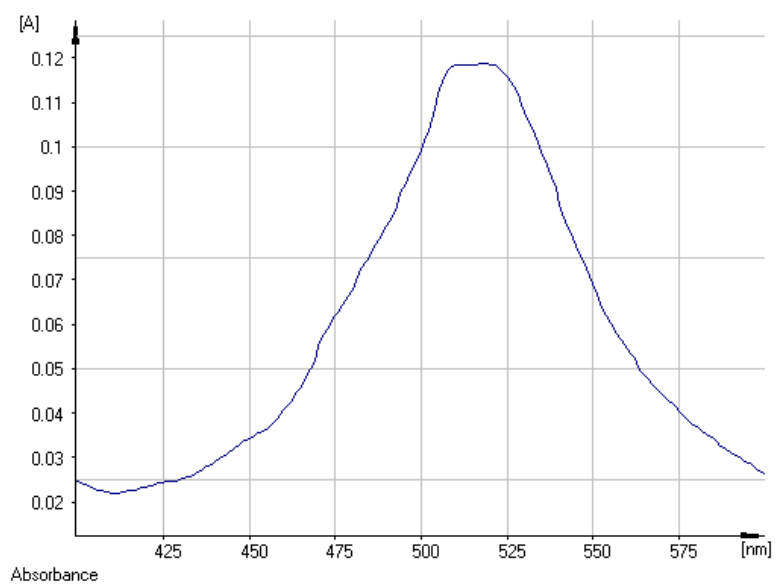


Figura A.2.7.- Spectrul de absorbție pentru extractul carotenoidic din pulpă de piersică

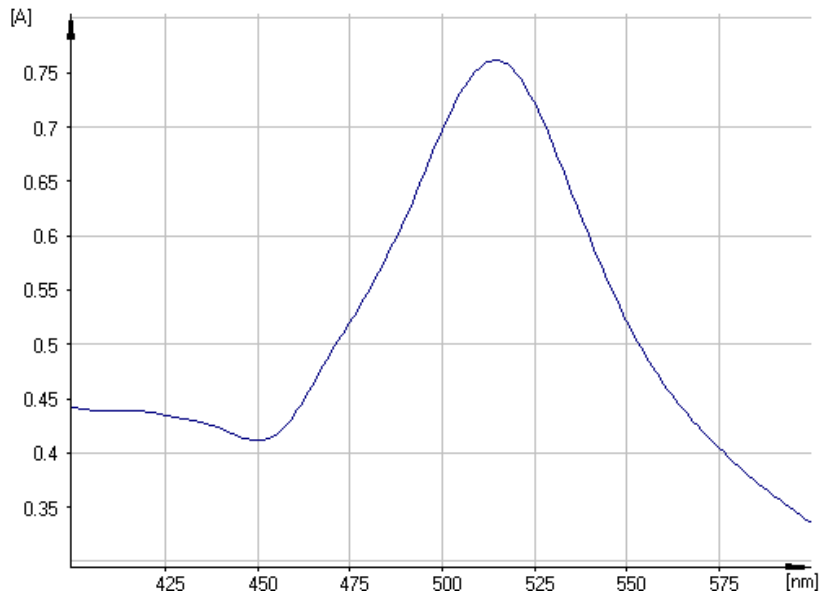


Figura A.2.8.- Spectrul de absorbție pentru extractul carotenoidic din flavedo de portocală

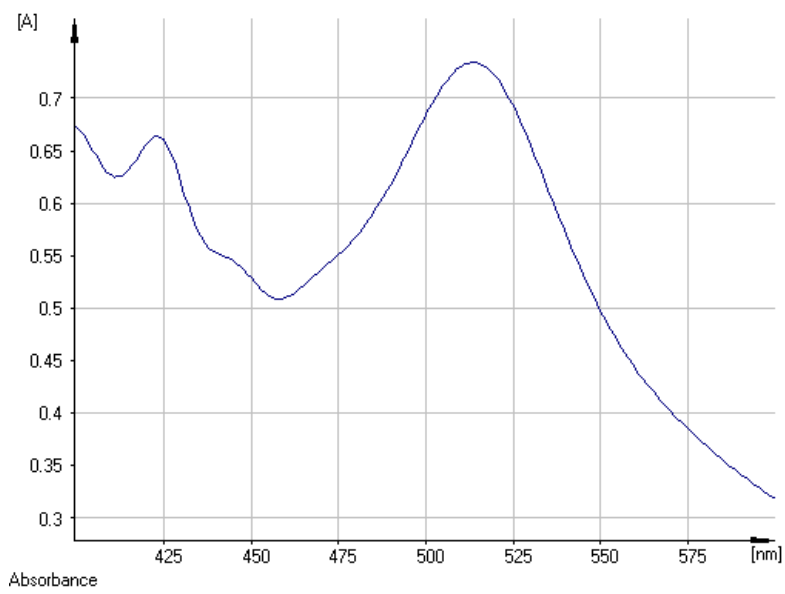


Figura A.2.9.- Spectrul de absorbție pentru extractul carotenoidic din albedo de portocală

ANEXA 3.

Tabelul A.3.1.

