

**Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați**  
**Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești**



# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**Caracterizarea în compuși bioactivi a unor plante în  
vederea utilizării în industria alimentară  
(Rezumatul tezei de doctorat)**

**Doctorand,  
RADU (LUPOAE) DANIELA SIMONA**

**Conducător științific,**

**Prof. dr. ing. habil. Nicoleta STĂNCIUC**

**Conducător științific în cotutelă**

**Prof. dr. ing. Petru ALEXE**

**Seria I 7: Ingineria produselor alimentare nr. 12**

**GALAȚI**

**2020**

**Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați**  
**Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești**



# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**Caracterizarea în compuși bioactivi a unor plante în  
vederea utilizării în industria alimentară  
(Rezumatul tezei de doctorat)**

**Doctorand**

**Daniela Simona RADU (LUPOAE)**

**Președinte**

**Prof univ.dr.ing. Gabriela Elena BAHIRM**  
Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați

**Conducător științific**

**Prof. univ.dr.ing. Nicoleta STĂNCIUC**  
Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați

**Conducător științific în cotutelă**

**Prof. univ.dr.ing. Petru ALEXE**  
Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați

**Referenți științifici**

**Prof. univ. dr. ing. Mona POPA**  
Universitatea de Științe Agronomice și Medicină  
Veterinară, București

**Prof. univ. dr. ing. Nicoleta Gabriela HĂDĂRUGĂ**  
Universitatea de Științe Agricole și Medicină  
Veterinară a Banatului "Regele Mihai I al României"  
din Timișoara

**Prof. univ. dr. ing. habil. Gabriela RÂPEANU**  
Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați

**Seria I 7: Ingineria produselor alimentare nr. 12**

**GALAȚI**

**2020**

Seriile tezelor de doctorat susținute public în UDJG începând cu 1 octombrie 2013 sunt:

**Domeniul fundamental ȘTIINTE INGINEREȘTI**

- Seria I 1: **Biotehnologii**
- Seria I 2: **Calculatoare și tehnologia informației**
- Seria I 3: **Inginerie electrică**
- Seria I 4: **Inginerie industrială**
- Seria I 5: **Ingineria materialelor**
- Seria I 6: **Inginerie mecanică**
- Seria I 7: **Ingineria produselor alimentare**
- Seria I 8: **Ingineria sistemelor**
- Seria I 9: **Inginerie și management în agricultură și dezvoltare rurală**

**Domeniul fundamental ȘTIINTE SOCIALE**

- Seria E 1: **Economie**
- Seria E 2: **Management**
- Seria SSEF: **Știința sportului și educației fizice**

**Domeniul fundamental ȘTIINTE UMANISTE ȘI ARTE**

- Seria U 1: **Filologie- Engleză**
- Seria U 2: **Filologie- Română**
- Seria U 3: **Istorie**
- Seria U 4: **Filologie - Franceză**

**Domeniul fundamental MATEMATICĂ ȘI ȘTIINTE ALE NATURII**

- Seria C: **Chimie**

**Domeniul fundamental ȘTIINTE BIOLOGICE ȘI BIOMEDICALE**

- Seria M: **Medicină**

## Cuprins

Denumire	Pagină
<b>Introducere</b>	<b>1</b>
<b>Introduction</b>	<b>4</b>
<b>STUDIUL DOCUMENTAR</b>	<b>7</b>
<b>CAPITOLUL 1. Aspecte botanice, morfologice și compoziționale ale florilor de lavandă</b>	<b>8</b>
1.1. Introducere	8
1.2. Aspecte botanice și morfologice	9
1.3. Compoziția chimică și fitochimică a lavandei	10
1.4. Principalele clase de compuși biologic activi din lavandă	13
1.4.1. Clorofilele	13
1.4.2. Carotenoidele	13
1.4.3. Compușii polifenolici. Structura și clase de polifenoli	14
1.5. Efecte pentru sănătate ale compușilor biologic activi din lavandă	16
1.5.1. Efecte ale clorofilelor pentru sănătate	16
1.5.2. Efecte ale carotenoidelor pentru sănătate	17
1.5.3. Efecte potențiale pentru sănătate ale polifenolilor	20
<b>CAPITOLUL 2. Aspecte teoretice privind principalele tehnici de extracție utilizate pentru compușii biologic activi din lavandă</b>	<b>22</b>
2.1. Aspecte teoretice privind extracția compușilor biologic activi	22
2.2. Tehnici convenționale de extracție	23
2.3. Tehnici asistate de extracție	24
2.4. Metode avansate de extracție a uleiurilor esențiale	25
<b>CAPITOLUL 3. Aspecte teoretice privind microîncapsularea compușilor biologic activi</b>	<b>28</b>
3.1. Aspecte generale	28
3.2. Criterii de clasificare a tehnicilor de microîncapsulare	28
3.3. Caracteristicile fizico-chimice ale microcapsulelor	29
3.4. Uscarea prin pulverizare	29
3.5. Coacervarea	30
3.6. Liofilizarea	31
3.7. Microîncapsularea carotenilor	31
3.8. Microîncapsularea clorofilelor	32
3.9. Aplicații ale microîncapsulării în cosmetică, industria alimentară și farmaceutică	32
<b>CONTRIBUȚII PROPRII</b>	<b>35</b>
<b>CAPITOLUL 4. Evaluarea comparativă a unor metode de extracție din perspectiva conținutului în compuși biologic activi din flori de lavandă</b>	<b>36</b>
4.1. Aspecte generale	36
4.2. Obiectivele studiului	36
4.3. Materiale și metode	37
4.3.1. Materiale utilizate	37
4.3.2. Reactivi utilizați	37
4.3.3. Aparatura utilizată	38
4.4. Metode	38
4.4.1. Extracția solid-lichid cu solvenți organici diferiți a compușilor biologic activi din flori de lavandă	38
4.4.2. Extracție combinată hexan:acetonă – ultrasonare	38
4.4.3. Extracție combinată etanol – microunde	38
4.4.4. Extracție cu CO <sub>2</sub> supercritic	39
4.4.5. Determinarea conținutului de carotenoide și clorofilă din extractele de lavandă	40

4.4.6. Conținutul de polifenoli totali	.....	41
4.4.7. Conținutul total de flavonoide	.....	41
4.4.8. Determinarea activității antioxidante	.....	42
4.4.9. Spectre de absorbție	.....	42
4.4.10. Determinarea acizilor grași din lipide totale prin gaza-cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă	.....	42
4.4.11. Determinarea compușilor volatili din extracte prin metoda ITEX/GC-MS	.....	43
4.4.12. Tratamentul termic	.....	44
4.4.13. Cinetica reacțiilor de degradare	.....	44
4.5. Analiza statistică a datelor	.....	45
4.6. REZULTATE ȘI DISCUȚII	.....	46
4.6.1. Screening-ul profilului fitochimic global al extractelor din flori din lavandă obținute prin extracția solid-lichid cu solvenți diferiți prin metode spectrofotometrice	.....	46
4.6.2. Screening-ul comparativ al profilului fitochimic al extractelor din flori de lavandă la extracția asistată de ultrasunete	.....	48
4.6.3. Screening-ul comparativ al profilului fitochimic al extractelor din flori de lavandă la extracția asistată de microunde	.....	48
4.6.4. Screening-ul comparativ al profilului fitochimic al extractelor din flori de lavandă la extracția extractă cu fluide supercritice	.....	49
4.6.5. Analiza comparativă a profilului fitochimic global a extractelor din flori de lavandă selectate pentru experimente ulterioare	.....	50
4.6.6. Evaluarea comparativă a profilului fitochimic individual al extractelor din flori din lavandă obținute prin extracția cu solvenți, extracția asistată de ultrasunete și extracția cu fluide supercritice prin metode cromatografice	.....	51
4.7. Evaluarea stabilității unor compuși biologic activi și a activității antioxidante la tratamentul termic	.....	58
4.7.1. Cinetica de degradare a clorofilelor	.....	58
4.7.2. Cinetica de degradare a compușilor carotenoidici	.....	61
4.7.3. Cinetica de degradare a compușilor polifenolici	.....	64
4.7.4. Compușii flavonoidici	.....	66
4.7.5. Cinetica de degradare a activității antioxidante	.....	68
4.8. Concluzii parțiale	.....	68
<b>CAPITOLUL 5. Dezvoltarea unor ingrediente cu funcționalitate ridicată pentru potențiale utilizări în produse alimentare</b>	.....	73
5.1. Introducere	.....	73
5.2. Obiectivele studiului	.....	73
5.3. Materiale și metode	.....	74
5.4. Reactivi utilizați	.....	74
5.5. Aparatura utilizată	.....	75
5.6. Metode de extracție a compușilor biologic activi	.....	75
5.6.1. Extracția compușilor hidrofobi	.....	75
5.6.2. Extracția compușilor hidrofili	.....	75
5.6.3. Extracția cu fluide supercritice	.....	76

5.6.4. Metode de caracterizare a extractelor	76
5.6.5. Metode de caracterizare a pudrelor microîncapsulate	76
5.7. Analiza statistică	79
5.8. REZULTATE ȘI DISCUȚII	79
5.8.1. Variante experimentale de microîncapsulare a compușilor biologic activi din flori de lavandă	79
5.8.2. Analiza comparativă a profilului fitochimic global a variantelor experimentale microîncapsulate	82
5.8.3. Activitatea antimicrobiană a pudrelor	83
5.8.4. Analiza morfologică și structurală a variantelor microîncapsulate prin microscopia confocală cu laser	84
5.8.5. Analiza morfologică și structurală a variantelor microîncapsulate prin microscopia de scanare cu electroni (SEM)	85
5.8.6. Dimensionarea particulelor	89
5.8.7. Analiza citotoxicologică a variantelor microîncapsulate	89
5.9. Concluzii parțiale	92
<b>CAPITOLUL 6. Cercetare aplicativă prin dezvoltarea de variante tehnologice de obținere a unor produse alimentare cu valoare adăugată</b>	95
6.1. Introducere	95
6.2. Obiectivele studiului	96
6.3. Materiale și metode	96
6.3.1. Caracterizarea activității antioxidante a produselor	96
6.3.2. Analiza reologică a mixurilor de înghețată	96
6.3.3. Analiza senzorială	97
6.4. REZULTATE ȘI DISCUȚII	98
6.4.1. Variante tehnologice de obținere a unor produse alimentare cu valoare adăugată	98
6.4.2. Evaluarea valorii adăugate ca activitate antioxidantă	98
6.4.3. Testarea pudrelor microîncapsulate în alte matrici alimentare	99
6.4.4. Analiza reologică a produselor alimentare cu valoare adăugată	100
6.4.5. Analiza senzorială a produselor alimentare cu valoare adăugată	102
6.4.6. Dezvoltarea unei tehnologii de obținere a unui produs de tip înghețată pe bază de lapte cu adaos de pudră microîncapsulată cu extract din flori de lavandă	102
6.5. Concluzii parțiale	104
<b>CAPITOLUL 7. Concluzii finale</b>	106
<b>CAPITOLUL 8. Contribuții personale și perspective de continuare a studiilor</b>	108
<b>CAPITOLUL 9. Lista publicațiilor</b>	109
<b>CAPITOLUL 10. Bibliografie</b>	110
<b>CAPITOLUL 11. Anexe</b>	131
Anexa 1. Lista figurilor	131
Anexa 2. Lista tabelelor	134
Anexa 3. Fișa de analiză senzorială a variantelor experimentale de înghețată cu valoare adăugată	135

## Introducere

Accentul deosebit pe creșterea funcționalității a înregistrat un **viraj** semnificativ în conceperea produselor alimentare, de la furnizarea nutrienților esențiali pentru susținerea vieții și creșterii la prevenirea sau chiar vindecarea diferitelor forme de boli. Mai mult, progresul tehnologic recent, schimbarea stilului de viață al consumatorului și tendințele socio-economice din întreaga lume indică necesitatea dezvoltării unor tehnologii inovative pentru obținerea unor **alimente cu beneficii pentru sănătate**. Acestea elemente sunt considerate **cheie** și determină dezvoltarea producției actuale de **alimente funcționale** pe piața globală.

Beneficiile pentru sănătate ale alimentelor funcționale derivă din conținutul în compuși biologic activi, cum ar fi compușii polifenolici, carotenoide, vitamine, acizi grași polinesaturați și peptide, care se găsesc în mod natural în produsele agroalimentare, se formează în timpul procesării sau se extrag din alte surse și se adaugă în alimente. Literatura de specialitate recunoaște deja **calitatea de ingrediente funcționale** pentru o serie de compuși, cum ar fi: fibrele, proteinele, vitaminele și antioxidanții, care prin diferite tehnici de extracție pot fi utilizate în **re-modelarea alimentelor**, cu scopul de a le îmbunătăți funcțiile. Componentele bioactive, cum ar fi sterolii, tocoferolii, carotenii, terpenele și polifenolii pot fi utilizate pentru a formula alimente funcționale cu proprietăți antioxidante îmbunătățite.

Dieta noastră zilnică implică consumul unei cantități ridicate de pigmenți precum carotenoide, antociani și clorofile (Downham și Collins, 2000). În corpul uman, acești compuși prezintă funcții biologice importante, care permit combaterea unor boli precum cancerul, bolile cardiovasculare, cataracta, arteroscleroza, degenerarea maculei și altele (Özkan și Bilek, 2014). Beneficiile aduse sănătății umane în urma consumului de clorofile includ acțiune antioxidantă, antiinflamatorie, antibacteriană, anticancerigenă, odorizantă precum și vindecarea rănilor (Hosikian și colab., 2010). Carotenoidele oferă efecte benefice în prevenirea anumitor tipuri de cancer, boli cardiovasculare și degenerative (Nishino, 1998).

Alegerea temei de doctorat "**Caracterizarea în compuși bioactivi a unor plante în vederea utilizării în industria alimentară**" s-a bazat pe potențialul funcțional insuficient exploatat al lavandei în industria alimentară și pe trendul general de creștere a cererii de alimente funcționale pe piața mondială, datorat progresului tehnologiilor de procesare și producție și conștientizării consumatorilor referitoare la rolul alimentului în promovarea sănătății. Prin urmare, tematica a luat în considerare posibilitatea de identificare a unor noi surse de compuși din surse naturale cu potențial antioxidant, care să aibă capacitatea nu doar să întârzie sau să împiedice formarea speciilor reactive în produsele alimentare, dar și dezvoltarea unor variante tehnologice de alimente, astfel încât prin creșterea consumului acestor antioxidanți naturali să se prevină apariția proceselor oxidative *in vivo*, protejând astfel organismul împotriva diferitelor boli. De asemenea, s-a luat în considerare ipoteza conform căreia, la nivel industrial și comercial, aplicațiile antioxidanților naturali sunt limitate, datorită susceptibilității lor la degradare prin oxidare, izomerizare, polimerizare, copolimerizare etc, în funcție de condițiile de mediu și de procesare (oxigen, enzime, lumină, temperaturi ridicate, pH acid sau alcalin), specifice industriei alimentare (Schoefs, 2002; Marquez și Sinnecker, 2008; Kang și colab., 2019).

