

CERCETĂRI PRIVIND AUTOOXIDAREA ALIMENTELOR ȘI METODE DE PREVENIRE, RETARDARE ȘI/SAU DIMINUARE

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

Chim. Maria-Raluca Szabo

Conducător științific:
Referenți științifici:

prof. univ. dr. ing. Lupea Alfa-Xenia
prof. univ. dr. ing. Rusnac Lucian
prof. univ. dr. ing. Olariu Lucia Iuliana
prof. univ. dr. Ostafe Vasile

Ziua susținerii tezei: 24.06.2008

UNIV. "POLITEHNICA"	
TIMIȘOARA	
BIBLIOTECA CENTRALĂ	
Căminul nr. 10	
Dulap _____	Lit. _____

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

Teza de doctorat a fost elaborată pe parcursul activității mele în cadrul Facultății de Chimie Industrială și Ingineria Mediului al Universității „Politehnica” din Timișoara și al Facultății de Inginerie Alimentară, Turism și Protecția Mediului al Universității „Aurel Vlaicu” din Arad.

Pentru realizarea analizelor gaz-cromatografice am beneficiat de sprijinul Laboratorului Central pentru Controlul Reziduurilor de Pesticide în Plante și Produse Vegetale București, al Centrului Regional de Spectrometrie de Masă din cadrul Departamentului de Chimie de la Universitatea McMaster din Canada și al Universității Tehnice din Milano.

Realizarea acestei lucrări nu ar fi fost posibilă fără sprijinul și implicarea conducătorului de doctorat, D-na Prof. univ. dr. ing. Alfa Xenia Lupea, al familiei, colegilor și prietenilor, cărora le adresez sincere mulțumiri.

Timișoara, mai 2008

Szabo Maria-Raluca

Szabo, Maria-Raluca

Cercetări privind autooxidarea alimentelor și metode de prevenire, retardare și/sau diminuare

Teze de doctorat ale UPT, Seria 4, Nr. 14, Editura Politehnica, 2008, 198 pagini, 85 figuri, 29 tabele.

ISSN: 1842-8223

ISBN: 978-973-625-659-2

Cuvinte cheie: autooxidare, activitate antioxidantă, extracte vegetale, *Ocimum basilicum*, *Thymus vulgaris*, *Equisetum arvense*, *Millefoli flos*, *Levisticum officinale*, *Maiorana hortensis*, *Anethum graveolens*, *Origanum vulgare*, *Petroselinum crispum*, *Rosmarinus officinalis*, *Apium graveolens*, biosenzor

Rezumat:

Creșterea nivelului de trai din ultima perioadă s-a remarcat și în orientarea unui segment din ce în ce mai mare al populației către produse naturale, chiar dacă mai scumpe. Teza prezintă contribuții referitoare la obținerea și caracterizarea unor extracte de plante din bucătăria și medicina românească: busuioc, cimbru, coada calului, coada șoricelui, leuștean, măghiran, mărar, oregano, pătrunjel, rozmarin și țelină, în scopul utilizării acestora ca antioxidanți și aromatizanți naturali. În plus, a fost propus un model cinetic pentru degradarea oxidativă a uleiurilor și a fost realizat un biosenzor pentru determinarea antioxidanților cu structură polifenolică.

CUPRINS

INTRODUCERE	7
PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU	9
I.1. Oxidarea principiilor active din alimente	9
I.1.1. Factorii care influențează oxidarea alimentelor	9
I.1.1.1. Natura substratului	10
I.1.1.2. Lumina	12
I.1.1.3. Temperatura	13
I.1.1.4. Ionii metalelor grele	14
I.1.1.5. Fotosensibilizatorii	14
I.1.1.6. Umiditatea și pH-ul	15
I.1.1.7. Radiațiile	16
I.1.1.8. Concentrația de oxigen	16
I.1.2. Autooxidarea lipidelor	16
I.1.2.1. Formarea hidroperoxizilor	18
I.1.2.2. Descompunerea hidroperoxizilor	25
I.1.2.3. Interacțiunea produșilor de oxidare ai acizilor grași cu proteine	29
I.1.2.4. Reacții de rupere a legăturii O-O prin homoliză indusă termic	30
I.2. Metode și tehnici de evaluare a autooxidării alimentelor (principii).....	32
I.2.1. Metode standardizate	32
I.2.2. Metode nestandardizate	35
I.2.2.1. Metode analitice	35
I.2.2.2. Metode spectrofotometrice	36
I.2.2.3. Metode cromatografice	38
I.2.2.4. Metode electrochimice	39
I.2.2.5. Metode electromagnetice	40
I.2.2.6. Analiza termică	41
I.2.2.7. Metode „in situ”	42
I.3. Metode de prevenire și de diminuare a oxidării alimentelor. Antioxidanți	42
I.3.1. Prevenirea proceselor de peroxidare enzimatică	43
I.3.2. Prevenirea proceselor de autooxidare	44
I.3.3. Măsurarea activității antioxidante / antiradicalice	53
PARTEA A II-A. CONTRIBUȚII PROPRII	56
II.1. Date botanice și farmacologice referitoare la speciile studiate	56
II.1.1. Busuiocul	56
II.1.2. Cimbrul	57
II.1.3. Coadă calului	58
II.1.4. Coadă șoricelului	59
II.1.5. Leușteanul	60

II.1.6. Măghiranul	61
II.1.7. Mărarul	62
II.1.8. Pătrunjelul	63
II.1.9. Oregano	64
II.1.10. Rozmarinul	65
II.1.11. Țelina	66
II.1.12. Substanțe identificate în uleiurile speciilor studiate	67
II.2. Modul de obținere al extractelor	68
II.3. Metode îmbunătățite de analiză a activității antioxidante	70
II.3.1. Metoda permanganometrică	70
II.3.2. Metoda chemiluminometrică utilizând luminol	76
II.3.3. Metoda spectrofotometrică cu DPPH	85
II.4. Studiul compoziției tincturilor	96
II.4.1. Cromatografie de gaze cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS)	96
II.4.2. Determinarea unor compuși flavonoidici și polifenolici	107
I.4.2.1. Flavonoide	107
I.4.2.2. Antociani și antocianidine	118
I.4.2.3. Taninuri	119
II.5. Posibilități de utilizare a mixturii antioxidante propuse.....	121
II.5.1 Analiza caracteristicilor și standardelor de calitate pentru uleiul de floarea soarelui tip „înalt oleic”.....	121
II.5.2. Posibilități de îndepărtare a clorofiliei prin adsorbție pe adsorbanți solizi și efectul asupra activității antioxidante și compoziției mixturii	130
II.5.3. Studiul eficacității mixturii antioxidante asupra unor grăsimi saturate și nesaturate	133
II.5.4. Analiza termică	140
II.5.5. Analiza efectului antimicrobian al mixturii propuse	143
II.6. Aplicații pentru industria alimentară	146
II.6.1. Modelarea procesului de oxidare	146
II.6.2. Senzor enzimatic pentru determinarea concentrației de antioxidanți	150
II.6.3. Testarea interesului consumatorilor pentru aditivi de origine naturală	155
CONCLUZII	159
ANEXE	168
Anexa 1	168
Anexa 2	169
Anexa 3	179
BIBLIOGRAFIE	185

INTRODUCERE

Una din problemele majore în domeniul chimiei alimentelor este procesul nedorit de oxidare a grăsimilor și al altor ingrediente, în timpul procesării și stocării acestora. Procesul nu poate fi stopat în totalitate, dar în scopul retardării sale mai mulți antioxidanți sintetici sau naturali (E300-E321) au fost aprobați de către Uniunea Europeană (Directivile 89/107/CEE, 94/34/CE, 94/35/CE, 94/36/CE, 95/2/CE, 96/85/CE, 98/72/CE și 2001/5/CE; Deciziile 97/292/CE și 2002/247/CE). Unii dintre aceștia, cum ar fi: propil-galatul (PG, E 310) și derivații săi, terț-butil-hidrochinona (TBHQ, E 319), butil-hidroxi-anisolu (BHA, E 320) și butil-hidroxitoluenu (BHT, E 321) sunt suspectați a fi toxici sau chiar carcinogenici. Acesta este motivul pentru care, în ultimii ani, au apărut pe piață diferite extracte din plante cu efect antioxidant comparabil și uneori chiar mai mare decât cel al antioxidantilor sintetici.

Oferta pieței trebuie să țină cont de preferințele consumatorilor. Creșterea nivelului de trai din ultima perioadă s-a remarcat și în orientarea unui segment din ce în ce mai mare al populației către produse naturale, chiar dacă mai scumpe, după cum se va putea observa și din studiul de caz prezentat la sfârșitul acestei lucrări.

Pornind de la aceste considerente și având la bază materialul vegetal recoltat din zona de Vest a țării, obiectivul principal al acestei teze a constat în analiza activității antioxidante a unor extracte din plante utilizate drept condimente în bucătăria românească, caracterizarea și purificarea acestora în scopul obținerii unei mixturi cu efect antioxidant și aromatizant în același timp.

Materialul vegetal din care s-au obținut extractele a constat din: (1) - busuioc (*Ocimum basilicum*) - partea aeriană; (2) - cimbru (*Thymus vulgaris*) - partea aeriană; (3) - coada calului (*Equisetum arvense*) - frunze; (4) - coada șoricelului (Millefoli flos) - flori; (5) - leuștean (*Levisticum officinale*) - frunze; (6) - măghiran (*Majorana hortensis*) - frunze; (7) mărar (*Anethum graveolens*) - partea aeriană; (8) - oregano (*Origanum vulgare*) - partea aeriană; (9) - pătrunjel (*Petroselinum crispum*) - frunze; (10) - rozmarin (*Rosmarinus officinalis*) - partea aeriană; și (11) - țelină (*Apium graveolens*) - frunze.

Teza cuprinde două părți principale:

Partea I, în care sunt prezentate considerațiile teoretice generale cu privire la procesul de oxidare al principiilor active din alimente, factorii care îl influențează, principalele reacții care au loc, tehnicile uzuale de urmărire a autooxidării alimentelor, metodele de prevenire și diminuare a acesteia.

Partea a II-a, în care sunt prezentate contribuțiile proprii, cuprinde date generale referitoare la plantele studiate, metodele de extracție și de purificare utilizate, metode îmbunătățite de analiză a activității antioxidante *in vitro* și *in situ*, analiza compoziției chimice a extractelor și analiza activității antimicrobiene a mixturii propuse.

În cadrul tezei de doctorat obiectivele urmărite au fost:

1. Extracția principiilor active din materialul vegetal și purificarea acestora;
2. Îmbunătățirea a trei dintre metodele existente pentru analiza activității antioxidante (metoda cu permanganat de potasiu, metoda cu luminol și metoda cu DPPH) și aplicarea acestora pe extractele apoase și alcoolice ale plantelor studiate;

3. Determinarea compușilor de aromă din extractele studiate prin cromatografie de gaze cuplată cu spectrometrie de masă;
4. Determinarea calitativă și cantitativă a conținutului de flavonoide, antociani și taninuri;
5. Propunerea unei mixturi antioxidante conținând șapte din cele unsprezece plante cercetate și verificarea acesteia în vederea:
 - determinării posibilității de folosire ca antioxidant pentru grăsimi saturate (untură) și nesaturate (ulei); analizarea în acest scop a comportării la oxidare a grăsimilor menționate, în prezența și în absența antioxidantilor, folosind atât metode standardizate cât și metode mai noi de tipul analizei termice și conductometriei;
 - determinării eficacității antimicrobiene a mixturii propuse;
6. Propunerea unui model cinetic pentru degradarea oxidativă a uleiurilor;
7. Propunerea și modelarea unui biosenzor pentru determinarea compușilor polifenolici din uleiuri;
8. Studiul receptivității populației față de alternative naturale de aditivi alimentari

Prin finalizare, studiile întreprinse în cadrul acestei teze vor permite identificarea și determinarea cantitativă a principiilor active în vederea caracterizării chimice cât mai complexe a speciilor studiate și propunerea unor modalități concrete de utilizare a acestora în industria alimentară.

PARTEA I.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU

I.1. Oxidarea principiilor active din alimente

Oxidarea produselor alimentare poate fi definită ca un proces chimic și/sau biochimic general, în care substratul este un compus de obicei nesaturat (lipidic în special), asupra căruia acționează fie direct, fie mediat, oxigenul molecular [1, 2]. Oxidarea alimentelor constituie cauza majoră a formării compușilor rău mirositori și a râncezirii, ceea ce contribuie la reducerea perioadei de garanție, a valorii nutritive și uneori chiar la creșterea toxicității acestora [2].

În procesele de oxidare normale prezintă importanță atât reacțiile enzimatică cât și cele neenzimatică. Acestea se găsesc în strânsă interacțiune. Astfel, formele active ale oxigenului rezultate pe cale enzimatică pot provoca oxidarea neenzimatică. Structura de bază care se formează în urma acestor reacții o reprezintă legătura peroxidică. Apariția legăturii peroxidice poate fi cauzată fie de un proces chimic de tip radicalic sub acțiunea directă și neselectivă a oxigenului atmosferic sau dizolvat în substratul nesaturat (olefine, grăsimi, acizi grași nesaturați, steroide etc.) fie de un proces biochimic catalizat de enzimele care favorizează încorporarea a doi atomi de oxigen în substrat (lipoxigenaza, fenoloxidaza, peroxidaza, ascorbinoxidaza și catalaza).

În alimente, cele două procese se pot desfășura simultan dacă parametrii de stare ai sistemului (temperatura, pH, tărie ionică, activitatea apei etc.) corespund actului primar de formare a radicalilor liberi (oricare ar fi natura lor). Deși cele două tipuri de procese, chimice și biochimice, au loc prin intermediul radicalilor liberi, ele se desfășoară după mecanisme și în condiții fundamentale diferite. Din acest motiv, peroxidarea chimică a fost denumită autooxidare spre a o deosebi de peroxidarea enzimatică [1].

I.1.1. Factorii care influențează autooxidarea alimentelor

Deoarece procesele oxidative au loc într-un număr foarte mare de produse alimentare și deoarece se desfășoară atât în timpul condiționării și prelucrării alimentelor cât și în timpul stocării lor este important a se cunoaște mecanismele după care se desfășoară dar și factorii care influențează aceste reacții pentru a se putea interveni în vederea limitării sau chiar a stopării lor. Factorii care influențează oxidarea alimentelor sunt redați în figura 1.

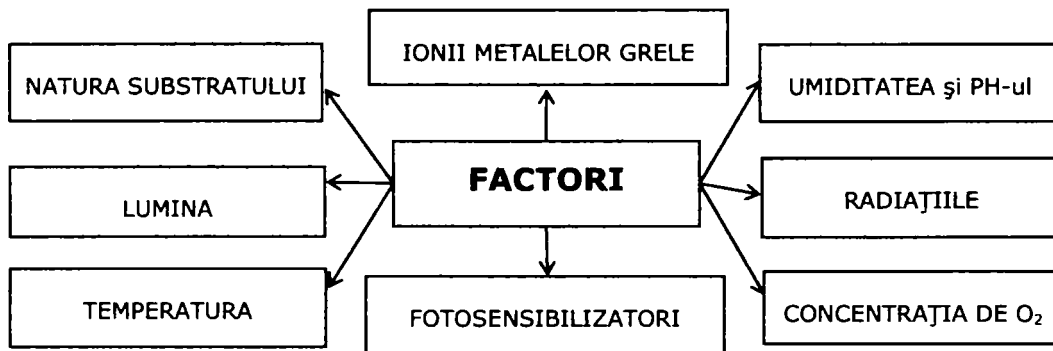


Figura 1. Factorii care influențează procesele de autooxidare

I.1.1.1. Natura substratului

Compoziția chimică a produselor alimentare prin conținutul lor în lipide și acizi grași dar și a altor substanțe nesaturate ușor oxidabile influențează în mod hotărâtor procesele de oxidare ale acestora.

A) Oxidarea lipidelor și a acizilor grași

Lipidele și acizii grași liberi reprezintă una din cele mai instabile componente alimentare care suferă transformări importante nu numai în timpul condiționării și preparării dar și în timpul stocării produselor alimentare. Ele influențează procesele de autooxidare prin numărul, poziția și geometria legăturilor duble astfel [1-4]:

- acizii grași saturați nu se oxidează în condiții normale;
- legăturile duble conjugate sunt mai reactive decât cele neconjugate;
- vitezele reacțiilor de oxidare cresc cu numărul de legături duble din structura acizilor grași;
- acizii cis se oxidează mai ușor decât izomerii lor trans;
- acizii liberi se oxidează mai ușor decât cei din structura lipidelor;

Procesul de alterare oxidativă este deci mai agresiv pentru grăsimile nesaturate și se desfășoară după un mecanism care va fi descris în paragraful următor.

B) Oxidarea carotenoizilor

Carotenoizii au o largă răspândire în toate țesuturile vegetale însoțind cel mai adesea clorofila. Importanța lor se datorează culorii pe care o conferă produselor alimentare cât și valorii lor nutritive, fiind surse importante de vitamina A. Datorită gradului mare de nesaturare, ei se oxidează ușor și în funcție de condițiile existente (presiunea parțială a O_2 , activitatea apei temperatură, prezența radicalilor liberi sau a hidroperoxidilor), oxidarea poate avea loc [1, 4, 5]:

- cu scindarea grupărilor terminale de la unul sau ambele capete, cu formare de :

caroten → β -apocarotenal → crocetina

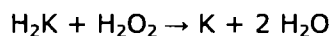
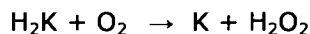


- la sistemul polienic după mecanismul oxidării lipidelor cu formare de peroxizi ca produși primari și respectiv compuși carbonilici, acizi alcoolici etc., ca produși finali ai oxidării;
- la grupările terminale respectiv la ciclul β -iononic formând 5,6 epoxizi. În continuare, poate avea loc o izomerizare cu formarea 5,8-epoxidului, respectiv a furanooxidului.

Procesul de oxidare al carotenoizilor decurge cuplat cu oxidarea acizilor grași nesaturați, fiind catalizat de porfirine și metale grele. Metalele grele, în special cuprul, catalizează îmbrunarea carotenului, în absența grăsimilor, datorită oxidării avansate. Mecanismul de cataliză este asemănător celui pentru grăsimi, accelerând viteza de formare a radicalilor liberi.

C) Oxidarea substanțelor tanante [4]

Procesul de autooxidare a substanțelor tanante, în special a catechinelor, prezintă o deosebită importanță în industria alimentară, deoarece determină închiderea la culoare a produselor vegetale. De menționat că același efect are loc și prin oxidarea enzimatică a catechinelor, substratul suferind aceleași transformări, din care cauză este greu de menționat în ce măsură îmbrunarea care apare este de natură enzimatică sau autooxidativă. Oxidarea catechinelor la chinone e posibil să se realizeze prin intermediul apei oxigenate, care se formează în urma unei reacții secundare și anume:



unde: H_2K - catechină; K- ortochinona corespunzătoare

În general, ortochinonele care se formează în urma oxidării catechinelor nu sunt stabile, descompunându-se foarte rapid. Pe măsură ce crește masa moleculară, stabilitatea scade; de asemenea scade și prin creșterea numărului de grupe fenolice; de exemplu chinonele derivaților pirogalolului sunt mai puțin stabile decât cele ale pirocatehinei. Instabilitatea chinonelor se explică prin tendința lor de a se condensa cu formare de produși de culoare închisă. În urma acestui proces se formează molecule alcătuite din 3-4 și mai multe resturi de catechină, deoarece masa moleculară crește de la circa 300 la peste 1000.

D) Oxidarea substanțelor de aromă [3, 4]

Oxigenul poate provoca degradarea substanțelor aromate și ca urmare alterarea aromei caracteristice, însoțită de apariția unui gust străin.

Procesul chimic de autooxidare a terpenelor, unele din principalele categorii de substanțe de aromă, se explică în prezent prin teoria desfășurării reacțiilor în lanț după schema clasică. Prezența hidroperoxidilor a putut fi pusă în evidență în primele stadii ale oxidării terpenelor.

De exemplu oxidarea limonenului duce la obținerea următorilor compuși: citronelal, linalol, citronelol, citral, d-carvona, și trans-carveol. Carvona este considerată substanța caracteristică pentru oxidarea terpenelor, care denaturează gustul și aroma.

E) Oxidarea acidului ascorbic [4]

Acidul ascorbic se oxidează foarte rapid în soluție, în special în mediu slab alcalin. Procesul de oxidare are loc în două stadii. În primul stadiu acidul ascorbic trece în acidul dehidroascorbic, proces care este reversibil. În acest caz se mai păstrează activitatea vitaminică. În a doua etapă în condițiile existenței unor oxidanți mai energici, are loc oxidarea până la acid 2,3-dicetogulonic și ulterior până la acid oxalic și treonic cu pierderea completă a activității vitaminelor. Acidul 2,3-dicetogulonic nu are valoare nutritivă și constituie substratul unor noi procese de descompunere până la pigmentii melanoidinici care sunt cauza îmbrunării sucului de citrice și a fructelor deshidratate.

F) Oxidarea aminoacizilor, peptidelor și proteinelor

Proteinele, peptidele și aminoacizii din alimente pot suferi modificări oxidative cauzate de anumiți agenți. Spre exemplu oxidarea histidinei, cisteinei, metioninei, triptofanului și tirozinei de către anionul superoxid, peroxidul de hidrogen sau oxigenul singlet poate avea loc atunci când alimente conținând fotosensibilizatori, cum ar fi riboflavina, sunt expuse la lumină. Aminoacizii liberi și resturile de aminoacizi pot fi oxidate în prezența lipidelor peroxidate. Metionina, cisteina, lizina și histidina sunt cele mai susceptibile la oxidare.

Oxidarea proteinelor a fost mai puțin studiată, în ciuda faptului că decurge simultan cu cea a lipidelor în marea majoritate a alimentelor. Proteinele influențează puternic caracteristicile fizice ale alimentelor, astfel încât modificările oxidative ale acestor biomolecule afectează puternic integritatea alimentelor. Modificările fizice și chimice în proteinele oxidate includ distrugerea aminoacizilor, descreșterea solubilității datorită polimerizării, pierderea activității enzimatică, formarea unor derivați ai amino-acizilor și modificări în digestibilitatea proteinelor. În plus, modificările oxidative pot altera capacitatea de legare a apei și de hidratare a proteinelor și pot duce la formarea complexilor lipido-proteici. Majoritatea acestor modificări oxidative au fost corelate cu scăderea calității alimentelor. Cercetări efectuate în ultimii 10 ani arată însă că în multe cazuri oxidarea proteinelor, mai cu seamă dacă este controlată, duce la îmbunătățirea proprietăților structurale ale alimentelor [4, 6, 7].

I.1.1.2. Lumina

Substanțele grase sunt afectate în mare măsură de acțiunea luminii, care catalizează procesele de râncezire oxidativă. În prezența oxigenului are loc o reacție fotochimică în lanț cu formare de peroxizi cu o viteză proporțională cu rădăcina pătrată a intensității radiației. Acțiunea radiațiilor depinde de capacitatea de absorbție a grăsimilor, fiind mai expuse alterării acizii grași cu un număr mai mare de duble legături. Cea ce caracterizează procesele fotochimice este faptul că în majoritatea cazurilor nu se opresc odată cu îndepărtarea sursei de radiații, ele continuând odată ce au fost amorțate.

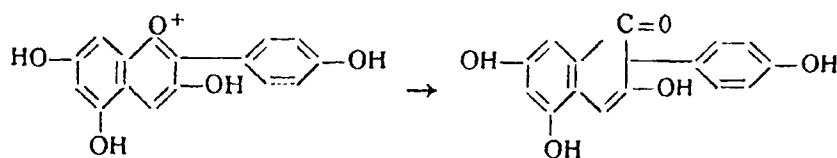
Hemoglobina, clorofila și β -carotenul exercită un efect dublu în procesele de oxidare. În cazul păstrării grăsimilor la întuneric, pigmentii joacă rolul de antioxidanți, în timp ce la lumină, pigmentii accelerează și chiar inițiază oxidarea fotochimică.

Un defect specific al produselor alimentare expuse la radiațiile luminoase îl constituie apariția așa numitului gust "de lumină", o sensibilitate ridicată în acest sens avându-l laptele, berea și vinul (în special când este sulfat). Apariția gustului "de lumină" este catalizată de prezența unor metale (Cu, Fe) care accelerează

procesele de oxidare a grăsimilor, aminoacizilor respectiv a proteinelor. Deosebit de labile sunt grupele -S-S- existente în proteine, grupe care pot suferi procese de oxidare și reducere cu formare de compuși cu miros caracteristic. Aminoacizii care conțin în moleculă sulf ca cisteina, cistina, metionina, sunt sursele principale. Se presupune că purtătorul gustului "de lumină" se formează prin reacția fotochimică dintre gruparea 3-metil-2-buten și o componentă sulfhidril, cu formare de 3-metil-2-buten-1-tiol. Sub acțiunea luminii, din humulon se formează radicalul prenil care reacționează cu hidrogenul sulfurat rezultat din cisteină sau glutation, formând prenilmercaptanul, responsabil de gustul caracteristic, alături de 3-metil-2-buten-1-tiol.

Degradarea aspectului produselor vegetale se caracterizează prin reducerea culorii (decolorare) și eventual brunificarea produselor datorita intensificării proceselor de oxidare a carotenoidelor și antocianilor. Carotenul suferă un proces de izomerizare, forma trans trecând în forma cis, cu reducerea activității vitaminice. Clorofila trece în feofitină, de culoare brună.

Antocianii se degradează sub acțiunea luminii datorită deschiderii ciclului, culoarea specifică reducându-se:



Pe lângă modificările de gust și culoare ale produselor alimentare sub acțiunea combinată a radiațiilor luminoase și a oxigenului are loc și degradarea unor vitamine cu reducerea sensibilă a valorii nutritive a alimentelor respective. De exemplu activitatea vitaminelor din grupul B este redusă în proporție de 10-13 %, efectul cel mai puternic fiind exercitat asupra vitaminei B₂ care se transformă în lumiflavină (trimetilizoaloxazină), sau lumicron în funcție de pH-ul mediului. Procesul depinde de temperatură și încetează la îndepărtarea sursei de lumină [4, 8, 9].

I.1.1.3. Temperatura

În unele operații culinare și în pregătirea unor semifabricate produsele alimentare sunt prăjite în ulei sau untură, temperatura de prăjire se situează între 150-200°C. Aceste prăjiri cer un volum mare de materii grase care pot suferi transformări profunde care le schimbă proprietățile fizice, chimice, organoleptice, nutriționale în special în cazul supraîncălzirilor și prin prăjiri repetate.

Efectul temperaturilor ridicate asupra lipidelor se poate manifesta în absența sau în prezența oxigenului. În mod practic însă, degradarea termică a lipidelor are loc în prezența oxigenului, efectul termic fiind cuplat cu cel de oxidare. În acest gen de degradare se formează atât produși ușor volatili cât și produși grei, nedistilabili, colorați, rezultați din polimerizarea gliceridelor nesaturate și din oxidare.

În fracțiunea volatilă acidă s-au identificat acizi grași nesaturați (C₆ - C₁₂), cetoacizi și hidroxiacizi (C₆ - C₈), diacizi și acizi aromatici. Fracțiunea volatilă neacidă include : hidrocarburi saturate (C₇ - C₁₄), hidrocarburi nesaturate (C₁₂ - C₁₄), alcooli (C₄ - C₈), esteri, lactone, aldehide saturate (C₅ - C₁₀), aldehide nesaturate (C₆ - C₁₁), compuși aromatici (fenoli, fenil-propionaldehidă, 2-pentil-furan).

Compușii nevolatili sunt formați din polimeri care pot fi: polimeri intermoleculari (între gliceride sau acizi grași ai aceleiași gliceride) și anume dimeri și trimeri datorită condensărilor de tip Diels-Alder precum și dimeri și trimeri de oxidare, polimeri intramoleculari rezultați din ciclizarea unei molecule de acid gras nesaturat, ciclul fiind mai mult sau mai puțin nesaturat.

Grăsimile și uleiurile degradate termic devin neutilizabile după un anumit timp de utilizare. Deși grăsimile degradate termic (cel puțin după prima utilizare) conțin o cantitate mică de peroxizi, aceștia pot contribui la distrugerea vitaminelor și acizilor grași esențiali din alimentele care au fost prăjite și care s-au absorbit din grăsimea degradată termic. Prezența acestor peroxizi în alimente contribuie la rănțezirea acestora.

De asemenea, trebuie avut în vedere că, la prăjire, sunt expuse proceselor oxidative în egală măsură și acil-lipidele saturate. Datele experimentale dovedesc că și în acest caz autooxidarea este un proces tipic radicalic dar inițierea din perioada de inducție va avea o cu totul altă alură mai ales în privința propagării lanțului radicalic. La o temperatură medie de peste 60°C selectivitatea autooxidării scade întrucât hidroperoxizii se descompun în radicali alcoxi și hidroxi:



Radicalii formați datorită marilor reactivități pot smulge un atom de hidrogen din catenele acizilor grași saturați. Din astfel de reacții rezultă un număr mare de produși între care predomină aldehidele și metilcetonele. Datorită regimului termic sever la care sunt supuse grăsimile saturate, scindările retroaldolice și autooxidarea aldehidelor intermediare sunt mult intensificate [1, 4, 5, 8].

I.1.1.4. Ionii metalelor grele

Produsele alimentare conțin întotdeauna urme de ioni ai metalelor grele, în special Fe, Cu, Mn, Mo care pot proveni din materii prime, materii auxiliare sau apa tehnologică, din utilaje sau din ambalaje. Acestea au o acțiune catalitică asupra procesului peroxidării. Trebuie diferențiat efectul ionilor metalelor grele din structuri chimice simple (oxizi, hidroxizi, săruri etc.) de cel al aceluiași ioni din structuri macrociclice heminice sau din metaloproteide. Diferențele în acest sens nu apar la nivelul stărilor de oxidare ci la nivel cinetic: viteză de reacție, mecanism, regioselectivitate [10].

I.1.1.5. Fotosensibilizatorii

O serie de pigmenți prezenți în produsele alimentare și în special carotenoidele, clorofilele și porfirinele în anumite condiții (concentrație, prezența radiațiilor luminoase) au rol de sensibilizatori optici (fotosensibilizatori) și prin aceasta un efect prooxidant. Carotenul de exemplu în concentrație de 0,01% inhibă oxidarea, pe când în concentrație de 0,001 % o accelerează. Molecula acestor fotosensibilizatori are capacitatea de a absorbi la frecvența radiației din ultraviolet și vizibil. Ea poate prelua energia cuantei pe care apoi o transmite moleculelor reactante.

Există două tipuri de sensibilizatori optici. Din tipul I fac parte combinațiile chimice care se activează sub acțiunea luminii și reacționează direct cu substratul, pe care îl transformă în radical liber.

Calea I: Sensibilizator + Substrat + $h\nu$ \longrightarrow Intermediar - I

Intermediar - I + O_2 \longrightarrow Produși + Sensibilizator

Sensibilizatorii de tipul al II-lea, opus față de primii transformă oxigenul activat în singlet 1O_2 .

Calea II: Sensibilizator + O_2 + $h\nu$ \longrightarrow Intermediar - II

Intermediar - II + Substrat \longrightarrow Produși + Sensibilizator

Următoarele substanțe acționează în calitate de fotosensibilizatori care produc oxigen singlet (1O_2) în alimente: clorofilele, feofitina - a, hematoporfirina, hemul din hemoglobină și mioglobină.

Cele două tipuri de sensibilizatori participă la reacții concurente ale căror viteze depind de natura sensibilizatorului și a substratului. La concentrații mari de oxigen domină tipul II. La concentrații mici de oxigen domină tipul I [3].

I.1.1.6. Umiditatea și pH-ul

Conținutul de umiditate a produselor alimentare și în principal apa liberă care determină presiunea de vapori din produs și deci activitatea apei (a_w), influențează într-o mare măsură atât procesele de autooxidare cât și peroxidările enzimatic. Valoarea activității apei în produsele alimentare variază în limite foarte largi (de la 0,2-0,4 la cereale, legume deshidratate, biscuiți etc. până la valori ridicate de 0,8-0,98 la gemuri, marmelade, pâine, carne etc.) având un rol determinant în desfășurarea reacțiilor chimice și biochimice.

În reacțiile chimice apa poate acționa ca un solvent în care reactanții sunt capabili să se dizolve, să fie transportați și să reacționeze, dar poate funcționa și ca partener în reacții chimice. Influența activității apei asupra oxidării este complexă. Evoluția vitezei de reacție poate fi prezentată ca având trei faze.

În prima fază când a_w are valori scăzute apa exercită un efect antioxidant explicat prin formarea de legături de hidrogen între moleculele de apă și cele de hidroperoxid. Acest complex protejează hidroperoxidii să nu se descompună în radicali liberi, astfel încât viteza de reacție este relativ redusă. Acest efect se manifestă doar la interfața lipidică saturată de apă. Un alt motiv al acțiunii antioxidante este dat de diminuarea activității catalitice a urmelor de metale grele prin hidratare și prin formare de hidroxizi insolubili.

Cea de-a doua fază are loc la o valoare intermediară a a_w în care viteza reacției de oxidare crește. Influența prooxidantă este atribuită compușilor susceptibili de a reacționa, iar metalele difuzează mai ușor spre situsurile catalitice.

Ce-a de a treia fază are loc la valori ridicate ale a_w între 0,7 și 1. Două efecte antagoniste se manifestă: diluția urmelor de metale ce catalizează reacția conduce la scăderea vitezei de reacție, iar diminuarea vîscozității conduce la creșterea vitezei de reacție.

Trebuie menționat faptul că în cazul produselor alimentare deshidratate poate avea loc și o oxidare a proteinelor, oxidare care este accelerată la un conținut ridicat în apă. În acest caz apa acționează ca solvent cauzând hidratarea proteinelor și astfel oxigenul este mai ușor transportat la grupările oxidabile ale proteinelor. La activități ale apei extrem de scăzute, degradarea proteinelor poate fi cauzată de radicalii liberi rezultați din oxidarea lipidelor [4, 11, 12].

În ceea ce privește influența pH-ului asupra proceselor de oxidare din produsele alimentare trebuie menționat că toate reacțiile redox sunt controlate prin valoarea potențialelor electrochimice, care la rândul lor sunt dependente de concentrația ionilor de hidrogen [12].

I.1.1.7. Radiațiile

Iradieră cu radiații ionizante a produselor alimentare (accidental sau în urma procesării acestora) poate modifica calitățile senzoriale (culoare, gust, miros, textură), nutriționale și inocuitatea acestora, ca urmare a unor reacții complexe (oxidare, polimerizare, decarboxilare, hidrogenare, dehidrogenare) pe care le suferă componentele chimice din aceste produse. Radiațiile ionizante sunt responsabile de inițierea proceselor de oxidare datorită radicalilor liberi pe care îi generează astfel că în multe privințe reacțiile sunt identice cu cele ce au loc în cazul autooxidării.

Cauzele chimice ale deteriorărilor de gust în grăsimile iradiate nu sunt încă foarte clare deoarece peroxizii și hidroperoxizii formați sunt inodori și nu au legătură cu gustul de seu care apare atât în cazul grăsimilor iradiate cât și în cazul celor autooxidate. Dacă în cazul autooxidării modificările de gust se datorează compușilor carbonilici formați în fazele secundare ale autooxidării, în cazul grăsimilor iradiate acești compuși (aldehida propionică, butirică, valerianică, capronică, crotonică, pelargonică și acroleină) se formează atât în prezența cât și în absența oxigenului [4, 13].

I.1.1.8. Concentrația de oxigen

Dacă aportul de oxigen este nelimitat, viteza oxidării este independentă de acesta, dar la presiuni de oxigen foarte scăzute, viteza oxidării este proporțională cu concentrația de oxigen (C_{O_2}), conform relației:

$$v = -\frac{dC_{O_2}}{dt} = \frac{k_1 \cdot C_{O_2}}{k_2 + C_{O_2}} \quad (\text{I.1-1})$$

unde: k_1 și k_2 sunt constantele de viteză pentru etapele de inițiere și respectiv de propagare a oxidării [3, 12].

I.1.2. AUTOOXIDAREA LIPIDELOR

Întrucât cea mai mare influență asupra calității produselor alimentare o au produșii de oxidare ai lipidelor, mecanismul de oxidare al acestora a fost cel mai bine studiat.

La reacțiile de autooxidare participă acizii (sau esterii acizilor) grași nesaturați. În prima etapă a se formează hidroperoxizi. Aceștia sunt relativ instabili și de aceea participă la numeroase reacții de degradare responsabile de apariția unor substanțe nedorite.

Schema generală a autooxidării acizilor grași este prezentată în figura 2. Această schemă va fi dezvoltată în paragrafele următoare.

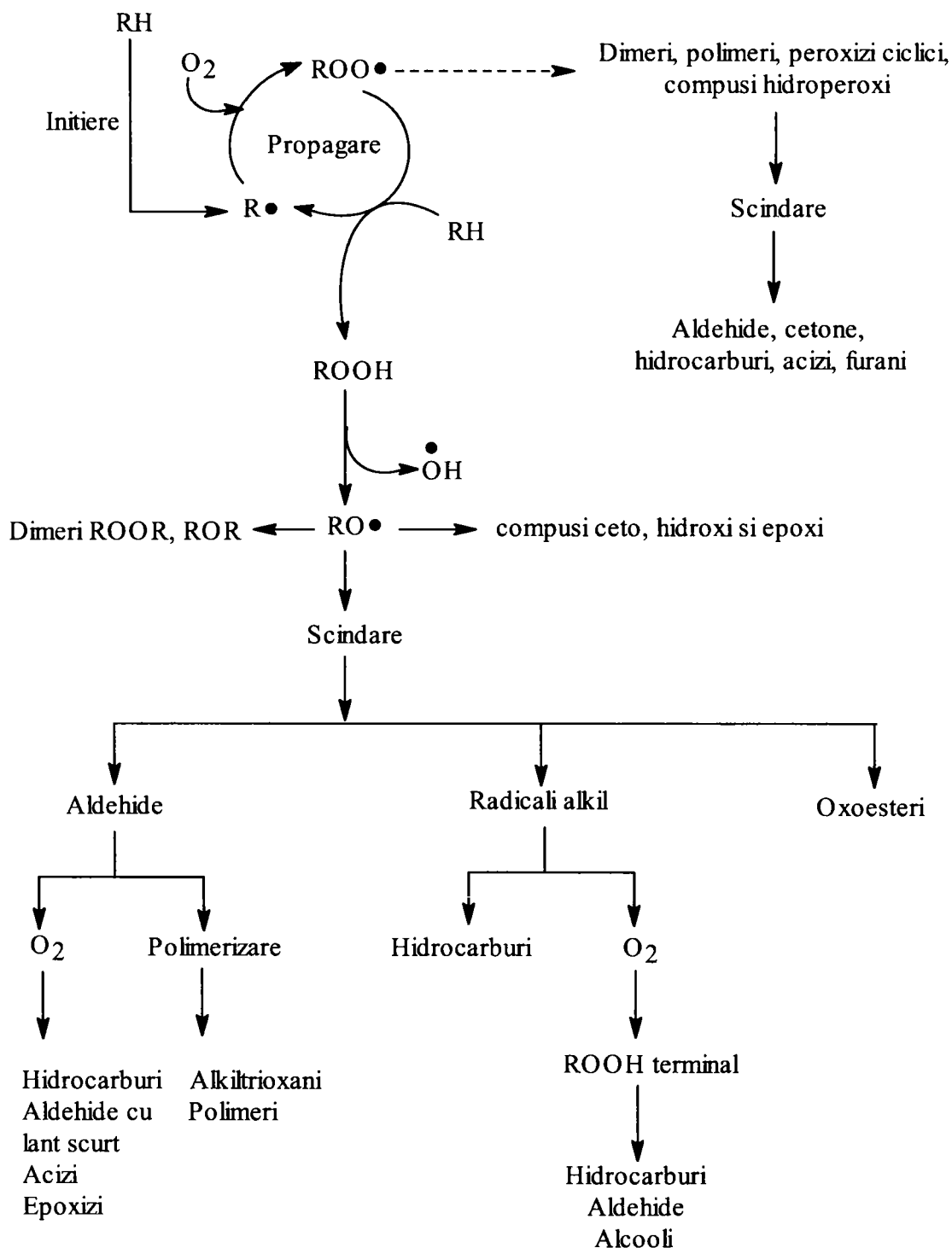


Figura 2. Schema generală de degradare a acizilor grași prin autooxidare [2,3]

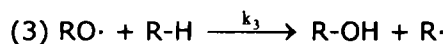
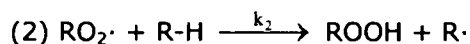
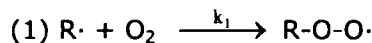
I.1.2.1. Formarea hidroperoxizilor

A) *Mecanismul formării hidroperoxizilor este unul înlănțuit clasic [1, 2]:*

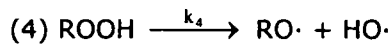
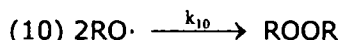
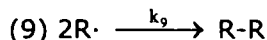
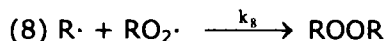
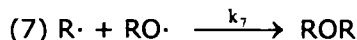
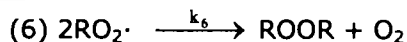
I. Inițiere: include perioada de inducție în care s-au identificat radicali liberi alchil ($R\cdot$), hidroxi ($HO\cdot$), peroxi ($ROO\cdot$), alcoxi ($RO\cdot$), etc.

II. Propagarea lanțului:

a) *Creșterea lanțului radicalic*



b) *Ramificarea lanțului*

III. Întreruperea lanțului

unde cu RH s-a notat acidul gras nesaturat.

Se consideră că formarea radicalilor liberi în cantitate suficientă este în strânsă legătură cu prezența oxigenului singlet care este o formă excitată a oxigenului molecular. Oxigenul singlet poate reacționa cu dublele legături ale acizilor grași nesaturați spre deosebire de oxigenul molecular care deși are doi electroni liberi posedă o stare cuantică numită triplet, incapabilă să reacționeze cu moleculele de lipide. Oxigenul singlet poate fi generat pe diferite căi, cea mai importantă fiind cea a fotosensibilizării prin intermediul pigmentilor naturali din alimente (paragraful 1.1.5).

Producerea primilor radicali liberi necesari pentru a efectua etapa de propagare ar putea avea loc prin descompunerea hidroperoxizilor, catalizată de către metale (în special metale tranzitionale) sau prin expunere la lumină. Timpul necesar pentru obținerea unei cantități suficiente de peroxid pentru a susține lanțul radicalic sau pentru a anihila efectul antioxidanților poartă denumirea de *perioadă*

de inducție. Peroxidul este atât produs de reacție cât și inițiator, deci reacția este autocatalitică [14].

Reacția (1) este extrem de rapidă, în cele mai multe cazuri viteza de reacție fiind limitată difuzional (k_1 aproximativ $10^7 - 10^9$ l/mol·s) și independentă de concentrația de oxigen, chiar la valori mici ale acesteia. Energia sa de activare este apropiată de zero (aceasta fiind comportarea obișnuită a reacțiilor de combinare a radicalilor). Este o reacție de echilibru, creșterea temperaturii favorizând procesul invers. În fază lichidă însă, reacția de disociere poate fi neglijată [10].

Reacția (2) este mai lentă. Constanta de viteză k_2 este dependentă de gradul de nesaturare având valori între 0,025 și 60 l/mol·s, corelat cu numărul de duble legături din structura acizilor grași, care poate varia între 1 și 6. Pentru compuși având structuri asemănătoare, viteza extragerii hidrogenului este legată de exotermicitatea reacției, reacția fiind favorabilă pentru substraturi având energia de legătură pentru R-H mai mică de 90 Kcal (energia de disociere radicalică a ROO-H).

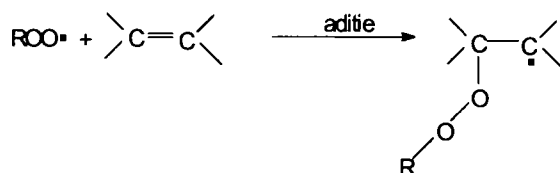
Trebuie remarcat că radicalii ROO· nu sunt foarte reactivi comparativ cu alți radicali organici. Energia de activare este relativ ridicată ceea ce indică efectul favorabil pe care îl are creșterea temperaturii [10].

Treptele schemei generale sunt aceleași pentru toți acizii grași nesaturați.

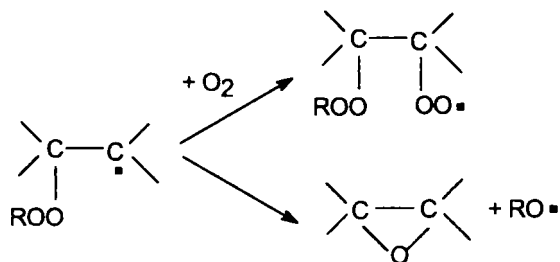
În cazul acidului oleic, extragerea atomului de hidrogen se produce la gruparea metilen adiacentă dublei legături, adică pozițiile 8 și 11. Prin aceasta iau naștere un amestec de 4 hidroperoxizi, cu gruparea peroxidică în pozițiile 8, 9, 10 și 11. Cantitatea de 8- și 11- hidroperoxid este mai mare decât cea a izomerilor 9- și 10-. Configurația dublei legături din este influențată de temperatură [3]. La 25°C cantitățile cis și trans 8- și 11- hidroperoxizi sunt egale, iar izomerii 9- și 10- au în special configurație trans [2,3].

Acidului linoleic, datorită structurii 1,4-pentadienice este de aproximativ 20 de ori mai susceptibil la oxidare decât cel oleic. Gruparea metilen din poziția 11 este activată de către cele două duble legături adiacente și extragerea hidrogenului din această poziție produce un radical pentadienil intermediar care se stabilizează prin formarea, în urma reacție cu oxigenul, a doi hidroperoxizi (cis, trans și trans, trans) conținând un sistem dienic conjugat și cu gruparea peroxidică în pozițiile 9 și respectiv 13. Grupările monoalil din acidul linoleic (pozițiile 8 și 14) reacționează de asemenea, dând naștere la 4 hidroperoxizi (8-, 10-, 12- și 14-OOH), care reprezintă aproximativ 4% din total și care conțin duble legături izolate [2].

Acest mecanism este în competiție cu adiția ROO· la dubla legătură:

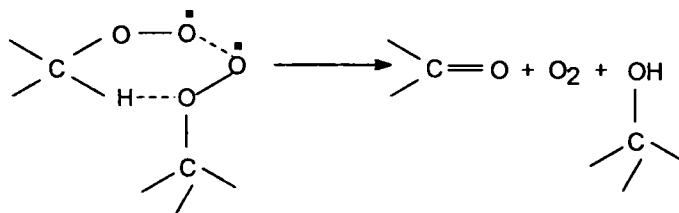


Radicalul provenit din reacția de adiție poate participa la două reacții paralele:

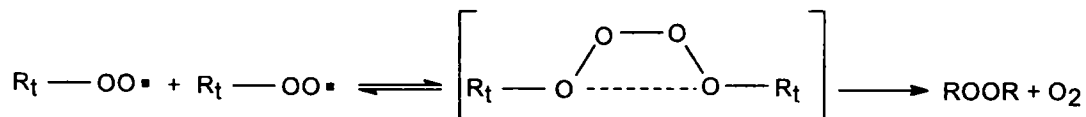


ducând la formare fie de poliperoxizi fie de epoxizi [10].

Reacțiile (6)-(10) corespund etapei de terminare a reacțiilor în lanțuite. Ponderea acestor reacții depinde în principal de structura acidului gras și de concentrația de oxigen. În cazul unor radicali primari sau secundari (cel mai comun) se formează compuși ceto- și hidroxi-:



În cazul radicalilor terțiari a fost pusă în evidență formarea unui tetroxid intermediar instabil [10]:



Terminarea lanțului poate de asemenea să aibă loc dacă sunt prezente molecule străine capabile să reacționeze cu radicalul $\text{ROO}\cdot$ prin adădire sau prin donarea unui atom de H (situație mai des întâlnită) pentru a da produși de reacție care nu vor propaga reacția de autooxidare. Efectul inhibitor al acestui tip de compuși este legat de viteza reacției cu radicalul $\text{ROO}\cdot$ precum și de inactivitatea produșilor de reacție [10]. Astfel de substanțe sunt antioxidanții (naturali - în principal tocoferoli, catechine - sau de sinteză - fenoli, amine, etc.), utilizați pentru a preveni deteriorarea alimentelor expuse la aer [3].

În urma unor rezultate experimentale în care s-a folosit drept substrat linoleatul de etil, s-a demonstrat că viteza de absorbție a oxigenului de către substratul lipidic nesaturat poate fi exprimată prin relația [3]:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = \frac{k_a \cdot C_{RH} \cdot C_{ROOH}}{1 + \frac{\lambda \cdot C_{RH}}{p}} \quad (\text{I.1-2})$$

în care: RH este substratul de acid gras nesaturat; ROOH - peroxidul format; p - presiunea oxigenului; λ și k_a - constante empirice.

B) Formarea hidroperoxizilor acizilor grași saturați

Deși oxidarea hidrocarburilor saturate a fost subiectul multor investigații, doar puține lucrări descriu autooxidarea acizilor grași saturați naturali și a esterilor acestora. Studiile mai vechi asupra autooxidării hidrocarburilor saturate sugerau aplicabilitatea rezultatelor obținute pentru acizii grași saturați, precum și o dependență liniară a vitezei de reacție, de lungimea lanțului de atomi de carbon. Studiile mai recente duc însă la concluzii diferite. Prezența a două maxime în curbele DSC indică faptul că termooxidarea decurge în cel puțin două etape, fiecare reacție fiind caracterizată de parametrii cinetici diferiți [15, 16].

Astăzi se acceptă că intermediar se formează monohidroperoxizi, iar atacul oxigenului se poate produce la toate grupările metilenice ale acizilor grași, dar se pare că există preferință pentru pozițiile α , β și γ .

Atacul oxigenului asupra atomului de carbon α produce un α -peroxid care se transformă în acid C_{n-1} .

Atacul oxigenului asupra atomului de carbon β produce un β -peroxid care poate suferi scindări între atomul C_α și gruparea carboxil cu formare de β -cetoacid care prin decarboxilare dă metilcetone C_{n-1} . β -Peroxidul poate suferi scindări fie între atomii de carbon α - β ai alcoxiradicalului intermediar cu formare de alcanal C_{n-2} , fie între atomii de carbon β - γ cu formare de hidrocarbură C_{n-3} .

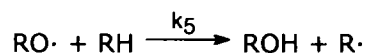
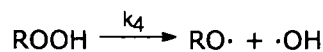
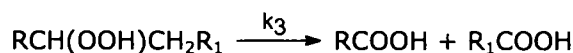
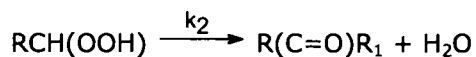
Atacul oxigenului asupra atomului de carbon γ duce la același tip de produși dar, în plus, hidroperoxidul din poziția γ este responsabil de formarea de γ -lactone prin ciclizarea γ -hidroxiacizilor formați intermediar.

Pentru prima etapă, de formare a hidroperoxizilor, viteza de reacție, v , poate fi descrisă printr-o ecuație de forma:

$$v = k_p(v_1 / 2k_1)^{1/2} \cdot C_{RH} \quad (I.1-3)$$

unde: v_1 este viteza de producere a radicalilor liberi, k_p și k_1 sunt constantele de viteza pentru reacțiile de propagare și de încetare, iar C_{RH} este concentrația de acid gras saturat.

În primele stadii ale oxidării reacția decurge prin atacul direct al oxigenului la legăturile C-H din moleculă. Viteza v_1 se presupune constantă, astfel încât termenul: $k_p(v_1 / 2k_1)^{1/2} = k = \text{const.}$ și k este o constantă globală de ordinul I. Cu înaintarea procesului de oxidare, hidroperoxizii se descompun în principal în cetone, alcooli și acizi grași după cum urmează:



S-a constatat că $k_4 \ll k_5$ și că formarea alcoolilor este descrisă de o cinetica de ordinul I. Procesul global de descompunere a produșilor primari se așteaptă să fie de asemenea de ordinul I:

$$v_{desc.} = (k_2 + k_3 + k_4) \cdot C_{ROOH} \quad (I.1-4)$$

Una din metodele prin care aceste fenomene au putut fi urmărite a fost calorimetria de scanare diferențială (DSC). Toți parametrii cinetici au indicat că perioada de inițiere este similară pentru trei tipuri de compuși investigați: acizi grași, esterii lor etilici și trigliceride. Similaritatea parametrilor cinetici demonstrează faptul că viteza de autooxidare a acizilor grași nu este corelată cu lungimea lanțului hidrocarbonat. S-a găsit de asemenea că autooxidarea compușilor saturați necesită energii mai mari decât a celor nesaturați [15, 16].

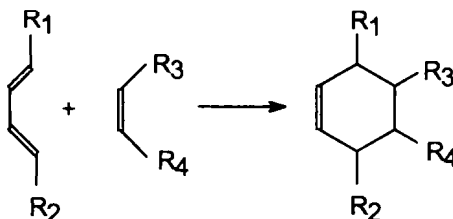
C. Reacții paralele.

C1. Formarea dimerilor și polimerilor

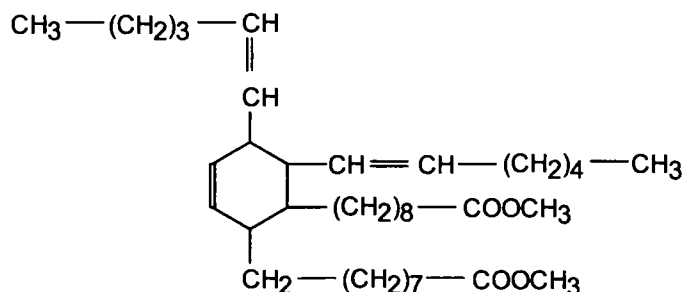
În unele cazuri, în paralel cu formarea hidroperoxidilor se obțin și produși polimerici, de multe ori cu structuri complexe, în special atunci când lipidele sunt oxidate termic. Aceste modificări sunt însoțite de scăderea indicelui de iod, creșterea masei moleculare și a vîscozității lipidelor respective [17].

La presiuni scăzute ale oxigenului, legătura carbon-carbon se formează între două grupe acil în mai multe moduri [3]:

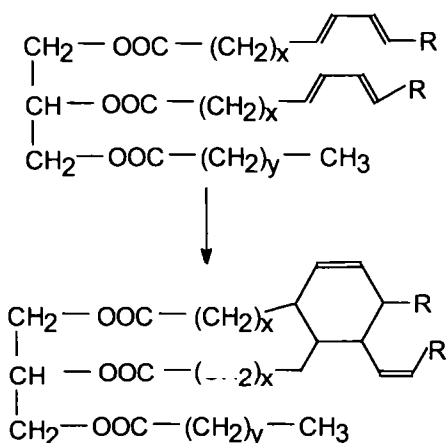
- reacția Diels-Alder între dubla legătură și o dienă conjugată, cu producere de ciclohexenă tetrasubstituită:



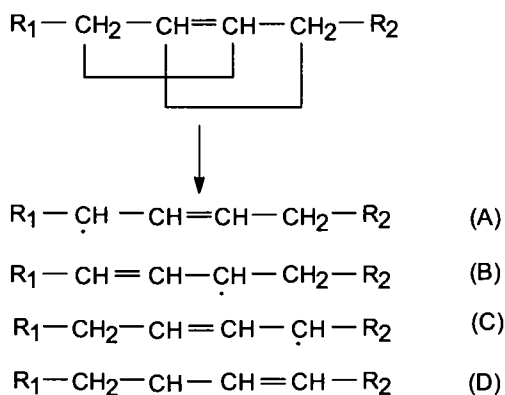
Linoleatul, de exemplu, poate forma un sistem dublu conjugat în timpul oxidării termice și apoi reacționează cu alte molecule de linoleat (sau cu oleat) cu producere de dimer ciclic:



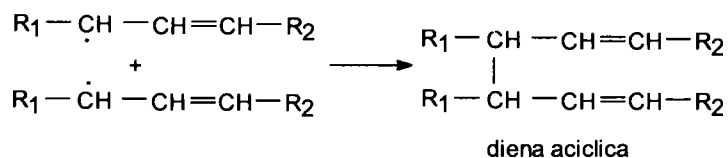
În cazul acilglicerolilor, dimerizarea are loc între grupările acil de la doi triacilgliceroli sau între două grupări acil de la aceeași moleculă:



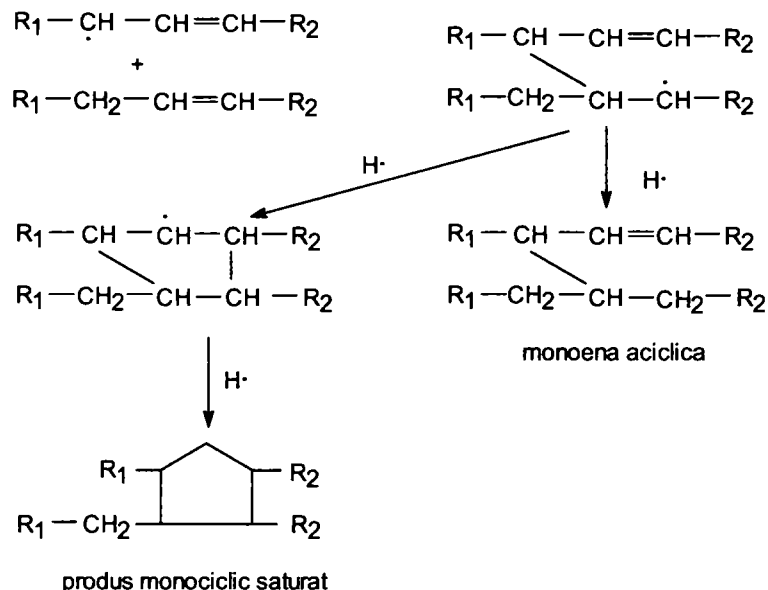
- combinarea radicalilor liberi cu formare de dimeri neciclici. Oleatul, de exemplu, dă naștere la un amestec de dimeri cuplați în pozițiile 8, 9, 10 și 11:



- adiția radicalilor liberi la dubla legătură. Această reacție conduce la formarea unui radical dimeric, care, la rândul său, poate extrage hidrogen de la altă moleculă sau atacă altă dublă legătură cu formare de compuși aciclici sau ciclici. De exemplu, la dimerizarea oleatului se formează următorii compuși:

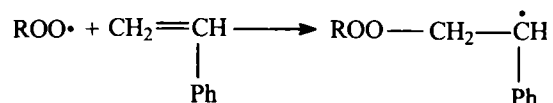


sau

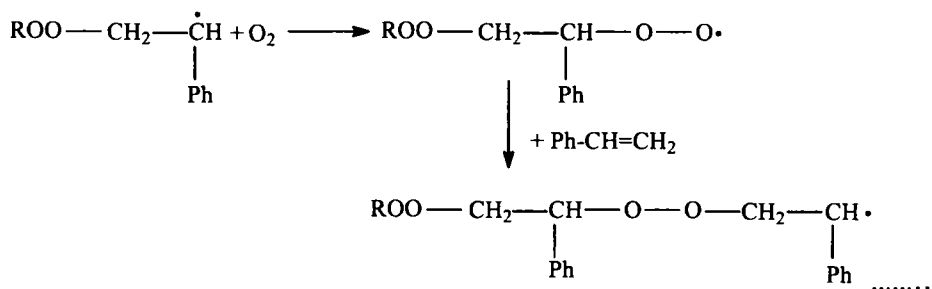


C2. Reacții paralele. Formarea copolimerilor peroxidici și a 1,4-epiperoxizilor

Dacă unul din atomii implicați în legătura dublă poartă un substituent cum ar fi: aril, vinil sau gruparea ciano, alchilperoxi-radicalul poate reacționa prin adăugare la dubla legătură:

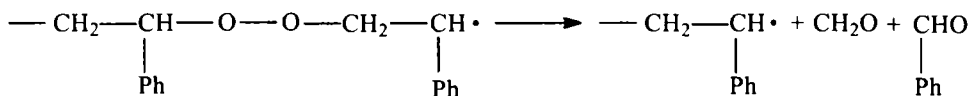


Radicalul alchilic format este foarte reactiv. Cu oxigenul poate forma un copolimer alternant, în raport 1:1, printr-o reacție în lanț:

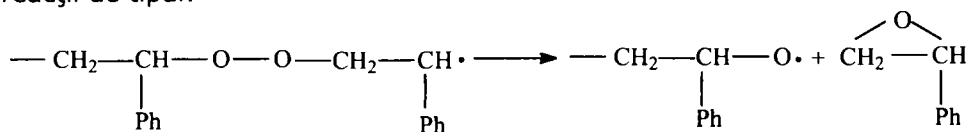


Reacțiile de obținere a polymerului peroxidic pot fi acompaniate de două reacții secundare cu pierderea grupării peroxidice, a căror importanță depinde în primul rând de presiunea oxigenului și de stabilitatea radicalului terminal al lanțului în creștere.

Obținerea polymerului este favorizată de presiuni ridicate. La presiuni medii, se pot forma compuși carbonilici, prin reacții concurente:



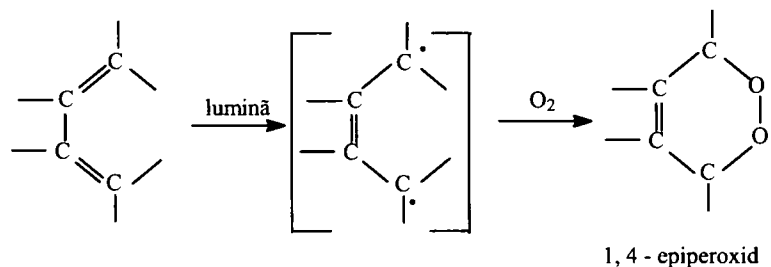
La presiuni scăzute formarea de epoxizi devine importantă, foarte probabil prin reacții de tipul:



Epoxizii pot fi de asemenea formați prin interacția dintre hidroperoxizi și olefine [10].

Polimerii peroxidici conțin de obicei până la zece unități monomerice. Prin încălzire au loc ruperi ale legăturilor O-O și C-C cu formare de compuși carbonilici. Ruperi ale acestor legături au de asemenea loc în mediu bazic.

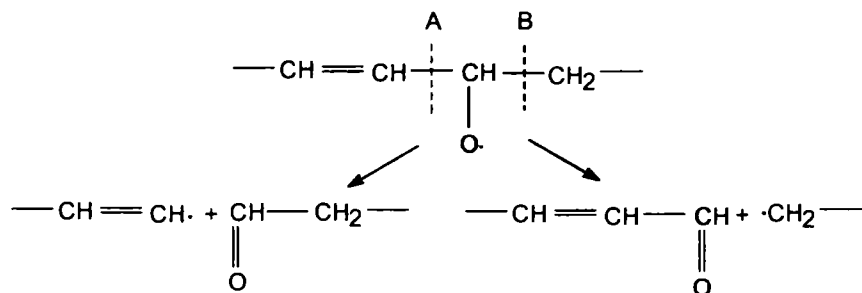
Sub influența luminii, compușii ce conțin legături duble conjugate pot suferi adiția 1,4 - a oxigenului cu formarea unui peroxid ciclic similar cu reacția Diels-Alder. Un fotosensibilizator (hematoporfirina, clorofila) este uneori necesar pentru a cataliza formarea peroxidului ciclic. Se presupune că energia luminoasă este transferată direct sau prin intermediul fotosensibilizatorului, dienei, cu formarea unui diradical care reacționează cu oxigenul [10]:



I.1.2.2. Descompunerea hidroperoxizilor

Hidroperoxizii acizilor grași sunt incolori, fără gust și fără miros. Sunt compuși care pot fi descompuși ușor, sub acțiunea căldurii, a luminii sau a anumitor substanțe prezente în mediu. Stabilitatea legăturii peroxidice se schimbă în funcție de natura substituenților. Scindarea acestora duce la obținerea unui amestec complex ce conține alcani, alchene, alcooli, aldehide, cetone, esteri, acizi, etc., fiind însoțită de scăderea gradului de nesaturare în cazul hidroperoxizilor proveniți de la acizi grași nesaturați [18]. Hidroperoxizii se descompun pe măsura formării lor, dar în primele stadii ale autooxidării viteza de formare a hidroperoxizilor depășește viteza de descompunere, fenomen ce se inversează în stadiile ulterioare.

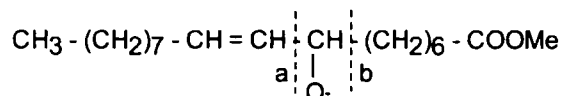
Primul pas în descompunerea hidroperoxizilor este scindarea legăturii oxigen-oxigen cu formare de radical alcoxi și radical hidroxi: Radicalul alcoxi poate suferi o scindare a legăturii carbon - carbon, de o parte sau de alta a grupării alcoxi [2, 3]:



Opțiunea „B” presupune scindarea legăturii C-C poziționată mai departe de locul dublei legături și este preferată energetic deoarece duce la formarea unei oxoene, sau a unei oxodiene, compuși care pot fi stabiliizați ulterior prin rezonanță. Fragmentările de tip „B” justifică existența demonstrată a unor produși secundari de tipul: alcani, alchene, derivați carbonilici, acizi carboxilici, esteri. În plus se generează radicali noi care amplifică viteza peroxidării. Energia de activare a acestor ruperi este relativ mare, în jur de 140-175 kJ/mol. Din acest motiv, astfel de fragmentări sunt caracteristice proceselor termooxidative.

Opțiunea „A” ar duce la obținerea de eteri vinilici și alchene, produși care au fost identificați în cazul foto-oxidării [2, 3].

De exemplu, din 8-hidroxi-peroxidul oleatului de metil, în funcție de locul de scindare:



Prin scindare în „a” se ajunge la decanal și 8-aldooctanoat de metil, iar prin scindare în „b” se ajunge la 2-undecanal și metilheptanoat.

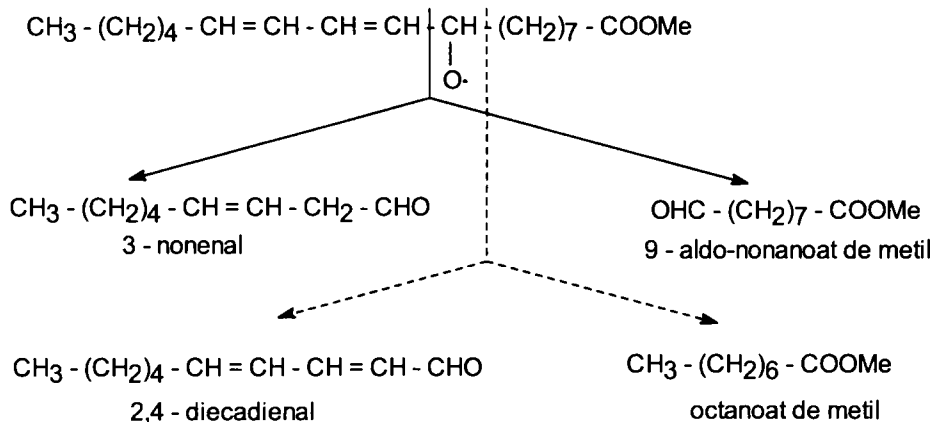
În aceeași manieră, fiecare din ceilalți trei hidroperoxizi ai oleatului vor produce patru produși tipici. Astfel, din 9-hidroperoxidul metiloleatului se va produce: nonanal, 9-aldononanoat de metil, 2-decanal, octanoat de metil; din 10-hidroperoxid, se va produce: octan, metil-10-oxo-9-decanoat, nonanal, metil-9-oxononanoat; iar din 11-hidroperoxid, se va produce: heptan, metil-11-oxo-9-undecanoat, metil-10-oxo-decanoat și octanal [3].

Așa cum s-a arătat, prin autooxidarea linoleatului se formează preponderent doi hidroperoxizi conjugați – și anume 9-hidroperoxi-10,12-octadecadienoat de metil (metil-9-HPODE) și 13-hidroperoxi-9,11-octadecadienoat de metil (metil-13-HPODE), din care se obțin radicali alcoxi, care, la rândul lor, se scindează cu formare de compuși mai simpli. De exemplu, din 9-hidroperoxi-10,12-octadecadienoat de metil se formează 3-nonenal, 9-aldononanoat de metil, 2,4-diecadienal și octanoat de metil.

O altă clasă de produși care au fost observați au fost epoxizii, formați prin cel puțin două tipuri de procese: fie formarea epoxidului în locul dublei legături, fie în imediata vecinătate a acesteia. În cazul trioleinei rezultatele experimentale indică faptul că oxigenul a fost adăugat la legătura dublă, fără pierderea atomilor de hidrogen.

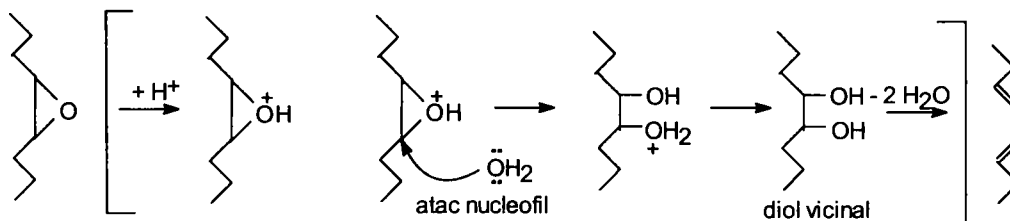
Numeroși compuși se obțin prin fragmentarea epoxi-intermediarilor prin scindarea legăturii dintre doi atomi de carbon ai inelului epoxidic pentru a forma un situs de nesaturare adițional și pierderea fragmentului ce conținea oxigenul. O altă

variantă implică protonarea oxigenului epoxidic urmată de deschiderea inelului și ruperea unor legături C-C.

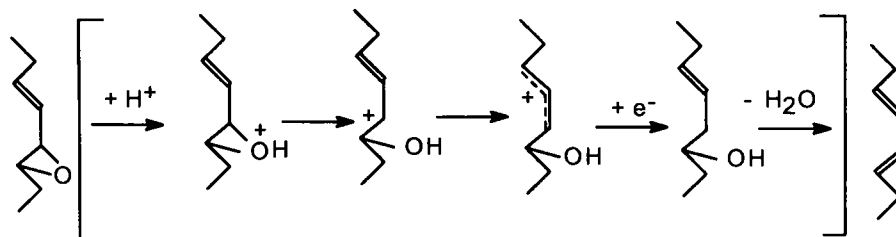


În cazul epoxidului format din trioleină retenția oxigenului și pierderea unui lanț hidrocarbonat a fost favorizată. Determinarea lungimii acestui lanț hidrocarbonat a permis stabilirea poziției inelului epoxidic între atomii de carbon 6 și 7. Spectrele de masă pentru trilinoleil hidroperoxizi și trilinolenil hidroperoxizi au pus în evidență aceleași modalități de fragmentare [18].

Mecanismul implică formarea a două legături duble. Se disting două situații în funcție de poziția grupării epoxidice (dacă a fost sau nu în vecinătatea unei legături duble). În primul caz, prin hidroliza catalizată acid se formează un diol vicinal, care suferă deshidratare:



În cea de-a doua situație se formează un intermediar stabilizat prin rezonanță cu o viață suficient de lungă pentru a putea primi un electron și a forma un enol, care imediat formează un situs de nesaturare prin pierderea grupării hidroxil ca urmare a deshidratării:



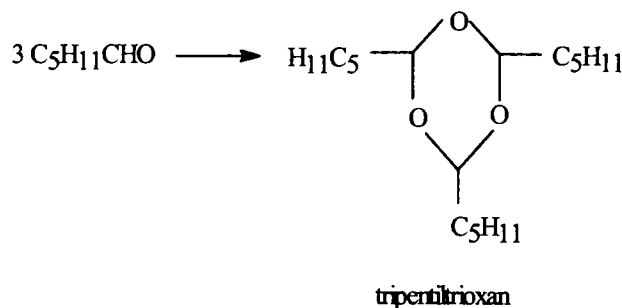
Stereochimia indicată în reacția de mai sus este arbitrară. Este foarte probabilă rotația legăturilor cu obținerea izomerilor trans [18].

Un alt set de produși de oxidare ai acizilor grași, aflați în cantități mai mici, sunt bis-hidroperoxizii. La descompunerea acestora se formează, ca și în cazul hidroperoxizilor simpli, epoxizi intermediari (doi epoxizi pot fi formați) care suferă transformări ulterioare similare cu cele ale monohidroperoxizilor [18].

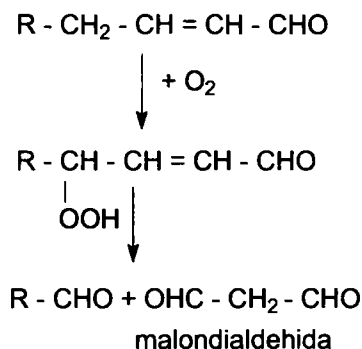
Trilinolenina formează anumite specii de produși care nu au fost observate pentru alți triacilgliceroli. Unele din acestea sunt ceva mai puțin polare decât monohidroperoxizii. Lipsa fragmentelor de scindare a lanțului acilic indică faptul că aceste molecule conțin o singură grupare hidroxil. Tot din trilinolenină se formează epidioxizi în locul uneia din dublele legături precum și hidroperoxid epidioxizi.

O altă clasă de produși de oxidare sunt diepoxizii, care au fost observați în cazul trioleinei și trilinoleinei, grupările epoxidice înlocuind dublele legături [18].

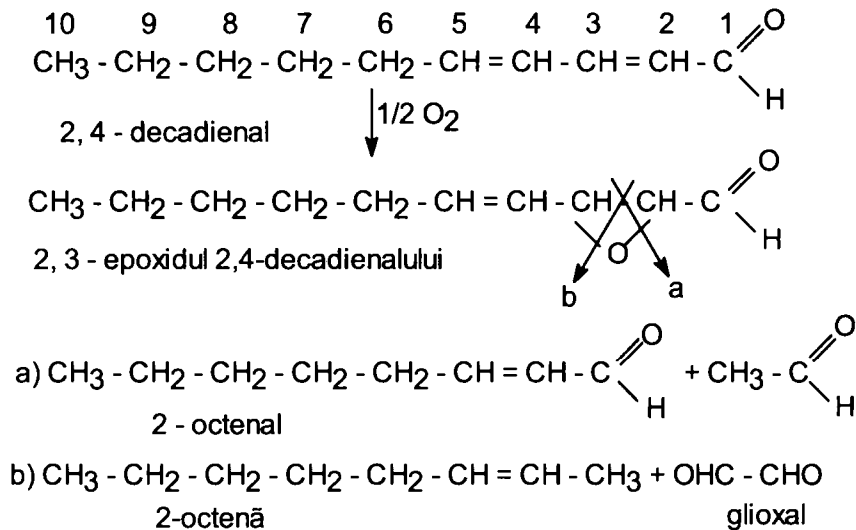
Aldehidele saturate care se formează în timpul autooxidării suferă mai departe o serie de transformări prin reacții de oxidare, dimerizare, condensare. De exemplu, trei molecule de hexanal se combină și formează tripentiltrioxanul:



Aldehidele nesaturate pot suferi o autooxidare clasică prin atacul oxigenului la gruparea α - metilenică cu formare de hidrocarburi cu lanț scurt, aldehide și dialdehide:

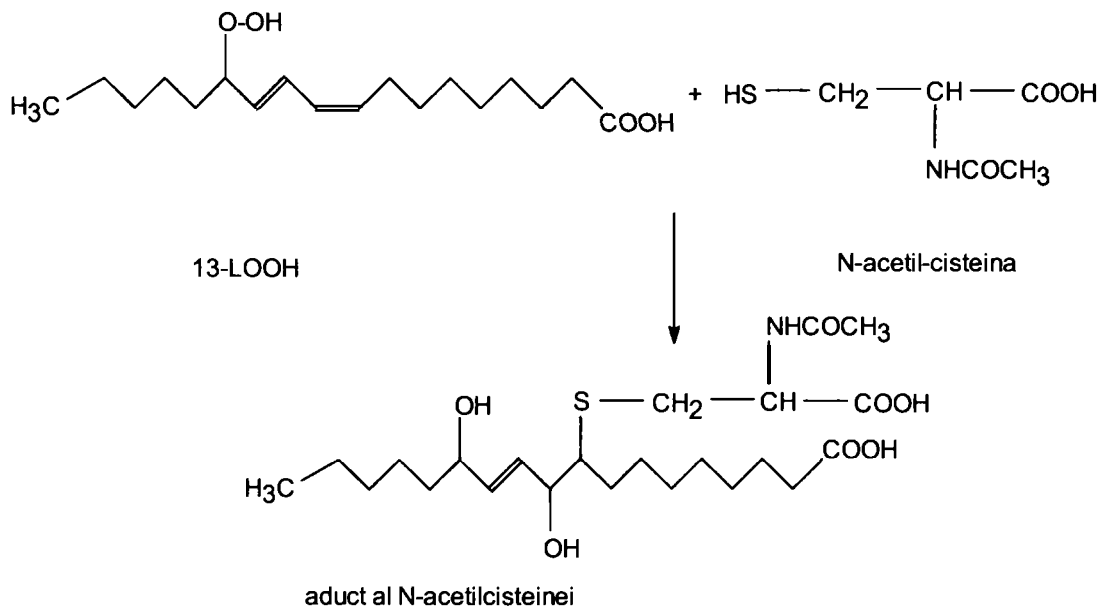


Prin oxidarea aldehidelor cu duble legături conjugate se formează epoxizi care se descompun mai departe, după varianta a sau b, conform schemei de mai jos [3]:



I.1.2.3. Interacțiunea produșilor de oxidare ai acizilor grași cu proteine

Hidroperoxizii pot să reacționeze cu grupările funcționale din catenele laterale ale aminoacizilor componenți ai proteinelor (-NH₂ din lizină, -CONH₂ din asparagină și glutamină, -SH din cisteină, -S-CH₃ din metionină, -OH din serină, tirozină, hidroxilizină). S-a studiat reacția model dintre 13-hidroxi-peroxidul acidului linoleic și N-acetilcisteina [2]:



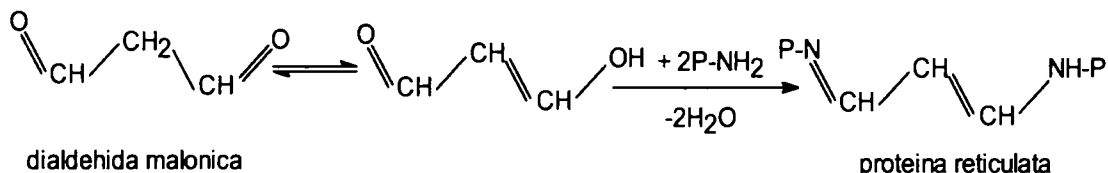
În prezența oxigenului astfel de aducți se pot forma și cu alți aminoacizi sau cu hem proteine. Acești aducți se descompun formând oxo-, epoxi-, mono-, di- și trihidroxiacizi. Unii dintre aceștia au gust amar.

Radicalii generați de hidroxiperoxizi pot extrage un hidrogen din catena laterală a proteinelor (PH):



Prin combinarea a doi radicali de proteină se formează proteine reticulate.

