

POSIBILITATEA UTILIZĂRII UNOR EXTRACTE VEGETALE DIN FRUCTE DE PĂDURE ÎN INHIBAREA PROCESELOR DE OXIDARE ALE UNOR BIOCONSTITUENȚI

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

Ing. Mariana Pop

Conducător științific:

Referenți științifici:

prof.univ.dr.ing. Alfa Xenia Lupea

prof.univ.dr. Andrei Dăneț

prof.univ.dr.chim. Vasile Ostafe

prof.univ.dr.ing. Lucian Rusnac

Ziua susținerii tezei: 03. 10. 2008

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 cu frecvență la Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului în cadrul Departamentului C.A.I.C.O.N. al Universității „Politehnica” din Timișoara.

Mulțumiri deosebite pentru sprijinul, răbdarea și ajutorul înalt calificat se cuvin conducătorului științific, doamnei prof. univ. dr. ing. Alfa Xenia Lupea.

Îmi exprim întreaga considerație față de membrii comisiei de doctorat, domnul președinte al comisiei conf. dr. ing. Petru Negrea Universitatea „Politehnica” din Timișoara și domnii prof. univ. dr. Andrei Dăneț de la Universitatea din București, prof. univ. dr. chim. Vasile Ostafe de la Universitatea de Vest din Timișoara, prof. univ. dr. ing. Lucian Rusnac decanul Facultății de Chimie Industrială și Ingineria Mediului, Universitatea „Politehnica” din Timișoara, care au răspuns solicitării de a face parte din comisia de analiză a tezei, pentru timpul acordat lucrării.

Nu în ultimul rând doresc să le mulțumesc părinților și soțului meu pentru suportul moral și sprijinul financiar acordat pe parcursul elaborării acestei teze.

Timișoara, octombrie 2008

Ing. Mariana Pop (c. Schwerin)

Părinților și soțului meu,

Pop, Mariana

Posibilitatea utilizării unor extracte vegetale din fructe de pădure în inhibarea proceselor de oxidare ale unor bioconstituenți

Teze de doctorat ale UPT, Seria 4, Nr. 17, Editura Politehnica, 2008, 262 pagini, 143 figuri, 70 tabele.

ISSN: 1842-8223

ISBN: 978-973-625-716-2

Cuvinte cheie:

antocianidine, extracte din fructe de pădure , *Vaccinium myrtillus*, *Vaccinium vitis-idaea*, antioxidanți naturali, coloranți naturali

Rezumat :

În ultimii ani cercetătorii și producătorii de alimente și-au sporit interesul asupra unor metaboliți secundari ai plantelor cum ar fi compușii naturali fenolici și polifenolici. Studii recente au arătat că, extractele din fructe de pădure aparținând genului *Vaccinium* manifestă *in vitro* efecte antioxidante și anticanceroase, efecte ce se datorează în mare parte compușilor fenolici respectiv polifenolici.

Studiul efectuat a urmărit obținerea de extracte din fructe de pădure valoroase prin conținutul lor de compuși polifenolici, în special antocianine, caracterizarea acestor extracte și posibilitatea de utilizare în industria alimentară ca antioxidanți în uleiuri vegetale respectiv în emulsiile 20% U/A ale acestora, ca și copigmenți naturali în vederea îmbogățirii caracteristicilor cromatice ale vinurilor rosé și alb, ca aditivi în creme bază cu aplicații în domenii diverse (alimentar, farmaceutic, cosmetic). În partea finală sunt prezentate activitatea antimicrobiană respectiv testarea *in vivo* a acțiunii acestor extracte asupra anumitor parametrii biochimici.

C U P R I N S

Introducere.....	9
PARTEA I. STADIUL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU	11
I. COMPUȘII FENOLICI	11
I.1. DIVERSITATEA ȘI UNELE PROPRIETĂȚI ALE COMPUȘILOR FENOLICI DIN PLANTE.....	11
I.1.1. Flavonoidele – Structură. Nomenclatură. Clasificare.....	11
I.1.2. Acizii fenolici.....	17
I.1.3. Stilbenele.....	19
I.1.4. Ligninele	19
I.2. BIOSINTEZA COMPUȘILOR FENOLICI ÎN PLANTE	20
I.2.1. Biosinteza acizilor hidroxicinamici	21
I.2.2. Biosinteza acizilor hidroxi benzoici	21
I.2.3. Biosinteza flavonolilor	23
I.3. DISTRIBUȚIA COMPUȘILOR FENOLICI ÎN PLANTE	23
I.4. ROLUL COMPUȘILOR FENOLICI ÎN PLANTE	25
I.4.1. Activitatea antioxidantă a compușilor fenolici.....	26
I.5. CHIMIA ANTOCIANIDINELOR ȘI ANTOCIANINELOR	34
I.5.1. Structura chimică și clasificare	35
I.5.2. Glicozilarea antocianinelor.....	39
I.5.3. Acilarea antocianinelor.....	39
I.5.4. Proprietăți fizico-chimice	41
I.5.4.1. Proprietăți fizice	41
I.5.4.2. Proprietăți chimice.....	43
I.5.5. Biosinteza antocianinelor.....	45
I.5.6. Culoarea și stabilitatea antocianinelor	46
I.5.7. Degradarea enzimatică a antocianinelor	47
I.5.8. Utilizarea antocianinelor ca aditivi alimentari	50
I.5.8.1. Utilizarea antocianinelor ca și coloranți în industria alimentară	50
I.5.8.2. Proprietățile antioxidante și conservante ale antocianinelor în industria alimentară	50
I.5.9. Acțiunea farmacologică a antocianinelor	52
I.6. METODE DE EXTRACȚIE ȘI ANALIZĂ A COMPUȘILOR FENOLICI	53
I.6.1. Generalități	53
I.6.2. Metode de extracție.....	54
I.6.2.1. Extracția cu solvenți la rece: macerarea	54
I.6.2.2. Extracția cu solvenți la cald.....	55
I.6.2.3. Extracția cu ultrasunete.....	55
I.6.2.4. Extracția cu microunde.....	56
I.6.2.5. Extracția cu fluide supercritice.....	56
I.7. METODE DE ANALIZĂ, SEPARARE ȘI IDENTIFICARE A COMPUȘILOR FENOLICI	57
I.7.1. Analiza polifenolilor totali	57
I.7.2. Analiza antocianinelor totale	58
I.7.3. Identificarea pigmentilor antocianici prin reacții de culoare.....	59
I.7.4. Separarea antocianinelor prin precipitare și metode cromatografice	60
I.7.4.1. Cromatografia în strat subțire și pe hârtie.....	61
I.7.4.2. Cromatografia pe coloană (cromatografia lichid-solid)	62

I.7.4.3. Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC).....	63
I.7.4.4. Spectroscopia electronică ultraviolet-vizibil (UV-VIS)	65
I.7.4.5. Spectroscopia de vibrație IR.....	66
I.7.4.6. Rezonanța magnetică nucleară (RMN)	66
I.7.4.7. Spectroscopia de masă (MS).....	67
PARTEA a-II-a — CONTRIBUȚII PROPRII. PARTEA EXPERIMENTALĂ	68
II.1. DATE BOTANICE REFERITOARE LA SPECIILE <i>VACCINIUM</i> STUDIATE	68
II.2. OBȚINEREA EXTRACTELOR DIN SPECIILE STUDIATE.....	73
II.2.1. Păstrarea și pregătirea materiei prime	73
II.2.2. Optimizarea procesului de extracție a compușilor polifenolici din fructe de <i>Vaccinium myrtillus</i> (afine negre) respectiv <i>Vaccinium vitis-</i> <i>idaea</i> (merișor de munte).....	73
II.2.2.1. Extracția în condiții dinamice	73
II.2.2.1.1. Extracția dinamică cu soluții etanolice respectiv metanolice la temperatura camerei	73
II.2.2.1.2. Obținerea de extracte lipofile și hidrofile din fructe de <i>Vaccinium</i> <i>myrtillus</i> respectiv <i>Vaccinium vitis-idaea</i> în vederea determinării activității antioxidante totale	74
II.2.2.2. Extracția în condiții statice.....	74
II.2.2.2.1. Obținerea extractelor apoase/alcoolice din fructe de <i>Vaccinium</i> <i>myrtillus</i> respectiv <i>Vaccinium vitis-idaea</i> prin extracție statică repetată.....	74
II.3. CARACTERIZAREA EXTRACTELOR DIN FRUCTE DE <i>VACCINIUM MYRTILLUS</i> RESPECTIV <i>VACCINIUM VITIS-IDAEA</i>	75
II.3.1. Polifenoli	75
II.3.1.1. Identificarea calitativă a compușilor polifenolici	75
II.3.1.2. Determinarea cantitativă a compușilor polifenolici	76
II.3.2. Flavonoide	78
II.3.2.1. Analiza calitativă a flavonoidelor	78
II.3.2.2. Analiza cantitativă a flavonoidelor	79
II.3.3. Antocianinele.....	81
II.3.3.1. Identificarea antocianinelor prin reacții de culoare	81
II.3.3.2. Identificarea antocianinelor prin cromatografie în strat subțire ...	82
II.3.3.3. Identificarea antocianinelor prin spectroscopie IR	82
II.3.3.4. Identificarea antocianinelor prin spectrometrie de masă	83
II.3.3.5. Identificarea și dozarea antocianinelor prin spectroscopie UV-VIS	83
II.3.3.6. Purificarea extractelor din fructe de <i>Vaccinium myrtillus</i> (afine) respectiv <i>Vaccinium vitis-idaea</i> (merișoare).....	84
II.3.3.6.1. Purificarea extractelor apoase pe coloană cu Sephadex LH-20.	84
II.3.3.6.2. Purificarea extractelor alcoolice pe coloană cu Diaion HP-20 SS	85
II.3.3.7. Identificarea antocianinelor prin cromatografie de lichide de înaltă performanță	85
II.3.3.8. Analiza cantitativă	89
II.4. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE A EXTRACTELOR DIN FRUCTE DE <i>VACCINIUM MYRTILLUS</i> RESPECTIV <i>VACCINIUM VITIS-IDAEA</i> ...	90
II.4.1. Determinarea activității antioxidante prin metoda spectrofotometrică cu DPPH.....	90
II.4.2. Determinarea activității antioxidante în sistem β -caroten / acid	

linoleic.....	91
II.5. STUDIUL CINETIC ASUPRA DEGRADĂRII TERMICE A EXTRACTELOR DIN FRUCTE DE <i>VACCINIUM MYRTILLUS</i> RESPECTIV <i>VACCINIUM VITIS-IDAEA</i> ..	91
II.6. STUDIUL DE CULOARE ÎN SPAȚIUL C I E L A B AL EXTRACTELOR DIN FRUCTE DE <i>VACCINIUM MYRTILLUS</i> RESPECTIV <i>VACCINIUM VITIS-IDAEA</i> ..	92
II.7. STUDIUL POSIBILITĂȚILOR DE APLICARE A EXTRACTELOR DIN FRUCTE DE <i>VACCINIUM MYRTILLUS</i> RESPECTIV <i>VACCINIUM VITIS-IDAEA</i> ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ	95
II.7.1. Studiul efectelor antioxidante ale extractelor din fructe de <i>Vaccinium myrtillus</i> respectiv <i>Vaccinium vitis-idaea</i> în uleiuri vegetale	95
II.7.2. Studiul efectului extractelor din fructe de <i>Vaccinium myrtillus</i> respectiv <i>Vaccinium vitis-idaea</i> adăugate în vinurile rosé și alb în vederea îmbunătățirii conținutului în compuși fenolici și a caracteristicilor cromatice ale acestora.....	102
II.7.3. Aprecierea stabilității cremelor alimentare cu adaos de extracte din fructe de pădure respectiv emulsii U/A ce conțin aceste extracte prin studiul comportării reologice	106
II.8. STUDIUL EFECTELOR UNOR EXTRACTE DIN FRUCTE DE <i>VACCINIUM MYRTILLUS</i> RESPECTIV <i>VACCINIUM VITIS-IDAEA</i> ASUPRA UNOR PARAMETRII BIOCHIMICI ȘI ASUPRA UNOR ENZIME REDUCĂTOARE LA COBAI	108
II.9. STUDIUL PROPRIETĂȚILOR ANTIMICROBIENE A EXTRACTELOR DIN FRUCTE DE <i>VACCINIUM MYRTILLUS</i> RESPECTIV <i>VACCINIUM VITIS-IDAEA</i>	113
PARTEA a-III-a — CONTRIBUȚII PROPRII. REZULTATE ȘI DISCUȚII	115
III.1. CARACTERIZAREA EXTRACTELOR REALIZATE DIN FRUCTE DE <i>VACCINIUM MYRTILLUS</i> RESPECTIV <i>VACCINIUM VITIS-IDAEA</i>	115
III.1.1. Caracterizarea extractelor obținute prin extracție dinamică cu soluții etanolice respectiv metanolice la temperatura camerei	117
III.1. 2. Caracterizarea extractelor lipofile și hidrofile din fructe de <i>Vaccinium myrtillus</i> respectiv <i>Vaccinium vitis-idaea</i>	126
III.1.3. Caracterizarea extractelor apoase/alcoolice obținute din fructe de <i>Vaccinium myrtillus</i> respectiv <i>Vaccinium vitis-idaea</i> prin extracție statică repetată.....	131
III.1.4. Analiza calitativă și cantitativă a antocianinelor în extractele din fructe de <i>Vaccinium myrtillus</i> respectiv <i>Vaccinium vitis-idaea</i> ...	136
III.1.4.1. Identificarea antocianinelor prin spectroscopie IR.....	136
III.1.4.2. Identificarea antocianinelor prin spectrometrie de masă.....	138
III.1.4.3. Identificarea și dozarea antocianinelor prin spectroscopie UV-VIS	148
III.1.4.4. Identificarea antocianinelor prin cromatografie de lichide de înaltă Performanță	157
III.2. CINETICA DEGRADĂRII TERMICE A EXTRACTELOR DIN FRUCTE DE <i>VACCINIUM MYRTILLUS</i> RESPECTIV <i>VACCINIUM VITIS-IDAEA</i>	165
III.3. EXTRACTE DIN FRUCTE DE <i>VACCINIUM MYRTILLUS</i> RESPECTIV <i>VACCINIUM VITIS-IDAEA</i> . STUDIUL DE CULOARE ÎN SPAȚIUL C I E L A B	171
III.4. APLICAREA EXTRACTELOR DIN FRUCTE DE <i>VACCINIUM MYRTILLUS</i> RESPECTIV <i>VACCINIUM VITIS-IDAEA</i> ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ.....	185
III.4.1. Efectele antioxidante ale extractelor din fructe de <i>Vaccinium myrtillus</i> (afine) respectiv <i>Vaccinium vitis-idaea</i> (merișoare) în	

uleiuri vegetale	185
III.4.2. Efectul extractelor din fructe de <i>Vaccinium myrtillus</i> respectiv <i>Vaccinium vitis-idaea</i> asupra conținutului de compuși fenolici și asupra caracteristicilor cromatice ale vinurilor rosé și alb	205
III.4.3. Comportarea reologică a cremelor alimentare cu adaos de extracte din fructe de pădure respectiv emulsii U/A ce conțin aceste extracte	223
III.5. ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A EXTRACTELOR DIN FRUCTE DE <i>VACCINIUM MYRTILLUS</i> RESPECTIV <i>VACCINIUM VITIS-IDAEA</i>	231
III.6. INFLUENȚA EXTRACTELOR APOASE DIN FRUCTE DE <i>VACCINIUM MYRTILLUS</i> (AFINE) RESPECTIV <i>VACCINIUM VITIS-IDAEA</i> (MERIȘOARE) ASUPRA UNOR ENZIME OXIREDUCTOARE ȘI A UNOR PARAMETRII BIOCHIMICI LA ANIMALE DE EXPERIENȚĂ	233
Concluzii	242
Bibliografie	245

INTRODUCERE

Din cele mai vechi timpuri omul a avut preocupări deosebite pentru a pătrunde în tainele vieții plantelor. Le-a studiat structura morfoanatomică, fiziologia, evoluția și, o dată cu aceasta, utilitatea. Pe lângă alți componenți cu valoare nutrițională, plantele conțin un mare grup de compuși biologic activ – polifenolii.

Pentru valorificarea plantelor în fitoterapie este necesară cunoașterea conținutului substanțelor biologice active, localizarea lor la nivelul țesuturilor și organelor, utilizarea unor metode moderne de extracție și purificare, precum și utilizarea cât mai eficientă a acestor compuși în diferite domenii de activitate cum ar fi: industria alimentară, industria farmaceutică, cosmetică.

În ultimii ani cercetătorii și producătorii de alimente și-au sporit interesul asupra unor metaboliți secundari ai plantelor cum ar fi compușii naturali fenolici și polifenolici. Principalul motiv care stă la baza acestui interes este recunoașterea proprietăților antioxidante ale acestora, marea lor abundență în alimentația noastră și rolul lor probabil în prevenirea diferitelor boli asociate cu stresul oxidativ, cum ar fi cancerul și bolile cardiovasculare. Pe deasupra, polifenolii, care constituie substanțele active ce se găsesc în multe dintre plantele medicinale, influențează activitatea unui lung șir de enzime și receptori celulari, deci a numeroase căi metabolice. Efectele lor asupra sănătății depind de cantitatea consumată și de bioavabilitatea lor.

Studii recente au arătat că, extractele din fructe de pădure, în particular fragi și fructe aparținând genului *Vaccinium* manifestă *in vitro* efecte antioxidante și anticanceroase, efecte ce se datorează în mare parte compușilor fenolici respectiv polifenolici.

Antocianinele sunt pigmenți colorați, naturali, caracteristici majorității fructelor și legumelor. Aceste substanțe posedă proprietăți homeostatice, hipotensive, cardioprotectoare și antitumorale. În lume există o diversitate de surse vegetale, care ar putea servi drept materie primă pentru obținerea antocianinelor. Una din aceste surse sunt fructele din speciile de *Vaccinium*.

Obiectivele urmărite în cadrul tezei de doctorat au fost:

- Obținerea de extracte din fructe de pădure valoroase prin conținutul lor de compuși polifenolici, în special antocianine;
- Caracterizarea extractelor obținute prin – determinarea calitativă și cantitativă a conținutului de compuși polifenolici totali, flavonoide totale respectiv antocianine totale;
- Determinarea puterii de colorare a extractelor prin studii de culoare în spațiul CIELAB;
- Cinetica degradării termice a extractelor;
- Studiul comportamentului microbiologic al extractelor obținute asupra unor bacterii gram pozitive și gram negative;
- Determinări biologice respectiv biochimice privind activitatea respectiv acțiunea extractelor.

Ca și aplicații practice directe s-a urmărit:

- Posibilitatea de utilizare a extractelor în industria alimentară ca antioxidanți în uleiuri vegetale respectiv în emulsiile 20% U/A ale acestora, ca și copigmenți naturali în vederea îmbogățirii caracteristicilor cromatice ale vinurilor rosé și alb, ca aditivi în creme bază cu aplicații în domenii diverse (alimentar, farmaceutic, cosmetic).

Teza este structurată în trei părți:

- Partea I – în care este prezentat stadiul cunoașterii în domeniul compușilor polifenolici cu privire la structura, nomenclatura, clasificarea acestora, punându-se totodată accent pe metodele de extracție și identificare a principiilor active, pe metodele de determinare a activității antioxidante a compușilor polifenolici și aplicațiile acestora în diverse ramuri industriale;
- Partea a-II-a – partea experimentală, cuprinde descrierea materialului vegetal luat în studiu (fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea*), metodele de extracție și analiză a principiilor active prezente în acestea cât și descrierea studiilor experimentale efectuate;
- Partea a III-a – în care sunt prezentate rezultatele obținute în urma caracterizării extractelor și a studiilor efectuate în ceea ce privește posibilitățile de aplicare a extractelor obținute în industria alimentară ca antioxidanți respectiv coloranți naturali. În partea finală sunt prezentate activitatea antimicrobiană respectiv testarea *in vivo* a acțiunii acestor extracte asupra anumitor parametrii biochimici.

PARTEA I

STADIUL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU

I. COMPUȘII FENOLICI

I. 1. DIVERSITATEA ȘI UNELE PROPRIETĂȚI ALE COMPUȘILOR FENOLICI DIN PLANTE

Țesuturile vegetale conțin numeroase substanțe cu grupe funcționale fenolice ce aparțin diferitor clase de compuși organici. Sistematizarea lor prezintă dificultăți, deoarece majoritatea compușilor naturali au funcții mixte și pot fi încadrate în diferite clase concomitent [1]. În ultimele decenii s-au acumulat o serie de date referitoare la potențialele efecte benefice ale compușilor fenolici. Aceste date au stimulat cercetări ulterioare focalizate pe efectele pe care alimentele bogate în polifenoli le au asupra sănătății [2].

Fenolii au o mare răspândire în plante și funcții biologice multiple. Cei mai simpli componenți sunt acizii fenolici și anume acidul shikimic, cafeic, clorogenic, galic, ferulic, sinapic, vanilic. Dintre aceștia cea mai mare importanță practică o au acizii cafeic și clorogenic care participă ca substrat în procesele de îmbrunare enzimatică [3].

Denumirea de "plant polyphenols" acoperă un domeniu mare de compuși reprezentați de taninuri hidrolizabile (metaboliți ai acidului galic), taninuri condensate (proantocianidine), flavonoide și alți compuși ce conțin în molecula lor structuri polifenolice [4].

În plantele superioare au fost identificate câteva mii de molecule ce au structura polifenolică (adică câteva grupări -OH și nucleu aromatic), iar în plantele comestibile s-au găsit câteva sute. Aceste molecule sunt metaboliți secundari din plante și sunt în general implicați în apărarea împotriva radiațiilor UV sau împotriva agresiunii patogenilor [5, 6]

Acești compuși pot fi clasificați în grupe diferite dependent de funcțiunile cu număr de inele aromatice conținute și de elementele structurale care se găsesc pe aceste inele.

Clasificarea substanțelor fenolice, care se bazează pe structura scheletului carbonic a fost propusă de Harbone în 1964 și se utilizează până în prezent cu unele modificări substanțiale. Distincțiile se fac astfel între flavonoide, acizi fenolici, stilbeni și lignine [1, 7].

I.1.1. Flavonoidele – Structură. Nomenclatură. Clasificare.

Flavonoidele sunt o clasă de substanțe fenolice larg răspândite mai ales sub formă de glicozizi. Multe flavonoide sunt colorate, constituind unii dintre principalii pigmenți vegetali, cum sunt antocianidinele și flavonele [8].

Din punct de vedere chimic, flavonoidele sunt compuși polifenolici (figura 1) care conțin 15 atomi de carbon ($C_6 - C_3 - C_6$) ce formează două inele benzenice (A și B) unite printr-un heterociclu piranic ce conține O (inelul C) [9, 10].

Diferitele grupe de flavonoide se deosebesc prin gradul de oxidare al atomului C_3 din inelul piranic. Reprezentanții fiecărei grupe se caracterizează prin numărul de grupări hidroxilice și metoxilice fixate în anumite poziții pe ciclurile A și B, uneori și pe heterociclu (inelul C). Mai rar în plante se întâlnesc și reprezentanți cu alte grupări funcționale sau care au catene laterale [8].

Flavonoidele predomină în plantele superioare, găsindu-se în flori, fructe, frunze, tulpini, rădăcini, scoarța copacilor, etc. În cantitate mică se găsesc în unele alge, în microorganisme și în unele insecte [1, 11].

Unele flavonoide reprezintă pigmenți galbeni (flavonolii, flavonele, chalconele), roșii, violeti, albaștri (antocianinele), brun-cafenii (taninurile) ai florilor, fructelor, și altor organe vegetale, altele (flavanonele și flavanonolii incolori) sunt copigmenți [12].

Flavonoidele se găsesc în natură în stare liberă, dar mai ales sub formă de glicozide. Sub aspect chimic, pigmenții flavonoidici sunt glicozide solubile în apă.

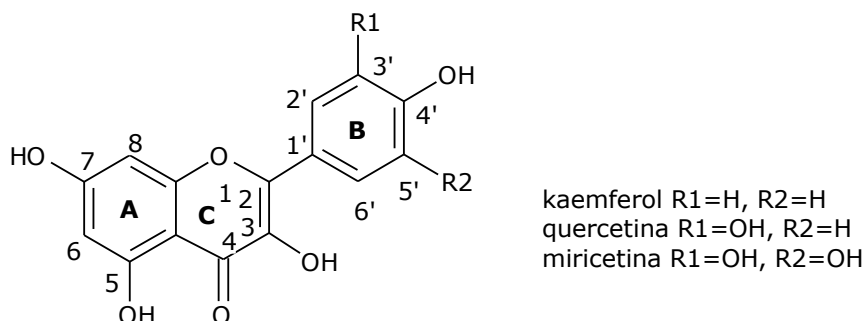


Figura 1.- Structura chimică a flavonolilor

Ca și în cazul unor substanțe neflavonice, pentru denumirea flavonoizilor se folosește nomenclatura trivială, ce creează dificultăți considerabile privind utilizarea literaturii în domeniu. Termenul „flavan” provine de la cuvântul latin „flavus” – galben, care însă nu reflectă în totalitate situația reală, deoarece substanțele în cauză manifestă întreg spectru de culori, printre ele întâlnindu-se și substanțe incolore. Flavonoizii posedă un spectru vast de activitate farmaceutică, fiind antialergeni, vasodilatatori, anticancerigeni, etc. [13]. Diversitatea flavonoizilor se datorează atât varietății structurilor $C_6 - C_3 - C_6$ (dată de numărul de grupări hidroxilice și metoxilice fixate pe inelele A, B și C), cât și sintezei biochimice a esterilor flavonoizilor cu diverși acizi mono- și dicarboxilici (ca de exemplu flavonoizi acetilați), a eterilor cu alcoolii (flavonoizilor alchilați) și cu hidrații de carbon (glucozidelor) [1]. Termenul „aglicon” se folosește pentru flavonoizii naturali și modificați, care nu au resturi esterice și glucidice.

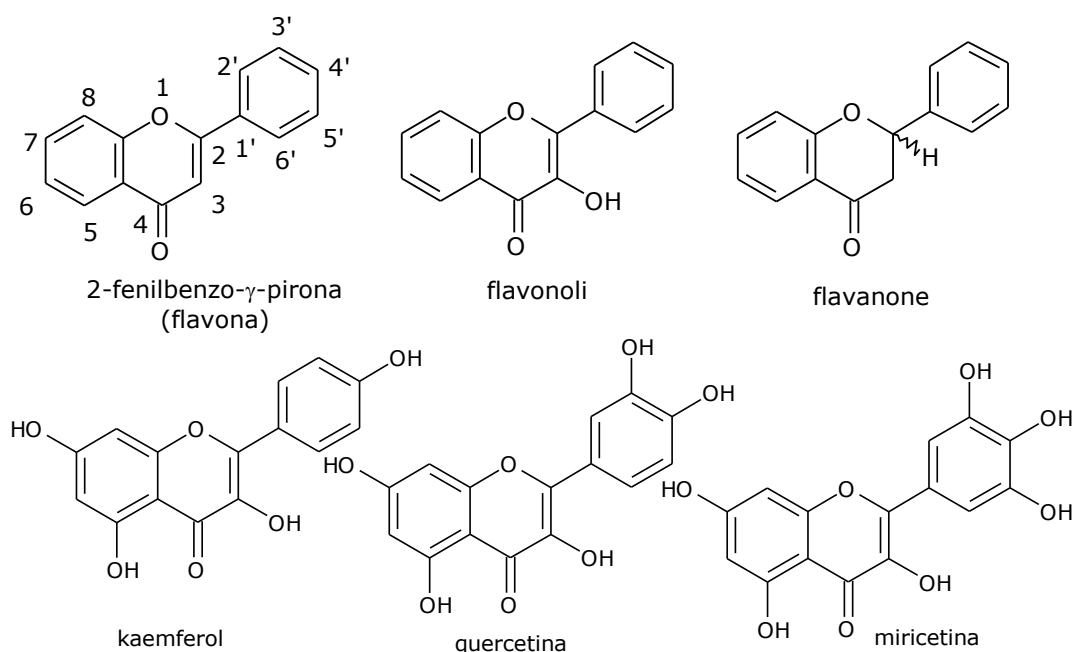
Prin diferite reacții de oxidare, reducere, izomerizare, etc., diferite grupe de flavonoide se pot transforma reciproc unele în altele, ceea ce constituie un mare avantaj pentru plante. În funcție de necesități, unele flavonoide mai puțin necesare pot fi transformate în flavonoide necesare organismului [11].

Prezența flavonoidelor în plante mărește rezistența acestora la atacul insectelor și al microorganismelor. Ele pot forma în celule sisteme de oxido-reducere care au un rol însemnat pentru organism. Unele flavonoide sunt folosite în terapeutică ca „*factors de protecție P*” și ca substanțe antioxidante la conservarea grăsimilor.

Datorită numărului de grupări hidroxil și pozițiilor pe care acestea le ocupă în structura flavonoidelor, acestea au abilitatea de a acționa ca și antioxidanți prin donarea unui electron unui oxidant. Flavonoidele sunt captatori ideali de radicali peroxil având efect de inhibare a peroxidării lipidelor [14, 15, 16].

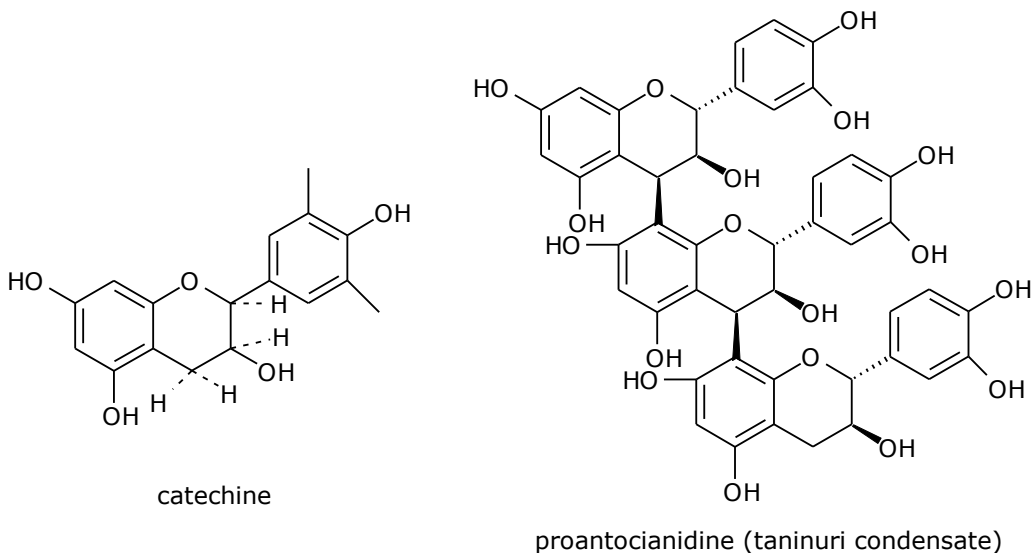
În funcție de gradul de oxidare al nucleului, de saturarea segmentului C₃, de substituentul de la C₃ și de locul de inserție al radicalului fenil, se cunosc mai multe grupe de compuși flavonoidici al căror inel de bază este 2-fenil-benzo-γ-pirona.

- **Flavonoide** [12] (*flavone* – pigmenți vegetali ce predomină în plantele superioare, în flori, frunze și fructe sub formă de glicozizi, sau libere în scoarța copacilor și în rădăcini, *flavonoli* - 3-hidroxiflavonele (kaemferolul, quercetina, miricetina) sunt substanțe puțin solubile, cu o colorație galben pal, prezente în florile și frunzele a circa 80% din plantele superioare și de asemenea în fructe [17], *flavanone* – derivați 2,3-dihidrogenați, incolori ai flavonelor. Agliconii flavonozidici au la bază nucleul 2-fenilbenzo-γ-pironic (2-fenilcromanic) pe care sunt grefate grupări hidroxil, metoxil, dimetilalil etc. Majoritatea compușilor sunt hidroxilați în pozițiile 5, 7, pe nucleul A. Pe nucleul B se pot găsi grefate 1-3 grupări fenolice la C 4', 3', 5'.

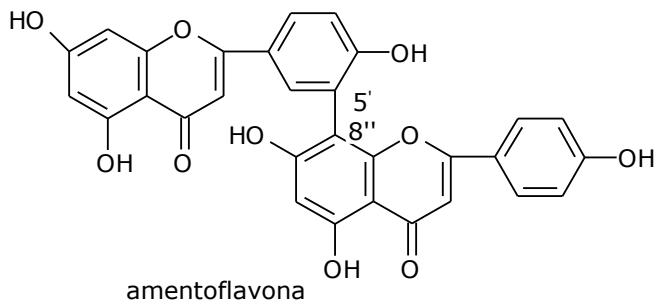


Flavonolii se găsesc de obicei sub formă de O-glicozide la atomul de oxigen din poziția C₃ respectiv mai puțin frecvent în poziția C₇ [13]. D-glucoza este cel mai comun rest de zahar. Alte resturi de zahar întâlnite sunt D-galactoza, L-ramnoza, L-arabinoza, D-xiloza și acidul D-glucuronic.

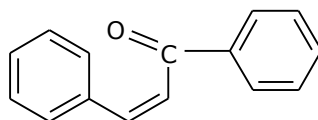
Flavanolii – sunt derivați 3-hidroxiilați ai flavanoneilor. Există în ambele forme: ca monomeri (catechine) și în formă polimeră (proantocianidine) [5].



- **Biflavonozide** – sunt dimeri ai flavonozidelor. Monomerii se pot lega între ei prin atomii de carbon din pozițiile 6 sau 8, care sunt foarte reactivi. Legăturile stabilite pot fi C-C (amentoflavona, agathisflavona, bilobetol, ginkgetol) sau C-O-C (hinokiflavona). Cele două unități consecutive ale biflavonoidelor pot fi de același tip (biflavone, biflavanone) sau de tipuri diferite (flavonă-flavanonă). Grupările hidroxil pot fi libere sau, cel mai adesea, metilate. Biflavonoidele sunt caracteristice pentru *Gymnospermae*. La *Angiospermae* distribuția lor este specifică.

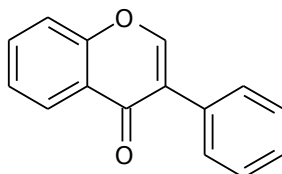


- **Chalcone** – flavonoide având ciclul piranic scindat, caracterizate prin prezența unui segment cetonic α - β nesaturat, alcătuit din 3 atomi de carbon.



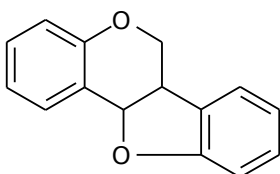
Benziliden-acetofenona
(Chalcone)

- **Aurone**, derivați ai benziliden cumaranonei – sunt substanțe rare, atribuirea lor la flavonoizi se face probabil din considerentele legăturii lor genetice cu flavonoizii tipici. Termenul „auron” reflectă culoarea acestor substanțe. Dintre reprezentanții ce au fost izolați în stare nativă din surse vegetale amintim auronul aurezidină [1].
- **Izoflavone** – derivă de la 3-fenil- γ -benzopirona, sunt larg răspandite în regnul vegetal și se găsesc de obicei sub formă de glicozide. Datorită poziției 3 a nucleului fenilic substituit, ele pot conduce ușor la închiderea de noi cicluri, fie pironice, fie în poziția 2-3, fie în poziția 7-8.

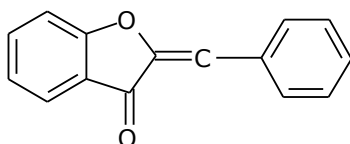


izoflavone

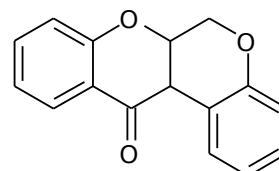
- **Pterocarpani** – produși de ciclizare ai izoflavonelor cunoscuți în natură ca fitoalexine; **rotenone** – izoflavone de origine hemiterpenică care mai închid un al doilea ciclu piranic între nucleul flavanic și fenilul substituit, din poziția 3 [18].



pterocarpani

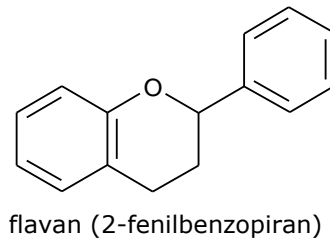
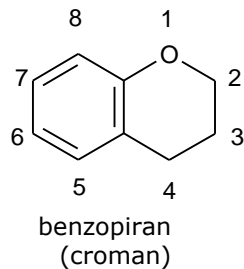


aurone



rotenoide

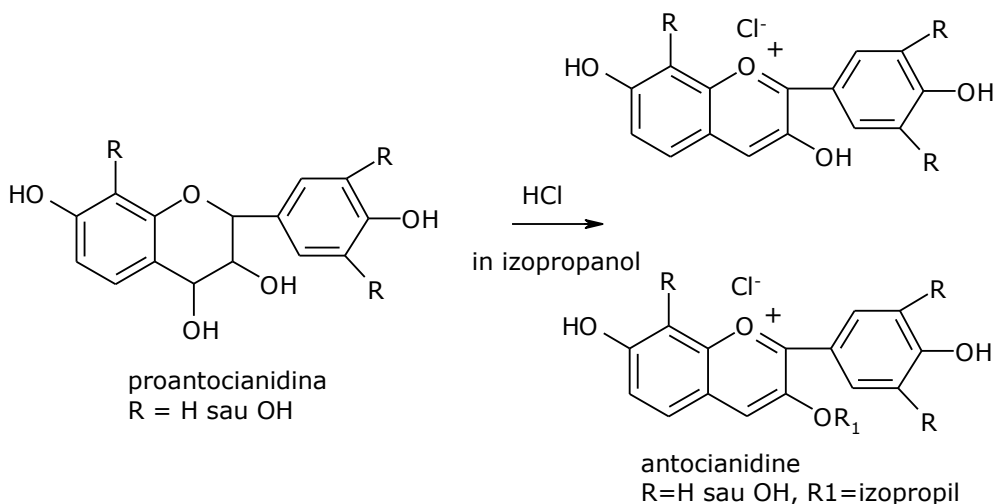
- **Antocianozide** (pigmenții antocianici, antocianinele), derivați ai 2-fenil-cromenei (2-fenilbenzopiriliu).



Antocianidinele – sunt pigmenți ce se găsesc dizolvați în seva vacuolară a țesuturilor epidermale din flori și fructe. În general se găsesc ca glicozizi numiți antocianine, ce există în diferite forme chimice, colorate cât și incolore, funcție de pH. Pigmenții antocianici sunt rezistenți la lumină, pH și condiții de oxidare. Degradarea lor este prevenită prin glicozilare, în general cu glucoză în poziția 3, și esterificare cu diverși acizi organici (acid citric, malic) respectiv cu acizi fenolici.

Antocianidinele sunt intermediari redox între flavanoli și flavonoli [19]. Aceste substanțe vor fi studiate mai amănunțit în cadrul subcapitolului I. 5.

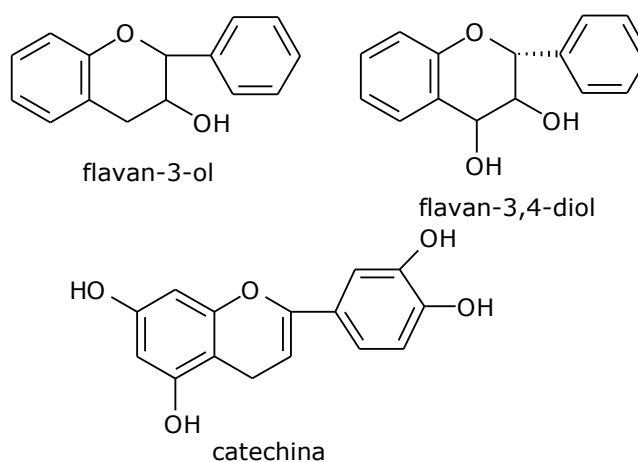
- **Proantocianidolii** (proantocianidinele), cunoscuți și sub denumirea de leucoantociani, sunt derivați ai flavan-3,4-diolilor. Această denumire a fost acordată grupului de polimeri, care prin hidroliză acidă, la cald, formează antocianidine. Mecanismul acestei reacții constă în eliminarea unei molecule de apă cu pierderea grupării OH de la C₄ și a atomului de H de la C₃. Pe lângă antocianidină se formează și 3-eterul acesteia.



Majoritatea proantocianidolilor se găsesc cu precădere în familiile *Rosaceae*, *Ericaceae* (*Vaccinium vitis-idaea*, *Vaccinium myrtillus*), *Vitaceae* (*Vitis vinifera*), *Fabaceae*, *Cannabaceae*. Au acțiune vasoprotectoare (angioprotectoare), antiaritmice, antioxidantă (captează

radicalii liberi, îndeosebi anionii superoxid, inhibând în acest mod peroxidarea lipidelor), respectiv au acțiune antimutagenă. Proantocianidolii și epicatechina sunt considerați astăzi adevărați „factori P” fiind de 1000 ori mai activi decât flavonele[12].

- **Catecolii** sunt derivați ai 3-hidroxi-flavanului, care prin condensare formează taninuri catechice.



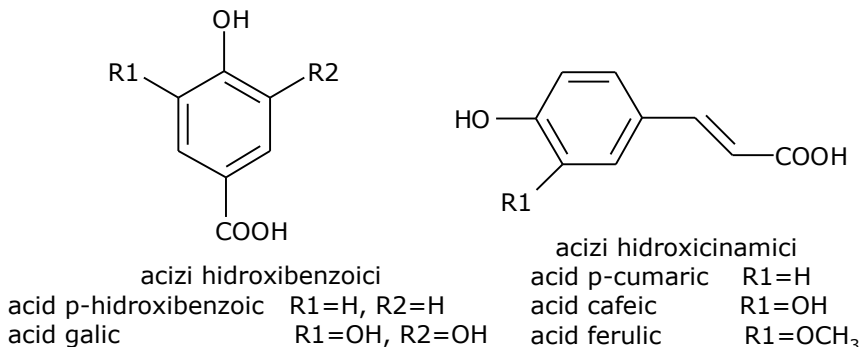
Substanțele tanante reprezintă un complex de substanțe larg răspândite în produsele alimentare de origine vegetală. Taninurile sunt substanțe organice heterogene care derivă de la polifenoli sau de la acizi fenolici. Ele se caracterizează prin faptul că au în moleculă elemente structurale polifenolice, au un gust astringent caracteristic și prezintă proprietatea comună de a precipita substanțele proteice din soluții. Pentru tehnologia produselor alimentare de origine vegetală, prezintă importanță atât datorită influenței asupra gustului cât și prin faptul că reprezintă substratul proceselor de îmbrunare oxidativă și enzimatică, au activitate bactericidă și vitaminică. În cantități mari, substanțele tanante se găsesc în gutui (0.321%), în fructele arbuștilor fructiferi – afine (0.250%), merișoare (0.250%), mere (0.100%). Catechinele sunt oxidate ușor, atât de oxigenul din aer, suferind fenomenul de autooxidare catalizat de prezența metalelor grele, cât și enzimatic, oxidare catalizată de *polifenoloxidază* și *peroxidază* cu apariția colorației brune. Marea sensibilitatea a catechinelor la procesele de oxidare se explică prin faptul că din întreaga clasă a flavonoidelor, ele au caracterul reducător cel mai puternic [3].

I.1.2. Acizii fenolici

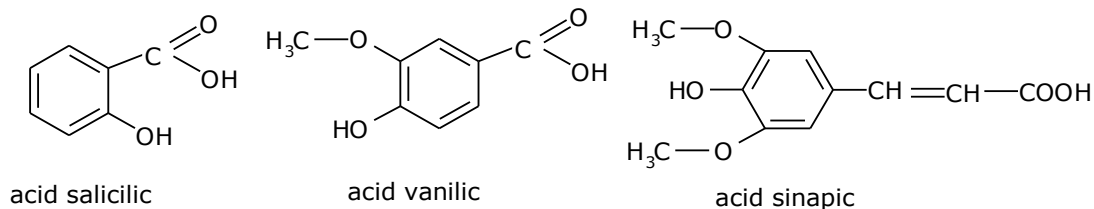
Pot fi distinse două clase de acizi fenolici:

1. derivați ai acidului benzoic
2. derivați ai acidului cinamic

Acizii hidroxibenzoici – au structura generală C_6-C_1 , derivă direct de la acidul benzoic. Structurile individuale ale acizilor hidroxibenzoici variază în funcție de numărul și poziția grupărilor hidroxil respectiv metoxi de pe inelul aromatic [20].



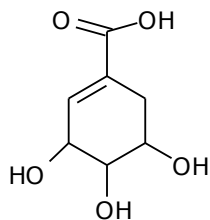
Cei mai întâlniți acizi hidroxicinamici sunt: acizii o- și p- hidroxicinamic, vanilic, siringic și acidul protocatehic. Aceștia pot fi prezenți în stare liberă, conjugați cu zaharuri sau cu acizi organici precum și legați de fracțiuni celulare, de exemplu în lignine [21]. De asemenea acizii hidroxicinamici sunt componenți ai structurilor complexe, cum ar fi taninurile hidrolizabile sau pot fi prezenți sub formă de esteri.



Deoarece acizii hidroxicinamici în stare liberă sau esterificați se găsesc doar în unele plante ce intră în alimentația umană, ei nu au fost studiați intensiv și nu sunt considerați a fi de mare interes nutrițional [5].

Acizii hidroxicinamici – sunt mult mai răspândiți în plante comparativ cu acizii hidroxicinamici. Cei mai des întâlniți acizi hidroxicinamici sunt acidul p-cumaric, acidul cafeic, acidul ferulic și acidul sinapic prezenți în fructe [20].

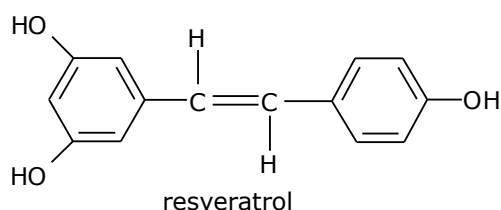
Acizii hidroxicinamici se găsesc de obicei sub diverse forme conjugate, formele libere sunt artefacte din hidroliza chimică sau enzimatică din timpul procesării materialelor vegetale. Formele conjugate sunt derivați glicozilați sau esteri ai acidului kinic, shikimic și tartric [21].



acid shikimic

I.1.3. Stilbenele

Stilbenele se regăsesc doar în cantități scăzute în alimentația umană. Una dintre acestea, resveratrolul, pentru care efectele anticancerigene au fost descoperite în timpul studierii plantelor medicinale se găsește în cantități scăzute, în urme, în vin (0,3-7 mg aglicon/L respectiv 15 mg glicozide/L în vinul roșu) [5].



Reprezentantul stilbenilor, resveratrolul, este o substanță cu o puternică acțiune antitumorală. Până nu demult se considera că, conținutul ridicat al acestei substanțe în speciile de *Vitis Vinifera* determină în mare măsură proprietățile benefice ale vinului sec, dând naștere așa numitului „*paradox francez*”, ce se explică prin longevitatea și numărul redus de boli cardiovasculare în Franța de Sud, unde tradițional se consumă vinul roșu sec.

De asemenea există date referitoare la prezența resveratrolului în unele fructe de pădure ca afine, merișoare, coacăze, acrișe etc. [22].

I.1.4. Ligninele

Ligninele sunt substanțe macromoleculare larg răspândite în regnul vegetal, care însoțesc aproape întotdeauna celuloza în diferite țesuturi și organe ale plantelor. Ligninele sunt compuși rezultați din condensarea a două până la cinci molecule de derivați fenilpropanici (C₆-C₃)_n, legați prin catenele laterale, aciclici sau ciclici, adesea lactonizați, β-glucozidați sau neglucozidați. Derivații fenilpropanici pot fi unii alcooli aromatici ce conțin grupări hidroxilice și metoxilice. Dintre substanțele monomere, fac parte alcoolul coniferilic, alcoolul hidroxiconiferilic și alcoolul sinapic, care la rândul lor pot fi considerați drept derivați ai acizilor cinamici.

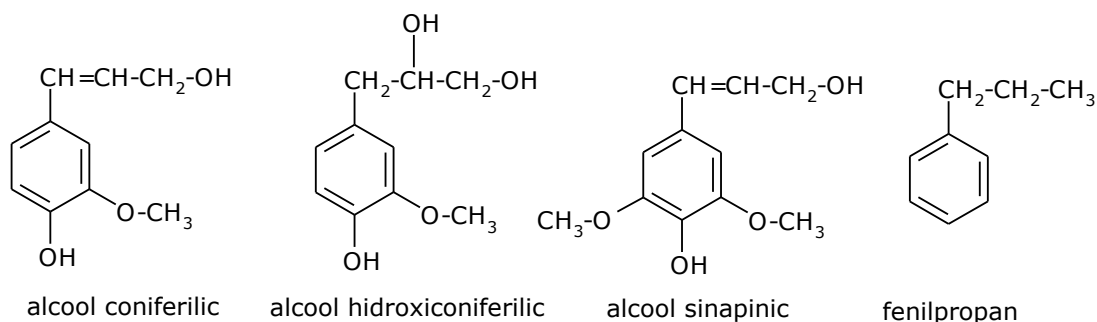
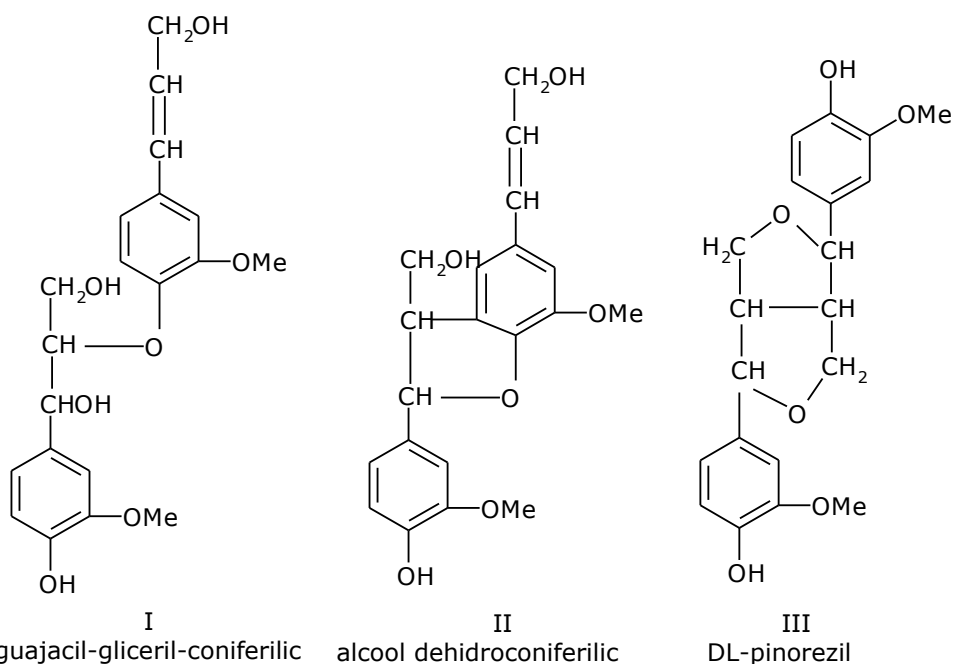


Figura 2 . Monomeri ai ligninelor

Lignanii sunt frecvent întâlniți în *Gymnospermae* și *Angiospermae*, mai ales în lemn, sub formă polimerizată (lignina, unde $n=4000$) sau în sucii celulari și în lamela mediană a membranei celulare, ca dimeri sau oligomeri [12], dar și în fructe precum coacăze, căpșuni, mure, merișoare etc [22].

Până în 1964 au fost izolați 27 lignani. În continuare sunt prezentați trei dintre aceștia, derivați de la alcoolul coniferilic.

Primii doi conțin gruparea $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$ prin care se pot lega de alte molecule de alcooli hidroxicinamilici spre a forma macromolecule de lignină. Al treilea se leagă printr-o grupare OH fenolică de o moleculă de alcool coniferilic formând un trimer guajacil-gliceril- β -pinorezinol eterul care la rândul lui se poate condensa mai departe. Se poate spune deci, că ligninele naturale sau sintetice au structuri complicate, neunitare.



Polifenolii din lemn ca de exemplu lignina, trec prin cracare termică în timpul generării fumului prin arderea lemnului, în fenoli volatili. Acești fenoli se depozitează pe suprafața alimentelor în timpul afumării unor preparate după care penetrează în aliment și astfel acționează ca antioxidanți [23]. Ligninele au fost identificate în plasma umană și în urină. Unul dintre puținele uleiuri care conține cantități considerabile de lignine este uleiul de in.

I.2. BIOSINTEZA COMPUȘILOR FENOLICI ÎN PLANTE

Așa cum s-a menționat, compușii fenolici prezenți în plante manifestă o mare varietate de structuri, pornind de la structuri simple ce conțin un singur ciclu aromatic hidroxilat până la structuri polimerice foarte complexe [24]. Căile de biosinteză a unor flavonoli și acizi fenolici sunt prezentate în figura 3. Fenilalanina produsă în plante pe calea shikimat, este un precursor comun pentru biosinteza a

mulți compuși fenolici în plantele superioare [20]. Similar, acizii hidroxicinamici, și în particular esterii lor cu coenzima A, sunt elemente structurale comune compușilor fenolici, ca lignine, flavonoide, taninuri condensate.

Calea metabolică fenilalanin/hidroxicinamat este definită ca „*metabolismul general fenilpropanoid*”. Acesta include reacții ce conduc de la L-fenilalanină la hidroxicinamați și formele lor activate [25]. Enzimele ce catalizează treptele acestui metabolism general sunt *fenilalanin ammoniulaza* (PAL), *acidul cinamic 4-hidroxiilaza* (CA4H), *4-cumarat coenzim A ligaza* (4CL) [20, 25].

I.2.1. Biosinteza acizilor hidroxicinamici

Formarea acizilor hidroxicinamici (cafeic, ferulic, 5-hidroxiferulic și sinapic) din acidul p-cumaric implică două tipuri de reacții: reacții de hidroxilare și reacții de metilare. Introducerea celei de-a doua grupări OH în structura acidului p-cumaric duce la formarea acidului cafeic (figura 3) și e catalizată de *monofenol mono-oxigenaze*, un grup de enzime bine cunoscute ce se găsesc în plante [20, 25, 26]. Metilarea acidului cafeic catalizată de *O-metiltransferaza*, duce la formarea acidului ferulic, care alături de acidul p-cumaric sunt precursori ai ligninelor. Acidul cafeic este substratul pentru acidul 5-hidroxiferulic, un acid foarte rar, care duce la formarea acidului sinapic ca rezultat al O-metilării.

Formarea derivaților acizilor hidroxicinamici necesită formarea hidroxicinamat – coenzimei A, catalizată de *hidroxicinamoil-CoA ligaze* sau de către *O-glicozil transferaze*. Hidroxicinamat-CoA intră în diverse reacții specifice ale căii metabolice „fenilpropanoid”, cum ar fi condensarea cu malonil-CoA când se formează flavonoide sau reduceri NADPH-dependente cu formare de lignine.

I.2.2. Biosinteza acizilor hidroxibenzoici

Se știe că există câteva căi de biosinteză individuale ale acizilor hidroxibenzoici, în funcție de natura materialului vegetal. Acizii hidroxibenzoici pot fi obținuți direct din calea shikimat (figura 3), în special din acidul dehidroshikimic, această reacție reprezentând principala cale de obținere a acidului galic [26]. De asemenea ei pot fi obținuți în urma degradării acizilor hidroxicinamici, similar cu β-oxidarea acizilor grași, intermediarii principali fiind esterii cinamoil-coenzimei A. Hidroxibenzoații se produc de asemenea ocazional prin degradarea flavonoidelor. De altfel, se știe că hidroxilarea și metilarea acizilor hidroxibenzoici au loc în mod analog în calea metabolică fenilalanin/hidroxicinamat [26].

Cunoașterea mecanismelor și în special a enzimelor implicate în biosinteza acizilor hidroxibenzoici și a derivaților acestora este destul de limitată în special în cazul fructelor, deși acidul galic și derivații acestuia joacă un rol important în formarea taninurilor hidrolizabile [20]. Componentii principali ai taninurilor hidrolizabile sunt acidul galic și acidul ellagic. Taninurile care produc numai acid galic se numesc galotaninuri iar cele care produc acid ellagic se numesc ellagitaninuri [27].

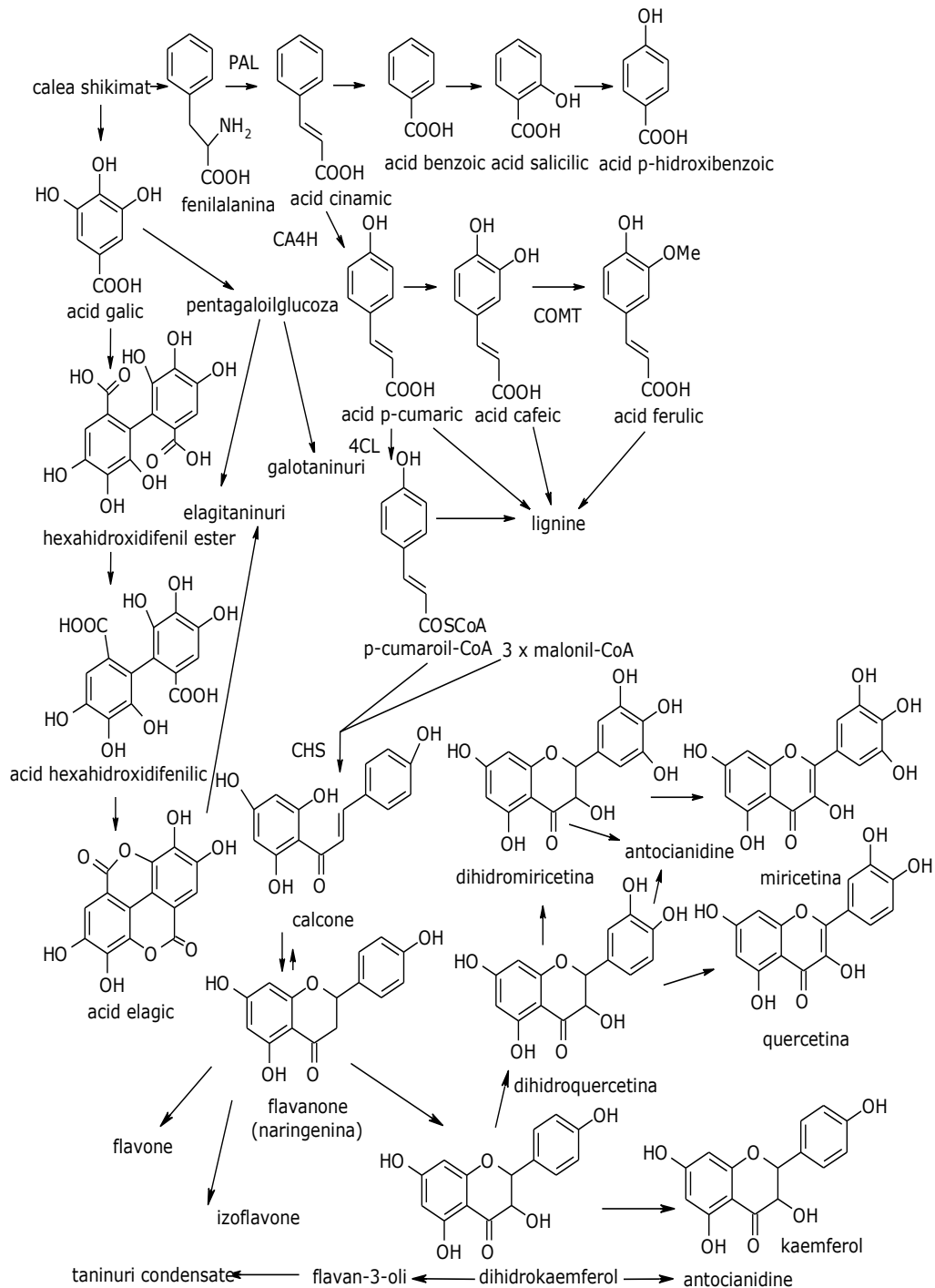


Figura 3. Biosinteza acizilor hidroxicinamici, hidroxi benzoici și a flavonoidelor [1,9, 28, 29]

I.2.3. Biosinteza flavonolilor

Treapta cheie în biosinteza flavonoidelor este catalizată de enzima *calconsintaza* și presupune condensarea a 3 molecule de malonil-CoA cu p-cumaroil-CoA în vederea formării structurii C₁₅ intermediare care este conform figurii 3, 4, 2', 4', 6'-tetrahidroxicalcona [9, 26]. Sinteza calconei este urmată de izomerizarea stereospecifică la (2S)-flavanone, naringenina (figura 3), catalizată de *calcon izomeraze*. Flavanonele reprezintă un punct de ramificare în biosinteză, întrucât acestea pot fi transformate în alte flavone (ex. apigenina) sau izoflavone (ex. genisteina). Enzima *flavanon-3-hidroxilaza* catalizează transformarea naringeninei în dihidrokaemferol precum și transformarea eriodictiolului în dihidroquercetină [25], iar enzima *flavonol sintaza* catalizează transformarea dihidrokaemferolului în kaemferol [25, 26].

Majoritatea flavonoidelor din metabolismul activ al țesuturilor plantelor se găsesc sub formă de glicozide. Există sute de glicozide diferite, însă cele mai frecvent întâlnite zaharuri sunt glucoza, galactoza, ramnoza, xiloza și arabinoza [25, 26].

Biosinteza antocianinelor – este prezentată în cadrul subcapitolului I.5.5 dedicat acestor pigmenți.

I.3. DISTRIBUȚIA COMPUȘILOR FENOLICI ÎN PLANTE

Compușii fenolici sunt sintetizați în țesuturile plantelor [30], fiind deci prezenți în toate produsele naturale folosite în practică. Industria alimentară a încorporat acești compuși în produsele sale finite pentru a preveni oxidarea lipidică care poate cauza degradarea alimentelor bogate în lipide. Fructele și legumele sunt surse excelente de compuși fenolici. De menționat că, antocianinele constituie principalul grup de compuși fenolici din fructele de pădure [31].

Conform datelor existente în literatură, conținutul de flavonoide (în special antocianine) în fructele de pădure este foarte variat. Acesta a fost estimat de numeroase grupuri de cercetători prin diverse metode. O selecție a datelor din literatură este prezentată în tabelul 1 [31, 32].

Tabelul 1.

Date selectate din literatură referitor la conținutul în antocianine a fructelor de pădure

Fructe	Conținut antocianine (mg·kg ⁻¹)
Mure	1150
Coacăze negre	825-4200
Afine negre	500-1200
Afine roșii	600-780
Zmeură neagră	1700-4277
Zmeură roșie	100-600
Căpșuni	150-350

Variația conținutului în compuși fenolici în aceeași specie se datorează în special diferențelor dintre varietățile de fructe de pădure [33] sau condițiilor de creștere (climă, sol) [20, 34, 35].

Ehlenfeldt și Prior [36] au făcut cercetari asupra conținutului în fenoli a mai multor varietăți de fructe de pădure și au raportat un conținut în aceste fructe relativ ridicat. De exemplu în afine (*Vaccinium myrtillus*) conținutul de fenoli variază între 490 respectiv 1990 mg acid galic/kg fructe.

Distribuția compușilor fenolici în fructe nu este egală la nivel subcelular și în țesuturi [20]. Cunoașterea distribuției acestora este importantă pentru a optimiza producția de compuși fenolici din produsele obținute din fructe și legume [37]. Acești compuși se depozitează în special în peretele celular unde se acumulează lignina și alte molecule mai simple (flavonoide și esterii acidului ferulic), și în vacuole unde se stochează compușii fenolici și derivații acestora [38]. În struguri, glicozidele flavonolice, antocianinele și esterii hidroxicinamici se acumulează în vacuolele celulelor subepidermale [39].

Acumularea de compuși fenolici solubili este mai mare în țesuturile externe ale fructelor cărnose, la nivel epidermal și subepidermal față de țesuturile interne (mezocarp și pulpă) [20, 40]. Întrucât formarea compușilor fenolici este influențată pozitiv de lumină, aceștia se găsesc în special în coaja fructelor. Antocianinele pot fi distribuite în tot fructul, însă în fragi, zmeură, stafide și alte fructe se găsesc în special în partea externă. De asemenea catechinele și taninurile sunt mai abundente spre partea exterioară a fructelor decât în țesuturile interne. Nivele ridicate de acizi hidroxicinamici și în special de derivați ai acidului cafeic s-au găsit adesea în partea externă a fructelor coapte [20].

Modificări ce apar în timpul creșterii, maturării, depozitării, procesării

Acumularea compușilor fenolici variază mult în stadiul de dezvoltare al fructelor. Numeroase investigații au confirmat faptul că, concentrațiile compușilor fenolici sunt în general ridicate în țesuturile fructelor tinere [20]. În particular, antocianinele se găsesc adesea în cantități mari pe suprafețele lăstarilor tineri. În fructe, conținutul total de compuși fenolici (mg/g fructe) scade în timpul creșterii, dar se pot observa două fenomene distincte. Fie nivelul acestora continuă să scadă ferm, cum se întâmplă în cazul speciilor albe sau varietăți colorate (struguri albi de masă, mango, banane), fie crește la sfârșitul maturării fructului, cum se întâmplă în cazul fructelor roșii în care se acumulează antocianine sau flavonoide [20, 41].

În zmeura roșie și neagră conținutul de pigmenți antocianici și fenoli totali crește odată cu maturarea fructelor [42]. De asemenea în fructele mature de afine și coacăze, la recoltare are loc creșterea concentrației în antocianine și fenoli totali [33]. Similar, în cazul coacăzelor negre, cantitatea de flavonoli, în special de glicozide ale quercetinei și în particular miricetina, crește pronunțat în timpul coacerii. În afine conținutul în miricetină în fructele coapte este de asemenea mai ridicat decât în fructele necoapte. Pe de altă parte, în majoritatea fructelor (stafide, cireșe, afine, etc.) concentrațiile în kaemferol și glicozidele quercetinei sunt mai scăzute în fructele coapte decât în cele necoapte [43].

Depozitarea fructelor poate de asemenea afecta conținutul de polifenoli care sunt ușor oxidabili. Rezultatele reacțiilor de oxidare în cazul fructelor și legumelor se observă în calitatea acestora, în special la nivelul caracteristicilor organoleptice și a culorii. Unele schimbări ce intervin pot fi

benefice (cum este în cazul ceaiului negru) sau dăunătoare (îmbrunarea fructelor) pentru acceptarea consumului [23].

Un efect pronunțat asupra conținutului în polifenoli al fructelor și legumelor îl au și metodele culinare de preparare a acestora. De exemplu, prin simpla îndepărtare a cojii fructelor și legumelor poate fi eliminată o cantitate importantă de polifenoli, deoarece aceste substanțe se găsesc de obicei în concentrații mult mai mari în partea exterioară, în coajă, decât în pulpă.

Procesarea industrială afectează de asemenea conținutul în polifenoli. Ca și decojirea fructelor, îndepărtarea semințelor la legume și decorticarea și măcinarea cerealelor poate duce la pierderea unor polifenoli. Mărunțirea țesuturilor plantelor poate duce la degradarea oxidativă a polifenolilor ca rezultat al compartimentării celulare și a contactului dintre *oxidaza polifenol citoplasmatică* și substraturile fenolice prezente în vacuole. Polifenolii sunt astfel transformați în pigmenți maronii care sunt polimerizați la grade diferite. Acest proces nedorit se poate produce, de exemplu, în timpul fabricării gemului sau a compotului din fructe. La fabricarea sucurilor de fructe scade de asemenea conținutul în flavonoide. Enzimele pectolitice folosite în timpul procesării hidrolizează de asemenea și esterii acidului hidroxicinamic. Invers, operația de macerare favorizează difuzia polifenolilor în suc, așa cum se întâmplă în timpul operației de vinificare a vinului roșu. Această macerare justifică faptul că, în vinurile roșii conținutul în polifenoli este de cel puțin 10 ori mai mare decât în vinurile albe [5].

I.4. ROLUL COMPUȘILOR FENOLICI ÎN PLANTE

Compușii fenolici prezenți în plante, legume și fructe reprezintă un grup de antioxidanți naturali, cu efecte de protecție împotriva bolilor cardiovasculare și de cancer [44].

Fenolii sunt materiale suport pentru celulele plantelor [45]. Ei sunt parte integrală a structurii pereților celulari, în special sub formă de materiale polimerice cum sunt de exemplu ligninele, și servesc ca suport mecanic și ca barieră împotriva invaziei microbiene.

Cea mai importantă funcție a flavonoidelor fenolice, în special a antocianinelor, alături de flavone și flavonoli ca și copigmenți, este contribuția lor la colorarea florilor și a fructelor. Acest lucru e important pentru atragerea insectelor și a păsărilor spre plante pentru polimerizarea și dispersia semințelor. Fenolii pot influența competiția dintre plante, fenomen numit allelopatie. În afara terpenoidelor volatile ca și compuși allelopatici pot servi fenolii simplii, acizii hidroxicinamici și acizii hidroxi-benzoici. În ultimul timp a crescut interesul asupra fenolilor, în special asupra flavonoidelor deoarece acestea pot acționa ca substanțe semnal în interacțiunile dintre plante și bacteriile fixatoare de N, în special la plantele leguminoase [26], precum și ca substanțe active în prevenirea cancerului [46].

Compușii fenolici contribuie la mecanismele de apărare ale plantelor împotriva bolilor. În mecanismele de apărare ale plantei aceștia acționează în două moduri: acționează direct asupra efectelor toxice sau se depun sub formă de lignine și acționează ca bariere [34].

Factorii de mediu au un efect major asupra conținutului în polifenoli. Acești factori pot fi pedoclimatici (tipul solului, expunerea la soare, cantitatea de ploaie) sau agronomici (cultura în sere sau câmp, culturi biologice, etc). Expunerea la lumină are un efect considerabil asupra majorității flavonoidelor. Gradul de coacere

afectează considerabil concentrațiile și proporțiile în diferiți polifenoli. În general, concentrația acizilor fenolici scade în timpul coacerii, în timp ce concentrația antocianinelor crește. Mulți polifenoli, în special acizii fenolici, sunt direct implicați în reacția plantelor la diferite tipuri de stres. Aceștia contribuie la vindecarea lignifierii locale sau a suprafețelor afectate ale plantelor; au proprietăți antimicrobiene și concentrațiile lor pot crește după infecție [5].

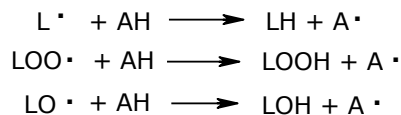
Lumina este unul dintre cei mai intens studiați factori de mediu în metabolismul fenolic [20]. Este cunoscut faptul că, compușii fenolici ajută la atenuarea intensității luminii ce ajunge la celule [47]. Conținutul în antocianidine a fructelor variază de la an la an, în funcție de radiația globală și de timpul de expunere. Compușii ce absorb radiațiile ultraviolete se acumulează mai întâi în straturile epidermice, în frunze și tulpini și tind să devină mijloace de protecție împotriva efectelor negative ale radiațiilor, împiedicând moartea celulelor prin protejarea ADN-ului celular de dimerizare sau rupere [25]. În condiții de stres termic și nutrițional (limita de fosfat) nivelul de antocianidine din mere și struguri crește. De asemenea, nivele scăzute de fier pot cauza creșterea eliberării de acizi fenolici, în timp ce tratamentul cu cantități mari de azot reduce conținutul de antocianidine din fructe și întârzie maturarea acestora.

I.4.1. Activitatea antioxidantă a compușilor fenolici

Un antioxidant poate fi definit ca „orice substanță care, prezentă chiar în concentrații scăzute, comparativ cu alte substanțe, întârzie sau inhibă semnificativ oxidarea unui substrat”. Prin convenție antioxidanții au fost împărțiți tradițional în două clase:

- antioxidanți primari sau de întrerupere a lanțului (chain-breaking);
- antioxidanți secundari sau de prevenire a oxidării.

Antioxidanții secundari sunt compuși care întârzie viteza oxidării. Aceasta poate fi realizată în mai multe moduri ce includ îndepărtarea substratului sau distrugerea oxigenului. Când sunt prezenți în urme, antioxidanții primari, AH, pot fie să întârzie sau să inhibe etapa de inițiere prin reacția cu radicalul lipidic, L, fie pot inhiba etapa de propagare prin reacția cu radicalii peroxi sau alcoxi [48, 49]:



Antioxidanții sintetici sunt des utilizați în industria alimentară și astfel sunt incluși în dieta umană. Pentru a putea fi utilizați, antioxidanții trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- să fie activi la concentrații scăzute (0,01-0,02%);
- să fie siguri pentru sănătatea consumatorilor;
- să nu manifeste nici un efect senzorial (aromă, miros neplăcut);
- să fie compatibili cu substratul.

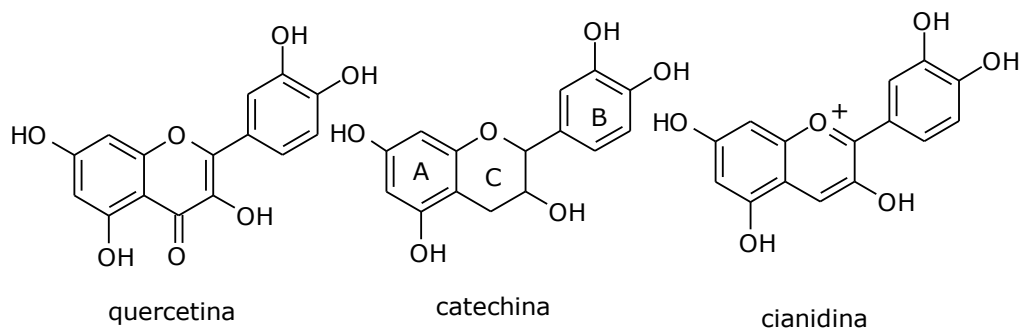
Concentrația totală dintr-un antioxidant permisă în alimente variază între 100-200 ppm.[50].

Interesul crescut de înlocuire a antioxidanților sintetici din alimente cu cei naturali a sprijinit căutarea surselor vegetale și alegerea de materii prime pentru identificarea de noi antioxidanți.

Pentru a preveni sau întârzia deteriorarea oxidativă a alimentelor, antioxidanții au fost folosiți în mare măsură ca aditivi în grăsimi, uleiuri respectiv în alimentele procesate, ceea ce a sporit interesul cercetătorilor de a înlocui antioxidanții sintetici din alimente cu antioxidanți naturali care se găsesc în majoritatea plantelor, în unele microorganisme, fungi sau chiar țesuturi animale. Majoritatea antioxidanților naturali fac parte din clasa compușilor fenolici, acizi fenolici și respectiv flavonoide [51, 52]. Compușii fenolici sunt antioxidanți naturali cu un ciclu aromatic și una sau mai multe grupări hidroxil. Polifenolii sunt agenți reducători și împreună cu alți agenți alimentari reducători, ca vitamina C, vitamina E și carotenoizii, protejează țesuturile organismelor împotriva stresului oxidativ.

Oxidarea este un proces ce are loc cu transfer de electroni de la un atom la altul. Deși oxigenul este indiscutabil esențial pentru viața organismelor, s-a dovedit că el poate participa și la distrugerea țesuturilor precum și la blocarea abilității acestora de a funcționa normal ca urmare a generării în timpul proceselor metabolice a radicalilor liberi [53, 54]. Proprietățile extrem de reactive ale oxigenului sunt cauzate de configurația sa. Oxigenul molecular are doi electroni neîmperecheați, fiecare dintre ei fiind localizați pe un orbital n^* , având același număr de spin. O creștere a reactivității O_2 se traduce printr-un fenomen identic pentru lungimea legăturii dintre cei doi atomi de oxigen și desigur printr-o energie de legătură joasă. Aceasta inițiază reacțiile radicalice și generează radicali liberi foarte nocivi cum sunt: oxigenul singlet 1O_2 , superoxidul O_2^- , radicalul hidroxil $HO\cdot$, radical peroxid $HO_2\cdot$, peroxidul de hidrogen H_2O_2 , ozonul O_3 [5, 21].

Activitatea antioxidantă a compușilor polifenolici depinde de structura moleculară, de numărul și poziția grupărilor OH [55, 56].



Prezența grupărilor OH pe ciclul B cât și prezența grupării carbonil și a dublei legături la $C_2 - C_3$ duc la creșterea activității antioxidante. Un studiu realizat de un grup de cercetători [55], asupra mai multor clase de compuși fenolici, a confirmat aceste date. Conform acestuia, quercetina care are număr egal de grupări OH și poziționate în același fel ca și în molecula catechinei manifestă o activitate antioxidantă mai mare. Acest fapt se explică datorită prezenței dublei legături din ciclul C față de heterociclul saturat al catechinei. Cianidina care are o structură asemănătoare cu a quercetinei manifestă și o activitate antioxidantă apropiată de a acesteia.

Extracția antioxidanților

În funcție de solubilitatea lor, compușii cu activitate antioxidantă pot fi clasificați fizic în două grupe:

- antioxidanți hidrofilii – cum sunt majoritatea compușilor polifenolici și vitamina C;
- antioxidanți lipofili – în special carotenoidele și vitamina E.

În cele mai multe studii de determinare a activității antioxidante, pentru obținerea extractelor s-au folosit solvenți polari ca EtOH, MeOH, acetona și apa și în consecință extractele conțin mai mulți componenți hidrofilii. Din această cauză activitatea antioxidantă a materialului supus extracției nu reflectă activitatea antioxidantă totală a acestuia. Pentru măsurarea activității antioxidante totale este necesară obținerea ambelor tipuri de extracte, atât hidrofilic cât și lipofilic.

În 2004 Prior și colaboratorii [57] au evaluat activitatea antioxidantă a 28 de produse alimentare, inclusiv fructe și legume. Rezultatele au indicat faptul că, toate fructele și legumele, cu excepția fructelor de avocado și zmeură au activitate antioxidantă lipofilică foarte scăzută, cu valori ce reprezintă mai puțin de 5% din activitatea antioxidantă totală. De aici s-a desprins concluzia, că în general fracțiunile hidrofile ale celor mai multe extracte din fructe și legume au o activitate antioxidantă mult mai ridicată decât fracțiunile lipofile.

În 2005 Prior și colaboratorii au indicat de asemenea că există câțiva factori cu mare impact asupra activității antioxidante a fructelor și legumelor; acești factori includ condițiile geografice, condițiile de mediu, perioada de recoltare, factorii genetici [58].

Metode de determinare a activității antioxidante a compușilor fenolici

Metodele folosite pentru determinarea activității antioxidante a alimentelor au evoluat de la metode chimice pentru substraturi lipidice la metode mai complexe de măsurare a capacității antioxidante în fluide și probe biologice. În cazul alimentelor este necesară determinarea eficacității antioxidanților naturali pentru protejarea împotriva deteriorării oxidative, pentru prevenirea modificărilor nesănătoase respectiv nedorite și pierderea valorilor comerciale și nutriționale [59].

Activitatea antioxidantă nu poate fi măsurată direct ci mai degrabă prin efectele de controlare a gradului de oxidare [48].

Pentru evaluarea activității antioxidante a compușilor naturali din alimente sau sisteme biologice se folosesc diverse metode, care utilizează diferiți generatori de radicali liberi, sunt rapide, simple și nu necesită echipamente speciale.

In vitro radicalii liberi cel mai des utilizați sunt acidul 2,2'-azinobis (3-etil-benzotiazolin-6- sulfonic) (ABTS) și 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Alte metode des folosite sunt metoda ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity assay*) și metoda FRAP (*Ferric ion reducing antioxidant power assay*) [60].

Majoritatea metodelor de determinare a activității antioxidante se bazează pe teste comune precum cele prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2.
Metode de exprimare a rezultatelor testelor de determinare a activității antioxidante
 [61]

Metoda	Rezultatul
Perioada de inducție	h, d
Perioada de pre-inducție (timpul de reacție la suprafața oxidării)	h, d
Gradul de oxidare	$\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$
Concentrația pentru producerea unui efect echivalent cu al unui antioxidant de referință	$\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$, $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Concentrația grupei funcționale după o perioadă de timp	$\text{miliechiv}\cdot\text{kg}^{-1}$
Concentrația produsului de oxidare după o perioadă de timp	$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ppm w/w)
Parametrul măsurat după o perioadă de timp	absorbantă, conductivitate, etc.

* h=ore, d=zile

Pentru o siguranță mai mare în privința rezultatelor care atestă activitatea antioxidantă a extractelor naturale, de cele mai multe ori, determinarea acestora nu se face printr-o singură metodă [62].

Metoda ORAC (Oxygen radical absorbance capacity assay)

Este o metodă folosită pentru măsurarea capacității antioxidante în industria alimentară, farmaceutică și cosmetică. Această metodă a fost pusă la punct de Cao și colaboratorii [63] și îmbunătățită mai târziu de Prior și colaboratorii [64]. Metoda implică folosirea unui generator de radicali hidrofili și a unei substanțe care detectează acești radicali (ficoeritrina, PE), o proteină izolată din *Porphyridium cruentum*. Ca generator de radicali liberi se utilizează un azo-compus, 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroclorid. Pierderea fluorescenței β -PE în urma reacției de oxidare se urmărește la 495 nm. Dezavantajul utilizării β -PE este că rezultatele variază la replicare, β -PE nu este fotostabilă, de aceea reproductibilitatea rezultatelor nu este asigurată. De asemenea β -PE poate interacționa cu polifenolii prezenți în probe datorită proteinei de legare. Din acest motiv Prior și colaboratorii au înlocuit β -PE cu Fluoresceina (FL), (3',6'-dihidroxispiro[izobenzenfuran-1[3H],9'[9H]-xanten]-3-ona). FL este relativ stabilă în comparație cu β -PE, are sensibilitate ridicată și este ușor de detectat prin fluorescență.

Metoda ORAC nu măsoară activitatea antioxidantă a probelor față de toți radicalii liberi, ci doar pentru *radicalii peroxi și hidroxi*.

Prin această metodă s-a determinat activitatea antioxidantă a 14 antocianine inclusiv a agliconilor acestora (delfinidină, cianidină, pelargonidină, malvidină, peonidină) și a derivaților ce conțin diverse zaharuri [65].

Metoda TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter)

Această metodă a fost introdusă de către grupul Ingold în vederea determinării statutului de antioxidant al plasmii umane. Ca și generator de radicali liberi se utilizează un azo-compus, ca de exemplu diclorhidratul de 2,2'-azobis-(2-amidinopropan), ABAP. Perioada de inducție în care reacțiile de oxidare de la nivelul

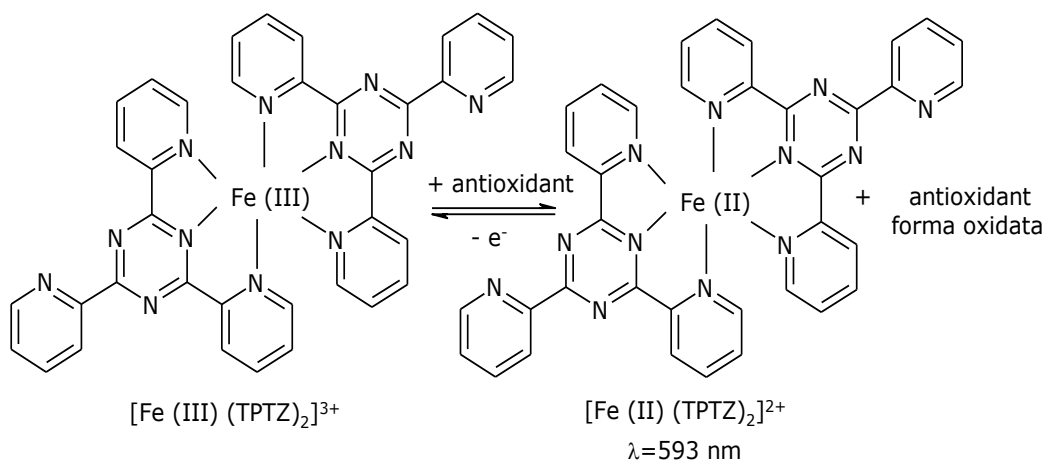
30 Stadiul cunoașterii în domeniu

plasmei sunt inhibitate de către antioxidanți este comparabilă cu cea a Troloxului (acid 6-hidroxi-2,5,7,8 tetrametil 2-carboxilic) folosit ca referință.

Această metodă poate fi de asemenea folosită pentru evaluarea activității antioxidante *in vitro* a băuturilor și alimentelor [66].

Metoda FRAP (Ferric ion reducing antioxidant power assay)

Metoda FRAP are la bază o reacție de oxido-reducere pentru măsurarea capacității probelor de a reduce Fe^{3+} la Fe^{2+} . Ca și antioxidant se folosește sarea ferică Fe(III) [67]. Reacția de oxido-reducere este a 2,4,6-tripiridil-s-triazinei (TPTZ) care după reducere prezintă un maxim de absorbție la 593 nm.



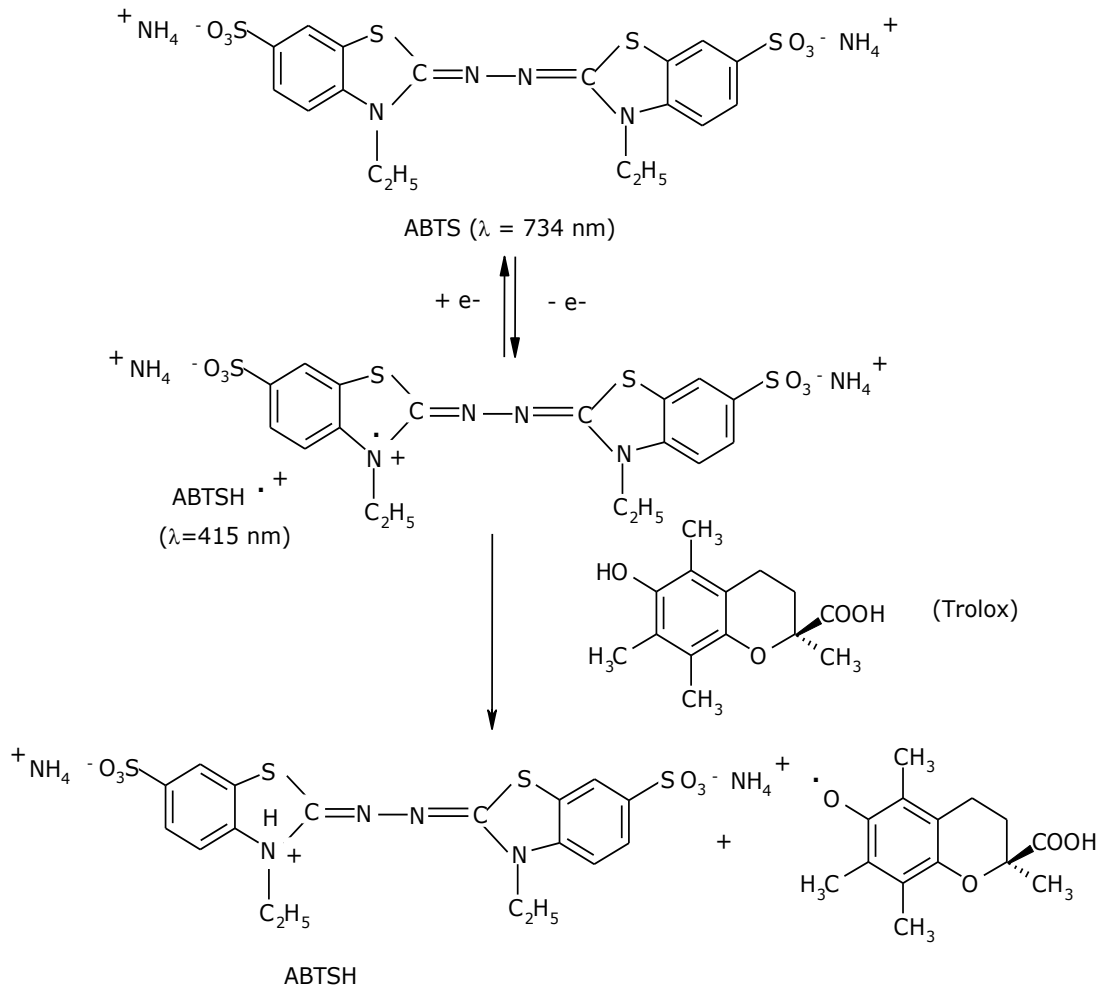
Această metodă a fost utilizată pentru determinarea activității antioxidante a polifenolilor, stabilindu-se că activitatea antioxidantă a acestora depinde de extinderea hidroxilării și conjugării [68, 69, 70] cât și a alcaloizilor totali din extractul de rostopască (*Chelidonium majus L.*) [71].

Metoda EAAT („Electrochemical antioxidant activity tester”) [72]

Metoda EAAT se bazează pe măsurarea modificărilor conductivității probei pe măsura reducerii radicalilor liberi din soluția tampon de către antioxidanți. Metoda a fost aplicată pentru determinarea activității antioxidante a sucurilor concentrate și a fructelor uscate (de exemplu afine) urmărindu-se capacitatea antioxidanților din probe de a anihila radicalul superoxid.

Metoda decolorării cationului ABTS⁺ (cationul acidului 2,2'-azino-bis(3-etil-benzotiazolina 6-sulfonic) [48, 59, 73]

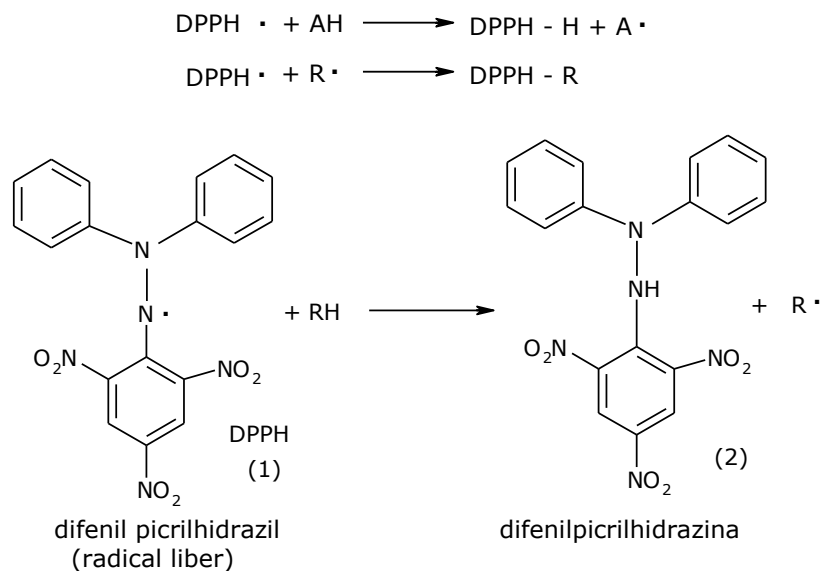
Acidul 2,2'-azino-bis(3-etil-benzotiazolina 6-sulfonic) este un alt reactiv folosit frecvent pentru determinarea activității antioxidante *in vitro*.



Metoda ABTS măsoară abilitatea relativă a antioxidantului de a „capta și stinge” radicalul ABTS $^+$ generat în faza apoasă comparativ cu un standard, Trolox (analogul hidrosolubil al vitaminei E). Radicalul ABTS \cdot^+ prezintă un spectru de absorbție maxim principal la 415 nm, și maxime secundare la 660, 734 și 820 nm. În general reducerea radicalului ABTS \cdot^+ albastru-verzui se măsoară în suspensie la lungimea de undă 743 nm.

*Metoda bazată pe generarea și captarea de radicali DPPH
(2,2-difenil-1-picril-hidrazil)*

Molecula de DPPH este un radical liber, stabil cu maxim de absorbție la 515 nm [74]. Când aceasta reacționează cu un antioxidant care poate dona un proton, se formează forma redusă concomitent cu modificarea colorației de la violet la galben și scăderea absorbanței la 515 nm. Mecanismul reacției este:



Metoda DPPH se folosește pentru determinarea activității antioxidante/antiradicalice a compușilor fenolici puri precum și a extractelor naturale [75]. Metoda inițială [76] a utilizat ca antioxidant gruparea tiol conținută în aminoacidul cisteină, urmărind reacția dintre radicalul DPPH și molecula de cisteină (1:1). Ulterior metoda a fost simplificată ajungându-se la concluzia că deși unele reacții sunt mai complexe nu este necesar ca acestea să decurgă mol la mol. Totuși această metodă are și unele limitări. Unii cercetători au raportat că cei mai mulți compuși fenolici reacționează lent cu DPPH, fiind necesare 1-6 ore. Aceasta sugerează faptul că, folosind DPPH activitatea antioxidantă trebuie evaluată în timp iar interferarea culorii DPPH-ului în timp cu cea a probelor ce conțin antocianine va duce la o subestimare a activității antioxidante.

În 1995 Brand-Williams și colaboratorii [77] au descoperit că unii compuși cu activitate antioxidantă reacționează cinetic diferit cu DPPH. De exemplu, antioxidanți ca terț-butilhidroxitoluenul (BHT) și acidul protocatehic nu ating punctul maxim al reacției decât după 3 respectiv 2 ore, în timp ce compuși ca acidul ascorbic, izoascorbic și izoeugenol reacționează imediat, în timp de câteva minute. La stadiul de maxim al reacției cu DPPH s-a observat că există o corelare stoichiometrică a acestora cu cantitatea de antioxidant prezentă.

Pentru interpretarea rezultatelor metodei DPPH s-a introdus un parametru denumit „concentrație eficientă” sau valoarea IC_{50} (sau EC_{50} , cum o numesc unii autori), definită ca valoarea concentrației substratului ce determină reducerea cu 50% a activității DPPH [78].

Prin această metodă s-au determinat proprietățile antioxidante ale extractelor metanolice din frunze de *Liriope spicata* L. [79], a extractului antocianic obținut din roșii dulci [80], a unor flavonoide extrase din plante medicinale [81].

A fost raportată chiar și o metodă HPLC de evaluare a activității antioxidante a unor alimente (în special băuturi vinuri, ceai, sucuri etc.) care utilizează radicalul 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) [82].

Metoda bazată pe acțiunea antioxidantă a permanganatului de potasiu în mediu acid
[83]

Această metodă a fost aplicată pentru determinarea activității antioxidante a sucurilor naturale din diferite fructe și se bazează pe acțiunea antioxidantă a permanganatului de potasiu în mediu acid asupra majorității substanțelor reducătoare vegetale. Principiul metodei constă în determinarea vitezei de decolorare a unei soluții 0,1 N de KMnO_4 în mediu acid, care conține produs de analizat, utilizând ca etalon o soluție de acid ascorbic.

Metoda de determinare a activității antioxidante a extractelor vegetale adăugate în sisteme lipidice prin măsurarea indicelui de peroxid

Activitatea antioxidantă a diverselor specii de plante cauzată în special de compușii fenolici a fost demonstrată în ultimii ani prin foarte multe studii.

Activitatea antioxidantă a compușilor se determină prin urmărirea evoluției în timp a valorilor indicilor de peroxid a probelor de grăsime (ulei) tratate cu antioxidanți sintetici sau naturali și se calculează ca variația, exprimată în procente, a indicelui de peroxid al probelor (grăsime + antioxidant) față de o probă martor, conform ecuației:

$$\% \text{ Activitate antioxidantă} = 100 \cdot \left[1 - \frac{IP_s}{IP_c} \right]$$

unde: IP_s = variația indicilor de peroxid a probelor de ulei cu adaos de antioxidanți;

IP_c = variația indicilor de peroxid a uleiului control.

Prin această metodă s-a determinat activitatea antioxidantă a unor flavonoide (apigenina, luteolina, kaemferolul, miricetina) folosite ca adaos la uleiul de floarea soarelui menținut la 98°C. Indicele de peroxid s-a măsurat periodic la fiecare 60 minute, timp de 300 minute [84].

Metoda a fost aplicată și de către colectivul nostru de cercetare pe uleiul de floarea soarelui cu adaos de extracte din frunze respectiv fructe de *Ziziphus jujuba*, *Ziziphus lotus*, extracte din frunze de *Hydrangea paniculata*, *Hydrangea aspera*. Rezultatele obținute au făcut obiectul unei lucrări științifice cotate ISI [85] precum și a unei părți dintr-o teză de doctorat [86].

Metoda de evaluare a activității antioxidante bazată pe sistemul

β -caroten/acid linoleic [87]

Metoda se bazează pe oxidarea unei emulsii de β -caroten/acid linoleic, oxidare care este urmărită spectrofotometric la 470 nm. Folosind această metodă a fost elucidată relația dintre structura a 42 flavonoide și activitatea lor antioxidantă [88].

Metoda de prevenire a pierderii oxidative a β -carotenului în sistemul β -caroten/acid linoleic a fost folosită de asemenea pentru evaluarea abilității antioxidante a extractului de lotus [89].

O metodă înrudită este cea a autooxidării linoleatului de metil. Aceasta are la bază oxidarea linoleatului de metil în prezența unor antioxidanți și se utilizează îndeosebi pentru studiul activității antioxidante a fructelor comestibile și necomestibile. Prin această metodă s-a determinat activitatea antioxidantă a 92 extracte fenolice obținute din materiale vegetale comestibile și necomestibile (fructe de pădure, legume, plante, cereale, semințe etc.) [90].

Metoda chemiluminometrică utilizând luminol

Chemiluminiscența luminolului (5 - amino - 2,3 - dihidronaftalazin-1,4-dionă) implică reacția acestuia în mediu bazic cu agenți oxidanți puternici, cum ar fi apa oxigenată (H_2O_2), ducând la emisia unei lumini albastre cu lungimea de undă maximă în jurul a 420 nm. Reacția este catalizată de ioni de metal, cum este $Cu(II)$. Adăosul de substanțe cu efect antioxidant duce la reducerea intensității semnalului luminos; cu cât efectul antioxidant este mai puternic, cu atât semnalul luminos este mai scăzut [91].

Prin această metodă a fost determinată activitatea antioxidantă a unor catechine, antocianine [92], precum și a unor flavonoide (quercetină, amestecuri de izoflavone) [93].

I.5. CHIMIA ANTOCIANIDINELOR ȘI ANTOCIANINELOR

Pentru consumatori culoarea este unul din cele mai importante atribute ale calității. Impresia inițială despre calitatea produsului alimentar e judecată pe baza aparențelor vizuale. Astfel, pigmenții naturali existenți în alimente, care sunt componenții primari ce absorb energia luminoasă în vizibil, furnizează culoarea și reprezintă cei mai importanți constituenți alimentari care dau informații imediate asupra calității alimentelor.