Teza de doctorat intitulată "**Caracterizarea în compuși bioactivi a unor plante în vederea utilizării în industria alimentară**" a avut ca scop extracția, identificarea și valorificarea compușilor biologic activi din flori de *Lavandula angustifolia* în ingrediente funcționalitate ridicată și dezvoltarea unor tehnologii de obținere a unor produse alimentare cu beneficii potențiale pentru sănătate, prin exploatarea potențialului fitochimic și biologic al acestei plante. Lavanda este cunoscută ca o sursă bogată de uleiuri esențiale. Lavanda (*L. angustifolia*) conține antociani,

fitosteroli, zaharuri, minerale, acid cumaric, acid glicolic, acid valeric, acid ursolic, herniarină, cumarină și taninuri (Prusinowska și Smigielski, 2014), cu efecte semnificative pentru sănătate, cum ar fi: activitatea antioxidantă, antiinflamatorie, anticancerigenă, antifungică, antibacteriană etc.

Principalele **obiective științifice** ale tezei de doctorat sunt:

- Stabilirea profilului fitochimic al extractelor din flori de lavandă (*Lavandula angustifolia*) obținute comparativ prin tehnici diferite de extracție în corelație cu proprietățile antioxidante și stabilitatea la procesare, din perspectiva stabilirii condițiilor optime de extracție și păstrare;
- Microîncapsularea compușilor biologic activi din extracte în ingrediente cu funcționalitate ridicată din perspectiva integrării în alimente funcționale, prin îmbunătățirea stabilității și a caracteristicilor de eliberare controlată.
- Dezvoltarea a două tehnologii de obținere a unor produse cu valoare adăugată prin adăugarea de ingrediente funcționale microîncapsulate.

Teza de doctorat este structurată în două părți, după cum urmează:

- I. **STUDIUL DOCUMENTAR** este împărțit în 3 capitole ce prezintă sintetizat diferite considerații teoretice din literatura de specialitate referitoare la compușii bioactivi din *Lavandula angustifolia*, cu accent pe beneficiile asupra sănătății. Sunt prezentate, de asemenea, principii teoretice și practice ale tehnicilor de extracție și de microîncapsulare
- II. **CONTRIBUȚII PROPRII** cuprinde 4 capitole în care sunt evidențiate rezultatele studiilor de cercetare realizate pe parcursul stagiului doctoral, prezentat succint în continuare:

**Capitolul 4, intitulat EVALUAREA COMPARATIVĂ A UNOR METODE DE EXTRACȚIE DIN PERSPECTIVA CONȚINUTULUI ÎN COMPUȘI BIOLOGIC ACTIVI** prezintă rezultatele obținute de la extracția, separarea, identificarea și cuantificarea compușilor biologic activi din florile de lavandă (caroteni, clorofile, compuși volatili, acizi grași, polifenoli și flavonoide) (*Lavandula angustifolia*) utilizând metode spectrofotometrice și tehnici de cromatografie lichidă (HPLC) și gazoasă (GC-MS).

**Capitolul 5, intitulat DEZVOLTAREA UNOR INGREDIENTE CU FUNCȚIONALITATE RIDICATĂ PENTRU POTENȚIALE UTILIZĂRI ÎN PRODUSE ALIMENTARE**, prezintă rezultatele obținute în etapele de microîncapsulare și dezvoltare a variantelor de ingrediente funcționale și caracterizarea pudrelor rezultate, din punct de vedere fitochimic, structural și morfologic, biologic și citotoxic.

**Capitolul 6, intitulat CERCETARE APLICATIVĂ PRIN DEZVOLTAREA DE VARIANTE TEHNOLOGICE DE OBȚINERE A UNOR PRODUSE ALIMENTARE CU FUNCȚIONALITATE RIDICATĂ**, prezintă rezultatele obținute prin elaborarea a două tehnologii pentru brevetarea a două produse cu funcționalitate superioară, care exploatează potențialul funcțional al florilor de lavandă și al extractelor de lavandă microîncapsulate, respectiv o tehnologie pentru obținerea unei înghețate pe bază de izolat proteic din zer și extracte de lavandă și pricomigdale.

Fiecare capitol al studiului experimental cuprinde următoarele subcapitole: *Introducere, Obiectivele; Materiale și metode, Rezultate și discuții, Concluzii și Bibliografie.*

**Capitolul 7, Concluzii finale**, prezintă principalele concluzii rezultate în urma experimentelor realizate.



Teza de doctorat cuprinde **147** pagini, în care sunt incluse **50** figuri și **23** tabele. Studiul documentar reprezintă 25 %, iar partea experimentală 75 %.

În final, sunt evidențiate contribuțiile originale ale tezei de doctorat și diseminarea rezultatelor obținute în domeniul de cercetare abordat. Astfel, rezultatele cercetărilor au fost valorificate prin elaborarea a 3 articole științifice, publicate sau în curs de publicare, 1 articol în reviste cotate Web of Science (acceptat pentru publicare în *International Food Research Journal*) și 2 articole publicate sau în curs de publicare în reviste indexate Web of Science (*The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI – Food Technology*). De asemenea, rezultatele au fost prezentate și la 5 conferințe internaționale și naționale.

Efectuarea experimentelor din cadrul tezei de doctorat a fost posibilă datorită infrastructurii *Centrului integrat de cercetare, expertiză și transfer tehnologic (BioAliment-TehnIA)* ([www.bioaliment.ugal.ro](http://www.bioaliment.ugal.ro)), din cadrul Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați.

Teza s-a realizat sub coordonarea științifică a comisiei de îndrumare cu următoarea componență:

- **Prof. dr. ing. Nicoleta STĂNCIUC** – conducător de doctorat
- **Prof. dr. ing. Petru ALEXE** – conducător de doctorat în cotutelă
- **Prof. dr. ing. Gabriela RÂPEANU** – coordonator studii de analiză spectrofotometrică și cinetica de degradare a compușilor polifenolici
- **Prof. dr. ing. Iuliana APRODU** – coordonator studii de caracterizare fitochimică.
- **Conf.dr.ing. Liliana MIHALCEA** – coordonator studii de extracție.

## CAPITOLUL 4.

# EVALUAREA COMPARATIVĂ A UNOR METODE DE EXTRAȚIE DIN PERSPECTIVA CONȚINUTULUI ÎN COMPUȘI BIOLOGIC ACTIVI DIN FLORI DE LAVANDĂ

### 4.1. Aspecte generale

Lavanda este intens studiată pentru conținutul în uleiuri esențiale și mai puțin pentru conținutul său în clorofile, carotenoide și compuși polifenolici. Prin urmare, studiul de față a urmărit testarea unor metode diferite de extracție (convențională cu solvenți, combinate și extracția cu fluide supercritice) din perspectiva evaluării comparative a conținutului în compuși biologic activi.

### 4.2. Obiectivele studiului

**Obiectivul principal** al studiului a constat în testarea comparativă a trei categorii principale de tehnici de extracție a compușilor biologic activi din florile de lavandă: **extracția solid-lichid cu solvenți organici diferiți** (extracție convențională), **extracția asistată combinată**, utilizând două variante de extracție în solvenți asistată de ultrasunete și microunde, și **extracția cu fluide supercritice**, utilizând CO<sub>2</sub> supercritic.

**Un obiectiv secundar** al studiului a vizat evaluarea stabilității la procesarea termică a unor compuși biologic activi țintă din extractele selectate, în vederea aprecierii potențialului de aplicare a extractelor selectate ca atare în diverse procese de producție.

### 4.3. Materiale și metode

#### 4.3.1. Materiale utilizate

Butașii de lavandă (*Lavandula angustifolia*) au fost procurați de pe piața locală românească și plantați pe teren propriu. La un grad optim de maturitate, florile au fost transportate la laborator și uscate în vederea prelucrării. Lavanda a fost întreținută în condiții optime, curățată regulat și irigată ocazional, deoarece nu necesită o cantitate mare de apă. Pe prezenta producție de lavandă din care s-au recoltat probe pentru analizele din cadrul lucrării de doctorat, nu s-au utilizat pesticide sau îngrășăminte.

Realizarea pudrei: După uscare în condiții nedenaturante (maxim 40°C), la întuneric, lavanda a fost mărunțită cu ajutorul unui dispozitiv de mărunțire.

#### 4.3.2. Reactivi utilizați

1. Metanol de puritate HPLC
2. Soluție de NaNO<sub>2</sub> 5 % (m/v)
3. Soluție de AlCl<sub>3</sub> 10 % (m/v)
4. Soluție de NaOH 1M
5. Reactiv Folin-Ciocalteu
6. Soluție Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20 % (m/v)
7. Soluție de KCl 0,025 M, pH=1.0
8. Soluție de CH<sub>3</sub>COONa·3H<sub>2</sub>O 0,4 M, pH=4.5
9. Soluție HCl 1N
10. Soluție de acid formic 3 – 5 %
11. Soluție de etanol 70 %
12. Reactiv DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)
13. Soluție TROLOX
14. Soluție acid galic

#### 4.3.3. Aparatura utilizată

Incintă de termostatare cu apă Julabo 5, Germania

Balanță analitică de înaltă precizie, XS 403 SM, METTLER TOLEDO, Elveția

Ultracentrifugă cu răcire, HETTICH Universal 320 R, Germania

pH – metru S 20 K, METTLER TOLEDO, Elveția

Spectrofotometru UV- VIS Biochrom Libra S22, 2017

Shaker orbital cu control analogic al frecvenței de agitare și termostatare, LAB COMPANION COMECTA S.A.

Concentrator sub vid AVC 2-18, CHRIST

Baie de ultrasonare

Cuptor cu microunde

Instalația de extracție cu fluide supercritice Natex Prozesstechnologie GmbH, Ternitz, Austria, model 10-023/2011).

#### **4.4. Metode**

##### **4.4.1. Extracția solid-lichid cu solvenți organici diferiți a compușilor biologic activi din flori de lavandă**

Extractul s-a obținut din florile uscate și măcinate de lavandă. Proba de analizat (2 g) a fost omogenizată cu 10 mL din diferiți solvenți organici, după cum urmează: acetonă, dietileter, hexan, metanol și omogenizate cu ajutorul unui shaker orbital la temperatura camerei timp de 4h, în vederea extracției compușilor polifenolici. Supernatantul rezultat s-a prelevat, iar procesul de extracție s-a repetat. Cele două supernatante rezultate s-au amestecat și centrifugat la 8500xg, la o temperatură de 4°C, timp de 10 minute.

##### **Extracția compușilor biologic activi prin metode combinate**

În acest caz, au fost utilizate în combinație solvenți și două metode de extracție utilizate intens în literatura de specialitate, și anume ultrasonare și extracția asistată de microunde.

##### **4.4.2. Extracție combinată hexan:acetonă – ultrasonare**

În acest caz, 2 g de pudră uscată și măcinată au fost omogenizate cu amestec n-hexan:acetonă 3:1, urmat de ultrasonare la 40°C timp de 30 și 40 de minute. După ultrasonare, amestecul a fost centrifugat la 8500xg, la o temperatură de 4°C, timp de 10 minute. Supernatantul a fost colectat, iar extracția s-a repetat de 4 ori. Supernatantul rezultat a fost amestecat și s-a concentrat la temperatura de 40°C sub presiune redusă până la sec (AVC 2-18, CHRIST).

##### **4.4.3. Extracție combinată etanol – microunde**

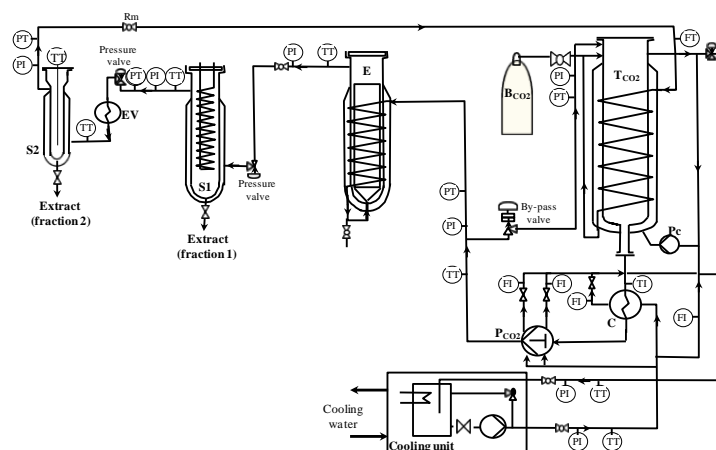
Extracția combinată solvenți-microunde s-a realizat în etanol într-un cuptor cu microunde astfel: s-a cântărit un gram de pudră uscată și măcinată de lavandă și s-a omogenizat cu 10 mL etanol (70%). Acest amestec a fost supus tratamentului cu microunde folosind următorii parametri pentru extracția compușilor biologic activi din lavandă:

- puterea de 210 W, timp de 30 secunde, la o temperatură de 64°C;
- puterea de 310 W, timp de 20 secunde, la o temperatură de 63,5°C;
- puterea de 420 W, timp de 15 secunde, la o temperatură de 64,5°C.

##### **4.4.4. Extracție cu CO<sub>2</sub> supercritic**

Lavanda recoltată în perioada 2017 și uscată la temperatura 25°C și măcinată fin înainte de extracție la moara coloidală (model UMC 12 - 2012, producator Stephan, Germania).

*Instalația de extracție cu CO<sub>2</sub> supercritic* (Natex Prozesstechnologie GmbH, Ternitz, Austria, model 10-023/2011) alcătuită din extractorul E (2 litri volum util) – figura 1 și două trepte de separare (fiecare cu 1,5 litri volum util) are integrat software-ul ABB (ABB - Mannheim, Germania). Extractorul E și cele două separatoare S1, respectiv S2 sunt dotate cu sisteme proprii de încălzire pentru asigurarea condițiilor optime de temperatură necesare procesului de extracție (Figura 4.1.).



**Figura 4.1.** Schița de principiu a instalației de extracție cu fluide supercritice

T<sub>CO2</sub> – tanc pentru CO<sub>2</sub>; B<sub>CO2</sub> – butelie cu CO<sub>2</sub>; E – extractor; S1 – separator 1; S2 – separator 2; P<sub>CO2</sub> – pompa de proces pentru CO<sub>2</sub>; P<sub>c</sub> – pompa de circulație pentru CO<sub>2</sub>; C – pre-răcitor; EV – evaporator; R<sub>m</sub> – robinet cu acționare manuală; TT – transmițător a temperaturii; TI – indicator temperatură; PT – transmițător de presiune; PI – indicator de presiune; FI – indicator de debit; FT – transmițător de debit.

**Tabel 4.1.** Parametrii de extracție în sistem discontinuu (Nadalin și colab., 2014)

Extractor C30		Separator 1 – S1	Separator 2 – S2	Debit CO <sub>2</sub> , kg/h	Randament gravimetric, %
I	<b>300 bar/60°C/1 h</b>	<b>150 bar/60°C 1 h și 2 h</b>	<b>50 bar/25°C 1 h și 2 h</b>	<b>20,27</b>	<b>4,67</b>
	300 bar/60°C/2h			20,10	2,05
II	400 bar/60°C/1 h			17,78	1,94
	400 bar/60°C/2h			nefinalizat	nefinalizat
I+II	300 bar/60°C/3h	150 bar/60°C	50 bar/25°C	20,16	6,59
	400 bar/60°C/3h	150 bar/60°C	50 bar/25°C	nefinalizat	nefinalizat

#### 4.4.5 Determinarea conținutului de carotenoide și clorofilă din extractele de lavandă

Extractele rezultate se diluează în solventul de extracție și se citește absorbanta la 470 nm pentru carotenoide totale, 663 nm și 645 nm pentru clorofile. Pentru calculul concentrației de carotenoide și clorofile s-au utilizat relațiile lui Arnon (1949) 1-4:

$$\text{Chl } a = 0,0127 \times A_{663} - 0,00269 \times A_{645} \quad (1)$$

$$\text{Chl } b = 0,0229 \times A_{645} - 0,00468 \times A_{663} \quad (2)$$

$$\text{tot Chl} = 0,0202 \times A_{645} + 0,00802 \times A_{663} \quad (3)$$

$$\text{Carotenoide totale} = (1000 \times A_{470} - 1,82 \times A_{663} - 85,02 \times A_{645})/198 \quad (4)$$

**4.4.6. Conținutul de polifenoli totali** s-a determinat cu ajutorul metodei colorimetrice Folin-Ciocalteu (Gutfinger, 1981). Pentru realizarea curbei de calibrare s-a utilizat ca standard acidul galic, iar rezultatele obținute au fost exprimate ca mg acid galic/mL extract (mg AG/mL) (Figura 4.2.).