Parametrii de lucru la determinarea Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb și Zn, prin spectrometrie de absorbție atomică în flacăra de aer-acetilenă, folosind Varian Spectra AA-110

| Condiții experimentale | Element analizat | | | | | | | | |
|---------------------------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Cd | Co | Cr | Cu | Fe | Mn | Ni | Pb | Zn |
| Prelevarea probei | Manual | | | | | | | | |
| Mod de calibrare | Concentrație | | | | | | | | |
| Unități de măsură | mg/l | | | | | | | | |
| Mod de măsură | PROMT | | | | | | | | |
| Precizia standard, % | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Precizia probei, % | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Factor de expansiune | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Grad de mediere, puncte | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Lungimea de undă, nm | 228,8 | 240,7 | 357,9 | 324,8 | 248,3 | 279,5 | 232,0 | 217,0 | 213,9 |
| Lățimea fantei, nm | 0,5 | 0,2 | 0,2 | 0,5 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 1,0 | 1,0 |
| Tensiune în lampă, V | 40 | 54 | 27 | 32 | 80 | 44 | 79 | 46 | 36 |
| Standard 1, mg/l | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 1,00 | 0,50 | 1,00 | 0,50 | 0,50 |
| Standard 2, mg/l | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 2,00 | 1,00 | 2,00 | 1,00 | 1,00 |
| Standard 3, mg/l | 1,50 | 1,50 | 1,50 | 1,50 | 4,00 | 2,00 | 3,00 | 1,50 | 1,50 |
| Standard 4, mg/l | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 2,50 | 8,00 | 4,00 | 4,00 | 2,00 | 2,00 |
| Standard 5, mg/l | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 5,00 | 10,00 | 5,00 | 5,00 | 3,00 | 2,50 |
| Algoritm de calibrare | New rational | | | | | | | | |
| Timp de măsurare, sec.. | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Timp de precizie, sec. | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Debit aer, l/min | 3,5 | 3,5 | 13,5 | 3,5 | 10,0 | 10,0 | 3,5 | 13,5 | 10,0 |
| Debit acetilenă, l/min | 1,5 | 1,5 | 2,9 | 1,5 | 2,0 | 2,0 | 1,5 | 2,0 | 2,0 |
| Înălțimea arzătorului, mm | 13,5 | 13,5 | 13,5 | 13,5 | 13,5 | 13,5 | 13,5 | 13,5 | 0 |