Măsurarea prezenței pigmenților naturali și sintetici în alimente este o provocare analitică pentru chimia alimentară. Diversitatea și complexitatea pigmenților naturali existenți și a derivaților lor complică măsurarea analitică. Cei mai mulți pigmenți naturali sunt labili și se pot degrada la alți compuși colorați, în special în timpul tratamentului termic al alimentelor.

În cadrul lumii plantelor, cei mai abundenți pigmenți sunt cei liposolubili, clorofilele și carotenoizii. Pigmenții carotenoidici sunt adesea mascați de către pigmenții clorofilieni verzi, cu excepția toamnei, când culoarea galben-oranj a carotenoizilor devine evidentă [94].

Pigmenții care dau culoarea roșie și albastră florilor și fructelor sunt, în general, antocianidine și se găsesc ca glicozizi numiți antocianine [8].

Antocianinele – sunt pigmenți vegetali, solubili în apă ce fac parte din grupa flavonoidelor a compușilor fenolici. Acești pigmenți sunt cei mai larg răspândiți în lumea plantelor, responsabili pentru culorile roșie, albastră, violetă a florilor, fructelor și altor organe ale plantelor; varietatea culorii este imprimată de pH-ul sucului celular și de microelementele din organismul vegetal, cu care se combină [95, 96]. Formarea acestor pigmenți se realizează la lumină, în lipsa acestora rezultând leucoantociani sau proantociani (substanțe incolore), ce la rândul lor prin oxidare sau în prezența luminii se transformă în antocianine [18].

Termenul „antocian” este de origine etimologică greacă: „anthos” – floarea și „cyanos” – albastru.

În perioada 1995-1997 Harborne și colaboratorii au identificat prezența în plante a 85 antocianine noi [97], iar în perioada 1998-2001 au mai identificat 50 antocianine noi în special în țesuturile florilor [98].

Răspândire: pigmentii antocianici sunt prezenți la *Angiospermae*, în familiile *Rosaceae*, *Moraceae*, *Rhamnaceae*, *Polygonaceae*, *Berberidaceae*, *Saxifragaceae*, *Malvaceae*, *Ericaceae* (*Vaccinium myrtillus*, *Vaccinium vitis-idaea*), *Liliaceae* etc., și mai rar în plantele inferioare [30].

I.5.1. Structura chimică și clasificare

Antocianinele în forma lor cea mai stabilă sunt derivați hidroxilați, metoxilați și acilați ai 2-fenilbenzopirenilului, glicozidați sau nu.

Cationul de 2-fenilbenzopiriliu se prezintă grafic cu heteroatomul în partea superioară, restul fenilic fiind situat în dreapta, indiferent de numărul și volumul substituenților atașați nucleului flavilic. Numerotarea nucleului benzopirilic A începe de la heteroatom, pozițiile se notează cu cifre arabe. Pozițiile în nucleul fenilic B se numără conform principiilor acceptate unanim – cu cifre arabe cu exponentul prim.

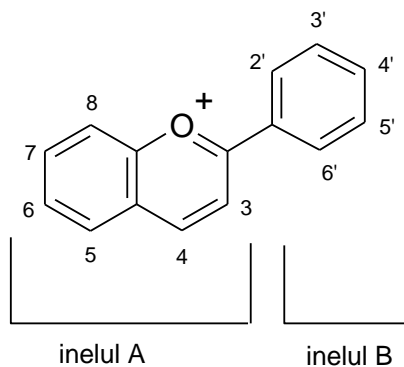


Figura 4. - Structura și numerotarea cationului de flaviliu

Este bine de menționat faptul că, pigmentii cu structură flavilică se caracterizează printr-o diversitate mare datorită variațiilor structurale în funcție de pH și de complexare, manifestând practic toate culorile spectrului [99].

În structura lor moleculară, antocianinele conțin un atom de oxigen oxonic iar în funcție de pH-ul mediului pot prezenta mai mulți ioni: un ion oxoniu (roșu) ce se formează în mediu acid, doi cationi carboniu (incolori) în mediu neutru și trei ioni fenoxoniu (violet) în mediul slab alcalin, care în mediu puternic alcalin formează fenoxizi de culoare albastră sau verde.

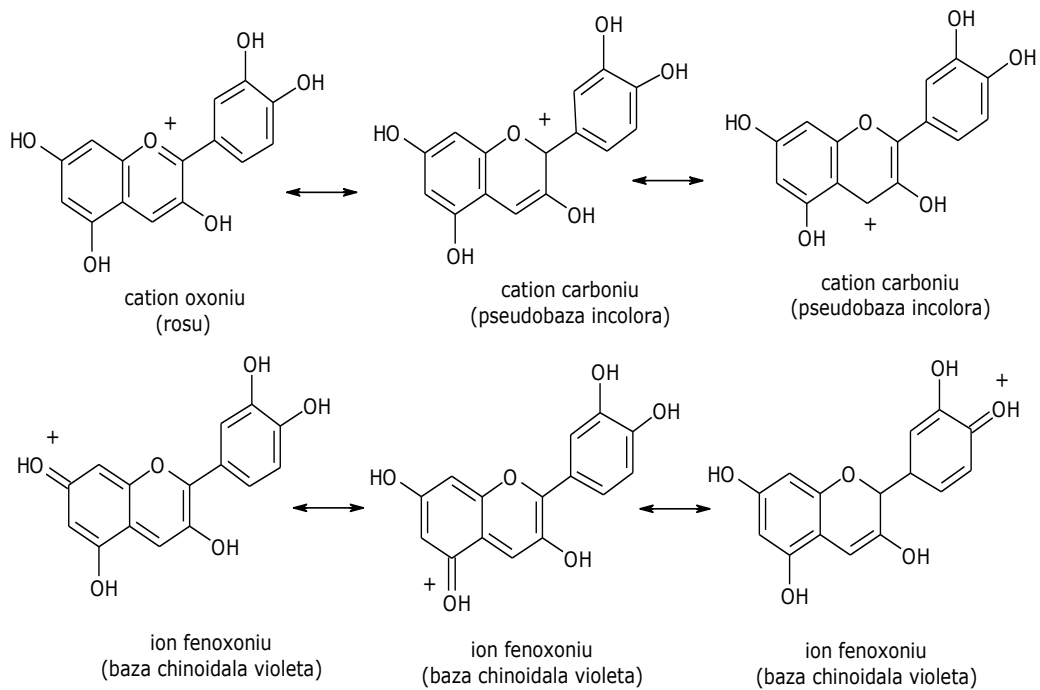


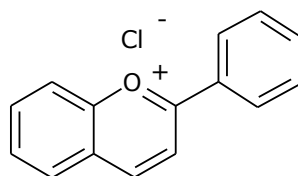
Figura 5. - Structura chimică a ionilor antocianidolilor

Antocianinele se acumulează în vacuolele celulelor ce alcătuiesc țesuturile epidermice, unde nucleul de flaviliu este legat cu resturile hidraților de carbon sau ale acizilor carboxilici proprii plantelor. Structurile care conțin doar nucleu fenilbenzopiranic se numesc **antocianidine** sau **antocianide**, pentru care se folosește termenul de **aglicon**. Agliconul conține legături duble conjugate responsabile de absorbția luminii în jur de 500 nm, cauzând apariția culorii roșii. **Agliconii antocianidinici** sunt de obicei penta- (3,5,7,3', 4') sau hexa-substituiți (3, 5, 7, 3', 4', 5'). Până astăzi se cunosc 22 antocianidine diferite (tabelul 3), dar numai 6 dintre ele sunt întâlnite cel mai des în plante.

Tabelul 3.*Principalele antocianidine cunoscute până astăzi [100]*

Antocianidina	Poziția substituită							Culoare
	3	5	6	7	3'	4'	5'	
Carajurina	H	H	OH	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	—
Arabidina	H	H	OH	OH	H	OH	OCH ₃	—
3'-Hidroxiarabidina	H	H	OH	OH	OH	OH	OCH ₃	—
Apigenina	H	OH	H	OH	H	OH	H	oranj
Luteolina	H	OH	H	OH	OH	OH	H	oranj
Tricetinidina	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	roșu
Pelargonidina	OH	OH	H	OH	H	OH	H	oramj
Auratinidina	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	oranj
Cianidina	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	roșu oranj
5-Metilcianidina	OH	OCH ₃	H	OH	OH	OH	H	roșu oranj
Peonidina	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	H	roșu
Rosinidina	OH	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	roșu
6-Hidroxicianidina	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H	roșu
6-Hidroxidelfinidina	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	roșu albastrui
Delfinidina	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	roșu albastrui
Petunidina	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	OH	roșu albastrui
Malvidina	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	roșu albastrui
Pulchellidina	OH	OCH ₃	H	OH	OH	OH	OH	roșu albastrui
Eupinidina	OH	OCH ₃	H	OH	OCH ₃	OH	OH	roșu albastrui
Capensinidina	OH	OCH ₃	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	roșu albastrui
Hirsutidina	OH	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃	roșu albastrui
Ricciodina A	OH	H	OH	OH	H	OH	H	—

Antocianidinele fiind derivați ai 2-fenil-a cromenei, au datorită prezenței în heterociclu a două duble legături, tendință pronunțată de a se stabili în formă aromatică, trecând în cationi ai unor săruri de piriliu, numite săruri de flaviliu, cu sarcina pozitivă la atomul de oxigen. De fapt, antocianidinele și antocianinele sunt stabile numai sub formă de cationi, izolându-se de obicei din plante sub formă de cloruri [8].



sare de flaviliu
(clorura de antocianidina)

Agliconii de bază, antocianidinele ce predomină în plantele superioare (figura 6) sunt: cianidina (în florile de cicoare), delfinidina (în florile de nemțșor), pelargonidina (în florile de mușcată), peonidina, malvidina și petunidina. Denumirile acestor antocianidine provin de la speciile vegetale în care acestea au fost identificate pentru prima dată [99].

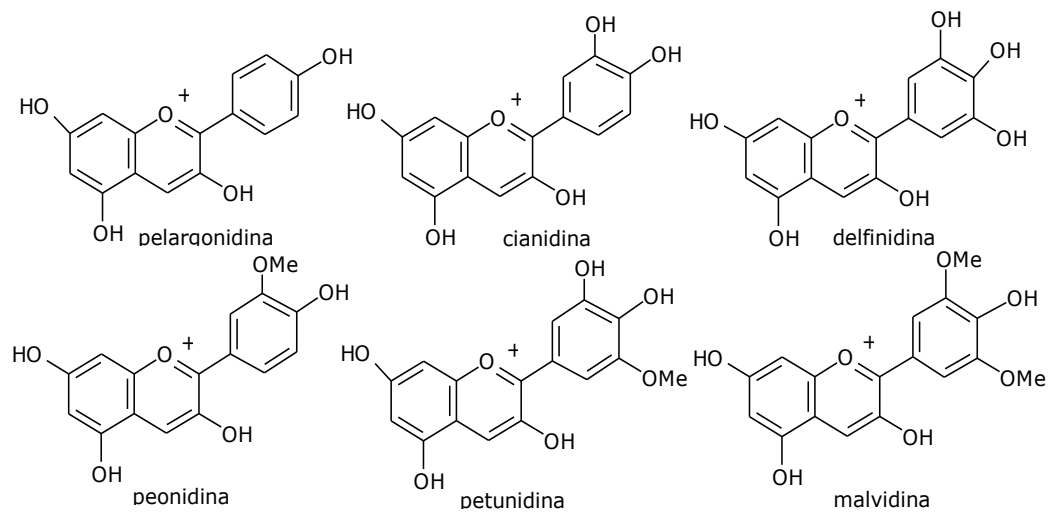


Figura 6. - Cele mai importante antocianidine naturale

După principiile nomenclurii substanțelor organice, peonidina poate fi considerată ca 3'-metoxicianidină, în timp ce petunidina și malvidina pot fi privite ca, 3'-metoxidelfinidină și respectiv ca, 3',5'-dimetoxidelfinidină [19].

Cercetările efectuate până în prezent au stabilit că cea mai răspândită antocianidină din fructe este cianidina. Ea se găsește în fragi, vișine, zmeură, coacăze negre și roșii, agrișe, răchițele, prune, afine, mere etc.

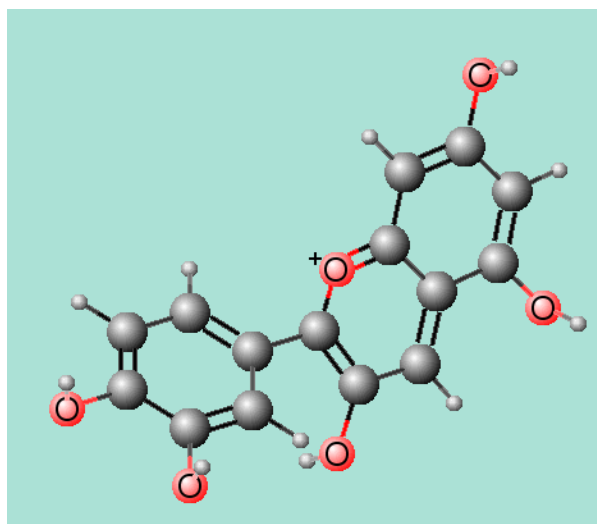


Figura 7. - Molecula cianidinei în 3D

După unii cercetători majoritatea fructelor conțin crizantemina (3-glicozidul cianidinei), în fiecare fruct existând însă în majoritatea cazurilor mai mulți pigmenți antocianici. De exemplu: în afinele negre se găsesc crizantemina, malvidin 3-monoglicozida, un monoglucozid al delfinidinei, un monozid al malvidinei, un monogalactozid al delfinidinei, 3-glicozidul pelargonidinei, un monozid al petunidinei; în afinele roși se găsește ideina, un derivat al cianidinei [3].

În fructe există o dinamică continuă a metoxilării și glicozilării antocianinelor.

I.5.2. Glicozilarea antocianinelor

Pigmenții antocianici sunt prezenți în sursele naturale sub formă de antocianine. Acestea au o mare diversitate structurală determinată de natura agentului de eterificare, de poziția diferiților substituenți, de modul de legătură între substituent și aglicon și de existența centrelor de chiralitate [99]. Prezența hidraților de carbon (figura 8) în calitate de agenți de eterificare asigură cea mai mare diversitate a antocianinelor. Cele mai multe antocianine sunt mono-, di- sau triglicozilate la gruparea hidroxil de la atomul de carbon din poziția 3.

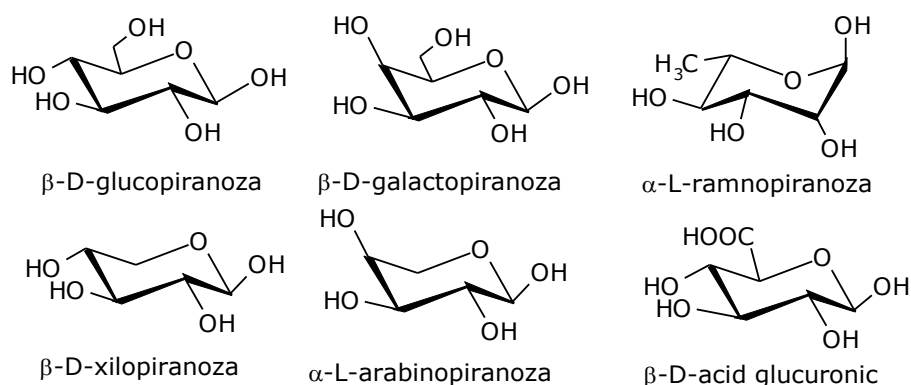


Figura 8. - Structura monozaharidelor identificate în structurile antocianinelor

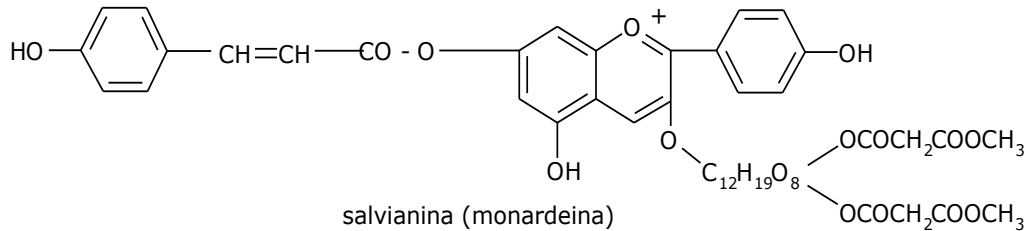
Cea mai des întâlnită monozaharidă este glucoza (90%) urmată de ramnoză, galactoză, xiloză și arabinoză. Cel mai rar identificat în structura antocianinelor este acidul glucuronic [101].

I.5.3. Acilarea antocianinelor

Un grup restrâns de antocianine îl formează cele acilate care au una sau mai multe grupări hidroxilice ale antocianidinei sau ale glucidei esterificate cu acizi fenil-propanoici [8, 12].

Unitățile de zaharuri din antocianine pot fi acilate cu grupări acil alifatic și/sau aromatice (figura 9). Cei mai răspândiți sunt esterii antocianidinelor cu acizii mono- și dicarboxilici (acetic, malonic), cu acizi fenolici (p-cumaric, ferulic, sinapic și cafeic) [99]. Astfel, salvianina, antocianină a pelargonidinei, conține 3 radicali acil,

unul al acidului p-hidroxicinamic, fixat la aglicon, și doi ai monometil esterului acidului malonic, fixați la restul de dihidrat de carbon.



Dintre grupările acil alifaticе cele mai des întâlnite sunt acidul acetic, malic, succinic, tarttric și oxalic [101] în timp ce grupările acil aromatice includ diverși acizi hidroxicinamici și doi acizi hidroxibenzoici (acidul p-hidroxibenzoic și acidul galic).

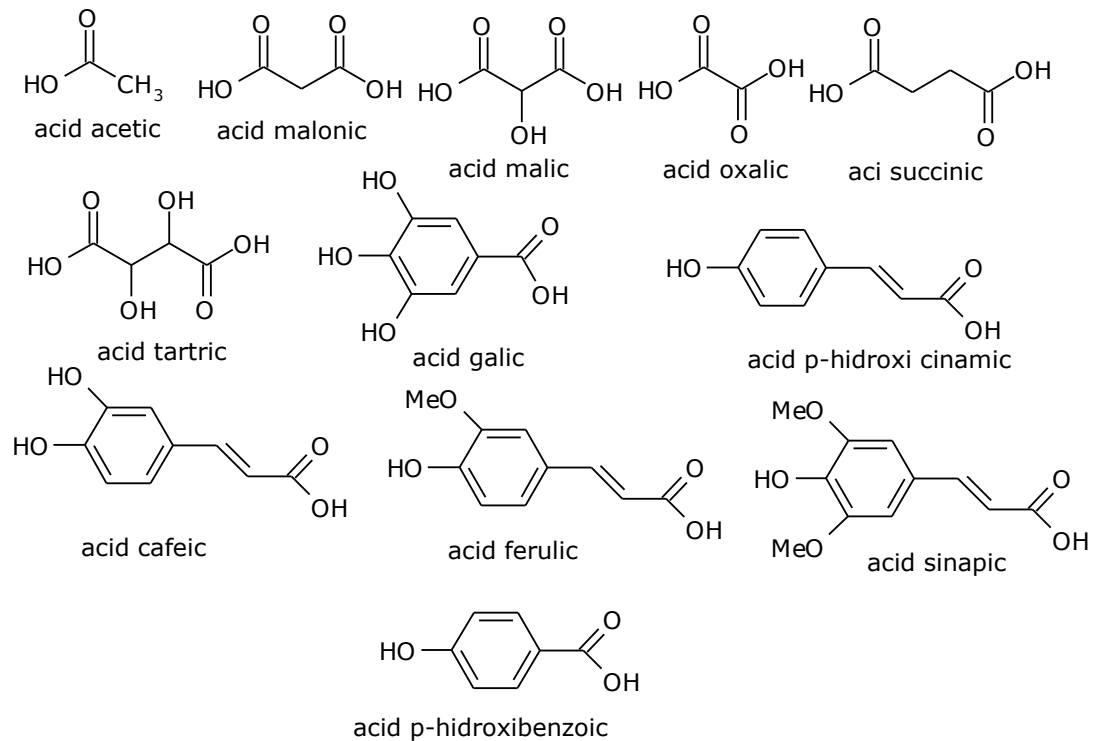


Figura 9. - Structurile substituenților acil alifatici și aromatici identificați în antocianine

Antocianidinele se găsesc însoțite și de flavonoide, mai ales de flavonolii corespunzători, ceea ce dovedește corelația biochimică dintre antocianidine și flavonoli [8].

I.5.4. Proprietăți fizico-chimice

I.5.4.1. Proprietăți fizice

Antocianinele sunt ușor solubile în apa și în dizolvanți polari; sunt însă greu solubile în eter, benzen și cloroform. Se extrag din țesutul vegetal proaspăt cu apă sau alcool acidulate (formează săruri de oxoniu colorate în roșu intens, insolubile în solvenți organici apolari). Din extractul obținut precipită, prin adăugare de eter, clorura de antocianină. Prin fierberea extractelor apoase sau alcoolice acide timp de 3 minute și păstrare la rece se depun cristale de săruri ale antocianidinelor.

Antocianinele pot fi separate de antocianidine prin repartiție între apă și acetat de etil [8]. Solubilitatea antocianinelor în apă are o importanță majoră pentru industria alimentară. Deși agliconii sunt practic insolubili în apă, glicozidele se caracterizează prin solubilitate mai ridicată. După comportamentul lor față de antocianine solvenții organici se împart în:

- „solvenți apolari” care nu dizolvă nici antocianine nici antocianidine chiar la temperaturi înalte; dintre aceștia menționăm: benzenul, hidrocarburile alifactice, acetatul de etil, eterul de petrol, etc.;
- „solvenți organici polari” care dizolvă atât antocianidinele cât și antocianinele, la rece; din această clasă fac parte alcoolii inferiori (metanolul, etanolul), acetonitrilul, acetona, etc.;
- „solvenți amfipolari” care asigură o solubilitate medie antocianinelor în comparație cu celelalte tipuri de solvenți (alcoolii alifatici: butanolii, pentanolii).

Antocianinele sunt foarte sensibile la modificarea acidității extractantului. În funcție de valoarea pH-ului antocianinele pot exista în 3 forme de bază: cationică, neutră și anionică (figura 10). Transformările acido-bazice ale antocianinelor servesc ca material pentru studiul echilibrului chimic. Diversitatea formelor acido-bazice ale acestora se datorează speciilor tautomere. Numărul acestora pentru aceeași structură a nucleului flavilic se apropie de numărul grupărilor hidroxil. Stabilitatea formelor acido-bazice scade în seria cationi > anioni > forme neutre, valorile timpului de înjumătățire a transformărilor fiind luni-ore-minute [102].

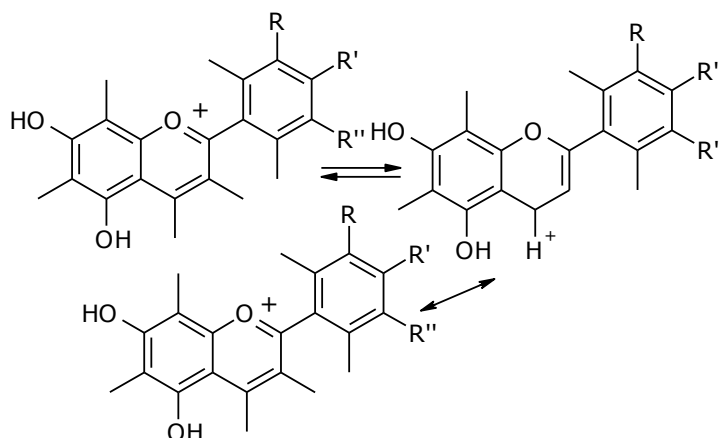


Figura 10. - Structura, tautomeria și mezomeria antocianidinelor [103]

Se știe că antocianinele se găsesc în câteva forme la echilibru (figura 11). Studii termodinamice și cinetice au condus la o schemă, acceptată în general, cu respectarea diferitelor transformări ca transfer de protoni, izomerizare și tautomerie de la cationul flaviliu (I) la antocianine simple în diverse condiții de pH.

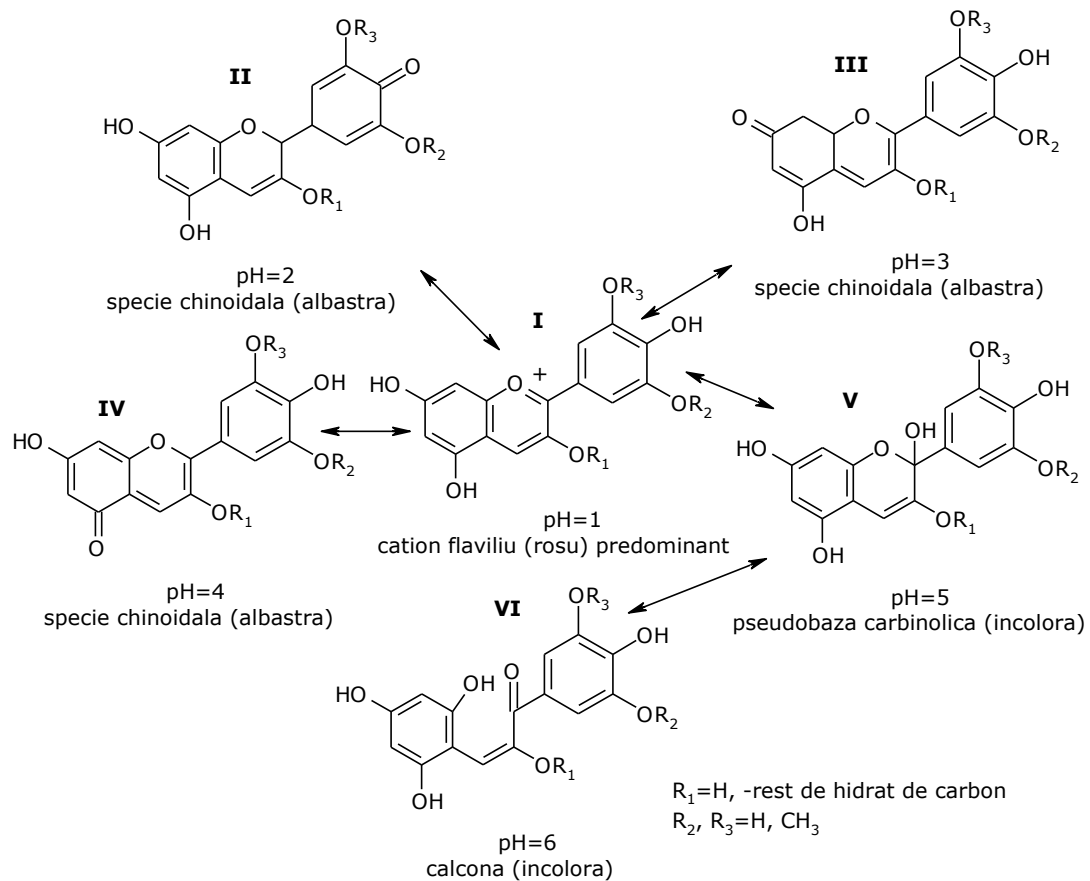


Figura 11. - Echilibrul formelor acido- bazice ale antocianinelor [104]

Datorită existenței echilibrelor de mai sus, formele anionice și în special cele neutre se vor distruge în timpul extracției. Din acest motiv este nevoie ca solventul folosit la extracție să se aciduleze cu acizi minerali sau cu acizi organici. Aciditatea ridicată a mediului de extracție stabilizează formele flavilice ale antocianinelor naturale însă, contribuie la îndepărtarea resturilor de glucide prin hidroliză, ceea ce duce la formarea agliconilor mai puțin solubili.

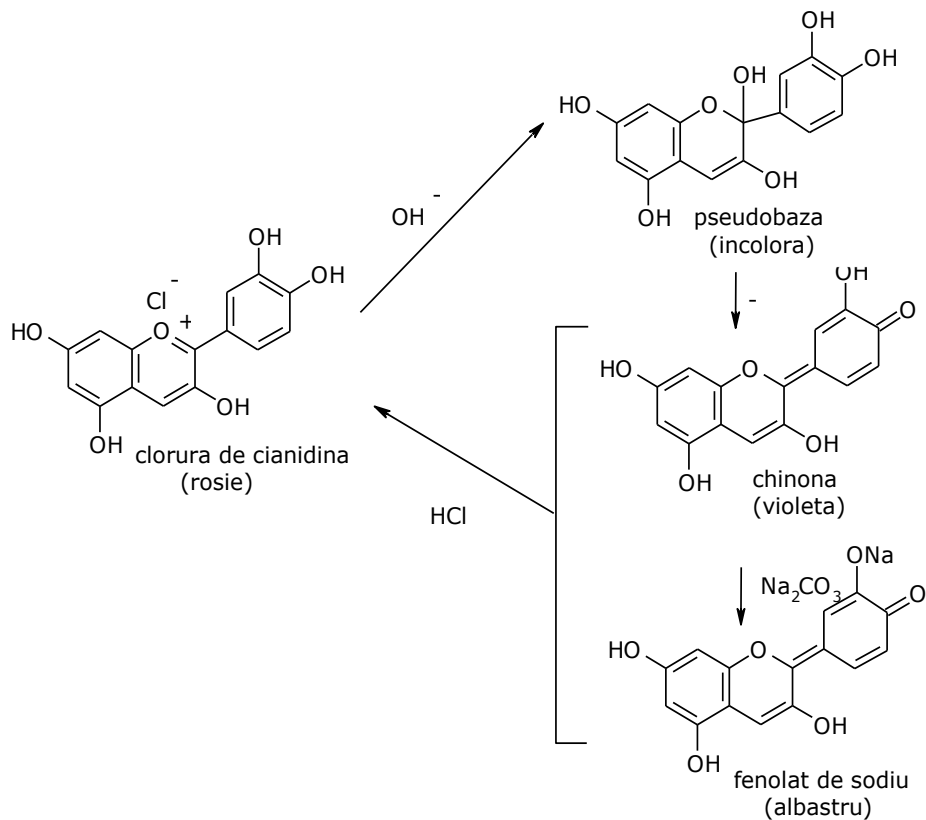
Pigmenții antocianici sunt sensibili la pH și suferă transformări structurale reversibile odată cu modificarea acestuia, ca rezultat al modificărilor majore ce au loc în spectrul de absorbție. La o valoare a pH-ului egală cu 1 predomină forma oxoniu colorată iar la pH – în jur de 5 predomină forma semicetalică, incoloră. Degradarea stabilității culorii antocianinelor după încălzire și iradiere cu lumina UV este asociată cu prezența speciilor acilate [105].

În funcție de pH-ul și conținutul în săruri a sucului vacuolar, în care sunt localizate în țesutul vegetal, antocianinele se găsesc ca săruri de flaviliu roșii, sau sub formă chinoidă violetă, sau ca săruri complexe ale formei chinoidă, albastru închis. De fapt, culoarea țesutului vegetal mai depinde și de alți factori, dintre care un rol important îl are copigmentarea. Prin copigmentare se înțelege nu numai prezența altor pigmenți însoțitori, ci și a unor substanțe incolore cum sunt flavanonele, taninurile și altele.

I.5.4.2. Proprietăți chimice

După cum s-a mai amintit, antocianidinele și antocianinele formează cu acizii minerali săruri de culoare roșie care sunt, spre deosebire de flavone, stabile la diluare cu apă. Prin încălzirea antocianinelor cu acizi are loc hidroliza, cu eliberarea antocianidinei, care cristalizează prin răcire sub formă de sare.

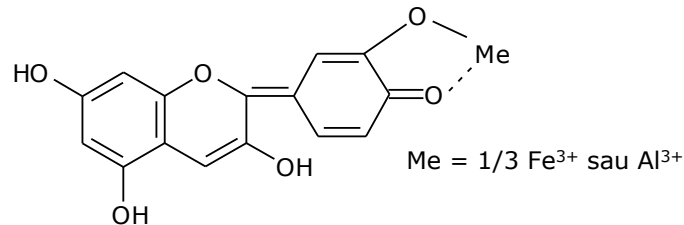
Prin tratarea cu alcalii sau cu acetat de sodiu a clorurii de antocianină sau de antocianidină, culoarea roșie trece în violet. Se formează o pseudobază cu caracter carbinolic, care elimină apă și trece într-un derivat chinonic. Prin tratare în continuare cu carbonat de sodiu, culoarea violetă se schimbă în albastru, datorită formării unui fenolat al formei chinoidă, după cum se poate observa din schemă:



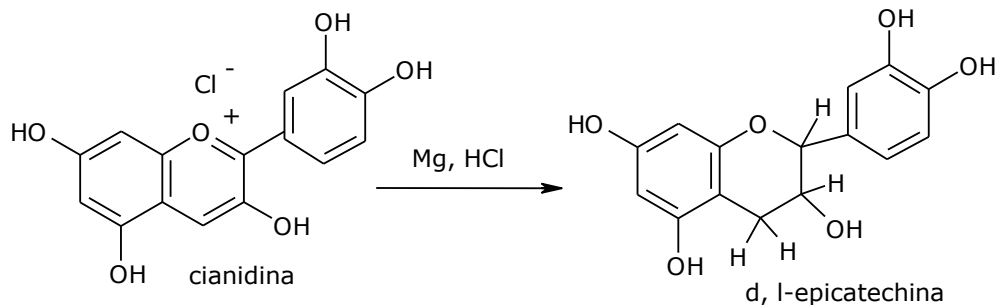
44 Stadiul cunoașterii în domeniu

Aceste transformări respectiv caracterul amfoter al compușilor explică utilizarea antocianinelor ca indicatori acido-bazici.

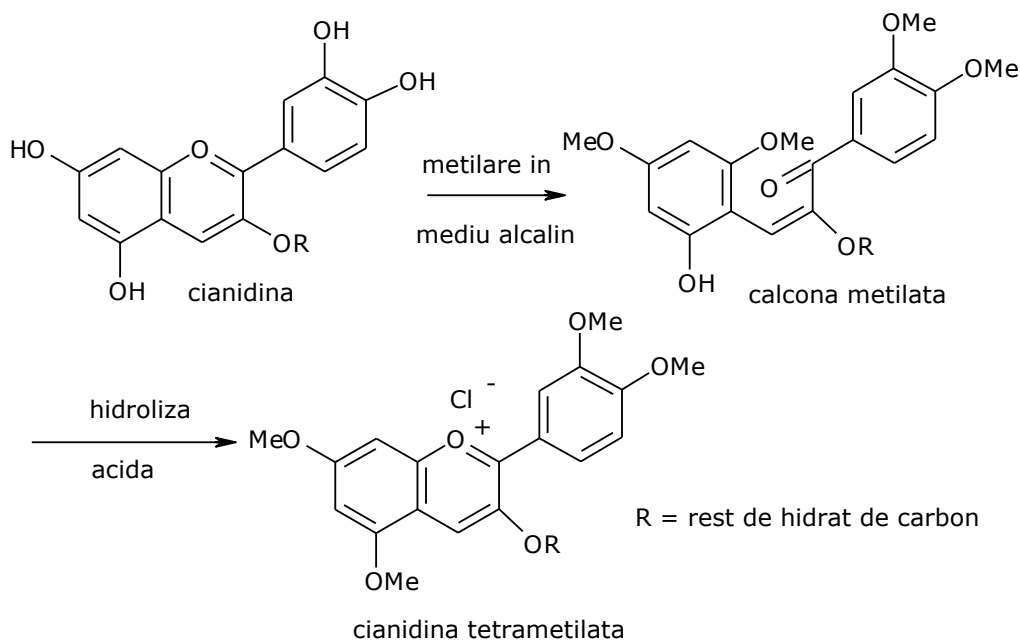
Antocianinele și antocianidinele care au pe inelul B două sau trei grupări hidroxil vicinale formează chelați cu ionii metalelor bi- și trivalente (Al^{3+} , Fe^{3+}) de culoare albastră (albastră-verzuie), cu condiția ca una din grupări să fie sub formă chinonică.



Prin reducere cu hidrogen activ (magneziu și acid clorhidric concentrat) antocianidinele trec în catechine. Astfel, din cianidină rezultă d,l-epicatechina.



După poziția ocupată de restul glucidic, diferitele antocianine pot avea unele proprietăți particulare caracteristice. Astfel, antocianinele care au restul de hidrat de carbon fixat în poziția 5 se deosebesc de celelalte antocianine prin următoarea comportare: prin metilare în soluție alcalină rezultă, din cauza mediului puternic alcalin, calcona corespunzătoare metilată, care prin hidroliză, datorită hidroxilului din poziția 5 liber, formează antocianidină tetrametilată. Când gruparea $-\text{OH}$ din poziția 5 este liberă se obține calcona metilată [8].



De asemenea, se constată deosebiri în comportarea față de soluția apoasă de clorură ferică. La tratarea soluției clorhidrice a antocianidinelor cu o soluție apoasă de FeCl_3 are loc o decolorare în decurs de 3 minute. La tratarea în aceleași condiții a antocianinelor ce au gruparea $-\text{OH}$ de la C_3 liberă, decolorarea este completă abia după 35 minute, iar în cazul antocianinelor cu un rest glucidic fixat la C_3 nu se observă decolorare nici după 3 zile [9].

I.5.5. Biosinteza antocianinelor

Pasul inițial în biosinteza tuturor flavonoidelor (figura 12) este condensarea 4-cumarat coenzimei A (derivat shikimat) cu 3 molecule de malonil coenzima A și formarea 2',4',6',4 - tetrahidroxicalconei, reacție catalizată de enzima *calconsintaza*. [26, 106, 107].

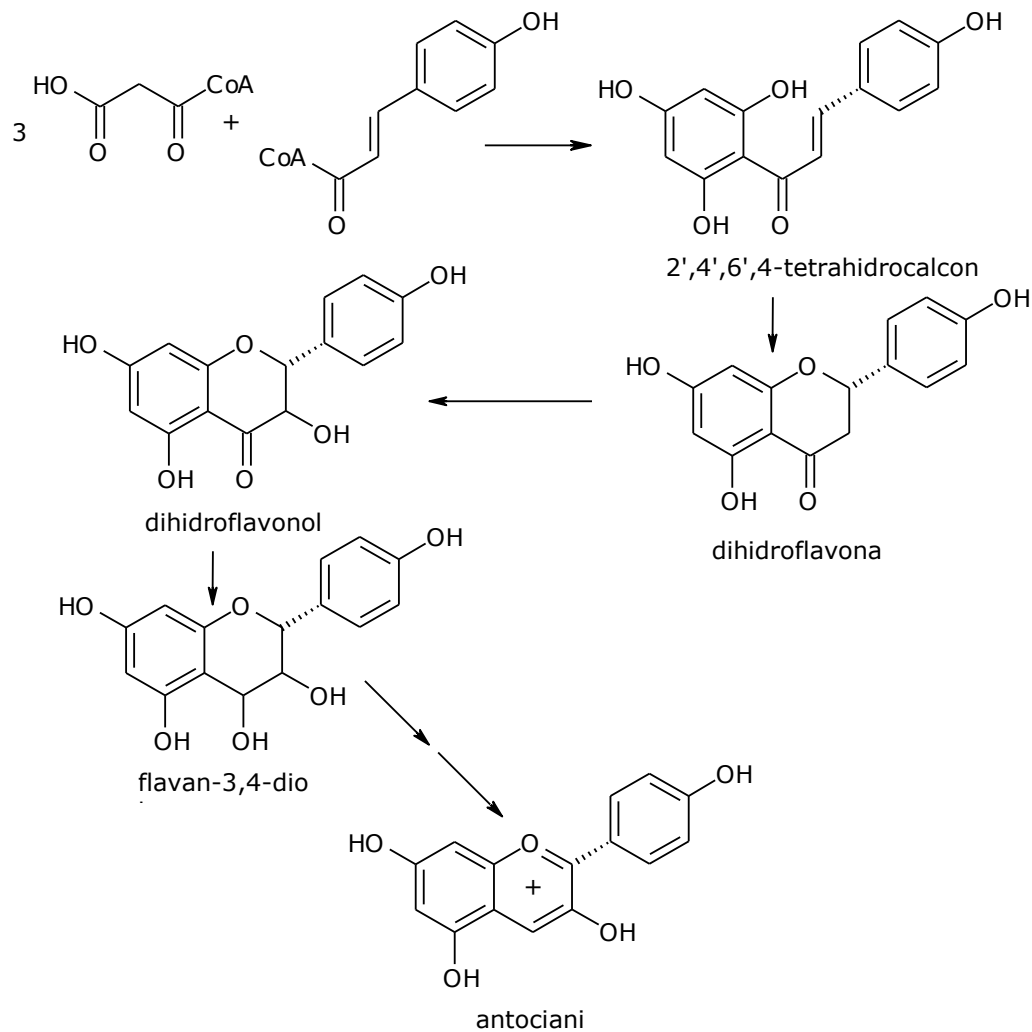


Figura 12. - Reprezentarea schematică a căii de biosinteză a antocianinelor

I.5.6. Culoarea și stabilitatea antocianinelor

Analiza pigmentilor colorați extrași din plante, legume și fructe este o problemă complexă. Una dintre cele mai bine stabilite funcții ale antocianinelor este contribuția lor la culoarea florilor și fructelor. Pentru a explica variația culorilor antocianinelor în plante, în special a nuanțelor de albastru s-au făcut eforturi considerabile. S-a dovedit că mulți factori ce includ concentrația și natura antocianinelor, formele acestora la echilibru, gradul de glicozidare și acilare, natura și concentrația copigmenților, complexele metalice, mecanismele asociațiilor intra- și intermoleculare precum și influența factorilor externi (pH-ul, natura solventului, temperatura etc.) au mare impact asupra culorii antocianinelor. Se presupune că,

copigmentarea este cel mai comun mecanism de colorare a florilor în nuanțe de albastru și alături de pH (care e probabil cel mai important factor) influențează culoarea florilor.

Copigmenții antocianici pot include și alte flavonoide precum flavonoli sau flavone. Rolul antocianinelor și al flavonelor în furnizarea unei colorații albastre stabile a florilor în *Angiospermae* a fost recent conturat de către Harborne și Williams [97, 98]. Aparent această colorare se datorează faptului că delfinidina a fost cea mai des întâlnită antocianidină în florile albastre și copigmentarea cu constituenți flavonoidici specifici a fost cel mai comun mecanism pentru modificarea culorii mov a glicozidei delfinidină la albastru [108].

Acolo unde există, complexele antocianine – flavone prezintă un raport flavonă : antocianină ridicat (de exemplu 10:1) cu excepția cazului în care este prezent și un cation metalic. Formarea chelaților metalelor polivalente (Al^{3+} , Fe^{3+} etc.) asigură diversitatea culorilor florilor în funcție de concentrația metalelor din sol. Relația dintre culoare și poziția substituită în antocianidine a fost investigată prin dezvoltarea unor modele cantitative structură-culoare. În timp ce pentru grupările hidroxil și metoxil din pozițiile 6 și 8 s-a raportat un efect hipsocromic, este interesant de notat faptul că zaharul legat la C_8 are un efect opus producând o culoare mai albăstruie. Studiile de culoare și stabilitate a 3-glucozidelor a șase antocianidine comune (soluții apoase) păstrate timp de câteva luni arată în special o variație mare la valori ale pH-ului de la slab acid la slab alcalin.

Considerațiile cu privire la stabilitatea antocianinelor sunt legate de culoare, formele de echilibru și copigmentare. Stabilitatea antocianinelor este influențată de o serie de factori fizico-chimici precum aciditatea soluției, temperatură, concentrația oxigenului molecular dizolvat, iradierea cu lumină, prezența enzimelor, a acidului ascorbic, a agenților nucleofili, polifenolilor, zaharurilor libere, etc.[109]. Unii dintre acești factori (temperatura) au acțiune directă asupra stabilității antocianinelor, ceilalți factori modificând stabilitatea în măsură diferită în cazul extractelor naturale și sistemelor model, ceea ce indică caracterul interdependent și complex al influenței lor.

Aciditatea la fel ca și temperatura influențează nu doar echilibrul acido-bazic a diferitelor forme ale antocianinelor ci are un aport considerabil la acțiunea celorlalți factori.

Se știe că antocianinele poliacilate sunt foarte stabile în soluții apoase neutre sau slab acide, în timp ce antocianinele simple sunt decolorate rapid prin hidratare în poziția 2 a nucleului antocianidinei. Modificarea culorii albastre și creșterea stabilității antocianinelor sunt obținute în multe cazuri prin copigmentare intramoleculară ceea ce implică o „stivuire” între antocianidină și grupările acil aromatice.

Hidroliza acidă este un proces distructiv foarte puternic care contribuie la destabilizarea antocianinelor. Antocianinele acilate ce posedă grupări esterice $-CO-O-$, suferă hidroliză la încălzire ușoară sau chiar la rece, pierzând restul acidului carboxilic. Resturile di- și oligozaharidice hidrolizează mai greu, ruperea legăturii între resturile glucidelor având loc în condiții de temperatură mai ridicată ($60^{\circ}C$).

Stabilitatea termică a compușilor fenolici este o funcție complexă a diversității lor structurale, depinzând de structura nucleului flavilic, de poziția, numărul și natura substituenților [110]. De exemplu, la prelucrarea termică de scurtă durată a sucului natural și a vinului de zmeură are loc degradarea considerabilă a antocianinelor (~16%). S-a constatat că în aceste condiții cea mai puțin stabilă antocianină este cianidin-3-glicozida, care este și cea mai simplă glicozidă din profilul antocianic al fructelor de zmeură [111].

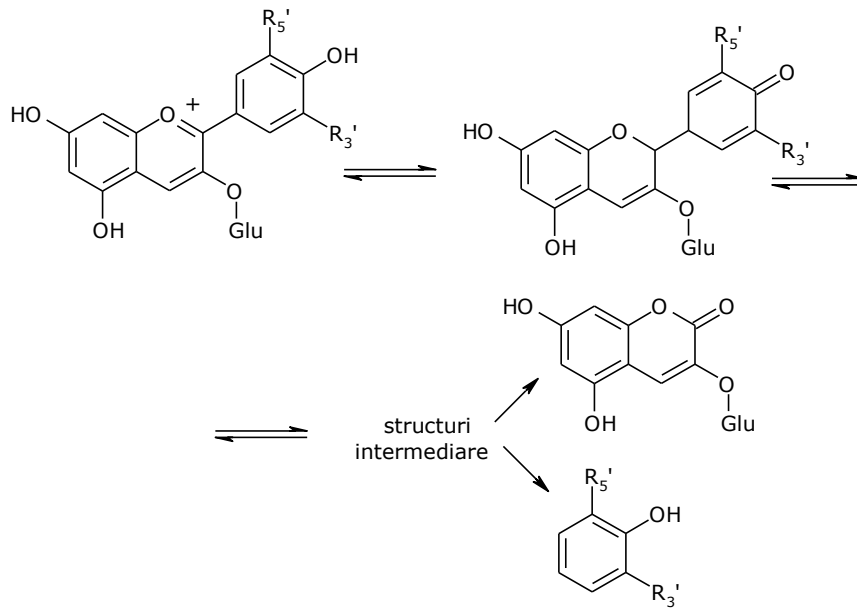
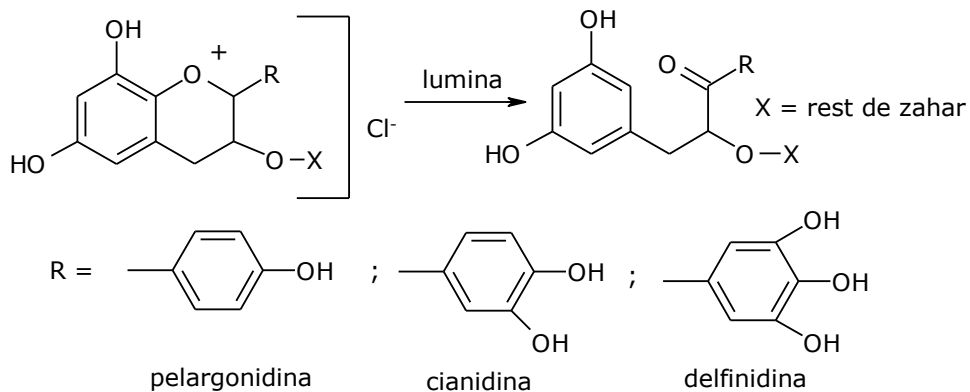


Figura 13. - Degradarea antocianinelor monoglucozilate accelerată de încălzire

Este bine cunoscut faptul că majoritatea pigmentelor naturali sunt mai stabili la întuneric decât la lumină. Acest lucru se datorează caracterului nesaturat al substanțelor colorate care le asigură posibilitatea de a participa în reacțiile de oxidoreducere, inițiate chimic și fotochimic [25].

Sub acțiunea luminii pigmentii antocianici se degradează prin deschidere de ciclu și ca urmare, intensitatea culorii se reduce [23]:



Pigmenții antocianici din fructe și legume participă nu numai la formarea culorii dar și a gustului, având în același timp valoare biologică de *factori de protecție P* și acțiune bacteriostatică. În cazul păstrării sucurilor de fructe bogate în antocianine un timp îndelungat, culoarea scade datorită precipitării lente a

substanțelor colorante. Precipitarea antocianinelor se explică prin faptul că ele se găsesc în stare coloidală iar cu timpul se denaturează. După unii autori precipitarea este determinată de procesele de oxidare, după alții are loc o polimerizare asemănătoare cu a substanțelor tanante. Se consideră că precipitarea poate avea loc și în urma combinării cu acetaldehida, chiar în absența aerului. Este posibilă și ipoteza micșorării solubilității ca urmare a reducerii conținutului de grupe metoxil [3].

I.5.7. Degradarea enzimatică a antocianinelor [3]

Precipitarea substanțelor antocianice are loc și sub acțiunea unei enzime specifice, pusă în evidență de unii cercetători în mucegaiurile *Aspergillus niger*, *Penicillium* etc., denumită **antocianază**. Acțiunea acestei enzime, care este o β -glucozidază, provoacă decolorarea sucurilor de coacăze, struguri, mure, afine, căpșuni. Procesul de decolorare constă în hidroliza grupării glicozidice a antocianelor cu formare de antocianidină și zahar.

La pH-ul natural al fructelor, antocianinele se găsesc sub două forme în echilibru. O formă este sarea de piriliu colorată, iar cealaltă este o pseudo-bază de tip carbinolic, incoloră. Starea de echilibru dintre cele două forme este determinată de pH. Prin creșterea pH-ului, echilibrul se deplasează spre forma incoloră și invers, la pH 3 – 4,5 predomină forma colorată de sare de piriliu. Sub acțiunea antocianazei se eliberează zaharul cu formare de antocianidine nestabile care la pH 3,5 – 4,5 au tendința de a se transforma spontan în derivați greu solubili și ușor atacați de oxigen, ceea ce provoacă precipitarea.

Preparatele de *antocianaze fungice* se folosesc la decolorarea sucurilor excesiv colorate, ca de exemplu sucul de coacăze. Unii cercetători au stabilit că și în fructe există *antocianază*, fiind pusă în evidență în cireșe, mure etc. Spre deosebire de antocianaza de natură fungică, antocianaza din fructe necesită oxigen pentru activare și este inhibată de tiouree. De asemenea ea își dublează activitatea în cazul în care se adaugă pirocatechină în concentrație de 0.01 M.

Oxidarea fenolilor din plante se realizează sub acțiunea *fenoloxidazelor* și *peroxidazelor* care sunt responsabile de îmbrunarea fructelor.

Markakis și colaboratorii [99] au arătat că *polifenoloxidaza* este aceea care oxidează pigmentii antocianici în prezența a diferite substanțe fenolice ca acidul clorogenic și pirocatechina.

Optimul de acțiune al *fenoloxidazelor* în general și a *catecoloxidazelor* în special este cuprins între pH = 6 – 9, fiind în funcție de natura produsului. După Hermann [112] toate speciile de fructe, cu excepția căpșunilor conțin la maturitate *o-polifenoloxidază*. Activitatea *o-polifenoloxidazei* este relativ ridicată în fructele cu semințe și sămburi, în bace fiind mai redusă. În majoritatea fructelor și legumelor, *polifenoloxidaza* se găsește în stare legată. *Peroxidazele* sunt de asemenea foarte răspândite în regnul vegetal, însoțind de cele mai multe ori *polifenoloxidazele*, realizând oxidarea unui număr mare de substanțe organice, printre care și polifenolii, având apa oxigenată ca acceptor de oxigen. Activitatea acestora variază în funcție de vârsta organelor și plantelor, cea mai intensă activitate constatându-se în organele tinere. Pe măsura dezvoltării organelor respectiv plantelor activitatea peroxidazelor scade.

I.5.8. Utilizarea antocianinelor ca aditivi alimentari

1.5.8.1. Utilizarea antocianinelor ca și coloranți în industria alimentară

Antocianinele sunt heterocicluri oxigenate care absorb puternic în domeniul vizibil al spectrului luminii. În zilele noastre există un interes deosebit pentru înlocuirea coloranților alimentari sintetici cu unii obținuți din surse naturale. Rolul antocianinelor ca agenți de colorare alimentari devine foarte important datorită contribuției lor la culoarea roșie și albastră a diverse fructe și legume, culoare care se păstrează mai mult sau mai puțin și în urma operațiilor de procesare a acestora, în vederea obținerii de gemuri, conserve, compoturi, vinuri etc. [113, 114]. Ca aditivi alimentari antocianinele sunt simbolizate sub forma E 163 [107].

Interesul față de antocianine ca și coloranți alimentari s-a dezvoltat datorită cercetărilor susținute privind toxicitatea și proprietățile cancerigene ale coloranților sintetici [115, 116]. S-a constatat că, consumul de coloranți naturali (în special a antocianinelor prezente din abundență în fructe și legume) nu are efecte negative asupra sănătății organismului uman. Culorile vii, naturale ale antocianinelor sunt bine apreciate, în timp ce în zilele noastre coloranții sintetici provoacă reacții negative din partea consumatorilor. Cu toate acestea, coloranții sintetici se utilizează în măsură mult mai mare decât cei naturali. Marele dezavantaj al coloranților naturali este stabilitatea lor redusă comparativ cu cei sintetici. Antocianinele se folosesc pentru colorarea lactatelor cu termen de păstrare redus, care nu suferă tratament termic. În multe cazuri procesele de prelucrare a produselor (însoțite de distrugerea totală a antocianinelor) nu pot fi evitate, de aceea este necesară post-introducerea acestora. Adăsurile antocianice pot servi de asemenea pentru modelarea culorii vinurilor obținute din struguri albi sau a vinurilor care și-au pierdut culoarea în urma prelucrării tehnologice. Modificări deosebit de profunde ale culorii sunt provocate de către metalele grele care interacționează cu polifenolii, în special cu substanțele tanante și cu antocianinele [3].

Fructele de dud sunt bogate în antocianine și pot fi considerate ca sursă potențială de producere a coloranților naturali. Principalele antocianine identificate în extractele din dudu sunt cianidin 3-glucozida și cianidin 3-rutinozida [116].

Cianidina este responsabilă de culoarea roșie a macului și albastră a albăstrelelor. În seva acidă a macului, cianidina există sub formă de cation, formă în care absoarbe în special lumina albastră și verde și reflectă lumina roșie, care este percepută de către ochi. În seva bazică a albăstrelelor cianidina există sub forma unor specii neutre cu număr egal de centri de încărcare pozitivi și negativi. În această formă cianidina absoarbe lumina roșie și verde, culoarea percepută fiind albastru [117].

I.5.8.2. Proprietățile antioxidante și conservante ale antocianinelor în industria alimentară

Deoarece nu s-au putut obține antioxidanți sintetici lipsiți complet de nocivitate, tendința actuală este de a se folosi pe scară din ce în ce mai largă antioxidanți naturali.

Rolul antocianinelor în produsele alimentare nu se limitează doar la proprietățile lor colorante. S-a constatat că toate clasele de antocianine sunt

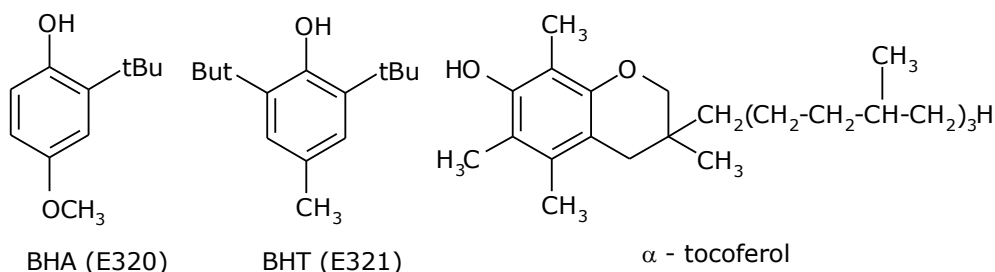
antioxidanți puternici îmbunătățind calitatea și valoarea produselor alimentare [118].

Antocianinele pot exista într-o varietate de forme protonate, deprotonate, hidratate și forme izomere, proporția dintre acestea depinzând puternic de pH. Aceste forme joacă un rol important în activitatea antioxidantă a antocianinelor. Structurile complet conjugate ale antocianinelor care permit delocalizarea de electroni formează radicali stabili favorabili în ceea ce privește abilitatea antioxidantă. Gradul de hidroxilare și metilare precum și poziția acestor grupări pe ciclul B afectează reactivitatea și stabilitatea moleculei și implicit activitatea antioxidantă a acesteia [119].

Efectul antioxidant al antocianinelor este confirmat prin aprecierea capacității antioxidante prin metoda ce utilizează radicalul 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH).

Proprietățile antioxidante și antiradicalice oferă antocianinelor rolul de fitoconservanți, atât în stare pură, cât și în amestecuri complexe.

S-a demonstrat că antocianinele sunt antioxidanți puternici comparativ cu antioxidanții clasici precum butilhidroxianisolul (BHA), butilhidroxitoluenul (BHT) și α -tocoferolii. Acești agenți naturali pe lângă faptul că influențează culoarea alimentelor, pot preveni autooxidarea lipidelor precum și peroxidarea lipidelor în sistemele biologice [120].



Fructele aparținând genului *Vaccinium* sunt surse bogate în flavonoide inclusiv antocianine și proantocianidine. Ele sunt recunoscute pentru capacitatea lor antioxidantă mai mare decât a acidului ascorbic și a butilhidroxitoluenului (BHT) [121].

Activitatea antioxidantă a antocianinelor și a fracțiunilor antocianice izolate din coacăze negre, zmeură și merișoare a fost investigată în emulsii stabilizate de zer. S-a demonstrat că la o concentrație de 200 μ M, cianidin 3-rutinozida și pelargondin 3-glucozida au acționat cel mai bine împotriva formării de hexanal. Activitatea antioxidantă a extractelor analizate scade în ordinea: extract din coacăze negre > extract din merișoare > extract din zmeură. Extractul antocianic obținut din coacăze negre a fost singurul care nu a manifestat efect prooxidant la o concentrație de 100 μ g/g, în timp ce la concentrație de 50 μ g/g toate extractele au favorizat oxidarea emulsiei în care au fost testate [122].

Activitatea antioxidantă a compușilor fenolici (antocianidine, elagitaninuri și proantocianidine) la concentrații de 1,4 4,2 și 8,4 μ g extract purificat/ mL probă, din zmeură (*Rubus idaeus*), afine (*Vaccinium myrtillus*), merișoare (*Vaccinium vitis-idaea*) și coacăze negre (*Ribes nigrum*) a fost determinată în sistemul lactalbumină-lipozom. Cea mai bună activitate protectoare împotriva oxidării lipidice au

manifestat-o extractele din merișoare și afine, urmate de cele din coacăze negre și zmeură [123, 124].

I.5.9. Acțiunea farmacologică a antocianinelor

Majoritatea fructelor conțin flavonoide și alți compuși fenolici care au rol în protejarea împotriva apariției bolilor cronice datorită acțiunii acestora ca antioxidanți (prin inhibarea radicalilor liberi întrerupând astfel propagarea a noi specii radicalice) sau datorită chelatării ionilor metalici ca Fe^{2+} care catalizează oxidarea lipidică [125].

Proprietățile farmacologice ale antocianinelor sunt demonstrate de existența „paradoxului francezesc” care denotă rolul hotărâtor al tuturor flavonoizilor, dar în cea mai mare măsură a antocianinelor cu privire la proprietățile farmacologice ale vinului roșu sec.

S-a sugerat faptul că, consumul de compuși intens colorați din fructe precum afine și merișoare, și legume inhibă oxidarea lipoproteinelor cu densitate scăzută și duc la scăderea colesterolului din sânge [126].

S-a demonstrat că pigmentii antocianici ajunși în organismul uman datorită consumului de fructe și legume sunt absorbiți sub formă glicozilată prin tractul gastrointestinal și au acțiune antiinflamatoare, antivirală, antidiabetică. Studii efectuate de-a lungul timpului au demonstrat că, extractele din fructe de afine, bogate în antocianine relaxează arterele coronariene, având proprietăți vasodilatatoare [127, 128].

Merișoarele la fel ca și alte fructe sunt bogate în compuși fenolici ca acizi fenolici, flavonoide, antocianine. Compușii izolați din extractele de merișoare reduc de asemenea riscul îmbolnavirilor de boli cardiovasculare. Studii recente au raportat activități de captare și inhibare a radicalilor liberi de către flavonolii glicozidați și antocianinele din merișoare și abilitatea lor de a oferi protecție împotriva oxidării lipoproteinelor *in vitro* [129, 130] cât și rolul lor în scăderea riscului de apariție a cancerului [131].

Activitatea antioxidantă a câtorva antocianidine a fost testată *in vitro* pe lipoproteine umane (LDL); după incubarea probelor la 37°C, extinderea oxidării a fost urmărită prin determinarea conținutului de diene conjugate și hexanal. S-a observat că inhibarea procesului de oxidare crește cu creșterea concentrației de antioxidant. Cel mai bun inhibitor al oxidării s-a dovedit a fi malvidina urmată de delphinidină, cianidină și pelargonidină [132].

Prin testarea activității antioxidante *in vitro* a mai multor clase de compuși polifenolici, pigmentii antocianici se clasează pe ultimul loc față de alți compuși; variația activității antioxidante a compușilor din clasele studiate se prezintă astfel [133]:

catechina > miricetina ≈ epicatechina ≈ rutina > acidul galic > quercetina > cianidina.

I.6. METODE DE EXTRACȚIE ȘI ANALIZĂ A COMPUȘILOR FENOLICI

I.6.1. Generalități

Analiza compușilor fenolici în alimentele procesate sau nu, începe cu extracția. Extracția este o operație care se bazează pe solubilitatea substanței active într-un solvent selectiv, în care celelalte componente ale materialului sunt insolubile. Procedul de extracție depinde de tipul de material ce urmează a fi analizat, de compusul fenolic care se urmărește și de procedeul analitic ce urmează a fi folosit. Primul pas îl reprezintă mărunțirea probei pentru creșterea suprafeței de contact, pentru a favoriza un contact mai bun între solventul și materialul supus extracției. De asemenea este de folos și mixarea probei pentru a ne asigura ca porțiunea ce urmează a fi extrasă este reprezentativă pentru întreaga probă. Întrucât unii compuși fenolici se găsesc sub formă de glicozide sau esteri, prepararea probei poate include hidroliza alcalină, acidă sau enzimatică pentru eliberarea fenolilor legați. Atunci când fenolii urmează a fi analizați sub formă de derivați, nu mai este nevoie de hidroliză.

Comportamentul antocianinelor în diferiți solvenți, influența temperaturii și a acidității extractantului impun modificări substanțiale ale tehnologiilor tradiționale de extracție. Obiectivele unei metode de extracție optime sunt: extracția produsului urmărit cu un randament satisfăcător, contaminarea minimă a extractului cu substanțe parazite și evitarea descompunerii fermentative și nefermentative în timpul extracției [94].

Extractele obținute prin diferite metode se supun concentrării prin distilarea dizolventului, prin uscarea în aeroemulsie, inclusiv prin utilizarea ultrasunetului. De asemenea, concentrarea extractelor se poate efectua folosind procedeele de osmoză și de ultrafiltrare prin membrane semipermeabile cu diametrul porilor de 0.004 ± 0.001 micrometri.

Alegerea solventului

În general, extracția implică contactul direct dintre un solvent lichid și un material solid. În timpul operației de extracție, solvenții organici difuzează în materialul solid și solubilizează compușii cu polaritate similară. Natura solventului folosit va determina tipurile de compuși ce vor fi extrași.

Obiectivul extracției cu solvenți este de a lua toți polifenolii din materialul vegetal solid și de a-i transfera în faza lichidă. Eficacitatea extracției depinde de proprietățile selective ale solventului, de temperatura și agitarea mecanică.

Cei mai des solvenți folosiți la extracția polifenolilor din materiale vegetale sunt solvenți polari ca MeOH, EtOH, apă, acetonă și solvenți nepolari ca diclorometan (DCM) și hexan. Metanolul în diverse concentrații este cel mai popular solvent datorită eficienței sale, a punctului de fierbere potrivit și datorită faptului că este mai economic. Astfel, metanolul a fost cu succes folosit pentru extracția polifenolilor din diverse legume și fructe [94].

Alegerea metodei de extracție

Pentru izolarea și extracția compușilor cu activitate antioxidantă s-au stabilit mai multe metode. Când alegem metoda de extracție prioritatea majoră este aceea de a nu provoca degradarea compușilor bioactivi.

Flavonoidele sunt în general compuși stabili și pot fi extrași din materialul vegetal proaspăt sau uscat cu solvenți la rece sau la cald. Cei mai potriviți solvenți sunt amestecuri apoase ce conțin EtOH, MeOH, acetonă sau dimetilformamida. E bine ca materialul vegetal bine uscat și pulverizat să fie extras mai întâi cu eter de petrol sau benzen pentru îndepărtarea materiilor rășinoase. S-a observat că în lemn există unele flavone solubile în eter de petrol sau benzen [8]. Extracția flavonoidelor din fructe a fost perfectată prin macerarea fructelor proaspete, neuscate sau extracția cu solvenți a materialului vegetal, prin extracția unui alicot obținut din fructe proaspete omogenizate sau prin extracția materialelor vegetale liofilizate.

Extracția antocianinelor este primul pas în determinarea acestora în orice tip de material vegetal. Alegerea metodei de extracție este foarte importantă în analiza antocianinelor, și depinde în mare parte de scopul extracției, de natura antocianinelor și de materialul vegetal. De asemenea este de dorit ca procedura de extracție să nu fie prea complexă, riscantă, consumatoare de timp sau costisitoare.

În cele mai multe fructe și legume pigmentii antocianici sunt localizați în celulele de la suprafață. Procedurile de extracție implică utilizarea în general a solvenților acizi, care denaturează membranele țesuturilor celulare și dizolvă simultan pigmentii. Mediul acid tinde să stabilizeze antocianinele, dar de asemenea poate modifica forma nativă a pigmentului în țesut prin formarea unor asociații cu metale, copigmenți sau alți factori. Extracția cu solvenți ce conțin și urme de HCl poate duce la degradarea pigmentilor în timpul concentrării. Pentru a minimiza descompunerea pigmentilor, s-a propus utilizarea acizilor organici slabi (acid formic, acetic, citric sau tartric) sau cantități mai mici (0,5 – 3%) de acizi mai volatili (acid trifluoracetic) care pot fi apoi îndepărtați în timpul concentrării [94].

De obicei extracția se realizează cu agitare magnetică sau mecanică dar recent s-au introdus și alte metode de creștere a eficienței și a vitezei operației de extracție.

I.6.2. Metode de extracție

1.6.2.1. Extracția cu solvenți la rece: macerarea – este metoda clasică de extracție, cea mai frecvent utilizată în laborator. Macerarea este procedeul care se aplică la prepararea soluțiilor extractive apoase cât și la prepararea soluțiilor extractive alcoolice, timpul de extracție variind de la 30-60 minute pentru extracția apoasă și până la zece zile pentru extracția alcoolică [8, 18, 134, 135]. Utilizarea ei dă posibilitatea de a evita transformările termice ale extractului, ceea ce permite conservarea componentelor acestuia în stare nativă. Dezavantajul major al acestei tehnici de extracție este gradul mic de extracție.

Antocianinele se extrag cu metanol acidifiat la rece. De obicei acidul folosit este acidul acetic (~7%) sau trifluoracetic (~3%). Utilizarea acizilor minerali poate duce la pierderea grupărilor acil atașate [108].

Extracția antocianinelor s-a încercat prin macerarea materialului vegetal mărunțit, pentru câteva ore peste noapte la 4°C în MeOH ce conține cantități mici de HCl (< 1%). Procedura de extracție este de obicei urmată de evaporarea metanolului la temperaturi între 30-40°C și poate duce la hidroliza grupărilor acil labile, datorită prezenței HCl. S-a încercat și extracția antocianinelor cu EtOH

acidificat cu acid citric (0,01%) în loc de HCl. Etanolul este preferat pentru industria alimentară, deoarece soluțiile metanolice sunt toxice, iar acidul citric este mai puțin coroziv decât HCl. Totuși, în acest caz recuperarea pigmentilor nu a fost așa de mare ca în cazul utilizării MeOH, și concentrarea este mai dificilă.

O altă procedură de extracție folosește ca solvent acetona urmată de separare cu CHCl_3 . Prin adăugare de cloroform se formează două faze, una apoasă care conține antocianine, fenoli, zaharuri, acizi organici și alți compuși solubili în apă, și una majoritară care conține solvenții organici nemiscibili, lipide, carotenoide, pigmenți clorofilieni și alți compuși nepolari. Această metoda are avantajul că extractul obținut nu va conține contaminanți lipofili.

Pentru extracția pigmentilor antocianici din diverse specii de *Vaccinium* s-a folosit o soluție ce conține HCl (0.1M): $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (96%) = 15:85 (v/v), timp de 24 ore la 5°C și agitare mecanică [136].

I.6.2.2. Extracția cu solvenți la cald: metoda se caracterizează printr-un randament ridicat de extracție chiar dacă are loc cu cantități relativ mici de solvent. S-a raportat că temperaturile ridicate îmbunătățesc eficiența extracției datorită intensificării difuzibilității și solubilității compușilor în solvenți. Totuși, metodele de extracție la temperaturi ridicate duc la creșterea ratei de degradare a antocianinelor. Conventional extracția compușilor antocianici se face de obicei la temperaturi care variaza de la 20 la 50°C, deoarece temperaturi >70°C cauzează degradarea rapidă a acestora și implicit a culorii lor. Gradul de degradare al pigmentilor antocianici depinde de temperatură și timp [137]. Pe lângă aceștia, alți factori adiționali precum lumina, prezența oxigenului, a metalelor, copigmenților, zaharurilor și a produșilor lor de degradare afectează stabilitatea și capacitatea antioxidantă a pigmentilor antocianici.

Alegerea temperaturii și a duratei de extracție permite evitarea sau cel puțin diminuarea descompunerii termice a compușilor. Pentru extracția completă a antocianinelor din petalele de trandafir cu acetonă, la fierbere, sunt suficiente două extracții cu durata de 20-25 minute. Apa fierbinte extrage antocianinele din coaja de prune în timp de 10-15 minute. Extracția cu solvenți la cald are și unele dezavantaje considerabile: în soluție trec foarte multe substanțe parazite, iar reziduul solid suferă o dispersare coloidală ceea ce impune necesitatea filtrării sau centrifugării filtratului obținut.

Metoda care permite comasarea randamentului înalt de extracție (extracția la cald) cu calitățile superioare ale extractului obținut la rece (transparența, cantitate redusă de balast solubil, etc.) presupune tratarea rapidă a materiei prime cu extractant fierbinte și poartă numele de PLE „*presurized liquid extraction*”. În calitate de extractant se pot folosi solvenți organici, apa, soluții apoase și alcoolice ale acidului citric [137].

Extracția repetată – extracția Soxhlet constă în extracția repetată a materialului vegetal cu un solvent organic volatil. Este o metodă mai rar folosită pentru extracția pigmentilor antocianici.

I.6.2.3. Extracția cu ultrasunete: extracția cu ultrasunete este o tehnică rapidă ce poate folosi amestecuri nemiscibile de solvenți (de exemplu hexan cu metanol-apă, 9:1) [108].

Extracția cu ultrasunete se utilizează mai mult la extracția uleiurilor esențiale și a celor volatile, deoarece este mult mai rapidă și eficientă decât tehnicile clasice de extracție. Fenomenul care stă la baza utilizării ultrasunetelor în extracția

principiilor active din plante este cavitația, prin efectele termice, mecanice și structurale, sub influența căruia are loc vidarea celulelor prin ruperea membranelor, permițându-se culegerea compușilor celulari sub forma de soluție. Extracția cu ultrasunete este un procedeu de extracție mai rapid și mai complet în comparație cu metodele tradiționale cum sunt macerarea/agitarea, deoarece suprafața de contact dintre solid și lichid este mult mai mare, iar timpul de extracție depinde de modul de preparare al probei [138].

Metoda de extracție cu MeOH 80% și ultrasunete se folosește pentru extracția polifenolilor din pudră de material vegetal liofilizat. Extracția cu ultrasunete-asistată este o metodă eficientă și rapidă de extracție a polifenolilor. Puterea ridicată a ultrasunetelor îmbunătățește extracția cu solvenți din materialul vegetal în special datorită efectelor mecanice. Frecvența scăzută, energia ridicată, puterea ridicată a ultrasunetelor de nivelul KHz sunt cele care dau avantajul reducerii timpului de extracție și intensifică extracția. Folosirea materialului vegetal sub formă de pudră fină duce la o capacitate de extracție maximă prin creșterea suprafeței de contact a probei [94].

Prin această metodă s-au extras compuși fenolici din reziduuri de struguri roșii. Cojile au fost separate de pulpă și supuse unui pretratament cu ultrasunete la 35 kHz timp de 15, 30, 45, 60, 75 respectiv 90 minute pentru a obține un extract cu un conținut ridicat în polifenoli [139].

I.6.2.4. Extracția cu microunde: extracția cu microunde este o tehnică simplă ce poate fi finalizată complet în câteva minute. Energia microundelor este aplicată probelor suspendate în solvent, într-un vas închis sau o celulă deschisă. Cu siguranță această metodă implică degradarea la încălzire a compușilor termolabili [108].

Literatura de specialitate este foarte săracă în ceea ce privește aplicarea microundelor în extracția principiilor active din plante. Această tehnică este însă foarte des întâlnită în industria alimentară.

I.6.2.5. Extractia cu fluide supercritice: extracția cu fluide supercritice nu este o tehnică nouă. Capacitatea de solvent a fluidelor supercritice este cunoscută de mai bine de un secol. Hannay și Hogart, 1879, au fost primii care au raportat că fluidele supercritice sau gazele dense au putere de solvatare și le-au folosit în procese industriale de extracție, dar la acea vreme s-a preferat extracția cu solvenți lichizi. Costurile ridicate ale investițiilor și tradiționalele operații atribuite extracției au amânat fără doar și poate utilizarea tehnologiei cu fluide supercritice în industria alimentară [140].

Metoda de extracție cu fluide supercritice este o tehnică de separare nedistructivă, aparținând proceselor care au loc la presiune ridicată, bazată pe puterea de solvatare a substanțelor aflate la temperaturi și presiuni superioare celor corespunzătoare punctului critic. Regiunea supercritică a unui component pur este definită ca regiunea de temperatură și presiune mai mare sau egală cu temperatura și presiunea critică a componentului.

Dioxidul de carbon este cel mai atractiv fluid folosit pentru procesarea produselor alimentare. Are P_c și T_c convenabile de 73,8 bar respectiv 31,1°C, este netoxic, neinflamabil, nereactiv, necoroziv. De altfel, este al doilea solvent din punct de vedere al costului scăzut după apă, și nu lasă nici un reziduu de solvent după extracție. CO₂ este un bun solvent pentru hidrocarburile și solidele nepolare.

Principalul dezavantaj al CO₂ supercritic îl constituie, cel mai probabil, limitarea capacității de extracție a compușilor polari.

După considerațiile despre avantajele menționate pentru extracția cu fluide supercritice care folosește ca agent de extracție CO₂, ar fi de așteptat ca extracția cu CO₂ supercritic să fie răspândită în industria alimentară, dar acest lucru nu este încă o realitate. În ultimii 30 de ani s-au prezentat sute de patente referitoare la acest proces, însă utilizarea lui pe plan mondial este mică. Cele mai multe instalații de extracție cu fluide supercritice se găsesc în Germania, SUA, Japonia și India. Motivul pentru rara utilizare a tehnologiei cu fluide supercritice este costul de investiție mare față de cel pentru extracția cu solvenți organici. În ciuda cunoștințelor științifice și a disponibilității mari de materii prime de calitate și care au un cost redus, la scară industrială nu există nici o instalație de extracție cu fluide supercritice în vreuna din țările Americii de Sud. Avantajele acestei metode sunt consumul scăzut de solvent, selectivitatea controlabilă și degradarea chimică sau termică a compușilor urmăriți mai puțin decât în cazul extracției cu solvenți în aparat Soxhlet [108].

Extracția cu CO₂ supercritic este o metodă alternativă pentru extracția compușilor cu beneficii terapeutice cum sunt sterolii, acizii grași și tocoferolii din semințe de merișor (*Vaccinium vitis-idaea*) [141].

Semințele de merișor sunt deșeuri rămase în urma procesării fructelor pentru obținerea sucurilor sau a altor produse înrudite. După ce fructele sunt presate pentru extragerea sucului, pulpa rămasă este uscată la aer iar semințele sunt separate. Se crede că semințele de merișor au un conținut ridicat de acizi ω nesaturați care asociați cu colesterolul total slăbesc și inhibă oxidarea lipoproteinelor cu densitate scăzută (LDL).

Extracția cu CO₂ supercritic a fost aplicată de asemenea la cereale, floarea soarelui și arahide. Toate aceste semințe pot fi extrase complet dacă sunt măcinate pentru a permite obținerea uleiului.

Din semințe de struguri albi, semințe de mure, prin tehnica de extracție cu CO₂ supercritic s-au extras tocoferoli, carotenoide și lipide.

În încercarea de a extrage antocianinele din căpșuni utilizând CO₂ supercritic s-a observat că acesta duce la o scădere a conținutului în antocianine a extractului obținut față de alte tehnici. Una dintre explicații ar fi faptul că, această degradare a antocianinelor este provocată de anumiți factori precum pH-ul și copigmentarea [142].

I.7. METODE DE ANALIZĂ, SEPARARE ȘI IDENTIFICARE A COMPUȘILOR FENOLICI

I.7.1. Analiza polifenolilor totali

Pentru analiza conținutului total de fenoli din plante există mai multe metode, inclusiv precipitarea cu metale, precipitarea cu solvenți organici, precipitarea cu acizi și formarea de produși colorați cu diferite elemente chimice.

Prima metodă utilizată a fost metoda Folin-Ciocalteu în 1927. Reactivul Folin-Ciocalteu este un reactiv molibdowolframic, un produs colorat ce absoarbe la 725-750 nm [143, 144, 145].

Procedeele Folin-Ciocalteu se bazează pe puterea de a reduce grupările hidroxil aromatice cu ajutorul complexului fosfomolibdat din reactivul Folin –

Ciocalteu. Această metodă măsoară totalul grupărilor hidroxil din compușii fenolici. Absorbția se măsoară la $\lambda=725$ nm. Concentrația în compuși fenolici totali se determină prin compararea cu valorile densității optice la concentrații diferite a unui compus fenolic standard, acid galic sau acid clorogenic, și se exprimă în echivalenți acid galic respectiv clorogenic [146].

Dezavantajul utilizării acestei metode cu reactiv FC este acela că nu se pot face diferențieri între diversele tipuri de fenoli. De asemenea substanțele ca, acid ascorbic, amine aromatice, zaharuri, compuși nefenolici, pot interacționa cu reactivul FC dând astfel un conținut mai mare de fenoli [58].

Totuși metoda FC se corelează bine cu procedeele de analiză a capacității antioxidante. Numeroși cercetători au indicat faptul că există o bună relație între analiza activității antioxidante a fructelor prin metoda ORAC cu conținutul ridicat de fenoli determinat prin metoda FC. Similar, metodele DPPH și ABTS de determinare a activității antioxidante dau de asemenea bune corelari cu conținutul în polifenoli.

În anul 2003 Cevallos-Casals și Cismeros-Zevallos [147] au analizat compușii fenolici din câteva fructe și legume, inclusiv din afine și au indicat un conținut de fenoli în acestea între 292 și 672 mg/100 g fructe proaspete. Lărgimea domeniului se poate datora diferitelor specii de afine și a gradului diferit de coacere. Studiile au arătat că, conținutul fructelor în fenoli se corelează cu gradul de maturitate al acestora, crescând cu vârsta fructelor respectiv cu gradul de coacere [33]. Un conținut mare de fenoli totali duce implicit la o activitate antioxidantă bună [148, 149].

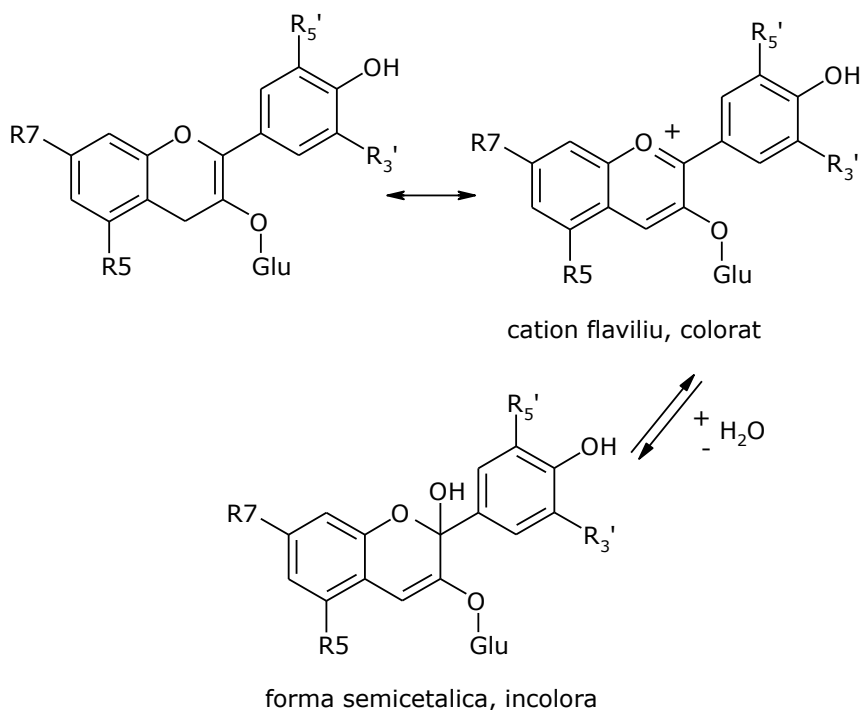
Metodele de analiză a polifenolilor totali cu reactiv Folin Ciocalteu se aplică și pentru măsurarea conținutului în polifenoli din urină, ca un indicator al consumului de polifenoli. Această metodă datorită simplității permite analizarea unui număr mare de probe pe zi, ceea ce o face ideală pentru utilizarea ei în studii epidemiologice și dă posibilitatea estimării consumului de polifenoli și determinarea rolului acestora în prevenirea unor boli [150].

I.7.2. Analiza antocianinelor totale

Pentru determinarea cantitativă a antocianinelor totale din fructe și legume există câteva metode analitice. Pe lângă acestea se folosește analiza HPLC sau utilizând antocianinele ca indicatori, acestea sunt titrate cu o cantitate cunoscută de bază până la modificarea culorii [151].

Valoarea absorbanței unui extract alcoolic sau volumul de bază folosit la titrarea unei probe este proporțională cu cantitatea de antocianine prezente. Pentru determinarea concentrației totale de antocianine prezente într-un extract se recomandă pe lângă alte tehnici și tehnicile spectrometrice.

Una dintre metodele de analiză a antocianinelor totale frecvent utilizată este metoda diferențială de pH. Această metodă se bazează pe modificările reversibile ce au loc în structura antocianinelor și în spectrul lor de absorbție la diferite valori de pH. Toate antocianinele naturale prezintă un echilibru între cationul flaviliu colorat și forma hidratată incoloră. La valori de pH=1 predomină forma colorată (cationul flaviliu) iar la valori de pH=4,5 predomină forma semicetalică incoloră. Echilibrul între formele cationului de flaviliu și forma semicetalică e prezentat în reacția următoare:



Metoda de pH diferențial se bazează pe această reacție care duce la valori diferite ale absorbanței când pH-ul se modifică. Este o metodă rapidă și eficientă de determinare a antocianinelor totale, chiar și în prezența pigmentilor degradați sau a altor compuși.

Prin această metodă s-a determinat conținutul total de antocianine monomere din extractul de mure negre (*Rubus fruticosus*) prin măsurarea absorbției la 510 și 700 nm în soluții tampon la pH=1,0 respectiv pH=4,5 [152].

Antocianinele totale din coacăze negre au fost determinate prin spectroscopie UV-VIS. S-a înregistrat spectrul extractului în MeOH : 0,1 M HCl, 85:15 v/v la 538 nm folosind cuve de cuarț de 1 cm. Antocianinele totale s-au exprimat ca echivalenți de cianidin-3-rutinozidă (al cărui coeficient de absorbție molară determinat experimental la 530 nm a fost 31085) [153].

I.7.3. Identificarea pigmentilor antocianici prin reacții de culoare [11]

Antocianinele și agliconii acestora, antocianidinele, sunt pigmenți vegetali care dau culoarea roșie, violetă și albastră a florilor, fructelor și tegumentelor semințelor. Prin fierberea cu acizi sau în prezența enzimelor, antocianinele hidrolizează și se obțin glucide și diferite antocianidine.

Antocianinele pot fi separate prin repartitie între solvenți organici și apă și pot fi identificate prin schimbarea culorii soluției acide la alcalinizare cu Na₂CO₃ [8].

Reacțiile pe care le dau antocianinele se datorează în mare parte grupărilor hidroxilice fenolice. Antocianinele dau reacții de culoare caracteristice cu sărurile metalelor grele, ca de exemplu:

- cu sărurile de plumb dau combinații de culoare albastră închisă;
- cu sărurile ferice dau combinații brune;
- cu sărurile de aluminiu dau colorații violete.

O caracteristică importantă a antocianinelor este faptul că își modifică culoarea în funcție de pH. Variația culorii se datorează unei schimbări în structura internă a moleculei.

În mediu acid se va observa apariția culorii roșu. Prin creșterea treptată a pH-ului (adăugare de NaOH 0,1 M) culoarea se modifică fiind acoperită întreaga gamă de culori a spectrului vizibil. Astfel, la:

pH < 3,0 culoare roșie; pH = 3,2-5,0 roșu-violet; pH = 5,2-6,0 violet
pH = 6,2-8,0 albastru; pH = 8,2-9,0 albastru-verde; pH = 9,2-11,0 verde
pH = 11,2-12,0 galben - verde; pH = 12,0 galben

Aceste modificări, la adăugarea de alcalii, se explică prin modificarea structurii antocianinelor. La început, clorura de antocianină sau antocianidină trece într-o pseudobază incoloră cu caracter carbinolic, care elimină apa și trece într-un derivat chinonic de culoare violetă. Prin tratarea în continuare cu alcalii, culoarea violetă se schimbă în albastru, datorită formării unui fenolat al formei chinoide (vezi figura 11).

Datorită modificării culorii în funcție de pH, pigmentii antocianici pot fi folosiți în chimia analitică ca indicatori de pH.

Pelargonidina este ușor de recunoscut, prin adaos de soluție de carbonat de sodiu apare o colorație violet, care devine verde-albăstrui la adaos de acetonă. În prezența carbonatului de sodiu, peonidina dă o colorație albastră la fel ca și cianidina. Colorația acesteia din urmă este instabilă în prezența NaOH. Malvidin 3,5 diglucozida în prezența carbonatului de sodiu formează o colorație verde-albăstruie, în timp ce malvidin 3-glucozida dă o colorație albastru-violet care nu se modifică în prezența hidroxidului de sodiu [154].

I.7.4. Separarea antocianinelor prin precipitare și metode cromatografice

Pentru separarea compușilor polifenolici nu există o singură strategie, alegerea metodei depinde de polaritatea compușilor și de cantitatea de probă.

Odată obținut extractul este avantajoasă realizarea unei curățiri preliminare. Metodele clasice de separare a fenolilor din extractele vegetale sunt precipitarea cu acetat și carbonați în mediu alcalin urmată de acidifiere. Procedura cu acetat este adesea nesatisfăcătoare deoarece unii fenoli nu precipită, alți compuși pot coprecipita și nu sunt întotdeauna ușor de îndepărtat sărurile acestora [108].

Prin precipitare este posibilă obținerea unor amestecuri de antocianine care însă sunt însoțite și de alte substanțe din compoziția extractului. Antocianinele pot fi precipitate din soluții apoase neutre cu $Pb(NO_3)_2$, $Pb(CH_3COO)_2$ sau cu acetat bazic de plumb (II), $Pb(OH)(CH_3COO)$ dar o bună parte din acestea (~20%) se descompun pe parcursul separării. Sărurile de plumb pot precipita și alte substanțe ce conțin grupări carboxilice și fenolice. După centrifugarea și spălarea precipitatului cu apă și etanol, antocianinele trec în soluție prin tratarea multiplă cu etanol acidulat cu HCl, iar $PbCl_2$ greu solubilă se elimină prin centrifugare [108, 155]. Amestecurile de antocianine astfel obținute sunt toxice datorită faptului că pot conține ioni de Pb^{2+} .

Din soluții apoase și alcoolice antocianinele pot fi separate în stare solidă prin tratare cu un volum de 10-25 ori mai mare (decât volumul soluției alcoolice/apoase) de eter dietilic. O altă metodă de separare a antocianinelor constă în complexarea lor cu pectină și precipitarea complexilor formați în prezența alcoolului sau a acetonei. Agliconii (antocianidinele) pot fi precipitați din soluții apoase cu acizi tari, acidul clorhidric fiind cel mai potrivit din punct de vedere al proprietăților alimentare ale produsului finit [26, 108, 155-157].

Prin precipitare nu se realizează separarea completă a antocianinelor de substanțele balast din extractele vegetale. Realizarea acestui obiectiv este posibilă doar cu ajutorul metodelor cromatografice, care sunt simple și eficiente.

Metodele cromatografice au ca principiu de bază separarea componentelor dintr-un amestec într-un sistem constituit dintr-o fază staționară și una mobilă.

I.7.4.1. Cromatografia în strat subțire și pe hârtie

Avantajele acestei tehnici sunt foarte bine cunoscute: timp de separare scurt, capacitate de detecție a reactivilor, posibilitatea de a rula mai multe probe în același timp. Această tehnică este de asemenea ideală pentru o separare preliminară a extractelor vegetale înainte de analiza HPLC.

Inițial, cromatografia pe hârtie a fost intens folosită pentru analiza compușilor fenolici, însă acum metoda cel mai des utilizată datorită simplității este cromatografia în strat subțire.

Metoda cromatografiei în strat subțire este extrem de utilizată datorită colorației proprii a pigmentilor antocianici. În acest caz cromatogramele nu necesită dezvoltare suplimentară. Eluenții folosiți au preponderent mediu acid, ceea ce denotă faptul că antocianinele se separă sub forma sărurilor de flaviliu. În tabelul 4 sunt prezentate mai multe sisteme de solvenți pentru diferite clase de polifenoli.

Tabelul 4.

Sisteme de solvenți utilizate pentru diferite clase de polifenoli [108, 158, 159]

Clasa	Sistemul de eluare	Raport eluenți
Agliconii flavonoidici	EtOAc – iPrOH - H ₂ O	100:17:13
	EtOAc - CHCl ₃	60:40
	CHCl ₃ - MeOH	96:4
Glicozide flavonoidice	n-BuOH – HOAc - H ₂ O	65:15:25
	EtOAc – MeOH - H ₂ O	50:3:10
	EtOAc – HCOOH - H ₂ O	9:1:1; 6:1:1; 50:4:10
	CHCl ₃ – MeOH - H ₂ O	65:45:12
Izoflavone	CHCl ₃ – MeOH - H ₂ O	40:10:1
	CHCl ₃ - MeOH	92:8
	CHCl ₃ - MeOH	3:1
Antocianidine și antocianine	EtOAc – HCOOH - 2 M HCl	85:6:9
	n-BuOH – HOAc - H ₂ O	4:1:2
	EtOAc – butanonă – HCOOH - H ₂ O	6:3:1:1
	EtCOMe – HCOOEt – HCOOH -H ₂ O	4:3:1:2
Proantocianidine	EtOAc – MeOH - H ₂ O	29:11:10
	EtOAc – HCOOH – HOAc - H ₂ O	30:1.2:0.8:8

Condițiile folosite pentru identificarea calitativă a antocianinelor prin cromatografie în strat subțire, descrise de Harborne sunt amestecuri de solvenți de forma: 1-butanol:2 M HCl (1:1 v/v), 1-butanol:acid acetic-apă (4:1:5), acid acetic:apă (18:85), acid acetic:apă:HCl concentrat (15:82:3), apă:HCl concentrat (97:3) [160-163].

Folosind sistemele acetat de etil : acid formic : acid acetic : apă = 100:11:11:26 și acetat de etil : acid formic : apă = 8:1:1 (V/V) a fost identificată calitativ prezența quercitinei, izoquercitinei și rutinei în diverse părți ale căpșunilor (planta și fructe) [164]. Prin TLC folosind sistemele CH₂Cl:CH₃OH (9.5:0.5 v/v) și EtOAc-CH₃OH-H₂O (100:20:10 v/v) însoțită de UV-VIS, IR și MS s-a identificat 3 flavonoide glicozilate în specia *Cadaba glandulosa* [165].

I.7.4.2. Cromatografia pe coloană (cromatografia lichid-solid)

Convențional metoda de separare cel mai des folosită este separarea pe coloane cromatografice deschise datorită simplității și valorii ca pas inițial de separare. Materialele folosite ca suport includ poliamidă, celuloză, silicagel, Sephadex LH-20, Sephadex G-10, G-25 și G-50 [108]. Ca și eluenți se folosesc metanol, etanol, acetona fiind cea mai bună pentru deplasarea polifenolilor cu masă moleculară mare. Absorbția extractelor crude pe coloane umplute cu Diaion HP-20 sau Amberlit XAD-20 (sau XAD-7) urmată de eluție cu metanol-apă este o cale excelentă de separare a fracțiunilor bogate în polifenoli [108].

Existența antocianinelor în formă cationică și anionică deschide posibilități largi de utilizare a cromatografiei cu schimbători de ioni. Rășinile Sephadex se pot utiliza pentru a adsorbi substanțele fenolice din extractul brut. Eluarea se efectuează cu amestecuri etanol:apă, sau etanol:acetona:apă. În aceste condiții se pot obține derivații cianidinei de culoare violetă și albastră [166].

Pentru separarea antocianinelor sub forma sărurilor de flaviliu se folosesc rășini Amberlit-XAD-7. Purificarea pe coloană cu Amberlit XAD-7 a fost utilizată și pentru extractele din fructe de afin și merișoare. Dimensiunile coloanei utilizate au fost: diametru 40 mm, lungime 300 mm. Mai întâi a avut loc eluarea zaharurilor libere, a acizilor fenolici și organici cu o soluție 6% acetonitril (CH₃CN / TFA / H₂O = 6 : 0.5 : 93.5 v/v/v). Eluarea a continuat apoi cu o soluție 50% CH₃CN (CH₃CN / TFA / H₂O = 50 : 0.5 : 49.5 v/v/v) obținându-se fracțiunile care conțin antocianine. În final coloana a fost spălată cu amestec CH₃CN / TFA = 99,5 : 0,5 pentru eluarea fenolilor rămași pe coloană. Frajeciunile ce conțineau antocianine au fost apoi purificate folosind HPLC preparativă pe o coloană ODS-HG-5 iar ca fază mobilă sistemul de solvenți A: 10% acid formic, respectiv B: 100% acetonitril [167].

Însă, conform unor date din literatură, rășinile schimbători de cationi au și unele neajunsuri, principalul fiind desorbția incompletă, care nu depășește 90% [168].

Astăzi se impune tehnica flash cromatografiei care simplifică procesul de purificare și reduce în mare măsură timpul de lucru prin utilizarea coloanelor gata preparate. Această tehnică oferă detecție UV, un sistem computerizat de control, utilizarea fazelor mobile cu gradient și posibilități de colectare automată a fracțiunilor. În cazul amestecurilor complexe și a celor care conțin compuși care au timpi de retenție foarte apropiați, se poate utiliza un sistem de solvenți cu gradient care schimbă compoziția eluentului pe parcursul eluției. Utilizând flash cromatografia „of-line” (coloane ISOLUTE Flash) se pot face separări în regim izocratic sau cu

gradient. În cazul Flash cromatografiei „on-line” o coloană ISOLUTE este montată într-un sistem în care coloana este conectată la un sistem de pompare care determină un debit mai mare al solventului prin coloană. În funcție de capacitatea pompei, compoziția solventului poate fi isocratică (pentru un singur solvent) sau cu gradient în proporții crescătoare de solvenți [169].

I.7.4.3. Cromatografia de lichide de înaltă performanță

Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) este o tehnică ce oferă acuratețe, rapiditate și sensibilitate ridicată. În prezent HPLC a devenit cea mai populară tehnică de separare a flavonoidelor atât la scară preparativă cât și ca metodă analitică. Analiza componentelor este realizată de un detector. Absorbția în vizibil sau ultraviolet este un parametru specific și se poate aplica cu succes la semnalarea componentelor dacă aceștia manifestă asemenea proprietate.

Pentru analiza HPLC analitică a subclaselor de flavonoide (flavone, flavonoli, izoflavone, antocianidine etc.) faza staționară, solventul și gradientul au fost optimizate. Solvenți ca, acetonitril – apă și amestec metanol-apă cu sau fără cantități mici de acid sunt foarte comuni. Ocazional se mai folosesc și alți solvenți ca tetrahidrofuran, izopropanol sau n-propanol. Ca faze staționare se folosesc octadecilsilil ODS, RP-18 sau C18, octasilil RP-18 sau C8. Silicagelul este rar folosit excepție făcând utilizarea lui pentru separarea ocazională a agliconilor flavonoidici polari, a flavonelor polimetoxilate, flavanonelor sau izoflavonelor [108].

Folosindu-se un sistem de solvenți și o coloană C₁₈ s-au analizat inițial 34 de agliconi flavonoidici, pentru care s-au găsit corelări între timpii de retenție și unele detalii structurale. Metilarea grupelor hidroxil din ciclul A reduce polaritatea compusului și produce o creștere a timpului de retenție, pe când metilarea în inelul B reduce timpul de retenție al agliconului [170].

Antocianinele există în soluție sub diverse forme structurale la echilibru, funcție de pH și temperatură. Pentru obținerea unor rezultate bune în HPLC este esențial controlul pH-ului fazei mobile și utilizarea coloanelor termostatate.