Dialdehida malonică este un agent de reticulare foarte bun, întrucât formează compuși de condensare cu grupările $-\text{NH}_2$ din catenele laterale ale proteinelor:

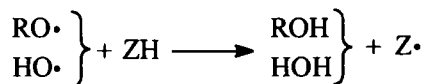
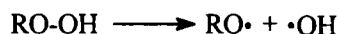


Și alți compuși carbonilici rezultați din autooxidarea acizilor grași condensează ușor cu grupele amino proteine cu formarea bazelor Schiff corespunzătoare, care apoi, prin mai multe condensări repetate de tip aldolic conduc la formarea polimerilor bruni. Polimerii bruni sunt adeseori lipsiți de azot deoarece aminocompușii pot fi eliminați ușor prin hidroliză. Când hidroliza se produce în primele stadii ale cascadei de condensări aldolice se eliberează aldehida care are un miros puternic și prin urmare va avea loc nu numai modificarea culorii (îmbrunare) ci și modificarea aromei globale.

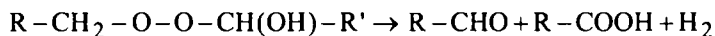
Atunci când conținutul de apă în amestecul proteine/lipide este scăzut, are loc mai degrabă degradarea catenelor laterale decât reticularea proteinelor. Pierderea de aminoacizi depinde puternic de natura proteinei și de condițiile de reacție. Mărind timpul de reacție și temperatura crește concentrația de volatile. Multe dintre acestea au un miros neplăcut cu atât mai evident cu cât este mai mare conținutul de azot din produse [2].

I.1.2.4. Reacții de rupere a legăturii O-O prin homoliză indusă termic

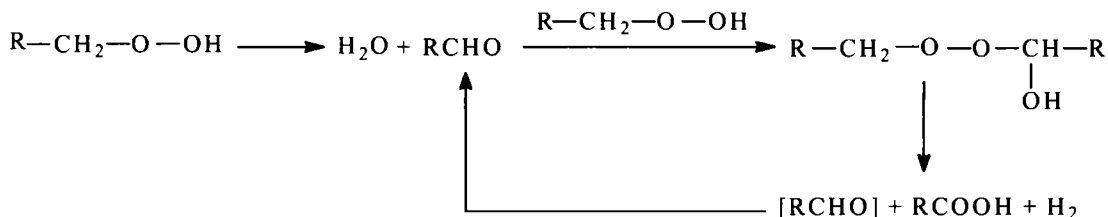
Descompunerea termică a hidroxialchil peroxizilor este relativ complexă. Radicalii formați pot extrage un atom de hidrogen de la substanțe donoare de hidrogen (de tipul ZH) cu formare de alcooli:



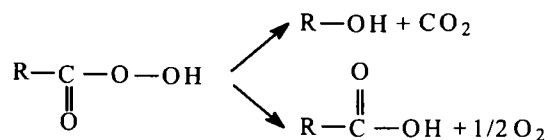
sau se pot descompune cu formare de hidrogen, aldehydă și acid:



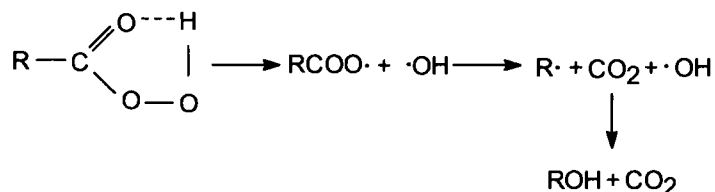
În unele cazuri, reacția este precedată de o perioadă de inducție care este mult redusă dacă în mediu s-a format deja aldehida:



Descompunerea termică a peroxiacizilor carboxilici poate duce la formarea de oxigen și acidul corespunzător sau de dioxid de carbon și alcoolul cu un atom de carbon mai puțin:

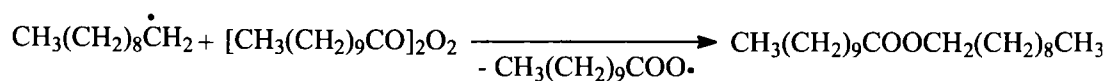
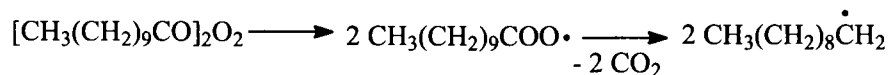


Este caracteristic faptul că acil hidroperoxizii nu inițiază procesul polimerizării și acesta e un motiv de a presupune că acil hidroperoxizii se descompun după un mecanism neradicalic prin formarea unui complex ciclic:



Descompunerea diacilperoxizilor alifatici, începe cu desfacerea legăturii peroxidice și formarea radicalului carboxilat, cu formarea posibilă din aceștia a doi oxizi de carbon și cu formarea radicalilor de hidrocarburi. Mai departe are loc descompunerea indusă a radicalilor cu formarea eterilor dar nu a alcoolilor ca în cazul descompunerii acil hidroperoxizilor.

Astfel, prin descompunerea peroxidului de lauroil se formează eter dideclic, n-decan și în cantități mai mici acidul undecilic. Formarea eterului are loc după reacția:



La prăjirea în ulei a produselor alimentare, mai ales la prăjirea repetată (în același ulei) se formează aldehide saturate și nesaturate, cetone, hidrocarburi, lactone, alcooli, acizi și esteri, care compun fracțiunea volatilă. În plus, se mai formează compuși nepolimerici polari de volatilitate moderată, dimeri și polimeri, acizi grași liberi, după cum a fost sistematizat în figura 3 [3].

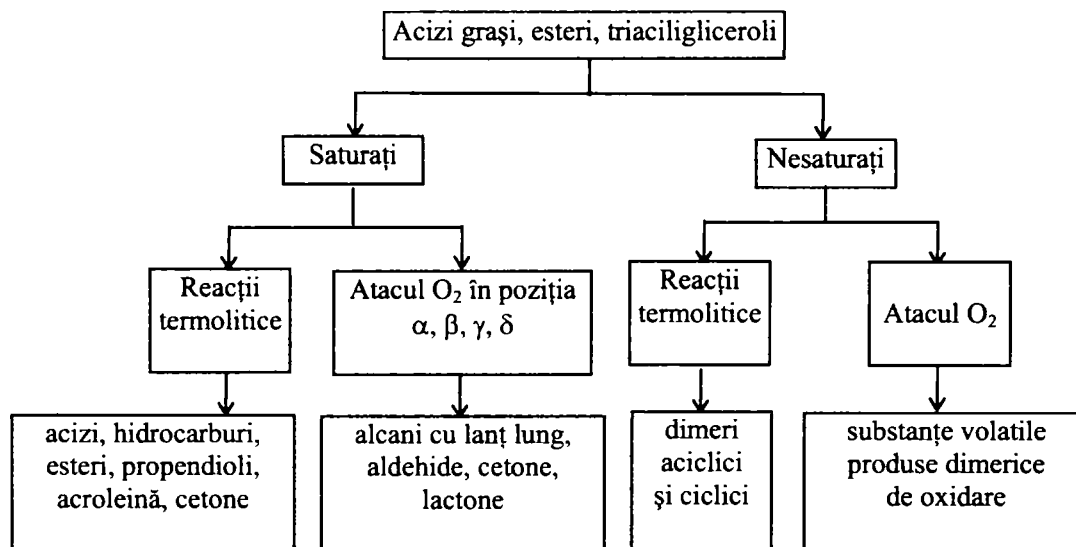


Figura 3. Produse care se formează la degradarea termică a lipidelor

Modificările pe care le suferă uleiul sau grăsimile la prăjire vor fi influențate de temperatură, durata prăjirii, existența metalelor, tipul de utilaj [2, 3, 19]. Stocarea la temperaturi scăzute conservă eficient grăsimile saturate, dar nu și pe cele nesaturate și acest fapt face necesară utilizarea antioxidanților [20].

I.2. METODE ȘI TEHNICI DE EVALUARE A AUTOOXIDĂRII ALIMENTELOR (PRINCIPII)

Selectarea celei mai potrivite metode de analiză este dificilă datorită complexității proceselor care au loc și care nici până în prezent nu au fost în totalitate elucidate. Începând cu anii 1940, o serie de teste au fost propuse în special pentru analiza oxidării lipidelor. Aceste teste măsoară fie:

- produșii caracteristici râncezirii hidrolitice
- produșii fazelor de inițiere și de propagare
- produșii fazei finale
- evoluția cantității de oxigen sau de substrat.

I.2.1. METODE STANDARDIZATE [21]

Începuturile activității de standardizare în România datează din perioada premergătoare celui de al doilea război mondial, primele standarde cu caracter

național fiind adoptate în 1937-1938 în cadrul AGIR - Asociația Generală a Inginerilor din România. În anul 1948 a luat ființă Comisiunea de Standardizare, primul organism național de standardizare. După o serie de reorganizări ale organismului național de standardizare, în 1970 a luat ființă Institutul Român de Standardizare - IRS care a funcționat până în anul 1998. Prin Ordonanța 39/1998 se pun bazele standardizării voluntare în România. De la aceasta dată, organismul național de standardizare este Asociația de Standardizare din România - ASRO. Ordonanța 39/1998 a fost aprobată și modificată prin Legea nr. 355 din 6 iunie 2002 și publicată în Monitorul Oficial al României nr. 447 din 26 iunie 2002.

Pe plan internațional există mai multe organisme care se ocupă de standardizare, cel mai cunoscut fiind ISO (International Organisation for Standardisation - o rețea a institutelor naționale de standardizare din 148 de țări, între care și țara noastră).

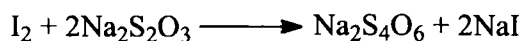
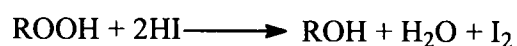
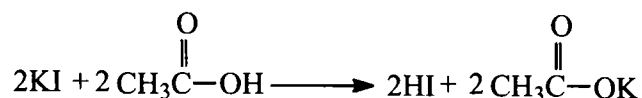
Standardul este „un document, stabilit prin consens și aprobat de un organism recunoscut, care furnizează, pentru utilizări comune și repetate, reguli, linii directoare sau caracteristici pentru activități sau rezultatele lor, în scopul obținerii unui grad optim de ordine într-un context dat” (SR 10000-1:1994). Standardele nu sunt obligatorii (au caracter de aplicare voluntară) dar în unele cazuri (cum sunt de exemplu domeniile care se referă la securitate) standardele pot fi făcute obligatorii de către instituțiile statului.

În domeniul analizei procesului de autooxidare al alimentelor, în România se utilizează încă metode standardizate care datează din anii 1974-1975: STAS 145/22-74 privind determinarea indicelui de peroxid din uleiuri și grăsimi vegetale și STAS 9065/10-75 care se referă la metode de apreciere a stadiului de oxidare a grăsimilor (reacția Kreis și indicii de peroxid) pentru carne și preparate din carne. Anumite informații mai pot fi obținute și prin determinarea indicelui de iod (STAS 145/19-67), a acidității libere (STAS 145/16-67) și prin examenul organoleptic (STAS 145/1-78).

Pe plan internațional nu există decât câteva metode standardizate în acest domeniu, cum ar fi: ISO 3960:2001 pentru determinarea indicelui de peroxid, ISO 6885:1998 pentru determinarea indicelui de anisidină și ISO 6886:1996 pentru determinarea stabilității la oxidare. Mai pot fi utilizate pentru urmărirea procesului de oxidare și ISO 3656:2002 pentru determinarea absorbției în domeniul ultraviolet și ISO 3961:1996 pentru determinarea indicelui de iod.

A. Determinarea valorii (indicelui) de peroxid (VP)

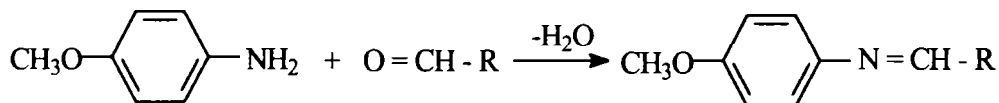
Este general acceptat că primii produși formați prin oxidarea grăsimilor sunt hidroperoxizii. Metoda de determinare a cantității de hidroperoxizi formați se bazează pe capacitatea acestora de a elibera I_2 din KI sau de a oxida Fe^{2+} la Fe^{3+} [22-24]. Reacțiile care au loc în primul caz sunt:



Există mai multe variante de determinare a indicelui (valorii) de peroxid [22-27], dar toate au la bază același principiu.

B. Determinarea valorii (indicelui) de anisidină (VA)

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 aceștia reacționează cu amine primare aromatice conform reacției:



În cazul p-anisidinei se formează un produs de culoare galbenă, cu maxim de absorbție la 350 nm [28]. Intensitatea absorbției crește dacă aldehida conține o dublă legătură conjugată cu gruparea carbonilică. De aceea metoda este utilizată în special pentru determinarea 2-alchenaldehidelor. Indicele de anisidină este definit ca de 100 de ori absorbanta (la 350 nm) a unei soluții formate din 1 g grăsime în 100 ml solvent. Valori ridicate ale acestuia pot fi indicii asupra faptului că grăsimea a fost oxidată, chiar dacă testul TBA sau alte teste de determinare a aldehydelor dau valori scăzute din cauză că aldehidele volatile au fost îndepărtate în mod accidental sau voit. O metodă îmbunătățită, de determinare a indicelui de anisidină prin injectare în flux, a fost pusă la punct de C.A. Gergiou, de la Universitatea din Atena [29]. Rezultatele obținute, comparate cu cele obținute prin metodele oficiale nu au dat abateri mai mari de 0,5-6,8%.

C. Determinarea indicelui TOTOX (OV – valoare oxidare)

Nu există o metodă standardizată de calcul al acestui indice, dar poate fi determinat matematic cu ajutorul formulei [30]:

$$\text{OV} = 2 \text{VP} + \text{VA}$$

unde VP și VA sunt valoarea de peroxid și respectiv valoarea de anisidină.

D. Testul Kreis

Se măsoară intensitatea colorației roșii ce pare a fi rezultatul reacție dintre epihidrin-aldehidă (izomer al aldehidei malonice) sau a altor compuși de oxidare cu fluoroglucinol (1,3,5-benzentriol). Alternativ se pot realiza măsurători în domeniul UV la lungimile de undă 234 și 268 nm, caracteristice trienelor conjugate. Dezavantajul constă în sensibilitatea prea mare: chiar și probe proaspete pentru care prezența produșilor de oxidare e exclusă dau colorație. Metoda este standardizată și în țara noastră [31].

E. Determinarea valorii (indicelui) de iod

Este o măsură a gradului de nesaturare dintr-o grăsime și se exprimă prin procentul de I₂ absorbit (ca urmare a adității la legăturile duble). O micșorare a acestei valori este folosită uneori pentru urmărirea reducerii acizilor dienoici în cursul autooxidării [32, 33].

F. Determinarea acidității libere

Aciditatea liberă poate fi de două feluri: aciditatea organică (rezultată din degradarea materiilor grase și exprimată în procente de acid oleic) și aciditatea minerală (rezultată în urma tratamentelor chimice cu acizi minerali și exprimată de obicei în procente de acid sulfuric. Aciditatea organică se poate determina prin titrare cu hidroxid de sodiu (sau de potasiu) în prezență de indicatori (fenolftaleină sau albastru de timol) sau prin titrare potențiomtrică [34].

G. Determinarea indicelui de stabilitate oxidativă

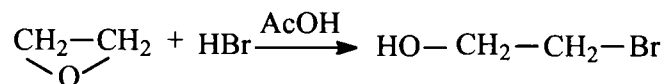
Principiul este asemănător cu cel al metodei oxigenului activ, metodă care va fi prezentată în paragraful 2.2.1. Aerul trece printr-o probă menținută la temperatură constantă, după care este barbotat într-un rezervor conținând apă deionizată. Acizii volatili produși prin oxidarea lipidelor sunt astfel dizolvați în apă ducând la creșterea conductivității acestora. Conductivitatea apei este monitorizată continuu iar indicele (valoarea) OSI este definit ca timpul (în ore) necesar pentru ca viteza de modificare a conductivității să atingă o anumită valoare predeterminată. Prin această metodă pot fi analizate simultan mai multe probe, dacă se dispune de un software corespunzător [35].

H. Analiza senzorială

Analiza senzorială implică în mod obișnuit stocarea grăsimilor analizate în diferite condiții controlate (cum ar fi temperatura de 62,8°C) și evaluarea lor periodică din punct de vedere al modificării proprietăților organoleptice. Probele sunt aerate zilnic, pentru a fi accelerată oxidarea. Metoda este dependentă de sensibilitatea degustătorilor [36].

I.2.2. METODE NESTANDARDIZATE [37]**I.2.2.1. Metode analitice****A. Textul oxiran (epoxid)**

Se bazează pe reacția:



Peroxizii se determină prin titrare cu HBr în AcOH în prezență de cristal violet până la o colorație albastru-verzuie. Nu este specifică pentru că acidul bromhidric atacă și compușii carbonilici α , β - nesaturați și dienolii și în plus nu este cantitativă cu unii epoxizi trans [38].

B. Metoda oxigenului activ (AOM)

Această metodă prezice stabilitatea unei grăsimi prin barbotarea de aer prin soluția de grăsime, utilizând condiții specifice de viteză de curgere (de exemplu 2,33 ml/sec), temperatură (cum ar fi 97,8°C) și concentrație. La diferite intervale de timp se determină prin titrare valoarea indicelui de peroxid. Indicele (valoarea) AOM se definește ca timpul (în ore) necesar atingerii unei valori a indicelui de peroxid de 100 meq/kg grăsime [39]. Cu cât o grăsime este mai stabilă la oxidare, cu atât timpul necesar va fi mai lung și de aceea metoda este mare consumatoare de timp,

fiind uneori necesare și 48 de ore. Tocmai de aceea au existat încercări de automatizare a acestei metode [40].

I.2.2.2. Metode spectrofotometrice

Spectroscopia poate fi utilizată pentru analiza substanțelor necunoscute în stare pură sau impură. Identificarea se face pe baza faptului că spectrul de absorbție prezintă un număr de benzi de absorbție caracteristice unor unități structurale din moleculă. Constanța în modul de apariție a benzilor datorate unei structuri specifice denotă faptul că fiecare grupare are o frecvență caracteristică. Aceste frecvențe au fost stabilite pe baza unor observații experimentale repetate, din informațiile de natură fizică sau prin metode empirice. În general, procesul interpretativ se face comparând poziția maximului de absorbție (lungimea de undă), intensitatea absorbției și apariția de noi benzi în spectru (datorată influenței unui grup structural asupra altuia) cu cele deja atribuite altor grupări analizate [41].

Spectrofotometria cantitativă se bazează pe modul în care un sistem urmărește legea lui Lambert-Beer [42]. Dacă se notează cu I_0 intensitatea unei radiații monocromatice incidente care traversează o probă de concentrație c (aflată într-o cuvă cu grosimea l) și cu I intensitatea radiației care nu a fost absorbită de probă (transmisă),

$$I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon \cdot c \cdot l} \quad (I.2-1)$$

unde ε este coeficientul molar de absorbție.

A. Determinarea spectrofotometrică a dienelor conjugate

Oxidarea acizilor grași polinesaturați duce la formarea unui sistem de duble legături conjugate împreună cu apariția de hidroperoxizi. S-a descoperit că există o corelație între absorbanta uleiurilor la 232 nm (care se datorează conjugării diene) și gradul de oxidare [43]. Valoarea:

$$\% \text{ dienă conjugată} = (\varepsilon_{232} - 0,07) \cdot 0,91 \quad (I.2-2)$$

este considerată o măsură a oxidării uleiului.

B. Absorbante specifice ale uleiurilor oxidate

S-a menționat faptul că hidroperoxizii cu duble legături conjugate formați ca produși primari de oxidare a uleiului de măsline absorb la 232 nm. Produsele secundare de oxidare, aldehide și cetone, absorb la lungimi de undă mai mari, la 270 nm. Dienele și trienele conjugate formate în timpul rafinării și înălbirii uleiurilor absorb de asemenea la 270 nm. Valori scăzute ale absorbanțelor specifice la aceste lungimi de undă indică uleiuri corespunzătoare din punct de vedere calitativ. De exemplu uleiul de măsline cu absorbanta specifică mai mare de 0,2 este considerat virgin doar dacă, valoarea absorbantei după ce uleiul a fost trecut peste alumina activată scade sub 0,11 [44, 45].

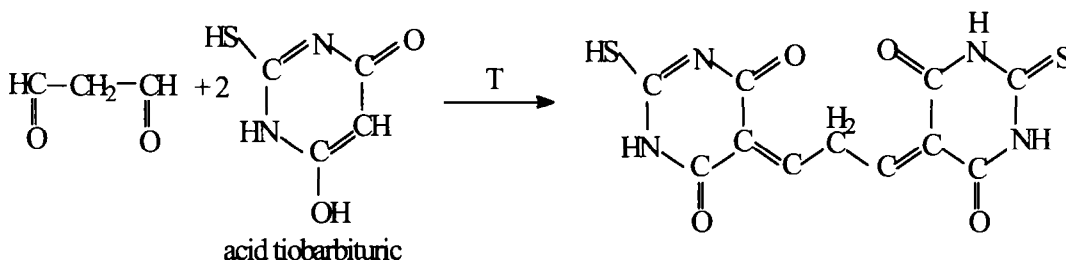
C. Spectroscopia FTIR (spectroscopie de infraroșu cu transformată Fourier)

Este o metodă simplă de determinare a procesului de oxidare. Benzile de absorbție asociate produșilor comuni de oxidare sunt identificate prin compararea lor cu cele specifice unor compuși de referință reprezentativi. În această metodă

este necesar să se identifice modificările spectrale care au loc în timpul oxidării, să se determine lungimile de undă specifice celor mai comune specii moleculare produse și să se elimine posibilele interferențe spectrale. Prin această metodă a fost evidențiată formarea de acizi carboxilici, cetone și alcooli ca produși de oxidare ai lipidelor [46].

D. Testul acidului tiobarbituric (TBA)

Este unul din cele mai folosite teste pentru determinarea produșilor secundari de oxidare ai grăsimilor deoarece rezultatele sale sunt foarte bine corelate cu evaluările senzoriale. Detectează rânțezirea grăsimilor la valori mai scăzute decât alte teste. Se bazează pe formarea de produși colorați, cu maximum absorbției la 532-535 nm, prin reacția produșilor de oxidare ai sistemelor nesaturate (în special aldehida malonică - MDA) cu acid tiobarbituric (TBA):



Rezultatele pot fi exprimate fie ca valori ale absorbanței fie ca unități de aldehidă malonică - mg aldehidă malonică / kg (bazate pe o curbă de etalonare). Corelația între valorile testului și calitatea alimentului este redată în tabelul 1 [47].

Tabel 1. Interpretarea valorilor testului TBA

Valoarea	Interpretarea
< 0,2	calitate bună
0,2 - 0,5	calitate tolerabilă
0,5 - 1,5	întrucâtva oxidat
1,5 - 5	oxidat
> 5	rânțed, necomestibil

Multe aldehide, aldehide nesaturate, 2,4-dinesaturate formează prin reacție cu acidul tiobarbituric pigmenți de culoare galbenă pentru care se poate măsura absorbanta la 450 nm; dien-aldehidele formează cu TBA un pigment roșu cu maximum absorbției în jur de 530 nm; diferiți alți compuși (de exemplu zaharoza) dau colorație roșie cu TBA, de aceea sunt necesare corecții. Valori scăzute pot apărea dacă aldehida malonică reacționează cu proteinele în sistem oxidativ.

Pentru a depăși aceste neajunsuri au fost dezvoltate tehnici specifice, bazate de asemenea pe formarea de aducți cu TBA, cum ar fi spectrofotometria derivativă și separarea prin HPLC cu detecție spectrofotometrică sau spectrofluorimetrică. Totuși, derivatizarea MDA cu TBA cere temperaturi relativ ridicate (70°C), temperaturi ce ar putea favoriza formarea unor cantități suplimentare de MDA. De aceea au fost căutați și alți reactivi ce conțin gruparea hidrazinică dar care necesită

condiții mai blânde pentru derivatizare, cum ar fi 2,4-dinitro-fenilhidrazina (DNPH) [48].

I.2.2.3. Metode cromatografice

Analiza hidroperoxizilor acizilor grași este cel mai adesea realizată prin metode cromatografice (GC sau HPLC). În cazul GC, polaritatea și instabilitatea termică a acestora necesită în multe cazuri derivatizări cum ar fi esterificarea grupărilor carboxilice sau hidrogenarea dublelor legături, ceea ce reduce cantitatea de informații obținută. Separarea prin HPLC a hidroperoxizilor izomeri a fost până acum posibilă pe coloane cu fază normală sau pe coloane cu fază reversibilă. Derivatizarea enzimatică post-coloană combinată cu detecția prin fluorescență sau chemiluminiscență îmbunătățește atât selectivitatea cât și sensibilitatea; cu toate acestea nici una din metodele HPLC propuse nu reușește să separe izomerii atât de bine pe cât ar fi de dorit [49-53].

A. Cromatografia de lichide la presiune înaltă (HPLC)

În toate aplicațiile cromatografiei de lichide pe coloană, amestecul care va fi separat este introdus în partea de sus a coloanei, sub forma unei probe mici, într-un flux format de faza mobilă (agentul de eluție). Dacă separarea are loc pe baza adsorbției, ea va depinde de interacția dintre solut și cele două faze cu care vine în contact (suprafața de adsorbantă și solventul). Dacă separarea se datorează repartiției, ea va depinde de distribuția solutului între cele două faze lichide: mobilă și staționară. Separarea poate avea loc și prin schimb ionic sau excluziune. În toate cazurile, o separarea corespunzătoare necesită o alegere adecvată a dimensiunilor coloanei, a fazei mobile lichide și a fazei staționare.

Deoarece instalația se află sub presiune înaltă, de la pompe până la capătul coloanei, toate conexiunile trebuie să fie etanșe și suficient de rezistente pentru a preveni scurgerile. Coloanele au diametre mici (sub 6 mm) și sunt umplute cu particule de fază staționară având dimensiunile între 5 și 50 μm . În aceste condiții, la presiuni interioare ridicate, se obțin viteze liniare foarte mari ducând la rezoluție superioară, eficiență sporită, timpi de separație mici și sensibilitate mai bună. Timpul la care apare fiecare pic este caracteristic pentru fiecare compus, iar aria aflată sub fiecare pic este proporțională cu concentrația sa [41].

B. Cromatografia de gaze

Cromatografia de gaze, numită astfel deoarece faza mobilă este un gaz, este alcătuită din cromatografia gaz – lichid (CGL) și cromatografia gaz – solid (CGS).

În cazul cromatografiei gaz-lichid faza staționară este formată dintr-un lichid cu punct de fierbere ridicat, iar procesul de sorbție este un proces de *repartiție*. În cazul cromatografiei gaz – solid, faza staționară este un solid, iar procesul de sorbție este în primul rând de *adsorbție*. Probele de analizat trebuie să fie volatile și termic stabile la temperatura de lucru. Ele sunt introduse în fluxul de gaz la capătul coloanei printr-un dispozitiv de injectare. Fluxul de gaz eluează componentii probei din coloană, în ordinea crescătoare a coeficienților lor de distribuție între cele două faze. Componentii separați trec apoi la detector, care este conectat cu dispozitivul de înregistrare. Intervalul de timp dintre momentul introducerii probei și apariția picului cromatografic este caracteristic pentru fiecare component, iar suprafața picului este proporțională cu concentrația componentului respectiv din amestec [41].

I.2.2.4. Metode electrochimice

A. Cromatografia micelară electrocinetică (MEKC)

Cromatografia micelară electrocinetică cu sisteme tampon complexe s-a dovedit eficientă în separarea unor izomeri foarte asemănători din punct de vedere al structurii. Astfel hidroperoxizii pot fi separați foarte bine cu un tampon fosfat conținând dodecilsulfat de sodiu (SDS) și 2-dodecoxyethanol (Brij 35) pentru a forma miclele, cu etanol și acetonă ca modificatori organici. Acest tampon prezintă totuși dezavantajul că are o selectivitate scăzută pentru acizii grași hidroxilați și necesită timp îndelungat pentru analize (aproximativ 30 de minute + 6 minute pentru condiționare). Utilizarea unui tampon de borax sau de meglumină (6-metilaminohexan-1,2,3,4,5-pentol) cu curgere normală a făcut posibilă reducerea analizei la aproximativ 10 minute și condiționarea la 1 minut, simultan cu îmbunătățirea eficienței și selectivității [54].

B. Electroforeza capilară

Electroforeza capilară (CE) a fost de curând adăugată la metodele de analiză a peroxidării lipidelor.

Viteza oxidării acizilor grași poate fi estimată (în general) fie din viteza de consumare a oxigenului, fie din viteza de formare a produșilor. Întrucât atât oxigenul cât și o mare parte a peroxizilor pot fi detectați folosind un detector electrochimic, electroforeza capilară este foarte potrivită acestui scop și poate fi ușor combinată cu detecția electrochimică [55]. Pentru a putea utiliza picul caracteristic oxigenului ca semnal analitic în electroforeza capilară trebuie avut grijă să nu intre oxigen din mediul înconjurător în amestecul de reacție sau în capilară. De aceea trebuie construit un dispozitiv care să injecteze periodic probe din amestecul de reacție în capilară, fără nici un fel de contaminare din partea atmosferei. Partenerii de reacție sunt separați mediat, astfel încât nu mai este necesară înghețarea acestora. Volumele extrase sunt foarte mici, astfel încât nu influențează viteza de reacție. Comparativ cu metoda de determinare indirectă a speciilor oxigen-reactive bazată pe formarea unei substanțe fluorescente – utilizată și în prezent, detecția electrochimică permite diferențierea peroxizilor. Oxigenul molecular migrează cu fluxul electroosmotic, în timp ce peroxizii formează complecși încărcăți negativ (în tampon borat) și părăsesc capilara bine separați.

O altă metodă de cuantificare a peroxizilor organici și anorganici constă din cuplarea electroforezei capilare cu detecția catodică amperometrică [56]. Un microelectrod din aur, polarizat la -600 mV față de un electrod de referință de Ag/AgCl este plasat la capătul capilare. Întrucât curgerea electroosmotică curăță electrodul detector de oxigen, nu este necesară degazarea celulei acestuia și nici a probei. Cu un volum de injecție de aproximativ 1 nL, peroxizii pot fi detectați până la o limită inferioară de 10 $\mu\text{mol/L}$.

B. Voltametria ciclică

Voltametria ciclică este o metodă foarte performantă de studiu a speciilor electroactive și constă în modificarea ciclică a potențialului unui electrod imersat într-o soluție și măsurarea intensității curentului rezultat. Metoda permite determinarea potențialelor redox formale, detectarea reacțiilor chimice care preced sau urmează reacțiile electrochimice și evaluări cinetice.

Prin cercetările lor, Idițoiu și col. [57] au proiectat și realizat din Pyrex o celulă electrochimică pentru analiza hidroperoxizilor a cărei schemă se prezintă în figura 4.

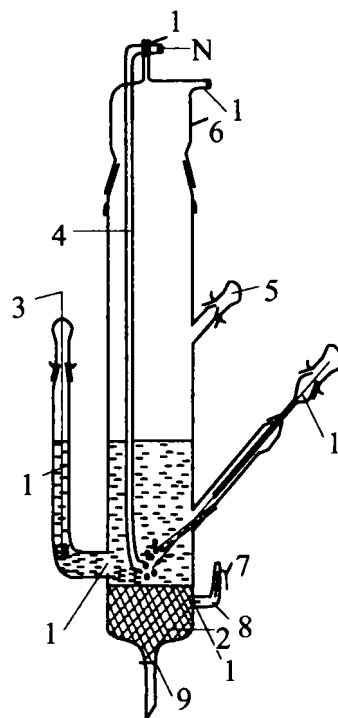


Figura 4. Schema celulei electrochimice pentru voltametrie ciclică
 1 - electrod de lucru; 2 - electrod de referință; 3 - electrodul auxiliar; 4 - tub pentru barbotat azot; 5 - deschiderea pentru probe; 6 - capacul celulei; 7 - contact mobil din Ag; 8 - tub lateral umplut cu Hg; 9 - robinet de golire; 10 - tub lateral pentru electrodul auxiliar; 11 - frită; 12 - robinet; 13 - ieșirea gazului; 14 - contact de platină

D. Testul Rancimat

Metoda Rancimat constă în următoarele : în proba încălzită la 110°C se barbotează constant aer. Compușii volatili formați în urma oxidării sunt antrenate de curentul de aer și colectați într-un vas cu apă distilată a cărei conductivitate crește proporțional cu cantitatea de substanțe volatile dizolvată [58].

I.2.2.5. Metode electromagnetice

A. Spectrometria de masă

Un spectrometru de masă se bazează pe utilizarea câmpurilor magnetice și electrice pentru a scinda specific moleculele substanțelor cu formare de ioni, în vid. Rezultă particulele având rapoarte m/z diferite (m - masa; z - sarcina) care sunt separate și înregistrate. Pentru a putea fi analizat, orice compus trebuie întâi ionizat și în plus, acest proces trebuie să aibă loc în starea gazoasă, la presiuni cât mai mici (apropiate de vid). Acest lucru este ușor de realizat pentru substanțele în stare gazoasă sau pentru cele cu volatilitate ridicată. Probleme apar în cazul substanțelor instabile termodinamic și care se descompun la încălzire și care necesită metode speciale (adeseori bazate pe procedee de desorbție sau desolvatare). Alegerea metodelor de ionizare depinde de natura probelor și de tipul informațiilor dorite. Există și așa-numita „ionizare slabă”, cum ar fi desorbția de câmp și ionizarea în electrospray care produc spectre de masă cu conținut mic sau chiar inexistent de fragmente ionice.

Hidroperoxizii formați prin oxidarea acizilor grași pot fi foarte bine analizați prin această metodă [59]. Chiar mai mult, au fost observate fragmente ionice care dau indicații asupra poziției grupărilor hidroperoxidice. Rezultatele astfel obținute au dus la formularea ipotezei conform căreia anionii hidroperoxidici se descompun printr-un intermediar asemănător structural cu anionii proveniți de la ceto-acizi.

B. Rezonanța electronică de spin

În cazul moleculelor care prezintă fenomenul de paramagnetism, ca urmare a spinilor electronici neîmperechiați, pot fi induse tranziții între stările de spin prin aplicarea unui câmp magnetic și asigurarea energiei electromagnetice necesare, de obicei corespunzătoare frecvențelor din domeniul microundelor. Spectrul de absorbție rezultat este descris ca spectru de rezonanță electronică de spin sau de rezonanță electronică paramagnetică. El este deosebit de util pentru studiul radicalilor, care se știe că posedă astfel de spini neîmperechiați, ca urmare a îndepărtării unui electron. Metoda măsoară modificările în absorbția energiei din domeniul microundelor detectând astfel numărul acestora în diferite matrici. Pentru captarea radicalilor liberi se utilizează diferite substanțe, cum ar fi: 5-(dietoxifosforil)-5-metil-1-pirolin N-oxid (DEPMPO) și 5,5-dimetil-1-pirolin N-oxid (DMPO) [60-62]. Pentru mărirea duratei de viață a aducților formați se recomandă separarea substratului de mediatorul oxidării prin extracție, de exemplu cu acetat de etil [61].

I.2.2.6. Analiza termică

Prin termenul de „Analiză termică” se indică o serie de tehnici care măsoară dependența de temperatură a unor proprietăți fizice ale substanțelor [63].

Calorimetria Diferențială Dinamică (DSC)

Tehnica DSC măsoară viteza de variație a căldurii degajate sau absorbite de sistemul investigat în timpul transformării termice, adică (dH/dt).

Sistemele de analiză DSC cu energie compensată sunt alcătuite din două microcalorimetre identice, de obicei cuplate. Proba de analiză S și cea de referință R sunt încălzite separat dar sunt supuse aceleiași program termic. În acest caz se măsoară cantitatea de energie care este necesară pentru a menține egale temperaturile celor două probe. Dacă, în cursul încălzirii are loc un proces exo- sau endoterm, atunci se produce un dezechilibru termic, iar diferența de temperatură măsurată prin intermediul unei termorezistențe va fi utilizată pentru a controla cantitatea de energie electrică care trebuie furnizată celor două microcalorimetre în scopul restabilirii echilibrului termic. Semnalul înregistrat rezultă din diferența între energia furnizată celor două calorimetre și deci reprezintă o măsură directă a cantității de căldură absorbită sau cedată de proba analizată în raport cu cea de referință. În curbele experimentale semnalul calorimetric poate fi înregistrat în funcție de temperatură sau de timp. Procesele exoterme se înregistrează în direcția pozitivă a ordonatei iar procesele endoterme se înregistrează în direcție opusă.

În urma determinării ariei vârfului DSC se poate calcula valoarea entalpiei procesului investigat precum și a capacității calorice, cu ajutorul ecuațiilor:

$$\text{Aria vârfului DSC:} \quad (A) = \pm \Delta H \cdot m \cdot K \quad (\text{I.2-3})$$

unde ΔH – entalpia procesului; m – masa probei; K – constantă de calibrare

$$C_p = \frac{dH/dt}{dT/dt} \cdot \frac{1}{m} \quad (\text{I.2-4})$$

Precizia rezultatelor DSC este afectată de condițiile experimentale și de aceea alegerea corespunzătoare a condițiilor de lucru este foarte importantă [64-66].

I.2.2.7. Metode « in situ »

A. Absorbția oxigenului (testul „bombei” de oxigen)

Se referă la cantitatea de oxigen absorbită de o probă. Se determină ca timpul necesar pentru a produce o anumită scădere a presiunii într-o cameră închisă („bombă”) sau ca timpul necesar pentru a absorbi o cantitate prestabilită de oxigen în condiții specifice de oxidare. Viteza cu care oxigenul este consumat poate fi considerată ca o măsură a stabilității probei. Un avantaj al aceste metode este capacitatea de a măsura stabilitatea unor produse alimentare complexe fără extragerea prealabilă a grăsimii. Acest lucru este important deoarece este posibil ca alți componenți ai produsului alimentar, cum ar fi metalele tranziționale sau anumiți agenți oxidanți să fie promotori ai oxidării și să nu se regăsească în grăsimile extrase; astfel predicția stabilității acestora ar putea să nu fie corectă [67].

B. Metode bazate pe chemiluminescență

Emisia foarte slabă de fotoni, cunoscută sub numele de chemiluminescență de nivel scăzut este unul din fenomenele fizice ce au loc în timpul deteriorării uleiurilor [68]. Aceasta este inițiată de către stările excitate din punct de vedere electric, implicate în reacțiile înlănțuite de peroxidare a lipidelor. Prin aceste metode pot fi detectați peroxi-esteri și dialchil-peroxizi, compuși care nu pot fi detectați prin metoda iodometrică datorită potențialului lor redox [69]. Rezultatele obținute prin această metodă sunt în bună concordanță cu cele obținute folosind un aparat Rancimat.

C. Metode fluorimetrice

Unii compuși rezultați prin oxidarea lipidelor, în special cei care posedă grupări amino libere pot forma produși fluorescenți care pot fi determinați cantitativ. Sunt relativ sensibile și în plus pot fi aplicate în multe cazuri și *in situ* pentru studiul oxidării deferitelor țesuturi sau alimente complexe.

De exemplu difenil-1-pirenilfosfina (DPPP) reacționează stoechiometric cu hidroperoxizii formați prin oxidarea lipidelor, în special cu cei liposolubili, cu formarea unui produs fluorescent, DPPP-oxidul. S-a observat o corelație liniară între intensitatea fluorescentă și cantitatea de hidroperoxid (metil-linoleat) analizat [70]. De asemenea a fost constatat faptul că hidroperoxizii esterilor acidului linoleic (sub formă de fosfolipide, trigliceroli și colesterol) duc la formarea de compuși fluorescenți prin reacția cu 1-aminopentan în prezența hemului, cu maximele de excitație și de emisie în preajma a 350 și 420 nm respectiv [71].

I.3. METODE DE PREVENIRE ȘI DE DIMINUARE A OXIDĂRII ALIMENTELOR. ANTIOXIDANȚI

Prevenirea degradării alimentelor, respectiv creșterea duratei lor de păstrare constituie un obiectiv major al cercetării în industria alimentară. De multe ori atenția

este îndreptată pentru a preveni alterările microbiologice, dar degradările chimice și biochimice, și în special cele oxidative rămân încă o problemă deoarece afectează un număr foarte mare de produse alimentare.

Stoparea sau limitarea la maxim a efectelor nedorite ale oxidării presupune cunoașterea mecanismelor intime de proces și a interconexiunilor posibile din alimente, mergându-se în acest sens pe două direcții:

1. Prevenirea proceselor de peroxidare enzimatică;
2. Prevenirea proceselor de autooxidare.

I.3.1. PREVENIREA PROCESELOR DE PEROXIDARE ENZIMATICĂ

Deoarece enzimele oxidative din categoria lipoxigenazelor, fenoloxidazelor, peroxidazelor și citocromoxidazelor provoacă schimbări importante ale calității produselor alimentare, una din problemele deosebite ale tehnologiei conservării este prevenirea acestor procese. În prezent se cunosc următoarele posibilități de acțiune în această direcție [4, 72]:

- Inactivarea termică a enzimelor
- Inactivarea enzimelor oxidante cu ajutorul substanțelor chimice
- Eliminarea oxigenului
- Reducerea cantității de polifenoli existenți în produse
- Scăderea pH-ului

Inactivarea termică a enzimelor

Prin încălzirea produselor alimentare la temperaturi cuprinse între 80 și 90 °C, are loc o inactivare rapidă a enzimelor. În funcție de natura produsului procesul se aplică prin opărire la produsele solide, sau prin preîncălzire la produsele fluide. Procesul de inactivare termică se explică prin degradarea proteinelor ce intră în constituția enzimei și prin pierderea capacității biochimice. Inactivarea termică a enzimelor depinde în afară de temperatură și timp, de pH-ul mediului și respectiv de proprietățile fizico-chimice ale mediului.

Inactivarea enzimelor oxidante cu ajutorul substanțelor chimice

Dintre substanțele chimice care se folosesc în prezent în tehnologia conservării, bioxidul de sulf (E-220) este substanța cea mai activă împotriva proceselor de îmbrunare enzimatică, în special pentru inhibarea polifenoloxidazei și peroxidazei. Pe lângă acesta se mai folosesc și alți compuși cu sulf: E-221 (sulfit de sodiu), E-222 (sulfit acid de sodiu), E-223 (disulfit de sodiu), E-224 (disulfit de potasiu), E-225 (sulfit de potasiu), E-226 (sulfit de calciu), E-227 (sulfit acid de calciu) și E-228 (sulfit acid de potasiu).

Acidul ascorbic în concentrații reduse întârzie îmbrunarea sucurilor de fructe dar nu prin inhibarea enzimei ci printr-un mecanism de reducere. În cazul în care acidul ascorbic este oxidat de o anumită cantitate de oxigen, el trece în acid dehidroascorbic, procesul de îmbrunare începând din nou, dar cu o viteză mai redusă decât inițial.

O serie de săruri neutre ale metalelor alcaline și alcalino-pământoase inhibă fenolaza. Se pare că activi sunt numai anionii, cationii neavând nici un efect. Dintre anioni, efectul cel mai puternic îl au clorurile. Sulfatii, acetatii, și tartrații nu au nici o acțiune, oxalații inhibă îmbrunarea, pe când nitrații o intensifică.

Acțiunea puternic inhibitoare a clorurilor și-a găsit a largă aplicare în practică prin folosirea clorurii de sodiu ca substanță ieftină și eficace. În ultimul timp soluțiile de clorură de sodiu nu se folosesc numai pentru inhibarea polifenoloxidazei din legume ci și pentru fructe. Un efect de inhibare asemănător îl are și clorura de calciu, care este folosită în același timp și pentru întărirea texturii fructelor moi, din care cauză prezintă o deosebită importanță pentru tehnologia conservării.

În afara inhibitorilor menționați mai pot fi folosite numeroase substanțe ca cisteina, glutationul, hidrocchinona, difenilamina, pirocatechina, adenzinotriofosfatul, și borații care însă nu prezintă importanță practică .

Eliminarea oxigenului

Prin reducerea conținutului de oxigen se realizează o inhibare parțială sau totală a oxidării enzimatică. Metodele prin care se obține acest efect se aplică pe larg în procesele tehnologice și vor fi prezentate în paragraful 3.2.1.

Reducerea cantității de polifenoli existenți în produse

Deoarece polifenolii reprezintă substratul proceselor de oxidare, prin îndepărtarea lor se obține o reducere a proceselor de îmbrunare enzimatică. Procedeele pot fi aplicat numai la produsele lichide, în special la sucurile din fructe și vinuri. Metoda cea mai cunoscută este tratarea cu gelatină, cunoscută sub denumirea de cleire. În ultimul timp în locul gelatinei se folosesc în industria sucurilor de fructe substanțele poliamidice sub formă de pulbere (de tipul nylonului sau relonului), care au efect de legare a polifenolilor mult mai puternic decât gelatina.

Modificarea pH-ului

Toate reacțiile enzimatică sunt puternic influențate de pH-ul mediului. Reacția are o viteză maximă pentru o anumită valoare a pH-ului sau pentru un interval foarte strâns de pH denumit pH optim. Abateri de la aceste valori produc o scădere bruscă a vitezei de reacție. După cum se știe pH-ul optim al enzimelor oxidante este cuprins între 6,9 și 7,5. Prin adăugarea acizilor organici, se reduce pH-ul schimbându-se domeniul de activitate al enzimei și se inhibă procesele de îmbrunare. Între pH 2,5 și 2,6 activitatea enzimatică este complet inhibată. În prezent se folosesc în acest scop acizii alimentari: lactic (E-270), citric (E-330), malic(E-296), fumaric (E-297), acetic (E-260), fosforic (E-338) și tartric (E-334) în concentrații de circa 0,5%. Studiile comparative făcute cu diferiți acizi organici au stabilit că efectul optim îl are acidul malic.

I.3.2. PREVENIREA PROCESELOR DE AUTOOXIDARE

Având în vedere transformările profunde de culoare, gust și aromă care au loc în produsele alimentare sub acțiunea oxigenului una din preocupările importante ale specialiștilor din industria alimentară este prevenirea proceselor de autooxidare. În prezent se folosesc următoarele metode [4]:

- Reducerea conținutului de oxigen din produse sau ambalaj;
- Prevenirea contaminării cu metale grele;
- Protecția față de lumină;
- Folosirea glucozoxidazei;

- Folosirea substanțelor antioxidante.

Reducerea conținutului de oxigen din produse sau din ambalaj

Pentru produsele lichide sensibile, cum sunt sucurile de fructe, se aplică pe larg, operația de deaerare, ce constă în eliminarea aerului în instalații speciale, în care produsul pulverizat este supus unui vid înaintat.

Mult mai eficace este alegerea unui mod de ambalare adecvat. Pentru a asigura o protecție optimă a produselor alimentare sensibile se recomandă ca ambalarea să se facă în atmosferă modificată, adică o atmosferă diferită de compoziția normală a aerului. În acest sens se practică în mod curent [73]: ambalarea în vacuum, ambalarea în atmosferă modificată de gaze și ambalarea activă și inteligentă. Utilizarea ambalării în atmosferă modificată presupune însă alegerea unui ambalaj cu proprietăți speciale, care să fie caracterizat printr-o permeabilitate corespunzătoare la gaze și vapori de apă care să asigure condițiile specifice atmosferei modificate.

Ambalarea în vacuum este foarte des utilizată în industria cărnii, a preparatelor din carne și în industria produselor lactate. În industria panificației și în cazul produselor vegetale cu textură slabă utilizarea ei este limitată datorită efectului de strivire asupra produselor și în plus la produsele vegetale proaspete sau minimal procesate induce trecerea de la respirație aerobă la respirație anaerobă (fermentație).

Ambalarea în atmosferă modificată de gaze este de fapt o extindere a tehnologiei de ambalare în vacuum cu scopul de a mări duratele de conservabilitate a produselor alimentare. Tehnica de ambalare în atmosferă modificată de gaze constă în ambalarea produsului într-o folie impermeabilă la gazele corespunzătoare amestecului și sudarea la cald a ambalajelor. Aerul este îndepărtat din pachet și înlocuit cu amestecul de gaze, presiunea gazului în interiorul pachetului ajungând de obicei la 1 atm, deci egală cu presiunea atmosferică. Gazele utilizate la ambalarea în atmosferă modificată a produselor alimentare sunt O_2 , CO_2 și/sau N_2 . Acestea nu sunt nici toxice și nici periculoase și în același timp sunt dorite ca înlocuitori ai aditivilor alimentari sintetici.

Prin metodele clasice de ambalare sub vid sau în atmosferă modificată de gaze se îndepărtează numai 98% din cantitatea de oxigen, restul de 2%, rămas în produs putând influența nefavorabil asupra calităților gustative.

Ambalarea activă și inteligentă urmărește folosirea interacțiunii produs-ambalaj într-un mod pozitiv în care ambalajele au rolul de a îmbunătăți conservabilitatea și siguranța microbiologică a produselor minimal procesate.

Ambalarea activă este definită ca o tehnică de ambalare care modifică în mod constant și activ atât proprietățile de permeabilitate ale materialelor plastice de ambalare cât și concentrația în diferiți compuși volatili și a gazelor din spațiul liber al ambalajului sau care adaugă compuși antioxidanți, antimicrobieni sau alte substanțe de îmbunătățire a aromei și gustului produselor alimentare.

Ambalarea inteligentă [74] este definită ca un sistem de ambalare capabil de a îndeplini unele funcții „inteligente” (detectare, sesizare, înregistrare, comunicare) care să ducă la mărirea duratei de păstrare, îmbunătățirea calității, sporirea siguranței alimentului, furnizarea de informații sau avertizarea cu privire la eventualele probleme apărute.

O metodă nouă de control a oxigenului și de modificare a atmosferei din ambalaj este cea a utilizării absorbantilor de oxigen. Aceștia se prezintă sub forma unor săculeți sau etichete care se pun în interiorul pachetului sau se lipesc pe peretele ambalajului. Ca absorbantii de oxigen se pot folosi compuși organici –

bazati pe acid ascorbic, pirocatechină, poliamide sau hidrocarburi nesaturate - dar și compuși anorganici – bazați pe Fe pudră care, în condiții corespunzătoare de umiditate, folosesc O₂ rezidual și formează hidroxid de fier netoxic [75].

Monitorizarea rapidă și eficientă a integrității pachetelor pe toată perioada depozitării, fără deschiderea ambalajelor, se poate face prin încorporarea în pachet (sub formă de etichetă sau tabletă) a unui indicator vizual redox care își schimbă culoarea datorită reacțiilor chimice sau enzimatiche. Se încearcă integrarea acestor indicatori de gaze în codul de bare al ambalajului sau în etichetele RFID (Radio frequency identification tags) astfel că semnalele emise de acestea vor fi nu doar vizuale ci și electronice [76].

Prevenirea contaminării cu metale grele [4, 72]

Metalele grele pot intra în compoziția produselor alimentare în urma tratamentelor fitosanitare, datorită apei, materialelor auxiliare sau proceselor de coroziune a utilajelor și ambalajelor. Pentru a reduce la minimum conținutul de metale grele s-a renunțat complet la aparatura de cupru, preferându-se în special pentru utilajele care vin în contact cu produsele alimentare oțelul inoxidabil și aluminiul. Pentru a inactiva metalele existente în produsele alimentare se utilizează complexarea acestora cu ajutorul agenților de chelare cum ar fi: acizi organici (citric, malic, tartric), săruri ale acizilor organici, sarea de sodiu a acidului etilendiaminotetraacetic (EDTA) sau flavone.

Protecția produselor alimentare față de lumină [4, 72]

Din punct de vedere practic prezintă importanță protejarea produselor alimentare față de acțiunea radiațiilor luminoase deoarece acestea favorizează și accelerează oxidarea compușilor fenolici - determinând modificări de culoare; a acizilor grași și carotenoizilor - determinând modificări de gust și aromă și a unor vitamine - afectând valoarea nutritivă a produselor respective.

Metoda cea mai eficientă de protecție a produselor alimentare față de efectele dăunătoare ale luminii este ambalarea corectă, respectiv folosirea unor materiale de ambalaj care să rețină sau să reflecte lumina, în special radiațiile ultraviolete. Cercetările spectrale, efectuate cu ambalaje din sticlă de diferite culori, au arătat că rezultatele optime se obțin prin folosirea celor culoare brun închis (ambra). Ambalajele tetra-pack datorită avantajelor pe care le prezintă - reciclabile, impenetrabile de către radiațiile luminoase, posibilitatea îndepărtării excesului de aer, etc. - au început să fie folosite pe scara din ce în ce mai largă. Ambalajele din material plastic, în majoritate lor sunt transparente pentru lumină. În vederea asigurării unei protecții sigure se obțin rezultate foarte bune prin cașerarea cu aluminiu, pulverizarea de aluminiu pe suprafață, încorporarea pulberii de aluminiu direct în folia de material plastic sau folosirea de pelicule colorate.

Pentru a preveni degradările provocate de lumină încă din faza de prelucrare a produselor sensibile, se recomandă ca în sălile de producție să se utilizeze lumina indirectă, în combinație cu o vopsea pe tavan, care să absoarbă radiațiile ultraviolete, având în același timp un grad de reflexie ridicat pentru radiațiile cu lungime de undă mare.

Folosirea glucozoxidazei [77]

În industria alimentară glucozoxidaza se folosește atât pentru îndepărtarea glucozei din o serie de produse care sunt supuse operațiilor termice, în vederea prevenirii proceselor de îmbrunare cât și pentru consumarea oxigenului din ambalaj.

În produsele lichide, adăugarea de 10-30 mg% glucozoxidază, provoacă consumarea oxigenului rezidual din recipiente, efectul fiind apreciat ca mai bun decât al dioxidului de sulf, cea ce permite o bună conservare a acestora, iar în cazul produselor ambalate în recipiente metalice se inhibă și procesul de coroziune. Se poate aplica la sucuri de fructe, vin și maioneze.

Pentru a preveni oxidarea produselor uscate s-a imaginat un sistem de introducere a glucozoxidazei în ambalaj. În acest scop, enzima dizolvată într-o soluție tampon se ambalează în pungi de polietilenă permeabile la aer și impermeabile la apă; oxigenul difuzează prin membrana de polietilenă și este consumat de glucozoxidază. Apa oxigenată formată este descompusă de catalază, enzimă care însoțește preparatul de glucozoxidază. Metoda și-a găsit aplicații la conservarea laptelui praf, a prafului de ouă, cafelei prăjite, untului, produselor din carne.

Folosirea substanțelor antioxidante

Conform directivei 95/2/EC din 20 II 1995, „antioxidanții sunt substanțe care prelungesc durata de păstrare (durata de viață) a produselor alimentare, prin protejarea lor față de deteriorarea cauzată de oxidare (râncezire și modificare de culoare)”. Antioxidanții sunt capabili să blocheze autooxidarea, putând interveni la diferite niveluri. În primul rând, antioxidanții preventivi sunt capabili de a absorbi oxigenul prezent, așa cum face ascorbilpalmitatul. Alți antioxidanți întrerup lanțul de reacții ale oxidării (antioxidanți primari).

Clasificarea inhibitorilor reacțiilor de oxidare a lipidelor în funcție de modul lor de acțiune este prezentată în tabelul 2 [78].

Tabel 2. Inhibitorii reacțiilor de oxidare a lipidelor [3]

Tipul	Modul de acțiune	Exemple
„Metal scavenger”	Chelatizează ionii metalici cum ar fi cei de cupru și fier, cu formare de complecși inactivi	Agenți de chelatizare ca EDTA, acidul citric, fosfolipidele, polifosfații
„Oxigen scavenger”	Reacționează cu oxigenul; reduce oxigenul.	Acidul ascorbic, ascorbil-palmitatul
Antioxidant (AH)	Întrerupe etape de propagare în cazul reacțiilor de oxidare; donează un atom de hidrogen sau un electron	Compuși fenolici cum sunt: BHA, BHT, TBHQ, PG, tocoferoli, hidroxitirozol, acid cafeic, carnosol, etc.
Agenți reducători (RSH)	Regenerează fenolii (sinergism)	Acidul ascorbic
Antioxidant enzimatic	Îndepărtează oxigenul dizolvat sau speciile oxidative	Superoxid dismutaza, glutatation peroxidaza, glucozo-oxidaz-catalaza
Antioxidanți cu funcții multiple	Regenerează antioxidanții primari chelatiți cu metale; reduce hidroperoxizii	Fosfolipide (fosfatidil-etanol amina – untura de pește), produși ai reacției Maillard
Fitosteroli metilsiliconici și etilidenici	Previn polimerizarea oxidativă în uleiurile încălzite	Polidimetilsiloxan, citrostadienol

În tabelul 3 sunt prezentați antioxidanții alimentari admiși pe plan internațional, cu numărul E asociat lor [3].

Tabel 3. Antioxidanți alimentari admiși [Ordinul nr. 438 din 18.06.2002]

Nr. CEE	Denumire
1. Agenți antioxidanți propriu – ziși	
E – 300	Acidul L-ascorbic
E – 301	L – Ascorbatul de sodiu
E – 302	L – Ascorbatul de calciu
E – 303	Diacetatul de ascorbil
E – 304	Palmitatul de ascorbil
E – 306	Extractul natural bogat în tocoferoli
E – 307	α - Tocoferolul de sinteză
E – 308	γ - Tocoferolul de sinteză
E – 309	δ - Tocoferolul de sinteză
E – 310	Galatul de propil (PG)
E – 311	Galatul de octil
E – 312	Galatul de dodecil
E – 315	Acidul erisorbic
E – 316	Erisorbatul de sodiu
E – 320	Butilhidroxianisolul (BHA)
E – 321	Butilhidroxitoluenul (BHT)
2. Substanțe care au acțiune antioxidantă dar și alte funcții	
E – 220	Anhidrida sulfuroasă
E – 221	Sulfitul de sodiu
E – 222	Bisulfitul de sodiu
E – 223	Pirosulfitul de sodiu
E – 224	Bisulfitul de potasiu
E – 226	Sulfitul de calciu
E – 322	Lecitina
3. Substanțe care întăresc acțiunea oxidanților primari	
E – 270	Acidul lactic
E – 325	Lactatul de sodiu
E – 326	Lactatul de potasiu
E – 327	Lactatul de calciu
E – 330	Acidul citric
E – 331	Citratul de sodiu
E – 332	Citratul de potasiu
E – 333	Citratul de calciu
E – 334	Acidul tartric
E – 335	Tartratul de sodiu
E – 336	Tartratul de potasiu
E – 338	Acidul ortofosforic
E – 339	Ortofosfatul de sodiu
E – 340	Ortofosfatul de potasiu
E – 341	Ortofosfatul de calciu
E – 372c	Esterul citric al mono – și digliceridelor acizilor grași alimentari

Se știe că nu există un antioxidant universal, valabil pentru toate produsele alimentare, ceea ce ridică problema alegerii antioxidantului adecvat. La alegerea unui antioxidant trebuie să se țină seama de:

- compatibilitatea cu produsul alimentar: de exemplu, galații sunt recomandați pentru conservarea unturii și mai puțin pentru conservarea margarinelor și uleiurilor vegetale;
- potențialul antioxidant: de exemplu, propilgalatul poate fi utilizat singur, în timp ce BHT și BHA sunt utilizați împreună, în care caz se obțin efecte sinergetice. La folosirea în comun a BHT și BHA, efectul antioxidant este dublu față de suma efectelor individuale. Pentru antioxidanții fenolici, efect sinergetic se obține și prin folosirea acizilor;
- tipul de prelucrare a produsului alimentar: în cazul prăjirii în grăsimi sau în uleiuri cu adaos de antioxidanți, trebuie să se aibă în vedere eventuala lor distilare cu vapori de apă (cazul BHA și BHT) sau descompunerea (cazul galatului de propil). Deci, în cazul produselor ce se prelucrează termic trebuie să se aibă în vedere rezistența termică a antioxidanților. Păstrarea activității antioxidanților după încălzire depinde de distribuția acestora între faza apoasă sau uleioasă. În general, antioxidanții hidrosolubili sunt distruși mai rapid sub influența căldurii și din acest motiv atât acidul ascorbic cât și acidul galic se esterifică pentru a crește solubilitatea lor în grăsimi, în care caz sunt mai termorezistenți;
- solubilitatea și dispersabilitatea antioxidantului: majoritatea antioxidanților sunt solubili în uleiuri și grăsimi, deci vor putea fi folosiți în sisteme alimentare care conțin lipide. Acidul ascorbic și ascorbații și mai puțin galatul de propil pot fi utilizați în sisteme alimentare hidrofile;
- modificarea culorii produsului: modificarea poate fi rezultatul combinării antioxidantului cu anumite componente ale produsului (cazul galatului de propil), modificării culorii antioxidantului însuși (cazul BHA, care în prezența de Na și K dă un produs colorat în roz);
- aciditatea sau alcalinitatea produsului alimentar: în produsele acide se recomandă folosirea antioxidanților fenolici care au caracter acid, deoarece în caz contrar își pierd eficacitatea, mai ales la temperaturi ridicate;
- modul de aplicare a antioxidantului: antioxidantul poate fi încorporat direct în grăsimi și uleiuri, poate fi pulverizat la suprafața produsului, poate fi încorporat în „purtători” (sare, condimente), sau în folia de ambalaj, de unde migrează în produs în timp.

Antioxidanții au un domeniu larg de utilizare, cuprinzând grăsimi animale, uleiuri vegetale, produse cu conținut variat de lipide, ambalaje pentru grăsimi sau produse alimentare bogate în grăsimi, produse cerealiere, pește și produse din pește, guma de mestecat etc. În legătură cu aceste utilizări, trebuie să se țină seama de:

- concentrația antioxidantului care produce efect maxim (optim); în acest caz trebuie să se țină seama și de conținutul produsului în antioxidanți naturali (tocoferoli, vitamina E, lecitină, acid ascorbic etc.);

- temperatura de prelucrare a alimentului, pentru produsele care se prelucrează termic, mai ales prin frigere, prăjire, coacere. La temperaturi mai mari de prelucrare termică, nivelul de antioxidant adăugat trebuie să fie mai mare;
- prezența factorilor prooxidanți: de exemplu, în prezența metalelor sau a acidului sorbic adăugat ca fungistatic la unt în concentrații de 0,05-0,1% se accelerează râncezirea untului chiar în prezența unei concentrații optime de antioxidant.

În prezent cercetările asupra antioxidantilor se concentrează asupra mai multor direcții [79]:

- stabilirea concentrațiilor și combinațiilor optime de antioxidanți pentru fiecare tip de alimente;
- evaluarea toxicității și a eventualelor efecte secundare ale antioxidantilor, în special a celor de sinteză;
- propunerea unor alternative naturale;
- stabilirea caracteristicilor structurale care conferă diverselor substanțe capacități antioxidante

Atât din punct de vedere economic cât și toxicologic, este recomandat să se reducă la minimum concentrația de antioxidant, prin asocierea acestuia cu un alt antioxidant primar sau prin asociere cu un sinergetic. De exemplu, asocierea a 0,01% BHA cu 0,02% palmitat de ascorbil permite dublarea perioadei de inducție în cazul untului de porc, în comparație cu acțiunea fiecărui antioxidant în parte. Pentru BHA și BHT efectul de sinergism se manifestă la 2,5 ppm BHA + 5 ppm BHT [3].

Tot mai multe foruri științifice, consideră că o mare parte dintre antioxidanții de sinteză, în special BHA și BHT cresc riscul cancerului prin acumularea lor în țesuturi, determinând hepatomegalie și întârziind dezvoltarea celulară [80]. Tabelul 4 redă eventualele reacții negative ce pot apărea în urma consumului de alimente ce conțin anumiți antioxidanți. Pe de altă parte, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives consideră că deși BHA și BHT produc reacții alergice, sunt anticarcinogenici și au stabilit că doza zilnică acceptabilă este de 0-0,5 mg/Kg corp pentru BHA și 0-0,3 mg/kg corp pentru BHT [81].

Tabel 4. Reacții negative posibile în urma consumului de alimente ce conțin anumiți antioxidanți

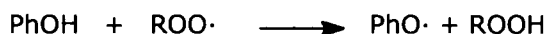
<i>Nr. cod</i>	<i>Eventuale reacții negative</i>
0	1
E-300	Se administrează cu precauție, în cantități mari produce diaree, atacă smalțul dinților și formează calculi la rinichi.
E-302	Stimulează acumularea oxalaților de calciu, ceea ce determină, în timp, formarea de calculi renali.
E-303	Aceleași reacții ca și ale vitaminei C, E300.
E-304	Aceleași reacții ca și ale vitaminei C, E300.
E-310	Risc de reacții alergice, tulburări gastrice, afecțiuni dermatologice. Interzis în hrana copiilor deoarece duce la tulburări sanguine, methemo-globinemie.

0	1
E-311	Risc de reacții alergice; tulburări gastrice, afecțiuni dermatologice (eczeme).
E-312	Risc de reacții alergice; tulburări gastrice, afecțiuni dermatologice (eczeme).
E-319	Greută, vomă, reacții delirante; o doză de 5 g este considerată letală.
E-320	Risc de reacții alergice, cancer, hiperactivitate, efect estrogenic, crește nivelul de colesterol din sânge. Interzis în hrana pentru copii și bebeluși.
E-321	Risc de reacții alergice, cancer, hiperactivitate, efect estrogenic, crește nivelul de colesterol din sânge. Interzis în hrana pentru copii și bebeluși.

Deși principiile care stau la baza utilizării antioxidantilor nu s-au schimbat în ultima jumătate de secol, alternativele naturale captează în prezent un mare segment al pieței [82]. Antioxidanții naturali sunt compuși chimici cu structuri complexe. Pot fi divizați în următoarele categorii [78]:

- Enzime, cum ar fi superoxid dismutaza (SOD), catalaza și glutatión peroxidaza, care diminuează generarea de specii oxigen reactive (ROS) prin îndepărtarea potențialilor oxidanți sau prin transformarea ROS/RNS (specii nitrogen reactive) în compuși relativ stabili. SOD catalizează transformarea radicalului superoxid în peroxid de hidrogen, care apoi poate fi transformat, cu ajutorul catalazei, în apă și oxigen molecular. Anionul superoxid nu este deosebit de reactiv dar în reacție cu metalele tranziționale cum ar fi fierul se poate transforma în unul din cei mai reactivi radicali: radicalul hidroxil. Glutatión peroxidaza (GPx) reduce peroxizii lipidici (ROOH) la molecule stabile, non-toxice de hidroxizi (ROH). Alături de fosfolipaze, GPx poate converti hidroperoxizii fosfolipidici (PL-OOH) la hidroxizi fosfolipidici (PL-OH).
- Proteine cu masă moleculară mare, cum ar fi albumina, ceruloplasmina, transferina și haptoglobina, care toate sunt prezente în plasmă, și care leagă metalele redox active limitând producerea de radicali, catalizată de acestea. Albumina și ceruloplasmina pot lega ionii de cupru, iar transferina cea de fier. Haptoglobina leagă proteinele ce conțin hem, proteine ce au activitate pro-oxidantă.
- Antioxidanți cu masă moleculară mică, subdivizați în antioxidanți liposolubili (tocoferoli, carotenoide, chinone, bilirubine și anumiți polifenoli) și hidrosolubili (acid ascorbic, acid uric și anumiți polifenoli). Aceștia acționează în special prin captarea radicalilor liberi.

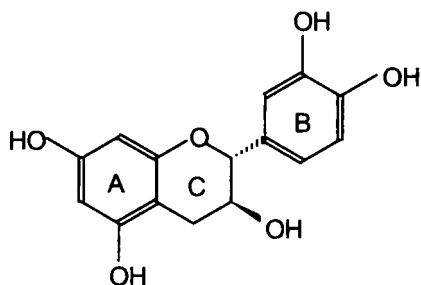
Binecunoscuți între aceștia sunt polihidroxifenolii de tipul flavonoidelor, tocoferolilor, antocianilor, etc. Se știe că activitatea antioxidantă a polihidroxifenolilor depinde de prezența grupării hidroxil, dar aceasta nu este singurul motiv al activității lor. Prezența unui lanț alchilic în poziția para este favorabilă delocalizării electronice și stabilizării fenoxiradicalilor formați în timpul reacției în lanț:



unde ROOH și ROO· reprezintă hidroperoxidul rezultat în urma oxidării și respectiv radicalul provenit prin scindarea hidroperoxidului, iar PhOH și PhO· reprezintă antioxidantul fenolic și respectiv radicalul fenoxi. Similar, grupările donoare de electroni din poziția orto măresc stabilitatea radicalului fenolici ducând la obținerea unui mai bun efect inhibitor. O a doua grupare hidroxil în poziția orto sau para afectează stabilitatea prin rezonanță. Producții oxidării sunt o - și p - chinone. În cazul m - dihidroxibenzenului formarea chinonelor nu este posibilă. Activitatea antioxidantă mai bună a acidului 3,4-dihidroxicinamic decât a acidului 3-metoxi-4-hidroxicinamic este explicată de prezența a două grupări hidroxil [83]. Trei grupări hidroxil vicinale măresc și mai mult activitatea antioxidantă, cum este cazul acidului galic [84].

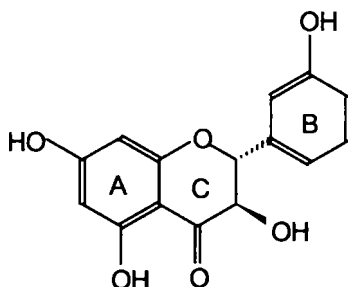
Introducerea unor zaharuri în structura unor flavonoide (hiperozidă, quercitrină, rutină, neohesperidină și hesperidină, kuromanină, keracianină, etc.) duce la scăderea activității antioxidante a acestora datorită efectelor sterice de mascare [84]

Studii electrochimice și calcule cuantice asupra compușilor cu inele de tipul 1,2 și 1,3 dihidroxibenzen (de exemplu catechina):



și asupra altor flavonoide au arătat că oxidarea are loc în inelul B.

Când inelul B nu posedă a doua grupare hidroxilică, cum ar fi în galangină:



inelul A are rol antioxidant. Oricum, datele obținute din aceste experimente depind puternic de pH-ul soluțiilor datorită echilibrului de protonare-deprotonare a grupărilor hidroxil în inelele A și B [84].

Un factor important pentru o cât mai mare eficiență a antioxidantilor îl reprezintă gradul lor dispersie în grăsimi, compoziția și caracteristicile coloidale ale fazei lipidice [85]. Creșterea temperaturii duce la scăderea stabilității antioxidantilor [86]. Timpul este un alt factor important. Pe durata procesării alimentelor, chiar și o scurtă întârziere la adăugarea antioxidantului poate reduce semnificativ calitatea

acestora. Antioxidanți binecunoscuți cum ar fi vitamina C, superoxid dismutaza, vitamina E sau melatonina pot deveni pro-oxidanți dacă au fost adăugați în cantități prea mari [87]. Controlul oxidării devine astfel un proces complex, pe lângă o combinație potrivită de inhibitori fiind importante și modul de procesare a alimentelor, modul de ambalare, restul ingredientelor prezente, etc.[88].

I.3.3. Măsurarea activității antioxidante/antiradicalice

Metodele de evaluare a activității antioxidante se bazează pe identificarea mecanismelor antioxidative în condiții variabile. Selectarea unei anumite metode trebuie să țină cont de tipul de produse în care se intenționează utilizarea antioxidantului. Metodele de examinare a activității antioxidante pot fi divizate în două categorii [78, 89]:

- măsurarea abilității de a dona un electron (sau un atom de hidrogen) unei anume specii oxigen reactive (ROS) sau unui acceptor de electroni;
- testarea abilității de a înlătura inițiatorii oxidării (inhibiția anumitor enzime, chelarea metalelor tranziționale, absorbția radiației UV).

În mod obișnuit sunt utilizate următoarele metode:

a) Metode spectrofotometrice

Metoda NBT (albastru de nitro tetrazoliu) [90]

Această metodă măsoară capacitatea componentelor produselor analizate de a îndepărta radicalul superoxid, utilizând tehnica colorării enzimatică. Anionul superoxid este generat de sistemul xantină/xantinoxidază (prin oxidarea xantinei de către xantinoxidază) și detectat cu ajutorul reactivului NBT care poate absorbi superoxidul, schimbându-și culoarea în albastru-purpuriu. Procesul poate fi urmărit la 570 nm.

Metoda DPPH• (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) [91]

O metodă rapidă și simplă pentru măsurarea capacității antiradical a alimentelor utilizează radicalul liber stabil DPPH• (1,1-difenil-2-picril-hidrazil). Electronul despereheat din radicalul liber DPPH• are absorbție maximă puternică la 517 nm (culoare albastru – violet). Culoarea se modifică până la galben când radicalul primește un H de la antioxidant/antiradical, formându-se astfel forma redusă 1,1-difenil-2-picril-hidrazina. Decolorarea este cu atât mai intensă cu activitatea antioxidantă/antiradicalică a compusului studiat este mai mare.

Metoda decolorării cationului ABTS•+ (acid 6-sulfonic 2,2'-azinobis (3-etil-benzotizolină) [92]

Metoda spectrofotometrică are la bază utilizarea radicalului cationului ABTS•+ și este una dintre cele mai folosite metode de determinare a activității antioxidante a extractelor vegetale. Metoda poate fi aplicată atât pentru compuși hidrofilici cât și pentru cei lipofilici și se bazează pe capacitatea antioxidantilor de a „stinge” radicalul ABTS•+, care este un cromofor albastru/verde, cu maxim de absorbție la 734 nm, în comparație cu analogul hidrosolubil al vitaminei E (Trolox).

Metoda FRAP (ferric reducing ability of plasma) [93]

Metoda FRAP utilizează o reacție de oxido-reducere pentru măsurarea capacității probelor de a reduce Fe^{3+} la Fe^{2+} . Reactivul necesar determinărilor este numit reactivul FRAP. Acesta se prepară din: tampon acetat, pH-3,6; soluție de FeCl_3 ; și clorhidrat de 2,4,6 tripiridil s-triazină. Procesul se urmărește prin citirea absorbanței la 593 nm.

Metoda bazată pe acțiunea oxidantă a KMnO_4 , în mediu acid [94]

Pentru determinarea capacității antioxidante a diferitelor alimente sau preparate a fost propusă o metodă rapidă bazată pe acțiunea oxidantă a KMnO_4 în mediu acid, asupra majorității substanțelor reducătoare vegetale. Esența metodei constă în determinarea vitezei de decolorare a unei soluții de KMnO_4 , în mediu acid, care conține produsul de cercetat.

Evaluarea activității antioxidante bazată pe sistemul β -caroten/acid linoleic [95]

Metoda se bazează pe oxidarea unei emulsii de β -caroten/acid linoleic, oxidare care este urmărită spectrofotometric la 470 nm.

b) Metode electrochimice**Metoda EAAT (electrochemical antioxidant activity tester) [96]**

Metoda EAAT are la bază măsurarea capacității antioxidantilor de a înlătura radicalului superoxid. Metoda constă în măsurarea modificărilor legate de conductivitatea probei pe măsură ce antioxidanții reduc radicalii liberi dintr-o soluție tampon. EAAT măsoară direct concentrația de reactanți și nu utilizează o reacție secundară cum ar fi schimbarea culorii ca și la alte metode. Cu ajutorul acestei metode sunt cuantificați toți antioxidanții care înlătură superoxidul din probă și anume: flavonoizii, carotenoizii, glutatationul, vitaminele, superoxid dismutaza.

Electroliza în flux continuu pe coloană cuplată cu voltametria ciclică [97]

Electroliza în flux continuu pe coloană cuplată cu voltametria ciclică este o metodă electrochimică simplă pentru determinarea potențialului de semiundă $E_{1/2}$ a compușilor antioxidanți precum și a numărului de electroni (n) transferați. Cu cât valorile $E_{1/2}$ sunt mai scăzute (mai negative), cu atât activitatea antioxidantă este mai mică.

c) Metode bazate pe chemiluminescență**Metoda ORAC (oxigen radical absorption capacity) [98]**

Metoda măsoară degradarea oxidativă a fluoresceinei ca urmare a reacției cu anumiți radicali liberi. Intensitatea semnalului fluorescent descrește pe măsura oxidării acesteia (măsurătorile se fac la un anumit interval de timp după momentul amestecării reactanților – de exemplu 35 de minute). Adăosul unor substanțe antioxidante inhibă procesul de degradare. Metoda ORAC nu măsoară activitatea antioxidantă a probelor împotriva tuturor radicalilor liberi, ci doar pentru *radicalii peroxil și hidroxil*. Standardele utilizate sunt TROLOX (analog al vitaminei E) pentru peroxil și acid galic pentru hidroxil.

Determinarea potențialului antioxidant total – metoda TRAP (total reactive antioxidant potential) [99]

Metoda are la bază utilizarea unui generator de radicali hidrofili și o substanță care detectează acești radicali (ficoeritrina). În această metodă ca și

generator de radicali liberi se utilizează ABAP, care este un azo-compus: 2,2'-azobis-(2-amidinopropan). Cuantificarea rezultatelor se face prin monitorizarea scăderii fluorescenței ficoeritrinei, la 495 nm, în urma reacției de oxidare declanșată de către ABAP.

Determinarea TRAP prin intensificarea chemiluminescenței luminolului.
Determinarea indicelui TAR (total antioxidant reactivity) [100]

Principiul determinării TRAP prin intensificarea chemiluminescenței luminolului este aproape identic cu cel de la metoda de bază, cu deosebirea că în locul ficoeritrinei se utilizează luminol. Ca și generator de radicali liberi se utilizează tot ABAP. Metoda se bazează pe înlăturarea radicalilor peroxil ($\text{ROO}\bullet$) și detectează majoritatea compușilor cu activitate antioxidantă prezenți în extractele vegetale.

Valorile TAR se determină prin măsurarea scăderii inițiale a luminescenței luminolului după adăugarea unor mici probe de extract.

Variante ale acestor metode se pot obține prin utilizarea altor substanțe chemiluminescente sau al altor generatori de radicali liberi.

d) Determinarea activității antiradicalice prin GC/MS [101]

Principiul metodei se bazează pe producerea radicalilor liberi prin descompunerea controlată a AIBN (azo-bis-izobutiro-nitril) și observarea evoluției sistemului care interacționează cu radicalul galvinoxil prin cromatografie de gaze cuplată cu spectrometrie de masă. Galvinoxilul este un radical liber stabil în stare solidă sau în soluție până la 70°C, în absența radiațiilor UV dar instabil când alți radicali sunt prezenți în sistem.

Alte sisteme generatoare de radicali liberi pot fi considerate și reacțiile Maillard, deoarece acestea sunt sisteme chimice complexe pe parcursul cărora se formează radicali liberi cu structură complexă, cum ar fi: peroxidul sau radicalul hidroxil. Avantajul utilizării sistemului Maillard este faptul că rata producerii radicalilor liberi nu este foarte mare iar cinetica reacției este ușor de urmărit.

PARTEA A II-A.