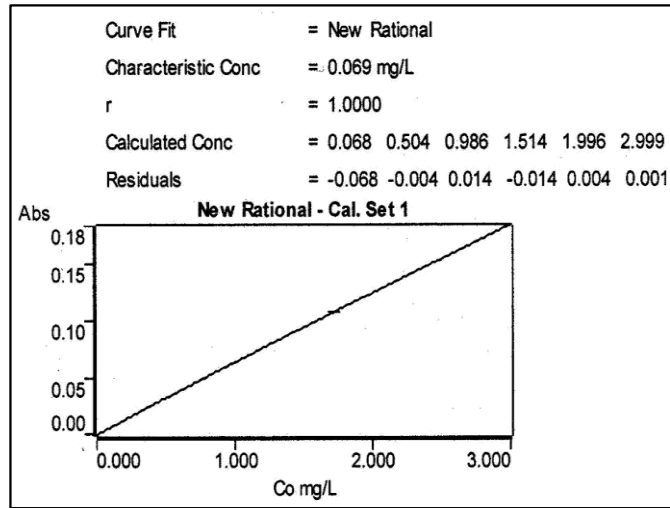


Figura A.3.1. - Dreapta de etalonare la determinarea Co

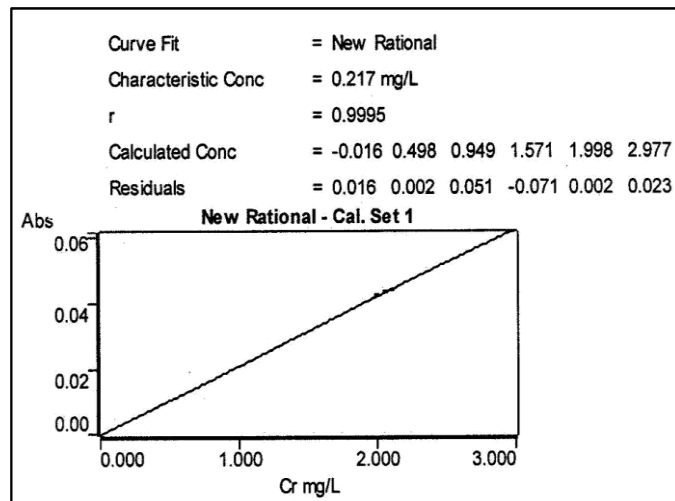


Figura A.3.2.-Dreapta de etalonare la determinarea Cr

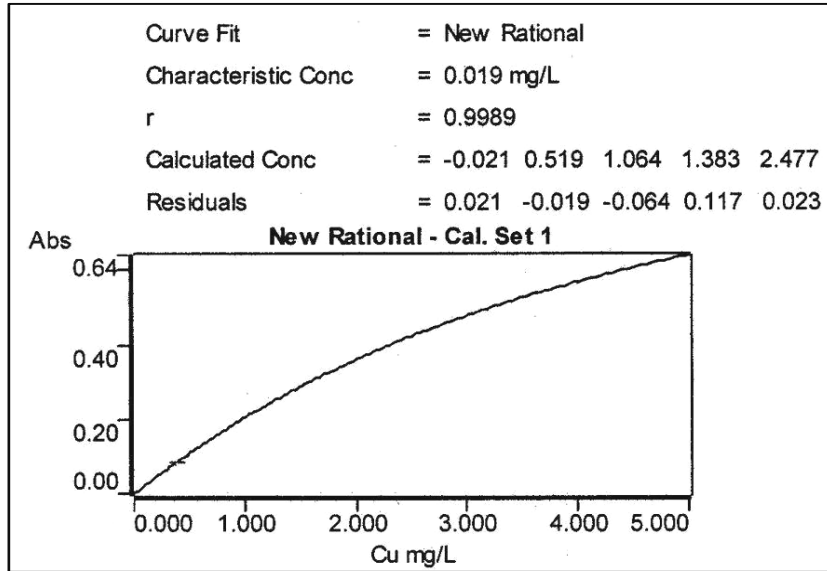


Figura A.3.3. - Dreapta de etalonare la determinarea Cu

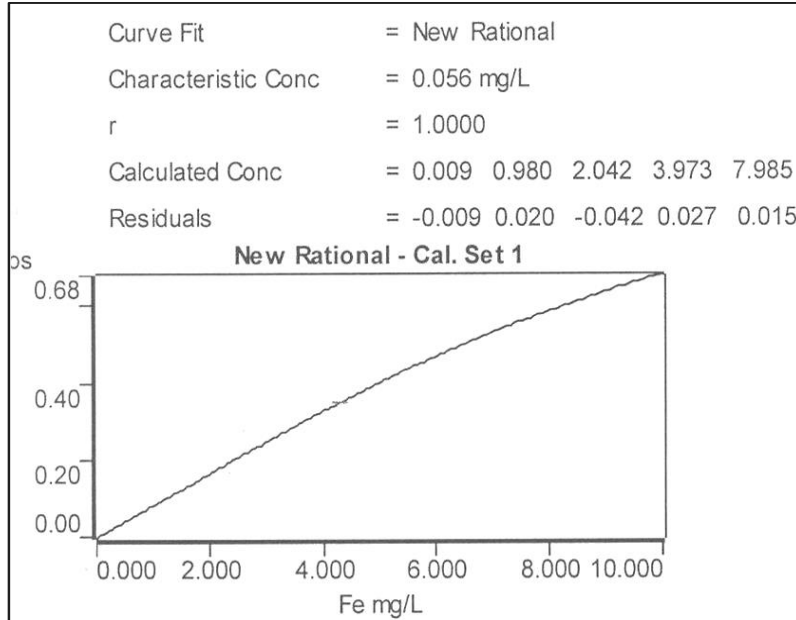


Figura A.3.4. - Dreapta de etalonare la determinarea Fe

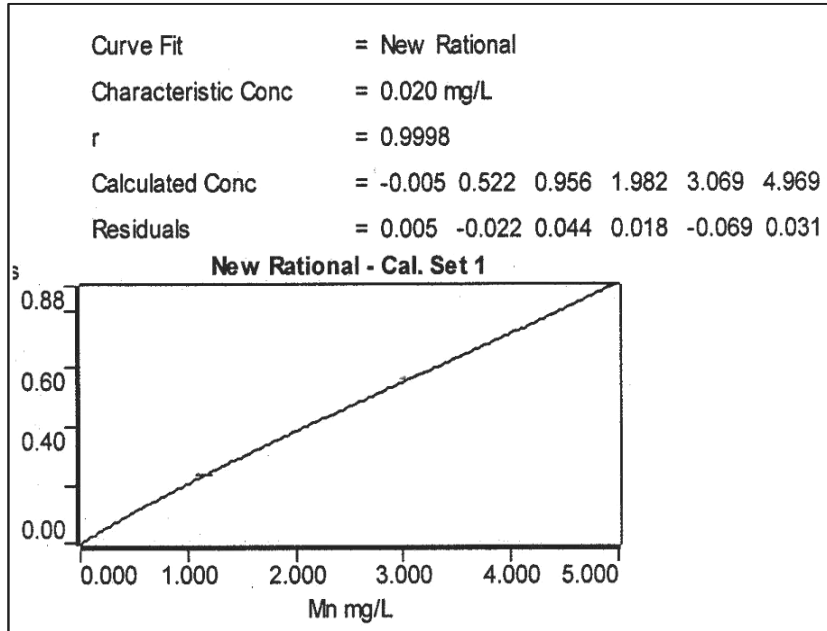