Pentru analiza antocianinelor se folosesc în general coloane C₁₈ cu fază inversă. Aceste coloane au faza staționară nepolară și faza mobilă polară. Detecția se bazează de obicei pe absorbția în UV sau VIS la diverse lungimi de undă caracteristice fiecărei clase de compuși [171, 172]. Lungimea de undă folosită în analiza HPLC a antocianinelor este 520 nm deoarece maximul de absorbție pentru cei mai mulți pigmenți antociani se află între 514 – 528 nm [173]. Pentru identificarea agliconilor se folosește maximul de absorbție din zona ultravioletă a spectrului electronic la 260 nm, însă la această lungime de undă pot fi detectați și compuși fenolici incolori din alte clase, de exemplu acizii cinamici. Din această cauză maximul de la 520 nm va fi considerat principal pentru antocianine.

Identificarea compușilor fenolici din extracte vegetale s-a realizat utilizând diverse faze mobile și staționare. Astfel:

- pentru analiza antocianinelor din dade s-a utilizat un sistem format din două pompe LC-10AD, detector SPD-M10A, cuptor CTO-10AS, degazor DGV-12A, sistem de control (Shimadzu, Japonia) echipat cu coloană Luna (C18, 3 μm, 4.6 mm x 100 mm, Phenomenex, Calif) la 35°C. Sistemul de eluare folosit a fost: A (1.5% acid fosforic) și B (1.5% acid fosforic, 20% acid acetic, 25% acetonitril), debit 1 mL/min; profilul eluției a fost cu gradient liniar cu 25% - 85%

solvent B în solvent A timp de 100 minute. Cromatogramele au fost monitorizate la 530 nm iar concentrația relativă a pigmentilor individuali s-a calculat din aria picurilor [116].

- Analiza HPLC a antocianinelor din diverse fructe comestibile [174] a fost realizată utilizând o coloană C18 Aqua Phenomenex (Torrance, CA, 4.6 x 250 mm, 5 μ m) și sistemul de solvenți cu gradient liniar de la 100% A (17.6% acid formic) la 50% A în 15 minute, urmată de eluarea timp de 5 minute cu 100% B (acetoneitril) la un debit de 1 mL/min.
- Calitatea și valoarea comercială a fructelor de merișoare (American cranberry – *Vaccinium macrocarpon*) este determinată de culoarea lor. Culoarea roșie a acestor fructe se datorează prezenței antocianinelor care mai au importante activități terapeutice, inclusiv antitumorale, antioxidante, antiulcer, antiinflamatoare. Pe baza cromatografiei de înaltă performanță (HPLC) a extractelor acid-alcoolice din merișoare folosind o coloană C18 cu fază inversă și sistemul de solvenți: A (apă-acid acetic 10:1) și B (metanol-acid acetic 10:1) cu gradient liniar (100% A la minutul 0 până la 40% A și 60% B timp de 20 minute) s-au identificat 6 antocianine: cianidin 3-galactozida, cianidin 3-glucozida, cianidin 3-arabinozida, peonidin 3-galactozida, peonidin 3-glucozida și peonidin 3-arabinozida [175].
- Separarea cromatografică a antocianinelor din extracte din fructe de *Vaccinium myrtillus* s-a realizat folosind o coloană Lichrosphere (12.5 x 4.0 cm, diametrul particulelor 5 μ m) iar pentru separarea antocianidinelor s-a folosit o coloană Supelco, Hypersil ODS C18, 150 x 4.6 mm, temperatură ambiantă și debit 1.0 mL/min timp de 45 minute. Sistemul de eluare folosit a fost solvent A (acetoneitril) de la 7% la timpul t=0 minute la 25% A la 45 minute, solvent B (soluție 4% acid fosforic). Detectia antocianinelor s-a făcut la 520 nm [176].
- Pentru monitorizarea profilului antocianic al extractelor din cireșe acrișoare (*Prunus cerasus L*) s-a folosit un sistem HPLC model SCL-10AV, cu coloană Polaris C18A și un sistem de eluare format din două faze mobile: A (apă:acid formic 9:1 v/v) și B (acetoneitril:apă:acid formic 5:4:1 v/v). Procentul de solvent B a fost modificat de la 8% la 18% în 12 minute, urmat de eluție în condiții izocratice pentru următoarele 5 minute și apoi de un al doilea gradient liniar segmentat de la 18% la 35% solvent B în 13 minute. Cromatograma a fost monitorizată la 518 nm [177].
- Pentru analiza HPLC a 15 antocianine prezente în extractul pur sub formă de pudră din afine (*Vaccinium myrtillus*) denumit *Bilberon 25* [178, 179, 180], s-a folosit un sistem HPLC HITACHI (L-7100) echipat cu coloană Develosil ODS-HG 5 (4.6 mm x 150 mm). Separarea antocianinelor s-a realizat prin eluție izocratică cu o soluție apoasă de 20% MeOH acidifiată cu 0.5% acid trifluoracetic cu un debit de 2 mL/min, temperatura coloanei 40°C și monitorizarea absorbantei la 520 nm folosind un detector HITACHI L-7420 UV-VIS [181].
- Antocianinele și acizii hidroxicinamici prezenți în diverse soiuri de cireșe din Slovenia au fost caracterizate și determinate cantitativ prin HPLC și spectrofotometrie UV-VIS. Compușii fenolici au fost extrași cu metanol. Analiza HPLC s-a realizat folosind o coloană

Hypersil PEP 300 C18 și un sistem de solvenți format din acid formic, apă și metanol. Hidroxicinamații au fost urmăriți la 320 nm iar antocianinele la 520 nm. S-a detectat prezența cianidin 3-glicozidei și a cianidin 3-rutinozidei ca antocianine majoritare în timp ce pelargonidin 3-rutinozida s-a identificat doar în urme. Principalii acizi hidroxicinamici identificați au fost acidul neoclorogenic și acidul 3'-p-cumaroilchinonic [182].

- Pentru analiza HPLC a unor flavonoide (kaemferol, quercetină, miricetină) și a unor acizi fenolici (acid p-cumaric, cafeic, ferulic, p-hidroxibenzoic, galic și elagic) din fructe de pădure s-au folosit coloane Spherisorb ODSI RP-18, LiChrospher 100RP-18, ODS-Hypersil RP-18, și sisteme de solvenți: 5% acid acetic/metanol, sau A (50 mM amoniudihidrogenfosfat, pH 2.6), B (0.2 mM acid o-fosforic, pH 1.5) și C (20% solvent A în 80% acetonitril) [183].

Trebuie însă menționat faptul că metoda HPLC este foarte costisitoare, motiv pentru care ea prezintă interes analitic și de cercetare dar nu poate fi utilizată pentru obținerea substanțelor individuale la scară industrială.

Cuplarea HPLC-MS este una din cele mai importante tehnici folosite în ultima decadă a secolului XX. Această combinație oferă posibilitatea de a folosi avantajele cromatografiei ca metodă de separare și spectroscopia de masă ca unealtă de identificare. MS este una din cele mai sensibile metode de analiză moleculară. Cuplarea dintre HPLC și MS nu a fost simplă întrucât condițiile normale de operare ale spectrometrului de masă (vid ridicat, temperatură ridicată, operare în fază gazoasă și debit scăzut) sunt diametral opuse față de cele folosite în HPLC (operare cu fază lichidă, debit mare, temperaturi relativ scăzute) [108].

Pe baza datelor HPLC și MS s-a determinat compusul majoritar din lăstare de grâu negru ca fiind cianidin 3-O-rutinozida alături de rutină [184].

Separări rapide și identificarea rapidă a flavonoidelor din amestecuri se obțin prin cuplarea HPLC-DAD-MS. Această tehnică își găsește aplicații pe un domeniu larg.

Prin această metodă s-a realizat identificarea antocianinelor dintr-o specie de fructe de pădure („*bayberry*”) care cresc în China, folosind un sistem compus din spectrometru de masă ZMD și cromatograf HPLC Waters 996, echipat cu detector UV-VIS. Separarea antocianinelor s-a realizat pe o coloană ODS-Hypersil (250 x 4 mm, 5 μm) cu următorul sistem de solvenți: A (5% acid formic și 95% apă, v/v), B (5% acid formic, 45% apă, și 50% MeOH, v/v/v). Eluarea a avut loc cu gradient liniar, detecția s-a făcut la 520 nm. S-a identificat prezența cianidin 3-glicozidei care reprezenta ~95% din totalul antocianinelor prezente urmată de pelargonidin 3-glucozida și delfinidin 3-glucozida [185].

O altă metodă de separare a antocianinelor o reprezintă MEKC („*micellar electrokinetic chromatography*”). Prin această metodă s-a reușit separarea a 6 antocianine (malvidin 3,5-diglucozida, malvidin 3-glucozida, malvidin 3-galactozida, pelargonidin 3-glucozida, cianidin 3,5-diglucozida, cianidin 3-galactozida) din struguri [186].

I.7.4.4. Spectroscopia electronică ultraviolet-vizibil (UV-VIS)

Determinarea curbelor de absorbție în UV-VIS a flavonoidelor în soluții neutre sau alcaline precum și a complexilor cu metale constituie una din principalele metode de identificare. Cu ajutorul spectrofotometriei de absorbție în vizibil și ultraviolet se fac foarte multe dozări de principii active naturale.

Toți fenolii absorb radiațiile luminii în regiunea UV. Din analiza spectrală a antocianinelor se observă prezența a două benzi caracteristice: **banda II**, caracteristică tuturor flavonoizilor în domeniul ultraviolet la $\lambda = 220-280$ nm și banda proprie nucleului de fenilbenzopiriliu (**banda I**) în regiunea vizibilă la $\lambda = 465-560$ nm. Hidroxilarea nucleului flavilic contribuie la deplasarea batocromă a maximumului benzii I, iar metilarea sau glicozidarea grupelor hidroxilice duce la deplasarea hipsocromică [187, 188]. O bandă suplimentară de absorbție, banda III, situată la 310-355 nm, este caracteristică antocianinelor acetilate și poate servi pentru identificarea lor. La acidularea soluțiilor antocianice banda I suferă o deplasare hipsocromă, în timp ce benzile II și III nu; concomitent pentru toate benzile crește absorbția.

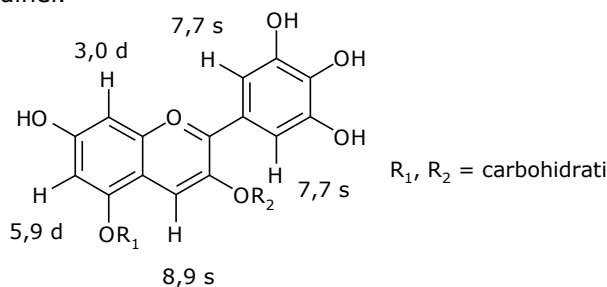
Dozarea cantitativă a antocianinelor se face spectrofotometric sau fotocolorimetric cu utilizarea maximumului de absorbție al benzii I, folosind în calitate de standard antocianina predominantă în sistemul analizat [189]. Pentru dozarea cantitativă se realizează curbe de etalonare cu standardul etalon al substanței respective în aceleași condiții și la concentrații apropiate.

I.7.4.5. Spectroscopia de vibrație IR

Spectroscopia în domeniul IR poate fi folosită pentru identificarea agliconilor și a derivaților acetilați. Lucrările consacrate cercetării spectrelor în domeniul IR al antocianinelor sunt foarte puține, una dintre cauze putând fi suprapunerea mai multor benzi asemănătoare în spectrele antocianinelor naturale de bază ceea ce complică interpretarea lor. Banda de la ~ 1640 cm^{-1} este caracteristică tuturor antocianinelor și corespunde vibrațiilor legăturii duble a oxigenului oxonic [155]. Vibrațiile de valență ale grupelor esterice carboxilice se înregistrează la 1690-1726 cm^{-1} , iar informațiile furnizate despre existența legăturilor de hidrogen inter- și intramoleculare se manifestă în spectru printr-o bandă lată de absorbție în regiunea 2100-2300 cm^{-1} .

I.7.4.6. Rezonanța magnetică nucleară (RMN)

Pentru determinarea structurii substanțelor flavonice, deosebit de utilă este spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară fie de carbon ^{13}C fie cea protonică, ^1H . Antocianinele se pot recunoaște în spectru ^1H -RMN după semnalul 8,8 (s, H-4) și semnalele caracteristice ale altor protoni aromatici, ca de exemplu ai glicozidelor, cum este cazul delfinidinei.



Pentru identificarea antocianinelor din diverse fructe spectrele ^1H și ^{13}C RMN s-au înregistrat cu un aparat JEOL 400, cu operare la 400 și 100 MHz [174].

I.7.4.7. Spectroscopia de masă (MS)

Spectroscopia de masă este o metodă ce se bazează pe obținerea ionilor și separarea acestora în funcție de raportul dintre masă și sarcină.

De mai mult de două decenii spectrometria de masă s-a dovedit a fi una din cele mai eficiente tehnici folosite în cercetare, în particular pentru analiza amestecurilor complexe a probelor biologice. Sensibilitatea ridicată, specificitatea și combinarea ușoară cu alte tehnici cromatografice au plasat-o pe aceasta printre metodele de analiză cel mai des folosite, mai ales pentru compușii flavonoidici [190].

Spectroscopia de masă se folosește pentru determinarea maselor molare ale compușilor și furnizează date prețioase despre structura intermediarilor care se obțin la degradare. Cuplarea spectrometriei de masă cu cromatografia de lichide de înaltă performanță permite micșorarea timpului necesar pentru analiză [191]. Prin spectrometrie de masă au fost caracterizate și fracțiunile obținute în urma separării pe o coloană cu Sephadex LH-20 a unui extract de coacăze sălbatice (*Vaccinium angustifolium*) [121].

Folosind sistemul (HPLC - MS) cromatografie de lichide cuplată cu spectrometrie de masă s-au obținut informații structurale despre antocianinele prezente în diverse specii de mure. Sistemul folosit a constat în spectrometru de masă Finningan MAT LCQ echipat cu un sistem binar HP 1100 și UV-VIS fixat la lungimea de undă $\lambda 550$ nm. Separarea antocianinelor s-a realizat folosind o coloană Phenomenex Phenyl Hexyl (5 μm , 250 x 4,6 mm) și o fază mobilă binară: A (apă:acetonitril:acid acetic = 89:9:2 v/v) și B (apă:acetonitril = 20:80 v/v) [192]. Prin cuplarea tehnicilor HPLC-ESI-MS s-a identificat prezența formelor izomere ale elagitaninurilor în mure negre, compuși a căror prezență nu a putut fi identificată prin alte tehnici [193].

Pentru monitorizarea antocianinelor din vin și must s-a folosit electroforeza capilară cuplată cu spectrometria de masă (CE/MS) [194] iar identificarea procianidinelor și antocianinelor din diverse specii de afine s-a făcut prin cuplarea HPLC-MS [195].

Eterogenitatea structurală a polifenolilor din extracte de merișoare, extracte din semințe de struguri și rodie a fost caracterizată prin tehnica MALDI-TOF MS. Avantajele acestei metode sunt faptul că din fiecare moleculă „părinte” se formează un singur ion molecular, precum și abilitatea de a detecta compuși cu mase moleculare mari și interpretarea izotopilor (se permite detecția izomerilor cu diferențe mici de masă) [196].

PARTEA a-II-a — CONTRIBUȚII PROPRII

PARTEA EXPERIMENTALĂ

II. 1. DATE BOTANICE REFERITOARE LA SPECIILE *VACCINIUM* STUDIATE

Fructele și frunzele speciilor de *Vaccinium* au o istorie lungă în utilizarea lor în medicină. Fructele de *Vaccinium myrtillus* (afine) și *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare, afine roșii) au fost folosite secole la rând în Europa pentru tratarea complicațiilor de la nivelul tractului urinar, al inflamațiilor și infecțiilor urinare. Frunzele acestor specii s-au folosit ca remediu împotriva diabetului. Calitățile medicinale ale acestor specii continuă a fi investigate și azi și utilizate în industria farmaceutică și alimentară în întreaga lume.

Încadrarea sistematică:

Filum	<i>Angiospermae (Ovariatae)</i>
Clasa	<i>Dicotyledoneae</i>
Ramura	<i>Parietaligenae</i>
Ordinul	<i>Ericales (Bicornes)</i>
Familia	<i>Ericaceae</i>
Genul	<i>Vaccinium</i>

Ordinul Ericales

Ordinul *Ericales* cuprinde exclusiv plante lemnoase, în majoritate arbuști sempervirescenți cu frunze întregi, coriacee. Este un ordin cu flori simpetale, mai rar cu corola neunită. Ordinul *Ericales* cuprinde familii puține, mai reprezentativă fiind familia *Ericaceae* [197].

Familia Ericaceae

Familia *Ericaceae* cuprinde circa 2500 de specii dintre care în România vegetează 14. Sunt arbuști și subarbuști cu frunze sempervirescente sau caducei, cu flori actinomorfe rar zigomorfe cu caliciul adesea dialisepal iar fructul o bacă sau capsulă [198]. Fructele sunt bace, capsule, rar drupe. *Ericaceele* cresc mai ales în regiunile înalte [197].

tartaric, malic, săruri minerale. Au proprietăți antidiareice și antibiotice, iar datorită antocianinelor reglează permeabilitatea și asigură protecția capilarelor din zona retiniană, contribuie la mărirea acuității vizuale și adaptarea vederii la întuneric.

Acțiune farmacodinamică – utilizări terapeutice

Frunzele și fructele de afin au importanță terapeutică în medicina umană și veterinară. Principiile active din frunze au rol astringent, bacteriostatic, hipoglicemiant. Sunt recomandate în tratarea diareei, diabetului, infecțiilor urinare, uremiei, gutei, reumatismului.

Principiile active din fructe au rol diuretic, antiinflamator, antidiareic, antihelmintic, antiseptic intestinal, antiseptic urinar, adjuvant în tratamentul de bază al diabetului; ușor coronaro-dilatatoare, asigură reglarea cardiovasculară, protejează pereții vaselor sanguine, protejează organismul împotriva radiațiilor, activează regenerarea purperei retiniene și sensibilizează fotoreceptorii.

Mirtilina, o substanță conținută de fructe și frunze, penetrează celula bacteriei și îi slăbește vitalitatea, iar administrată intern, scade glicemia. Pigmenții care dau nuanța albăstruie fructului protejează corpul împotriva radioactivității și reglează anumite procese imunitare.

În medicina umană se folosesc pentru tratarea enteritei, diareei, dizenteriei, putrefacției intestinale, hemoragiilor prin fragilitate capilară, retinopatiilor, arterosclerozei, tulburărilor circulatorii, diabetului, insuficienței biliare sub formă de infuzii, macerate, decocturi.

În medicina veterinară se folosesc pentru tratarea diareei, gastroenteritei, afecțiunilor renale, cistitei, sub formă de infuzii, decocturi și macerate.

În industria farmaceutică din antocianozidele extrase din fructe se prepară medicamentul DIFABION, cu rol de protejare a pereților vaselor sanguine.

Specia *Vaccinium vitis-idaea* (merișor de munte) [197-203]

Este o specie meliferă, răspândită în Europa, Asia, America de Nord.

Vaccinium vitis-idaea este un arbust tufos, mic, de 5-30 cm întâlnit la mare altitudine, mai sus decât afinul, la lumină sau locuri slab umbrite, pajiști alpine și montane, luminișuri, molidișuri rărite la limita superioară de vegetație lemnoasă pe întreg lanțul Carpaților la 1300-1400 m.

Se mai numește merișor, afin roșu, bujor, cimișir, coacăz, coacăz de munte, poranici, smârdar, stropșele. Vegetează pe soluri scheletice, cu reacție puternic acidă.

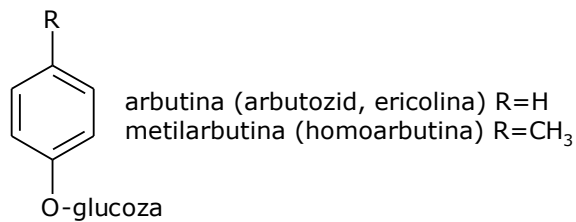
Vitis-idaea folium, frunzele de merișor sunt eliptice, cu vârful rotunjit sau emarginat, pielose, rigide, persistente, ușor răsfrânte pe margini, pe fața superioară verde-închis, lucitoare, pe cea interioară verde-palid cu puncte rare, brune, scurt-pețiolate.

Florile sunt albe-roz, dispuse câte 2-6 în raceme terminale nuanțate; perioada de înflorire este mai-iulie. Florile furnizează albinelor nectar (0,1-0,9 mg/floare) și polen, vizita acestora fiind intensă pe toată perioada de înflorire. Fructele sunt bace sferice, roșii, lucitoare, acrișoare, comestibile, se coc în august-septembrie.

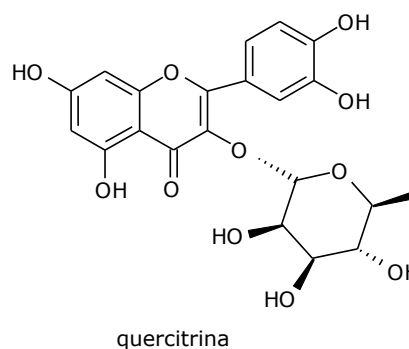
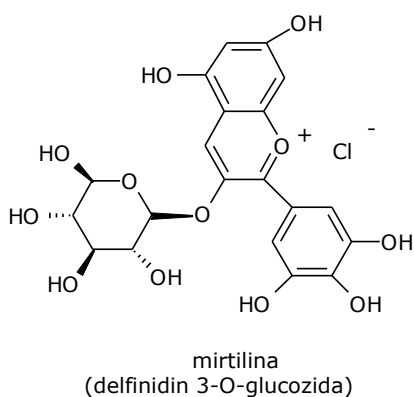
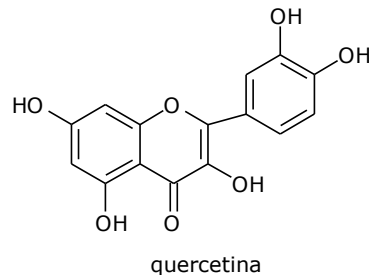
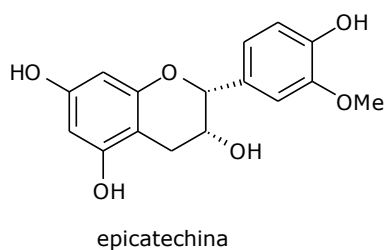


Compoziția chimică: principii active

Frunzele conțin arbutozid (arbutină, ericolină) (3,5-8 %), hidrochinonă, metilarbutozid (metilarbutină, homoarbutină), flavonoizi, taninuri, acid chinic, vitamina C, săruri de magneziu, săruri ale acizilor organici. Frunzele (*Vitis idaea folium*) se recoltează în septembrie-octombrie, când conținutul în substanțe active este maxim. Se usucă la umbră, în strat subțire. Uscarea artificială se face la circa 30°C. După uscare frunzele se strujesc, iar ramurile se aruncă. Se păstrează în saci textili sau de hârtie, în camere uscate.



Vaccinium vitis-idaea fructus conține derivați de acid benzoic, alți acizi organici (citric, malic, chinic, lactic, oxalic), derivați antocianici (mirtalina a și b), vitamine (C și din complexul B), derivați flavonici, catechine, triterpenoide, carbohidrați, pectine, β-caroten, săruri minerale și are acțiune antimicrobică (fructele proaspete păstrate în apă nu dezvoltă mucegai nici după 2 ani).



Acțiune farmacodinamică - utilizări terapeutice

Frunzele plantei au utilizări terapeutice în medicina umană și veterinară. Principiilor active li se atribuie rol diuretic, antiseptic, antidiareic, antiinflamator, astringent, sudorific. Sunt folosite în tratarea cistitelor, afecțiunilor renale, gutei, reumatismului, diareei, leucoreei, hemoragiilor, iar la animale și în gastroenterite, stări *a frigore*, febrile. Acțiunea farmacodinamică este dată de arbutozidă, metilarbutozidă, flavonoide, taninuri, acidul chinic și vitamina C. Pe traiectul căilor urinare, trec arbutozida și metilarbutozida în hidrochinonă și respectiv, în metilhidrochinonă, care se elimină rapid prin urină colorând-o în verde. Acestea, alături de flavonoide, sunt răspunzătoare de acțiunea diuretică, dezinfectantă și slab antidiabetică. Flavonoidele au acțiune diuretică. S-a constatat că atât *in vivo* cât și *in vitro*, extractele apoase de frunze sunt active față de stafilococ. Această acțiune nu este proporțională cu concentrația în hidrochinonă din urină, ci depinde de sensibilitatea germenilor față de această substanță. Supradozarea produce iritarea mucoasei gastrice și fenomene alergice.

În medicina umană se folosește: pentru tratarea gutei, reumatismului, cistitelor, pielitei, litiazei renale (calculoză), afecțiunilor căilor urinare cu stări inflamatorii purulente, hematuriei, diareei, tusei sub formă de extract sau decoct.

În medicina veterinară se folosește - sub formă de infuzie, decoct, macerat, pulbere de frunze și extracte alcoolice.

Din fructe au fost obținuți derivați antocianici cu acțiune de protecție vasculară în special retiniană, favorizând acuitatea vizuală și adaptabilitatea la întuneric.

Fructele sunt folosite în industria alimentară (compot, gem, dulceață, șerbet etc.), se pot păstra în apă proaspătă și pot fi folosite oricând în scopul dorit.

II.2. OBȚINEREA EXTRACTELOR DIN SPECIILE STUDIATE

II.2. 1. Păstrarea și pregătirea materiei prime

Materia primă: fructele de afine (*Vaccinium myrtillus*) și merișoare (*Vaccinium vitis-idaea*) au fost culese în perioada august-septembrie între anii 2005-2007 din diverse regiuni muntoase și anume: de pe Muntele Mic (la o altitudine de 1400 m), respectiv regiunea Coșevița și Borlova. După recoltare au fost înlăturate fructele necoapte cât și frunzele și partea lemnoasă. Materialul vegetal selectat a fost uscat la temperatura camerei și lumină difuză, și apoi păstrat în cutii de carton, la întuneric.

II.2.2. Optimizarea procesului de extracție a compușilor polifenolici din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine negre) respectiv *Vaccinium vitis-idaea* (merișor de munte)

II.2.2.1. Extracția în condiții dinamice

II.2.2.1.1. *Extracția dinamică cu soluții etanolice respectiv metanolice la temperatura camerei*

Găsirea unei metode eficiente de extracție a polifenolilor din fructe este de mare interes, în special datorită efectelor pe care le au polifenolii în prevenirea unor boli. În acest studiu pentru extracția polifenolilor s-a folosit alcool etilic și alcool metilic de diferite concentrații.

Obiectivul acestui studiu a fost investigarea efectului concentrației solventului asupra gradului de extracție a compușilor fenolici.

Materiale utilizate:

Ca materie primă pentru obținerea extractelor alcoolice din fructe de *Vaccinium myrtillus*, s-au folosit fructe uscate culese de pe Muntele Mic în anul 2005, iar pentru obținerea extractelor din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* s-a folosit suc brut obținut cu ajutorul unui blender din fructe proaspete culese în anul 2006. Reactivii utilizați au fost alcool metilic (p.a., Merck) respectiv alcool etilic (p.a., 96%, Chimopar, București).

Mod de lucru: [204, 205]

2 grame fructe uscate (*Vaccinium myrtillus*), mărunțite în prealabil, respectiv 4 grame suc obținut din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* au fost extrase cu alcool etilic respectiv cu alcool metilic de diferite concentrații (20, 30, 50, 70, 80, 94%) în raport 1:10 (w/v) prin agitare mecanică la 400 rpm, timp de o oră la temperatura camerei. Amestecul obținut a fost apoi centrifugat la 2000 rpm timp de 6 minute, supernatantul a fost colectat, filtrat și păstrat la frigider (5°C) până în momentul efectuării analizelor: determinarea conținutului de polifenoli totali, flavonoide totale și activitate antioxidantă.

Deoarece compușii fenolici sunt extrem de sensibili la lumină, toate operațiile au avut loc cu protejare împotriva luminii.

Rezultatele obținute au făcut obiectul unei lucrări științifice, cotate ISI [206].

II.2.2.1.2. Obținerea de extracte lipofile și hidrofile din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* în vederea determinării activității antioxidante totale

În cele mai multe studii de determinare a activității antioxidante, pentru obținerea extractelor s-au folosit solvenți polari ca EtOH, MeOH, acetona și apa și în consecință extractele conțin mai mulți componenți hidrofili. Din această cauză activitatea antioxidantă a materialului supus extracției nu reflectă activitatea antioxidantă totală a acestuia. Pentru determinarea activității antioxidante totale este necesară obținerea ambelor tipuri de extracte, atât hidrofilic cât și lipofilic. În acest sens am realizat aceste extracte din fructe culese din regiunea Coșevița, Borlova și Muntele Mic în anii 2006, 2007.

Materiale utilizate:

Ca materie primă s-au folosit fructe uscate și proaspete de *Vaccinium myrtillus* culese din regiunea Coșevița și Borlova (2006, 2007) respectiv fructe uscate și proaspete de *Vaccinium vitis-idaea* culese de pe Muntele Mic, în anul 2007. Reactivii utilizați au fost hexan și alcool etilic (p.a., 96%, Chimopar, București).

Mod de lucru:[207]

Materialul vegetal mărunțit în prealabil (5g) a fost supus extracției sub agitare magnetică cu 25 mL hexan timp de 2 minute. Amestecul obținut a fost apoi filtrat cu ajutorul unei pâlnii Büchner. Extracția cu hexan s-a repetat de două ori, iar extractele lipofile obținute au fost combinate și evaporate până la starea de gel folosind un rotavapor, în condiții de vid și la temperatură de maximum 40°C. Reziduul obținut în urma extracției cu hexan s-a extras de două ori cu 25 mL etanol acidifiat (7% acid acetic în alcool etilic 80%) în vederea obținerii fracțiunii hidrofili.

Extractele obținute au fost reunite, filtrate și păstrate la frigider până în momentul efectuării analizelor: determinarea conținutului de polifenoli totali, flavonoide totale și activitate antioxidantă.

II.2.2.2. Extracția în condiții statice

II.2.2.2.1. Obținerea extractelor apoase/alcoolice din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* prin extracție statică repetată

Materiale utilizate:

Materia primă folosită (fructe uscate de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea*) a provenit de pe Muntele Mic, culeasă în anul 2007. Reactivii utilizați au fost apă distilată și alcool etilic (solvent pentru extracție, p.a. 96%, Chimopar, București).

Mod de lucru:

Pentru obținerea unor extracte mai bogate în pigmenți antocianici, fructele uscate, mărunțite în prealabil au fost supuse extracției succesive timp de 5 zile, la o temperatură de 5°C, cu reutilizarea solventului pe alt material vegetal proaspăt. Raportul material vegetal : solvent a fost 1 : 10. Procedura de extracție este prezentată în tabelul 5.

Tabelul 5.

Condițiile experimentale pentru obținerea extractelor apoase/alcoolice

Ziua	Fructe (g)	Solvent sau extract inițial (mL)	Extract obținut (mL)	Timp de extracție (h)	Temperatura (°C)
1.	15	150 mL EtOH (96%)/apă	130 mL E1	24	5
2.	13	130 mL E1	110 mL E2	24	5
3.	11	110 mL E2	90 mL E3	24	5
4.	9	90 mL E3	70 mL E4	24	5
5.	7	70 mL E4	50 mL E5	24	5

E1 = extract obținut după o zi; E2 = extract obținut după 2 zile; E3 = extract obținut după 3 zile; E4 = extract obținut după 4 zile; E5 = extract obținut după 5 zile (extract final)

Extractele finale (E5 apos respectiv E5 alcoolic) astfel obținute au fost păstrate la frigider până în momentul analizei lor și a utilizării lor în diverse aplicații precum: utilizarea ca antioxidanți pe probe de uleiuri vegetale, copigmenți pentru intensificarea culorii vinurilor Rosé și alb, efectul lor asupra unor parametri biochimici și asupra unor enzime la cobai.

II.3. CARACTERIZAREA EXTRACTELOR DIN FRUCTE DE VACCINIUM MYRTILLUS RESPECTIV VACCINIUM VITIS-IDAEA

II.3.1. Polifenoli

Prezența compușilor polifenolici în extractele din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* a fost evidențiată prin cromatografie în strat subțire, respectiv au fost dozați cantitativ conform Farmacopeei Române și prin metoda colorimetrică Folin Ciocalteu.

II.3.1.1. Identificarea calitativă a compușilor polifenolici

Analiza calitativă a compușilor fenolici s-a realizat prin cromatografie în strat subțire.

Metodă: [208]

1 g material vegetal pulbere (fructe uscate de afine respectiv merișoare) a fost supus extracției cu 20 mL alcool etilic 50%. Extracția s-a făcut într-un pahar

Erlenmayer prevăzut cu o pâlnie, pe baie de apă până la punctul de fierbere al solventului. În momentul în care solventul începe să fiarbă, se întrerupe fierberea, soluția se răcește, se filtrează și se aduce la volumul de 20 mL cu același solvent.

Analiza cromatografică în strat subțire s-a realizat folosind plăci Kieselgel (Merck) Silicagel 60 F₂₅₄, de dimensiune 20 x 20 cm, cu o grosime a stratului de 0,25 mm. În paralel cu cele două extracte s-a supus cromatografiei și standardul de pirocatechină (catechol, Merck), soluție etanolică 0,1%. Developarea plăcii s-a realizat pe o distanță de aproximativ 8 cm. Uscarea cromatogramelor s-a făcut la temperatura camerei iar vizualizarea spoturilor a putut fi realizată cu ochiul liber pentru extracte datorită prezenței pigmentilor colorați, completată de vizualizare la lampa cu raze UV.

Pentru developare s-a utilizat sistemul: toluen : acetat de etil : acid formic : apă = 5 : 100 : 10 : 10.

Extractele au evidențiat un spot principal de culoare roșu-brun la $R_f = 0,75$, și un spot de culoare orange la $R_f = 0,46$ (în cazul extractului din afine) și 0,32 (în cazul extractului din merișoare). Valoarea R_f a standardului de pirocatechină a fost 0,76.

II.3.1.2. Determinarea cantitativă a compușilor polifenolici

Analiza cantitativă a compușilor fenolici a fost realizată prin două metode:

- prin metoda prevăzută în Farmacopee, folosind ca substanță etalon pirocatechina și reactivii (R) prevăzuți de Farmacopee [208];
- prin metoda colorimetrică ce utilizează reactiv Folin Ciocâlteu, folosind ca substanță etalon acidul galic [94, 144, 207,].

Materialul vegetal folosit pentru analiză a fost: fructe uscate de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea*, 2005, 2006 .

1. Determinarea cantitativă a compușilor polifenolici conform Farmacopeei

Mod de lucru:

În vederea obținerii extractelor alcoolice, 1 g material vegetal (fructe uscate) a fost supus extracției cu 100 mL EtOH 50%, pe baie de apă la reflux, timp de 30 minute. Soluția fierbinte a fost filtrată prin vată de sticlă într-un balon cotat de 100 mL și după răcire s-a completat până la semn cu alcoolul folosit pentru spălarea repetată a rezidului (**soluția A**).

Determinarea conținutului în polifenoli totali

La 5,0 mL soluție A s-a adăugat 5,0 mL acid fosfowolframic, soluție (R), și după agitare s-a filtrat, îndepărtând primele fracțiuni de filtrat. În continuare 5,0 mL filtrat s-au diluat cu carbonat de sodiu (R) 200 g/L la 10 mL, într-un balon cotat (**soluția probă**). După 1 minut se determină absorbanta soluției la 660 nm, folosind ca lichid de compensare o soluție preparată din 0,5 mL filtrat adus cu apă la balon cotat de 10 mL.

Trasarea curbei de etalonare

Conținutul în polifenoli totali a probelor de analizat s-a calculat cu ajutorul unei curbe etalon, stabilite în paralel și în aceleași condiții cu soluția probă. S-au luat în lucru 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,45; 0,50 mL soluție etalon de pirocatechină 0,1 g/L la care s-au adăugat 0,25 mL acid fosfowolframic

soluție (R) și carbonat de sodiu (R) 200 g/L în fiecare balon cotat de 10 mL. Ca lichid de compensare s-a folosit o soluție preparată din 0,25 mL acid fosfowolframic soluție (R) și apă distilată într-un balon cotat de 10 mL.

Curba de etalonare obținută este reprezentată în figura 14:

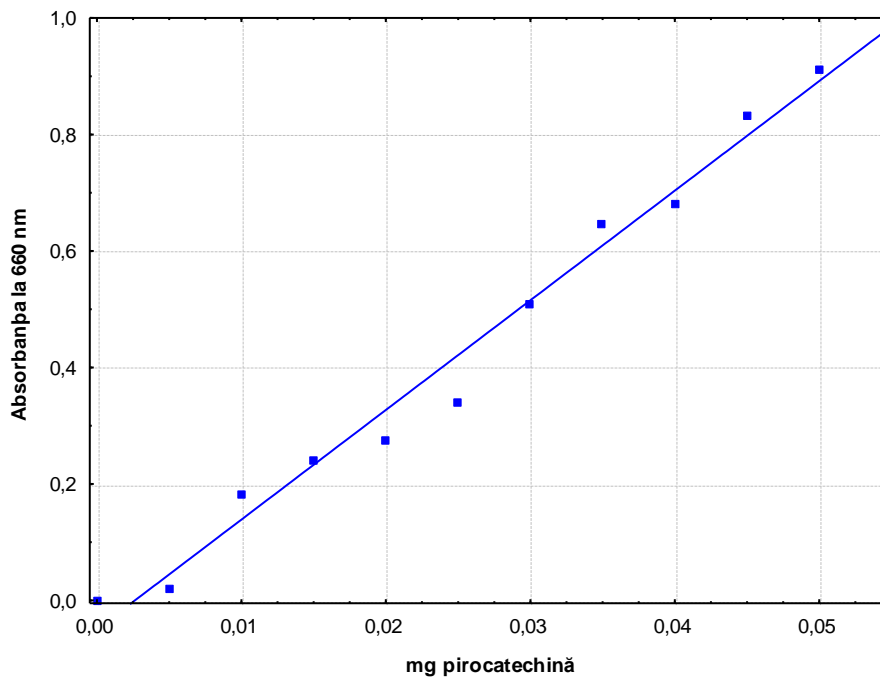


Figura 14. - Curba de etalonare pentru pirocatechină

Pe baza absorbanțelor citite a fost stabilită ecuația dreptei și s-a calculat coeficientul de corelare:

$$y = -0,0495 + 18,826 \cdot x; \quad r^2 = 0,9814$$

unde: y – absorbanța soluției la lungimea de undă $\lambda = 660$ nm
x – cantitatea de pirocatechină, mg

Conținutul în polifenoli totali a extractelor analizate este prezentat în capitolul III - Rezultate și discuții.

2. Determinarea cantitativă a compușilor polifenolici (determinarea conținutului în polifenoli totali) prin metoda Folin Ciocâlțeu

Compușii fenolici și polifenolici sunt reprezentanții unei mari clase de antioxidanți naturali prezenți în plante, alimente și băuturi și de obicei se determină cantitativ printr-o metodă colorimetrică ce folosește reactiv Folin Ciocâlțeu. Această metodă se bazează pe reacția de reducere a reactivului Folin Ciocâlțeu, un amestec de oxizi de wolfram și molibden [94].

Mod de lucru:

La 0,5 mL extract etanolic (sau metanolic) se adaugă 7 mL apă distilată, 0,5 mL reactiv Folin-Ciocalteu (Merck) și se agită bine. Amestecul obținut se lasă 3 minute în repaus apoi se adaugă 2 mL soluție carbonat de sodiu 20% și se agită din nou. Absorbanța soluției rezultate se înregistrează la 720 nm, după menținerea probelor timp de o oră pe baie de apă la 25°C. Concentrația în compuși fenolici totali se calculează cu ajutorul unei ecuații de regresie liniară obținută în urma realizării curbei de etalonare a acidului galic, iar rezultatele se exprimă ca miligrame echivalenți acid galic (mg GAE)/100 g fructe [146].

Trasarea curbei de etalonare

Pentru trasarea curbei de etalonare, la 1 mL soluție apoasă ce conține 5, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 mg/L acid galic se adaugă 0,5 mL reactiv Folin-Ciocalteu, și 2 mL soluție carbonat de sodiu (20%). Absorbanța soluțiilor standard se măsoară la 720 nm după 30 de minute, timp în care soluțiile se lasă în repaus pentru realizarea reacției. Rezultatele se exprimă ca mg acid galic/100 g fructe.

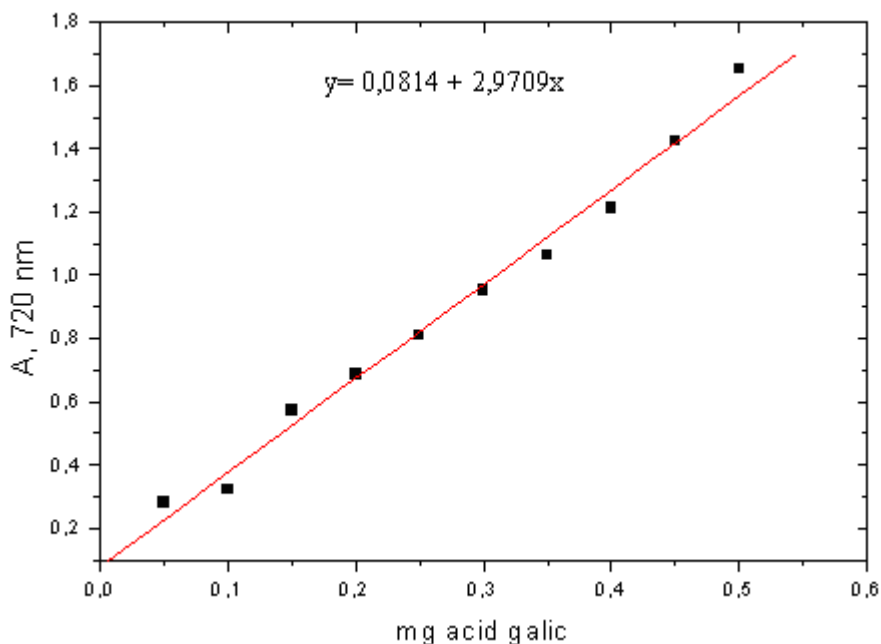


Figura 15. - Curba de etalonare pentru acidul galic ($r^2 = 0,9938$)

II.3.2. Flavonoide

II.3.2.1. Analiza calitativă a flavonoidelor

Analiza calitativă a compușilor flavonoidici s-a realizat prin cromatografiere în strat subțire a extractelor metanolice respectiv etanolice 5% în același sistem de solvenți (fază mobilă) pentru materialele vegetale supuse analizei (afine negre și afine roșii).

Obținerea extractelor și analiza cromatografică a acestora s-a realizat în condițiile descrise la II.3.1.1. În paralel s-au supus cromatografierii și standarde de quercetină și rutină, soluții alcoolice 0,1%.

Pentru dezvoltare s-a utilizat sistemul: acid acetic glacial : acid formic : apă : acetat de etil (7:7:14:72) și sistemul acid acetic:acid clorhidric:apă (30:3:10), denumit sistemul Forestal pentru identificarea agliconilor flavonoidici [18].

Dezvoltarea plăcilor s-a realizat pe o distanță de aproximativ 6,5 cm. Uscarea cromatogramei s-a realizat la aer cald iar vizualizarea spoturilor s-a realizat cu ochiul liber și la lampa cu raze UV.

Pentru martorii utilizați s-au determinat R_f -urile. Pe baza acestora cât și a culorilor produșii respectivi s-au identificat și în extracte.

În cazul utilizării sistemului Forestal s-au obținut cele mai bune rezultate și anume: s-au identificat următoarele spoturi cu valorile R_f :

	Valoarea R_f	Culoare spot
Quercetină	0,44	galben-portocaliu
Rutină	0,38	galben
Extract din fructe de <i>Vaccinium myrtillus</i> (afine)	0,56	roșu portocaliu
	0,81	mov-albăstrui
Extract din fructe de <i>Vaccinium vitis-idaea</i> (merișor)	0,48	galben-portocaliu
	0,31	portocaliu murdar.

II.3.2.2. Analiza cantitativă a flavonoidelor

Analiza cantitativă a flavonoidelor a fost realizată prin două metode:

- prin metoda oficială prevăzută de Farmacopeea Română, X [208], rezultatul fiind exprimat în rutozidă, g%;
- prin metoda descrisă de Marinova și colaboratorii [210]. Conținutul total în flavonoide a fost exprimat ca mg echivalenți de catechină (CE)/100 g masă vegetală, pe baza unei curbe de etalonare trasată în prealabil

1. Determinarea cantitativă a flavonoidelor conform Farmacopeei Române [208]

S-a lucrat cu același material vegetal ca și la extractele obținute la paragraful II.3.1.2 (soluția A).

Determinarea conținutului de flavonoide

10,0 mL soluție A se diluează cu MeOH (R) într-un balon cotat de 25 mL. Se agită timp de 2-3 minute apoi se lasă în repaus timp de 10 minute. Se filtrează și se îndepărtează primele fracțiuni de filtrat.

Soluția probă se obține prin adăugarea la 5 mL filtrat a 5 mL acetat de sodiu 100 g/L și 3 mL clorură de aluminiu 25 g/L. Se agită și se completează cu metanol la 25 mL într-un balon cotat. După 15 minute, dacă este cazul se completează din nou cu metanol la 25 mL și se determină absorbanta soluțiilor probă la lungimea de undă de 430 nm, folosind ca lichid de compensare o soluție obținută din 5 mL filtrat,

8 mL apă distilată și MeOH într-un balon cotat de 25 mL. Calculul concentrației în flavonoide a probei de analizat s-a făcut cu ajutorul unei curbe de etalonare trasată pentru rutină.

Trasarea curbei de etalonare

S-au luat în lucru: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 mL soluție – etalon de rutină 0,1 g/L în MeOH. La aceste volume s-au adăugat 5 mL acetat de sodiu 100 g/L, 3 mL clorură de aluminiu 25 g/L și metanol (R) la balon cotat de 25 mL. Ca lichid de compensare se folosește o soluție obținută din: 5 mL filtrat, 8 mL apă distilată și metanol la balon cotat de 25 mL. Curba de etalonare obținută este prezentată în figura 16.

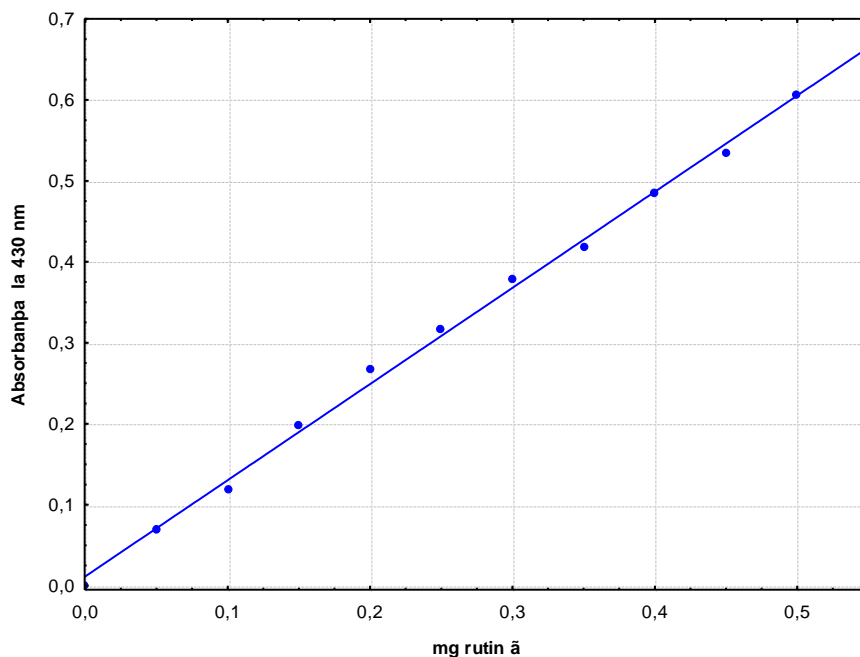


Figura 16. - Curba de etalonare pentru rutină

Pe baza absorbanelor citite a fost stabilită ecuația dreptei și s-a calculat coeficientul de corelare:

$$y = 0,0116 + 1,1875 \cdot x; r^2 = 0,9971$$

unde: y – absorbanta soluției la lungimea de undă $\lambda=430$ nm

x – cantitatea de rutină, mg

Cantitatea de flavonoide corespunzătoare absorbantei citite este:

$$X = A / 0,9163 \text{ mg rutină}$$

$$\text{Flavonoide, \% exprimat în rutină} = (X \cdot 4) / g \quad (1)$$

unde: X = mg flavonoide corespunzătoare absorbantei citite

g = cantitatea de material vegetal folosit pentru analiză

2. Determinarea conținutului de flavonoide totale prin metoda descrisă de Marinova și colaboratorii [210]

Într-un balon cotat de 10 cm³ la 1 mL extract s-au adăugat 4 mL apă distilată și 0,3 mL soluție NaNO₂ 5%. După agitarea și menținerea în repaus timp de 5 minute se adaugă 0,3 mL soluție clorură de aluminiu 10% și se agită din nou. După 6 minute de repaus se adaugă 2 mL soluție NaOH 1M și se aduce volumul la 10 mL cu apă distilată. Absorbanța soluției se înregistrează la 510 nm față de un martor. Conținutul total în flavonoide a fost exprimat ca mg echivalenți de catechină (pirocatechină) (CE)/100 g masă vegetală, pe baza unei curbe de etalonare. Trasarea curbei de etalonare s-a făcut conform modului de lucru descris la paragraful II.3.1.2., cu măsurarea absorbției la 510 nm.

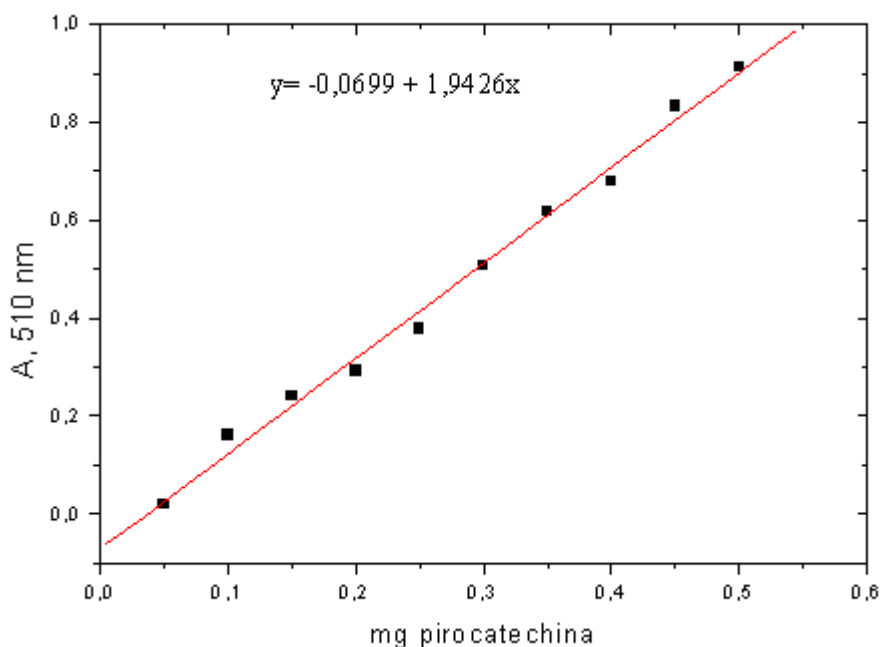


Figura 17. - Curba de etalonare pentru pirocatechină

II.3.3. Antocianinele

II.3.3.1. Identificarea antocianinelor prin reacții de culoare

Antocianinele sunt pigmenți vegetali derivați ai flavanului, care dau culoarea roșie, violetă sau albastră a florilor, fructelor și altor organe. Varietatea culorii este imprimată de pH-ul sucului celular și de microelementele din organismul vegetal cu care antocianinele se combină [12].

Metodele analitice clasice pentru identificarea acestor compuși constau în reacții de culoare. Antocianinele dau reacții de culoare caracteristice cu sărurile unor metale (Al³⁺, Fe³⁺) și ca în sistemele biologice își modifică culoarea funcție de pH-ul mediului în care se află.

Mod de lucru

La 1 mL extract vegetal analizat (extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea*, preparat conform metodologiei descrisă la paragraful II.2.2.2.1) s-a adăugat 1 mL reactiv de identificare.

La tratarea cu soluție de clorură ferică, în cazul ambelor extracte s-a observat o decolare semnificativă în decurs de numai trei minute, decolorarea fiind mai evidentă în cazul extractului de merișoare. În prezența NaOH precum și a acetului de sodiu, culoarea roșie a extractului de merișoare s-a modificat în mov-albăstrui, iar în cazul extractului de afine (diluată 1:10) apariția nuanțelor de albastru a fost mai evidentă.

II.3.3.2. **Identificarea antocianinelor prin cromatografie în strat subțire**

Analiza calitativă a compușilor antocianici prezenți în speciile studiate din familia *Ericacea* a fost realizată prin cromatografie în strat subțire.

În cazul pigmentilor antocianici metoda cromatografiei în strat subțire este foarte ușor de utilizat, deoarece datorită colorației proprii a pigmentilor, de cele mai multe ori cromatogramele nu necesită dezvoltare suplimentară.

Pentru identificarea cromatografică a compușilor din extractele din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* (obținute conform paragrafului II.2.2.2.1, diluate 1:10) ca fază staționară s-au folosit plăci cromatografice Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck 10x10 cm), iar ca sistem de dezvoltare s-a folosit, sistemul n-butanol:acid acetic:apă = 4:1:5 [158].

Dezvoltarea cromatogramei s-a realizat pe distanța de 8 cm. Plăcuțele au fost uscate la temperatura camerei, la întuneric și apoi examinate la lumina zilei, spoturile fiind evidențiate datorită colorației proprii.

Valorile R_f pentru extractele analizate respectiv standardele de antocianine

	R _f	Culoare spot
Extract din fructe de <i>Vaccinium vitis-idaea</i> (merișor)	0,26	roșu
	0,41	roșu
Extract din fructe de <i>Vaccinium myrtillus</i> (afine)	0,14	albastru-mov
	0,20	albastru-mov
	0,24	roșu
Cianidină	0,26	roșu
Delfinidină	0,14	albastru-mov
Malvidină	0,19	albastru-mov

Pentru martorii utilizați (sol. 0,2 mg/mL) s-au calculat R_f-urile după care, pe baza R_f-ului și a culorilor, unii au fost identificați în extractele analizate de noi.

Analiza calitativă a compușilor antocianici prezenți în cele două tipuri de afine, realizată prin cromatografie în strat subțire a evidențiat prezența cianidinei, în toate extractele vegetale analizate, sub forma unui spot de culoare roșie.

II.3.3.3. **Identificarea antocianinelor prin spectroscopie IR**

Spectrele IR ale extractelor etanolice din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* (obținute conform paragrafului II.2.2.2.1) s-au înregistrat cu ajutorul unui spectrometru Specord M-80 Carl Zeiss Yena.

Spectroscopia IR a evidențiat prezența unei benzi la $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$, bandă caracteristică tuturor antocianinelor, care corespunde vibrațiilor legăturii duble a oxigenului oxonic.

Atribuirea benzilor din spectrele IR pentru extractele analizate sunt prezentate în tabelul 23 capitolul III – Rezultate și discuții.

II.3.3.4. **Identificarea antocianinelor prin spectrometrie de masă**

Spectrele de masă au fost înregistrate pe un aparat "High Capacity Ion Trap Ultra" (HCT Ultra), Bruker Daltonics, Bremen, Germania, legat la un computer pe care funcționează pachetul integrat de programe Compass™ 1.2., care include modulul Hystar™ 3.2.37 pentru controlul instrumentului și achiziționarea de spectre, și modulele Esquire Control™ 6.1.512 și Data Analysis™ 3.4.179 pentru salvarea cromatogramelor și procesarea datelor MS, tehnica de lucru utilizată în obținerea spectrelor de masă fiind ionizarea prin electrospray.

S-au înregistrat spectrele de masă ale extractelor E5 (alcoolice) din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* obținute conform metodologiei descrisă la paragraful II.2.2.2.1.

Atribuirea picurilor de masă în spectrele celor două extracte este prezentată în capitolul III - Rezultate și discuții.

II.3.3.5. **Identificarea și dozarea antocianinelor prin spectroscopie UV-VIS**

S-au înregistrat spectrele UV-VIS ale extractelor E5 (apoase și alcoolice) și s-au comparat cu cele ale antocianidinelor cianidină, delphinidină, malvidină în soluție alcoolică.

Modul de preparare al extractelor apoase și alcoolice din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* a fost descris în paragraful II.2.2.2.1.

Toate experimentele au fost realizate utilizând un spectrofotometru UV-VIS model Specord 205 (Analytik Jena, Germania).

Pentru trasarea spectrelor pe intervalul 220-500 nm extractele au fost diluate de 25 de ori (extractul de merișor) respectiv de 45 ori (extractul de afine), iar pentru trasarea spectrelor pe intervalul 500-750 nm extractele etanolice și apoase au fost diluate în raport 1:5, pentru o mai bună observare a picurilor. Soluțiile de antocianidine etalon folosite au fost de asemenea diluate cu etanol până la obținerea unor spectre clare.

Pentru dozarea conținutului de antocianine prin spectroscopie UV-VIS s-a trasat curba de etalonare a clorhidratului de cianidină (etalon, Merck) soluție alcoolică, EtOH 96%, acidifiată cu HCl 0,1M (1 mL HCl 0,1M/100 mL EtOH).

Compusul standard 1 mg, cântărit la balanța analitică cu precizie de $\pm 0,0001 \text{ g}$ a fost transferat într-un balon cotat de 5 mL și dizolvat cu alcool etilic acidifiat, obținându-se soluția stoc. Prin diluții succesive s-au obținut soluții de concentrații diferite pe baza cărora s-a construit curba de etalonare.

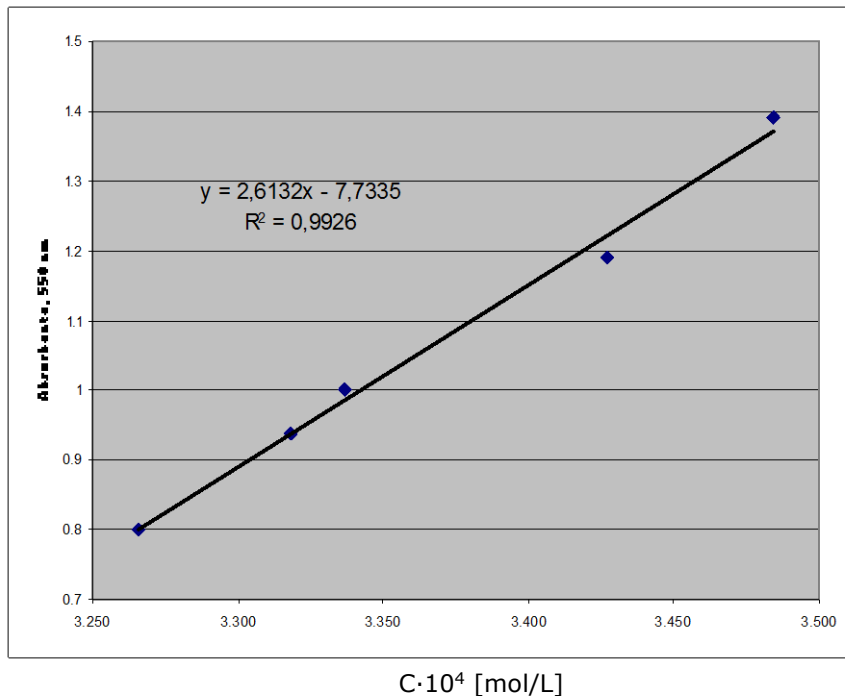


Figura 18. - Curba de etalonare pentru clorhidratul de cianidină

II.3.3.6 Purificarea extractelor din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine) respectiv *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare)

II.3.3.6.1. Purificarea extractelor apoase pe coloană cu Sephadex LH-20

În cazul extractelor apoase, din culoarea cât și din spectrele UV-VIS s-a evidențiat prezența antocianinelor. În vederea identificării calitative a acestora, s-a urmărit purificarea extractelor apoase din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* pe coloană cu Sephadex LH-20, cu $\phi = 2$ cm și $h = 20$ cm. Extractele au fost obținute prin extracție statică repetată conform paragrafului II.2.2.2.1.

Pregătirea coloanei: 25 g Sephadex au fost lăsate pentru gonflare în solvent într-un pahar Berzelius timp de 2 ore, după care suportul a fost introdus cu ajutorul unei pâlnii în coloană, cu grijă pentru a evita formarea bulelor de aer.

Mod de lucru: 10 mL extract apos s-a purificat prin trecerea pe coloană cu Sephadex LH-20. Eluarea s-a făcut cu etanol 70%. S-au cules 15 fracțiuni a câte 5 mL. Pentru fiecare fracțiune culeasă s-a realizat identificarea calitativă a compușilor prezenți prin cromatografie în strat subțire.

Deoarece culoarea fracțiunilor culese (roz pal, orange până la galben pai) cât și valoarea R_f -urilor predominante (0,6;0,8) în sistemul $H_2O : HCOOH : AcOH : AcOEt = 5:2:2:18$ pe plăcuțe cromatografice cu strat de Kieselgel 60 F_{254} (Merck), au indicat mai degrabă prezența compușilor flavonoidici decât a antocianidelor, fracțiunile reunite și concentrate au fost supuse analizei HPLC comparându-se cromatogramele obținute cu cea a flavonoidului quercetină (reactiv Sigma, minim 96%). Pentru analiza HPLC a acestor extracte purificate s-a folosit o coloană LiChrosorb RP18, 150 x 4,6, 5 μm , și faza mobilă: metanol: apă (pH=3 cu H_3PO_4). Eluarea s-a realizat cu metanol:apă = 5:5, debit de 1,5 mL/minut, la o temperatură a coloanei de 25°C. Volumul de injectare a fost 20 μL , iar detecția s-a făcut în UV la 360 nm. Rezultatele obținute sunt prezentate în figurile 68-70, capitolul III – Rezultate și discuții.

Deoarece această purificare nu a permis separarea dorită în continuare s-a lucrat pentru purificare cu un suport anionic.

II.3.3.6.2. Purificarea extractelor alcoolice pe coloană cu Diaion HP-20 SS

S-a realizat purificarea extractelor E5 alcoolice (obținute conform paragrafului II.2.2.2.1) folosind o coloană cu $\phi = 2$ cm și $h = 20$ cm, cu suport reprezentat de o rășină anionică Diaion HP-20 SS (Merck, Germania).

Pregătirea coloanei: 5 g rășină Diaion HP-20SS a fost lăsată pentru condiționare timp de 15 minute în 50 mL metanol, după care metanolul a fost îndepărtat prin decantare și înlocuit cu același volum de apă distilată. Amestecul a fost omogenizat și apoi lăsat în repaus 10 minute, după care a fost introdus în coloană cu ajutorul unei pâlnii, excesul de apă fiind îndepărtat pe măsura introducerii suportului în coloană prin partea inferioară a acesteia.

Mod de lucru: 10 mL extract alcoolic s-a introdus în coloană prin picurare și apoi a fost lăsat 20 minute pentru a se absorbi pe rășină. Eluarea s-a realizat cu etanol acidifiat cu 0,5% acid citric; s-au cules 10 fracțiuni a câte 5 mL. Pentru fracțiunile 3,5,7 (cele mai bogate în antocianine) s-a trasat spectrul UV-VIS pentru identificarea pigmentilor antocianici. Atât culoarea acestora cât și spectrele UV-VIS au evidențiat prezența acestor pigmenti.

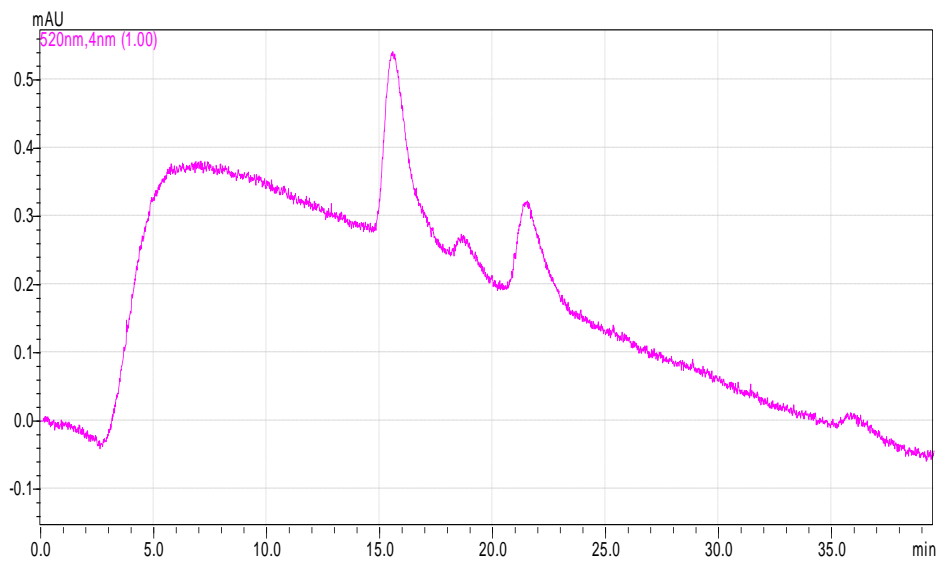
II.3.3.7. Identificarea antocianinelor prin cromatografie de lichide de înaltă performanță

În vederea analizei calitative a pigmentilor antocianici, extractele purificate pe coloană cu Diaion HP-20SS (fracțiunile 3-7) au fost supuse analizei prin cromatografie de lichide de înaltă performanță. Pentru aceasta s-a utilizat un cromatograf tip HPLC Agilent 1100 cu pompă binară și degazor sub vid, coloană Nucleosil C18 cu dimensiunile 4,6 x 150 mm, și diametrul particulelor 5 μm , detector UV-VIS, soft HPChemStation.

Condiții de lucru:

- coloană Nucleosil RP C18, 4,6 x 150 mm, 5 μ m
- volumul de injectare 20 μ l
- debitul 1.0 mL/min
- temperatura coloanei: 25°C
- faza mobilă: [176]
A: acetonitril (HPLC)
B: soluție 4.0% acid fosforic
- eluarea s-a realizat după metoda gradientului liniar în următoarele condiții: 7% A (la timpul t=0) urmată de creșterea concentrației eluentului A până la 25% în 45 minute
- detecție: $\lambda = 520$ nm, $\lambda = 254$ nm

Cromatogramele obținute pentru standardele de antocianidine (de concentrație $2 \cdot 10^{-4}$ g/L) sunt prezentate în figurile 19, 20 și 21 iar cromatogramele corespunzătoare extractelor purificate din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* sunt prezentate în capitolul III – Rezultate și discuții).



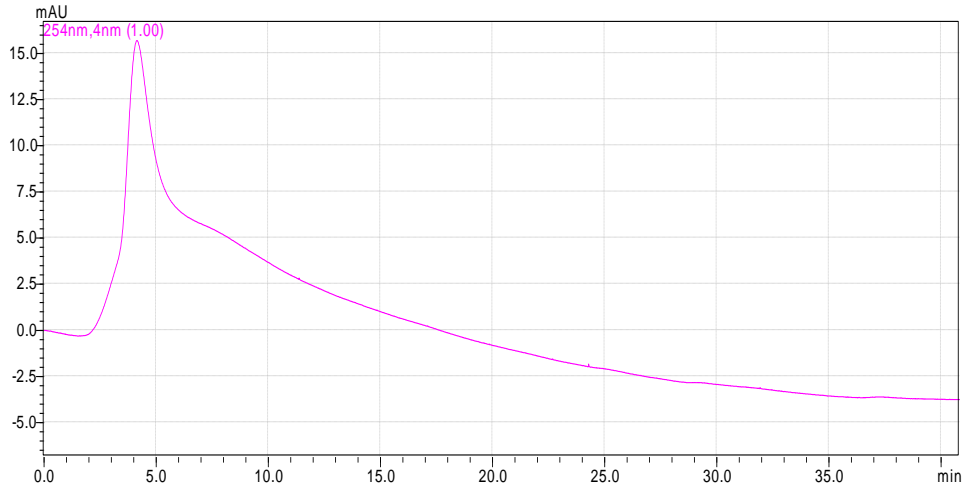
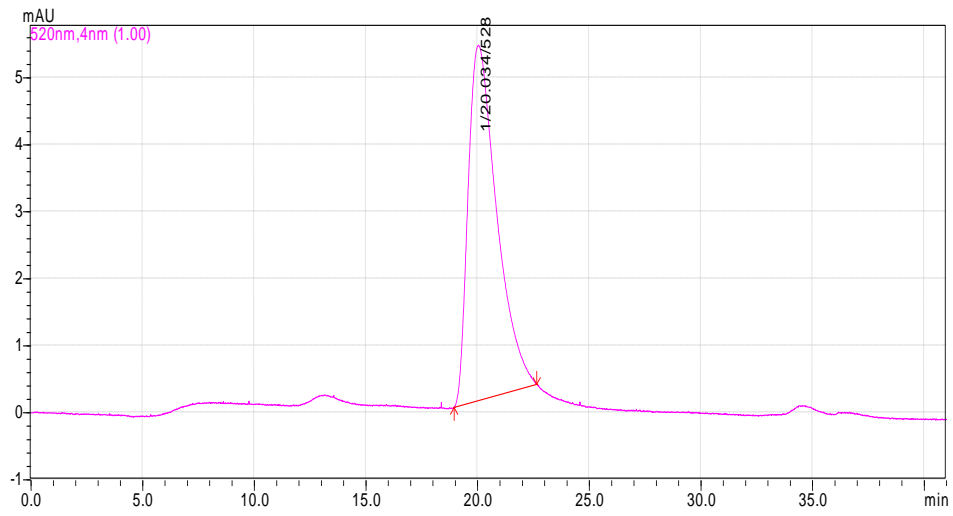


Figura 19. - Cromatograma RP-HPLC a standardului de cianidină înregistrată la 520 nm respectiv 254 nm



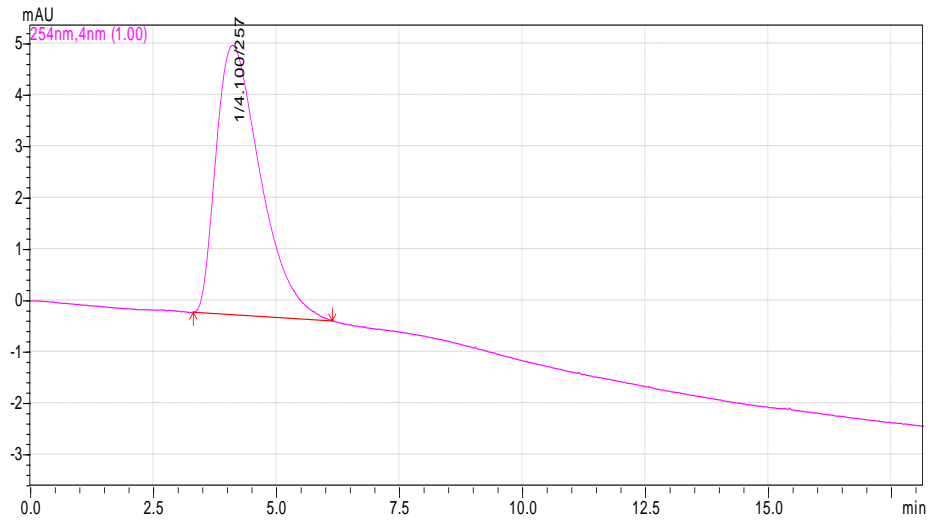
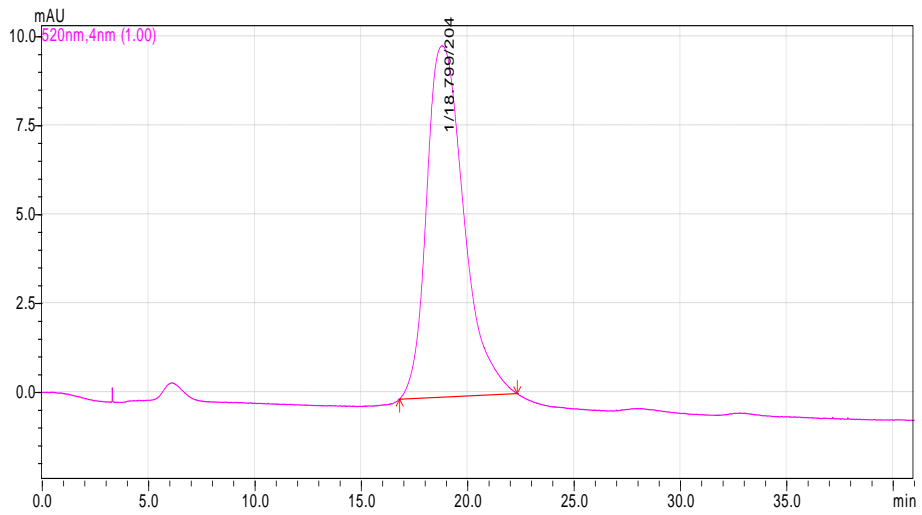


Figura 20. - Cromatograma RP-HPLC a standardului de delfinidină înregistrată la 520 nm respectiv 254 nm



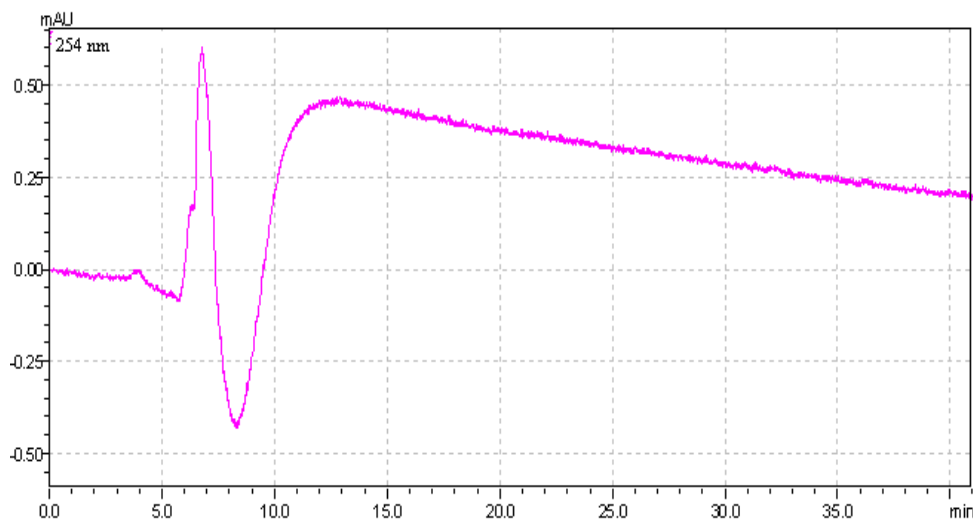


Figura 21. - Cromatograma RP-HPLC a standardului de malvidină înregistrată la 520 nm respectiv 254 nm

II.3.3.8. Analiza cantitativă

Pentru analiza cantitativă a pigmentilor antocianici din extractele de fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* s-au folosit 2 tehnici:

1. tehnica indicată de Markakis [99] bazată pe cunoașterea absorbânței molare specifice a antocianinelor la 535 nm. Prin această metodă s-a determinat conținutul total de antocianine din fructele culese în anii 2005 și 2006.

Mod de lucru: 1 g pulbere produs vegetal, a fost extras la rece (4°C) cu 100 mL amestec alcool etilic:acid clorhidric 1,5 N (85:15) timp de 24 ore. Soluția astfel obținută, a fost filtrată și completată până la 100 mL cu același solvent și s-a citit absorbânța la 535 nm.

Calculul concentrației totale de antocianine se face după formula:

$$\text{Ant. (mg/mL)} = \frac{A_p \cdot d}{98,2 \cdot p} \quad (2)$$

unde: A_p – reprezintă absorbânța soluției la 535 nm;
 d – reprezintă factorul de diluție (în mL);
 98,2 – valoarea extincției în solventul acid-etanol, măsurat într-o cuvă de 1 cm, la 530 nm, la o concentrație de 1% cianidină;
 p – cantitatea de material vegetal luată pentru analiză, în g.

2. determinarea conținutului de antocianine totale dozate prin spectroscopie UV-VIS

Pigmenții antocianici au un rol critic în calitatea culorii multor fructe și legume proaspete sau prelucrate. Astfel, exactitatea determinării valorii antocianinelor totale este foarte folositoare tehnologiilor alimentare în evaluarea calității alimentelor procesate sau neprocesate. Informații substanțiale calitative și cantitative pot fi obținute și din caracteristicile spectrale ale antocianinelor [94].

Astfel, am determinat conținutul de antocianine totale spectrofotometric, pe care l-am exprimat ca, conținut total de cianidină, pe baza curbei de etalonare a acesteia (figura 18).

Ecuția corespunzătoare curbei de etalonare pentru standardul de cianidină a fost:

$$y = 2,6132x - 7,7335 \quad (r^2=0,9926) \quad (3)$$

Prin această metodă s-a calculat conținutul total de antocianine din extractele apoase și alcoolice (E5) obținute conform metodologiei prezentată la paragraful II.2.2.2.1, pe baza spectrelor UV-VIS ale acestora (figurile 62-65). Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 25 – Rezultate și discuții.

II.4. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE A EXTRACTELOR DIN FRUCTE DE *VACCINIUM MYRTILLUS* RESPECTIV *VACCINIUM VITIS-IDAEA*

II.4.1. Determinarea activității antioxidante prin metoda spectrofotometrică cu DPPH

Radicalul DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) este unul dintre radicalii liberi cei mai stabili și disponibili comercial, radical ce prezintă un maxim de absorbție la 517 nm. În prezența unei substanțe donoare de protoni, radicalul liber de DPPH trece în forma stabilă (1,1-difenil-2-picril-hidrazina), cu modificarea simultană a culorii de la violet intens la galben pai.

Prin metoda spectrofotometrică ce utilizează radicali liberi de DPPH s-a determinat activitatea antioxidantă a tuturor extractelor realizate, cât și a soluțiilor de standarde: cianidină, malvidină, delfinidină.

Mod de lucru:

Într-o eprubetă s-au introdus 4 mL soluție alcoolică de DPPH (metanolică sau etanolică după caz) 20 mg/L și 0,25 mL extract vegetal și s-a urmărit continuu spectrofotometric variația absorbanței la 517 nm timp de 60 de minute la temperatura camerei.

Activitatea antioxidantă corespunzătoare procentului de DPPH a fost calculată cu formula [83, 212, 213, 214]:

$$\% \text{ Activitate antioxidantă} = \frac{A_{(t=0)} - A_{(t=60)}}{A_{(t=0)}} \cdot 100 \quad (4)$$

unde: $A_{(t=0)}$ = absorbanța probei la timpul $t=0$ min
 $A_{(t=60)}$ = absorbanța probei la timpul $t=60$ min

Prin această metodă s-a determinat activitatea antioxidantă a tuturor extractelor obținute.

II.4.2. Determinarea activității antioxidante în sistem β -caroten/acid linoleic

Prin această metodă s-a determinat activitatea antioxidantă a extractelor hidrofiele obținute conform metodologiei descrisă la paragraful II.2.2.1.2 și a extractelor alcoolice (E5) obținute prin extracție repetată conform paragrafului II.2.2.2.1.

Mod de lucru: [89, 146]

2 mg β -caroten (de puritate >97%, Merck) s-au dizolvat în 10 mL cloroform. La 1 mL din soluția obținută s-au adăugat 20 mg acid linoleic (conc, Merck) și 200 mg Tween 40 (Merck). Prin agitare s-a obținut o emulsie din care apoi s-a îndepărtat cloroformul prin evaporare la rotavapor, la temperatura de 30°C. După evaporarea cloroformului se adaugă 50 mL apă distilată și se agită pentru obținerea emulsiei β -caroten/acid linoleic. La 5 mL emulsie se adaugă 0,2 mL extract și se determină imediat extincția la lungimea de undă 470 nm. În paralel se realizează o probă control care conține 5 mL emulsie β -caroten/acid linoleic și 0,2 mL apă distilată. Absorbanta la 470 nm a probelor astfel pregătite a fost determinată la fiecare 30 de minute timp de 3 ore. Între determinări probele au fost menținute în baie de apă termostată la 35°C.

Pentru calculul activității antioxidante s-a folosit următoarea formulă de calcul:

$$AA\% = \left[1 - \frac{(A_i - A_t)}{(A'_i - A'_t)} \right] \times 100 \quad (5)$$

unde: A_i = absorbanta probei la $t=0$ min;
 A_t = absorbanta probei la $t=180$ min;
 A'_i = absorbanta probei control la $t=0$ min;
 A'_t = absorbanta probei control la $t=180$ min;

II.5. STUDIUL CINETIC ASUPRA DEGRADĂRII TERMICE A EXTRACTELOR DIN FRUCTE DE *VACCINIUM MYRTILLUS* RESPECTIV *VACCINIUM VITIS-IDAEA*

Analiza termogravimetrică constă în înregistrarea masei probei în funcție de temperatură sau de timp ($m = f(T)$; $m = f(t)$) atunci când, într-o anumită atmosferă, temperatura probei variază după un anumit program (cel mai frecvent se utilizează programe liniare de temperatură, când proba se încălzește sau se răcește cu viteza constantă). Curba obținută se numește curba termogravimetrică (TG), de

piroliză sau termogramă. Pentru a pune în evidență etapele procesului investigat, majoritatea aparatelor de analiză TG trasează simultan și curba termogravimetrică derivată (DTG) - ($dm/dT = f(T)$).

Fiecare material prezintă o curba TG specifică ce poate fi utilizată pentru identificare. Totuși, și în cazul analizei TG, apare problema standardizării care este dificil de rezolvat, având în vedere influența factorilor operaționali asupra rezultatelor termogravimetrice.

Analizele TG se pot aplica pentru reacțiile de descompunere în urma cărora rezultă componente gazoase. Pentru o corectă analiză cinetică a unui proces eterogen, este necesară înregistrarea curbelor de analiză termică la mai multe viteze de încălzire [215].

Curbele TG/DTG pot fi folosite pentru estimarea calității unor produse alimentare (ulei [216], extracte vegetale [217] etc.) prin determinarea parametrilor cinetici și a perioadei de inducție a oxidării. De multe ori metodele termogravimetrice de analiză sunt considerate avantajoase deoarece sunt mai precise și necesită cantități mici de substanță, iar rezultatele sunt obținute rapid.

Mod de lucru

Curbele ne-izoterme TG/DTG ale gelurilor, masei vâscoase, obținute în urma evaporării la temperatura camerei timp de 240 ore a extractelor apoase din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine) respectiv *Vaccinium vitis-idaea* (merișor de munte) a căror metodologie de obținere este prezentată în paragraful II.2.2.2.1, au fost obținute cu ajutorul aparatului Netzsch, în atmosferă de azot și condiții dinamice (viteză de încălzire ce variază cu 2, 5, 7, 10 respectiv 15°C/min pe intervalul de temperatură de la 20°C la 400°C. Programul utilizat pentru interpretarea rezultatelor a fost Netzsch Proteus – Thermal Analysis.

Rezultatele obținute sunt prezentate în capitolul III – Rezultate și discuții.

II.6. STUDIUL DE CULOARE ÎN SPAȚIUL C I E L A B A L EXTRACTELOR DIN FRUCTE DE *VACCINIUM MYRTILLUS* RESPECTIV *VACCINIUM VITIS-IDAEA*

În industria alimentară este foarte important să se utilizeze ca aditivi și adjuvanți produse ecologice. În acest sens, este de dorit ca în locul coloranților alimentari sintetici, ce pot fi toxici, să se utilizeze coloranți naturali, extrași din plante.

Afinele (*Vaccinium myrtillus*) și merișoarele (*Vaccinium vitis-idaea*) sunt surse de coloranți netoxici. Extragerea acestora și utilizarea lor ca aditivi de colorare în diferite produse alimentare este un domeniu intens cercetat [218].

În acest subcapitol se face un studiu referitor la culoarea și proprietățile de colorare ale unor coloranți naturali obținuți din afine și merișoare.

După cum se știe, culoarea este descrisă de trei proprietăți: tonalitatea culorii, luminozitatea și saturația acesteia. Puterea de colorare este o măsură a abilității relative a unui colorant sau pigment de a modifica culoarea unui alt colorant la care este adăugat. În mod curent, pigmentii colorați se examinează în amestec cu pigmenți albi, de obicei dioxid de titan, în diferite rapoarte de amestecare [219-228]. Modul de lucru pentru obținerea pigmentilor colorați (a extractelor apoase – E1) din afine și merișoare este redat în paragraful II.2.2.2.1.

Prezentul studiu se referă la analiza proprietăților legate de culoare ale extractelor obținute precum: nuanța, strălucirea, luminozitatea și puterea de colorare. Analiza acestor proprietăți s-a realizat prin amestecarea extractelor cu dioxid de titan în diferite proporții și aplicarea ulterioară pe suport celulozic. S-au efectuat măsurători de culoare conform sistemului CIELAB, pentru fiecare compus în parte având ca etalon baza albă.

Se cunoaște că, sistemul CIELAB constă din două axe a^* și b^* , care sunt perpendiculare și reprezintă tonalitatea culorilor (figura 22). A treia axă este luminozitatea L^* , care este perpendiculară pe planul ($a^* b^*$). L^* ia valori între 0 pentru negrul perfect și 100 pentru albul perfect; a^* reprezintă calitatea de roșu/verde a culorii (valorile pozitive semnifică roșu, iar cele negative verde), iar b^* reprezintă calitatea de galben/albastru a culorii (valorile pozitive semnifică galben iar cele negative albastru).

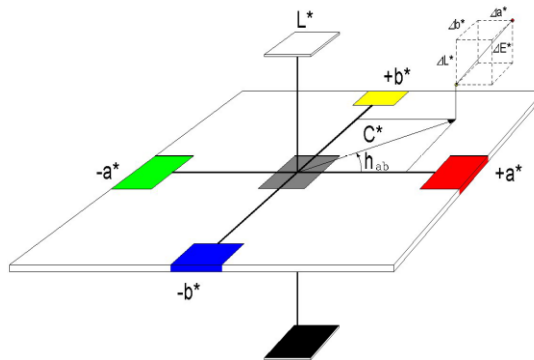


Figura 22. - Spațiul CIELAB al culorilor

Axele de coordonate L^* , a^* și b^* definesc spațiul color tridimensional CIE. Astfel, dacă coordonatele L^* , a^* și b^* sunt cunoscute, atunci culoarea este nu numai descrisă ci și localizată în spațiu. Înăuntrul acestui sistem, orice culoare poate fi specificată prin coordonatele L^* , a^* și b^* .

În cadrul prezentului studiu s-au utilizat trei tipuri de iluminanți:

1. Iluminantul D65 – corespunzător luminii zilei, cu o temperatură a culorii de 6500 K;
2. Iluminantul A – corespunzător unui bec cu incandescență, cu o temperatură a culorii de 2856 K;
3. Iluminantul F2 – corespunzător luminii albe fluorescente.

Luând în considerare graficul emisiei pentru spectrul vizual, numit și curba de distribuție relativă a energiei pentru acel iluminant, pentru cei trei iluminanți luați în studiu, se obțin următoarele reprezentări [228]:

- Iluminantul standard CIE D65 (figura 24) reprezintă lumina zilei cu o temperatură a culorii de 6500 K. El a fost introdus în 1964. Nu există actual o sursă de lumină care să se potrivească exact cu iluminantul teoretic. Acest iluminant este aplicat la măsurători de

culoare pentru a vedea cum arată o culoare care este privită în lumina zilei sau cu surse de lumină ce o aproximează.

- Iluminantul standard A (figura 23) reprezintă distribuția radiației unui bec incandescent cu o temperatură a culorii de 2856 K.
- Iluminantul standard CIE F2 reprezintă lumina unei surse fluorescente albe reci (figura 25). Liniile ce ies din graficul continuu se referă la principalele linii de emisie ale mercurului.

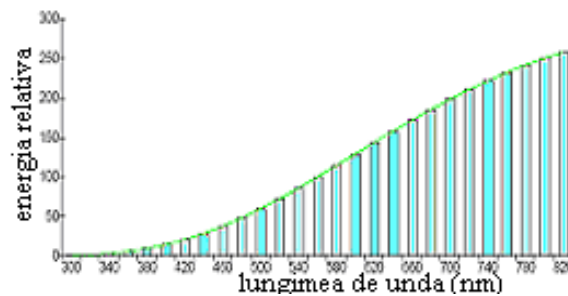


Figura 23. - Iluminantul A

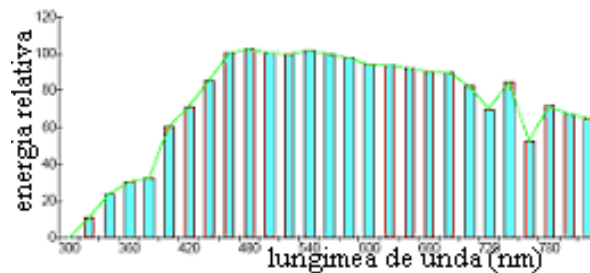


Figura 24. - Iluminantul D65

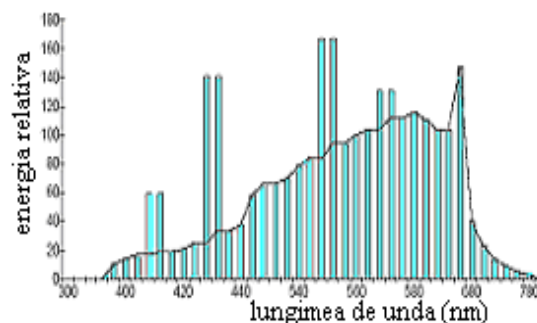


Figura 25. - Iluminantul F2

Sursele de lumină afectează culoarea. Chiar și o ușoară variație în lumina solară cu timpul și sezonul joacă un rol considerabil în percepția culorii. O sursă de lumină afectează culoarea prin spectrul de absorbție și cel de reflexie și prin compoziția lui spectrală.

Această aparentă schimbare a culorii în funcție de sursa de iluminare este un tip de dicroism. Fenomenul seamănă cu cel observat de majoritatea oamenilor care constată că hainele lor au o culoare la lumina zilei și alta la lumină fluorescentă.

În cadrul determinărilor experimentale s-a lucrat cu 10 probe, câte cinci pentru fiecare specie, probe care diferă între ele prin concentrația în pigmenți colorați (antocianine).

Mod de lucru:

2 mL extract cu conținut diferit de antocianine s-a înglobat prin omogenizare în 20 g bază albă (dioxid de titan). Amestecul obținut a fost aplicat în strat uniform pe un suport celulozic apoi s-a lăsat la temperatura camerei 24 ore pentru uscare, după care cu ajutorul unui spectrofotometru Minolta 320 s-au efectuat măsurători de culoare la cei trei iluminanți.

Rezultatele obținute sunt prezentate în capitolul III – Rezultate și discuții.

II.7. STUDIUL POSIBILITĂȚILOR DE APLICARE A EXTRACTELOR DIN FRUCTE DE *VACCINIUM MYRTILLUS* RESPECTIV *VACCINIUM VITIS-IDAEA* ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ

II.7.1. Studiul efectelor antioxidante ale extractelor din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* în uleiuri vegetale

Reacțiile de oxidare limitează durata de viață (de valabilitate) a produselor alimentare proaspete sau procesate și reprezintă o mare îngrijorare pentru industria alimentară [229].

Folosirea antioxidanților sintetici pentru menținerea calității și a valorii nutriționale a alimentelor este practică de mai mult timp în industria alimentară. Un astfel de exemplu îl reprezintă folosirea antioxidanților pentru controlarea oxidării lipidelor, principala cauză care duce la dezvoltarea de mirosuri și gusturi neplăcute în uleiurile alimentare precum și în produsele alimentare cu conținut de grăsimi.

Antioxidanții sunt substanțe naturale sau de sinteză care prelungesc durata de conservare a uleiurilor. Ele trebuie să fie inofensive din punct de vedere fiziologic și să nu influențeze mirosul, gustul sau aspectul uleiului [230, 231].

Antioxidanții aparțin unei clase de compuși chimici specifici care posedă abilitatea de a preveni sau de a reduce gradul reacțiilor oxidative în alimente, produse farmaceutice și în alte produse de larg consum [232]. Acești compuși – ca de exemplu acidul ascorbic – sunt prezenți fie natural în alimente fie sunt adăugați în una dintre etapele de procesare ale acestora.

În general oxidarea alimentelor poate fi prevenită cu ajutorul antioxidanților sintetici ca de exemplu terț-butil hidroxianisol (BHA), terț-butil hidroxitoluen (BHT) și propilgalații (PG), însă siguranța lor din punct de vedere alimentară a ridicat numeroase semne de întrebare [229].

Încercarea de a elimina antioxidanții sintetici din industria alimentară este un impuls în explorarea surselor naturale de antioxidanți. În acest context un mare număr de legume, fructe și unele plante sunt deja cunoscute ca fiind surse bogate de antioxidanți [212, 233-237].

Interesul în ceea ce privește antioxidanții naturali a crescut datorită faptului că, ingredientele ce provin din surse naturale pot avea acțiune antioxidantă prin inhibarea radicalilor lipidici. Compuși antioxidanți ca polifenolii și flavonoidele pot distruge radicalii liberi ca peroxizii, hidroperoxizii sau lipid-peroxizii și pot inhiba mecanismele oxidative care duc la apariția bolilor degenerative (boli cardiovasculare, cancer etc.) [238-240].

Obiectivul studiului de față este examinarea eficienței extractelor de afine și merișoare în stabilizarea uleiului de armurariu (*Silybum marianum*) și a uleiului de sofrănel, un ulei ce conține acizi grași saturați în cantități relativ mici 1,5% acid miristic, 3% acid palmitic, 1% acid stearic, față de conținutul în acizi grași nesaturați – 0,5% acid arachidonic, 33% acid oleic, 61% acid linoleic. Uleiurile au fost obținute prin presare la rece. Studiul a fost realizat asupra uleiurilor ca atare și asupra emulsiilor lor 20% U/A în timpul păstrării la temperatura mediului ambiant. Stabilirea eficienței extractelor s-a realizat prin măsurarea produșilor de oxidare primari și secundari, comparativ cu unii antioxidanți sintetici ca: acid ascorbic (de puritate analitică achiziționat de la Sigma Aldrich, Germania) și terț-butilhidroxitoluen, BHT (Merck, Germania).

Pregătirea probelor de ulei cu adăug de antioxidanți sintetici și naturali s-a făcut conform tabelului 6:

Tabelul 6.*Pregătirea probelor*

Nr.crt. probă	Ulei de armurariu [UA]	Nr. probă	Ulei de sofrănel [US]
1.	100 mL UA control	8.	100 mL US control
2.	100 mL UA + 0,1% E.V.m.	9.	100 mL US + 0,1% E.V.m.
3.	100 mL UA + 0,5% E.V.m	10.	100 mL US + 0,5% E.V.m
4.	100 mL UA + 0,1% E.V.v.i	11.	100 mL US + 0,1% E.V.v.i
5.	100 mL UA + 0,1% E.V.v.i.	12.	100 mL US + 0,1% E.v.i.
6.	100 mL UA + 200 ppm BHT	13.	100 mL US + 200 ppm BHT
7.	100 mL UA + 200 ppm vit.C	14.	100 mL US + 200 ppm vit.C

E.V.m. = extract alcoolic (E5) din fructe de *Vaccinium myrtillus*; E.V.v.i. = extract alcoolic (E5) din fructe de *Vaccinium vitis-idaea*

Stabilizarea și păstrarea probelor [229]:

Probele astfel pregătite (conform tabelului 6) au fost menținute timp de 30 de minute la 40°C pentru uniformizarea dispersiei. Probele control (fără adăug de extract sau antioxidanți sintetici) au fost pregătite, stabilizate și păstrate în același condiții analitice. Probele astfel stabilizate au fost păstrate timp de 35 de zile la lumină și temperatură ambiantă (25°C).

Prepararea emulsiilor 20% ulei în apă

Emulsiile sunt sisteme disperse formate din două lichide nemiscibile din care unul este dispersat sub formă de picături în cel de-al doilea care devine astfel mediul de dispersie. Emulsiile diferă de celelalte sisteme disperse coloidale printr-un domeniu larg de mărime a picăturilor disperse. Mărimea particulelor influențează aspectul acestora:

Mărimea particulelor	Aspectul emulsiei
Picături mai mari de 1 μm	Emulsie alb-lăptoasă
Picături între 1 și 0,1 μm	Emulsie alb-albăstruie
Picături între 0,1 și 0,005 μm	Emulsie semitransparentă (translucidă)
Micropicături de 0,005 μm și mai mici	Emulsie transparentă

De regulă emulsiile se obțin prin dispersarea unui lichid în celălalt – procedeu numit emulsionare – procesul putând fi realizat prin metode mecanice, electrice sau folosind ultrasunetele.

Factorii de stabilitate ai emulsiilor sunt legați de cele două faze ale acestora, de agentul de emulsionare și de condițiile de preparare.

Aceștia pot fi sistematizați după cum urmează:

- Faza internă – componenții chimici, mărimea particulelor și distribuția lor după mărime, viscozitatea, concentrația, tensiunea interfacială
- Faza externă – viscozitatea, polaritatea și componenții chimici
- Agentul de emulsionare: proprietățile fizice și grosimea filmului din jurul particulelor, componenții chimici și concentrația, solubilitatea în faza continuă, pH-ul fazelor.
- Condițiile de preparare: temperatura, presiunea, intensitatea agitării.

Ușurința obținerii și stabilitatea emulsiilor sunt foarte mult influențate de structura moleculară a lichidelor ce se emulsionază. Componentele nepolare nu dau emulsii stabile. Introducerea în moleculă a grupelor polare duce la compuși care se emulsionază bine. Pe suprafața picăturii sferice de emulsie se produce orientarea moleculelor disperse, care se situează cu radicalul polar în direcția apei și cu cel nepolar (radicalul hidrocarbonat) ancorat în restul lichidului nemiscibil cu apa. Radicalii polari din apă se hidratează realizând o legătură între suprafață și mediu și stabilizând în acest mod sistemul. Emulsionarea se face cu atât mai bine cu cât tensiunea superficială la limita de separație este mai mică [241,242].

Natura fazei uleioase poate avea efect semnificativ asupra formării și comportării emulsiei. Viscositatea și polaritatea fazei uleioase vor determina distribuția inițială a dimensiunii picăturilor și stabilitatea emulsiei.