CONTRIBUȚII PROPRII

II.1. Date botanice și farmacologice referitoare la speciile studiate

II.1.1. BUSUIOCUL [102-111]



Regnul:	Plantae
Subregnul:	Tracheobionta
Încregătura:	Magnoliophyta
Clasa:	Magnoliopsida
Subclasa:	Asteridae
Ordinul:	Lamiales
Familia:	Lamiaceae
Genul:	Ocimum
Specia:	<i>Ocimum Basilicum</i>

Busuiocul este o plantă anuală, de origine tropicală. Are tulpina de aproximativ 60 de cm. Frunzele sunt ovale și pețiolate, de culoare verde-intens pe partea superioară și verde-gri pe partea inferioară. Florile sunt albe sau alburii, grupate spiciform spre vârful tulpinii și al ramurilor. Mirosul este plăcut aromă, caracteristic.

Aria de răspândire:

Genul *Ocimum* este larg răspândit în Asia, Africa și America de Sud și Centrală. Busuiocul a fost cultivat pentru prima dată în India. Astăzi se cultivă și în multe țări din Europa, în special în zona Mediteraneană.

Conținut ulei volatil: 0,2 – 1%, cu compoziția chimică diferită în funcție de chemotipul de la care provine (tabelul 5).

Activitate farmacologică. Utilizare

Puțin studiată din punct de vedere farmacodinamic. Utilizat empiric în tulburări gastro - intestinale, ca stimulent al digestiei, ca diuretic sau în inflamații ale căilor respiratorii. Este un excelent condiment. Uleiul volatil are proprietăți antimicrobiene și antifungice. Se utilizează și în industria parfumurilor.

II.1.2. CIMBRUL [102, 103, 105-111]

Regnul:	Plantae
Subregnul:	Tracheobionta
Încregătura:	Magnoliophyta
Clasa:	Magnoliopsida
Subclasa:	Asteridae
Ordinul:	Lamiales
Familia:	Lamiaceae
Genul:	Thymus
Specia:	<i>Thymus vulgaris</i>

Cimbrul prezintă o tulpină în patru muchii, ramificată, de obicei ramificată în partea inferioară, înălțime de până la 20 de cm. Frunzele sunt opuse, sesile, sau scurt pețiolate, linear lanceolate sau eliptice, mici, cu marginile întregi și recurbate spre fața inferioară, ceea ce le dă un aspect de tubușoare fine. Florile mici sunt dispuse în verticile reunite în raceme terminale. Caliciul bilabiat prezintă lobi, pe când corola albă sau rozee este bilabiată. Mirosul este caracteristic și gustul aromat.

Aria de răspândire:

Cimbrul este o specie mediteraneană dar care este mult cultivată de la grădinile individuale până la marile culturi în scopul industrializării plantei.

Compuși chimici identificați: pe lângă uleiul volatil (1 - 2,5%) mai conține: tanin, flavone, acizi cafeic, ursolic, oleanolic, rozmarinic și clorogenic, vincenina-2, n-triacontan, saponine sterolice, glucide, lipide, proteine, vitamine.

Activitate farmacologică. Utilizare

Este utilizat în terapeutică sub formă de infuzie, îndeosebi în tratamentul tusei și bronșitelor, datorită proprietăților antiseptice și calmante asigurate de timol, carvacrol și alte componente volatile ale uleiului. Mai prezintă acțiune diuretică, coleretică și antihelmitică față de oxiuri, ankilostome și tricocefali. S-a mai pus în evidență acțiunea secretomotorie, secretolitică, spasmolitică, stomahică și carminativă. La acțiunea fenolilor se adaugă și cea antispastică exercitată de flavone.

La supradozare apare o stare de intoxicare caracterizată de vomă, gastroenterită, paralizie centrală și exitus, însoțite și de o afectare a celulei hepatice, albuminurie și hemoglobinurie.

O foarte largă întrebuințare își găsește în industria alimentară, condiment în alimentația casnică și în industria parfumurilor.

Intră în compoziția unor specialități veterinare utilizate ca tonice, vermifuge sau cicatrizante.

II.1.3.COADA CALULUI [102, 103, 105-111]



Regnul:	Plantae
Subregnul:	Tracheobionta
Încrângătura:	Equisetophyta
Clasa:	Equisetopsida
Ordinul:	Equisetalis
Familia:	Equisetaceae
Genul:	Equisetum
Specia:	<i>Equisetum arvense</i>

Coadă calului este o plantă perenă, erbacee, cu două feluri de tulpini. Primăvara se dezvoltă tulpinile simple, brune, fertile (poartă în vârf spice cu spori), înalte de 40 cm. Îndată după fructificare, aceste tulpini fertile putrezesc și în locul lor apar tulpini sterile de 60 cm, mai subțiri, verzi, mult ramificate, având ramurile laterale dinușe în verticile. Tulpinile sterile apar la începutul verii. În jurul nodurilor, tulpinile sterile au frunzulițe solzoase, brune, în forma de guleră și rămurele aciculare. Acestea sunt mai lungi la baza tulpinii și mai scurte spre vârful ei, dar nu sunt mai lungi decât distanța dintre noduri, ceea ce face planta în întregime să aibă înfățișarea unui con. În pământ, are un rizom ce crește oblic, purtând la noduri rădăcini subțiri, precum tubercule. Culoarea tulpinilor este verde cenușie, mirosul lipsește, iar gustul este ușor acrișor.

Aria de răspândire:

Coadă calului este o plantă extrem de răspândită, frecventă în zona de câmpie – munte (păduri, șanțuri, ogoare). Lipsește doar în Australia și Antarctica.

Compuși chimici identificați: pe lângă uleiul volatil (tabelul 5) mai conține: 6-8% dioxid de siliciu, ecvisetonină (saponină), izocvercetrozidă și ecvzetină (flavone), alcaloizi, dimetil-sulfonă, acizi aconitic, malic, oxalic și rezine, săruri minerale.

Activitate farmacologică. Utilizare

Planta are efect antimicrobian, antiseptic urinar, diuretic, bronhodilatator, remineralizant (datorită conținutului însemnat de acid silicic și săruri minerale), diuretic și expectorant. Pentru efectul ei în coagularea sângelui, planta este utilă în sângerări, expectorații cu sânge și hemoragii. Prin efectul ei depurativ, coada calului este un bun remediu pentru prevenirea arteriosclerozei. În tulburările digestive, ceaiul din coada calului combate aciditatea crescută, favorizând vindecarea ulcerului gastric.

Contra mătreaței, părul se spală, zilnic, cu fiertură de coada calului, apoi pielea capului se masează cu ulei de măsline.

Ceaiul din coada calului, sub formă de gargară, este util în caz de amigdalită, inflamații ale mucoasei bucale, stomatite ulceroase, gingivite și sângerări ale gingiei.

II.1.4.COADA ȘORICELULUI [102, 103, 105-111]

Regnul:	Plantae
Subregnul:	Tracheobionta
Încregătura:	Magnoliophyta
Clasa:	Magnoliopsida
Subclasa:	Asteridae
Ordinul:	Asterales
Familia:	Asteraceae
Genul:	Achillea
Specia:	<i>Achillea millefolium</i>

Coadă șoricelului prezintă o tulpină erectă, glabră sau ușor pubescentă, înălțimea ei ajunge până la 80 cm. Frunzele sunt de două-trei ori penat-sectate, cu lacinii foarte înguste, ușor-păroase, dispuse altern pe tulpina. Flori dispuse în calatidii ovoide iar acestea grupate în corinburi. Florile marginale sunt albe sau trandafirii, uneori nuanțate cenușiu, cele centrale tubuloase, hermafrodite și au un parfum aromatic, acrișor.

Aria de răspândire:

Coadă șoricelului este o plantă erbacee, perenă, întâlnită de la câmpie până în regiunea subalpină, pe soluri nisipoase, relativ umede, însorite sau umbrite. Este la fel de bine răspândită în toată Europa, în țările Africii de Nord, în Asia și America de Nord.

Compuși chimici identificați: conține 0,1-0,5% ulei volatil (tabelul 5), acizii achileic, formic, aconitic, ascorbic, valerianic, palmitic, stearic, miristic, oleic, linoleic, succinic, salicilic, cafeic, alcool etilic, metilic, flavone, maltoză, zaharoză, glucoza, arabinoză, galactoză, dextrine, aminoacizi, proteine, taninuri, săruri de fier, mangan, zinc, cupru, cadmiu, nichel, siliciu și calciu.

Activitate farmacologică. Utilizare

Planta conține principii antiinflamatoare, calmante, astringente, aseptice. Elimină sau limitează procesul inflamator, distruge microorganismele, provoacă strângerea țesuturilor, moderează secrețiile și ușurează cicatrizarea.

Intern se folosește pentru: stimularea poftii de mâncare, anorexie, bronșite, tuse, rinite, rinosinuzite, alergii, sedativ, colici hepato-biliare, deschinezie-biliară, balonări, cistite, ascaridioza, ulcer gastric, ulcer duodenal, cancerul organelor, pelviene, boli de ochi, hemoragii nazale, osteoporoza, hemoragii stomacale.

Uz extern: afecțiuni vasculare, exeme, arsuri, contuzii, răni purulente, ulceratii, hemoroizi, fisurile sinilor, abcese dentare, astm bronșic, mâncărimi vaginale, leucoree, prolaps uterin.

II.1.5. LEUȘTEANUL [102, 103, 105-111]

Regnul:	Plantae
Subregnul:	Tracheobionta
Încrângătura:	Magnoliophyta
Clasa:	Magnoliopsida
Subclasa:	Rosidae
Ordinul:	Apiales
Familia:	Apiaceae
Genul:	Levisticum
Specia:	<i>Levisticum officinale</i>

Rădăcina leușteanului este pivotantă și de foarte mari dimensiuni, putând atinge lungimi de peste 1 metru. Tulpina este groasă, tubulară, înalță de 2-3 metri. Frunzele sunt compuse, dublu sectate cu marginea foliolelor dințată. În plină vară leușteanul înflorește dând naștere unor flori compuse în forma unor umbrele, de culoare galbenă, din care se vor forma semințele. Gustul și mirosul sunt puternic arome, caracteristice.

Aria de răspândire:

Este o plantă perena, cultivată în grădină, trăiește în medie 7-10 ani. Leușteanul crește pe soluri grele și reci și este cunoscut și utilizat în toată Europa și America de Nord, dar probabil are origine asiatică.

Conținut ulei volatil: 0,6 – 1% (tabelul 5).

Activitate farmacologică. Utilizare

Principiile active pe care le conține au o puternică acțiune terapeutică asupra aparatului respirator, a aparatului reno-urinar, asupra sistemului endocrin și a celui imunitar. Este un excelent remediu pentru prevenirea bolilor, atunci când este consumat sistematic ca aliment.

Leușteanul poate deveni, atunci când este dozat corespunzător, un remediu eficient într-o multitudine de boli: indigestie, dispepsie (are puternice efecte de stimulare a secrețiilor care ajută în procesul de digestie, stimulează peristaltismul tubului digestiv), anorexie (stimulent digestiv și tonic nervos), pete pe pile, reacții alergice, litiază renală, răceala, gripă, bronșită.

Este recomandat și în colecistită, enterită și în colita de putrefacție.

Are efecte antiseptice, expectorante, și mărește capacitatea naturală a organismului de a combate infecțiile.

Uleiul obținut din leuștean scade tensiunea și stimulează diureza. Ceaiul preparat din semințe de leuștean liniștește rapid durerile de stomac.

II.1.6. MĂGHIRANUL [102, 103, 105-111]

Regnul:	Plantae
Subregnul:	Tracheobionta
Încrângătura:	Magnoliophyta
Clasa:	Magnoliopsida
Subclasa:	Asteridae
Ordinul:	Lamiales
Familia:	Lamiaceae
Genul:	Origanum
Specia:	<i>Maiorana hortensis</i> sau <i>Origanum majorana</i>

Măghiranul se prezintă ca un subarbust, înalt de 20-50 cm, cu frunze mici, ovale, tomentoase, de un verde cenușiu, chiar albicioase. Ele sunt opuse, scurt pețiolate, lungi de 2-3 cm, cu marginea întreagă. Florile, albe sau rozee, sunt grupate în inflorescențe globuloase, mici de o jumătate de cm, sunt plasate sub axila bracteelelor dințate pe margini. Întreaga plantă este aromată și cu gust arzător.

Aria de răspândire:

Originară din Orient, măghiranul s-a extins, fiind cultivat cel mai mult în țările din nordul și sudul Mării Mediterane.

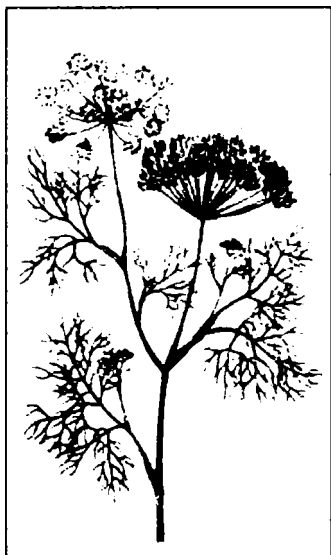
Compuși chimici identificați: conține 0,3-0,9% ulei volatil (tabelul 5), aproximativ 2,3% taninuri, n-triacontan, β -sitosterol, acid ascorbic, planteoză, zaharoză, alte glucide, pectine, lipide. Frunzele conțin un complex flavonoidic (0,48%) format din luteolol-7-glucozida, apigenol-7-glucozida, diosmetină, 7-glucuronatul diosmetinei, dinatină, vitexină, orientină, timonină și majoranină.

Activitate farmacologică. Utilizare

Produsul vegetal este folosit îndeosebi drept condiment, intrând în compoziția a numeroase amestecuri condimentare în industria alimentară. Sub formă de infuzie este ușor stomahic și sedativ, pe când sub formă de decoct se administrează, în asociere cu alte plante, ca sedativ și carminativ. Se recomandă în unele stări nervoase și mai ales în combaterea insomniilor. De asemenea, are însușirea de a mări diureza.

Ceaiul mai este cunoscut și pentru efectele sale sudorifice. Este știut faptul că produce transpirație abundentă și mărește temperatura organismului, de aceea se recomandă persoanelor care au probleme cu circulația

Uleiul volatil este mai mult dirijat către industria parfumeriei.

II.1.7. MĂRARUL [102, 103, 105-111]

Regnul:	Plantae
Subregnul:	Tracheobionta
Încregătura:	Magnoliophyta
Clasa:	Magnoliopsida
Subclasa:	Rosidae
Ordinul:	Apiales
Familia:	Apiaceae
Genul:	Anethum
Specia:	<i>Anethum graveolens</i>

Mărarul este o specie anuală. Întreaga plantă este pruinooasă. Frunzele sunt de 3-4 ori penat-sectate. Lipsește atât involucrel cât și involucrelul, iar florile sunt galbene. Fructele sunt eliptice, turtite dorsoventral, lungi de 2,5-5 mm și late de 1,5-3 mm. Culoarea lor este brun închis, cu miros puternic aromat, caracteristic și ușor picant.

Aria de răspândire:

Mărarul este originar din regiunea mediteraneană și din sudul Rusiei și se folosește din cele mai vechi timpuri. Era cunoscut și apreciat de babilonieni, asirieni, romani pentru proprietățile tămăduitoare. Mărarul a fost intens folosit și în medicina tibetană (Unani) și în cea indiană (Ayurveda). La un moment dat devine specific bucătăriei Europene. În prezent se cultivă intensiv și în Egipt.

Compuși chimici identificați: fructele de mărar conțin 2,5-4% ulei volatil (tabelul 5), alături de limonen, miristicină și dilapiol, vitamina C, fibre. Mai conține 10-20% ulei gras.

Activitate farmacologică. Utilizare

Mărarul posedă proprietăți stomahice, carminative, antispastice și diuretice. Fiind o foarte bună sursă de fibre, mărarul ajută la reducerea colesterolului din sânge. Ajută, de asemenea, la normalizarea presiunii sângelui, datorită conținutului ridicat de potasiu, prevenind astfel infarctul sau atacul de cord.

Este utilizat pe scară largă drept condiment, în preparatele de carne și în alimentația obișnuită. Este o plantă de neînlocuit, conferind salatelor de crudități o aroma deosebită. Mărarul se folosește de preferință proaspăt și se adăuga la sfârșit. Semințele de mărar sunt bune pentru murarea castraveților, la prepararea fripturilor la cuptor sau la prepararea oțetului de ierburi aromate.

II.1.8. PĂTRUNJELUL [102, 103, 105-111]

Regnul:	Plantae
Subregnul:	Tracheobionta
Încrengătura:	Magnoliophyta
Clasa:	Magnoliopsida
Subclasa:	Rosidae
Ordinul:	Apiales
Familia:	Apiaceae
Genul:	Petroselinum
Specia:	<i>Petroselinum sativum</i>

Pătrunjelul se prezintă ca o plantă bianuală, erbacee, având înălțimi de 20-80 cm, cu tulpini striate longitudinal, cu frunze lung pedunculate și bi- sau tripartite în lobi triunghiulari, dințați. În pământ prezintă o rădăcină carnoasă, pivotantă. Florile sunt mici, de culoare alb-verzuie sau galbenă verzuie. Fructele, diachene, sunt organizate pe tipul umbreliferelor, de 3-4 mm lungime, cu 5 coaste filiforme, două stiluri divergente, cu gust și miros aromatic, caracteristic.

Aria de răspândire:

Planta, originară din țările bazinului mediteranean, atât europene cât și africane, în prezent este cultivată în toată Europa, America și Asia.

Compuși chimici identificați: 2,5-5% ulei volatil (tabelul 5), flavonozide, vitamina C, provitamina A, vitaminele B și E, apiol, săruri de fier, mangan, calciu, magneziu, sodiu și potasiu, fosfor, sulf, iod, clorofila, histidină și aproximativ 20% ulei gras format îndeosebi din gliceroli ai acidului petroselinic.

Activitate farmacologică. Utilizare

Pătrunjelul întărește sistemul de apărare al organismului, stimulează sistemul nervos, este antiinfecțios, elimină sau limitează procesele inflamatoare, reglează ciclul menstrual, este diuretic (eliminând apa, ureea, acidul uric și clorurile) și depurativ curățând corpul de toxine, antiseptic al sângelui, al tubului digestiv și al cailor urinare, vasodilatator, antitumoral, antianemic, antirahitic și antiscorbutic. Pătrunjelul stimulează expectorația eliminând din bronhii și plămâni substanțele dăunătoare, împiedică uscarea conjunctivei și a corneei, favorizează creșterea transpirației contribuind și în acest fel la eliminarea toxinelor, este regenerativ capilar, vermifug, stimulent al fibrelor musculare netede (intestinale, urinare, biliare, uterine).

Neutralizează efectele nocive ale tutunului și alcoolului

II.1.9. OREGANO [102, 103, 105-111]

Regnul:	Plantae
Subregnul:	Tracheobionta
Încrângătura:	Magnoliophyta
Clasa:	Magnoliopsida
Subclasa:	Asteridae
Ordinul:	Lamiales
Familia:	Lamiaceae
Genul:	Origanum
Specia:	<i>Origanum vulgare</i>

Planta are tulpini drepte, ramificate la partea superioară, cu tulpina și ramurile de culoare roșietică violacee și pubescente. Poate ajunge la 85 cm înălțime. Frunzele întregi și de dimensiuni moderate, sunt ovale și opuse. Inflorescențele terminale, corimbiforme, au la bază bractee roșietice sau violacee, iar florile bilabiatae au petale colorate de un alb de la alb la purpuriu. Caliciul este campanulat. Aroma este caldă, balsamică.

Aria de răspândire:

Planta crește spontan în țara noastră la marginea pădurilor, a tufărișurilor, prin tăieturi de pădure și crește puternic însoțite. Este răspândită în Europa și Asia și în special în regiunea Mediteraneană. Este cultivat pe scară largă în Chile.

Compuși chimici identificați: aproximativ 1% ulei volatil (tabelul 5), taninuri (cca. 8%), acizi cafeic, ursolic, oleanolic, flavone (apigenol, luteol, naringenol, kempherol, retusina, vincenina, aurina, leptozidiba), antociani (peonidol și malvidol).

Activitate farmacologică. Utilizare

Datorită componentelor sale, produsul vegetal ca și diversele preparate din acesta, posedă proprietăți antiseptice, stomahice, antispastice și diuretice, ușurează respirația, calmează tusea. Are și acțiune emenagogă, motiv pentru care se folosește pentru declanșarea menstruației, dacă aceasta a fost suprimată în urma unei răceli. Are efect energizant. Uleiul volatil este puternic antimicrobian.

Oregano are activitate antioxidantă, datorată în particular compușilor fenolici și flavonoidici. Ținând cont și de activitatea antimicrobiană împotriva unor agenți patogeni care se pot întâlni în alimente, cum ar fi *Listeria monocytogenes*, rezultă că poate fi utilizat cu bune rezultate în conservarea alimentelor.

Se mai utilizează în aromaterapie și în industria parfumurilor precum și în bucătăria mediteraneană.

II.1.10. ROZMARINUL [102, 103, 105-111]

Regnul:	Plantae
Subregnul:	Tracheobionta
Încrângătura:	Magnoliophyta
Clasa:	Magnoliopsida
Subclasa:	Asteridae
Ordinul:	Lamiales
Familia:	Lamiaceae
Genul:	Rosmarinus
Specia:	<i>Rosmarinus officinalis</i>

Rozmarinul este un arbust întotdeauna verde, cu aspect de ... și ... pământului. Frunzele și plantei sunt de culoare albicioasă, tulpina prezentând frunze opuse, lineare, subulate, sesile, lungi de 2-3 cm și înguste de 1-2 mm, dure, aspre, coriace. Florile, grupate în ciorchini scurți, axilari sau terminali, sunt bilabiata și au o culoare albastră sau albă. Fructele, tetraachene, au culoare brună, lucioasă. Au miros puternic aromat iar gustul este aromat și ușor amărui.

Aria de răspândire:

Este o plantă de origine mediteraneană, dar se întinde și până în insulele Canare, iar cultivat și în America de Nord.

Compuși chimici identificați: 0,22-1,2% ulei volatil (tabelul 5), compuși terpenici, ceruri, etolide, alcani și alchene, acizi polihidroxi-alcanici, acizi fenolici (acid rozmarinic, cafeic, gentizic, vanilic, siringic, galic, tanic), substanțe flavonoidice (luteolol, apigenol, diosmina, diosmetina, ghencvanina, hispidulina, cirzimaritina, salvigenina, nepetina, cirzilion), tanin (3,4-8,4%), saponine, acid glicolic, acid nicotinic, acid ascorbic.

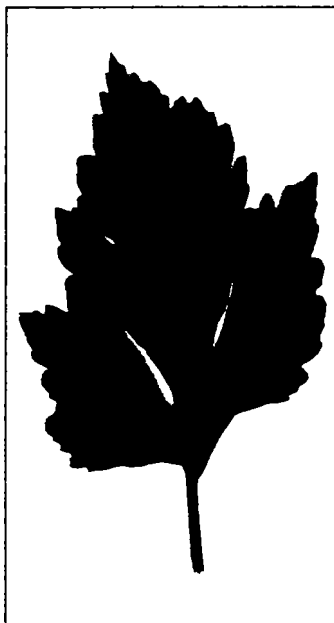
Activitate farmacologică. Utilizare

Rozmarinul stimulează circulația sanguină, din care cauză este utilizat în tratamentul vertijelor și a migrenelor, acționează excitant la nivelul tubului digestiv datorită efectului coleretic, colagog și antifatulent, atigutos și antireumatic, hipocolesterolemiant. Extractul de rozmarin are puternică activitate antioxidantă cu implicații în combaterea proceselor de senescență.

Uleiul volatil este puternic epileptizant. Se utilizează în parfumerie și cosmetică. Extern se folosește ca cicatrizant, antiseptic, ca stimulant al pielii capului.

Vârfurile florare se folosesc drept condiment și conservant al unor preparate din carne.

II.1.11. ȚELINA [102, 103, 105-111]



Regnul:	Plantae
Subregnul:	Tracheobionta
Încrângătura:	Magnoliophyta
Clasa:	Magnoliopsida
Subclasa:	Rosidae
Ordinul:	Apiales
Familia:	Apiaceae
Genul:	Apium
Specia:	<i>Apium graveolens</i>

Țelina are o tulpină striată, de 15-40 cm, cu frunze în formă de pană, întreaga plantă având gust și miros caracteristice.

Trăirea rășpânre:

Cunoscută încă de pe vremea egiptenilor, țelina este cultivată în prezent în întreaga lume, în special în zonele cu clima temperată.

Compuși chimici identificați: 0,01% ulei volatil (tabelul 5), acizi organici alifatici și aromatici, glucide, aminoacizi, baze purinice, bergapten, vitaminele A, C, B1, B2, B6, E, K și PP și minerale: fier, calciu, fosfor, potasiu.

Activitate farmacologică. Utilizare

Țelina prezintă proprietăți diuretice și eupeptice, precum și emenagoge și ocitocice. Se mai folosește pentru tratarea hipertensiunii arteriale, afecțiunilor reumatice, gutei și asteniilor sexuale. 3-butilftalida din țelină reduce tensiunea arterială prin relaxarea vaselor sanguine, relaxare care face apoi posibilă dilatarea acestora, permițând sângelui să circule cu mai multă ușurință.

Datorită conținutului bogat în vitamine, minerale și diferiți acizi, țelina consumată ca atare sau în salate, este un tonic eficient al sistemului nervos, un bun remineralizant și aperitiv. Este utilă în afecțiuni renale (colică renală, litiază renală), precum și cardiacilor cu edeme și albuminurie, prin efectul declorurant pe care îl are. Având proprietăți hipoglicemizante, este un bun adjuvant în tratarea diabetului zaharat. În bronșite are efect expectorant și emolient. Fiind diuretică și depurativă, este excelentă în curele de slăbire. Țelina sau sucul de țelină crește pofta de mâncare și stimulează digestia, combate gazele stomacale și intestinale, fiind un bun diuretic pentru bolnavii de ficat, inimă, rinichi și plămâni. Sucul de țelină ajută la eliminarea substanțelor toxice în caz de reumatism și gută, echilibrează funcțiile sexuale, bucurându-se de reputația unui foarte bun afrodisiac

II.1.12. SUBSTANȚE IDENTIFICATE ÎN ULEIURILE SPECIILOR STUDIAȚE

Datele de literatură referitoare la compuşii chimici identificați în speciile uleiurile speciilor studiate sunt sumarizate în tabelul 5.

Tabel 5. Lista substanțelor identificate în uleiurile de busuioc, cimbru, coada calului, coada șoricelului, leuștean, măghiran, mărar, oregano, pătrunjel, rozmarin și țelină [112-150]

busuioc	Bergamoten, Bicyclgermacren, Bisabolen, Borneol, Borneol acetat, β -Bourbonen, Cadinen, δ -Cadinen, ι -Cadinol, Camphen, Camphor, Carvacrol, Cariofilen, Cineol, Citral dimetil acetal, Citronelol, Copaen, α -Cuben, β -Cuben, α -Cubeben, β -Cubeben, β -Elemen, γ -Elemen, δ -Elemen, Estragol, Eugenol, α -Farnesen, β -Farnesen, Fencon, Germacren, α -Guaien, β -Guaien, δ -Guaien, Humulen, β -Linalool, metil-Cinamat, metil-Eugenol, β -Mircen, α -Muurolen, Neral dimetil acetal, Nerol, β -Ocimen, α -Pinen, Sabinen, α -Selinen, β -Selinen, γ -Selinen, δ -Selinen, Terpin-4-ol, α -Terpinen, β -Terpinen, δ -Terpinen, Terpene-4-ol, α -Terpineol, Terpinolen, Timol
cimbru	Acid cafeic, Acid labiatic, Apigenin, Cariofilen-oxid, Dolcimen, α -Felandren, D-Limonen, Linalil-acetat, Luteolin, Naringenin, Octan-1-en-3-ol, Terpinen-4-ol, Terpinil-acetat, Timo-dihidroquinona, Timol-metil-ether, Timonin, α -Tuien, α -Tuiona
coada calului	Acid ascorbic, Acid equisetetic, Acid equisetolic, Acid monosilicic, Acid nicotinic, Camferol, Campesterol, Equisetin, Fitol, Fitona, Fucosterol, Geranilacetona, Palustrin, Quercetina, Riboflavina, β -Sitosterol, Tiamina
coada șoricelului	Acid ascorbic, Acid formic, Acid salicilic, Acid valeric, Acid izovaleric, Achilin, 8alpha-angeloxy-Achillin, Apigenin, Apigenin-7-O-glucozida, Austricin, Azulena, Borneol, Borneol acetat, Camazulena, Camfen, Camfor, Caproaldehida, Cariofilen, Centaureidin, Cineol, Citral dimetil acetal, 3 β -hidroxi-11 α ,13-dihidro-Costunolida, Crizantenil-acetat, 2-Formilbutan, Germacren, Izoartemisia-cetona, Leucodin, 8-alpha-angeloxy-Leucodin, D-Limonen, Luteolin, Luteolin-7-O-glucozida, β -Mircen, Neral dimetil acetal, α -Pinen, β -Pinen, Sabinen, β -Sitosterol, Spatulanol, γ -Terpinen, α -Terpineol, Timol, Triciclina, α -Tuien
leuștean	Acid angelic, Acid ascorbic, Cumarina, metil-Eugenol, β -Felandren, Ligustilida, β -Ocimen, β -Pinen, Terpinil-acetat
măghiran	Borneol, Borneol acetat, α -Cadinol, Camfene, Camfor, Carvacrol, dihidro Carvona, Cariofilen, Epoxicariofilen, Cineol, Citral, Citronelol, p-Cimen-8-ol, Dolcimen, Bicycloelemene, Elemol, Epoxilinalool, α -Felandren, β -Felandren, Geranil acetat, Bicyclgermacrene, Humulen, D-Limonen, Linalool, Linalil acetat, Mircene, Ment-2-en-1-ol, Nerol, β -Ocimen, α -Pinen, β -Pinen, cis-Piperitol, Sabinen, Sabinen hidrat, Sabinen hidrat acetat, Spatulanol, Terpilin, γ -Terpinen, Terpeneol, Terpinen-4-ol, Terpinen-3-ol, cis-Tuianol, α -Tuien, Timol, d-Verbenol, Viridiflorol

mărar	3,6-dimethyl-2,3,3a,4,5,7a-hexahydrobenzofuran, Carvol, Carvona, dihidro-Carvona, Dilapiol, DHC, Elemicin, α -Felandren, β -Felandren, D-Limonen, 3,9-epoxi-1-p-Mentena, Miristicin, β -Ocimen, Terpinolen
oregano	Acid cafeic, Bisabolen, Borneol, Carvacrol, Cariofilen, Cineol, Dolcimen, Eugenol, D-Limonen, Linalool, Myrcen, β -Ocimen, α -Pinen, Sabinen, Terpilen, γ -Terpinen, 4-Terpeneol, Terpinil acetat, Timol
pătrunjel	Apiol, Elemen, β -Felandren, Limonen, 1,3,8-p-Menthatriena, β -Mircen, Miristicin, α -Pinen, β -Pinen, dimetil-Stiren
rozmarin	Acid carnosic, Acid rozmarinic, Borneol, Borneol acetat, Camfen, Camfor, Carnosol, Cariofilen, Crisantenona, Cineol, Dolcimene, α -Felandren, D-Limonen, Linalool, Mircen, Nerol, α -Pinen, β -Pinen, Sabinen, γ -Terpinen, Terpinolen, Terpinen-4-ol
țelina	Apiim, Apiumozida, Bergapten, 3-n-butilftalida, Cariofilen, dihidro-Carvona, Carvona, Celerozida, Eudesmol, 3-Hexenal, Hex-3-en-1-ol, Humulena, Izo-imperatorin, Izo-pimpinelin, Ligustilida, D-Limonen, β -Mircen, 2-Nonenal, β -Ocimen, β -Pinen, Sandal, Sedanolida, Sedanenolida, 5,6-dihidro derivat Sedanenolid, α -Selinen, β -Terpinen, (3E,5E)-undeca-1,3,5-triena, Xantotoxin

II.2. MODUL DE OBȚINERE AL EXTRACTELOR

Materialul vegetal din care s-au obținut extractele a fost: (1) - busuioc (*Ocimum basilicum*) - partea aeriană; (2) - cimbru (*Thymus vulgaris*) - partea aeriană; (3) - coada calului (*Equisetum arvense*) - frunze; (4) - coada șoricelului (Millefoli flos) - flori; (5) - leuștean (*Levisticum officinale*) - frunze; (6) - măghiran (*Maiorana hortensis*) - frunze; (7) mărar (*Anethum graveolens*) - partea aeriană; (8) - oregano (*Origanum vulgare*) - partea aeriană; (9) - pătrunjel (*Petroselinum crispum*) - frunze; (10) - rozmarin (*Rosmarinus officinalis*) - partea aeriană; și (11) - țelină (*Apium graveolens*) - frunze.

Materialul a fost achiziționat în anul 2004 în cursul lunilor iunie-iulie de pe piața locală. Din acesta s-au obținut hidrodistilate prin antrenare cu vapori de apă sau tincturi, după cum urmează.

a) Procedeu de obținere a hidrodistilatelor

S-a utilizat o instalație de laborator de antrenare cu vapori de apă (figura 5). După ce au fost spălate cu apă potabilă și apoi cu apă distilată, frunzele de busuioc, leuștean, mărar și respectiv țelină au fost folosite pentru a umple vasul secundar al instalației de antrenare cu vapori; cantitatea de plantă utilizată a fost determinată prin cântărire. În urma procesului de hidrodistilare s-au obținut emulsii de ulei în apă, câte 200 de mL, care au fost menținute la frigider. Înaintea efectuării analizelor, probele au fost agitate viguros, pentru obținerea unor emulsii stabile.

Schema unei instalații industriale de obținere a uleiurilor din plante prin antrenare cu vapori de apă este prezentată în anexa 1, figura 61.

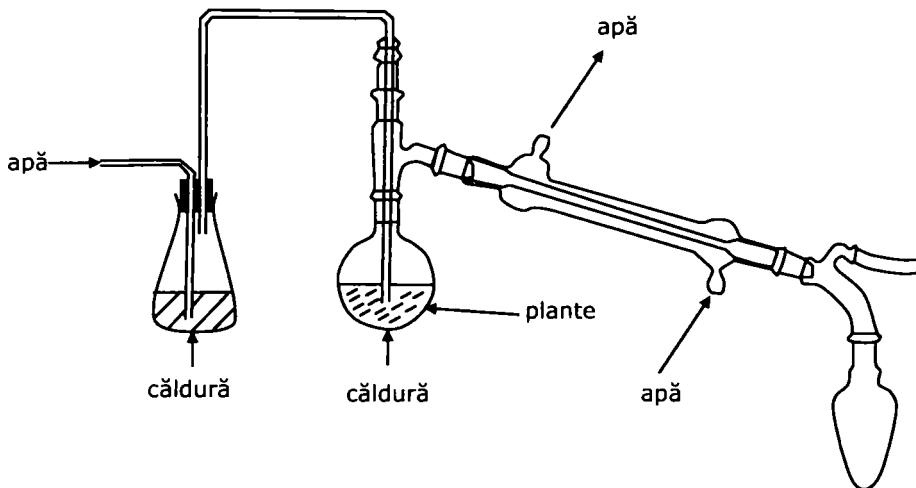


Figura 5. Schema instalației de antrenare cu vapori de apă utilizată pentru obținerea emulsiilor

b) Procedeu de obținere al tincturilor

Materialul vegetal, spălat cu apă potabilă și apoi cu apă distilată, a fost uscat la temperatura camerei și la lumină difuză și păstrat, timp de aproximativ 30 de zile, în pungi de hârtie la întuneric și temperatura camerei.

Pentru obținerea tincturilor s-a procedat conform schemei din figura 6:

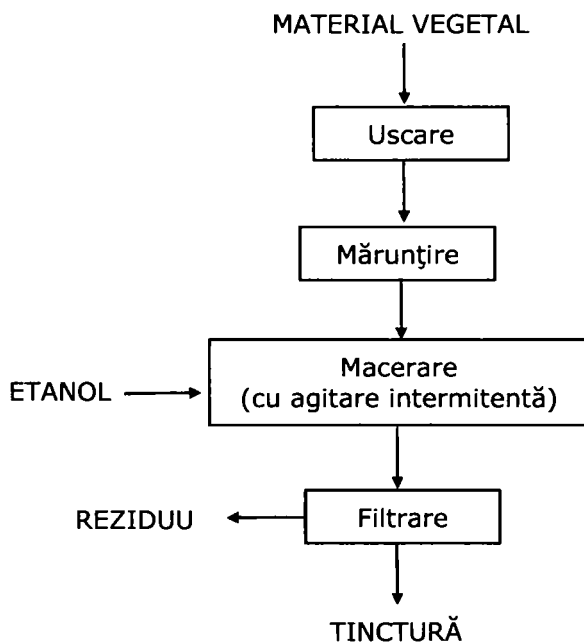


Figura 6. Schema tehnologică a procesului de obținere al tincturilor conform Farmacopeei

Porțiuni de câte 10 g plantă uscată au fost măcinate cu un blender, s-au adăugat 100 mL etanol și amestecul a fost lăsat la macerat timp de 10 zile sub agitare periodică, după metoda descrisă în Farmacopeea Română [151]. După trecerea celor 10 zile amestecul a fost filtrat și tinctura rezultată a fost păstrată la frigider până la efectuarea analizelor.

II.3. METODE ÎMBUNĂTĂȚITE DE ANALIZĂ A ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE

II.3.1. METODA PERMANGANOMETRICĂ

Descrierea metodei

Metoda se bazează pe oxidarea substanțelor organice cu caracter reducător, aflate în extractele obținute din plante, ca urmare a reacției cu permanganat de potasiu (KMnO_4) în mediu de acid sulfuric (H_2SO_4), reacție în urma căreia are loc decolorarea soluției de permanganat de potasiu. În unele lucrări din literatură [94, 152, 153] activitatea antioxidantă a extractelor era estimată calitativ, ca fiind invers proporțională cu timpul de decolorare a soluției de permanganat de potasiu de o anumită concentrație. Acest mod de evaluare prezintă dezavantajul că nu pot fi comparate rezultatele obținute de diverși cercetători.

Îmbunătățirea adusă metodei constă în aceea că decolorarea soluției de permanganat de potasiu a fost urmărită spectrofotometric, ceea ce a permis propunerea unei formule pentru estimarea cantitativă a activității antioxidante și clarificarea noțiunilor de potențial antioxidant, putere antioxidantă și capacitate antioxidantă [154-156]. Metoda a fost aplicată pe hidrodistilate și tincturi obținute din busuioc, leuștean, mărar și țelină conform II.2.a) și b).

Reactivi

Permanganat de potasiu, acid sulfuric, acid ascorbic p.a. ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) (Merck) și alcool etilic (Chimopar, București).

Aparatura

Pentru obținerea hidrodistilatelor s-a utilizat o instalație de antrenare cu vapori de apă (figura 5); pentru urmărirea reacției s-a utilizat spectrofotometrul SPEKOL 10 (Carl Zeiss, Jena), dotat cu cuve de cuarț de 30 de mL (grosimea cuvei: 1,5 cm) și cu agitator magnetic; acesta a fost cuplat cu o placă de achiziție (Axxi-chrom 727 computer interface, Axxion Chromatography, Inc. USA) și cu un calculator Pentium II.

Mod de lucru

În prima etapă s-a preparat amestecul oxidant constând din: 1,5 mL permanganat de potasiu, 0,01 M; 3,5 mL acid sulfuric 2M și (20-v) mL apă distilată, unde „v” este volumul de probă (mL) de analizat. Acesta a fost introdus în cuva de cuarț a spectrofotometrului (de 30 de mL) și s-a pornit agitarea. S-a adăugat proba și simultan s-a pornit înregistrarea semnalului spectrofotometric, la 530 nm (lungimea de undă λ_{max} caracteristică permanganatului de potasiu), până la obținerea unei valori constante; momentul adăugării probei s-a considerat momentul zero. Placa de achiziție adaptată spectrofotometrului a convertit semnalul spectrofotometric în mV și rezultatele au fost afișate sub forma unor perechi (timp; semnal) care au putut fi exportate în programul Microsoft Excel pentru calcule ulterioare. Adițional a fost utilizat pentru calcule și programul Microcal Origin 4.1.

Variația concentrației de permanganat de potasiu a fost determinată pe baza unei drepte de etalonare. Rezultatele au fost comparate cu cele obținute la adăugarea de acid ascorbic 0,001 M (3 mL).

Rezultate obținute

Dreapta de etalonare pentru permanganat de potasiu și ecuația corespunzătoare sunt prezentate în figura 7.

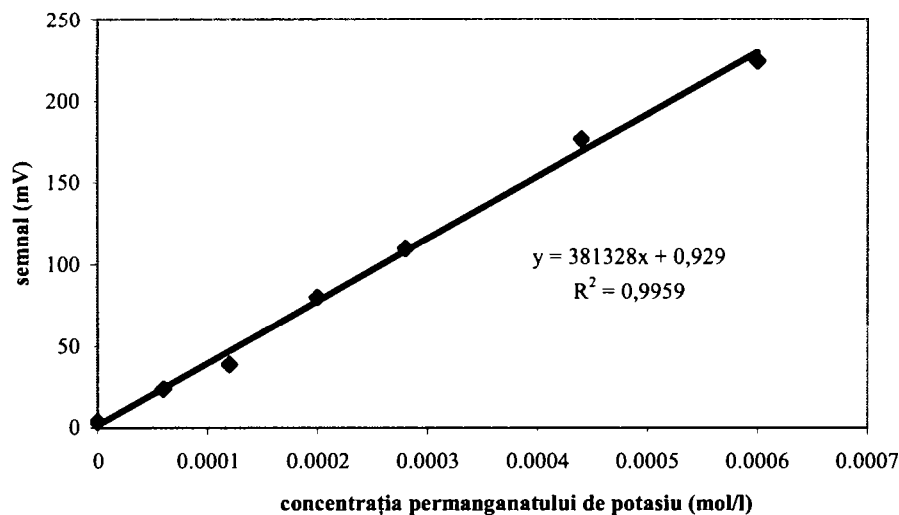


Figura 7. Dreapta de etalonare pentru permanganat de potasiu în amestecul oxidativ

În ecuația din figura 7, „y” reprezintă semnalul spectrofotometric (mV) iar „x” reprezintă concentrația de permanganat de potasiu (mol/L) în amestecul oxidativ. Pe baza acestei ecuații, concentrația de permanganat de potasiu (x) poate fi determinată din valoarea semnalului spectrofotometric (y) cu formula:

$$x = \frac{y - 0,929}{381328} \quad (\text{II.3-1})$$

Pasul următor a constat în reprezentarea variației în timp a concentrației de permanganat de potasiu, calculată cu ajutorul ecuației (II.3-1), la adăugarea a diferite volume din probele analizate. S-a constatat că forma curbelor diferă de la o probă la alta și depinde de cantitatea de hidrodistilat adăugată. În figura 8 se prezintă forma curbelor rezultate la adăugarea a 0,5 mL, 1 mL, 2 mL și respectiv 3 mL emulsie de țelină.

Pentru cantități mici de emulsie luată în lucru se remarcă, așa cum era de așteptat, descreșterea concentrației de permanganat de potasiu în timp. Pentru cantități mai mari de emulsie adăugată forma curbelor obținute este diferită (figura 8, curbele 3 și 4). Descreșterea rapidă a concentrației este urmată de o falsă creștere datorată probabil formării particulelor de dioxid de mangan (MnO_2) care ulterior precipită, ceea ce determină o nouă descreștere.

Se presupune că în prima etapă, corespunzătoare descreșterii rapide a concentrației de permanganat, sunt implicate substanțe cu activitate antioxidantă

ridicată, care sunt capabile să reducă Mn (VII) la Mn (II). În etapa următoare reacționează substanțele cu activitate antioxidantă mai scăzută, care reduc Mn (VII) numai până la Mn (IV) - MnO_2 . În prima fază a acestui proces, particulele coloidale de MnO_2 formate induc difuzia luminii și astfel o falsă absorbție. Ulterior o parte din particulele de MnO_2 încep să precipite și o altă parte sunt probabil dizolvate de acidul sulfuric din mediul de reacție, ceea ce duce la descreșterea absorbției.

Falsa absorbție indusă de formarea particulelor de MnO_2 este un fenomen nedorit. S-a observat că acest fenomen poate fi controlat dacă soluția de permanganat de potasiu este proaspăt preparată și viteza de agitare este ridicată.

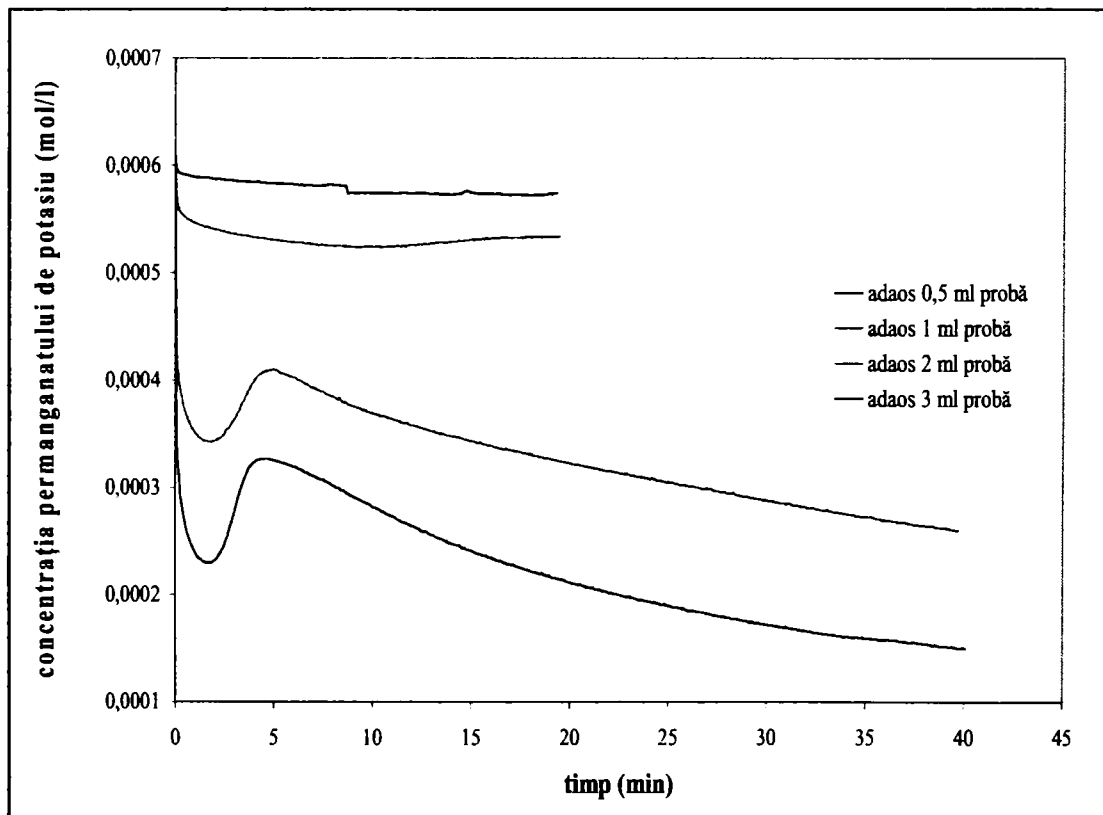


Figura 8. Variația în timp a concentrației permanganatului de potasiu la adăugarea a 0,5 mL, 1 mL, 2 mL și respectiv 3 mL emulsie de țelină

În literatura de specialitate se utilizează trei termeni pentru a descrie activitatea antioxidantă: *potențialul antioxidant* (referitor la potențialul de oxidoreducere care poate fi evaluat prin metode electrochimice), *puterea antioxidantă* (referitor la viteza de reacție a antioxidantului cu sistemul oxidativ) și *capacitatea antioxidantă* (referitor la cantitatea de oxidant „neutralizată” de către un anumit volum de probă, raportată la cantitatea de oxidant „neutralizată” de același volum dintr-o soluție de o anumită concentrație a unui antioxidant cunoscut, de exemplu vitamina C).

Metoda permanganometrică permite determinarea puterii și a capacității antioxidante.

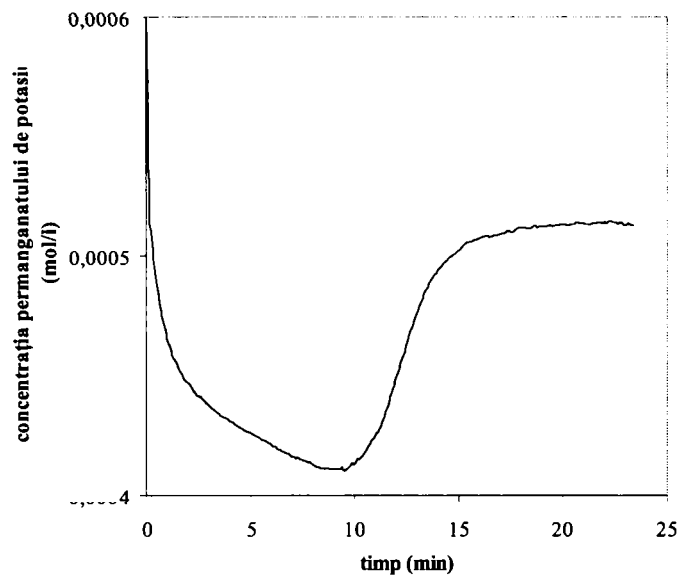


Figura 9. Variația concentrației de permanganat de potasiu după adăugarea a 3 mL emulsie de busuioc

În figurile 9 și 10 se exemplifică modul de determinare a puterii antioxidante, în cazul emulsiei de busuioc. S-a procedat în modul următor: în prima etapă s-a reprezentat grafic variația concentrației de permanganat de potasiu după adăugarea unui volum determinat (în acest caz 3 mL) de probă (figura 9).

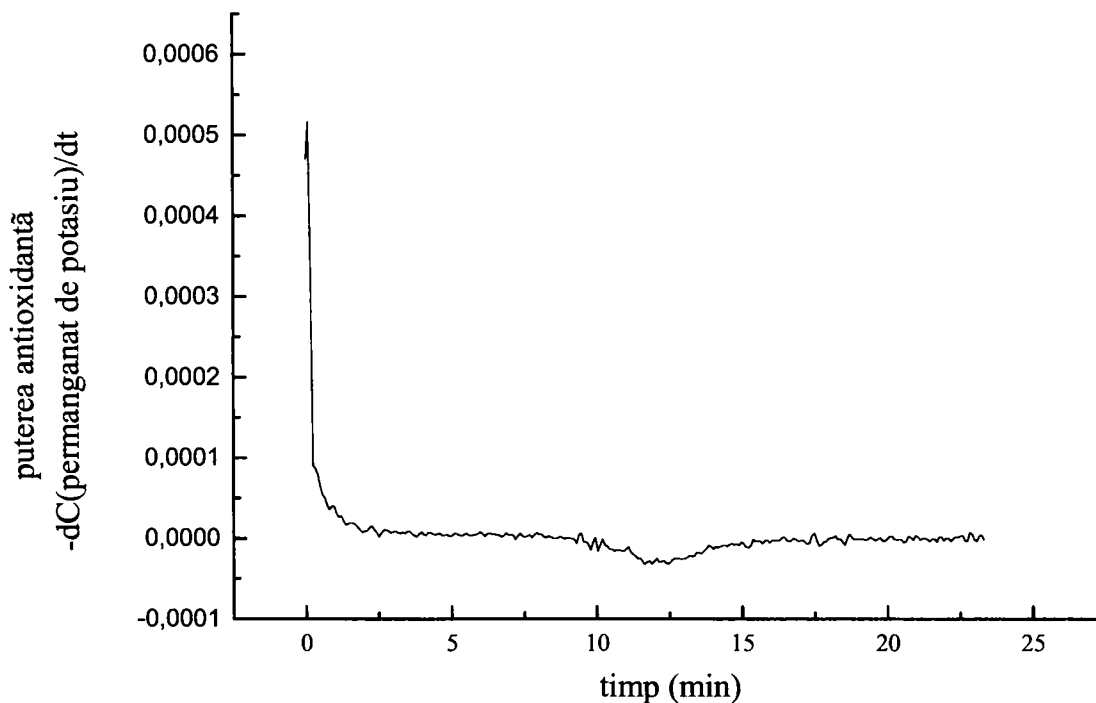


Figura 10. Variația puterii antioxidante în timp

În a doua etapă, curba obținută a fost derivată cu ajutorul programului Microcal Origin 4.1.; pasul următor a constat în reprezentarea evoluției puterii antioxidante, exprimată ca derivata cu semn schimbat a concentrației de permanganat de potasiu în funcție de timp (figura 10).

Se observă scăderea foarte accentuată a puterii antioxidante după primele 3-4 minute. Programul permite redarea rezultatelor fie sub formă grafică fie sub formă tabelară. În tabelul 6 este redată variația puterii antioxidante, pentru cele 4 emulsii studiate, în primele 4 minute.

Tabel 6. Puterea antioxidantă a emulsiilor de busuioc, leuștean, mărar și țelină

Timp (min)	Puterea antioxidantă (mol/L·min)			
	emulsia de busuioc	emulsia de leuștean	emulsia de mărar	emulsia de țelină
0	$4,70 \cdot 10^{-4}$	$5,96 \cdot 10^{-4}$	$5,65 \cdot 10^{-5}$	0,00167
1	$3,95 \cdot 10^{-5}$	$8,69 \cdot 10^{-6}$	$2,57 \cdot 10^{-5}$	$1,46 \cdot 10^{-4}$
2	$8,99 \cdot 10^{-6}$	$8,26 \cdot 10^{-6}$	$7,39 \cdot 10^{-6}$	$3,28 \cdot 10^{-5}$
3	$9,08 \cdot 10^{-6}$	$6,52 \cdot 10^{-6}$	$1,39 \cdot 10^{-6}$	$1,80 \cdot 10^{-5}$
4	$4,58 \cdot 10^{-6}$	$3,93 \cdot 10^{-6}$	$6,30 \cdot 10^{-7}$	$8,39 \cdot 10^{-6}$

Se obișnuiește exprimarea capacității antioxidante ca și cantitatea dintr-un anumit antioxidant cunoscut (acid ascorbic, trolox, etc.), care are același efect antioxidant cu 1g (sau 1 mol, sau 1 mL, etc.) din proba analizată [4]. Întrucât până în prezent nu s-au făcut determinări cantitative ale capacității antioxidante folosind metoda permanganometrică, a fost necesară introducerea unei formule pentru calculul acesteia și anume [154]:

$$CA = \frac{n_{\text{probă}}}{n_{\text{standard}}} \cdot \frac{C_{\text{standard}}}{m_{\text{plantă}}} \cdot \frac{V_{\text{emulsie}}}{100} \quad (\text{II.3-2})$$

unde: CA – capacitatea antioxidantă (mmol/g);

$n_{\text{probă}}$, n_{standard} – numărul de moli de oxidant reduși după adăugarea unor volume egale de probă și respectiv standard;

C_{standard} - concentrația standardului (mmol/mL)

$m_{\text{plantă}}$ - masa (g) de plantă proaspătă supusă hidrodistilării;

V_{emulsie} - volumul (mL) de emulsie obținută.

În tabelul 7 sunt redate valorile capacităților antioxidante pentru emulsiile studiate, calculate cu ajutorul formulei (II.3-2). S-a lucrat cu câte 3 mL de probă, concentrația acidului ascorbic a fost 0,001 mmol/mL, iar volumul de emulsie obținută a fost de 200 mL. Determinările au fost făcute imediat după obținerea emulsiilor și apoi la o lună diferență.

Dintre emulsiile studiate se remarcă emulsia de țelină, care are cele mai ridicate valori atât pentru puterea cât și pentru capacitatea antioxidantă. Se observă de asemenea, în toate cazurile, descreșterea în timp a capacității antioxidante, datorită cel mai probabil prezenței oxigenului în recipientele de păstrare a probelor.

Tabel 7. Capacitatea antioxidantă (CA) a emulsiilor de busuioc, leuștean, mărar și țelină

Planta	CA (mmol/g)	CA (mmol/g) după o lună
busuioc	$1,33 \times 10^{-5}$	$8,5 \times 10^{-6}$
leuștean	$1,1 \times 10^{-5}$	$8,1 \times 10^{-6}$
mărar	$1,63 \times 10^{-5}$	$1,48 \times 10^{-5}$
țelină	$5,8 \times 10^{-5}$	$2,53 \times 10^{-5}$

Metoda permanganometrică are aplicabilitate în special în cazul extractelor apoase și mai puțin în cazul tincturilor, când permanganatul de potasiu în mediu acid reacționează și cu solventul (alcool etilic). Totuși, anumite aprecieri calitative se pot face, după cum se observă din figura 11. Astfel comparând curba 1 corespunzătoare unui adaos de 0,2 mL tinctură de țelină, cu curba 2 corespunzătoare unui adaos de 0,2 mL tinctură de busuioc, se observă o scădere mai accentuată și mai bruscă a concentrației de permanganat de potasiu (deci o capacitate și o putere antioxidantă mai mare) în cazul tincturii de țelină, în condițiile în care cantitatea de etanol a fost aceeași (întrucât tincturile au avut aceeași concentrație). Influența alcoolului etilic asupra procesului se remarcă din compararea figurii 11 (curba 1) cu figura 8 (curba 4); astfel numai 0,2 mL de tinctură de țelină adăugați provoacă o descreștere mai accentuată a concentrației de permanganat de potasiu decât 3 mL de hidrodistilat de țelină.

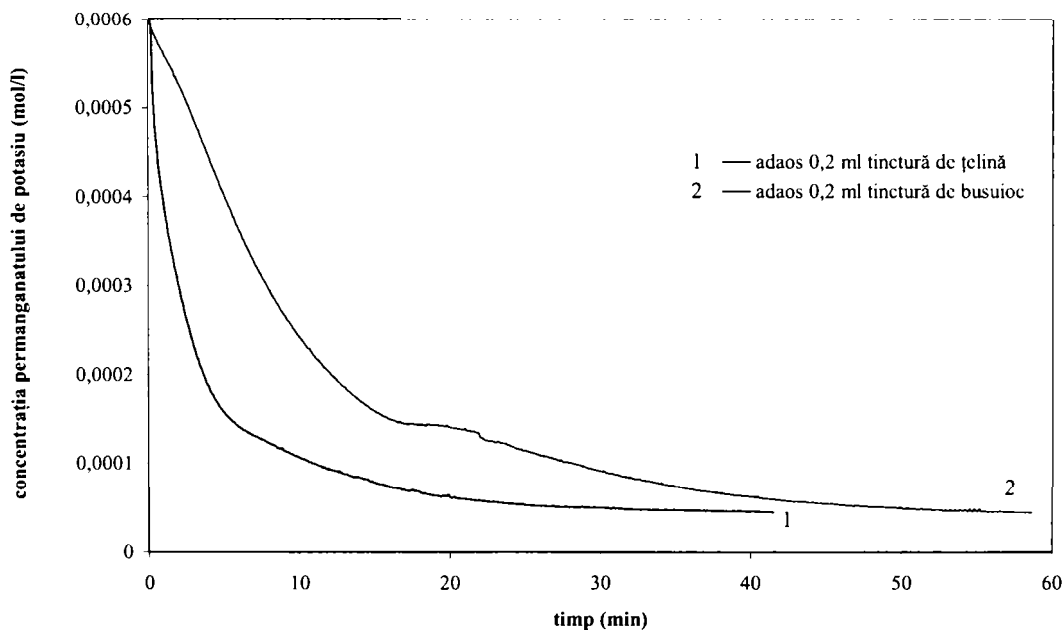


Figura 11. Variația concentrației de permanganat de potasiu în timp după adăugarea unor volume egale (0,2 mL) de tinctură de țelină și respectiv de busuioc

Rezultatele obținute au constituit obiectul unei lucrări științifice [154].

Avantaje și dezavantaje ale metodei

Metoda permanganometrică propusă este o metodă simplă, puțin costisitoare, care nu necesită o aparatură complicată și permite evaluarea cantitativă atât a puterii cât și a capacității antioxidante.

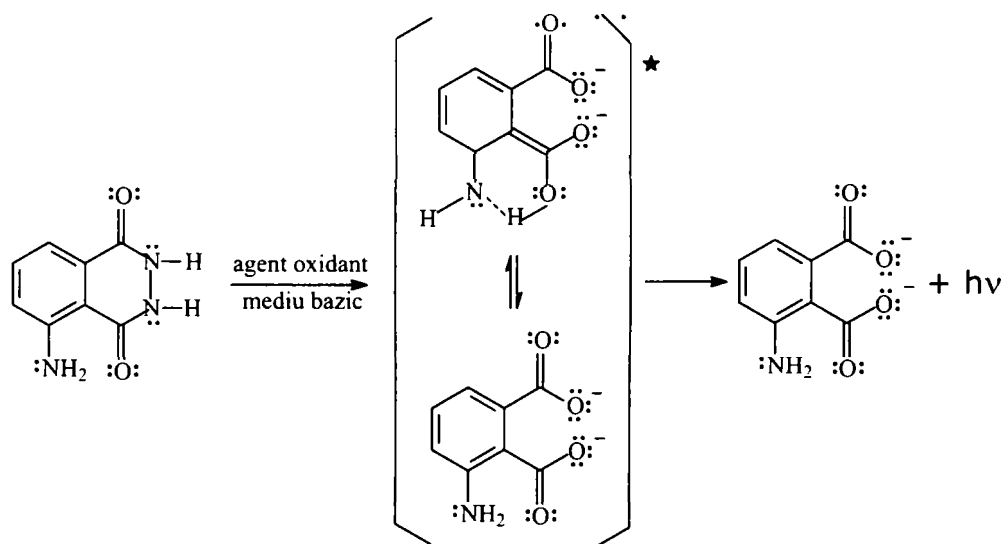
Dezavantajul major al acestei metode constă în aceea că, spre deosebire de hidrodistilate, tincturile nu pot fi analizate cantitativ.

O altă problemă este aceea că hidrodistilatele se obțin în mod uzual din plante proaspete, a căror masă poate varia în funcție de conținutul de apă, afectând rezultatele calcului capacității antioxidante. De altfel, hidrodistilatele și uleiurile esențiale care se pot obține după spargerea emulsiei prezintă în sine o serie de dezavantaje [3] atunci când sunt utilizate, printre care: nu conțin toate componentele aromatizante ale materialului de start, întrucât o parte rămân în reziduu de extracție, motiv pentru care pot fi și mai ușor oxidate – și deci au o perioadă de valabilitate mai redusă; în cazul uleiurilor volatile concentrate, care se folosesc în cantități mici, se pune problema dispersabilității în masa produsului alimentar în care se intenționează a se utiliza; datorită volatilității lor, uleiurile esențiale pot fi ușor pierdute în cazul aplicării unor tratamente termice severe cum ar fi sterilizarea.

O parte din aceste dezavantaje pot fi eliminate prin utilizarea tincturilor obținute din plante aromatice.

II.3.2. METODA CHEMILUMINOMETRICĂ UTILIZÂND LUMINOL*Descrierea metodei*

Chemiluminescența 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 [157]:



Reacția este catalizată de anumiți ioni metalici cum ar fi Cu(II) [158]. Adăosul unei substanțe cu efect antioxidant are ca efect reducerea intensității semnalului luminos; cu cât efectul antioxidant este mai puternic, cu atât semnalul luminos este mai scăzut.

A. APLICAȚIE PE STUDIUL HIDRODISTILATELOR DE BUSUIOC, LEUȘTEAN, MĂRAR ȘI JELINĂ

Reactivi

Luminol (5-amino-2,3-dihidronaftalazin-1,4-diona) (Merck) și peroxid de hidrogen (H_2O_2 30% w/v), sulfat de Cu (II) (CuSO_4), hidroxid de sodiu (NaOH), carbonat de sodiu (Na_2CO_3) și hidrogenocarbonat de sodiu (NaHCO_3) (Chimopar, București). Toate soluțiile au fost preparate din reactivii de puritate analitică prin dizolvare în apă distilată, după cum urmează: soluția de luminol $2 \cdot 10^{-3}$ mol/L (0,04 g luminol în 100 mL tampon $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$: 0,53g/2,52g); soluția de sulfat de cupru (II) $4,79 \cdot 10^{-3}$ mol/L; soluția de peroxid de hidrogen $8,82 \cdot 10^{-3}$ mol/L (proaspăt preparată) și soluția de hidroxid de sodiu 10^{-2} mol/L.

Aparatura

Aparatura utilizată a fost descrisă în paragraful II.3.1., iar modul de preparare al hidrodistilatelor a fost descris în paragraful II.2.a).

Mod de lucru

Un amestec constând din 5 mL soluție de hidroxid de sodiu, 1 mL soluție de sulfat de Cu(II) și 3 mL soluție de luminol a fost introdus în cuva de cuarț de 30 mL și supus agitării (amestec A). Separat, 5 mL soluție de peroxid de hidrogen au fost diluați la 15 mL fie cu 10 mL de apă, fie cu 7 mL de apă și 3 mL hidrodistilat (amestec B). După exact 1 minut, amestecul B a fost injectat cu ajutorul unei seringi peste amestecul A și semnalul luminos emis a fost înregistrat la 420 nm cu lampa spectrofotometrului stinsă, timp de 20 de minute. Fiecare experiment a fost repetat de cinci ori.

Placa de achiziție adaptată spectrofotometrului a convertit semnalul spectrofotometric în mV și rezultatele au fost afișate sub forma unor perechi (timp; semnal) care au putut fi exportate în programul Microsoft Excel pentru calcule ulterioare. Adicional a fost utilizat pentru calcule și programul Microcal Origin 4.1.

La câteva secunde după combinarea celor două amestecuri s-a observat emisia unui semnal luminos corespunzând unui semnal de aproximativ 50 mV, datorat probabil speciilor oxigen reactive (ROS) deja prezente în soluția de peroxid de hidrogen care reacționează cu luminolul. Acest prim semnal luminos descrește foarte rapid până la un minimum. Momentul corespunzător minimumului a fost considerat momentul zero al experimentului. După acest minim, lumina emisă începe să crească încet în intensitate, corelat probabil cu formarea de noi ROS, până la un nou maxim (dar nu mai mare de 10 mV) și apoi să descrească încet. Spre deosebire de primul semnal, cel de-al doilea este reproductibil (coeficienții de variație calculați au fost de 1% sau chiar mai puțin), după cum se poate observa în figura 12.

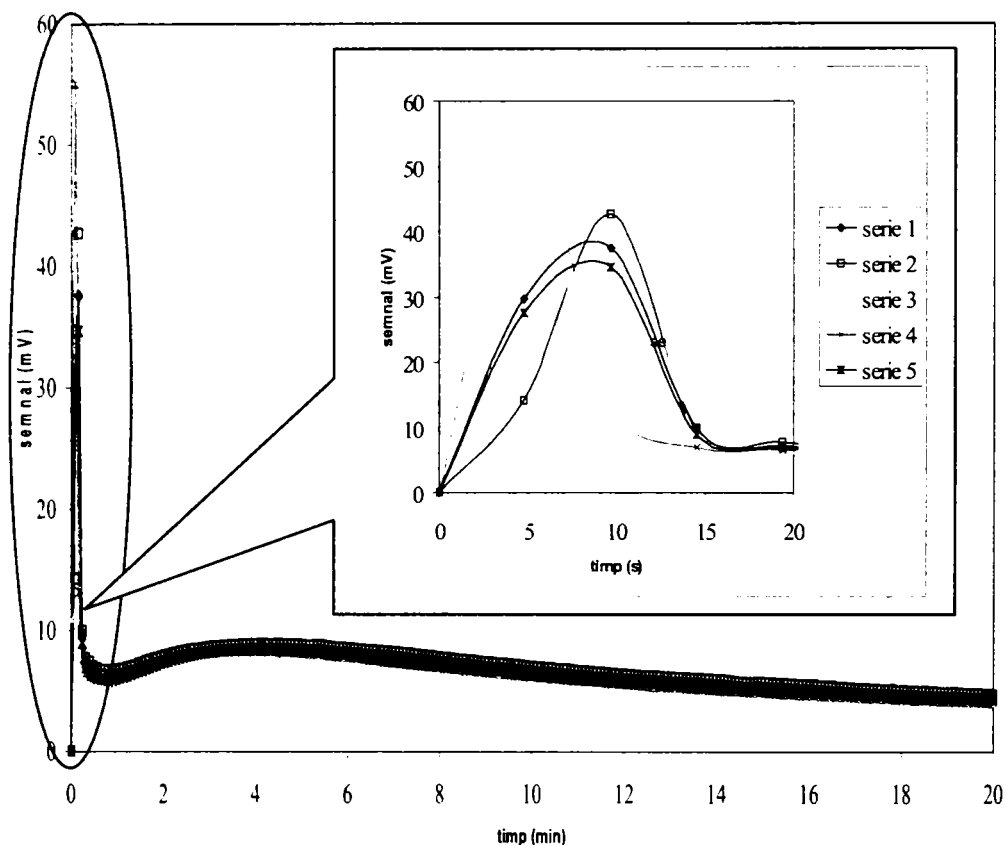


Figura 12. Variația în timp a semnalului spectrofotometric pentru reacția luminolului cu peroxidul de hidrogen (experimentele au fost repetate de 5 ori)

Rezultate obținute

S-a reușit îmbunătățirea performanțelor metodei descrisă de Novas și colab. [158] și anume creșterea intensității luminii emise, ceea ce a permis urmărirea spectrofotometrică a reacției, prin simpla mărire a bazicității mediului prin adaos de hidroxid de sodiu (NaOH).

Atunci când se folosește un luminometru pentru determinările de chemiluminescență, practica uzuală constă în analiza semnalului luminos emis, la o anumită perioadă de timp de la inițierea reacției. Novas și colab. [158] au comparat activitățile antioxidante pe baza intensității semnalelor luminoase la 6 secunde după amestecare. Dar acel moment de referință ales este posibil să nu corespundă maximului intensității semnalului. Procedul propus de noi, care utilizează un spectrofotometru, permite urmărirea procesului de la început până la sfârșit. Acest procedeu duce la determinări mai precise deoarece este posibil nu numai să se determine cu exactitate maximul intensității semnalului (figura 13) ci și să se evalueze și alți parametri, cum ar fi aria semnalului, pentru a fi utilizați în calcule ulterioare.

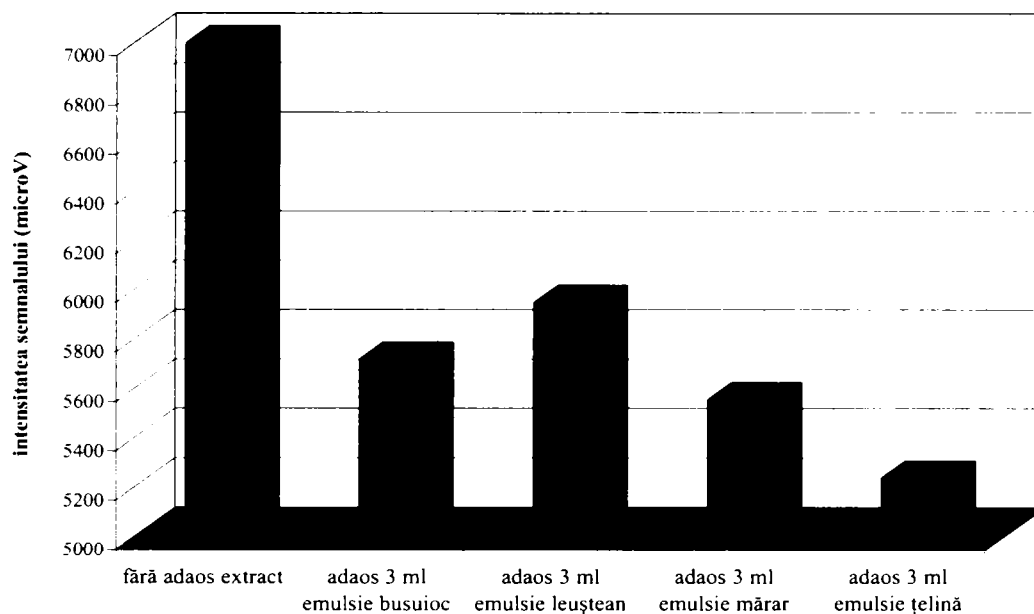


Figura 13. Descreșterea maximului intensității semnalelor după adăugarea emulsiilor studiate la apa oxigenată

O alt mod de estimare a activității antioxidante [159] implică crearea mediei curbelor ce reprezintă variația în timp a semnalului spectrofotometric corespunzător fiecărui extract și compararea ariei acestora pentru primele 10 minute (figura 14).

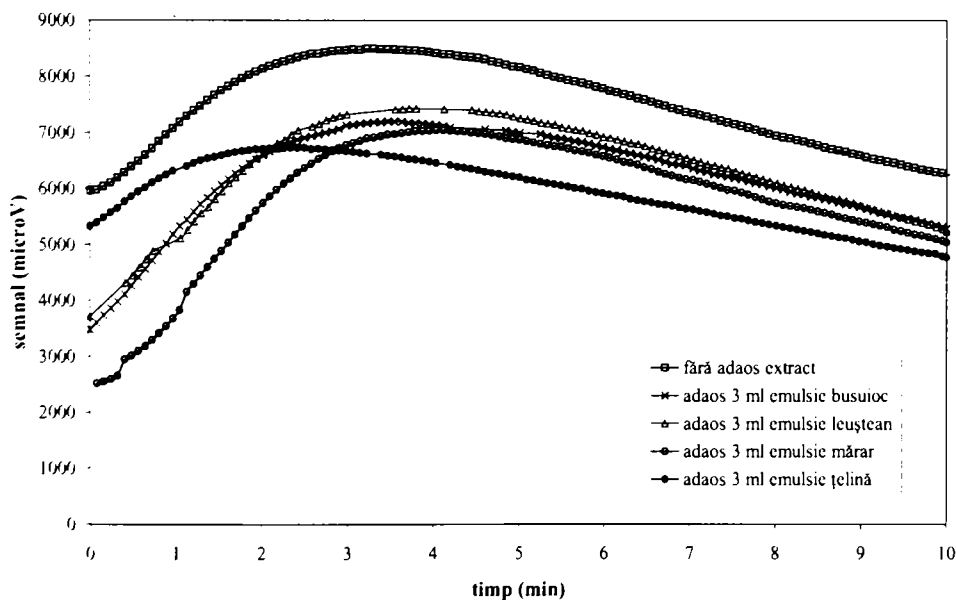


Figura 14. Media curbelor reprezentând variația în timp a semnalului spectrofotometric corespunzător reacției luminolului cu apa oxigenată în absența / prezența emulsiilor studiate

În ambele moduri s-a observat aceeași tendință, iar rezultatele au fost calitativ similare cu cele determinate anterior prin metoda permanganometrică

(paragraful II.3.1). Hidrodistilatul de țelină s-a dovedit a fi cel mai eficient și prin metoda chemiluminometrică.

Prin utilizarea celui de-al doilea mod de calcul a fost posibil să se evalueze atât **puterea** cât și **capacitatea antioxidantă** (figurile 15 și 16) a extractelor studiate.

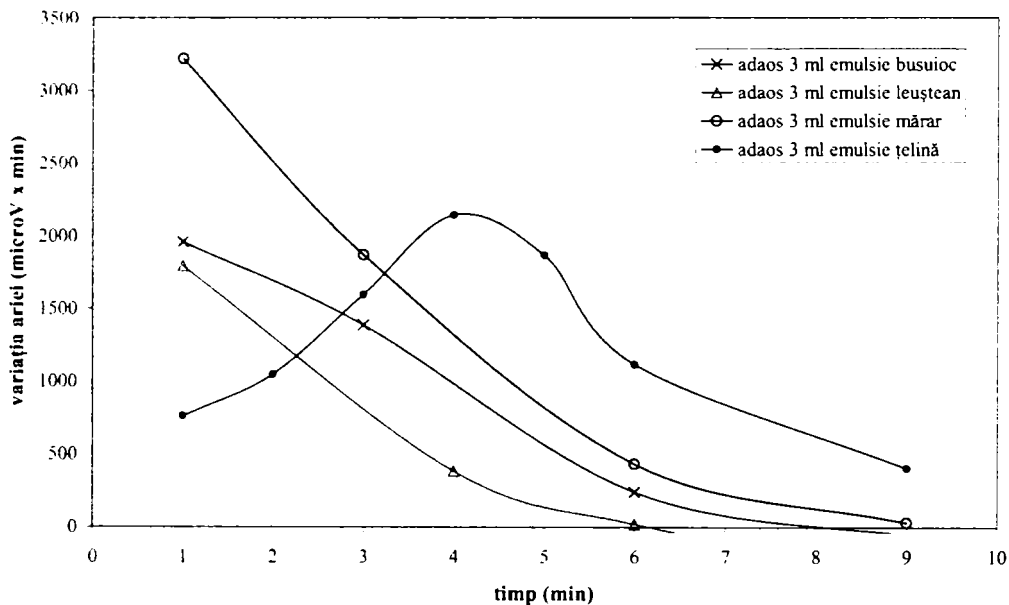


Figura 15. Profilul puterii antioxidante pentru emulsiile studiate

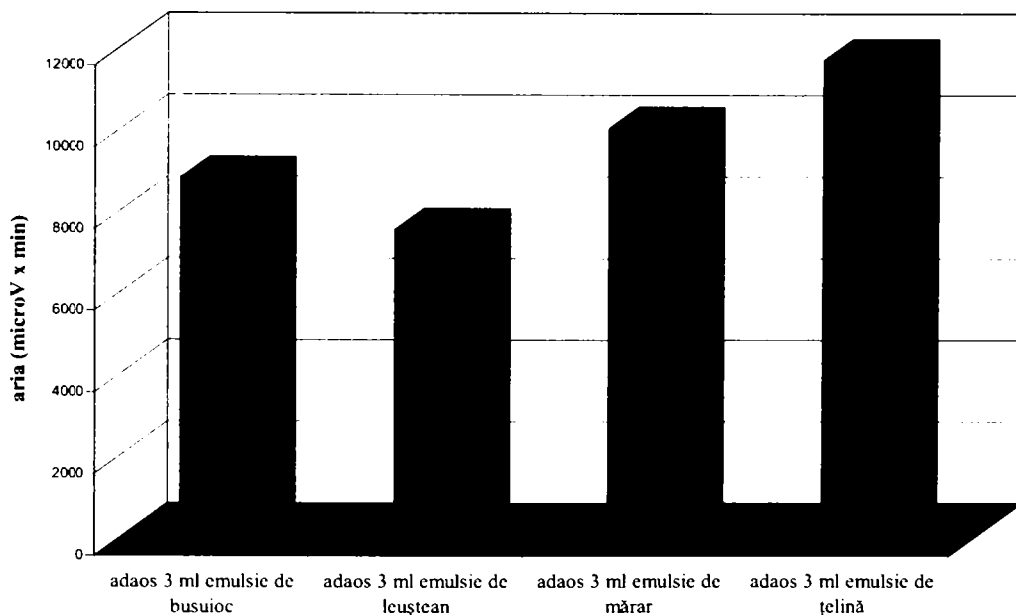


Figura 16. Profilul capacității antioxidante pentru emulsiile studiate

Puterea antioxidantă, corelată cu viteza reacției de inhibiție, se consideră a fi direct proporțională cu variația în timp a ariei dintre cele două semnale corespunzătoare reacției dintre luminol și apă oxigenată, cu și fără extract adăugat (figura 15).