Figura A.3.5.-Dreapta de etalonare la determinarea Mn

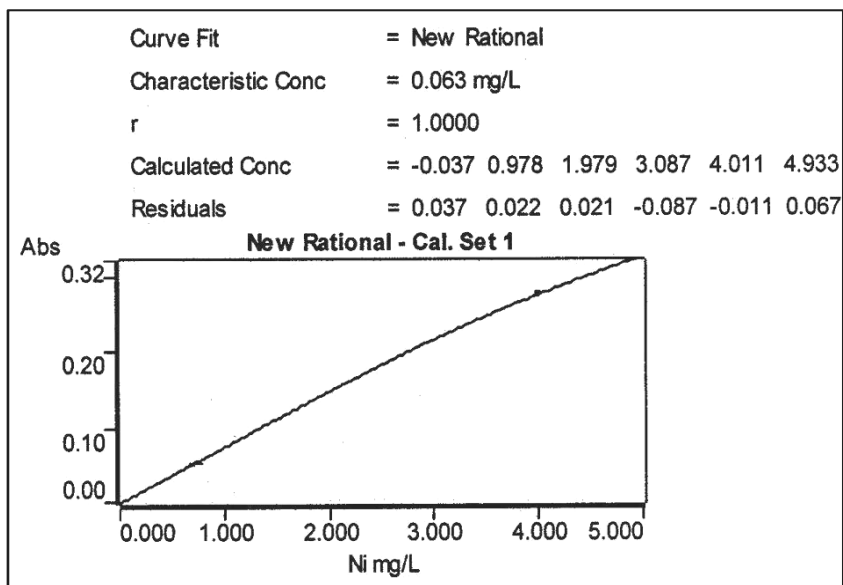


Figura A.3.6. - Dreapta de etalonare la determinarea Ni

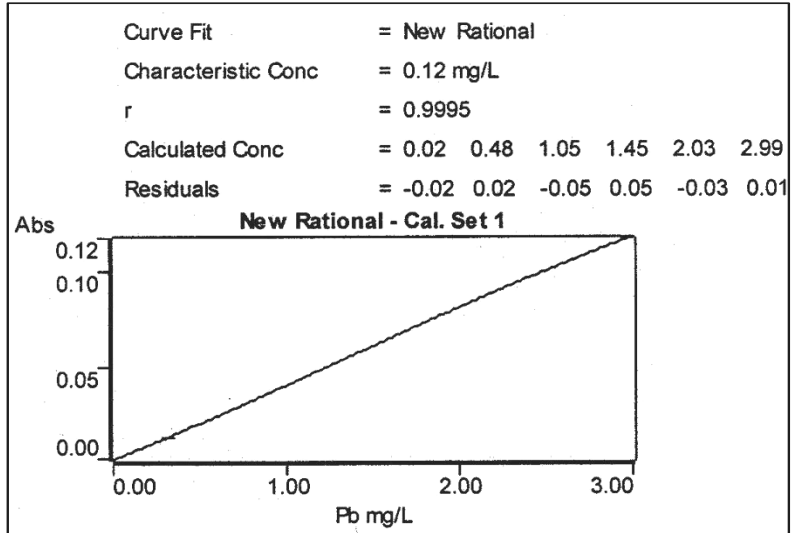


Figura A.3.7. - Dreapta de etalonare la determinarea Pb

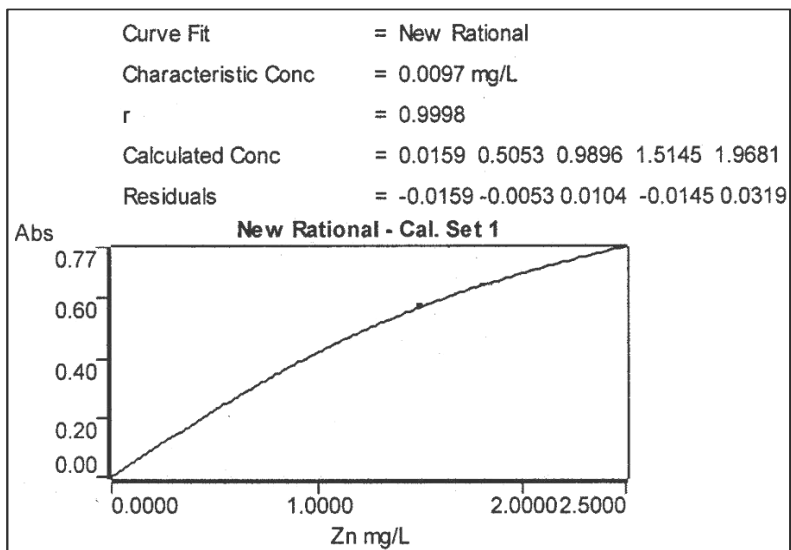


Figura A.3.8.-Dreapta de etalonare la determinarea Zn

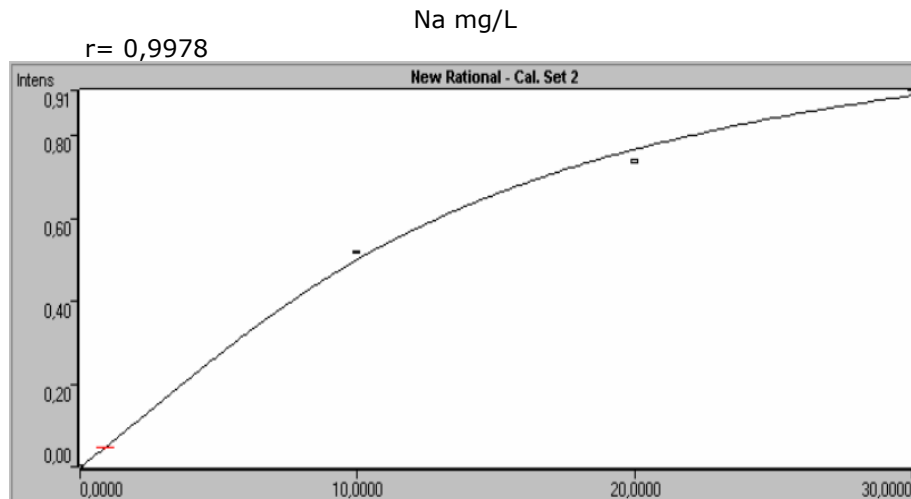


Figura A.3.9. - Dreapta de etalonare la determinarea Na