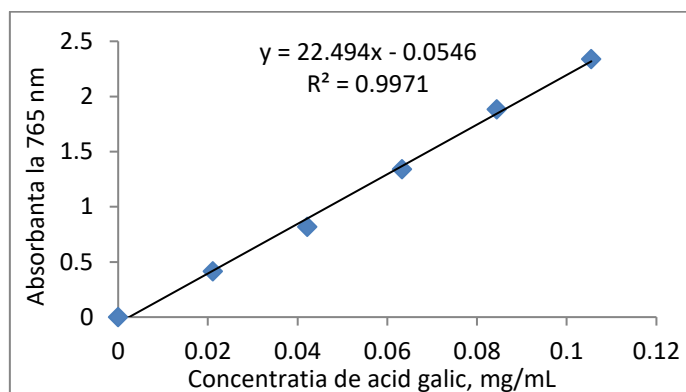


Figura 4.2. Curba de calibrare cu acid galic, mg AG/mL

**4.4.7. Conținutul total de flavonoide** a fost determinat utilizând metoda descrisă anterior de către Dewanto și colab., (2002). Conținutul total de flavonoide se determină cu ajutorul curbei standard catehinice și se exprimă ca mg echivalenți catehینici/g probă liofilizată ± SD (mg EC/mL) (Figura 4.3.).

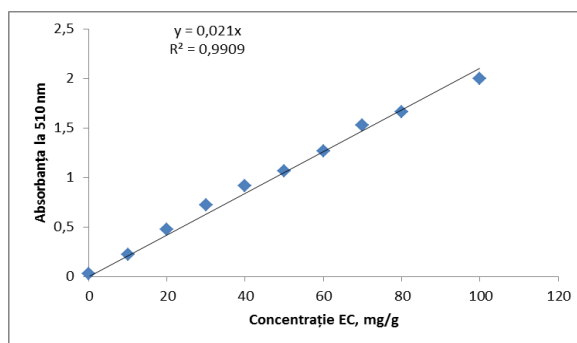


Figura 4.3. Curba de calibrare pentru determinarea conținutului total de flavonoide, mg EC/g SU

**4.4.8. Determinarea activității antioxidante** s-a realizat utilizând metoda DPPH (2,2-difenil-1 picrilhidrazil)

*Determinarea activității antioxidante:* Pentru exprimarea activității antioxidante în mMol Trolox/ml s-a utilizat curba etalon din Figura 4.4.

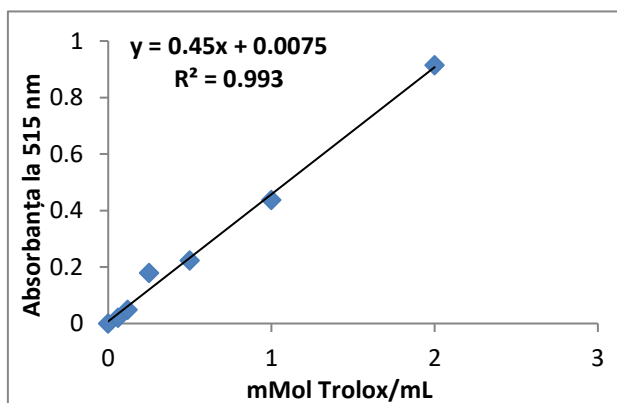


Figura 4.4. Curba de calibrare utilizată pentru determinarea activității antioxidante, mMoli Trolox/mL

#### 4.4.9. Spectre de absorbție

Toate extractele au fost testate prin spectroscopie UV-Vis pentru a verifica lungimile de undă la care se înregistrează maximul de absorbție. Extractele au fost dizolvate în solvenții cu

care s-a realizat extracție, s-a realizat o diluție în proporție de 1:3, iar scanarea s-a efectuat în domeniul spectral 200-900 de nm cu ajutorul spectrofotometrului Cintra 202.

#### 4.4.10. Determinarea acizilor grași din lipide totale

Pentru determinarea acizilor grași din lipidele totale au fost selectate 3 probe, și anume: extractul obținut prin extracție cu hexan și acetonă urmată de ultrasonare 20 și 40 de minute și extractul obținut prin extracția cu fluide supercritice, fracțiunea S40.

Concentrațiile de acizi grași au fost exprimate în % de arie din totalul ariilor acizilor grași.

#### 4.4.11. Determinarea compușilor volatili din extracte prin metoda ITEX/GC-MS

Pentru determinarea acizilor grași din lipidele totale au fost selectate 3 probe, și anume: extractul obținut prin extracție cu hexan și acetonă urmată de ultrasonare 20 și 40 de minute și extractul obținut prin extracția cu fluide supercritice, fracțiunea S40.

Extracția compușilor volatili s-a realizat prin tehnica in-tube, după o metodă descrisă de [Socaci și colab. \(2013\)](#), prin utilizarea a 0.1g de extract S45 și S40 și 0.05 g din extractul obținut prin ultrasonare. Analiza compușilor volatili s-a realizat cu ajutorul echipamentului gaz cromatograf GC-MS QP-2010 (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japan) cuplat cu spectrometru de masa. Compușii volatili s-au separat cu ajutorul unei coloane capilare Zebron ZB-5ms cu dimensiuni de 25 m×0.25 mm și grosime film de 0.25 μm. s-a utilizat helin 1 mL/min și raport de 1:100.

#### 4.4.12. Tratamentul termic

Tratamentul termic a fost aplicat pentru a verifica stabilitatea la procesarea termică a extractelor. Pentru experimentele de cinetică de degradare termică, a fost selectat extractul obținut prin extracția combinată hexan:acetonă 3:1 și ultrasonare timp de 30 de minute. Astfel, extractul de concentrație 20 mg/ml s-a dizolvat în etanol din care 0,4 mL au fost supuși tratamentului termic la diferite temperaturi cuprinse între 75 și 100°C, timp de 0-40 minute. După tratamentul termic, probele au fost introduse în apă cu gheață pentru a evita propagarea degradării compușilor biologic activi.

#### 4.4.13. Cinetica reacțiilor de denaturare

Modelul cinetic de conversie fracțională descris de ecuația 5. a fost utilizat pentru a descrie efectul tratamentului termic asupra compușilor biologic activi din extractul de lavandă. Acest model cinetic poate fi aplicat în cazul proceselor de degradare termică care iau în considerare o valoare pozitivă a proprietății studiate după o durată prelungită a tratamentului termic.

$$X_t = X_\infty + (X_\infty - X_i) \exp(-kt) \quad (5)$$

în care:

$X_\infty$  - valoarea de echilibru pentru o durată infinită a tratamentului termic;

$X_i$  – valoarea răspuns pentru probelor native.

Ecuația 5. este valabilă în domeniul de temperatură în care valoarea  $X_\infty$  nu se modifică odată cu modificarea duratei de expunere la diferite temperaturi.

Cinetica de degradare a activității antioxidante a fost descrisă cu ajutorul modelului cinetic de ordinul I, dat de ecuația 6:

$$-\frac{dC}{dt} = k \cdot C \quad (6)$$

unde  $k$  este constanta vitezei de degradare (1/min). Prin integrare, ecuația (6) devine:

$$-\ln\left(\frac{C_0}{C}\right) = k \cdot t \quad (7)$$

Timpul de înjumătățire ( $t_{1/2}$ ) este dat de ecuațiile:

$$k \cdot t_{1/2} = -\ln(1/2) \quad (8)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (9)$$

Dependența de temperatură a constatărilor vitezelor de reacție,  $k$  (1/min) a fost descrisă de ecuația Arrhenius (ecuația 10.):

$$k = k_{ref} \exp\left(-\frac{E_a}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right) \quad (10)$$

în care:

- $T$  și  $T_{ref}$  reprezintă temperatura absolută, respectiv temperatura de referință (K);
- $k_{ref}$  reprezintă constanta vitezei de reacție la temperatura de referință;
- $E_a$  reprezintă energia de activare (kJ/mol);
- $R$  reprezintă constanta universală a gazelor (8,314 J/(mol·K)).

Energia de activare a fost calculată cu ajutorul regresiei liniare a dreptei  $\ln k$  în funcție de  $1/T$  (K).

#### 4.5. Analiza statistică a datelor

Toate experimentele au fost efectuate în triplicat. Rezultatele au fost exprimate în termeni de valori medii. Analiza statistică a datelor a fost efectuată utilizând pachetul de instrumente de analiză a datelor al software-ului Microsoft Excel. Coeficientul de determinare ( $R^2$ ) și eroarea medie pătratică ( $MSE$ ) au fost utilizate precum criterii pentru adecvarea modelului.

#### 4.6. REZULTATE ȘI DISCUȚII

În studiile realizate, au fost testate diferite metode de extracție și analizate comparativ conținutul în clorofile, carotenoide, conținut de polifenoli totali (TPC), flavonoide totale (TFC), acizi grași, compuși volatili și activitatea antioxidantă.

##### 4.6.1. Screening-ul profilului fitochimic global al extractelor din flori din lavandă obținute prin extracția solid-lichid cu solvenți diferiți prin metode spectrofotometrice

Pentru extracția cu solvenți organici, s-au utilizat: acetonă, dietileter, etanol, n-hexan și metanol. Rezultatele obținute prin extracție cu solvenți organici sunt prezentate în **Tabelul 4.2**.

**Tabel 4.2.** Conținutul de compuși biologic activi în extractele obținute prin extracție cu solvenți

Compus	Acetonă	Dietileter	Hexan	Metanol
TPC, mg AG/mL	0,06±0,01	0,05±0,01	0,008±0,001	0,05±0,01
TFC, mg EC/mL	84,74±2,31	52,71±3,45	10,61±0,89	121,85±2,54
Clorofila a, μg/mL	36,64±2,47	14,22±1,47	6,50±0,78	23,38±2,41
Clorofila b, μg/mL	36,08±2,74	4,93±1,75	2,51±0,96	18,27±1,07
Carotenoide totale, μg/mL	14,43±1,24	4,90±1,45	2,05±0,71	11,18±0,45
Activitate antioxidantă, mMol Trolox/mL	0,68±0,17	0,46±0,12	0,26±0,07	1,28±0,23

Din **Tabelul 4.2**, se poate observa o distribuție semnificativ diferită a gradului de extracție a compușilor biologic activi în funcție de tipul de solvent. Flavonoidele totale s-au extras în cea mai mare concentrație în metanol (121,85±2,54 mg EC/mL), urmat de acetonă (84,74±2,31 mg EC/mL) și dietileter (52,71±3,45 mg EC/mL), cu o concentrație mai mică în hexan, de 10,61±0,89 mg EC/mL.

Cel mai eficient solvent pentru extracția clorofilelor a, b și a carotenoidelor totale a fost acetona, cu 36,64±2,47 μg/mL, 36,08±2,74 μg/mL și respectiv 14,43±1,24 μg/mL urmată de metanol cu 23,38±2,41 μg/mL clorofilă a, 18,27±1,07 μg/mL clorofilă b și 11,18±0,45 μg/mL.

Extractul cu ce mai puternică activitate antioxidantă a fost cel obținut cu metanol, cu 1,28±0,23 mMol Trolox/mL, care probabil este dată de conținutul mai mare în TFC.



#### 4.6.2. Screening-ul comparativ al profilului fitochimic al extractelor din flori de lavandă la extracția asistată de ultrasunete

Pentru extracția cu ultrasunete s-au utilizat diferite tipuri de combinații de solvenți, respectiv n-hexan-acetonă în raport de 1:1, 3:1 și etanol, timp de 30 de minute la 40°C.

Rezultatele obținute prin extracție combinată sunt prezentate în **Tabelul 4.3**.

**Tabel 4.3.** Profilul fitochimic global al extractelor din flori de lavandă la extracția asistată de ultrasunete

Compus	Hexan:Acetonă 1:1	Hexan:Acetonă 3:1	Etanol (70%)
TPC, mg AG/g SU	nd	5,41±0,08	0,08±0,007
TFC, mg EC/ g SU	nd	4,20±0,85	7,40±0,40
Clorofila a, μg/ g SU	0,53±0,02	4,50±1,16	1,04±0,02
Clorofila b, μg/ g SU	0,56±0,07	6,40±0,39	1,32±0,15
Carotenoide totale, μg/g SU	0,28±0,06	2,71±0,28	0,84±0,06
Activitate antioxidantă, mMol Trolox/g SU	2,68±0,37	4,46±0,98	1,32±0,02

Din **Tabelul 4.3** se poate observa că extracția cu amestec de hexan și acetonă 3:1 a permis obținerea celui mai mare conținut în clorofilă, compuși polifenoli, flavonoide și activitate antioxidantă.

#### 4.6.3. Screening-ul comparativ al profilului fitochimic al extractelor din flori de lavandă la extracția asistată de microunde

Tehnica a fost aplicată și pentru extracția compușilor biologic activi din flori de lavandă, la diferiți parametri (**Tabel 4.4**).

**Tabel 4.4.** Conținutul de compuși biologic activi în extractele obținute prin extracție asistată cu microunde

Compus	MW 15 sec (420 W, 64,5°C)	MW 20 sec (310 W, 63,5°C)	MW 30 sec (210 W, 64°C)
TPC, mg AG/mL	3,56±0,01	0,26±0,01	0,26±0,01
TFC, mg EC/mL	1,10±0,12	0,11±0,04	0,10±0,02
Clorofila a, μg/mL	4,59±0,09	4,16±0,01	3,05±0,02
Clorofila b, μg/mL	2,39±0,02	2,22±0,04	1,34±0,04
Carotenoide totale, μg/mL	2,48±0,06	2,95±0,26	1,82±0,01
Activitate antioxidantă, mMol Trolox/mL	1,13±0,04	0,52±0,01	0,32±0,01

Se poate observa un grad de extracție ridicat pentru compușii polifenolici în prima variantă (timp de extracție 15 sec, putere 420 W, temperatură 64,5°C). Pentru clorofile și compușii carotenoidici există diferențe semnificative între primele două variante și varianta trei, scăderea puterii concomitent cu creșterea timpului de extracție nu a condus la creșterea concentrației de compuși biologic activi în extracte.

#### 4.6.4. Screening-ul comparativ al profilului fitochimic al extractelor din flori de lavandă la extracția cu fluide supercritice

Extracția cu CO<sub>2</sub> supercritic (SCE) se efectuează la temperaturi scăzute, în mod normal sub 60°C, ceea ce permite protejarea compușilor termolabili din extract.

În **Tabelul 4.5** sunt prezentate valorile obținute pentru compușii biologic activi în fracțiunea S45, obținută după 1 oră și respectiv 3 ore de extracție la 300 bar.