Pe baza măsurătorilor pentru primele 10 minute, **capacitatea antioxidantă** a fost considerată ca fiind proporțională cu aria dintre cele două semnale mai sus menționate: cu și fără extract adăugat (figura 16).

Dacă în cazul metodelor propuse anterior [158-159], exista o proporționalitate inversă între mărimile utilizate pentru estimarea activității antioxidante și valoarea acesteia (de exemplu, în figura 14, cu cât este mai mică intensitatea semnalului luminos cu atât este mai mare activitatea antioxidantă), estimarea activității antioxidante pe baza metodei îmbunătățite este mai intuitivă, relația de proporționalitate fiind directă (figura 16).

Rezultatele obținute au constituit obiectul unei publicații științifice [160].

B. STUDIUL TINCTURILOR UNOR PLANTE CONDIMENTARE PRIN METODA CHEMILUMINOMETRICĂ

Reactivii utilizați și aparatura au fost descrise în paragraful II.3.2.-A Modul de preparare al tincturilor celor 11 plante analizate a fost descris în paragraful II.2.b.

Determinarea activității antioxidante prin metoda chemiluminometrică

Amestecul A a fost preparat în modul descris în paragraful II.3.2.-A. Separat, 5 mL soluție de peroxid de hidrogen au fost diluați la 15 mL cu 10 mL de apă și s-au adăugat 0,1 mL din tinctura supusă analizei (amestec B). După exact 1 minut, amestecul B a fost injectat cu ajutorul unei seringi peste amestecul A și semnalul luminos rezultat a fost înregistrat la 420 nm cu lampa spectrofotometrului stinsă, timp de 20 de minute. Fiecare experiment a fost repetat de cinci ori.

Rezultate obținute

Forma curbelor obținute pentru cele 11 tincturi analizate este redată în figura 17.

Modul de calcul a fost descris în paragraful II.3.2.-A.

Variația puterii antioxidante în timp și profilul capacității antioxidante pentru tincturile studiate sunt redată în tabelul 8 și respectiv figura 18.

Atunci când sunt descrise proprietățile antioxidante ale extractelor din plante este bine să se ia în considerare atât puterea cât și capacitatea lor antioxidantă. Cu cât este mai mare puterea antioxidantă, cu atât extractul acționează mai rapid și cu cât este mai mare capacitatea antioxidantă, cu atât extractul reduce o cantitate mai mare de agent oxidant.

Dintre tincturile studiate, cele de coada șoricelului, rozmarin, măghiran, cimbru și leuștean au avut cele mai ridicate valori ale capacității antioxidante (figura 18). Puterea lor antioxidantă a fost de asemenea ridicată la începutul reacției dar a

scăzut rapid în timp (tabelul 8). Extractele celorlalte plante studiate, mai puțin eficiente (oregano, busuioc, mărar, țelină, coada calului și pătrunjel), au prezentat profiluri diferite pentru puterea antioxidantă, cu valori mici la început care au crescut în prima parte a procesului după care au scăzut din nou (figura 18 și tabelul 8). Același tip de profil a fost observat și în cazul hidrodistilatului de țelină (figura 15).

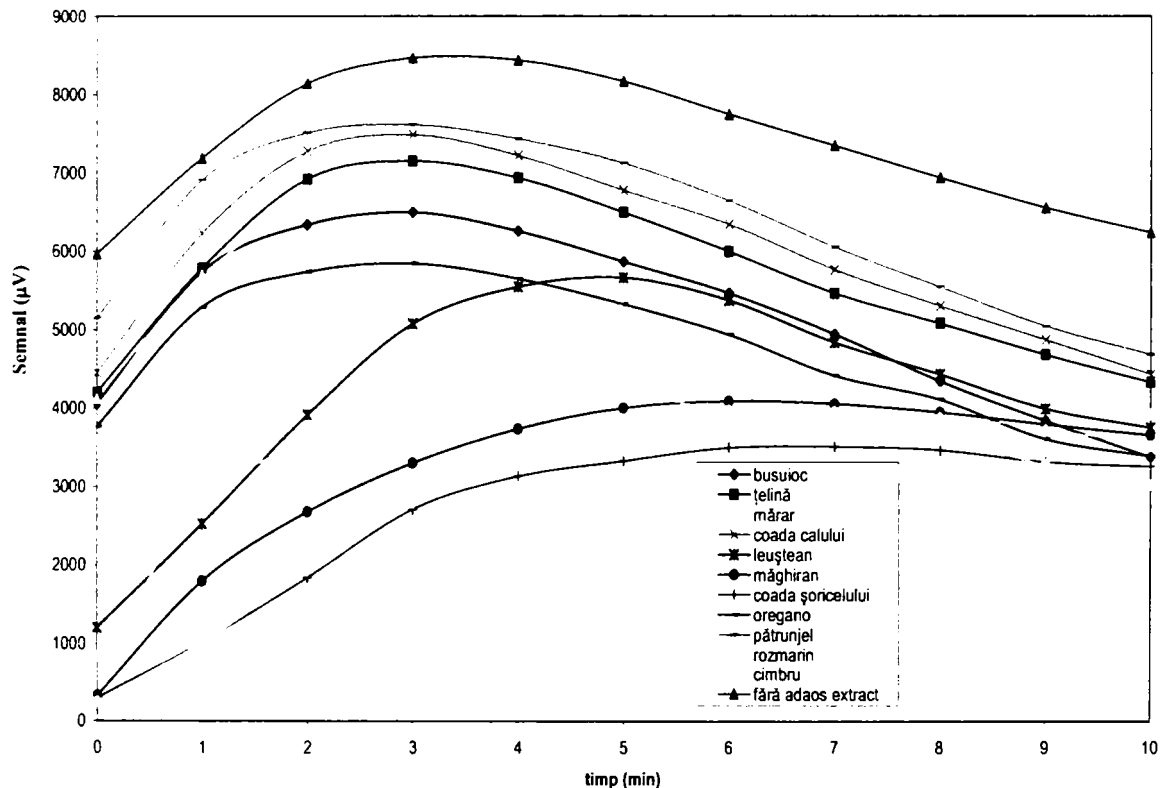


Figura 17. Media curbelor reprezentând variația în timp a semnalului spectrofotometric corespunzător reacției luminolului cu apa oxigenată în absența / prezența tincturilor studiate

O bună recomandare pentru practica alimentară și/sau medicinală rezultată ca urmare a acestui studiu este aceea de a combina plante cu ambele tipuri de profiluri pentru a asigura un efect antioxidant relativ constant și de durată.

Rezultatele obținute au constituit obiectul unei lucrări științifice [161].

Avantaje și dezavantaje

Metoda propusă este o metodă simplă, puțin costisitoare (în special datorită faptului că solventul utilizat este apa distilată) și care nu necesită o aparatură complicată.

Principalul dezavantaj al metodei constă în dificultatea raportării rezultatelor la un standard, întrucât majoritatea antioxidantilor recunoscuți sunt liposolubili.

Tabel 8. Puterea antioxidantă redată în forma variației în timp a ariei dintre semnalul coresponzător reacției dintre luminol și apa oxigenată în absența / prezența tincturilor studiate

Timp (min)	Puterea antiradicalică ($\mu V \times min$)										
	busuioc	țelină	mărar	coada calului	leustean	măghiran	coada șoricelului	oregano	pătrușel	rozmarin	cimbru
1	1456,5±0,1	1364,9±0,2	1445,0±0,3	1015,0±1,0	4492,7±0,1	5294,4±0,3	5695,5±0,4	1825,0±0,4	325,5±0,2	5715,5±1,1	4572,6±0,2
2	1644,9±0,3	1344,5±0,2	1570,0±0,4	932,2±1,2	4465,9±0,1	5449,2±0,5	6255,5±0,9	2169,8±0,4	474,9±0,2	6217,7±0,9	4512,5±0,2
3	1975,0±0,4	1357,6±0,6	1720,0±0,6	1014,1±1,3	3839,2±0,2	5406,4±0,6	6120,1±1,1	2601,4±0,4	832,5±0,2	6040,3±0,6	4603,2±0,3
4	2345,0±0,4	1678,0±0,9	2045,6±0,6	1371,9±1,3	3411,5±0,2	5206,4±0,7	5803,2±1,1	2975,4±0,3	1200,1±0,2	5629,1±0,3	4651,5±0,3
5	2615,0±0,4	1960,0±0,8	2292,9±0,7	1680,0±1,3	3071,9±0,3	4808,9±0,7	5448,7±1,1	3190,4±0,3	1398,8±0,3	5040,5±0,3	4507,7±0,4
6	2600,0±0,4	2020,0±0,7	2288,3±0,7	1705,0±1,1	2746,9±0,3	4222,5±0,7	4855,3±1,1	3135,7±0,3	1381,7±0,3	4336,3±0,2	4198,2±0,4
7	2415,0±0,3	1890,0±0,6	2148,0±0,6	1565,0±1,1	2515,0±0,3	3549,8±0,7	4188,3±1,8	2944,4±0,2	1272,0±0,4	3636,3±0,3	3767,7±0,4
8	2250,0±0,2	1620,0±0,6	1887,6±0,6	1360,0±0,9	2260,0±0,3	2892,4±0,6	3407,5±1,8	2631,9±0,3	1094,0±0,4	2955,0±0,3	3230,5±0,4
9	2050,0±0,2	1255,0±0,5	1554,4±0,5	1050,0±0,8	1925,0±0,3	2265,8±0,5	2748,4±1,7	2279,5±0,2	840,9±0,4	2317,3±0,5	2699,8±0,4
10	1803,5±0,2	905,0±0,4	1264,0±0,5	760,0±0,8	1450,0±0,3	1685,9±0,5	2127,1±1,6	1915,4±0,2	547,4±0,4	1784,2±0,4	2261,3±0,4

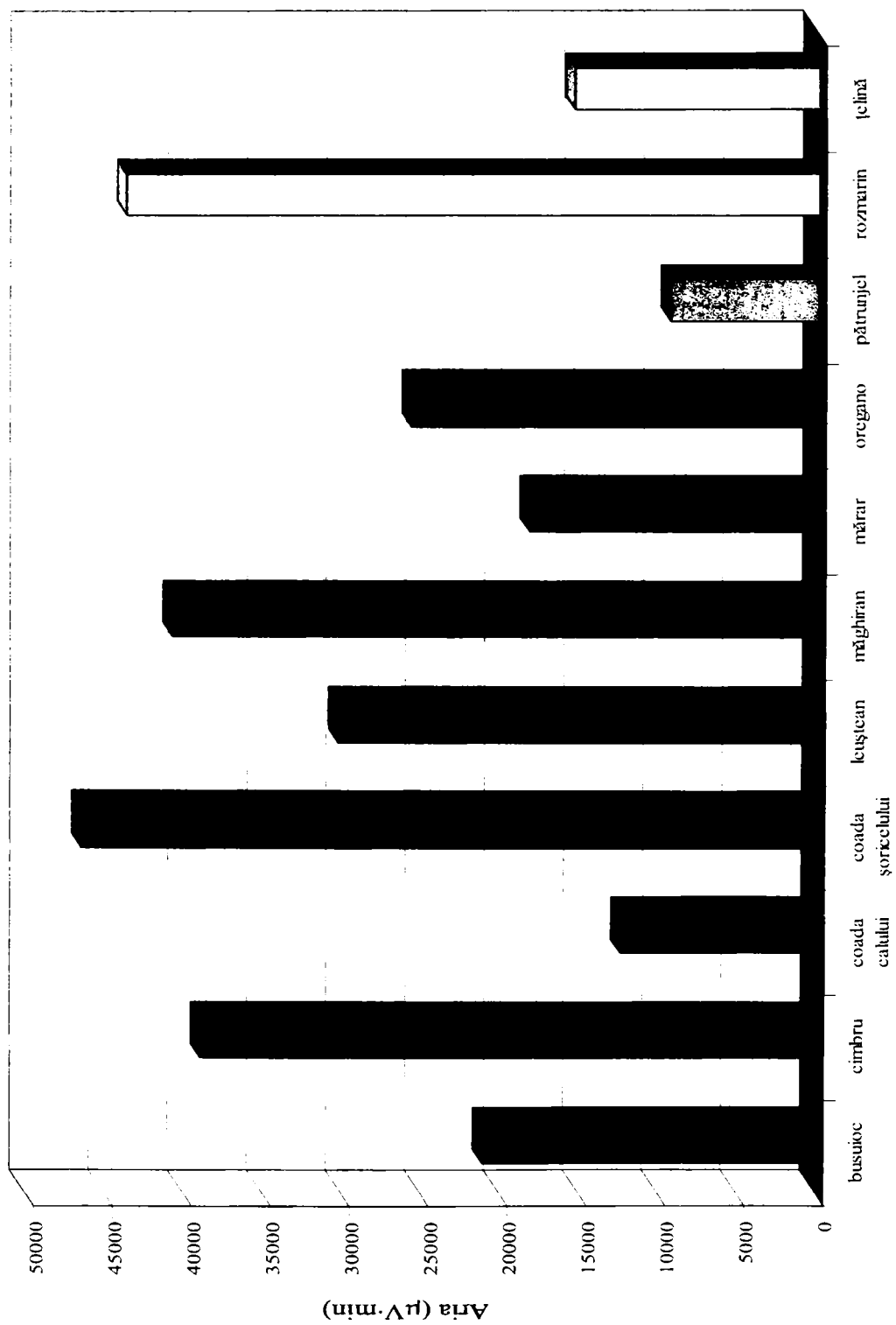
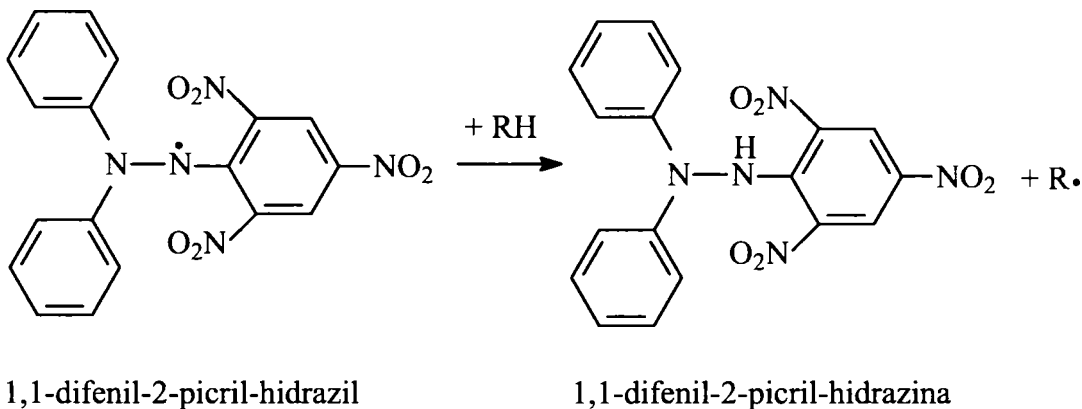


Figura 18. Profilul capacității antioxidante pentru tincturile studiate

II.3.3. METODA SPECTROFOTOMETRICĂ CU DPPH PENTRU DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE

Descrierea metodei

Molecula de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) este un radical liber stabil din cauza delocalizării electronului liber asupra întregii molecule. Delocalizarea este responsabilă de culoarea violet a substanței cu λ_{\max} în jurul a 520 nm. Când o soluție de DPPH este amestecată cu cea a unei substanțe donoare de atomi de hidrogen se obține forma stabilă, non-radicalică, a DPPH-ului (1,1-difenil-2-picril-hidrazina), cu schimbarea simultană a culorii de la violet intens la galben palid datorat grupării picril încă prezente [91]:



Radicalul obținut va suferi reacții ulterioare care controlează stoechiometria generală (numărul de molecule de DPPH „neutralizate” de o moleculă de donator. De exemplu cisteina duce la o stoechiometrie 1:1, acidul ascorbic și α -tocoferolul la 2:1. De fapt, din cauza complexității reacțiilor secundare, stoechiometria totală nu este în mod necesar un număr natural cum ar fi 1 sau 2. În plus, prima etapă ar putea fi reversibilă [91].

În metoda originală [162] perioada de reacție recomandată a fost de 30 de minute și aceasta a fost în cele mai multe cazuri urmată. Cercetări recente [91] recomandă, din cauza complexității proceselor care au loc, urmărirea spectrofotometrică a reacției până la terminare. În unele cazuri rezultatele sunt prezentate sub forma concentrației reziduale de DPPH obținută pe baza unei drepte de etalonare. Aceasta este o complicație inutilă ținând cont de faptul că DPPH-ul respectă legea Lambert-Beer în domeniul de lucru [91].

Acesta este motivul pentru care am propus și demonstrat o metodă îmbunătățită de calcul a concentrației reziduale de radical DPPH care să țină cont nu numai de absorbanta acestuia ci și de cea a formei stabile, non-radicalice.

A. ÎMBUNĂȚĂȚIREA MODULUI DE EVALUARE A CONCENTRAȚIEI DE DPPH

Reactivi

DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) și acid ascorbic ($C_6H_8O_6$) p.a. (Merck) și metanol (CH_3OH) (Chimopar, București).

Aparatura

Toate experimentele au fost realizate la lungimea de undă de 517 nm, utilizând un spectrofotometru Ultrospec III (Pharmacia-LKB) cu un singur fascicul.

Stabilirea formulei de calcul a concentrației de DPPH

Lucrând cu concentrație cunoscută de DPPH ($c_0 = 10^{-4}$ mol/L în metanol) s-a determinat coeficientul molar de absorbție, ε_y , din relația Lambert-Beer ca fiind $\varepsilon_y = 1,14 \cdot 10^4$ l·mol⁻¹·cm⁻¹. Acest rezultat este foarte apropiat de cel obținut de alți cercetători [91]. Coeficientul molar de absorbție pentru forma stabilă, non-radicalică a DPPH-ului a fost determinată în mod similar și s-a găsit $\varepsilon_y = 430$ l·mol⁻¹·cm⁻¹.

Bazat pe aditivitatea absorbanței, se obține:

$$A = A_v + A_y + A_m = \varepsilon_v \cdot c_v \cdot l + \varepsilon_y \cdot c_y \cdot l + 0,963 \quad (\text{II.3-3})$$

unde: A este absorbanta citită de spectrofotometru; A_v și c_v sunt respectiv absorbanta și concentrația radicalului liber DPPH; A_y și c_y sunt respectiv absorbanta și concentrația formei stabile, non-radicalice a DPPH-ului; A_m este absorbanta metanolului (solventul) la 517 nm (0,963); l este grosimea cuvei spectrofotometrului (1 cm). Întrucât:

$$c_y = c_0 - c_v \quad (\text{II.3-4})$$

relația (II.3-3), după înlocuirea parametrilor cunoscuți, devine:

$$A - 0,963 = 1,14 \cdot 10^4 \cdot c_v \cdot 1 + 430 \cdot (10^{-4} - c_v) \cdot 1 \quad (\text{II.3-5})$$

Din ecuația (II.3-5) se obține, pentru spectrofotometrul cu un singur fascicul, o relație simplă (II.3-6) între c_v și A :

$$c_v = \frac{A - 1,006}{10970} \quad (\text{II.3-6})$$

Această ecuație (II.3-6) ar trebui să fie valabilă pentru orice spectrofotometru cu un singur fascicul.

În paralel am efectuat o dreaptă de etalonare pentru DPPH, după cum se poate observa în figura 19.

Pe baza ecuației liniei de tendință, redată în figura 19, și fără a lua în considerare absorbanta formei neradicalice a DPPH-ului, relația între valoarea absorbatei indicate de spectrofotometru, A , și concentrația radicalului liber DPPH ar fi:

$$c_v = \frac{A - 0,9585}{11462} \quad (\text{II.3-7})$$

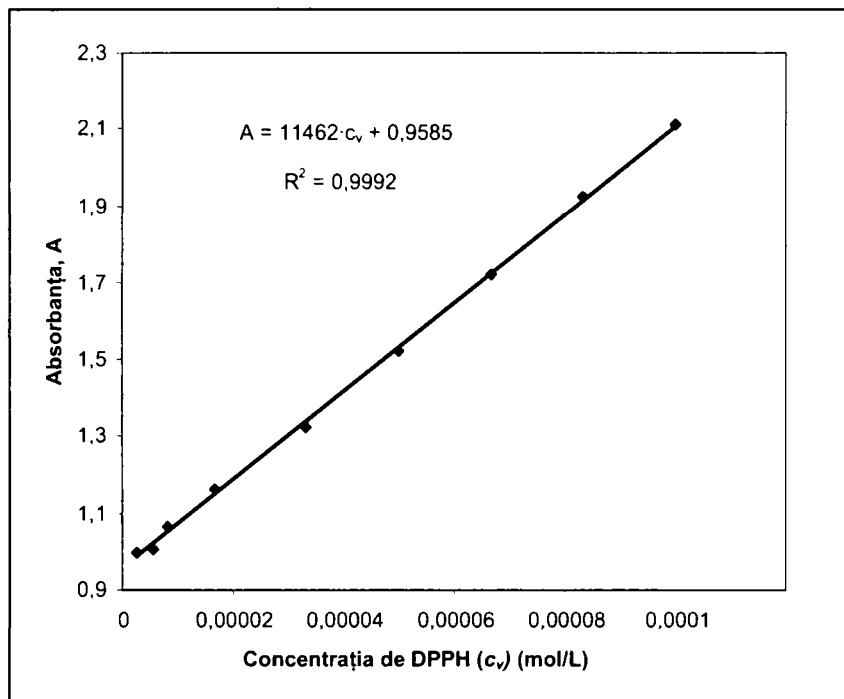


Figura 19. Dreapta de etalonare pentru radicalul liber DPPH

O aplicație a ecuațiilor (II.3-6) și (II.3-7) poate fi ilustrată prin verificarea lor experimentală asupra activității antioxidante a acidului ascorbic. Pentru aceasta s-a preparat o soluție de DPPH în metanol cu concentrația 10^{-4} M și 2,9 mL soluție au fost amestecați cu 0,1 mL probă (acid ascorbic cu concentrația de $0,4 \cdot 10^{-3}$ M) într-o cuvă de cuarț 4 mL (grosimea 1 cm) [163]. Modificările absorbantei au fost urmărite la lungimea de undă de 517 nm până când s-a ajuns la un „platou”. Experimentul a fost repetat de 5 ori.

Rezultate obținute

Softul spectrofotometrului Ultrospec III oferă posibilitatea salvării datelor sub forma unor perechi timp-semnal care pot fi exportate în programul Microsoft Excel pentru calcule ulterioare. Figura 20 arată descreșterea absorbantei după adăugarea a câte 0,1 mL soluție de acid ascorbic $0,4 \cdot 10^{-3}$ mol/L, în cadrul celor cinci repetări ale experimentului, împreună cu media curbelor rezultate. Se poate remarca marea reproductibilitate a metodei.

Pentru calculele ulterioare a fost folosită media curbelor obținute. Prin aplicarea ecuațiilor (II.3-6) și (II.3-7), datele de absorbantă au fost convertite în concentrații ale radicalului liber DPPH. Astfel pentru fiecare valoare a absorbantei s-au obținut două valori ale concentrației. Acestea au fost reprezentate grafic în funcție de timp, pentru a compara rezultatele obținute folosind ecuația (II.3-6) cu cele obținute folosind ecuația (II.3-7) (figura 21).

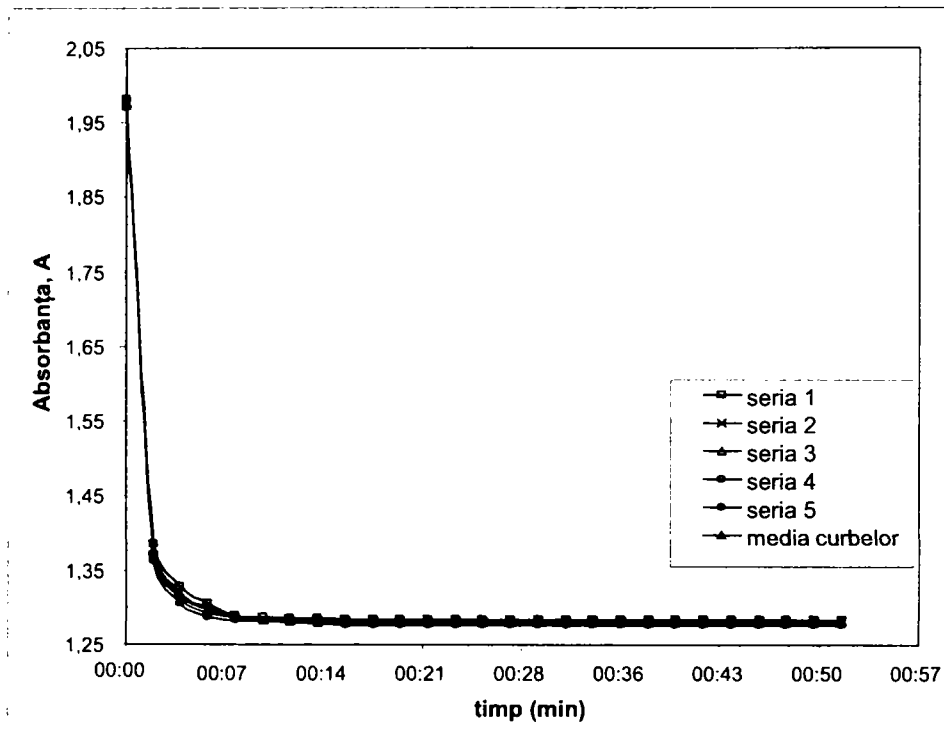


Figura 20. Descreșterea absorbantei pentru reacția dintre DPPH și acid ascorbic

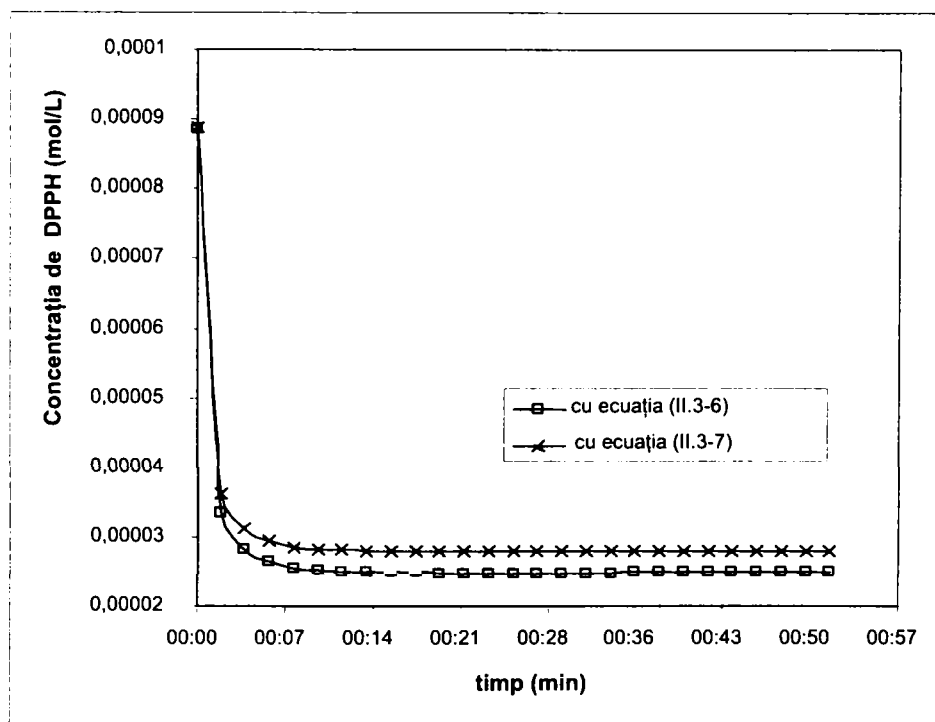


Figura 21. Variația concentrației reziduale de DPPH, calculată cu ecuațiile (II.3-6) și (II.3-7)

Pasul următor a constat în calcularea coeficientului de variație (CV) pentru fiecare pereche de valori ale concentrației, utilizând următoarea formulă [164]:

$$CV = \frac{\text{deviatia std.}}{\text{medie}} \cdot 100 \quad (\text{II.3-8})$$

S-a găsit că acesta variază între 0,2% (în apropierea momentului de start a reacției) și 8,2% (la sfârșitul acesteia). Diferențele sunt datorate formării difenilpicril-hidrazinei (a cărei concentrație crește în timp) și care nu a fost luată în considerare în ecuația (II.3-7). Valori ale coeficientului de variație sub 10% pot fi considerate acceptabile. Chiar dacă forma curbelor din figura 21 este asemănătoare, consider că este mai bine să se utilizeze pentru calculele ulterioare ecuația (II.3-6), întrucât reflectă cu mai multă acuratețe procesele chimice care au loc.

Dacă variația concentrației radicalului liber DPPH în timp este cunoscută, activitatea antiradicalică este ușor de evaluat. În prezent nu există un mod unitar de a interpreta datele experimentale, întrucât cel puțin trei metode sunt utilizate în mod curent [91, 165].

Astfel unii autori lucrează cu noțiunea de reducere procentuală a DPPH-ului, uneori numită „inhibiție” sau „captare”, definită de relația:

$$Q = \frac{A_0 - A_c}{A_0} \cdot 100 \quad (\text{II.3-9})$$

unde Q este inhibiția, A_0 este absorbanta inițială și A_c este valoarea absorbantei citită după o perioadă determinată de la adăugarea probei.

Un alt parametru recent introdus pentru interpretarea rezultatelor este „concentrația eficientă”, notată cu EC_{50} sau IC_{50} , definită ca și concentrația de substrat care cauzează o scădere cu 50% a activității DPPH-ului (culorii).

În unele cazuri rezultatele sunt prezentate sub forma concentrației reziduale de DPPH.

Avantajele formulei de calcul propuse

Formula de calcul propusă pentru concentrația radicalului liber DPPH reflectă mai bine procesele chimice care au loc în mediul de reacție, întrucât ia în calcul absorbanta ambelor forme colorate ale DPPH-ului. În plus, prin utilizarea acesteia, dreapta de etalonare nu mai este necesară.

Cu toate acestea, în lumina diferențelor dintre marele număr de sisteme de testare disponibile, rezultatele unei singure metode pot da informații insuficiente asupra activității antioxidante a extractelor obținute din diferite matrici alimentare și de aceea trebuie interpretate cu precauție. Se recomandă confirmarea rezultatelor obținute prin metode adiționale.

Rezultatele obținute au constituit obiectul unei lucrări științifice [166].

B. METODĂ NOUĂ DE EVALUARE A ACTIVITĂȚII ANTIRADICALICE

Diversitatea metodelor de estimare a activității antiradicalice prin metoda spectrofotometrică utilizând DPPH face dificilă compararea rezultatelor obținute de diverși cercetători [167]. Pentru a ușura acest lucru am propus o nouă metodă de

calcul a activității antiradicalice/antioxidante prin referirea la unul dintre cei mai utilizați antioxidanți în industria alimentară, BHT (2,6-di-tert-butil-4-metil-fenol).

DPPH-ul a fost dizolvat în metanol (10^{-4} M). Câte 2,9 mL soluție metanolică de DPPH au fost amestecați cu câte 0,1 mL soluție de BHT, în etanol, de concentrații: 0,34 M; 0,1M; 0,04M; 0,02M; 0,004M; 0,002M; 0,0004M și 0,0002M. Modificările absorbanței au fost urmărite la 517 nm, cu ajutorul spectrofotometrului Ultrospec III (Pharmacia-LKB), până la atingerea unui „platou”. Fiecare experiment a fost repetat de cinci ori (seria 1, 2, 3, 4, 5 – „pentaplicat”).

Rezultate obținute

Utilizând ecuația (II.3-6), datele de absorbție au fost convertite în concentrații ale radicalului liber DPPH. Pentru fiecare set de experimente s-au trasat curbele corespunzătoare împreună cu media acestora, după cum este exemplificat în figura 22 pentru adăugarea a câte 0,1 mL soluție BHT de concentrație 0,04M.

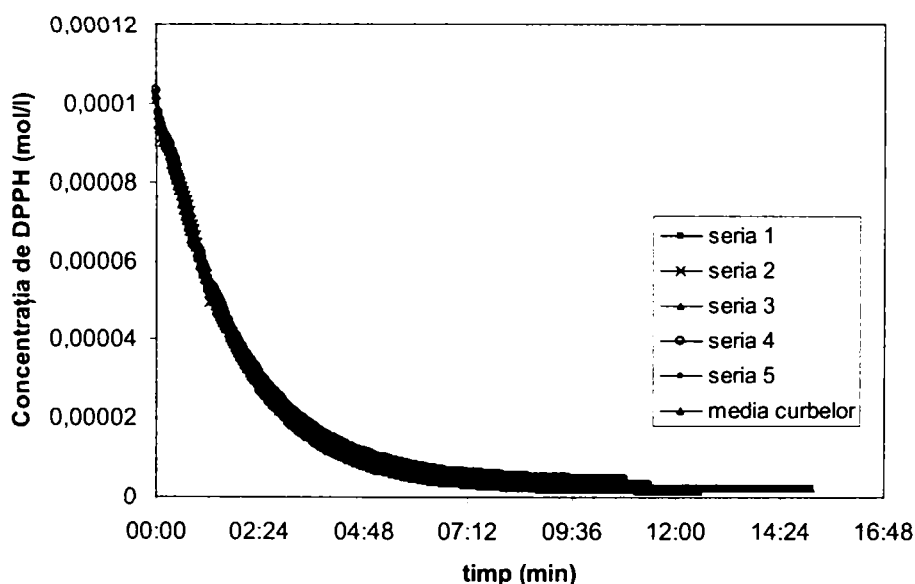


Figura 22. Descreșterea concentrației radicalului liber DPPH după adăugarea a 0,1 mL soluție de 2,6-di-terț-butil-4-metil-fenol (BHT) de concentrație 0,04M

În același mod s-a procedat și în cazul celorlalte soluții de BHT cu concentrațiile 0,34 M; 0,1M; 0,02M; 0,004M; 0,002M; 0,0004M și 0,0002M. Pentru fiecare caz s-a determinat și media curbelor rezultate în scopul utilizării acestora pentru calculele ulterioare.

Pasul următor a constat în determinarea timpului până când concentrația de DPPH s-a redus la jumătate, pentru fiecare set de experimente. Prin reprezentarea valorilor obținute în funcție de concentrația de BHT, s-a găsit o dependență de tip putere, cu un foarte bun coeficient de corelație ($R^2 = 0,98$), după cum se arată în figura 23.

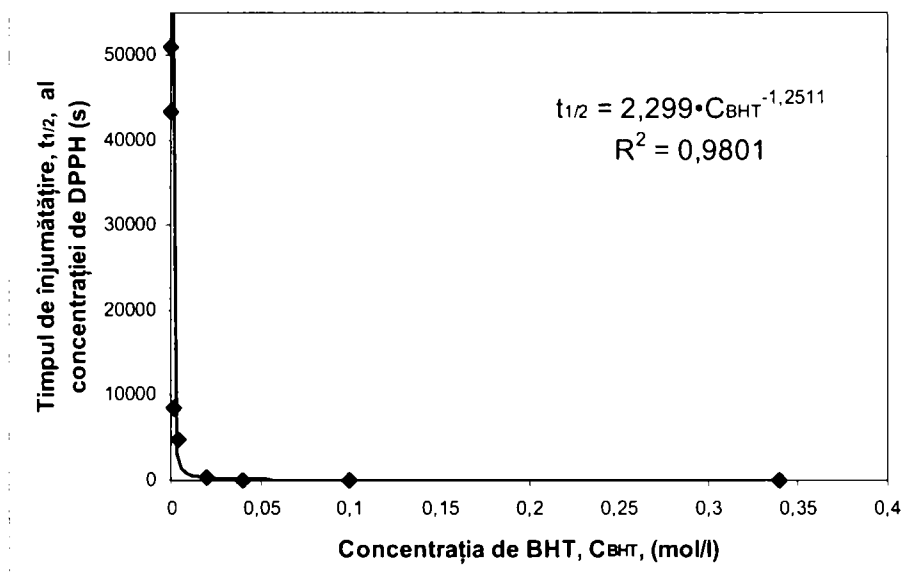


Figura 23. Dependența dintre timpul de înjumătățire a soluției de DPPH și concentrația soluției de 2,6-di-terț-butil-4-metil-fenol (BHT)

Bazat pe ecuația din figura 23, dacă se cunoaște timpul de înjumătățire a soluției de DPPH în cazul adăugării unei probe necunoscute, activitatea antiradicalică (AA, mol/L) exprimată în termeni de concentrație echivalentă de BHT (concentrația unei soluții de BHT care prezintă aceeași activitate antiradicalică) poate fi calculată cu următoarea formulă:

$$AA = \sqrt[1,2511]{\frac{2,299}{t_{1/2}}} \cong \left(\frac{2,3}{t_{1/2}}\right)^{0,8} \quad (\text{II.3-10})$$

Trebuie subliniat faptul că deși pe parcursul calculelor s-a utilizat o ecuație care depinde de caracteristicile aparatului utilizat (ecuația II.3-6), ecuația obținută în final (II.3-10) este independentă de acestea. Înseamnă că ecuația (II.3-10) poate fi aplicată pentru orice măsurători spectrofotometrice dacă se utilizează aceeași metodă cu DPPH. După cum se observă, formula obținută este extrem de simplă și unicul parametru necesar a fi cunoscut pentru determinarea activității antiradicalice este timpul de înjumătățire al soluției de DPPH.

Ecuația (II.3-10) poate avea o aplicație extrem de practică, ținând cont de faptul că se cunosc cantitățile de BHT recomandate pentru fiecare tip de aliment cu conținut de grăsimi [168]. Aceasta înseamnă că printr-un experiment extrem de simplu, de tipul celui descris în acest paragraf se poate aproxima cantitatea necesară din orice fel de amestec cu proprietăți antiradicalice/antioxidante.

O metodă asemănătoare poate fi aplicată pentru calculul activității antiradicalice (AA) prin raportarea la oricare alt antioxidant cunoscut.

Rezultatele obținute au constituit obiectul unei lucrări științifice [169].

C. APLICAȚIE A NOULUI MOD DE CALCUL LA STUDIUL EVOLUȚIEI ÎN TIMP A ACTIVITĂȚII ANTIRADICALICE A TINCTURILOR DE BUSUIOC, CIMBRU, COADA CALULUI, COADA ȘORICELULUI, LEUȘTEAN, MĂGHIRAN, MĂRAR, OREGANO, PĂTRUNJEL, ROZMARIN ȘI JELINĂ

Modul de lucru

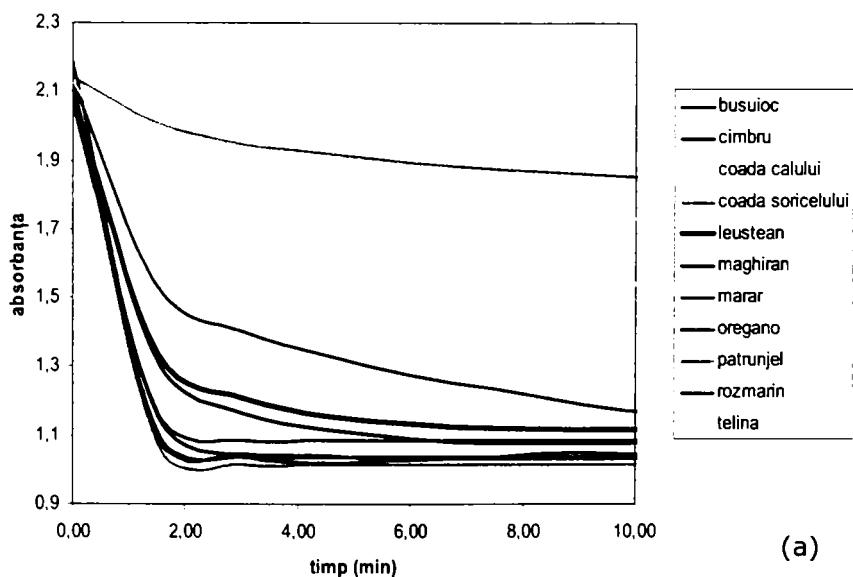
Reactivii utilizați și modul de preparare al tincturilor au fost descrise în paragrafele II.3.3-B. și respectiv II.2.b. Pe lângă tincturile simple s-a preparat și o tinctură din următorul amestec: busuioc, cimbru, coada șoricelului, leuștean, măghiran, oregano și rozmarin în cantități egale. Modul de efectuare al experimentelor a fost descris în paragraful II.3.3-B. Tincturile au fost păstrate la frigider și analizate imediat după obținere, la un an și la doi ani după aceea (perioada maximă de valabilitate a tincturilor fiind de 2 ani [151]).

Rezultate obținute

Imediat după adăugarea fiecărei probe soluția de DPPH a început să se decoloreze, mai repede sau mai încet în funcție de puterea antioxidantă a extractului studiat. Variația absorbanței pentru primele 10 minute este redată în figura 24 în cazul tincturilor proaspăt preparate (a), la un an (b) și la doi ani (c) de la preparare.

După determinarea timpului până când concentrația de DPPH s-a redus la jumătate ($t_{1/2}$), activitatea antioxidantă (AA) exprimată ca și concentrație echivalentă de BHT (mol/l) a fost calculată cu ajutorul formulei (II.3-11), iar rezultatele obținute sunt reprezentate grafic în figura 25.

Comparând profilul activității antiradicalice pentru tincturile proaspăt preparate din figura 25 cu profilul capacității antioxidante determinat prin chemiluminescență și redat în figura 18, se remarcă același tip de variație.



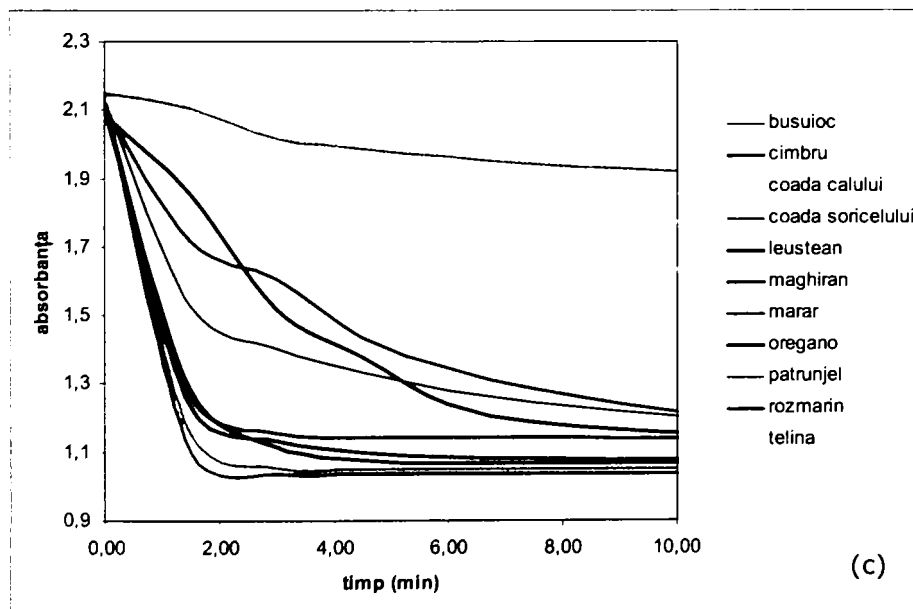
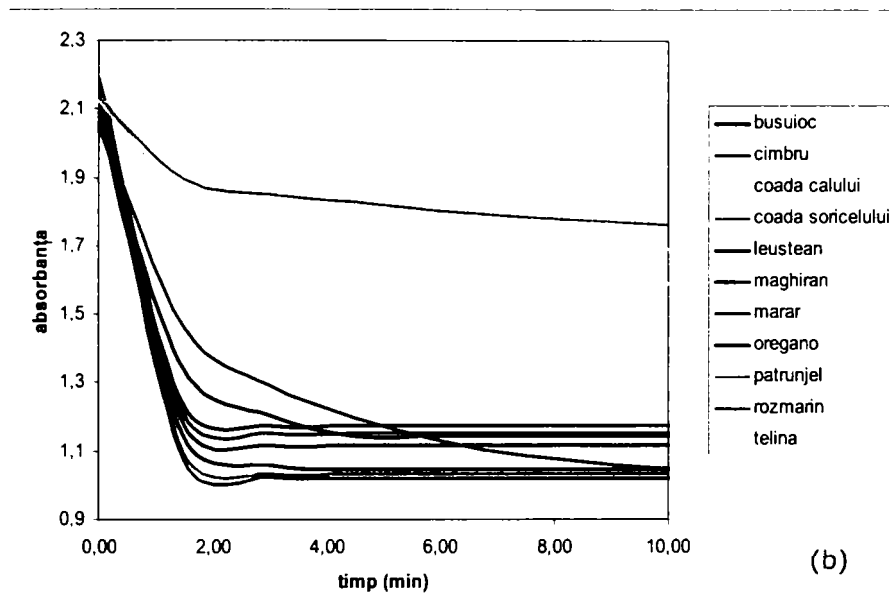


Figura 24. Descreșterea absorbanței caracteristică DPPH-ului la adăugarea a 0,1 mL tinctură: (a) proaspăt preparată; (b) la un an de la preparare; (c) la doi ani de la preparare

Imediat după preparare, cea mai eficientă este tinctura de coada șoricelului urmată de rozmarin, măghiran, cimbru, leustean, oregano și busuioc. Mărarul, țelina, coada calului și pătrunjelul au cele mai scăzute valori atât pentru activitatea antiradicalică cât și pentru capacitatea antioxidantă. Similaritatea rezultatelor obținute prin cele două metode este motivul pentru care analizele tincturilor la 1 an și la 2 ani de la obținere au fost făcute numai prin metoda implicând utilizarea DPPH-ului.

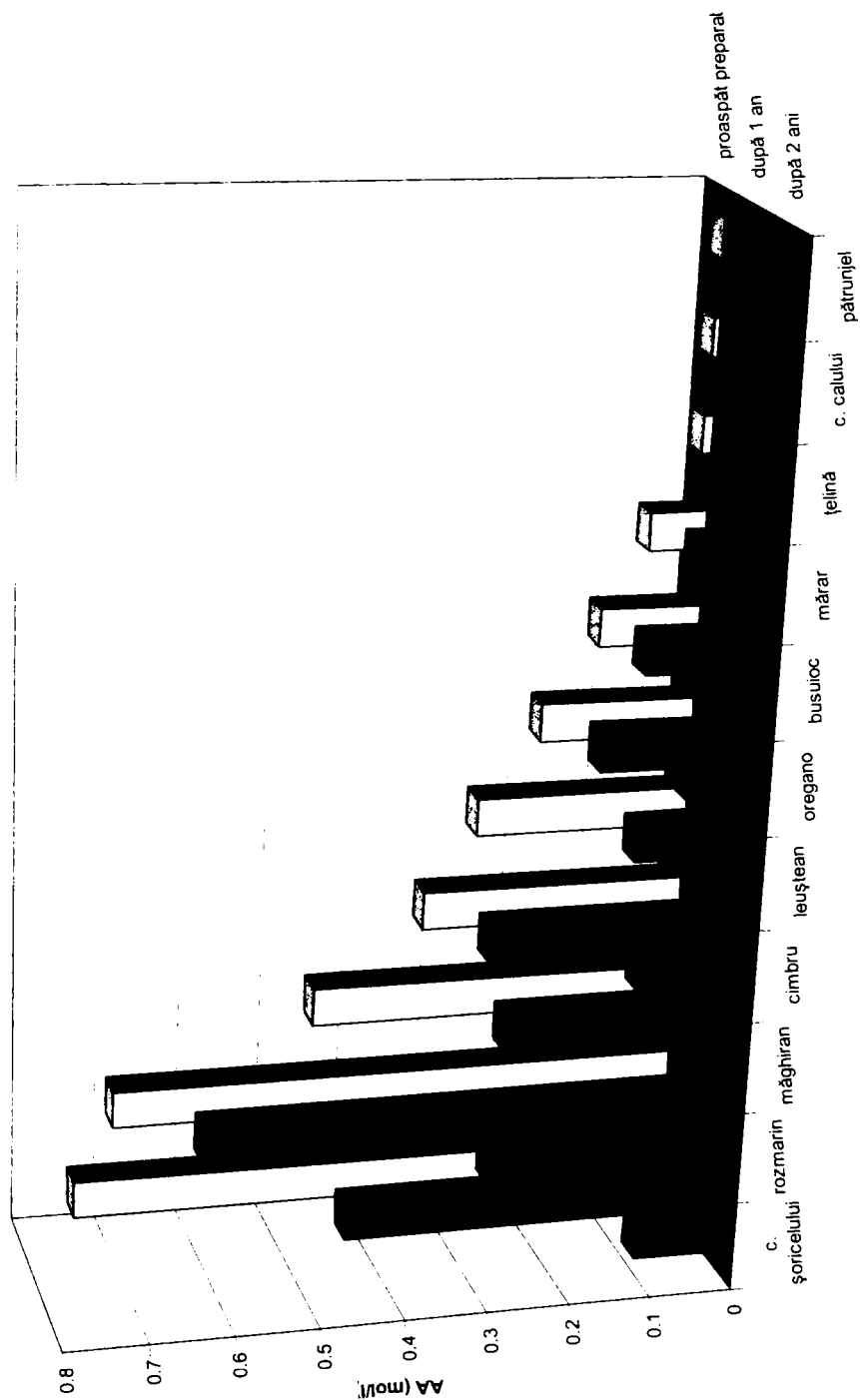


Figura 25. Variația în timp a activității antiradicalice (AA) pentru tincturile studiate

Utilizând ecuația (II.3-6), datele de absorbție au fost convertite în concentrații ale radicalului liber DPPH. Pentru fiecare tinctură analizată s-au trasat curbele reprezentând variația în timp a concentrației de DPPH, corespunzătoare fiecăruia din cele cinci seturi de determinări, împreună cu media acestora. Pentru calculele ulterioare s-a utilizat doar media acestor curbe.

După un an, activitatea antiradicalică a scăzut mai mult sau mai puțin în funcție de tipul plantei. Tincturile de rozmarin, cimbru, oregano și busuioc au înregistrat cele mai mici variații. Cea mai pronunțată scădere a activității antioxidante o înregistrează tinctura de coada șoricelului care își pierde locul de lider în favoarea tincturii de rozmarin. Următoarea în clasament este tinctura de cimbru, la mică distanță de tinctura de măghiran.

După doi ani, activitatea tuturor tincturilor a scăzut la mai mult de jumătate. Lider rămâne tinctura de rozmarin, urmată de tincturile de cimbru, coada șoricelului și oregano.

Motivația care a stat la baza acestui studiu a fost dorința de a realiza un amestec de tincturi din plante condimentare, care să aibă pe lângă efectul aromatizant și efect antioxidant/antiradicalic cât mai mare și mai constant, pretabil pentru utilizare în industria alimentară. Ca urmare a rezultatelor prezentate în figura 25, tincturile de mărar, țelină, coada calului și pătrunjel au fost eliminate, datorită valorilor foarte mici ale activității antiradicalice, urmând a fi studiată activitatea unui amestec al tincturilor de coada șoricelului, rozmarin, măghiran, cimbru, leuștean, oregano și busuioc. Acestea din urmă au fost alese fie pentru valoarea ridicată a activității antiradicalice (în special tincturile coada șoricelului și de rozmarin), fie pentru constanța acestei activități, mai ales în primul an de la obținere.

S-au utilizat două moduri de obținere a amestecului: (a) prin amestecarea unor cantități egale din tincturile celor 7 plante alese; (b) prin obținerea directă a unei tincturi dintr-un amestec constând din cele 7 plante (uscate) luate în cantități egale, conform 4.3.7. Activitatea antiradicalică (exprimată ca și concentrație echivalentă de BHT) a extractelor (a) și (b), calculată utilizând ecuațiile (II.3-6) și (II.3-10), este redată în tabelul 9.

Tabel 9. Activitatea antiradicalică (AA) a extractului de busuioc, cimbru, coada șoricelului, leuștean, măghiran, oregano și rozmarin în funcție de modul de obținere

Modul de obținere al extractului	Timpul de înjumătățire a concentrației de DPPH	AA (mol/l)
amestecarea tincturilor (a)	9,2 secunde	0,33
amestecarea plantelor și obținerea tincturii corespunzătoare (b)	3,7 secunde	0,68

Ambele amestecuri prezintă o aromă bogată și plăcută. Se observă însă din tabelul 9 că activitatea antiradicalică a amestecului obținut prin metoda (b) este dublă față de cel obținut prin metoda (a) și foarte apropiată de cea a tincturii de rozmarin (figura 25). Din acest motiv cercetările asupra proprietăților și comportării „in situ” a „**mixturii antioxidante**” (extractul de busuioc, cimbru, coada șoricelului, leuștean, măghiran, oregano și rozmarin) s-au făcut pe **tinctură obținută prin metoda (b)**.

II.4. STUDIUL COMPOZIȚIEI TINCTURILOR DE BUSUIOC, CIMBRU, COADA CALULUI, COADA ȘORICELULUI, LEUȘTEAN, MĂGHIRAN, MĂRAR, OREGANO, PĂTRUNJEL, ROZMARIN ȘI ȚELINĂ

II.4.1. CROMATOGRAFIE DE GAZE CUPLATĂ CU SPECTROMETRIE DE MASĂ (GC/MS)

Deși limitată pentru compușii volatili, care reprezintă doar aproximativ 15% din compușii cunoscuți [170], cromatografia de gaze este totuși o metodă importantă de identificare a compoziției unor amestecuri, mai cu seamă atunci când este cuplată cu spectrometrie de masă, situație în care utilizarea standardelor nu mai este necesară.

Reactivi

Izoctan (2,2,4-trimetil-pentan), cloroform (CHCl_3), etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) și clorură de sodiu (NaCl) (Chimopar, București). Tincturile analizate sunt cele preparate conform II.2.b.

Aparatura

Pentru toate determinările s-a utilizat un gaz cromatograf Trace GC Ultra (cu injector: split/splitless și coloană capilară : BPX-5 , 30m, 0.25 mm D.I., 0.25 μm f.s), cuplat cu spectrometru de masă cu trapă ionică MS Polaris Q și cu autosampler AS 2000; întreaga linie este produsă de Thermo Finnigam. Analizele au fost efectuate în cadrul Laboratorului Central pentru Controlul Reziduurilor de Pesticide în Plante și Produse Vegetale, București.

Mod de lucru

Extracția din soluțiile în alcool etilic s-a efectuat, cu izooctan și cloroform. Pentru extracție s-a folosit o pâlnie de separare de 250 mL care a fost spălată cu apă bidistilată și alcool etilic după fiecare serie de extracție. Pentru fiecare extracție s-au folosit 10 mL extract alcoolic.

S-a efectuat mai întâi extracția în izooctan. S-au folosit 2 porții a câte 10 mL de izooctan. Emulsia formată în urma agitării energice, a fost "spartă » cu soluție salină de NaCl 50%. S-a separat faza de izooctan de faza alcoolic-apoasă.

Faza alcoolic-apoasă rămasă a fost supusă separării cu 2 porții a câte 10 mL cloroform. Emulsia formată în urma agitării energice, a fost "spartă » cu soluție salină de NaCl 50%. S-a separat faza de cloroform de faza alcoolic-apoasă.

Condiții GC/MS

Autosampler : volum soluție injectată: 0,1 μL ; viteză de injecție: 100 $\mu\text{L}/\text{sec}$.

Gaz Cromatograf : Injector : temperatura : 200 $^{\circ}\text{C}$, split : 50 -1
 Gaz purtător : (He) 1mL/min.
 Cuptor : inițial : 100 $^{\circ}\text{C}$ -1 min
 rampa 1 : 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ până la 220 $^{\circ}\text{C}$ – 5 min.
 rampa 2 : 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ până la 250 $^{\circ}\text{C}$ – 5 min.
 rampa 3 : 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ până la 300 $^{\circ}\text{C}$ – 3 min.

Spectrometru de Masă: Temperatura sursei : 280 $^{\circ}\text{C}$

Start achiziție : 2 min.
 Microscanări : 3
 Timp ionic maxim : 25
 Polaritate : pozitiv
 Tip scanare : full scan 15-750 m/e

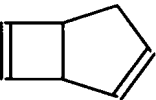
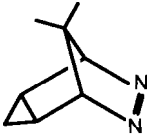
Timp de achiziție : timp de lucru gaz cromatograf 35 min.

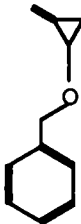
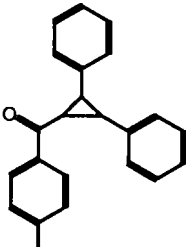
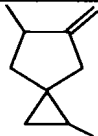
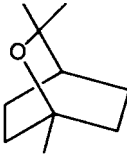
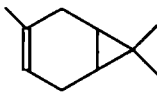
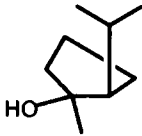
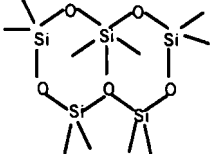
Rezultate obținute

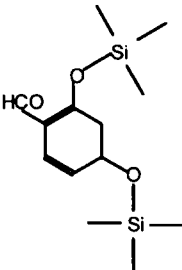
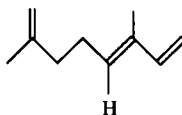
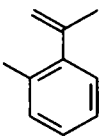
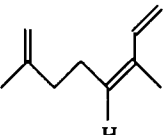
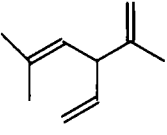
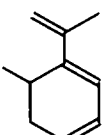
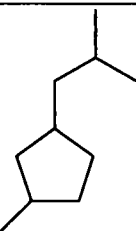
Cromatogramele obținute sunt redată în Anexa 2. Cea mai mare parte a picurilor au apărut în primele 15 minute ale analizei. Fiecare probă a fost repetată de două ori și reproductibilitatea a fost bună. Cu câteva excepții (cum ar fi tincturile de busuioc și de rozmarin), au fost identificate mai multe picuri în faza izooctanică decât în cea cloroformică. În unele cazuri, cum este cel al tincturilor de coada calului și leuștean, cromatogramele în faza cloroformică nu au pus în evidență picuri semnificative, motiv pentru care nu au fost redată.

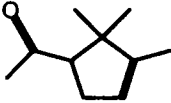
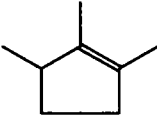
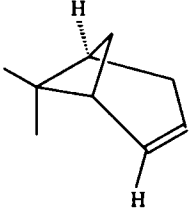
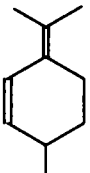
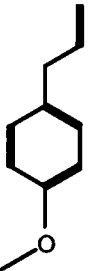
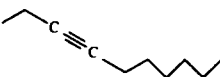
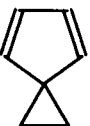
Spectrele de masă corespunzătoare picurilor din cromatograme au fost interpretate utilizând sub-programul AMDIS al programului NIST 2002. Interpretarea a fost realizată în cadrul Centrului Regional de Spectrometrie de Masă al Departamentului de Chimie de la Universitatea McMaster din Canada. Au fost luate în considerare numai rezultatele cu probabilitatea mai mare de 80%. Substanțele identificate în tincturile analizate, ordonate după timpii de retenție, sunt redată în tabelul 10. Coloanele 4 și 5 arată procentul în care se află substanța identificată în faza izooctanică și respectiv cloroformică. Unele dintre picuri nu prezintă interes: siloxanii provin foarte probabil din umplutura coloanei sau din septum-ul siliconic al portului de injecție.

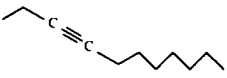
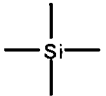
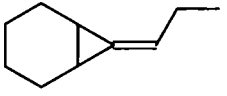
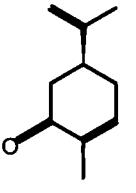
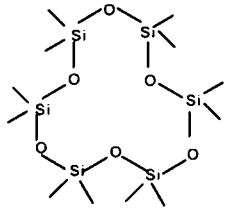
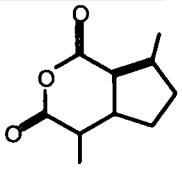
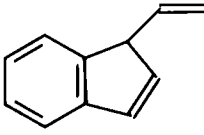
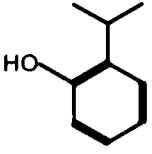
Tabel 10. Lista substanțelor identificate prin GC/MS în tincturile de busuioc, cimbru, coada calului, coada șoricelului, leuștean, măghiran, mărar, oregano, pătrunjel, rozmarin și țelină

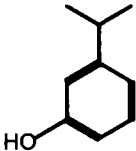
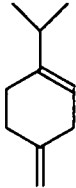

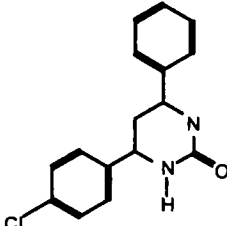
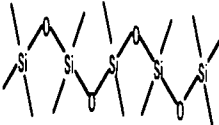
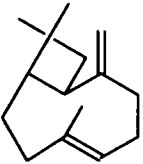
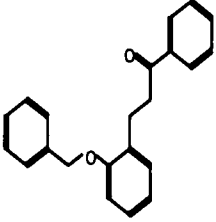
Nr	Substanța	Structura	Timpul de retenție	procentul		Tinctura
				faza izooctanică	faza cloroformică	
0	1	2	3	4	5	6
1	biciclo[3.2.0]hepta-2,6-diena C ₇ H ₈		2,38	0,02%	0,01%	măghiran
				0,003%	-	mărar
				0,01%	-	oregano
2	4,4a,5,5a-tetrahidro-6,6-dimetil-, (1à,4à,4aà,5aà)-1,4-metan-1H-ciclopropan [d] iridazina C ₈ H ₁₂ N ₂		2,76	0,13%	-	pătrunjel

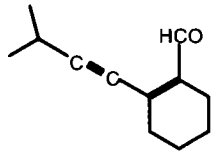
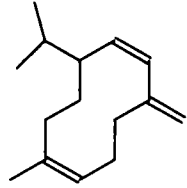
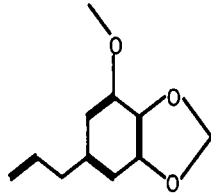
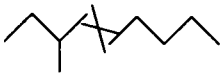

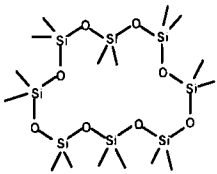
0	1	2	3	4	5	6
3	1-metilen-2-benziloxi-ciclopropan $C_{11}H_{12}O$		2,77	-	0,002%	măghiran
4	1-(4-Metilbenzoi)-2,3-difenil-ciclopropan (2,3-difenilciclopropil)-(4-metilfenil)-metanona $C_{23}H_{20}O$		3,17	-	0,02%	g
				0,02%	-	pătrunjel
				0,22%	-	cimbru
				0,14%	-	rozmarin
5	1,5-dimetil-6-metilen-spiro[2.4]heptan $C_{10}H_{16}$		3,22	1,32%		țelină
				3,78%	-	mărar
6	CINEOL 4,7,7-trimethyl-8-oxabicyclo[2.2.2]octan $C_{10}H_{18}O$		3,28	1,89%	-	rozmarin
7	3-CARENA 3,7,7-trimetilbicio[4.1.0]hept-3-ena $C_{10}H_{16}$		3,46	2,12%	-	cimbru
				0,11%	-	măghiran
8	SABINENE HIDRAT 4-metil-1-propan-2-il-biciclo[3.1.0]hexan-4-ol $C_{10}H_{18}O$		3,63	0,15%	0,11%	măghiran
9	DOW CORNING 345 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10-decametil-1,3,5,7,9,2,4,6,8,10-pentaoxapenta silecan $C_{10}H_{30}O_5Si_5$		3,75	-	0,01%	coada șoricel.
				0,08%	-	oregano
				-	0,05%	mărar

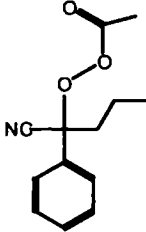
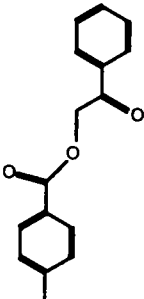
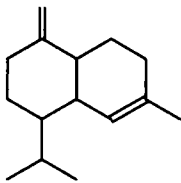
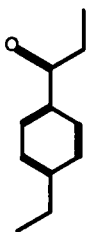
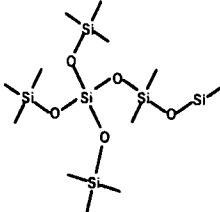
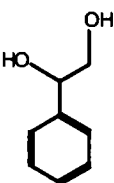
0	1	2	3	4	5	6
10	2,4-bis(trimetilsiloxi) benzaldehida $C_{13}H_{22}O_3Si_2$		3,77	0,01%	-	oregano
11	α -OCIMEN (3E)-3,7-dimetil-octa-1,3,7-triena $C_{10}H_{16}$		3,82		0,12%	busuioc
12	1-metil-2-prop-1-en-2-il-benzen $C_{10}H_{12}$		3,83	-	0,16%	oregano
				0,16%	-	pătrunjel
				0,02%	-	mărar
13	β -cis-Ocimen (3Z)-3,7-dimetil-octa-1,3,6-triena $C_{10}H_{16}$		3,84	0,74%	0,11%	busuioc
14	SANTOLIN-TRIENA 3-etenil-2,5-dimetil-hexa-1,4-diena $C_{10}H_{16}$		3,98	0,73%	-	măghiran
15	1,3,8-p-MENTATRIENA 1-metil-4-prop-1-en-2-il-ciclohexa-1,3-diena $C_{10}H_{14}$		4,08	-	0,12%	oregano
				0,12%	-	pătrunjel
16	1-metil-3-(2-metilpropil) ciclopentan $C_{10}H_{20}$		4,51	0,06%	-	leuștean

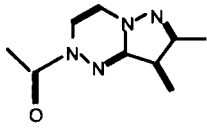

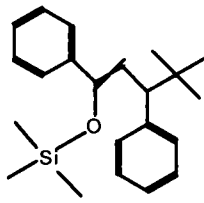
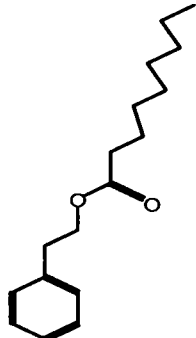
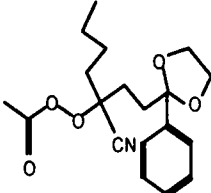

0	1	2	3	4	5	6
17	CAMFOLENAL 1-(2,2,3-trimetil-1-ciclopent-3-enil) etanona C ₁₀ H ₁₆ O		4,62	0,19%	-	rozmarin
18	1,2,3-trimetilciclopentena C ₈ H ₁₄		4,88	0,08%	0,07%	rozmarin
19	1R-à-PINEN (1S,5S)-4,7,7-trimetilbiciclo[3.1.1]hept-3-ena C ₁₀ H ₁₆		4,92	0,07%	-	măghiran
20	IZOTERPINOLEN 3-metil-6-propan-2-ilidene-ciclohexena C ₁₀ H ₁₆		5,10	0,06%	-	măghiran
				-	0,05%	rozmarin
21	ESTRAGOL 1-metoxi-4-prop-2-enil-benzen C ₁₀ H ₁₂ O		5,12	0,60%	0,07%	busuioc
22	dec-3-ina C ₁₀ H ₁₈		5,18	0,22%	-	mărar
23	spiro[2.4]hepta-4,6-diena C ₇ H ₈		5,25	0,01%	-	mărar

0	1	2	3	4	5	6
24	undec-3-ina $C_{11}H_{20}$		5,28	0,31%	-	mărar
25	TETRAMETILSILAN $C_4H_{12}Si$		5,45	0,01%	-	leuștean
26	7-propilidenenorcaran 7-Propylidene- bicyclo[4.1.0]heptan $C_{10}H_{16}$		5,56	0,05%	-	mărar
27	CARVOL, D- CARVONA (5S)-2-metil-5-prop- 1-en-2-il-ciclohex-2- en-1-ona $C_{10}H_{14}O$		5,74	0,23%	-	cimbru
				2,88%	-	mărar
28	2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12-dodecametil-1,3,5,7,9,11-hexaoxa-2,4,6,8,10,12-hexasilaciclododecan $C_{12}H_{36}O_6Si_6$		5,75	0,11%	-	oregano
29	2,7-dimetil-4-oxabicyclo[4.3.0]non-6-ena-3,5-diona $C_{10}H_{12}O_3$		5,80	0,05%	0,05%	oregano
30	1-etenil-1H-inden $C_{11}H_{10}$		6,21	0,01%	-	leuștean
31	TIMOL 5-metil-2-propan-2-il-fenol $C_{10}H_{14}O$		6,31	3,23%	1,32%	cimbru

0	1	2	3	4	5	6
32	CARVACROL 2-metil-5-propan-2-il-fenol MW: 150.218 MF: C ₁₀ H ₁₄ O		6,32	1,16%	1,16%	cimbru
				1,85%	1,85%	oregano
				0,05%	-	țelină
33	β-TERPINEN 4-metiliden-1-propan-2-il-ciclohexena C ₁₀ H ₁₆		6,92	0,04%	-	țelină
34	tetradec-7-ena C ₁₄ H ₂₈		7,01	0,06%	-	leuștean
35	4-(4-clorofenil)-6-fenil-3H-pirimidin-2-ona C ₁₆ H ₁₁ ClN ₂ O		7,78	-	0,05%	coada șoricel.
36	bis[(dimetil-trimetilsililoxi-silol)oxi]-dimetil-silan C ₁₂ H ₃₆ O ₄ Si ₅		7,80	0,19%	-	oregano
				-	0,10%	rozmarin
				0,10%	-	coada calului
				-	0,17%	mărar
37	CARIOFLEN (4E)-4,11,11-trimetil-8-metiliden-biciclo[7.2.0]undec-4-ena C ₁₅ H ₂₄		7,95	0,13%	-	cimbru
				0,26%	-	rozmarin
				0,09%	-	măghiran
38	3-(2-benziloxifenil)-1-fenil-propan-1-ona C ₂₂ H ₂₀ O ₂		7,97	0,01%	-	țelină

0	1	2	3	4	5	6
39	2-(3-metilbut-1-inil)ciclohexen-1-carboxaldehida $C_{12}H_{16}O$		8,74	0,12%	-	busuioc
40	GERMACREN D (1Z,6Z)-1-metil-5-metiliden-8-propan-2-il-ciclodeca-1,6-diena		9,11	0,10%	-	busuioc
41	MIRISTICIN 4-metoxi-6-prop-2-enil-benzo[1,3]dioxol $C_{11}H_{12}O_3$		9,21	-	0,30%	oregano
				0,29%	-	pătrunjel
42	3-metilnon-4-ena $C_{10}H_{20}$		9,48	0,02%	-	leuștean
43	(dimetil-trimetilsiloxi-silil)oxi-[(dimetil-trimetilsiloxi-silil)oxi-dimetilsilil]oxi-dimetilsilan $C_{14}H_{42}O_5Si_6$		9,72	-	0,20%	pătrunjel
				-	0,05%	măghiran
				0,08%	-	oregano
44	2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12,14,14,16,16-hexadecametil-1,3,5,7,9,11,13,15-octaoxa-2,4,6,8,10,12,14,16-octasilaciclohexadecan $C_{16}H_{48}O_8Si_8$		9,74	0,03%	-	oregano

0	1	2	3	4	5	6
45	(1-ciano-1-fenil-butil) etanperoxoat $C_{13}H_{15}NO_3$		9,95	0,0038%	0,0005%	măghiran
46	2-oxo-2-fenil-etil esterul acidului 4-metil-benzoic $C_{16}H_{14}O_3$		10,40	0,01%	-	busuioc
47	gamma CADINEN 6-metil-1-metiliden-4-propan-2-il-3,4,4a,7,8,8a-hexahidro-2H-naftalen $C_{15}H_{24}$		10,70	0,17%	-	busuioc
48	1-(4-etilfenil) propan-1-ona $C_{11}H_{14}O$		10,91	0,06%	-	țelină
49	trimetil-[metil-tris(trimetilsililoxi)sililoxi-silil]oxi-silan $C_{13}H_{40}O_5Si_6$		11,41	0,04%	0,04%	oregano
				0,02%	-	coada calului
50	1-feniletan-1,2-diol $C_8H_{10}O_2$		11,66	0,58%	-	țelină

0	1	2	3	4	5	6
51	2-acetil-2,8-dihidro-7-metil-8-metilen-pirazolo[5,1-c][1,2,4] triazina $C_9H_{10}N_4O$		11,82	0,002%	-	țelină
52	hexadec-3-ina		12,52	0,16%	-	țelină
53	(4,4-dimetil-1,3-difenil-pent-1-enoxi)-trimetil-silan $C_{22}H_{30}OSi$		12,89	-	0,01%	coada șoricel.
				0,01%	0,01%	țelină
54	fenetil-nonanoat $C_{17}H_{26}O_2$		13,34		0,001%	oregano
				0,001%		pătrunjel
55	[1-ciano-1-[2-(2-fenil-1,3-dioxolan-2-il)etil]pentil] etanperoxoat $C_{19}H_{25}NO_5$		14,15	0,01%	-	coada calului
56	pentadeca-5,10-dien-1-ol $C_{15}H_{28}O$		16,29	0,01%	-	coada calului

0	1	2	3	4	5	6
57	1-(diclorometil-sulfonil-metil)-3-(trifluorometil)benzen $C_9H_7Cl_2F_3O_2S$		19,84	0,01%	-	țelină
58	triclora[(diclorofenil)metoxi]-benzen $C_{18}H_{27}Cl_5O$		19,85	0,03%	-	mărar
59	URACIL 1,3,6-trimetil-5-(3-metil-1H-indol-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona $C_{16}H_{17}N_3O_2$		21,94	-	0,02%	rozmarin
60	bromoformonitril $CBrN$	$NC - Br$	32,90	0,01%	-	rozmarin

Până în prezent tincturile celor 11 plante au fost prea puțin studiate din punct de vedere a compoziției; în schimb informații referitoare la compoziția uleiurilor obținute din aceleași plante (busuioc, cimbru, coada calului, coada șoricelului, leuștean, măghiran, mărar, oregano, pătrunjel, rozmarin și țelină) abundă în literatura de specialitate. Comparând datele din literatură, sistematizate în tabelul 5 cu cele obținute prin GC/MS și redată în tabelul 10 se constată câteva asemănări, dar mai cu seamă deosebiri.

Unele dintre substanțele identificate, cum ar fi: cadinenul (tinctura de busuioc), camfenul (tinctura de măghiran), cariofilenul (tincturile de cimbru, rozmarin și măghiran), carvacrolul (tinctura de oregano), carvolul (tinctura de mărar), estragolul (tinctura de busuioc), germacrenul (tinctura de busuioc), mentatriena (tinctura de pătrunjel), miristicinul (tinctura de pătrunjel), ocimenul (tinctura de busuioc), pinenul (tinctura de măghiran), sabinen-hidratul (tinctura de măghiran), terpinenul (tinctura de țelină), terpineolul (tinctura de măghiran) și timolul (tinctura de cimbru) au fost găsite și în uleiurile esențiale ale aceluiași

plante. Există însă un mare număr de substanțe care au fost identificate în uleiurile esențiale și nu se regăsesc în tincturile studiate, cum ar fi: bergamotenu, bisabolenu, borneolul, camforul, linaloolul, mircenu, tuiona, verbenolul, etc. Și reciproca este valabilă, în sensul că o serie de substanțe au fost identificate în tincturi și nu se regăsesc în uleiurile esențiale: carvacrolul în tincturile de cimbru și de țelină, carvolul în tinctura de cimbru, mentatriena și miristicinul în tinctura de oregano, izo-terpinolenul în tinctura de măghiran, etc. [112-150]. O serie de compuși, cum ar fi: biciclo[3.2.0]hepta-2,6-diena; 4,4a,5,5a-tetrahidro-6,6-dimetil-(1à,4à,4aà,5aà)-1,4-methan-1H-ciclopropa[d]piridazina; 1-metilen-2-benziloxiciclo-propan; 1,5-dimetil-6-metilen – spiro[2.4]heptan; (1R,4S)-1-metil-4-propan-2-il-ciclohex-2-en-1-ol; 1-metil-2-prop-1-en-2-il-benzen; 1-metil-3-(2-metil-propil)-ciclo-pentan; 1,2,3-trimetilciclopentena; etc. au fost identificați pentru prima dată.

Multe dintre substanțele identificate sunt cunoscute pentru activitatea lor antimicrobiană: carvacrolul, izoterpinolenul, cariofilenu, mentatriena, 3-carena, camfenul, pinenu și timolul. Efectul lor este mai intens în faza de creștere și uneori mai mare decât acela al unor compuși sintetici [171-176].

Santolin-triena, unul din componentele tincturii de măghiran, a fost recunoscut ca agent anti-inflamator [175].

Activitatea antioxidantă demonstrată a tincturilor studiate poate fi datorată prezenței unor terpene cum ar fi: izoterpinolena, terpinenu, ocimenu, cariofilenu, mentatriena, santolin-triena, a unor alcooli monoterpenici cum ar fi terpineolul și 1-metil-4-propan-2-il-ciclohex-2-en-1-olul, unor diterpene cum ar fi pinenu și a unor fenoli cum ar fi carvacrolul și timolul [139, 141]. Cu cât e mai mare cantitatea din acești compuși, cu atât e mai mare efectul antioxidant. Spre exemplu tinctura de cimbru în care a fost identificat 3,23% timol în faza izo-octanică și 1,16% în faza cloroformică și carvacrol (1,16% în ambele faze) are activitatea antioxidantă mai ridicată decât tinctura de oregano (cu doar 1,85% carvacrol în ambele faze) și mult mai ridicată decât tinctura de țelină cu numai 0,05% carvacrol în faza izooctanică.

Prin această metodă nu au fost identificați compuși polifenolici sau flavonoidici, probabil din cauza volatilității lor scăzute.

II.4.2. DETERMINAREA UNOR COMPUȘI FLAVONOIDICI ȘI POLIFENOLICI

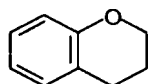
În capitolul anterior s-a arătat că toate cele 11 tincturi analizate au activitate antioxidantă și antiradicalică. În extractele naturale, acest tip de activitate este de obicei corelată cu prezența unor compuși flavonoidici și/sau polifenolici [94]. Câțiva compuși fenolici au fost identificați prin gaz-cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă (paragraful II.4.1). Nu a fost însă identificat nici un compus flavonoidic, probabil din cauza volatilității scăzute și a reactivității relativ ridicate a acestui tip de compuși.

Trebuie menționat faptul că valorile obținute sunt relative în sensul că ele pot varia în funcție de zona de recoltare a plantelor, de anotimp și de specificul hidrologic al anului de recoltare.

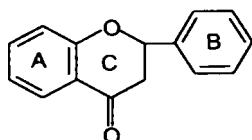
II.4.2.1. Flavonoide

Flavonoidele reprezintă un grup de substanțe naturale, de origine vegetală, derivați ai benzopiranului și care prin structura lor posedă proprietăți antioxidante care le conferă capacitatea de interveni activ în controlul reacțiilor de oxidare din organism.