Pentru aplicații în industria alimentară și farmaceutică fazele uleioase folosite sunt în număr limitat. În cele mai multe cazuri, acestea se bazează pe trigliceride nesaturate de origine vegetală sau animală cum ar fi uleiurile de arahide, măsline, susan, porumb, migdale, soia, bumbac, floarea soarelui etc.

În timpul procesului de obținere a emulsiilor este de preferat o viteză mai mare de agitare în prima parte și o viteză mai scăzută în cea de-a doua etapă. Dacă picăturile de emulsie sunt supuse unei viteze intense de amestecare o perioadă mai

lungă de timp, ele se vor alungi și se vor rupe în picături mai mici, astfel încât numărul picăturilor multiple se micșorează. Dacă viteza de amestecare este insuficientă, picăturile vor fi mai mari ceea ce facilitează ecremarea și/sau coalescența.

În cursul determinărilor experimentale s-a urmărit efectul concentrației de antioxidanți asupra stabilității emulsiilor în timp.

În cadrul determinărilor experimentale s-au utilizat:

- ulei de armurariu obținut prin presare la rece, achiziționat din comerț (viscozitate dinamică $\eta^{20C} = 92$ cP –DV-E Viscosimeter BROOKFIELD);
- ulei de șofrănel obținut prin presare la rece, achiziționat din comerț (viscozitate dinamică $\eta^{20C} = 80$ cP);
- extracte vegetale alcoolice din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea*, obținute conform metodologiei descrisă la paragraful II.2.2.2.1;
- emulgator hidrofil: monopalmitat de sorbitan polietoxilat (Tween 40, Merck).

Mod de lucru:

Prepararea emulsiilor s-a făcut folosind o metodă modificată a celei descrisă de Abdalla și Roozen [243, 244]. Emulsiile 20% ulei în apă s-au obținut din 20 g de ulei ce conține 0,1%, respectiv 0,5% extract alcoolic din fructele de pădure studiate. S-a adăugat Tween 40 (2g) și s-a adus la balon cotat de 100 mL cu apă distilată, iar apoi s-a supus agitării cu ajutorul unui multistirer (Vorweck, Thermomix Varoma, Pentol GmbH-Labortechnik, Grenzach-Wyhlen, Germania) timp de 10 min la 500 rpm și 30°C. Amestecul a fost apoi transvazat într-un omogenizator Turbo Ultraturax și agitat la 9500 rpm timp de 2 min și apoi la 500 rpm timp de 5min. Emulsiile astfel obținute s-au menținut timp de 8 zile la temperatura camerei pentru a monitoriza stabilitatea la oxidare.

Amestecarea fazelor s-a realizat cu un agitator cu două rânduri de palete înclinate la 45°, cu diametrul de 45 mm și lățimea de 20 mm. Pe fiecare paletă sunt prevăzute 5 orificii cu diametrul de 3 mm pentru a asigura o distribuție mai bună a lichidului în procesul de agitare și a permite micșorarea presiunii dinamice în timpul agitării, respectiv scăderea rezistenței hidraulice. Înclinarea paletelor are rolul de a asigura nu numai circulația fluidului în plan orizontal ci și circulația acestuia prin curenți verticali, rezultați ca urmare a descompunerii forței dezvoltate de paletă în componente radiale și axiale. Impactul dintre jetul de fluid expulzat de palete și suprafața internă a vasului în care are loc agitarea asigură divizarea avansată a picăturilor.

Emulsifierea joacă un rol important în stabilitatea oxidativă a picăturilor de ulei. Mărima acestora afectează gradul de oxidare lipidică în emulsiile de tip U/A.

Caracteristicile fizice ale picăturilor pot de asemenea afecta cinetica oxidării în emulsii și variază considerabil în alimente, funcție de concentrația, mărimea și starea fizică a picăturilor. Emulsiile tipice folosite în industria alimentară conțin particule a căror mărime variază de la 0,2 – 100 μm . Studii recente efectuate pe

emulsii au indicat nevoia de a studia mai intens influența caracteristicilor picăturilor asupra oxidării lipidice [245].

Distribuția mărimii particulelor s-a măsurat prin integrarea luminii divizate (Mastersizer, Malvern Instruments, Malvern, UK, la firma TECHPharm, Bruchsal) folosind parametrii optici standard și 1, 2-propandiol ca mediu dispersant.

Nivelul deteriorării oxidative al probelor de ulei și al emulsiilor 20% U/A, cu adaus de antioxidanți s-a urmărit în timp prin măsurarea valorilor indicilor de peroxid, conținutul în diene conjugate (CD) și triene conjugate (CT) și valoarea indicelui de *p*-anisidină.

Determinarea valorii indicelui de peroxid (PV)

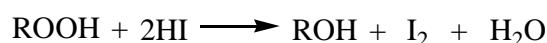
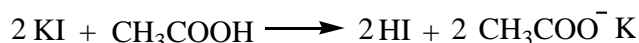
Este general acceptat faptul că, primii produși formați la oxidarea grăsimilor sunt hidroperoxizii. Hidroperoxizii sunt produși primari ai oxidării lipidelor și joacă un rol important în autooxidările viitoare ale lipidelor, iar pentru inhibarea formării și /sau acțiunii acestor specii instabile sunt utilizați antioxidanții ca mijloc al aprecierii activității antioxidante. De exemplu, se determină activitatea antioxidantă a extractelor vegetale, prin adăugarea acestora în ulei și păstrarea acestuia în diverse condiții [246, 247].

Indicele de peroxid și perioada de inducție (definită ca timpul până indicele de peroxid atinge valoarea de 20 mechiv O₂/kg) sunt măsurati și utilizați pentru a stabili activitatea relativă a extractelor [48].

Deși valoarea indicelui de peroxid este aplicabilă pentru urmărirea formării peroxizilor în primele stadii ale oxidării, metoda este totuși empirică. Acuratețea metodei este discutabilă. Rezultatele variază funcție de procedeul folosit și funcție de temperatura de lucru [23].

Metoda de determinare a cantității de hidroperoxizi formați se bazează pe capacitatea acestora de a elibera I₂ din KI sau de a oxida Fe²⁺ la Fe³⁺ [248-250].

Reacțiile acestei metode sunt:



unde ROOH este hidroperoxidul lipidic

Reactivi:

- Soluție acid acetic:cloroform=3:2
- Soluție saturată de iodură de potasiu
- Soluție de tiosulfat de sodiu 0,01M
- Amidon soluție 1%

Mod de lucru pentru probele de ulei [248, 251]:

Într-un Erlenmayer cu dop rodat de 250 mL s-au introdus 2,5g ulei. S-au adăugat 15 mL amestec acid acetic:cloroform și s-a agitat pentru dizolvare. S-a adăugat 0,25 mL soluție saturată de iodură de potasiu și s-a agitat timp de 1 minut după care s-a adăugat 15 mL apă distilată. S-a titrat cu soluție de tiosulfat de sodiu 0,01N în prezență de amidon, până ce culoarea violetă a dispărut. În paralel s-a realizat o probă martor.

Determinările s-au efectuat triplicat pentru fiecare probă în parte.

Mod de lucru pentru emulsii [252]:

La 20 mL emulsie s-au adăugat 20 mL diclorometan (agitare 10 secunde și centrifugare 1 min la 500 rpm) și 5 g de sare. Frațiunea de diclorometan a fost evaporată și fracțiunile uleioase derivate din emulsie au fost investigate mai departe în vederea determinării valorii indicelui de peroxid, a valorii dienelor și trienelor conjugate respectiv a valorii indicelui de *p*-anisidină

Indicele de peroxid se calculează cu relația :

$$IP = (V_p - V_M) \cdot N \cdot 1000 / m_p \quad (6)$$

unde:

V_p = volumul soluției de tiosulfat de sodiu 0,01M folosit la tirarea probei

V_M = volumul soluției de tiosulfat de sodiu 0,01M folosit la titrarea probei martor

M = molaritatea soluției de tiosulfat de sodiu

m_p = masa probei

Indicele de peroxid se exprimă în mechiv O_2 /kg probă [251].

Determinarea spectrofotometrică a dienelor (CD) și trienelor conjugate (CT) [94]

La oxidarea acizilor grași polinesaturați, alături de hidroperoxizi se formează un sistem de duble legături conjugate. S-a demonstrat că, există o corelație între absorbanta uleiurilor la 232 nm (care se datorează conjugării dienice) și gradul de oxidare.

Produsele de autooxidare, adică CD și CT, s-au determinat prin urmărirea absorbanței la o lungime de undă fixă în regiunea UV (la 232 pentru CD și 268 nm pentru CT) într-o masă constantă de probă. O creștere a absorbanței arată că proba s-a oxidat.

Reactivi:

2,2,4-trimetilpentan (izooctan, produs Merck)

Mod de lucru:

0,03 g ulei cântărite cu precizie de patru zecimale se introduc într-un balon cotate de 25 mL și se aduce la semn cu izooctan; pentru determinarea dienelor conjugate se măsoară absorbanta la 233 nm, iar pentru determinarea trienelor conjugate se determină absorbanta la 268 nm, față de un blanc reprezentat de izooctan [94].

Valoarea absorbanțelor poate fi folosită ca atare, ca măsură a oxidării [94, 252, 253], sau poate fi introdusă într-o serie de formule de calcul ale procesului de oxidare.

Determinarea valorii indicelui de p-anisidină [254]

Peroxizii formați ca urmare a autooxidării acizilor grași sunt intermediari instabili, care se descompun într-o varietate de compuși, mulți carbonilici, printre care 2-alchenaldehide și 2,4-dienaldehide. În prezență de acid acetic, p-anisidina reacționează cu aldehidele rezultate din descompunerea hidroperoxizilor cu formarea unui produs de culoare galbenă care prezintă un maxim de absorbție la 350 nm. Valoarea absorbanței molare la 350 nm crește dacă aldehida conține o dublă legătură. Din acest motiv indicele de p-anisidină este potrivit pentru determinarea în special a 2-alchenalilor.

Principiul metodei: reacția în soluție acetică a compușilor alchidici din ulei cu p-anisidina și citirea extincției la 350 nm.

Reactivi:

- Soluție p-anisidină: 2,5 g/L p-anisidină (Merck) în acid acetic glacial
- Izoctan (2,2,4-trimetilpentan, Merck)
- Acid acetic glacial (minim 96%, Reactivul București)

Mod de lucru:

0,5g ulei cântărit cu precizie de patru zecimale se introduc într-un balon cotate de 10 mL. Pentru solubilizarea uleiului se aduce la semn cu izooctan (soluția A). Se citește absorbanta soluției (A_b) la 350 nm față de izooctan, în cuve de cuarț de 1 cm. Într-o eprubetă se măsoară 5 mL soluție A la care se adaugă 1 mL soluție p-anisidină, se agită și se lasă în repaus timp de 10 minute după care se măsoară absorbanta la 350 nm (A_s) folosind ca blank o soluție formată din 5 mL izooctan și 1 mL soluție p-anisidină. Valoarea indicelui de p-anisidină (p-A.V.) se calculează cu formula:

$$p-AV = \frac{25 \cdot (1.2A_s - A_b)}{m} \quad (7)$$

unde: A_s = absorbanta soluției de grăsime (soluția A) după reacția cu p-anisidină

A_b = absorbanta soluției de grăsime (soluția A)

m = cantitatea de probă, în g

Rezultatele obținute sunt prezentate în capitolul III – Rezultate și discuții și au făcut obiectul a 2 lucrări științifice dintre care una cotate ISI [284].

II.7.2. Studiul efectului extractelor din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* adăugate în vinurile rosé și alb în vederea îmbunătățirii conținutului în compuși fenolici și a caracteristicilor cromatice ale acestora

Conținutul de compuși fenolici constituie unul dintre cei mai importanți parametri de calitate ai vinului, datorită contribuției lor la caracteristicile organoleptice, la particularitatea culorii, astringența și tăria acestuia [255]. Vinul este intens studiat datorită modificărilor continue în compoziția acestuia ce au loc în timpul păstrării. În timp, s-au efectuat multe studii în încercarea de a descrie modificările chimice ce au loc în timpul învechirii vinurilor în sticlă și influența acestora asupra calității senzoriale a vinului.

În timpul maturării și învechirii vinului, compușii fenolici participă la numeroase reacții chimice. Antocianinele sunt transformate progresiv în alți pigmenți oligomerici și polimerici mai stabili, care duc la modificări importante ale culorii (de la nuanțe de roșu strălucitor la nuanța de roșu-cărămiziu). Reacțiile considerate responsabile de apariția acestor modificări de culoare includ: reacții de condensare indirectă a acetaldehidelor, reacții de copigmentare și asociere [256]. Cele mai rapide modificări ale caracteristicilor cromatice ale vinurilor roșii au loc în primul an de păstrare. În acest timp temperatura are o influență mult mai mare decât concentrația oxigenului. Un alt factor important care influențează culoarea vinului este durata de păstrare, deoarece cele mai multe modificări ce au loc în timpul păstrării vinului sunt dependente de timp. La vinurile albe, una dintre cele mai mari probleme este instabilitatea culorii acestuia după îmbuteliere. Îmbrunarea rezultă în urma oxidării fenolilor la chinone care prin polimerizare formează macromolecule ce au o nuanță tipică de galben-brun. De obicei îmbrunarea oxidativă a vinurilor albe începe în primele stadii de vinificare prin reacții enzimatică, în care esterii acidului hidroxicinamic joacă un rol important. Studii recente au demonstrat existența unor noi procese oxidative prin care flavonolii sunt transformați în pigmenți galbeni de xantiliu, ce contribuie la îmbrunarea vinului [257].

Atât din punct de vedere al culorii cât și în ceea ce privește celelalte caracteristici, vinurile rosé sunt considerate ca vinuri intermediare între cele albe și cele roșii, de cele mai multe ori apropiindu-se de ultimele. Se caracterizează prin plinătate dar și prin suplețe, prospețime și fructuositate, fiind consumate ca vinuri tinere. Culoarea acestora se apropie de culoarea vinurilor roșii, cu un mare avantaj de nuanțe, de la portocaliu clar până la roșu ciresiu deschis [258].

Cunoașterea caracteristicilor cromatice ale vinurilor este deosebit de importantă, ele fiind un criteriu de calitate definitoriu atât pentru vinul tânăr, cât și pentru vinul supus procesului de maturare și învechire. Necesitatea definirii caracteristicilor cromatice ale vinurilor a condus la elaborarea a numeroase metode, dintre care cele mai folosite sunt cele spectrometrice [259, 260].

S-au luat în studiu două tipuri de vin îmbuteliate, achiziționate din comerț: rosé (din producția anului 2005 respectiv 2006) și Risling (vin alb, producție 2006) din podgoria Recaș la care s-au adăugat extracte din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* respectiv *Vaccinium myrtillus* în două concentrații. Pentru fiecare probă s-a urmărit determinarea conținutului de polifenoli și antocianine totale, precum și caracteristicile cromatice. S-a lucrat pe un set de 12 probe pregătite astfel:

Tabelul 7.*Pregătirea probelor*

Nr. probă	Soi - an de recoltă	Tip extract adăugat	mL extract/L vin
P1	Rosé - 2006	Extract din fructe de <i>V. vitis-idaea</i>	10
P2	Rosé - 2006	Extract din fructe de <i>V. vitis-idaea</i>	5
P3	Ro sé - 2006	Extract din fructe de <i>V. myrtillus</i>	10
P4	Ro sé - 2006	Extract din fructe de <i>V. myrtillus</i>	5
P5	Ro sé - 2005	Extract din fructe de <i>V. vitis-idaea</i>	10
P6	Ro sé - 2005	Extract din fructe de <i>V. vitis-idaea</i>	5
P7	Ro sé - 2005	Extract din fructe de <i>V. myrtillus</i>	10
P8	Ro sé - 2005	Extract din fructe de <i>V. myrtillus</i>	5
P9	Riesling - 2006	Extract din fructe de <i>V. vitis-idaea</i>	10
P10	Riesling - 2006	Extract din fructe de <i>V. myrtillus</i>	10
P11	Riesling - 2006	Extract din fructe de <i>V. vitis-idaea</i>	5
P12	Riesling - 2006	Extract din fructe de <i>V. myrtillus</i>	5

*Concentrația extractelor utilizate în pigmenți colorați (antocianine) exprimată ca mg cianidină/mL extract este: extract alcoolic din fructe de *Vaccinium myrtillus* 34,14 mg cianidină/mL extract; extract alcoolic din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* 33,09 mg cianidină/mL extract

Metodologia de obținere a extractelor folosite este prezentată în paragraful II.2.2.2.1.

Adausul acestora în probele de vin s-a realizat prin injectare prin dopurile de plută evitând contactul vinului cu oxigenul. Pe parcursul experimentului (2 luni) probele au fost păstrate la întuneric la o temperatură de ≈ 15 °C.

Înainte de adăugarea extractelor în vin s-au efectuat analizele de rutină ale acestuia în ceea ce privește conținutul în alcool, pH-ul și aciditatea titrabilă, conform OIV, 2006 [261]. De asemenea s-au determinat caracteristicile cromatice ale vinurilor supuse analizei și cantitatea de compuși fenolici totali din acestea prin metode spectrofometrice.

Aciditatea titrabilă (TA) și pH-ul fiecărui soi de vin achiziționat din comerț s-a determinat folosind un titroprocesor Metrohm 686 (Metrohm Ltd., Switzerland) și un pH-metru (pH - 330i, WTW, Germania). Aciditatea titrabilă, exprimată ca și conținutul în echivalenți de acid tartric (g/L) s-a determinat prin diluarea a 10 mL vin la balon cotat de 100 mL cu apă distilată și titrarea probei cu NaOH 0,1M la pH = 8,1 [262].

Determinări analitice**1. analiza conținutului de antocianine totale:** [263]

Reactivi: soluție alcoolică acidulată: 20 cm³ HCl conc. ($d=1,19$ g/cm³), se aduce la balon cotat de 1000 cm³ cu EtOH 96%.

Mod de lucru: într-un balon cotat de 10 mL, se măsoară 1 mL probă de analizat (vin) și se aduce la semn cu soluție alcoolică. Se determină absorbanta la

550 nm față de soluția alcoolică acidă. Cantitatea de antocianine se determină conform relației:

$$m = 0,015 \cdot D_0 \quad (\text{mg/mL}) \quad (8)$$

unde: D_0 – reprezintă absorbanta probei la 550 nm;
0,015 – coeficient de corelare determinat experimental

2. determinarea polifenolilor totali prin metoda Folin-Ciocalteu:

Principiul metodei: toți compușii fenolici prezenți în vin sunt oxidați de către reactivul Folin-Ciocalteu (un amestec de acid fosfowolframic $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$, și fosfomolibdenic $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$), care după oxidarea fenolilor este redus la un amestec de oxizi albaștri de wolfram, W_8O_{23} , respectiv molibden, Mo_8O_{23} . Colorația albastră a amestecului obținut prezintă un maxim de absorbție în regiunea 750 nm, și este proporțională cu cantitatea totală de compuși fenolici prezenți în probe.

Mod de lucru: într-un balon cotate de 10 mL se măsoară 0,1 mL probă vin, 5 mL apă distilată, 0,5 mL reactiv Folin-Ciocalteu, 2 mL soluție carbonat de sodiu, Na_2CO_3 20%, se agită și se aduce la semn cu apă distilată. Pentru stabilizarea reacției, probele se lasă în repaus 30 de minute după care se determină absorbanta la 750 nm față de un blanc preparat cu apă distilată în locul probei de vin [144, 264]. Rezultatele se exprimă ca mg acid galic/L vin pe baza unei curbe de etalonare.

Realizarea curbei etalon pentru determinarea conținutului total de fenoli din vin

Soluție standard: 1 mg/mL soluție acid galic monohidrat 98%.

În baloane cotate de 10 mL se măsoară: 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1 mL soluție standard și se aduce la semn cu apă distilată. La 0,1 mL din fiecare soluție se adaugă 6 mL apă distilată, 0,5 mL reactiv FC și se agită timp de 1 minut. După 1 minut, se adaugă 0,15 mL carbonat de sodiu 20%, și se aduce la semn cu apă distilată. Amestecul se lasă în repaus timp de 1 oră și apoi se citește absorbanta la 750 nm.

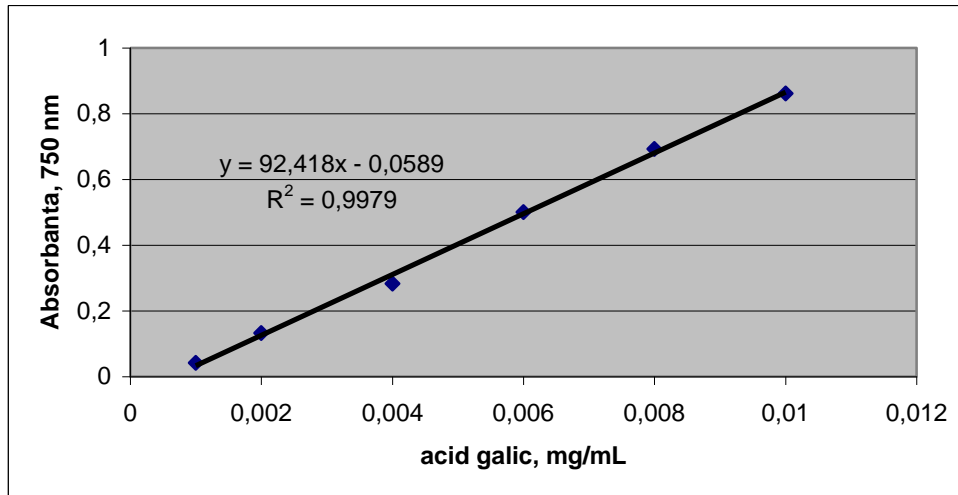


Figura 26. - Curba de etalonare a acidului galic

3. Determinarea caracteristicilor cromatice

Structura specifică a unor compuși din vinurile roșii, face ca aceștia să absoarbă radiații de energie relativ scăzută din domeniul spectral vizibil (400-800 nm). Absorbția nu este limitată la lumină de o anumită lungime de undă, ci se produce cu intensitate diferită pe domeniul spectral vizibil. Datorită faptului că, în jurul lungimii de undă de 520 nm, absorbția este mai puternică, culoarea predominantă percepută este cea roșie; se percepe însă și componenta galben-brună sub formă de nuanță cărămizie, precum și cea albastră, care imprimă nuanța de culoare întunecată, ușor albastruie.

La 420 nm absorb compușii fenolici monomeri, dar mai ales polimeri cu molecule mici, medii și mari, combinații ale acestora cu aminoacizii sau cu alți compuși, melanine, derivați xantenici etc., de culoare galbenă, portocalie sau brună.

La 520 nm absorb antocianidinele libere sub formă de cationi flaviliu, combinațiile tanin-antocianice de dimensiuni moleculare diferite, asociații intermoleculare și complecși de copigmentare ai antocianinelor cu alți compuși, având culoarea roșie.

La 620 nm absorb antocianidinele sub formă chinonică, compuși polimeri, asociații intermoleculare și complecși de copigmentare în care este stabilizată forma chinonică, având culoare albastră [259].

Determinarea caracteristicilor cromatice prin *metoda Glories* s-a efectuat pe vinul nediluat, deoarece prin diluare se modifică echilibrul dintre constituenții colorați ai vinului.

Densitatea culorii s-a determinat prin măsurarea absorbanței probelor de vin la 420, 520, 620 nm față de o probă martor (apa distilată) în cuve de cuarț cu grosimea de 1 cm [256, 265], folosind un spectrofotometru M40-Carl Zeiss Jena. Determinările s-au efectuat prin citirea directă la spectrofotometru a absorbanțelor corespunzătoare fiecărei lungimi de undă în parte.

Metoda Glories stabilește următorii parametri de culoare: intensitatea culorii (I.C.*), tenta culorii (T) precum și contribuția fiecărei culori: roșie, galbenă și albastră la culoarea vinului folosind formulele:

$$I.C.^* = A_{420} + A_{520} + A_{620} \quad (9)$$

$$T = \frac{A_{420}}{A_{520}} \quad (10)$$

$$420\% = \frac{A_{420}}{I.C.^*} \cdot 100 \quad (11) \quad \text{unde } 420\% \text{ reprezintă contribuția}$$

culorii galben la culoarea vinului

$$520\% = \frac{A_{520}}{I.C.^*} \cdot 100 \quad (12) \quad \text{unde } 520\% \text{ reprezintă contribuția}$$

culorii roșu la culoarea vinului

$$620\% = \frac{A_{620}}{I.C.^*} \cdot 100 \quad (13) \quad \text{unde } 620\% \text{ reprezintă contribuția}$$

culorii albastru la culoarea vinului

Rezultatele obținute sunt prezentate în cadrul capitolului III – Rezultate și discuții și au făcut obiectul unei lucrări științifice cotate ISI [287].

II.7.3. **Aprecierea stabilității cremelor alimentare cu adaus de extracte din fructe de pădure respectiv emulsii U/A ce conțin aceste extracte prin studiul comportării reologice**

Cremele sunt preparate alimentare de consistență semisolidă (moale), obținute prin încorporarea substanțelor active în excipienți (care formează baza cremei) și destinate consumului.

Adausul de extracte de afine și merișor într-o bază de cremă de vanilie

Procedeu de obținere a amestecului:

Pentru obținerea amestecului s-au utilizat extracte apoase din fructe de afine respectiv merișor, obținute conform metodologiei de lucru prezentată la subcapitolul II.2.2.2.1, care au fost înglobate într-o bază de cremă alimentară obținută prin Direcția de Control și Avizare a produselor alimentare Alba Iulia. Crema de vanilie, umplutură pentru biscuiți este formată dintr-un amestec de: apă, zahăr, amidon modificat din porumb, grăsime vegetală, stabilizator (carboximetilceluloză – E 466), sare, agent de acidifiere (acid tartric), conservant (sorbit de potasiu), colorant (tartrazină, sunset yellow, dioxid de titan), vanilină, polisorbit 60.

La 40 g bază de cremă s-au adăugat 0,2 mL extract din fructe de afine respectiv merișoare (extracte E5 apoase cu un conținut de polifenoli totali exprimați ca echivalenți acid galic: extract apos din fructe de *Vaccinium myrtillus* 59,75 mg GAE/mL respectiv extract apos din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* 58,45 mg GAE/mL), amestecându-se bine (prin mojarare). Crema astfel preparată a fost introdusă în recipiente de sticlă, acoperite și păstrate la rece la frigider la temperatura de aproximativ 10°C.

Adausul de emulsii U/A cu conținut de extract din afine în baza de cremă de vanilie

Procedeu de obținere a amestecului:

Pentru obținerea acestor amestecuri s-au folosit emulsii 20% U/A ale uleiurilor de armurariu respectiv șofrănel obținute conform metodologiei de lucru prezentată în subcapitolul II.7.1.

La 40 g bază de cremă s-au adăugat 4 mL emulsie 20% ulei de armurariu în apă respectiv emulsie 20% ulei de șofrănel în apă ce conțin 0,5% extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* (59,75 mg GAE/mL extract), amestecându-se bine iar amestecul obținut s-a păstrat la frigider.

*Analiza comportamentului reologic al amestecurilor obținute***Generalități**

Cunoașterea caracteristicilor și a proprietăților fizico-mecanice presupuse în abordarea reologică a stării comportamentale a unor materiale ajută, pe de altă parte, și tehnologia modernă de prelucrare a acestora.

Studiul reologic al proprietăților mecanice relevă numeroase caracteristici structural-morfologice care influențează aceste proprietăți, concomitent cu procesele elementare proprii curgerii și deformării materiei [266].

Sub acțiunea unor solicitări externe toate corpurile, cu excepția rigidului, se deformează. Mărimea deformației și a vitezei de deformare depind de mărimea solicitării și de proprietățile reologice ale corpului.

Lichidele vâscoase supuse la solicitări, se deformează continuu în timp, deformația este dependentă de timpul de solicitare. Viteza de deformare depinde de mărimea solicitării. La aceste corpuri solicitarea se corelează cu viteza de deformare ($\dot{\gamma}$).

Fluidele vâscoelastice sub acțiunea solicitărilor se deformează continuu, iar în timp curg, fără să ajungă la o stare de echilibru a deformației, iar viscozitatea este o măsură a forțelor de rezistență. După suprimarea solicitării, datorită componentei elastice, o parte din deformație se recuperează.

Exprimarea comportării reologice a corpurilor vâscoelastice se face cu ajutorul unor ecuații care reprezintă dependența între tensiuni și deformații, viteze de deformare și coeficienți de material. Toate ecuațiile sunt valabile numai cu regim laminar, în condiții izoterme.

Ecuațiile reologice sau constitutive se obțin pe baza unor considerații analoge (mecanice sau electrice), analitice, pe baza unor considerații fenomenologice sau prin modelarea empirică a datelor experimentale [267].

Condițiile de investigare

Caracterizarea reologică a fost realizată în cadrul laboratorului de Fenomene de Transfer al Universității Politehnica din Timișoara, utilizând un viscozimetru rotațional RHEOTEST – 2 care permite măsurarea momentului de torsiune ce apare datorită stratului inelar de substanță introdus între un cilindru fix și altul rotit cu turație cunoscută. Momentul de torsiune este corelat cu tensiunea de forfecare τ_f , iar turația și grosimea stratului inelar determină viteza de deformare $\dot{\gamma}$.

Măsurătorile au fost determinate în condiții de termostatare.

Comportarea reologică se redă prin reprezentarea $\tau = f(\dot{\gamma})$. Curbele ce redau dependența tensiunii de forfecare τ funcție de viteza de deformare $\dot{\gamma}$ pentru

probele analizate au fost obținute pentru temperatura $T_1 = 22^{\circ}\text{C}$ respectiv $T_2 = 35^{\circ}\text{C}$.

În cadrul capitolului III-Rezultate și discuții este redată comportarea reologică a cremelor analizate.

II.8. STUDIUL EFECTELOR UNOR EXTRACTE DIN FRUCTE DE VACCINIUM MYRTILLUS RESPECTIV VACCINIUM VITIS-IDAEA ASUPRA UNOR PARAMETRII BIOCHIMICI ȘI ASUPRA UNOR ENZIME REDUCĂTOARE LA COBAI

Studii recente au arătat că, extractele din fructe de pădure, în particular fragi și fructe aparținând genului *Vaccinium* manifestă *in vitro* efecte antioxidante și anticancer, efecte ce se datorează în mare parte compușilor polifenolici.

Principalul motiv care stă la baza interesului manifestat față de compușii polifenolici este recunoașterea proprietăților antioxidante ale acestora, marea lor abundență în alimentația noastră și rolul lor probabil în prevenirea diferitelor boli asociate cu stresul oxidativ, cum ar fi cancerul și bolile cardiovasculare. Pe deasupra, polifenolii, care constituie substanțele active ce se găsesc în multe dintre plantele medicinale, influențează activitatea unui lung șir de enzime și receptori celulari.

Pigmenții antocianici, sunt des întâlniți în hrana oamenilor datorită prezenței lor în fructe, legume și băuturi. Ei sunt implicați în numeroase activități biologice inclusiv activitate antioxidantă, antiinflamatoare și anticancer. Pentru o bună înțelegere a efectelor lor pozitive, este necesară cunoașterea metabolismului acestora. S-a dovedit faptul că, antocianinele sunt rapid absorbite și apar în plasma animalelor și în plasma umană sub formă de glicozide [268-271].

În colaborare cu Catedra de Biochimie a Facultății de Medicină Veterinară a Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului Timișoara, au fost efectuate cercetări cu scopul de a identifica:

- Modificări ce apar la nivelul **principalilor parametri sanguini**
- Modificări ce apar la **nivelul activității unor enzime eritrocitare**
- Modificări ce apar **la nivelul unor organe**
- Modificări ce apar la nivelul **formulei leucocitare**

la cobai tratați cu extract apos din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* [272-275].

S-au determinat parametri biochimici: malondialdehida (MDA) și glutatiunul (GSH), indicatori ai instalării stresului oxidativ; activitățile enzimelor oxido-reducătoare: *glutathion peroxidaza* (GSH-px), (E.C.1.11.1.9), *glutathion reductaza* (GSH-red), (E.C.1.6.4.2), *catalaza eritocitară* (CAT), (E.C.1.11.1.6) și *superoxid dismutaza* (SOD), (E.C.1.15.1.1.) precum și activitățile *fosfatazei alcaline* (PA), (E.C.2.6.1.12), *alanin amino transferazei* (ALAT), (E.C.2.6.1.2) și *aspartat amino transferazei* (ASAT), (E.C.2.6.1.1).

Au fost determinate de asemenea modificările care apar la nivelul unor organe (ficat, rinichi, splină) și modificările care apar la nivelul formulei leucocitare.

Metode de lucru:

Prepararea hemolizatului

Se prelevează 1 ml sânge, se centrifughează 10 minute și se îndepărtează stratul superior. Se adaugă 5 ml soluție izotonică de NaCl 0.85% și se agită bine, se centrifughează; se prelevează supernatantul și se repetă spălarea de 3 ori.

Se adaugă 0.2ml eritrocit la un volum de cel puțin 4 ml H₂O bidistilată și se lasă în repaus 10 minute la temperatura camerei. Se agită bine, se centrifughează pentru îndepărtarea stromei și se reține supernatantul.

Determinarea malondialdehidei (MDA)

Principiul metodei. Metoda se bazează pe reacția dintre malondialdehidă cu acidul tiobarbituric, rezultând un produs colorat.

Modul de lucru

Se întocmește o curbă etalon conform tabelului de mai jos.

Eprubeta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ml sol.standard	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
ml apă	49,5	49	48,5	48	47,5	47	46,5	46	45,5	45
Conc. etalon $\mu\text{mol/l}$	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

Se pregătesc 3 probe: proba de analizat, martor și etaloane. Peste 0,5 ml plasmă se adaugă 0,5 ml reactiv de lucru 4, în martor se adaugă 0,5 ml apă distilată și 0,5 ml reactiv de lucru 4, iar în etaloane peste 0,5 ml din fiecare etalon se adaugă 0,5 ml reactiv de lucru 4. Se mențin eprubetele în baia de apă la fierbere timp de 30 minute, se centrifugează și se determină extincția supernatantului la 532 nm.

Reactivi:

1. Reactiv TBA: 0,7 g acid tiobarbituric (TBA, Merck) se dizolvă în acid percloric 10% prin încălzire la 50°C. (soluția e stabilă 4 săptămâni la 20°C).
2. Acid tricloracetic: 20%.
3. Standard MDA: 164 mg 1,1,3,3 tetrahidroxipropan se dizolvă în apă
4. Reactiv de lucru: 1 parte reactiv 1+3 părți reactiv 2.

Determinarea glutationului

Principiul metodei

Glutationul redus formează cu acidul dinitro tiobarbituric (DNTB) un produs colorat care are maximum de absorbție la 412 nm.

Modul de lucru:

0,2 ml sânge total se hemolizează cu 2 ml apă.

0,1 ml hemolizat se tratează cu 5 ml reactiv Drabkin, pentru determinarea hemoglobinei din hemolizat.

Pentru determinarea glutatationului se procedează astfel:

	Reactivi	Probă	Martor (blanc)
1.	Hemolizat	2 ml	-
2.	Apă distilată	-	2 ml
3.	Agent de precipitare (acid metafosforic glacial și EDTANa ₂ , NaCl)	3 ml	3 ml
Se lasă în repaus 5 minute și se filtrează			
4.	Filtrat	2 ml	2 ml
5.	Na ₂ HPO ₄ 0,3 M	8	8
6.	DNTB	1	1
Se citește extincția la 412 nm			

Calculul:

$$\text{Conc. glutatation } ((\mu \text{ moli/g Hb}) = \frac{A_p - A_m}{cH_b} \cdot 30,4 \quad (14)$$

unde: A_p = absorbanta probei

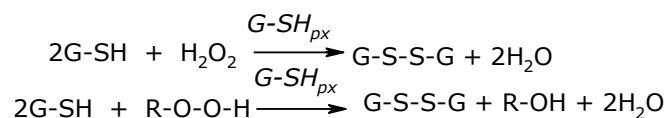
A_m = absorbanta probei martor

cH_b = concentrația H_b din hemolizat

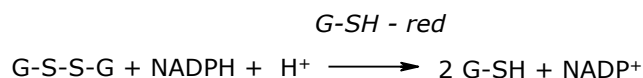
Determinarea glutatation peroxidazei

Principiul metodei:

Glutatation peroxidaza ($G-SH_{px}$) catalizează descompunerea apei oxigenate sau a unui hidroperoxid având ca donor de hidrogen glutatationul redus.



Terț-butil peroxidul este cel mai potrivit substrat pentru determinarea enzimei. Rata formării glutatationului oxidat este măsurată cu ajutorul glutatation reductazei ($G-SH_{red}$) iar oxidarea $NADPH + H^+$ este urmărită la 360 nm.



Modul de lucru:

În cuve cu un volum critic de 1 ml sunt adăugați următorii reactivi, conform tabelului de mai jos:

Nr Crt	Reactivi	Probă (μl)	Martor (blanc)(μl)
1	Tris-HCl, 1M EDTA 5m M, pH 8	100	100
2	Glutation G-SH 0,1M	20	20
3	Glutation reductază, 10 n/ml	100	100
4	NADPH + H ⁺ , 2m M	100	100
5	Hemolizat 1:20	10	10
6	Apă distilată	670	660
Se incubează la 37°C timp de 10 minute			
7	Butilhidroxiperoxid 7 mM	-	10

Rata va fi de aproximativ 0,015-0,02 OD unit/min, care se exprimă în UI/g Hb.

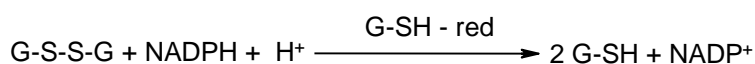
$$\text{Glu-px } (\mu \text{ moli/g Hb}) = \frac{\Delta E}{A_{Hm}} \cdot 32.15 \quad (15)$$

A_{Hm} = absorbanța hemolizatului

Determinarea glutation reductazei

Principiul metodei:

Glutation peroxidaza catalizează reacția:



Modul de lucru:

Se realizează proba și martorul (blanc) conform tabelului de mai jos.

Nr. Crt	Reactivi	Probă	Martor
1.	Sol NADH+H ⁺ 6mM	0,5	0,5
2.	Apă distilată	-	0,1
3.	Hemolizat	0,1	-
Se incubează 5 minute la 37°C			
4.	G-S-S-G	0,1	0,1
Se citește extincția la 360 nm			

Calculul:

$$\text{Glu - red } (\mu \text{ moli/g Hb}) = \frac{E_p - E_m}{\text{min}} \cdot \frac{2120}{cH_b} \quad (16)$$

cH_b = conc. H_b din hemolizat

Oxidarea $\text{NADPH} + \text{H}^+$ este urmărită la 360 nm.

Determinarea catalazei eritrocitare

Principiul metodei.

Catalaza sanguină s-a determinat prin metoda colorimetrică Sinha. Această metodă se bazează pe faptul că dicromatul de potasiu este redus în mediul acid, de către peroxidul de hidrogen la acetat cromic, compus colorat în verde care se poate fotocolorimetra la 570 nm.

Catalaza sanguină se lasă să acționeze asupra unei cantități fixe de H_2O_2 , o perioadă determinată de timp, apoi reacția enzimatică este oprită prin adăugarea unui amestec de dicromat de potasiu în soluție de acid acetic glacial, iar cantitatea de H_2O_2 rămasă este determinată prin diferență față de o probă etalon.

Reactivi: - tampon fosfat după Sørensen:

a. fosfat monopotasnic 66,7 mM. KH_2PO_4 - se usucă 1-2 h la 110°C 9,8 g KH_2PO_4 , se solvă în apă demineralizată și lipsită de CO_2 și se diluează la 1000 ml;

b. fosfat disodic 66,7 mM – sarea anhidră - se usucă 1-2 h la 110°C 9,479 g Na_2HPO_4 , se solvă în apă demineralizată și lipsită de CO_2 , se completează la 1000 ml.

Se amestecă 39,2 ml din soluția a cu 60,8 ml din soluția b și se aduce la 100 ml cu apă demineralizată pentru a se obține un pH = 7.

- H_2O_2 0.16m
- Soluție bicromat de potasiu 0.1%
- CH_3COOH glacial

Modul de lucru: peste 0,1 ml de sânge s-au adăugat 0,4 ml soluție tampon fosfat cu pH = 7 și 0,5 ml H_2O_2 0,16 M. După o scurtă agitare, s-a incubat un minut la termostat la temperatura de 25°C . S-au adăugat apoi 2 ml soluție de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1% în acid acetic glacial. Probele s-au supus apoi fierberii timp de 10 minute, apoi soluțiile s-au răcit sub jet de apă și s-au citit absorbanțele la λ 570 nm.

În paralel s-a efectuat și o probă etalon cu 0,5 ml H_2O_2 0,16 M.

Calculul :

$$\text{Activitatea catalazică } (\mu\text{M } \text{H}_2\text{O}_2/\text{min,ml}) = \frac{E_{\text{etalon}} - E_{\text{probă}}}{E_{\text{etalon}}} \times 10 \times \text{diluție} \quad (17)$$

Determinarea superoxid dismutazei (SOD)

Principiul metodei. Metoda se bazează pe capacitatea superoxid dismutazei de a inhiba reducerea sării de tetrazoliu -Nitro Blue Tetrazolin (NBT), de către radicalii superoxid. O unitate enzimatică de SOD reprezintă cantitatea de enzimă care produce 50% inhibiție în condiții standard. Radicalii superoxid sunt generați în mediu de reacție prin fotoreducerea riboflavinei.

Modul de lucru: Mediul de reacție al probei conține:

1. 2,55 ml soluție tampon fosfat;
2. 0,20 ml soluție EDTANa₂;
3. 0,1 ml plasmă sau hemolizat;
4. 0,1 ml soluție NBT;
5. 0,05 ml soluție riboflavină.

Paralel se face o probă martor cu aceeași compoziție, cu excepția hemolizatului care va fi înlocuit cu soluție tampon.

Martorul și proba au fost supuse iluminării timp de 5 minute la un bec de neon într-o incintă întunecată, după care se citește extincția la 560 nm.

În martor, deoarece lipsește enzima, radicalii superoxid formați prin fotoreducerea riboflavinei, reduc sarea de tetrazoliu la un formazan, intensitatea culorii albastre fiind maximă (100% inhibiție).

În probă, SOD descompune o parte din radicalii superoxid, iar cantitatea de formazan formată este mai mică.

Procentul de inhibiție realizat de enzima din probă se calculează utilizând relația:

$$100 - \frac{A_p}{A_m} \times 100 = a\% \text{ inhibiție} \quad (18)$$

Pentru a exprima rezultatele obținute în unități enzimaticе, a% inhibiție se raportează la mg/mL proteină în probă.

$$U / mg = \frac{a\% \text{ inhibiție}}{50\% \text{ inhibiție} \cdot mg / ml} \quad (19)$$

Reactivi:

- soluția NBT -1,5mM în apă distilată;
- soluție EDTANa₂ 0,1 M în apă distilată adusă la pH 7,8 cu NaOH 0,1 M;
- soluție riboflavină 0,12 M în apă distilată.;
- soluție tampon fosfat de potasiu 36 mM, pH =7,8.

OBS: Ceilalți parametri Ca, Mg, P, proteine precum și transaminazele, GGT-ul și fosfataza alcalină au fost determinate pe ANALIZOR BIOCHIMIC- HOSPITEX, 2007, utilizând diagrame de control și kituri specifice de la firma Radelkis.

II.9. STUDIUL PROPRIETĂȚILOR ANTIMICROBIENE A EXTRACTELOR DIN FRUCTE DE VACCINIUM MYRTILLUS RESPECTIV VACCINIUM VITIS-IDAEA

Determinarea activității antimicrobiene a extractelor din fructe de pădure s-a realizat prin metoda difuzimetrică [276, 277]. Metoda difuzimetrică, cunoscută în literatura de specialitate sub denumirea de Testul Kirby-Bauer constă în principiu în plasarea pe suprafața unui mediu potrivit (geloză-agar pentru bacterii) respectiv Sabourand (glucoză agar pentru fungi) a unor runde impregnate cu substanță de testat, mediul fiind în prealabil inoculat cu o suspensie bacteriană/fungică pură. După incubare, zonele de inhibiție sunt măsurate iar valorile diametrelor sunt traduse în următoarele categorii stabilite în standard: susceptibil când $d > 17$ mm, intermediar pentru valori ale diametrelor cuprinse între 12 și 17 mm, rezistent când $d < 12$ mm.

Mod de lucru:

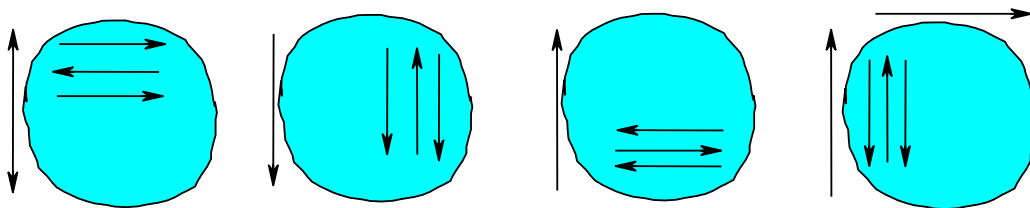
Activitatea antimicrobiană a sucului brut și a extractelor apoase din fructe de *Vaccinium myrtillus* și *Vaccinium vitis-idaea*, determinată prin metoda difuziei în agar cu discuri impregnate (metoda difuzimetrică) a fost testată pe trei specii bacteriene: bacterie gram pozitivă *Staphylococcus aureus* – ATCC 25923, gram negative: *Escherichia Coli* – ATCC 35298, *Proteus mirabilis*.

Reactivi: - medii de cultivare (geloză-sânge CLED, MacConkey, Chapman)
- mediu de cultură pentru activitatea antimicrobiană (Müller-Hinton agar)

Înainte de efectuarea antibiogramelor, tulpinile de referință au fost cultivate în modul următor:

- *Staphylococcus aureus* pe mediile geloză-sânge și Chapman
- *Escherichia Coli* pe mediile geloză-sânge, CLED, MacConkey
- *Proteus mirabilis* pe mediile geloză-sânge, CLED, MacConkey

După obținerea de colonii izolate pe mediile selective sus menționate am suspendat inoculi de bacterii în ser fiziologic steril până când densitatea suspensiei testate a egalat turbiditatea standardului echivalent unei concentrații de $3 \cdot 10^8$ /mL McFarland. Cuciile Petri (cu diametrul de 9 cm) ce conțin mediul Müller-Hinton agar au fost inoculate cu 1 mL de suspensie microbiană. Suspensia a fost răspândită pe întreaga suprafață a plăcii cu ajutorul unui tampon steril prin metoda dispersiei în 4 direcții pentru acoperirea completă a suprafeței.



După aceasta, suprafața mediului din plăcile Petri a fost lăsată să se usuce la temperatura camerei timp de maxim 15 minute.

Discurile de hârtie de filtru (rondelile cu diametrul de 6 mm, sterilizate în prealabil la pupinel într-o placă Petri din sticlă timp de 1 oră la 180°C) au fost impregnate cu 80 μL:

- Suc de merișoare
- Extract apos de merișoare
- Extract apos de afine
- Suc de afine.

Discurile astfel impregnate și uscate în plăci Petri sterile au fost aplicate aseptice pe suprafața fiecărei plăci Petri pentru antibiogramă cu ajutorul unei pensete sterile.

Fiecare disc a fost ușor presat pentru a asigura un contact bun cu suprafața mediului. Plăcile inoculate au fost incubate timp de 20 de ore la 37°C (în termostat). Zonele de inhibiție au fost exprimate ca media a trei analize independente.

PARTEA a-III-a – CONTRIBUȚII PROPRII

REZULTATE ȘI DISCUȚII

III.1. CARACTERIZAREA EXTRACTELOR REALIZATE DIN FRUCTE DE *VACCINIUM MYRTILLUS* RESPECTIV *VACCINIUM VITIS-IDAEA*

Așa cum s-a prezentat în prima parte a lucrării, în literatură există numeroase date care atestă legătura directă dintre capacitatea antioxidantă, conținutul de polifenoli totali și flavonoide totale [148, 149, 192, 206, 210].

Analiza cantitativă a compușilor polifenolici și a flavonoidelor din fructele de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* s-a realizat inițial prin metodele descrise de Farmacopeea Română [208]. Conținutul în polifenoli totali a materialului vegetal analizat conform Farmacopeei este prezentat în tabelul 8.

Tabelul 8.

Conținutul de polifenoli tip pirocatechină din fructele de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea*

Produs vegetal	Absorbanța la 660 nm	Conținutul total de polifenoli (mg pirocatechină)	% Compuși fenolici
Fructe <i>Vaccinium vitis-idaea</i> (2005)	0,4779	0,0227	11,35
Fructe <i>Vaccinium vitis-idaea</i> (2006)	0,6720	0,0331	16,55
Fructe <i>Vaccinium myrtillus</i> (2005)	0,5113	0,0245	12,25
Fructe <i>Vaccinium myrtillus</i> (2006)	0,6241	0,0305	15,25

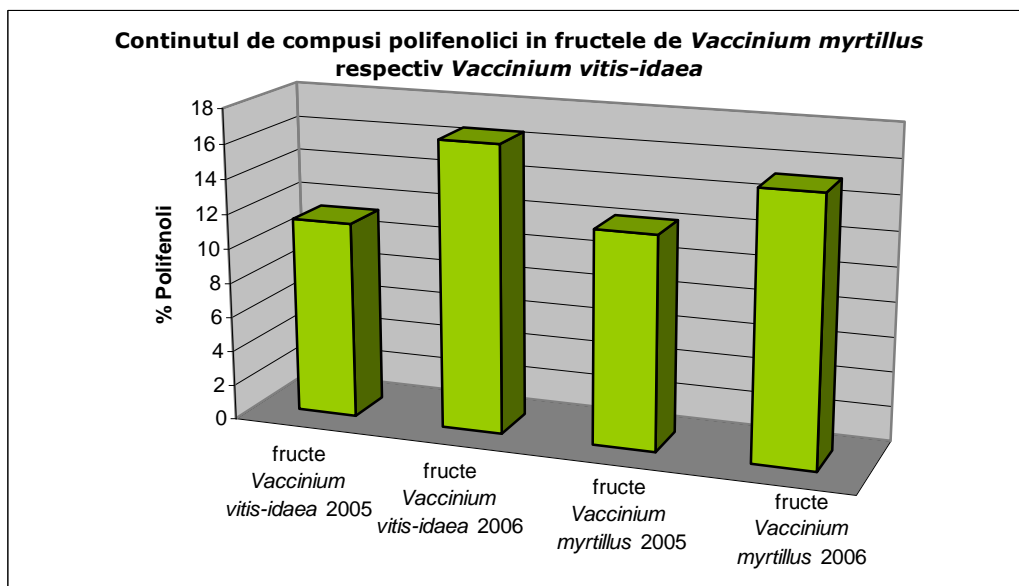


Figura 27. - Variația conținutului de polifenoli în fructele de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea*

Rezultatele obținute experimental indică un conținut de compuși fenolici de tip pirocatechină mai ridicat în fructele culese în anul 2006. Se observă că, în anul 2005 fructele de *Vaccinium myrtillus* erau mai bogate în polifenoli de tip pirocatechină decât fructele de *Vaccinium vitis-idaea*, în schimb în anul 2006 situația este inversă.

Conținutul în flavonoide al fructelor analizate exprimat ca % rutină este prezentat în tabelul 9.

Tabelul 9.

Conținutul total de flavonoide exprimat în rutină

Produs vegetal	Flavonoide g% (exprimate în rutină, %)
Fructe <i>Vaccinium vitis idaea</i> (2005)	1,9814
Fructe <i>Vaccinium vitis idaea</i> (2006)	2,1525
Fructe <i>Vaccinium myrtillus</i> (2005)	1,1644
Fructe <i>Vaccinium myrtillus</i> (2006)	1,2753

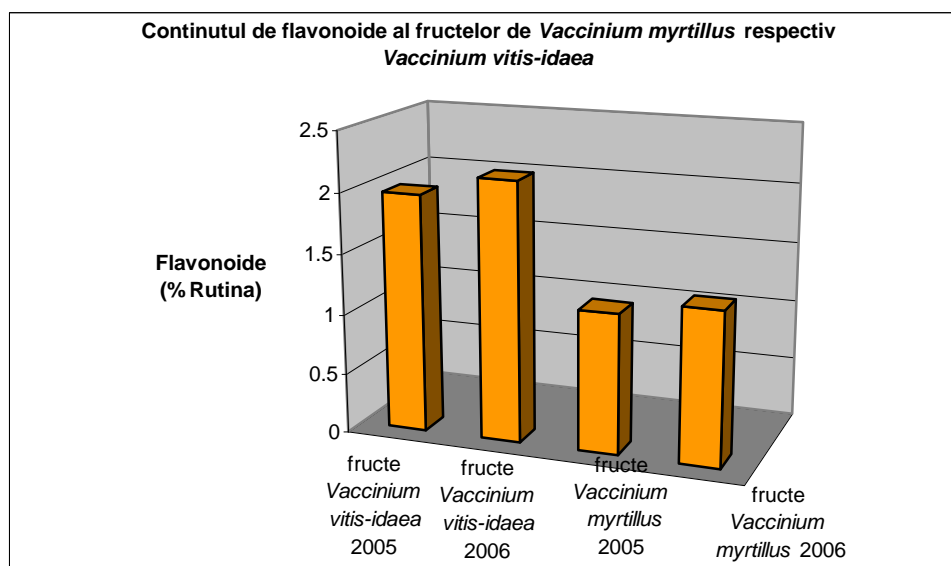


Figura 28. - Variația conținutului de flavonoide în fructele de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea*

Cel mai mare conținut în flavonoide se observă în cazul fructelor de *Vaccinium vitis-idaea* (2006), iar cel mai mic în cazul fructelor de *Vaccinium myrtillus* (2005). Variația conținutului de flavonoide respectiv polifenoli din același tip de material vegetal, cules din aceeași regiune se poate datora condițiilor de mediu din anul respectiv.

III.1.1. **Caracterizarea extractelor obținute prin extracție dinamică cu soluții etanolice respectiv metanolice la temperatura camerei**

Rezultatele obținute pentru conținutul de fenoli totali (metoda Folin Ciocalteu [146]) flavonoide totale [210] precum și pentru raportul dintre acestea în extractele etanolice și metanolice obținute din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv activitatea antioxidantă [83] a extractelor sunt prezentate în tabelele 10 și 11, iar în figurile 29 și 30 este prezentată variația conținutului de fenoli totali respectiv flavonoide totale în extractele analizate.

Tabelul 10.
 Conținutul de fenoli totali, flavonoide totale în extractele etanolice obținute din fructe de *Vaccinium myrtillus*

Nr. Crt	Solvent folosit la extracție	Fenoli totali (mg GAE/100 g fructe)	Flavonoide totale (mgCE/100 g fructe)	Flavonoide/Fenoli totali	Activitate antioxidantă [%]
1.	20% EtOH	258,2	160	0,62	87,26
2.	30% EtOH	354,8	282,1	0,79	87,67
3.	50% EtOH	410,6	359,8	0,87	88,15
4.	70% EtOH	416,8	396,3	0,95	89,32
5.	80% EtOH	716	511,1	0,71	89,73
6.	94% EtOH	683,6	501,8	0,73	88,54

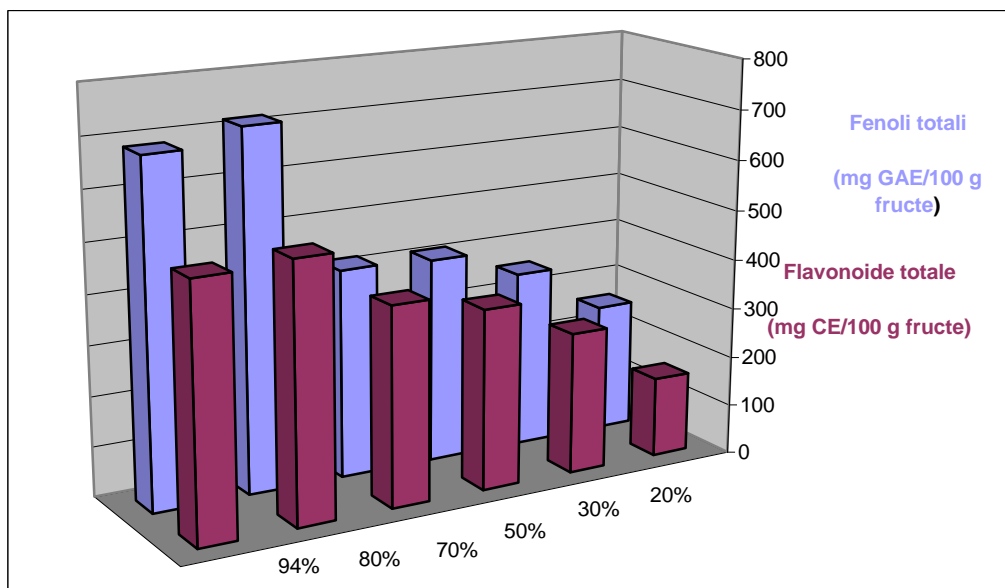


Figura 29. - Variația conținutului de fenoli totali respectiv flavonoide totale în extractele etanolice din fructe de *Vaccinium myrtillus*

Tabelul 11.

Conținutul de fenoli totali, flavonoide totale în extractele metanolice obținute din fructe de *Vaccinium myrtillus*

Nr. Crt.	Solvent folosit la extracție	Fenoli totali (mg GAE/ 100 g fructe)	Flavonoide totale (mg CE/100g fructe)	Flavonoide/ Fenoli totali	Activitate antioxidantă [%]
1	20% MeOH	434,8	292,4	0,67	87,94
2	30% MeOH	535,8	350	0,65	88,21
3	50% MeOH	575,6	409,9	0,71	86,61
4	70% MeOH	670,6	484,9	0,72	86,22
5	80% MeOH	711	533,6	0,75	87,21
6	96% MeOH	714	549,6	0,77	87,37

Analizând comparativ conținutul în fenoli totali a celor două extracte (figura 29 și 30) se constată că, cel mai mare conținut în fenoli totali s-a înregistrat în extractul obținut cu soluție etanolică 80%, urmat de extractul obținut cu soluție metanolică 96%. În extractele pentru obținerea cărora s-a folosit etanol de concentrație 80% respectiv metanol de concentrație 80% conținutul de fenoli totali înregistrat a fost apropiat.

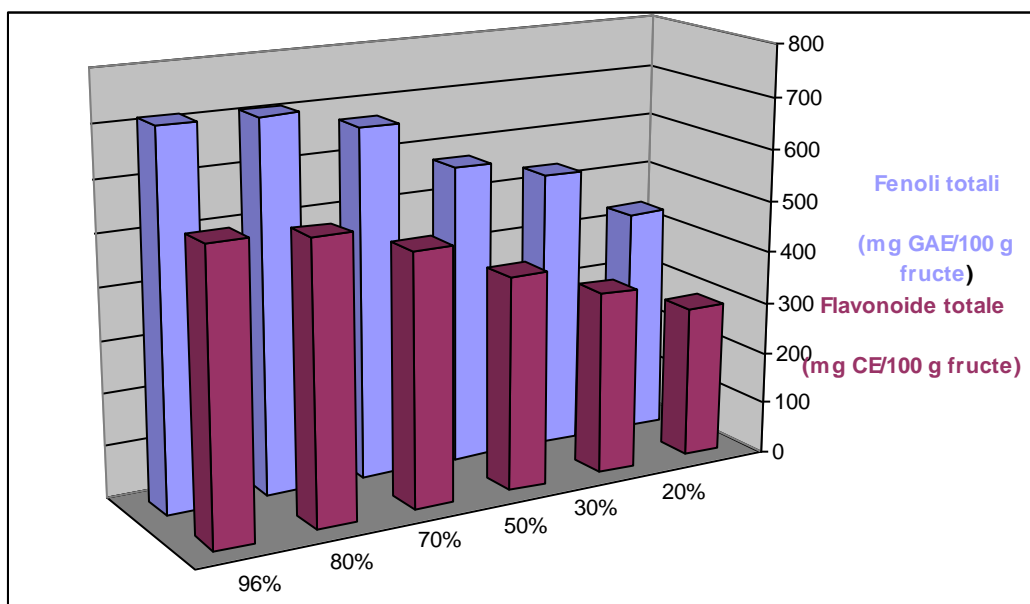


Figura 30. - Variația conținutului de fenoli totali respectiv flavonoide totale în extractele metanolice din fructe de *Vaccinium myrtillus*

În extractele pentru obținerea cărora s-a folosit EtOH 70% respectiv MeOH 70% se observă o diferență majoră între conținutul de fenoli totali (416,8 mg GAE/100 g fructe versus 670,6 mg GAE/100 g fructe) la valori apropiate ale

conținutului de flavonoide totale (396,3 mg CE/100 g versus 484,9 mg CE/100 g fructe).

O discuție asupra acestei diferențe ar avea un grad destul de mare de nesiguranță datorită numărului relativ redus de analize efectuate. Cel mai bun solvent folosit pentru extracția compușilor fenolici din fructe uscate de *Vaccinium myrtillus* s-a dovedit a fi metanolul dar pentru industria alimentară etanolul este mai convenabil. Din acest studiu s-a observat că extractele etanolice au o bună activitate antioxidantă (în medie >88%)

În tabelele 12 și 13 sunt prezentate datele referitoare la conținutul de fenoli totali respectiv flavonoide totale înregistrate în extractele etanolice și metanolice obținute din suc de fructe de *Vaccinium vitis-idaea*.

Tabelul 12.

Conținutul de fenoli totali, flavonoide totale în extractele etanolice obținute din suc de fructe de Vaccinium vitis-idaea

Nr. Crt.	Solvent folosit la extracție	Fenoli totali (mg GAE/ L suc)	Flavonoide totale (mg CE/ L suc)	Flavonoide/ Fenoli totali	Activitate antioxidantă [%]
1.	20% EtOH	929,65	252,96	0,27	83,31
2.	30% EtOH	1126,34	320,60	0,28	88,55
3.	50% EtOH	1084,63	329,76	0,30	89,08
4.	70% EtOH	1248,07	411,48	0,33	87,86
5.	80% EtOH	1155,60	375,77	0,32	90,99
6.	94% EtOH	1094,70	359,97	0,33	89,30

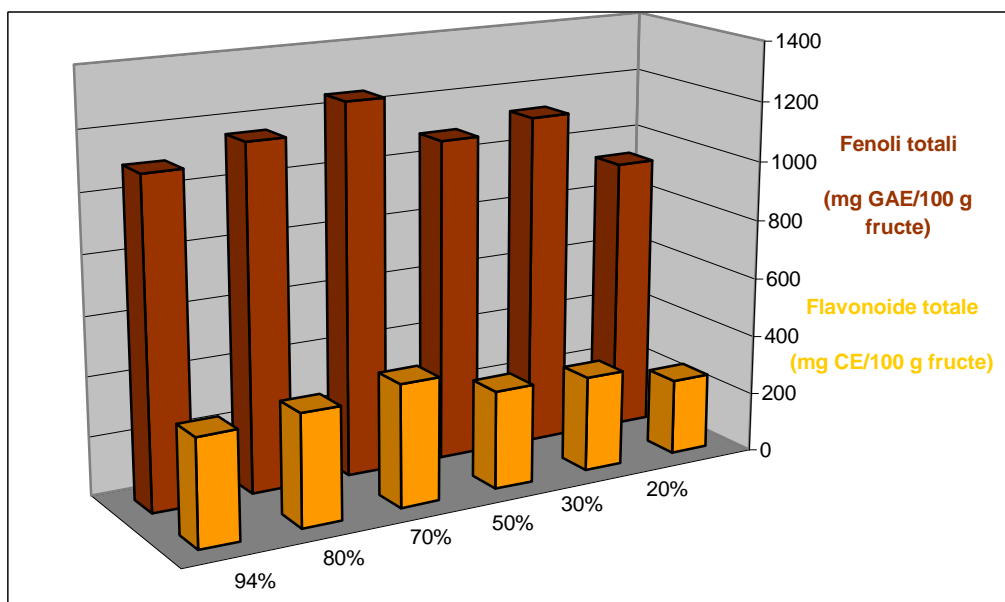


Figura 31. - Variația conținutului de fenoli totali respectiv flavonoide totale în extractele etanolice din suc de fructe de *Vaccinium vitis-idaea*

Tabelul 13.

Conținutul de fenoli totali, flavonoide totale în extractele metanolice obținute din suc de fructe de *Vaccinium vitis-idaea*

Nr. Crt.	Solvent folosit la extracție	Fenoli totali (mg GAE/ L suc)	Flavonoide totale (mg CE/ L suc)	Flavonoide/ Fenoli totali	Activitate antioxidantă [%]
1	20% MeOH	857,99	274,82	0,32	87,94
2	30% MeOH	964,44	302,17	0,31	88,21
3	50% MeOH	982,07	321,29	0,32	86,61
4	70% MeOH	1113,93	357,12	0,32	86,22
5	80% MeOH	1153,99	361,58	0,31	88,21
6	96% MeOH	1151,70	369,36	0,32	87,37

În grupul extractelor metanolice obținute din suc de fructe de *Vaccinium vitis-idaea* raportul flavonoide totale/fenoli totali este aproximativ egal. În cazul extractelor etanolice, cel mai mare conținut de fenoli totali respectiv flavonoide totale s-a înregistrat la folosirea ca solvent de extracție a etanolului de concentrație 70% în timp ce în cazul extractelor metanolice, folosirea metanolului de concentrație 80% s-a dovedit a fi cel mai bun solvent pentru extracția compușilor fenolici.

Rezultatele obținute în urma utilizării la extracție a metanolului 80% respectiv 96% sunt aproape similare. Deși cele mai mari cantități de fenoli totali s-au înregistrat în cazul extractelor metanolice, datele obținute de noi reflectă de asemenea un conținut mare de fenoli totali în extractele etanolice, la o concentrație a etanolului folosit la extracție între 30-94% (>1000 mg GAE/L suc).

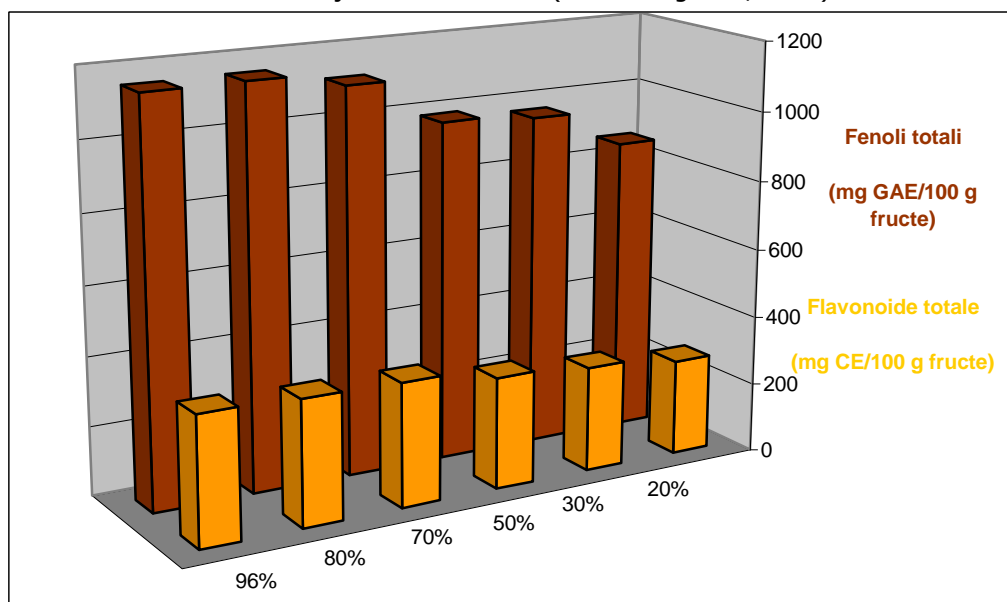


Figura 32. - Variația conținutului de fenoli totali respectiv flavonoide totale în extractele metanolice din suc de fructe de *Vaccinium vitis-idaea*

S-a analizat activitatea antioxidantă a tuturor extractelor obținute, activitate care a fost comparată cu activitatea antioxidantă a soluțiilor de standarde, antocianidine de tipul peonidină, malvidină, delfinidină, cianidină cu structură flavonoidică ($C=10^{-4}$ g/L) precum și cu activitatea antioxidantă a unui antioxidant sintetic des utilizat în industria alimentară t-butil-hidroxitoluen (BHT, $C=10^{-4}$ g/L). Diferența ce se observă între activitatea antioxidantă a extractelor analizate poate fi atribuită concentrațiilor de fenoli respectiv flavonoide totale prezente în acestea.

Capacitatea de captare a radicalilor DPPH (activitatea antioxidantă) a soluțiilor standardelor analizate și a soluției de BHT este prezentată în tabelul 14.

Tabelul 14.

Activitatea antioxidantă a soluțiilor standard de flavonoide ($C=10^{-4}$ g/L) și a unui antioxidant sintetic BHT ($C=10^{-4}$ g/L)

Soluție standard	Peonidină	Malvidină	Delfinidină	Cianidină	BHT
Activitate antioxidantă, [%]	12,32	26,82	78,79	73,27	88,29

În tabelul 15 sunt prezentate valorile absorbanțelor probelor etalon la 517 nm.

Tabelul 15.

Variația absorbanțelor soluțiilor probelor etalon de flavonoide și de antioxidant sintetic

Timp [min]	Peonidina	Malvidina	Delfinidina	Cianidina	BHT
0	0,9693	0,9693	0,9693	0,9693	0,9693
1	0,9603	0,9657	0,5893	0,8779	0,9575
5	0,9478	0,9230	0,2641	0,5159	0,8756
10	0,9344	0,8949	0,2616	0,4107	0,6627
15	0,9275	0,8700	0,2575	0,3588	0,5662
20	0,9242	0,8582	0,2518	0,3336	0,4235
25	0,9187	0,8379	0,2429	0,3121	0,3617
30	0,9141	0,8084	0,2407	0,2904	0,2299
35	0,9036	0,7805	0,2392	0,2714	0,1691
40	0,8933	0,7763	0,2384	0,2706	0,1627
45	0,8721	0,7511	0,2302	0,2652	0,1422
50	0,8608	0,7340	0,2283	0,2623	0,1278
55	0,8505	0,7221	0,2176	0,2601	0,1215
60	0,8498	0,7093	0,2055	0,2590	0,1135

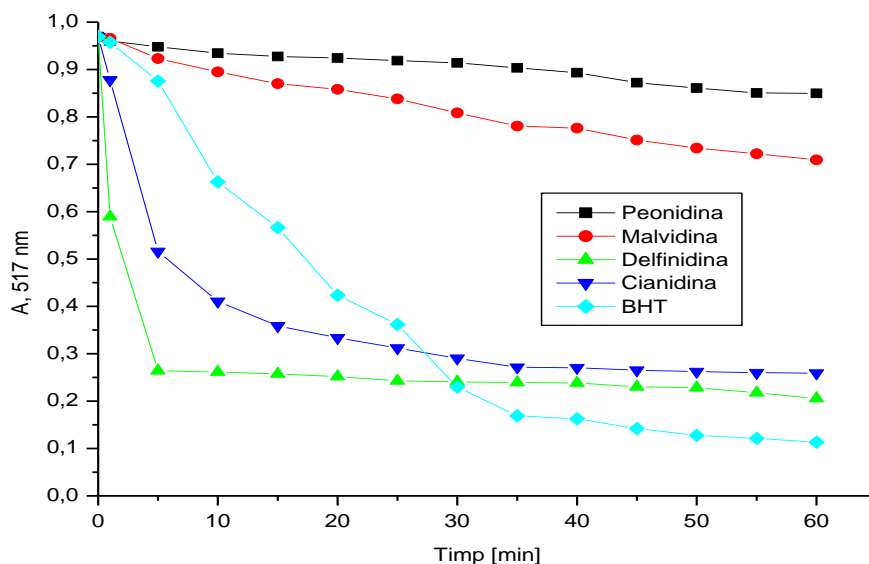


Figura 33. - Capacitatea de captare a radicalului DPPH pentru standardele de antocianine și t-butil-hidroxitoluen (BHT)

Din valorile obținute pentru activitatea antioxidantă (în medie 88% pentru extractele etanolice și 87% pentru cele metanolice) reiese că prezența concomitentă a mai multor polifenoli (flavonoide, antocianine) în extractele analizate potențează activitatea antioxidantă față de cea a soluțiilor standard individuale.

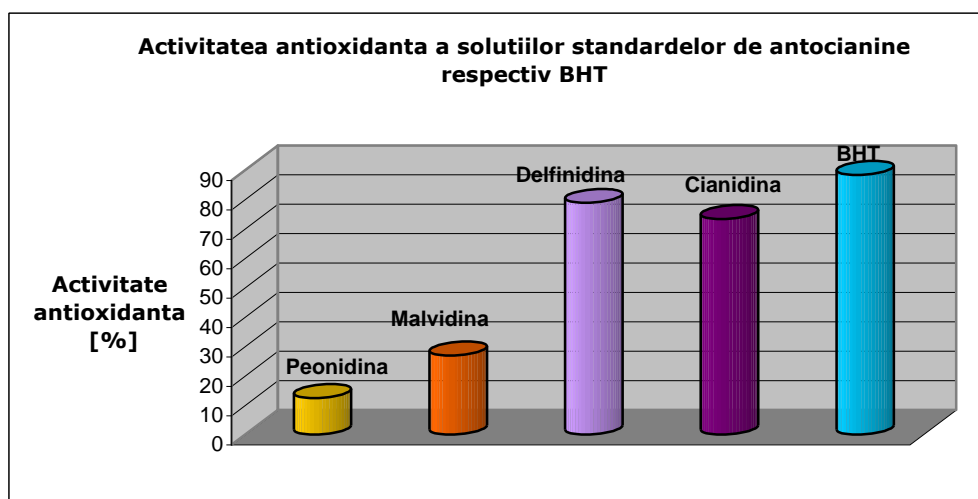


Figura 34. - Activitatea antioxidantă a soluțiilor de standarde (10⁻⁴ g/L)

Din studiul efectuat se observă că, odată cu creșterea concentrației solventului folosit la extracție crește și conținutul în flavonoide totale. În cazul extractelor metanolice obținute din suc de fructe de *Vaccinium vitis-idaea* se observă o creștere lentă a conținutului în flavonoide pe măsură ce concentrația metanolului este mai mare de 70%.

Rezultatele obținute au fost analizate statistic, calculând coeficienții statistici de bază cu ajutorul „programului Statistica”.

Analiza statistică

Din analiza statistică efectuată se observă o puternică corelare între conținutul de fenoli totali și cel de flavonoide totale precum și între conținutul de fenoli totali și concentrația metanolului folosit la obținerea extractelor (tabelul 16).

Tabelul 16.

Corelarea între conținutul de fenoli totali și cel de flavonoide totale, respectiv între conținutul de fenoli totali și concentrația solventului folosit la extracție

	R²	P
<i>Extract etanolic din fructe de Vaccinium myrtillus *</i>		
Fenoli totali – Flavonoide totale (fig. 31)	0.8883	0.0049
Fenoli totali – Concentrația etanolului	0.8166	0.0135
<i>Extract metanolic din fructe de Vaccinium myrtillus **</i>		
Fenoli totali – Flavonoide totale (fig 32)	0.9819	0.0001
Fenoli totali – Concentrația metanolului	0.9349	0.0016
<i>Extract etanolic din suc de fructe de Vaccinium vitis-idaea*</i>		
Fenoli totali – Flavonoide totale	0.8897	0.0047
Fenoli totali – Concentrația etanolului	—	—
<i>Extract metanolic din suc de fructe de Vaccinium vitis-idaea**</i>		
Fenoli totali – Flavonoide totale	0.9805	0.0001
Fenoli totali – Concentrația metanolului	0.9201	0.0025

R = coeficient de corelare, P = abaterea limită, *= extracte obținute cu etanol de concentrație 20, 30, 50, 70, 80, 94%, ** = extracte obținute cu metanol de concentrație 20, 30, 50, 70, 80, 96%

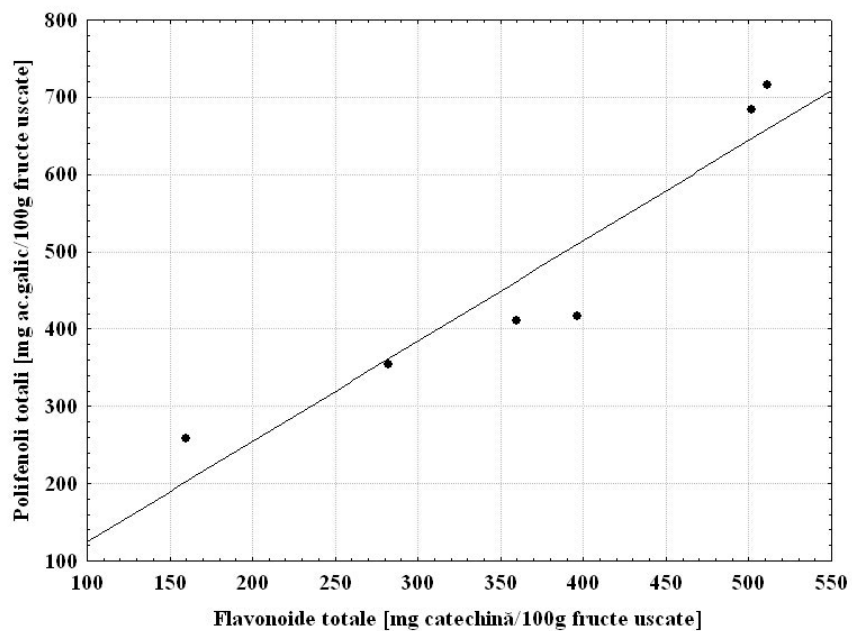


Figura 35. - Dependența liniară dintre polifenolii totali din extractele etanolice din fructe de *Vaccinium myrtillus* și flavonoidele totale

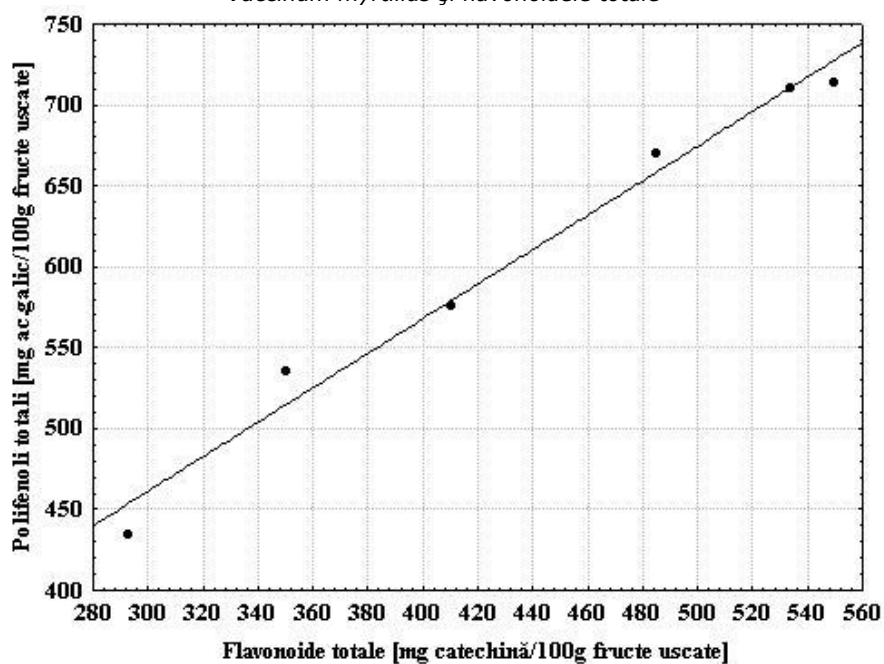


Figura 36. - Dependența liniară dintre polifenolii totali din extractele metanolice din fructe de *Vaccinium myrtillus* și flavonoidele totale

Valoarea coeficienților de corelare este acceptabilă, indicând o corelare bună prin regresie liniară, care demonstrează faptul că, compușii fenolici contribuie în calitate de principii active la activitatea antioxidantă a extractelor studiate.

În urma analizei de regresie efectuată, se observă o bună corelare între conținutul de fenoli totali-flavonoide totale precum și între conținutul de fenoli totali și concentrația metanolului folosit la extracție ($R > 0,9$ comparativ cu 0,8 în extractele etanolice).

Concluzii

Acest studiu prezintă date importante referitoare la activitatea antioxidantă, conținutul de flavonoide totale respectiv de fenoli totali a extractelor studiate.

De asemenea se observă că, cantitatea de fenoli totali respectiv flavonoide totale extrasă este influențată de concentrația solventului folosit.

Pentru a obține cantități maxime de compuși fenolici extrași se recomandă utilizarea ca solvent de extracție a etanolului 80% respectiv a metanolului 96%, pentru obținerea extractelor din fructe uscate de *Vaccinium myrtillus*, respectiv a etanolului 70% și metanolului 80% pentru extractele din suc de fructe de *Vaccinium vitis-idaea*.

Activitatea antioxidantă este un parametru de calitate important al fructelor. Datele prezentate referitoare la conținutul în fenoli totali respectiv flavonoide totale reprezintă o bază în ceea ce privește rolul protectiv al fructelor împotriva radicalilor liberi.

În viitor urmărim separarea cromatografică a principiilor active (antocianidine de tipul cianidină, delphinidină, malvidină) din extractele studiate și utilizarea lor ca factori de protecție împotriva oxidării.

III.1. 2. Caracterizarea extractelor lipofile și hidrofile din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea*

Conținutul de polifenoli totali al extractelor obținute conform metodologiei descrisă la paragraful II.2.2.1.2, a fost determinat prin metoda Folin Ciocalteu. Conținutul de flavonoide totale s-a determinat prin metoda descrisă de Marinova și colaboratorii [210], iar activitatea antioxidantă prin metoda ce utilizează radicali DPPH [83] precum și prin metoda de decolorare cu β -caroten, în sistemul β -caroten – acid linoleic [89, 146]. În general, activitatea antioxidantă a extractelor vegetale variază funcție de metoda aleasă pentru determinarea acestora [89]. Din acest motiv folosirea unei singure metode de determinare a activității antioxidante poate fi inadecvată. În acest scop am ales să determinăm activitatea antioxidantă a extractelor obținute prin două metode ce se bazează pe mecanisme diferite, metoda ce utilizează radicali liberi de DPPH bazată pe o reacție de transfer de electroni și o metodă de decolorare în sistemul β -caroten/acid linoleic bazată pe reacția de transfer a unui atom de hidrogen.

Rezultatele experimentale obținute, inclusiv activitatea antioxidantă determinată prin cele două metode sunt prezentate comparativ în tabelul 17.

Tabelul 17.
 Conținutul de polifenoli totali, flavonoide totale și activitatea antioxidantă a extractelor analizate

Extract	Polifenoli totali (mg GAE/100 g fructe)	Flavonoide totale (mg CE/100 g fructe)	AA [%] (DPPH)	AA [%] (sistem β -caroten/acid linoleic)
E1	370,6	138,16	47,29	71,43
E2	529,80	207,15	76,71	72,64
E3	315,46	170,39	68,90	77,78
E4	236,56	159,07	29,62	44,90
E5	424,38	231,75	55,32	74,92
E6	575,98	396,89	46,02	53,78
E7	725,16	504,68	75,62	87,09
BHT	—	—	88,29	85,12

E1= extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* uscate (Coșevița 2007)

E2= extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* proaspete (Coșevița 2007)

E3= extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* proaspete (Borlova 2007)

E4= extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* uscate (Coșevița 2006)

E5= extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* proaspete (Coșevița 2006)

E6= extract din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* uscate (Muntele Mic 2007)

E7= extract din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* proaspete (Muntele Mic 2007)

Valorile absorbanțelor la 517 nm a extractelor analizate pe baza cărora s-a calculat activitatea antioxidantă sunt prezentate în tabelul 18.

Tabelul 18.
 Variația absorbanțelor pentru extractele analizate

Timp [min]	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
0	0,9693	0,9693	0,9693	0,9693	0,9693	0,9693	0,9693
1	0,8942	0,7654	0,7978	0,8839	0,8042	0,8512	0,8553
5	0,8900	0,5358	0,5091	0,8776	0,6123	0,7422	0,6256
10	0,8887	0,4417	0,4814	0,8739	0,5633	0,6983	0,5677
15	0,8822	0,4179	0,4411	0,8737	0,5291	0,6677	0,5082
20	0,8762	0,3831	0,3927	0,8726	0,5056	0,6436	0,4420
25	0,8705	0,3529	0,3544	0,8734	0,4841	0,6192	0,4107
30	0,8620	0,3227	0,3461	0,8663	0,4786	0,5986	0,3735
35	0,8560	0,2930	0,3278	0,8612	0,4639	0,5768	0,3254
40	0,8107	0,2692	0,3179	0,7968	0,4569	0,5644	0,2990
45	0,7980	0,2557	0,3114	0,7705	0,4453	0,5566	0,2785
50	0,7729	0,2397	0,3042	0,7293	0,4419	0,5445	0,2619
55	0,6423	0,2312	0,3031	0,6974	0,4371	0,5314	0,2458
60	0,5109	0,2257	0,3014	0,6821	0,4330	0,5232	0,2363

Activitatea antioxidantă corespunzătoare metodei de analiză cu DPPH a fost calculată cu formula [83, 215, 216]:

$$\% \text{ Activitate antioxidantă} = \frac{A_{(t=0)} - A_{(t=60)}}{A_{(t=0)}} \cdot 100 \quad (4)$$

unde: $A_{(t=0)}$ = absorbanța probei la timpul $t=0$ min
 $A_{(t=60)}$ = absorbanța probei la timpul $t=60$ min

Din reprezentarea grafică a absorbanțelor soluțiilor de DPPH (20 mg/L) cu adaos de extracte naturale din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* se observă că:

- cea mai mare activitate antioxidantă o au extractele obținute din fructe proaspete de *Vaccinium myrtillus* din recolta anului 2007;
- cea mai mică valoare a activității antioxidante o are extractul obținut din fructe uscate de *Vaccinium myrtillus* din recolta anului 2006.

În cazul acestor extracte se pot observa și diferențe ale conținutului de polifenoli totali și flavonoide totale. Extractele obținute din fructe de *Vaccinium myrtillus* din recolta 2007 (E1, E2) au un conținut mai ridicat de polifenoli totali dar mai scăzut în flavonoide totale decât extractele obținute din același tip de fructe culese din aceeași regiune în anul 2006 (E4, E5).

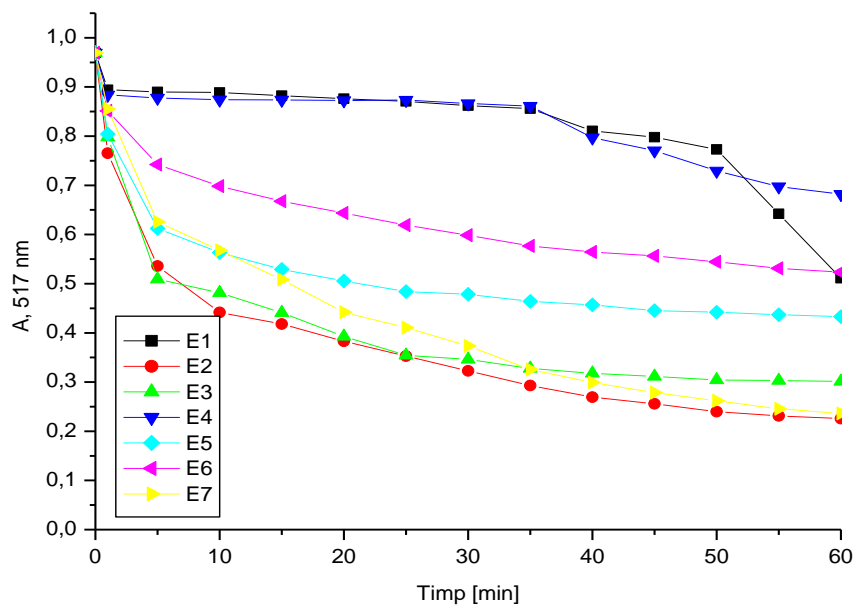


Figura 37. - Capacitatea de captare a radicalului DPPH pentru extractele vegetale

În cazul extractelor obținute din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* cea mai mare activitate antioxidantă o prezintă extractul obținut din fructe proaspete (E7).

Pentru siguranța rezultatelor s-a folosit o a doua metodă de determinare a activității antioxidante, metoda de decolorare cu β -caroten.

Formula de calcul pentru activitatea antioxidantă determinată prin metoda de decolorare cu β -caroten, în sistemul β -caroten/acid linoleic este următoarea:

$$AA\% = \left[1 - \frac{(A_i - A_t)}{(A'_i - A'_t)} \right] \times 100 \quad (5)$$

unde: A_i = absorbanta probei la $t=0$ min;
 A_t = absorbanta probei la $t=180$ min;
 A'_i = absorbanta probei control la $t=0$ min;
 A'_t = absorbanta probei control la $t=180$ min;

Valorile absorbanțelor la 470 nm a probelor analizate pe baza cărora s-a calculat activitatea antioxidantă sunt prezentate în tabelul 19.

Tabelul 19.
Variația absorbanțelor la 470 nm pentru probele analizate în sistemul β -caroten/acid linoleic

Timp [min]	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	C	BHT
0	0,517	0,517	0,517	0,517	0,517	0,517	0,517	0,517	0,517
30	0,508	0,486	0,497	0,449	0,503	0,488	0,517	0,446	0,516
60	0,505	0,483	0,493	0,447	0,503	0,483	0,512	0,382	0,513
90	0,504	0,481	0,493	0,443	0,499	0,482	0,512	0,348	0,512
120	0,501	0,447	0,492	0,443	0,498	0,482	0,511	0,333	0,511
150	0,498	0,468	0,475	0,441	0,497	0,478	0,505	0,312	0,501
180	0,458	0,460	0,471	0,403	0,465	0,421	0,490	0,310	0,486

C = proba control

Din variația absorbanțelor în timp a emulsiilor β -caroten/acid linoleic se observă că proba control fără adăugare de antioxidanți (de tip extract vegetal) se oxidează mult mai rapid, în timp ce extractele analizate prezintă activități antioxidante variate. Ordinea în care crește activitatea antioxidantă determinată în sistemul β -caroten/acid linoleic este: extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* uscate (Coșevița 2006) < extract din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* uscate (Muntele Mic 2007) < extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* uscate (Coșevița 2007) < extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* proaspete (Coșevița 2007) < extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* proaspete (Coșevița 2006) < extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* proaspete (Borlova 2007) < extract din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* proaspete (Muntele Mic 2007). Cu alte cuvinte, extractele din fructe de *Vaccinium myrtillus* uscate au activitate antioxidantă mai scăzută decât cele din fructe proaspete indiferent de anul de recoltare sau locația geografică.

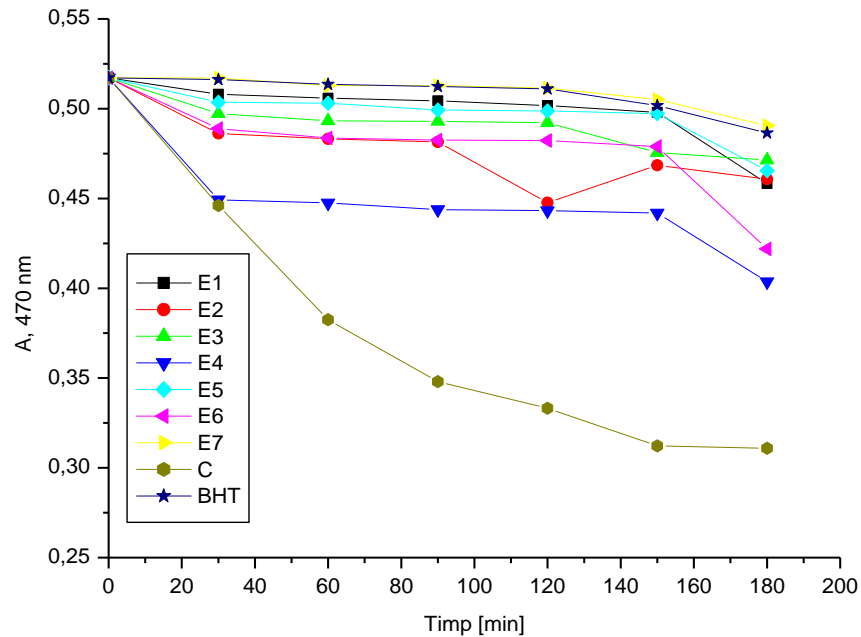


Figura 38. - Variația absorbanței în timp a emulsiilor β -caroten/acid linoleic cu adaus de extracte vegetale respectiv *t*-butilhidroxitoluen (BHT)

Dacă facem o comparație între activitatea antioxidantă a extractelor analizate prin cele două metode (vezi tabelul 17), se observă că, doar în cazul extractului (E2) obținut din fructe de *Vaccinium myrtillus* proaspete (Coșevița 2007) valorile activității antioxidante determinată prin cele două metode sunt apropiate. În cazul celorlalte extracte valorile activității antioxidante determinate în sistemul β -caroten/acid linoleic sunt mai ridicate decât cele determinate prin metoda cu DPPH (figura 39).

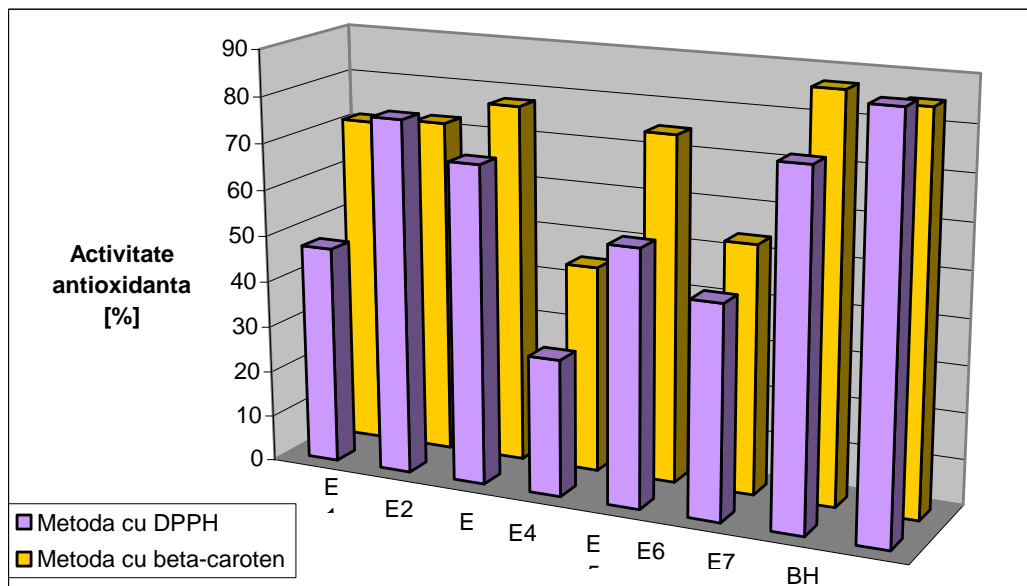


Figura 39. - Activitatea antioxidantă a extractelor analizată prin cele două metode

Cea mai mare activitate antioxidantă determinată prin cele două metode o înregistrează extractul E7 din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* proaspete (Muntele Mic 2007), care prezintă și cel mai mare conținut de polifenoli totali respectiv flavonoide totale, iar cele mai mici valori ale activității antioxidante în cazul celor două metode aplicate, s-au înregistrat la extractele obținute din fructe uscate (E1, E4, E6).

III.1.3. **Caracterizarea extractelor apoase/alcoolice obținute din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* prin extracție statică repetată**

Extractele apoase respectiv etanolice obținute conform metodologie prezentată în capitolul II- Partea experimentală, subcapitolul II.2.2.2.1, au fost analizate în vederea determinării conținutului în polifenoli totali (PT), flavonoide totale (FT), antocianine totale (AT) și a activității antioxidante (AA).

Rezultatele experimentale obținute pentru parametrii analizați sunt prezentate sintetic în tabelul 20.

Tabelul 20.

Valorile obținute experimental pentru parametrii: PT, FT, AT, AA

Parametru	Extract apos <i>V. myrtillus</i>	Extract alcoolic <i>V. myrtillus</i>	Extract apos <i>V. vitis-idaea</i>	Extract alcoolic <i>V. vitis-idaea</i>
Polifenoli totali (mg GAE/mL extr.)	59,75	61,34	58,45	60,18
Flavonoide totale (mg CE/mL extr.)	22,11	23,14	24,62	25,31
Antocianine totale (mg cianidină/mL extract)	33,88	34,14	32,20	33,09
Activitate antioxidantă [%] (met. DPPH)	81,80	83,61	80,30	81,31
Activitate antioxidantă [%] (met. β -caroten)	71,04	80,67	68,80	77,23

*pentru determinarea activității antioxidante prin metodele cu DPPH și β -caroten, extractele au fost diluate în raport 1:10

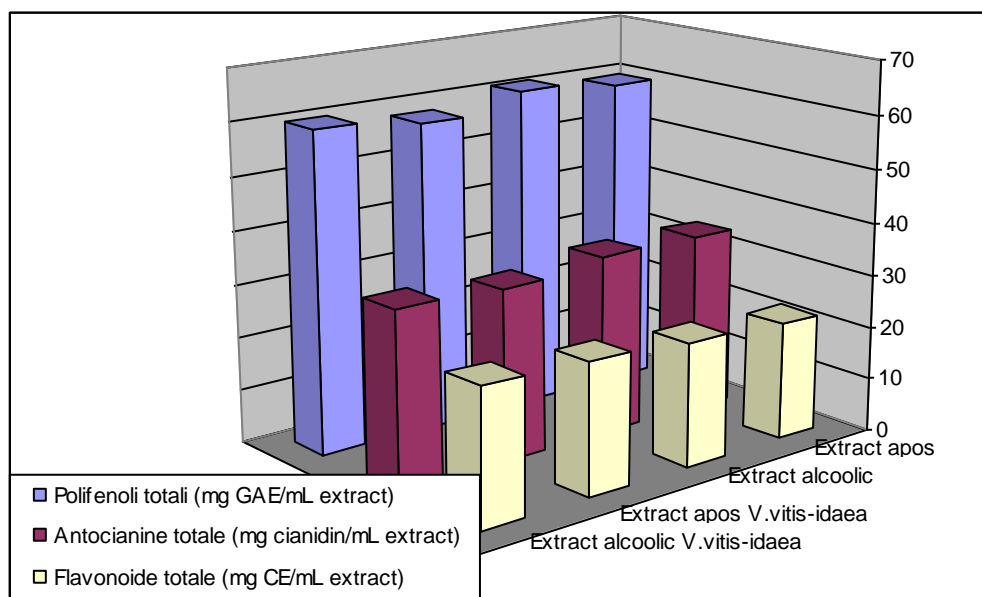


Figura 40. - Variația conținutului în polifenoli totali, antocianine și flavonoide totale în extractele apoase și alcoolice

Din figura 40 se observă că atât extractele apoase cât și cele alcoolice sunt bogate în polifenoli. Extractele din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine negre) sunt mai bogate în antocianine, în timp ce extractele din fructe de *Vaccinium vitis-idaea*

(afine roșii) sunt mai bogate în flavonoide. Raportul flavonoide totale/polifenoli totali în extractele din fructe de *Vaccinium myrtillus* este 0,37 în timp ce în extractele din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* este 0,42.