**Tabel 4.5.** Conținutul de compuși biologic activi în extractele obținute prin extracție cu CO<sub>2</sub> supercritic, fracțiunea S45

Compus	1 oră de extracție 300 bar	3 ore de extracție 300 bar
TPC, mg AG/g SU	67,56±1,42	80,95±0,67
TFC, mg EC/g SU	15,67±2,98	34,02±0,51
Clorofila <i>a</i> , mg/g extract SU	6,78±0,98	5,22±0,12
Clorofila <i>b</i> , mg/g extract SU	3,45±0,78	2,95±0,16
Carotenoide totale, mg/g SU	18,24±0,04	15,67±1,45
Activitate antioxidantă, mMol Trolox/g SU	28,89±2,34	34,02±0,51

Din **Tabelul 5.5.**, se poate observa că extracția cu CO<sub>2</sub> supercritic a condus la obținerea unor oleoresine cu profil fitochimic diferit, remarcându-se o concentrație ridicată de flavonoide după 3 ore de extracție, în timp ce extracția timp de 1 oră a determinat extracția unor concentrații mai mari de clorofile și carotenoide totale.

#### 4.6.5. Analiza comparativă a profilului fitochimic global a extractelor din flori de lavandă selectate pentru experimente ulterioare

Din experimentele efectuate, s-a remarcat că extracția combinată n-hexan:acetonă raport 3:1 cu ultrasonare, în condiții de extracție 30 min la 40°C (**E1**), extracția în etanol 70% în combinație cu ultrasonarea (**E2**), în condiții de extracție 30 min la 40°C, și extracția cu CO<sub>2</sub> supercritic (**E40 și E45**) au permis un control al profilului fitochimic, cu obținerea unor concentrații ridicate de compuși hidrofobi în **E1**, hidrofilii în **E2** și ambele categorii în **E40 și E45 (Tabel 4.6.)**.

**Tabel 4.6.** Profilul fitochimic al extractelor din flori de lavandă

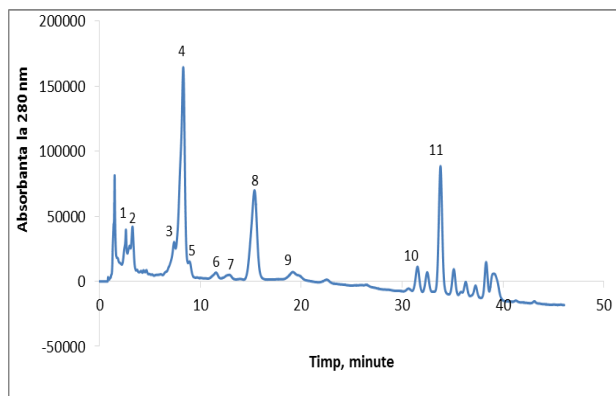
Compuși fitochimici	E1	E2	E40+E45
Clorofile totale, mg/g SU	3,19±0,12	nd*	13,13±0,45
Clorofila <i>a</i> , mg/g SU	2,10±0,08	nd	8,22±0,12
Clorofila <i>b</i> , mg/g SU	0,69±0,02	nd	4,95±0,16
Carotenoide totale, mg/g SU	0,42±0,01	nd	28,24±0,04
Polifenoli totali, mg AG/g SU	19,45±0,45	180,80±2,91	89,95±0,67
Flavonoide totale, mg EC/g SU	23,61±0,75	80,77±2,53	67,02±0,51
Activitatea antioxidantă, mMol/g SU	17,54±3,98	108,33±0,86	102,36±3,56

\*nd – nedeterminat

În **tabelul 4.6.** este prezentat profilul fitochimic global al celor trei extracte obținute prin diferite tehnici de extracție. Se poate observa că extracția în etanol asistată de ultrasunete (**E2**) a permis obținerea unor extract cu un conținut ridicat de polifenoli și flavonoide, care a condus la o activitate antioxidantă remarcabilă, de 108,33±0,86 mMol Trolox/g S.U. Extracția asistată de fluide supercritice a fost superioară extracției cu ultrasunete în ceea ce privește extracția compușilor hidrofobi, permițând obținerea unui extract cu un conținut semnificativ mai mare de clorofile, carotenoide totale și flavonoide.

#### 4.6.6. Evaluarea comparativă a profilului fitochimic individual al extractelor din flori din lavandă obținute prin extracția cu solvenți, extracția asistată de ultrasunete și extracția cu fluide supercritice prin metode cromatografice

Profilul cromatografic al extractului obținut din florile de lavandă a relevat prezența a unsprezece compuși polifenolici, însă concentrația de acizi polifenolici a fost majoritară (**Figura 4.5**). Cea mai mare concentrație a fost înregistrată de acidul vanilic și acidul cinamic. Totodată, în concentrații mari s-au găsit și acidul ferulic și acidul rozmarinic. Quercetina a relevat o concentrație destul de mică în extractul din flori de lavandă împreună cu apigenina.



**Figura 4.5.** Profilul cromatografic al extractului din flori de lavandă – Peak (1) - acid galic; Peak (2) – acid 3,4 - hidroxibenzoic; Peak (3) - acid clorogenic; Peak (4) – acid vanilic; Peak (5) - acid cafeic; Peak (6) - acid p-coumaric; Peak (7) – quercetină; Peak (8) – acid ferulic; Peak (9) - apigenină; Peak (10) – acid rozmarinic; Peak (11) – acid cinamic.

Pentru extractele obținute, s-au utilizat tehnici de cromatografie lichidă de înaltă performanță și cromatografie de gaze pentru a determina profilul fitochimic al acestora, și, totodată, și caracterul antimicrobian al uleiului esențial extras din *L. angustifolia*. Profilul cromatografic a reliefat prezența a unsprezece compuși polifenolici diferiți, în cele mai mari concentrații găsindu-se acidul cafeic, acidul rozmarinic și acizii 4-hidroxibenzoici.

Extractele hidrofobe obținute prin extracție asistată de ultrasunete (EAU) și cele două extracte obținute prin extracția asistată de fluide supercritice au fost analizate comparativ în ceea ce privește conținutul de compuși volatili, rezultatele fiind prezentate în **Tabelul 4.5**.

**Tabel 4.5.** Profilul compușilor de aromă în extractele de lavandă

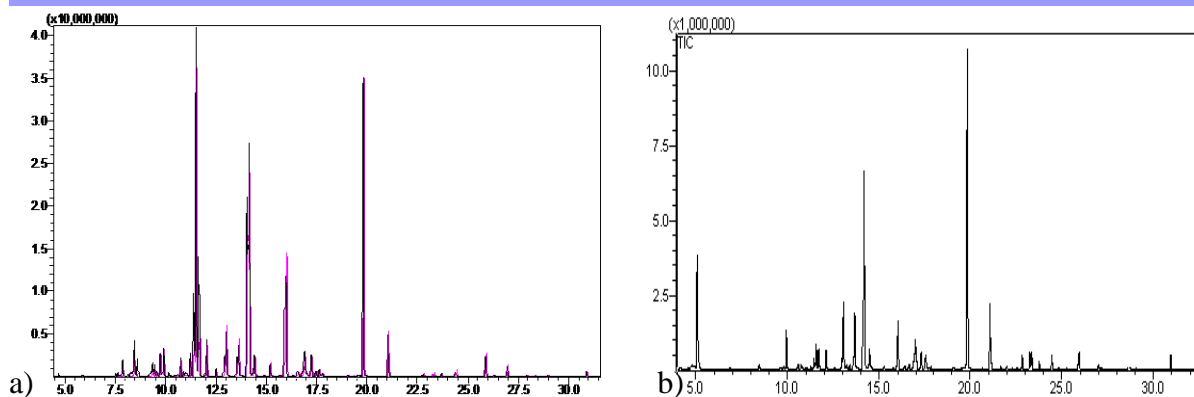
Compus	% din suprafața totală a peak-ului		
	SCE (S40)	SCE (S45)	E1
2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-2(5H)-Furanone, 5.5-dimethyl-	-	-	9,24±0,89
1-Hexanol	0,05±0,01	0,08±0,01	-
Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane, 1,7,7-trimethyl-	0,03±0,01	0,13±0,02	-
Origanene	0,06±0,01	0,15±0,02	-
α-Pinene	0,30±0,02	0,77±0,04	-
3-Heptanone, 6-methyl-	0,11±0,05	0,11±0,01	-
Heptane, 2.5.5-trimethyl-			0,24±0,07
Camphene	0,77±0,09	1,97±0,11	-
n.i	0,17±0,02	0,86±0,11	-
2-Thujene	0,04±0,01	0,08±0,01	-
4(10)-Thujene (Sabinen)	0,10±0,01	0,47±0,02	-
β-Pinene	0,25±0,05	0,41±0,03	-
1-Octen-3-ol	0,20±0,05	0,17±0,01	-

**CARACTERIZAREA ÎN COMPUȘI BIOACTIVI A UNOR PLANTE ÎN VEDEREA UTILIZĂRII ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ**

3-Octanone	1,30±0,07	1,09±0,05	0,30±0,10
β-Myrcene	1,34±0,10	1,32±0,11	2,83±0,45
Butanoic acid, butyl ester	0,15±0,01	0,18±0,01	-
n.i	0,09±0,01	0,10±0,01	-
Acetic acid, hexyl ester (1-Hexyl acetate)	0,85±0,08	0,80±0,11	-
α-Terpinene	0,08±0,01	0,11±0,01	-
p-Cymene	0,83±0,10	1,16±0,04	0,23±0,01
Limonene	3,48±0,54	4,87±0,58	0,97±0,15
Eucalyptol	16,72±0,98	17,62±1,20	2,10±0,58
β-trans-Ocimene	4,02±0,45	5,13±0,74	1,56±0,62
β-cis-Ocimene	1,58±0,23	1,60±0,12	1,48±0,23
γ-Terpinene	0,16±0,01	0,36±0,01	-
6-Methyl-2-(2-oxiranyl)-5-hepten-2-ol	3,98±0,23	3,45±0,41	6,74±1,02
Linalool oxide (fr.1)	3,04±0,25	2,66±0,52	5,76±0,28
β-Linalool	19,94±1,01	20,44±1,20	15,18±1,20
Octen-1-ol, acetate	1,01±0,05	0,97±0,11	1,85±0,57
2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-, (E, Z)-	0,71±0,11	0,58±0,15	0,18±0,02
Camphor	10,3±0,74	7,82±1,21	4,39±0,23
Lavandulol	0,35±0,01	0,33±0,08	-
Borneol	1,76±0,05	2,38±0,04	3,16±0,78
1-Terpinen-4-ol	1,41±0,47	1,42±0,09	1,46±0,06
n.i			1,30±0,24
Butanoic acid, hexyl ester	-	0,37	-
n-Hexyl butanoate	0,44±0,04	-	-
α-Terpineol	-	0,20±0,01	-
Isobornyl formate	-	0,11±0,01	0,22±0,21
Linalool acetate	18,08±0,87	15,28±1,25	25,86±1,24
Lavandulyl acetate	2,63±0,56	2,13±0,52	5,62±0,78
n.i	0,15±0,08	0,08±0,01	1,06±0,06
8-Hydroxylinalool	-	-	2,54±0,24
Nerol	0,14±0,09	0,11±0,01	0,53±0,08
u.i.	0,38±0,11	0,24±0,05	1,17±0,09
Caryophyllene	1,73±0,12	1,20±0,02	1,86±0,08
α-Bergamotene	0,08±0,01	0,05±0,01	-
β-Farnesene	0,62±0,02	0,49±0,01	0,43±0,09
γ-Murolene	0,09±0,01	-	-
n.i	0,15±0,04	0,17±0,01	0,98±0,14
Acetic acid. hexyl ester	-	-	0,39±0,07

\* neidentificat

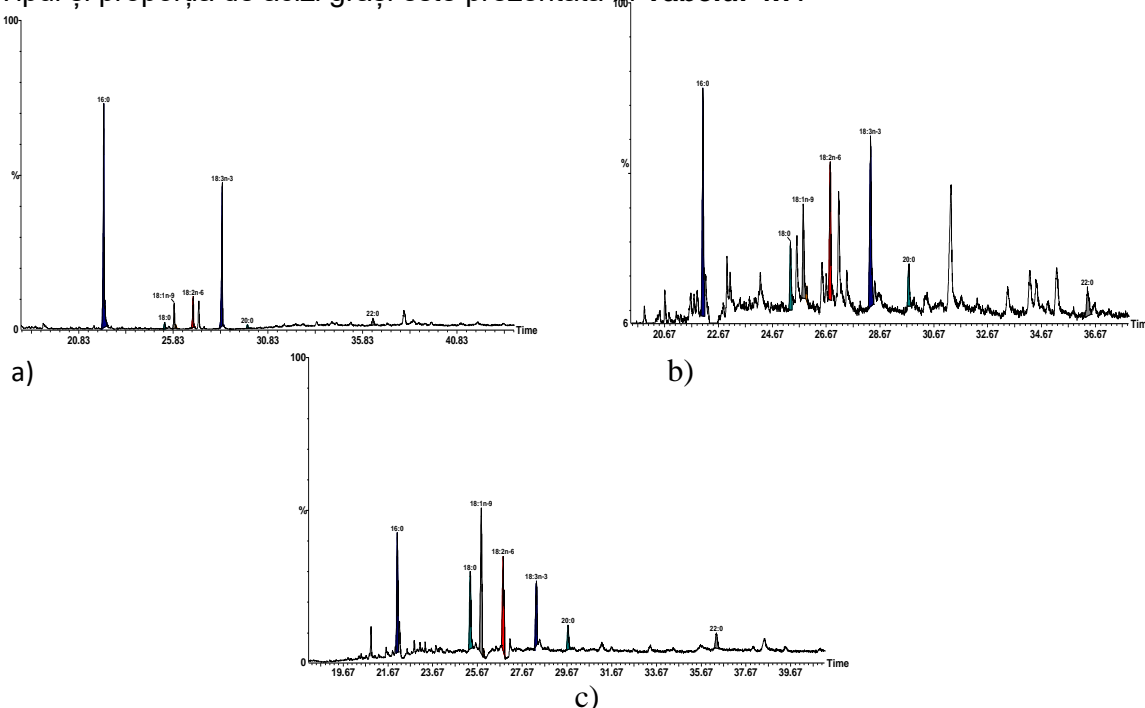
Analiza GC-MS a celor trei tipuri de extracte a permis identificarea a 44 și respectiv 26 de compuși volatili în extractele CO<sub>2</sub> și E1.



**Figura 4.6.** Cromatogramele GC-MS pentru identificarea și cuantificarea compușilor volatili din extractele obținute prin extracția cu fluide supercritice (a) (S45 – negru, S40 – roz) și extracția asistată de ultrasunete (b)

În extractul CO<sub>2</sub>, au fost identificați 7 compuși principali ( $\beta$ -linalool, eucaliptol, linalool acetat,  $\beta$ -trans-ocimen, și limonen) (**Figura 4.6**), în timp ce în extractul **E1** au fost identificați tot 7 compuși principali, constând în linalool acetat,  $\beta$ -linalool, 6-methyl-2-(2-oxiranyl)-5-hepten-2-ol, linalool oxid, lavandulil acetat și camfor. Extractul obținut prin extracția cu fluide supercritice este mai bogat în compuși volatili. De exemplu, fracțiunile **S40** și **S45** conțin  $\alpha$ -pinen, 3-heptanonă, 6-methyl-, camfen, sabinen,  $\beta$ -pinen, 1-Octen-3-ol etc, în timp ce extractul **E1** conține o cantitate dublă de  $\beta$ -mircen, 6-Methyl-2-(2-oxiranyl)-5-hepten-2-ol, linalool oxid (fr.1) și octen-1-ol, acetat și o cantitate semnificativ mai mică de camfor. Diferențe semnificative au fost identificate și în conținutul de limonen, eucaliptol,  $\beta$ -trans-ocimen,  $\beta$ -Linalool, cu o proporție mai mare în fracțiunea **S45** și mai mică în extractul **E1**. În ceea ce privește conținutul de acetat de linalool, extractul **E1** a prezentat cel mai mare conținut ( $25,86 \pm 1,24\%$ ), urmat de fracțiunea **S40** ( $18,08 \pm 0,87\%$ ) și S45 ( $15,28 \pm 1,25\%$ ).