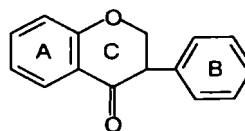
Benzopiranul (cromanul) substituit cu fenil în poziția 2 (flavan) se găsește în structura majorității flavonoidelor. Dacă substituția se face în poziția 3 va fi generată seria izoflavonelor:



Croman (benzopiran)



Flavone



Izoflavone

REAȚII DE IDENTIFICARE

Metodele analitice clasice pentru identificarea acestor substanțe constau în reacții de precipitare și culoare.

Prin tratarea flavonelor cu acid sulfuric concentrat se formează săruri de flaviliu; prin diluare cu apă precipită flavona neschimbată, datorită hidrolizei sării de flaviliu.

Soluțiile concentrate de NH_4OH , NaOH , KOH , Na_2CO_3 formează cu flavonele colorații galbene.

Flavonele ce conțin o grupare hidroxilică în orto- sau peri- față de gruparea carbonil și două grupări hidroxilice în nucleul B, formează complecși cu metalele. Soluția alcoolică de flavonă tratată cu o soluție 5% de AlCl_3 formează o colorație galbenă, fluorescentă în UV, caracteristică.

O altă reacție caracteristică pigmentilor flavonici este formarea de precipitate galbene floconoase cu acetatul neutru de plumb soluție 10%

Modul de lucru

La un mL de extract vegetal analizat (preparat conform II.2.b.) s-a adăugat câte 1 mL de reactiv de identificare [177].

Rezultate obținute

În tabelul 11 sunt redată rezultatele reacțiilor de culoare utilizate pentru identificarea calitativă a flavonoidelor.

Tabel 11. Reacții de identificare a flavonoidelor

Tincturi	reactivi				
	H_2SO_4 96%	NH_4OH 80%	KOH 70%	AlCl_3 5%	$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$
0	1	2	3	4	5
Busuioc	precipitat negru	precipitat verde închis uleios	precipitat verde închis uleios	precipitat verde gălbui	precipitat verde gălbui

0	1	2	3	4	5
Cimbru	precipitat negru	precipitat verde închis uleios	precipitat verde închis uleios	precipitat verde gălbui închis	precipitat verde
Coada calului	precipitat brun închis	precipitat verde închis uleios	precipitat verde închis uleios	precipitat verde gălbui	precipitat verde gălbui
Coada șoricelului	precipitat maro închis	precipitat galben- portocaliu uleios	precipitat galben- portocaliu uleios	precipitat galben deschis	precipitat galben intens
Leuștean	precipitat verde închis	precipitat verde uleios	precipitat verde uleios	precipitat verde brun	precipitat verde brun
Măghiran	precipitat maro închis	precipitat verde închis roșcat uleios	precipitat verde închis roșcat uleios	precipitat verde gălbui	precipitat verde brun
Mărar	precipitat roșu închis	precipitat maro deschis uleios	precipitat maro deschis uleios	precipitat galben pal	precipitat galben
Oregano	precipitat roșu brun închis	precipitat maro deschis	precipitat maro uleios	precipitat galben brun	precipitat galben brun deschis
Pătrunjel	precipitat verde închis	precipitat verde închis uleios	precipitat verde închis uleios	precipitat verde închis	precipitat verde închis
Rozmarin	precipitat roșu brun închis	precipitat brun uleios	precipitat brun uleios	precipitat galben lăptos	precipitat maro gălbui deschis
Țelină	precipitat verde închis	precipitat verde închis uleios	precipitat verde închis uleios	precipitat verde închis	precipitat verde

SPECTROSCOPIE UV-VIZ

S-au trasat spectrele UV-VIZ ale tincturilor de busuioc, cimbru, coada calului, coada șoricelului, leuștean, măghiran, mărar, oregano, pătrunjel, rozmarin și țelină și s-au comparat cu cele ale flavonoidelor rutină și quercetină în soluție alcoolică.

Reactivi

rutină: 2-(3,4-dihidroxi-fenil)-5,7-dihidroxi-3-[(2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-[[[(2R,3R,4R,5S,6S)-3,4,5-trihidroxi-6-metil-oxan-2-il]oximetil] oxan-2-il] oxichromen-4-ona, quercetina: 2-(3,4-dihidroxi-fenil)-3,5,7-trihidroxi-chromen-4-ona, (p.a.) (Merck) și etanol (C₂H₅OH) (Chimopar, București).

Aparatura

Toate experimentele au fost realizate utilizând un spectrofotometru Ultrospec III (Pharmacia-LKB).

Mod de lucru

Modul de preparare al tincturilor de busuioc, cimbru, coada calului, coada șoricelului, leuștean, măghiran, mărar, oregano, pătrunjel, rozmarin și țelină a fost descris în paragraful II.2.b.

Spectrele au fost trasate pe intervalul 220-750 nm. Pentru aceasta au fost preparate soluții diluate de rutină și quercetină în etanol. Tincturile au fost de asemenea diluate cu etanol până la obținerea unor spectre clare.

Rezultate obținute

Spectrele UV-VIZ ale etaloanelor rutină și quercetină sunt prezentate în figura 26.

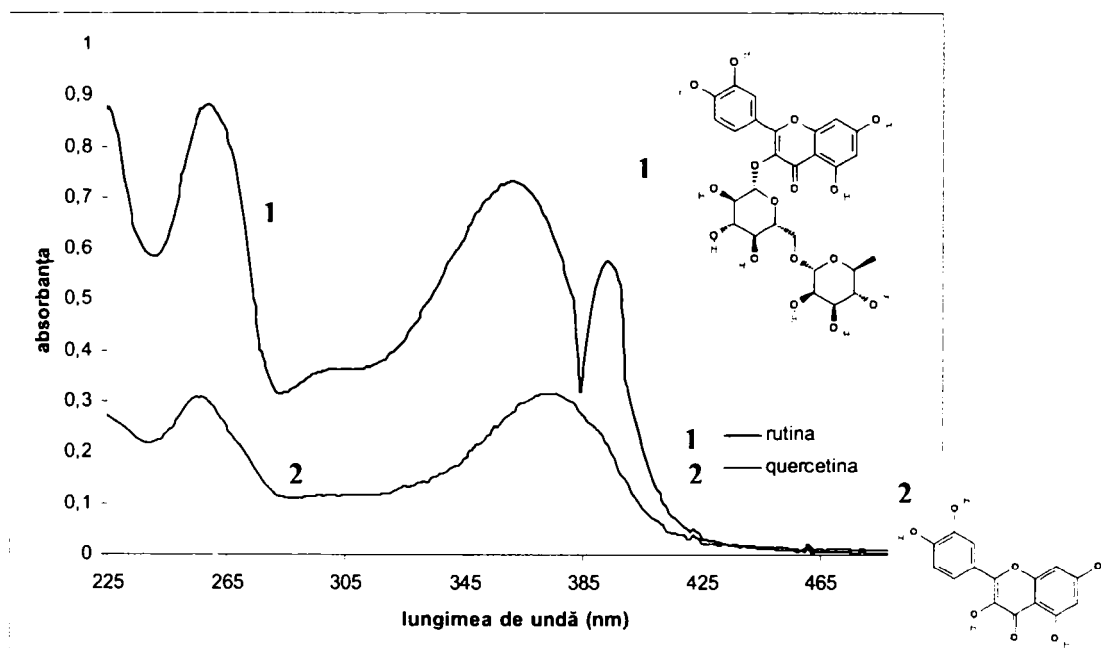


Figura 26. Spectrele UV-VIZ ale quercetinei și rutinei

Pentru trasarea spectrelor tincturilor studiate pe intervalul 220-500 nm acestea au fost diluate de 100 de ori (figura 27a), iar pentru trasarea spectrelor pe intervalul 500-750 au fost diluate de 12,5 ori (figura 27b), pentru o mai bună evidențiere a maximelor de absorbție.

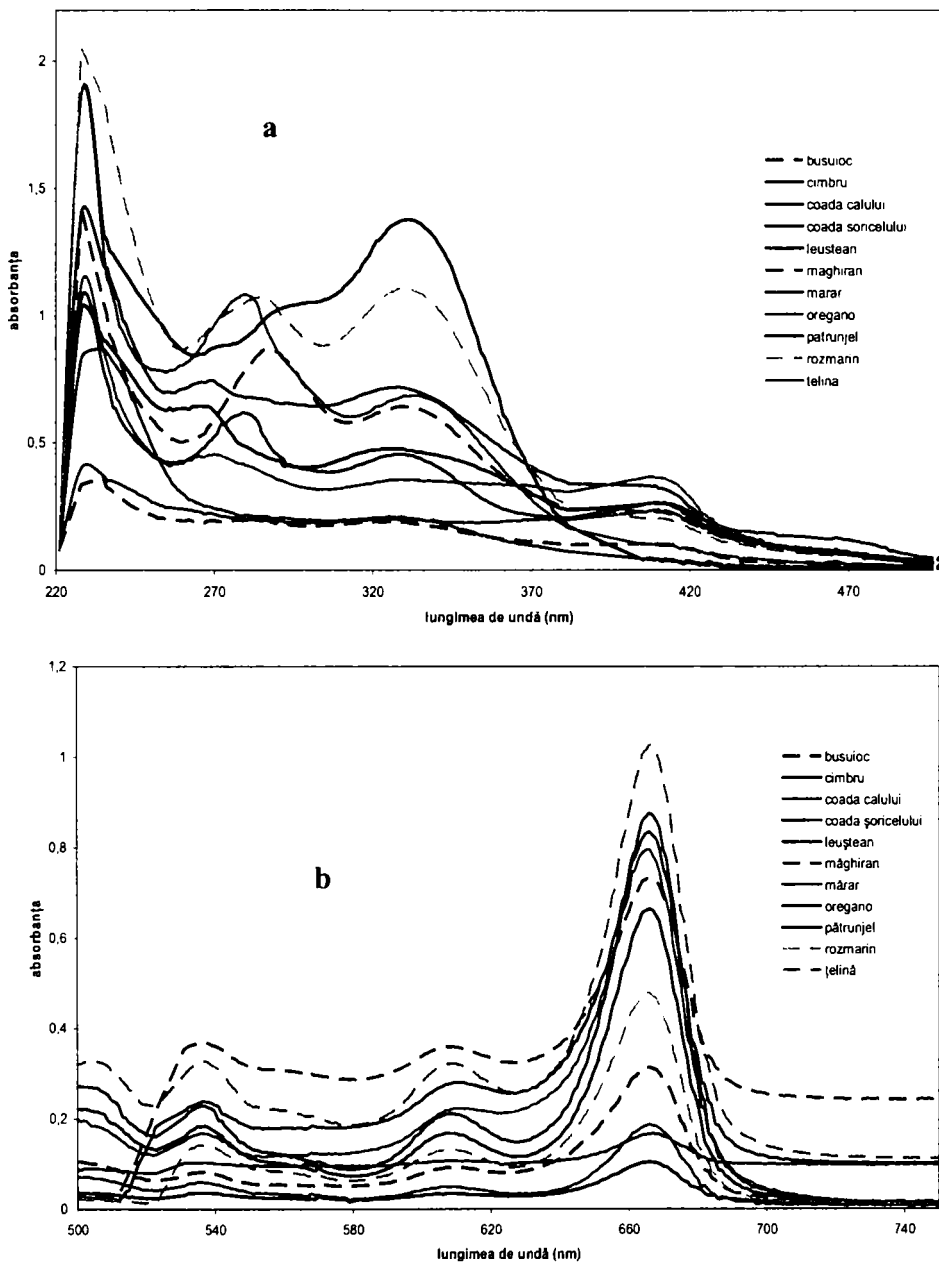


Figura 27 a și b. Spectrele UV-VIZ ale tincturilor studiate

Atribuirea valorilor din figura 27 este următoarea [170, 178, 179]:

- în domeniul 200-350 nm se evidențiază benzi aparținând tranzițiilor de tip $\pi \rightarrow \pi^*$ și $n \rightarrow \pi^*$ date de alchene conjugate, compuși carbonilici, carboxilici și derivați ai acestora, chinone, structuri aromatice substituie cu grupări acide și hidroxilice (flavone, catechine, vitamine, acizi organici, etc.);

- în domeniul 340-800 nm benzile de absorbție provin din tranziții de tip $n \rightarrow \pi^*$ date de structuri cu conjugare extinsă (catechine, caroteni, vitamine, steroli, etc.)

Pe lângă benzile comune cu ale etaloanelor există și valori caracteristice altor grupări prezente în extracte [172, 180, 181]:

- semnalul de la 270 nm se poate datora conjugării unor cetone;
- banda caracterizată de maxime între 284-290 nm este specifică acizilor organici;
- banda caracterizată de maxime între 335-338 nm indică prezența compușilor cu conjugare extinsă
- banda caracterizată de maxime între 405-419 nm indică prezența compușilor cu conjugare extinsă și a grupărilor funcționale de tipul (OH) sau (CO) atașate la (C=C);
- semnalele de la 510 și 541 nm ar putea fi datorate unor structuri chinonice conjugate;
- banda de la 600-700 nm pune în evidență existența unor structuri cu conjugare extinsă precum și a unor grupări funcționale provenite probabil din taninuri, flavone sau polifenoli

Dacă în prima parte a spectrelor din figura 27 (intervalul 220-500 nm) valorile λ_{\max} erau destul de împrăștiate, pe intervalul 500-900 nm se constată repetitivitatea apariției unor maxime și anume: 510 nm (în cazul a trei dintre tincturile studiate), 541 nm, 615 nm și 670 nm la toate tincturile analizate. Comparând aceste valori cu spectrele pentru clorofila a și b [180] se constată identitatea aproape perfectă ceea ce înseamnă posibilitatea atribuirii lor unor structuri de tip porfirinic. De altfel era de așteptat ca extractul alcoolic să conțină acest tip de structuri, în special clorofila care se găsește din abundență în frunze.

Cantitatea de clorofilă poate fi determinată pe baza unei formule inspirată de AOCS [44, 181]:

$$\text{Clorofila (ppm)} = \frac{12,5 \cdot [A_{670} - (A_{630} + A_{710}) \cdot 0,5]}{0,101 \cdot L} \quad (\text{II.4-1})$$

unde 12,5 este diluția probei, A este absorbanta iar L este grosimea cuvei (1 cm).

Rezultatele obținute pentru cele 11 tincturi studiate sunt redată în tabelul 12.

Tabel 12. Cantitatea de clorofilă din tincturile analizate

Tinctura	Cantitatea de clorofilă (ppm)
Busuioc	28,8
Cimbru	70,6
Coadă calului	71,7
Coadă șoricelului	9,16
Leuștean	87,8
Măghiran	49,9
Mărar	7,3
Oregano	18,5
Pătrunjel	65,6
Rozmarin	45,8
Țelina	92,9

Prezența clorofilei și/sau a altor structuri porfirinice ridică probleme deosebite legate de durata de viață a tincturilor, din cauza faptului că acest tip de substanțe sunt fotosensibilizatori [179]. Acesta este motivul pentru a fost studiat efectul diferitelor metode de îndepărtare a clorofilei asupra activității antioxidante/antiradicalice a extractelor alcoolice. Rezultatele obținute sunt redată în paragraful II.5.2.

SPECTROSCOPIE ÎN INFRAROȘU

Spectrele în infraroșu au fost trasate pentru trei dintre tincturile studiate și anume tinctura cu cea mai scăzută activitate antioxidantă (cea de coada calului) și cele 2 tincturi cu cea mai ridicată activitate antioxidantă (de coada șoricelului și de rozmarin).

Reactivi

KBr de puritate spectrală (Merck, Germania).

Aparatura

Aparatul utilizat pentru înregistrarea spectrelor IR a fost de tip SPECORD 80.

Mod de lucru

Analiza în domeniul infraroșu ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) s-a efectuat prin metoda pastilării cu bromură de potasu. Anterior analizei, tincturile studiate au fost aduse la sec prin evaporarea alcoolului.

Rezultate obținute

Spectrele IR ale celor 3 tincturi studiate sunt prezentate în figura 28 iar valorile benzilor spectrale caracteristice în tabelul 13.

Tabel 13. Benzi spectrale caracteristice tincturilor de coada calului, coada șoricelului și rozmarin

Tinctura	Număr de undă, cm^{-1}
Coada calului	3404; 3040; 2924; 2884; 2856; 2368; 2348; 2340; 2336; 2300; 1714; 1628; 1552; 1384; 1332; 1076; 808; 616; 568; 554; 542; 534; 518; 510; 476; 472; 468; 460; 396; 380; 376; 372; 368; 364; 348; 330
Coada șoricelului	3424; 3000; 2924; 2396; 2368; 2336; 2332; 2300; 1714; 1680; 1612; 1540; 1384; 1320; 1260; 1210; 1068; 888; 616; 590; 558; 540; 532; 508; 504; 496; 488; 480; 476; 472; 468; 464; 402; 388; 378; 368; 354; 346; 340; 336
Rozmarin	3432; 3036; 2928; 2444; 2368; 2356; 2344; 2340; 2332; 2300; 1714; 1680; 1636; 1528; 1384; 1348; 1050; 838; 610; 592; 584; 572; 568; 552; 546; 540; 532; 526; 512; 508; 500; 458; 402; 394; 380; 372; 354; 348; 344; 336

Se remarcă abundența de benzi spectrale datorată multitudinii de compuși din cele trei extracte. Dintre acestea unele sunt comune cel puțin pentru două din cele trei extracte și e posibil a fi atribuite după cum urmează [179]:

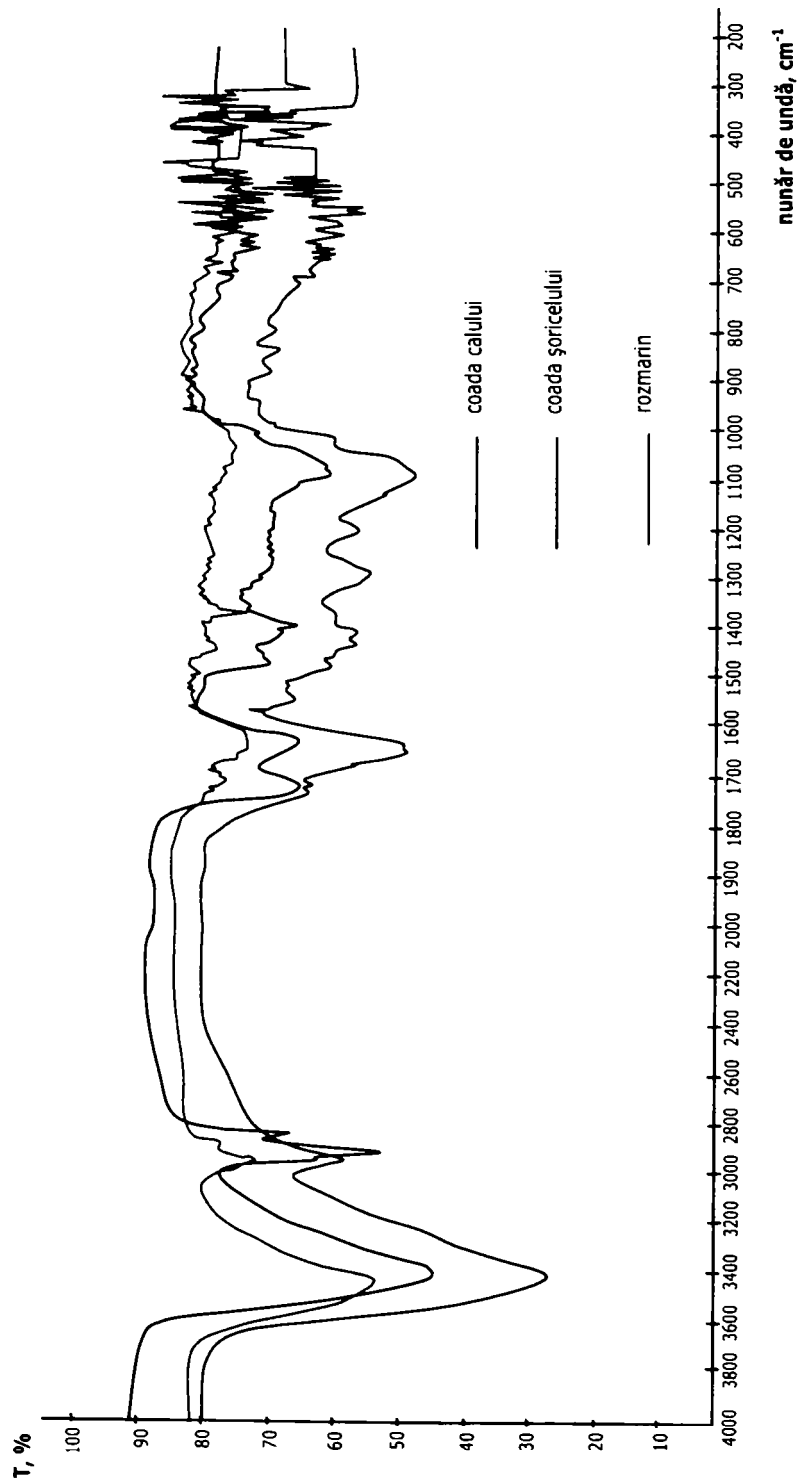


Figura 28. Spectrele IR ale tincturilor de coada calului, coada șoricelului și rozmarin

- valorile din preajma lui 3400 cm^{-1} ar putea fi datorate unor grupări $-\text{OH}$ asociate dar și unor amine sau amide; existența celor dintâi este confirmată și de picurile din intervalul $1050\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$, caracteristice legăturii C-O (alcoolice sau eterice);
- valorile între $2850\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ sunt caracteristice legăturilor C-H; valori peste 3000 cm^{-1} indică existența unor legături duble alifatică sau aromatică; prezența nucleelor aromatice este confirmată de existența unor picuri în preajma lui 1500 și respectiv 1600 cm^{-1} , iar a alchenelor de picul de la 1680 cm^{-1} ; caracteristic pentru gruparea metil este picul de la 1384 cm^{-1} ;
- prezența structurilor nesaturate substituie este evidențiată și de multitudinea de benzi din intervalul $400\text{-}900\text{ cm}^{-1}$;
- picul intens de la 1714 cm^{-1} este caracteristic grupării carbonilice din aldehide, cetone, acizi carboxilici, esteri, amide sau anhidride.

Ținând cont de aceste informații se poate presupune existența în compoziția tincturilor a unor compuși de tip polifenolici, responsabili, după cum se știe, de activitatea antioxidantă a multor extracte [122, 123, 131, 137].

CONȚINUTUL TOTAL DE FLAVONOIDE

Spectrele UV-VIZ ale celor 11 tincturi studiate au pus în evidență existența unor benzi de absorbție caracteristice flavonoidelor. Conținutul total de flavonoide a fost determinat prin metoda lui Marinova și colab. [182].

Reactivi

quercetină, 2-(3,4-dihidroxi-fenil)-3,5,7-trihidroxi-chromen-4-ona, (p.a.) (Merck); azotit de sodiu (NaNO_2), clorură de aluminiu (AlCl_3) și hidroxid de sodiu (NaOH) (Chimopar, București)

Aparatura

Toate experimentele au fost realizate utilizând un spectrofotometru Uvikon 930.

Mod de lucru

Modul de preparare al tincturilor a fost descris în paragraful II.2.b.

1 mL probă sau soluție standard de quercetină a fost introdus într-un balon cotat de 10 mL conținând 4 mL de apă bidistilată. În vas au fost adăugați 0,3 mL NaNO_2 5%. După 5 minute s-au adăugat 0,3 mL AlCl_3 10%. În minutul 6 s-au adăugat 2 mL NaOH 1M și s-a completat până la semn cu apă bidistilată. Absorbanța soluției obținute s-a citit față de blank de reactivi la 510 nm. Probele au fost analizate în duplicat.

Rezultate obținute

Dreapta de etalonare pentru quercetină și ecuația corespunzătoare sunt prezentate în figura 29.

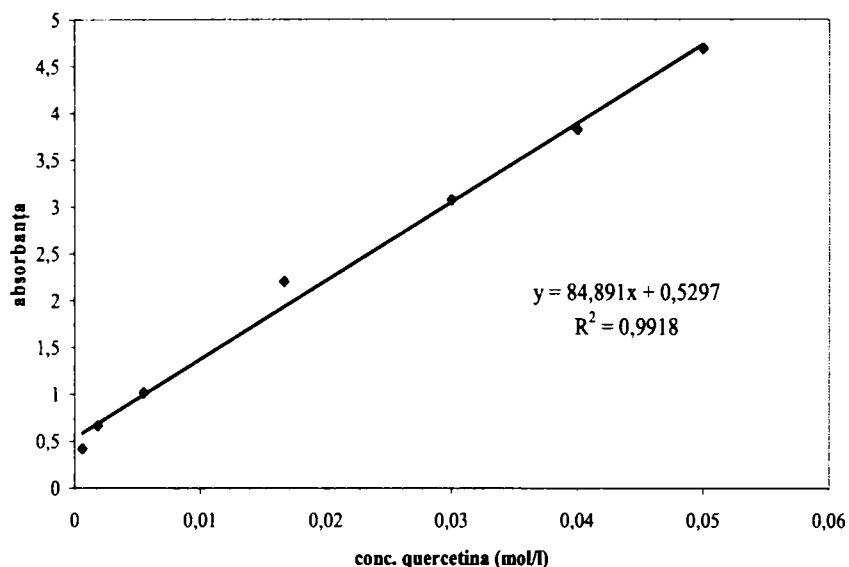


Figura 29. Dreapta de etalonare pentru quercetină, la 510 nm

În ecuația din figura 29, „y” reprezintă absorbanta iar „x” reprezintă concentrația de quercetină (mol/L). Pe baza acestei ecuații, conținutul total de flavonoide din fiecare tinctură poate fi exprimat ca și concentrație echivalentă de quercetină, dacă se cunoaște valoarea absorbantei corespunzătoare, cu ajutorul formulei:

$$x = \frac{y - 0,5297}{84,891} \quad (\text{II.4-2})$$

Valorile obținute sunt redată în tabelul 14.

Tabel 14. Conținutul total de flavonoide exprimat ca și concentrație echivalentă de quercetină

Tinctura	Concentrația (mol/L)·10²
Busuioc	1,518
Cimbru	3,796
Coadă calului	1,089
Coadă șoricelului	2,316
Leuștean	3,257
Măghiran	4,575
Mărar	1,176
Oregano	4,059
Pătrunjel	1,849
Rozmarin	3,773
Telina	2,613

Se observă că cel mai mare conținut de flavonoide îl are tinctura de măghiran ($4,575 \cdot 10^{-2}$ mol/L), urmată de tinctura de oregano ($4,059 \cdot 10^{-2}$ mol/L) și cea de cimbru ($3,796 \cdot 10^{-2}$ mol/L). Tinctura de rozmarin și cea de coada șoricelului,

care au dovedit cea mai ridicată activitate antioxidantă au un conținut ceva mai scăzut de flavonoide (3,773 mol/L și respectiv 2,316 mol/L). Se constată că cele patru tincturi care au fost eliminate din mixtura finală datorită activității antioxidante scăzute (tinctura de coada calului, de mărar, de pătrunjel și cea de țelină) prezintă și cele mai mici valori pentru conținutul total de flavonoide. Cu toate acestea nu s-a putut face o corelație satisfăcătoare între conținutul de flavonoide și activitatea antioxidantă a extractelor studiate, ceea ce indică faptul că compușii flavonoidici nu sunt singurii responsabili de activitatea antioxidantă a acestora.

DOZAREA RUTINEI ȘI QUERCETINEI PRIN CROMATOGRAFIE DE LICHIDE DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ (HPLC)

Cromatografia de lichide de înaltă performanță a fost utilizată în numeroase ocazii pentru analiza flavonoidelor, iar rutina și quercetina sunt două dintre flavonoidele cele mai întâlnite în extractele vegetale [183].

Reactivi

acetonitril și acid fosforic de puritate cromatografică (Merck), rutină (puritate 100%) și quercetină (puritate 99%) (Fluka)

Aparatura și modul de lucru

Sistemul HPLC utilizat (Varian) a constat din: Varian ProStar Valvemodule model 500, Autosampler model 410, Solvent delivery module 240, Interfață Varian Star 800, Detector UV model 345. Coloana utilizată a fost Varian ChromSep HPLC OmniSpher 5 C18, 150 x 4,6 mm, dimensiunea particulelor 5 mm. Condițiile de lucru au fost următoarele: debit 1 mL/min, faza mobilă: 50% acetonitril, 50% tampon fosfat (pH 2,5), volumul de injecție: 10 mL (cu excepția tincturii de coada șoricelului, la care volumul de injecție a fost (5 mL), iar detecție la 360 nm.

Rezultate obținute

Ecuția corespunzătoare dreptei de etalonare pentru rutină a fost:

$$y = 1,159400e + 007x + 7,015602e + 003 \quad (r^2 = 1,000) \quad (\text{II.4-3})$$

iar pentru quercetină a fost:

$$y = 1,652625e + 007x + 3.335234e + 004 \quad (r^2 = 0.999) \quad (\text{II.4-4})$$

Cromatogramele corespunzătoare celor 11 extracte sunt redată în anexa 3. Timpii de retenție și concentrațiile celor două flavonoide urmărite sunt prezentate în tabelul 15.

Se observă că quercetina se găsește în cantități foarte mici în tincturile de cimbru, măghiran, mărar, oregano și pătrunjel (concentrația maximă găsită: 0,0521 mg/mL în tinctura de oregano), în urme în tincturile de busuioc, coada șoricelului, leuștean și țelină și deloc în tincturile de coada calului și rozmarin.

Tabel 15. Timpii de retenție și concentrațiile rutinei și quercetinei în cele 11 tincturi analizate

Extract	Compusul analizat	t_R (min)	mg/mL extract
Busuioc	Rutină	1,122	0,1198
	Quercetină	2,188	Urme
Cimbru	Rutină	1,167	0,1209
	Quercetină	2,201	0,013
Coada calului	Rutină	1,143	0,1386
	Quercetină	-	-
Coada șoricelului	Rutină	1,164	1,1748
	Quercetină	2,193	Urme
Leuștean	Rutină	1,116	0,6506
	Quercetină	2,095	Urme
Măghiran	Rutină	1,159	0,932
	Quercetină	2,211	0,0413
Mărar	Rutină	1,146	0,233
	Quercetină	2,095	0,0027
Oregano	Rutină	1,156	0,3831
	Quercetină	2,211	0,0521
Pătrunjel	Rutină	1,132	0,5124
	Quercetină	2,169	0,0003
Rozmarin	Rutină	1,176	0,6951
	Quercetină	-	-
Țelină	Rutină	1,135	0,3321
	Quercetină	-	Urme

Rutina a fost identificată în toate tincturile analizate, în cantități mult mai mari comparativ cu quercetina. Cantitatea cea mai mare de quercetină a fost găsită în tinctura de coada șoricelului (1,1748 mg/mL), iar cantitatea cea mai mică în tinctura de busuioc (0,1198 mg/mL).

II.4.2.2. Antociani și antocianidine

Reprezintă derivați hidroxiilați ai sării de 7-hidroxi-2-fenilbenzopiriliu (sare de flaviliu) ce se găsesc în plante, sub formă liberă numite antocianidine sau sub formă de glicozide (având un rest de monozaharidă legat de una din grupele OH) numite antociani [184].

Dozarea antocianidinelor se bazează pe proprietatea acestora de a prezenta o absorbție maximă a radiațiilor cu lungimea de undă 550 nm în soluție alcoolică și acidă [185].

Reactivi

acid clorhidric concentrat și alcool etilic 96% (Chimopar)

Aparatura

Toate determinările au fost realizate cu ajutorul unui spectrofotometru UVIKON 930.

Mod de lucru

S-a preparat o soluție alcoolică acidulată astfel: într-un balon cotat de 1000 cm³ s-au introdus 20 cm³ acid clorhidric concentrat ($d = 1,19 \text{ g/cm}^3$) și s-a adus la semn cu alcool etilic 96%.

Pentru efectuarea determinării, într-un balon cotat de 100 cm³ s-au pipetat 10 cm³ soluție extractivă. Imediat s-a adus la semn cu soluție alcoolică acidă. După omogenizare s-a centrifugat la 3000 rotații/minut, în fiole închise, timp de 5 minute sau s-a lăsat câteva ore pentru limpezire.

Extincțiile s-au măsurat la 550 nm, matorul fiind soluția alcoolică acidulată.

Rezultate obținute

Conținutul în antocianidine s-a determinat cu relația [185]:

$$m = 15 \cdot D_0 \text{ (mg/l)} \quad (\text{II.4-5})$$

în care: D_0 – extincția la 550 nm; 15 – coeficient determinat experimental.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 16.

S-a găsit că cel mai mare conținut în antocianidine îl are tinctura de țelină, iar cel mai mic tincturile de mărar și de coada șoricelului. Nici în acest caz nu s-a putut face o corelație satisfăcătoare între conținutul de antocianidine și activitatea antioxidantă a extractelor studiate.

Tabel 16. Conținutul de antocianidine al tincturilor studiate

Tinctura	Absorbanța la $\lambda = 550 \text{ nm}$	Conținut antocianidine (mg/L)
Busuioc	0,0740	1,11
Cimbru	0,1857	2,7855
Coada calului	0,1795	2,6925
Coada șoricelului	0,0312	0,468
Leuștean	0,2004	3,006
Măghiran	0,1297	1,9455
Mărar	0,0292	0,438
Oregano	0,0568	0,852
Pătrunjel	0,1656	2,484
Rozmarin	0,1263	1,8945
Țelina	0,2361	3,5415

II.4.2.3. Taninuri

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

Din punct de vedere fiziologic, taninurile sunt considerate factori de apărare ai plantelor împotriva infecțiilor bacteriene și virale (precipită proteinele microorganismelor), antioxidanți (sunt puternic reducători), transportori de hidrogen (participă la sisteme redox celulare); unii autori consideră taninurile substanțe de

rezervă pentru organismele vegetale întrucât dispar din semințe în perioada încolțirii [186].

Metoda de determinare a acestora [185] a constatat în titrarea la rece cu KMnO_4 în prezența indigoului carmin folosit ca și indicator de oxido-reducere.

Reactivi

Sulfat de amoniu; acetonă; eter; KMnO_4 , soluție 0,01N proaspăt preparată; soluție alcoolică tartrică ce conține 10% în volume alcool etilic absolut și 5g/L acid tartric neutralizat cu KOH 1N (pentru prepararea acesteia, într-un balon cotat de 1000 mL s-au introdus 100 mL alcool etilic absolut, 5 g acid tartric și 33 mL KOH 1N și s-a adus la semn cu apă distilată); soluție de indigo carmin 0,15 g/L proaspăt preparată (pentru prepararea acesteia, într-un balon cotat de 1000 mL s-au introdus 50 mL soluție de indigo-carmin 3g/L filtrată, 50 mL H_2SO_4 33,33% în procente de volum și s-a completat cu apă).

Mod de lucru

Pentru obținerea taninurilor cu grad mare de puritate, tinctura a fost saturată cu sulfat de amoniu. Precipitatul format a fost separat prin filtrare și supus uscării prin evaporare. Materialul brut uscat a fost purificat prin reluare cu acetonă la reflux. Reziduul de distilare a fost spălat cu eter și supus din nou uscării. Pentru determinarea cantitativă a substanțelor tanante materialul uscat a fost dizolvat în apă rece.

Pentru efectuarea determinării, într-un flacon de 100 mL s-au pipetat 50 mL soluție de indigo-carmin 0,15% și 2 mL din soluția de analizat. S-a titrat cu KMnO_4 , 0,01N până la dispariția colorației albastre și apariția colorației galbene. S-a notat cu V_1 volumul de soluție de KMnO_4 utilizat la titrare. Proba titrată a fost păstrată, pentru a putea compara colorația obținută cu colorația de la proba următoare.

Într-un alt vas conic de 100 mL s-au adăugat 50 mL soluție de indigo-carmin 0,15% și 2 mL soluție alcoolică tartrică. S-a titrat cu KMnO_4 , 0,01N până la colorație identică cu colorația probei anterior titrată. S-a notat cu V_2 volumul de soluție de KMnO_4 utilizat la titrare. Determinările s-au efectuat în duplicat.

Rezultate obținute

Valorile obținute pot fi influențate de prospețimea soluției de indigo carmin, caracterizată printr-o culoare albastră, vie. Conținutul de taninuri (mg/L) s-a calculat cu formula [185]:

$$m = 2 \cdot (V_1 - V_2) \text{ (mg/l)} \quad (\text{II.4-6})$$

Rezultatele sunt redată în tabelul 17. Reproducibilitatea a fost bună.

Tabel 17. Conținutul de taninuri al tincturilor studiate

Tinctura	Conținut taninuri (mg/L)
0	1
Busuioc	1,9
Cimbru	9,1
Coadă calului	0,7
Coadă șoricelului	11,4
Leuștean	5,9
Măghiran	14,4

0	1
Mărar	3,2
Oregano	14,9
Pătrunjel	0,4
Rozmarin	23,52
Telina	2

Cea mai mare valoare a indicelui de permanganat a fost găsită în cazul rozmarinului, aproape dublă față de următoarele două tincturi bogate în taninuri: tinctura de oregano și cea de măghiran. Cea mai mică valoare a fost întâlnită în cazul tincturii de pătrunjel.

II.5. POSIBILITĂȚI DE UTILIZARE A MIXTURII ANTIOXIDANTE PROPUSE

Prima parte a cercetărilor experimentale proprii a condus la propunerea unei mixturi antioxidante extrem de eficientă la testările *in vitro* obținută prin macerarea alcoolică a unor cantități egale de **coada șoricelului, rozmarin, măghiran, cimbri, leuștean, oregano și busuioc** uscate, conform Farmacopeei [151].

În cea de-a doua parte a contribuțiilor proprii s-au efectuat cercetări pentru a stabili aplicabilitatea mixturii propuse.

Pentru aceasta s-au testat în prima fază caracteristicile și comportarea la oxidare a unor uleiuri înalt oleice obținute pentru prima dată în țara noastră, în anul 2006, din specii hibride de floarea soarelui importate din Italia (II.5.1).

A fost studiat de asemenea efectul metodelor de îndepărtare a clorofilei (din mixtura analizată), prin adsorbție pe adsorbanți solizi, asupra activității antioxidante și a compoziției acesteia (II.5.2).

Testările eficacității mixturii antioxidante s-au efectuat pe uleiul înalt oleic cu cel mai mare conținut de acid linoleic (obținut din hibridul Carnia) și pe untură de porc (II.5.3).

Etapile oxidării au fost evidențiate prin analiză termică (II.5.4) pentru ulei de tip Carnia și pentru untură cu și fără adaos de antioxidanți.

S-a studiat de asemenea activitatea antimicrobiană a amestecului propus (II.5.5).

II.5.1. ANALIZA CARACTERISTICILOR ȘI STANDARDELOR DE CALITATE PENTRU ULEIUL DE FLOAREA SOARELUI TIP „ÎNALT OLEIC” OBȚINUT DIN EXPERIMENTELE AGRICOLE REALIZATE ÎN ZONA ARAD ÎN ANUL 2006

S-a urmărit stabilirea compoziției în acizi grași nesaturați a patru tipuri de uleiuri cu conținut ridicat în acid oleic, obținute prin presare la rece, din hibridii de floarea soarelui: Carnia, PR64H45, PR64H91 și PR65A22 (produse special pentru acest studiu de S.C. Feragro S.R.L.); determinarea unor parametri fizico-chimici ai uleiurilor; studiul comportării celor patru tipuri de uleiuri la oxidare. Rezultatele au fost comparate cu valorile obținute pentru un ulei obținut dintr-un hibrid obișnuit de floarea soarelui, Banatia obținut tot de la S.C. Feragro S.R.L..

Mod de lucru

Metodele de analiză aplicate sunt în conformitate cu standardele ISO:

- Determinarea conținutului în acizi grași a fiecărui tip de ulei prin cromatografie de gaze (ISO 5508:1990), datele fiind analizate statistic prin metoda ANOVA
- Determinarea acidității conform ISO 3656:1996
- Determinarea indicelui de peroxid conform ISO 3960:2001
- Determinarea indicelui de refracție conform ISO 6320:2000 folosind refractometrul automat ABBEMAT
- Determinarea absorbanței în UV conform ISO 3656:2002; pentru determinarea spectrelor în domeniul UV (folosind spectrofotometrul Ultrospec III de la Pharmacia-LKB) a fost necesară diluarea probelor după cum urmează:
 - pentru ulei normal: 3 mL solvent (izoctan) + 3μl ulei
 - pentru uleiurile obținute din hibridi: 3 mL solvent (izoctan) + 10μl ulei

Pentru determinarea vâscozității, a densității și a conductivității s-au folosit metodele curente, descrise în literatură [187].

Rezultate obținute

- Determinarea conținutului în acizi grași

În cadrul unui program de colaborare cu Universitatea de Studii din Udine (BIOSUN), cele 4 uleiuri obținute din hibridi înalt oleici au fost analizate prin gaz-cromatografie pentru determinarea conținutului în acizi grași. S-a determinat de asemenea % de ulei din semințe (tabelul 18).

Tabel 18. Conținutul în acizi grași și procentul de ulei din semințe

Hibrid	Acid palmitic, %	Acid stearic, %	Acid oleic, %	Acid linoleic, %	Conținut ulei în semințe (%)
Carnia	4,54	2	85,2	5,8	42,3
PR64H45	4,5	3,3	85,12	3,21	43,61
PR64H91	3,31	1,7	91,2	2,05	46,09
PR65A22	4,39	1,26	88,13	3,21	47,11

Din rezultatele obținute se poate observa că toate tipurile de hibridi studiate prezintă un conținut ridicat de ulei (peste 42%), valoarea cea mai ridicată este pentru PR65A22 (47,11%) urmat de PR64H91 cu un conținut de 46,09%. Procentul de acid oleic este foarte ridicat la toate cele patru probe, uleiul PR64H91 având valoarea cea mai mare (91,2%). Uleiurile Carnia și PR64H91 au conținut aproape identic de acid oleic, dar conținutul de acid linoleic este mai mare în cazul uleiului Carnia (5,8%). Uleiul PR64H91 are cel mai scăzut procent de acid palmitic (3,31%), la celelalte uleiuri diferențele fiind nesemnificative. Conținutul de acid stearic cel mai mare îl are uleiul PR64H45 iar cel mai mic uleiul PR65A22.

- Determinarea vâscozității, densității și acidității

Rezultatele obținute în urma determinării acestor indici se încadrează în limitele normale și sunt trecute în tabelul 19:

Tabel 19. Viscositatea, densitatea și aciditatea uleiurilor analizate

Tip ulei	Carnia	PR64H45	PR64H91	PR65A22	Banatia
Viscozitatea ($^{\circ}$ Engler)	6,09	6,26	6,19	6,1	4,12
Densitatea (g/cm^3)	0,909	0,91	0,9	0,911	0,917
Aciditate (% acid oleic)	1,49	1,61	1,57	1,7	5,57

- Verificarea stabilității la oxidare

Uleiurile au fost supuse unei oxidări accelerate la temperatura de 110°C timp de 100 de ore, într-un cuptor Caloris L1003 prevăzut cu ventilație. Probele au fost recoltate la intervalul de 12, 36, 60 și 100 ore și s-au determinat indicele de peroxid, indicele de refracție, absorbanta în domeniul UV și evoluția conductivității. Determinările au fost făcute la temperatura camerei.

A. *Indicele de peroxid (IP)*

Indicele de peroxid (IP) a fost determinat conform normelor ISO 3656:1996. Variația IP în timp, pentru cele patru uleiuri analizate și pentru uleiul normal de floarea soarelui sunt redate în tabelul 20.

Tabel 20. Valorile IP pentru uleiurile analizate

Timp (h)	Indice de peroxid (meq peroxid/kg)				
	Carnia	PR64H45	PR64H91	PR65A22	Banatia
0	0,535	0,56	0,546	0,541	0,5543
12	0,846	0,697	0,566	0,627	0,972
36	0,462	0,407	0,311	0,505	1,030
60	0,990	0,738	0,622	0,856	0,676
100	2,288	1,986	1,132	0,986	0,750

Din rezultatele obținute se observă că acizii grași supuși temperaturii ridicate au suferit o modificare semnificativă în primele 12 ore, pentru toate probele analizate. În prima perioadă IP crește datorită peroxidării acizilor grași din compoziția uleiurilor.

După această perioadă valorile IP variază, datorită avansării proceselor de oxidare și instabilității hidroperoxidilor formați, la temperaturi ridicate.

Valorile mici ale indicilor de peroxid, obținute pentru uleiul din floarea soarelui tip Banatia, trebuie privite cu circumspecție: cel mai probabil sunt consecința transformării unei cantități importante din hidroperoxidii formați în prima etapă în produși avansați ai oxidării.

B. *Determinarea indicelui de refracție*

Variația indicelui de refracție pe parcursul oxidării pentru cele cinci uleiuri analizate este redată în figura 30.

Formarea preponderentă a hidroperoxidilor în prima etapă este evidențiată de minimele înregistrate după 12 ore. După acest interval de timp indicii de refracție au crescut, corelat cu descompunerea hidroperoxidilor și formarea produșilor finali de oxidare, către finalul procesului ajungând toți la aproximativ aceeași valoare.

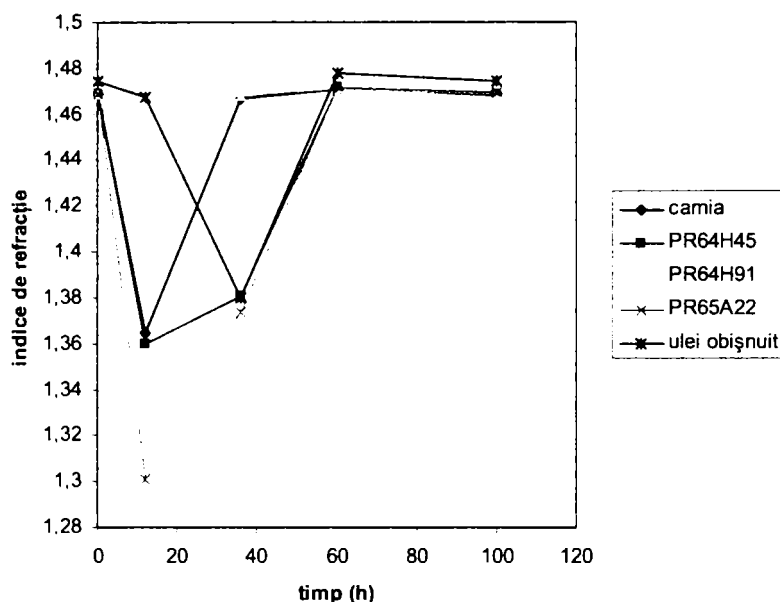


Figura 30. Variația indicelui de refracție

C. Determinarea absorbanței în domeniul UV

Se știe că temperatura înaltă este promotor a oxidării acizilor grași iar determinarea absorbanței în domeniul UV este un indice analitic bun pentru măsurarea alterărilor oxidative. Producții procesului de oxidare prezintă absorbție maximă la diferite lungimi de undă, unii dintre aceștia în intervalul 220-330 nm (tabelul 21) [188].

Tabel 21. Maximele absorbanței principalelor grupări cromofore ale produșilor de oxidare

Produs	λ_{max} (nm)
monoena	190
diena	220-230
triena	265-270
tetraena	310-320
ceto-aldehide	265-280
α -ceto-aldehide	282
α , β etilen-ceto-aldehide	220-250; 310-330
α -dicetone	280
β -dicetone	274
acizi α -cetonici	210

Monitorizând spectrele UV ale alterărilor probelor analizate se pot obține informații utile privind procesul de oxidare a acizilor grași. Primii compuși ai oxidării pot fi puși în evidență în jurul lungimii de undă de 230 nm [189]. Spectrele UV ale probelor de ulei analizate (referința: izooctan), în funcție de timp, sunt prezentate în figurile 31-35.

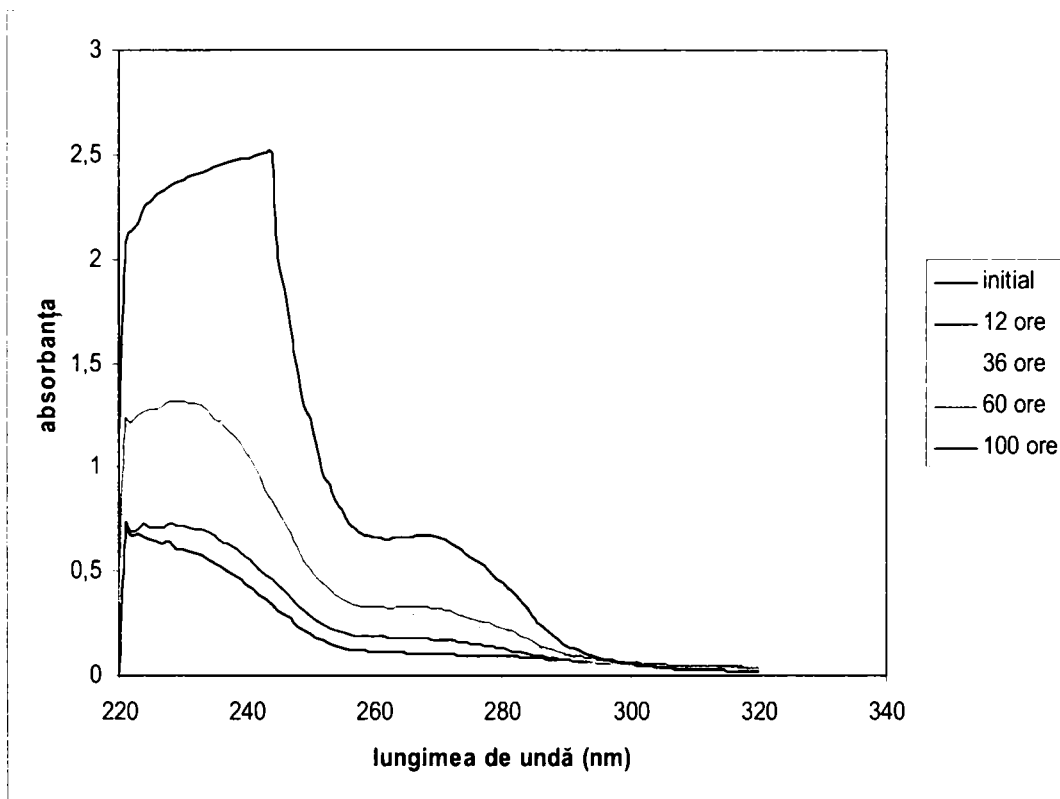


Figura 31. Spectrele UV pentru ulei normal (obișnuit) supus oxidării accelerate

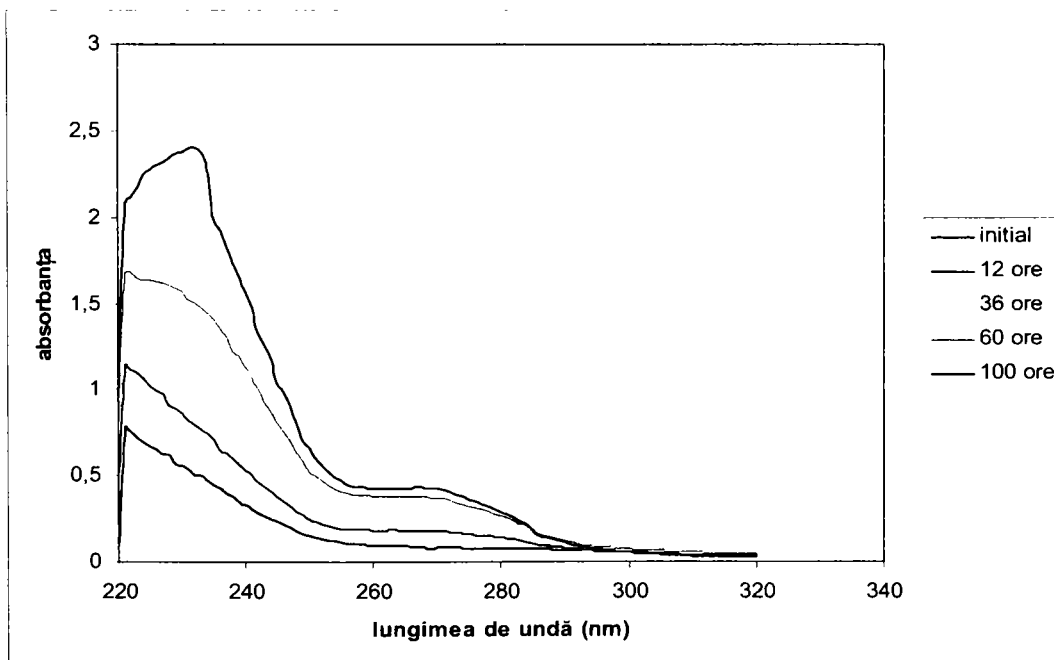


Figura 32. Spectrele UV pentru ulei Carnia supus oxidării accelerate

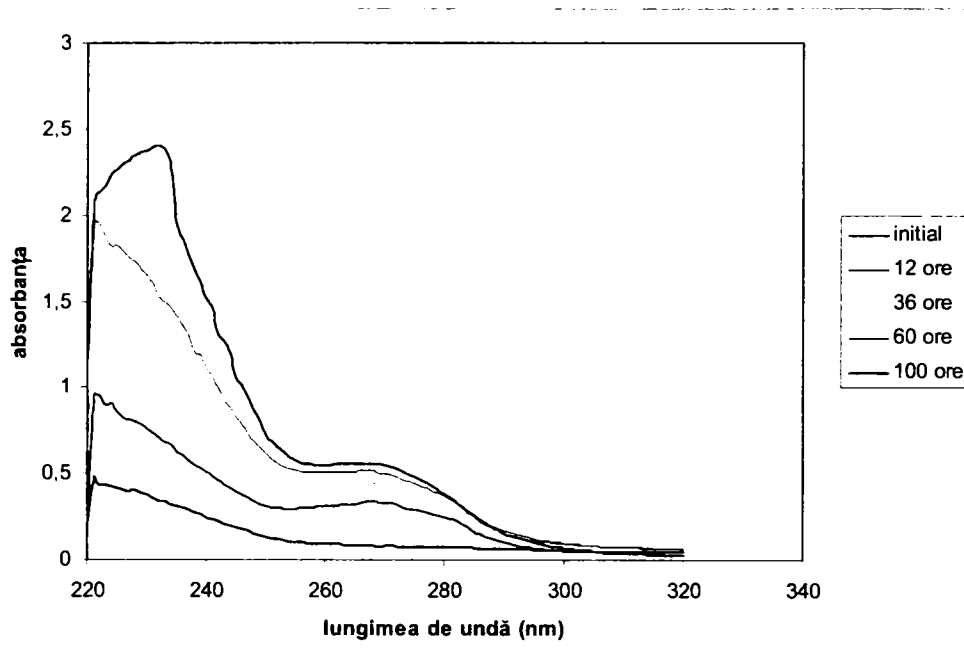


Figura 33. Spectrele UV pentru ulei PR65A22 supus oxidării accelerate

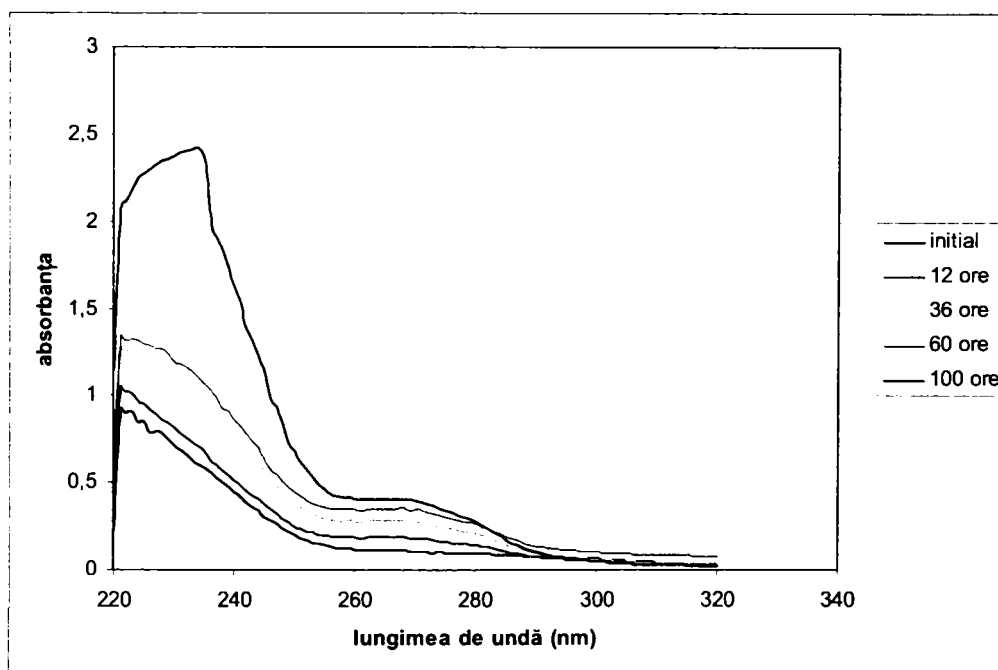


Figura 34. Spectrele UV pentru ulei PR64H45 supus oxidării accelerate

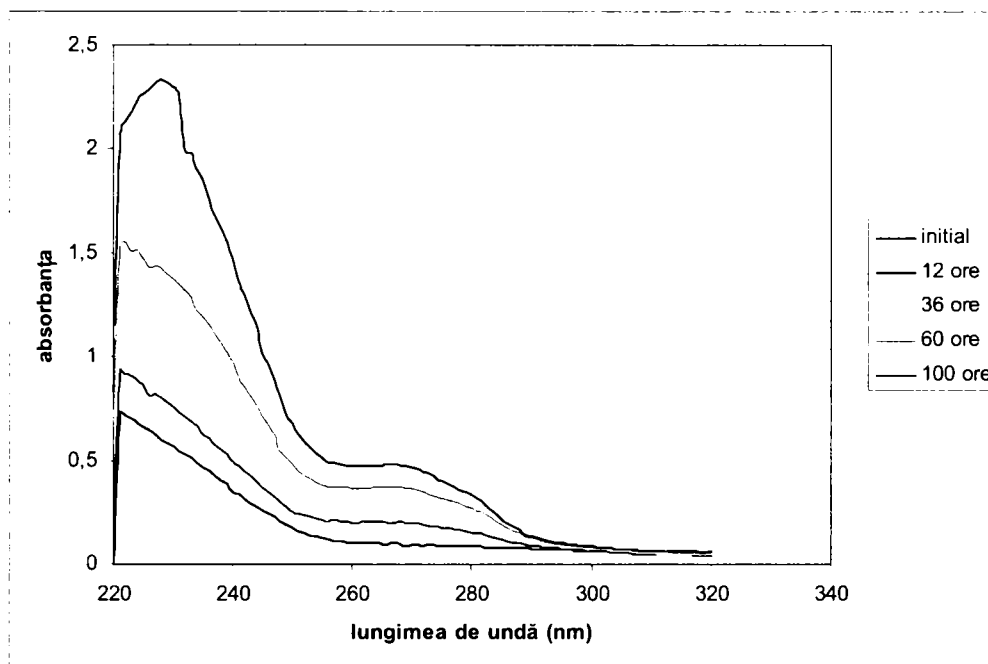


Figura 35. Spectrele UV pentru ulei PR64H91 supus oxidării accelerate

Ținând cont de valorile obținute pentru absorbanta se pot calcula extincțiile specifice la 232 și 270 nm, corespunzătoare formării dienelor și trienelor conjugate (K_{232} respectiv K_{270}), cu ajutorul formulei [189]:

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \cdot l} \quad (\text{II.5-1})$$

unde: K_{λ} și E_{λ} - extincția specifică respectiv absorbanta la lungimea de undă λ ; c - concentrația (g/100 mL); l - grosimea cuvei (cm).

Valorile K_{232} respectiv K_{270} sunt reprezentate grafic în figurile 36 și 37.

Se remarcă creșterea mult mai pronunțată a acestor valori, în timp, în cazul uleiului obișnuit (normal). Acest fapt indică o stabilitate mult mai redusă la oxidare a uleiului normal comparativ cu cele patru uleiuri înalt oleice.

Dintre uleiurile înalt oleice cele mai mari valori atât pentru K_{232} cât și pentru K_{270} au fost calculate pentru PR65A22. Rezultatul este surprinzător întrucât, conform datelor din tabelul 18 nu acesta este uleiul cu conținutul cel mai mare de acizi grași nesaturați. O posibilă explicație constă în conținutul diferit de substanțe cu efect antioxidant de tipul tocoferolilor, care se găsesc în mod natural în uleiul de floarea soarelui.

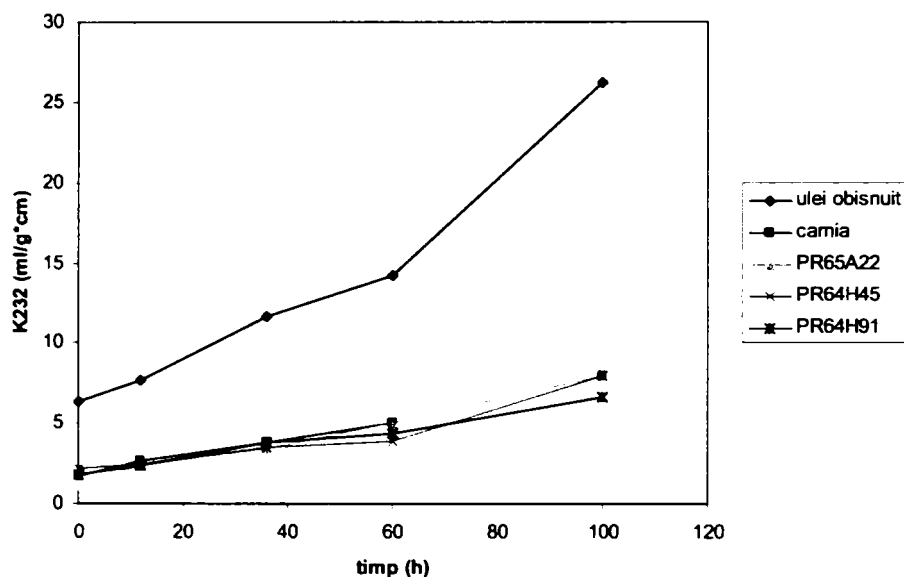


Figura 36. Valorile K_{232} pentru uleiurile de floarea soarelui studiate

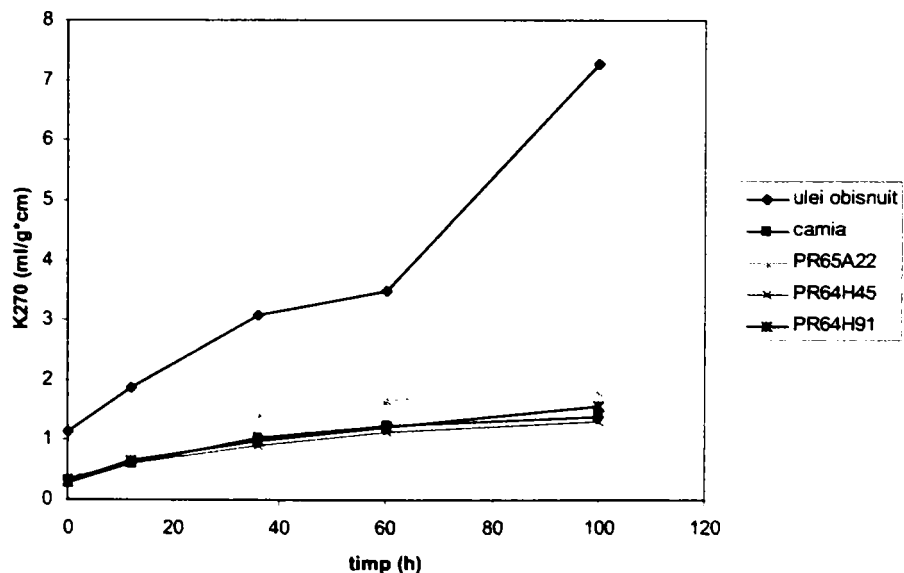


Figura 37. Valorile K_{270} pentru uleiurile de floarea soarelui studiate

D. Studiul variației conductivității în timpul oxidării

Așa cum s-a arătat în partea întâi a lucrării, în urma oxidării uleiurilor se formează și o serie de compuși polari de tipul acizilor, alcoolilor, etc. O parte dintre aceștia părăsesc mediul de reacție, fiind destul de volatili – și pe acest fapt se bazează metoda Rancimat [190]. Scopul acestui studiu a fost analiza variației conductivității ca urmare a produșilor de reacție polari care au rămas în mediul de reacție.

Modul de lucru

Într-o pâlnie de separare au fost introduși câte 25 mL de apă distilată și 1 mL de probă ulei și amestecul a fost agitat puternic timp de 1 minut. După separarea fazelor a fost colectat stratul inferior, apos și a fost determinată conductivitatea acestuia cu ajutorul unui conductometru tip Corning. S-a procedat în mod analog cu probele de untură de porc care, pentru lichefiere, a fost încălzită pe baie de apă.

Rezultate obținute

Variația conductivității pentru cele patru tipuri de uleiuri înalt oleice comparativ cu un ulei obișnuit și cu untura de porc este redată în figura 38.

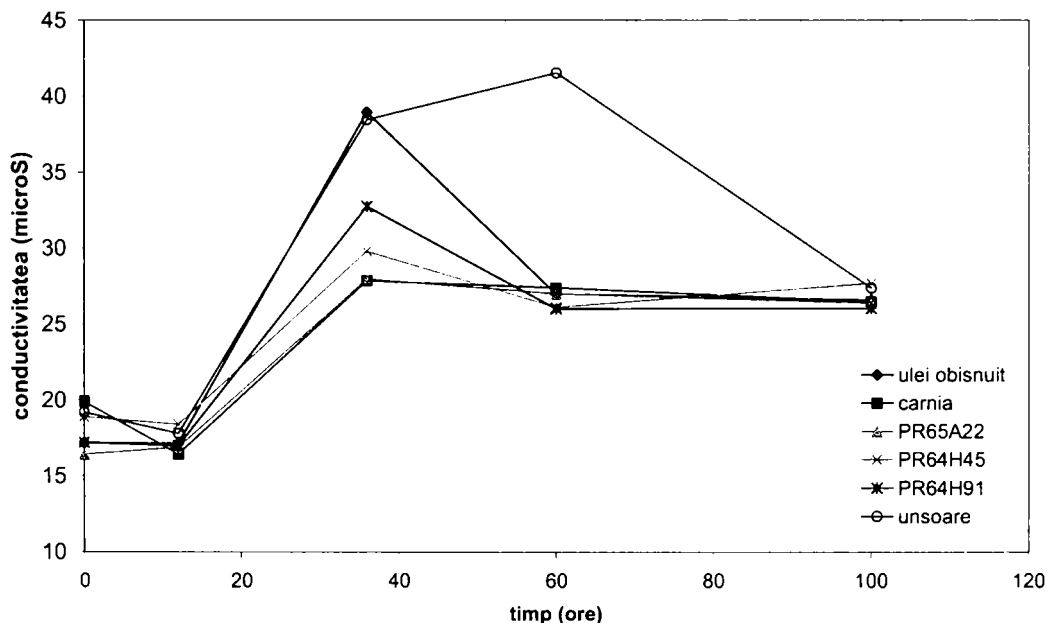


Figura 38. Variația conductivității pentru probele studiate

Formarea hidroperoxizilor care, conform datelor din literatură, are loc în primele 12 ore, ar putea fi asociată cu ușoara scădere a conductivității remarcată în acest interval de timp. Următoarele ore, corespunzătoare descompunerii hidroperoxizilor și formării de compuși cu polaritate mai ridicată se remarcă prin creșterea conductivității emulsiei apoase, cea mai mare creștere înregistrându-se, așa cum era de așteptat, în cazul uleiului obișnuit. După primele 36 de ore, pentru toate cele cinci uleiuri studiate se înregistrează o scădere a conductivității, explicabilă prin formarea de compuși polimerici care cresc viscozitatea sistemului [191].

În cazul oxidării unturii de porc, în compoziția căreia procentul de acizi grași saturați este mult mai mare decât în cazul uleiurilor, polimerizarea decurge mai încet, scăderea conductivității înregistrându-se abia după 60 de ore de oxidare accelerată. După 100 de ore de la începerea experimentului, conductivitățile tuturor probelor analizate sunt foarte apropiate ca valoare, fiind relativ mici și – cu excepția unturii de porc – aproape egale cu valorile înregistrate după 60 de ore de oxidare, ceea ce indică o echilibrare a celor două tendințe: de formare de compuși polari și de polimerizare.

Trebuie subliniat faptul că urmărirea conductivității prin această metodă dă informații relevante și concordante cu cele obținute prin alte metode.

E. Concluzii

Ca urmare a studiilor efectuate se poate concluziona că:

- Cele patru tipuri de ulei înalt oleice, produse din hibridii de floarea soarelui Carnia, PR64H91, PR64H45, și PR65A22 prezintă caracteristici (viscozitate, densitate, aciditate) mult diferite față de uleiul obișnuit de floarea soarelui obținut în același mod, adică prin presare la rece;
- Stabilitatea la oxidare este mai mare în cazul uleiurilor înalt oleice și poate fi corelată cu compoziția acestora în acizi grași;
- Există diferențe și între cele patru uleiuri înalt oleice referitor la caracteristicile și comportarea lor la oxidare, dar acestea sunt ne semnificative. Din acest motiv în studiile ulterioare ne-am limitat doar la uleiul de floarea soarelui de tip Carnia.

Prezentul studiu a constituit obiectul unui program de cercetare româno-italian – BIOSUN, din perioada 2005-2007, între Universitatea Aurel Vlaicu din Arad și Universitatea de Studii din Udine.

II.5.2. POSIBILITĂȚI DE ÎNDEPĂRTARE A CLOROFILEI PRIN ADSORBȚIE PE ADSORBANȚI SOLIZI ȘI EFECTUL ASUPRA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE ȘI COMPOZIȚIEI MIXTURII

Întrucât, așa cum s-a arătat în paragraful II.4.2.1., prezența clorofilei în extractul studiat nu este dorită, s-a urmărit eficiența îndepărtării acesteia folosind ca adsorbant solizi cărbunele activ și Sephadex LH20. Deși unele lucrări de specialitate sugerează posibilitatea utilizării aluminei activate în acest scop [192], o teză de doctorat recentă evidențiază rezultate nesatisfăcătoare [193].

Mod de lucru

Câte 2 g de adsorbent solid (cărbune și respectiv Sephadex LH20) au fost amestecate câte cu 5 mL mixtură, timp de 15 minute, pentru a asigura atingerea echilibrului de adsorbție. Înainte de utilizare cele 2 g de Sephadex LH20 au fost supuse gonflării în etanol. Ulterior amestecul a fost filtrat, iar filtratul a fost analizat în vederea determinării conținutului de clorofilă, flavonoide, antociani și taninuri precum și a activității antioxidante, prin metodele descrise anterior în paragrafele II.4.2. și respectiv II.3.3.

Rezultate obținute

Pentru trasarea spectrelor de absorbție în intervalul 220-500 nm filtratul a fost diluat de 100 de ori (figura 39a) iar pentru intervalul 500-750 nm de 12,5 ori (figura 39b).

Se remarcă scăderea intensității picurilor caracteristice clorofilei de la 541, 615 și 670 nm în cazul utilizării Sephadex-ului. Utilizarea unei cantități egale de cărbune activ a dus la dispariția în totalitate a acestora, ceea ce indică o eficiență mai mare în îndepărtarea clorofilei. Comparând însă spectrele din intervalul 220-500 nm, se observă scăderea intensității și micșorarea numărului de picuri, în special în

cazul utilizării cărbunelui activ, ceea ce indică faptul că odată cu clorofila au fost adsorbiți și alți compuși de interes.

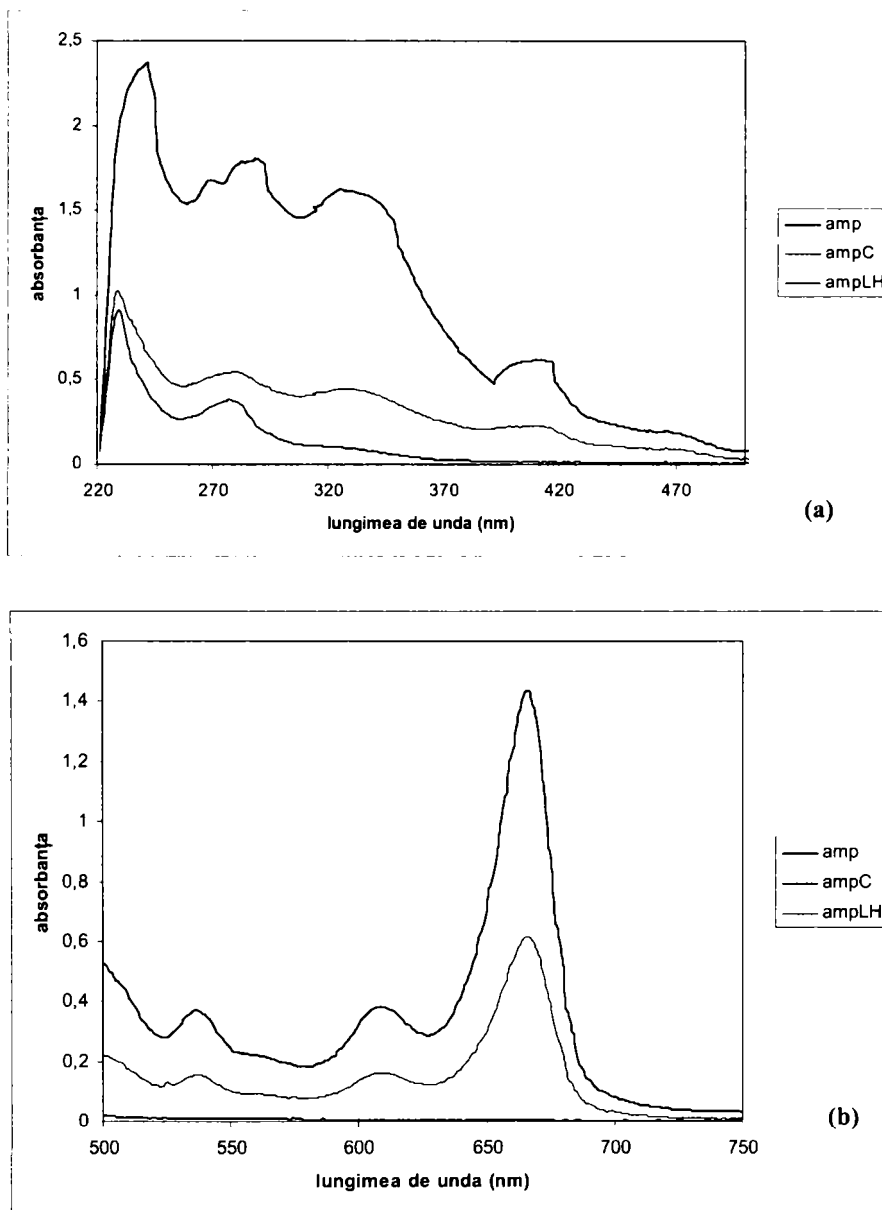


Figura 39 a și b. Spectrele UV-VIZ ale mixturii analizate, înainte (amp) și după tratarea cu cărbune activ (ampC) și respectiv cu Sephadex LH20 (ampLH)

Conținutul de clorofilă (ppm) din amestecurile analizate a fost determinat din valorile absorbantei la 630, 670 și 710 nm folosind formula II.4-1.

Conținutul total de flavonoide (mol/L) a fost determinat prin metoda lui Marinova și colab. [180] folosind formula II.4-2.

Conținutul de antociani (mg/mL) și de taninuri (indice de permanganat) au fost determinate prin metodele lui Ianculov și Modoran [185] și au fost calculate cu ajutorul formulelor II.4-5 și II.4-6. Rezultatele obținute sunt redată în tabelul 22.

Tabel 22. Conținutului de clorofilă, flavonoide, antociani și taninuri din amestecul studiat, înainte și după tratarea cu cărbune activ și respectiv Sephadex LH20.

Amestec	Conținut clorofilă (ppm)	Conținut total de flavonoide (mol/L)·10 ²	Conținutul de antociani (mg/L)	Conținut de taninuri (mg/L)
Inițial	140,6	4,809	3,45	16,9
Tratat cu cărbune activ	0,25	0,713	0,1215	2
Tratat cu Sephadex LH20	60,68	3,632	2,553	7,4

Deși cărbunele activ a fost mult mai eficient în ceea ce privește îndepărtarea clorofilei, el adsoarbe în același timp și o mare parte din flavonoide (85%), antociani (96%) și taninuri (88%). Utilizarea Sephadex-ului LH20, prin acest procedeu simplu, a dus la o mai slabă îndepărtare a clorofilei (doar 57%), în schimb procentul de flavonoide recuperate a fost de 76%, de antociani 74% iar de taninuri 44%.

Datorită reținerii de către adsorbenți și a unor substanțe active de tipul celor sumarizate în tabelul 21, este de așteptat ca activitatea antioxidantă/antiradicalică a amestecului să scadă. Această ipoteză a fost testată prin metoda cu DPPH [169].

Variația absorbânței specifice DPPH-ului în primele 10 minute de la adăugarea a câte 0,1 mL mixtură este redată în figura 40.

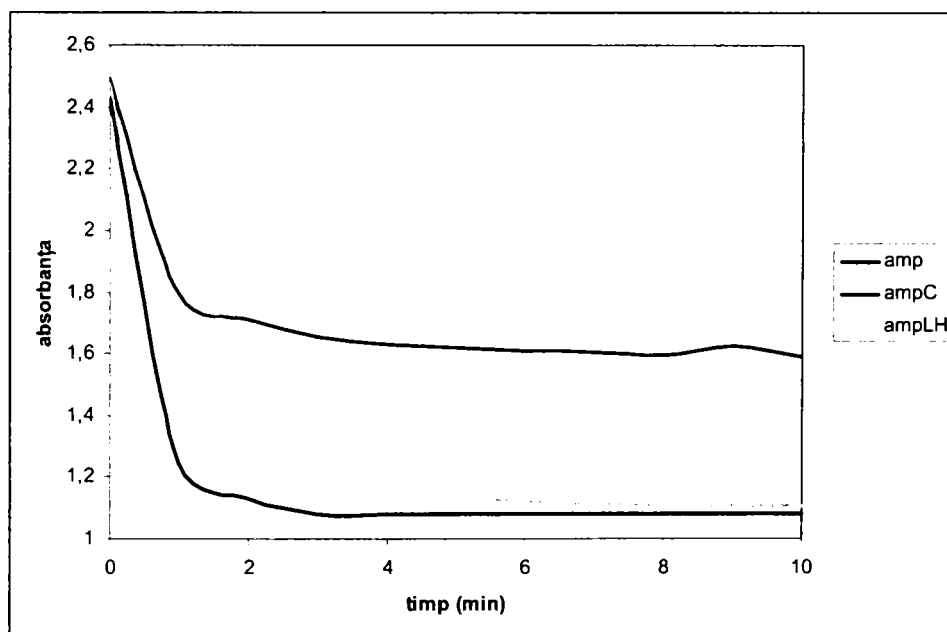


Figura 40. Descreșterea absorbânței caracteristice DPPH-ului la adăugarea a 0,1 mL mixtură proaspăt preparată (amp), tratată cu cărbune activ (ampC) și respectiv cu Sephadex LH 20 (ampLH)

Din timpul de înjumătățire a concentrației de DPPH s-a calculat activitatea antiradicalică (exprimată ca și concentrație echivalentă de BHT) utilizând ecuațiile (II.3-6) și (II.3-11), rezultatele fiind redată în tabelul 23.