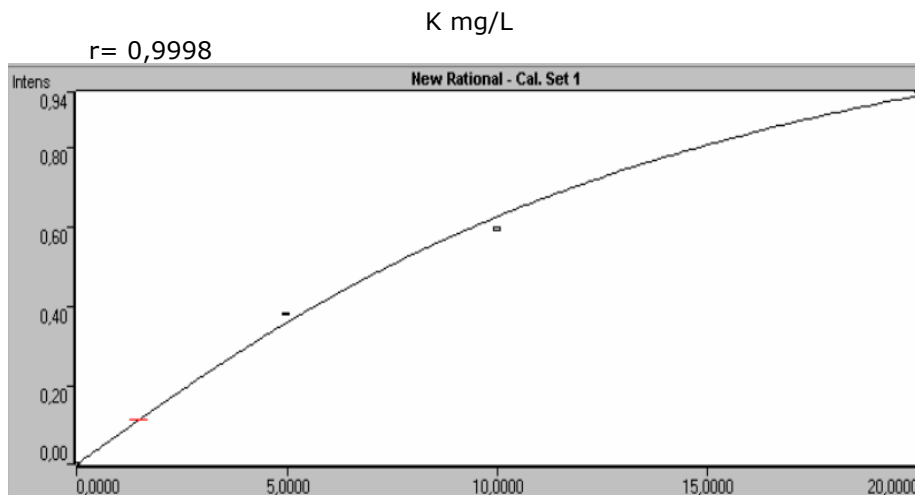


Figura A.3.10. - Dreapta de etalonare la determinarea K

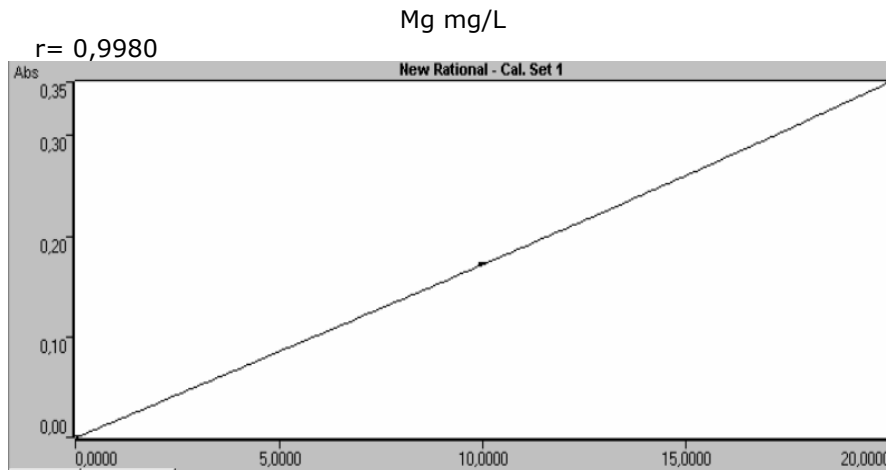


Figura A.3.11. - Dreapta de etalonare la determinarea Mg

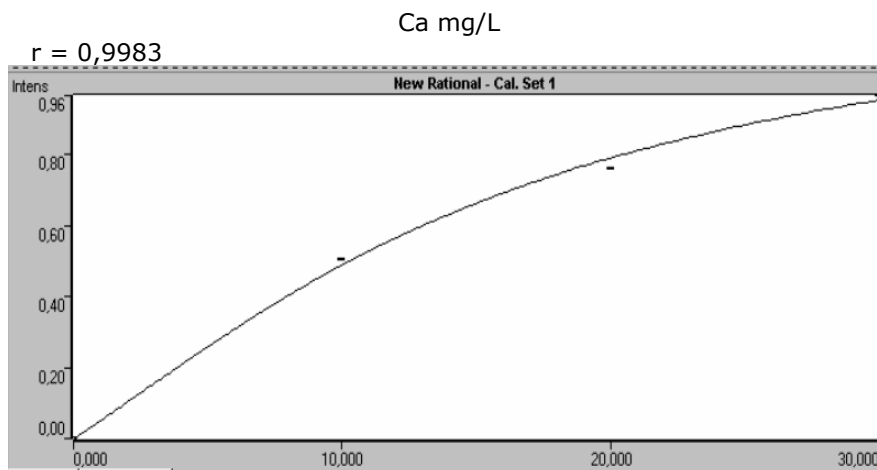


Figura A.3.12. - Dreapta de etalonare la determinarea Ca

ANEXA 4.

ANEXA 4.

Tabelul A.4.1.
Variația conținutului de pigmenți carotenoidici din gălbenușul ouălor de-a lungul desfășurării experimentului