Variația absorbanțelor soluțiilor de DPPH la 517 nm cu adaos de extracte naturale este prezentată în tabelul 21 respectiv figura 41, iar a emulsiilor β -caroten/acid linoleic cu adaos de extracte naturale determinate la 470 nm în tabelul 22 și figura 42.

Tabelul 21.

Variația absorbanțelor pentru extractele analizate

Timp [min]	Extract apos <i>Vaccinium myrtillus</i>	Extract alcoolic <i>Vaccinium myrtillus</i>	Extract apos <i>Vaccinium vitis-idaea</i>	Extract alcoolic <i>Vaccinium vitis-idaea</i>
0	0,8112	0,8112	0,8112	0,8112
1	0,7231	0,7158	0,7819	0,7803
5	0,6433	0,7061	0,4651	0,3812
10	0,5672	0,6012	0,3254	0,2190
15	0,4312	0,5410	0,2261	0,1991
20	0,3102	0,2982	0,2078	0,1921
25	0,1931	0,1891	0,1943	0,1897
30	0,1821	0,1731	0,1902	0,1885
35	0,1767	0,1713	0,1872	0,1877
40	0,1723	0,1701	0,1819	0,1871
45	0,1675	0,1654	0,1783	0,1770
50	0,1610	0,1595	0,1609	0,1682
55	0,1501	0,1432	0,1576	0,1531
60	0,1476	0,1329	0,1598	0,1516

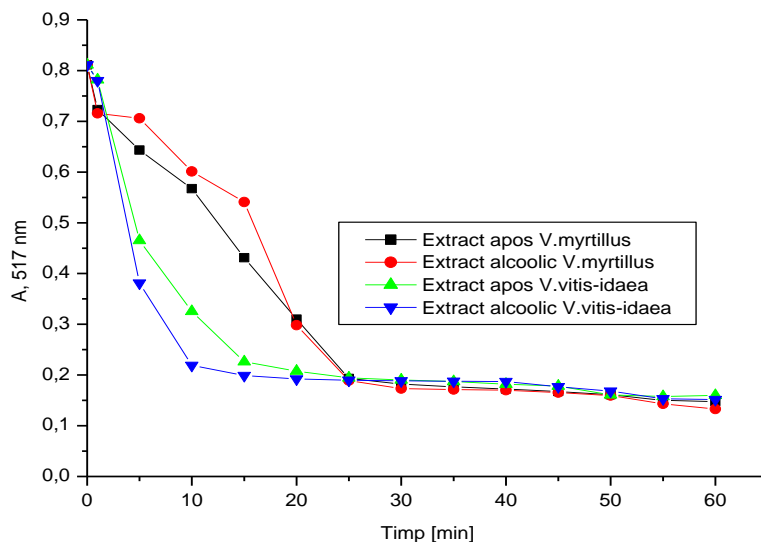


Figura 41. - Capacitatea de captare a radicalului DPPH pentru extractele vegetale

Cu cât valoarea absorbanțelor înregistrate la 517 nm este mai mică, cu atât capacitatea de captare a radicalului DPPH pentru extracte este mai mare. Din reprezentarea grafică a variației absorbanțelor extractelor la 517 nm urmărită timp de 60 minute se observă că în primele 25 de minute extractul alcoolic din fructe de *Vaccinium myrtillus* a înregistrat cele mai mari valori ale absorbantei, după care acestea scad cel mai mult. Datorită acestui fapt putem trage concluzia că, principiile active prezente în extractul alcoolic din fructe de *Vaccinium myrtillus* reacționează mai lent cu radicalul DPPH, comparativ cu principiile active din extractul alcoolic din fructe de *Vaccinium vitis-idaea*.

Tabelul 22.
Variația absorbanțelor la 470 nm pentru probele analizate în sistemul β -caroten/acid linoleic

Timp [min]	Extract apos <i>Vaccinium myrtillus</i>	Extract alcoolic <i>Vaccinium myrtillus</i>	Extract apos <i>Vaccinium vitis-idaea</i>	Extract alcoolic <i>Vaccinium vitis-idaea</i>	Proba control
0	0,5312	0,5312	0,5312	0,5312	0,5312
30	0,5217	0,5264	0,5205	0,5287	0,4954
60	0,5131	0,5197	0,5173	0,5212	0,4564
90	0,5067	0,5114	0,4801	0,5179	0,4011
120	0,4884	0,5071	0,4796	0,5101	0,3876
150	0,4785	0,4901	0,4723	0,4956	0,3645
180	0,4732	0,4925	0,4687	0,4856	0,3309

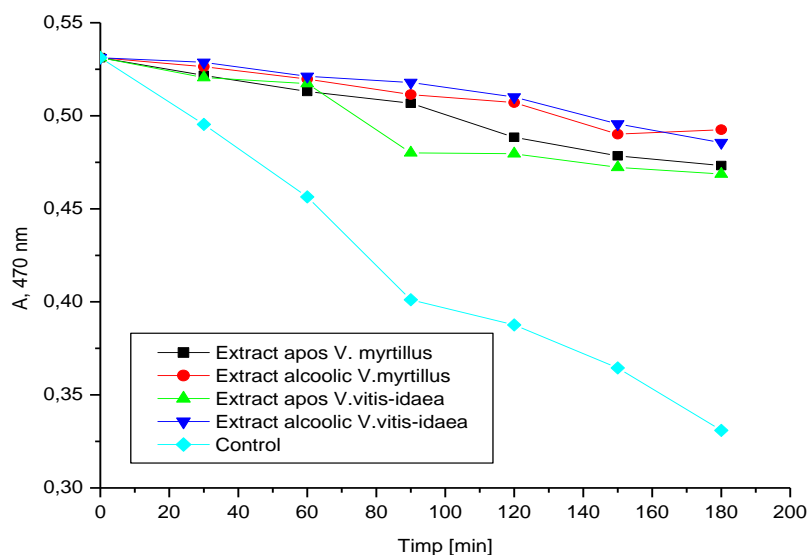


Figura 42. - Variația absorbantei în timp a emulsiilor β -caroten/acid linoleic cu adăug de extracte vegetale

Urmărind spectrofotometric la 470 nm oxidarea emulsiei de β -caroten/acid linoleic cu adaus de extracte naturale se observă că, cel mai rapid se oxidează proba control, fără adaus de antioxidanți, iar cel mai greu probele cu adaus de extracte alcoolice din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea*.

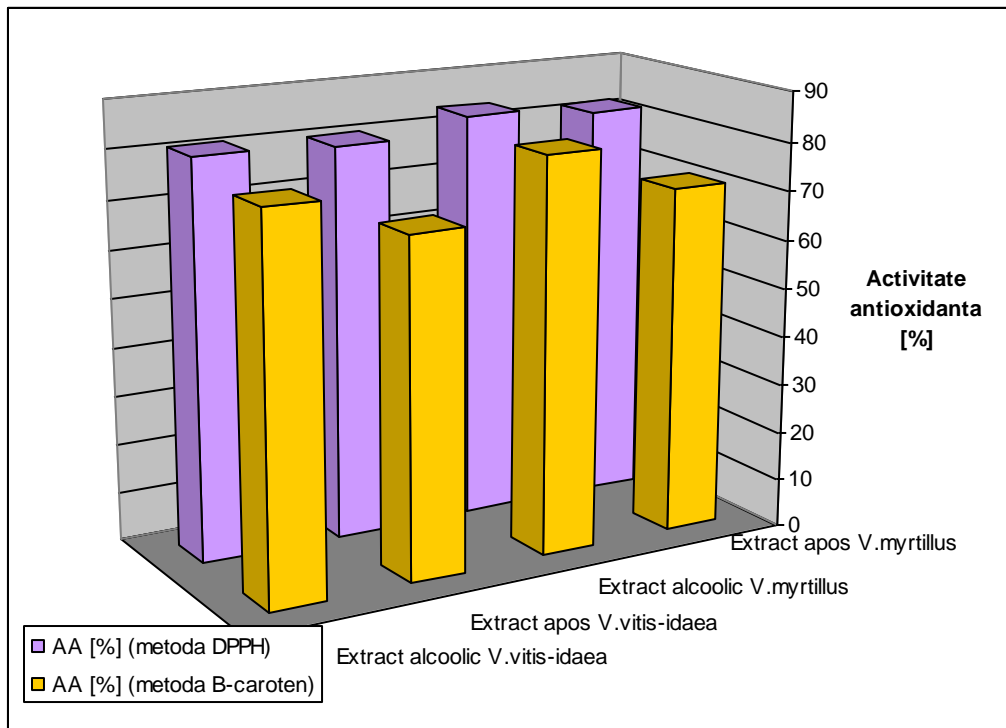


Figura 43. - Activitatea antioxidantă a extractelor determinată prin metoda cu DPPH respectiv metoda β -caroten/acid linoleic

Urmărind reprezentarea grafică a valorii activității antioxidante a extractelor apoase respectiv alcoolice determinată prin metoda cu DPPH respectiv prin metoda ce utilizează sistemul β -caroten/acid linoleic, se observă că cele mai mari valori s-au înregistrat pentru extractele alcoolice prin metoda ce utilizează radicali liberi DPPH. Diferențele ce apar între valorile activității antioxidante determinată prin cele două metode sunt mult mai mici decât diferențele ce apar în cazul extractelor apoase. Valorile mai mari ale activității antioxidante determinată prin metoda cu DPPH arată că extractele analizate sunt buni captatori de radicali liberi de tip 1,1-difenilpicrilhidrazil (DPPH).

III.1.4. Analiza calitativă și cantitativă a antocianinelor în extractele din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea*

III.1.4.1. Identificarea antocianinelor prin spectroscopie IR

Spectrele de IR ale extractelor analizate sunt prezentate în figurile 44 și 45, iar atribuirea benzilor caracteristice în tabelul 23.

În spectrul IR al extractelor din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea*, s-au putut distinge o serie de benzi spectrale ce pot fi atribuite astfel: la 724 respectiv 908 cm^{-1} apar vibrațiile de deformare în plan a legăturii CH din vecinătatea legăturilor duble C=C din cele două cicluri aromatice; între 1026 – 1200 cm^{-1} apar vibrații de valență ale grupării -C-O ($\nu_{\text{C-O}}$), în regiunea 1560-1660 cm^{-1} apar benzi caracteristice vibrației de valență a legăturii duble a oxigenului oxonic, bandă caracteristică tuturor antocianinelor, benzile de la 1660 cm^{-1} , fiind tipice scheletului flavonoidic.

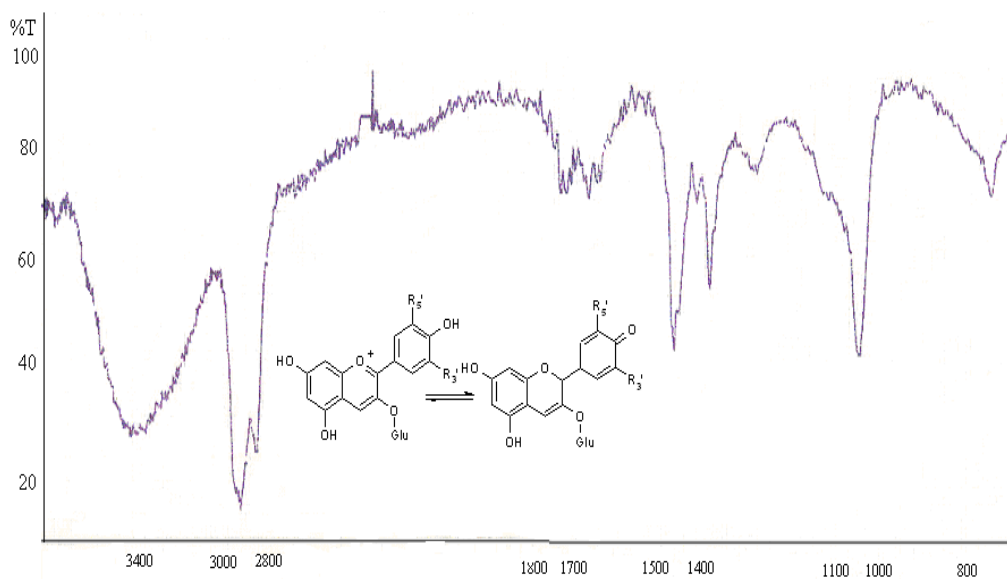


Figura 44. - Spectrul IR al extractului alcoolic (E5) din fructe de *Vaccinium myrtillus*

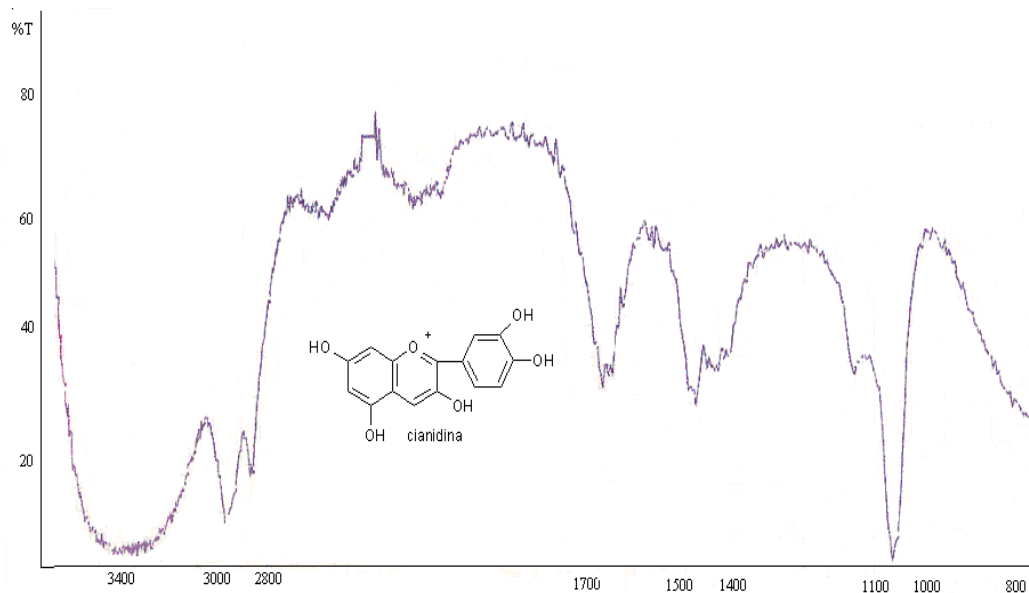


Figura 45. - Spectrul IR al extractului alcoolic (E5) din fructe de *Vaccinium vitis-idaea*

Atribuirea benzilor din spectrele IR pentru extractele analizate sunt prezentate în tabelul 23.

Tabelul 23.

Atribuirea benzilor din spectrele IR pentru extracte

Extractul	Banda caracteristică (cm ⁻¹)	Atribuirea benzii
Extract etanolic din fructe de <i>Vaccinium myrtillus</i> (afine)	724; 1026; 1378; 1460; 1560; 1660; 2320; 2924; 3068	δ_{C-H} V _{C-O} δ_{CH_2} δ_{C-H} V _{C=O} VO-H intermolecular
Extract etanolic din fructe de <i>Vaccinium vitis-idaea</i> (merișoare)	956; 1028; 1264; 1452; 1560; 1660; 2320; 2948; 3040; 3408	δ_{C-H} V _{C-O} V _{C-OH} fenolic δ_{C-H} V _{C=O} VO-H intermolecular

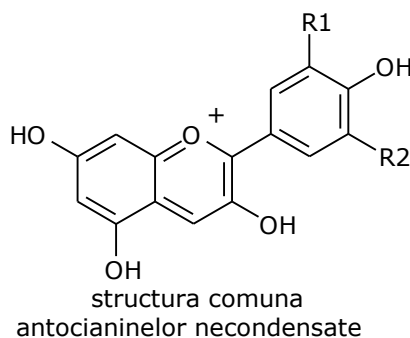
S-au analizat extractele alcoolice din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* obținute conform paragrafului II.2.2.2.1.

III.1.4.2. **Identificarea antocianinelor prin spectrometrie de masă**

Datorită complexității plantelor și alimentelor (fructe, legume etc.), pentru analiza pigmentilor prezenți, cel mai des se folosesc tehnicile de separare. Metodele tradiționale de determinare a compușilor fenolici din fructe se referă la măsurarea fenolilor totali datorită asociației lor cu reacțiile de îmbrunare. Deoarece nevoia de identificare a compușilor fenolici a fost tot mai evidentă, aceste reacții bazate pe metode colorimetrice au fost înlocuite de analizele HPLC. Detecția în cadrul acestor analize se bazează de obicei pe absorbția în UV sau VIS la diverse lungimi de undă caracteristice claselor de compuși fenolici. Alte metode de detecție precum spectrometria de masă a fost dezvoltată și utilizată într-un număr mare de analize. Datele spectrale confirmă greutatea moleculară și furnizează informații structurale pentru compușii prezenți.

Spectrometria de masă a fost folosită pentru monitorizarea pigmentilor antocianici prezenți în fructele de pădure. Tehnica de lucru utilizată în obținerea spectrelor de masă a fost ionizarea prin electrospray. Atribuirea picurilor de masă în spectrele extractelor E5 (alcoolice) din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* obținute conform metodologiei descrisă la paragraful II.2.2.2.1. este prezentată în continuare.

În figura 46 este prezentată structura celor mai comuni agliconi întâlniți în fructele de pădure [194, 278].



Antocianină	R1	R2	Masa exactă calculată
Malvidină	OCH ₃	OCH ₃	331,08
Petunidină	OCH ₃	OH	317,07
Peonidină	OCH ₃	H	301,07
Pelargonidină	H	H	271,06
Cianidină	OH	H	287,06
Delfinidină	OH	OH	303,05

Figura 46. - Structura celor mai comuni agliconi

În figura 47 este prezentat spectrul de masă (+)MS înregistrat pentru extractul din fructe de *Vaccinium myrtillus*.

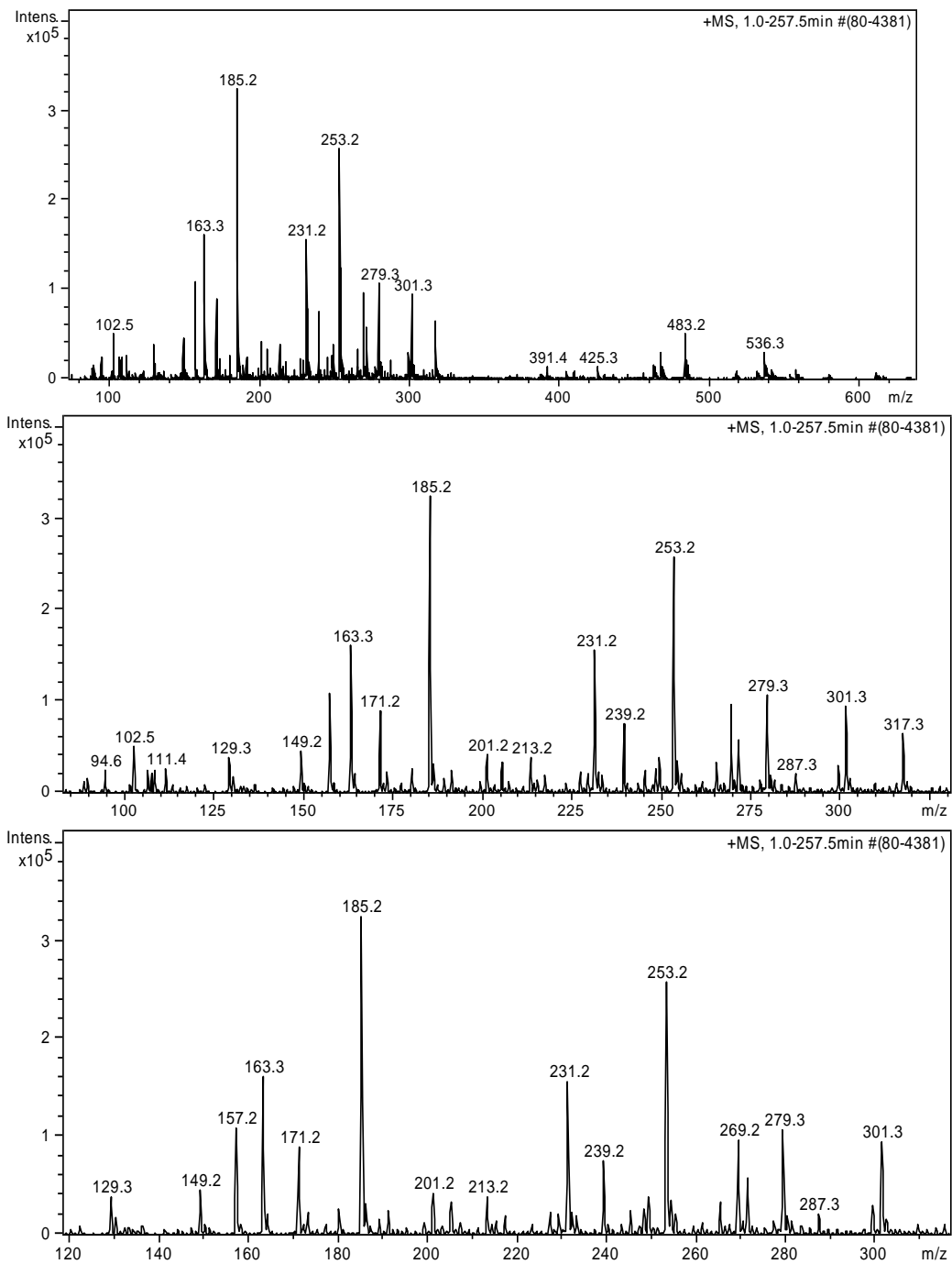
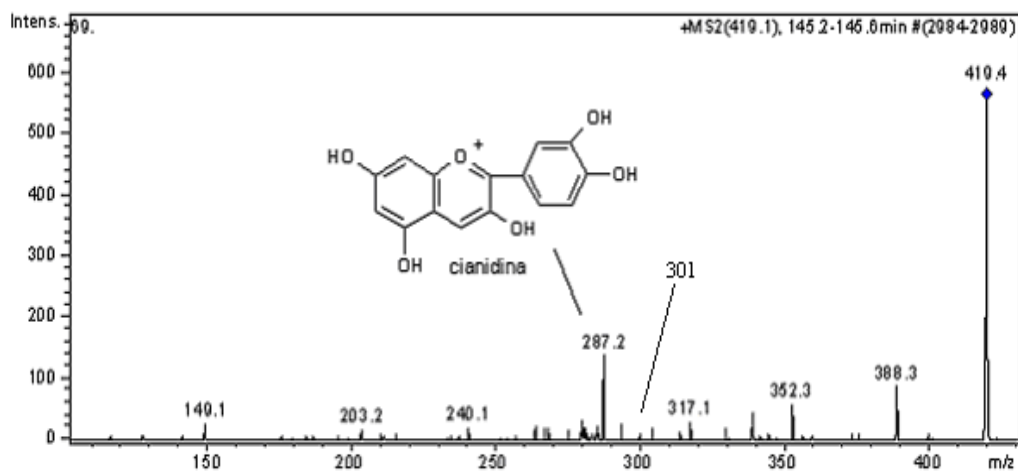


Figura 47. - Spectrul de masă (+)MS al extractului din fructe de *Vaccinium myrtillus*

Prin înregistrarea spectrului de masă al extractului din fructe de *Vaccinium myrtillus* s-au obținut mai multe picuri de intensități diferite. Acestea au fost analizate și identificate continuu prin spectrometrie de masă. Din figura 43 se observă prezența în extractul analizat a trei agliconi antocianici: petunidină ($m/z=317,3$), peonidină ($m/z=301,3$) și cianidină ($m/z=287,3$).

Pentru a identifica scheletul antocianic s-a recurs la izolarea ionului molecular dorit, fragmentarea acestuia, urmată apoi de izolări și fragmentări succesive ale altor ioni prezenți în spectrele de fragmentare. Antocianidinele substituite cu grupări OH (de exemplu pelargonidina, cianidina, delfinidina, etc.) pot avea pierderi de masă $\Delta m/z=18$ (apă) și $\Delta m/z=28$ unități (gruparea carbonil CO), iar cele substituite cu grupări metoxi pot prezenta pierderi de $\Delta m/z=15$ (radical metil). De asemenea în timpul fragmentării antocianinelor comune se observă ca un proces general scindarea hexozei dehidratată $\Delta m/z=162$ [194, 278].

Urmărind fragmentarea (+)MS2 a ionului molecular cu $m/z=419$ și a ionului molecular $m/z=449$ se poate demonstra că aceștia pot fi derivați de cianidină. Astfel, ionul molecular de la $m/z=419$ poate fi atribuit antocianinei cianidin 3-xiloza, ce se obține prin fragmentarea (+)MS2 a ionului molecular cu $m/z=449$ prin pierdere de 30 unități de masă de la zahar. Ionul molecular cu $m/z=449$ poate fi de asemenea un derivat de cianidină de tip cianidin-3-hexoză care prin pierderea unei molecule de hexoză dehidratată ($\Delta m/z=162$) duce la formarea cianidinei ($449-162=287$). Ionul molecular cu $m/z=449$ ar putea fi de asemenea un derivat de delfinidină sau petunidină care prin fragmentare poate să ducă la formarea de molecule mai mici (figura 48).



Agliconul peonidină apare ca fragment al ionului molecular de la $m/z=505$ și este pus în evidență în spectrul (+)MS2 al acestuia. Structura corespunzătoare ionului molecular cu $m/z=505$ poate fi peonidin-6-acetil-3-glucozida (figura 50).

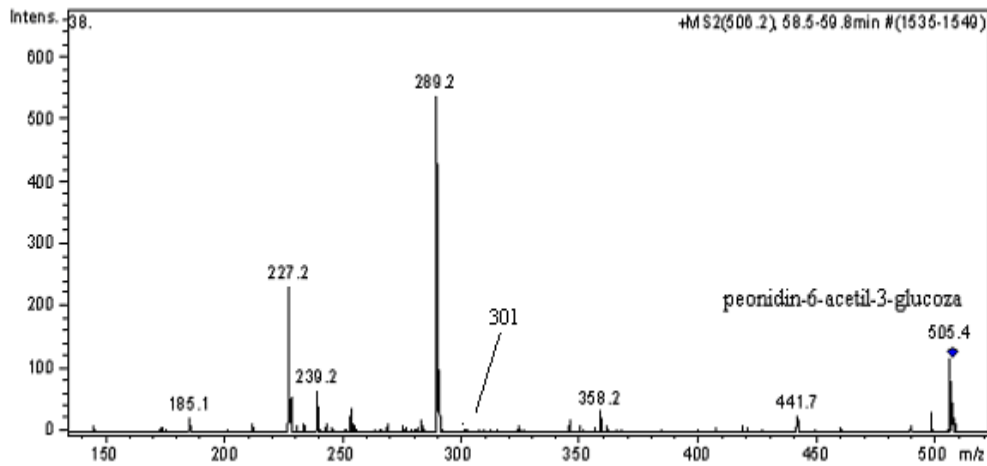
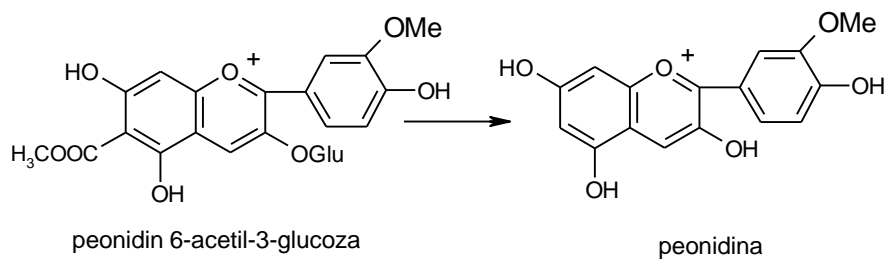


Figura 50. - Spectrul de masă (+)MS2 al ionului molecular $m/z=505$

Atribuirea picurilor de masă în spectrul (+)MS2 ($m/z=505$):



Prezența agliconului petunidină sub formă de petunidin-3-rutinozida ($m/z=625$) este evidențiată în figura 51.

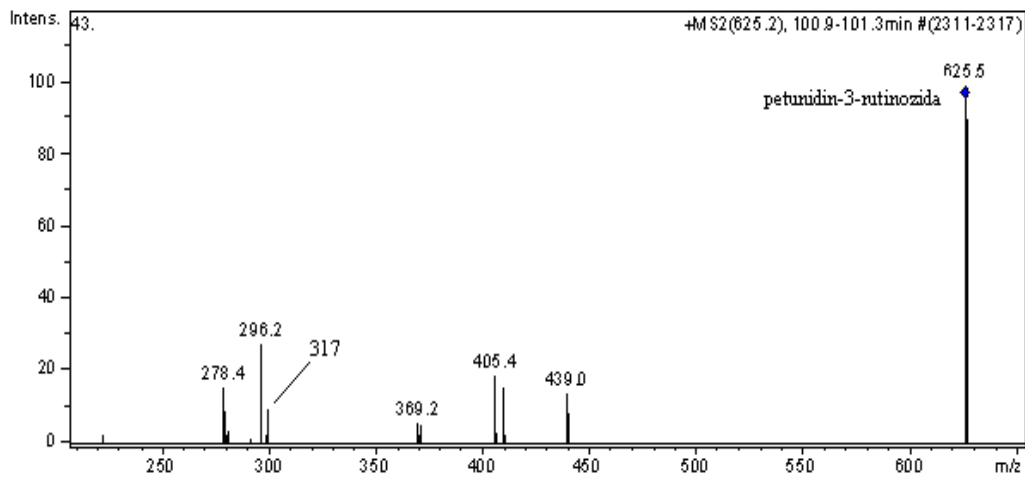
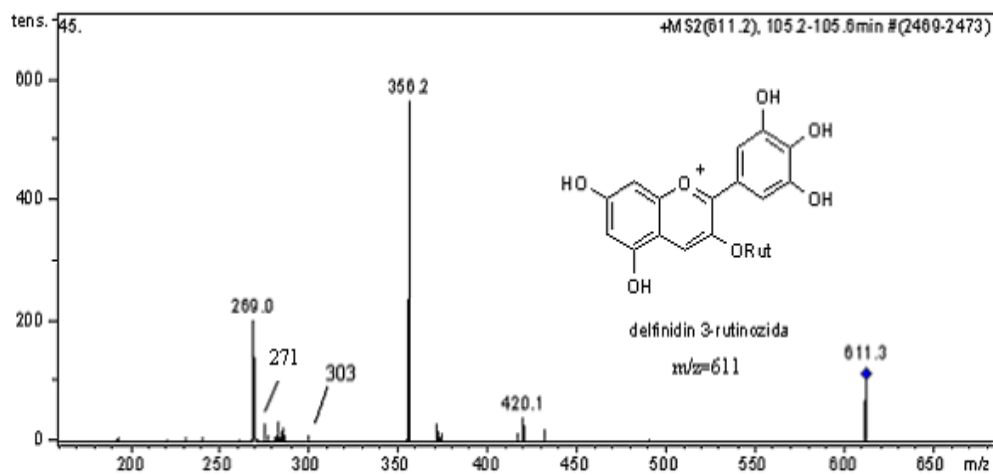


Figura 51. - Spectrul de masă (+)MS2 al ionului molecular $m/z=625$

Din spectrul de masă (+)MS2 al ionului molecular $m/z=611$ ce poate fi atribuit delfinidin-3-rutinozidei se remarcă prezența delfinidinei. Ionul molecular $m/z=611$ poate fi atribuit de asemenea și cianidin 3,5-diglucozidei. Prin fragmentarea (+)MS3 a ionului molecular $m/z=356$ provenit din $m/z=611$, se poate evidenția și prezența pelargonidinei la $m/z=271$, care este de fapt cianidină dehidratată.



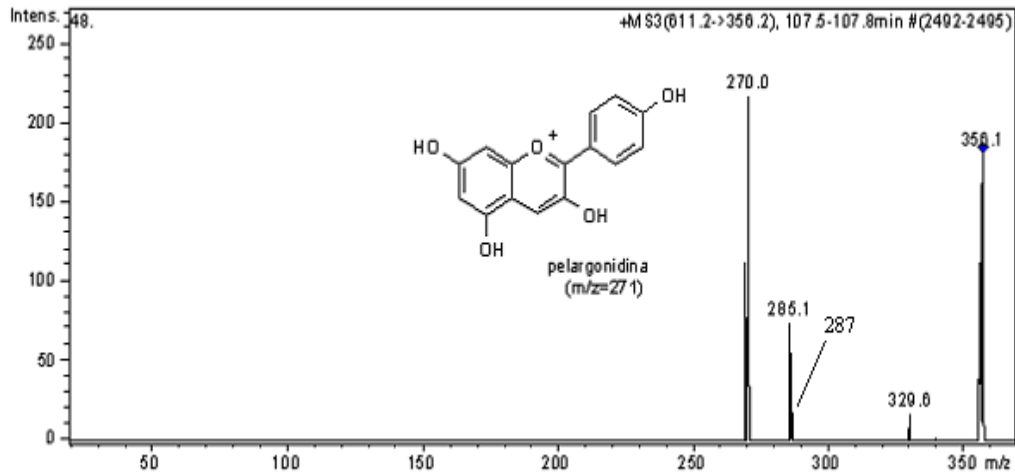
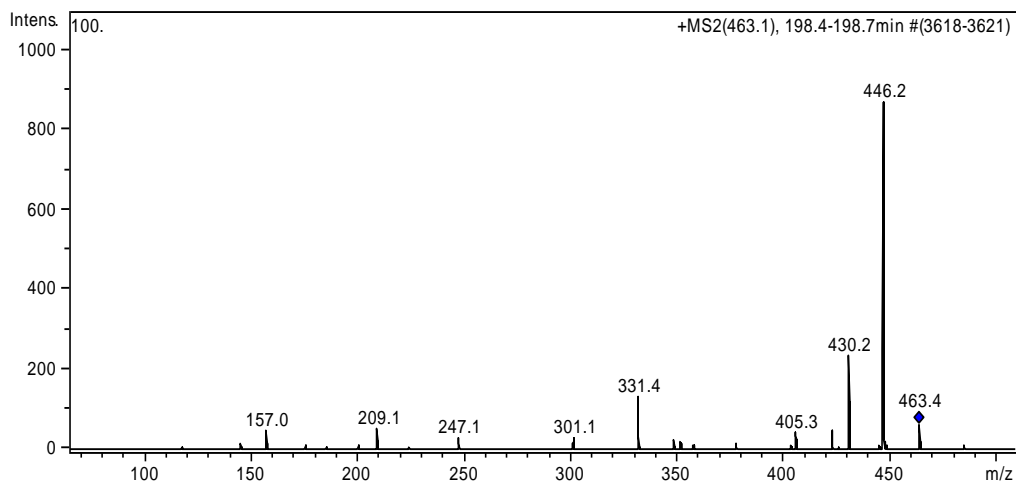


Figura 52. - Spectrul de masă (+)MS2 al ionului molecular $m/z=611$ și spectrul de masă (+)MS3 al ionului precursor $m/z=356$ provenit din ionul molecular $m/z=611$

În spectrul (+)MS2 a ionului molecular $m/z=463$ unul dintre fragmente apare la $m/z=331$, masă ce corespunde malvidinei, și deci ionul molecular $m/z=463$ poate fi atribuit unui derivat de malvidină, malvidin 3-arabinoza (figura 53). Ionul molecular $m/z=463$ poate fi de asemenea atribuit și peonidin 3-galactozidei care prin pierderea hexozei formează antocianidina peonidină.



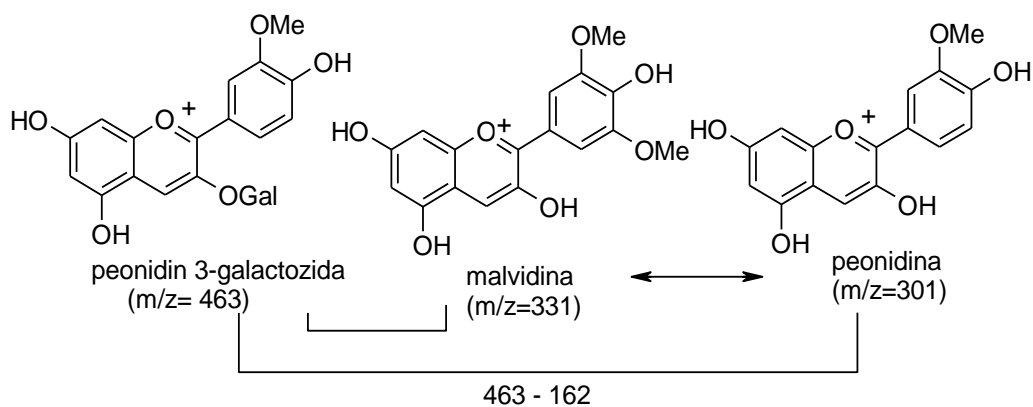


Figura 53. - Spectrul de masă (+)MS² al ionului molecular m/z=463 și atribuirea fragmentelor

În figura 54 este prezentat spectrul de masă (+)MS al extractului din fructe de *Vaccinium vitis-idaea*, iar în tabelul 24 este prezentat profilul antocianic al extractului.

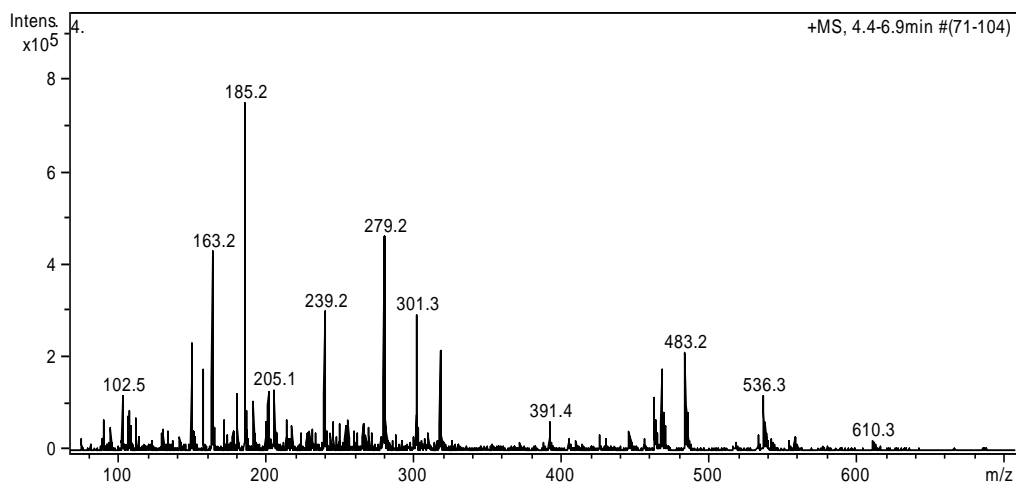
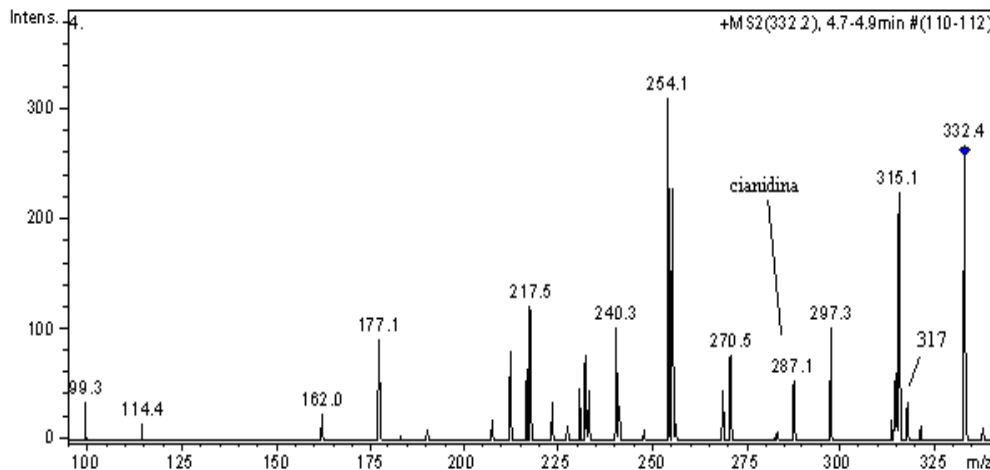


Figura 54. - Spectrul de masă (+)MSⁿ al extractului din fructe de *Vaccinium vitis-idaea*

Tabelul 24.*Profilul antocianic al extractului din fructe de Vaccinium vitis-idaea*

Nr. Picului	Compusul	Ionul molecular (m/z)	Fragmentul (m/z)
180	Cianidină	287,2	-
191	Peonidină	301,3	-
193	Delfinidină	303,3	-
206	Petunidină	317,3	-
218	Malvidină	331,3	-
273	Cianidin 3-xilozida	419,5	287
282	Peonidin 3-arabinozida	433,4	301
283	Delfinidin 3-arabinozida	435,3	303
291	Cianidin 3-glucozida	449,3	287
	Petunidin 3-arabinozida	449,3	317
299	Malvidin 3-arabinozida	463,3	331
301	Delfinidin 3-galactozida	465,3	303
344	Cianidin 3,5-diglucosida	611,3	287

Prin fragmentarea (+)MS2 a ionului molecular cu $m/z=332$ ce poate fi atribuit malvidinei, în urma unei pierderi de masă $\Delta m/z=15$ (radical metil) se observă prezența fragmentului de petunidină ($m/z=317$) în extractul din fructe de *Vaccinium vitis-idaea*, figura 55.

**Figura 55.** - Fragmentarea (+)MS2 a ionului molecular $m/z=332$

Urmărind fragmentarea (+)MS2 a ionului molecular $m/z=611$ și fragmentarea (+)MS3 a ionului molecular precursor, $m/z=356$, se observă prezența pelargonidinei în extractul analizat ($m/z=271$).

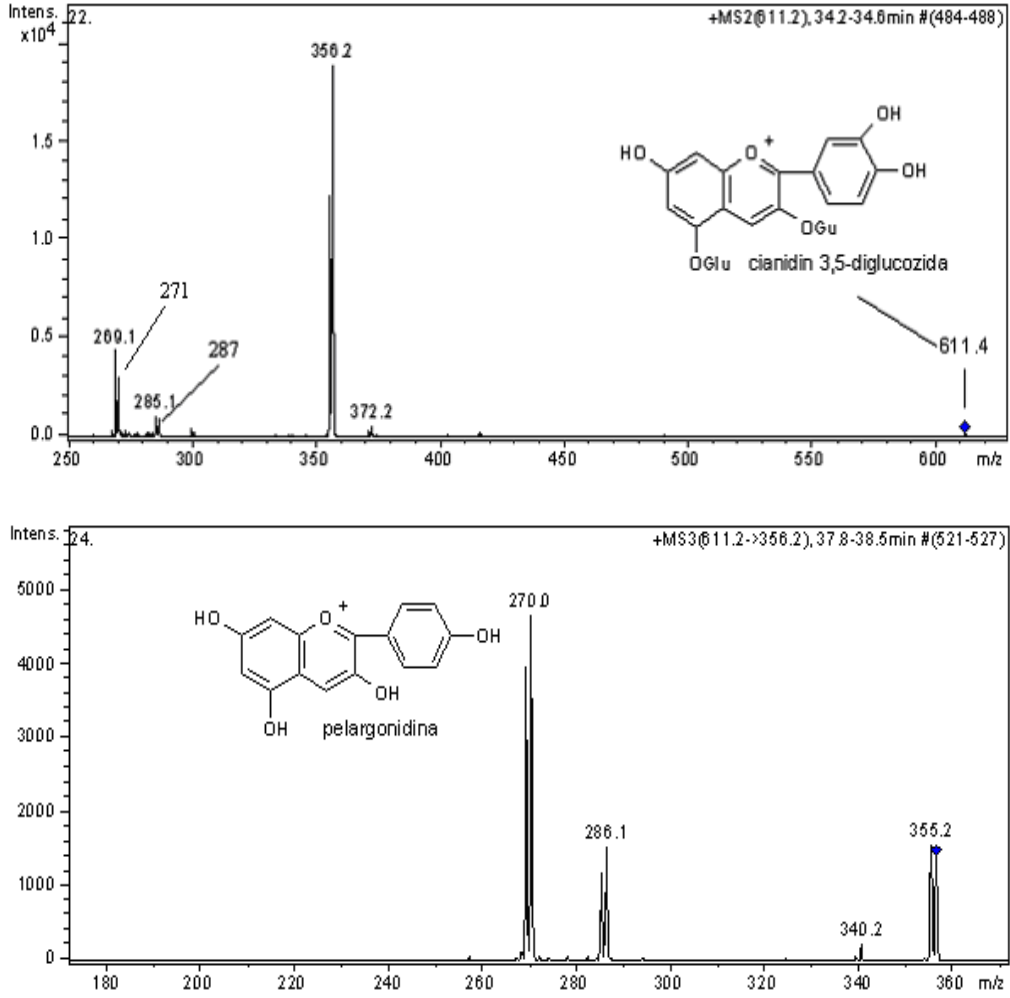
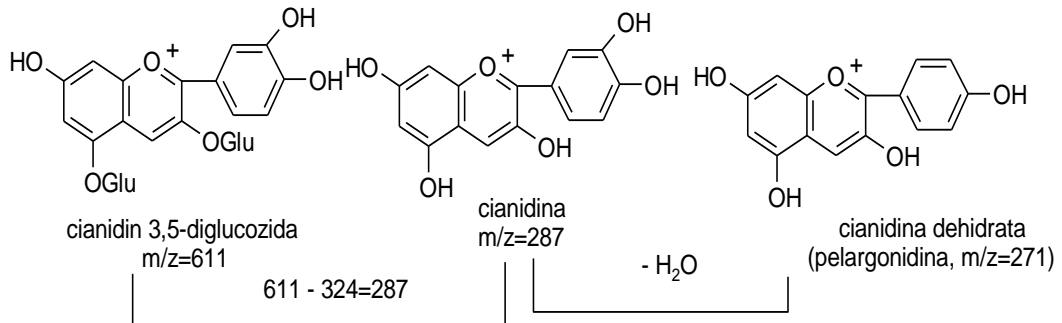


Figura 56. - Fragmentarea (+)MS2 a ionului molecular $m/z=611$, respectiv (+)MS3 a ionului precursor $m/z=356$



Prin fragmentarea (+)MS2 a ionului molecular $m/z=449$ se pot identifica următoarele fragmente (figura 57):

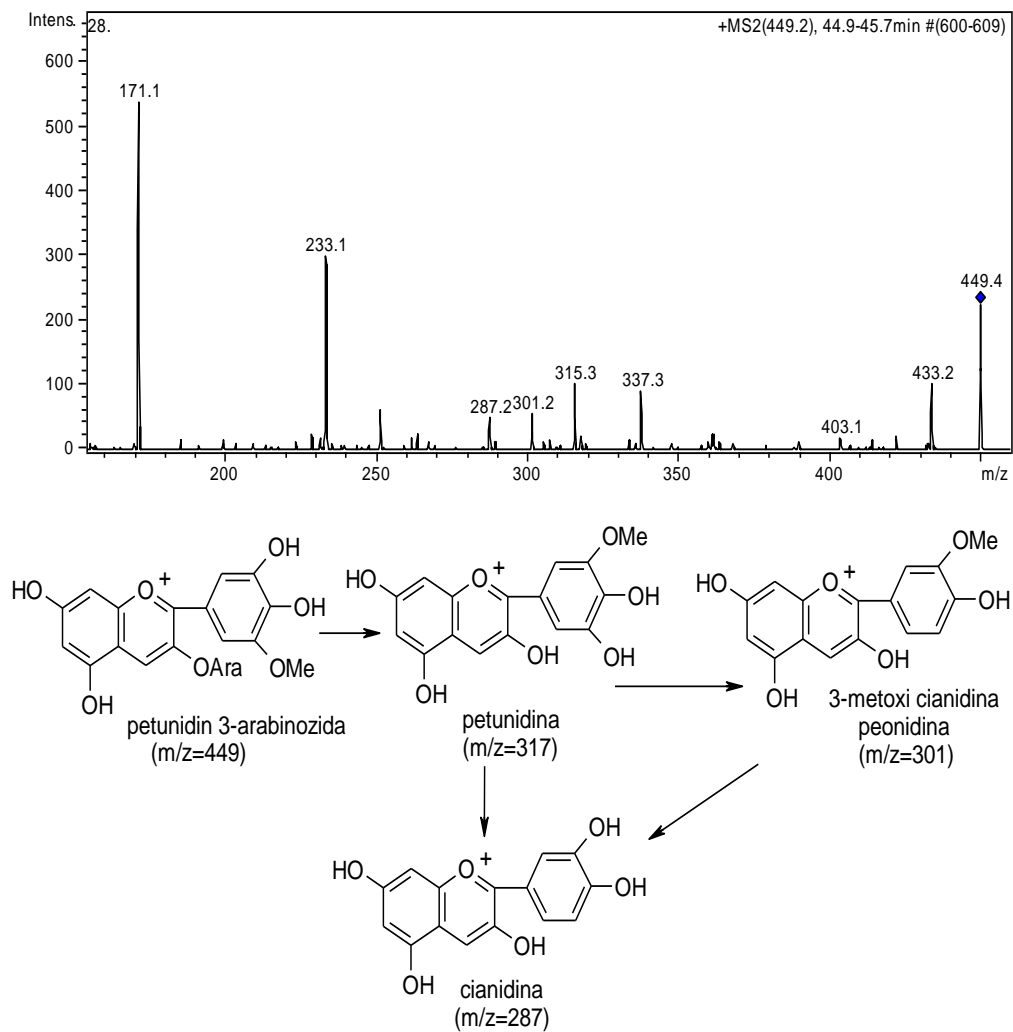


Figura 57. - Fragmentarea (+)MS2 a ionului molecular $m/z=449$

III.1.4.3. Identificarea și dozarea antocianinelor prin spectroscopie UV-VIS

În vederea realizării analizei calitative a antocianinelor în extractele apoase și etanolice din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea*, s-au trasat spectrele UV-VIS ale extractelor (figurile 62-65) și s-au comparat cu spectrele UV-VIS ale standardelor de cianidină, delfinidină, malvidină (figurile 58 – 61).

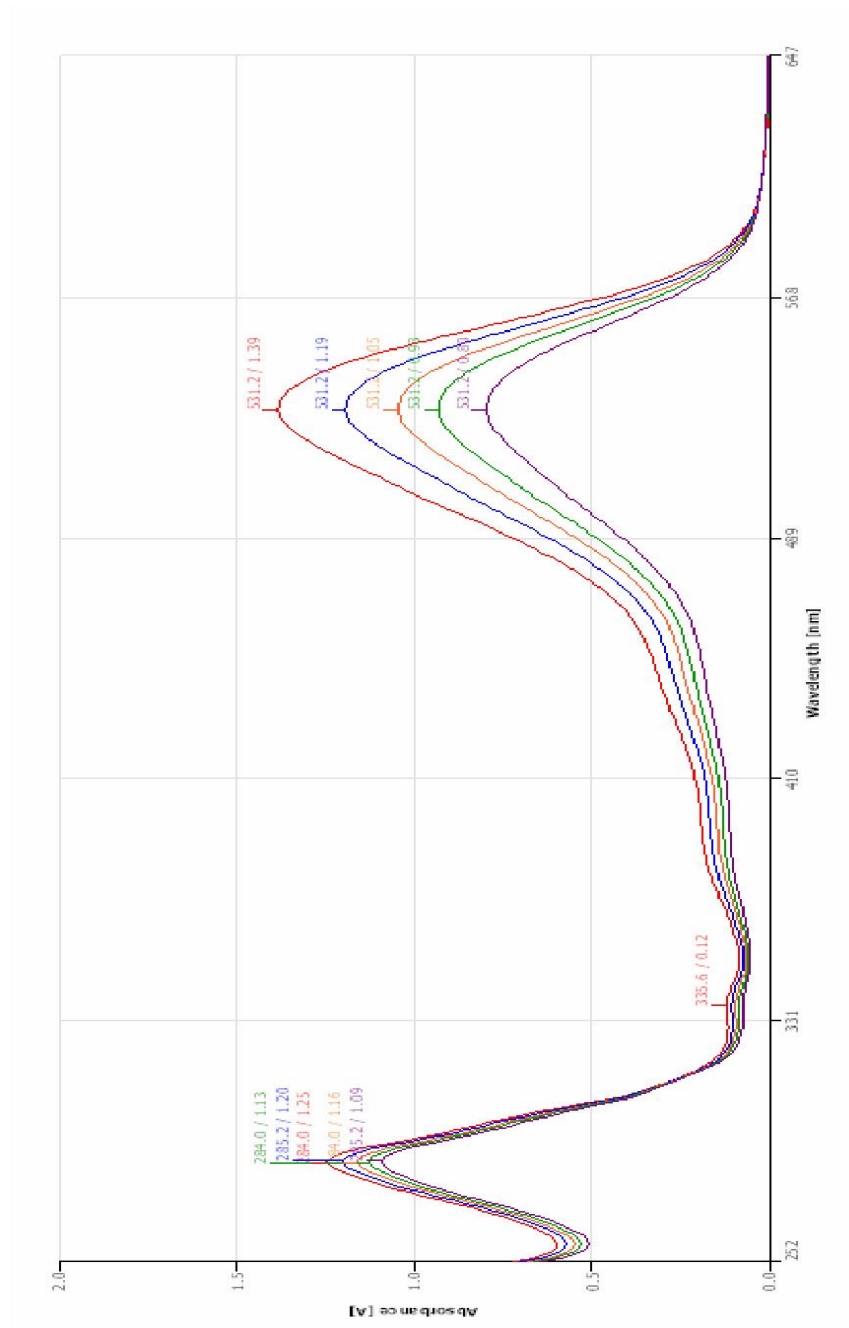


Figura 58. - Spectrul UV-VIS al cianidinei

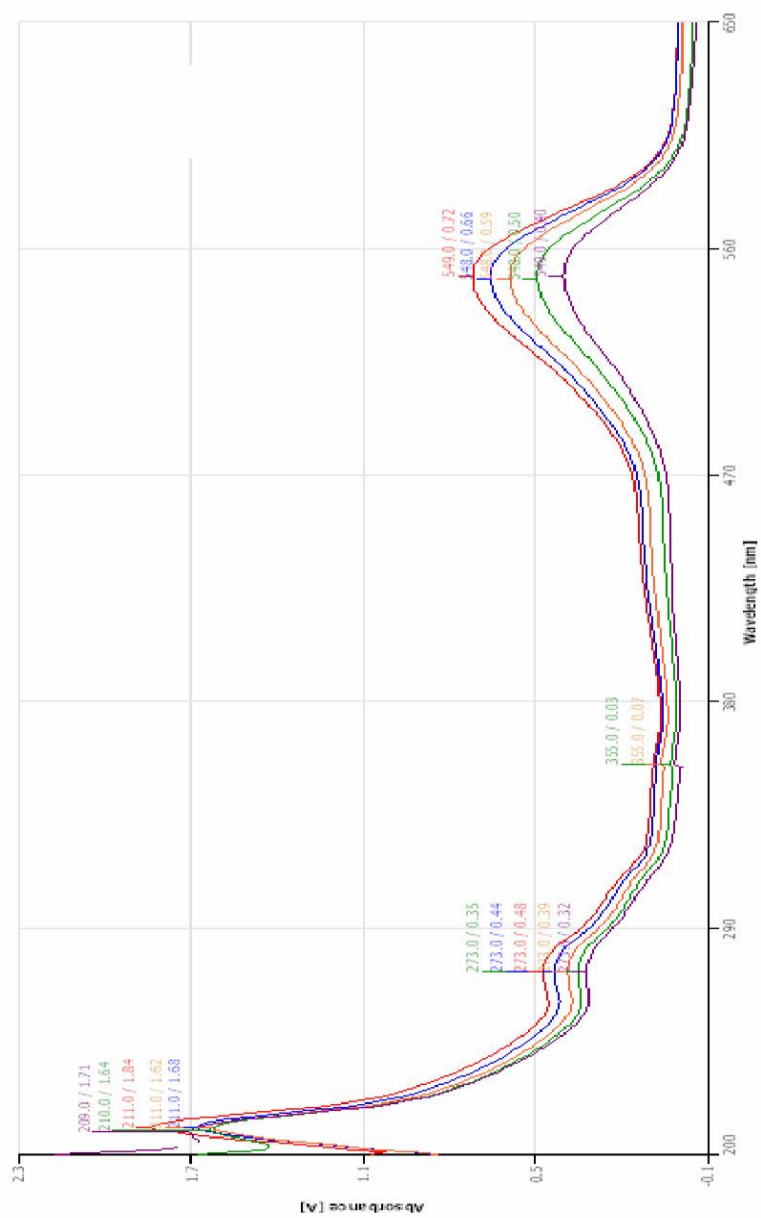


Figura 59. - Spectrul UV-VIS al delphininei

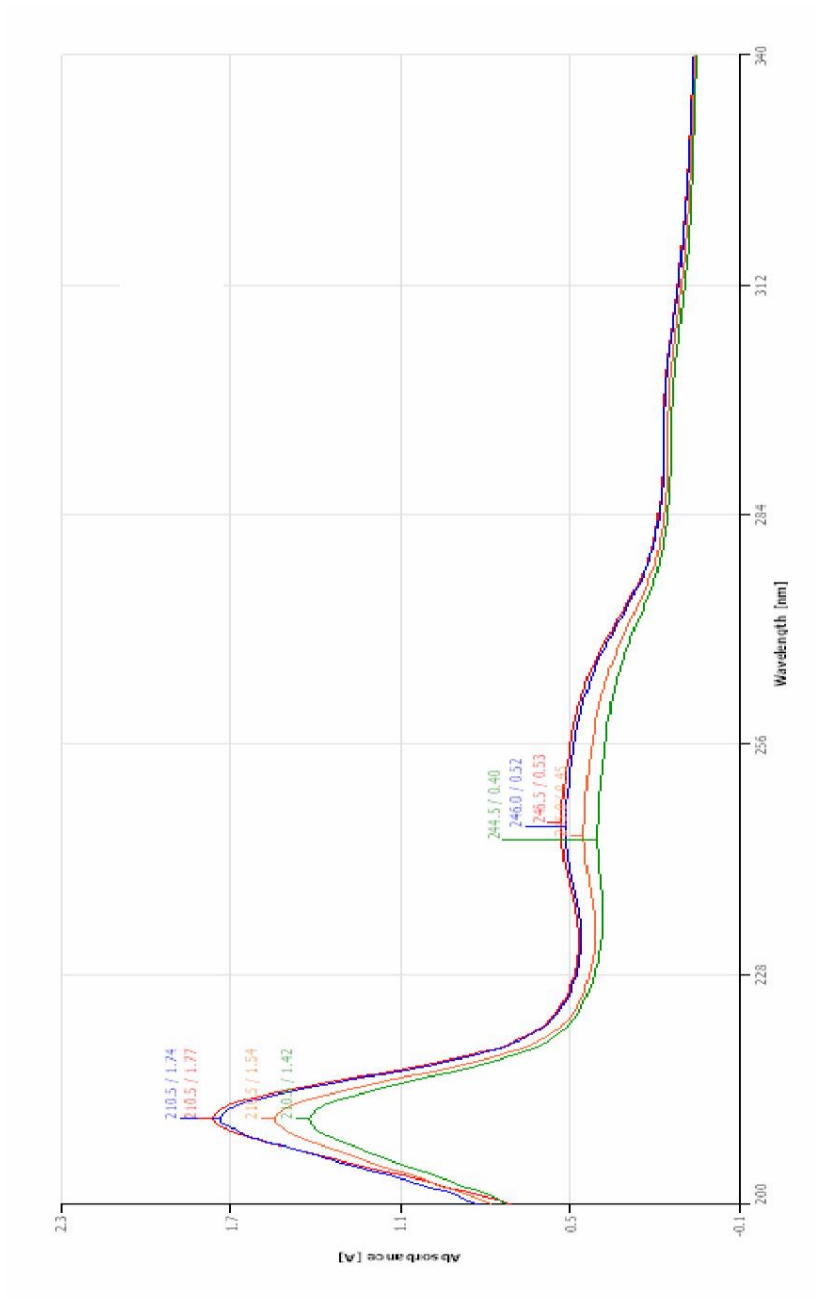


Figura 60. - Spectrul UV al malvidinei

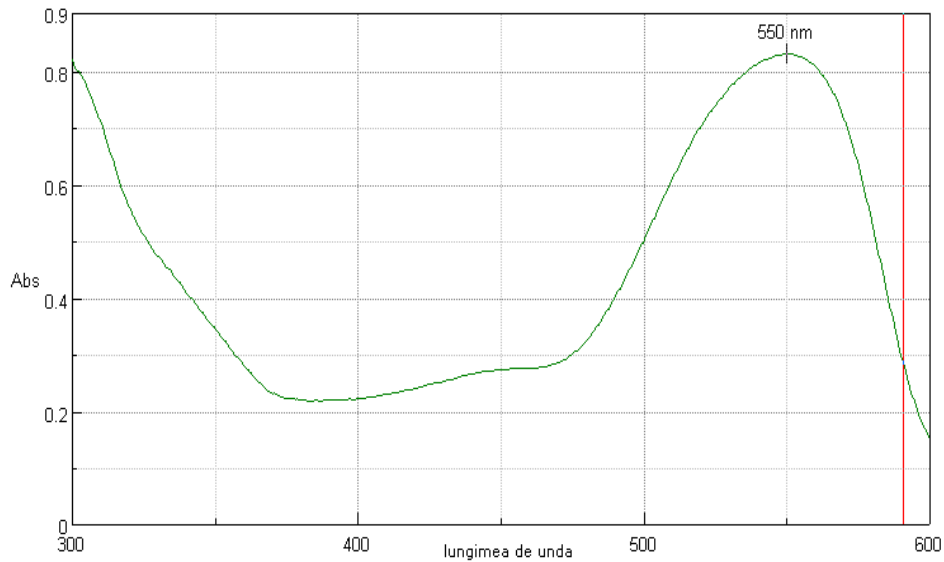


Figura 61. - Spectrul VIS al malvidinei

Conform spectrelor înregistrate, standardele de antocianine (concentrație 0,2 mg/mL) au maximele de absorbție la următoarele lungimi de undă:

Standardul	λ (nm; UV)	λ (nm; VIS)
Cianidină	285	531
Delfinidină	273	549
Malvidină	245	550

Pentru trasarea spectrelor UV-VIS ale extractelor pe intervalul 220-500 nm acestea au fost diluate de 25 de ori (extractul de merișor) respectiv de 45 ori (extractul de afine), iar pentru trasarea spectrelor pe intervalul 500-750 nm extractele etanolice au fost diluate în raport 1:5. Analizând spectrele de absorbție UV-VIS al extractelor obținute (figurile 62-65) se pot observa următoarele:

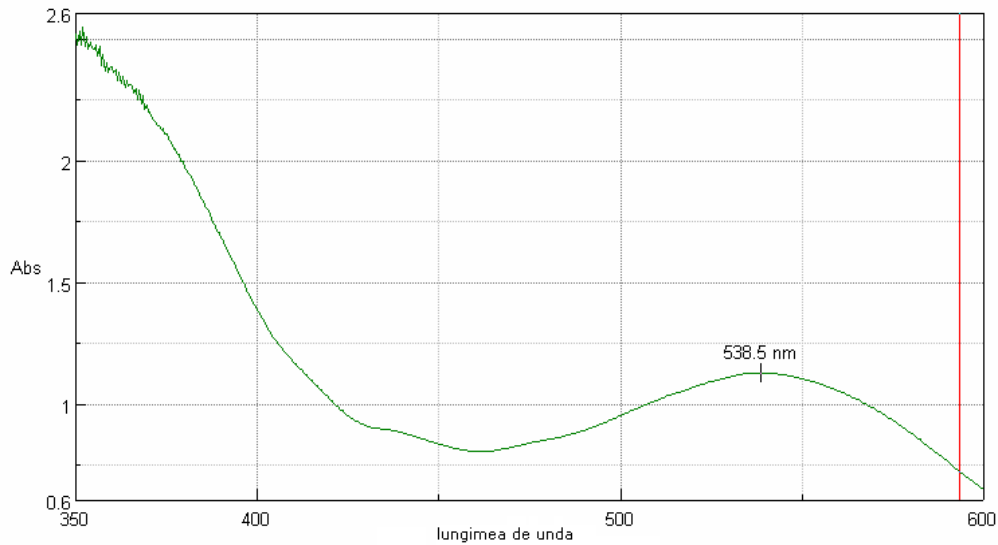


Figura 62. - Spectrul de absorbție în vizibil al extractului etanolic din fructe de *Vaccinium myrtillus*

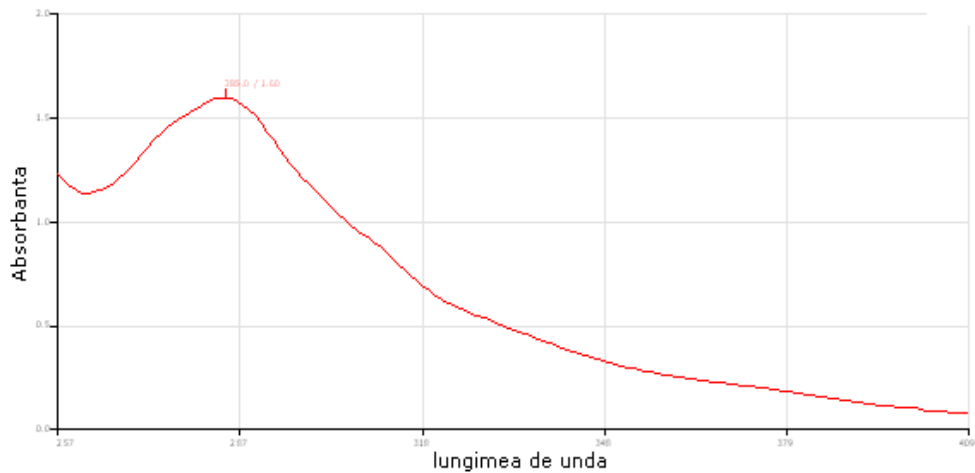


Figura 63. - Spectrul de absorbție în UV al extractului etanolic din fructe de *Vaccinium myrtillus*

- din spectrele UV-VIS ale extractului etanolic din fructe de *Vaccinium myrtillus* se poate observa că acesta prezintă un maxim la lungimea de undă de 536 nm în vizibil, iar în ultraviolet un maxim la 285 nm, maxime asociate prezenței antocianinelor.

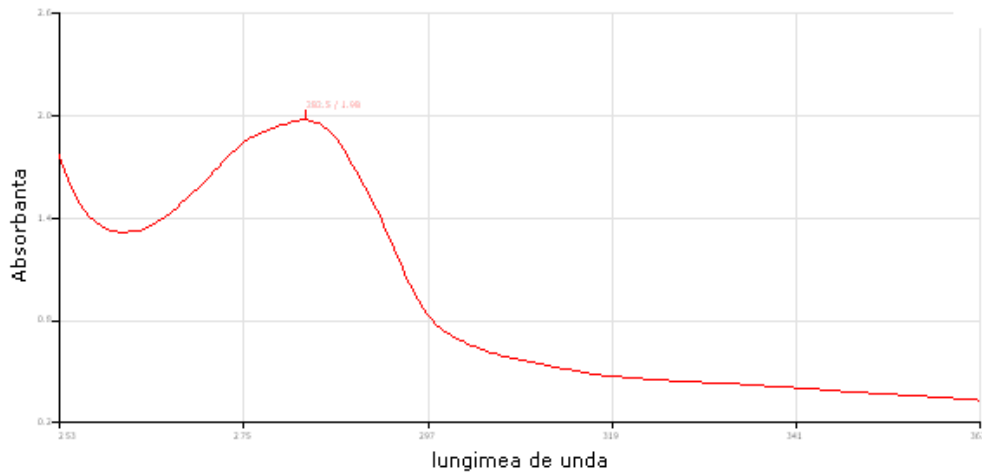


Figura 64. - Spectrul de absorbție în UV al extractului etanolic din fructe de *Vaccinium vitis-idaea*

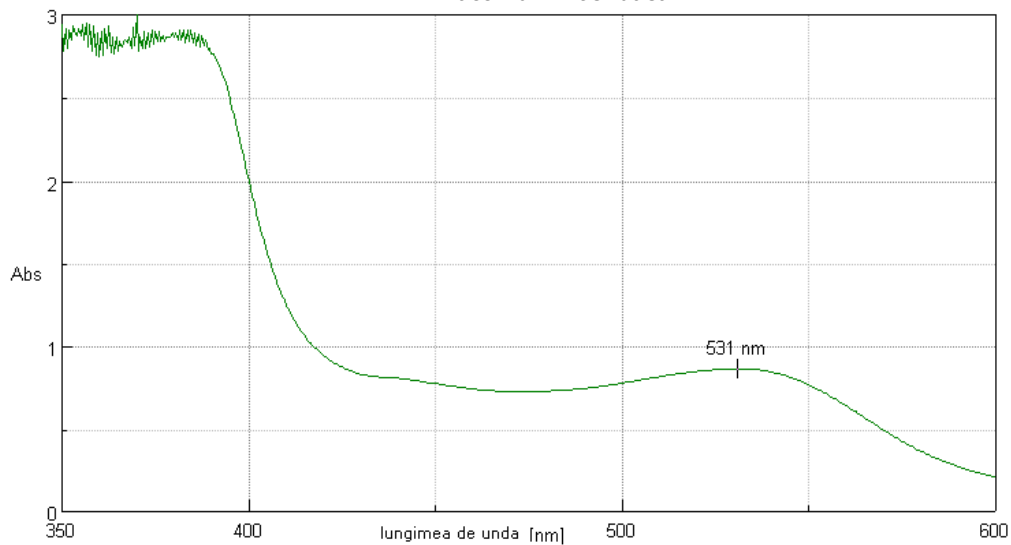


Figura 65. - Spectrul de absorbție în vizibil al extractului etanolic din fructe de *Vaccinium vitis-idaea*

Ca și în cazul extractului din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine), în extractul din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare) este sesizată prezența antocianinelor prin maximele înregistrate: în vizibil la lungimea de undă de 531 nm, respectiv în ultraviolet la lungimea de undă de 282 nm.

Pe baza curbei de etalonare a cianidinei (figura 18, subcapitolul II.3.3.5) s-a calculat cantitatea de antocianine din extractele apoase și alcoolice obținute conform metodologiei descrisă în subcapitolul II.2.2.2.1. Rezultatele obținute sunt redată în tabelul 25.

Tabelul 25.
Cantitatea de antocianine din extractele analizate

Extractul analizat	Cantitatea de antocianine (mg cianidină/mL extract)
Extract apos din fructe de <i>Vaccinium myrtillus</i>	33,88
Extract etanolic din fructe de <i>Vaccinium myrtillus</i>	34,14
Extract apos din fructe de <i>Vaccinium vitis-idaea</i>	32,20
Extract etanolic din fructe de <i>Vaccinium vitis-idaea</i>	33,09

Din rezultele obținute se observă că, alcoolul etilic extrage cel mai bine pigmentii antocianici din fructe. Cel mai mare conținut în antocianine, exprimat cantitativ ca mg cianidină/mL extract se găsește în extractul etanolic din fructe de *Vaccinium myrtillus*.

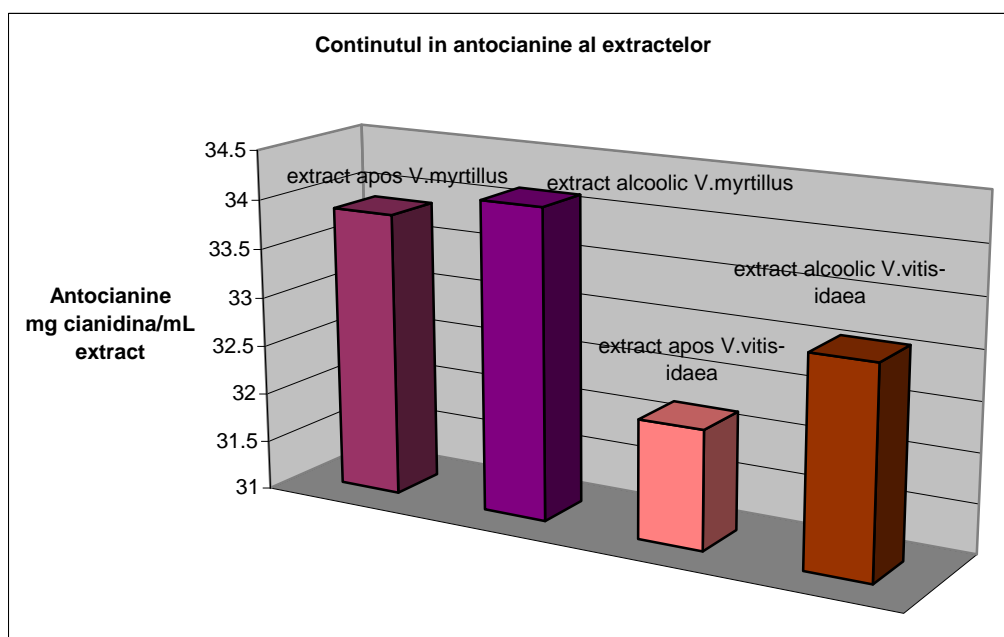


Figura 66. - Conținutul în antocianine al extractelor analizate

Conținutul total de antocianine pentru fructele recoltate în ani diferiți s-a determinat prin tehnica indicată de Markakis [99]. Rezultatele obținute sunt redată în tabelul 26.

Tabelul 26.

Conținutul total de antocianine pentru fructele recoltate în ani diferiți

Produs vegetal	Absorbanță , 535 nm	Factor de diluție, d [mL]	Antocianine (mg cianidină/100 g fructe)
Fructe de <i>Vaccinium myrtillus</i> 2005	1,559	35	555,6
Fructe de <i>Vaccinium myrtillus</i> 2006	1,515	35	539,9
Fructe de <i>Vaccinium vitis-idaea</i> 2005	1,415	15	216,1
Fructe de <i>Vaccinium vitis-idaea</i> 2006	1,194	15	182,4

Rezultatele prezentate indică faptul că, cantitatea de antocianine exprimată ca mg cianidină/100 g fructe este mai scăzută pentru fructele culese în anul 2006 (figura 67) atât în cazul afinelor negre (*Vaccinium myrtillus*) cât și în cazul afinelor roșii (*Vaccinium vitis-idaea*).

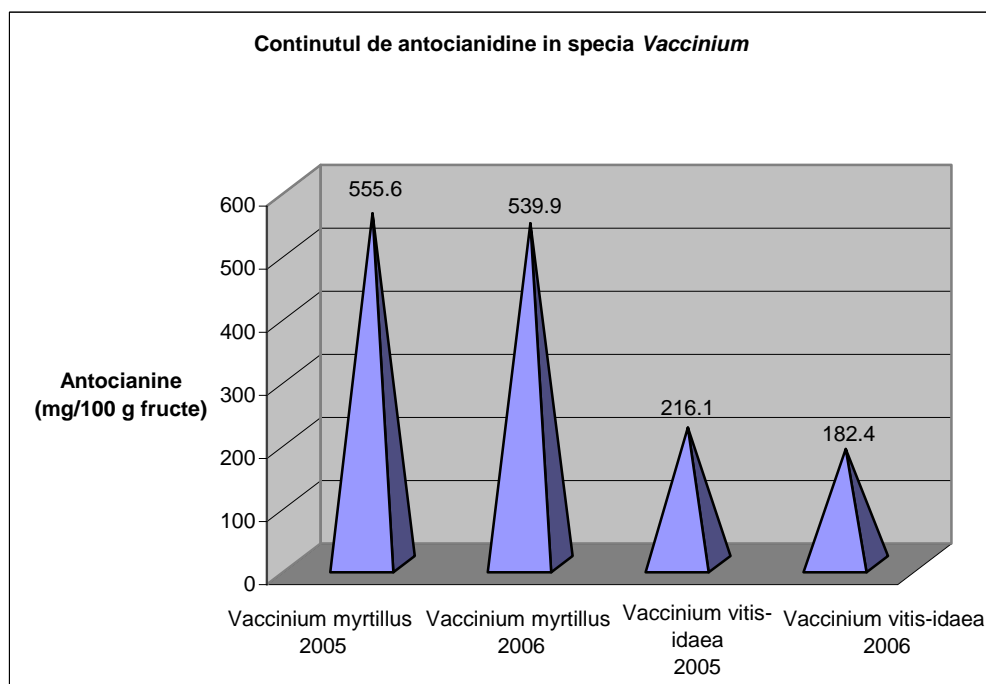


Figura 67. - Variația conținutului în antocianine în speciile *Vaccinium*

Comparând rezultatul obținut cu conținutul în antocianine în jur de 525 mg/100 g produs vegetal pentru fructele de *Vaccinium myrtillus* ca și pentru specii înrudite conform [211], rezultatul obținut de noi este puțin mai mare, fapt ce se poate explica prin condițiile de mediu ale zonei de unde provine materialul vegetal.

III.1.4.4. **Identificarea antocianinelor prin cromatografie de lichide de înaltă performanță**

După cum s-a putut observa și din analiza în UV-VIS a extractelor din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea*, pigmenții flavonoidici (antocianinele în special) sunt prezenți atât în extractele propriu zise cât și în cele purificate.

Identificarea calitativă a pigmenților flavonoidici în extractele purificate pe Sephadex LH-20

Extractele apoase din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* obținute conform metodologiei prezentată în subcapitolul II.2.2.2.1, au fost purificate pe coloană cu Sephadex LH-20 și apoi analizate HPLC în vederea identificării calitative a compușilor flavonoidici. În urma analizei RP-HPLC a extractelor din fructe de pădure purificate pe Sephadex LH-20 s-au obținut cromatogramele prezentate în figurile 69 și 70, și s-a identificat prezența quercetinei numai în extractul din fructe de *Vaccinium myrtillus* (figura 70).

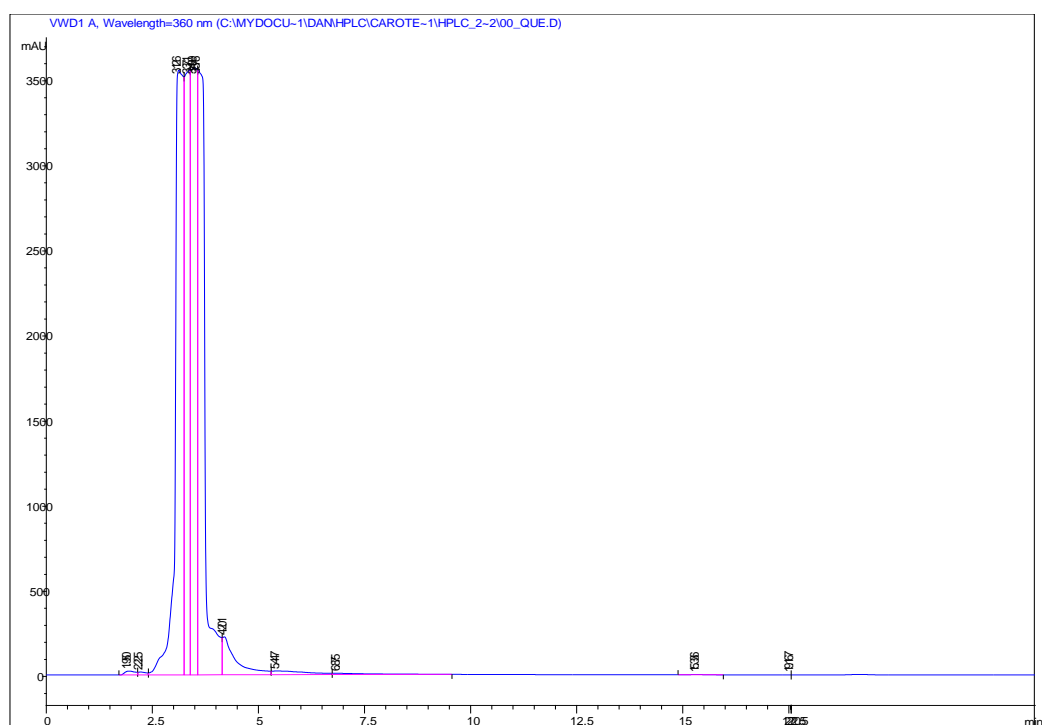


Figura 68. - Cromatograma RP-HPLC a quercetinei

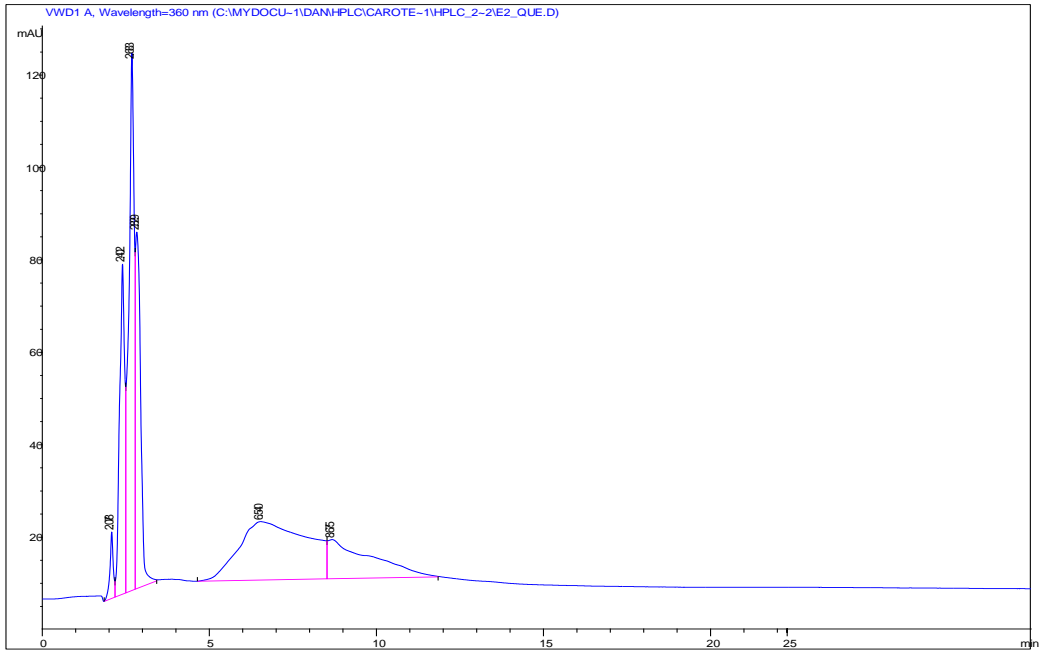


Figura 69. - Cromatograma RP-HPLC a extractului din fructe de *Vaccinium vitis-idaea*

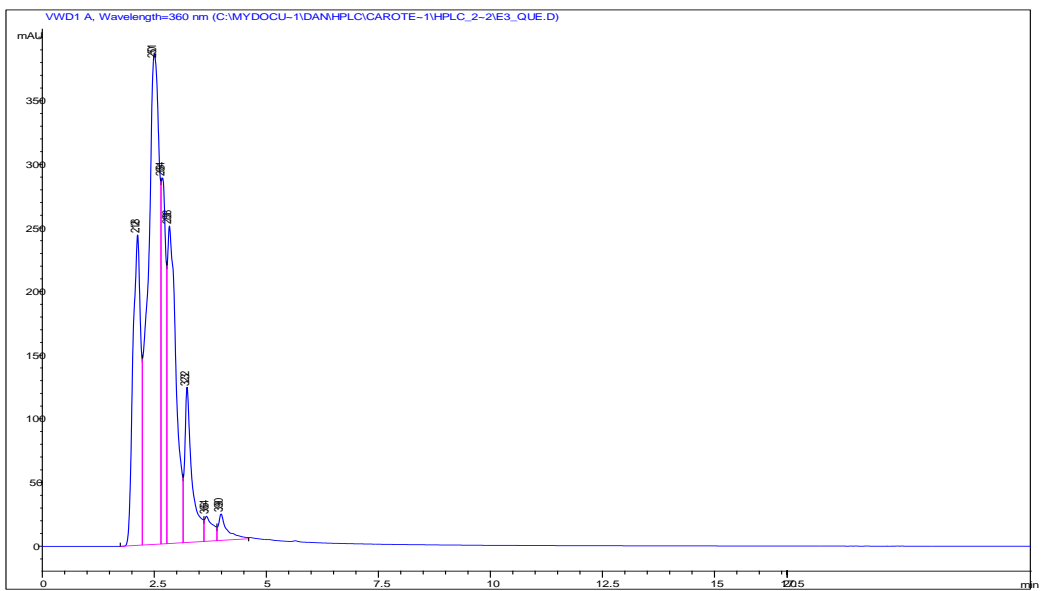


Figura 70. - Cromatograma RP-HPLC a extractului din fructe de *Vaccinium myrtillus*

Identificarea pigmentilor antocianici prin HPLC în extractele din fructe de Vaccinium myrtillus respectiv Vaccinium vitis-idaea purificate pe coloană cu Diaion HP-20SS

Identificarea calitativă a pigmentilor antocianici s-a făcut comparativ cu standardele de antocianine cianidină, delfinidină, malvidină, pe baza timpilor de retenție. Cromatogramele standardelor sunt prezentate în figurile 19, 20, 21 – capitolul II – Partea experimentală.

Standard	$\lambda = 254 \text{ nm}$	$\lambda = 520 \text{ nm}$
	Timp de retenție (min)	Timp de retenție (min)
Cianidină	4,121	15,341 21,452
Delfinidină	4,100	20,034
Malvidină	6,631	18,799

Cromatogramele obținute în urma analizei RP-HPLC (dectecție 520 nm) a fracțiunilor 3, 5, 7 ale extractului din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine) purificat pe coloană cu Diaion HP-20SS, sunt prezentate în figurile 71, 72 și 73.

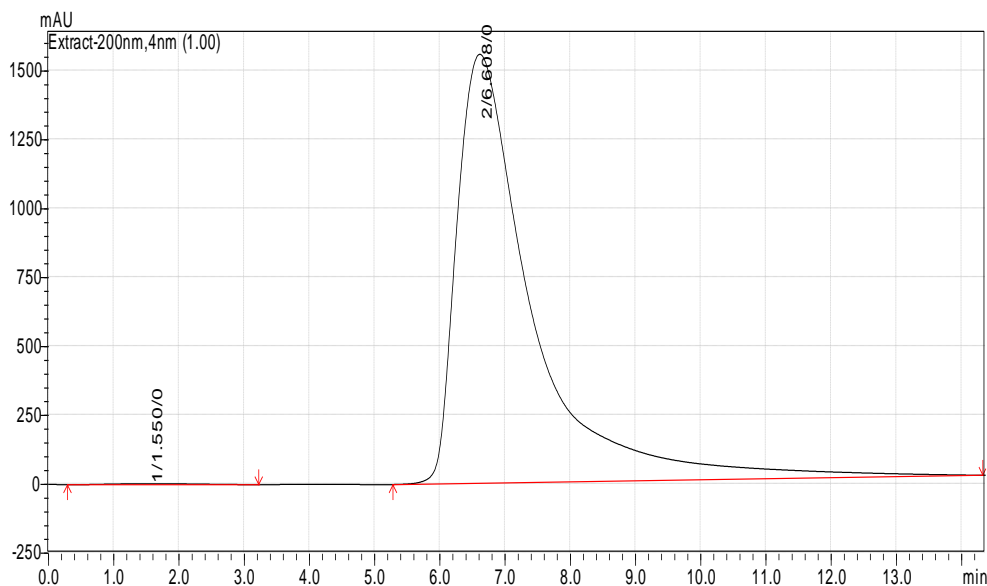


Figura 71. - Cromatograma RP-HPLC a fracțiunii 3

După cum se observă din figura 71, malvidina a fost bine resorbită de umplutura coloanei C18, cu fază inversă, picul obținut fiind bine conturat.

În cazul analizei HPLC a fracțiunii 5 se observă prezența unui alt pic bine conturat la timpul de retenție 4,11 min ce corespunde delfinidinei. În fracțiunea 7 a extractului din fructe de *Vaccinium myrtillus* purificat pe coloană cu Diaion HP-20SS se observă atât prezența malvidinei cât și a delfinidinei.

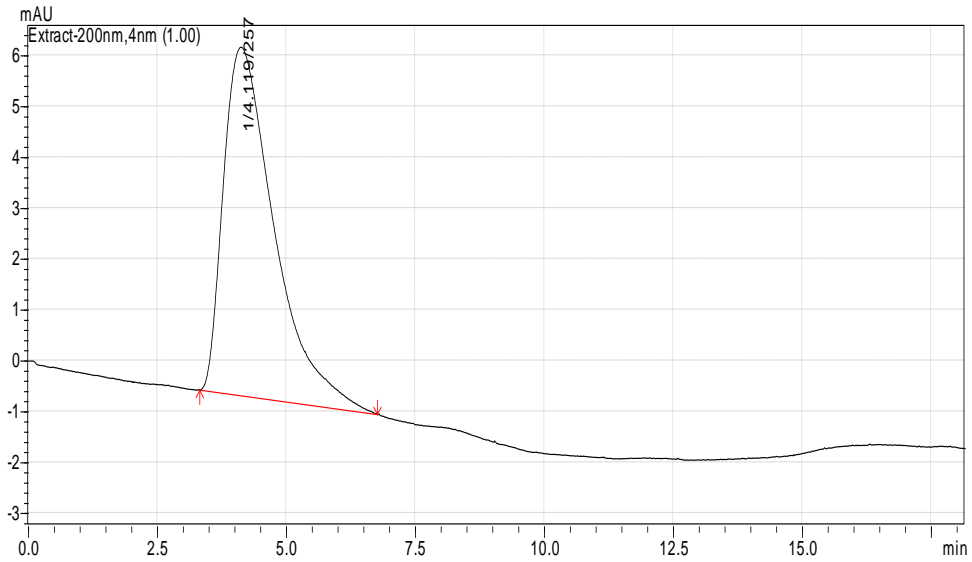


Figura 72. - Cromatograma RP-HPLC a fracțiunii 5

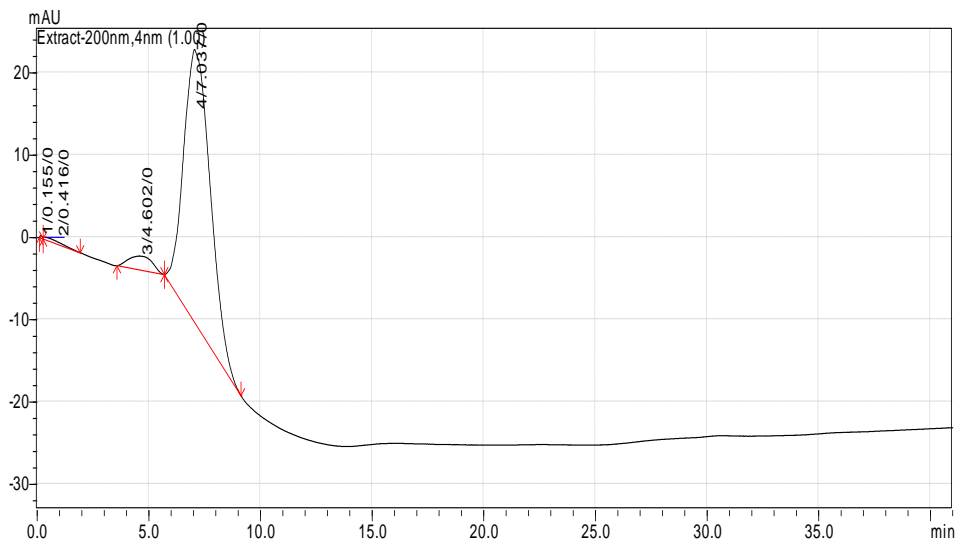


Figura 73. - Cromatograma RP-HPLC a fracțiunii 7

În tabelul 27 sunt prezentate sintetic rezultatele analizei RP-HPLC privind antocianinele prezente în fracțiunile principale.

Tabelul 27.
Prezența antocianinelor în fracțiunile extractului din fructe de *Vaccinium myrtillus* purificat pe Diaion HP-20SS

Extract etanolic din fructe de <i>Vaccinium myrtillus</i> (afine negre)	Agliconul corespunzător antocianinelor	Nr. Frațiuni	Timp de retenție (min)
	Malvidină	3	6,608
	Delfinidină	5	4,110
	Delfinidină	7	4,602
	Malvidină		7,037

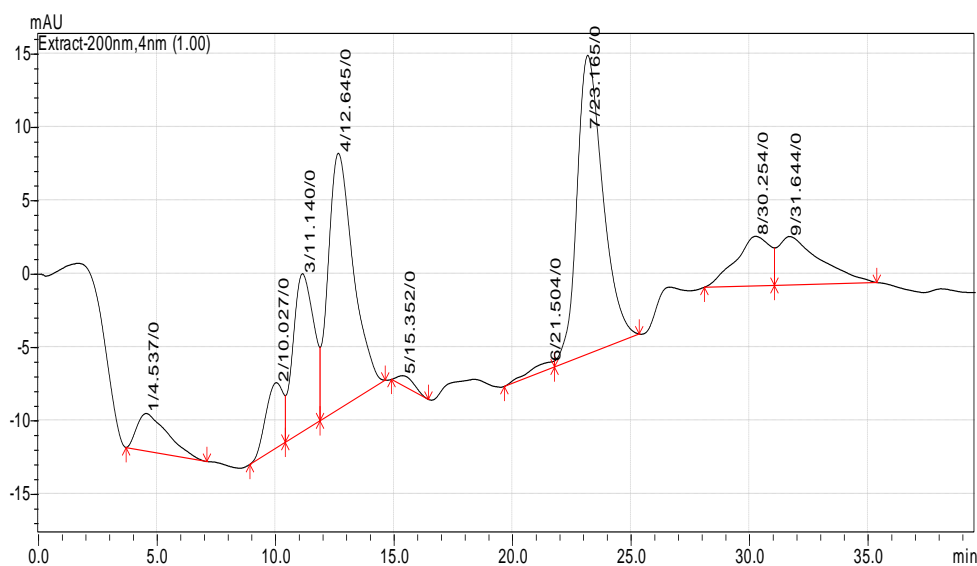


Figura 74. - Cromatograma RP-HPLC a extractului standardizat pentru aplicații practice din fructe de *Vaccinium myrtillus* („extract standard”), detecția 520 nm

În paralel s-a înregistrat cromatograma extractului E5 alcoolic din fructe de *Vaccinium myrtillus* considerat ca „extract standard” pentru aplicații practice. În cromatograma acestuia (figura 74) se observă și prezența cianidinei cu cele două picuri caracteristice la timpii de retenție 15,362 respectiv 21,504. Pe baza datelor din literatură [176] la timpul de retenție 31,644 poate fi identificată prezența petunidinei în extractul din fructe de *Vaccinium myrtillus*.

Cromatogramele rezultate în urma analizei RP-HPLC a extractului din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișor de munte) purificat pe coloană cu Diaion HP-20 SS, sunt reprezentate în figurile 75, 76 și 77.

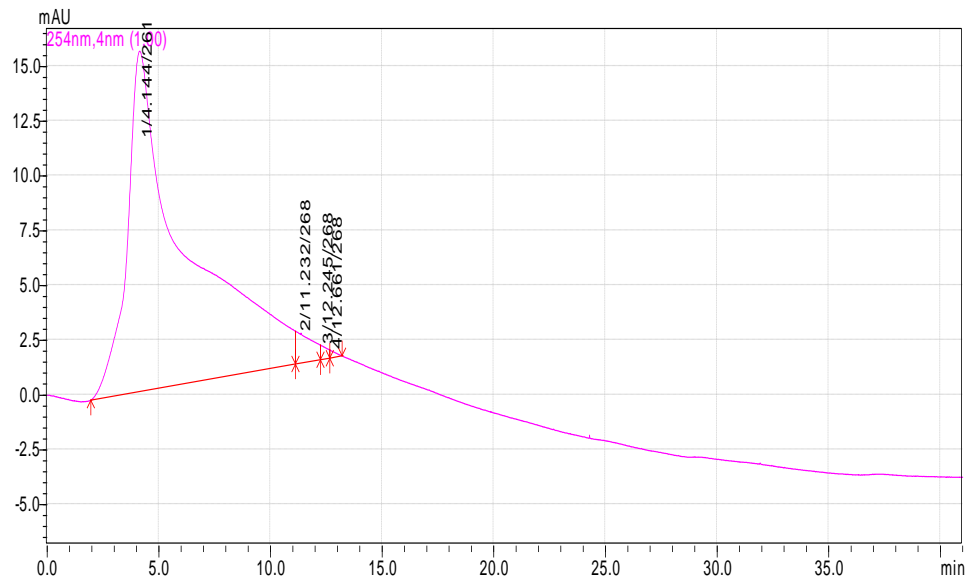


Figura 75. - Cromatograma RP-HPLC a fracțiunii 3

În fracțiunea 3 culeasă la purificarea extractului din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* pe coloană cu Diaion HP-20 SS se observă prezența delfinidinei iar în fracțiune 5 a delfinidinei și cianidinei. Cianidina apare de asemenea și în fracțiunea 7 la timpul de retenție 21,6 min.