Tabel 23. Activitatea antiradicalică a mixturii tratate cu cărbune activ (ampC) și respectiv cu Sephadex LH 20 (ampLH)

Modul de tratare al extractului	Timpul de înjumătățire a concentrației de DPPH	Activitatea antiradicalică (mol/L)
cu cărbune	132 secunde	0,04
cu Sephadex LH20	21,3 secunde	0,17

Comparând rezultatele obținute cu cele pentru mixtura netratată, redată în tabelul 9, se remarcă o scădere a activității antioxidante de patru ori în cazul amestecului tratat cu Sephadex LH20 și de 17 ori în cazul amestecului tratat cu cărbune activ. Utilizarea ulterioară a amestecurilor pentru prevenirea oxidării trebuie să țină cont de aceste rezultate în sensul că se va folosi o cantitate de 4 ori mai mare dacă amestecul a fost tratat cu Sephadex LH20 și de 17 ori mai mare dacă a fost tratat cu cărbune activ.

Alegerea uneia sau alteia dintre variante depinde de condițiile de depozitare a materiei grase în care se intenționează utilizarea amestecului antioxidant. Dacă există siguranța că materia grasă va fi păstrată la întuneric, îndepărtarea clorofilei nu mai este necesară.

II.5.3. STUDIUL EFICACITĂȚII MIXTURII ANTIOXIDANTE ASUPRA UNOR GRĂSIMI SATURATE ȘI NESATURATE

Testarea eficacității *in situ* a mixturii antioxidante propuse s-a realizat prin introducerea acesteia în untură de porc (grăsime saturată) și în ulei tip Carnia (grăsime nesaturată) care apoi au fost supuse unui test de oxidare accelerată. Rezultatele au fost comparate cu cele obținute în cazul utilizării BHT ca și antioxidant. Legislația din România admite un maxim de 100 mg BHT/kg grăsime. Pentru testare s-a folosit o concentrație de 75 mg BHT/kg grăsime.

Mod de lucru

Din măsurătorile de determinare a activității antiradicalice cu DPPH (paragraful II.3.3. și paragraful II.5.2) s-a determinat cantitatea de extract care se așteaptă să aibă aceeași activitate ca și 75 mg BHT/kg grăsime și s-a găsit a fi de aproximativ 0,5 mL/kg grăsime în cazul amestecului netratat și 7,5 mL/kg grăsime în cazul amestecului trecut pe cărbune activ.

Cantități corespunzătoare din mixtura antioxidantă netratată au fost introduse în uleiul de floarea soarelui tip Carnia, nerafinat și în untura de porc. Acestea au fost procurate direct de la producător, fără adaos anterior de antioxidanți sintetici. Teste cu mixtura fără clorofilă (trecută pe cărbune activ) s-au efectuat numai în cazul uleiului, întrucât untura de porc este în mod obișnuit depozitată la întuneric, în vase de culoare închisă.

Probe a câte 100 mL untură sau ulei au fost introduse în pahare Berzelius de 150 mL. După adăugarea antioxidantului, pentru o bună dispersare a acestuia, probele au fost supuse agitării timp de 5 minute într-o baie de ultrasunete. Ulterior au fost expuse timp de 5 ore la lumina zilei, pentru a iniția oxidarea.

Activitatea antioxidantă a fost analizată printr-un test de oxidare accelerată, la 110°C timp de 100 de ore. Au fost recoltate probe după 12, 36, 60 și 100 de ore. Fiecărei probe i s-au determinat: indicele de peroxid (ISO 3960:2001) și absorbanța specifică în ultraviolet (ISO 3656:2002), folosind spectrofotometrul Ultrospec III de la Pharmacia-LKB. Pentru trasarea spectrelor, 10 μ l ulei de floarea soarelui și respectiv 3 μ l unsoare de porc au fost diluate cu 3 mL izooctan într-o cuvă de cuarț cu grosimea de 1 cm.

Rezultatele au fost comparate cu cele obținute la adăugarea a 75 mg BHT/kg grăsime. Probe de ulei și de untură fără adaos de antioxidanți au fost supuse aceluiași procedeu.

Rezultate obținute

- Indicele de peroxid

Deși metoda este aplicabilă pentru urmărirea formării peroxidizilor în primele stadii ale oxidării, acuratețea acesteia este discutabilă, iar rezultatele variază în funcție de procedeul folosit și de temperatura de lucru.

Metoda standard de determinare a indicelui de peroxid se bazează pe oxidarea transformarea iodurii în iod de către hidroperoxizi și peroxizi, cantitatea de iod formată fiind determinată prin titrare cu tiosulfat de sodiu în prezență de amidon ca indicator.

Pentru determinarea indicelui de peroxid, probele au fost analizate în duplicat și în cazul unor variații mai mari de 10% au fost repetate. În tabelul 24 este trecută media rezultatelor obținute.

Tabel 24. Variația indicelui de peroxid (IP) pentru grăsimile analizate

Proba		Timp (h)				
		0	12	36	60	100
IP (meq peroxid/kg)	Ulei Carnia fără adaos de antioxidant	0,54±0,06	0,85±0,08	0,46±0,05	0,99±0,11	2,29±0,23
	Ulei Carnia cu adaos de BHT (75 mg/kg)	0,54±0,06	1,43±0,07	0,95±0,03	0,87±0,05	1,85±0,09
	Ulei Carnia cu mixtură antioxidantă „ca atare” (0,5 mL/kg)	0,54±0,06	1,32±0,07	0,85±0,05	1,89±0,10	3,12±0,13
	Ulei Carnia cu mixtură antioxidantă fără clorofilă (7,5 mL/kg)	0,54±0,06	0,91±0,09	0,85±0,04	1,02±0,06	2,54±0,11
	Unsoare de porc fără adaos de antioxidant	0,45±0,05	2,45±0,15	2,89±0,19	3,57±0,17	3,51±0,21
	Unsoare de porc cu adaos de BHT (75 mg/kg)	0,45±0,05	1,82±0,11	2,22±0,06	3,56±0,18	3,44±0,22
	Unsoare de porc cu adaos de mixtură antioxidantă „ca atare” (0,5 mL/kg)	0,45±0,05	2,20±0,03	2,32±0,04	2,50±0,07	2,93±0,09

Variații semnificative ale indicelui de peroxid pot fi observate deja după primele 12 ore. În primele ore valoarea acestuia crește datorită peroxidării acizilor grași. După aceasta, valorile indicelui de peroxid fluctuează, probabil datorită instabilității peroxizilor formați la temperaturi ridicate.

Comparând rezultatele obținute pentru uleiul și pentru untura fără adaos de antioxidanți se observă valori de două – trei ori mai mari ale indicelui de peroxid în cazul unturii decât în cazul uleiului, deși ar fi fost așteptat ca untura să fie mai stabilă la oxidare, fiind o grăsime saturată. O posibilă explicație constă în efectul antioxidant al tocoferolilor, prezenți în cantități mari în uleiurile vegetale.

Studiind datele din tabelul 24 se observă că în uleiul tip Carnia, mixtura antioxidantă (cu sau fără clorofilă) influențează favorabil formarea peroxizilor, la fel și BHT-ul în primele 36 de ore. BHT-ul își manifestă activitatea antioxidantă doar în stadiile avansate ale oxidării. În schimb, în untura de porc, atât BHT-ul cât și mixtura propusă s-au dovedit utile în încetinirea procesului oxidativ, către sfârșitul acestuia mixtura fiind chiar mai eficientă decât antioxidantul de sinteză.

- Absorbanta specifică în ultraviolet

Spectrele UV în domeniul 220-320 nm pentru uleiul tip Carnia supus oxidării accelerate, fără adaos de antioxidanți, au fost redată în figura 32. Forma spectrelor pentru celelalte probe analizate este redată în figurile 41-46.

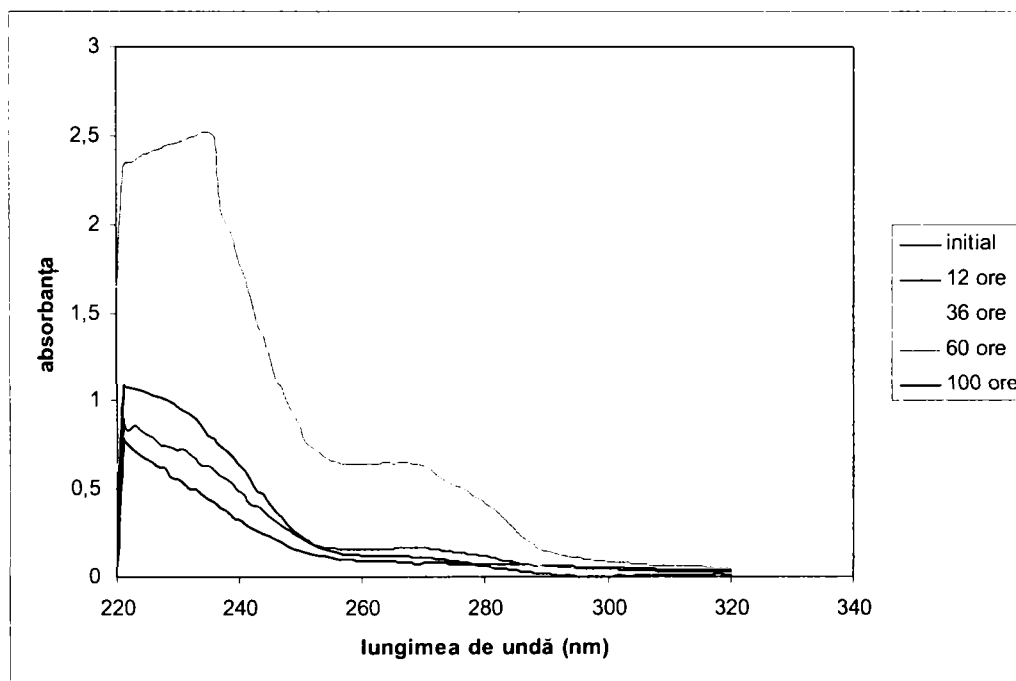


Figura 41. Spectrele UV pentru uleiul Carnia cu BHT supus oxidării accelerate

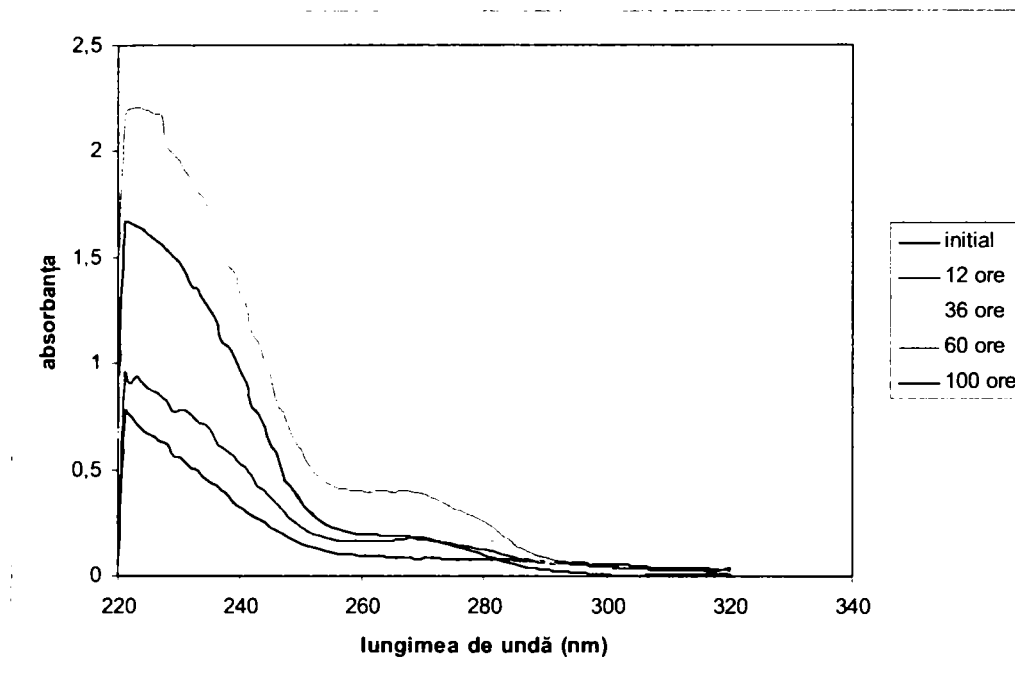


Figura 42. Spectrele UV pentru uleiul Carnia, cu adaos de mixtură, supus oxidării accelerate

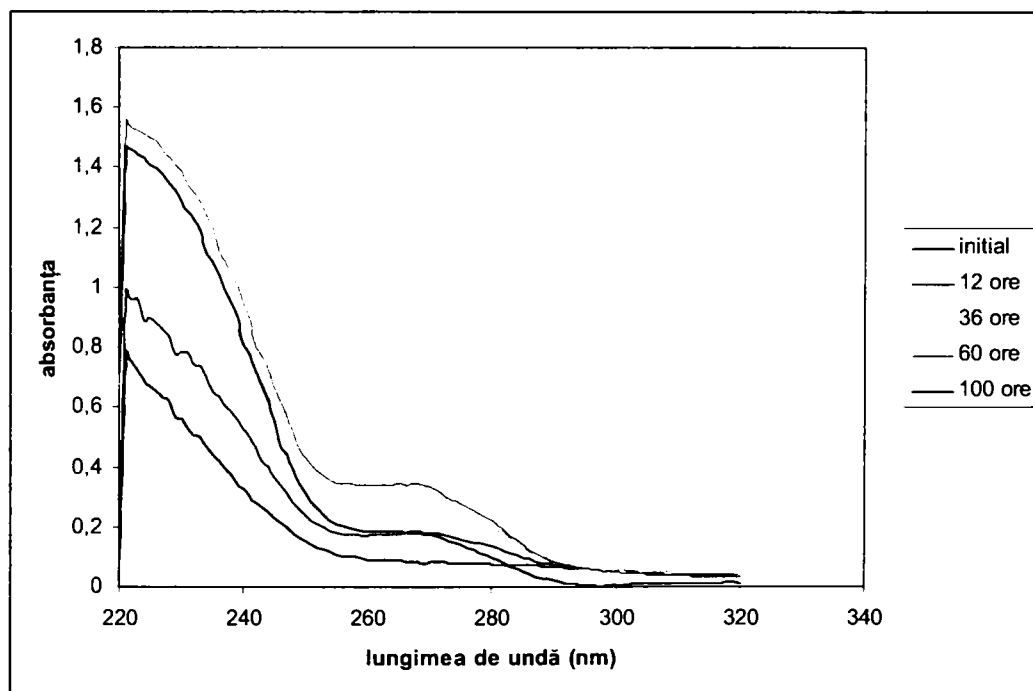


Figura 43. Spectrele UV pentru uleiul Carnia, cu adaos de mixtură (fără clorofilă), supus oxidării accelerate

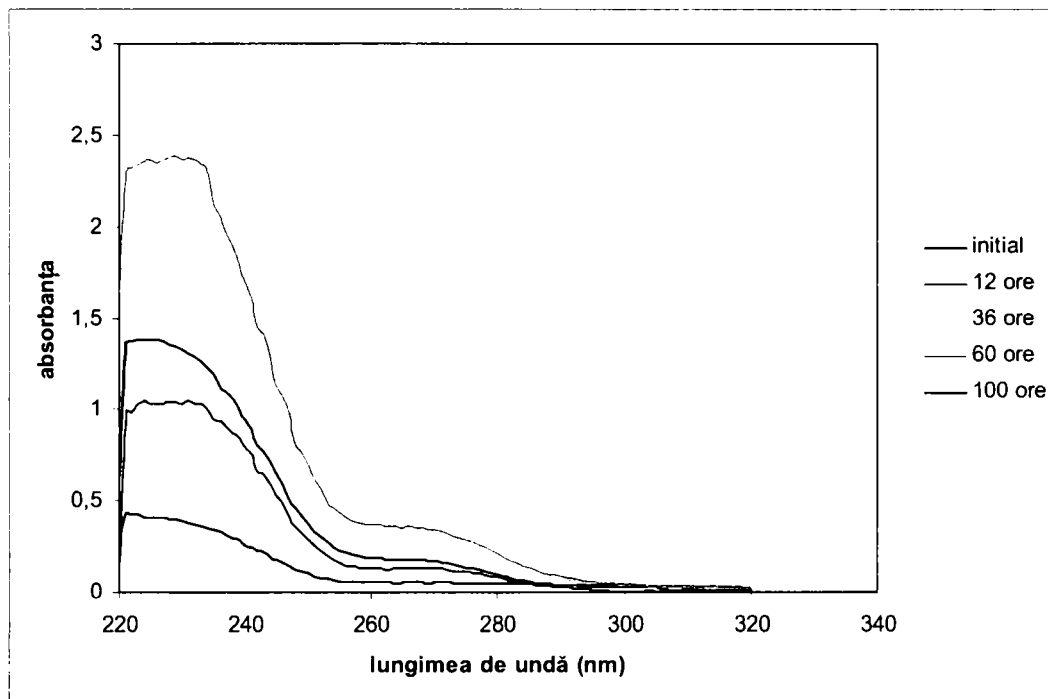


Figura 44. Spectrele UV pentru untura de porc, fără adaos de antioxidanți, supusă oxidării accelerate

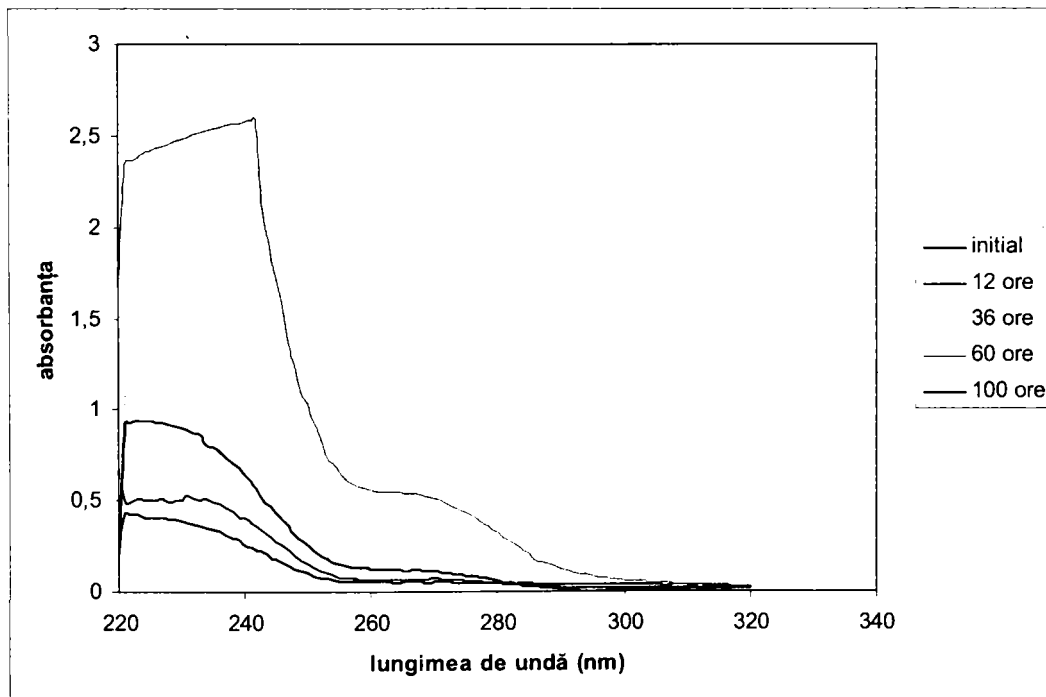


Figura 45. Spectrele UV pentru untura de porc, cu BHT, supusă oxidării accelerate

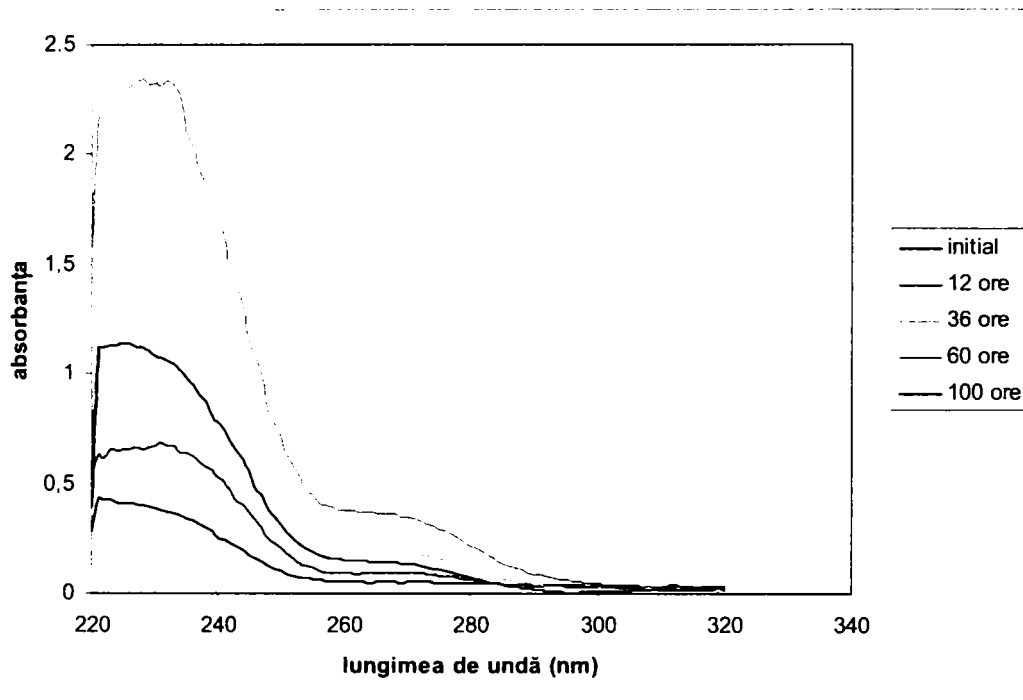


Figura 46. Spectrele UV pentru untura de porc, cu adaos mixtură, supusă oxidării accelerate

Din valorile absorbantei s-au calculat extincțiile specifice la 232 și 270 nm cu ajutorul formulei (II.5-1). Variația acestora pe parcursul oxidării accelerate se poate observa din figurile 47 și 48.

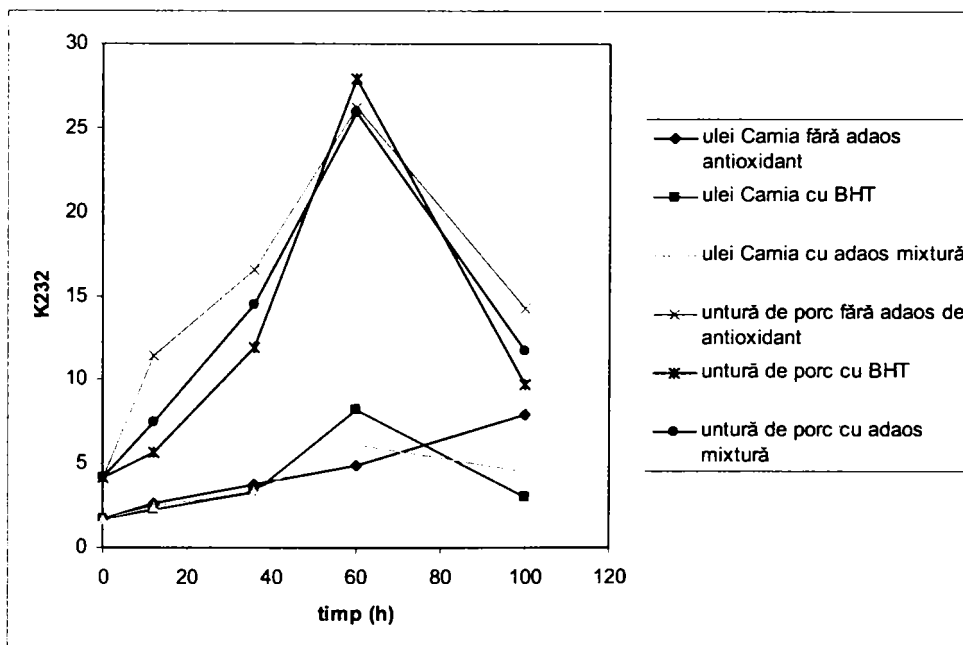
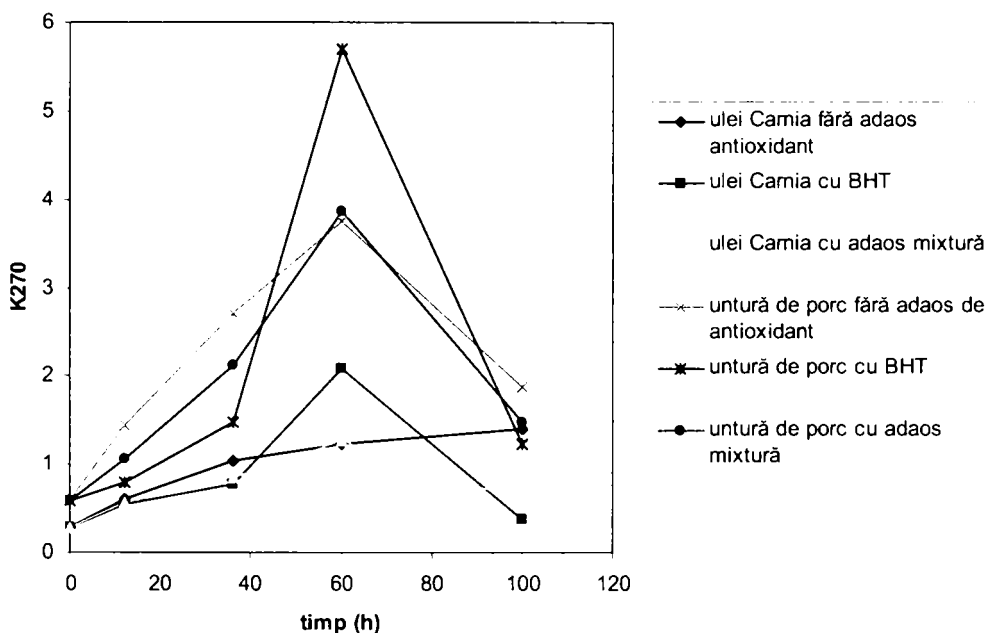


Figura 47. Valorile K_{232}

Figura 48. Valorile K₂₇₀

Rezultate și discuții

Se poate observa și prin această metodă că atât BHT cât și mixtura propusă au efect slab antioxidant sau chiar pro-oxidant în cazul uleiului de tip Carnia. Efectul observat a fost mai mare în cazul adaosului de mixtură antioxidantă decât în cazul adaosului de BHT. Îndepărtarea clorofilei din mixtura antioxidantă a avut urmări pozitive, deductibile din valorile mai scăzute ale absorbanțelor în intervalul 220-320 nm.

Atât influența BHT-ului, cât și cea a mixturii antioxidante, în cazul formării dienelor și trienelor conjugate, este mai mare în cazul utilizării în untura de porc. Valori ridicate ale K₂₃₂ și K₂₇₀ s-au obținut după 60 de ore în special în cazul adaosului de BHT, care însă au scăzut la sfârșitul experimentului (după 100 de ore). Explicația constă în formarea formarea unor pelicule de tip polimeric, observabilă cu ochiul liber, care implicit a dus la scăderea numărului de duble și triple legături.

La temperaturi peste 100°C, de tipul celor din acest experiment, o mare parte dintre antioxidanți se pot pierde prin evaporare. Antioxidanții sintetici de tipul BHT (2,6-diterț-butil-4-metil-fenol) sau BHA (2-terț-butil-4-metoxifenol) se pierd relativ rapid [194]. Pierderea de antioxidanți naturali este mai mică, întrucât volatilitatea acestora este mai redusă decât cea a antioxidanților sintetici uzuali. Și ei suferă modificări în timpul oxidării, de exemplu carnosolul este convertit în miltironă și dehidro-rosmarin-chinonă [195].

O altă caracteristică este conținutul scăzut de oxigen în uleiul aflat la temperaturi ridicate. Cantități adiționale pot intra în ulei prin difuziune din aer. Din acest motiv lanțurile de autooxidare sunt scurte, astfel încât antioxidanții sunt consumați relativ rapid. În aceste condiții tocoferolii sunt descompuși fie prin reacția directă cu oxigenul fie prin reacția cu produșii de oxidare ai acizilor grași. Cu cât uleiul este mai nesaturat, cu atât aceștia sunt mai rapid distruși [196].

Întrucât concentrația de radicali liberi lipidici este mare, dimerizarea decurge ușor fie prin reacția dintre doi astfel de radicali, fie prin reacția dintre un radical lipidic și unul provenit de la un antioxidant. Dacă concentrația de antioxidanți naturali este mare (cum este cazul tocoferolilor în uleiul de floarea soarelui), atunci și concentrația de radicali liberi proveniți din aceștia este mare și crește șansa formării de produși dimerici prin reacția dintre ei, în ciuda reactivității scăzute. Producții formați posedă activitate antioxidantă modestă. Presupunem că anumiți componenți ai mixturii analizate pot retarda degradarea tocoferolilor, datorită reactivității mai mari. Cu toate acestea stabilizarea uleiurilor cu compuși de tip flavonoidic și fenolici este puțin eficientă deoarece ei sunt puțin solubili în ulei și astfel activitatea lor antioxidantă nu se manifestă de fapt decât la interfață [197].

II.5.4. ANALIZA TERMICĂ

Curbele TG/DTG pot fi folosite pentru estimarea calității uleiurilor prin determinarea parametrilor cinetici și a perioadei de inducție a oxidării. Pe de altă parte, întrucât descompunerea termică oxidativă implică reacții exoterme și endoterme, este posibilă estimarea energiei implicate în procese prin tehnici de tipul DTA și DSC. De multe ori aceste metode sunt mai avantajoase decât cele convenționale, deoarece sunt mai precise și necesită cantități mai mici de substanță, iar rezultatele sunt obținute mai rapid [198].

Mod de lucru

Curbele ne-izoterme TG/DTG au fost obținute cu ajutorul aparatului Netzsch STA 409 PC, în aer (30 mL/min), folosind creuzete de alumina și o viteză de încălzire de 5°C/min. Masa probei (ulei carnia respectiv untură de porc cu și fără adaos de antioxidant) a fost de aproximativ de 27,5 mg (o picătură) iar intervalul de temperatură de la 36 la 800°C. Programul utilizat pentru interpretarea rezultatelor a fost Netzsch Proteus – Thermal Analysis.

Rezultate obținute

Profilul curbelor TG/DTG pune în evidență trei etape de descompunere, atât pentru ulei cât și pentru untură, după cum se poate observa în figurile 49 și 51.

Conform lui de Souza și colab. [198], începutul oxidării este caracterizat de absorbția oxigenului cu formare de peroxizi ai acizilor grași. Această comportare este în general identificabilă prin creșterea masei inițiale a probelor. În cazul uleiului Carnia și a unturii, aceasta a fost de aproximativ 2%.

Prima etapă corespunde la două procese suprapuse și a fost atribuită descompunerii acizilor grași polinesaturați de tipul acidului linoleic cu formarea unor compuși de tipul dimerilor, trimerilor și polimerilor care sunt în mod constant îndepărtați de către vaporii generați în timpul încălzirii. Această etapă, în cazul uleiului, a început la 244,9°C cu vârful picului DTG la 294,4°C iar în cazul unturii a început la 247,5°C și vârful picului DTG a fost la 288,6°C.

Descompunerea acizilor grași mononesaturați de tipul acidului oleic este atribuită în literatură [198] celei de-a doua etape de pierdere în greutate. În timpul acestui proces, se presupune că dublele legături se rup, cauzând saturarea moleculelor de trigliceride. Această etapă a fost caracterizată de $T_{onset} = 393,4^{\circ}\text{C}$ și un vârf la 406,8°C în cazul uleiului și $T_{onset} = 366,8^{\circ}\text{C}$ și vârful la 404,7°C în cazul unturii.

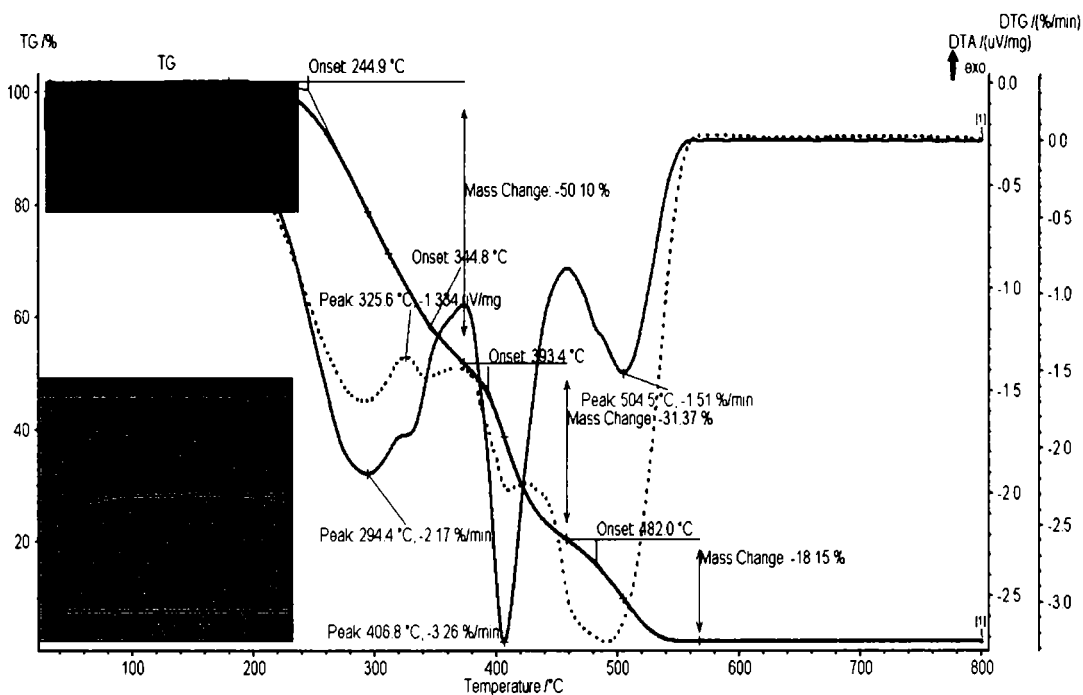


Figura 49. Curbele TG/DTG/DTA pentru uleiul Carnia

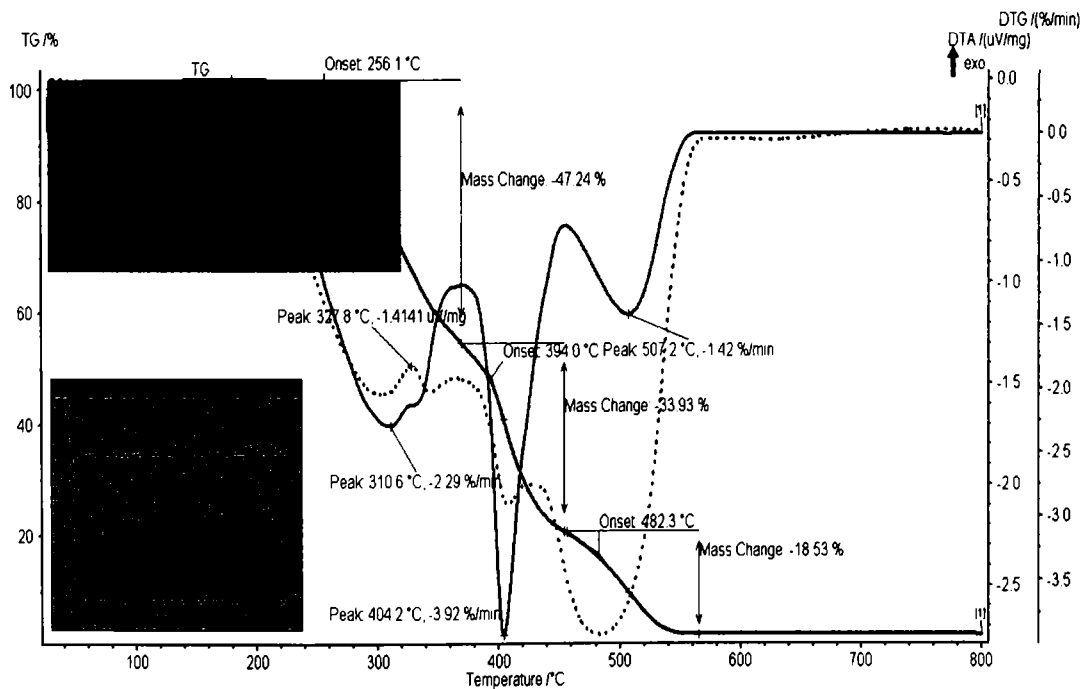


Figura 50. Curbele TG/DTG/DTA pentru uleiul Carnia cu adaos de mixtură antioxidantă 0,5 mL/kg grăsime

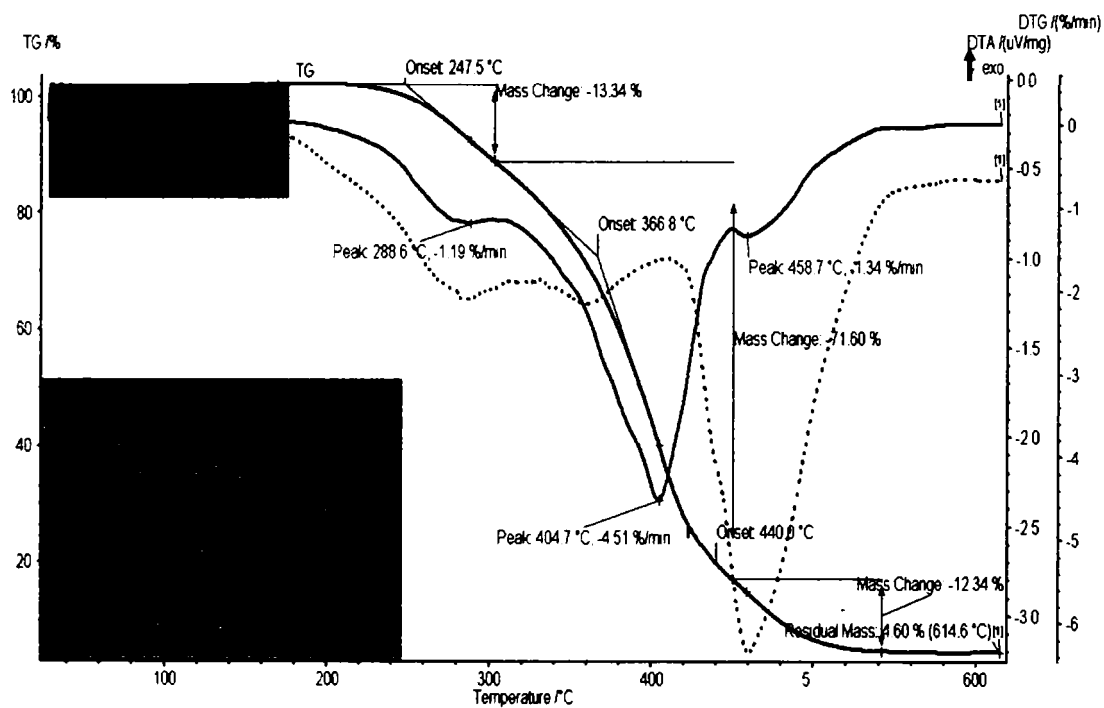


Figura 51. Curbele TG/DTG/DTA pentru untură

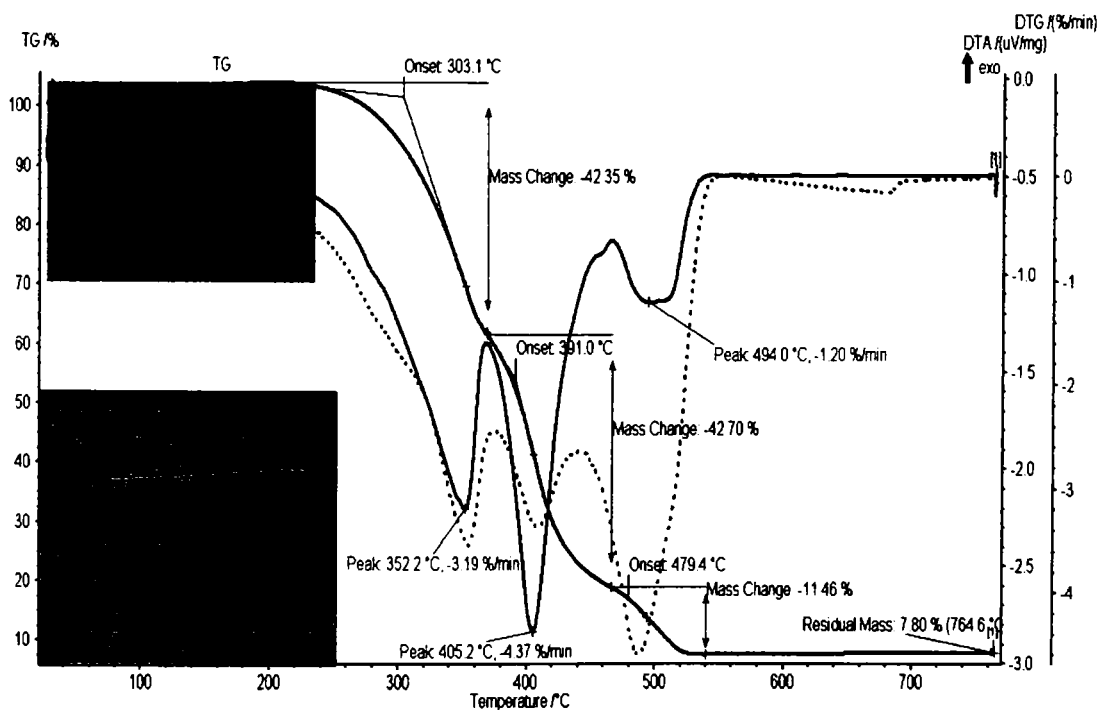


Figura 52. Curbele TG/DTG/DTA pentru untură cu adaos de mixtură antioxidantă 0,5 mL/kg grăsime

Ultima etapă observată, cu $T_{\text{onset}} = 482^{\circ}\text{C}$ și vârful la $504,5^{\circ}\text{C}$ pentru ulei și respectiv $T_{\text{onset}} = 440^{\circ}\text{C}$ și vârful la $458,7^{\circ}\text{C}$ pentru untură, corespunde probabil descompunerii acizilor grași saturați de tipul acidului palmitic.

Prima etapă de descompunere este cea mai importantă pentru stabilitatea termică a grăsimilor vegetale sau animale. Pe baza temperaturii de începere a descompunerii termice se poate compara stabilitatea diferitelor tipuri de uleiuri precum și eficiența eventualelor adaosuri de antioxidanți [198].

Curbele DTA corespunzătoare uleiului, cu și fără antioxidanți (figurile 50 și 49), evidențiază câte trei etape endoterme și o etapă exotermă, situată în preajma temperaturii de 325°C . Etapa exotermă corespunde conform [198] polimerizării fragmentelor rezultate la descompunerea acizilor grași polinesaturați. Etapele endoterme se referă la descompunerea acizilor grași poli- și mono-nesaturați precum și a celor saturați. Această constatare este întărită de faptul că, în cazul unturii, în care conținutul în acizi grași polinesaturați este foarte scăzut, etapa exotermă nu a fost identificată (figurile 51 și 52).

Toate procesele au temperaturile caracteristice deplasate spre valori mai mari în cazul grăsimilor aditivate. Adaosul a doar 0,5 mL mixtură antioxidantă/kg grăsime a deplasat semnificativ T_{onset} pentru prima etapă de la $244,9$ la $256,1^{\circ}\text{C}$ pentru ulei și de la $247,5$ la $303,1^{\circ}\text{C}$ pentru untură, după cum se poate observa din figurile 50 și 52.

Și prin această metodă s-a găsit că mixtura antioxidantă naturală propusă în această teză determină o îmbunătățire importantă a stabilității la termoxidare a uleiului, fiind chiar mai eficientă în cazul unturii.

II.5.5. ANALIZA EFECTULUI ANTIMICROBIAN AL MIXTURII PROPUSE

Activitatea antimicrobiană, determinată prin metoda difuziei în agar cu discuri impregnate de hârtie de filtru (metoda difuzimetrică), a fost testată pe trei specii bacteriene: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 49399) și *Escherichia coli* (ATCC 25922) și pe o ciupercă tip drojdie (*Candida albicans*, ATCC 24433).

Reactivi

Mediile de cultivare („tryptic soy” agar și Müller-Hinton agar) au fost achiziționate de la firma Merck (Germania) iar mediul Sabouraud 2% (m/V) de la Biolife (Italia). Discurile de hârtie de filtru impregnate cu substanțe antibacteriene (antibiotice) și antifungice (antimicotice) au fost achiziționate de la HiMedia Laboratoires (India), Bioanalyse Ltd. (Turcia) și Abtek Biologicals Ltd. (UK) (tabelul 25).

Standardul McFarland pentru turbiditate a fost achiziționat de la BioMérieux (Marcy l'Étoile, Franța). Principiul metodei turbidimetrice McFarland de determinare a numărului de celule microbiene dintr-un mL inocul este redat în tabelul 26.

Microorganismele testate: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 49399, *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Candida albicans* ATCC 24433 au fost achiziționate de la Microbiologics (USA). Înainte de analiză tulpinile bacteriene au fost cultivate pe tryptic soy agar în condiții aerobe timp de 24 h la 37°C , cu excepția *Streptococcus pyogenes* ATCC 49399, care a fost cultivat pe tryptic soy agar cu 5% sânge de oaie steril defibrinat.

Candida albicans a fost cultivată pe mediu Sabouraud 2% (m/V) în condiții aerobe, timp de 48 h la 37°C .

Tabel 25. Substanțele antimicrobiene etalon

Substanța antimicrobiană	Concentrația	Producător
Ofloxacin	5 µg / disc	HiMedia Laboratoires (India)
Penicilin	10 UI / disc	HiMedia Laboratoires (India)
Cloramfenicol	10 UI / disc	HiMedia Laboratoires (India)
Oxacillin	1 µg / disc	HiMedia Laboratoires (India)
Erytromycin	15 µg / disc	Bioanalyse Ltd. (Turcia)
Gentamicin	10 µg / disc	Abtek Biologicals LTD (UK)
Itraconazole	10 µg / disc	HiMedia Laboratoires (India)
Nistatin	30 µg / disc	HiMedia Laboratoires (India)

Tabel 26. Metoda McFarland

Cod standard McFarland*	0,5	1	2	3	4
Clorură de bariu 1.0% (mL)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
Acid sulfuric 1.0% (mL)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
Densitatea aproximativă a celulelor (1X10 ⁸ mL)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0
Transmitanța, % (600 nm)	74.3	55.6	35.6	26.4	21.5
Absorbanța (600 nm)	0.132	0.257	0.451	0.582	0.669

* Standardele Mc Farland comerciale sunt numerotate astfel, (pentru identificare). Cifrele desemnează 10 x cantitatea de BaCl₂ (in mL) conținută în fiecare proba standard

Mod de lucru

Activitatea antibacteriană a fost estimată prin metoda Kirby-Bauer [199].

Pe scurt, inoculi de celule bacteriene și de blastospori fungici tip drojdie au fost suspendați în ser fiziologic steril până când densitatea suspensiei testate a egalat turbiditatea standardului, echivalent unei concentrații de 3.0×10^8 /mL (McFarland Standard, BioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Cutii Petri ($d = 9$ cm) cu agar Müller-Hinton (pentru speciile bacteriene) sau agar Sabouraud (pentru fungi) au fost inoculate cu câte 1 mL de suspensie microbiană. Suspensia a fost răspândită pe întreaga suprafață cu ajutorul unei seringi sterile de 1 mL. După 5 minute excesul de fluid a fost îndepărtat cu ajutorul unei pipete sterile. Suprafața mediului din cutiile Petri a fost lăsată să se usuce la temperatura camerei, timp de maxim 20 de minute.

Discurile de hârtie de filtru sterile, impregnate cu 80 µL mixtură nediluată au fost aplicate aseptice pe suprafața fiecărei cutii, într-o poziție centrală. Pentru aceasta au fost utilizate pensete sterile. Fiecare disc a fost ușor presat pentru a asigura un contact bun cu suprafața mediului. Discuri de control impregnate cu substanțe antimicrobiene au fost de asemenea plasate în cutiile Petri inoculate, la distanțe potrivite. Gentamicina, ofloxacina, cloramfenicolul, penicilina, eritromicina și oxacilina au fost utilizate ca substanțe de referință antibacteriene, iar nistatinul și itraconazolul ca substanțe de referință antifungice.

Cutiile inoculate au fost incubate timp de 20 de ore la 37°C pentru speciile bacteriene și timp de 48 de ore pentru *C. albicans*. Zonele de inhibiție au fost exprimate ca diametrul (mm) zonelor libere din jurul discurilor. Rezultatele au fost exprimate ca media a trei analize independente.

Rezultate obținute

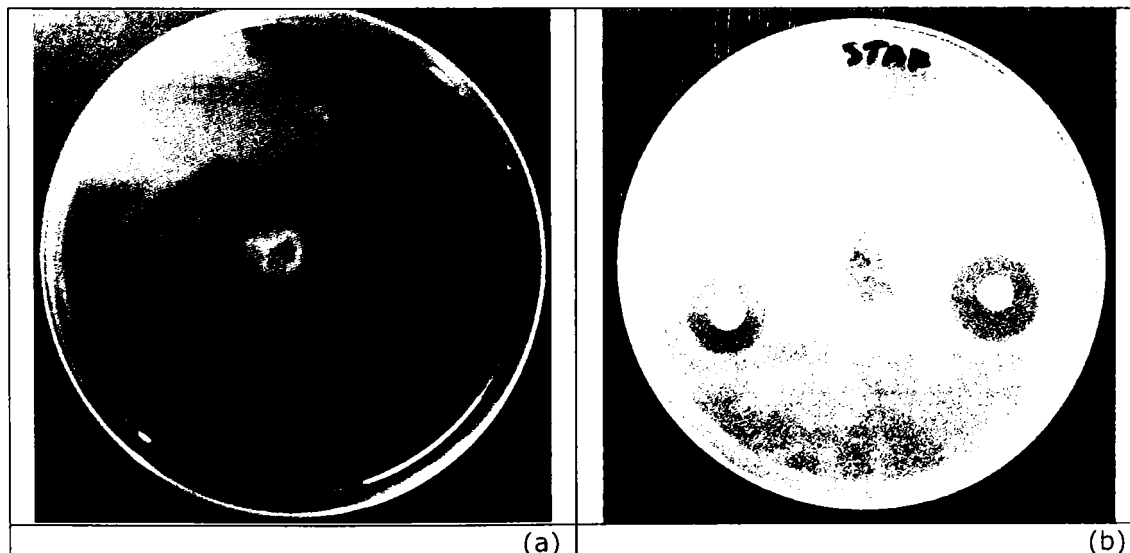
Produsul testat a dovedit activitate bactericidă împotriva speciilor bacteriene *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* și *Escherichia coli* precum și activitate antifungică împotriva *Candida albicans*, după cum se poate observa din tabelul 27.

Tabel 27. Zonele de inhibiție

Microorganismele de referință	Zonele de inhibiție (mm)			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
Extract	18	19	15	18
Nistatin	ND	ND	ND	17
Itraconazol	ND	ND	ND	19
Cloramfenicol	ND	27	ND	ND
Gentamicină	ND	ND	25	ND
Ofloxacină	ND	ND	38	ND
Penicilină	ND	19	ND	ND
Eritromicină	ND	25	ND	ND
Oxacilină	19	ND	ND	ND

ND - nedetectat

Cele mai largi zone de inhibiție au fost în cazul *S. pyogenes* (de la 18 la 20 mm), și în cazul *S. aureus* (de la 17,5 la 19 mm). Zone de inhibiție mai mici au fost înregistrate pentru extractul studiat în cazul testării contra *E. coli* (de la 13 la 16 mm). Produsul de dovedit de asemenea puternică activitate antifungică împotriva *C. albicans*, cu zone de inhibiție similare cu cele din cazul *S. aureus* (de la 17.5 la 19 mm) (figura 53 a-d).



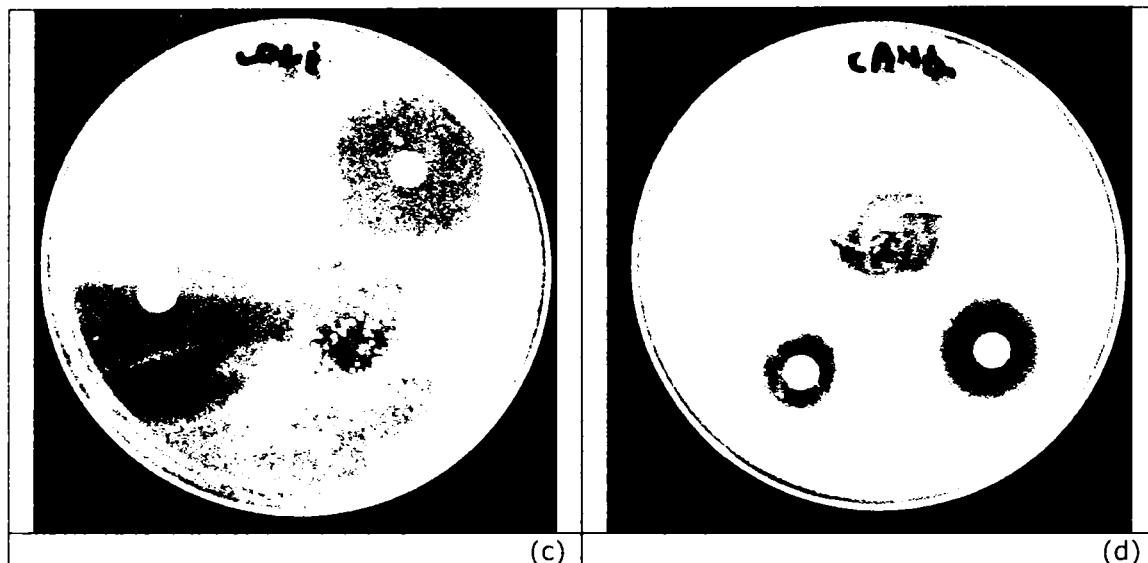


Figura 53. Antibiograme: (a) *Streptococcus pyogenes*; (b) *Staphylococcus aureus*; (c) *Escherichia coli*; (d) *Candida albicans*

Rezultatele sugerează că activitatea antibacteriană exprimată împotriva microorganismelor bacteriene Gram-pozitive patogene *Staphylococcus aureus* și *Streptococcus pyogenes* este comparabilă cu cea a substanțelor bacteriene de referință. Activitatea antibacteriană împotriva *Escherichia coli*, o bacterie Gram-negativă, a fost detectabilă dar mult mai redusă (jumătate din activitatea antibacteriană exercitată de substanțele de referință). Activitatea antifungică a extractului analizat este de asemenea comparabilă cu cea a substanțelor de referință.

II.6. APLICAȚII PENTRU INDUSTRIA ALIMENTARĂ

II.6.1. MODELAREA PROCESULUI DE OXIDARE

Principiile modelării

Considerând complexitatea sistemelor alimentare și luând în considerare că sfârșitul duratei de valabilitate reprezintă dispariția unor factori de calitate S (nutrienți, arome caracteristice, etc.) și apariția unor factori de calitate nedorți P (pierderea aromelor, decolorarea, etc.), se ajunge astfel la un model asemănător unui proces ireversibil de tipul [200]:



Vitezele de pierdere a factorilor de calitate R și de formare a factorilor de calitate P pot fi exprimate de relațiile:

$$v_s = -\frac{dQ_s}{dt} = k_f (Q_s)^r \quad (\text{II.6-2})$$

$$v_p = \frac{dQ_p}{dt} = k'_f (Q_p)^{r'} \quad (\text{II.6-3})$$

unde Q_s , Q_p – ponderea factorilor de calitate S și respectiv P; k_f și k'_f - constante de viteză.

Factorii de calitate R și P sunt de obicei proprietăți chimice, fizice, microbiologice sau senzoriale cuantificabile. Trebuie subliniat faptul că procesul modelat de ecuațiile (II.6-1-II.6-3) nu redă un mecanism de real, iar r și r' sunt pseudo-ordine de proces sau ordine aparente de proces.

Factorii de calitate S și P sunt de obicei proprietăți chimice, fizice, microbiologice sau senzoriale cuantificabile. Trebuie subliniat faptul că procesul modelat de ecuațiile (II.6-1-II.6-3) nu redă un mecanism de real, iar r și r' sunt pseudo-ordine de proces sau ordine aparente de proces.

Ordinele aparente de proces și constantele de viteză pot fi determinate prin „fitarea” curbilor de variație în timp a valorilor determinate experimental S sau P. Metodele cele mai utilizate pentru aceasta sunt: metoda diferențială și metoda integrală. În cazul metodei diferențiale se procedează în felul următor [201]:

1. se determină valorile corespunzătoare parametrilor S sau P (direct sau indirect) în funcție de timp;
2. se reprezintă grafic variația acestora în timp și se trasează curba cea mai probabilă, cel mai adesea utilizând o metodă statistică de „fitare” (exemplu: regresie polinomială);
3. se determină vitezele de proces corespunzătoare diferitelor momente prin derivarea grafică sau numerică a curbei;
4. prin logaritizarea relațiilor (II.6-2) și (II.6-3) se obțin expresiile liniare:

$$\lg v_s = \lg k_f + r \lg Q_s \quad (\text{II.6-4})$$

$$\lg v_p = \lg k'_f + r' \lg Q_p \quad (\text{II.6-5})$$

5. se trasează graficul dependenței $\lg v_s = f(\lg Q_s)$ sau $\lg v_p = f(\lg Q_p)$
6. cu ajutorul metodei celor mai mici pătrate se „fitează” punctele pe o dreaptă
7. se determină valorile pentru constanta aparentă de viteză și pentru ordinul aparent de proces din caracteristicile drepte, respectiv ordonata la origine și tangenta unghiului format cu horizontala.

Mod de lucru

A fost modelat procesul de oxidare, la 110°C, a patru uleiuri înalt oleice obținute din hibridii de floarea soarelui: Carnia, PR64H45, PR64H91 și PR65A22. Absorbanta în UV, la lungimea de undă de 232 nm, corespunzătoare formării dienei conjugate, a fost aleasă ca factor de calitate, P (pasul 1). Pentru calcule au

fost folosite valorile extincției specifice, K_{232} , calculate cu ajutorul formulei (II.5-1) și redată în figura 36. Au fost parcurși pașii 1-7 pentru toate cele patru uleiuri înalt oleice. A fost utilizat programul Microcal Origin 4.1. S-au calculat și indicatorii de adecvanță și anume [202]:

- coeficientul de corelație, R

$$R = \sqrt{1 - \frac{\sum_{i=1}^n (\bar{y}_i - y_{i,\text{calculat}})^2}{\sum_{i=1}^n (\bar{y}_i - \bar{y})^2}} \quad (\text{II.6-6})$$

- deviația standard, SD, a valorilor măsurate față de valorile calculate pe baza ecuației de regresie, care poate servi la calcularea intervalului de încredere pentru fiecare valoare individuală:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{y}_i - y_{i,\text{calculat}})^2}{n}} \quad (\text{II.6-7})$$

unde n – numărul de seturi de date; y – variabila dependentă; $y_{i,\text{calculat}}$ – valoarea rezultată pentru y pe baza ecuației de regresie, \bar{y}_i – valoarea experimentală; \bar{y} – media aritmetică a valorilor experimentale.

Rezultate obținute

În figura 54 este redată, pentru uleiul de tip Carnia, curba cea mai probabilă pentru caracterizarea evoluției în timp a lui K_{232} (pasul 2).

Vitezele de proces, în diferite momente, au fost determinate prin derivarea grafică a curbei din figura 54.

În figura 55 este trasat graficul dependenței $\lg v = f(\lg K_{232})$. Prin „fitarea” punctelor pe o dreaptă au putut fi determinați ordinul aparent de proces („B” din ecuația drepte) și $\lg k_f$ („A” din ecuația drepte), împreună cu indicatorii de adecvanță R (coeficientul de corelație) și SD (deviația standard).

În mod analog s-a procedat și în cazul celorlalte uleiuri înalt oleice. Valorile obținute pentru constanta aparentă de viteză și pentru ordinul aparent de proces sunt redată în tabelul 28.

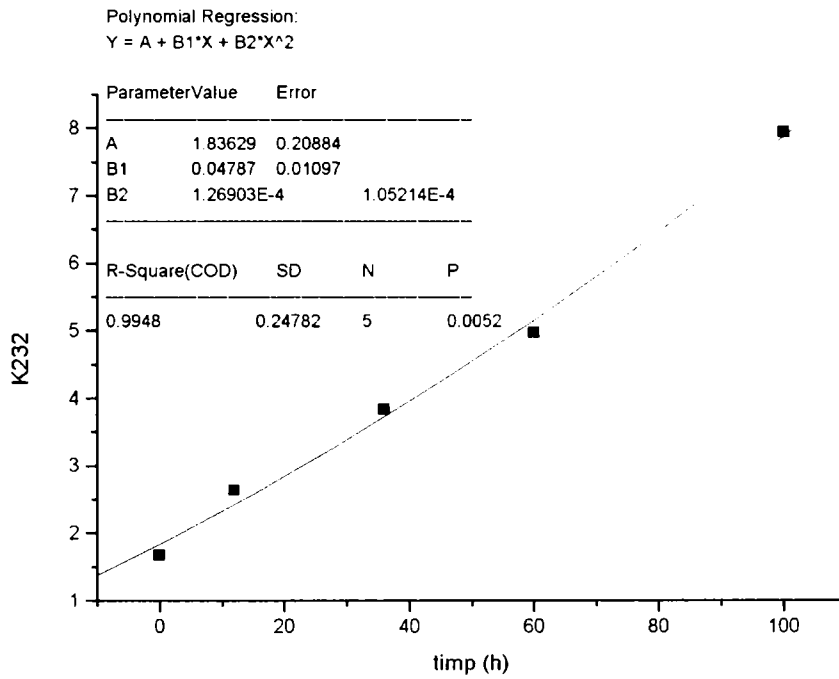


Figura 54. Curba cea mai probabilă pentru evoluția K_{232} în timp, în cazul uleiului de tip Carnia

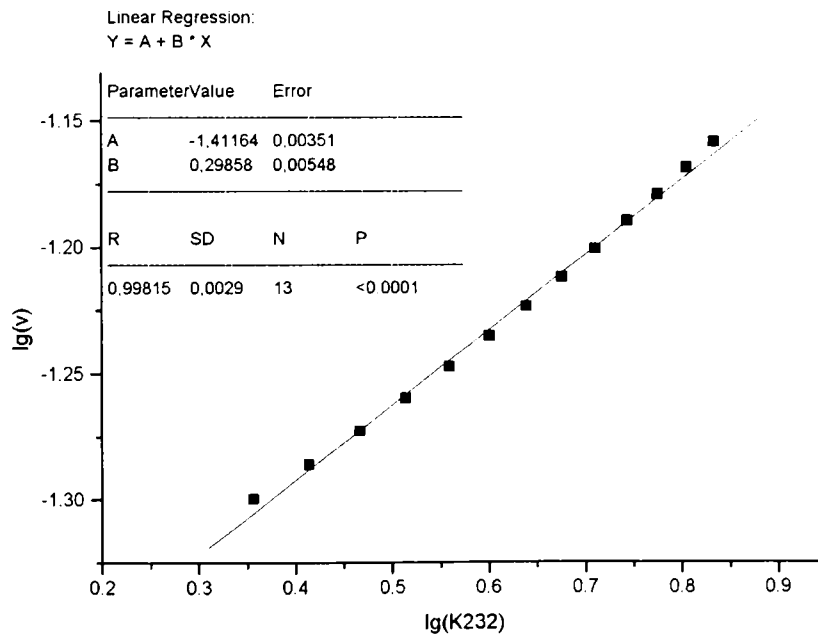


Figura 55. Regresia liniară pentru dependența $\lg v = f(\lg K_{232})$ în cazul uleiului Carnia

Tabel 28. Valorile constantelor aparente de viteză, ale ordinelor aparente de proces și ale indicatorilor de adecvare R și SD

cazul	ulei	k_f	r'	R	SD
I	Carnia	0,0388	0,29858	0,99815	0,0029
II	PR65A22	0,0531	0,14815	0,9941	0,00266
III	PR64H45	0,0151	0,99276	0,99558	0,01024
IV	PR64H91	0,0447	0,04212	0,99351	0,00064

Trebuie precizat că valorile obținute corespund temperaturii de lucru de 110°C.

Corelațiile obținute au fost foarte bune (valorile pentru R au fost peste 0,99). Se remarcă ordin aparent de proces unitar în cazul uleiului obținut din hibridul PR64H45 și ordine aparente de proces subunitare în cazul celorlalte uleiuri.

Modelul ar putea avea aplicabilitate practică în industria alimentară în sensul că dacă se impune o valoare maximă a extincției specifice la 232 nm, peste care uleiul se consideră prea degradat pentru a mai fi utilizat, poate fi calculată durata de valabilitate a acestuia.

De menționat însă că modelele de tipul celui descris au de obicei aplicabilitatea limitată la sistemele alimentare particulare pentru care au fost studiate, mai cu seama că de multe ori modelul nu corespunde cu adevăratul mecanism de proces. De aceea o extrapolare a rezultatelor obținute la sisteme similare trebuie realizată cu precauție. În unele cazuri se impune o mai adâncă studiere a reacțiilor importante pentru calitatea alimentelor în scopul elucidării mecanismului real. Astfel de studii sunt realizate de obicei în sisteme model, astfel încât compoziția și concentrația relativă a componentelor să poată fi controlată și monitorizată.

II.6.2. SENZOR ENZIMATIC PENTRU DETERMINAREA CONCENTRAȚIEI DE ANTIOXIDANȚI

Principiul metodei

Multe dintre uleiurile vegetale conțin substanțe naturale cu proprietăți antioxidante, marea majoritate cu structură polifenolică [203]. Analiza enzimatică a polifenolilor din uleiuri ridică probleme datorită insolubilității acestora din urmă în apă (biosenzorii convenționali fiind concepuți aproape exclusiv pentru a funcționa în mediu apos). În ultimii ani au fost dezvoltați mai mulți senzori enzimatici pentru determinarea polifenolilor în soluții apoase [204-205] și au început cercetările pentru punerea la punct a unor biosenzori care să opereze în mediu organic [203, 206].

Noutatea metodei propuse constă în „solubilizarea” uleiului în apă cu ajutorul unei substanțe tensioactive, ceea ce a permis utilizarea unei enzime active în mediu apos pentru obținerea unui biosenzor amperometric.

Materiale

Peroxidaza din hrean (Sigma Aldrich), 2,6-Bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenolul (BHT, Sigma Aldrich), etanolul (C₂H₅OH, Chimopar), peroxidul de hidrogen (H₂O₂ 30%, Merck) fosfatul monosodic monohidratat (NaH₂PO₄·H₂O, Sigma Aldrich) și fosfatul disodic dihidratat (Na₂HPO₄·2H₂O, Sigma Aldrich) au fost utilizate fără purificare anterioară.

Pentru solubilizarea uleiului au fost folosiți următorii detergenți: lauril-sulfat de sodiu (99%, Sigma Aldrich) și Eskaphor EM 310 (Haug Chemie GMBH).

Aparatura

O celulă electrochimică de 10 mL a fost legată de electrodul de lucru, electrodul de referință (Ag/AgCl) și de electrodul auxiliar din platină prin intermediul găurilor din capac. Agitarea (100 rpm) a fost asigurată de un agitator magnetic. Cei trei electrozi au fost conectați la un analizor voltametric (Voltalab 40, PGZ 301).

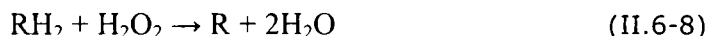
Mod de lucru

Electrodul de lucru a fost preparat zilnic în următorul mod: suprafața electrodului de grafit a fost șlefuită timp de aproximativ 10 secunde pe hârtie. Acest pretratament a generat rugozitatea dorită pentru o mai bună adeziune a soluției de enzimă. Un volum de 10 μ l soluție de peroxidază (3 mg/mL în tampon fosfat de pH 7,4) a fost depusă pe suprafața electrodului și a fost lăsată să se usuce timp de aproximativ 20 de minute (perioadă necesară pentru stabilirea echilibrului de adsorbție). După aceea, excesul de enzimă a fost îndepărtat prin spălare cu soluție de tampon fosfat având același pH.

Detecția amperometrică a fost realizată, cu ajutorul aparatului Voltalab 40, prin aplicarea potențialului dorit (-50 mV) și înregistrarea semnalului amperometric. A fost analizat uleiul de tip Carnia solubilizat (cu ajutorul soluțiilor de detergent) cu și fără diferite cantități de antioxidant adăugate (soluție alcoolică de BHT 0,001 M sau tinctură din plante, preparată conform II.3.3-C și diluată de 10 ori), în prezența soluției de peroxid de hidrogen 100 μ M. Programul utilizat pentru achiziția și prelucrarea datelor a fost VoltaMaster 4.

Rezultate obținute

Peroxidaza (E.C.1.11.1.7) catalizează dehidrogenarea unui mare număr de compuși organici cum ar fi fenolii și aminele aromatice în reacție cu peroxidul de hydrogen [207]:



Procedeul utilizat pentru imobilizarea peroxidazei, înafara faptului că este extrem de simplu și de rapid, a dus la rezultate reproductibile (deviație standard mai mică de 5% observată pentru răspunsul a 10 electrozi proapăt preparați). În toate cazurile o linie de bază stabilă a fost obținută în mai puțin de 3 minute. Așa cum era de așteptat, timpul de răspuns a crescut cu creșterea viscozității mediului (creșterea concentrației de ulei) și cu descreșterea vitezei de amestecare, întrucât acești doi factori încetinesc viteza de difuzie a substratului către catalizator. Cu toate acestea nu a putut fi aplicată o viteză prea mare de agitare din cauza spumării detergenților. Dacă biosenzorul a fost stocat în atmosferă uscată la 4°C, răspunsul acestuia a fost constant timp de aproximativ două zile. După aproximativ o săptămână, sensibilitatea acestuia a scăzut considerabil.

S-a găsit că concentrația maximă de detergent care nu influențează semnalul amperometric este de 0,2%. Semnalul amperometric a fost înregistrat pentru diferite volume de BHT adăugate în ulei și a fost comparat cu cel înregistrat în cazul utilizării tincturii din plante.

Primele rezultate semnificative legate de variația semnalului amperometric la adăugarea de mixtură antioxidantă (diluată de 10 ori) și respectiv soluție alcoolică de BHT 0,001 M sunt redată în figurile 56 și 57.

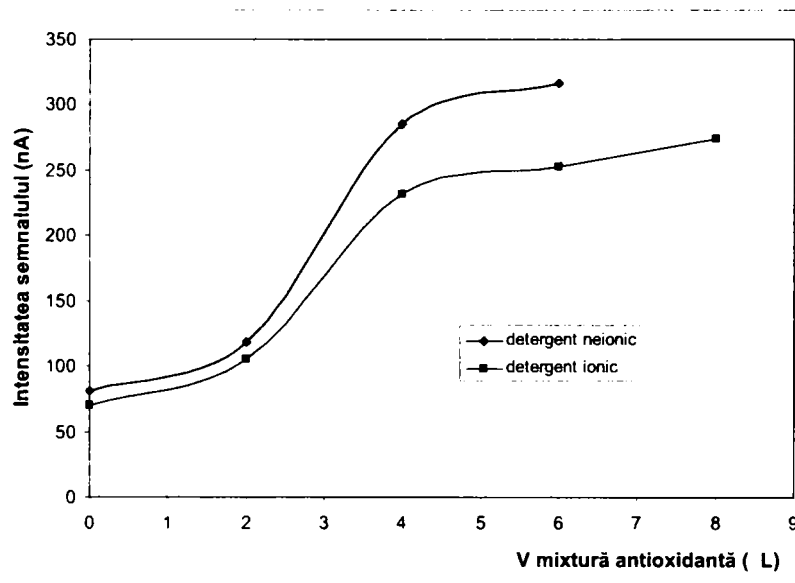


Figura 56. Variația semnalului amperometric la adăugarea a diferite volume din mixtura antioxidantă diluată

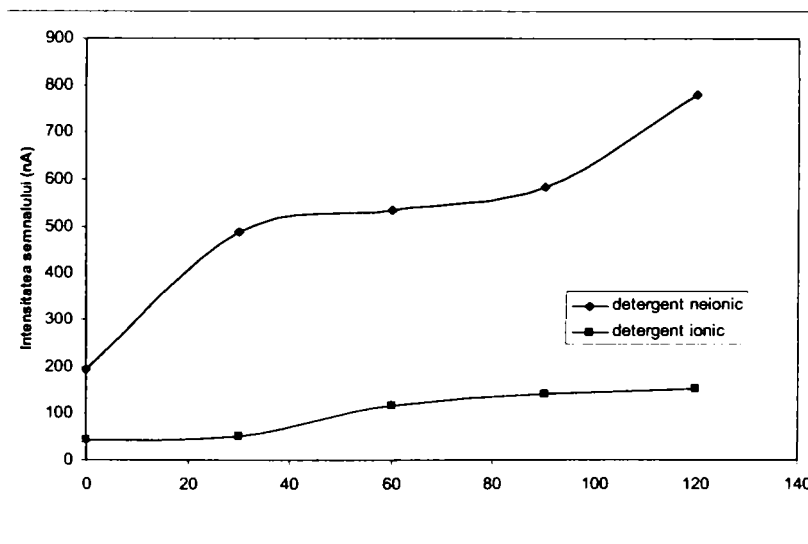


Figura 57. Variația semnalului amperometric la adăugarea a diferite volume din soluția de BHT 0,001M. Semnalul inițial corespunde uleiului „solubilizat” cu detergent ionic și respectiv neionic

Semnalul inițial ($V = 0$) corespunde uleiului „solubilizat” cu detergent ionic (lauril-sulfat de sodiu) și respectiv neionic (Eshaphor EM 310). Rezultatele par a fi influențate de repartitia antioxidantului studiat între cele două faze: apoasă și

uleioasă. Mixtura antioxidantă are o comportare mai bună decât soluția de BHT, în sensul că este mai puțin sensibilă la variații ale compoziției (constituenților) electroliților (mediului de lucru).

Bazat pe ecuația Michaelis-Menten [208] au fost determinate valorile pentru K_M (constanta Michaelis-Menten) și I_{max} (intensitatea maximă a semnalului) cu ajutorul programului Kaleidagraph 4.0. (tabel 29).

Cele mai bune rezultate (cele mai mari valori pentru K_M și I_{max}) și cea mai bună specificitate a biosenzorului (I_{max}/K_M) au fost obținute atunci când pentru solubilizarea uleiului a fost utilizat Eskaphor 310.

Tabel 29. Valorile pentru constanta Michaelis-Menten (K_M), intensitatea maximă a semnalului (I_{max}), specificitate (I_{max}/K_M) și coeficientul de corelație, R

Substrat	Detergent	K_M	I_{max} (nA)	I_{max}/K_M	R
tinctură din plante	Lauril-sulfat de sodiu	111,64 $\mu\text{L}/\text{L}$	639,01	5,574 (nA· μL)/L	0,99586
	Eskaphor 310	94,887 $\mu\text{L}/\text{L}$	687,46	7,245 (nA· μL)/L	0,99188
BHT	Lauril-sulfat de sodiu	9,7508 μM	252,95	25,94 (nA/ μM)	0,99572
	Eskaphor 310	14,054 μM	1286,8	91,56 (nA/ μM)	0,99329

Se intenționează continuarea cercetărilor în acest domeniu. Într-o primă fază se va urmări stabilizarea semnalului amperometric și apoi corelarea răspunsului obținut pentru amestecul antioxidant cu cel obținut pentru BHT în vederea stabilirii concentrației de compuși fenolici din amestecului antioxidant.

Integrarea analizei cu biosenzori în schema tehnologică de obținere a uleiurilor vegetale

Operațiile care se desfășoară într-o fabrică de ulei sunt de două tipuri: operații pregătitoare (I) și operații de prelucrare (II).

Prima grupă de operații cuprinde recepția, curățirea, uscarea și depozitarea.

În cea de-a doua grupă se încadrează toate operațiile de transformare a materiei prime pregătite în vederea prelucrării până la obținerea produsului finit: descojirea, măcinarea, prăjirea, presarea, extracția, distilarea, dezbenzinarea și rafinarea [209]. Introducerea antioxidantilor, controlată de biosenzori, e indicat a avea loc după operația de rafinare (figura 58).

Prin intermediul unității de monitorizare cu biosenzori este determinat conținutul de antioxidanți din ulei și informația este trimisă computerului care decide dacă este necesar adaosul unei cantități suplimentare. Cu ajutorul calculatorului este comandată pompa de alimentare cu antioxidanți precum și valva de golire a rezervorului.

Sistemul va putea fi reglat atât pentru antioxidanți de sinteză, de tipul BHA sau BHT cât și pentru extracte naturale cu grad mare de complexitate.