| Nr. de zile de la începerea furajării diferențiate | 0 | | | 5 | | | 10 | | | 15 | | | 20 | | | 25 | | | |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| | I | II | III | I | II | III | I | II | III | I | II | III | I | II | III | I | II | III | |
| Lotul | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| α -Caroten | 0,21 | 0,18 | 0,23 | 0,19 | 0,20 | 0,27 | 0,17 | 0,24 | 0,28 | 0,18 | 0,28 | 0,32 | 0,20 | 0,24 | 0,31 | 0,17 | 0,29 | 0,33 | |
| β -Caroten | 1,12 | 1,16 | 1,08 | 1,18 | 1,16 | 1,35 | 1,15 | 1,28 | 1,42 | 1,18 | 1,46 | 1,68 | 1,16 | 1,47 | 1,66 | 0,98 | 1,43 | 1,62 | |
| ε -Caroten | 0,36 | 0,39 | 0,42 | 0,33 | 0,35 | 0,45 | 0,39 | 0,52 | 0,59 | 0,37 | 0,55 | 0,63 | 0,35 | 0,53 | 0,58 | 0,36 | 0,55 | 0,60 | |
| γ -Caroten | - | - | - | - | - | 0,12 | - | 0,38 | 0,56 | - | 0,78 | 0,89 | - | 0,76 | 0,83 | - | 0,73 | 0,88 | |
| α -Criptoxantină | 0,33 | 0,30 | 0,36 | 0,31 | 0,32 | 0,48 | 0,36 | 0,46 | 0,57 | 0,38 | 0,48 | 0,59 | 0,32 | 0,45 | 0,56 | 0,35 | 0,48 | 0,53 | |
| β -Criptoxantină | 0,62 | 0,67 | 0,65 | 0,69 | 0,63 | 0,83 | 0,64 | 1,20 | 1,32 | 0,67 | 1,53 | 1,68 | 0,63 | 1,50 | 1,65 | 0,66 | 1,53 | 1,68 | |
| Luteină | 7,12 | 7,22 | 7,18 | 7,20 | 6,86 | 7,46 | 7,08 | 7,96 | 8,23 | 7,13 | 8,86 | 9,05 | 6,86 | 8,81 | 9,12 | 6,91 | 8,92 | 8,96 | |
| Zeaxantină | 5,53 | 5,61 | 5,67 | 5,56 | 5,47 | 6,24 | 5,49 | 7,11 | 8,03 | 5,51 | 11,23 | 13,25 | 5,47 | 11,16 | 13,14 | 5,49 | 11,08 | 13,04 | |
| Violaxantină | 0,36 | 0,31 | 0,34 | 0,32 | 0,36 | 0,51 | 0,32 | 0,49 | 0,56 | 0,38 | 0,53 | 0,61 | 0,36 | 0,51 | 0,58 | 0,34 | 0,42 | 0,56 | |
| Total carotenoide | 15,65 | 15,84 | 15,93 | 15,80 | 15,35 | 17,71 | 15,64 | 29,64 | 21,56 | 15,80 | 25,64 | 28,68 | 15,35 | 25,43 | 28,23 | 15,26 | 25,43 | 28,20 | |
| Nr. de ouă produse pe zi | 10 | 10 | 11 | 10 | 10 | 17 | 11 | 19 | 20 | 12 | 20 | 20 | 10 | 20 | 20 | 10 | 20 | 20 | |

Tabelul A.4.1. (continuare)

| Nr. de zile de la începerea furaării diferențiate | 30 | | | 35 | | | 40 | | | 45 | | | 50 | | | 55 | | |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | I | II | III | I | II | III | I | II | III | I | II | III | I | II | III | I | II | III |
| α -Caroten | 0,19 | 0,25 | 0,28 | 0,16 | 0,21 | 0,32 | 0,21 | 0,23 | 0,30 | 0,15 | 0,20 | 0,24 | 0,18 | 0,21 | 0,30 | 0,20 | 0,18 | 0,24 |
| β -Caroten | 0,89 | 1,40 | 1,58 | 1,12 | 1,43 | 1,61 | 1,16 | 1,39 | 1,64 | 1,13 | 1,18 | 1,29 | 0,99 | 1,16 | 1,23 | 1,14 | 1,12 | 1,20 |
| ε -Caroten | 0,33 | 0,51 | 0,58 | 0,37 | 0,54 | 0,51 | 0,33 | 0,48 | 0,56 | 0,35 | 0,43 | 0,53 | 0,38 | 0,41 | 0,45 | 0,36 | 0,39 | 0,43 |
| γ -Caroten | - | 0,70 | 0,86 | - | 0,68 | 0,81 | - | 0,65 | 0,86 | - | 0,52 | 0,73 | - | 0,33 | 0,41 | - | 0,12 | 0,18 |
| α -Criptoxantină | 0,32 | 0,42 | 0,49 | 0,30 | 0,45 | 0,51 | 0,36 | 0,48 | 0,52 | 0,32 | 0,39 | 0,46 | 0,30 | 0,34 | 0,38 | 0,34 | 0,32 | 0,33 |
| β -Criptoxantină | 0,64 | 1,48 | 1,69 | 0,60 | 1,52 | 1,70 | 0,69 | 1,55 | 1,62 | 0,63 | 1,42 | 1,51 | 0,60 | 0,83 | 0,96 | 0,67 | 0,71 | 0,77 |
| Luteină | 6,85 | 8,84 | 9,01 | 6,96 | 8,93 | 8,98 | 6,89 | 8,78 | 8,93 | 7,16 | 8,23 | 8,41 | 6,96 | 8,13 | 8,26 | 6,90 | 7,18 | 7,31 |
| Zeaxantină | 5,52 | 10,92 | 12,84 | 5,48 | 10,83 | 12,98 | 5,50 | 10,81 | 13,08 | 5,55 | 10,31 | 12,68 | 5,46 | 10,04 | 11,92 | 5,43 | 7,12 | 7,23 |
| Violaxantină | 0,32 | 0,48 | 0,52 | 0,34 | 0,45 | 0,52 | 0,31 | 0,48 | 0,53 | 0,35 | 0,40 | 0,45 | 0,34 | 0,32 | 0,43 | 0,31 | 0,36 | 0,40 |
| Total carotenoide | 15,06 | 25,00 | 27,85 | 15,33 | 25,04 | 27,94 | 15,45 | 24,85 | 28,04 | 15,64 | 21,91 | 26,30 | 15,21 | 23,77 | 24,34 | 15,35 | 17,50 | 18,09 |
| Nr. de ouă prodate pe zi | 10 | 20 | 20 | 11 | 20 | 20 | 11 | 20 | 20 | 12 | 20 | 20 | 10 | 18 | 19 | 10 | 16 | 18 |