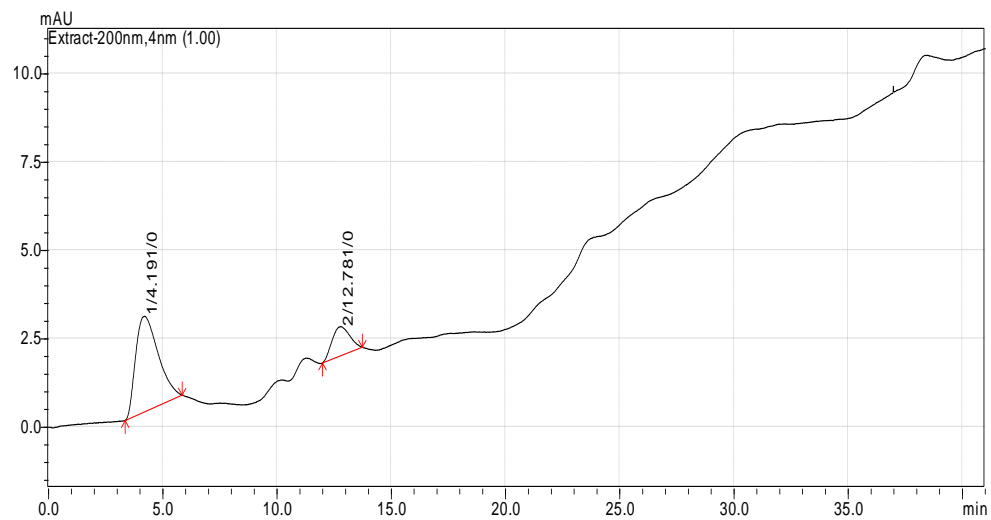


Figura 76. - Cromatograma RP-HPLC a fracțiunii 5

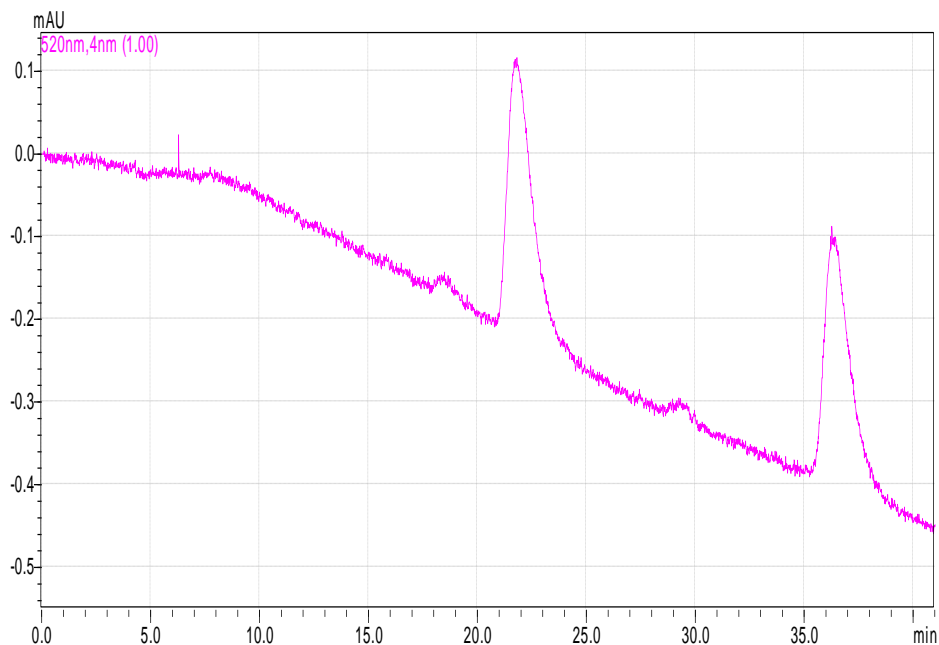


Figura 77. - Cromatograma RP-HPLC a fracțiunii 7

În tabelul 28 sunt prezentate sintetic rezultatele analizei RP-HPLC privind antocianinele prezente în fracțiunile principale

Tabelul 28.

Prezența antocianinelor în fracțiunile extractului din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* purificat pe Diaion HP-20 SS

Extract etanolic din fructe de <i>Vaccinium vitis-idaea</i> (afine roșii)	Agliconul corespunzător antocianinelor	Nr. Frațiuni	Timp de retenție (min)
	Delfinidină	3	4,144
	Delfinidină	5	4,101
	Cianidină		12,781
	Cianidină	7	21,623
	Peonidină		36,347

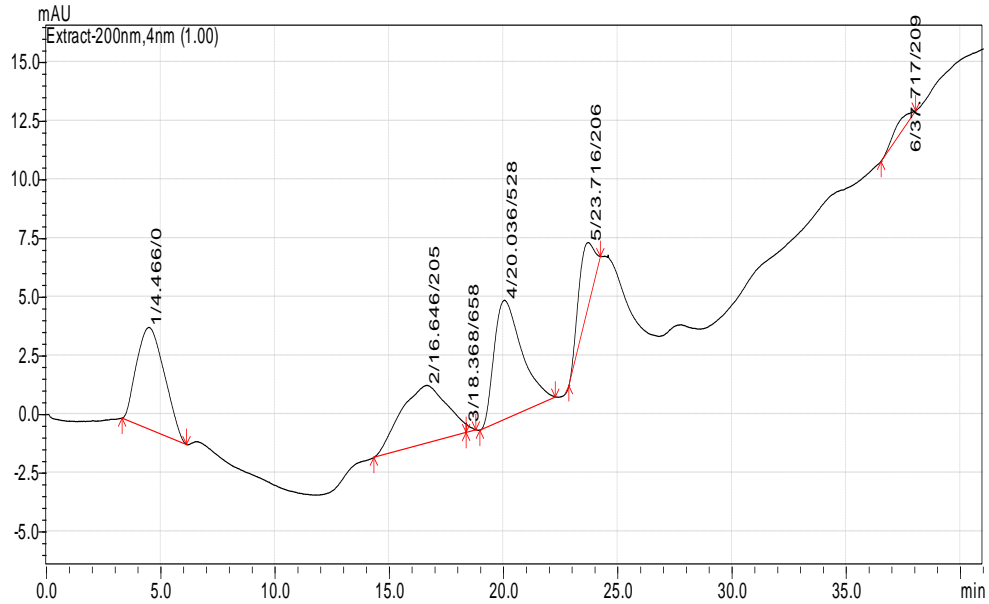


Figura 78. - Cromatograma RP-HPLC a a extractului standardizat pentru aplicații practice din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* („extract standard”), detecția 520 nm

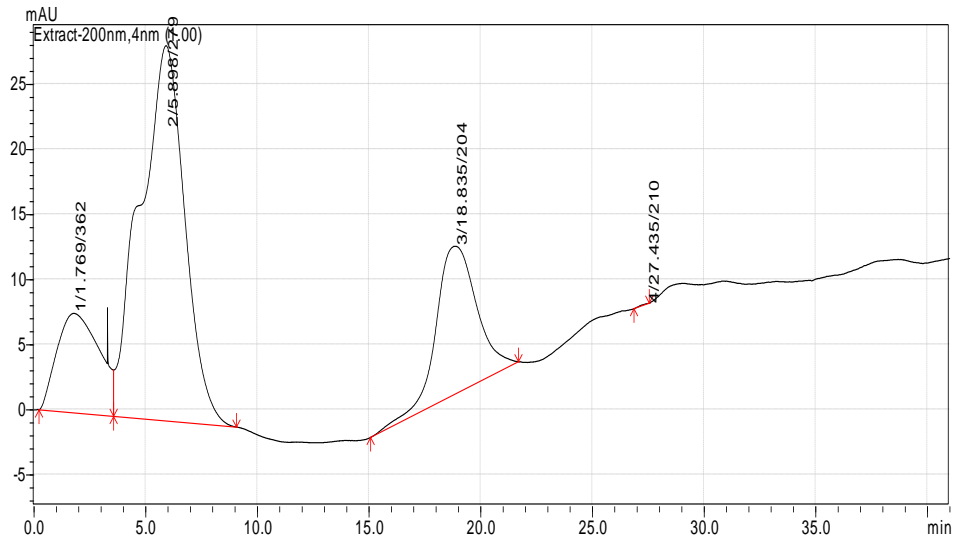


Figura 79. - Cromatograma RP-HPLC a a extractului standardizat pentru aplicații practice din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* („extract standard”), detecția 254 nm

În paralel s-a înregistrat cromatograma extractului E5 alcoolic din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* considerat ca „extract standard” pentru aplicații practice. Detecția s-a făcut la 520 nm respectiv 254 nm. În extractul obținut se observă

prezența delfinidinei ($t_R=4,466$ figura 78), cianidinei ($t_R=16,646$, $t_R=20,036$ figura 78), peonidinei ($t_R=37,717$ figura 78), malvidinei ($t_R=18,368$ figura 78, $t_R=6,098$; $t_R=18,835$ figura 79), antocianidine a căror prezență a fost confirmată și prin spectrometria de masă.

III.2. CINETICA DEGRADĂRII TERMICE A EXTRACTELOR DIN FRUCTE DE *VACCINIUM MYRTILLUS* RESPECTIV *VACCINIUM VITIS-IDAEA*

Din termogramele obținute se observă că procesul de degradare (descompunere) al gelurilor supuse analizei are loc în două etape. Prima etapă are loc între 100 și 180°C și este asociată atât pierderii de apă legată cât și degradării unor principii active prezente în extracte, de tipul compușilor polifenolici (în special antocianine). Cea de-a doua etapă, din intervalul 250-310°C poate fi atribuită degradării în totalitate a gelului, mai precis a pectinelor prezente în masa vâscoasă rezultată după evaporarea extractelor la temperatura camerei.

În figurile 80 respectiv 81 sunt prezentate curbele TG obținute la o viteză de încălzire de 2 K/min pentru gelurile obținute din fructe de afine respectiv merișoare.

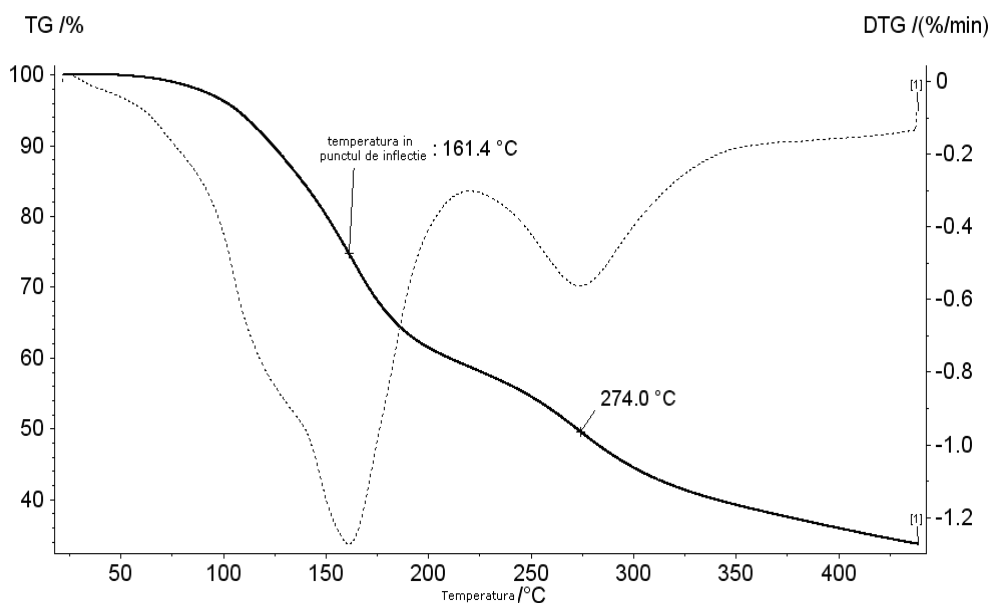


Figura 80. - Curba TG pentru extractul sub formă de gel obținut din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișor) obținut cu 2 K/min.

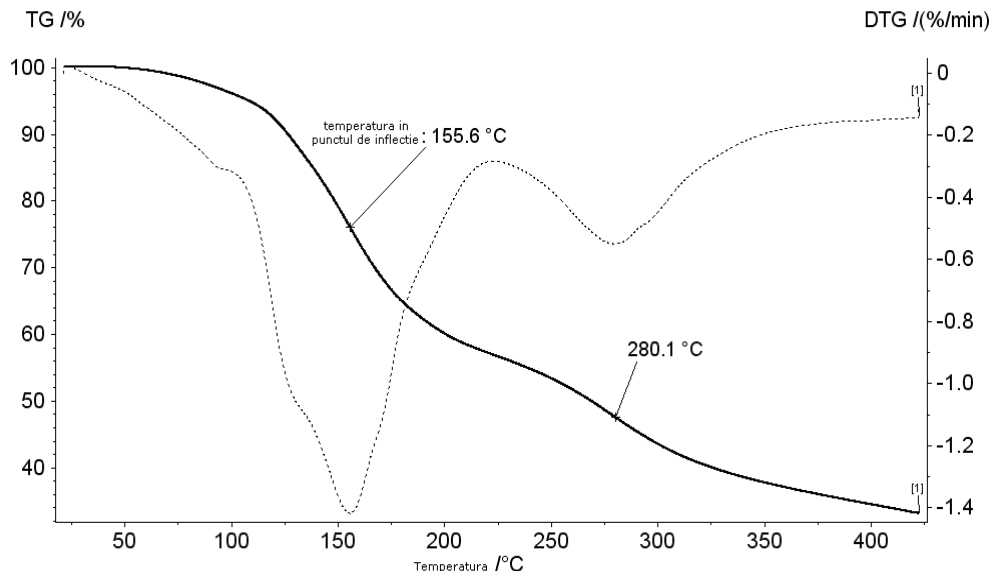


Figura 81. - Curba TG pentru extractul sub formă de gel obținut din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine) obținut cu 2 K/min

Pentru stabilitatea termică a gelurilor obținute din extracte este foarte importantă prima etapă, deoarece pe baza cunoașterii domeniului de temperatură la care începe descompunerea termică se poate compara eficiența acestora când sunt folosite ca adausuri cu caracter antioxidant sau pentru menținerea și îmbogățirea unor parametri senzoriali precum culoarea în produsele alimentare.

Studiul cinetic al procesului de degradare al probelor analizate s-a realizat folosind metodele *Kisinger*, *Ozawa* și *KAS* [279-281] aplicate prima dată pentru polimeri dar extinse ulterior și asupra unor produse naturale, taninuri obținute prin extracție [217].

Aplicarea metodelor izoconversionale permite evaluarea energiei de activare fără a cunoaște explicit expresia funcției de conversie (modelul cinetic) precum și evaluarea dependenței energiei de activare de gradul de conversie.

Cel mai des aplicată este *Metoda Kissinger* [279]. Relația ce stă la baza acestei metode este:

$$\ln \frac{\beta}{T_p^2} = \ln(ARF(\alpha)) - \frac{E}{RT_i} \quad (20)$$

unde: β - gradul de încălzire, T_i – temperatura din punctul de inflexiune, R - constanta generală a gazelor, $F(\alpha)$ – funcția cinetică

Reprezentarea grafică $\ln \frac{\beta}{T_p^2}$ funcție de $(1/T)$ este o dreaptă din a cărei pantă se determină energia de activare. În figurile 82 și 83 sunt prezentate dreptele Kissinger ale probelor analizate pentru etapa a doua de descompunere.

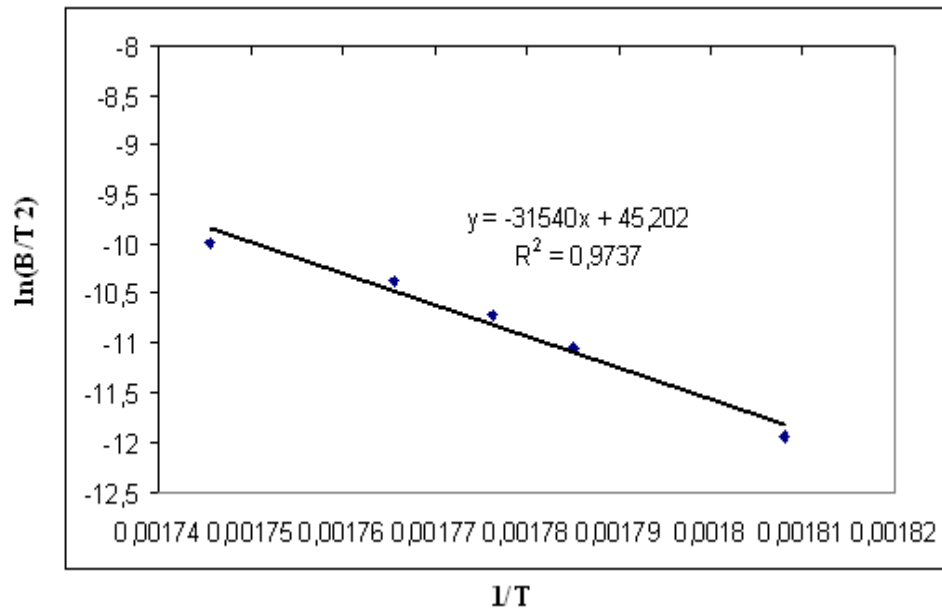


Figura 82. - Dreapta Kissinger pentru etapa a 2-a de descompunere a extractului sub formă de gel obținut din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine)

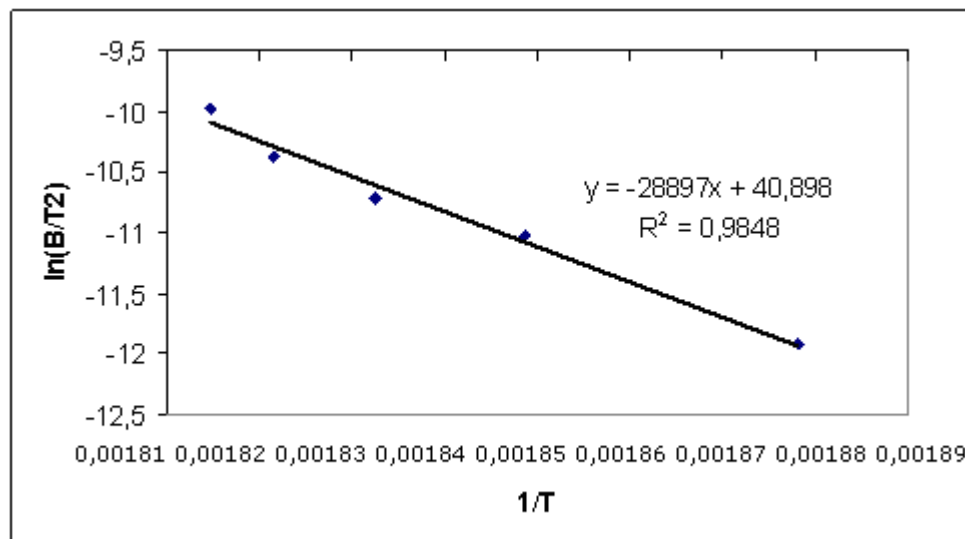


Figura 83. - Dreapta Kissinger pentru etapa a 2-a de descompunere a extractului sub formă de gel obținut din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare)

Pentru calculul energiei de activare folosind metoda Ozzawa (ecuația 21) [280], se reprezintă grafic $\ln \beta$ funcție de $(1/T)$.

$$\log(\beta) = C - 0.4567 \left(\frac{E}{RT_{\%}} \right) \quad (21) \quad \text{unde: } C - \text{constantă; } T - \text{temperatura.}$$

În figurile 84 și 85 sunt prezentate curbele Ozawa pentru extractele de afine respective merișoare.

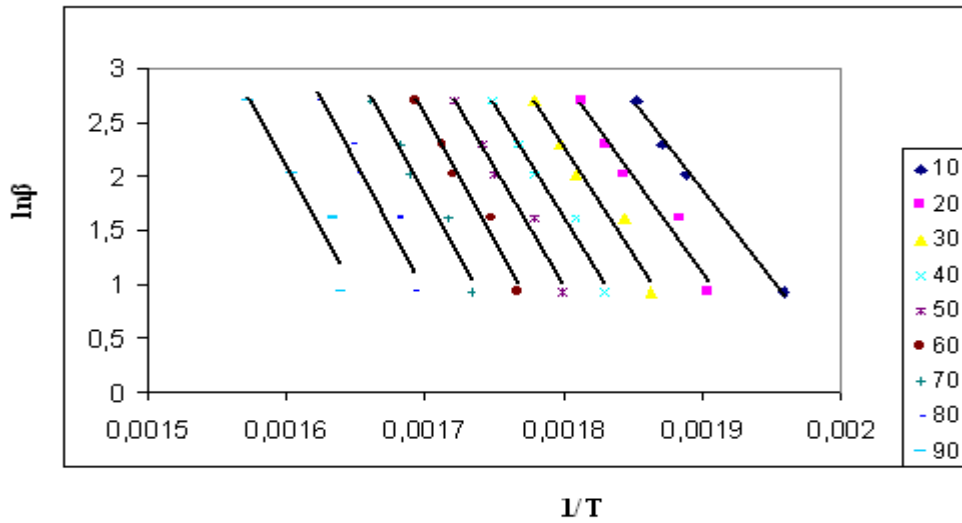


Figura 84. - Curbele Ozawa pentru degradarea extractului de afine sub formă de gel

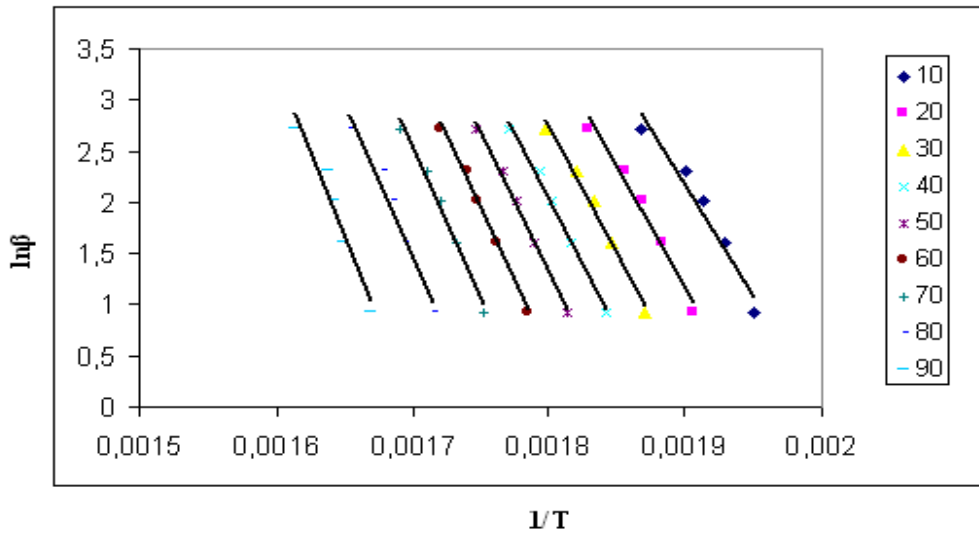


Figura 85. - Curbele Ozawa pentru degradarea extractului de merișoare sub formă de gel

Metoda KAS se bazează pe ecuația (22) [281]. Această ecuație este similară cu ecuația Kissinger, singura diferență este faptul că temperatura este la un grad de conversie sigur.

$$\ln\left(\frac{\beta}{T_{\%}^2}\right) = C - \frac{E}{RT_{\%}} \quad (22)$$

În figurile 86 și 87 sunt prezentate diagramele KAS pentru extractele analizate.

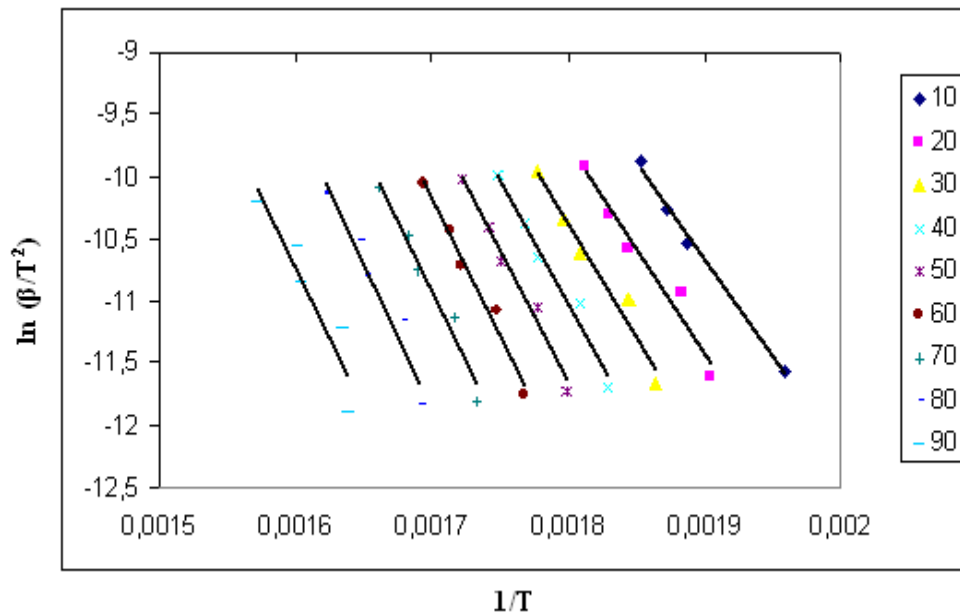


Figura 86. - Diagrama KAS pentru extractul de afine sub formă de gel

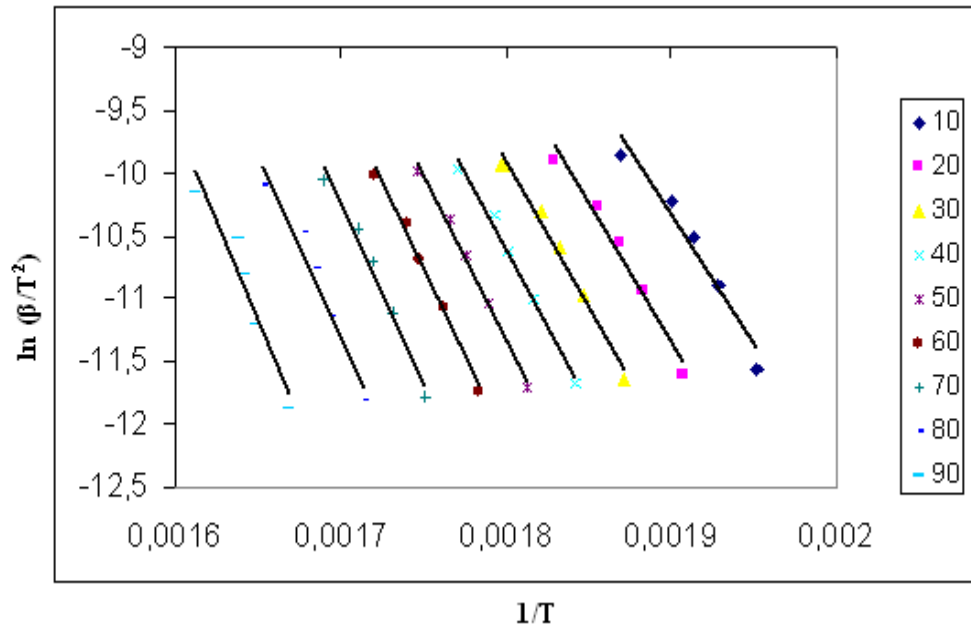


Figura 87. - Diagrama KAS pentru extractul de merișoare sub formă de gel

Folosind metodele menționate mai sus s-a evaluat energia de activare a procesului de degradare al gelurilor analizate. Valorile obținute sunt prezentate în tabelul 29.

Tabelul 29.

Energia de activare pentru cele două extracte evaluată prin diferite metode

Metoda de evaluare	Proba 1		Proba 2	
	Etapa I de degradare	Etapa a II a de degradare	Etapa I de degradare	Etapa a II a de degradare
Kissinger	110,4099	237,62	161,6907	240,2497
Ozawa	119,1182	180,7	121,598	213,5621
KAS	118,0754	180,62	120,6591	215,2938

Proba 1- gel obținut din extract de afine, proba 2- gel obținut din extract de merișoare

Din datele prezentate în tabelul 29 se observă că, energiile de activare pentru prima etapă de degradare se încadrează în domeniul 110 – 160 kJ/mol. Valorile cele mai scăzute s-au obținut pentru gelul obținut din extract din afine (proba 1). În etapa a doua de degradare pentru ambele probe s-au înregistrat valori ridicate ale energiei de activare se încadrează în domeniul 180 – 240 kJ/mol.

III.3. EXTRACTE DIN FRUCTE DE *VACCINIUM MYRTILLUS* RESPECTIV *VACCINIUM VITIS-IDAEA*. STUDIU DE CULOARE ÎN SPAȚIUL C I E L A B

În cadrul acestui studiu s-a urmărit determinarea proprietățile de colorare a pigmentilor naturali extrași din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine negre) respectiv *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare – afine roșii).

S-a lucrat cu un set de 5 probe pentru fiecare extract, numerotate A1 – A5 în cazul extractului din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine), care diferă între ele prin concentrația de pigmenți colorați exprimată prin conținutul total de antocianine (tabelul 30). Dozarea acestora se bazează pe proprietatea lor de a prezenta în soluție alcoolică acidă un maxim de absorbție la $\lambda = 550 \text{ nm}$ [263].

Tabelul 30.

Conținutul în antocianine al probelor supuse analizelor

Proba	A1	A2	A3	A4	A5
Conținut în antocianine (mg/mL)·10 ⁻³	4.78	2.36	1.65	1.23	0.86

Pentru a avea o imagine de ansamblu asupra culorilor obținute după aplicarea pe suport celulozic a celor 5 probe, au fost efectuate măsurători de culoare în sistemul CIELAB.

Pentru fiecare probă în parte s-au determinat:

- reflectanța probelor de extracte față de un standard la trei iluminanți; exemplificarea este redată pentru iluminantul D65, tabelul 31;
- saturația (C), tonalitatea (h) și coordonatele rectangulare L*, a*, b*

Reflectanța, este o mărime fizică care depinde de unghiul de incidență, polarizarea radiației și indicele de refracție a materialelor care formează suprafața de separație. Din datele obținute se observă că aceasta depinde de lungimea de undă respectiv de concentrația colorantului. Astfel, pentru proba cu concentrația cea mai mare în antocianine reflectanța este cea mai mică la o anumită lungime de undă. În toate cazurile ca și pentru standard aceasta crește odată cu lungimea de undă.

În continuare sunt redate rezultatele determinărilor efectuate pentru extractul din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine).

Datele privitoare la curbele de reflexie ale pigmentilor coloranți extrași din afine față de standard (baza albă) pentru iluminantul D65 sunt prezentate în tabelul 31.

Tabelul 31.

Reflectanța pigmentilor colorați din probele A1-A5 față de standard (baza albă) pentru iluminantul D65

λ (nm)	Standard	A1	A2	A3	A4	A5
400	52.06	50.64	51.33	51.64	51.76	51.83
420	90.00	80.89	84.85	86.53	87.58	88.11
440	92.19	83.29	87.18	89.01	90.00	90.45
460	92.50	84.80	88.48	90.01	90.87	91.15
480	92.70	85.97	89.42	90.58	91.46	91.54
500	92.75	87.06	90.31	91.41	92.06	92.21
520	92.99	87.92	91.00	91.91	92.39	92.42
540	93.09	88.58	91.28	92.41	92.59	92.61
560	92.99	88.48	91.49	92.56	92.67	92.70
580	93.18	88.61	91.55	92.67	92.72	92.82
600	93.22	88.79	91.69	92.73	92.75	92.84
620	93.39	88.82	91.78	92.77	92.89	92.96
640	93.35	88.93	92.15	92.84	93.01	93.09
660	93.39	89.54	92.44	93.00	93.09	93.12
680	93.29	90.39	92.47	93.07	93.17	93.18
700	93.40	91.54	92.75	93.09	93.20	93.22

În tabelul 32 sunt prezentate rezultatele obținute în urma măsurătorilor spectrofotometrice pentru probele A1-A5 la cei trei iluminanți. Pe baza datelor din tabelul 32 se poate afirma faptul că, lumina afectează culoarea. Compoziția spectrală a luminii emise și reflectate pe suprafața obiectelor determină modificarea culorii percepute. Această aparentă schimbare a culorii în funcție de sursa de iluminare este un tip de dicroism. În cazul unui colorant alimentar, fenomenul de dicroism este nedorit. Lumina fluorescentă dintr-o hală de fabricație, din depozite, magazine de desfacere cât și lumina gălbuie provenită de la un bec de iluminare dintr-un restaurant, duc în afara riscului unor modificări mai profunde și la modificarea culorii băuturilor și a produselor alimentare. Acest efect poate fi interpretat de consumator ca o degradare rapidă a calității produselor.

Tabelul 32.

Valorile măsurătorilor de culoare pentru probele A1-A5,
comparativ cu baza albă

Tip iluminant	Număr compus		A1	A2	A3	A4	A5
D65	Coordonate cilindrice și rectangulare	C	3.39	2.90	2.38	2.08	1.84
		h	1.82	1.80	1.82	1.83	1.87
		L	95.18	96.13	96.85	97.0	97.05
		a	-0.84	-0.66	-0.6	-0.57	-0.55
		b	3.29	2.82	2.31	2.01	1.76
	Valori Tristimulus	X	83.05	86.13	86.99	87.5	87.47
		Y	88.06	91.21	92.08	92.39	92.57
		Z	89.71	93.66	95.33	96.31	96.67
	A	Coordonate cilindrice și rectangulare	C	3.09	2.56	2.06	1.76
h			1.53	1.48	1.49	1.51	1.53
L			95.33	96.62	96.95	97.15	97.11
a			0.28	0.22	0.16	0.10	0.07
b			3.09	2.55	2.05	1.76	1.48
Valori Tristimulus		X	98.33	101.86	102.71	103.21	103.08
		Y	88.40	91.52	92.32	92.61	92.70
		Z	29.64	30.96	31.48	31.79	31.90
F2		Coordonate cilindrice și rectangulare	C	3.56	2.86	2.31	2.01
	h		1.74	1.71	1.72	1.73	1.75
	L		95.29	96.59	96.91	97.13	97.69
	a		-0.60	-0.38	-0.34	-0.31	-0.30
	b		3.51	2.83	2.29	1.99	1.64
	Valori Tristimulus	X	90.87	94.21	95.04	95.61	95.53
		Y	88.32	91.44	92.22	92.56	92.67
		Z	57.68	60.40	61.44	62.09	62.36

D65 = iluminantul corespunzător luminii zilei, cu o temperatură a culorii de 6500 K; A = iluminantul corespunzător unui bec cu incandescență, cu o temperatură a culorii de 2856 K; F2 = iluminantul corespunzător luminii albe fluorescente.

În urma măsurătorilor de culoare efectuate în sistemul CIELAB (tabelul 32), în figura 88 s-a reprezentat grafic dependența luminozității față de concentrația de colorant de tip extract de afine introdusă în baza albă, atunci când se utilizează iluminantul D65. Se constată că luminozitatea scade cu creșterea concentrației de colorant.

Dupa cum se știe, luminozitatea se referă la cantitatea de lumină reflectată de culoare sau la cât de mult negru este în culoare. Scăderea luminozității era așteptată, deoarece pe măsură ce concentrația de colorant în proba albă crește, produsul se va închide la culoare.

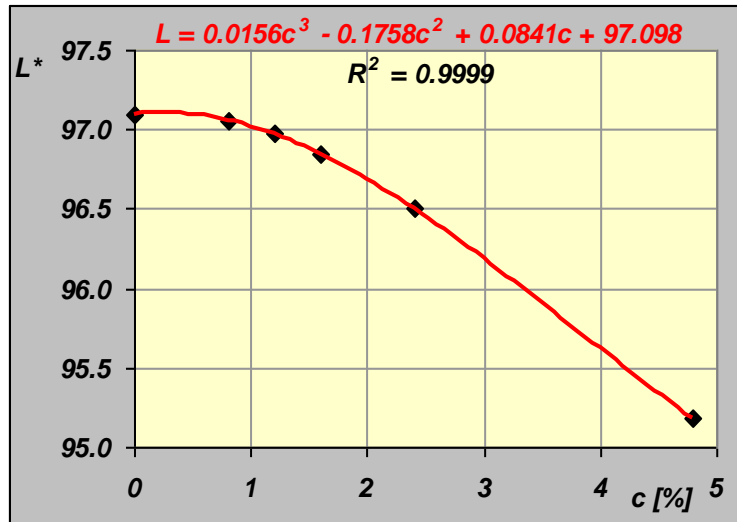


Figura 88. - Dependența luminozității (L^*) de concentrația pigmentilor coloranți din probe (extract din afine)

Dacă se reprezintă grafic (figura 89) dependența parametrului a^* față de concentrația de colorant de tip A introdusă în baza albă, atunci când se utilizează iluminantul D65, se constată că valoarea parametrului a^* scade cu creșterea concentrației de colorant. Aceasta înseamnă că pe măsură ce crește concentrația colorantului A, tonalitatea culorii se deplasează spre verde.

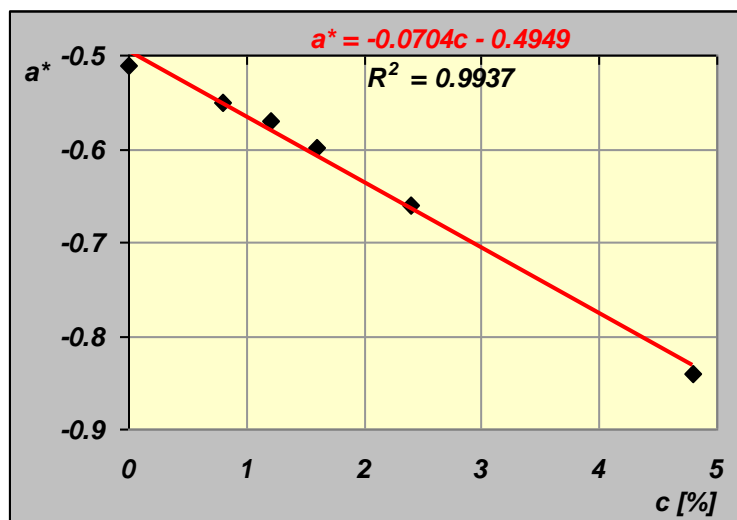


Figura 89. - Dependența coordonatei a^* de concentrația pigmentilor coloranți din probe (extract din afine)

Parametrul a^* este negativ, și se constată că valoarea lui scade liniar cu creșterea concentrației colorantului, deci tonalitatea culorii se deplasează spre verde, iar în cazul în care se reprezintă grafic (figura 90) dependența parametrului b^* față de concentrația de colorant de tip A introdusă în baza albă, atunci când se utilizează iluminantul D65, se constată că valoarea parametrului b^* crește cu creșterea concentrației de colorant. Aceasta înseamnă că pe măsură ce crește concentrația colorantului A, tonalitatea culorii se deplasează spre galben.

Puterea de colorare a colorantului A, extras din afine, este o măsură a abilității relative a acestui colorant de a modifica culoarea unui pigment alb la care este adăugat.

Examinarea puterii de colorare a colorantului A, extras din afine, s-a realizat prin reprezentarea diferenței de culoare ΔE în funcție de creșterea concentrației de pigmenți coloranți de tip A introdusă în baza albă, atunci când se utilizează iluminantul D65 (figura 90).

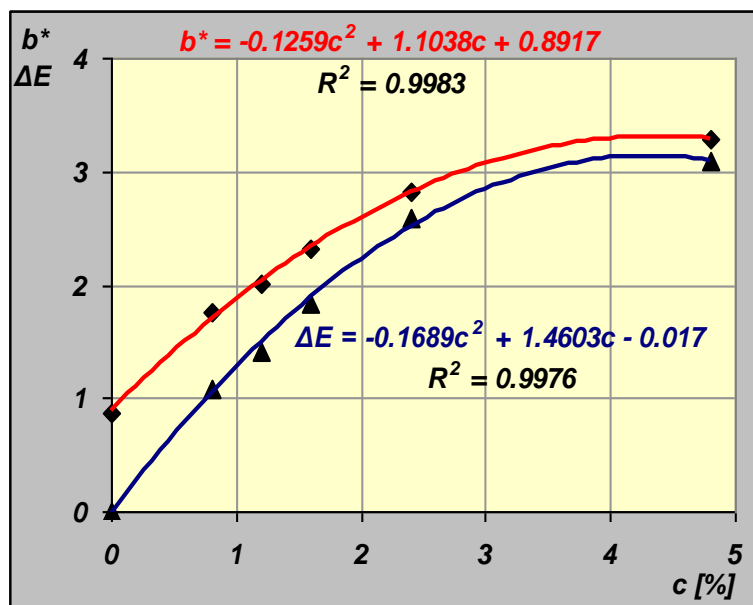


Figura 90. - Dependența coordonatei b^* și a diferenței de culoare ΔE de concentrația pigmentilor coloranți din probe la iluminantul D65

Se constată că deși concentrația colorantului de tip extract de afine crește semnificativ, diferența de culoare față de proba albă crește doar foarte puțin astfel încât se poate concluziona că puterea de colorare a colorantului de tip extract din afine, este slabă.

Reprezentarea culorii în spațiul L^* , a^* , b^* este prezentată în figura 91.

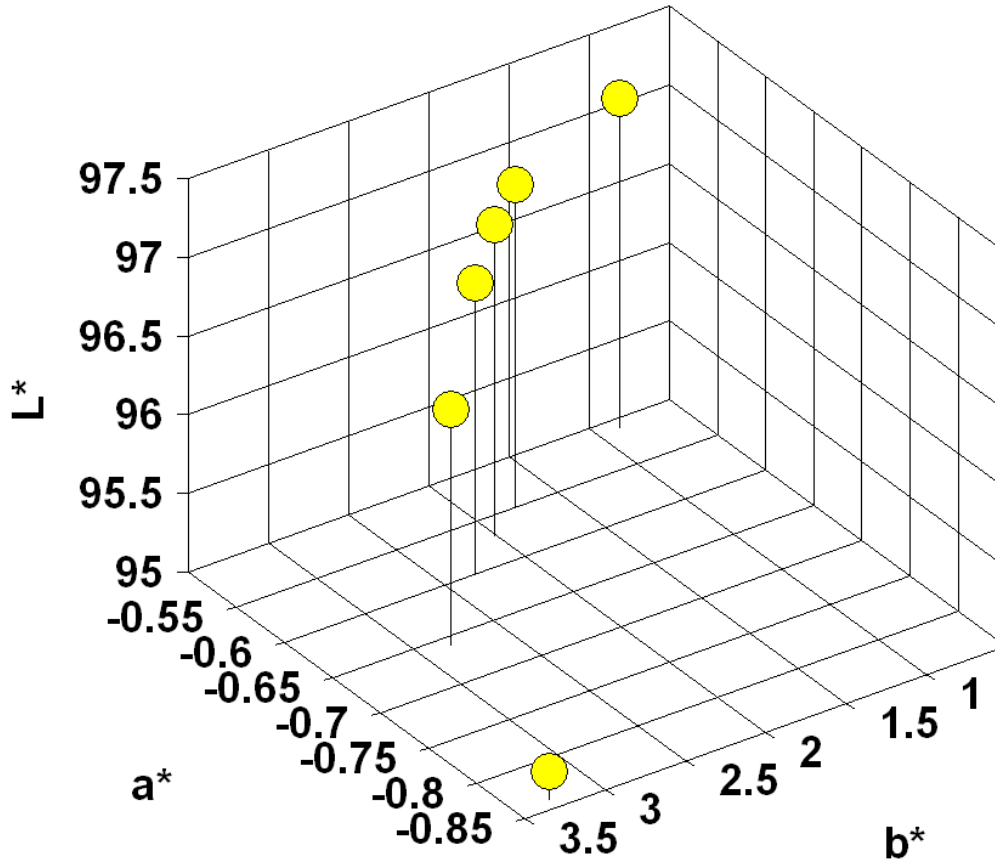


Figura 91. - Evoluția culorii în spațiul tridimensional L^* , a^* , b^* pe măsură ce crește concentrația de colorant A extras din afine

Se știe că sursele de lumină sunt corpuri care emit lumină prin natura lor; sursele comune de lumină sunt soarele, lumina incandescentă și lumina fluorescentă; de asemenea se știe că, tipuri specifice de lumină vor emite cantități diferite de energie în fiecare parte a spectrului vizual.

Foarte important în cazul unui colorant alimentar este fenomenul nedorit de dicroism. Astfel, o băutură răcoritoare care își modifică culoarea de la un bar iluminat cu o anumită sursă de lumină, la masa unde este servită, care este iluminată de o altă sursă de lumină, poate fi interpretată de consumator ca o degradare rapidă a calității băuturii.

În cazul colorantului A, extras din afine, fenomenul de dicroism s-a analizat prin compararea diferenței de culoare ΔE a probelor examinate sub cei trei iluminanți D65, A și F2 (tabelul 33). Diferența de culoare a fost calculată cu relația:

$$\Delta E_{ab}^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (23)$$

Tabelul 33.

Valorile ΔE pentru pigmenții colorați din extractul apos din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine) sub efectul iluminanților standard

ΔE Iluminantul standard	A1	A2	A3	A4	A5
D65	3.09	2.59	1.84	1.42	1.08
A	3.39	2.56	1.83	1.40	0.99
F2	3.96	2.89	2.10	1.66	1.17

Se constată că pe măsură ce crește concentrația colorantului din probă crește și diferența de culoare observată sub cei trei iluminanți. Colorantul A prezintă deci fenomenul de dicroism.

S-a urmărit stabilirea parametrului cu rolul preponderent în modificarea diferenței de culoare. Pentru aceasta s-au comparat valorile derivate ΔL , Δa , Δb , ΔC și Δh ale parametrilor L^* , a^* , b^* respectiv ale **saturației** și **tonalității** pentru probele analizate (tabelul 34).

Tabelul 34.

Valorile parametrilor ΔL , ΔC , Δh , Δa și Δb la cei trei iluminanți pentru pigmenții colorați extrași din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine)

Tip iluminant	Număr compus	A1	A2	A3	A4	A5
D65	ΔL	-2.05	-0.74	1.03	-0,17	-0.18
	ΔC	2.31	1.81	1.29	1.0	0.76
	Δh	0.12	0.14	0.1	0.08	0.02
	Δa	-0.51	-0.33	-0.23	-0.20	-0.18
	Δb	2.25	1.79	1.27	0.98	0.73
A	ΔL	-1.94	-0.65	-0.32	-0.12	-0.17
	ΔC	2.29	1.75	1.26	0.96	0.68
	Δh	0.09	0.02	0.03	0.05	0.06
	Δa	0.04	0.14	0.08	0.02	0.01
	Δb	2.29	1.75	1.26	0.96	0.68
F2	ΔL	-1.06	-0.67	-0.35	-0.13	-0.16
	ΔC	2.70	2.00	1.45	1.15	0.81
	Δh	0.05	0.01	0.01	0.02	0.05
	Δa	-0.48	-0.26	-0.22	-0.19	-0.18
	Δb	2.66	1.98	1.44	1.14	0.79

Valoarea parametrului ΔE ca atare nu permite distingerea cu ochiul liber a diferenței de culoare decât dacă valoarea sa este peste 0,5. În cazul extractului studiat cele mai mari diferențe de culoare în funcție de iluminanții folosiți s-a constatat în cazul probei A1, când se folosește concentrația cea mai mare de colorant.

Parametrii care intervin în calculul diferenței de culoare ΔE sunt cei enumerați iar contribuția lor la valorile acestora sunt următoarele:

- ΔL - minoră, valorile luminozității fiind apropiate la toți cei trei iluminanți.

- **Δa** – prezintă diferențe mai mari între iluminanții D65 și F2 pe de o parte și iluminantul A pe de altă parte. Astfel, valorile pozitive pentru **Δa** înregistrate în cazul iluminantului standard A indică o intensificare a nuanței de roșu pentru probe.
- **Δb** – prezintă diferențe mai mari între iluminanții D65 și A pe de o parte și iluminantul F2 pe de altă parte. În mod similar valori **Δb** mai mari pentru iluminantul standard F2 indică o intensificare a nuanței de galben pentru probe.
- **ΔC** – prezintă diferențe mai mari între iluminanții D65 și A pe de o parte și iluminantul F2 pe de altă parte. Valorile **ΔC** mai mari pentru probele A1-A5 pentru iluminantul standard F2 indică o culoare mai saturată, mai vie.
- **Δh** - valorile tonalității prezintă diferențe mari la toți cei trei iluminanți, pentru toate probele.

Aceleași determinări s-au făcut și pentru pigmentii prezenți în extractul din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare), probele M1-M5.

Tabelul 35.

Conținutul în antocianine a probelor M1 – M5 analizate

Proba	M1	M2	M3	M4	M5
Conținut în antocianine (mg/mL)·10 ⁻³	9,67	4,45	2,80	2,15	1,46

În tabelul 36 sunt prezentate datele privitoare la curbele de reflexie ale pigmentilor extrași din merișoare față de standard (baza albă) pentru iluminantul D65 iar în tabelul 37 sunt prezentate valorile măsurătorilor de culoare comparativ cu baza albă.

Tabelul 36.

Reflectanța pigmentilor colorați din probele M1 – M5 extrași din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare) față de standard (baza albă) pentru iluminantul D65

λ (nm)	standard	M1	M2	M3	M4	M5
400	52.06	50.02	50.79	51.33	51.40	51.61
420	90.00	78.06	81.97	83.55	84.58	85.91
440	92.19	80.68	84.18	85.73	86.93	88.34
460	92.50	82.68	85.87	87.21	88.56	89.51
480	92.70	85.10	97.37	88.68	89.86	90.36
500	92.75	87.02	88.72	89.94	91.37	91.49
520	92.99	88.42	89.66	90.85	91.68	91.90
540	93.09	89.43	90.34	91.45	91.98	92.37
560	92.99	89.66	90.41	91.59	92.10	92.52
580	93.18	90.07	90.66	91.79	92.33	92.73
600	93.22	90.17	90.78	91.86	92.41	92.78
620	93.39	90.43	91.21	92.26	92.77	92.99
640	93.35	90.66	91.35	92.50	92.86	93.04
660	93.39	91.15	91.89	92.68	92.89	93.09
680	93.29	91.64	92.06	92.83	92.92	93.19
700	93.40	92.19	92.27	92.84	92.98	93.24

Pentru a se observa mai bine dependența reflectanței de lungimea de undă respectiv de concentrația de pigment s-a realizat și reprezentarea grafică (figura 92).

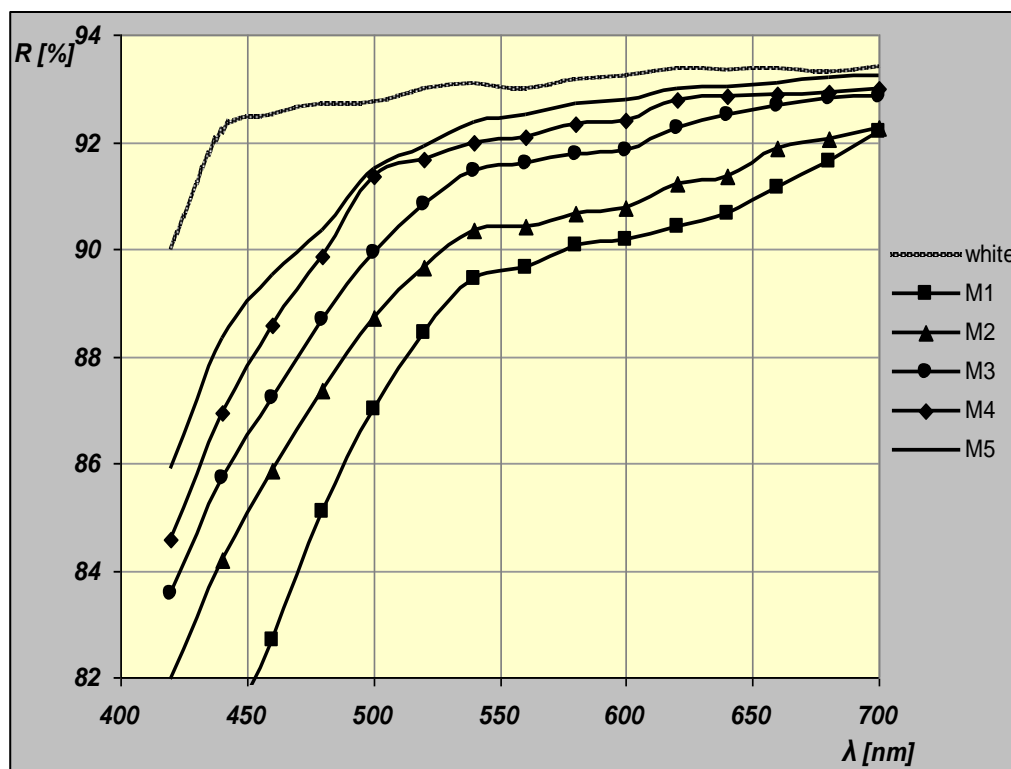


Figura 92. - Variația reflectanței funcție de lungimea de undă

Astfel, pentru proba cu concentrația cea mai mare în antocianine reflectanța este cea mai mică la o anumită lungime de undă. În toate cazurile ca și pentru standard aceasta crește odată cu lungimea de undă.

Tabelul 37.

Valorile măsurătorilor de culoare pentru probele M1 – M5 comparativ cu baza albă

Tip iluminant	Număr compus	M1	M2	M3	M4	M5	
D65	Coordonate cilindrice și rectangulare	C	5.58	3.91	3.69	3.33	2.77
		h	1.76	1.77	1.77	1.77	1.78
		L	95.52	95.97	96.45	96.68	96.87
		a	-1.03	-0.76	-0.73	-0.66	-0.57
		b	5.49	3.83	3.62	3.26	2.71
	Valori Tristimulus	X	83.71	84.86	85.99	86.55	87.05
		Y	88.87	89.93	91.10	91.66	92.13
		Z	87.42	90.87	92.39	93.49	94.79
A	Coordonate cilindrice și rectangulare	C	5.32	3.72	3.46	2.80	2.49
		h	1.48	1.47	1.47	1.48	1.48
		L	95.49	96.16	96.63	96.72	96.99
		a	0.48	0.39	0.35	0.24	0.23
		b	5.29	3.69	3.44	2.79	2.48
	Valori Tristimulus	X	99.79	100.71	101.95	101.87	102.87
		Y	89.51	90.39	91.53	91.52	92.42
		Z	28.98	30.03	30.54	30.85	31.30
F2	Coordonate cilindrice și rectangulare	C	6.00	4.15	3.86	3.14	2.82
		h	1.69	1.69	1.69	1.71	1.69
		L	95.73	96.11	96.58	96.80	96.97
		a	-0.71	-0.59	-0.47	-0.43	-0.34
		b	5.96	4.12	3.84	3.11	2.80
	Valori Tristimulus	X	91.88	92.96	94.14	94.21	95.20
		Y	89.36	90.28	91.42	91.46	92.38
		Z	56.13	58.42	59.44	60.15	61.06

Dependențele grafice ale valorilor coordonatelor L^* , a^* , b^* în funcție de concentrația de pigmenți colorați din probele analizate, raportate la pigmentul alb sunt prezentate în figurile 93, 94 și 95.

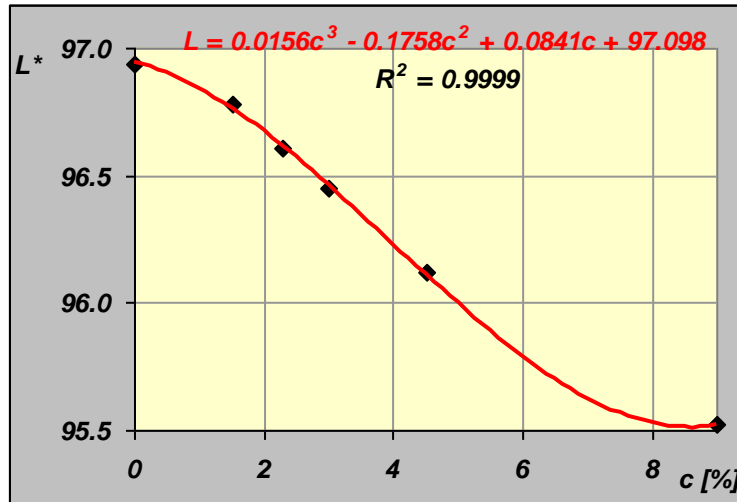


Figura 93. - Dependența luminozității (L^*) de concentrația pigmentilor colorați din probe

În figura 93 s-a reprezentat grafic dependența luminozității față de concentrația de colorant de tip extract apos din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* introdusă în baza albă, atunci când se utilizează iluminantul D65. Se constată că luminozitatea scade cu creșterea concentrației de colorant. Scăderea luminozității era așteptată, deoarece pe măsură ce concentrația de colorant în proba albă crește, produsul se va închide la culoare.

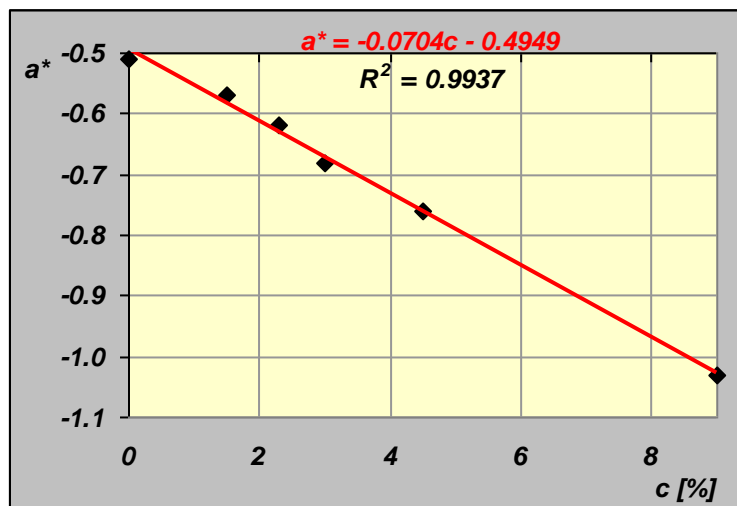


Figura 94. - Dependența coordonatei a^* de concentrația pigmentilor colorați din probe

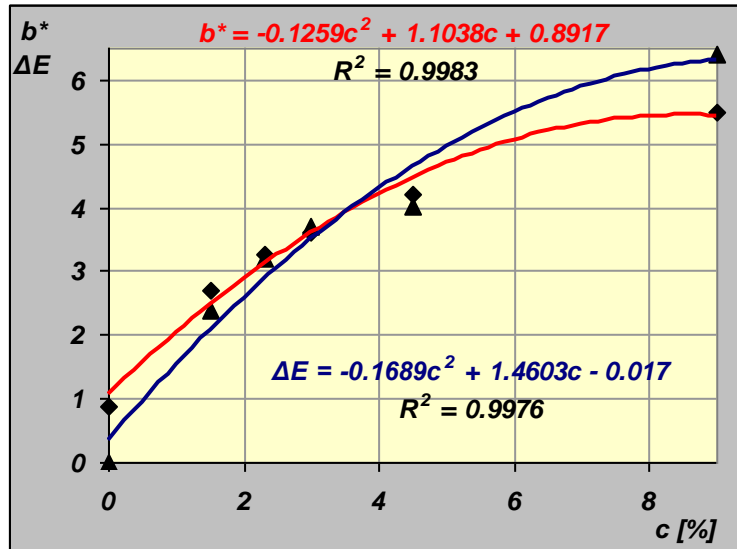


Figura 95. - Dependența coordonatei b^* și a diferenței de culoare ΔE de concentrația pigmentilor colorați din probe la iluminantul D65

Se constată că deși concentrația pigmentilor colorați crește semnificativ, diferența de culoare față de proba albă crește doar foarte puțin. Culoarea naturală a fructelor de merișoare este roșie. Nuanța obținută folosind extract de merișoare în concentrații scăzute este foarte slabă. De fapt, culorile probelor analizate au nuanțe diferite de galben și verde.

Reprezentarea culorii în spațiul L^* , a^* , b^* este prezentată în figura 96.

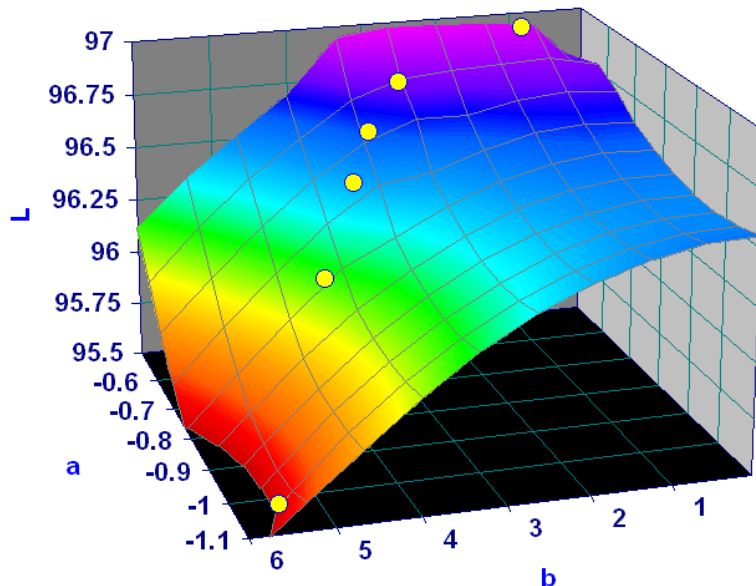


Figura 96. - Spațiul L^* , a^* , b^* , pentru colorantul M extras din merișoare

Examinarea puterii de colorare a pigmentilor extrași din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare), s-a realizat prin reprezentarea diferenței de culoare ΔE în funcție de creșterea concentrației de colorant de tip extract apos introdusă în baza albă, atunci când se utilizează iluminantul D65 (vezi figura 95).

Se constată că deși concentrația pigmentilor colorați crește semnificativ, diferența de culoare față de proba albă crește doar foarte puțin astfel încât se poate concluziona că, puterea de colorare a extractului apos din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare), este slabă.

Și în cazul pigmentilor colorați extrași din merișoare, fenomenul de dicroism s-a examinat prin compararea diferenței de culoare ΔE a probelor examinate sub cei trei iluminanți D65, A și F2 (tabelul 38).

Tabelul 38.

Valorile ΔE pentru pigmentii M din extractul apos din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare) sub efectul iluminanților standard

ΔE Iluminantul standard	M1	M2	M3	M4	M5
D65	6.41	4.03	3.71	3.19	2.4
A	6.57	4.25	3.86	2.90	2.46
F2	7.45	4.76	4.34	3.29	2.83

Se observă că și pigmentii colorați extrași din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare) prezintă fenomenul de dicroism, manifestat prin diferența de culoare observată la cei trei iluminanți.

S-a urmărit stabilirea parametrului cu rolul preponderent în modificarea diferenței de culoare. Pentru aceasta s-au comparat valorile derivate ΔL , Δa , Δb , ΔC și Δh ale parametrilor L^* , a^* , b^* respectiv ale **saturației** și **tonalității** pentru probele analizate (tabelul 39).

Tabelul 39.

Valorile parametrilor ΔL , ΔC , Δh , Δa și Δb la cei trei iluminanți pentru pigmentii colorați extrași din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare)

Tip illuminant	Număr compus	M1	M2	M3	M4	M5
D65	ΔL	-1.71	-1.27	-0.78	-0.55	-0.36
	ΔC	4.50	2.82	2.60	2.24	1.69
	Δh	0.31	0.24	0.22	0.21	0.18
	Δa	-0.70	-0.42	-0.40	-0.33	-0.24
	Δb	4.45	2.80	2.58	2.23	1.68
A	ΔL	-1.48	-1.11	-0.65	-0.65	-0.28
	ΔC	4.51	2.91	2.66	1.99	1.69
	Δh	0.02	0.01	0.01	0.02	0.01
	Δa	0.40	0.31	0.27	0.16	0.15
	Δb	4.50	2.90	2.64	1.99	1.69
F2	ΔL	-1.53	-1.14	-0.67	-0.66	-0.28
	ΔC	5.14	3.29	3.00	2.27	1.96
	Δh	0.05	0.04	0.03	0.01	0.03
	Δa	-0.59	-0.37	-0.35	-0.31	-0.28
	Δb	5.11	3.26	2.98	2.25	1.94

Interpretarea rezultatelor experimentale prezentate în tabelul 39 conduc la aceleași concluzii ca cele detaliate pentru extractul din fructe de *Vaccinium myrtillus*, și anume că, influența luminozității este minoră, că între iluminanți standard apar diferențe în ceea ce privește parametrul corespunzător culorii roșu, galben, respectiv saturația și tonalitatea culorii.

Concluzii

În cadrul acestui studiu s-a urmărit determinarea proprietăților de colorare ale unor coloranți naturali extrași din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine, probele A1-A5 respectiv fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare), probele M1-M5.

S-au analizat proprietățile legate de culoare pentru cele două tipuri de extracte a căror concentrație în pigmenți colorați exprimată ca concentrația în antocianine a fost cuprinsă între $0,86 \cdot 10^{-3}$ – $4,78 \cdot 10^{-3}$ mg/mL pentru extractul din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv $1,46 \cdot 10^{-3}$ – $9,67 \cdot 10^{-3}$ mg/mL în cazul extractului din fructe de *Vaccinium vitis-idaea*, studiindu-se nuanța, strălucirea, luminozitatea, și puterea de colorare. Analiza proprietăților s-a efectuat prin amestecarea coloranților cu dioxid de titan în diferite proporții.

S-au efectuat măsurători de culoare conform sistemului CIELAB, pentru fiecare compus în parte având ca etalon baza albă.

Au fost analizate mai multe seturi de probe cu trei tipuri de iluminanți: D65 - corespunzător luminii zilei, cu o temperatură a culorii de 6500 K; A - corespunzător unui bec cu incandescență, cu o temperatură a culorii de 2856 K; F2- corespunzător luminii albe fluorescente reci.

În cazul iluminantului D65, s-a constatat că luminozitatea scade cu creșterea concentrației de colorant pentru ambele tipuri de extracte. Scăderea luminozității era așteptată, deoarece pe măsură ce concentrația de colorant în proba albă crește, produsul se va închide la culoare.

În același timp, s-a constatat, că pentru ambele tipuri de extracte valoarea parametrului a^* scade cu creșterea concentrației în antocianine a extractelor. Totodată, se constată că valoarea parametrului b^* crește cu creșterea concentrației de colorant. Aceasta înseamnă că pe măsură ce crește concentrația colorantului tonalitatea culorii se deplasează spre galben.

Au fost reprezentați parametrii ce caracterizează culoarea pentru cele două tipuri de extracte în spațiul L^* , a^* , b^* . Puterea de colorare a acestora a fost stabilită prin reprezentarea diferenței de culoare ΔE în funcție de creșterea concentrației de colorant introdusă în baza albă, atunci când s-a utilizat iluminantul D65. S-a constatat că deși concentrația coloranților crește, diferența de culoare față de proba albă crește doar foarte puțin, astfel încât se poate concluziona că puterea de colorare a coloranților testați extrași din afine respectiv din merișoare, este slabă.

În cazul ambelor tipuri de extracte s-a examinat fenomenul de dicroism, prin compararea diferenței de culoare ΔE a probelor examinate sub cei trei iluminanți D65, A și F2 și de asemenea s-a examinat care dintre parametrii L^* , a^* și b^* au rolul preponderent în modificarea diferenței de culoare. Pentru aceasta s-au comparat valorile ΔL , ΔC , Δh , Δa și Δb pentru probele analizate. S-a constatat că parametrii care se modifică la schimbarea iluminantului sunt ΔC , Δh și Δa .

Rezultatele studiului prezentat au făcut obiectul a două lucrări științifice aflate în curs de publicare [282, 283].

III.4. APLICAREA EXTRACTELOR DIN FRUCTE DE *VACCINIUM MYRTILLUS* RESPECTIV *VACCINIUM VITIS-IDAEA* ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ

III.4.1. Efectele antioxidante ale extractelor din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine) respectiv *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare) în uleiuri vegetale

Obiectivul studiului de față a fost examinarea eficienței extractelor de afine și merișoare în stabilizarea uleiului de armurariu (*Silybum marianum*) și a uleiului de șofrănel obținute prin presare la rece precum și a emulsiilor 20% ulei în apă a acestora, în timpul păstrării la temperatura mediului ambiant, prin măsurarea produșilor de oxidare primari și secundari. Studiul s-a realizat comparativ cu probe de ulei cu adaus de antioxidanți sintetici (t-butilhidroxitoluen (BHT), vitamina C) la o concentrație de 200 ppm în probă (100 mL ulei).

Uleiul de armurariu (*Silybum marianum*) și uleiul de șofrănel obținute prin presare la rece și fără adaus de antioxidanți sintetici, au fost cumpărate de la un supermarket. Inițial acestea au fost verificate prin determinare indicelui de peroxid și a produșilor primari diene și triene conjugate (tabelul 40). Dienele respectiv trienele conjugate s-au exprimat funcție de valoarea absorbantei la 232 nm – CD, și 268 nm – CT, a 50 mg ulei dizolvat în 5 mL izooctan.

Tabelul 40.

Valorile parametrilor caracteristici pentru uleiuri înainte de adăugarea antioxidanților

Determinări	Ulei de armurariu	Ulei de șofrănel
Indice de peroxid (meq O ₂ /kg ulei)	2,4	4
Diene conjugate (CD)	0,09	0,11
Triene conjugate (CT)	0,232	0,391

Probele de ulei pregătite conform tabelului 6, subcapitolul II.7.1. – Partea experimentală, au fost stabilizate și păstrate timp de 35 de zile în sticle de culoare închisă, la lumină și temperatură ambiantă.

Nivelul de deteriorare oxidativă al uleiului de armurariu și șofrănel și a emulsiilor 20% U/A ale acestora, a fost urmărit în timpul depozitării prin măsurarea indicelui de peroxid (PV), a conținutului de diene și triene conjugate - CD respectiv CT, apoi a indicelui de p-anisidină (p-AV).

Indicii de peroxid (PV) au fost mășurați conform procedurii AOAC [251].

Produsele de autooxidare, adică CD și CT, s-au determinat prin urmărirea absorbantei la o lungime de undă fixă în regiunea UV (la 232 pentru CD și 268 nm pentru CT) într-o masă constantă de probă. Pentru măsurarea acestor parametri în emulsii, a fost necesară extracția fracțiunilor uleioase din acestea. Pentru toate probele s-a mai determinat indicele de p-anisidină, care reprezintă compuşii de oxidare secundari.

Analiza dimensiunii particulelor pentru emulsiile 20% U/A (ulei de armurariu respectiv ulei de șofrănel) cu un aparat de tip Malvern a arătat că atât în cazul emulsiei 20% a uleiului de armurariu (figura 97) cât și în cazul emulsiei 20% a

uleiului de șofrănel (figura 99), s-a obținut o distribuție bimodală a mărimii picăturilor.

Domeniul reprezentativ în care variază diametrul particulelor celor două emulsii obținut prin extrapolarea datelor furnizate de aparatul Malvern, este prezentat în figurile 98 (emulsia uleiului de armurariu) respectiv 100 (emulsia uleiului de șofrănel).

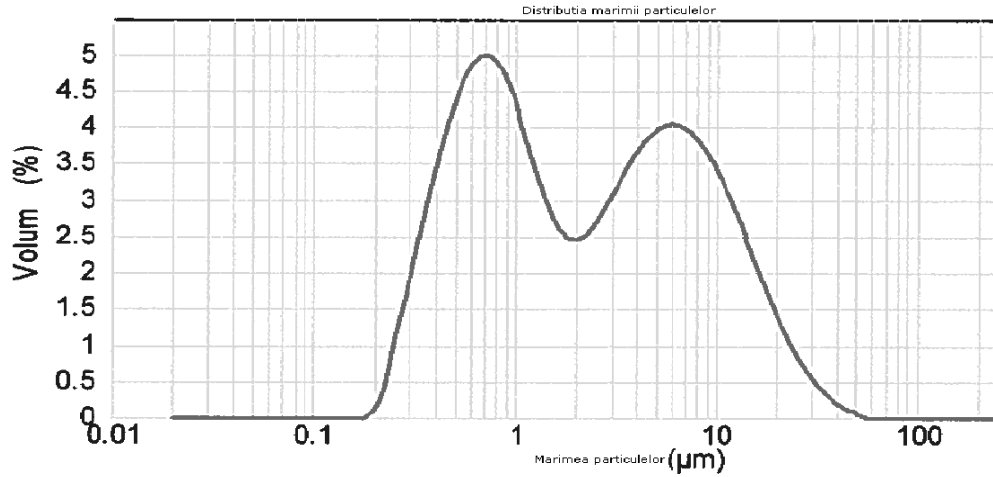


Figura 97. - Distribuția mărimii particulelor în emulsia 20% U/A a uleiului de armurariu

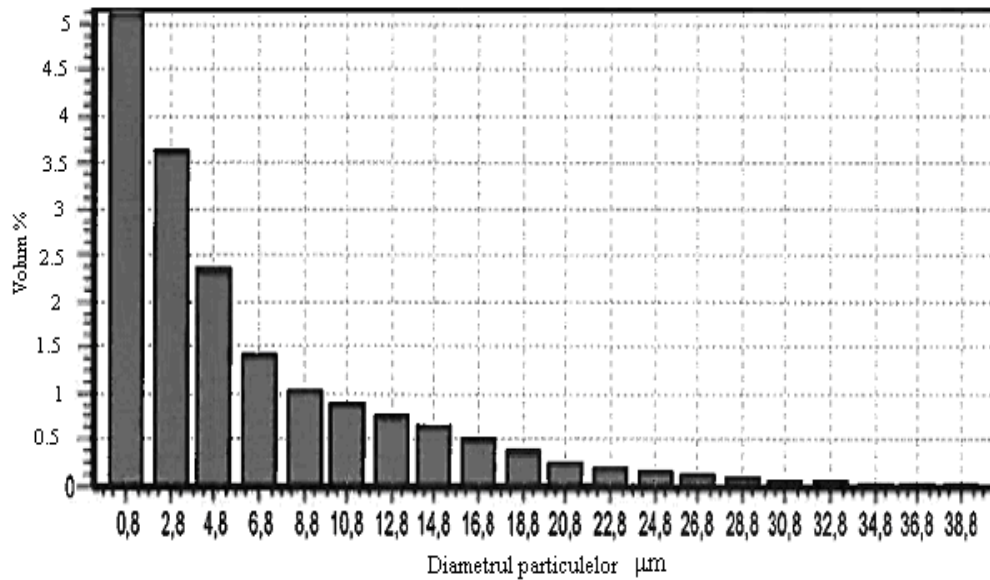


Figura 98. - Domeniul variației diametrului mediu al particulelor din emulsia 20% UA/A obținut prin aplicarea softwerului aparatului Mastersizer (UA= ulei de armurariu, A=apă)

În cazul emulsiilor 20% U/A a uleiului de șofrănel rezultatul distribuției bimodale a mărimii picăturilor ca și domeniul de variație al diametrului particulelor sunt prezentate în figurile 99 și 100.

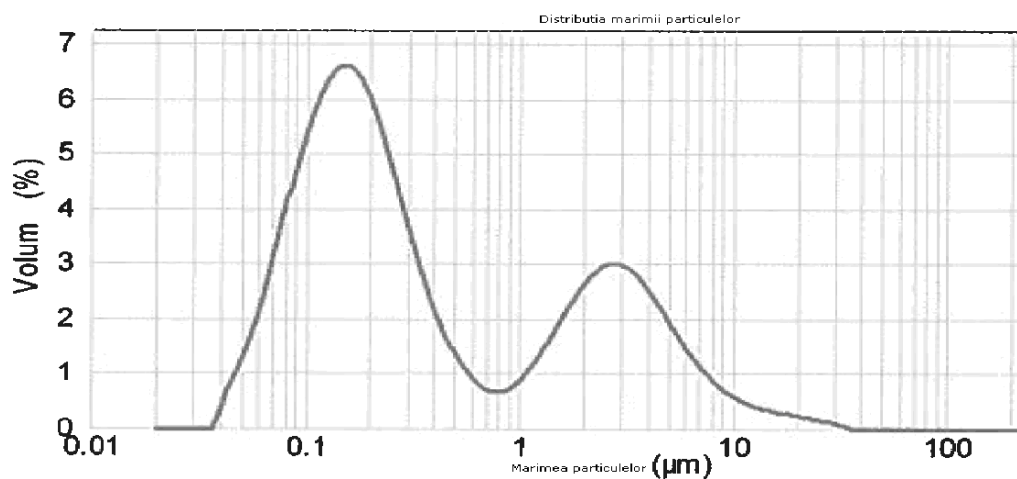


Figura 99. - Distribuția mărimii particulelor în emulsia 20% U/A a uleiului de șofrănel

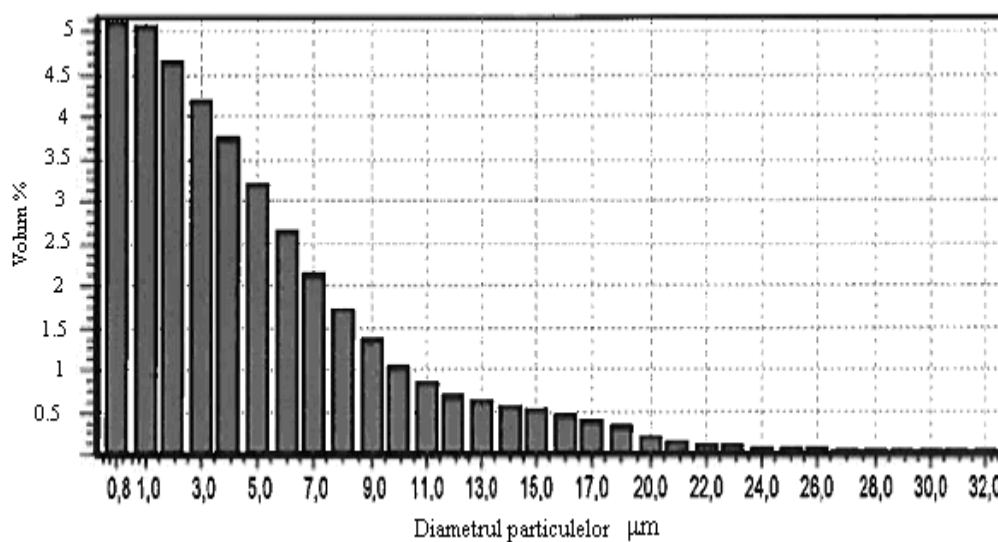


Figura 100. - Domeniul variației diametrului mediu al particulelor din emulsia 20% US/A obținut prin aplicarea softwerului aparatului Mastersizer (US= ulei de șofrănel)

Din valorile diametrului particulelor celor două emulsii cu aspect alb-lăptos se observă că emulsia uleiului de șofrănel prezintă picături cu diametru mai mic,

viscozitatea acesteia fiind de asemenea mai redusă, 12 cP față de 24 cP viscozitatea emulsiei uleiului de armurariu.

Păstrate la temperatură ambiantă timp de 90 de zile emulsiile și-au dovedit stabilitatea.

Degradarea oxidativă a uleiurilor respectiv a emulsiilor 20% U/A ale acestora stabilită pe baza indicilor de peroxid

Variația valorilor indicelui de peroxid pentru cele două uleiuri sunt redată în tabelele 41 și 43, iar dependența indicelui de peroxid (IP) funcție de timp pe parcursul oxidării probelor de ulei cu adaos de extracte și antioxidanți sintetici în condiții de lumină, temperatură ambiantă, pe o perioadă de 35 de zile este redată în figurile 101, 102, 105 și 106.

Tabelul 41.

Variația indicilor de peroxid în timp la uleiul de armurariu păstrat la temperatura de 25°C, la lumină în sticle de culoare închisă

Ziua	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
0	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
2	4,0	2,8	2,8	3,6	3,2	2,8	2,8
4	6,4	4,2	3,6	4,0	3,8	3,6	3,6
7	9,2	5,4	4,8	4,6	4,2	4,8	6,4
10	13,8	6,6	5,6	5,6	4,8	6,0	11,2
15	15,2	9,8	7,4	9,2	7,6	6,8	12,0
20	16,4	10,4	10,6	10,0	10,4	8,0	18,8
25	21,6	10,8	11,2	10,4	10,4	11,6	19,8
35	42,8	27,8	26,8	25,2	25,6	28,4	39,4

UA = ulei de armurariu; P1 = ulei control; P2 = UA + 0,1% extract afine; P3 = UA + 0,5% extract afine; P4 = UA + 0,1% extract merișor; P5 = UA + 0,5% extract merișor; P6 = UA + 200 ppm BHT; P7 = UA + 200 ppm vit C

Figurile 101 și 102 arată o creștere relativă a indicelui de peroxid pentru **uleiul de armurariu** (*Silybum marianum*) stabilizat cu extracte de fructe de *Vaccinium vitis-idaea*, respectiv *Vaccinium myrtillis* la două concentrații diferite.

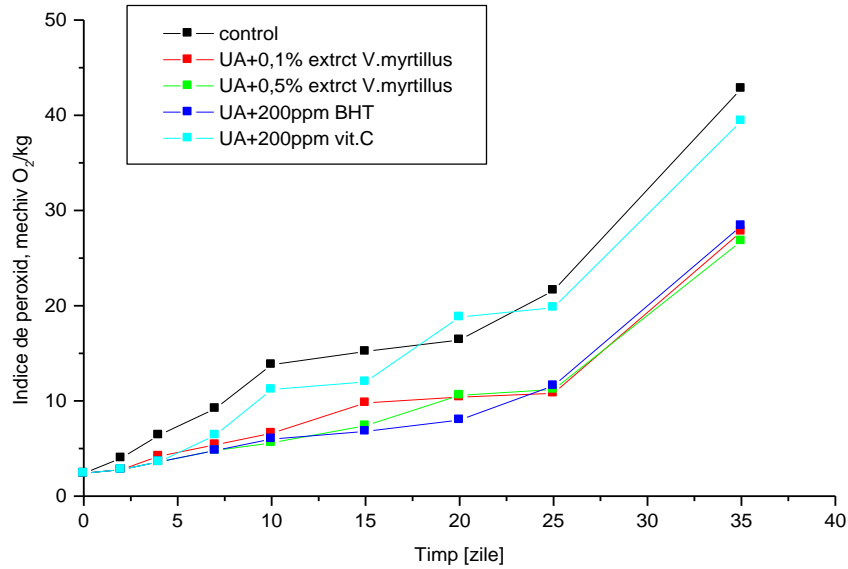


Figura 101. - Variația indicilor de peroxid a uleiului de armurariu cu adaus de extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* față de probele cu adaus de antioxidanți sintetici

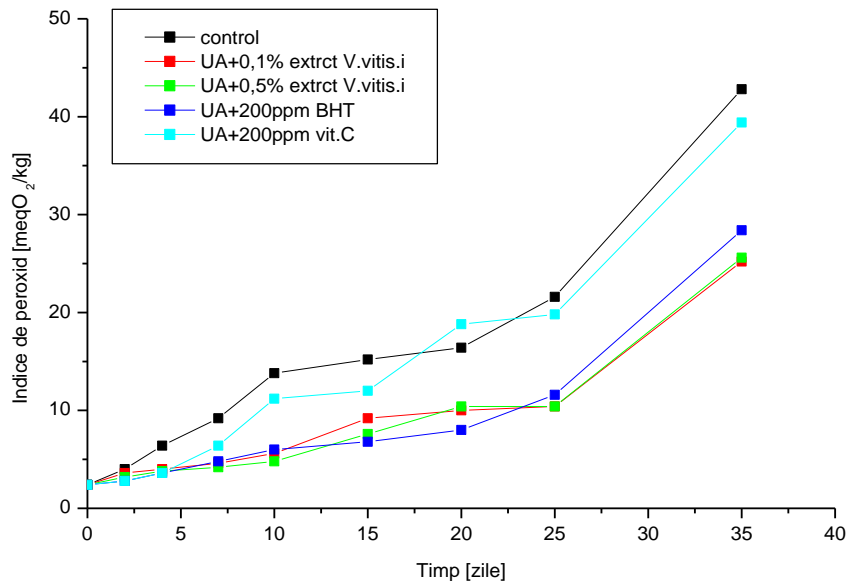


Figura 102. - Variația indicilor de peroxid a uleiului de armurariu cu adaus de extract din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* față de probele cu adaus de antioxidanți sintetici

Rezultatele obținute sunt următoarele:

- Pentru toate probele s-a înregistrat o creștere a indicelui de peroxid;
- Pentru proba martor (fără extract) valorile indicelui de peroxid au fost mai mari indicând astfel un grad de oxidare mai înalt. Cantitatea de peroxizi în cazul probei martor a corespuns după 35 zile unei valori de 42,8 meq O₂/ kg ulei față de valoarea inițială de 2,4 meq O₂/ kg ulei. Aceasta corespunde unei creșteri de aproximativ 20 de ori a indicelui de peroxid.
- Până în ziua 20, cel mai bun efect de protecție l-a manifestat antioxidantul sintetic t-butilhidroxitoluenul (BHT), dar apoi acesta este înlocuit de extractele de fructe de pădure. După ziua 21 se evidențiază efectul antioxidant superior al extractelor de fructe de pădure care variază în ordinea:

extract de *Vaccinium vitis-idaea* > extract de *Vaccinium myrtillus*

- Valoarea indicelui de peroxid pentru vitamina C este mai scăzută decât pentru proba martor (cu 3,4%) dar mai mare (12-14%) decât cel al extractelor din fructe la sfârșitul experimentului. Cu alte cuvinte, antioxidantul natural vitamina C, folosit curent în industria alimentară, farmaceutică și cosmetică are o eficiență inferioară celor două extracte din fructe de pădure. O mențiune specială, în ziua 20 valoarea indicelui de peroxid pentru proba de ulei cu adaos de vitamina C este mai mare ceea ce ar corespunde unui efect prooxidant determinat de aceasta. Din ziua 25 însă, se manifestă acțiunea antioxidantă a acesteia.
- Rezultatele obținute demonstrează că extractele din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* cu un conținut de antocianine exprimat în echivalenți de cianidină de $3,414 \cdot 10^{-3}$ g cianidină/L extract *Vaccinium myrtillus*, respectiv $3,309 \cdot 10^{-3}$ g cianidină/L extract *Vaccinium vitis-idaea* (extract adăugat în probele de ulei 0,1%, v/v), respectiv de polifenoli totali exprimat ca echivalenți acid galic (g GAE/L extract) $6,134 \cdot 10^{-3}$ g GAE/L extract *Vaccinium myrtillus* și 6,018 g GAE/L extract *Vaccinium vitis-idaea* (extract 0,1%, v/v), precum și cu un conținut de $17,07 \cdot 10^{-3}$ g cianidină/L, $30,67 \cdot 10^{-3}$ g GAE/L extract *Vaccinium myrtillus* (0,5% extract adăugat în probele de ulei, v/v), $16,545 \cdot 10^{-3}$ g cianidină/L, $30,09 \cdot 10^{-3}$ g GAE/L extract *Vaccinium vitis-idaea* (0,5% extract adăugat în probele de ulei, v/v) adăugate probelor de ulei confirmă încetinirea procesului de degradare oxidativă a uleiului de *Silybum marianum*. Evident că în probele în care concentrația în antioxidanți a extractelor a fost mai mare rezultatele sunt superioare.

Procesul de oxidare urmărit la temperatura camerei a emulsiei 20% ulei de armurariu în apă exprimat prin valorile indicilor de peroxid este prezentat în tabelul 42 respectiv figurile 103 și 104.

Tabelul 42.
 Valorile indicilor de peroxid pentru emulsiile 20% ulei armurariu în apă, păstrate la temperatura de 25 °C, lumină, în sticle de culoare închisă, timp de 8 zile

Ziua	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
1	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
2	2,2	1,9	1,8	1,8	1,6	1,4	2,1
3	3,1	2,2	1,95	1,95	1,8	1,5	2,8
4	5,8	3,6	3,6	3,6	3,2	1,9	5,2
5	7,2	5,8	5,4	5,2	4,9	4,8	6,8
6	9,4	7,4	7,0	7,0	6,7	5,1	8,8
7	15,6	10,8	10,2	10,4	9,8	7,6	15,6
8	22,8	17,6	16,5	15,2	15,0	12,4	22,4

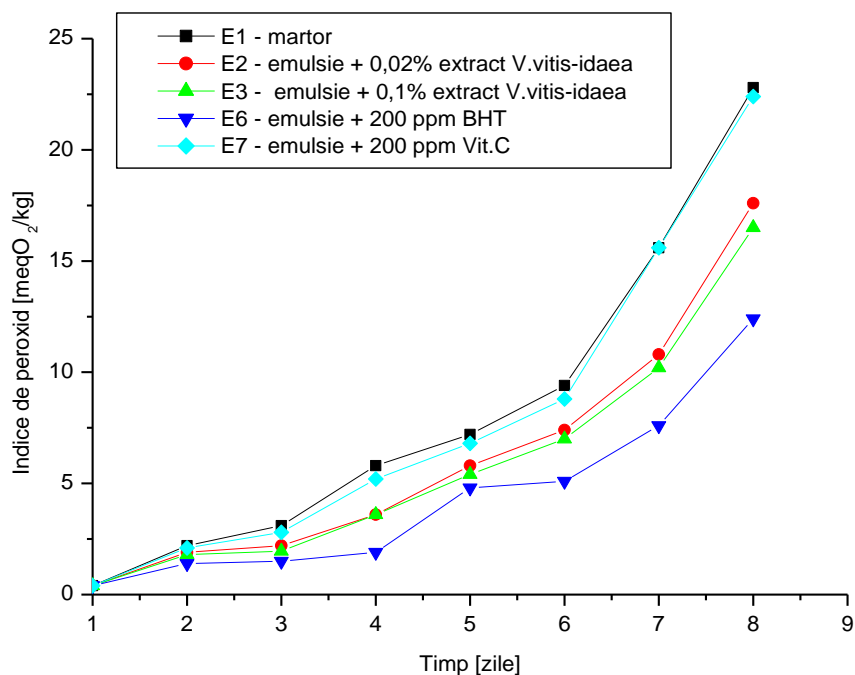


Figura 103. - Variația indicilor de peroxid a emulsiilor cu adaus de extract din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* față de probele cu adaus de antioxidanți sintetici

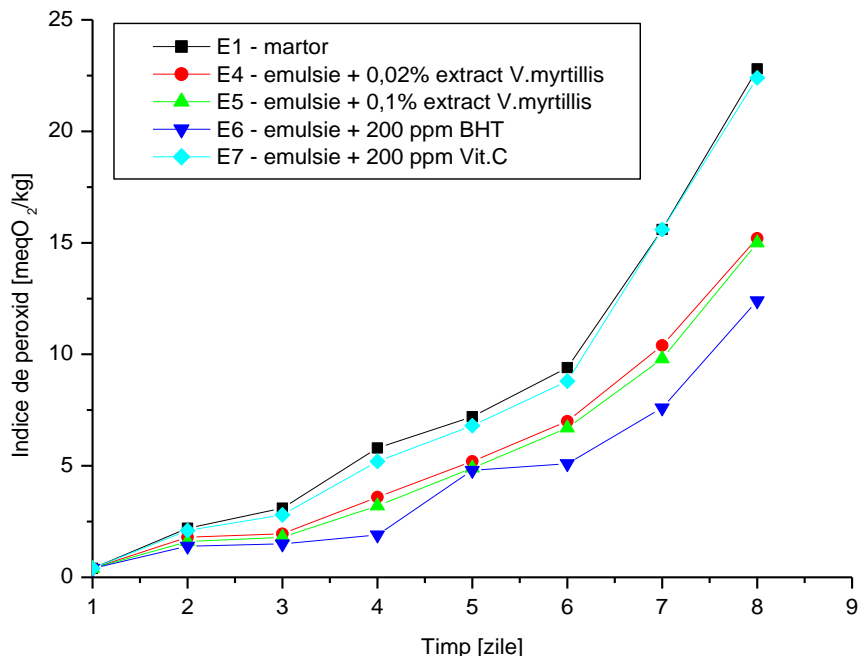


Figura 104. - Variația indicilor de peroxid a emulsiilor cu adaus de extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* față de probele cu adaus de antioxidanți sintetici

Oxidarea emulsiilor 20% U/A păstrate la temperatura camerei, la lumină în sticle de culoare închisă a fost urmărită pe un interval de 8 zile. Analiza rezultatelor obținute a condus la următoarele concluzii:

- Pentru toate probele s-a înregistrat o creștere a valorii indicelui de peroxid;
- În emulsie efectul antioxidant al antioxidantului de sinteză t-butilhidroxitoluen (BHT) a fost superior antioxidantului natural, vitamina C;
- În emulsie efectul antioxidant al antioxidantului de sinteză t-butilhidroxitoluen (BHT) este superior față de cel al unor probe în care concentrația de antioxidanți naturali este de 5 ori mai mică decât în probele de ulei ceea ce demonstrează o limită pentru concentrația minimă de antioxidanți naturali;
- În același timp a fost dovedit efectul protector față de oxidare al extractelor naturale prezente în emulsii ceea ce deschide posibilități variate de folosire a lor în special în sistemele proprii produselor alimentare.

Verificarea rezultatelor obținute pentru uleiul de armurariu și emulsia sa 20% U/A, s-a făcut prin efectuarea aceluiași determinări pe un alt ulei, respectiv

emulsia acestuia, păstrând aceleași concentrații ale componentilor, ulei de sofrănel, cu un conținut mai mare de acizi grași nesaturați, deci mult mai susceptibil la oxidare, folosind atât extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* cât și extract din fructe de *Vaccinium vitis-idaea*.

Pentru probele de **ulei de sofrănel** rezultatele experimentale cu privire la indicii de peroxid sunt prezentați în tabelul 43 respectiv figurile 105 și 106.

Tabelul 43.

Variația indicilor de peroxid pentru uleiul de sofrănel păstrat la temperatura de 25°C, la lumină în sticle de culoare închisă

Ziua	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14
0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
2	8,0	4,2	1,8	3,8	2,0	2,0	5,2
4	10,2	5,8	2,0	5,4	2,6	3,2	6,4
7	16,4	8,2	3,6	7,6	3,2	4,0	8,8
10	22,2	12,4	5,2	9,4	4,6	4,0	16,4
15	28,4	18,4	6,0	12,0	8,0	6,0	24,4
20	34,0	26,4	12,4	16,0	9,8	8,8	32,4
25	42,4	38,0	16,8	28,0	17,2	10,8	38,4
35	46,8	40,6	34,8	38,2	33,8	26,8	44,8

US = ulei de sofrănel; P8 = ulei control; P9 = US + 0,1% extract afine; P10 = US + 0,5% extract afine; P11 = US + 0,1% extract merișor; P12 = US + 0,5% extract merișor; P13 = US + 200 ppm BHT; P14 = US + 200ppm vit C

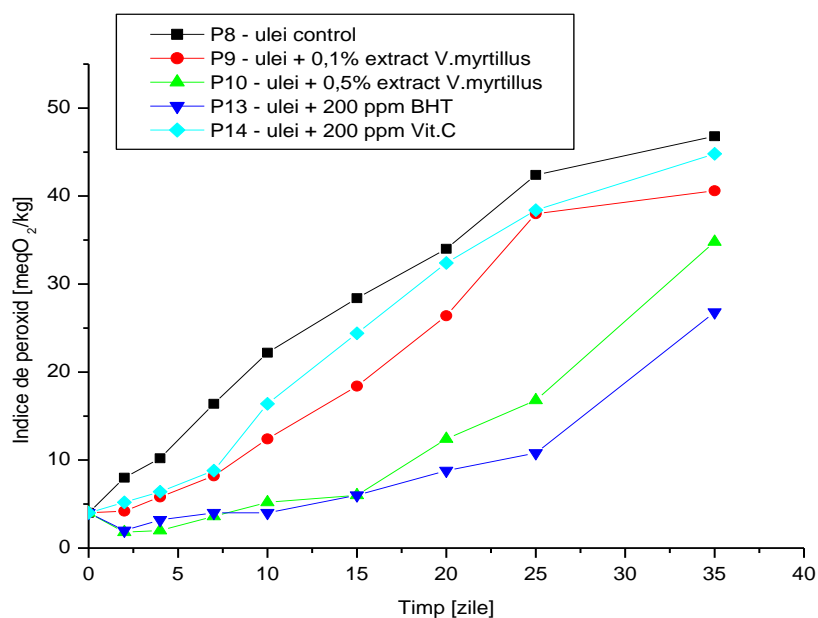


Figura 105. - Variația indicilor de peroxid a uleiului de sofrănel cu adaus de extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* față de probele cu adaus de antioxidanți sintetici

Activitatea antioxidantă a extractelor din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* în **uleiul de sofrănel** expus la lumină și temperatură ambiantă, timp de 35 de zile a fost confirmată prin urmărirea variației indicelui de peroxid.

Din valorile determinate experimental pentru acesta se pot trage următoarele concluzii:

- Dacă valoarea indicelui de peroxid depășește valoarea 10 pentru uleiul control încă din ziua 10, pentru probele protejate prin adaos de antioxidanți intervalul de timp se modifică:
 - după ziua 7 pentru proba cu adaos de antioxidant natural vitamina C
 - după ziua 25 pentru proba cu adaos de antioxidant de sinteză t-butil-hidroxitoluen (BHT)
 - după ziua 10-15 pentru probele cu adaos de extracte în care concentrația în antioxidanți naturali (polifenoli totali respectiv antocianine totale exprimate prin echivalenți de acid galic respectiv cianidină) a fost 0,1%
 - după ziua 20 pentru ambele tipuri de extracte cu concentrația de antioxidanți naturali echivalentă de 0,5%
- după atingerea „valorii critice” de 10-12 a indicelui de peroxid, activitatea protectoare a tuturor antioxidanților folosiți în experimente scade în măsură mai mare sau mai mică (pentru BHT); o explicație ar putea-o constitui natura substratului susceptibil la oxidare care poate ar necesita o concentrație mai mare a tuturor antioxidanților luați în lucru.

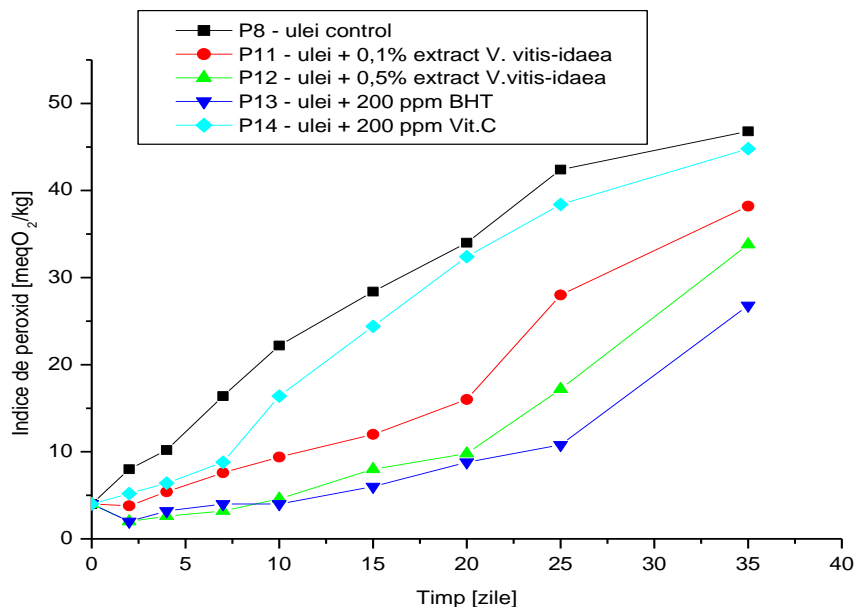


Figura 106. -Variația indicilor de peroxid a uleiului de sofrănel cu adaos de extract din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* față de probele cu adaos de antioxidanți sintetici

Urmărirea procesului de oxidare pentru emulsia 20% ulei de șofranel în apă, păstrată la temperatura de 25°C în sticle închise la culoare s-a realizat prin determinarea valorilor indicelui de peroxid (tabelul 44) folosind în principiu același tip de probe și timp de urmărire a oxidării ca în cazul emulsiilor precedente, din ulei de armurariu.