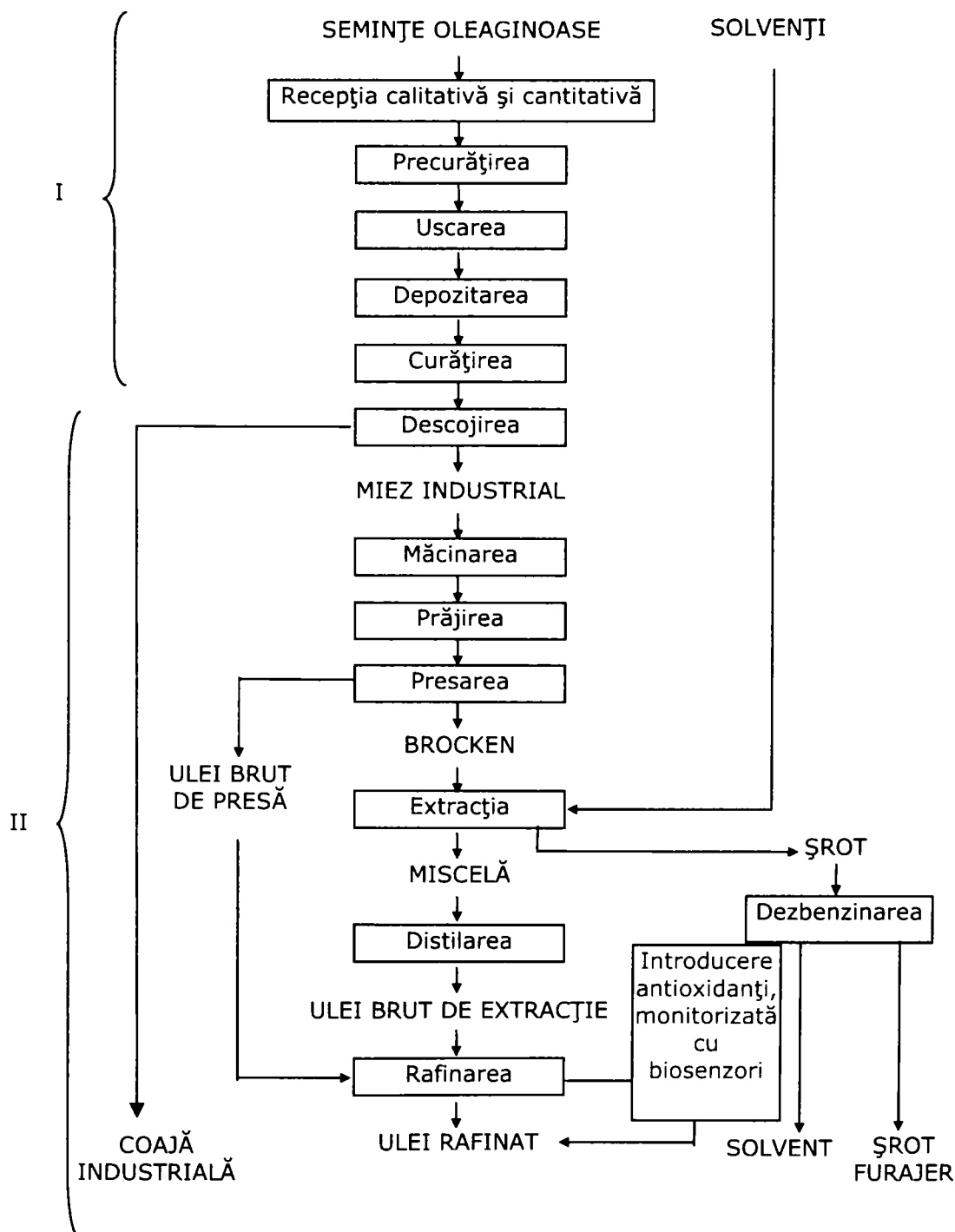


Figura 58. Schema tehnologică de obținere a uleiurilor vegetale alimentare

Schema propusă pentru sistemul de monitorizare este prezentată în figura 59.

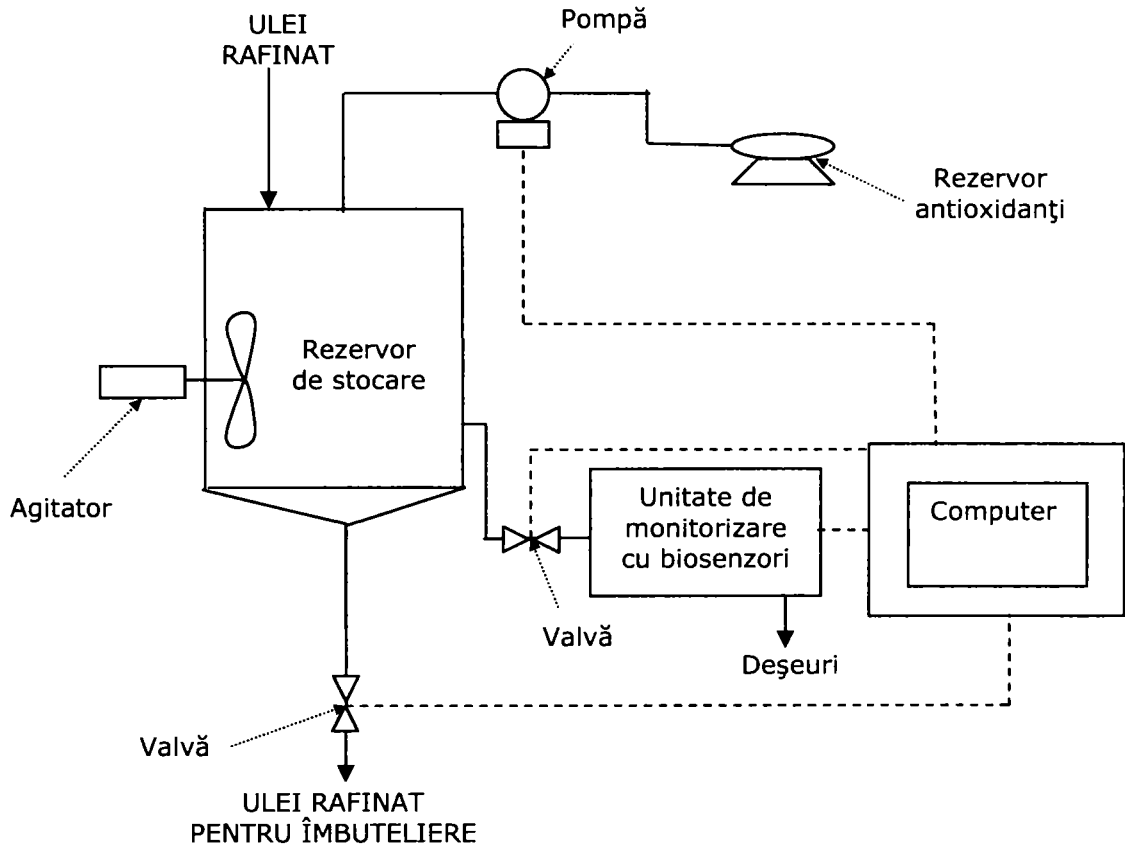


Figura 59. Schema sistemului de monitorizare cu biosenzori

1II.6.3. TESTAREA INTERESULUI CONSUMATORILOR PENTRU ADITIVI DE ORIGINE NATURALĂ

Conform Ordinului Ministrului Sănătății nr.975/1999, aditivii alimentari sunt substanțe care se folosesc la prepararea unor produse alimentare în scopul ameliorării calității acestora sau pentru a permite utilizarea unor tehnologii avansate de prelucrare.

O tendință actuală pe plan mondial este orientarea spre produse naturale, E-urile de sinteză fiind percepute de o mare parte a populației ca o amenințare la adresa sănătății. S-a urmărit testarea percepției locuitorilor din zona Aradului asupra aditivilor alimentari.

Mod de lucru

Au fost intervievate 130 de persoane din diferite medii sociale și categorii de vârstă. Conținutul chestionarului a fost următorul:

1. Numele și prenumele, vârsta
2. Care este criteriul cel mai important la alegerea unui anumit produs alimentar?
 - a) Prețul
 - b) Aspectul
 - c) Calitatea
 - d) Altul (specificați).....
3. Ce părere aveți despre E-urile din alimente?
 - a) Toate sunt periculoase pentru sănătate
 - b) Sunt avizate de Uniunea Europeană deci, în limitele admise, nu prezintă pericol pentru sănătate
 - c) Unele E-uri sunt periculoase pentru sănătate, unele sunt inofensive
 - d) Alta (specificați)... ..
4. Cu cât ați fi dispus să plătiți în plus pentru achiziționarea unor alimente care să conțină alternative naturale la aditivii (E-urile) de sinteză?
 - a) 0-50%
 - b) 50-100%
 - c) 100-200%
 - d) oricât
 - e) nu mă interesează
5. Aveți domiciliul stabil
 - a) La sat
 - b) La oraș, dar locuiesc în oraș
 - c) La oraș
6. Ultimul ciclu de studii finalizat este:
 - a) Ciclul primar (clasele 1-4)
 - b) Ciclul secundar (clasele 5-8)
 - c) Liceul
 - d) Facultatea
 - e) Masterat sau doctorat
7. Venitul / membru de familie este :
 - a) Sub 300 RON
 - b) 300-500 RON
 - c) 500-1000 RON
 - d) peste 1000 RON

Rezultate obținute:

Referitor la criteriul cel mai important în alegerea unui aliment, 66,15% dintre persoanele intervievate au ales calitatea, după cum se poate observa în figura 60.

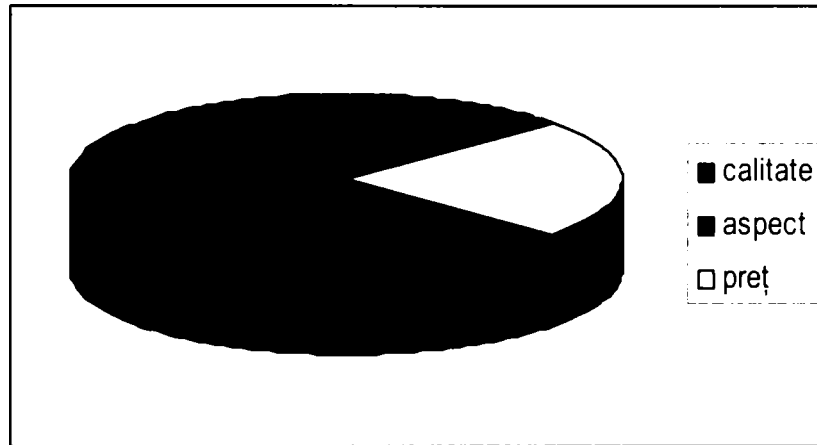


Figura 60. Criteriul cel mai important la alegerea unui anumit produs alimentar

Dintre persoanele intervievate, cei cu studii post-universitare au optat în proporție de 100% pentru calitate. Aspectul alimentelor a fost un criteriu important pentru tineri (63,63% dintre cei care au ales acest criteriu). Prețul a fost un criteriu important pentru locuitorii de la sate și pentru o parte dintre cei cu venituri mici și medii.

Peste 50% dintre persoanele intervievate consideră că toate E-urile sunt periculoase pentru sănătate (figura 61). Vârsta a fost un factor mai puțin important în schimb studiile au fost relevante. Peste 75% dintre persoanele cu studii superioare au avut o percepție corectă asupra aditivilor alimentari.

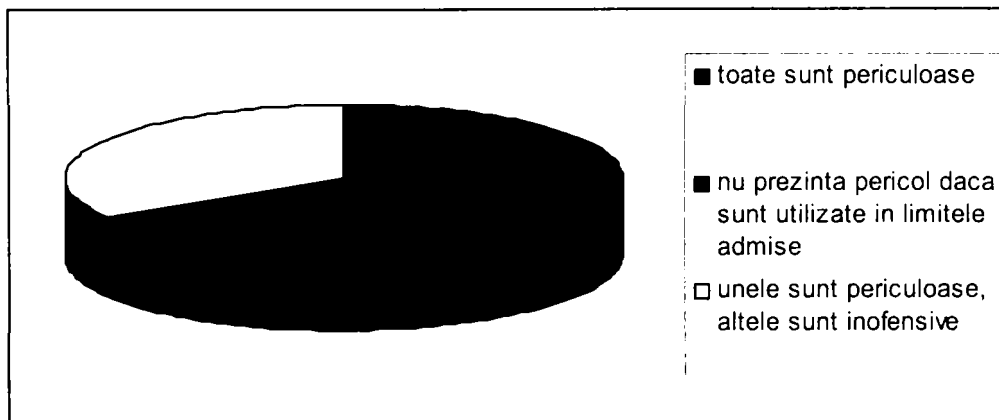


Figura 61. Percepția asupra aditivilor alimentari

Alternativele naturale la aditivii de sinteză sunt o investiție bună întrucât aproximativ 80% dintre persoanele intervievate s-au arătat dispuse a plăti cel puțin

cu 50% mai mult pentru un produs natural (16,5% fiind gata să plătească oricât), după cum se poate observa în figura 62.

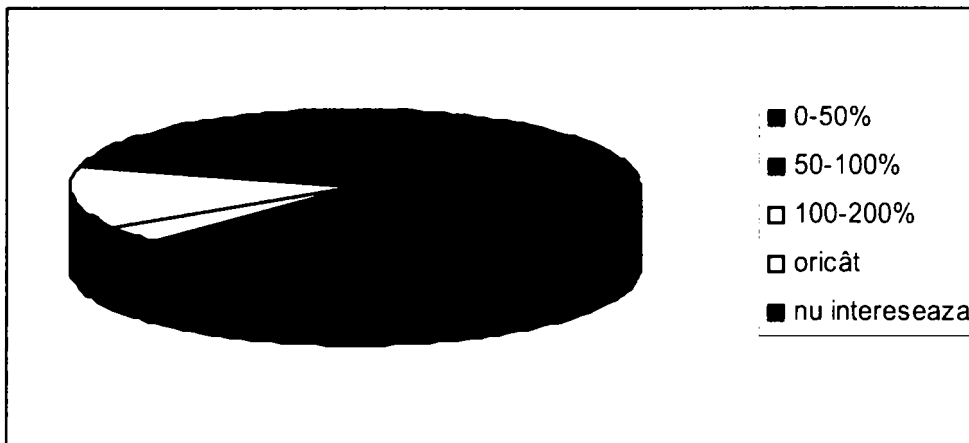


Figura 62. Disponibilitatea de plată suplimentară pentru achiziționarea unor produse naturale

Nu s-au arătat interesate 20,76% dintre persoanele chestionate. 70% dintre persoanele care locuiesc la sat ar fi interesate de achiziționarea produselor naturale dacă prețul acestora nu ar depăși cu 50% prețul actual.

În concluzie se poate spune că datorită percepției preponderent negative asupra aditivilor alimentari, populația interviuată s-a arătat interesată în achiziționarea unor produse care să conțină alternative naturale ale acestora, chiar dacă implică cheltuieli mai ridicate. Acest fapt reprezintă o oportunitate și un imbold pentru desfășurarea de studii și elaborarea de produse mai sănătoase, conforme cu dorințele consumatorilor.

CONCLUZII

Aspectele teoretice prezentate în prima parte, de considerații generale, a tezei au lasat deschisă problema prevenirii oxidării nedorite a produselor alimentare, în special a celor cu conținut ridicat de grăsimi.

Busuiocul, cimbrul, coada calului, coada șoricelului, leușteanul, măghiranul, mărarul, oregano, pătrunjelul, rozmarinul și țelina, deși origine din diverse zone ale lumii sunt cultivate și în țara noastră și utilizate pe scară largă în bucătăria, medicina și cosmetica tradițională. Cercetări anterioare pe uleiurile obținute din aceste plante au dovedit existența a o serie de compuși cu proprietăți nu doar aromatizante ci și antioxidante și chiar antimicrobiene. Tincturile lor au fost destul de puțin studiate și acesta a fost motivul care a stat la baza unor cercetări din cadrul prezentei teze și anume analiza complexă a compoziției și proprietăților lor, în special antioxidante, cu scopul de a propune un amestec de tincturi din plante condimentare care să aibă pe lângă efectul aromatizant și efect antioxidant / antiradicalic cât mai mare și mai constant.

În PRIMA ETAPĂ a cercetărilor experimentale proprii s-a urmărit **îmbunătățirea unor metode utilizate curent pentru analiza activității antioxidante** in vitro și anume: metoda permanganometrică, metoda chemiluminometrică cu luminol și o metodă spectrofotometrică implicând utilizarea DPPH – ului (1,1-difenil-2-picril-hidrazil).

- În unele lucrări din literatură, activitatea antioxidantă a extractelor este estimată calitativ, prin **metoda permanganometrică**, ca fiind invers proporțională cu timpul de decolorare a soluției de permanganat de potasiu de o anumită concentrație la adăugarea unei anumite cantități de extract. În cadrul lucrărilor din teză decolorarea soluției de permanganat de potasiu a fost urmărită spectrofotometric, ceea ce a permis propunerea unei formule pentru estimarea cantitativă a activității antioxidante. Metoda a fost testată pe patru hidrodistilatele obținute busuioc, leuștean, mărar și țelină. S-a găsit că, dintre cele patru, emulsia de țelină are cea mai ridicată activitate antioxidantă.

- În **metoda chemiluminometrică**, adaosul unei substanțe cu efect antioxidant la o soluție bazică de luminol (5-amino-2,3-dihidronaftalazin-1,4-dionă) are ca efect reducerea intensității semnalului luminos; cu cât efectul antioxidant este mai puternic, cu atât semnalul luminos este mai scăzut.

Metoda a fost testată pe hidrodistilatele din busuioc, leuștean, mărar și țelină când s-au obținut rezultate comparabile cu cele obținute prin metoda permanganometrică și pe tincturile celor 11 plante luate în studiu. În cazul tincturilor s-a constatat că activitatea antioxidantă variază în ordinea:

coada șoricelului > rozmarin > măghiran > cimbru > leuștean > oregano > busuioc > mărar > țelină > coada calului > pătrunjel.

S-au remarcat două tipuri de profiluri ale puterii antioxidante și anume: în cazul tincturilor de plante cu capacitate antioxidantă ridicată (coada șoricelului, rozmarin, măghiran, cimbru și leuștean), puterea antioxidantă a fost ridicată la începutul reacției dar a scăzut rapid în timp; extractele celorlalte plante studiate,

mai puțin eficiente (oregano, busuioc, mărar, țelină, coada calului și pătrunjel), au prezentat valori mici la început care au crescut în prima parte a procesului, după care au scăzut din nou. Același tip de profil a fost observat și în cazul hidrodistilatului de țelină.

Ca urmare a acestui studiu s-a făcut recomandarea de a combina plante cu ambele tipuri de profiluri pentru a asigura un efect antioxidant relativ constant și de durată.

• Atunci când o **soluție de DPPH** este amestecată cu cea a unei substanțe donoare de atomi de hidrogen se obține forma stabilă, non-radicalică, a DPPH-ului (1,1-difenil-2-picril-hidrazina), cu schimbarea simultană a culorii de la violet intens la galben pal. S-a introdus și demonstrat o formulă îmbunătățită de calcul a concentrației reziduale de radical DPPH (c_v). Pentru un spectrofotometru monofascicul aceasta este: $c_v = (A - 1,006)/10970$ unde: A - absorbanța. Coeficienții de variație au fost sub 10%.

În scopul ușurării comparării rezultatelor obținute de diverși cercetători, s-a propus o nouă metodă de calcul a activității antiradicalice/antioxidante prin referirea la unul dintre cei mai utilizați antioxidanți în industria alimentară, BHT (2,6-di-tert-butil-4-metil-fenol). S-a stabilit o corelație directă între timpul de înjumătățire ($t_{1/2}$) a concentrației de DPPH și concentrația de antioxidant (BHT) adăugată. Ca urmare a putut fi exprimată activitatea antiradicalică (AA, mol/l), în termeni de concentrație echivalentă de BHT, printr-o formulă independentă de caracteristicile aparatului: $AA = 1,2511\sqrt{2,299/t_{1/2}} \cong (2,3/t_{1/2})^{0,8}$ ($R^2 = 0,98$).

Utilizând metoda propusă, s-a urmărit evoluția activității antiradicalice după unu și respectiv 2 ani de păstrare a tincturilor în condiții de întuneric și temperaturi scăzute (la frigider). Pentru tincturile proaspăt preparate, s-au remarcat rezultate concordante cu cele obținute prin metoda chemiluminometrică.

- După un an, activitatea antiradicalică a scăzut mai mult sau mai puțin în funcție de tipul plantei, cea mai pronunțată scădere a activității antioxidante înregistrând-o tinctura de coada șoricelului.
- După 2 ani, activitatea tuturor tincturilor a scăzut la mai mult de jumătate. Tinctura cu cea mai mare activitate antiradicalică a fost cea de rozmarin, urmată de tincturile de cimbru, coada șoricelului și oregano.

Pe baza rezultatelor obținute **am propus realizarea unei tincturi din șapte dintre cele 11 plante studiate (coada șoricelului, rozmarin, măghiran, cimbru, leuștean, oregano și busuioc) luate în cantități egale**, pentru care activitatea antioxidantă determinată prin metoda cu DPPH a fost de 0,68 mol/l.

În cea de-a **DOUA ETAPĂ** a cercetărilor experimentale proprii s-a urmărit **caracterizarea chimică** a celor 11 tincturi analizate utilizând cromatografia de gaze cuplată cu spectrometria de masă, cromatografia de lichide de înaltă performanță, spectrofotometria și alte metode analitice.

• Pentru **cromatografia de gaze**, s-a făcut extracția în izooctan și apoi în cloroform. Au fost identificate, cu o probabilitate mai mare de 80%, 60 de substanțe preponderente și anume:

- în tinctura de *busuioc*: 1-metoxi-4-prop-2-enil-benzen (ESTRAGOL), α - și β - ocimenul, (1Z,6Z)-1-metil-5-metiliden-8-propan-2-il-ciclodeca-1,6-diena (GERMACREN D), 2-oxo-2-fenil-etil esterul acidului 4-metil-benzoic, 6-metil-1-metiliden-4-propan-2-il-

- 3,4,4a,7,8,8a-hexahidro-2H-naftalen (gamma CADINENE), 2-(3-metilbut-1-yl)ciclohexen-1-carbaldehidă
- în tinctura de *cimbru*: 1-(4-metilbenzoil)-2,3-difenilciclopropan-(2,3-difenilciclopropil)-(4-metil-fenil)-metanona, 3,7,7-trimetilbicyclo [4.1.0] hept-3-ena (3-CARENA), (5S)-2-metil-5-prop-1-en-2-il-ciclohex-2-en-1-ona (CARVOL), 5-metil-2-propan-2-il-fenol (TIMOL), 2-metil-5-propan-2-il-fenol (CARVACROL), 4,11,11-trimetil-8-metiliden-bicyclo[7.2.0] undec-4-ena (CARIOFILEN)
 - în tinctura de *coada calului*: bis[(dimetil-trimetilsililoxi-silil)oxi]-dimetil-silan, trimetil-[metil-tris(trimetilsililoxi) sililoxi-silil]oxi-silan, [1-ciano-1-[2-(2-fenil-1,3-dioxolan-2-il)etil]pentil] etan-peroxoat, pentadeca-5,10-dien-1-ol
 - în tinctura de *coada șoricelului*: 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10-decametil-1,3,5,7,9,2,4,6,8,10-pentaoxapentasilcan, 4-(4-clorofenil)-6-fenil-3H-pirimidin-2-ona, (4,4-dimetil-1,3-difenil-pent-1-enoxi)-trimetil-silan
 - în tinctura de *leuștean*: 1-metil-3-(2-metilpropil)ciclopentan, tetrametil-silanul, 1-etenil-1H-indenul, 3-metilnon-4-ena, tetradec-7-ena
 - în tinctura de *măghiran*: bicyclo[3.2.0]hepta-2,6-diena, -metilen-2-benziloxi-ciclopropanul, 4-metil-1-propan-2-il-bicyclo[3.1.0]hexan-4-ol (SABINENE HIDRAT), 3-etenil-2,5-dimetil-hexa-1,4-diena (SANTOLIN-TRIANA), (1-ciano-1-fenil-butyl) etanperoxoat, (1S,5S)-4,7,7-trimetil-bicyclo [3.1.1] hept-3-ena (1R-à-PINEN), 1-(4-metilbenzoil)-2,3-difenilciclopropan-(2,3-difenilciclopropil)-(4-metil-fenil)-metanona, 3,7,7-trimetilbicyclo [4.1.0]hept-3-ena (3-CARENA), 3-metil-6-propan-2-ilidene-ciclohexena (IZOTERPINO-LEN), (4E)-4,11,11-trimetil-8-metiliden-bicyclo[7.2.0]undec-4-ena (CARIOFILEN), (dimetil-trimetil-sililoxi-silil)oxi-[(dimetil-tri-metilsililoxi-silil)oxi]-dimetil-silil]oxi-dimetil-silan
 - în tinctura de *mărar*: bicyclo[3.2.0]hepta-2,6-diena, 1,5-dimetil-6-metilen-spiro[2.4]heptan, 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10-decametil-1,3,5,7,9,2,4,6,8,10-pentaoxapentasilcan, 1-metil-2-prop-1-en-2-il-benzen, dec-3-ina, spiro[2.4]hepta-4,6-diena, undec-3-ina, tricloro[(diclorofenil) metoxi]-benzen și 7-propilidenenorcaran, (5S)-2-metil-5-prop-1-en-2-il-ciclohex-2-en-1-ona (CARVOL), bis[(dimetil-trimetilsililoxi-silil)oxi]-dimetil-silan,
 - în tinctura de *oregano*: bicyclo[3.2.0]hepta-2,6-diena, 1-(4-metilbenzoil)-2,3-difenilciclopropan-(2,3-difenilciclopropil)-(4-metil-fenil)-metanona, 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10-decametil-1,3,5,7,9,2,4,6,8,10-pentaoxapentasilcan, 2,4-bis (trimetil-sililoxi) benzaldehidă, 2,2,4,4,6,6,8,8,10,12,12-dodeca-metil-1,3,5,7,9,11-hexaoxa-2,4,6,8,10,12-hexasilaciclodecan, 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12,14,14,16, 16-hexa-decametil-1,3,5,7,9,11,13,15-octaoxa-2,4,6,8,10,12,14,16-octasilaciclohexadecan, 2,7-dimetil-4-oxabicyclo[4.3.0]non-6-ena-3,5-diona, 1-metil-2-prop-1-en-2-il-benzen, 1-metil-4-prop-1-en-2-il-ciclohexa-1,3-diena, (1,3,8-p-MENTATRIE-NA), 4-metoxi-6-prop-2-enil-benzo [1,3] dioxol (MIRISTICIN), 2-metil-5-propan-2-il-fenol (CARVACROL), bis[(di-metil-trimetilsililoxi-silil)oxi]-dimetil-silan, trimetil-[metil-tris(trimetil-sililoxi)sililoxi-silil]oxi-silan, fenetil-nonanoat

- în tinctura de *pătrunjel*: 4,4a,5,5a-tetrahidro-6,6-dimetil-(1à,4à,4aà, 5aà)-1,4-metan-1H-ciclopropan[d]piridazina, 1-(4-metilbenzoil)-2,3-difenil-ciclopropan-(2,3-difenilciclopropil)-(4-metil-fenil)-metanona, 1-metil-2-prop-1-en-2-il-benzen, 1-metil-4-prop-1-en-2-il-ciclohexa-1,3-diena (1,3,8-p-MENTATRIENA) și 4-metoxi-6-prop-2-enilbenzo[1,3] dioxol (MIRISTICIN), (dimetil-trimetilsililoxi-silil)oxi-[(dimetil-trimetil-sililoxi-silil)oxi-dimetil-silil]oxi-di-metil-silan, fenetil-nonanoat
- în tinctura de *rozmarin*: 1-(4-metilbenzoil)-2,3-difenil-ciclopropan-(2,3-difenilciclopropil)-(4-metil-fenil)-metanona, 4,7,7-trimethyl-8-oxabicyclo [2.2.2] octan (CINEOL), 1-(2,2,3 -trimetil-1-ciclopent-3-enil)etanona (CAMFOLENAL), 1,3,6-trimetil-5-(3-metil-1H-indol-2-il)-1H-pirimidin-2,4-diona bromoformonitril și 1,2,3-trimetil-ciclopentena, 3-metil-6-propan-2-ilidene-ciclohexena (IZOTERPINOLEN), bis[(dimetil - trimetil-sililoxi-silol)oxi]-dimetil-silan, (4E)-4,11,11-trimetil-8-metiliden-biciclo [7.2.0]undec-4-ena (CARIOFILEN)
- în tinctura de *țelină*: 1,5-dimetil-6-metilen-spiro[2.4]heptan, 4-metiliden-1-propan-2-il-ciclohexena (β -TERPINEN), 1-(4-etilfenil)propan-1-ona, 1-feniletan-1,2-diol, 2-acetil-2,8-dihidro-7-metil-8-metilen-pirazolo[5,1-c][1,2,4]triazina, hexadec-3-ina, 1-(diclorometil-sulfonil-metil)-3-(trifluoro-metil) benzen, 3-(2-benziloxifenil)-1-fenil-propan-1-ona, (4,4-dimetil-1,3-difenil-pent-1-enoxi)-trimetil-silan

În extractele analizate s-a constatat prezența unor compuși terpenici de tip: ocimen, cariofilen, terpineol, pinen și a unor fenoli cum ar fi carvacrolul și timolul. Cu cât concentrația acestora a fost mai mare, cu atât efectul antioxidant a fost mai puternic. Multe dintre substanțele identificate sunt cunoscute și pentru activitatea lor antimicrobiană, ca de exemplu: carvacrolul, izoterpinolenul, cariofilenul, mentatriena, 3-carena, camfenul, pinenul și timolul.

• **Prezența flavonoidelor** a fost studiată atât sub aspect calitativ, prin reacții de culoare și spectroscopie UV-VIZ și IR, cât și sub aspect cantitativ prin HPLC.

Reacțiile de culoare au indicat prezența principalelor clase de flavonoide în toate cele 11 extracte studiate.

Spectrele UV-VIZ au evidențiat existența unor benzi în domenii comune cu cele ale unor flavonoide de referință, rutina și quercetina: domeniul 200-350 nm benzi aparținând tranzițiilor de tip $\pi \rightarrow \pi^*$ și $n \rightarrow \pi^*$ iar în domeniul 340-800 nm benzile de absorbție provin din tranziții de tip $n \rightarrow \pi^*$ date de conjugarea extinsă. Pe lângă benzile comune cu ale etaloanelor au fost identificate și valori caracteristice altor grupări prezente în extracte și anume: semnal la 270 nm care se poate datora conjugării unor cetone; maxime între 284-290 nm specifice acizilor organici; maxime între 335-338 nm indicând prezența compușilor cu conjugare extinsă; maxime între 405-419 nm indicând prezența compușilor cu conjugare extinsă și a grupărilor funcționale de tipul (OH) sau (CO) atașate la (C=C) și semnale la 510 și 541 nm care ar putea fi datorate unor structuri chinonice conjugate. Pe intervalul 500-900 nm s-a constatat repetitivitatea apariției unor maxime și anume: 510, 541, 615 și 670 nm, care au fost atribuite lor unor structuri porfirinice de tipul clorofilei.

Spectroscopia în IR a pus în evidență existența mai multor benzi caracteristice compușilor polifenolici și anume: valorile din preajma lui 3400 cm^{-1} ar putea fi datorate unor grupări -OH asociate, confirmată și de picurile din intervalul $1050-1300 \text{ cm}^{-1}$, caracteristice legăturii C-O (alcoolice sau eterice); valorile între

2850-3100 cm^{-1} sunt caracteristice legăturilor C-H; valori peste 3000 cm^{-1} indică existența unor legături duble alifactice sau aromatice; prezența nucleelor aromatice este confirmată de existența unor picuri în preajma lui 1500 și respectiv 1600 cm^{-1} , iar a alchenelor de picul de la 1680 cm^{-1} ; caracteristic pentru gruparea metil este picul de la 1384 cm^{-1} ; prezența structurilor nesaturate substituie este evidențiată și de multitudinea de benzi din intervalul 400-900 cm^{-1} . S-a remarcat de asemenea un pic intens la 1714 cm^{-1} , caracteristic grupării carbonilice din aldehide, cetone, acizi carboxilici, esteri, amide sau anhidride.

Conținutul total de flavonoide exprimat ca și concentrație echivalentă de quercetină a variat între $4,575 \cdot 10^{-2}$ mol/l (tinctura de măghiran) și $1,089 \cdot 10^{-2}$ mol/l în tinctura de coada calului. Nu s-a putut face o corelație satisfăcătoare între conținutul de flavonoide și activitatea antioxidantă a extractelor studiate, ceea ce indică faptul că compușii flavonoidici nu sunt singurii responsabili de activitatea antioxidantă a acestora.

În extractele analizate au fost determinate prin *cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC)* rutina și quercetina. S-a constatat că quercetina se găsește în cantități foarte mici în tincturile de cimbru, măghiran, mărar, oregano și pătrunjel (concentrația maximă găsită: 0,0521 mg/ml în tinctura de oregano), în urme în tincturile de busuioc, coada șoricelului, leuștean și țelină și deloc în tincturile de coada calului și rozmarin. În schimb rutina a fost identificată în toate tincturile analizate, în cantități mult mai mari comparativ cu quercetina. Cantitatea cea mai mare de quercetină a fost găsită în tinctura de coada șoricelului (1,1748 mg/ml), iar cantitatea cea mai mică în tinctura de busuioc (0,1198 mg/ml).

Cantitatea de *clorofilă* determinată a variat între 7,3 ppm (tinctura de mărar) și 92,9 ppm în tinctura de țelină.

- Bazat pe proprietatea acestora de a prezenta o absorbție maximă a radiațiilor cu lungimea de undă 550 nm în soluție alcoolică și acidă, a fost dozată cantitatea de **antociani** prezenți. S-a găsit că cel mai mare conținut în antociani îl are tinctura de țelină (3,5415 mg/l), iar cel mai mic tincturile de mărar (0,438 mg/l) și de coada șoricelului (0,468 mg/l). Nici în acest caz nu s-a putut face o corelație satisfăcătoare între conținutul de antociani și activitatea antioxidantă a extractelor studiate.

- Analiza cantitativă a **taninurilor** s-a realizat prin titrarea la rece cu KMnO_4 în prezența indigoului carmin folosit ca și indicator de oxido-reducere. Rezultatele au variat între 23,52 mg/l pentru tinctura de rozmarin și 0,4 mg/l pentru tinctura de pătrunjel.

Cea de-a **TREIA ETAPĂ** a cercetărilor proprii a urmărit **aplicabilitatea mixturii propuse ca inhibitor al oxidării unor grăsimi de origine vegetală și animală**.

- Au fost determinate **caracteristicile și comportarea la oxidare a unor uleiuri înalt oleice** obținute pentru prima dată în țara noastră, în anul 2006, din specii hibride de floarea soarelui importate din Italia: Carnia, PR64H45, PR64H91 și PR65A22.

Folosind analiza gaz-cromatografică s-a constatat că toate tipurile de hibridi studiate prezintă un conținut ridicat de ulei: PR65A22 cu 47,11%, PR64H91 cu 46,09%, PR64H45 cu 43,61% și Carnia cu 42,3%. Procentul de acid oleic este foarte ridicat la toate cele patru probe, uleiul PR64H91 având valoarea cea mai mare (91,2%). Uleiurile Carnia și PR64H91 au conținut aproape identic de acid oleic. Conținutul de acid linoleic este mai mare în cazul uleiului Carnia (5,8%). Uleiul PR64H91 are cel mai scăzut procent de acid palmitic (3,31%), la celelalte uleiuri

diferențele fiind nesemnificative. Conținutul de acid stearic cel mai mare îl are uleiul PR64H45 (3,3%) iar cel mai mic uleiul PR65A22 (1,26%).

Pentru *verificarea stabilității la oxidare*, uleiurile au fost supuse unei *oxidări accelerate la temperatura de 110°C timp de 100 de ore*, într-un cuptor de calcinare prevăzut cu ventilație. Probele au fost recoltate la intervalul de 12, 36, 60 și 100 ore și s-au determinat *indicele de peroxid, indicele de refracție, absorbanta în domeniul UV și evoluția conductivității*. Determinările au fost făcute la temperatura camerei și pentru comparație s-a lucrat în mod identic cu un ulei obișnuit de floarea soarelui din soiul Banatia.

Indicele de peroxid a suferit o modificări semnificative în primele 12 ore, pentru toate probele analizate, corelat cu peroxidarea acizilor grași din compoziția uleiurilor. După această perioadă valorile IP fluctuează, posibil datorită instabilității hidroperoxidilor formați la temperaturi ridicate.

Formarea preponderentă a hidroperoxidilor în prima etapă este evidențiată și de minimele *indicii de refracție* înregistrate după 12 ore. După acest interval de timp indicii de refracție au crescut, corelat cu descompunerea hidroperoxidilor și formarea produșilor finali de oxidare, către finalul procesului ajungând toți la aproximativ aceeași valoare.

Monitorizând *spectrele UV* ale alterărilor probelor analizate s-a observat că, pe măsura avansării procesului de oxidare, valorile absorbantei au crescut pentru toate lungimile de undă cuprinse între 220 și 300 nm, pentru toate cele cinci uleiuri analizate, corespunzător formării unor cantități din ce în ce mai mari de compuși de timpul mono-, di-, tri- și tetraenelor, ceto- și etilen-ceto-aldehidelor, α și β dicetonelor și acizilor α -cetonici. Extincțiile specifice la 232 și 270 nm, corespunzătoare formării dienelor și trienelor conjugate, au avut valori mult mai mari în cazul uleiului obișnuit (obținut din hibrid Banatia). Acest fapt indică o stabilitate mult mai redusă la oxidare a uleiului normal comparativ cu cele patru uleiuri înalt oleice. Dintre uleiurile înalt oleice cele mai mari valori atât pentru K_{232} cât și pentru K_{270} au fost calculate pentru uleiul PR65A22.

S-a analizat de asemenea *variația conductivității* ca urmare a produșilor de reacție polari care au rămas în mediul de reacție. Formarea hidroperoxidilor, care s-a arătat ca are loc în primele 12 ore, ar putea fi asociată cu ușoara scădere a conductivității remarcată în acest interval de timp. Următoarele ore, corespunzătoare descompunerii hidroperoxidilor și formării de compuși cu polaritate mai ridicată se remarcă prin creșterea conductivității emulsiei apoase, cea mai mare creștere înregistrându-se, așa cum era de așteptat, în cazul uleiului obișnuit. După primele 36 de ore, pentru toate cele cinci uleiuri studiate se înregistrează o scădere a conductivității, explicabilă prin formarea de compuși polimerici care cresc vâscozitatea sistemului. În cazul oxidării unsorii de porc, în compoziția căreia procentul de acizi grași saturați este mult mai mare decât în cazul uleiurilor, polimerizarea decurge mai încet, scăderea conductivității înregistrându-se abia după 60 de ore de oxidare accelerată. După 100 de ore de la începerea experimentului, conductivitățile tuturor probelor analizate au fost foarte apropiate ca valoare, relativ mici și – cu excepția unsorii de porc – aproape egale cu valorile înregistrate după 60 de ore de oxidare, ceea ce indică o echilibrare a celor două tendințe: de formare de compuși polari și de polimerizare.

Ca urmare a studiilor efectuate se poate afirma că: cele patru tipuri de ulei înalt oleice, produse din hibridii de floarea soarelui Carnia, PR64H91, PR64H45, și PR65A22 prezintă caracteristici (viscozitate, densitate, aciditate) mult diferite față de uleiul obișnuit de floarea soarelui obținut în același mod, adică prin presare la rece; stabilitatea la oxidare este mai mare în cazul uleiurilor înalt oleice și poate fi

corelată cu compoziția acestora în acizi grași; există diferențe și între cele patru uleiuri înalt oleice referitor la caracteristicile și comportarea lor la oxidare, dar acestea sunt ne semnificative.

- A fost studiat de asemenea efectul **metodelor de îndepărtare a clorofilei** (din mixtura analizată), prin adsorbție pe adsorbanți solizi (cărbune activ și Sephadex LH20), asupra activității antioxidante și a compoziției acesteia. S-a remarcat scăderea intensității picurilor caracteristice clorofilei de la 541, 615 și 670 nm în cazul utilizării Sephadex-ului. Deși cărbunele activ a fost mult mai eficient în ceea ce privește îndepărtarea clorofilei, el adsoarbe în același timp și o mare parte din flavonoide (85%), antociani (96%) și taninuri (88%). Utilizarea Sephadex-ului LH20 a dus la o mai slabă îndepărtare a clorofilei (doar 57%), în schimb procentul de flavonoide recuperate a fost de 76%, de antociani 74% iar de taninuri 44%. Utilizând metoda de determinare a activității antioxidante cu DPPH, s-a remarcat de o scădere a acesteia de patru ori în cazul amestecului tratat cu Sephadex LH20 și de 17 ori în cazul amestecului tratat cu cărbune activ.

- **Testarea eficacității in situ** a mixturii antioxidante propuse s-a realizat prin introducerea acesteia în untură de porc (grăsimă saturată) și în ulei tip Carnia (grăsimă nesaturată) care apoi au fost supuse unui test de oxidare accelerată. Rezultatele au fost comparate cu cele obținute în cazul utilizării BHT ca și antioxidant.

Comparând rezultatele obținute pentru uleiul și pentru untura fără adaos de antioxidanți se observă valori de două – trei ori mai mari ale *indicelui de peroxid* în cazul unturii decât în cazul uleiului, deși ar fi fost așteptat ca untura să fie mai stabilă la oxidare, fiind o grăsime saturată. O posibilă explicație constă în efectul antioxidant al tocoferolilor, prezenți în cantități mari în uleiurile vegetale. În uleiul tip Carnia, mixtura (cu sau fără clorofilă) influențează favorabil formarea peroxizilor, la fel și BHT-ul în primele 36 de ore. BHT-ul își manifestă activitatea antioxidantă doar în stadiile avansate ale oxidării. În schimb, în untura de porc, atât BHT-ul cât și mixtura propusă s-au dovedit utile în încetinirea procesului oxidativ, către sfârșitul acestuia mixtura fiind chiar mai eficientă decât antioxidantul de sinteză.

Urmărind *spectrele UV* s-a observat și prin această metodă că atât BHT cât și mixtura propusă au efect slab antioxidant sau chiar pro-oxidant în cazul uleiului de tip Carnia. Influența lor în cazul formării dienei și trienei conjugate este mai mare în cazul utilizării în untura de porc. Valori ridicate ale K_{232} și K_{270} s-au obținut după 60 de ore în special în cazul adaosului de BHT, care însă au scăzut la sfârșitul experimentului (după 100 de ore), corelat probabil cu formarea unor pelicule de tip polimeric. La temperaturi ridicate, de tipul celor din acest experiment, o mare parte dintre antioxidanți se pot pierde prin evaporare. Antioxidanții sintetici de tipul BHT se pierd relativ rapid. Pierderea de antioxidanți naturali este mai mică, întrucât volatilitatea acestora este mai redusă decât cea a antioxidanților sintetici uzuali. În schimb aceștia pot suferi modificări în timpul oxidării.

- **Etapele oxidării** au fost evidențiate prin **analiză termică** pentru uleiul tip Carnia și pentru untura de porc. Curbele TG/DTG pot fi folosite pentru estimarea calității acestora prin determinarea parametrilor cinetici și a perioadei de inducție a oxidării. Profilul *curbelor TG/DTG* a pus în evidență trei etape de descompunere și anume: descompunerea acizilor grași polinesaturați de tipul acidului linoleic, descompunerea acizilor grași mononesaturați de tipul acidului oleic și descompunerea acizilor grași saturați de tipul acidului palmitic. Adăugarea a numai 0,5 mL mixtură antioxidantă / kg grăsime a dus la deplasări semnificative a picurilor corespunzătoare celor trei etape, spre valori ale temperaturii mai ridicate.

• S-a găsit că amestecul propus are și o **activitate antimicrobiană** foarte bună. Activitatea antimicrobiană a fost determinată prin metoda difuziei în agar cu discuri impregnate (metoda difuzimetrică) de hârtie de filtru, pe trei specii bacteriene: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 49399) și *Escherichia coli* (ATCC 25922) și pe o ciupercă tip drojdie (*Candida albicans*, ATCC 24433). Rezultatele sugerează că activitatea antibacteriană este comparabilă cu cea a substanțelor de referință împotriva microorganismelor bacteriene Gram-pozitive patogene *Staphylococcus aureus* și *Streptococcus pyogenes* și mult mai redusă (jumătate din activitatea antibacteriană exercitată de substanțele de referință) împotriva *Escherichia coli*, o bacterie Gram-negativă. Activitatea antifungică a extractului analizat este de asemenea comparabilă cu cea a substanțelor de referință.

PARTEA FINALĂ a lucrării cuprinde aplicații pentru industria alimentară.

• **Modelarea procesului de degradare oxidativă** în absența și în prezența antioxidanților ar putea avea aplicabilitate practică în industria alimentară la calculul duratei de valabilitate a alimentelor cu conținut ridicat de grăsimi.

Ținând cont de complexitatea sistemelor alimentare s-a considerat că sfârșitul duratei de valabilitate reprezintă dispariția unor factori de calitate R (nutrienți, arome caracteristice, etc.) sau formarea unor factori de calitate nedoriți P (absența aromelor, decolorarea, etc.). Ca factor de calitate P a fost aleasă absorbanta în UV la lungimea de undă de 232 nm. Au fost determinate valorile pentru constanta aparentă de viteză și pentru ordinul aparent de reacție, folosind metoda diferențială, pentru cele patru tipuri de uleiuri înalt oleice analizate. Corelațiile au fost destul de bune ($R > 0,99$).

Pe baza rezultatelor obținute, dacă se impune o valoare maximă a indicelui de peroxid peste care uleiul se consideră prea degradat pentru a mai fi utilizat, poate fi calculată durata de valabilitate a acestuia pe baza ecuațiilor cinetice cunoscute. De menționat însă că modelele de tipul celui descris au de obicei aplicabilitatea limitată la sistemele alimentare particulare pentru care au fost studiate.

• Pentru monitorizarea cantității de antioxidant adăugate în ulei la sfârșitul perioadei de rafinare, a fost propus un model de **biosenzor** activ în mediu apos, uleiul supus analizei urmând a fi „solubilizat” cu ajutorul unei soluții de detergent neionic.

• S-a analizat justificarea economică și socială a cercetărilor întreprinse pentru găsirea unor alternative naturale la aditivii de sinteză de tipul antioxidanților. Pentru aceasta a fost testată percepția locuitorilor din zona Aradului asupra aditivilor alimentari. Au fost intervievate 130 de persoane din diferite medii sociale și categorii de vârstă. Peste 50% dintre persoanele intervievate consideră că toate E-urile sunt periculoase pentru sănătate. Vârsta a fost un factor mai puțin important în schimb studiile au fost relevante. Peste 75% dintre persoanele cu studii superioare au avut o percepție corectă asupra aditivilor alimentari. Alternativele naturale la aditivii de sinteză sunt o investiție bună întrucât aproximativ 80% dintre persoanele intervievate s-au arătat dispuse a plăti cel puțin cu 50% mai mult pentru un produs natural (16,5% fiind gata să plătească oricât). Nu s-au arătat interesate 20,76% dintre persoanele chestionate. 70% dintre persoanele care locuiesc la sat ar fi interesate de achiziționarea produselor naturale dacă prețul acestora nu ar depăși cu 50% prețul actual.

Referitor la criteriul cel mai important în alegerea unui aliment, 66,15% dintre persoanele intervievate au ales calitatea. Dintre persoanele intervievate, cei cu studii post-universitare au optat în proporție de 100% pentru calitate. Aspectul alimentelor a fost un criteriu important pentru tineri (63,63% dintre cei care au ales

acest criteriu). Prețul a fost un criteriu important pentru locuitorii de la sate și pentru o parte dintre cei cu venituri mici și medii.

Se poate spune că datorită percepției preponderent negative asupra *mult discutatelor E-uri*, populația interviuată s-a arătat interesată în achiziționarea unor produse care să conțină alternative naturale ale acestora, chiar dacă implică cheltuieli mai ridicate. Acest fapt reprezintă o oportunitate și un imbold pentru desfășurarea de studii și elaborarea de produse mai sănătoase, conforme cu dorințele consumatorilor.

Rezultatele cercetării teoretice au fost valorificate prin publicarea unei cărți, **Oxidarea în sisteme alimentare și biologice și metode de prevenire** în Editura „Aurel Vlaicu” din Arad [4].

Rezultatele cercetărilor experimentale din teza de doctorat au fost valorificate prin 12 lucrări publicate dintre care: o lucrare în *Internațional Journal of Food Properties* [161], o lucrare în *Chemical Papers*, reviste cu impact ISI [166], o lucrare publicată în *Proceedings of the 12th Symposium on Analytical and Environmental Problems*, Szeged, Hungary [160], 8 lucrări publicate în *Scientific and Technical Bulletin of „Aurel Vlaicu” University, Series: Chemistry, Food Science and Engineering*, revistă clasificată CNCSIS de tip B, o lucrare publicată în *Proceedings of the 8th Symposion of Colloid and Surface Chemistry*, Editura Academica Galați [154] și prin 2 lucrări trimise spre publicare (1 lucrare la *Czech Journal of Food Sciences* – ID 73/2008-CJFS și o lucrare la *Internațional Journal of Food Properties* – trimisă la referenți).

ANEXE

ANEXA 1

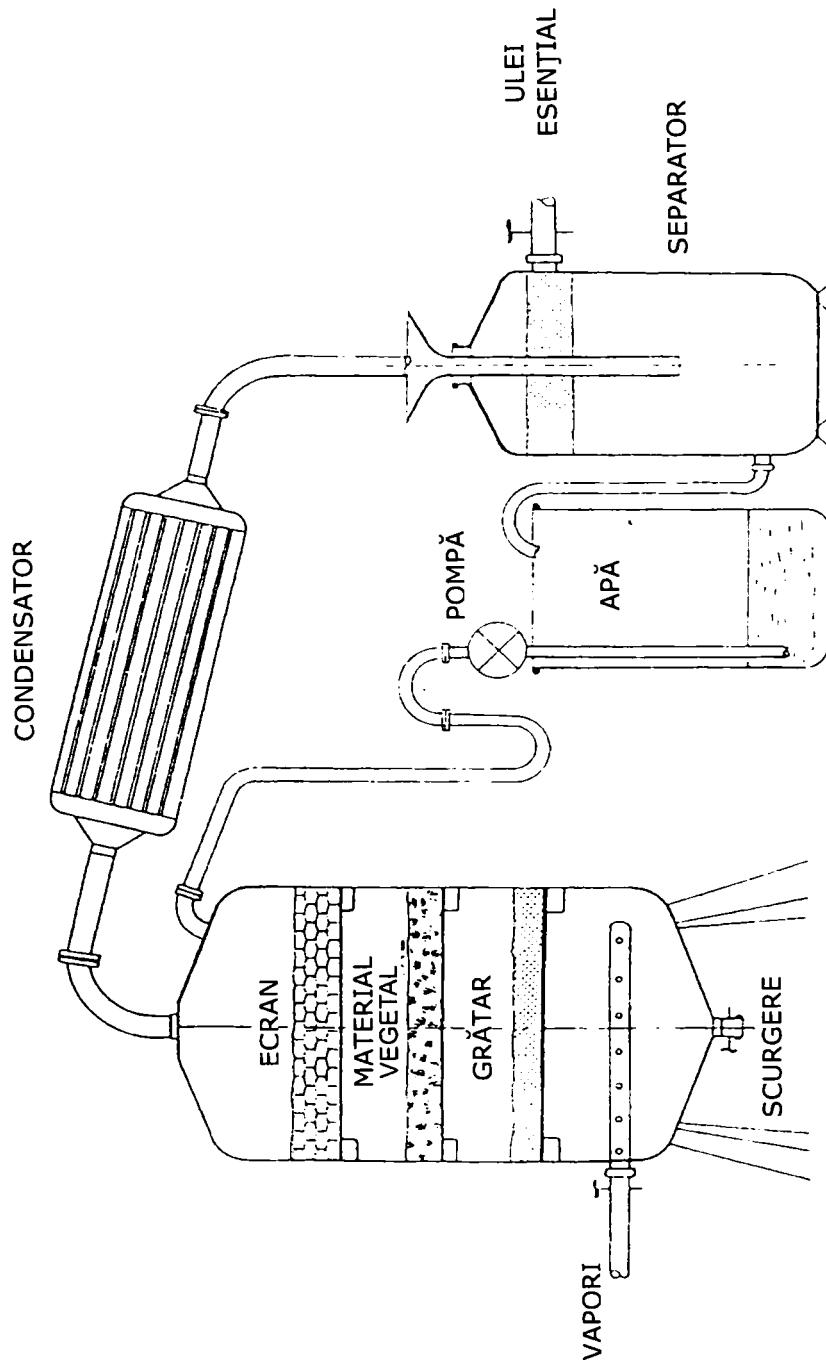


Figura 63. Schema instalației industriale de obținere a uleiurilor esențiale

ANEXA 2. GAZ CROMATOGRAMELE PENTRU CELE 11 TINCTURI STUDIATE

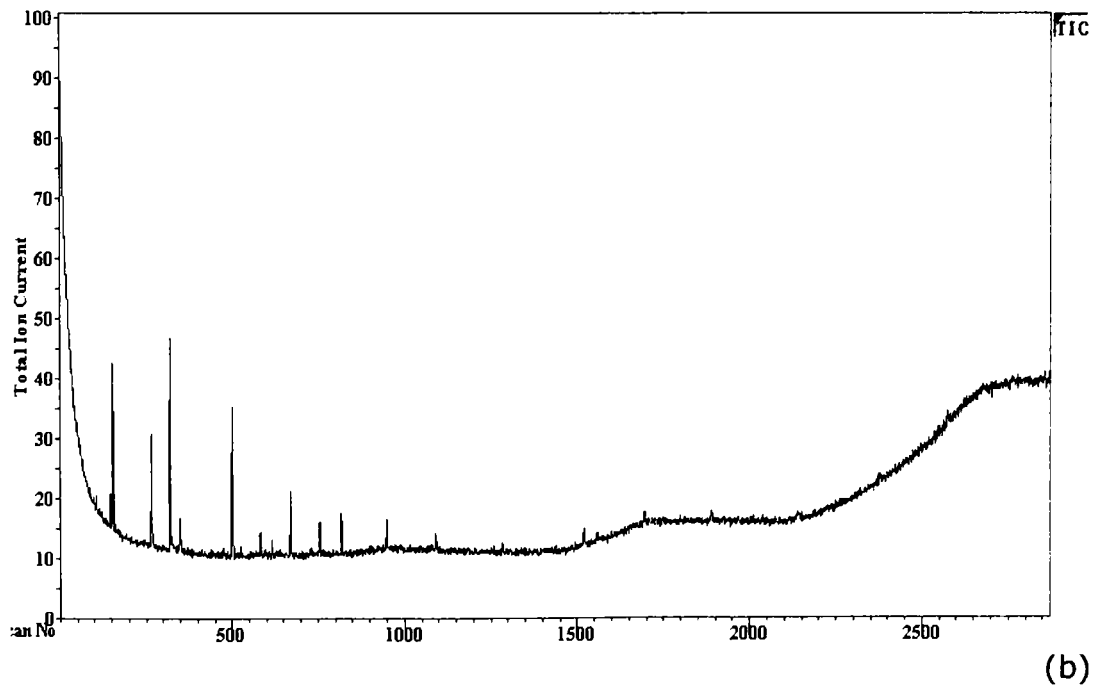
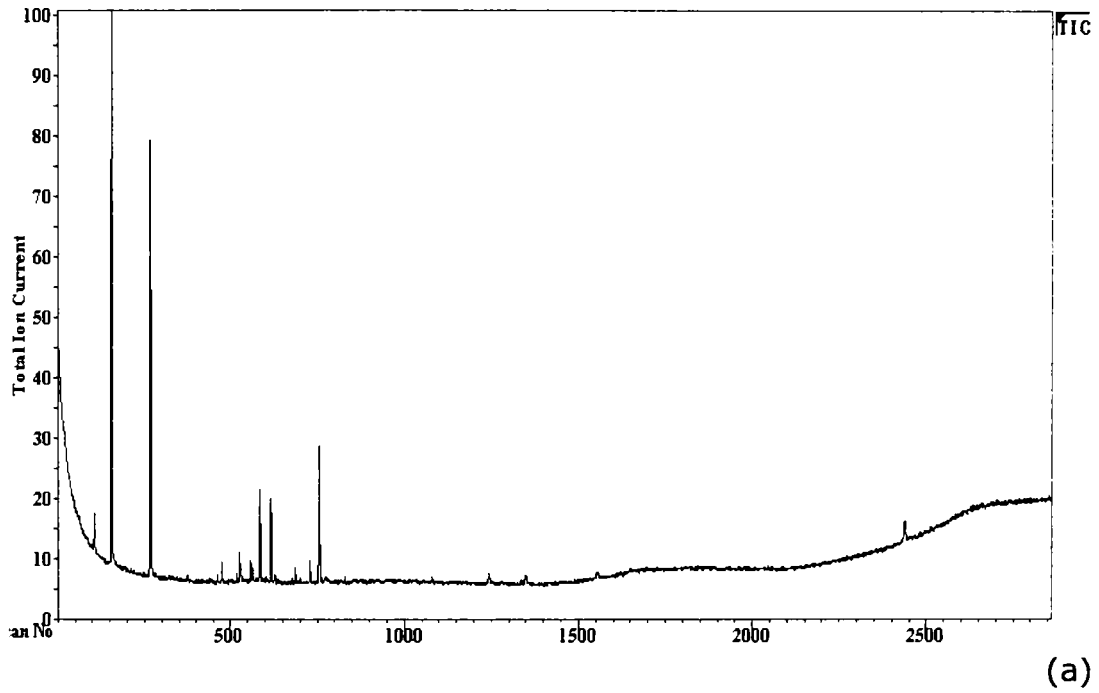


Figura 64. Gaz cromatogramele pentru tinctura de busuioc:
(a) faza izo-octanică; (b) faza cloroformică

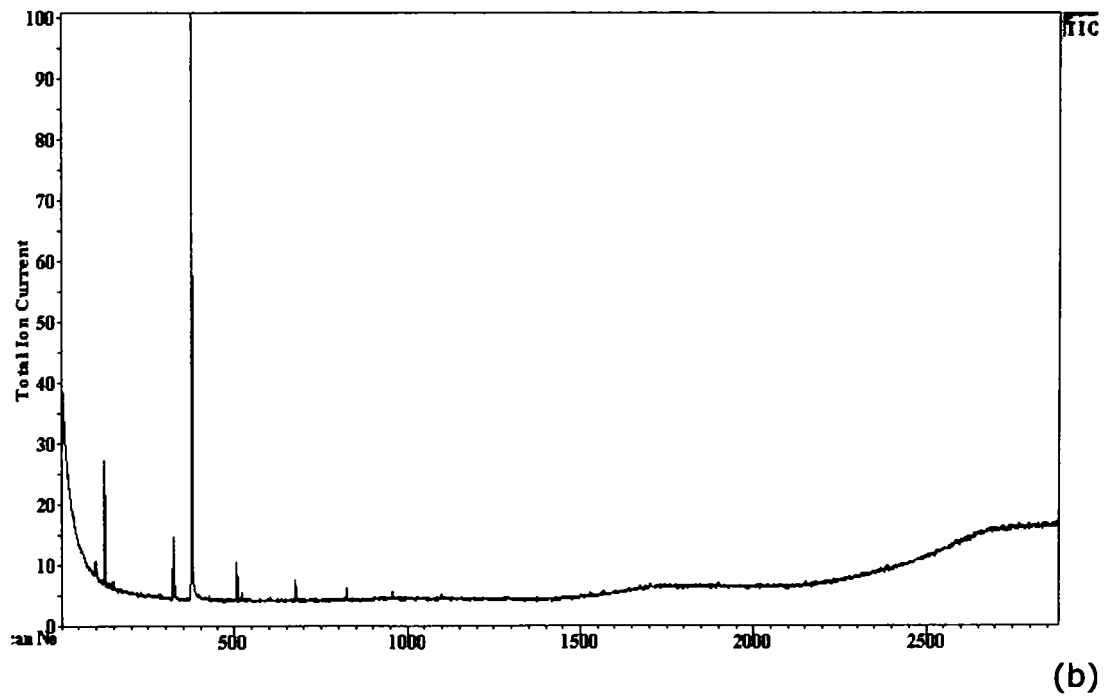
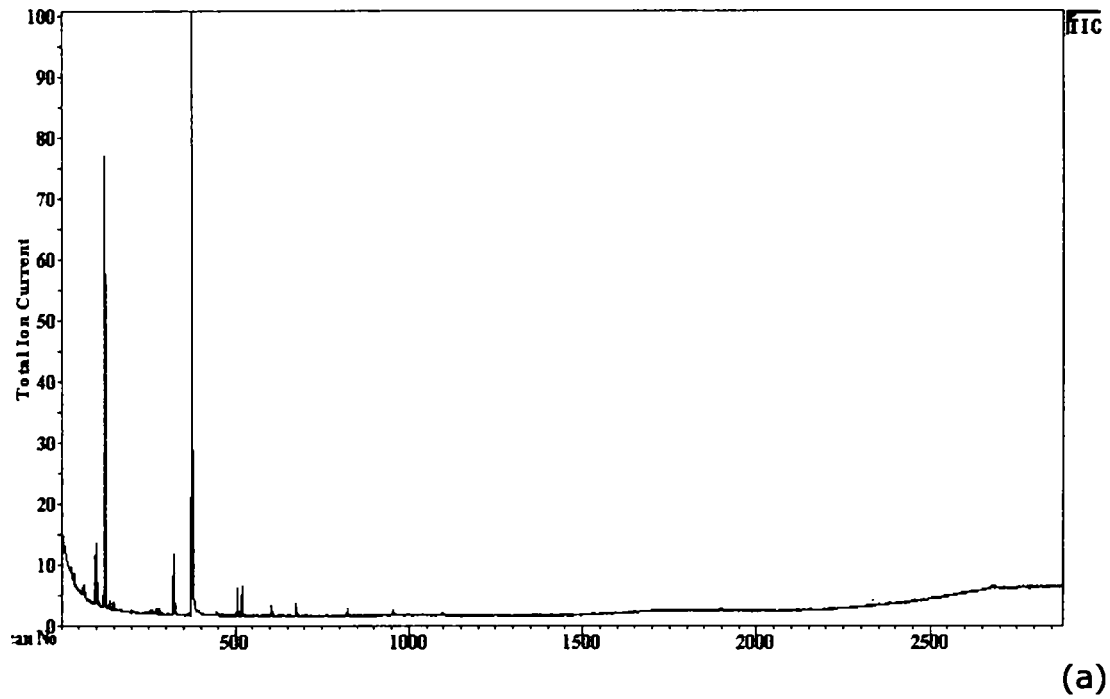


Figura 65. Gaz cromatogramele pentru tinctura de cimbru:
(a) faza izo-octanică; (b) faza cloroformică

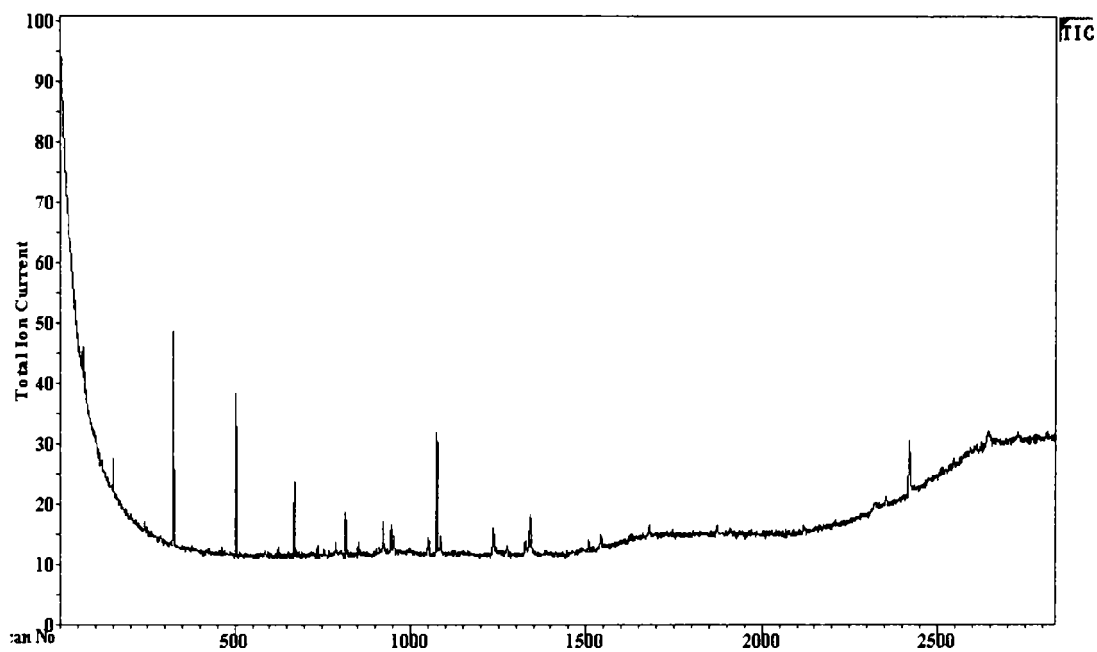


Figura 66. Gaz cromatograma pentru tinctura de coada calului, faza izo-octanică

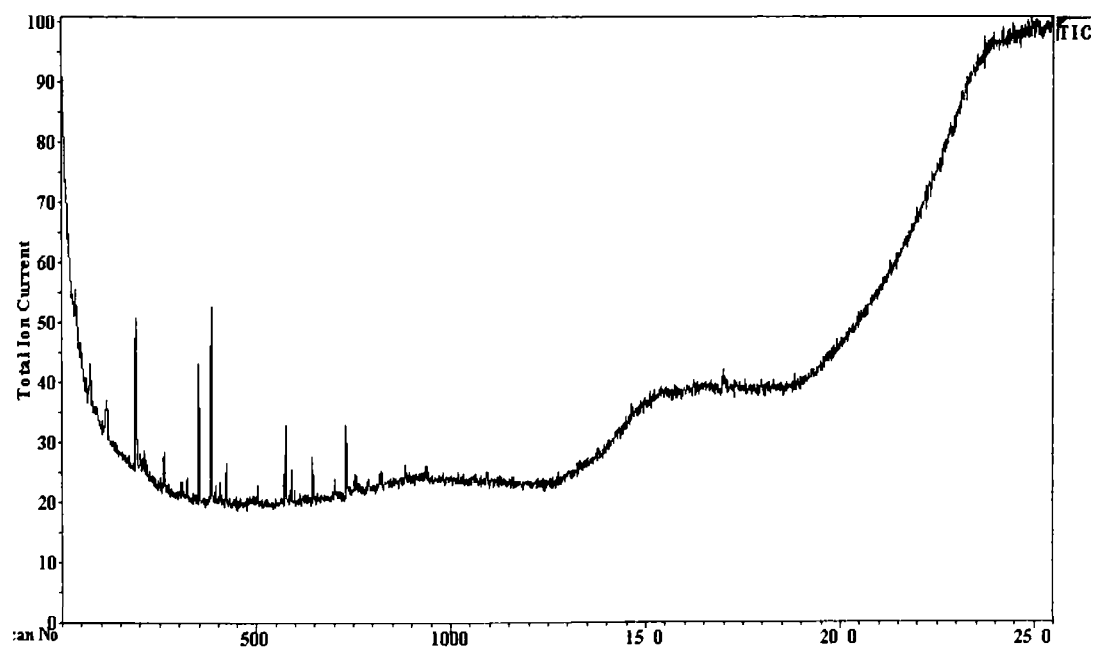
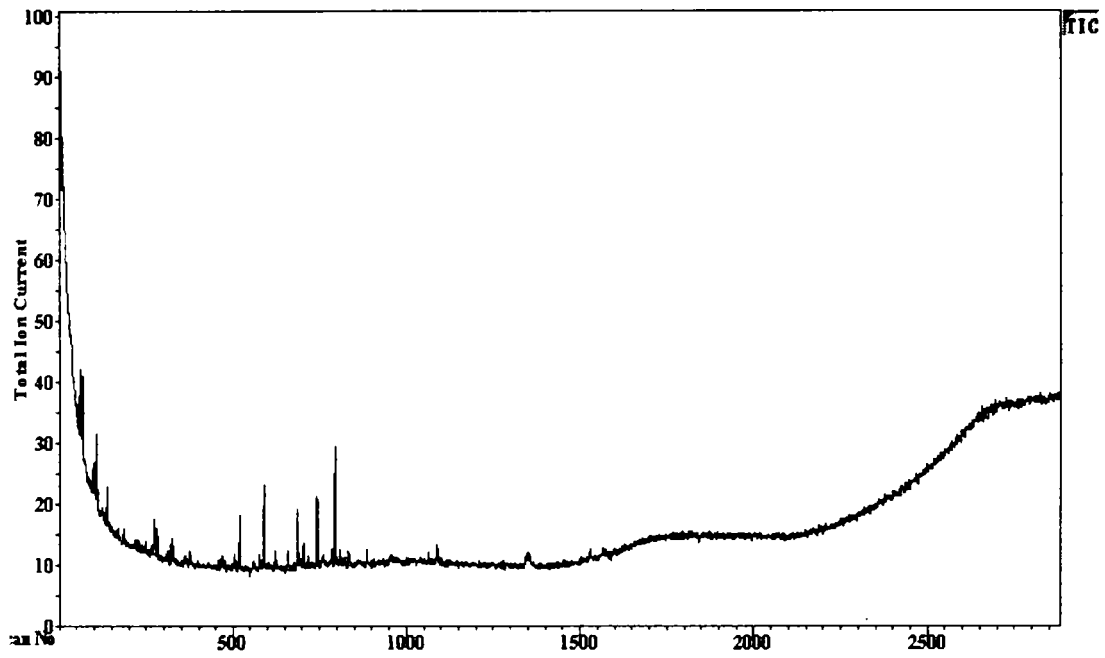
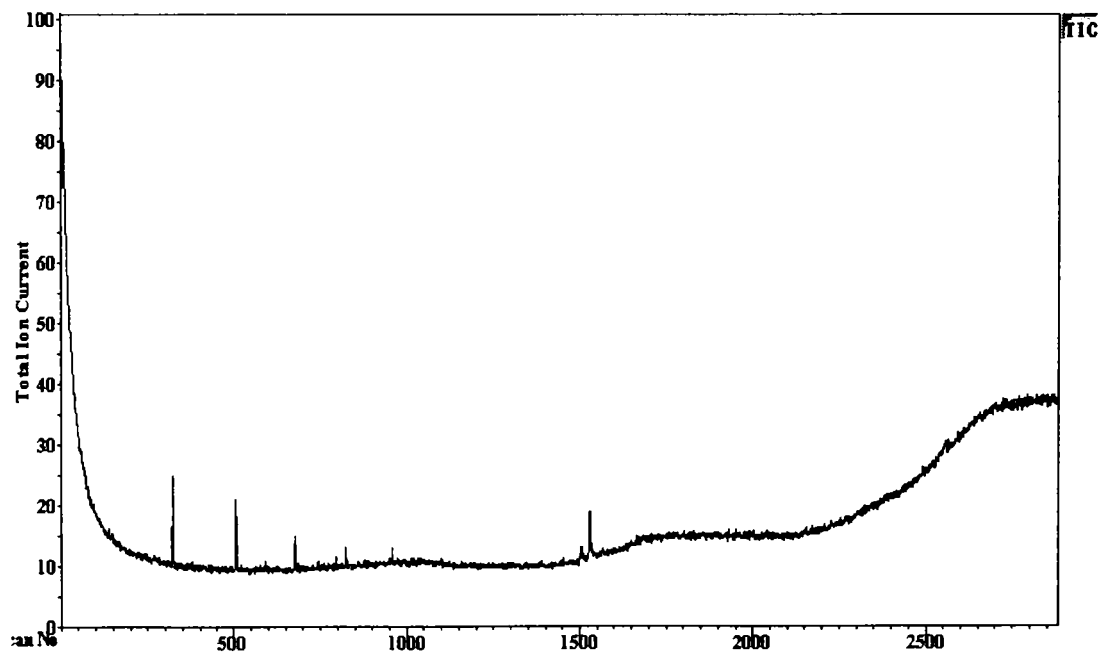


Figura 67. Gaz cromatograma pentru tinctura de leuștean, faza izo-octanică

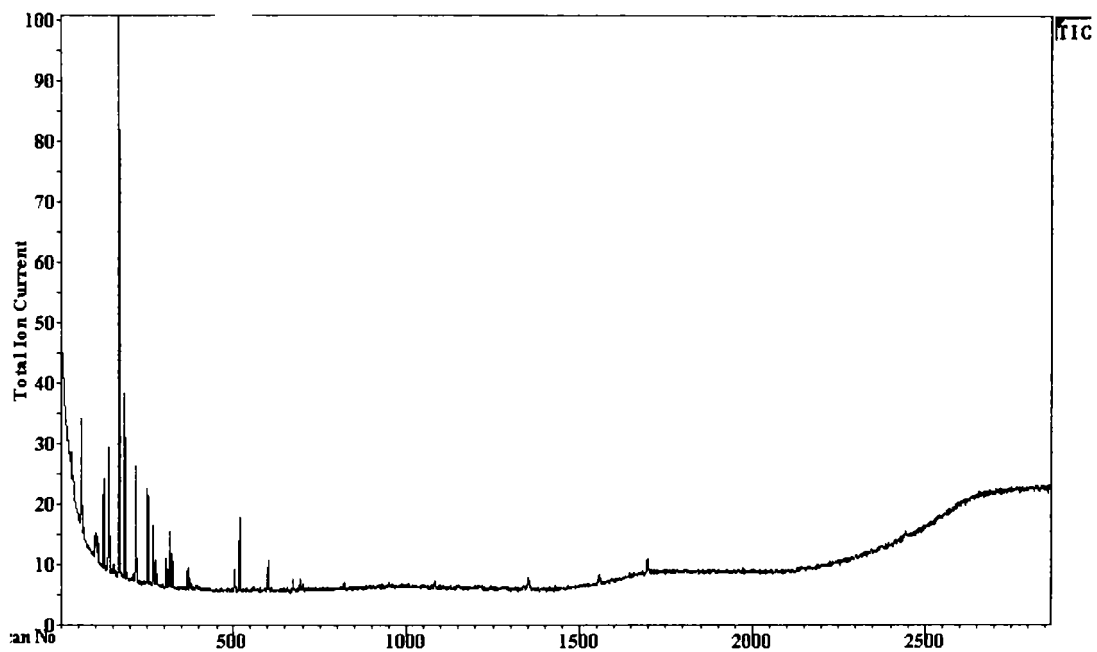


(a)

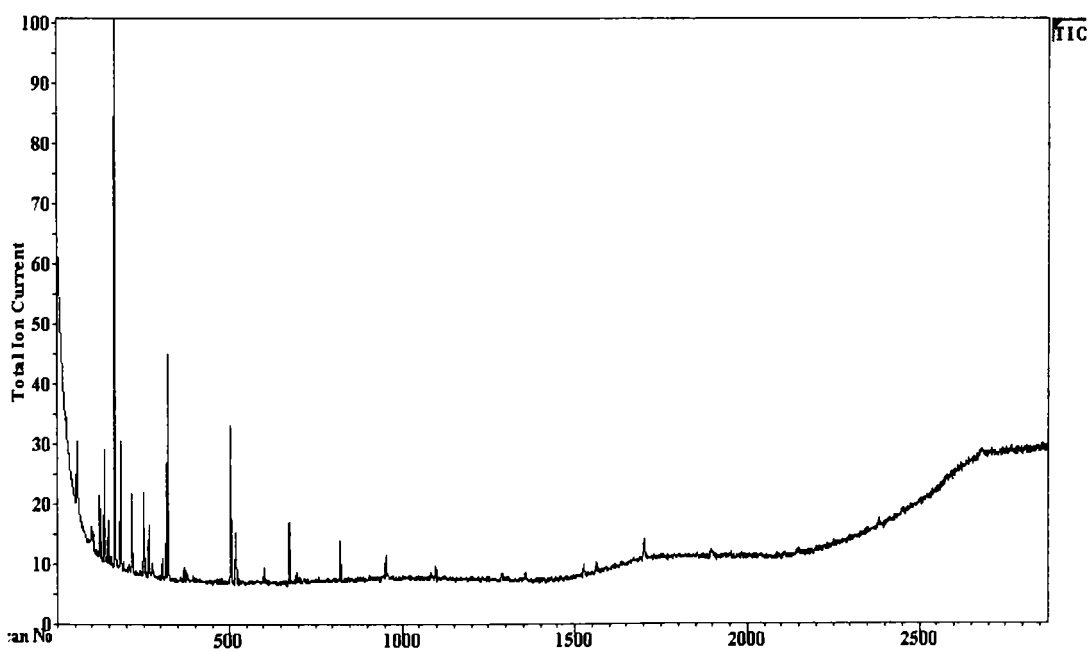


(b)

Figura 68. Gaz cromatogramele pentru tinctura de coada șoricelului:
a) faza izo-octanică; b) faza cloroformică

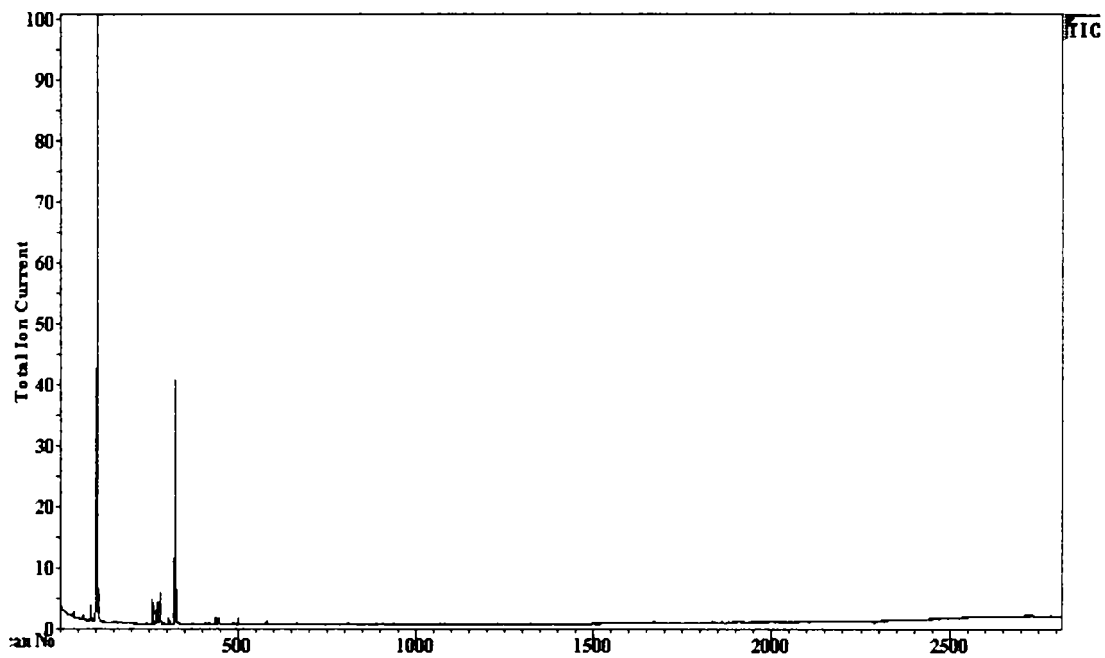


(a)

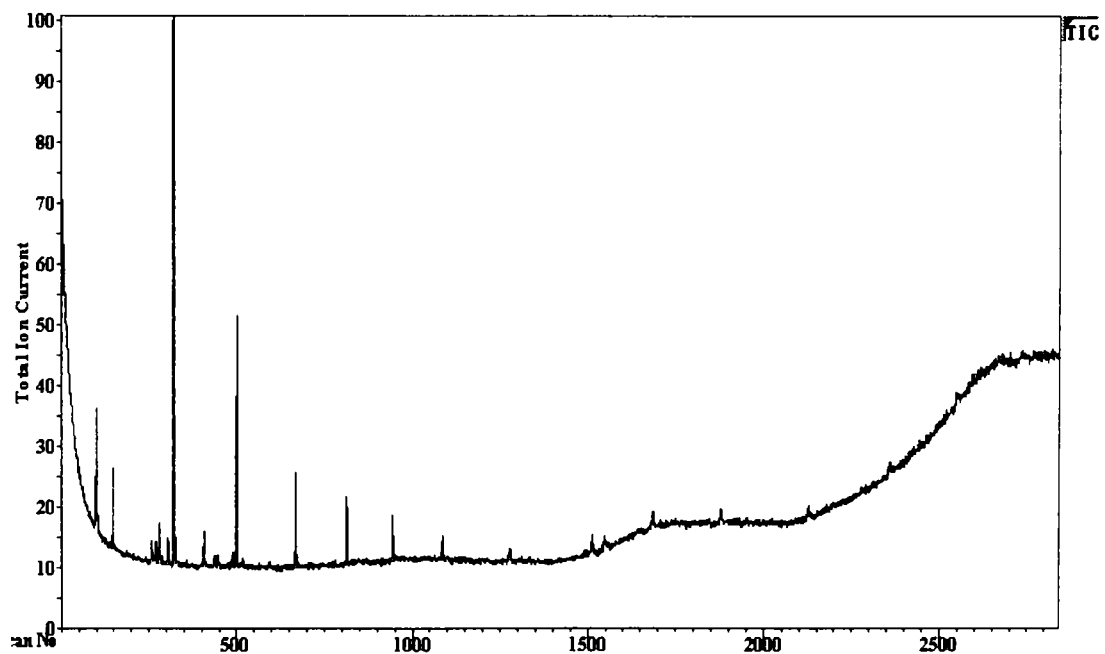


(b)