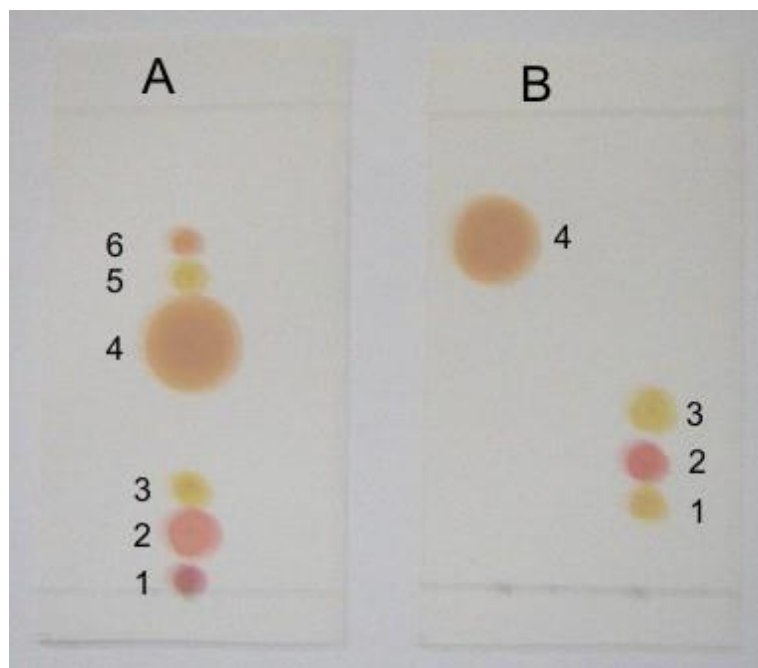


Figura A.4.- Cromatogramele în strat subțire pentru extractul carotenoidic din făina de fructe de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*) utilizată ca adaos în hrana găinilor:

A- Cromatograma corespunzătoare hidrocarburilor carotenoidice:

1: licopen; 2: γ -caroten; 3: δ -caroten; 4: β -caroten; 5: α -caroten; 6: ϵ -caroten

B- Cromatograma corespunzătoare xantofilelor: 1: violaxantină; 2: zeaxantină; 3: luteină; 4: β -criptoxantină.

ANEXA 5.