Dependența indicelui de peroxid funcție de timp pe parcursul oxidării emulsiei uleiului de șofranel cu adaus de extracte naturale și antioxidanți sintetici este redată în figurile 107 și 108.

Tabelul 44.

Valorile indicilor de peroxid pentru emulsiile 20% ulei de șofranel în apă, păstrate la temperatura de 25 °C, lumină, în sticle de culoare închisă, timp de 8 zile

Ziua	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14
1	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
2	3,2	1,9	1,8	1,8	1,6	1,4	3,1
3	4,1	3,2	1,95	2,95	1,8	1,5	4,8
4	7,8	5,6	3,6	5,6	3,2	2,2	8,2
5	10,2	9,8	6,4	8,2	5,6	3,8	12,8
6	14,4	11,4	7,6	10,0	7,55	4,2	18,8
7	18,6	16,8	11,2	15,4	10,8	7,6	25,6
8	25,2	21,6	16,5	21,2	15,0	10,4	27,4

E8 = proba martor, E9 = emulsie + 0,02% extract de *Vaccinium vitis idaea*, E10 = emulsie + 0,1% extract de *Vaccinium vitis idaea*, E11 = emulsie + 0,02% extract de *Vaccinium myrtillus*, E12 = emulsie + 0,1% extract de *Vaccinium myrtillus*, E13 = emulsie + 200 ppm BHT, E14 = emulsie + 200 ppm vitamina C

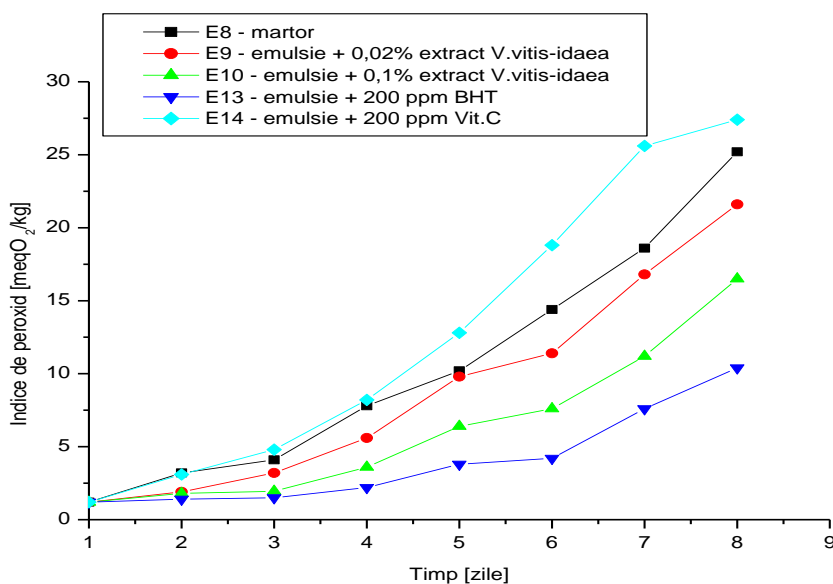


Figura 107. – Variația indicilor de peroxid a emulsiilor cu adaus de extract din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* față de probele cu adaus de antioxidanți sintetici

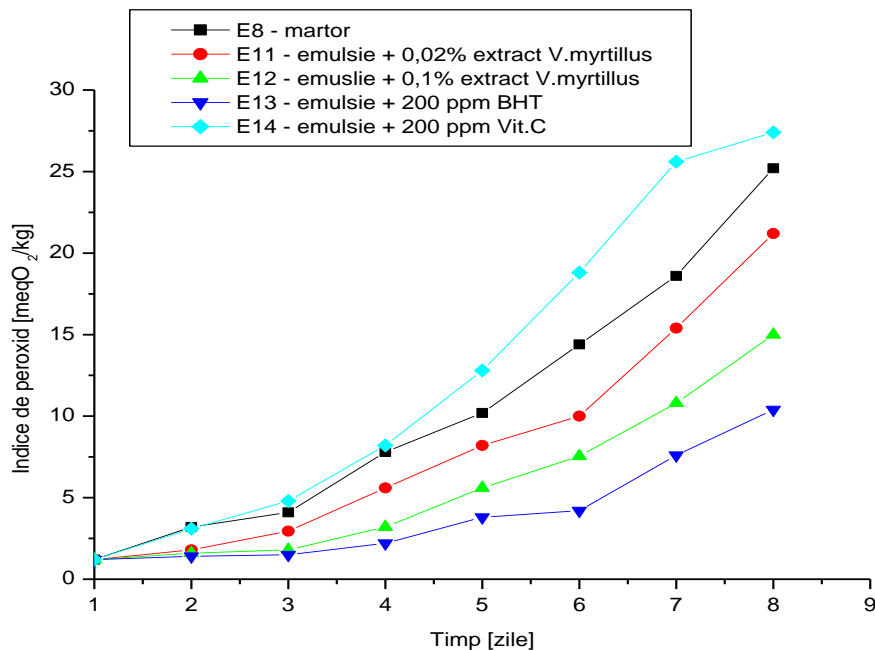


Figura 108. - Variația indicilor de peroxid a emulsiilor cu adaus de extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* față de probele cu adaus de antioxidanți sintetici

Din valorile obținute se pot trage următoarele concluzii:

- indicele de peroxid depășește „valoarea critică” de 10 în ziua a 5-a pentru emulsia martor, netratată cu antioxidanți;
- pentru probele de emulsie 20% ulei de șofrănel/apă protejate cu adaus de antioxidanți, intervalul de timp după care se depășește valoarea 10 pentru indicele de peroxid se modifică:
 - după ziua 4 pentru proba cu adaus de antioxidant natural, vitamina C;
 - după ziua 8 pentru proba cu adaus de antioxidant de sinteză t-butilhidroxitoluen, BHT;
 - după ziua 5 respectiv 6 pentru probele cu adaus de extracte ce corespund concentrației inferioare de principii active, antioxidanți;
 - în ziua 7 pentru ambele tipuri de extracte prezente în probe la concentrație mai mare ale antioxidanților (polifenoli respectiv antocianine totale);
- de menționat că, în cazul emulsiei 20% ulei de șofrănel/apă pentru concentrația superioară de antioxidant adăugat în aceasta, intervalul de timp în care antioxidanții naturali își manifestă efectul protector (apreciat prin valoarea indicelui de peroxid) diferă doar cu o zi față de cel al emulsiei ce conține antioxidant de sinteză, BHT.

Determinarea spectrofotometrică a dienelor (CD) și trienelor (CT) conjugate

Determinările spectrofotometrice pentru determinarea prezenței dienelor și trienelor prin măsurarea absorbției la 232 nm pentru diene și 268 nm pentru triene au fost făcute în paralel pentru uleiul de armurariu și emulsia 20% ulei de armurariu în apă respectiv pentru uleiul de șofrănel și emulsia sa 20% U/A ca atare, cât și pentru probele tratate cu antioxidant de sinteză t-butil-hidroxitoluen, cu antioxidant natural, vitamina C și pentru câte două probe ce conțin extracte din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine) respectiv *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare) în concentrație diferită, păstrate la temperatura de 25°C, în sticle de culoare închisă. În cazul probelor de ulei absorbția acestora a fost urmărită timp de 35 de zile iar în cazul emulsiilor absorbția probelor a fost citită zilnic și urmărită timp de 8 zile

Tabelul 45.

Creșterea conținutului de diene conjugate în uleiul de Silybum marianum stabilizat cu extracte naturale în comparație cu antioxidanții sintetici

Proba	Perioada de păstrare (zile)								
	0	2	4	7	10	15	20	25	35
P1	0,09	0,093	0,109	0,210	0,375	0,426	0,531	0,632	0,991
P2	0,09	0,100	0,101	0,193	0,294	0,372	0,446	0,510	0,778
P3	0,09	0,092	0,102	0,189	0,289	0,371	0,429	0,510	0,675
P4	0,09	0,101	0,108	0,179	0,273	0,359	0,396	0,458	0,612
P5	0,09	0,102	0,106	0,176	0,271	0,349	0,381	0,449	0,610
P6	0,09	0,091	0,101	0,172	0,261	0,334	0,406	0,500	0,608
P7	0,09	0,101	0,112	0,181	0,293	0,378	0,461	0,590	0,867

P1=proba martor, P2=ulei+0,1% extract de *Vaccinium myrtillus*, P3 = ulei + 0,5% extract de *Vaccinium myrtillus*, P4 = ulei + 0,1% extract de *Vaccinium vitis idaea*, P5 = ulei + 0,5% extract de *Vaccinium vitis idaea*, P6 = ulei + 200 ppm BHT, P7 = ulei + 200 ppm vitamina C

Tabelul 46.

Creșterea conținutului de diene conjugate în emulsia 20% ulei de Silybum marianum în apă, stabilizată cu extracte naturale comparativ cu antioxidanții sintetici

Proba	Perioada de păstrare (zile)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
E1	0,193	0,295	0,469	0,510	0,656	0,932	1,265	1,692
E2	0,197	0,211	0,401	0,495	0,644	0,725	0,841	1,129
E3	0,173	0,291	0,311	0,498	0,521	0,613	0,891	1,101
E4	0,129	0,219	0,308	0,471	0,537	0,696	0,936	0,988
E5	0,098	0,128	0,265	0,377	0,512	0,649	0,803	0,945
E6	0,09	0,111	0,213	0,352	0,416	0,536	0,601	0,690
E7	0,109	0,115	0,312	0,482	0,692	0,785	0,912	1,359

E1 = proba martor, E2 = emulsie + 0,02% extract de *Vaccinium vitis idaea*, E3 = emulsie + 0,1% extract de *Vaccinium vitis idaea*, E4 = emulsie + 0,02% extract de *Vaccinium myrtillus*, E5 = emulsie + 0,1% extract de *Vaccinium myrtillus*, E6 = emulsie + 200 ppm BHT, E7 = emulsie + 200 ppm vitamina C

Tabelul 47.

Creșterea conținutului de diene conjugate în uleiul de șofrănel stabilizat cu extracte naturale în comparație cu antioxidanții sintetici

Proba	Perioada de păstrare (zile)								
	0	2	4	7	10	15	20	25	35
P8	0,11	0,149	0,280	0,323	0,492	0,598	0,731	0,821	1,063
P9	0,11	0,137	0,192	0,291	0,366	0,511	0,645	0,721	0,896
P10	0,11	0,141	0,193	0,281	0,334	0,499	0,687	0,689	0,741
P11	0,11	0,137	0,197	0,273	0,368	0,457	0,687	0,687	0,741
P12	0,11	0,137	0,198	0,269	0,359	0,461	0,679	0,691	0,723
P13	0,11	0,113	0,178	0,258	0,371	0,491	0,672	0,712	0,763
P14	0,11	0,125	0,221	0,293	0,409	0,576	0,683	0,796	0,987

P8=proba martor; P9=ulei+0,1% extract *Vaccinium myrtillus*; P10=ulei+0,5% extract *Vaccinium myrtillus*; P11=ulei+0,1% extract *Vaccinium vitis-idaea*; P12=ulei+0,5% extract *Vaccinium vitis-idaea*; P13=ulei+200 ppm BHT; P14=ulei+200 ppm vitamina C

Tabelul 48.

Creșterea conținutului de diene conjugate în emulsia 20% ulei de șofrănel în apă, stabilizată cu extracte naturale comparativ cu antioxidanții sintetici

Proba	Perioada de păstrare (zile)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
E8	0,108	0,125	0,176	0,201	0,237	0,542	0,683	0,917
E9	0,102	0,110	0,142	0,193	0,214	0,287	0,521	0,723
E10	0,097	0,103	0,137	0,185	0,211	0,274	0,455	0,701
E11	0,098	0,102	0,122	0,187	0,214	0,263	0,461	0,635
E12	0,086	0,091	0,109	0,173	0,198	0,211	0,421	0,612
E13	0,075	0,095	0,116	0,184	0,205	0,262	0,451	0,623
E14	0,112	0,132	0,154	0,198	0,221	0,315	0,487	0,764

E8- proba martor; E9 - emulsie + 0,02% extract *Vaccinium vitis-idaea*; E10 - emulsie + 0,1% extract *Vaccinium vitis-idaea*; E11 - emulsie + 0,02% extract *Vaccinium myrtillus*; E12 - emulsie + 0,1% extract *Vaccinium myrtillus*; E13 - emulsie + 200 ppm BHT; E14 - emulsie + 200 ppm Vitamina C

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelele 45-48 și au permis stabilirea următoarelor:

- în ceea ce privește conținutul de diene conjugate din probe:
 - pentru proba martor conținutul de diene crește continuu în timp cu același procent pentru ambele tipuri de uleiuri, indiferent de compoziția în acizi grași a acestora;
 - se poate afirma că, procentul de creștere al conținutului de diene final față de cel inițial este același și în cazul celor două tipuri de emulsii și comparabil cu cel al uleiului ca atare;
 - creșterea în timp a procentului de diene din probele tratate cu antioxidanți a variat astfel:

- pentru probele ce conțin antioxidant de sinteză, t-butilhidroxitoluen, BHT, creșterea înregistrată în ziua 35 pentru cele două uleiuri a fost de 7 ori mai mare, respectiv de aproximativ 8 ori pentru cele două tipuri de emulsii la finalul experimentului;
- în cazul probelor de ulei tratate cu cele două tipuri de extracte cu concentrații inferioare ale conținutului în antioxidanți naturali, creșterea a fost în mod inexplicabil mai mare sau cel mult egală pentru uleiul mai saturat, uleiul de armurariu (*Silybum marianum*). În cazul uleiului mai nesaturat, uleiul de șofrănel, creșterea conținutului de diene a fost asemănătoare dar pentru extractul din fructe de *Vaccinium myrtillus* adăugat în concentrație de 0,5% s-a manifestat efectul antioxidant al acestuia printr-o multiplicare mult mai redusă a conținutului de diene
- adaosul de vitamina C ca antioxidant în probele de ulei sau în emulsiile 20% U/A s-a dovedit a avea cel mai slab efect protector de inhibare a formării dienelor pentru ambele tipuri de ulei folosite

Determinarea spectrofotometrică a trienelor formate pe parcursul proceselor de oxidare a uleiurilor și emulsiilor s-a făcut prin măsurarea absorbantei la 268 nm (tabelele 49-52).

Tabelul 49.

Creșterea conținutului de triene conjugate în uleiul de Silybum marianum stabilizat cu extracte naturale comparativ cu antioxidanții sintetici

Proba	Perioada de păstrare (zile)								
	0	2	4	7	10	15	20	25	35
P1	0,232	0,310	0,471	0,529	0,710	0,921	1,090	1,211	1,379
P2	0,232	0,303	0,381	0,461	0,511	0,691	0,801	0,916	1,093
P3	0,232	0,306	0,397	0,451	0,510	0,680	0,799	0,921	1,009
P4	0,232	0,259	0,371	0,458	0,537	0,619	0,731	0,857	0,991
P5	0,232	0,269	0,378	0,441	0,531	0,602	0,711	0,857	0,989
P6	0,232	0,300	0,381	0,450	0,501	0,691	0,791	0,871	1,013
P7	0,232	0,309	0,420	0,510	0,681	0,833	0,900	0,998	1,136

Valorile dienelor și trienelor conjugate exprimate ca absorbantă la 232 nm și 268 nm a 50 mg fracțiune uleioasă extrasă din emulsie.

Tabelul 50.

Creșterea conținutului de triene conjugate în emulsia 20% ulei de Silybum marianum în apă, stabilizată cu extracte naturale comparativ cu antioxidanții sintetici

Proba	Perioada de păstrare (zile)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
E1	0,232	0,313	0,471	0,696	0,911	1,115	1,903	2,323
E2	0,231	0,303	0,389	0,416	0,511	0,912	1,019	1,916
E3	0,225	0,302	0,375	0,415	0,509	0,680	0,998	1,908
E4	0,228	0,297	0,371	0,403	0,531	0,719	0,931	1,873
E5	0,221	0,269	0,348	0,398	0,514	0,702	0,919	1,857
E6	0,214	0,273	0,319	0,381	0,501	0,761	0,929	1,279
E7	0,232	0,398	0,421	0,519	0,881	1,133	1,399	1,998

Tabelul 51.

Creșterea conținutului de triene conjugate în uleiul de șofrănel stabilizat cu extracte naturale comparativ cu antioxidanții sintetici

Proba	Perioada de păstrare (zile)								
	0	2	4	7	10	15	20	25	35
P8	0,391	0,480	0,700	0,841	1,096	1,301	1,612	1,821	1,992
P9	0,391	0,455	0,682	0,735	0,961	1,200	1,601	1,791	1,823
P10	0,391	0,458	0,651	0,711	0,932	1,198	1,600	1,780	1,821
P11	0,391	0,473	0,632	0,751	0,981	1,199	1,621	1,781	1,857
P12	0,391	0,462	0,612	0,749	0,973	1,187	1,612	1,781	1,910
P13	0,391	0,439	0,596	0,720	0,887	1,109	1,545	1,750	1,786
P14	0,391	0,451	0,601	0,731	0,910	1,362	1,611	1,866	2,120

P8=proba martor; P9=ulei+0,1% extract *Vaccinium myrtillus*; P10=ulei+0,5% extract *Vaccinium myrtillus*; P11=ulei+0,1% extract *Vaccinium vitis-idaea*; P12=ulei+0,5% extract *Vaccinium vitis-idaea*; P13=ulei+200 ppm BHT; P14=ulei+200 ppm vitamina C

Tabelul 52.

Creșterea conținutului de triene conjugate în emulsia 20% ulei de șofrănel în apă, stabilizată cu extracte naturale comparativ cu antioxidanții sintetici

Proba	Perioada de păstrare (zile)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
E8	0,162	0,192	1,113	1,352	1,576	1,892	1,926	2,065
E9	0,159	0,188	1,057	1,216	1,451	1,732	1,924	2,179
E10	0,151	0,183	1,012	1,132	1,331	1,567	1,891	2,011
E11	0,147	0,187	1,024	1,114	1,278	1,512	1,847	1,973
E12	0,139	0,174	0,197	1,036	1,212	1,426	1,764	1,914
E13	0,137	0,181	0,193	1,017	1,254	1,546	1,821	1,963
E14	0,160	0,187	1,013	1,275	1,695	1,965	2,055	2,321

E8- proba martor; E9 - emulsie + 0,02% extract *Vaccinium vitis-idaea*; E10 - emulsie + 0,1% extract *Vaccinium vitis-idaea*; E11 - emulsie + 0,02% extract *Vaccinium myrtillus*; E12 - emulsie + 0,1% extract *Vaccinium myrtillus*; E13 - emulsie + 200 ppm BHT; E14 - emulsie + 200 ppm Vitamina C

Rezultatele obținute au permis stabilirea următoarelor:

- pentru ambele probe martor de ulei conținutul de triene crește de peste 5 ori după 35 zile;
- pentru probele martor reprezentate de cele două emulsii creșterea conținutului de triene după 8 zile este mult mai mare (dublu) față de uleiurile ca atare și mai pregnantă pentru emulsia 20% ulei de șofrănel în apă;
- ambele tipuri de emulsii tratate cu antioxidantul de sinteză t-butilhidroxitoluen, BHT, s-au dovedit a fi mult mai bine protejate comparativ cu celelalte probe; evident că protecția a fost mai bună pentru emulsia pe bază de ulei cu conținut mai mic de acizi grași polinesaturați (ulei de armurariu);
- activitatea de protecție a celor două tipuri de extracte din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* este comparabilă între ele atât pentru uleiul ce conține un procent de acizi grași saturați mai mare cât și pentru cel cu un procent mai mare de acizi grași polinesaturați;
- pentru uleiul de armurariu (*Silybum marianum*), efectul protector al celor două extracte la concentrație de 0,5% este comparabil, în ceea ce privește formarea de triene aciclice cu cel al probei cu adaos de antioxidant de sinteză, BHT;
- efectul de protecție al antioxidantilor naturali din cele două emulsii este inferior celor adăugați direct în ulei, comparabil cu cel al vitaminei C folosită ca agent de protecție; evident că efectul de protecție este mai mare față de uleiul mai saturat comparativ cu cel asupra uleiului cu un conținut mai ridicat de acizi grași polinesaturați.

Determinarea valorii indicelui de p-anisidină

Modificarea valorii indicelui de p-anisidină, care reprezintă produsele de oxidare secundare obținute în timpul degradării oxidative a uleiurilor dă indicații asupra procesului de autooxidare a acizilor grași din uleiuri, emulsii și alți componenți lipidici. Rezultatele obținute în urma determinării valorii acestui indice pe un interval de 35 zile pentru probele de ulei respectiv de 8 zile pentru probele de emulsii tratate cu antioxidanți conform experimentelor anterioare sunt reprezentate grafic în figurile 109 – 112.

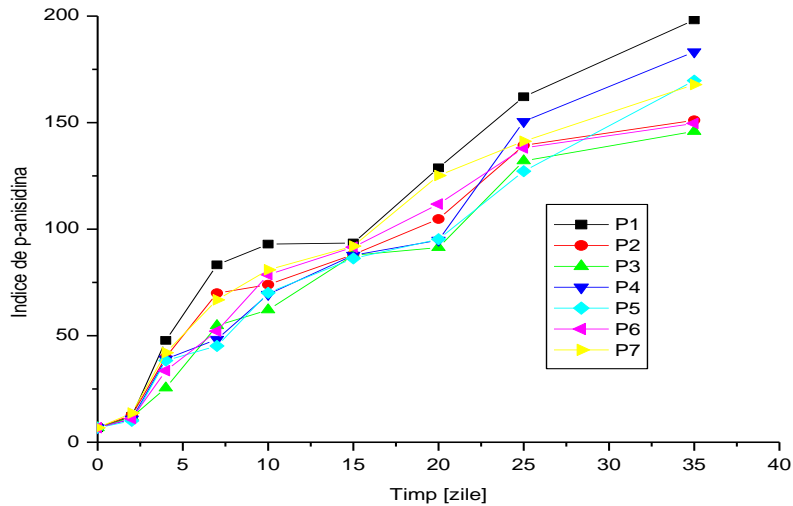


Figura 109. - Indicele de p-anisidină a uleiului de armurariu

Se poate observa că, formarea produselor secundare de oxidare s-a intensificat pe măsura avansării în timp a experimentelor. Valoarea indicelui de p-anisidină pentru proba martor a atins un maxim de 198,22, după 35 de zile de depozitare la temperatura camerei față de o valoare inițială de 6,81. O diferență semnificativă a fost remarcată între valorile probei martor și proba cu adaos de 0,5% extract de *Vaccinium vitis-idaea*.

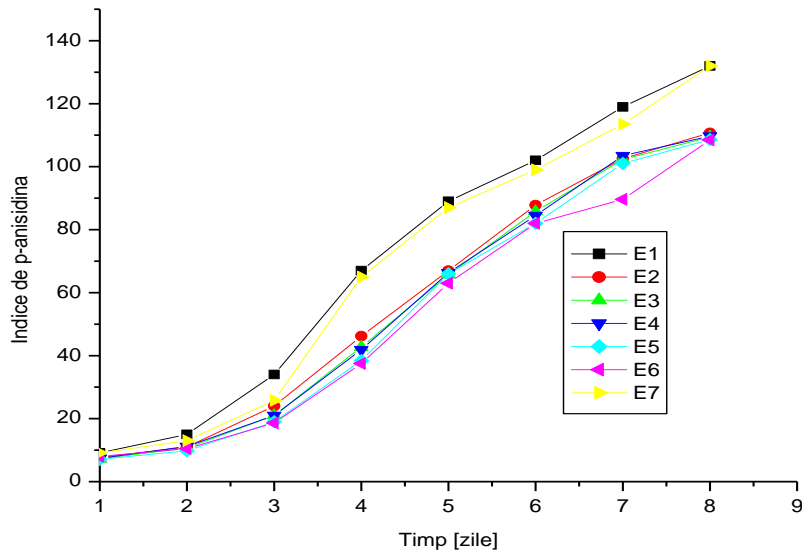


Figura 110. - Indicele de p-anisidină al emulsiei 20% U/A (ulei de armurariu)

S-a observat că pentru emulsiile 20% ulei de armuraniu (*Silybum marianum*) în apă protejate cu BHT și extracte de fructe de pădure indicii de p-anisidină au fost similari.

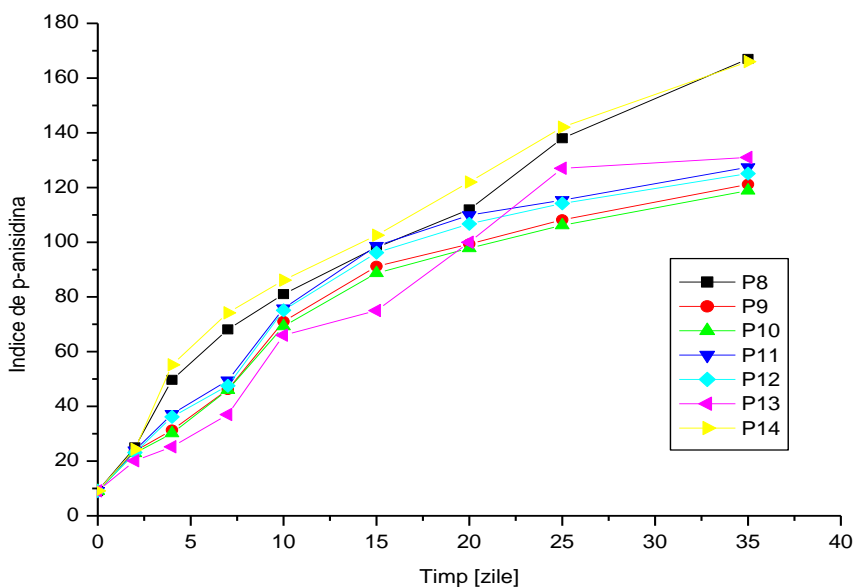


Figura 111. - Variația indicelui de p-anisidină al uleiului de sofrănel

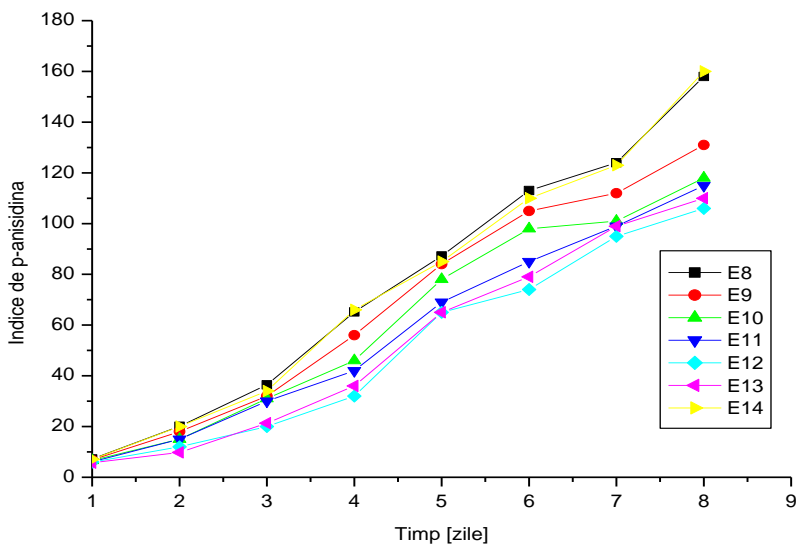


Figura 112. - Variația indicelui de p-anisidină al emulsiilor 20% U/A (ulei de sofrănel)

În cazul uleiului de șofrănel, valoarea cea mai mare a indicelui de p-anisidină s-a înregistrat la proba tratată cu vitamina C, aceasta manifestând în mod neașteptat un efect prooxidant. Până în ziua 20 cea mai mică valoare a indicelui de p-anisidină s-a înregistrat la proba tratată cu antioxidant de sinteză t-butil-hidroxitoluen, BHT. După această perioadă, s-a dovedit că cel mai bun efect l-a avut adaosul de extracte naturale în ordinea:

extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* adăugat în concentrație de 0,5% > extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* adăugat în concentrație de 0,1% > extract din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* adăugat în concentrație de 0,5% > extract din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* adăugat în concentrație de 0,1%.

Din analiza rezultatelor obținute în cazul emulsiilor 20% U/A (ulei de șofrănel), se evidențiază faptul că, în emulsia cu adaos de extract de *Vaccinium myrtillus* (concentrație 0,5% - proba E12) se înregistrează cea mai mică valoare a indicelui de p-anisidină iar cea mai mare valoare a acestuia se înregistrează în emulsia cu adaos de vitamina C.

Varițiile mari ale indicilor ce măsoară produșii de oxidare primari și secundari pentru toate probele de ulei luate în studiu se datorează atât mecanismului radicalic al procesului de oxidare cât și conținutului de acizi grași polinesaturați ai uleiurilor studiate. Așa cum era de așteptat toți acești parametri variază crescător pe parcursul oxidării.

Valorile indicilor de peroxid sunt un indiciu clar al autooxidării lipidelor. Pentru o mai bună confirmare a acestor rezultate, au fost măsurați și alți parametri de oxidare ca de exemplu: valoarea dienelor și trienelor conjugate și valoarea indicelui de p-anisidină. Valorile PV, CD, CT și a indicelui de p-anisidină a probelor cu adaos de extracte din fructe de pădure au fost semnificativ mai scăzute decât cele ale probei martor, fapt care indică efectul antioxidant al extractelor de fructe de pădure în protejarea uleiurilor vegetale.

Efectul antioxidantilor naturali este pozitiv, comparabil și în unele cazuri chiar mai bun decât al antioxidantului de sinteză BHT, des întâlnit în industria alimentară.

Rezultatele studiului realizat au făcut obiectul a două lucrări științifice [284, 285].

III.4.2. Efectul extractelor din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* asupra conținutului de compuși fenolici și asupra caracteristicilor cromatice ale vinurilor rosé și alb

Calitatea probelor de vin a fost determinată prin analize de rutină în conformitate cu International Organisation of Vine and Wine, (OIV) 2006 [261].

Rezultatele determinărilor analitice efectuate înainte de adăugarea extractelor în probele de vin sunt redată în tabelul 53.

Tabelul 53.

Compoziția, intensitatea și tonalitatea culorii vinurilor luate în studiu

Parametrii analizați	Rosé 2005	Rosé 2006	Riesling 2006
pH	3,18	3,25	2,97
Aciditate titrabilă (g acid tartric/L)	5,91	6,21	5,42
Antocianine totale (mg/L)	238	239	174
Polifenoli totali (mg GAE/L)	290,64	303,40	235,45
Intensitatea culorii	0,68	0,64	0,08
Tonalitatea culorii	1,06	0,98	2,61

Compoziția, intensitatea, tonalitatea culorii mostrelor de vin au fost corespunzătoare, deci au asigurat acuratețea viitoarelor tratamente respectiv analize.

Probele de vin cu adaos de extracte din fructe de pădure au fost analizate pe parcursul a 2 luni.

În tabelele 54, 55, 56 este prezentată variația intensității culorii, calculată ca suma absorbanțelor probelor la trei lungimi de undă ($I.C.^* = A_{420} + A_{520} + A_{620}$) pentru cele 12 probe cu adaos de extracte.

Tabelul 54.

Intensitatea culorii, IC^ a probelor de vin rosé 2006 cu adaos de extracte naturale*

Ziua	P0	P1	P2	P3	P4	
0	0,64	0,68	0,76	0,75	0,70	
1	↓	0,65	0,65	0,72	0,68	
3		0,64	0,64	0,70	0,66	
5		0,62	0,62	0,69	0,65	
10		0,58	0,57	0,68	0,64	
15		0,57	0,55	0,67	0,61	
25		0,55	0,54	0,64	0,57	
35		0,54	0,53	0,61	0,57	
45		0,53	0,53	0,60	0,56	
		0,50				

P0=valorile intensității culorii probei martor, vin Rosé 2006

P1, P2, P3, P4 au aceeași semnificație ca în tabelul 7, subcapitolul II.7.2.

Tabelul 55.*Intensitatea culorii, IC* a probelor de vin rosé 2005 cu adaos de extracte naturale*

Ziua	P0	P5	P6	P7	P8	
0	0,68	0,71	0,70	0,86	0,80	
1	↓	0,70	0,69	0,85	0,79	
3		0,68	0,68	0,82	0,78	
5		0,66	0,67	0,81	0,77	
10		0,65	0,61	0,81	0,70	
15		0,64	0,60	0,76	0,70	
25		0,63	0,60	0,74	0,69	
35		0,60	0,59	0,73	0,68	
45		0,56	0,60	0,59	0,73	0,67

P0=valorile intensității culorii probei martor, vin Rosé 2005

P5, P6, P7, P8 au aceeași semnificați ca în tabelul 7, subcapitolul II.7.2.

Tabelul 56.*Intensitatea culorii, IC* a probelor de vin alb, Riesling 2006 cu adaos de extracte naturale*

Ziua	P0	P9	P10	P11	P12	
0	0,08	0,17	0,27	0,14	0,29	
1	↓	0,16	0,25	0,13	0,27	
3		0,14	0,25	0,13	0,23	
5		0,14	0,23	0,12	0,22	
10		0,12	0,19	0,10	0,17	
15		0,09	0,18	0,09	0,16	
25		0,09	0,18	0,08	0,14	
35		0,08	0,17	0,06	0,13	
45		0,03	0,07	0,08	0,05	0,13

P0=valorile intensității culorii probei martor, vin alb, Riesling 2006

P9, P10, P11, P12 au aceeași semnificați ca în tabelul 7, subcapitolul II.7.2.

În cazul tuturor probelor se observă o creștere a intensității culorii încă din momentul adaosului de extracte. În timp însă, aceasta scade și se stabilizează la o valoare întotdeauna mai mare decât cea a probelor martor.

Reprezentând grafic variația intensității culorii pentru fiecare soi de vin analizat în parte Rosé 2006, probele 1-4 (figura 113), Rosé 2005 probele 5-8 (figura 114), Riesling 2006 probele 9-12 (figura 116) se pot trage următoarele concluzii:

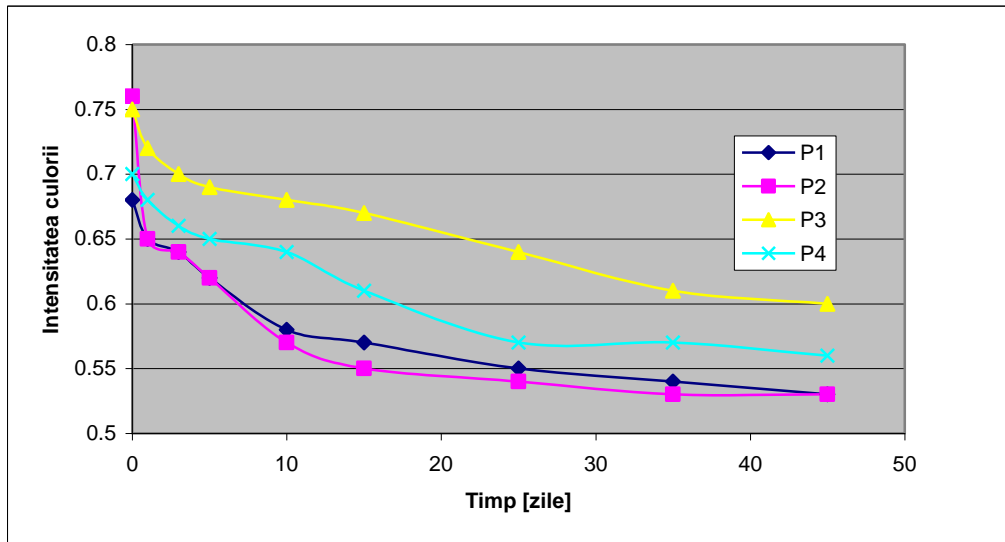


Figura 113. - Variația intensității culorii probelor de vin Rosé 2006 (P1-P4)

În cazul probelor de vin Rosé 2006 cu adaus de extracte din afine respectiv merișoare (figura 113), se observă o scădere a intensității culorii încă din prima zi de la adăugarea extractelor. Pe parcursul experimentului intensitatea culorii cea mai mare se păstrează pentru probele cu adaus de extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* (extract mai bogat în antocianine – pigmenți coloranți, decât extractul din fructe de *Vaccinium vitis-idaea*). În cazul acestora se observă că, prin folosirea unor extracte de concentrație diferită se menține o diferență aproximativ constantă a intensității culorii acestor probe pe tot parcursul experimentului pentru extractul din fructe de *Vaccinium myrtillus*. În schimb, în cazul probelor cu adaus de extract din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* diferența între intensitatea culorii probelor tratate cu extract de concentrație diferită (1 la 5 ori) este mică, uneori inexistentă.

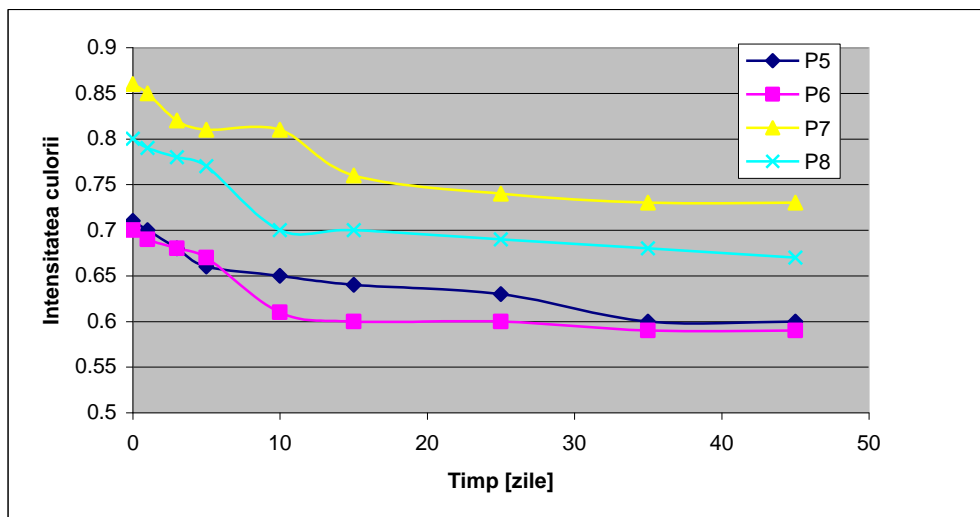


Figura 114. - Variația intensității culorii probelor de vin Rosé 2005 (P5-P8)

Se poate afirma faptul că la probele de vin Rosé 2005 cu adaos de extracte comparativ cu probele Rosé 2006, intensitatea culorii este mai pronunțată, ceea ce se observă din valorile mult mai ridicate ale acesteia: peste 0,8 în primele 10 zile pentru proba de Rosé 2005 cu adaos de extract din fructe de *Vaccinium myrtillus*, 10 mL/L (P7) față de 0,75-0,68 pentru proba de Rosé 2006 (P3) cu același adaos în primele 10 zile.

În timp, intensitatea culorii la vinul Rosé 2005 cu adaos de extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* crește în medie cu aproximativ 0,15 unități față de vinul inițial în timp ce la vinul Rosé 2006 cu adaos de același extract intensitatea crește cu aproximativ 0,1 unități. Acest lucru poate fi observat mai clar dacă urmărim valorile intensității culorii pentru probele de vin martor (fără adaos de extracte – tabelul 57) comparativ cu cele pentru probele cu adaos de extracte prezentate în tabelele 58, 59 și 60. În tabelele 58, 59 și 60 sunt prezentate rezultatele obținute pe parcursul a 45 zile, după ziua 45 valoarea acestora fiind constantă, deși analizele s-au continuat.

Tabelul 57.

Conținutul în antocianine, polifenoli totali, intensitatea și tonalitatea culorii vinurilor ca atare păstrate la temperatură de $\approx 15^{\circ}\text{C}$, la întuneric

Parametrii analizați	Rosé 2005		Rosé 2006		Riesling 2006	
	t_0	$t_0 + 45$ zile	t_0	$t_0 + 45$ zile	t_0	$t_0 + 45$ zile
Antocianine totale (mg/L)	238	236	239	235	174	170
Polifenoli totali (mg GAE/L)	290,64	288,72	303,40	301,42	235,45	232,17
Intensitatea culorii	0,68	0,56	0,64	0,50	0,08	0,03
Tonalitatea culorii	1,06	0,96	0,98	0,96	2,61	2,54

t_0 = vin ca atare; $t_0 + 45$ = vin după 45 zile

Se știe că în timpul păstrării vinurilor intensitatea culorii scade [286], lucru evidențiat și prin rezultatele obținute. Pentru vinurile mai colorate acest lucru este mult mai evident (78% - 82% pentru vinurile Rosé față de 37% pentru vinul alb, Riesling).

Conținutul în antocianine face diferența semnificativă și observabilă cu ochiul liber între vinurile albe și roze.

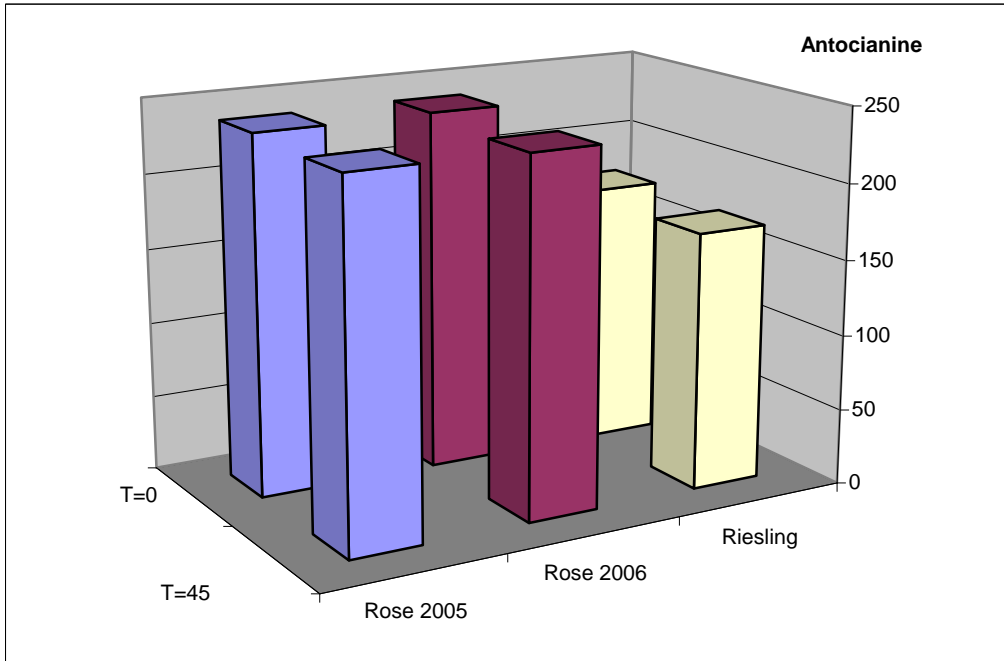


Figura 115. - Variația conținutului în antocianine a probelor martor

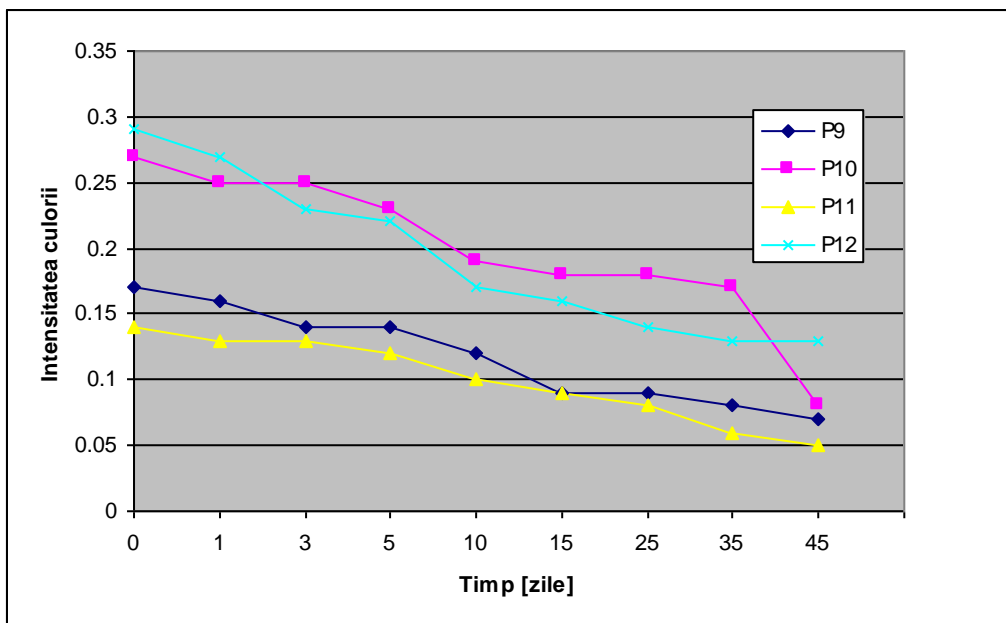


Figura 116. - Variația intensității culorii probelor de vin alb (P9-P12)

Intensitatea culorii vinului alb îmbogățit cu extracte din fructe de pădure crește considerabil în primele zile și se menține la valori mai ridicate față de proba martor până la sfârșitul experimentului. Odată cu adausul de extracte de fructe de pădure apare îmbrunarea rezultată în urma oxidării fenolilor la chinone care prin polimerizare formează macromolecule ce au o nuanță tipică de galben-brun. Aceasta este mai evidentă în cazul probelor îmbogățite cu extract de afine, a căror nuanță este cărămizie și care se menține în timp.

Folosind suma absorbanțelor de la 420, 520 și 620 nm ca măsură a intensității culorii, orice compus care contribuie la intensificarea îmbrunării poate fi considerat ca factor al modificării culorii.

În continuare sunt prezentate rezultatele obținute în urma aplicării *metodei Glories* privind determinarea principalelor caracteristici cromatice ale probelor analizate. De asemenea a fost determinat conținutul în antocianine respectiv polifenoli totali. Pentru probele martor, vinuri ca atare, conținutul în antocianine respectiv polifenoli totali a fost ilustrat în tabelul 57.

Tabelul 58.

Compoziția, intensitatea respectiv tonalitatea culorii probelor de vin Rosé (2005) analizate după 45 de zile de la adăugarea de extracte din fructe de pădure

Parametrii analizați	Rosé + 10mL /L EM		Rosé + 5 mL /L EM		Rosé + 10 mL /L EA		Rosé + 5 mL /L EA	
	t ₀	t ₀ + 45 zile	t ₀	t ₀ + 45 zile	t ₀	t ₀ + 45 zile	t ₀	t ₀ + 45 zile
AT (mg/L)	295	240	252	239	382	264	290	240
PT (mg GAE/L)	432,82	335,76	417,02	321,36	460,52	334,35	461,06	319,74
IC*	0,70	0,60	0,69	0,59	0,85	0,73	0,79	0,68
T	1,07	1,06	1,07	1,05	0,99	0,98	1,02	1,01

EM = extract din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișor);

EA = extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine)

AT= antocianine totale, PT= polifenoli totali, IC*=intensitatea culorii, T=tenta culorii

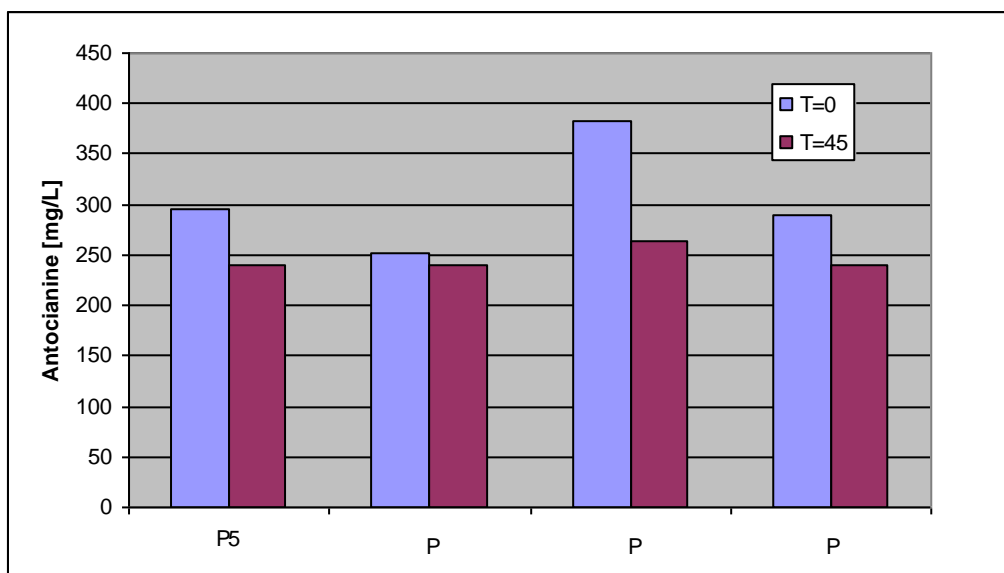


Figura 117. - Variația conținutului de antocianine la probele Rosé 2005 cu adaus de extracte

Tabelul 59.

Compoziția, intensitatea respectiv tonalitatea culorii probelor de vin Rosé (2006) analizate după 45 de zile de la adăugarea de extracte din fructe de pădure

Parametri analizați	Rosé + 10 mL /L EM		Rosé + 5 mL /L EM		Rosé + 10 mL /L EA		Rosé + 5 mL /L EA	
	t ₀	t ₀ + 45 zile	t ₀	t ₀ + 45 zile	t ₀	t ₀ + 45 zile	t ₀	t ₀ + 45 zile
AT (mg/L)	310	248	241	238	332	286	272	240
PT (mg GAE/L)	469,71	357,61	386,50	244,76	573,70	473,93	480,75	389,21
IC*	0,65	0,53	0,65	0,53	0,72	0,60	0,68	0,56
T	1,11	1,08	1,11	1,08	1,06	1,01	1,04	1,04

EM = extract din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare); EA = extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine)

AT= antocianine totale, PT= polifenoli totali, IC*=intensitatea culorii, T=tenta culorii

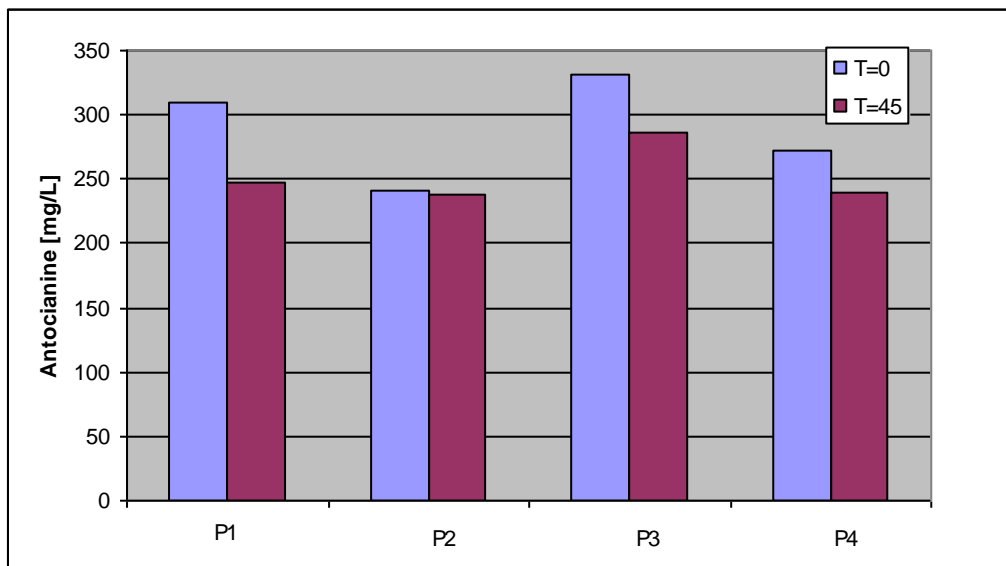


Figura 118. - Variația conținutului de antocianine la probele Rosé 2006 cu adaos de extracte

Din reprezentarea grafică a datelor experimentale referitoare la conținutul în antocianine a probelor cu adaos de extracte din fructe de pădure (figurile 117, 118) se observă că, proba de vin Rosé din anul 2005 cu adaos de 10 mL/L extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* (P7) este cea mai bogată în pigmenți antocianici, însă și cea în care aceștia se „pierd” în cantitatea cea mai mare. Surprinzător este faptul că în cazul probelor cu adaos de extract din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* în concentrație de 5 mL/L (P6 respectiv P2), conținutul în antocianine rămâne aproximativ același și după 45 de zile. Deci, putem spune că, extractul din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* este mai stabil în probele de vin decât extractul din fructe de *Vaccinium myrtillus*.

Tabelul 60.

Compoziția, intensitatea respectiv tonalitatea culorii probelor de vin Riesling (2006) analizate după 45 de zile de la adăugarea de extracte din fructe de pădure

Param analiz.	Riesling + 10 mL/L EM		Riesling + 5 mL /LEM		Riesling + 10 mL /L EA		Riesling + 5 mL/L EA	
	t ₀	t ₀ + 45 zile	t ₀	t ₀ + 45 zile	t ₀	t ₀ + 45 zile	t ₀	t ₀ + 45 zile
AT (mg/L)	182	174	178	172	319	205	307	192
PT (mg GAE/L)	256,0	237,2	242,2	236,4	259,5	247,2	257,9	246,3
IC*	0,16	0,07	0,13	0,05	0,25	0,08	0,27	0,13
T	2,13	2,89	2,60	2,65	1,39	1,37	1,48	1,48

EM = extract din fructe de *Vaccinium vitis-idaea*; EA = extract din fructe de *Vaccinillus myrtillus*

AT= antocianine totale, PT= polifenoli totali, IC*=intensitatea culorii, T=tenta culorii

Rezultatele obținute au dus la următoarele concluzii:

- Coloranții naturali din extractele din fructe de pădure, îmbogățesc culoarea vinului rosé imediat după adăugare, și o mențin în timpul depozitării. Culoarea cea mai intensă la începutul experimentului a avut-o vinul rosé din producția anului 2005, intensitatea culorii acestuia fiind cu 6% mai mare decât a vinului rosé din 2006.
- Prin adăugare de extract din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* în concentrație de 10 mL/L respectiv 5 mL/L (v/v) la probele de vin rosé, intensitatea culorii acestora crește cu 1-2% (de la o intensitate a probelor inițiale de 0,68 (vin rosé 2005) și 0,64 (vin rosé 2006) la o intensitate de 0,70 respectiv 0,69 (vin rosé 2005 cu adaus de extract), și 0,65 (vin rosé 2006 cu adaus de extract) față de o creștere de 10-15% în prima zi (la probele de vin rosé la care s-a adăugat extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* în aceleași concentrații). La probele cu adaus de extract de afine, intensitatea culorii la sfârșitul experimentului era cu cel puțin 5% mai mare față de intensitatea culorii vinului fără adaus de extracte.
- În timp, tonalitatea culorii crește mai ales datorită apariției proceselor de îmbrunare, a oxidării fenolilor, a formării sărurilor de xantiliu și datorită polimerizării taninurilor.
- Vinul de producție 2006 prezintă valori mai mari ale tonalității, și de asemenea procente mai însemnate de galben în vreme ce procentajul de roșu este mai redus (figura 119-120). Totuși, deși toate probele de vin prezintă valori scăzute ale tonalității culorii, diferențele de culoare sunt apeciabile la un test vizual. În același timp, se poate observa o acumulare de antocianine la ambele probe de vin (2005 și 2006) fără a se remarca diferențe semnificative între cele două.

În ceea ce privesc contribuțiile adaosului de extracte naturale la culoarea finală a vinului rosé și alb exprimate prin variația celor trei culori, roșie, galbenă, și albastră în timp, acestea sunt prezentate în tabelele 61, 62, 63 respectiv separat pentru fiecare culoare în figurile 119-127.

Tabelul 61.

Contribuția culorilor galben (420%), roșu (520), albastru (620%) la culoarea finală a probelor de vin Rosé 2006 cu adaus de extracte naturale

Ziua	P1			P2			420 %	P3			P4		
	420%	520%	620%	420%	520%	620%		420%	520%	620%	420%	520%	620%
0	49,38	42,07	8,54	45,62	42,52	11,85	47,33	44,32	8,32	46,39	44,91	8,69	
1	47,99	43,29	8,71	48,56	43,57	7,86	47,31	44,62	8,07	47,14	45,12	7,73	
3	48,35	43,22	8,41	48,91	43,25	7,82	46,66	45,83	7,51	47,22	44,96	7,81	
5	48,94	44,15	6,89	48,63	43,73	7,63	47,19	45,44	7,36	47,42	45,23	7,34	
10	49,66	44,02	6,32	49,78	44,44	5,77	47,51	45,69	6,80	46,45	45,98	7,57	
15	49,15	44,65	6,18	49,12	45,51	5,37	47,47	45,75	6,77	48,51	45,68	5,8	
25	49,34	44,96	5,69	49,52	45,53	4,94	47,21	46,70	6,09	47,64	47,16	5,19	
35	49,29	45,51	5,19	49,55	45,86	4,58	47,75	47,08	5,16	48,22	46,76	5,01	
45	49,29	45,51	5,19	49,55	45,86	4,58	47,75	47,08	5,16	48,22	46,76	5,01	

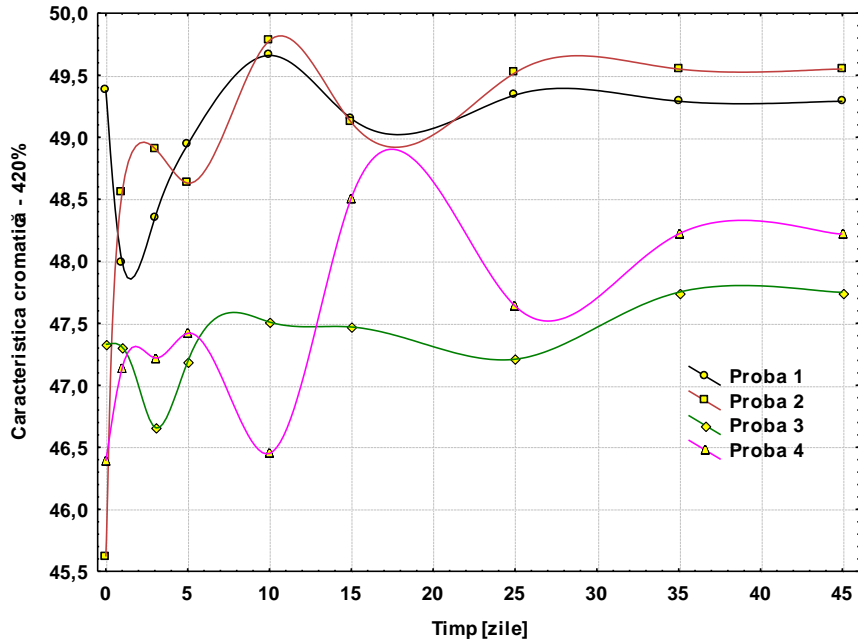


Figura 119. - Variația caracteristicii cromatice 420%-galben în timp comparativ pentru probele de vin rosé 2006 tratate cu extracte vegetale (P1-P4)

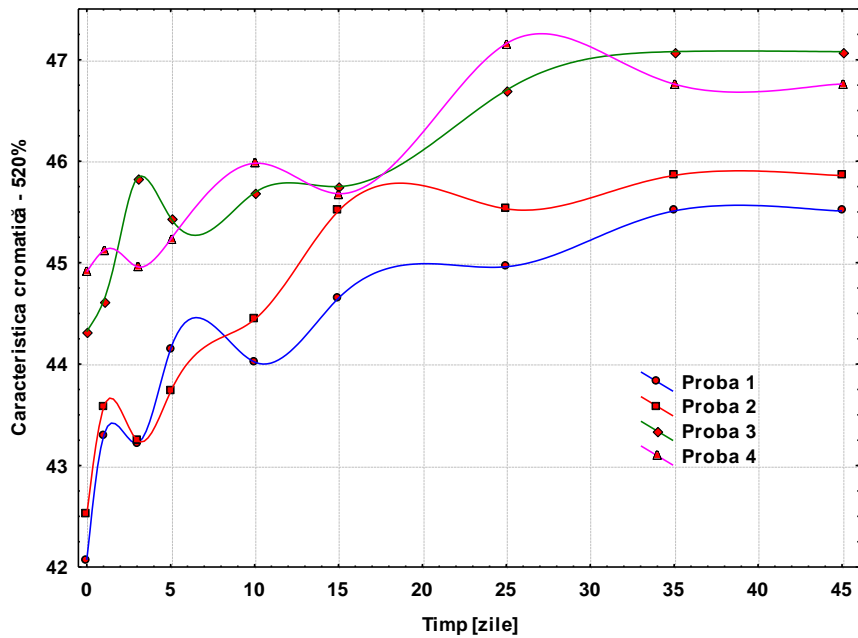


Figura 120. - Variația caracteristicii cromatice 520%-roșu în timp comparativ pentru probele de vin rosé 2006 tratate cu extracte vegetale (P1-P4)

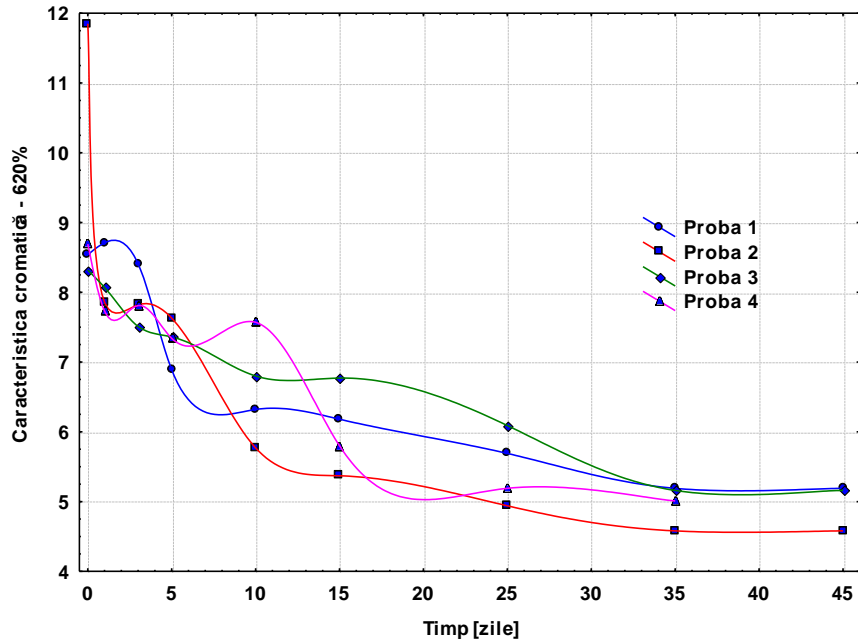


Figura 121. - Variația caracteristicii cromatice 620%-albastru în timp comparativ pentru probele de vin rosé 2006 tratate cu extracte vegetale (P1-P4)

Din analiza reprezentărilor grafice se trag următoarele concluzii:

- extractul de merișoare, contribuie la îmbogățirea culorii vinului în galben iar cel din afine îmbogățește culoarea vinului în roșu, proporțional cu cantitatea de extract adăugată;
- în general, caracteristicile cromatice înregistrează modificări în plus sau în minus până în ziua 25-a pentru culorile galben și roșu, cu excepția probei de vin rosé 2006 cu adaos de extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine) de concentrație mai redusă care în această zi înregistrează un maxim de variație. După 35 zile se observă apariția unui palier. Pentru același vin și aceleași adaosuri de extracte variația caracteristicii cromatice proprii culorii albastru se stabilizează în intervalul 10-15 zile având apoi o tentă ușor descrescătoare.

În continuare (tabelul 62, figurile 122-124) sunt prezentate rezultatele obținute pentru probele de vin Rosé 2005 tratate cu extracte naturale din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine) respectiv *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare).

Tabelul 62.

Contribuția culorilor galben (420%), roșu (520), albastru (620%) la culoarea finală a probelor de vin Rosé 2005 cu adaus de extracte naturale

Ziua	P5			P6			P7			P8		
	420%	520%	620%	420%	520%	620%	420%	520%	620%	420%	520%	620%
0	47,72	44,05	8,23	47,89	44,48	7,62	45,56	46,21	8,23	45,94	45,79	8,26
1	47,62	44,48	7,89	47,53	44,59	7,64	45,65	46,09	8,26	46,35	45,55	8,09
3	48,14	44,26	7,59	48,01	44,27	7,71	46,13	45,52	8,35	46,57	45,29	8,13
5	47,99	44,36	7,64	48,55	44,42	7,03	46,13	45,52	8,35	46,60	45,27	8,29
10	48,55	44,48	6,96	48,71	45,65	5,63	46,06	45,77	8,17	46,86	46,65	6,48
15	47,94	45,09	6,97	48,80	45,86	5,33	46,56	46,25	7,19	46,84	46,62	6,54
25	47,79	45,36	6,84	48,76	45,92	5,31	46,50	47,19	6,31	47,05	46,76	6,19
35	48,52	45,79	5,68	48,53	46,10	5,37	46,49	47,19	6,31	47,05	46,89	6,11
45	48,52	45,79	5,68	48,53	46,10	5,37	46,49	47,19	6,31	47,05	46,89	6,11

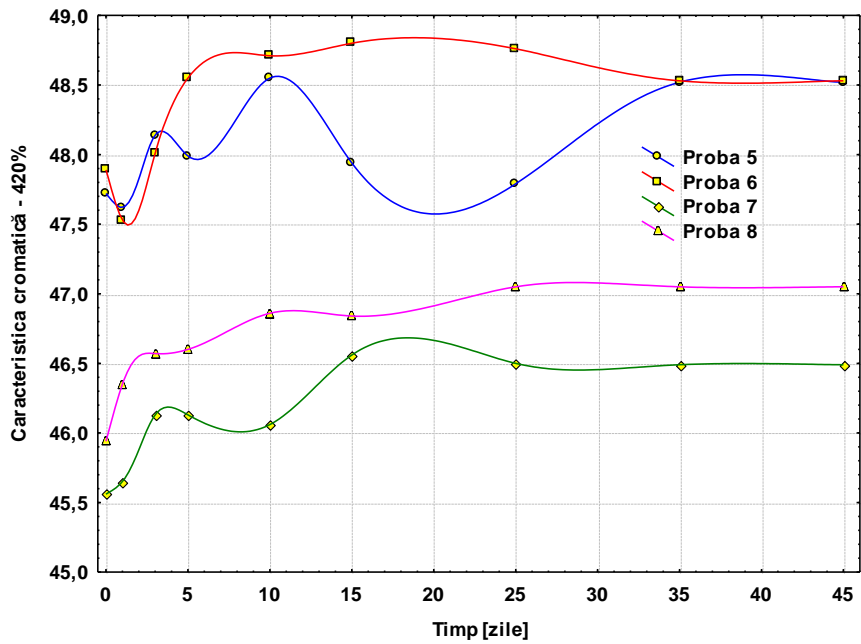


Figura 122. - Variația caracteristicii cromatice 420%-galben în timp comparativ pentru probele de vin rosé 2005 tratate cu extracte vegetale

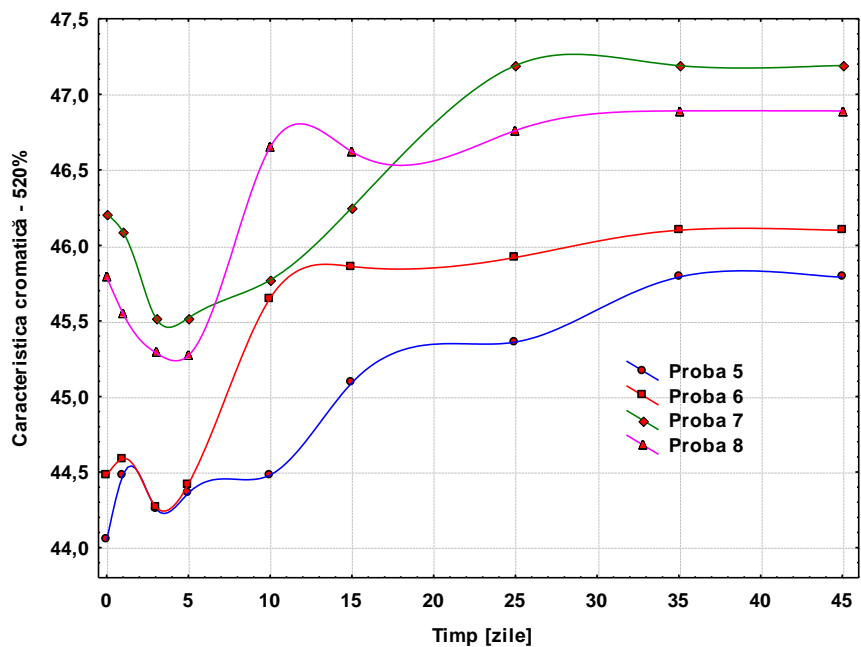


Figura 123. - Variația caracteristicii cromatice 520%-roșu în timp comparativ pentru probele de vin rosé 2005 tratate cu extracte vegetale

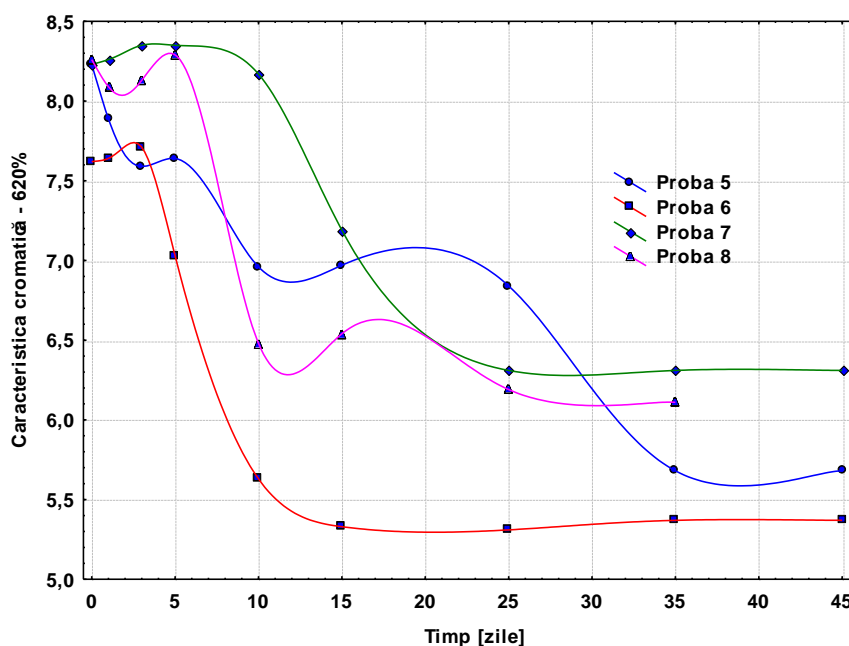


Figura 124. - Variația caracteristicii cromatice 620%-albastru în timp comparativ pentru probele de vin rosé 2005 tratate cu extracte vegetale

Concluziile privind rezultatele analizelor sunt următoarele:

- datorită faptului că, în jurul lungimii de undă de 520 nm, absorbția este mai puternică, culoarea predominantă percepută este cea roșie; se percepe însă și componenta galben-brună sub formă de nuanță cărămizie, precum și cea albastră, care imprimă nuanța de culoare întunecată, ușor albastruie;
- la vinurile rosé studiate în funcție de anul de recoltă se observă o contribuție a culorii galbene la culoarea vinului mai mare cu 2-3% decât a culorii roșii (figurile 119-124). Contribuția culorii albastre la culoarea vinului are valoarea cea mai mare pentru probele de vin din anul 2006. Valoarea mai mare a componentei albastre a acestor vinuri este datorată probabil unei bune copigmentări sau condensări a antocianinelor cu alți compuși polifenolici, dând naștere unor noi forme de antocianine care stabilizează nuanța violetă a vinului.
- În general stabilizarea variației caracteristicilor cromatice pentru toate culorile apare tot în ziua 25 cu excepția culorii albastru pentru vinul rosé 2005 tratat cu extract din fructe de *Vaccinium vitis-idaea*, care pentru proba ce conține o cantitate mai mare de extract înregistrează o scădere semnificativă în perioada 25-30 zile după care se stabilizează.

În tabelul 63 respectiv figurile 125-127 sunt prezentate rezultatele obținute pentru probele de vin alb, Riesling 2006 tratate cu extracte naturale din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine) respectiv *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare).

Tabelul 63.

Contribuția culorilor galben (420%), roșu (520), albastru (620%) la culoarea finală a probelor de vin Riesling 2006 cu adaus de extracte naturale

Ziua	P9			P10			P11			P12		
	420%	520%	620%	420%	520%	620%	420%	520%	620%	420%	520%	620%
0	57,67	28,72	13,60	51,26	36,91	11,83	61,43	25,28	13,28	51,07	32,70	16,23
1	59,79	28,02	12,19	51,63	37,09	11,27	63,66	24,46	11,88	50,15	33,71	16,14
3	61,13	27,01	11,86	51,75	37,2	11,04	63,77	24,78	11,44	53,19	34,29	12,51
5	60,84	27,51	11,65	53,07	37,73	9,19	63,96	24,81	11,22	52,81	34,31	12,88
10	67,48	28,01	4,51	54,85	38,92	6,23	63,60	26,19	10,22	54,65	36,89	8,46
15	71,44	26,13	2,42	54,66	39,97	5,37	69,48	22,86	7,66	55,88	37,62	6,49
25	72,59	25,29	2,11	54,85	40,42	4,72	75,11	18,11	6,77	58,28	36,44	5,28
35	73,78	25,61	0,61	57,32	38,80	3,87	82,82	14,10	3,07	58,81	37,98	3,22
45	73,78	25,61	0,61	57,32	38,80	3,87	82,82	14,10	3,07	58,81	37,98	3,22

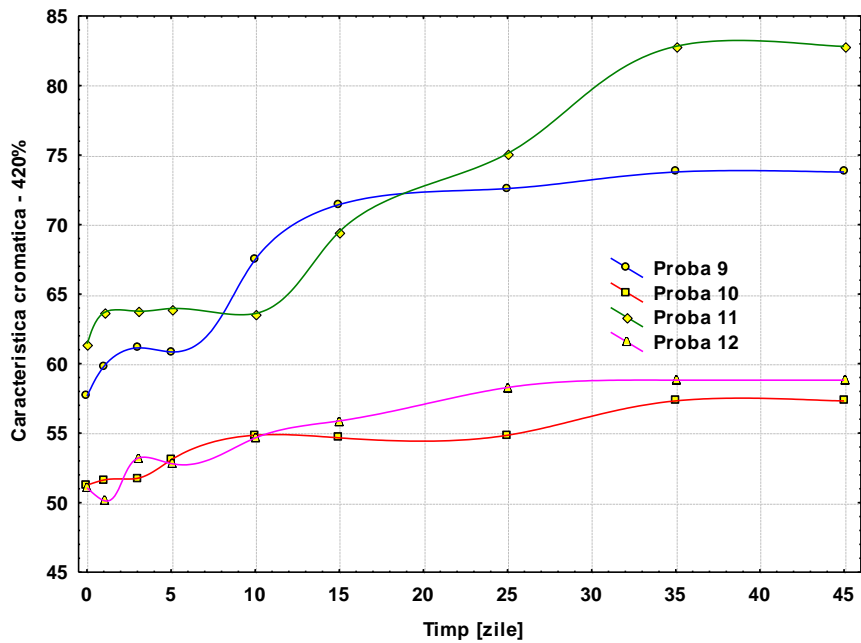


Figura 125. - Variația caracteristicii cromatice 420%-galben în timp comparativ pentru probele de vin alb tratate cu extracte vegetale

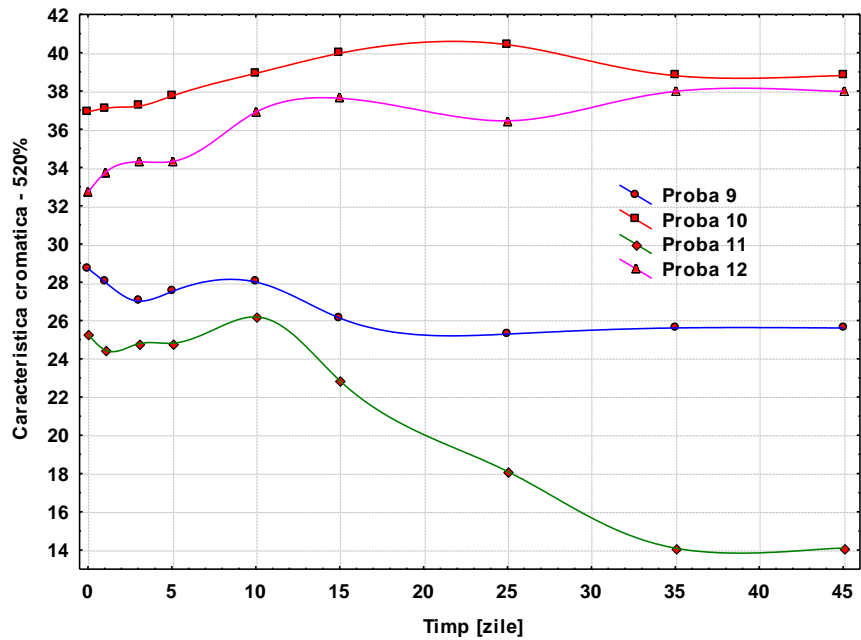


Figura 126. - Variația caracteristicii cromatice 520%-rosu în timp comparativ pentru probele de vin alb tratate cu extracte vegetale

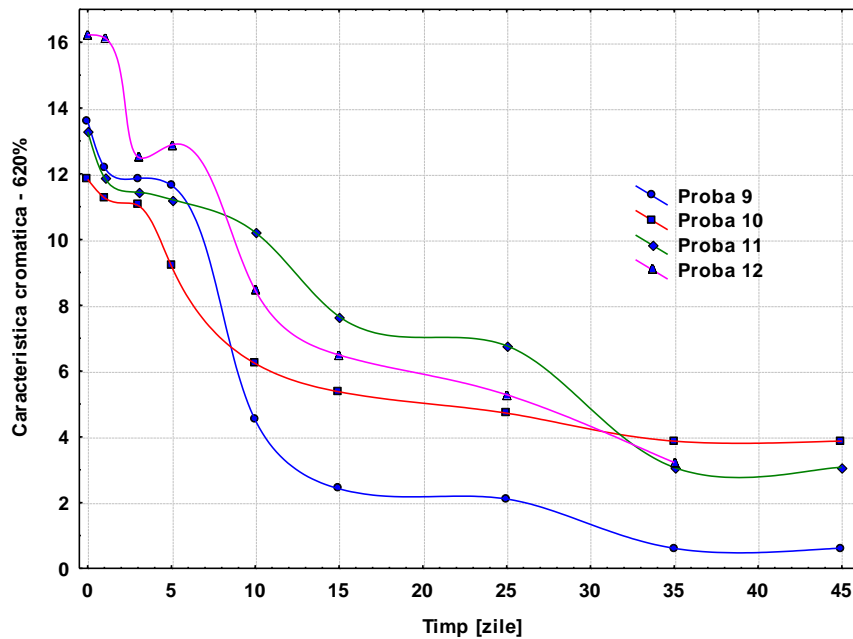


Figura 127. - Variația caracteristicii cromatice 620%-albastru în timp comparativ pentru probele de vin alb tratate cu extracte vegetale

În ceea ce privește rezultatele tratamentului vinului alb cu cele două extracte vegetale din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine) și *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare) la două concentrații, acestea sunt următoarele:

- pentru un procent de până la 40% a contribuției culorii roșii la culoarea vinului alb, nuanța acestuia este cărămizie (probele 10, 12 îmbogățite cu extract din fructe de *Vaccinium myrtillus*, afine);
- în cazul probelor cu adaos de extract din fructe de *Vaccinium vitis-idaea*, merișoare, probele 9, 11, peste 55% din culoarea vinului este dată de galben, nuanța acestuia fiind oranj, confirmată și de datele din literatură [114] conform cărora la un $\text{pH} \approx 3$ sau mai scăzut, antocianinele au culoare oranj sau roșie și există sub forma cationilor de flaviliu (pH -ul vinului alb analizat = 2,97);
- stabilizarea variației caracteristicilor cromatice pentru cele trei culori, galben, roșu, albastru se instalează mai rapid, după ziua 15 cu excepția probei de vin cu adaos de extract din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* de concentrație mai scăzută.

În concluzie:

Menținerea stabilității culorii vinurilor este o problemă ce apare în timpul procesării și păstrării acestuia. În cadrul studiului efectuat s-a demonstrat faptul că, culoarea vinurilor rosé și alb poate fi îmbogățită prin adaos de extracte din fructe de

pădure. Această intensificare a culorii se poate datora creșterii conținutului de antocianine din vin prin adăugarea extractelor naturale, dar și a altor compuși, precum flavone și acizi fenolici ce pot lua parte la reacțiile de copigmentare.

Stabilirea caracteristicilor cromatice ale vinurilor rosé și alb a fost făcută prin metoda Glories. Rezultatele obținute conduc la concluzia că, vinul este într-o continuă modificare în ceea ce privește compoziția sa în timpul depozitării iar culoarea vinului depinde de stabilitatea compușilor fenolici în timp. Vinul Rosé tânăr are o culoare roșie predominantă (datorată antocianinelor), iar pe măsură ce timpul trece, datorită proceselor de policondensare a compușilor fenolici, culoarea se modifică, devenind mai închisă în cazul în care compușii fenolici care dau culoarea albastră sunt dominanți, sau căpătând nuanțe brune atunci când compușii fenolici care dau culoarea galbenă sunt dominanți.

După 2 luni de păstrare în sticlă a vinului cu adaos de extracte se observă o scădere a intensității culorii, a conținutului în antocianine și fenoli totali, însă îmbogățirea probelor de vin în acești compuși prin copigmentarea cu extracte naturale, este evidentă comparativ cu probele martor. Vinul tratat cu extract din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine) a înregistrat cele mai ridicate valori ale acestor parametri.

Rezultatele obținute în cadrul acestui studiu au făcut obiectul unei lucrări științifice publicată în revistă cotate ISI [287].

III.4.3. Comportarea reologică a cremelor alimtare cu adaos de extracte din fructe de pădure respectiv emulsii U/A ce conțin acest extracte

În cadrul lucrărilor experimentale (II.7.3) s-a studiat comportarea reologică pentru o bază de cremă alimentară de vanilie cu adaos de extracte din afine, merișoare respectiv emulsii 20% U/A ce conțin extract de afine. În tabelul 64 este prezentată componența cremelor supuse analizei reologice.

S-a observat că, toate probele analizate au comportare nenenewtoniană cu prag inițial, dependența $\tau = f(\dot{\gamma})$ fiind de tip plastic și prezentând ecuația reologică generală:

$$\tau = \tau_0 + K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (24)$$

unde: τ – tensiune de forfecare

τ_0 – pragul inițial

K – constantă

n – coeficient al comportării nenenewtoniene (n = 1 – tip plastic ideal;

n < 1 – tip plastic real; n > 1 – dilatant).

Pentru $\tau_0 \neq 0$ fluidele aparțin domeniului viscoplastic neliniar, iar pentru n < 1 comportarea este cea corespunzătoare sistemelor plastice reale.

Tabelul 64.*Componentele cremelor supuse analizei reologice. Prepararea probelor*

Proba	Bază de cremă (g)	Cantitate extract în emulsia finală (mL)
Cremă + extract afine	40	0,2
Cremă + extract merișor	40	0,2
Cremă + emulsie U/A (șofrănel)	40	4
Cremă + emulsie U/A (armurariu)	40	4

În vederea determinării influenței pe care modificarea temperaturii o are asupra proprietăților de curgere respectiv a stabilității cremelor, probele de cremă de vanilie cu adaos de extracte din fructe de afine respectiv merișor sau cu adaos de emulsii U/A ce conțin extract din afine precum și o probă martor au fost supuse determinărilor experimentale după 72 de ore de la preparare.

Măsurătorile reologice au fost realizate în condiții de termostatare la 22 și 35°C (nu s-a dorit creșterea temperaturii peste pragul de 40°C deoarece s-a ținut cont de faptul că unele principii active din extractele adăugate se degradează peste acest prag).

Valorile corespunzătoare tensiunii de forfecare pentru proba martor la cele două temperaturi sunt prezentate în tabelul 65 iar în figura 128 este redată comportarea reologică a probei martor.

Tabelul 65.*Valorile corespunzătoare tensiunii de forfecare pentru proba martor*

Viteza de deformare ($\dot{\gamma}$), 1/s	Tensiunea de forfecare, τ (Pa)	
	$T_1 = 22^\circ\text{C}$	$T_2 = 35^\circ\text{C}$
3,0	97,86	95,35
5,4	120,37	108,97
9,0	147,34	126,21
16,2	184,31	160,96
27,0	234,91	202,38
48,6	312,19	265,49
81,0	409,22	342,49

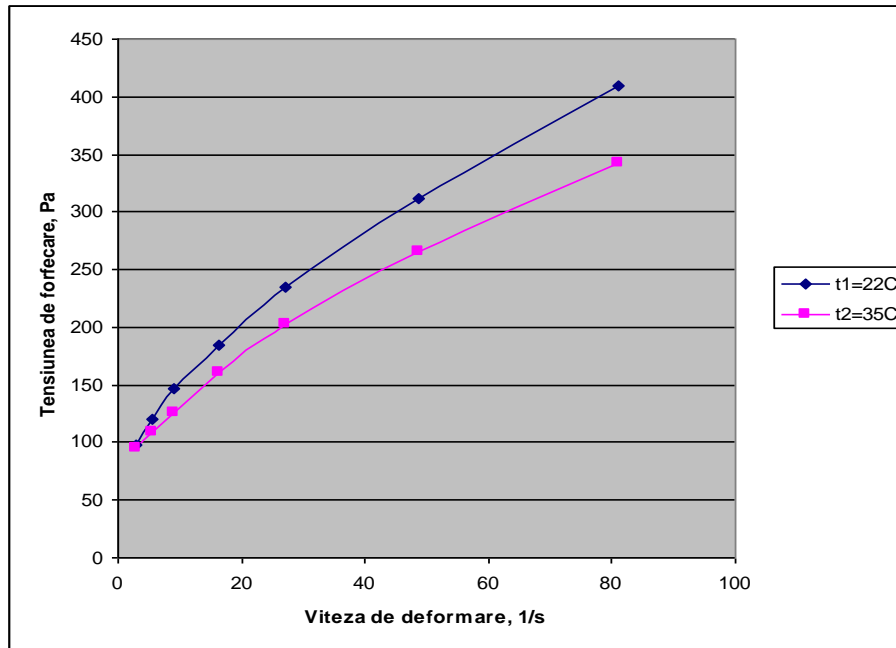


Figura 128. - Dependența tensiunii de forfecare τ funcție de viteza de deformare $\dot{\gamma}$ pentru proba martor la cele două temperaturi

Nu s-au constatat separări ale fazelor și nici schimbări ale tipului de comportament reologic ci doar o mică scădere a consistenței, fapt ilustrat prin scăderea constantei K. Creșterea temperaturii duce la scăderea efortului unitar τ (de exemplu la $\dot{\gamma} = 27$ 1/s, scăderea este de aproximativ 35 Pa).

Valorile experimentale ale tensiunii de forfecare la diferite valori ale vitezei de deformare la cele două temperaturi corespunzătoare probelor obținute prin adăugarea de extracte din fructe de afine respectiv merișoare cremei de vanilie bază sunt redată în tabelul 66 respectiv în figurile 129 și 130.

Tabelul 66.

Valorile corespunzătoare tensiunii de forfecare pentru probele cu adaos de extracte

Viteza de deformare ($\dot{\gamma}$), 1/s	Tensiunea de forfecare, τ (Pa) Cremă + extract afine		Tensiunea de forfecare, τ (Pa) Cremă + extract merișoare	
	T ₁ = 22°C	T ₂ = 35°C	T ₁ = 22°C	T ₂ = 35°C
3,0	90,07	91,18	69,5	58,38
5,4	108,14	102,86	81,45	66,16
9,0	131,22	119,54	96,74	77,56
16,2	161,24	145,67	116,76	92,57
27,0	199,6	175,42	149,3	105,64
48,6	260,76	222,4	189,6	-
81,0	330,82	281,89	238,5	-
145,8	446,47	378,64	316,92	-

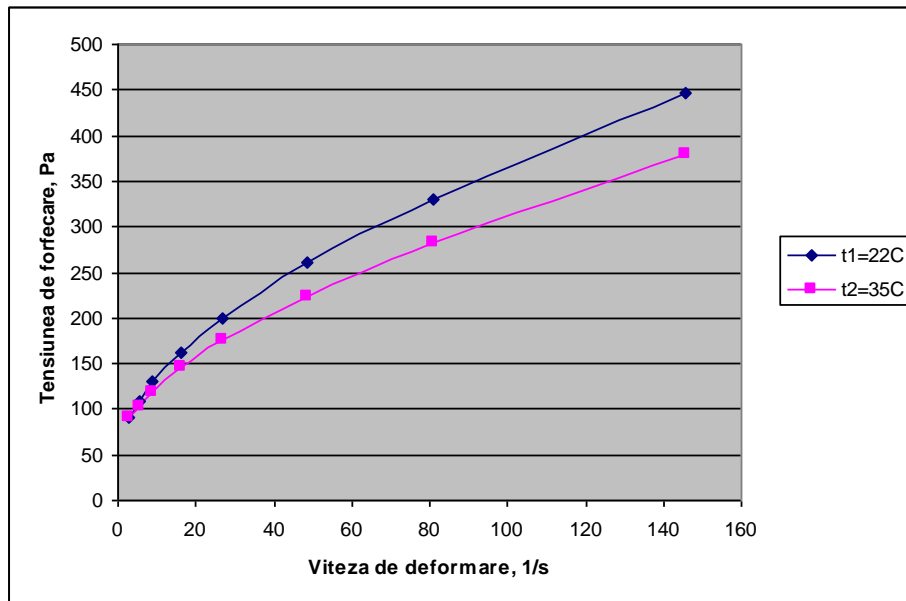


Figura 129. - Dependența tensiunii de forfecare τ funcție de viteza de deformare $\dot{\gamma}$ pentru proba de cremă cu adaos de extract de afine la cele două temperaturi

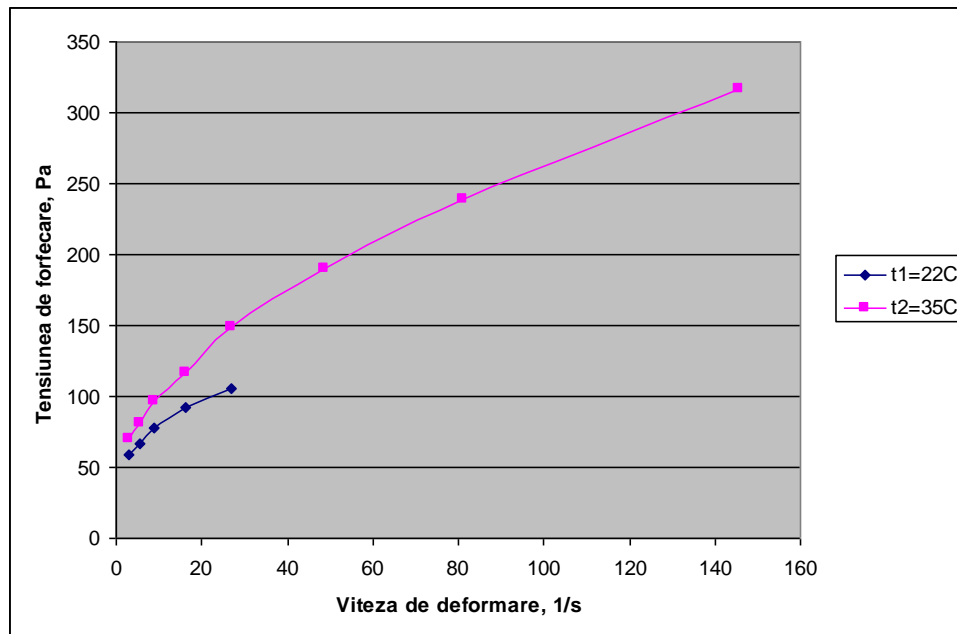


Figura 130. - Dependența tensiunii de forfecare τ funcție de viteza de deformare $\dot{\gamma}$ pentru proba de cremă cu adaos de extract de merișor la cele două temperaturi

Odată cu creșterea temperaturii se observă o creștere a coeficientului preexponențial K și o scădere a pragului inițial τ_0 la proba cu adaos de extract de merișor, în timp ce la proba cu adaos de extract de afine pragul inițial τ_0 crește cu creșterea temperaturii iar coeficientul preexponențial din ecuația 21 scade (vezi tabelul 66).

Valorile experimentale obținute pentru cele două probe cu adaos de emulsii 20% U/A sunt prezentate în tabelul 67 respectiv în figurile 131 și 132.

Tabelul 67.

Valorile corespunzătoare tensiunii de forfecare pentru probele cu adaos de emulsii U/A

Viteza de deformare ($\dot{\gamma}$), 1/s	Tensiunea de forfecare, τ (Pa) Cremă + emulsie armurariu		Tensiunea de forfecare, τ (Pa) Cremă + emulsie șofrănel	
	$T_1 = 22^\circ\text{C}$	$T_2 = 35^\circ\text{C}$	$T_1 = 22^\circ\text{C}$	$T_2 = 35^\circ\text{C}$
3,0	191,54	143,73	201,27	151,51
5,4	227,68	165,69	243,53	172,36
9,0	278,83	190,43	295,79	201,55
16,2	349,17	234,08	371,13	254,93
27,0	434,79	287,73	466,48	309,14
48,6	-	344,72	-	-

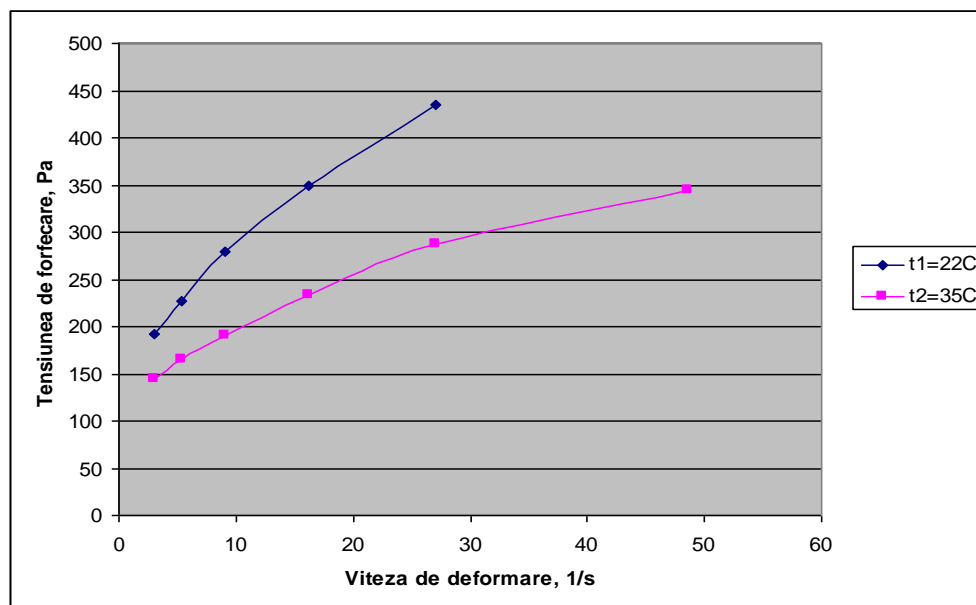


Figura 131. - Dependența tensiunii de forfecare τ funcție de viteza de deformare $\dot{\gamma}$ pentru proba de cremă cu adaos de emulsie de ulei de Silybum marianum (ulei de armurariu) la cele două temperaturi

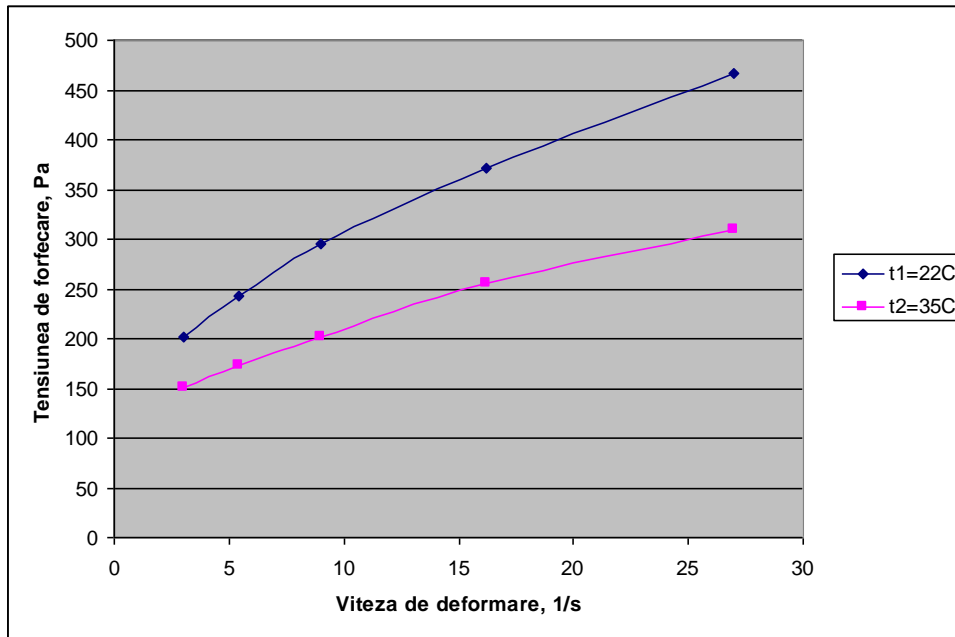


Figura 132. - Dependența tensiunii de forfecare τ funcție de viteza de deformare $\dot{\gamma}$ pentru proba de cremă cu adaos de emulsie de ulei de șofrănel la cele două temperaturi

La proba cu adaos de emulsie 20% ulei de armurariu în apă, odată cu creșterea temperaturii se observă o scădere a pragului inițial τ_0 în timp ce valoarea coeficientului preexponențial K și chiar a exponentului n se păstrează la valori relativ apropiate. În schimb, la proba cu adaos de emulsie 20% ulei de șofrănel în apă se observă de asemenea o scădere a coeficientului preexponențial K și o creștere a exponentului n , iar valoarea pragului inițial τ_0 rămâne relativ apropiat.