Figura 69. Gaz cromatogramele pentru tinctura de măghiran:
a) faza izo-octanică; b) faza cloroformică

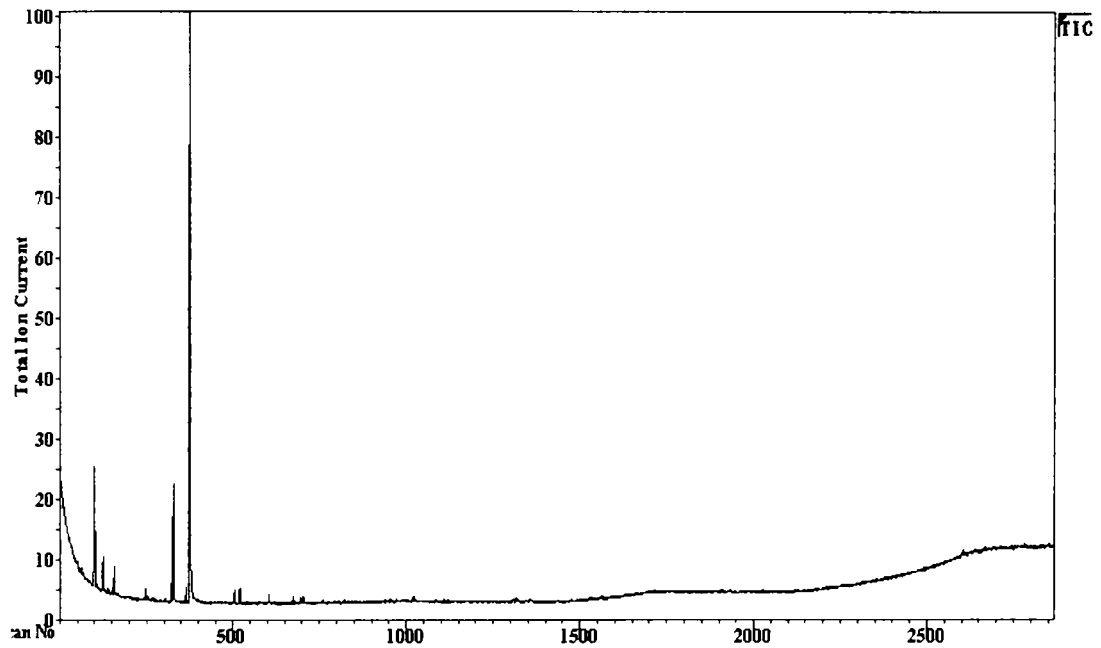


(a)

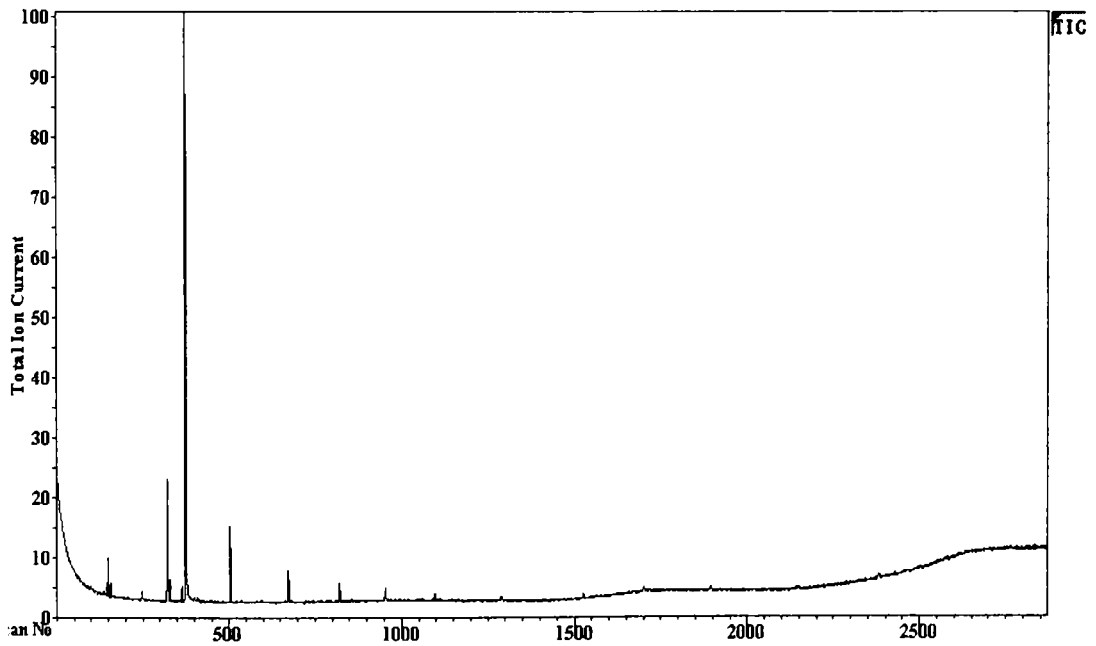


(b)

Figura 70. Gaz cromatogramele pentru tinctura de măr: a) faza izo-octanică; b) faza cloroformică

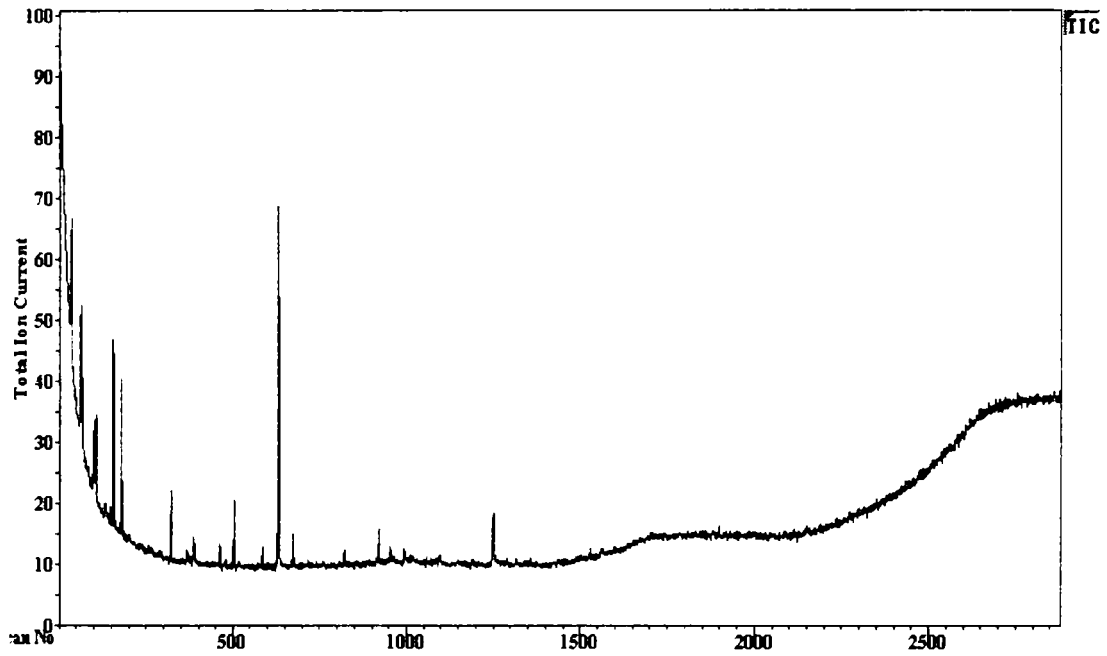


(a)

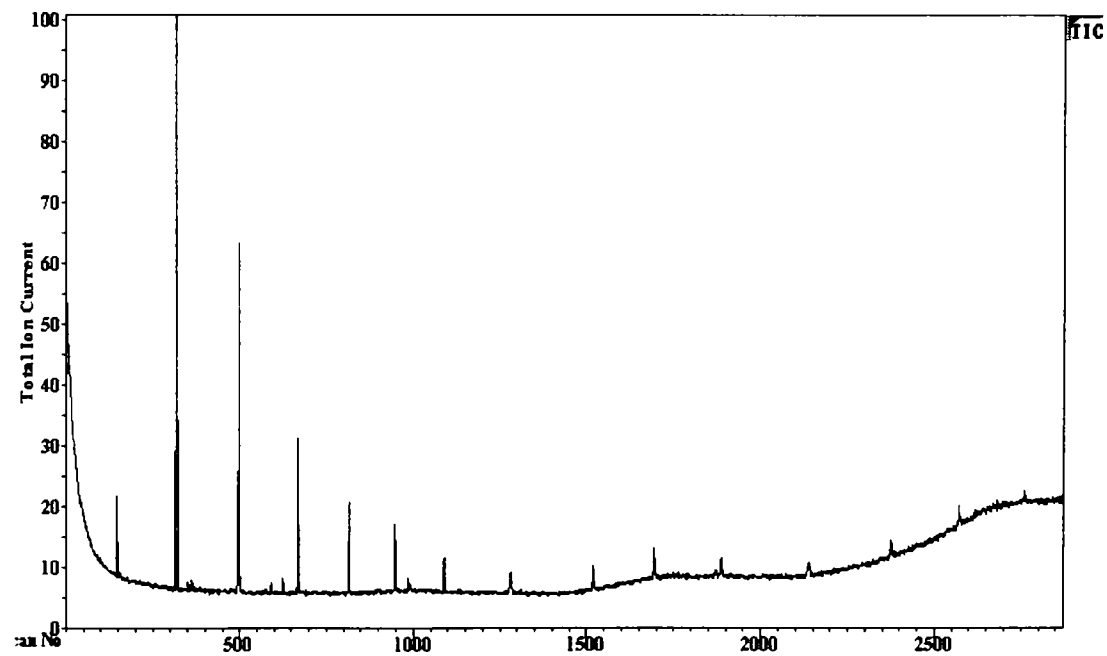


(b)

Figura 71. Gaz cromatogramele pentru tinctura de oregano:
a) faza izo-octanică; b) faza cloroformică

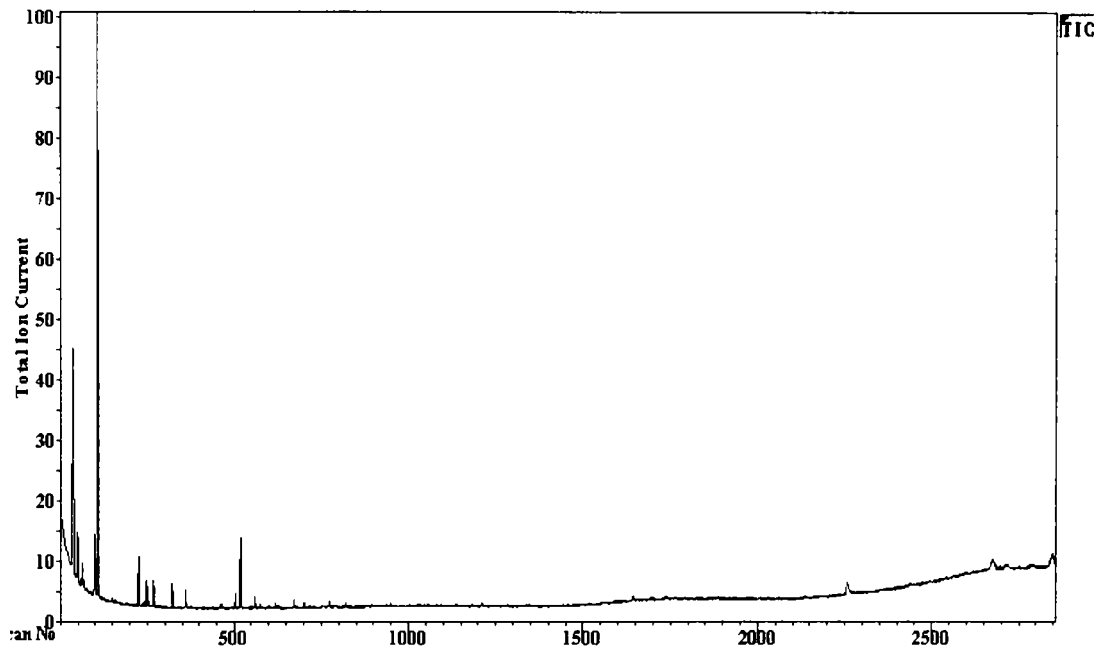


(a)

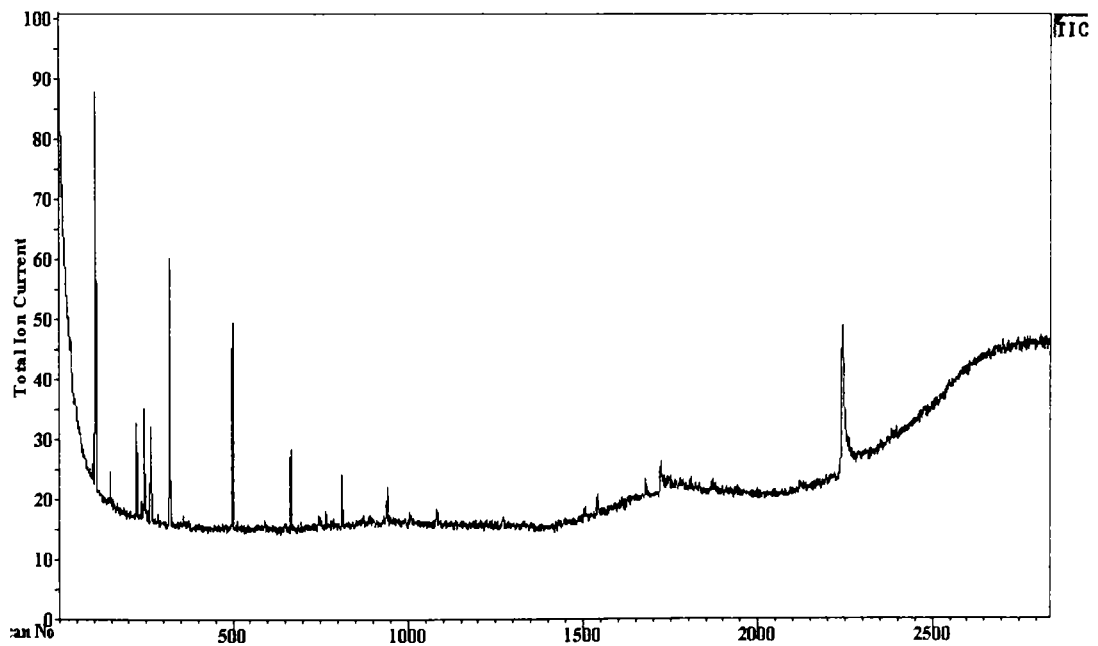


(b)

Figura 72. Gaz cromatogramele pentru tinctura de pătrunjel:
a) faza izo-octanică; b) faza cloroformică

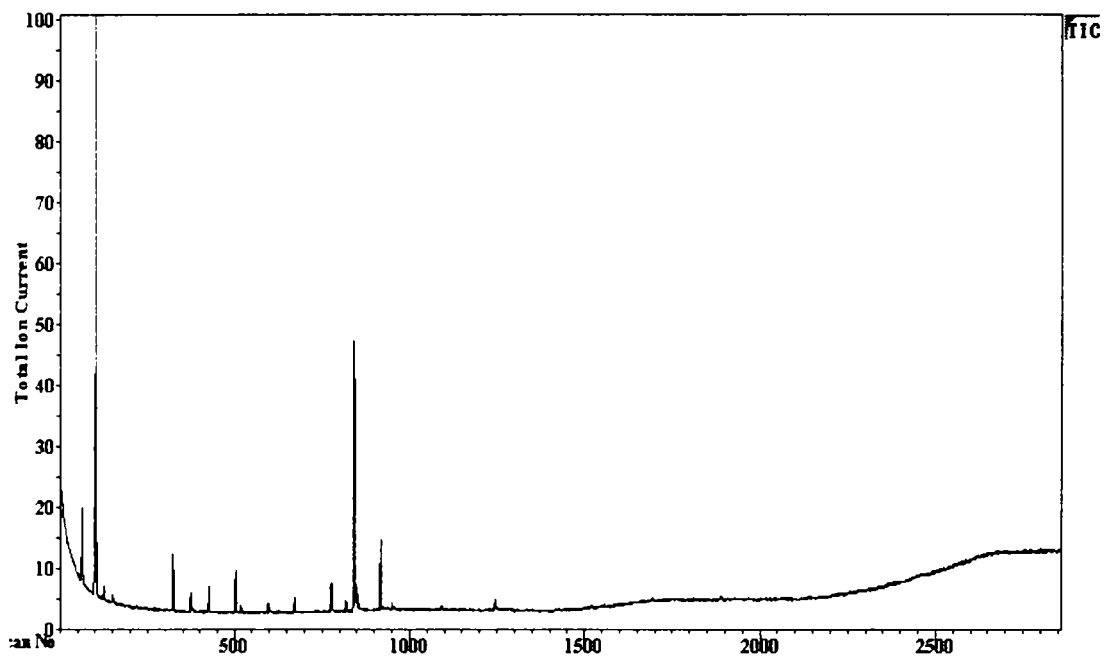


(a)

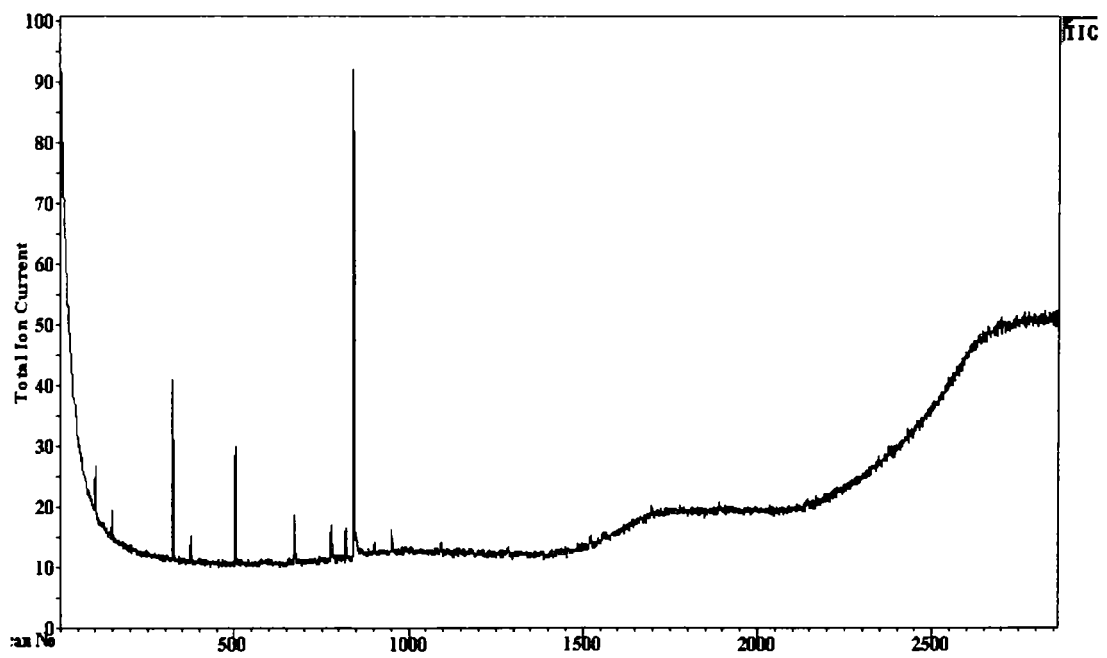


(b)

Figura 73. Gaz cromatogramele pentru tinctura de rozmarin:
a) faza izo-octanică; b) faza cloroformică



(a)



(b)

Figura 74. Gaz cromatogramele pentru tinctura de țelină:
a) faza izo-octanică; b) faza cloroformică

ANEXA 3. CROMATOGRAMELE HPLC PENTRU CELE 11 TINCTURI STUDIATE

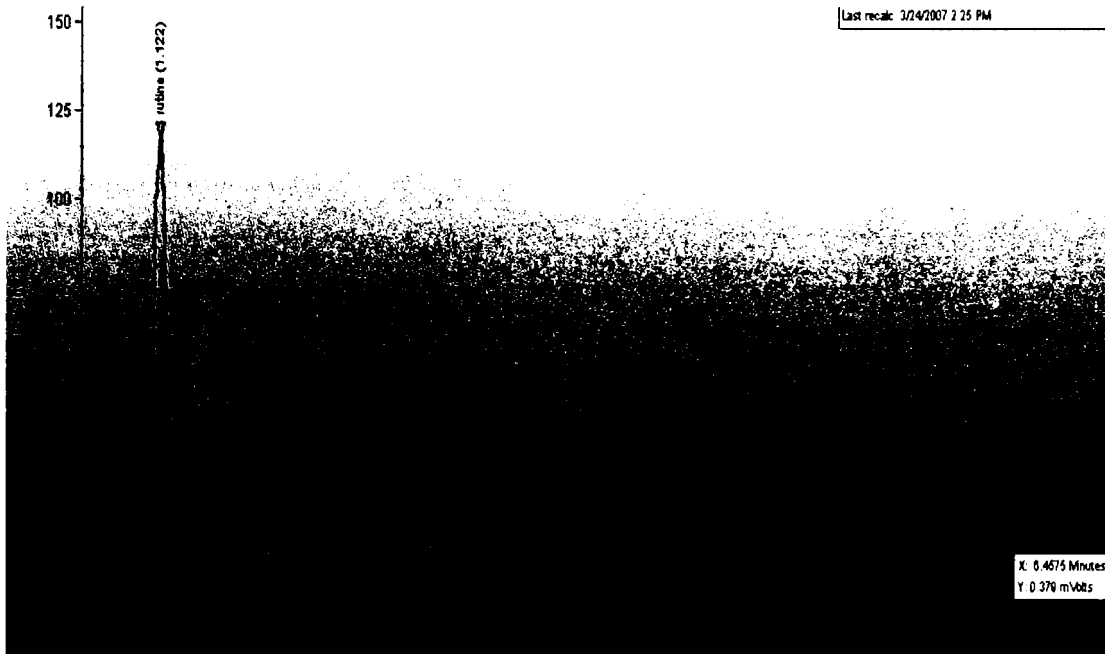


Figura 75. Cromatograma HPLC pentru tinctura de busuioc

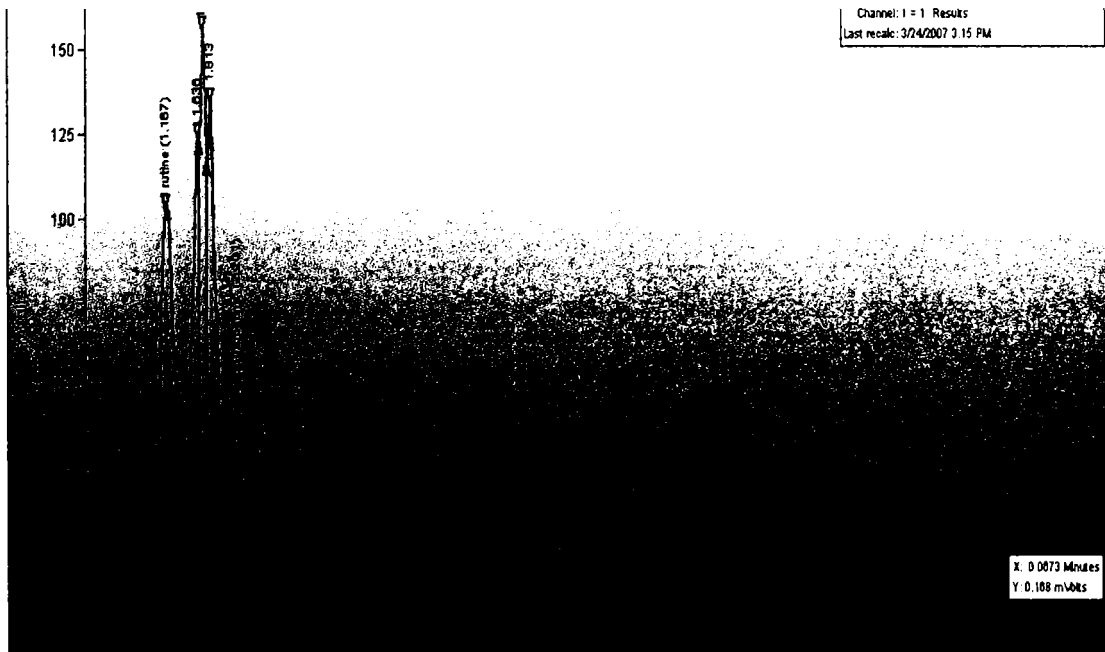


Figura 76. Cromatograma HPLC pentru tinctura de cimbru

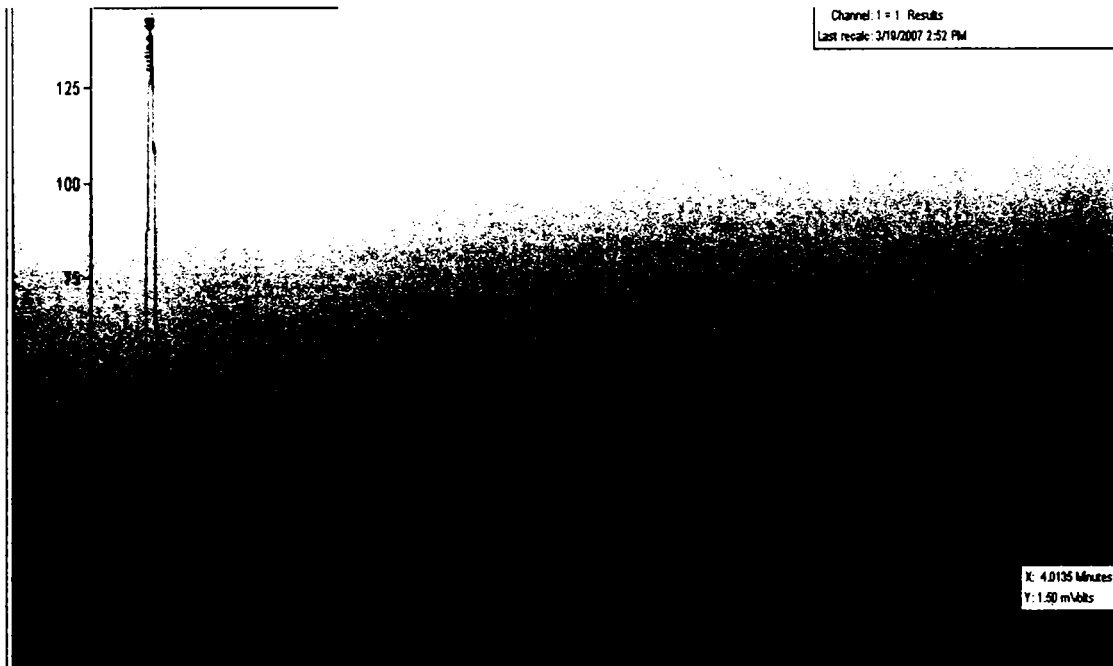


Figura 77. Cromatograma HPLC pentru tinctura de coada calului



Figura 78. Cromatograma HPLC pentru tinctura de coada șoricelului

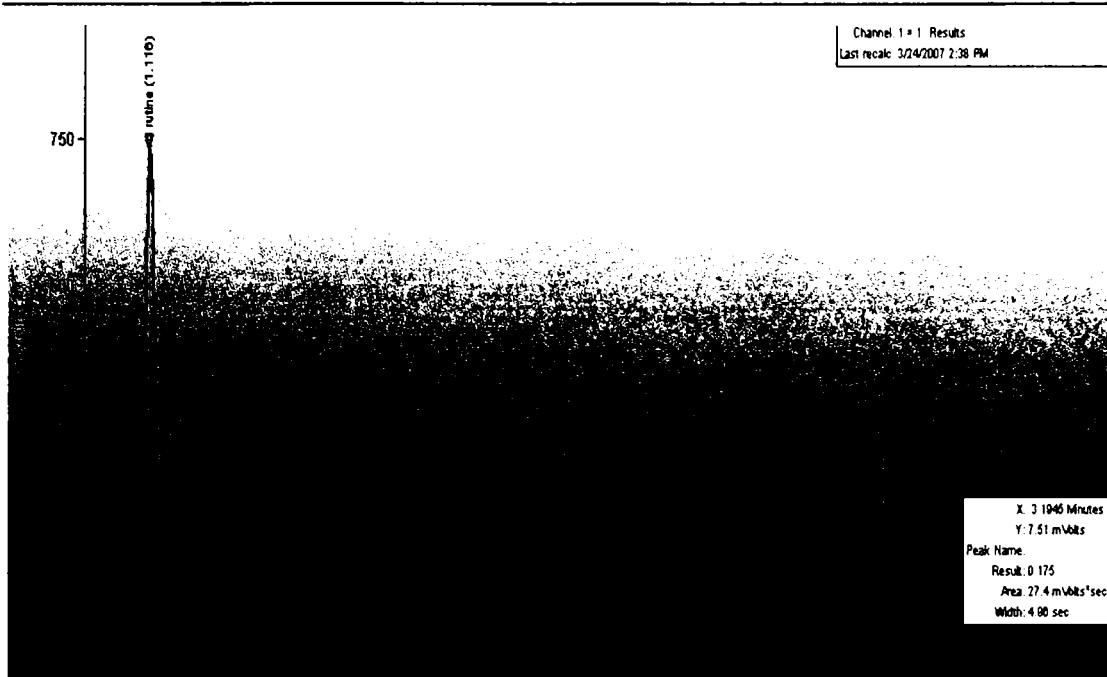


Figura 79. Cromatograma HPLC pentru tinctura de leuștean

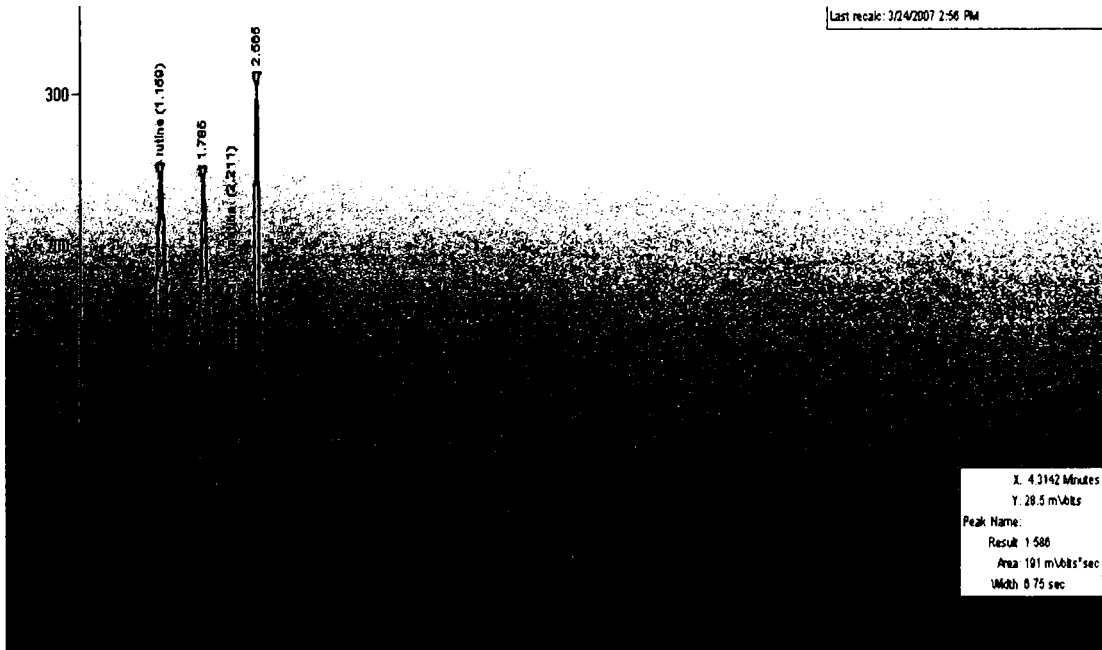


Figura 80. Cromatograma HPLC pentru tinctura de măghiran



Figura 81. Cromatograma HPLC pentru tinctura de mărar



Figura 82. Cromatograma HPLC pentru tinctura de oregano

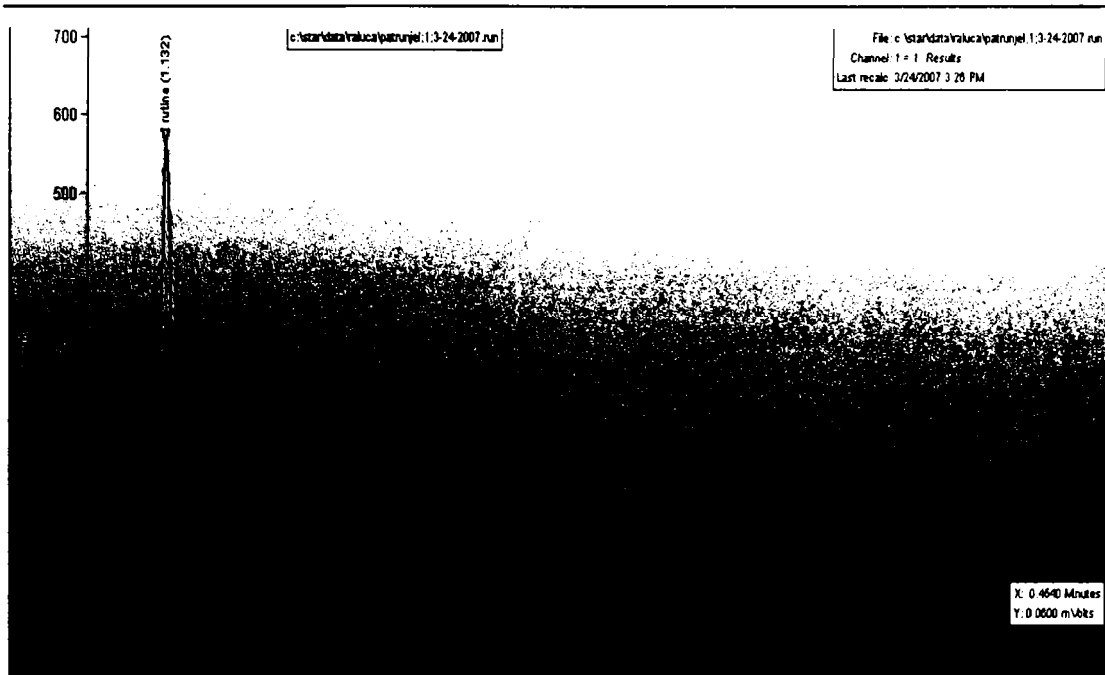


Figura 83. Cromatograma HPLC pentru tinctura de pătrunjel

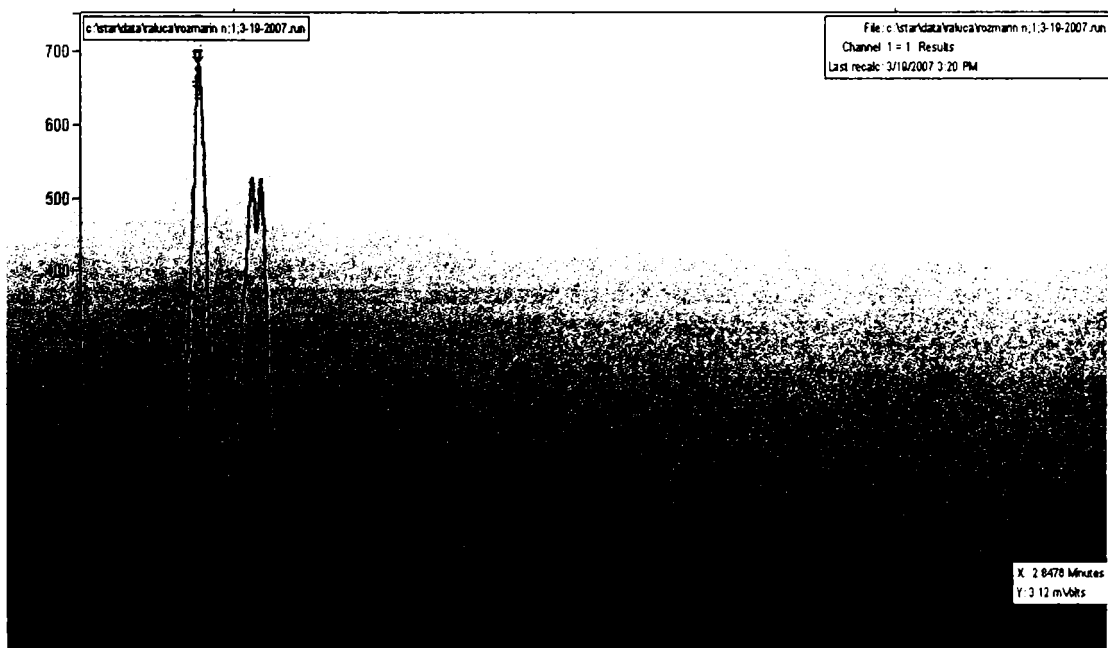


Figura 84. Cromatograma HPLC pentru tinctura de rozmarin



Figura 85. Cromatograma HPLC pentru tinctura de rozmarin

BIBLIOGRAFIE

1. Leonte M., Traian F., **Chimia alimentelor**, vol. I, Ed. Pax Aura Mundi, Galați, 1999, ISBN: 973-98859-3-4
2. Lupea A.X., **Transformări ale biocompușilor procesați în scop alimentar**, CEP USM, Chișinău, 2004, ISBN: 9975-70-470-0
3. Banu C. (coordonator), **Aditivi și ingrediente pentru industria alimentară**, Ed. Tehnică, București, 2000, ISBN: 973-31-1436-7
4. **Szabo M.R.**, Dicu A., Ursachi C., Condrat D., „**Oxidarea în sisteme alimentare și biologice și metode de prevenire**”, Editura Universității „Aurel Vlaicu” din Arad, 2007
5. Lee J., Kim M., Park K., „Lipid oxidation and carotenoid content in frying oil”, *Journal of Food Science*, **68** (4), 1248-1253, 2003
6. Andersen H.J., „Protein oxidation in foods: Mechanism and implications”, IFT Annual Meeting – New Orleans Louisiana, 2001
7. **Szabo M.R.**, Idițoiu C., Lupea A.X., Chambree D., „Chemical aspects of the aliments oxidative degradation”, *Scien. and Techn. Bull. of Univ. „A. Vlaicu” Arad*, **7**, 60-64, 2002
8. Larsen H., Magnus E.M., „Effect of oxygen transmission rate, of the packages, light and storage temperature on the oxidative stability of extruded oat”, *Journal of Food Science*, **68** (3), 1100-1107, 2003
9. Lee J., Min S., Min D.B., „Formation of volatile compounds in soy flour by singlet oxygen oxidation during storage under light”, *Journal of Food Science*, **68** (6), 1933-1937, 2003
10. xxx, **Chemical and physical aspects of catalytic oxidation**, J.L. Portefaix and F. Figueras, Paris, 1980
11. Labuza T.P., **Shelf-life dating of foods**, Food & Nutrition Press, Westport, CT, 1982
12. **Szabo M.R.**, Idițoiu C., Chambre D., „Ambient medium influence on the food degradation kinetics”, *Scien. and Techn. Bull. of Univ. „A. Vlaicu” Arad*, **9**, 71-76, 2004
13. Lee E.J., Love J., „Effect of antioxidants on consumer acceptance of irradiated turkey meat”, *Journal of Food Science*, **68** (5), 1659-1663, 2003
14. Aruoma, O.I., **Free radical and food additives**, Taylor & Francis, London, 1991
15. Litwinienko, G., Daniluk A., Kasprzycka-Guttman, „A differential scanning calorimetry study on the oxidation of C₁₂-C₁₈ saturated fatty acids and their esters”, *Journal of the American Oil Chemists Society*, **76** (6), 655-657, 1999
16. Litwinienko, G., Daniluk A., Kasprzycka-Guttman, „Study on autoxidation kinetics of fats by differential scanning calorimetry. 1. Saturated C₁₂-C₁₈ fatty acids and their esters”, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **39** (1), 7-12, 2000
17. Litwinienko, G., Kasprzycka-Guttman, T., „Study on autoxidation kinetics of fats by differential scanning calorimetry. 2. Unsaturated fatty acids and their esters”, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **39** (1), 13-17, 2000
18. Moya Moreno, M.C.M., Mendoza Olivares, D., Amezcua Lopez, F.J., Gimeno Adelantado, J.V., Bosch Reig, F., *Talanta*, **50**, 2, 269-273, (1999);

19. Richardson, T., Finley, J.W., **Chemical changes in food during processing**, AVI Publ. Co. Inc., Westport, Connecticut, 1985
20. Costin, G.M., Segal, R. (editori), **Alimente funcționale. Alimentele și sănătatea**, Ed. Academica, Galați, 1999
21. **Szabo M.R.**, Idițoiu C., Lupea A.X., "Chemical standardized methods used to evaluate the lipid oxidation", *Scien. and Techn. Bull. of Univ. "A. Vlaicu" Arad*, Series: „Chemistry, Food Science and Engineering”, **9**, 77-81, 2004
22. 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 (PV)**, 7th ed., Edited by C. Paquot & A. Haufenne, Oxford, England: Blackwell Scientific Publications, pag. 199-200, 1987
23. ISO 3960:2001, „Animal and vegetable fats and oils – Determination of peroxide value”
24. STAS 145/22-74, „Uleiuri și grăsimi vegetale - Determinarea indicelui de peroxid”
25. STAS 9065/10-75, „Carne și preparate din carne - Metode de apreciere a stadiului de oxidare a grăsimii”
26. Nourou P.G., Gheorghiu C.A., Polissiou A.G., "Direct Parallel Flow Injection Multichannel Spectrophotometric Determination of Olive Oil Peroxide Value", *Analytica Chimica Acta*, **389**, 239-245, 1999
27. Terao J., Matsushita S., „Products formed by photosensitized oxidation of unsaturated fatty acid esters”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **54**, 234-238, 1977
28. ISO 6885:1998, "Animal and vegetable fats and oils – Determination of anisidine value”
29. Labrinea E.P., Thomaidis N.S., Georgiou C.A., "Direct Olive Oil Anisidine Value Determination by Flow Injection", *Anal. Chim. Acta*, **448**, 201-206, 2001
30. Dimitriu M., **Biochimia produselor alimentare**”, Ed. Didactică și Pedagogică, București 1973
31. STAS 9065/10-75, „Carne și preparate din carne - Reacția Kreis”
32. STAS 145/19-67, „Uleiuri și grăsimi vegetale – Determinarea indicelui de iod”
33. Carașol I., Dumitrescu L., "Cercetări privind structura și gradul de degradare a unor lipide din alimentație și cosmetică”, *Analele Universității « Aurel Vlaicu » din Arad, Seria : Chimie, Fascicola : Inginerii Alimentare*, 131-136, 2000
34. STAS 145/16-67, „Uleiuri și grăsimi vegetale. Determinarea acidității libere”
35. ISO 6886:1996, „Animal and vegetable fats and oils – Determination of oxidation stability (Accelerated oxidation test)”
36. STAS 145/1-78, "Uleiuri și grăsimi vegetale – Examenul organoleptic”
37. **Szabo M.R.**, Idițoiu C., Lupea A.X., "Modern unstandardized methods used to evaluate the lipid oxidation", *Scien. and Techn. Bull. of Univ. "A. Vlaicu" Arad*, Series: „Chemistry, Food Science and Engineering”, **9**, 82-93, 2004
38. Nasirullah, Nagaraja K.V., „Oxidative rancidity in refined sunflower oil with respect to storage variation”, *Fat Science Technology*, **91** (2), 80-82, 2006
39. Anwar F., Bhangar M.I., Kazi T.G., „Relationship between rancimat and active oxygen method values at varying temperatures for several oils and fats”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **80** (2), 151-155, 2003
40. Deman J.M., Deman L., „Automated AOM test for fat stability”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61** (3), **534-536**, 1984

41. Donald J.P., Clyde W.F., **Chimie analitică**, Editura Tehnică, București, 1989
42. Reschiglian P., Zattoni A., Melucci D., Locatellio C., Torsi G., Pandalai S.G., « Standardless and absolute analysis through the Lambert-Beer law » in **Recent research developments in applied spectroscopy**, vol. 3, INDE, 61-80, 2000.
43. Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M., „Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein”, *Free Radic Res Commun.*, **6**, 67-75, 1989
44. Harwood J., Aparicio R. (Editors), **Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties**, Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, 2000
45. International Olive Oil Council (IOOC), *Spectrophotometric Investigation in the Ultraviolet*, CO1/T.20 No. 19, Madrid, Spain, 1996
46. Muik B., Lendl B., Molina-Diaz A., Ayora-Cañada M.J., „Direct monitoring of lipid oxidation in edible oils by Fourier transform Raman spectroscopy”, *Chemistry and Physics of Lipids*, **134**, 173-182, 2005
47. Smith C.D., Belk K.E., Sofos J.N., Scanga J.A., Kain M.L., Smith G.C., „Effects of activated ozone, on lipid peroxidation, when applied to carcasses and to ground beef during blending”, *2001 Animal Sciences Research Report*, The Department of Animal Sciences, Colorado State University;
48. Fenaille F., Mottier P., Turesky R.J., Ali S., Guy P.A., „Comparison of analytical techniques to quantify malondialdehyde in milk powders”, *Journal of Chromatography A*, **921**, 237-245, 2001
49. Pilz J., Meineke I., Gleiter C.H., “Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative”, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and applications*, **742** (2), 315-325, 2000
50. Okogeri O.I., Reinhold G., Dauwe C., “GPC technique for monitoring virgin olive oil quality”, *IFT Annual Meeting, Session 88B, Food Chemistry: Food Composition and Analysis*, New Orleans, Louisiana, 2001
51. Caponio F., Gomes T., Bilancia M.T., „Measurement of degradation of the lipid fraction in margarines”, *Eur. Food Res. Technol.*, **216**, 83-87, 2003
52. Li Linxiang, Yoshihiro Abe, Yukiko Nagasawa, Risa Kudo, Noriko Usui, Kazuhiro Imai, Tadahiko Mashino, Masataka Mochizuki, Naoki Miyata, „An HPLC assay of hydroxyl radicals by the hydroxylation reaction of terephthalic acid”, *Biomedical Chromatography*, DOI: 10.1002/bmc.339, 2004
53. Bosca F., Miranda M.A., Morera I.M., Samadi A., „Involvement of type I and type II mechanisms in the linoleic acid peroxidation photosensitized by tiaprofenic acid”, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **58** (1), 1-5, 2000
54. Melchior D., Gab S., “Simultaneous micellar electrokinetic chromatographic determination of isomeric fatty acid hydroperoxides and corresponding hydroxy fatty acids”, *Journal of Chromatography A*, **894**, 145-155, 2000
55. Radschuweit A., Ruttinger H.H., Nuhn P., “Capillary zone electrophoresis with electrochemical detection – a simple and effective method to analyze oxygen-consuming and peroxide-forming processes”, *Journal of Chromatography A*, **937**, 127-134, 2001
56. Ruttinger H.H., Radschuweit A., “Determination of peroxides by capillary zone electrophoresis with amperometric detection”, *Journal of chromatography A*, **868**, 127-134, 2000
57. Idrîtoiu C., Aikens D., „Cyclic voltametry determination of α , α' - dimethylphenyl hydroperoxide”, *Revue Roumaine de Chimie*, **23** (6), pag.

- 959-965, (1978);
58. Forster A., Simon K., Schmidt R., Kaltner D., „What is it about antioxidative characteristics of hops”, *EBC-Congress*, Budapest, 2001
 59. MacMillan D.K., Murphy R.C., „Analysis of lipid hydroperoxides and long-chain conjugated keto acids by negative ion electrospray mass spectrometry”, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **6** (12), 1190-1201, 1995
 60. Dikalov S.I., „Reassignment of organic peroxy radical adducts”, *Free Radical Biology and Medicine*, **27** (7-8), 864-872, 1999
 61. Yue Quian S., Wang H.P., Schafer F.Q., Buettner G.R., „EPR detection of lipid free radicals from PUFA, LDL and cell oxidations”, *Free Radical Biology and Medicine*, **29** (6), 568-579, 2000
 62. Dikalov S.I., Mason R.P., „Spin trapping of polyunsaturated fatty acid-derived peroxy radicals: reassignment to alkoxy radical adducts”, *Free Radical Biology and Medicine*, **30** (2), 187-197, 2001
 63. Brown E.M., **Introduction to Thermal Analysis**, ED. Chapman and Hall, N.Y., 1998
 64. Litwinienko G., „Autooxidation of unsaturated fatty acids and their esters”, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **65**, 639-646, 2001
 65. Litwinienko G., Kasprzycka-Guttman T., „A DSC study on thermoxidation kinetics of mustard oil”, *Thermochimica Acta*, **319**, 185-191, 1998
 66. Kasprzycka-Guttman T., Jarosz-Jarszewska M., Litwinienko G., „Specific heats and kinetic parameters of thermo-oxidative decomposition of peanut oil”, *Thermochimica Acta*, **250**, 197-205, 1995
 67. Endo Y., Kimoto H., Fujimoto K., „Retarded Autooxidation of Sardine Oil with Oleate”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57** (12), 2202-2204, 1993
 68. Miyazawa T. and al., „Rapid estimation of peroxide content of soybean oil by measuring thermoluminescence”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **71**, 343-345, 1994
 69. Matthaus B., „Determination of the oxidative stability of vegetable oils by rancimat and conductivity and chemiluminescence measurements”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 1039-1043, 1996
 70. Mareyuki Takahashi, Miyako Shibata, Etsuo Niki, „Estimation of lipid peroxidation of live cells using a fluorescent probe, diphenil-1-pyrenylphosphine”, *Free radical biology and medicine*, **31** (2), 164-174, 2001
 71. Yoden Kazuaki, Iio Toshihiro, Tabata Toshikazu, „Fluorescence formation from esterified linoleic acid hydroperoxides with amino compounds”, *Chem. Pharm. Bull.*, **37** (2), 519-522, 1989
 72. Segal B. Balint C., **Procedee de îmbunătățire a calității și stabilității produselor alimentare**, Editura Tehnică, București, 1982.
 73. Niculiță P., Popa Mona, **Tehnici de conservare a produselor agroalimentare**, Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară, București, 2002.
 74. Yam K.L., Takhistov P.T., Militz J., „Intelligent Packaging: Concepts and Applications”, *Journal of Food Science*, **70** (1), R1-R10, 2005.
 75. Grün I.U., Ahn J., Clarke A.D., Lorenzen C.L., „Reducing oxidation of meat”, *Food Technology*, **60**, 36-43, 2006
 76. Banu C. și colaboratorii, **Principii de drept alimentar**, Editura Agir, București, 2003.
 77. Segal R., **Biochimia produselor alimentare**, Editura Academică, Galați, 2006

78. Vaya J., Aviram M., „Nutritional Antioxidants: Mechanism of Action, Analyses of Activities and Medical Applications”, *Curr. Med. Chem.- Imm., Endoc. & Metab. Agents*, **1**, 99-117, 2001
79. **Szabo M.R.**, Idițoiu C., Chambree D., „Trends in food antioxidants study”, *Scien. and Techn. Bull. of Univ. "A.Vaicu" Arad, Series: „Chemistry, Food Science and Engineering”*, **8**, 48-55, 2003
80. Ssonko U.L., Wenshui X., „Food Phenolics, Pros and Cons: A Review”, *Food Reviews International*, **21** (4), 367-388, 2005
81. ...“Safety evaluation of certain food additives”, *WHO Food Additives*, Series: 42, WHO, 1999
82. Packer L., Hiramatsu M., Yoshikazu T., **Antioxidant Food Supplements in Human Health**, Academic Press, San Diego, USA, 1999
83. Litwinienko G., Kasprzycka-Guttman T., Jamek D., „DSC study of antioxidant properties of dihydroxyphenols”, *Thermochimica Acta*, **331**, 79-86, 1999
84. Kim Dae-Ok, Chang Yong Lee, „Comprehensive Study on Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Various Polyphenolics in Scavenging a Free Radical and its Structural Relationship”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **44**, 253-273, 2004
85. Schwarz K., Huang S.W., German J.B., Tiersch B., Hartmann J., Frankel E.N., „Activities of Antioxidants are Affected by Colloidal Properties of Oil-in-Water and Water-in-Oil Emulsions and Bulk Oils”, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4874-4882, 2000
86. Dopico-García M.S., López-Vilariño J.M., González-Rodríguez, „Effect of Temperature and Type of Food Simulant on Antioxidant Stability”, *Journal of Applied Polymer Science*, **100**, 656-663, 2006
87. Bakan V., Demirtas I., Dülger H., „The antioxidant paradox or antioxidant damage”, *Pediatr. Surg. Int.*, **20**, 903, 2004
88. Klahorst Suanne J., „Abstract on antioxidants”, *Food Product Design: Cover* – May 2001
89. Becker E.M., Nissen L.R., Skibsted L.H., „Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects”, *Eur. Food. Res. Technol.*, **219**, 561-571, 2004
90. Nishibori S., Namiki K., „Superoxide anion radical-scavenging ability of fresh and heated vegetable juices (jpn.)”, *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **45** (2), 144-148, 1988
91. Molyneux P., „The use of stable free radical diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity”, *Songklanakarın J. Sci. Technol.*, **26** (2), 211-219, 2004
92. Lotito S.B., Renart M.L., Fraga C.G., „Assessing the Antioxidant Capacity in the Hydrophilic and Lipophilic Domains. Study of a Sample of Argentine Wines”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **957** (1), 284-287, 2002
93. Agbor G.A., Oben J.E., Ngogang J.Y., Xinxing C., Vinson J.A., „Antioxidant Capacity of Some Herbs/Spices from Cameroon: A Comparative Study of Two Methods”, *J. Agric. Food. Chem.*, **53** (17), 6819-6824, 2005
94. Gergen I., Palicica R., Lucaci L., Dragoș D., Gogoășă 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, 9-13, 1997

95. Nascimento M.A., Silva A.K., Franca L.C.B., Quignard E.L.J., López J.A., Almeida M.G., „*Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae): Preliminary study of its antioxidant activity”, *Bioresource Technology*, **97** (12), 1387-1391, 2006
96. Alonso Á.M., Guillén D.A., Barroso C.G., „Development of an electrochemical method for the determination of antioxidant activity. Application to grape-derived products”, *European Food Research and Technology*, **216** (5), 445-448, 2003
97. Yang Bin, Kotani A., Arai K., Kusu F., „Estimation of the Antioxidant Activities of Flavonoids from Their Oxidation Potentials”, *Analytical Sciences*, **17** (5), 599-604, 2001
98. Wang C.C., Chu C.Y., Chu K.O., Choy K.W., Khaw K.S., Rogers M.S., Pang C.P., „Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity Assay Versus Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay in Plasma”, *Clinical Chemistry*, **50**, 952-954, 2004
99. Schlesier K., Harwat M., Böhm V., „Assessment of Antioxidant Activity by Using Different in Vitro Methods”, *Free Radical Research*, **36** (2), 177-187, 2002
100. Perez D.D., Leighton F., Aspee A., Aliaga C., Lissi E., „A comparison of methods employed to evaluate antioxidant capabilities”, *Biological Research*, **33** (2), 71-77, 2000
101. Georgescu L.P., Antemir A., „Free Radical Scavenger Activity determined by GC/MS method, IUPAC CSC-2003
102. Ciulei I, Grigorescu E., Stănescu U., **Plante medicinale, fitochimie și fitoterapie**, vol. I+II, Ed. Medicală, București, 1993
103. <http://www.eukarya.ro>
104. Hampstead M., **The basil book**, Pocket Books, New York, USA, 1984
105. Huxley A. (ed), **New RHS Dictionary of Gardening**, Macmillan, 1992
106. Hickman J.C. (ed), **The Jepson Manual: Higher plants for California**, Univ. of California Press: Berkeley, 1993
107. Zohary D., Hopf M., **Domestication of plants in the Old World**, third edition, Oxford Univ. Press, 2000
108. Popovici L., Moruzi C., Toma I., **Atlas botanic**, Ed. Didactică și Pedagogică, București, 1993
109. Pârnu C., Godeanu S., Stroe L., **Călăuză în lumea plantelor și animalelor**, Editura Ceres, București, 1985
110. Pârnu C., **Ecologie generală**, Ed. Tehnică, 1999
111. Ghizdavu I., Pașol P., Pălăgeșiu I., Bobârnac B., Filipescu C., Matei I., Georgescu T., Baicu T., Bărbulescu Al., **Entomologie agricolă**, Ed. Didactică și Pedagogică, București 1997
112. Kurobayashi Y., Kouno E., Fuzita A., Morimitsu Y., Kubota K., „Potent Odorants Characterize the Aroma Quality of Leaves and Stalks in Raw and Boiled Celery”, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **70** (4), 958-965, 2006
113. Pino J.A., Rosado A., Goire I., Roncal E., „Evaluation of flavor characteristic compounds in dill herb essential oil by sensory analysis and gas chromatography”, *J. Agric. Food. Chem.*, **43**, 1307-1309, 1995
114. Dokhani S., Cottrell T., Khajeddin J., Mazza G., „Analysis of Aroma and Phenolic Components of Selected Achillea Species”, *Plant Foods for Human Nutrition*, **60** (2), 55-62, 2005
115. Özcan M., Chalchat J.C., „Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey”, *Bulg. J. Plant Physiol.*, **30** (3-4), 68-73, 2004

116. Hogg C.L., Svoboda K.P., Hampson J.B. and Brocklehurst, S., "Investigation into the composition and bioactivity of essential oil from Lovage (*Levisticum officinale* W.D.J. Koch). *International Journal of Aromatherapy*, **11** (3), 144-151, 2001
117. Thappar K., Dhar A.K., Balyan S.S., Khan S., Raina P., Dhar P.L., Choudhary D.K., Isaac S., "Variation in the major components of seed and leaf oil of genetically improved celery (*Apium graveolens* L.)", *Journal of Food Science and Technology*, **40** (4), 426-428, 2003
118. Orav A., Kailas T., Jegorova A., "Composition of the essential oil of dill, celery, and parsley from Estonia", *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences. Chemistry*, **52** (4), 147-154, 2003
119. Petropoulos S.A., Daferera D., Akoumianakis C.A., Passam H.C., Polissiou M.G., "The effect of sowing date and growth stage on the essential oil composition of three types of parsley (*Petroselinum crispum*)", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **84** (12), 1606-1610, 2004
120. Simon J.E., Quinn J., Murray R.G., "Basil: A source of essential oils", **Advances in new crops**, Janick and J.E. Simon (eds.), Timber Press, Portland, OR, 484-489, 1990
121. Kurowska A., Gatazka I., "Essential oil composition of the parsley seed of cultivars marketed in Poland", *Flavour and Fragrance Journal*, **21** (1), 143-147, 2005
122. Atti-Santos A.C., Rossato M., Pauletti G.F., Rota L.D., Rech J.C., Pansera M.R., Agostini F., Serafini L.A., Moyna P., "Physico-chemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils", *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **48** (6), 1035-1039, 2005
123. Boutekedjiret C., Bentahar F., Belabbes R., Bessiere J.M., "Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation", *Flavour and Fragrance Journal*, **18** (6), 481-484, 2003
124. Andruszczak S., "The effect of foundation method and harvesting time on the yield of lovage (*Levisticum officinale* K.)", *Annales UMCS, Sec. E.*, **59** (3), 1049-1056, 2004
125. Misharina T.A., Polshkov A.N., Ruchkina E.L., Medvedeva I.B., "(Changes in the composition of the essential oil of Marjoram during storage)", *Prikl. biohim. Mikrobiol.*, **39** (3), 353-358, 2003
126. Nickavar B., Mojab F., Dolat-Abadi R., "Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran", *Food Chemistry*, **90** (4), 609-611, 2005
127. Guillén M.D., Cabo N., Burill J., "Characterisation of the essential oils of some cultivated aromatic plants of industrial interest", *J. Sci. Food. Agric.*, **70**, 359-363, 1996
128. Sacchetti G., Medici A., Maietti S., Radice M., Muzzoli M., Manfredini S., Braccioli E., Bruni R., "Composition and Functional Properties of the Essential Oil of Amazonian Basil, *Ocimum micranthum* Willd., Labiatae in Comparison with Commercial Essential Oils", *J. Agric. Food Chem.*, **52** (11), 3486 -3491, 2004
129. Donovan A., Isaac S., Collin H.A., "Inhibitory effects of essential oil components extracted from celery on the growth of *Septoria apiicola*, causal agent of leaf spot disease", *Plant pathol.*, **42** (5), 691-700, 1993
130. Jirovetz L., Buchbauer G., Stoyanova A., Georgiev E., Damianova S.T., "Composition, quality control, and antimicrobial activity of the essential oil of long-time stored dill (*Anethum graveolens* L.) seeds from Bulgaria", *J. Agric. Food Chem.*, **51**(13), 3854-3857, 2003

131. Radulović N., Stojanović G., Palić R., „Composition and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. essential oil”, *Phytotherapy Research*, **20** (1), 88-85, 2006
132. Santoyo S, Cavero S, Jaime L, Ibanez E, Senorans FJ, Reglero G, „Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction.”, *J Food Prot.*, **68** (4), 790-795, 2005
133. Sartoratto A., Machado A.L.M., Delarmelina C., Figueira G. M., Duarte M.C.T., Rehder V.L.G., „Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil”, *Brazilian Journal of Microbiology*, **35**, 275-280, 2004
134. Adam K., Sivropoulou A., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M., „Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi”, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1739-1745, 1998
135. Salvagnini L.E., Migliato K.F., Isaac V.L.B., Correa M.A., Salgrado H.R.N., Pietro R.C.L.R., „Evaluation of the efficacy of preservatives associated with *Achillea millefolium* L. extract against *Bacillus subtilis*”, *Brazilian Journal of Microbiology*, **37**, 75-77, 2006
136. Gog L., Berenbaum M.R., DeLucia E.H., Zanger A.R., „Autotoxic effects of essential oils on photosynthesis in parsley, parsnip, and rough lemon”, *Chemoecology*, **15**, 115-119, 2005
137. Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A, Akpulat HA, „Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae)”, *J Ethnopharmacol.*, **87** (2-3), 215-20, 2003
138. Juliani H.R., Simon J.E., „Antioxidant activity of basil”, **Trends in new crops and new uses**, J. Janick and A. Whipkey (eds.), ASHS Press, Alexandria, VA, 575-579, 2002
139. El-Ghorab A.H., Mansour A.F., El-Massry K.F., „Effect of extraction methods on the chemical composition and antioxidant activity of Egyptian marjoram (*Majorana hortensis* Moench)”, *Flavour and Fragrance Journal*, **19** (1), 54-61, 2003
140. Gherase F, Miron A, Zagnat M, Hancianu M, Stanescu U, Grigorescu E, „(Phytochemical investigations regarding the flavonoidic compounds of some species belonging to the *Achillea millefolium* L. group)”, *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.*, **108** (1), 177-180, 2004
141. Lagouri V., Blekas G., Tsimidou M., Kokkini S., Boskou D., „Composition and antioxidant activity of essential oils from Oregano plants grown wild in Greece”, *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, **197** (1), 20-23, 1993
142. Bailey Klepser T., Berryhill B., Dixon K., McGinnis M.M., Mulholland S., Pomeroy S., “Evaluation of Dietary Supplements with Claims of Antimicrobial activity”, *Journal of Infectious Disease Pharmacotherapy*, **6** (3), 1-30, (2003).
143. Pappas R.S., „Certificate of analysis – organic sweet marjoram oil”, <http://www.essentialoils.org/marjoram.htm>
144. Soriano M.C., Sotomayor J.A., Correal E., Gomez S., Garcia-Vallejo C., “Chemical composition of *Thymus* and *arundanas* Willk, and its parents *T. mastichina* L. and *T. baeticus* Boiss ex Lacaita”, *J. Essent. Oil. Res.*, **9**, 593-594, 1997

145. Nostro A., Blanco A.R., Cannatelli M.A., Enea V., Guido F., Morelli I. Roccardo A.S., Alonzo V., „Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol”, *FEMS Microbiology Letters*, **230** (2), 191-195, 2004
146. Jerković I., Mastelić J., Miloš M., „The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia”, *International Journal of Food Science & Technology*, **36** (6), 649-654, 2001
147. Kokkini S., Karousou R., Hanlidou E., Lanaras T., „Essential oil composition of Greek (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) and Turkish (*O. onites*) oregano: a tool for their distinction”, *Journal of Essential Oil Research (JEOR)*, 2004,
148. http://findarticles.com/p/articles/mi_qa4091/is_200407/ai_n9450509/pg_1
149. Vazquez R.S., Dunford N.T., „Bioactive components of mexican oregano oil as affected by moisture and plant maturity”, *Journal of Essential Oil Research* 2005,
150. http://findarticles.com/p/articles/mi_qa4091/is_200511/ai_n15935864/pg_1
151. ***, **Farmacopeea Română**, Ed. A X-a, Editura Medicală București, 1065, 1993
152. Ianculov I., Gergen I., Palicica R., Lucaci L., „Determinarea puterii antioxidante a unor plante inferioare”, *Cercetări științifice, Seria IV: Procese și Tehnologii Agroalimentare*, Editura Agroprint Timișoara, 121-124, 1998
153. Dumbravă D., Ianculov I., Goian M., Rusănescu N., „Determinarea capacității antioxidante a unor extracte din diferite materiale vegetale”, *Lucrările Simpozionului „Științe, Procese și Tehnologii Agroalimentare”, Zilele Academice Timișene*, Ediția a VII-a, Editura Eurostampa, 164-168, 24-25 mai 2001
154. **Szabo M.R.**, Idițoiu C., Dincă N., Chambre D., „Antioxidant activity analysis of some biocolloids from plants”, *Proceedings of the 8th Symposion of Colloid and Surface Chemistry*, Editura Academica Galați, 40-43, 2-4 iunie 2005
155. Cacig S., **Szabo M.R.**, Lupea A.X., Ardelean A., „Determination of the antioxidant activity of *Ziziphus jujuba* and *Hydrangea incognita* aqueous extracts”, *Studia Universitatis Vasile Goldiș Arad, Seria: Științele vieții*, **15**, 69-72, 2005
156. Cacig S., **Szabo M.R.**, Lupea A.X., „Spectrophotometric method for the study of the antioxidant activity applied on *Ziziphus jujuba* and *Hydrangea paniculata* aqueous extracts”, *Matica Srpska (Proc. Nat. Sci. Novi Sad)*, **110**, 87-93, 2006
157. Bustos C., Salgado G., Lopez C., „The oxidation of luminol an experiment to maximize the efficiency of chemiluminescence from luminol”, *Chem. Educator*, **6**, 97-99, 2001
158. Novas M.J., Jménez A.M., Asuero A.G., „Determination of antioxidant activity of canary seed infusions by chemiluminescence”, *Journal of Analytical Chemistry*, **59** (1), 75-76, 2004
159. Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V.M., Azzolini A. ECS., Fonseca M. JV., „Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method”, *AAPS PharmSci.* **5** (2), Article 20, 1 -5 , 2003

160. **Szabo M.R.**, Idițoiu C., Dincă Nicolae, "Evaluation of antiradical activity in natural aqueous extracts by chemiluminescence", *Proceedings of the 12th Symposium on Analytical and Environmental Problems*, Szeged, Hungary, 58-62, 2005
161. **Szabo M.R.**, Idițoiu C., Chambre D., Lupea A.X., "Antiradical activity evaluation of some plants used in the Romanian cuisine", *International Journal of Food Properties*, **11**, 330-338, 2008
162. Blois M.S., „Antioxidants determinations by the use of a stable free radical”, *Nature*, **191**, 1199-1200, 1958
163. Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., Lee C.Y., „Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine”, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 7292-7295, 2003
164. Scapim C.A., de Carvalho C.G.P., Cruz C.D., „Uma proposta de classificação dos coeficientes de variação para a cultura do milho”, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **30** (5), 683-686, 1995.
165. **Szabo M.R.**, Meșter M., Chambre D., Idițoiu C., Jianu I., „DPPH analysis for antioxidant effect of mint, bilberry and black tea, aqueous extracts”, *Scien. and Techn. Bull. of Univ. A. Vlaicu Arad, Series Chemistry*, **11**, 117-121, 2006
166. **Szabo M.R.**, Idițoiu C., Chambre D., Lupea A.X., "Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay", *Chemical Papers*, **61** (3), 214-216, 2007
167. Onița N., Șișu E., Lupea A.X., **Szabo R.**, „Aminophosphonic acids and derivatives. Antioxidant activity ranking”, *Rev. Chim.*, **57** (10), 1022-1024, 2006.
168. Ordinul nr. 438/295 din 2002 al Ministrului Sănătății și Familiei și al Ministrului Agriculturii, Alimentației și Pădurilor pentru aprobarea Normelor privind aditivii alimentari destinați utilizării în produsele alimentare pentru consum uman
169. **Szabo M.R.**, Chambre D., Idițoiu C., „New method for the calculus of the antioxidant activity in the DPPH spectrophotometric assay”, *Scien. and Techn. Bull. of Univ. A. Vlaicu Arad, Series Chemistry*, **11**, 122-125, 2006
170. Zamfir A.D., Dincă N., **Metode fizico-chimice de analiză**, Ed. Univ. „A. Vlaicu” Arad, 2005
171. Moreno S., Scheyer T., Romano C.S., Vojnov A.A., "Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition", *Free Radical Research*, **40** (2), 223-231, 2006
172. Chami N., Bennis S., Chami F., Aboussekhra A., Remmal A., "Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol *in vitro* and *in vivo*", *Oral Microbiol. Immunol.*, **20** (2), 106-111, 2005
173. Bennis S., Chami F., Chami N., Bouchikhi T., Remmal A., „Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol”, *Letters in Applied Microbiology*, **38** (6), 454-458, 2004
174. Inouye S., Takizawa T., Yamaguchi H., "Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy (JAC)*, **47**, 565-573, 2001
175. Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V., „Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts”, *Journal of Applied Microbiology*, **86** (6), 985-990, 1999

176. Tantatoui-Elaraki A., Beraoud L., "Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* by essential oils of selected plant materials." *J. Environ. Path. Toxicol. Oncol*, **13**, 67-72, 1994
177. Dincă N., Grosu V., Condrat D., *Chimia alimentelor – lucrări practice*, Editura Univ. Aurel Vlaicu, Arad, 2007
178. Medeleanu M., Milea M., **Metode spectroscopice în chimia organică**, Centru de multiplicare Universitatea „Politehnica” Timișoara, 1998
179. Balaban A.T., Pogany I., Banciu M., **Aplicații ale metodelor fizice în chimia organică**, Ed. Științifică Enciclopedică, București, 1983
180. Wold J.P., „Understanding and measuring photooxidation in dairy products by fluorescence spectroscopy”, *Spectroscopy Europe*, **18** (5), 8-13, 2006
181. American Oil Chemist Society (AOCS), **Official Methods and Recommended Practices**, 4th Edition, Edited by D. Firestone. Champaign, IL, 1987
182. Marinova D., Ribarova F., Atanasova M., „Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables”, *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, **40** (3), 255-260, 2005
183. de Oliveira B.H., Nakashima T., de Souza Filho J.D., Frehse F.L., „HPLC analysis of flavonoids in *Eupatorium littorale*”, *Journal of Brazilian Chemical Society*, **12** (2), 243-246, 2001
184. Avram M., **Chimie Organică**, vol. II, ed. a 2-a, Ed. Zecasim, București, 1995
185. Ianculov I., Modoran D., „Caracterizarea polifenolilor existenți în unele specii vegetale”, *Cercetări Științifice, Seria III: Procese și Tehnologii Alimentare*, Ed. Agroprint – Timișoara, 1997
186. Moța C., Roșu A., Câmpeanu Gh., „Compuși bioactivi de origine vegetală. Abordări biotehnologice”, în: **Progrese în biotehnologie**, vol. II, cordonatori: Prof.Univ.Dr. Gh. Câmpeanu, Prof.Univ.Dr. Doc. I. F. Dumitru, <http://www.unibuc.ro/eBooks/biologie/ProgreseVolumul2>
187. Idițoiu C., Chambree D., **Szabo M.R., Chimie fizică generală experimentală**, Ed. Universității „Aurel Vlaicu” Arad, 2002
188. Rovellini P., Cortesi N., Fedeli E., „Ossidazioni dei lipidi. Nota 1”, *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, **74** (5), 181-189, 1997
189. Vieira T., Regitano-D'Arce M., „Stability of oils heated by microwave: UV-spectrophotometric evaluation”, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **18** (4), http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611998000400015&lng=es&nrm=iso, ISSN 0101-2061, 1998
190. Prankl H., Schindlbauer H., „Oxidation stability of fatty acid methyl esters”, *10th European Conference on Biomass for Energy and Industry*, 8-11 June 1998, Würzburg, Germany, 1-5, 1998
191. Basu A., Berndorfer A., Buelna C., Campbell J., Ismail K., Lin Y., Rodriguez L., Wang S.S., „Smart sensing of oil degradation and oil level measurements in gasoline engines”, *SAE Technical Paper Series 2000-01-1366*
192. Pons W.A., Kuck J.C., Frampton V.L., „Bleaching of refined cottonseed oil with modified alumina absorbents”, *Journal of the American Oil Chemists Society*, **40** (1), 10-13, 1963
193. Cacic S., **Posibilitatea utilizării extractelor vegetale ca ingrediente naturali pentru medicamente, cosmetice și alimente**, *Teză de doctorat*, Editura Politehnica, 2007

194. Warner C.R., Brumley W.C., Daniels D.H., Joe Jr F.L., Fazio T., „Reactions of antioxidants in foods”, *Food Chem. Toxicol.*, **24**, 1015–1023, 1986
195. Wei G.J., Wang M., Rosen R.T., Ho C. T., „Identification of thermal decomposition products of carnosol, an antioxidant of rosemary and sage”, *J Food Lipids*, **6**, 173–181, 1999
196. Kajimoto G., Yoshida H., Shibahara A., „Decomposition of tocopherol in oils by oxidative products (oxidised fatty acids) of vegetable oils, and the accelerating effect of fatty acid on the decomposition of tocopherol”, *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi*, **42**, 313–320, 1989
197. Trojáková L., Réblová Z., Pokorný J., „Degradation of tocopherols in rapeseed oil with rosemary extract under different conditions”, *Czech. J. Food Sci.*, **18**, 175–180, 2000
198. 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 Journal of Chemical Engineering*, **21** (2), 265-273, 2004
199. Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C., Turck M., „Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method”, *Am. J. Clin. Pathol.* **45**, 493-496, 1966
200. Saguy I., Karel M., „Modeling of quality deterioration during food processing and storage”, *Food Technol.*, **34** (2), 78-85, 1980
201. Hills C.G.Jr., Grieger-Block R.A., „Kinetic data: generation, interpretation and use”, *Food Technol.*, **34**, pag. 56-66, 1980
202. Constantin G., Negrea R., **Lecții de statistică descriptivă**, Universitatea de Vest Timișoara, 2004
203. Campanella L., Favero G., Pastorino M., Tomassetti M., “Monitoring the rancidification process in olive oils using a biosensor operating in organic solvents”, *Biosensors and Bioelectronics*, **14**, 179-186, 1999
204. Kulys J., Schmid R.D., “A sensitive enzyme electrode for phenol monitoring”, *Analytical Letters*, **23**, 589-597, 1990
205. Ciucu A., Magearu V., Fleschin S., Lucaciu I., David F., “Biocatalytical membrane electrode for phenol”, *Analytical Letters*, **24**, 567-580, 1991
206. Wang J., Naser N., “Tissue bioelectrode for organic phase enzymatic assays”, *Analytica Chimica Acta*, **264**, 7-12, 1992
207. Rotaru L., “Caracterizarea soiurilor si selectiilor de vite portaltoi prin studiul profilului enzimatic al lastarilor cu ajutorul electroforezei”, *Revista de politica stiintei si scientometrie*, Numar special 2005, Raport de cercetare grant CNCSIS cod 1206
208. Idițoiu C., **Chimie Fizica si Coloidala**, vol. 1, ed. a 2-a, Ed. Univ. „Aurel Vlaicu”, Arad, 2005
209. Racolța E., **Tehnologii generale în industria alimentară**, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, 2007

Titluri recent publicate în colecția „TEZE DE DOCTORAT”

seria 4: Inginerie Chimică

1. **Gheorghe Radu Emil Mărieș** – *Contribuții la studiul unor caracteristici fizice ale polimerilor, utilizabili în articole sportive de performanță, prin metode termice, ISBN 978-973-625-453-6, (2007);*
2. **Mihaela Bragea** – *Contribuții la modelarea și simularea fenomenului de disponibilitate la migrație în mediu a elementelor radioactive din deșeurile industriei uranifere, ISBN 978-973-625-462-8, (2007);*
3. **Gerlinde Grandtner** – *Contribuții la studiul sintezei și caracterizării unor oligomeri și polimeri pe bază de inulină, ISBN 978-973-625-500-7, (2007)*
4. **Lavinia Afrodita Lupa** – *Studii privind recuperarea și valorificarea zincului din deșeuri provenite din procesul de zincare termică, ISBN 978-973-625-548-9, (2007);*
5. **Elvira-Mihaela Ciopec** – *Studii privind obținerea și caracterizarea îngrășămintelor de tipul PK cu microelemente, ISBN 978-973-625-525-0, (2007);*
6. **Mirel Glevitzky** – *Contribuții la îmbunătățirea calității sucurilor, prin utilizarea tehnicilor de modelare matematică, în vederea extinderii duratei de viață și impactul acesteia asupra siguranței alimentului, ISBN 978-973-625-516-8, (2007);*
7. **Ioana Maria Carmen Ienașcu** – *Substanțe potențial biologic active cu structură o-hidroxibenzamidică, ISBN 978-973-625-600-4, (2008);*
8. **Delia-Gabriela Dumbravă** – *Contribuții la studiul, izolarea și purificarea pigmentilor carotenoidici din produse naturale, ISBN 978-973-625-566-3, (2008);*
9. **Corina-Ileana Orha** - *Contribuții la studiul proceselor de obținere și caracterizare a unor materiale zeolitice funcționalizate cu utilizare în dezinfectia apei, ISBN 978-973-625-594-6, (2008);*
10. **Raul-Ciprian Moldovan** – *Îmbunătățirea performanțelor funcționale ale microdebitmetrelor electrotermice utilizând metode de modelare matematică și simulare numerică, ISBN 978-973-625-642-4, (2008).*



EDITURA POLITEHNICA