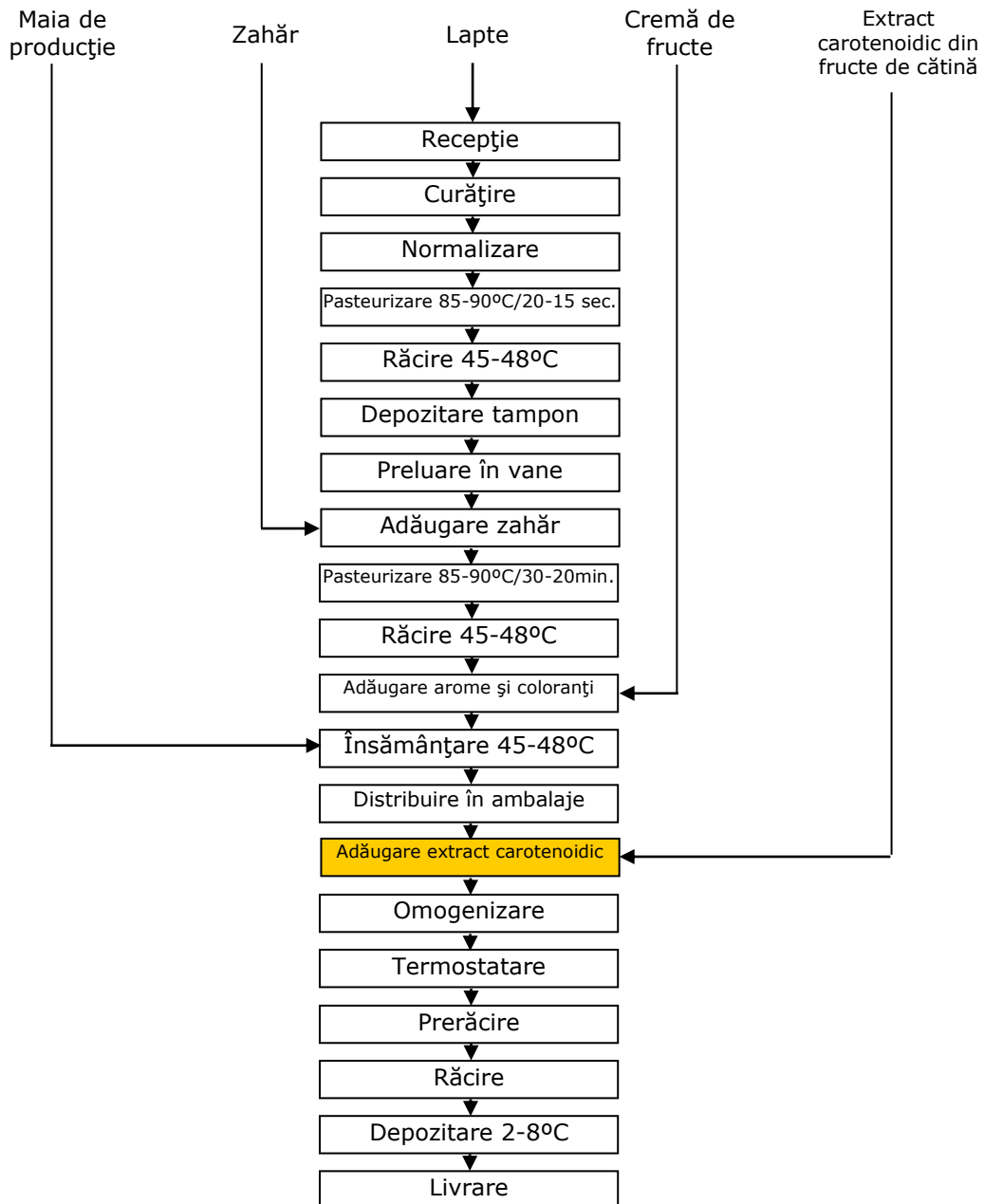


Figura A.5. - Schema tehnologică de obținere a iaurtului cu fructe

Tabelul A.5.

Rezultatele analizei senzoriale pentru sortimentele de iaurt

| Nr. analizator | Cod produs | Aspect (punctaj) | Consistență (punctaj) | Culoare (punctaj) | Aromă (punctaj) | Gust (punctaj) |
|-------------------------------|------------|------------------|-----------------------|-------------------|-----------------|----------------|
| 1 | A | 4 | 2 | 3 | 3 | 3 |
| 2 | A | 4 | 3 | 3 | 4 | 4 |
| 3 | A | 4 | 2 | 2 | 3 | 5 |
| 4 | A | 3 | 3 | 3 | 3 | 6 |
| 5 | A | 2 | 3 | 2 | 4 | 5 |
| 6 | A | 3 | 2 | 2 | 3 | 6 |
| 7 | A | 4 | 2 | 3 | 3 | 4 |
| 8 | A | 4 | 2 | 2 | 4 | 5 |
| 9 | A | 2 | 3 | 3 | 3 | 6 |
| 10 | A | 4 | 2 | 2 | 3 | 1 |
| 11 | A | 4 | 2 | 2 | 3 | 5 |
| 12 | A | 3 | 3 | 2 | 4 | 6 |
| 13 | A | 4 | 2 | 2 | 4 | 4 |
| 14 | A | 3 | 2 | 2 | 3 | 4 |
| 15 | A | 4 | 3 | 3 | 4 | 6 |
| 1 | B | 4 | 3 | 3 | 3 | 6 |
| 2 | B | 2 | 2 | 3 | 4 | 4 |
| 3 | B | 3 | 3 | 3 | 3 | 5 |
| 4 | B | 3 | 2 | 3 | 3 | 4 |
| 5 | B | 3 | 2 | 3 | 3 | 6 |
| 6 | B | 4 | 2 | 3 | 4 | 6 |
| 7 | B | 3 | 2 | 3 | 4 | 1 |
| 8 | B | 4 | 2 | 3 | 2 | 4 |
| 9 | B | 4 | 3 | 3 | 4 | 6 |
| 10 | B | 3 | 3 | 2 | 3 | 1 |
| 11 | B | 3 | 3 | 3 | 4 | 6 |
| 12 | B | 3 | 3 | 3 | 4 | 6 |
| 13 | B | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 |
| 14 | B | 2 | 3 | 3 | 4 | 5 |
| 15 | B | 4 | 3 | 3 | 3 | 5 |
| 1 | C | 4 | 3 | 3 | 4 | 6 |
| 2 | C | 4 | 3 | 3 | 4 | 6 |
| 3 | C | 4 | 3 | 3 | 4 | 6 |
| 4 | C | 4 | 3 | 3 | 4 | 6 |
| 5 | C | 4 | 3 | 3 | 4 | 5 |
| 6 | C | 4 | 3 | 3 | 4 | 6 |
| 7 | C | 4 | 3 | 3 | 4 | 4 |
| 8 | C | 4 | 3 | 3 | 4 | 5 |
| 9 | C | 4 | 3 | 3 | 4 | 5 |
| 10 | C | 4 | 3 | 2 | 4 | 5 |
| 11 | C | 4 | 3 | 3 | 4 | 6 |
| 12 | C | 4 | 3 | 3 | 4 | 5 |
| 13 | C | 4 | 2 | 3 | 4 | 6 |
| 14 | C | 4 | 3 | 3 | 3 | 6 |
| 15 | C | 4 | 3 | 3 | 4 | 6 |
| 1 | D | 4 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 2 | D | 4 | 3 | 2 | 4 | 6 |
| 3 | D | 4 | 3 | 3 | 3 | 4 |
| 4 | D | 4 | 3 | 3 | 4 | 5 |
| 5 | D | 4 | 3 | 3 | 4 | 6 |
| 6 | D | 4 | 2 | 3 | 4 | 6 |
| 7 | D | 4 | 3 | 3 | 4 | 5 |
| 8 | D | 4 | 3 | 2 | 3 | 6 |
| 9 | D | 4 | 3 | 3 | 4 | 6 |
| 10 | D | 4 | 3 | 3 | 4 | 5 |
| 11 | D | 4 | 3 | 3 | 3 | 6 |
| 12 | D | 4 | 3 | 3 | 3 | 6 |
| 13 | D | 3 | 3 | 3 | 4 | 5 |
| 14 | D | 4 | 3 | 3 | 4 | 6 |
| 15 | D | 4 | 3 | 3 | 4 | 6 |
| Interval punctaj conform STAS | | 0- 4 | 0- 3 | 0- 3 | 0- 4 | 0- 6 |