În **Figura 4.7.** este prezentată cromatograma de identificare și cuantificare a profilului acizilor grași, care prezintă 7 peak-uri în extractul CO<sub>2</sub> (**Figura 4.7. a**) și 8 peak-uri în **Figura 4.7. b**. Tipul și proporția de acizi grași este prezentată în **Tabelul 4.7**.



**Figura 4.7.** Cromatogramele GC-MS pentru identificarea și cuantificarea profilului acizilor grași totali din extractele de lavandă fracțiunile CO<sub>2</sub> S40 (a) și S45 (b) și extractul E1 (c)

**Tabel 4.7.** Compoziția în acizi grași (% din acizii grași totali) în extractele de flori de lavandă

Acid gras	E40	E45	E1
Acid $\alpha$ -linolenic (18:3n-3)	31,67 $\pm$ 1,58	25,61 $\pm$ 1,25	11,82 $\pm$ 0,55
Acid palmitic (16:0)	49,80 $\pm$ 2,31	25,10 $\pm$ 0,87	18,71 $\pm$ 0,80
Acid linoleic (18:2n-6)	7,66 $\pm$ 1,02	16,81 $\pm$ 1,05	19,66 $\pm$ 0,85
Acid oleic (18:1n-9)	5,37 $\pm$ 0,89	11,35 $\pm$ 0,99	27,21 $\pm$ 1,10
Acid stearic (18:0)	1,55 $\pm$ 0,05	8,39 $\pm$ 0,11	13,73 $\pm$ 0,62
Acid behenic (22:0)	2,52 $\pm$ 0,12	5,79 $\pm$ 0,35	3,58 $\pm$ 0,20
Acid arachidic (20:0)	0,86 $\pm$ 0,16	5,63 $\pm$ 0,52	4,62 $\pm$ 0,25
Acid vaccenic (18:1n-7)	0,59 $\pm$ 0,01	1,31 $\pm$ 0,07	0,67 $\pm$ 0,08
AGSs	54,73 $\pm$ 1,25	44,91 $\pm$ 1,53	40,64 $\pm$ 1,35
AGMSs	5,93 $\pm$ 1,20	12,66 $\pm$ 1,28	27,88 $\pm$ 1,20
AGPNs	39,33 $\pm$ 1,48	42,43 $\pm$ 1,87	31,48 $\pm$ 1,35
<i>n</i> -3 AGPN	31,67 $\pm$ 1,59	25,61 $\pm$ 0,85	11,82 $\pm$ 0,55
<i>n</i> -6 AGPNs	7,66 $\pm$ 1,58	16,81 $\pm$ 0,98	19,66 $\pm$ 0,90
<i>n</i> -6/ <i>n</i> -3	0,24	0,66	1,66
AGPN/AGM	0,72	0,94	0,77

Abrevieri: AGS- acizi grași saturați, AGMN- acizi grași mononesaturați, AGPN-acizi grași polinesaturați.

Profilul acizilor grași depinde de tipul de extracție. Din **tabelul 4.7.** se poate observa că fracțiunea **S40** a prezentat cea mai mare proporție de acid  $\alpha$ -linolenic (31,67 $\pm$ 1,58%) și acid palmitic (49,80 $\pm$ 2,31%), în timp ce extractul **E1** a prezentat o proporție mai mare de acid linoleic (19,66 $\pm$ 0,85%), oleic (27,21 $\pm$ 1,10%) și stearic (13,73 $\pm$ 0,62%).

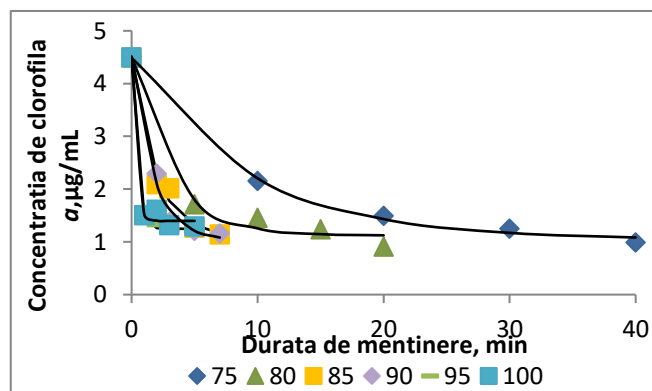
Se poate observa că extractele au prezentat o concentrație ridicată de acizi polinesaturați, cu valoarea cea mai ridicată în fracțiunea **S45** de 42,43% și o valoare mai mică de acizi grași mononesaturați, cu cea mai mare valoare înregistrată în extractul **E1** (27,88 $\pm$ 1,20%) și cea mai mică în fracțiunea **S40** (5,93 $\pm$ 1,20%). Acizii *n*-3 au avut cea mai mare contribuție în fracțiunea **S40** (31,67 $\pm$ 1,59%) comparativ cu acizii *n*-6 (7,66 $\pm$ 1,58%) și mai mica în **E1**, de 11,82 $\pm$ 0,55% și respectiv, 19,66 $\pm$ 0,90%.

#### 4.7. Evaluarea stabilității unor compuși biologic activi și a activității antioxidante la tratamentul termic

##### 4.7.1 Cinetica de degradare a clorofilelor

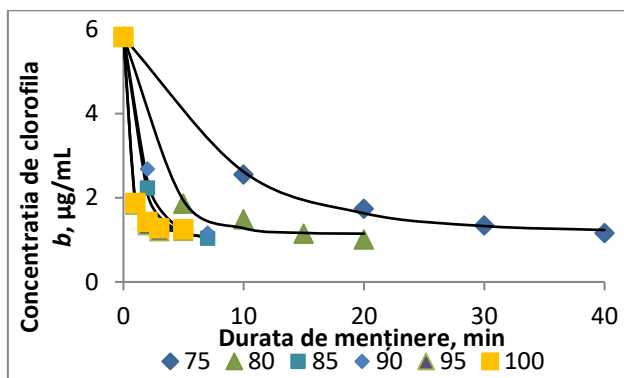
Modelul cinetic de conversie fracțională dat de ecuația 5 a fost utilizat pentru a descrie efectul tratamentului termic asupra compușilor biologic activi din extractul de lavandă.

Cinetica de degradare termică a fost studiată în intervalul de temperatură 75° – 100°C. Din **Figura 4.8.** se poate observa că degradarea termică a clorofilei a a urmat un model cinetic de conversie fracțională.



**Figura 4.8.** Modelul cinetic de conversie fracțională care descrie degradarea termică a clorofilei a în extractul de lavandă

În **Figura 4.9.** sunt prezentate curbele de degradare termică a clorofilei *b* în extractul de lavandă.



**Figura 4.9.** Modelul cinetic de conversie fracționată care descrie degradarea termică a clorofilei *b* în extractul de lavandă

Constantele vitezelor de degradare estimate de modelul cinetic de conversie fracționată sunt prezentate în **Tabelul 4.8.**

**Tabel 4.8.** Parametrii cinetici estimați de modelul cinetic de conversie fracționată la degradarea termică a clorofilelor *a* și *b* în extractul de lavandă

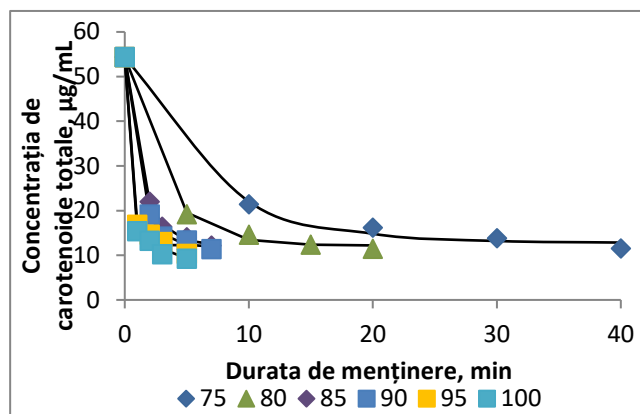
Compus	Temperatura, °C	$k (x10^{-2}), 1/min$	$C_{\infty}$	$E_a, kJ/Mol$
Clorofila <i>a</i>	75	10,83±1,15	1,03±0,09	<b>139,69±15,22</b>
	80	32,05±8,32	1,11±0,05	
	85	52,24±12,10	1,07±0,03	
	90	61,07±15,90	1,02±0,02	
	95	229,98±5,97	1,24±0,03	
	100	297,81±11,99	1,39±0,10	
Clorofila <i>b</i>	75	11,58±0,96	1,12±0,08	<b>123,49±18,24</b>
	80	34,92±6,18	1,14±0,12	
	85	61,82±5,86	1,04±0,07	
	90	70,90±6,49	0,98±0,03	
	95	208,71±9,72	1,22±0,02	
	100	220,82±16,23	1,28±0,03	

Pe baza valorilor constantelor vitezei de degradare, se poate aprecia că cele două componente bioactive se degradează similar în intervalul de temperatură 75-80°C, în timp ce în intervalul de temperatură 85-90°C, clorofila *b* se degradează cu o viteză mai mare și mai mică la temperaturi mai ridicate.

#### 4.7.2. Cinetica de degradare a compușilor carotenoidici

Modelul cinetic de conversie fracționată dat de ecuația 4 a fost utilizat pentru a descrie efectul tratamentului termic asupra compușilor carotenoidici totali din extractul de lavandă.

În **Figura 4.10.** sunt prezentate curbele de degradare termică a carotenoidelor totale în extractul de lavandă.



**Figura 4.10.** Modelul cinetic de conversie fracționară care descrie degradarea termică a carotenoidelor totale în extractul de lavandă

Tratamentul termic a avut un efect semnificat asupra conținutului de carotenoide totale, determinând o reducere de cca. 79% după 40 de minute de menținere la 75°C și respectiv 20 de minute la 80°C. La temperaturi mai ridicate, pierderile în carotenoide totale au fost semnificative, variind între 74% la 85°C până la cca. 83% la 100°C după 5 minute de menținere (**Figura 4.18**). Constantele vitezelor de degradare estimate de modelul cinetic de conversie fracționară sunt prezentate în **Tabelul 4.9**.

**Tabel 4.9.** Parametrii cinetici estimați de modelul cinetic de conversie fracționară la degradarea termică a conținutului de carotenoide totale în extractul de lavandă

Compus	Temperatura, °C	$k (x10^{-2}), 1/min$	$C_{\infty}$	$E_a, kJ/Mol$
Carotenoide totale	75	15,05±2,01	12,73±1,07	114,18±11,44
	80	34,79±3,24	12,28±0,66	
	85	74,35±4,22	12,24±0,55	
	90	90,95±8,09	12,16±0,70	
	95	184,43±4,65	11,87±1,21	
	100	212,73±3,79	10,49±1,31	

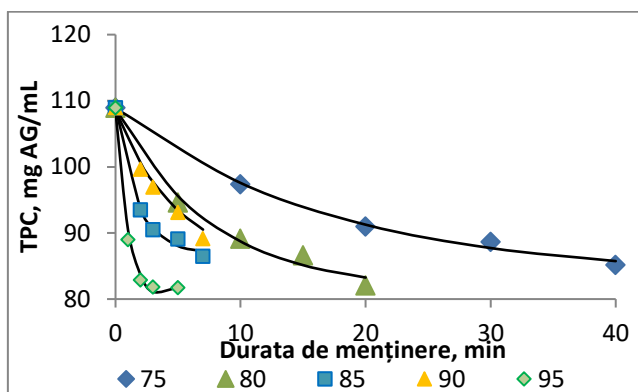
Din **Tabelele 4.8.-4.9.**, se poate observa o degradare cu o viteză mai mare în intervalul de temperatură 75-90°C, urmată de o degradare similară la temperaturi de 95°C, în timp ce la 100°C, clorofila *a* se degradează cel mai rapid.

Termostabilitatea carotenoidelor se datorează dublelor legături conjugate. La aplicarea unui tratament termic intens, structurile sunt scindate și apar reacții moleculare în care sunt implicate dublele legături.

#### 4.7.3. Cinetica de degradare a compușilor polifenolici

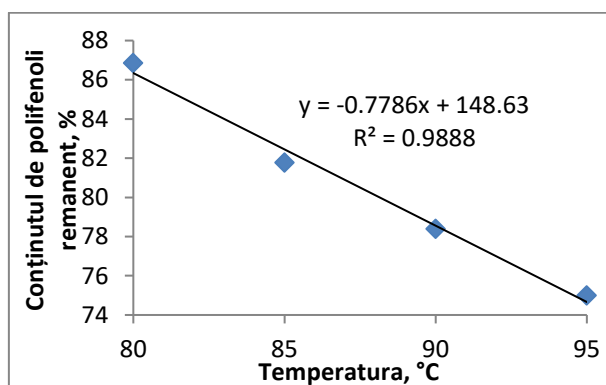
Modelul cinetic de conversie fracționară a fost utilizat pentru a descrie cinetica de degradare termică a compușilor polifenolici totali din extractul de lavandă.

Curbele de degradare termică sunt prezentate în **Figura 4.11**.



**Figura 4.11.** Modelul cinetic de conversie fracțională care descrie degradarea termică a TPC în extractul de lavandă

Studiile de cinetică de degradare au evidențiat stabilitatea termică a compușilor polifenolici în extractul de lavandă. Din **Figura 4.12.** se poate observa că tratamentul termic cu o durată de menținere de 5 min a condus la păstrarea concentrației de polifenoli în proporție de ~87% la 80°C, ~82% la 85°C, ~79% la 90°C și ~75% la 95°C.



**Figura 4.12.** Conținutul procentual de TPC în extractul de lavandă după tratamentul termic în intervalul 80-95°C timp de 5 min

Tratamentul la 100°C timp de 5 min a condus la creșterea conținutului de polifenoli totali cu cca. 9%, indicând creșterea gradului de extractibilitate a compușilor polifenolici. În studiul de față, s-a observat o scădere a TPC în primele 3 minute de tratament termic, urmată de o ușoară creștere a concentrației.

Constantele vitezelor de degradare estimate de modelul cinetic de conversie fracțională sunt prezentate în **Tabelul 4.10.**

**Tabel 4.10.** Parametrii cinetici estimați de modelul cinetic de conversie fracțională la degradarea termică a polifenolilor în extractul de lavandă

Compus	Temperatura, °C	$k (x10^{-2}), 1/min$	$C_{\infty}$	$E_a, kJ/Mol$
TPC	75	5,80±0,90	83,22±1,89	94,65±8,19
	80	12,94±3,30	81,18±2,58	
	85	20,35±8,91	86,85±0,93	
	90	30,82±0,19	84,62±1,56	
	95	38,79±1,50	79,50±1,08	
	100	58,69±1,54	77,57±1,89	

Din **Tabelul 4.10.**, se poate observa o degradare lentă a polifenolilor în intervalul de temperatură 75-80°C, urmată de o degradare accelerată la temperaturi de 85-95°C.