Interpretarea rezultatelor obținute în urma determinărilor experimentale asupra tuturor probelor analizate a fost realizată ulterior și prin utilizarea programului „Table Curve 2D v4”. Acest program asigură trasarea graficului care redă dependența $y = f(x)$, alegerea tipului de ecuație care descrie această dependență, stabilirea coeficienților ecuației precum și valoarea coeficientului de corelare r^2 . Din determinările preliminare a rezultat că probele studiate au o comportare nenewtoniană. Ținând seama de tipurile comportamentelor reologice ale substanțelor nenewtoniene (pseudoplastice, dilatante) ca și din reprezentările grafice directe, a rezultat că cel mai apropiat tip de ecuație este cel care redă dependența nenewtoniană cu prag inițial $\tau = \tau_0 + K \cdot \dot{\gamma}^n$. Deci, au fost alese ecuații de tipul $y = a + b \cdot x^c$, ecuații care au fost verificate cu precizie foarte bună (tabelul 68).

Tabelul 68.

Ecuțiile reologice ale probelor analizate la diferite temperaturi, deduse din dependența $\tau = f(\dot{\gamma})$ (Program "Table Curve")

Proba	Ecuția reologică $T_1 = 22^\circ\text{C}$	r^2	Ecuția reologică $T_2 = 35^\circ\text{C}$	r^2
Martor	$\tau = 50,632 + 24,926 \cdot \dot{\gamma}^{0,606}$	0,999	$\tau = 57,315 + 18,064 \cdot \dot{\gamma}^{0,628}$	0,999
Cremă + extract afine	$\tau = 47,9 + 23,13 \cdot \dot{\gamma}^{0,571}$	0,999	$\tau = 61,7 + 15,064 \cdot \dot{\gamma}^{0,611}$	0,999
Cremă + extract merișor	$\tau = 35,864 + 18,067 \cdot \dot{\gamma}^{0,551}$	0,999	$\tau = 12,91 + 31,058 \cdot \dot{\gamma}^{0,333}$	0,997
Cremă + emulsie armurariu	$\tau = 86,62 + 56,78 \cdot \dot{\gamma}^{0,55}$	0,999	$\tau = 54,95 + 53,29 \cdot \dot{\gamma}^{0,438}$	0,997
Cremă + emulsie șofrănel	$\tau = 93,49 + 58,162 \cdot \dot{\gamma}^{0,563}$	0,999	$\tau = 95,916 + 27,13 \cdot \dot{\gamma}^{0,627}$	0,998

După cum se observă atât din curbele din figurile 130, 131 cât și din ecuațiile reologice (tabelul 68), creșterea temperaturii conduce la scăderea consistenței cremei cu adaos de extract de merișor și a cremei cu adaos de emulsie de armurariu, fapt ilustrat de micșorarea pragului inițial τ_0 , în timp ce crema cu adaos de emulsie de șofrănel își menține aceeași consistență.

În figurile 133 și 134 sunt reprezentate variația tensiunii de forfecare funcție de viteza de deformare comparativ, pentru toate probele analizate, la cele două temperaturi.

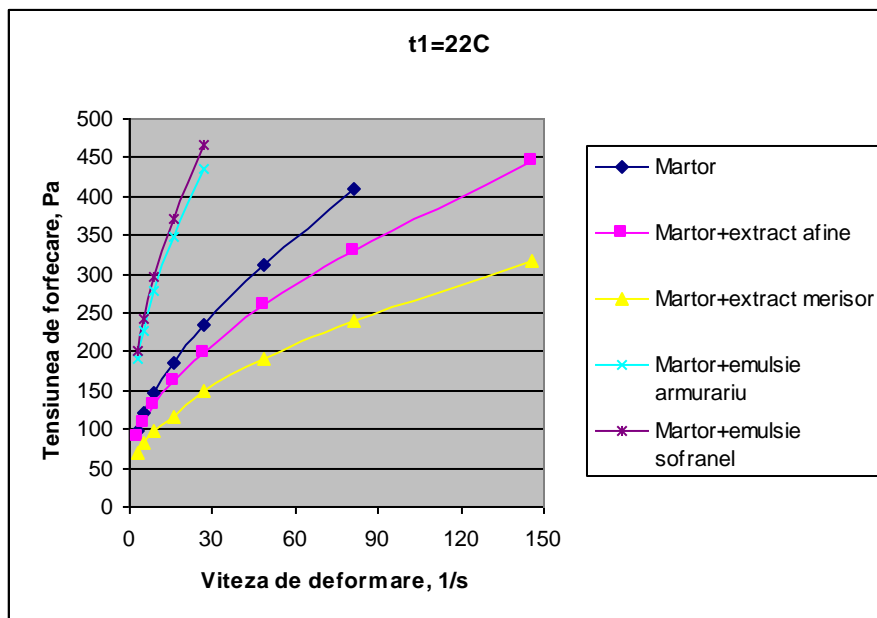


Figura 133. - Dependența tensiunii de forfecare τ funcție de viteza de deformare $\dot{\gamma}$ pentru toate probele analizate la temperatura de 22°C

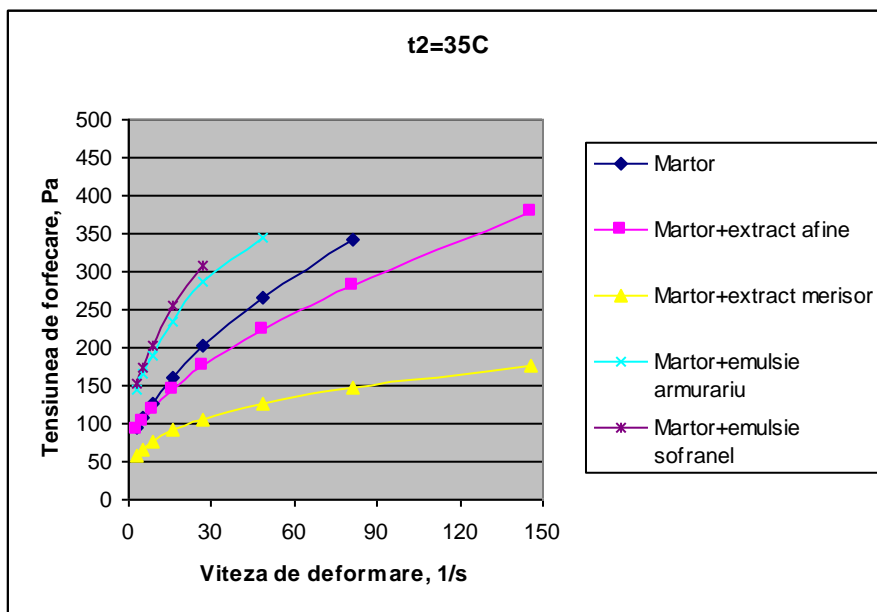


Figura 134. - Dependenta tensiunii de forfecare τ funcție de viteza de deformare $\dot{\gamma}$ pentru toate probele analizate la temperatura de 35°C

Concluzii:

În urma testului reologic efectuat asupra cremei de vanilie ca atare cât și asupra cremei cu adaos de extracte din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine), *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare) respectiv a cremei cu adaos de emulsii U/A se pot desprinde următoarele concluzii:

- Cunoașterea proprietăților reologice ale materialelor este deosebit de importantă pentru stabilirea condițiilor optime (temperatură, viteză de deformare) de utilizare ale acestora;
- Cremele studiate au comportare newtoniană cu prag inițial al tensiunii de forfecare, corespunzătoare domeniului viscoplastic neliniar, ecuația reologică generală fiind:

$$\tau = \tau_0 + K \cdot \dot{\gamma}^n$$

- Toate probele analizate au comportare corespunzătoare sistemelor plastice reale ($n < 1$);
- Comportarea probelor analizate funcție de temperatură este diferită. Creșterea temperaturii duce la scăderea consistenței probelor de cremă fără a le afecta în mod semnificativ stabilitatea. Acest comportament reologic recomandă extractele din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine), *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare), respectiv emulsiile U/A ce conțin aceste extracte pentru aplicare în industria alimentară, farmaceutică sau cosmetică.

Rezultatele obținute au făcut obiectul unei lucrări științifice prezentată în cadrul „A XXX-a Conferință Națională de Chimie”, Calimănești-Căciulata, 2008 [288].

III.5. ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A EXTRACTELOR DIN FRUCTE DE *VACCINIUM MYRTILLUS* RESPECTIV *VACCINIUM VITIS-IDAEA*

Activitatea antimicrobiană a sucului brut și a extractelor apoase din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* a fost testată folosind metoda difuzimetrică, prin care s-a apreciat gradul de sensibilitate al unor microorganisme patogene față de acestea, în condiții de laborator *in vitro*.

Testarea extractelor și a sucurilor s-a efectuat atât pe microorganisme din specia bacteriilor gram pozitive cât și gram negative.

Rezultatele experimentale obținute sunt prezentate în tabelul 69 respectiv figurile 135 și 136.

Tabelul 69.

Activitatea antimicrobiană a probelor testate după 20 ore de incubare exprimată prin valoarea diametrelor zonelor de inhibiție

Nr. crt	Substanța testată	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i>			<i>Proteus mirabilis</i>		
		S	I	R	S	I	R	S	I	R
1.	Extract apos <i>Vaccinium myrtillus</i>		8,1 ±0,4		12,4 ±0,8					+++
2.	Suc <i>Vaccinium myrtillus</i>		6,8 ±0,6				++			++
3.	Extract apos <i>Vaccinium vitis-idaea</i>			++			++	12,2 ±0,8		
4.	Suc <i>Vaccinium vitis-idaea</i>		10,4 ±0,6				++			++

S-sensibil la substanța testată; I-intermediar; R-rezistent la substanța testată (+++ - foarte rezistent; ++ - puțin rezistent)



(a) *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*



(b) *Staphylococcus aureus*

(c) *Escherichia coli*

Figura 135. - Reacția culturilor de *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* respectiv *Staphylococcus aureus* la acțiunea extractelor apoase și a sucului brut din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* (după 20 de ore)

În ceea ce privește acțiunea antimicrobiană față de *Staphylococcus aureus* (figura 135 b) s-au remarcat extractul apos notat „A” în figura 135 (b), sucul notat „a” în figura 135 (c) din fructe de *Vaccinium myrtillus* și extractul notat „M” în figura 135 b, c din fructe de *Vaccinium vitis-idaea*. Specia *Proteus mirabilis* s-a dovedit a fi sensibilă la acțiunea extractului din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* și rezistentă la acțiunea extractului din fructe de *Vaccinium myrtillus*. Extractul din fructe de *Vaccinium myrtillus* are acțiune antimicrobiană asupra speciei *Escherichia coli* (figura 135 c).

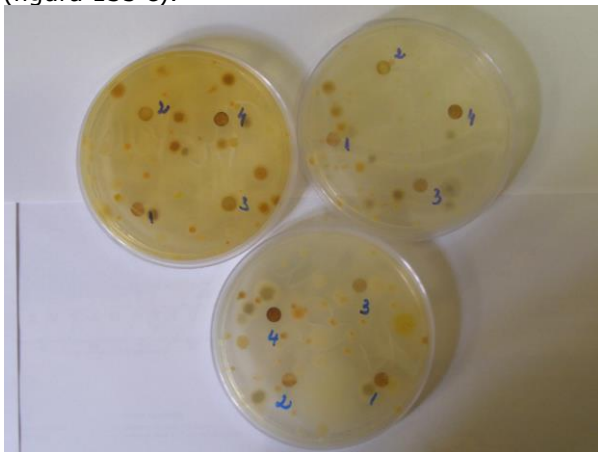


Figura 136. Reacția culturilor de *Escherichia coli* (stânga), *Proteus mirabilis* (dreapta) respectiv *Staphylococcus aureus* (jos) la acțiunea extractelor apoase și a sucului brut din fructe de *Vaccinium myrtillus*

De remarcat este faptul că, cele trei tulpini bacteriene s-au dovedit a fi rezistente când culturile au fost incubate cu extracte ce au fost diluate la o concentrație de 0,2 g/mL (figura 136). Colonii izolate de *Escherichia coli* au apărut mai ales în jurul zonelor cu rondelile impregnate cu suc de *Vaccinium myrtillus* (2), extract (3) respectiv suc (4) din fructe de *Vaccinium vitis-idaea*. Coloniile de *Proteus mirabilis*, au fost mai rezistente față de acțiunea extractelor apoase (1, 3), acestea reușind să se dezvolte chiar lângă zonele cu rondelile după cum indică și figura 136. Specia *Staphylococcus aureus* s-a dovedit mai sensibilă, incubarea cu extracte dovedind activitatea antimicrobiană a acestora.

III.6. INFLUENȚA EXTRACTELOR APOASE DIN FRUCTE DE *VACCINIUM MYRTILLUS* (AFINE) RESPECTIV *VACCINIUM VITIS-IDAEA* (MERIȘOARE) ASUPRA UNOR ENZIME OXIREDUCTOARE ȘI A UNOR PARAMETRII BIOCHIMICI LA ANIMALE DE EXPERIENȚĂ

Experimentele au fost realizate pe trei loturi de câte 10 cobai (*guinea pigs*), în vârstă de 1 an, în greutate de 40-60 g.

Cobaii au fost menținuți tot timpul experimentului în condiții corespunzătoare atât din punct de vedere al microclimatului cât și al calității hranei.

Celor trei loturi experimentale li s-a administrat zilnic, timp de 14 zile după cum urmează:

- Lotul M (martor) – 0,2 mL apă distilată;
- Lotul L1 – 0,2 mL extract apos din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine), (33,88 mg cianidină/mL extract);
- Lotul L2 – 0,2 mL extract apos din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare), (32,20 mg cianidină/mL extract).

Sacrificarea s-a făcut după o prealabilă anestezie, respectându-se condițiile impuse de Legea 205 /2004, art. 7, 18, 22 și reglementările nr. 143/400/2002 și 37/2002, privind protecția animalelor vertebrate în cazul utilizării pentru experimente și alte scopuri științifice.

S-a recoltat sânge prin puncție cardiacă pe anticoagulant (heparină). După sacrificare s-au recoltat de la fiecare individ, următoarele organe: **ficat, rinichi și splină**.

Valorile parametrilor biochimici determinați în urma tratamentelor cu extracte apoase din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine) și *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare) asupra animalelor de experiență aflate în stres oxidativ sunt redată global în tabelul 1 iar reprezentările grafice în figurile 1- 7.

După două săptămâni de administrare a extractelor s-a determinat o ușoară creștere a activității GOT cu 32,8% în cazul administrării extractului din afine față de valoarea martorului, respectiv cu 18,9% în cazul administrării extractului de merișor. O creștere cu 25,15 % s- a înregistrat la cobaii tratați cu extract de afine față de cei tratați cu extract din merișor. Totuși valorile activității GOT se situează la ambele loturi tratate cu extracte naturale la valori care se situează în limita datelor din literatură (tabelul 70, figura 137).

Tabelul 70 .

Valorile medii ale parametrilor GOT, GPT, GGT, proteine, Hb, Fe, P, Ca, Mg, ALP, GSH, MDA, CAT, SOD, G-px și G-red la animalele de experiență (cobai) trate cu extracte apoase din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea*

Lot	Parametru	M (lot martor)	L1 (afine)	L2 (merișoare)
	GOT	11,17	16,62	13,28
	GPT	13,06	9,49	12,83
	GGT	14,72	17,52	28,85
	Proteine	6,97	7,09	6,96
	Hb	11	14,6	10,76
	Fe (μg/dL)	244,17	331	239
	P	10,14	12,09	9,51
	Ca	8,52	9,3	9,51
	Mg	2,52	2,35	2,8
	ALP	142,8	179,92	132,61
	GSH (μmoli)	7,025	8,52	6,05
	MDAx10 (μmol/dL)	4,05	4,45	4,0445
	CATx10	4,02	4,396	4,162
	SOD	5,66	8,45	15,5
	G-px x 10	2,797	2,25	3,09
	G-red	6,38	7,5	9,37

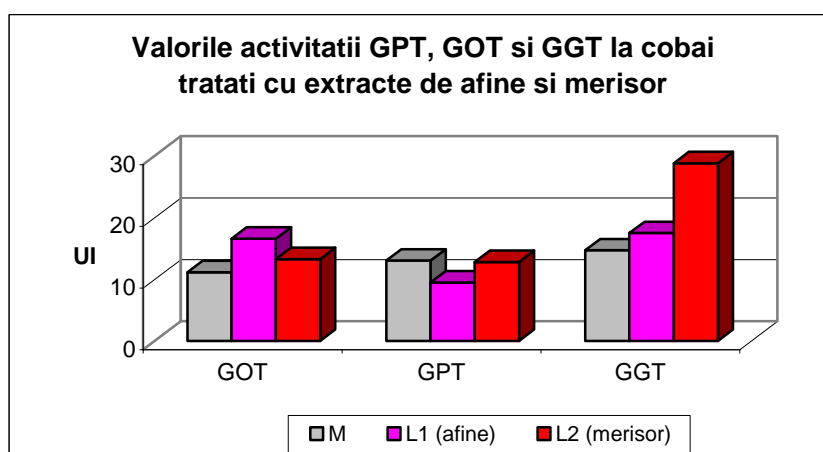


Figura 137. - Valorile medii ale activității transaminazelor serice și ale glutamil transferazei la cobai tratați cu extracte apoase din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine) respectiv fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare)

În cazul activității GPT valorile medii ale acesteia, la lotul L1 la care s-a administrat extract apos de afine se situează la valori mai scăzute față de cele

obținute la lotul L2 căruia i s-a administrat extract apos de merișoare cu 26,2%, respectiv cu 28,4% mai scăzute față de lotul martor. La fel ca și în cazul GOT, valorile se situează în limita datelor din literatură.

În cazul determinării activității γ - glutamil transpeptidazei (GGT), rezultatele se prezintă diferit. O creștere semnificativă s-a înregistrat la lotul L2 (merișor), creșterea fiind cu 96% față de lotul martor. Valorile medii ale GGT la lotul L1 înregistrează o scădere cu 64,6%, valoarea înregistrată la L1 înregistrând doar o ușoară creștere cu 16% față de lotul martor.

Analizând aceste date se observă că transaminazele serice nu sunt semnificativ afectate, deci se menține o bună funcționare a hepatocitului ceea ce de altfel se confirmă și din valorile medii ale activității fosfatazei alcaline (tabelul 70, figura 141).

S-a observat, totuși, un efect nedorit al extractului de merișor în ceea ce privește activitatea GGT. Această enzimă constituie un indicator sensibil al afectării ficatului. Valorile ridicate indică că administrarea extractului de merișor ar putea acționa ca toxic pentru hepatocit. Determinarea acestei enzime se utilizează în vederea confirmării valorilor fosfatazei alcaline.

Proteinemia este un indicator al stării nutriționale, a funcțiilor ficatului, rinichilor precum și a stării de hidratare. În ceea ce privește determinarea valorilor medii ale proteinemiei, acestea înregistrează valori aproximativ egale la toate cele trei loturi, ceea ce demonstrează că administrarea celor două extracte nu afectează în mod semnificativ funcționarea ficatului și rinichilor.

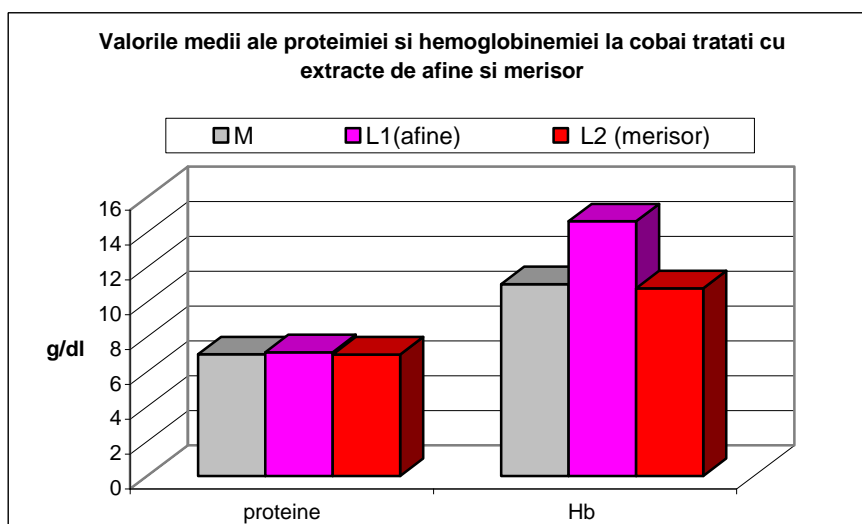


Figura 138. - Valorile medii ale proteinemiei (g/dl) și hemoglobinemiei (g/dl) la cobai tratați cu extracte apoase din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine) respectiv fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare)

În ceea ce privește valoarea medie a hemoglobinemiei s-au înregistrat următoarele rezultate:

- la lotul L2 la care s-a administrat extract apos din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare) nu s-au înregistrat diferențe semnificative față de lotul martor;
- la lotul L1 la care s-a administrat extract apos din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine) s-a înregistrat o creștere a valorii hemoglobinemiei cu 32,7% față de lotul martor, ceea ce semnifică o intensificare a sintezei de hemoglobină.

Se poate concluziona că, extractul din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine) are un efect stimulator în sinteza hemoglobinei, spre deosebire de extractul din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare) unde nu se înregistrează diferențe semnificative ale hemoglobinemiei, respectiv ale valorilor medii ale sideremiei (figura 3).

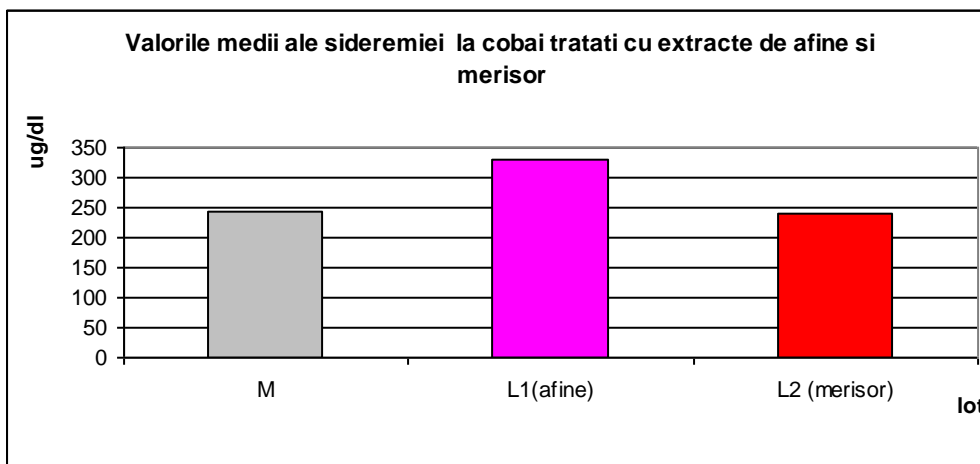


Figura 139. - Valorile medii ale sideremiei ($\mu\text{g/dl}$) la cobai tratați cu extracte apoase din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine) respectiv fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare)

Concentrația sideremiei plasmatice este determinată de absorbția fierului din intestine, ficat, splină, sistem osos, respectiv de sinteza de hemoglobină. La lotul L1 (afine) s-a înregistrat o creștere cu 35,56% față de lotul martor, ceea ce confirmă efectul de stimulare a sintezei de hemoglobină și de stimulare a absorbției fierului conținut în extractul de afine, cu prioritate.

Rezultatele obținute în ceea ce privește determinările fosforemiei, calcemiei și magnezemiei sunt redată în tabelul 70 și figura 140.

Valorile medii ale tuturor celor trei parametrii se încadrează în valorile date în literatura de specialitate [298-292].

În ceea ce privește valorile medii ale fosforemiei, s-au înregistrat valori mai ridicate cu 19,04% la lotul L1 tratat cu extract de afine față de lotul martor, respectiv cu 21,4% față de lotul L2 la care s-a administrat extract de merișoare,

cea ce demonstrează o intensificare a absorbției intestinale a acestuia, de către extractul de afine.

Calciul ionic este reglat de hormonii paratiroidieni și vitaminele D. Calciul seric constituie suma dintre calciul ionizat, cel complexat și calciul legat de proteine (în majoritate de albumină).

La loturile tratate cu extracte de afine și merișoare nu se înregistrează diferențe semnificative față de lotul martor respectiv față de datele din literatură.

O situație similară a fost înregistrată la magnezemie. În urma determinării acestuia au rezultat valori medii similare cu ale lotului martor, respectiv cu datele indicate în literatura de specialitate.

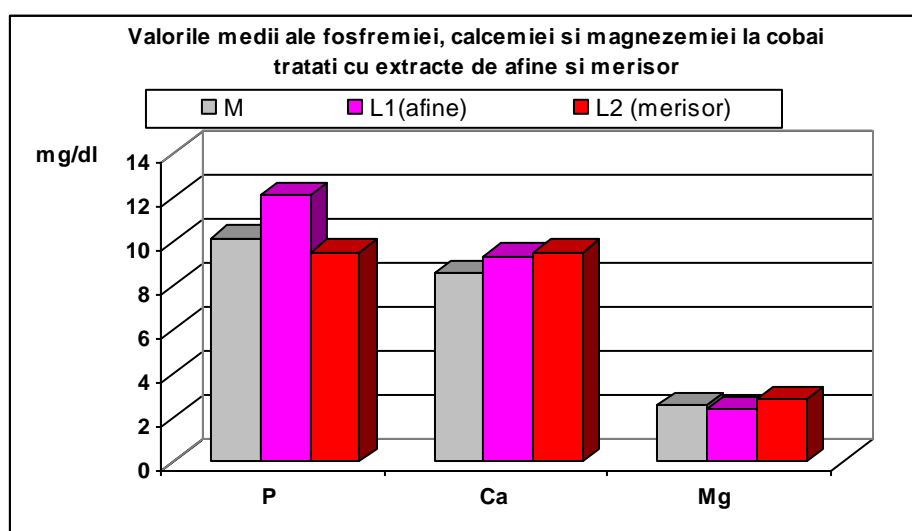


Figura 140. - Valorile medii ale fosforemiei (mg/dl), calcemiei (mg/dl) și magnezemiei (mg/dl) la cobai tratați cu extracte din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine) respectiv fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare)

Rezultatele obținute în ceea ce privește determinările valorilor medii ale activității fosfatazei alcaline sunt redate în tabelul 170 și figura 141.

După cum s-a prezentat în discuția activității transaminazelor serice, se observă valori crescute cu 25,7% la lotul L1 (afine) față de lotul martor, respectiv cu 26,3 % față de lotul L2 (merișor), ceea ce semnifică o intensificare a fixării fosforului, fapt confirmat și prin rezultatele obținute la determinarea fosforemiei.

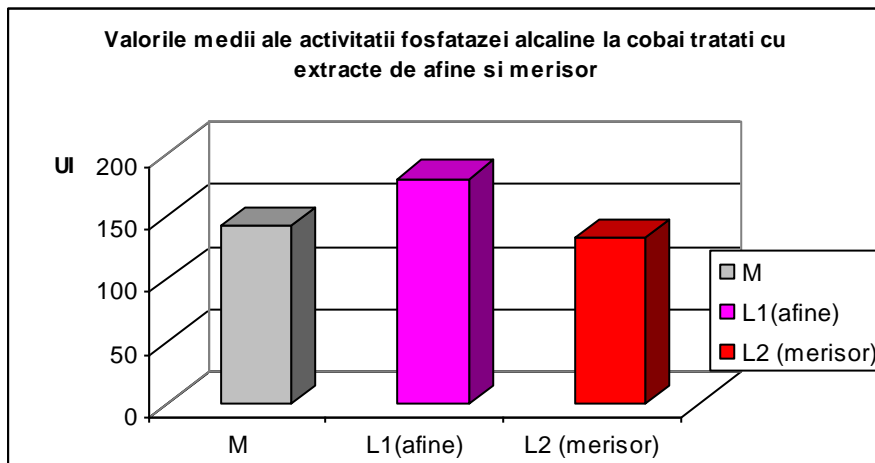


Figura 141. - Valorile medii ale activității fosfatazei alcaline la cobai tratați cu extracte din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine) respectiv fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare)

În vederea studierii efectului antioxidant al extractelor de afine și merișoare s-au efectuat determinări pentru identificarea parametrilor specifici peroxidării lipidice și anume:

- nivelul malondialdehidei ($\mu\text{moli/dl}$), o măsură a instalării stresului oxidativ;
- nivelul glutationului redus (GSH) ($\mu\text{moli/dl}$);
- determinarea enzimelor implicate în lupta împotriva stresului oxidativ: *catalaza* (CAT) (UI), *superoxid dismutaza* (SOD) (UI), *glutacion peroxidaza* (G-px) (UI) și *glutacion reductaza* (G-red) (UI).

Rezultatele obținute sunt prezentate sintetic în tabelul 70 respectiv figurile 142 și 143.

Valoarea medie a glutationului redus (GSH) determinată în cazul lotului L1 la care s-a administrat extract apos din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine) a înregistrat o creștere a nivelului acestuia cu 22,1% față de lotul martor, respectiv cu 30,5 % față de lotul L2 la care s-a administrat extract apos din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare). Valoarea înregistrată în cazul lotului L1 este ușor mai ridicată și față de cea indicată de literatura de specialitate, ceea ce semnifică o intensificare a reacțiilor de reducere a glutationului oxidat, respectiv de stimulare a activității enzimelor antioxidante implicate în sistem, deși la lotul L1 se înregistrează și o creștere nesemnificativă a nivelului malondialdehidei (cu 9,81% față de lotul martor), ceea ce se întâlnește la aproximativ toate substanțele cu caracter antioxidant, administrate pe timp scurt (respectiv – cele 2 săptămâni de experiment).

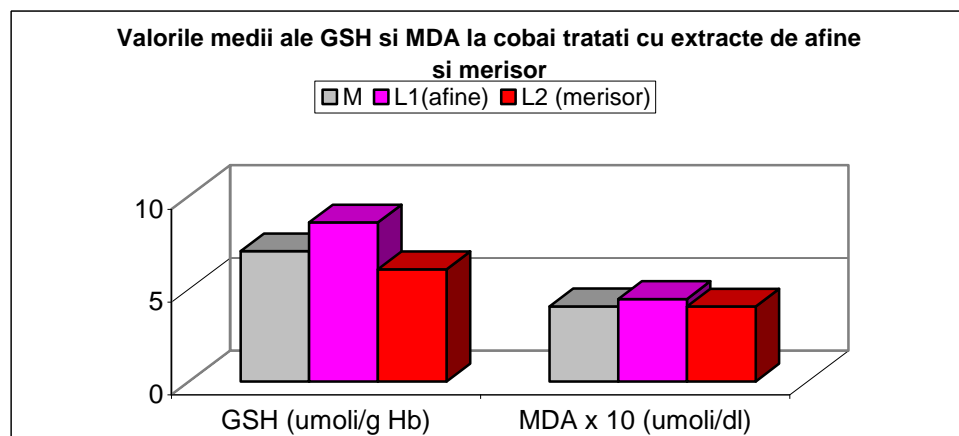


Figura 142. - Valorile medii ale glutationului redus (GSH) ($\mu\text{mol/g Hb}$) și ale malondialdehidei (MDA) ($\mu\text{mol/dl}$) la cobai tratați cu extracte din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine) respectiv fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare)

Stresul oxidativ la care sunt supuse organismele vii generează radicali liberi (RL) respectiv specii reactive ale oxigenului (SRO) care în concentrații fiziologice, stimulează creșterea și diviziunea celulară. O mutație la nivel celular poate cauza devierea permanentă a reacțiilor oxidative cu formarea SRO în exces. Celula este astfel pusă în situația de continuă proliferare. În doze mari, cronice, speciile reactive al oxigenului sunt oncogene, iar în doze foarte mari, acestea produc apoptoza.

În organism, producerea este asigurată pe cale endogenă la nivelul mitocondriilor, peroxizomilor și lizozomilor, pentru speciile reactive ale oxigenului ($\text{O}_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , H_2O_2 , HClO^{\bullet} ; 1O_2) și la nivelul membranei celulare și microsomale, în cursul sintezei de prostaglandine, când se eliberează OH^{\bullet} .

Peroxizii lipidici acționează în calitate de substanțe lezante prin modificarea proprietăților membranei celulare și a membranelor mitocondriilor și lizozomilor (creșterea fluidității, fragilității și permeabilității), ceea ce duce la dispariția gradientilor osmotici, chimici și electrici. În acest fel, scade sau este anulată excitabilitatea celulară, se perturbă profund procesele metabolice și apar leziunile morfologice.

Antioxidanții enzimatici cu rol protector sunt *superoxid dismutaza* (SOD) și *catalaza* (CAT), iar cei cu rol detoxifiant sunt *glutacion peroxidaza* (GSH-px) și *glutacion transferaza* (GSH-S-T). Eficiența lor crește dacă acționează sinergic cu alți antioxidanți.

Rolul *catalazei* este cel de detoxifiere, de descompunere a H_2O_2 produsă de *superoxid dismutaza*. Ea acționează ca un protector al SOD prin inactivarea H_2O_2 , a SOD, în detoxifiere; reacția catalizată de SOD este cea de dismutare a radicalului superoxid $\text{O}_2^{\bullet-}$. Enzima inhibă indirect peroxidarea acizilor grași nesaturați deoarece $\text{O}_2^{\bullet-}$ este atât factor inhibitor cât și factor terminal în peroxidarea lipidelor [293-296].

GSH-px este prezentă în toate celulele în cantități variabile. În eritrocite se află în cantități mari și joacă un rol major în menținerea integrității membranelor

eritrocitare la stres oxidativ. GSH-px acționează la concentrații mici de H_2O_2 constituind principala enzimă utilizată de celule pentru detoxifiere.

G-red acționează împreună cu CAT și SOD în îndepărtarea peroxizilor formați în exces.

Studiind nivelul activității enzimelor enumerate anterior, implicate în sistemul antioxidant al eritrocitelor s-au constatat următoarele:

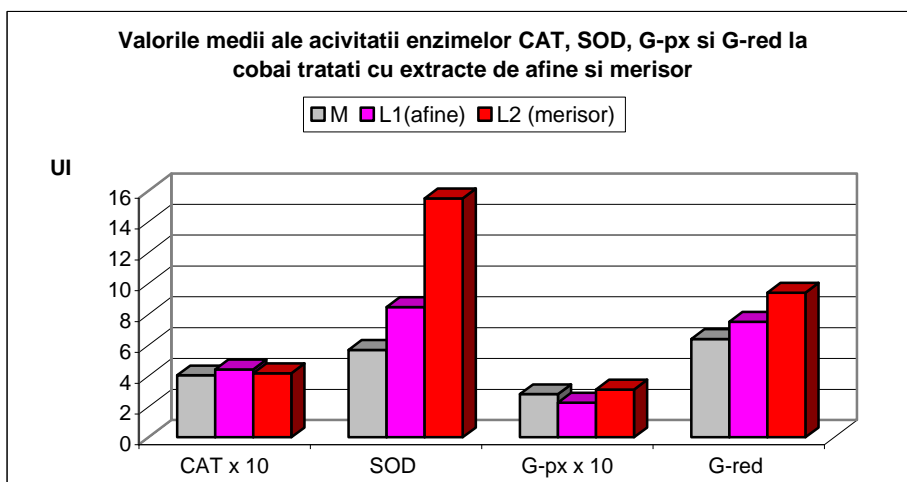


Figura 143. - Valorile medii ale activității catalazei eritrocitare, superoxid dismutazei, glutation peroxidazei și ale glutation reductazei (UI) la cobai tratați cu extracte din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine) respectiv fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare)

- activitatea catalazică nu suferă modificări majore: s-a sesizat o ușoară creștere cu 9,3 % la lotul experimental L1 la care s-a administrat extract apos din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine), respectiv cu 3,52 % la lotul L2 la care s-a administrat extract apos din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare) față de lotul martor;
- în cazul determinării activității SOD, rezultatele sunt extrem de semnificative, în sensul că s-a înregistrat o creștere cu 49,3 % în cazul lotului tratat cu extract de afine (lotul L1) respectiv cu 73,58 % la lotul L2 tratat cu extract de merișoare față de lotul martor;
- între cele două loturi trate cu extracte naturale din fructe de pădure există o diferență de activitate de 83% (lotul L2 înregistrează această creștere față de lotul L1). Această diferență se poate explica prin faptul că toate tipurile de enzime sunt implicate în detoxifierea organismului față de administrarea extractului de merișoare în special, ceea ce este confirmat și de rezultatele prezentate anterior (tabelul 70, figura 143).

Activitatea G-px nu înregistrează diferențe semnificative între cele două loturi tratate cu extracte naturale. Totuși, o creștere cu 37,3 % a activității G-px a fost înregistrată la lotul L2 tratat cu extract de merișoare față de lotul L1 tratat cu extract de afine. Aceasta se poate explica printr-o reacție de detoxifiere la apariția

unor mici cantități suplimentare de apă oxigenată, care ar putea apărea și datorită faptului că extractul de merișoare nu stimulează activitatea catalazică, așa cum s-a înregistrat în activitatea CAT în cazul extractului de afine.

Valorile medii ale activității G-red, înregistrate la lotul L1 au fost cu 17,5% mai mari față de cele înregistrate la lotul martor, iar valorile activității G-red, înregistrate la lotul L2 au fost cu 46,9 % mai mari față de cele înregistrate la lotul martor. La lotul L2 s-a înregistrat o creștere a activității G-red cu 24,9 % față de lotul L1. Aceasta s-ar putea explica prin faptul că în cazul extractului de afine se formează o cantitate mai scăzută de peroxizi lipidici față de administrarea extractului de merișoare.

Concluzii:

În urma determinărilor efectuate se desprind următoarele concluzii:

- ambele extracte (afine și merișoare) acționează în sensul stimulării sistemului antioxidant al celulelor;
- transaminazele serice nu sunt semnificativ afectate de cele două tipuri de extracte, deci se menține o bună funcționare a hepatocitului ceea ce de altfel se confirmă și din valorile medii ale activității fosfatazei alcaline,
- valorile ridicate ale GGT indică faptul că, administrarea extractului de merișoare ar putea acționa ca toxic pentru hepatocit;
- extractul de afine stimulează sinteza de hemoglobină și de absorbție a fierului;
- ambele extracte (de afine și de merișoare) acționează în sensul stimulării absorbției calciului și fosforului, cu efecte mai pozitive la extractul de afine;
- extractul de afine are efect antioxidant mai puternic, ceea ce se relevă printr-o valoare mai mare a glutathionului redus și o valoare medie mai scăzută a MDA, față de extractul de merișoare;
- la administrarea extractului din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine) se înregistrează valori mai scăzute ale activității SOD, G-px și G-red față de cele înregistrate la administrarea extractului din fructe de *Vaccinium vitis-idaea* (merișoare), ceea ce s-ar putea datora conținutului mai bogat în substanțe antioxidante (flavonoizi, antocianine, compuși polifenolici) decât în cazul extractului de merișoare;
- extractul din fructe de *Vaccinium myrtillus* (afine) are un efect antioxidant mai pregnant, relevat chiar și în numai două săptămâni de experiment.

Rezultatele obținute au făcut obiectul unei lucrări științifice [297].

CONCLUZII

Calitatea și valoarea biologică a alimentelor depinde de conținutul și activitatea antioxidantilor în ansamblu polifenoli, caroteni, antocianine, acid ascorbic prezenți.

În general pe parcursul păstrării și prelucrării tehnologice a materiei vegetale, conținutul și activitatea antioxidantilor scade. Unul din mecanismele de bază ale degradării alimentelor este procesul de oxidare, proces care implică multiple reacții de oxido-reducere. Având în vedere compoziția chimică extrem de complexă a fructelor, legumelor, a tuturor plantelor în antioxidanți și prooxidanți și influența atât a proceselor cât și a metodelor de prelucrare tehnologică, problema asigurării stabilității antioxidantilor în produsele alimentare obținute final devine necesară pentru asigurarea unor produse de calitate superioară.

Pe baza celor prezentate în prima parte a tezei cu privire la necesitatea înlocuirii antioxidantilor și coloranților sintetici cu cei naturali atât în industria alimentară cât și în industria farmaceutică și cosmetică, în teză am realizat un studiu detaliat al principiilor active din două tipuri de fructe de pădure ce aparțin aceleiași gen, *Vaccinium myrtillus* (afine negre) respectiv *Vaccinium vitis-idaea* (afine roșii – merișor de munte), specii autohtone.

Rezultatele finale sunt următoarele:

1. s-au obținut mai multe tipuri de extracte prin mai multe metode de extracție și anume, extracție dinamică cu soluții etanolice respectiv metanolice la temperatura camerei și extracție statică repetată (macerare) cu apă respectiv alcool etilic. Prin extracție statică repetată conținutul de compuși polifenolici, în special antocianine a fost evident mai ridicat;
2. principiile active prezente în extracte au fost puse în evidență aplicând mai multe metode, cromatografice, cromatografia în strat subțire, cromatografia de lichide de înaltă performanță, respectiv spectroscopice, spectroscopia UV-VIS, spectroscopia IR, spectrometria de masă;
3. conținutul de compuși polifenolici totali, flavonoide respectiv antocianine totale au fost determinate cantitativ prin două metode, conform Farmacopeei Române respectiv prin metoda aplicată curent în practică, metoda Folin Ciocalteu;
4. s-a analizat activitatea antioxidantă a tuturor extractelor obținute, comparativ cu activitatea antioxidantă a unor soluții de standarde, antocianidine de tipul peonidină, malvidină, delfinidină, cianidină cu structură flavonoidică ($C=10^{-4}$ g/L) precum și cu activitatea antioxidantă a unui antioxidant sintetic des utilizat în industria alimentară t-butilhidroxitoluen (BHT, $C=10^{-4}$ g/L). Prin metoda ce utilizează radicali liberi de tip 1,1-difenilpicril-hidrazil (DPPH) s-au înregistrat valori mai mari ale activității antioxidante decât valorile determinate prin metoda ce utilizează

sistemul β -caroten/acid linoleic. Valorile mai mari ale activității antioxidante, determinată prin metoda cu DPPH, arată că extractele analizate sunt buni captatori de radicali liberi de tip 1,1-difenilpicril-hidrazil (DPPH);

5. determinarea puterii de colorare pentru cele două tipuri de extracte a fost realizată prin studii de culoare în spațiul CIELAB, urmărindu-se nuanța, strălucirea, luminozitatea, și puterea de colorare a acestora; concentrația în pigmenți colorați a extractelor analizate exprimată ca și concentrația în antocianine, a fost cuprinsă între $0,86 \cdot 10^{-3}$ – $4,78 \cdot 10^{-3}$ mg/mL pentru extractul din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv $1,46 \cdot 10^{-3}$ – $9,67 \cdot 10^{-3}$ mg/mL în cazul extractului din fructe de *Vaccinium vitis-idaea*; rezultatele obținute au permis stabilirea concentrației minime în care aceste extracte manifestă putere de colorare;
6. studiul degradării termice al extractelor din fructe de pădure a evidențiat faptul că degradarea compușilor polifenolici din extractele analizate începe deja la 100°C ;
7. s-a demonstrat că principiile active extrase din fructele de *Vaccinium myrtillus* și *Vaccinium vitis-idaea* manifestă activitate antioxidantă pronunțată adăugate ca atare sau ca emulsii 20% U/A în uleiurile vegetale, activitate net superioară acidului ascorbic, dar apropiată de cea a antioxidantului sintetic t-butil-hidroxitoluen (BHT) propriu industriei alimentare (E 321);
8. prin copigmentarea vinurilor rosé și alb cu adaos de extracte din fructe de pădure s-a demonstrat faptul că poate fi îmbogățită culoarea acestora. Această intensificare a culorii se poate datora creșterii conținutului de antocianine din vin prin adăugarea extractelor naturale, dar și a altor compuși, precum flavone și acizi fenolici ce pot lua parte la reacțiile de copigmentare.
9. analizând comportamentul reologic al extractelor din fructe de *Vaccinium myrtillus* respectiv *Vaccinium vitis-idaea* folosite ca adaosuri în baze de creme alimentare se poate spune că aceste extracte pot fi folosite cu succes nu numai în industria alimentară ci și în baze de creme pentru industria farmaceutică, cosmetică ca antioxidanți respectiv coloranți naturali fără efecte negative asupra stabilității acestora;
10. prin determinarea activității antimicrobiene a celor două extracte s-a stabilit că prin diluarea acestora până la o concentrație de 0,2 mg/mL tulpinile bacteriene sunt rezistente. La concentrații mai ridicate s-a demonstrat activitate antimicrobiană față de specia *Staphylococcus aureus* respectiv asupra speciei *Escherichia coli* numai în cazul extractului din fructe de *Vaccinium myrtillus*. Pentru specia de *Proteus mirabilis* efectul antimicrobian a fost evidențiat numai pentru extractul din fructe de *Vaccinium vitis-idaea*.
11. determinările efectuate *in vivo* pe animale de experiență aflate în stres oxidativ (cobai) au demonstrat că ambele extracte (afine și merișoare) acționează în sensul stimulării sistemului antioxidant al celulelor, în sensul stimulării absorbției calciului și fosforului. Efectele sunt mai pozitive la

extractul de afine, *Vaccinium myrtillus*, acesta având un efect antioxidant mai pregnant, relevat chiar și în numai două săptămâni de experiment.

Rezultatele cercetărilor experimentale care au stat la baza elaborării acestei teze de doctorat au fost valorificate după cum urmează:

- 3 lucrări ISI publicate în *Revista de Chimie*, 59(5)/2008; 59(8)/2008; 59(9)/2008;
- 2 lucrări publicate în Proceedings: New Trends and Strategies in the Chemistry of Advanced Materials with Relevance in Biological Systems, Technique and Environmental Protection, 8-9 noiembrie 2007, Timișoara, România, Institutul de Chimie Timișoara al Academiei Române, Autoritatea Națională pentru Cercetare științifică, ISBN 978-973-52-0217-0
- 1 lucrare publicată *Lucrări științifice INMATEH – Agriculture and Engineering – complying with the European requirements*, vol II (24), București 2008, revistă recunoscută CNCSIS, cat.B+, nr.737/2007, ISSN 1583-1019
- 1 lucrare comunicată și publicată în „Proceedings of International Conference on Ecological Materials and Technologies ECOMAT”, Bucharest, Romania, 25-26 septembrie **2008**
- 1 lucrare publicată în rezumat în lucrările celei de „A XXX-a Conferință Națională de Chimie”, Călimănești-Căciulata, **2008**
- 1 lucrare publicată în *Buletinul USAMV-CN 65 / 2008* ISSN 1454-2382, Cluj-Napoca
- 1 lucrare în curs de publicare la *Revista de Chimie*, cu impact ISI, aflată în portofoliu pentru luna decembrie/2008
- 1 lucrare trimisă spre publicare la *International Journal of Food Properties*, revistă cu impact ISI

BIBLIOGRAFIE

1. Harborne, J.B., *The Flavonoids: Advances in research since*, Chapman & Hall, London, **1986**
2. Mennen, L.I., Walker, R., Bennetau-Pelissero, C., Scalbert, A., Risks and safety of polyphenol consumption, *Am. J. Clin. Nutr.*, **2005**, 81(suppl.), 326S-9S
3. Segal, Br., *Biochimia produselor alimentare*, Ed. Tehnică București, **1971**
4. Packer, L., Hiramatsu, M., Yoshikawa, T., *Antioxidant Food Supplements in Human Health, cap.26 Antioxidants in Herbs: Polyphenols*, **1999**, 393-410, www.sciencedirect.com/science/book/9780125435901
5. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.*, **2004**, 79(5), 727-747
6. Ghedira, K., Les flavonoides: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique, *Phytothérapie*, **2005**, 4, 162-169
7. Ribereaux-Gayon, P., *Les composés phénoliques des végétaux*, Bordeaux, **1968**, 255
8. Bodea, C., *Tratat de Biochimie vegetală*, vol II, Editura Academiei, **1965**
9. Harborne, J.B., *The flavonoids: recent advances*. In: Goodwin TW, ed. Plant Pigments. London, England: Academic Press, **1988**, 299-343
10. Beecher, G. R., Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake, *J. Nutr.*, **2003**, 133, 3248S-3254S
11. Ianculov, I., Filimon, M., *Analiza Biochimică*, Ed. Orizonturi Universitare Timișoara, **2003**
12. Istudor, V., *Farmacognozie. Fitochimie. Fitoterapie*, vol I, Ed. Medicală București, **1998**
13. Watzl, B., Rechkemmer, G., Flavonoide, *Ernährungs-Umschau*, **2001**, 48, 498-502
14. Rice-Evans, C., Flavonoid Antioxidants, *Current Medicinal Chemistry*, **2001**, 8, 797-807
15. Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D., Trinajstić, N., Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids, *Croatica Chemica ACTA*, **2003**, 76(1), 55-61
16. Gorduza, V.M., Tărăbășanu-Mihăilă, C., Gorduza, V., Cernătescu, C., Rusu, M., Structure-reactivity relationships of antioxidant flavonoids, *Ovidius University Annals of Chemistry*, **2000**, 11(1), 56-59
17. Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., Tomás-Barberá, F.A., Datta, N., Singamsong, R., Chen, S.S., Flavonoids in Food and their health benefits, *Plant Foods for Human Nutrition*, **2004**, 59, 113-122
18. Ciulei, I., Grigorescu, E., Stănescu, U., *Plante Medicinale, Fitochimie și Fitoterapie*, vol 1, Editura Medicală, **1993**
19. Tărăbășanu-Mihăilă, C., Gorduza, V.M., Radu, F., Mazgareanu, M., *Coloranți organici de interes alimentar, cosmetic și farmaceutic*, București Uni Press, **1997**, 331
20. Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J., *Fruit Phenolics*, Boca Raton USA CRC Press, **1990**

21. Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H., *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human diet*, Blackwell Publishing, **2006**
22. Navindra P. Seeram, *Nutritional Oncology – cap. 37 Berries*, **2006**, 615-628
23. Lupea, A.X., *Transformări ale biocompușilor procesați în scop alimentar*, CEP USM Chișinău, **2004**
24. Miller, A.L., Antioxidant Flavonoids: Structure, Function and Clinical Usage, *Alternative Medicine Review*, **1996**, 1(2), 103-111
25. Strack, D., *Phenolic metabolism*. In: Dey P.M., Harborne, J.B. eds. *Plant Biochemistry*, London UK, Academic Press, **1997**, 387-416
26. Grotowald, E., *The Science of Flavonoids*, Springer Science-Business Media Inc., USA, **2006**
27. Hagerman, A.E., *Tanin Handbook: Tanin Chemistry*, Hagerman laboratory, **1998**, www.muohio.edu/hagerman.html
28. Yu, O., Matsuno, M., Subramanian, S., *Flavonoid Compounds in Flowers: Genetics and Biochemistry*, Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology vol.I, Global Science Books, **2006**, 282-292
29. Jaakola, L., Määttä, K., Pirttilä, A.M., Törrönen, R., Kärenlampi, S., Hohtola, A., Expression of Genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin and flavonol levels during bilberry fruit development, *Plant Physiology*, **2002**, 130, 729-739
30. Tsukasa Iwashina, The structure and distribution of the flavonoids in Plants, *J. Plant Res.*, **2000**, 113, 287-299
31. Sikora, E., Cieślik, E., Topolska, K., The sources of natural antioxidants, *Acta Sci.Pol., Technol.Aliment*, **2008**, 7(1), 5-17
32. Clifford, M.N., Review, Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden, *J. Sci. Food Agric.*, **2000**, 80, 1063-1072
33. Prior, R.L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G., Mainland, C.M., Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of *Vaccinium* species, *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, 46, 2686-2693
34. Bennet, R.C., Wallsgrave, R. M., Secondary metabolites in plant defence mechanisms, Tansley Review nr.72, *New Phytol.*, **1994**, 127, 617-633
35. Dixon, R.A., Paiva, N.L., Stress-induced phenylpropanoid metabolism, *Plant Cell.*, **1995**, 7, 1085-1097
36. Ehlenfeldt, M.K., Prior, R.L., Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry, *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 2222-2227
37. McRae, K.B., Lidster, P.D., DeMarco, A.C., Dick, A.J., Comparison of the polyphenol profiles of apple fruit cultivars by correspondence analysis, *J.Sci. Food Agric.*, **1990**, 50, 329-342
38. Monties, B., *Lignins*. In: Dey P.M., Harborne J.B., eds. *Methods in Plant Biochemistry*. London, UK, Academic Press, **1989**, 113-157
39. Moskowitz, A.H., Hrazdina, G., Vacuolar contents of fruit subepidermal cells from *Vitis* species, *Plant Physiol.*, **1981**, 68, 686-692
40. Cheynier, V., Polyphenols in foods are more complex than often thought, *Am. J. Clin. Nutr.*, **2005**, 81, 223S-9S
41. Ayaz, F.A., Kadioglu, A., Bertoft, E., Acar, C., Turna, I., Effect of fruit maturation on sugar and organic acid composition in two blueberries (*Vaccinium arctostaphylos* and *Vaccinium myrtillus*) native to Turkey, *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, **2001**, 29, 137-141

42. Wang SY, Lin H-S, Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage, *J. Agric Food Chem*, **2000**, 48:140-146
43. Stöhr, H., Hermann, K., The phenolics of fruits. VI. The phenolics of currants, gooseberries and blueberries. Changes in phenolic acids and catechins during development of black currants., *Z. Lebensm-Unters Forsch*, **1975a**, 159, 31-37
44. Ilja CW Arts, Hollman, P.CH., Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies, *Am. J. Clin. Nutr.*, **2005**, 81(suppl), 317S-25S
45. Cook, N.C., Samman, S., Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *J. Nutr. Biochem.*, **1996**, 7, 66-76
46. Moon, Y.J., Wang, X., Morris, M.E., Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism, *Toxicology in Vitro*, **2006**, 20, 187-210
47. Treutter, D., Significance of flavonoids in plant resistance: a review, *Environ. Chem. Lett.*, **2006**, 4, 147-157
48. Antolovich, M., Prezler, P.D., Patsalides, E., Mc Donald, S., Robards, K., Methods for testing antioxidant activity, *Analyst*, **2002**, 127, 183-198
49. Prakash, A., *Antioxidant activity*, A Publication of Analytical Progress Press, medallion Laboratories, 9000 Polymouth Ave.N., Minneapolis MN., 55427
50. ...“Safety evaluation of certain food additives”, *WHO Food Additives*, Series: 42, WHO, **1999**
51. Boskon Dimitrios, Sources of natural phenolic antioxidants, *Trends in Food Sci.&Technol.*, **2006**, 17, 505-512
52. Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chem.*, **2006**, 99, 191-203
53. Buchanan, B.B., Gruissen, W., Jones, R.L., *Biochemistry of Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Biologist, Rockville, Maryland, **2000**
54. Cotelle, N., *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2001**, 1, 569-590
55. Rice-Evans, C.E., Miller, N.J., Paganca, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, **1996**, 20(7), 933-956
56. Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., Flavonoid Antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *J.Nutr.Biochem.*, **2002**, 13, 572-584
57. Wu, X., Gu, L., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., Beecher, G. & Prior, R. L. Factors in the development of a database of food total antioxidant capacity using lipophilic and hydrophilic oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL}): A preliminary study of 28 foods, *J. Food Compos. Anal.*, **2004**, 17:407-422
58. Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., The chemistry behind antioxidant capacity assays, *J.Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 1841-1856
59. Sánchez-Moreno, C., Review: Methods used to evaluate the free radical Scavenging activity in foods and biological systems, *Food Sci. Technol. Int.*, **2002**, 8(3), 121-137
60. Tsai, P-J., Wu, S-C., Cheng, Y-K., Role of polyphenols in antioxidant capacity of napiergrass from different growing seasons, *Food Chem.*, **2008**, 106, 27-32
61. Fujisawa, S., Kadoma, Y., Evaluation of Several Natural and Synthetic antioxidants by the induction period method, *Internet Electronic Journal of Molecular Design*, **2003**, 2, www.biochempress.com
62. Peschel, W., Sánchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzia, I., Jiménez, D., Lammela-Raventós, R., Buxaderas, S., Codina, C., An industrial

- approch in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes, *Food Chem.*, **2006**, 97, 137-150
63. Wang, H., Cao, G., Prior, R.L., Total Antioxidant Capacity of fruits, *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, 44, 701-705
 64. Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B. & Jacob, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples, *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51:3273-3279
 65. Wang, H., Cao, G., Prior, R.L., Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins, *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 304-309
 66. Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I., Özyurt, D., Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assay Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay, *Molecules*, **2007**, 12, 1496-1547
 67. Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K., Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant Power (FRAP) assays: A comparative study, *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 3122-3128
 68. R.Pulido, L.Bravo, F.Saura-Calixto, *J.Agric. Food. Chem*, **2000**, 48(8), 3396-3402
 69. V. Katalinic, M. Milos, T. Kulisic, M. Jukic, *Food Chemistry*, **2006**, 94,550-557
 70. Aqil, F., Ahmad, I., Mehmood, Z., Antioxidant and free radical Scavenging Properties of Twelve Traditionally Used Indian Medicinal Plants, *Turk. J. Biol.*, **2006**, 30, 177-183
 71. Then, M., Szentmihályi, Sárközi, A., Varga, J.S., Examination on antioxidant activity in the greater celandine (*Chelidonium majus L*) extracts by FRAP method, *Acta Biologica Szegediensis*, **2003**, 47(1-4), 115-117
 72. R. Segal, A.Popa, C. Craiu, *Analele Universităţii Aurel Vlaicu, Arad*, **2000**, 11-16
 73. Lien, E.J., Ren, S., Bui, H.H., Wang, R., Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants, *Free Radical Biology & Medicine*, **1999**, 26(3/4), 285-294
 74. Molyneux, P., The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, **2004**, 26(2), 211-219
 75. Wettasinghe, M., Shahidi, F., Scavenging of reactive-oxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals, *Food Chem.*, **2000**, 70, 17-26
 76. Blois, S., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **1958**, 181, 1199-1200
 77. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm.-Wiss. Technol.*, **1995**, 28, 25-30
 78. Godjevac, D., Vajs, V., Menkovic, N., Tesčević, V., Janackovic, P., Milosavljevič, Flavonoids from flowers of *Cephalaria pastricensis* and their antiradical activity, *J. Serb. Chem. Soc.*, **2004**, 69(11), 883-886
 79. Hou, W.C., Wu, W.C., Yang, C-Y., Chen, H-J., Liu, S-Y., Lin, Y-H., Antioxidant activities of leaf extracts of *Liriope spicata L.*, *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **2004**, 45, 285-299
 80. Terahara, N., Konczak, I., Ono, H., Yoshimoto, M., Yamakawa, O.,

- Characterization of acylated Anthocyanins in Callus Induced from Storage root of purple-Fleshed Sweet Potato, *Ipomoea batatas* L., *J. Biomed. Biotechnol.*, **2004**, 5, 279-286
81. Okava, M., Kinjo, J., Nohara, T., Ono, M., DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants, *Biol. Pharm. Bull.*, **2001**, 24(10), 1202-1205
 82. Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoka, Terao, J., HPLC Method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1998**, 62(6), 1201-1204
 83. Gerger, I., Palicica, R., Lucaci, L., Dragoș, D., Gogoșă, I., Ursulescu, M., Pîrsan, P., *Corelarea capacității antioxidante a unor extracte obținute din plante medicinale cu unii componenți caracteristici ai acestora*, Cercetări Științifice, Seria III: Procese și Tehnologii Agroalimentare, Editura Agroprint Timișoara, **1997**, 9-13
 84. Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Rižner Hraš, A., Simonič, M., Knez, Ž., Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities, *Food Chem.*, **2005**, 89, 191-198
 85. Lupea, A.X., **Pop, M.**, Cacic, S., Structure-Radical Scavenging activity relationships of Flavonoids from *Ziziphus* and *Hydrangea* extracts, *Revista de Chimie*, București, **2008**, 59(3), 309-313
 86. Cacic, S., Posibilitatea utilizării extractelor vegetale ca ingrediente naturale pentru medicamente, cosmetice și alimente, *Teză de doctorat*, Ed. Politehnica, seria 4: Inginerie Chimică, nr.1, **2007**
 87. Nascimento, M.A., Silva, A.K., Franca, L.C.B., Quinard, E.L.J., López, J.A., Almeida, M.G., Turnera ulmifolia L (Turneraceae): Preliminary study of its antioxidant activity, *Bioresource Technology*, **2006**, 97(12), 1387-1391
 88. Burda, S., Oleszek, W., Antioxidant and antiradical activities of flavonoids, *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 2774-2779
 89. Yang, D., Wang, Q., Ke, L., Jiang, J., Ying, T., Antioxidant activities of various extracts of lotus (*Nelumbo nufiura Gaertn*) rhizome, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, **2007**, 16(suppl 1), 158-163
 90. Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M., Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds, *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 3954-3962
 91. Novas, M.J., Jiménez, A.M., Asuero, A.G., Determination of antioxidant activity of Canary Seed Infusions by Chemiluminescence, *J. Analytical chemistry*, **2004**, 59(1), 75-76
 92. Miyazawa, T., Nakagawa, K., Structure-related emission Spectrometric analysis of the chemiluminescence of catechins, theaflavins and anthocyanins, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1998**, 62(4), 829-832
 93. Georgetti, S.R., Casagrande, R., Di Mambro, V.M., Azzolini, E.A., Fonseca, m.JV., evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method, *AAPS PharmSci.*, **2003**, 5(2), article 20 (<http://www.pharmsci.org>)
 94. Wrolstad, R.E., Acree, T. E. Decker, E.A., Penner, M.H., Reid, D.S., Schwartz, S.J., Shoemaker, C.F., Smith, D.M., Spoms, P., *Handbook of Food Analytical Chemistry, Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components*, John Wiley&Sons, Inc., Publication, **2005**, 515-517
 95. von Elbe, J.H., Schwartz, S.J., *Colorants.In: Food Chemistry*. Fenneme OR (ed.) 3rd. Ed., Marcel Dekker Inc., New York, **1996**
 96. Robinson, G.M., Robinson, R., Survey of anthocyanins.I. *Biochem. J.*, **1931**,

- 25, 1687-1705
97. Harborne, J.B., Williams, C.A., Anthocyanin and other flavonoids, *Natural Product Reports*, **1998**, 631-652
98. Harborne, J.B., Williams, C.A., Anthocyanin and other flavonoids, *Natural Product Reports*, **2001**, 18, 310-333
99. Markakis, P., Anthocyanins as Food Colours – New York, Academic Press, **1982**, 254
100. Francis, F.J., Food Colorants: anthocyanins, *Crit.Rev. Food Sci. Nutr.*, **1989**, 28, 273-314
101. Andersen, Ø.M., Jordheim, M., The Anthocyanins. In *Flavonoids.Chemistry, Biochemistry and Applications*, Andersen, Ø.M., Markham, K.R., CRC Press, Taylor&Francis Group, Boca Raton, London New York, **2006**
102. Rastelli, G., Constantino, L., Albasini, A., Physicochemical Properties of Anthocyanidins.1. Theoretical Evaluation of the Stability of Neutral and Anionic Tautomeric Forms, *J. Mol. Struct. Theochem*, **1993**, 2, 157-166
103. Harsteen, B.H., The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *Pharmacology&Terapeutics*, **2002**, 96, 67-202
104. Antolovich, M., Prezler, P., Robards, K., Ryan, D., Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits, *The Analyst Critical review*, **2000**, 125, 989-1009
105. Hayashi, K., Ohara, N., Tsukui, A., Stability of anthocyanins in various vegetables and fruits, *Food Sci. Technol. Int.*, **1996**, 2, 30-33
106. Holton, T.A., Cornish, E.C., A survey of anthocyanins I, Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis, *The Plant Cell*, **1995**, 7, 1071-1083
107. *Wikipedia*, the free encyclopedia, <http://en.wikipedia.org/>
108. Andersen, Ø.M., Markham, K.R., *Flavonoids.Chemistry, Biochemistry and Applications*, CRC Press, Taylor&Francis Group, Boca Raton, London New York, **2006**
109. Rabino, I., Mancinelli, A.L., Light, Temperature and anthocyanin production, *Plant Physiol.*, **1986**, 81, 922-924
110. Hamama, A.A., Nawar, W.W., Thermal Decomposition of Some Phenolic Antioxidants, *J. Agric. Food Chem.*, **1991**, 39, 1063-1069
111. Rommel, A., Heatherbell, P.A., Wrolstad, R.E., Red Raspberry Juice and Wine: Effect of Processing and Storage on Anthocyanin Pigment Composition, Color and Appearance, *J. Food Sci.*, **1990**, 55(4), 1011-1017
112. Herman, K., *Fruchtsaft Ind.*, **1960**, 4 (5), 296
113. Fossen, T., Cabrita, L., Andersen, Ø.M., Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region, *Food Chem.*, **1998**, 63(4), 435-440
114. Pascual-Teresa, S., Sanchez-Ballesta, M. T., *Rev. Phytochem.*, DOI 10.1007/s11101-007-9074-0
115. Bridle, P., Timberlake, C.F., Anthocyanins as natural food colours – selected aspects, *Food Chem.*, **1997**, 58(1-2), 103-109
116. Liu, X., Xiao, W., Xu, Y., Wu, J., Quantification and purification of mulberry anthocyanins with Macroporous Resins, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2004**, 5, 326-331
117. <http://nobel.scas.bcit.ca/chem2204/expt9/expt9.htm>, Chromatographic Techniques
118. Netzel, M., Strass, G., Kessenheimer, B., Bitsch, I., Effect of storage time on anthocyanin content in blackcurrant juice and beverages containing

- blackcurrant juice concentrate. *Vitamine und Zusatzstoffe in der Emerung von Mensch und Tier.* – Gera: Gebruder Frank KG, **1999**, 433-436
119. Kähkönen, M.P., Heinonen, M., Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons, *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 628-633
 120. Narayan, M.S., Akhilender Naidu, K., Ravishankar, G.A., Srinivas, L., Venkataram, L.V., Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **1999**, 60(1),1-4
 121. Schmidt, B.M., Howell, A.B., McEniry, B., Knight, C.T., Seigler, D., Erdman Jr., J.W., Lila, M.A., Effective Separation of Potent Antiproliferation and antiadhesion Components from Wild Blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) fruits, *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 6433-6442
 122. Viljanen, K., Kylli, P., Hubbermann, E.M., Schwarz, K., Heinonen, M., Anthocyanin antioxidant activity and partition behavior in whey protein emulsion, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 2022-2027
 123. Viljanen, R., Kylli, P., Kivikari, R., Heinonen, M., Inhibition of protein and lipid oxidation in liposomes by Berry Phenolics, *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 7419-7424
 124. Viljanen, R., Kivikari, R., Heinonen, M., Protein-lipid interactions during liposome oxidation with added anthocyanin and other phenolic compounds, *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 1104-1111
 125. Wang, H., Nair, M.G., Strasburg, G.M., Chang, Y-C., Booren, A.M., Gray, J.I., DeWitt, D.L., Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglicon, cyanidin, from tart cherries, *J.Nat. Prod.*, **1999**, 62, 294-296
 126. Beattie, J., Crozier, A., Duthie, G.G., Potential Health Benefits of Berries, *Current Nutrition&Food Science*, **2005**, 1, 71-86
 127. Bell, D.R., Gochenaur, K., Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin rich extracts, *J. Appl. Physiol.*, **2006**, 100, 1164-1170
 128. Mazza, G.J., Anthocyanins and hearth health, *Ann. Ist. Super Sanità*, **2007**, 43(4), 369-374
 129. Vatter, D.A., Ghaedian, R., Shetty, K., Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry, *Asia Pac. J. Cli. Nutr.*, **2005**, 14(2), 120-130
 130. Netto, C.C., Cranberry and its phytochemicals: a review of in vitro anticancer studies, *J. Nutr.*, **2007**, 137, 186S-193S
 131. Fergurson, P.Y., Kurowska, E., Freeman, D.J., Chambers, A.F., Koropatnick, D.Y., A flavonoid fraction from cranberry extract inhibits proliferation of human tumor cell lines, *J. Nutr.*, **2004**, 134, 1529-1535
 132. Satué-Garcia, M.T., Heinonen, M., Frankel, E.N., Anthocyanins as antioxidants on human Low-Density Lipoprotein and Lecitin-Liposome Systems, *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 3362-3367
 133. Frankel, E.N., Natural Phenolic Antioxidants and their impact on health, *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, **1999**, 385-392
 134. *Flavonoides*, <http://www.docencia.udea.edu.co/Flavonoides.html>
 135. K. Karwowska, E. Malgorzata, Pol.PL. 122.936 (Cl. A. 61k 035/78), 15 Jun. 1984; *CA* **102**, 12351c (**1985**)
 136. Starast, M., Karp, K., Vool, E., Moor, U., Tonutare, T., Paal, T., Chemical composition an quality of cultivated and natural blueberry fruit in Estonia, *Veg. Crops Res. Bull.*, **2007**, 66, 143-153
 137. Yu, Z.Y., Howard, L.R., Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape

- skin, *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 5207-5213
138. C. Santos-Buelga, G. Williamson, *Methods in polyphenol analysis*, Westle Research Centre, Switzerland, 2003, <http://www.rsc.org/is/books>
139. Usaquén-Castro, X., Martínez-Rubio, M., Aya-Baquero, H., González-Martínez, G., Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from red-grape (*Vitis vinifera*) residues, **2006**, 1315-1324, <http://dx.doi.org/10.1051/IUFoST:20060638>
140. McHugh, M.A., Krukonis, V.J., *Supercritical Fluid Extraction, Principles and Practice*, Butterworths Publishers, Boston, **1986**
141. Bhagdeo, M., *Determination of Extractables from Cranberry Seeds using Supercritical CO₂*, Master of Science in Chemistry, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg V.A., **2004**
142. Gil, M.I., Holcroft, D.M., Kader, A.A., Changes in Strawberry anthocyanins and other polyphenols in response to carbon dioxide treatments, *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 1662-1667
143. Kaur, C., Kapoor, H.C., Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian Vegetables, *International J. Food Sci. Technol.*, **2002**, 37, 153-161
144. Singleton, V.L., Rossi Jr., J.A., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent, *Am. J. Enol. Vitic.*, **1965**, 16, 144-158
145. Slinkard, K., Singleton, V.L., Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods, *Am. J. Enol. Vitic.*, **1977**, 28(1), 49-55
146. Karadeniz, F., Burdurlu, H.S., Koca, N., Soyer, Y., Antioxidant activity of selected Fruits and vegetables grown in Turkey, *Turk J. Agric. For.*, **2005**, 29, 297-303
147. Cevalos-Casals, B.A., Cisneros-Zevallos, L., Stoichiometric and kinetic studies of phenolic antioxidants from andean purple corn and red-fleshed sweetpotato, *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 3313-3319
148. Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D., Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products, *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, 46, 4113-4117
149. Moyer, R.A., Hummer, K.E., Finn, C.E., Frei, B., Wrolstad, R.E., Anthocyanins, phenolics, and Antioxidant Capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*, *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 519-525
150. Roura, E., Andrés-Lacueva, C., Estruch, R., Lamuela-Raventós, R.M., Total polyphenol intake estimated by a modified Folin Ciocalteu assay of urine, *Clin. Chem.*, **2006**, 52(4), 749-751
151. Mazza, G., Miniati, E., Anthocyanins in fruits, vegetables and grains, CRC Press Inc., Boca Ratan, **1993**
152. Jiao, Z., Liu, J., Wang, S., Antioxidant activities of total pigment extract from Blackberries, *Food Technol. Biotechnol.*, **2005**, 43(1), 97-102
153. Lohachoompol, V., Srzednicki, G., Craskee, J., The Change of total anthocyanins in blueberries and their antioxidant effect after drying and freezing, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2004**, 5, 248-252
154. Robinson, G.M., Robinson, R., *A survey of anthocyanins I*, *Biochem. XXV*, **1931**, 1687-1705
155. Anderson, O.M., Francis, G.W., Techniques of pigment identification, Annual Plant Review-Plant Pigments and their Manipulation, **2004**, 14, 293-341
156. Takeoka, G., Dao, L., Anthocyanins. In *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*, Hurst, W.J. Eds. CRC Press, Boca Raton **2002**,

- 219-241
157. Rodriguez-Saona, L.E., Wrolstad, R.E., Unit F1.1. Anthocyanins, Extraction, isolation and purification of anthocyanins. In Current Protocols in Food Analytical Chemistry, Wrolstad, R.E., Willey, New York, **2001**
 158. Sherma, J., Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis, *J. Chromatography A*, **2000**, 880, 129-147
 159. Maleš, Z., Medic-Sarić, M., Optimization of TLC analysis of flavonoids and phenolic acids of *Helleborus atrorubens* Waldst. et Kit., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2001**, 24, 353-359
 160. Harborne, J.B., Plant Polyphenols. Anthocyanin production in the cultivated potato, *Biochem. J.*, **1960**, 74, 262-269
 161. Harborne, J.B., Spectral Methods of Characterizing anthocyanins, *Biochem. J.*, **1958**, 70, 22-28
 162. Harborne, J.B., Sherratt, H.S.A., Plant Polyphenols, *Biochem. J.*, **1961**, 78, 298-306
 163. Harborne, J.B., Sherratt, H.S.A., Plant Polyphenols, *Biochem. J.*, **1962**, 84, 100-106
 164. Maleš, Z., Plazibat, M., Vundac, V.B., Žuntar, I., Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree-*Arbutus unedo* L. (*Ericaceae*), *Acta Pharm.*, **2006**, 56, 245-250
 165. Gohar, A.A., Flavonol Glycosides from *Cadaba glandulosa*, *Z. Naturforschung*, **2002**, 57C, 216-220
 166. Harborne, J.B., *The flavonoids: Advances in Research since 1986*, New York: Chapman&Hall, **1994**
 167. Kähkönen, M.P., Heinämäki, J., Ollicainen, V., Heinonen, M., Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities, *J. Sci. Food Agric.*, **2003**, 83, 1403-1411
 168. Scordino, M., Di, M.A., Passerini, A., Maccarone, E., Adsorption of flavonoids on resins: cyanidin 3-glucoside, *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 1965-1972
 169. "...Method Development in Solid Phase Extraction using Polar ISOLUTE SPE Sorbents for the Extraction of Non-Aqueous Samples", Argonaut Technologies, **2004**
 170. J. Daigle, E.J. Conkerton, *J. Chromatogr.*, 24, **1982**, 262-265
 171. Mozetič, B., Trebše, P., Identification of sweet cherry anthocyanins and hydroxycinnamic acids using HPLC coupled with DAD and MS detector, *Acta Chim. Slov.*, **2004**, 51, 151-158
 172. Hong, V., Wrolstad, R.E., Use of HPLC Separation/Photodiode Array detection for characterization of anthocyanins, *J. Agric. Food Chem.*, **1990**, 708-715
 173. Mazza, G, Miniati, E., *Anthocyanins in fruits, vegetables and grains*, CRC Press, London U.K., **1993**, www.amazon.com
 174. Einbond, L.S., Reynertson, K.A., Luo, X-D., Basile, M.J., Kennelly, E.J., Anthocyanin antioxidants from edible fruits, *Food Chem.*, **2004**, 84, 23-28
 175. Zhou, Y., Singh, B.R., Effect of Light on Anthocyanin levels in Submerged Harvested Cranberry Fruit, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2004**, 5, 253-258
 176. Burdulis, D., Ivananskas, L., Dirsė, V., Kazlauskas, S., Ražukas, A., Study of diversity of anthocyanin composition in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits, *Medicina (Kaunas)*, **2007**, 43(12), 971-977
 177. Blando, F., Gerardi, C., Nicoletti, I., Sour Cherry (*Prunus cerasus* L) anthocyanins as ingredients for functional foods, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2004**, 5, 253-258
 178. Ychiyanagi, T., Hatano, Y., Matsugo, S., Konishi, T., Simultaneous

- comparison of relative reactivities of twelve major anthocyanins in Bilberry towards Reactive Nitrogen Species, *Chem Pharm. Bull.*, **2004**, 52(11), 1312-1315
179. Ychiyanagi, T., Kashiwada, Y., Ikeshiro, Y., Hotano, Y., Shida, Y., Horie, M., Matsugo, S., Konishi, T., Complete assignment of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) anthocyanins separated by capillary zone electrophoresis, *Chem. Pharm. Bull.*, **2004**, 52(2), 226-229
180. Ychiyanagi, T., Oikawa, K., Tateyama, C., Konishi, T., Acid mediated hydrolysis of blueberry anthocyanins, *Chem. Pharm. Bull.*, **2001**, 49(1), 114-117
181. Ychiyanagi, T., Hatano, Y., Matsugo, S., Konishi, T., Structural dependence of HPLC Separation Pattern of Anthocyanins from Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.), *Chem. Pharm. Bull.*, **2004**, 52(5), 628-630
182. Mozetič, B., Trebše, P., Hribar, J., Determination and Quantitation of Anthocyanins and Hydroxycinnamic Acids in Different Cultivars of Sweet Cherries (*Prunus avium* L) from Nova Gorica Region (Slovenia), *Food Technol. Biotechnol.*, **2002**, 40(3), 207-212
183. Häkkinen, S.H., Kärenlampi, S.O., Heinonen, M., Mykkänen, H.M., Törrönen, A.R., HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries, *J. Sci. Food Agric.*, **1998**, 77, 543-551
184. Watanabe, M., An anthocyanin compound in buckwheat sprouts and its contribution to antioxidant capacity, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2007**, 71(2), 579-582
185. Fang, Z.X., Zhang, M., Wang, L.X., Sun, J.C., Identification of anthocyanin in bayberry (*Myrica rubra* Sieb et Zucc.) by HPLC-DAD-ESIMS and GC, *J. Food and Drug Analysis*, **2006**, 14(4), 368-372
186. Bednar, P., Tamassi, A.V., Presutti, C., Pavlikova, M., Lemr, K., Fanali, S., Separation of structurally related anthocyanins by MEKC, *Chromatographia*, **2003**, 58, 283-287
187. Flavonoides, <http://www.membres.lycos.fr/jjww/flavonoide.html>
188. Robards, K., Antolovich, M., Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids, A Review, *Analyst*, **1997**, 122, 11R-34R
189. Byamukama, R., Jordheim, M., Kiremire, B., Namukobe, J., Andersen, O.M., Anthocyanins from flowers of *Hippeastrum* cultivars, *Scientia Horticulturae*, **2006**, 109, 262-266
190. Prasain, J.K., Wang, C.C., Barnes, S., Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples, *Free Radical Biology&Medicine*, **2004**, 37(9), 1324-1350
191. Robards, K., Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables, *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1000, 657-691
192. Wada, L., Ou, B., Antioxidant activity and phenolic content of Oregon Caneberries, *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 3495-3500
193. Hager, T.J., Howard, L.R., Liyanage, R., Lay, J.O., Prior, R.L., Ellagitannin Composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS, *J. Agric. Food Chem.*, published on web American Chemical Society 01/23/**2008**
194. Bednár, P., Papoušková, Müller, L., Barták, P., Stávek, J., Pavlonšek, Lemr, K., Utilization of capillary electrophoresis/mass spectrometry (CE/MSⁿ) for the study of anthocyanin dyes, *J. Separation Sci.*, manuscript ID: JSSC-**2005**-00071.R1
195. Prior, R.L., Lazarus, S.A., Cao, G., Muccitelli, H., Hammerstone, J.F.,

- Identification of Procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium Spp.*) using High-performance liquid Chromatography/Mass Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 1270-1276
196. Reed, J.D., Krueger, C.G., Vestling, M.M., MALDI-TOF mass spectrometry of oligomeric food polyphenols, *Phytochemistry*, **2005**, 66, 2248-2263
197. Morariu, I., Todor, I., *Botanica Sistematică*, Ed. Didactica și Pedagogică, București, **1996**
198. Tămaș, M., *Botanică farmaceutică*, vol III, Sistematica-Cormobionta, Ed. Medicală Universitară „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, **1999**
199. Pârveu, C., *Universul Plantelor, Mică enciclopedie*, ediția a III-a, Ed. Enciclopedică, București, **2000**
200. Crăciun, F., Bujor, O., Alexan, M., *Farmacia naturii*, vol.II, Ed. Ceres, București, **1977**
201. Leung, A.Y., Foster, S., *Encyclopedia of common natural ingredients used in Foods, Drugs and Cosmetics*, second Edition, Willey-Interscience Publication, John Willey&Sons Inc., New York, **1996**
202. Kemper, K.I., The Longwod Herbal Task Force: Bilberry (*Vaccinium myrtillus*), **1999**, 1-13, USA-NRCS PLANTS Database: <http://plants.usda.gov>
203. www.oceanspray.com
204. Shi, J., Yu, J., Pohorly, J., Young, J.C., Bryan, M., Wu, Y., Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution, *Food Agric.&Environment*, **2003**, 1(2), 42-47
205. Xu, Y., Zhang, R., Fu, H., Studies on the optimal Process to extract Flavonoids from red-raspberry fruits, *Nature and Science*, **2005**, 3(2), 43-46
206. **Pop, M.**, Lupea, A.X., Turcuș, V., Studies on the polyphenolic compounds extraction from *Vaccinium* fruits, *Revista de Chimie*, București, **2008**, 59(5), 491-494
207. Teow, C.C., Truong, V.D., McFeeters, R.F., Thompson, R.L., Pecota, K.V., Yencho, G.C., Antioxidant activities, phenolic and β -carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours, *Food Chem.*, **2007**, 103, 829-838
208. *Farmacopeea Română*, ediția a-X-a, Editura Medicală, București, **1993**
209. Wagner, H., Bladts, S., Zgajnski, E.M., „*Plant Drug Analysis*”, Springer Verlag, Berlin, **1984**, 163-164
210. Marinova, D., Riborova, F., Atanassova, M., Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables, *J. of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, **2005**, 40(3), 255-260
211. Georgescu, C., *Teză de doctorat*, Universitatea „Babeș-Bolyai”, Cluj-Napoca, Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului, **2002**
212. **Pop, M.**, Glevitzky, M., Cacic, S., Lupea, A. X., “Studiul proprietăților de inhibare a proceselor oxidative din uleiurile vegetale folosind antioxidanți din familia Rhamnaceae”, *Rev. Chim.*(București), Nr. 57 (11), **2006**, 1119-1122
213. **Pop, M.**, Pădure, M., Lupea, A.X., *Vaccinium vitis-idaea* extract as antioxidant in food industry, Proceedings: New Trends and Strategies in the Chemistry of Advanced Materials with Relevance in Biological Systems, Technique and Environmental Protection, 8-9 noiembrie 2007, Timișoara, România, Institutul de Chimie Timișoara al Academiei Române, Autoritatea Națională pentru Cercetare științifică, ISBN 978-973-52-0217-0, **2007**, 85-91
214. Glevitzky, M., **Pop, M.**, Brusturean, G.A., Bogdan, I., Marinescu, S., Perju, D., Eficiența utilizării agenților antioxidanți la protejarea sucurilor de fructe, *Revista de Chimie*, București, **2008**, in press

215. Brown, E.M., *Introduction to Thermal Analysis*, ed. Chapman and Hall, New York, **1998**
216. de Souza, A.G., Santos, J.C., Conceição, M.M., Dantas Silva, M.C., Prasad, S., A thermoanalytic and kinetic study of sunflower oil, *Brazilian J. Chem. Eng.*, **2004**, 21(2), 265-273
217. Garro Galvez, J.M., Riedl, B., Conner, A.h., Analytical studies on Tara Tannins, *Holzforschung*, **1997**, 51, 235-243
218. Wissgott, U., Bortlik, K., Prospects for new natural food colorants, *Trends in Food Science&Technology*, **1996**, 7, 298-302
219. Billmeyer, F.W.Jr., Saltzman, M., *Principles of Color Technology*, 2nd Edition, John Wiley&Sons, New York, **1981**
220. *DIN 6147*. Colorimetric evaluation of colour differences of surface colours according to the CIELAB formula
221. Malacara, D., *Color vision and colorimetry: theory and applications.*, Bellingham, Washington USA: SPIE, The International Society for Optical Engineering, **2002**
222. Collet, S., Chagas, L., Baudin, G., *Colour Management: A User's Point of View*, *Advances in Printing Science and Technology*, Proceedings of the 21st Research Conference of the International Association for the Graphic Arts Industry, september **1999**
223. Camgoz, N., *Effects of hue, saturation, and brightness on attention and preference*, Ankara, Turkey: Bilkent University, PhD Dissertation, **2000**
224. Koenig B., *Color workbook*. English, Upper Saddle River, New Jersey, USA: Pearson Education, **2003**
225. *DIN 53146* Testing of paper and board; determination of opacity *DIN 53147* Testing of paper; determination of transparency
226. *DIN 53236* Prüfung von Farbmitteln; Mess und Auswertebedingungen zur Bestimmung von Farbunterschieden bei Anstrichen, ähnlichen Beschichtungen und Kunststoffen
227. *DIN 6167* Description of the Yellowing of Near White or Colourless Materials
228. Popa, S., Jurcău, D., Jurcău, C., Pleșu, N. *Pigmenți organici*. Volumul I. *Pigmenții și culoarea*, Ed.Orizonturi Universitare, Timișoara, **2005**
229. Anwar, F., Siddiq, A., Iqbal, S., Rafique Asi, M., Stabilization of sunflower oil with Moringa Oleifera leaves under ambient storage, *J. Food Lipids*, **2007**, 14, 35-49
230. Boeru, G.L., Puzdrea, D., *Tehnologia uleiurilor vegetale*, Ed. Tehnică, București, **1980**
231. Rusnac, L.M., *Uleiuri vegetale. Proprietăți-Separare-Purificare*, Ed. Politehnica, Timișoara, **2004**
232. Sin, D.W.M., Wong, Y.C., Mak, C.Y., Sze, S.T., Yao, W.Y., Determination of five phenolic antioxidants in edible oils: Method validation and estimation of measurement uncertainty, *J. Food Composition and Analysis*, **2006**, 19, 784-791
233. Shyamala, B.N., Gupta, S., Lakshmi, A.J., Prakash, J., Leafy vegetable extracts-antioxidant activity and effect on storage stability of heated oils, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **2005**, 6, 239-245
234. Cacig, S., Glevitzky, M., **Pop, M.**, Lupea, A.X., "Statistical mathematical modeling of sunflower oil oxidation dynamics. The antioxidants addition influence.", *Scientific and Technical Bulletin of "Aurel Vlaicu" University, Series: Chemistry, Food Science of Engineering*, XII, Vol .11, **2006**, 8-13, ISSN 1582-1021

235. **Pop, M.**, Glevitzky, M., Cacig, S., Lupea, A.X., "Modelarea matematică a variației indicelui de peroxid în cazul uleiului de floarea soarelui tratat cu antioxidanți naturali, respective sintetici", *Studia Universitatis Vasile Goldiș*, Seria Științele Vieții, **2006**, Vol. 16, 97-102
236. Bogdan, I., Glevitzky, M., Cacig, S., **Pop, M.**, Lupea, A.X., "Aspecte privind influența antioxidanților naturali și sintetici asupra gradului de oxidare al uleiului de măsline", *Studia Universitatis Vasile Goldiș*, Seria Științele Vieții, **2006**, 16, 103-106,
237. Glevitzky, M., **Pop, M.**, Cacig, S., Lupea, A.X., Silaghi-Perju, D., "Models based on experimental data of oil stability and antioxidants influence", *MicroCAD 2007- Internațional Scientific Conference, University of Miskolc, Hungary*, 22-23 March **2007**
238. Yanishlieva, N.V., Marinova, E.M., Stabilization of edible oils with natural antioxidants, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2001**, 103, 752-767
239. Samotyja, U., Malecka, M., Effects of blackcurrant seeds and rosemary extracts on oxidative stability of bulk and emulsified lipid substrates, *Food Chem.*, **2007**, 104, 317-323
240. Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M., *Antioxidants in food*, CRC Press Boca Raton Boston-New York-Washington DC, **2001**, 210-247
241. Fridrikhsberg, D.A., *A course in colloid chemistry*, Mir Publishers, Moscow, **1986**
242. Robins, M.M., *Current Opinion in Colloid&Interface Science*, **2000**, 5(5-6), 265
243. Abdalla, A.E., Roozen, J.P., Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion, *Food Chem.*, **1999**, 64, 323-329
244. Abdalla, A.E., Tirzite, D., Tirzitis, G., Roozen, J.P., Antioxidant activity of 1,4-dihydropyridine derivatives in β -carotene methyl linoleate, sunflower oil and emulsions, *Food Chem.*, **1999**, 66, 189-195
245. Osborn, H.T., Akon, C.C., Effect of emulsifier type, droplet size, and oil concentration on lipid oxidation in structural lipid-based oil-in-water emulsions, *Food Chem.*, **2004**, 84, 451-456
246. **Pop, M.**, Lupea, A.X., Pădure, M., *Determination of antioxidant activity of some vegetable extract using DPPH assay and sunflower oils as oxidation substrate* - Lucrări științifice INMATEH - Agriculture and Engineering - complying with the European requirements, vol II (24), București **2008**, revistă recunoscută CNCSIS, cat.B+, nr.737/2007, ISSN 1583-1019
247. Pădure, M., **Pop, M.**, Lupea, A.X., Studies concerning the protected effects of *Vaccinium myrtillus* fruit extract over the edible oils stability - Proceedings: New Trends and Strategies in the Chemistry of Advanced Materials with Relevance in Biological Systems, Technique and Environmental Protection, 8-9 noiembrie 2007, Timișoara, România, Institutul de Chimie Timișoara al Academiei Române, Autoritatea Națională pentru Cercetare științifică, ISBN 978-973-52-0217-0, **2007**, 91-98
248. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives. Method 2501: *Determination of the Peroxide Value*, 7th ed., Edited by C.Paquot, A. Hanfenne, Oxford, England: Blackwell Scientific Publications, **1987**, 199-200
249. *ISO. 3960:2001*, Animal and vegetable fats and oils - Determination of peroxide value
250. *STAS 145/22-74*, Uleiuri și grăsimi vegetale - Determinarea indicelui de peroxid

251. *** AOAC Official Method 965.33. *Peroxid Value of Oils and Fats*. Titration Method, **1995**
252. Siriwardhana, N., Jeon, Y.J., Antioxidative effect of cactus pear fruit (*Opuntia ficus-indica*) extract on lipid peroxidation inhibition in oils and emulsion model systems, *Eur. Food Res. Technol.*, 2004, 219, 369-379
253. Suja, K.P., Abraham, J.T., Thamizh, S.N., Yayalekshung, A., Arumughan, C., Antioxidant efficacy of sesame cake extract in vegetable oil protection, *Food Chem.*, **2004**, 84, 393-400
254. ***AOAC Official Method. *Determination of the p-Anisidine Value*, Fifth Edition: method II.D.26, **2001**
255. Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Evolution of the phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle, *Food Chem.*, **2006**, 95, 405-412
256. González-Manzano, S., Santos-Buelga, C., Dueñas, M., Rivas-Gonzalo, J.C., Escribano-Bailón, T., Colour implications of self-association processes of wine anthocyanins, *Eur. Food Res. Technol.*, DOI10.1007/s00217-007-0560-9, original paper
257. Recamales, A.F., Sayago, A., González-Miret, M., Hernanz, D., The effect of time and storage conditions on the phenolic composition and colour of white wine, *Food Res. Inter.*, **2006**, 39, 220-229
258. Poiană, M-A., *Tehnologii fermentative și extractive*, Ed. Eurobit, Timișoara, **2004**
259. Pascu, L., Stabilirea calității vinurilor roșii pe baza caracteristicilor cromatice, *Revista de Chimie*, București, **2005**, 56(7),703-707
260. Poiană, M-A., Gergen, I., Dobrei, A., Moigradean, D., Influence of Copigmentation on the Chromatic Structure of Red Wine from the Recas Vineyard, *Pomology, Viticulture and Enology, Proceedings. 43rd Croatian and 3rd International Symposium on Agriculture*, Opatija, Croația, **2008**, 879-900
261. OIV, International Organisation of Vine and Wine, *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*, **2006**, vol. I și II
262. Cliff, M.A., King, M.C., Schlosser, Y., Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC comercial red wines, *Food Res. Inter.*, **2007**, 40, 92-100
263. Ianculov, I., Modoran, D., *Caracterizarea polifenolilor existenți în unele specii vegetale*, Cercetări științifice, Seria III: Procese și Tehnologii Alimentare, Ed. Agroprint, Timișoara, **1997**
264. Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Am. J. Enol. Vitic.*, **1974**, 25, 119
265. Glories, Y., La couleur des vins rouges: 1^o partie "les equilibres des anthocyanes et des tanins", *Connaissance Vigne Vin*, **1984**, 18, 195-217
266. Petrea, I.C., Ionescu, L.M., *Fizica elastomerilor, reologie*, Ed. Didactică și Pedagogică, București, **1981**
267. Tudose, R.Z., *Ingineria proceselor fizice din industria chimică*, vol I- Fenomene de transfer, Ed. Academiei Române, București, **2000**
268. Valentová, K., Ulrichová, J., Cvak, L., Šimánek, V., Cytoprotective effect of a bilberry extract against oxidative damage of rat hepatocytes, *Food Chem.*, **2007**, 101, 912-917
269. Wang, X., Sun, H., Fan, Y., Li, L., Makino, T., Kano, Y., Analysis and bioactive evaluation of the compounds absorbed into Blood after oral administration of the extracts of *Vaccinium vitis-idaea* in rat, *Biol. Pharm. Bull.*, **2005**, 28(6),

- 1106-1108
270. Telavéra, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Manach, C., Lamaison, J.L., Rémésy, C., Anthocynins are efficiently absorbed from the small intestine in Rats, *J. Nutr.*, **2004**, 134, 2275-2279
271. Ramirez-Tortosa, C., Andersen, Ø. M., Gardner, P.T., Morrice, P.C., Wood, S.G., Duthie, S.J., Collins, A.R., Duthie, G.G., Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats, *Free Radical biology&Medicine*, **2001**, 31(9), 1033-1037
272. Beuttler, E., *Red cell metabolism*, Grune Statton New York, 1963, **113**
273. Iordăchescu, D., Dumitru, I.F., *Biochimie practică*, Ed. Univ. București, **1988**, 185
274. Meingassner, G., Schmook, F.P., *Reference Paper-Reference value for Crl: CD(SD)BR RATS*, Sandoz Research Institute, Vienna, **1992**, 3(1)
275. Sinha, A., Determination of catalase, *Anal. Biochem.*, **1985**, 47, 393-398
276. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), Performance standards for antimicrobial susceptibility test, 6th ed., Wayne, P.A., *Approved Standards*, **1997**, M2-A6
277. Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Oksman-Caldentey, K.M., Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries, *J. Applied Microbiology*, **2001**, 90, 494-507
278. Nkajima, J., Tanaka, I., Seo, S., Yamazaki, M., Saito, K., LC/PDA/ESI-MS Profiling and Radical Scavenging Activity of Anthocyanins in Various Berries, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2004**, 5, 241-247
279. Kissinger, H.E., *Anal. Chem.*, **1957**, 29, 1702
280. Ozawa, T., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1965**, 1881, 114-120
281. Akahira, T., Sunrose, T., *Joint Convention of Four Electrical Institutes*, Paper no.246, **1969**
282. Popa, S., **Pop, M.**, Lupea, A.X., Turcuș, V., Colour study in CIELAB space on natural colorants from *Vaccinium vitis-idaea* fruits, *Revista de Chimie*, București, aflată în portofoliu pentru luna octombrie **2008**
283. **Pop, M.**, Popa, S., Lupea, A.X., Gruiescu, C., Colour study on extracts on bilberry (*Vaccinium myrtillus* fruits), trimisă spre publicare mai **2008**, *International Journal of Food Properties*
284. **Pop, M.**, Lupea, A.X., Effect of berries extracts on the oxidative stability of *Sylibum marianum* oil and its 20% oil-in-water emulsion, *Revista de Chimie*, București, **2008**, 59(9), 95-959
285. **Pop, M.**, Ardelean, A., Lupea, A.X., Berries extracts-antioxidant activity and effect on storage stability of crocus (*Crocus banaticus*) oil, „Proceedings of International Conference on Ecological Materials and Technologies ECOMAT”, Bucharest, Romania, 25-26 septembrie **2008**
286. Castillo-Sanchez, J.X., Garcíá-Falcón, M.S., Garrido, J., Martinez-Carballo, E., Martins-Dias, L.R., Mejuto, X.C., Phenolic compounds and colour stability of Vinhão wines: Influence of wine-making protocol and fining agents, *Food Chem.*, **2008**, 106, 18-26
287. **Pop, M.**, Lupea, A.X., Glevitzky, M., Ardelean, A., The effect of berries extract addition on the phenolic content and on the colour of rosé and white wines, *Revista de Chimie*, București, **2008**, 59(8), 829-833
288. Tămaș, A., **Pop, M.**, Lupea, A.X., Aprecierea stabilității cremelor alimentare cu adaus de extracte din fructe de pădure, respectiv emulsii U/A ce conțin aceste extracte prin studiul comportării reologice, A XXX-a Conferință Națională de Chimie, Călimănești-Căciulata, **2008**

289. Constantinescu, D., Bojar, O. – *Plante medicinale*, Ed. Medicală București **1969**, p.122.
290. Dejica ,O. *Stresul oxidativ în bolile interne*, Ed. Casa cărții de știință, Cluj-Napoca, **2000**, p. 48.
291. Dejica, D. și col. *Antioxidanți și terapia antioxidantă*, Ed. Casa cărții de știință, Cluj-Napoca, **2001**, p. 23.
292. Ghergariu S., Cadariu M., Spanu I., *Manual de laborator clinic veterinar*, Ed. All Educational, Bucuresti, **2000**
293. Olinescu, R. *SOD and free SH groupes in diferent brain areas of the neurolepticatreated rats*, Rev. Roum. Biochim., **1991**, vol. 23, 1-2, p. 99.
294. Olinescu,R. *Radicalii liberi în patologia umană*, Ed. Tehnică București, **1994**, p. 121-144.
295. Papuc, C. și col. *Biomarkeri ai peroxidării lipidice*, Lucr. Șt. Med. Vet. Timișoara, **2005**, Vol.37, p. 518-523.
296. Popescu, A. *Biochimie medicală*, Ed. Med. București, **1980**, p. 374.
297. Olariu, L., **Pop, M.**, Lupea, A.X., Tulcan, C., Brudiu, I., The effect of *Vaccinium myrtillus* and *Vaccinium vitis-idaea* fruits extracts on the antioxidant system of mamalian organism, *Buletinul USAMV-CN 65/2008*, ISSN 1454-2382, Cluj-Napoca, octombrie **2008**