#### 4.7.4. Compușii flavonoidici

În urma tratamentului termic, s-a remarcat o stabilitate ridicată a compușilor flavonoidici, fără modificări semnificative în conținut (**Tabel 4.11.**).

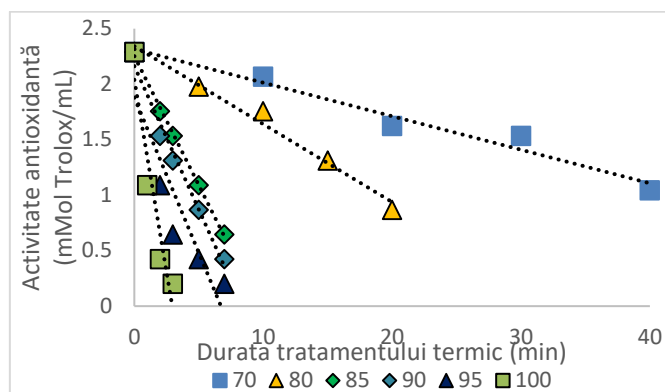
**Tabel 4.11.** Variația conținutului total de flavonoide la tratamentul termic a extractului din flori din lavandă

Temperatura, °C	Durata de menținere, min	TFC, mg EC/mg extract
75	0	4,20±0,85
	10	3,93±0,42
	20	3,76±0,36
	30	3,83±0,74
	40	4,16±0,41
80	0	4,20±0,85
	5	3,94±0,74
	15	4,34±0,23
	20	3,78±0,58
	25	3,96±0,65
85	0	4,20±0,85
	2	5,01±0,45
	3	3,91±0,33
	5	4,04±0,41
	7	4,17±0,14
90	0	4,20±0,85
	1	4,00±0,47
	2	2,78±0,11
	3	4,18±0,25
	5	4,02±0,28
95	0	4,20±0,85
	1	2,11±0,28
	2	3,54±0,29
	3	3,79±0,47
	5	4,10±0,51
100	0	4,20±0,85
	1	3,42±0,11
	2	4,33±0,18
	3	3,58±0,41

Creșterea cantității de flavonoide se poate datora formării compușilor monomerici rezultați din hidroliza legăturilor dintre C-glicozide, deoarece în majoritatea plantelor flavonoidele există sub formă de C-glicozid dimer sau oligomer.

#### 4.7.5. Cinetica de degradare a activității antioxidante

Tratamentul termic a avut un impact semnificativ asupra activității antioxidante, determinând o scădere cu aproximativ 54% la 75°C după 40 minutes și 92% la 100°C după 3 minute (**Figura 4.13**). Cinetica de degradare a activității antioxidante a urmat un model de ordin I, care a permis estimarea parametrilor cinetici, cum ar fi constanta vitezelor de degradare și energia de activare (**Tabel 4.11.**).



**Figura 4.13.** Modelul cinetic de ordinul I care descrie degradarea termică a activității antioxidante a extractului de lavandă la tratamentul termic în intervalul de temperatură 75-100°C

**Tabel 4.11.** Parametrii cinetici estimați de modelul de ordinul I la degradarea termică a activității antioxidante în extractul de lavandă

Compus	Temperatura, °C	$k (x10^{-2}), 1/min$	$C_{\infty}$	$E_a, KJ/Mol$
Activitatea antioxidantă	75	$1,86 \pm 0,09$	$83,22 \pm 1,89$	<b><math>158,69 \pm 29,11</math></b>
	80	$4,69 \pm 0,87$	$81,18 \pm 2,58$	
	85	$17,87 \pm 1,28$	$86,85 \pm 0,93$	
	90	$23,49 \pm 2,37$	$84,62 \pm 1,56$	
	95	$34,01 \pm 1,27$	$79,50 \pm 1,08$	
	100	$77,35 \pm 3,78$	$77,39 \pm 1,21$	

Se poate observa din **Tabelul 4.11.**, că activitatea antioxidantă se degradează cu o viteză mai mică în tot intervalul de temperatură, probabil că stabilitatea termică este datorată stabilității termice a compușilor flavonoidici.

#### 4.8. Concluzii parțiale

Obiectivul principal al studiului a fost acela de a testa trei categorii de tehnici de extracție diferite și de a analiza profilul fitochimic global și individual al acestora, din perspectiva selectării unor extracte cu profil individualizat, pentru utilizări particulare. Un obiectiv secundar al studiului a fost acela de a testa stabilitatea la procesarea termică a unor compuși țintă și de a descrie degradarea termică a acestora pe baza unor modele cinetice, din perspectiva utilizării extractelor selectate ca atare în diferite aplicații industriale, cu scopul optimizării proceselor termice în vederea păstrării potențialului biologic activ.

Rezultatele obținute au permis formularea următoarelor concluzii parțiale:

1. Au fost testate trei categorii de tehnici de extracție: o tehnică clasică, de extracție solid-lichid, două tehnici combinate asistate (solvenți și ultrasonare, solvenți și microunde) și extracție cu fluide supercritice (CO<sub>2</sub> supercritic). Studiul a vizat o serie de compuși biologic activi, cum ar fi: clorofile, carotenoide, acizi grași, compuși volatili, flavonoide, polifenoli, în corelație cu activitate antioxidantă.
2. În cazul extracției solid-lichid, au fost utilizați o serie de solvenți organici, cum ar fi acetonă, dieetileter, hexan și metanol, Metanolul a permis obținerea unui extract cu cea mai mare concentrație de flavonoide ( $121,85 \pm 2,54$  mg EC/mL), și în consecință cea mai ridicată valoare pentru activitatea antioxidantă ( $1,28 \pm 0,23$  mMol Trolox/mL). Cele mai mari concentrații de clorofile ( $36,64 \pm 2,47$  μg/mL pentru clorofila a și  $36,08 \pm 2,74$  μg/mL pentru clorofila b) și carotenoide totale ( $14,43 \pm 1,24$  μg/mL) s-au obținut la extracția cu acetonă.
3. La stabilirea spectrelor de absorbție au fost înregistrate benzi înguste în intervalele spectrale diferite pentru clorofila a și b, în domeniul albastru (408 nm pentru extractul în acetonă și

- dietileter, 410 nm pentru hexan și 375 nm pentru extractul în metanol) și roșii (663 pentru extractul în acetonă, 667 nm pentru extractul în dietileter, 668 nm pentru extractul în hexan și 665 nm pentru extractul în metanol).
4. Pentru extracția asistată de ultrasunete, ca solvent s-a selectat amestecul de hexan:acetonă în raport de 3:1 și etanolul, pentru 30 min la 40°C, rezultatele evidențiind un conținut semnificativ mai mare de compuși biologic activi în extractul obținut cu amestec de hexan:acetonă 3:1, cu excepția conținutului de flavonoide, care s-au extras cu un randament mai mare în etanol. De exemplu, extractul obținut cu amestec de hexan:acetonă în raport de 3:1 a prezentat un conținut de clorofila *a* și *b* de 4,50±1,16 și respectiv 6,40±0,39 μg/mg extract, cu o activitate antioxidantă de 4,46±0,98 mMol Trolox/mg extract, valori ridicate au fost înregistrate și pentru conținutul de compuși polifenolici, cu 5,41±0,08 mg AG/mg extract pentru polifenolii totali și 4,20±0,85 mg EC/mg extract pentru flavonoidele totale.
  5. La extracția în etanol asistată de microunde, rezultate superioare s-au obținut în condiții de timp de extracție 15 sec, putere 420 W și temperatura de 64,5°C, extractul prezentând un conținut mai mic de clorofila *a* și *b* comparativ cu extracția convențională, de 4,59±0,09 μg/mL și respectiv 2,39±0,02 μg/mL.
  6. Extracția cu fluide supercritice a permis obținerea a două tipuri de extracte, corespunzătoare celor două separatoare, S40 și S45, cu profil fitochimic global diferit, extracția la 300 de bari, timp de o oră a permis obținerea unei fracțiuni S45 mai bogată în clorofila și carotenoide totale, comparativ cu prelungirea duratei de extracție la 3 ore, Timpul de extracție a influențat concentrația de flavonoide și polifenoli în fracțiunea S45, cu valori de 80,95±0,67 mg AG/g SU și respectiv de 34,02±0,51 mg EC/ g SU, cu aproape 20% mai mare pentru polifenoli și mai mult de 2 ori mai mare pentru flavonoide comparativ cu extracția timp de 1 oră. Activitatea antioxidantă a fost mai mare cu cca, 18% în cazul extractului obținut după 3 ore de extracție.
  7. Pentru analiza comparativă, au fost selectate patru extracte rezultate din extracția combinată *n*-hexan:acetonă raport 3:1 cu ultrasunete, în condiții de extracție 30 min la 40°C (**E1**), extracția în etanol 70% în combinație cu ultrasunetea (**E2**), în condiții de extracție 30 min la 40°C, și extracția cu CO<sub>2</sub> supercritic (**E40 și E45**) au permis un control al profilului fitochimic, cu obținerea unor concentrații ridicate de compuși hidrofobi în **E1**, hidrofili în **E2** și ambele categorii în **E40 și E45**, Astfel, în extractul obținut prin ultrasunete cu etanol, conținut de compuși hidrofili (polifenoli și flavonoide) este semnificativ mai mare (180,80±2,91 mg AG/g SU și respectiv 80,77±9,53 mg EC/g SU), în timp ce extractul supercritic are un conținut remarcabil în ambele categorii de compuși, cu o activitate antioxidantă de 78,36±89,56 mMol/g SU.
  8. Extractul obținut prin extracție combinată etanol cu ultrasunete a fost analizat în ceea ce privește profilul cromatografic individual al compușilor polifenolici, fiind identificată prezența a unsprezece compuși polifenolici, cu o majoritate a acizilor polifenolici. Cea mai mare concentrație a fost înregistrată de acidul vanilic și acidul cinamic. Totodată, în concentrații mari s-au găsit și acidul ferulic și acidul rozmarinic. Quercetina a relevat o concentrație destul de mică în extractul din flori de lavandă împreună cu apigenina.
  9. Extractele obținute prin extracție combinată solvenți asistată de ultrasunete (**E1**) și cele două extracte obținute prin extracția asistată de fluide supercritice (**E40 și E45**) au fost analizate comparativ în ceea ce privește conținutul de compuși volatili. Astfel, analiza GC-MS a celor trei tipuri de extracte a permis identificarea a 44 și respectiv 26 de compuși volatili în extractele CO<sub>2</sub> și extractele obținute prin ultrasunete. În extractul CO<sub>2</sub>, au fost identificați 7 compuși principali (β-linalool, eucaliptol, linalool acetat, β-trans-ocimen, și limonen), în timp ce în extractul **E1** au fost identificați tot 7 compuși principali, constând în linalool acetat, β-linalool, 6-methyl-2-(2-oxiranyl)-5-hepten-2-ol, linalool oxid, lavandulil acetat și camfor.

10. În ambele extracte, compușii majoritari au reprezentat mai mult de 71% din compoziția extractelor, Între fracțiunile **E40** și **E45** nu au fost identificate diferențe semnificative în ceea ce privește profilul compușilor volatili, însă diferențe semnificative apar între cele două tipuri de extracte. Extractul obținut prin extracția cu fluide supercritice este mai bogat în compuși volatili. De exemplu, fracțiunile **E40** și **E45** conțin  $\alpha$ -pinen, 3-heptanonă, 6-methyl-, camfen, sabinen,  $\beta$ -pinen, 1-Octen-3-ol etc, în timp ce extractul obținut prin ultrasonare (**E1**) conține o cantitate dublă de  $\beta$ -mircen, 6-Methyl-2-(2-oxiranyl)-5-hepten-2-ol, linalool oxid (fr,1) și octen-1-ol, acetat și o cantitate semnificativ mai mică de camfor.
11. Diferențe semnificative au fost identificate și în conținutul de limonen, eucaliptol,  $\beta$ -trans-ocimen,  $\beta$ -Linalool, cu o proporție mai mare în fracțiunea **E45** și mai mică în **E1**. În ceea ce privește conținutul de acetat de linalool, extractul obținut prin ultrasonare a prezentat cel mai mare conținut ( $25,86 \pm 1,24\%$ ), urmat de fracțiunea **E40** ( $18,08 \pm 0,87\%$ ) și **E45** ( $15,28 \pm 1,25\%$ ).
12. Fracțiunea **E40** a prezentat cea mai mare proporție de acid  $\alpha$ -linolenic ( $31,67 \pm 1,58\%$ ) și acid palmitic ( $49,80 \pm 2,31\%$ ), în timp ce extractul **E2** a prezentat o proporție mai mare de acid linoleic ( $19,66 \pm 0,85\%$ ), oleic ( $27,21 \pm 1,10\%$ ) și stearic ( $13,73 \pm 0,62\%$ ),
13. Toate cele trei extracte au prezentat o concentrație ridicată de acizi polinesaturați, cu valoarea cea mai ridicată în fracțiunea **E45** de  $42,43\%$  și o valoarea mai mică de acizi grași mononesaturați, cu cea mai mare valoare înregistrată în extractul **E2** ( $27,88 \pm 1,20\%$ ) și cea mai mică în fracțiunea **E40** ( $5,93 \pm 1,20\%$ ). Acizii *n*-3 au avut cea mai mare contribuție în fracțiunea **E40** ( $31,67 \pm 1,59\%$ ), comparativ cu acizii *n*-6 ( $7,66 \pm 1,58\%$ ) și mai mica în **E2**, de  $11,82 \pm 0,55\%$  și respectiv  $19,66 \pm 0,90\%$ ,
14. Comparativ cu extracția cu solvenți, se poate observa o redistribuire semnificativă a profilului acizilor grași, cu o creștere a gradului de extracție a acidului palmitic și a acidului  $\alpha$ -linolenic de 2,66 ori, concomitent cu o scădere a conținutului de acid oleic de 5 ori și a acidului linoleic cu 2,56. Comparativ cu fracțiunea **E45**, profilul acizilor grași în fracțiunea **E40** relevă scăderea de cca. 2 ori a concentrației de acid palmitic, de cca. 1,3 ori a concentrației de acid  $\alpha$ -linolenic, dar și o creștere a concentrației de acid linoleic, arahidic și behenic.
15. Degradarea termică a compușilor biologic activi din extractul din flori de lavandă, obținut prin tehnică combinată, solvent-ultrasonare (amestec *n*-hexan: acetonă raport 3:1, timp de extracție 30 de minute, temperatură  $40^\circ\text{C}$ ) a urmat un model cinetic de conversie fracțională, descris de ecuația 6, care a permis estimarea parametrilor cinetici de degradare termică, și anume constantele vitezei de degradare termică și energia de activare pentru clorofile, carotenoide și polifenoli. Degradarea activității antioxidante a fost descrise de modelului cinetic de ordin I.
16. Pe baza valorilor constantelor vitezei de degradare, s-a putut aprecia că principalele clorofile se degradează similar în intervalul de temperatură  $75-80^\circ\text{C}$ , în timp ce în intervalul de temperatură  $85-90^\circ\text{C}$ , clorofila *b* se degradează cu o viteză mai mare și mai mică la temperaturi mai ridicate.
17. Energiile de activare pentru degradarea termică a clorofilelor *a* și *b* în extractul de lavandă au avut valori de  $139,69 \pm 15,22$  kJ/mol și respectiv  $123,49 \pm 18,24$  kJ/mol, ceea ce denotă o mai susceptibilitate mai mare a clorofilei *a* la degradarea termică comparativ cu clorofila *b*, în condițiile studiate.
18. Tratamentele termice au avut un efect semnificativ asupra conținutului de carotenoide totale, determinând o reducere de cca. 79% după 40 de minute de menținere la  $75^\circ\text{C}$  și respectiv 20 de minute la  $80^\circ\text{C}$ . La temperaturi mai ridicate, pierderile în carotenoide totale au fost semnificative, variind între 74% la  $85^\circ\text{C}$  până la cca. 83% la  $100^\circ\text{C}$  după 5 minute de menținere.

19. Comparativ, carotenoidele totale se degradează cu o viteză mai mare în intervalul de temperatură 75-90°C, urmată de o degradare similară la temperaturi de 95°C, în timp ce la 100°C, clorofila *a* se degradează cel mai rapid.
20. S-a observat că valorile estimate de modelul de conversie fracțională pentru concentrația de carotenoide totale la o durată infinită a tratamentului termic ( $C_{\infty}$ ) variază cu temperatura, ceea ce denotă că în aceste condiții concentrația finală de carotenoide este dependentă de temperatură.
21. Energia de activare pentru degradarea termică a conținutului total de carotenoide în extractul de lavandă au avut valori de  $114,18 \pm 11,44$  kJ/mol, fiind mai mică comparativ cu clorofilele, ceea ce denotă o dependență mai mică a constantelor vitezelor de degradare față de temperatură, deci o stabilitate mai ridicată.
22. Tratamentul termic cu o durată de menținere de 5 min a condus la păstrarea concentrației de polifenoli în proporție de ~87% la 80°C, ~82% la 85°C, ~79% la 90°C și ~75% la 95°C.
23. Tratamentul la 100°C timp de 5 min a condus la creșterea conținutului de polifenoli totali cu cca, 9%, indicând creșterea gradului de extractibilitate a compușilor polifenolici,
24. În cazul conținutului total de polifenoli, s-a observat o degradare lentă în intervalul de temperatură 75-80°C, urmată de o degradare accelerată la temperaturi de 85-95°C.
25. Dintre compușii studiații, polifenolii au prezentat cea mai mică dependență de temperatură, energia de activare pentru degradarea termică a polifenolilor în extractul de lavandă având valori de  $94,65 \pm 8,19$  kJ/mol.
26. În urma tratamentului termic, s-a remarcat o constanță a concentrației de flavonoide totale, fenomen explicat prin formarea compușilor monomerici rezultați din hidroliza legăturilor dintre C-glicozide, deoarece în majoritatea plantelor flavonoidele există sub formă de C-glicozid dimer sau oligomer.
27. Rezultatele obținute au permis selectarea condițiilor optime de extracție în vederea obținerii și utilizării unor extracte valoroase din punct de vedere compozițional în experimentele ulterioare.
28. Au fost obținute variante de extracte cu activitate antioxidantă ridicată, care pot fi utilizate în combaterea radicalilor liberi endogeni (enzime oxidative, lanț respirator) sau exogeni (fumat, toxine, poluarea aerului), radicali care pot deteriora acizii nucleici, contribuind astfel dezvoltarea aterosclerozei, cataractei, cancerului, ischemiei, (vasoconstricție, tromboză), gută, îmbătrânire, demență, diabet, fibroza pulmonară și bolile Alzheimer și Parkinson.
29. De asemenea, studiul are caracter inovativ și aplicativ deoarece nu au fost identificate studii în literatura de specialitate care să se axeze pe profilul clorofilic, carotenoidic, polifenolic și al acizilor grași, rezultatele obținute contribuind la creionarea unui tablou complet al profilului fitochimic al florilor de lavandă.

## CAPITOLUL 5.

### DEZVOLTAREA UNOR INGREDIENTE CU FUNCȚIONALITATE RIDICATĂ PENTRU POTENȚIALE UTILIZĂRI ÎN PRODUSE ALIMENTARE

#### 5.1. Introducere

Microîncapsularea permite crearea unei bariere fizice între nucleu și materialele de încapsulat, protejând astfel compusul biologic activ de condițiile de mediu precum, lumină, temperatură, umiditate, oxigen, dar și față de interacțiunile cu alte substanțe. Factorii cheie pentru o microîncapsulare eficientă sunt reprezentați de tipul de material încapsulant, precum și caracteristicile compușilor de încapsulat, tehnicile de microîncapsulare și parametrii de proces.

#### 5.2. Obiectivele studiului

**Scopul** acestui studiu a fost selectarea unor matrici complexe de microîncapsulare a compușilor biologic activi extrași din lavandă, din perspectiva dezvoltării de compozite funcționale pentru industria alimentară, precum și caracterizarea pudrelor rezultate. Tehnica selectată pentru încapsularea compușilor bioactivi din lavandă a fost coacervarea și liofilizarea.

#### 5.3. Materiale și metode

Materialele utilizate în experimente au fost descrise la subcap. 4.3.1.

#### 5.4. Reactivi utilizați

- ✓ Metanol de puritate HPLC
- ✓ Soluție de  $\text{NaNO}_2$  5 % (m/v)
- ✓ Soluție de  $\text{AlCl}_3$  10 % (m/v)
- ✓ Soluție de NaOH 1M
- ✓ Reactiv Folin-Ciocalteu
- ✓ Soluție  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20 % (m/v)
- ✓ Soluție HCl 1N
- ✓ Soluție de acid formic 3 – 5 %
- ✓ Soluție de etanol 70 %
- ✓ Reactiv DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)
- ✓ Soluție TROLOX
- ✓ Soluție acid galic
- ✓ Soluție catechină

#### 5.5. Aparatura utilizată

- ✓ Incintă de termostatare cu apă Julabo 5, Germania
- ✓ Balanță analitică de înaltă precizie, XS 403 SM, METTLER TOLEDO, Elveția
- ✓ Ultracentrifugă cu răcire, HETTICH Universal 320 R, Germania
- ✓ pH – metru S 20 K, METTLER TOLEDO, Elveția
- ✓ Spectrofotometru UV- VIS Biochrom Libra S22, 2017
- ✓ Shaker orbital cu control analogic al frecvenței de agitare și termostatare, LAB COMPANION COMECTA S.A,
- ✓ Concentrator sub vid AVC 2-18, CHRIST
- ✓ Baie de ultrasonare
- ✓ Cuptor cu microunde
- ✓ Liofilizator MARTIN CHRIST ALPHA 1-4



## 5.6. Metode de extracție a compușilor biologic activi

### 5.6.1. Extracția compușilor hidrofobi

Pentru extracția compușilor hidrofobi, s-a aplicat tehnica de extracție combinată, utilizând amestec de hexan:acetonă în raport de 3:1 și ultrasonare timp de 15 minute pentru fiecare ciclu de extracție, în condiții controlate de temperatură (40°C). Astfel, 20 g de flori de lavandă uscate și măcinate au fost amestecate cu 200 mL amestec de hexan:acetonă în raport de 3:1 și supuse extracției prin ultrasonare. După extracție, amestecul a fost centrifugat la 8500xg, la o temperatură de 4°C, timp de 10 minute, apoi filtrat. Extracția a fost repetată de 5 ori, iar supernatantul colectat. După cele 5 cicluri de extracție, supernatantul a fost concentrat până la sec cu ajutorul concentratorului sub vid AVC 2-18, CHRIST. Extractul a fost codificat **E1**.

### 5.6.2. Extracția compușilor hidrofilii

Pentru extracția compușilor hidrofilii, s-a aplicat tehnica de extracție combinată, utilizând etanol 70% și ultrasonare timp de 15 minute pentru fiecare ciclu de extracție, în condiții controlate de temperatură (40°C). Astfel, 20 g de flori de lavandă uscate și măcinate au fost amestecate cu 200 mL amestec de soluție etanol 70% și supuse extracției prin ultrasonare. După extracție, amestecul a fost centrifugat la 8500xg, la o temperatură de 4°C, timp de 10 minute, apoi filtrat. Extracția a fost repetată de 5 ori, iar supernatantul colectat. După cele 5 cicluri de extracție, supernatantul a fost concentrat până la sec cu ajutorul concentratorului sub vid AVC 2-18, CHRIST. Extractul a fost codificat **E2**.

### 5.6.3. Extracția cu fluide supercritice

Protocolul de extracție cu fluide supercritice a fost descris la subcapitolul 4.4.4. extractele utilizate au fost obținute în condițiile prezentate în **Tabelul 5.1.:**

**Tabel 5.1.** Parametrii de extracție în sistem discontinuu (Nadalin și colab., 2014)

	Extractor C30	Separator 1 S1	Separator 2 S2	Debit CO <sub>2</sub> , kg/h	Randament gravimetric, %
I	300 bar/60°C/1 h	150 bar/60°C 1 h	50 bar/25°C 1 h	20,27	4,67

Extractele obținute au fost codificate **E40** și **E45**.

### 5.6.4. Metode de caracterizare a extractelor

**Determinarea conținutului de clorofile.** Extractele s-au diluat în *n*-hexan-acetonă, raport 3:1, după care s-a citit absorbanta la lungimile de undă 663 nm și 645 nm. Pentru calculul concentrației de clorofile s-au utilizat relațiile 1-3.

**Determinarea conținutului de carotenoide totale.** Extractele s-au diluat în *n*-hexan-acetonă, raport 3:1, după care s-a citit absorbanta la lungimea de undă 470 nm. Pentru calculul concentrației de carotenoide totale s-a utilizat relația 11:

$$\text{Carotenoide totale} = (1000 \times A_{470} - 2,13 \text{ Chl } a - 97,63 \text{ Chl } b) / 209 \quad (11)$$

**Conținutul de polifenoli totali** s-a determinat cu ajutorul metodei colorimetrice Folin-Ciocalteu (Gutfinger, 1981). Metoda de determinare a compușilor polifenolici totali a fost descrisă în subcapitolul 5.2.

**Conținutul total de flavonoide** a fost determinat utilizând metoda descrisă anterior de către Dewanto și colab., (2002). Metoda de determinare a compușilor flavonoidici totali a fost descrisă în subcapitolul 5.2.

**Determinarea activității antioxidante** utilizând metoda DPPH (2,2-difenil-1 picrilhidrazil). Metoda de determinare a activității antioxidante a fost descrisă în subcapitolul 5.3.

### 5.6.5. Metode de caracterizare a pudrelor microîncapsulate

#### Determinarea eficienței încapsulării

Pentru a evalua eficiența încapsulării compușilor biologic activi s-au determinat:

- conținutul total de clorofilă totală, clorofilă *a*, clorofilă *b*, carotenoide, polifenoli și flavonoide;
- conținutul de clorofilă totală, clorofilă *a*, clorofilă *b*, carotenoide, polifenoli și flavonoide de suprafață al microparticulelor (Idham și colab., 2010),

Eficiența încapsulării (% EE) se calculează cu ecuației 12:

$$\%EE = \frac{(Total-Suprafata)}{Total} \times 100 \quad (12)$$

### Activitatea antimicrobiană

Testarea activității antimicrobiene, față de microorganismele indicator (*Aspergillus niger* MIUG M5, *Penicillium expansum* MIUG M11, *Bacillus subtilis* MIUG B1 și *Salmonella agona* MIUG BP1) a fost realizată utilizând metoda descrisă de Cortes-Zavaleta și colab., (2014).

Raportul de inhibiție a creșterii a fost calculat utilizând următoarea formulă (13):

$$RI = \frac{D_M - D_P}{D_M} \times 100, \% \quad (13)$$

### Structura și morfologia pudrelor microîncapsulate

Scopul analizelor CLSM a fost de a evidenția dimensiunea și morfologia compușilor biologic activi din extractul de lavandă încapsulați în diferite matrici. În această etapă s-a utilizat un sistem microscopic cu scanare laser confocal Zeiss LSM 710, iar imaginile 3D au fost captate și analizate cu ajutorul software-ului ZEN 2012 SP1. Specificațiile tehnice ale echipamentului sunt: diode laser (405 nm), laser Ar (458, 488, 514 nm), laser DPSS (pompa de diode pentru solide (561 nm) și laser HeNe (633 nm), microscop cu inversie AxioObserver Z1, obiectiv apocromatic 40x (cu deschiderea de 1,4) și filtre FS49, FS38 și FS15.

### Microscopia de scanare electronică

Examinarea morfologică a pudrelor fine (V3 și V4) s-a realizat utilizând microscopia cu scanare de electroni (FEI Quanta 200) utilizând un voltaj de 15 kV în vacuum scăzut. Pudrele au fost fixate pe un tub de aluminiu utilizând bandă dublu adezivă din carbon. Pentru creșterea conductivității, probele au fost acoperite cu un strat subțire de aur de 5 nm, cu ajutorul unui modul SPI-Module Sputter Coater (SPI Supplies, USA), utilizând un curent de 18 mA. Imaginile SEM au fost colectate la diferite magnitudini între 500 și 100,000X.

### Dimensiunea particulelor

Distribuțiile mărimii particulelor au fost determinate suplimentar prin măsurarea intensității luminii împrăștiată de fasciculul laser, la trecerea prin proba complet hidratată. Măsurătorile mărimii particulelor au fost efectuate cu ajutorul analizorului PA-200G Wet Laser Particle Analyzer (MRC, Holon, Israel).

### Evaluarea citotoxicității compușilor microîncapsulați

Citotoxicitatea pudrelor microîncapsulate a fost evaluată prin teste *in vitro* pe o cultură de fibroblaste provenită din linia stabilizată NCTC clona L929 prin metoda Roșu Neutru.

### 5.7. Analiza statistică

Pentru evaluarea citotoxicității, rezultatele reprezintă valori medii pentru 3 determinări ± deviația standard (SD). Analiza statistică a rezultatelor s-a realizat cu ajutorul testului Student t-test pe perechi de probe. Diferențele au fost considerate statistic semnificative la  $p < 0,05$ .



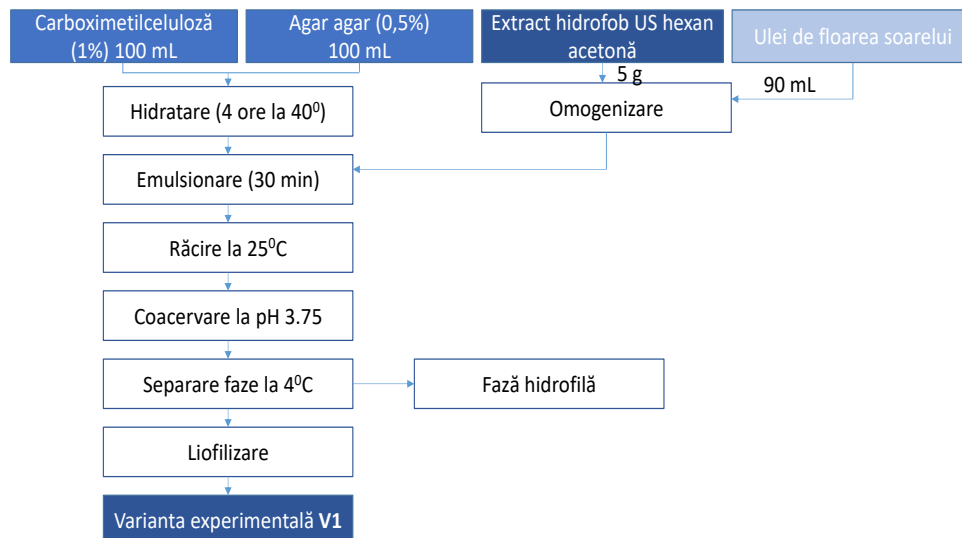
## 5.8. REZULTATE ȘI DISCUȚII

### 5.8.1. Variante experimentale de microîncapsulare a compușilor biologic activi din flori de lavandă

Au fost selectate 4 variante de încapsulare, două pentru extractul hidrofob, una pentru extractul hidrofil și una pentru extractul CO<sub>2</sub> supercritic.

#### Varianta de încapsulare 1

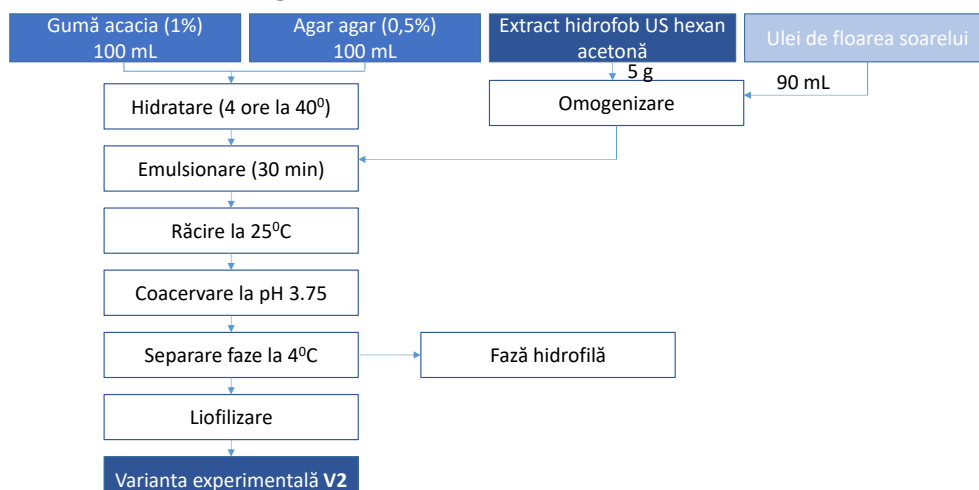
A presupus utilizarea unei combinații de agar și carboximetilceluloză în raport de 2:1. Schema tehnologică de obținere a **variantei de microîncapsulare 1**, prin coacervare complexă și liofilizare este prezentată în **Figura 5.1**.



**Figura 5.1.** Schema tehnologică de obținere a **variantei de microîncapsulare 1**, prin coacervare complexă și liofilizare

#### Varianta de încapsulare 2

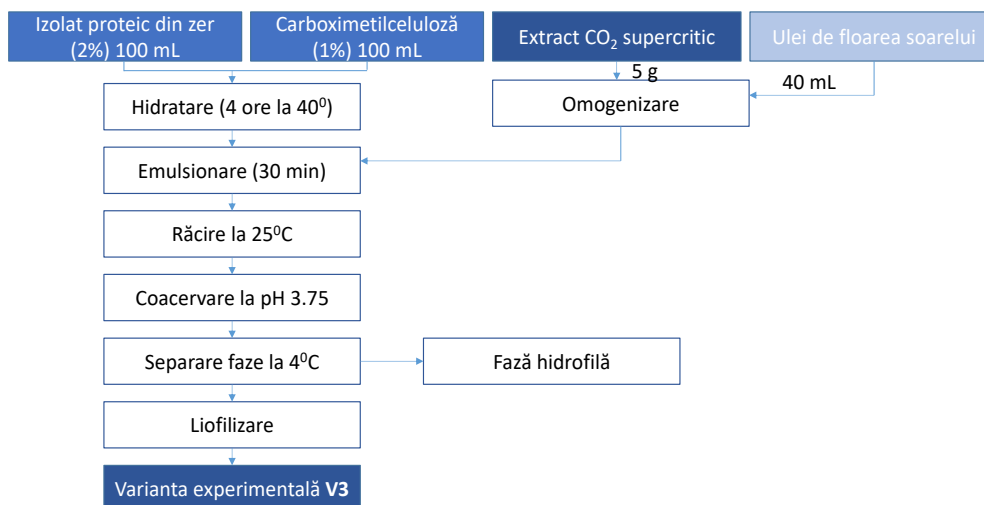
A presupus utilizarea unei combinații de agar și gumă acacia în raport de 2:1. Schema tehnologică de obținere a **variantei de microîncapsulare 2**, prin coacervare complexă și liofilizare este prezentată în **Figura 5.2**.



**Figura 5.2.** Schema tehnologică de obținere a **variantei de microîncapsulare 2**, prin coacervare complexă și liofilizare

### Varianta de încapsulare 3

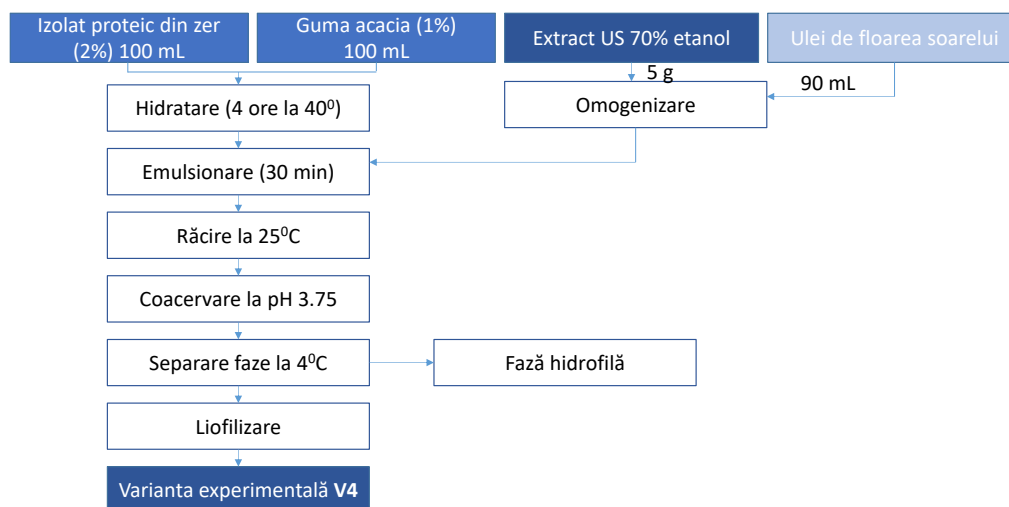
A presupus utilizarea unei combinații de izolat proteic din zer și carboximetilceluloză în raport de 2:1. Schema tehnologică de obținere a **variantei de microîncapsulare 3**, prin coacervare complexă și liofilizare este prezentată în **Figura 5.3**.



**Figura 5.3.** Schema tehnologică de obținere a **variantei de microîncapsulare 3**, prin coacervare complexă și liofilizare

### Varianta de încapsulare 4

A presupus utilizarea unei combinații de izolat proteic din zer și gumă acacia în raport de 2:1. Schema tehnologică de obținere a **variantei de microîncapsulare 4**, prin coacervare complexă și liofilizare este prezentată în **Figura 5.4**.



**Figura 5.4.** Schema tehnologică de obținere a **variantei de microîncapsulare 4**, prin coacervare complexă și liofilizare

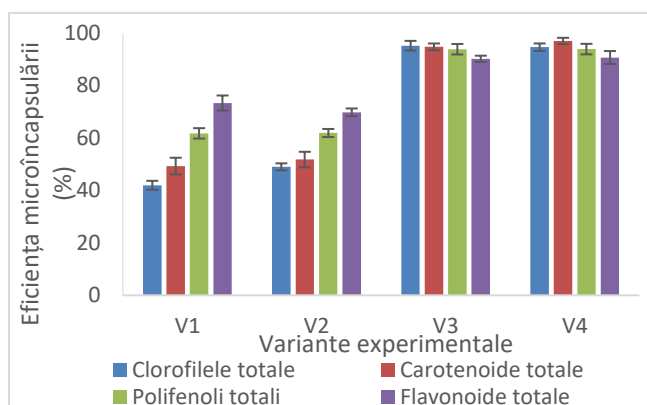
### 5.8.2. Analiza comparativă a profilului fitochimic global a variantelor experimentale microîncapsulate

În studiul nostru, au fost testate patru variante de încapsulare. Eficiența microîncapsulării a fost evaluată pentru fiecare compus testat, valorile obținute fiind prezentate în **Tabelul 5.2**.

**Tabel 5.2.** Eficiența încapsulării variantelor microîncapsulate

Compuși fitochimici	V1	V2	V3	V4
Clorofile totale	41,97±1,70	49,02±1,33	95,22±1,85	94,65±1,44
Clorofila a	38,87±1,43	44,79±0,57	96,62±2,87	98,01±1,56
Clorofila b	43,90±3,56	51,79±2,55	90,61±1,20	90,61±1,36
Carotenoide totale	49,32±3,16	50,14±2,97	94,79±1,29	97,04±1,20
Polifenoli totali	61,79±1,98	61,92±1,54	93,88±2,01	93,93±2,01
Flavonoide totale	73,36±2,87	69,82±1,47	90,22±1,20	90,72±2,47

Din **tabelul 5.2.** se poate observa că utilizarea proteinelor în procesul de microîncapsulare a condus la o creștere a eficienței încapsulării (EÎ) pentru fiecare compus fitochimic. De exemplu, pentru clorofila a, EÎ a fost de 38,87±1,43% în varianta 1, și 98,01±1,56% în varianta 4. Variantele 3 și 4 au prezentat cele mai mari valori ale EÎ pentru toți compușii analizați, ceea ce sugerează că proteinele din zer sunt materiale încapsulante foarte eficiente (**Figura 5.5.**).



**Figura 5.5.** Eficiența de microîncapsulare a compușilor bioactivi în cele 4 variante experimentale

În **tabelul 5.3.** este prezentat profilul fitochimic al variantelor de pudre microîncapsulate obținute.

**Tabel 5.3.** Profilul fitochimic al variantelor experimentale de pudre microîncapsulate

Compuși fitochimici	V1	V2	V3	V4
Clorofile totale, mg/g SU	1,54±0,11	0,88±0,03	0,43±0,05	0,27±0,04
Clorofila a, mg/g SU	0,61±0,01	0,68±0,02	0,17±0,07	0,10±0,06
Clorofila b, mg/g SU	0,93±0,10	1,05±0,10	0,27±0,02	0,16±0,03
Carotenoide totale, mg/g SU	338,70±4,60	339,30±2,39	95,00±1,29	58,82±1,20
Polifenoli totali, mg AG/g SU	5,17±0,42	5,47±1,54	9,71±2,01	10,78±0,10
Flavonoide totale, mg EC/g SU	4,25±0,87	3,98±0,47	6,61±1,20	6,92±0,92
Activitatea antioxidantă, mMol/g SU	2,85±0,12	3,44±0,32	4,77±0,26	4,80±0,15

Se poate observa un profil fitochimic diferit pentru variantele de pudre, cu un conținut mai mare de clorofile și carotenoide în variantele 1 și 2 (conținut de carotenoide totale de 338,70±24,60 mg/g SU în V1 și 339,30±2,39 mg/g SU în V2). Compușii polifenolici și flavonoidele s-au regăsit în concentrație mai mare în variantele 3 și 4, ceea ce a condus la o activitate antioxidantă mai mare.

### 5.8.3. Activitatea antimicrobiană a pudrelor

În **Tabelul 5.4.** este prezentată activitatea antimicrobiană a variantelor microîncapsulate. Cea mai mare activitate antimicrobiană și anume de 100% a fost identificată în cazul variantelor 1 și 2 împotriva *Penicillium expansum* MIUG M11 și *Bacillus subtilis* MIUG B1 (**Figurile 5.6-5.9.**). Din **Tabelul 5.4.** se poate observa că cea mai rezistentă tulpină fungică s-a dovedit a fi *Aspergillus niger* MIUG M5 pentru toate cele patru variante, prezentând activitate antifungică fără sau mai mică (0 până la 6,52%).

**Tabel 5.4.** Activitatea antifungică a variantelor experimentale de pudre microîncapsulate

Microorganism indicator	Raport de inhibiție, %			
	V1	V2	V3	V4
<i>Aspergillus niger</i> MIUG M5	0±0,0	4,68±0,3	6,52±0,4	4,34±0,4
<i>Penicillium expansum</i> MIUG M11	100±0,0	100±0,0	29,03±0,5	58,83±0,5
<i>Bacillus subtilis</i> MIUG B1	22±0,5	100±0,0	50,0±0,5	18,51±0,8

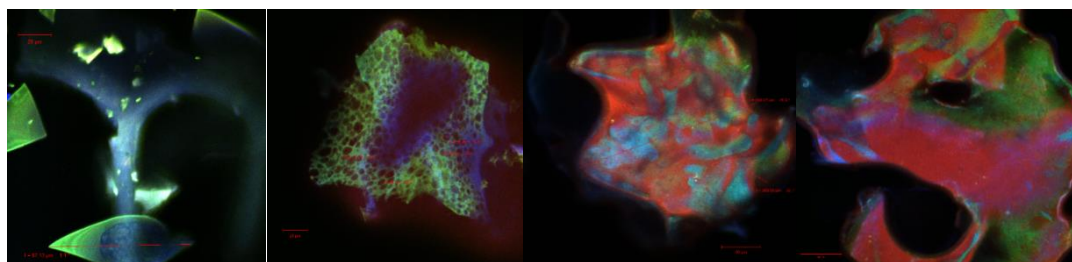
Activitatea antimicrobiană mai mare în cazul variantelor 1 și 2 poate fi asociată cu conținutul mai ridicat de carotenoide și, probabil, cu cel al acizilor grași liberi.

Cu toate acestea, rezultatele noastre au arătat un efect antibacterian notabil în principal datorită prezenței carotenoidelor și clorofililor.

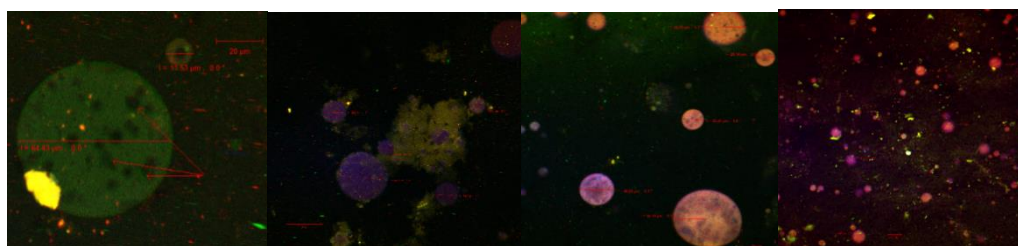
#### 5.8.4. Analiza morfologică și structurală a variantelor microîncapsulate prin microscopia confocală cu laser

În probele native obținute prin microîncapsulare (**Figura 5.10.**), s-au observat solzi subțiri cu forme iregulate și asimetrice, emisia acestora fiind pe toată gama spectrală datorită compoziției lor complexe. Cu toate acestea, variantele 1 și 2 par să aibă o distribuție mai uniformă a compușilor biologic activi în interiorul matricelor biopolimerice microîncapsulate.

S-au observat formațiuni mari (244,57 – 306,93 μm precum cele din **Figura 5.10. c**) cu formă neregulată și structură poroasă (precum microcavități sau fisuri cu diametrul de 6-8 μm din **Figura 5.10. b**).



**Figura 5.10.** Imagini ale pudrelor native microîncapsulate obținute cu ajutorul microscopiei confocale: V1 (a), V2 (b), V4 (c), V3 (d)

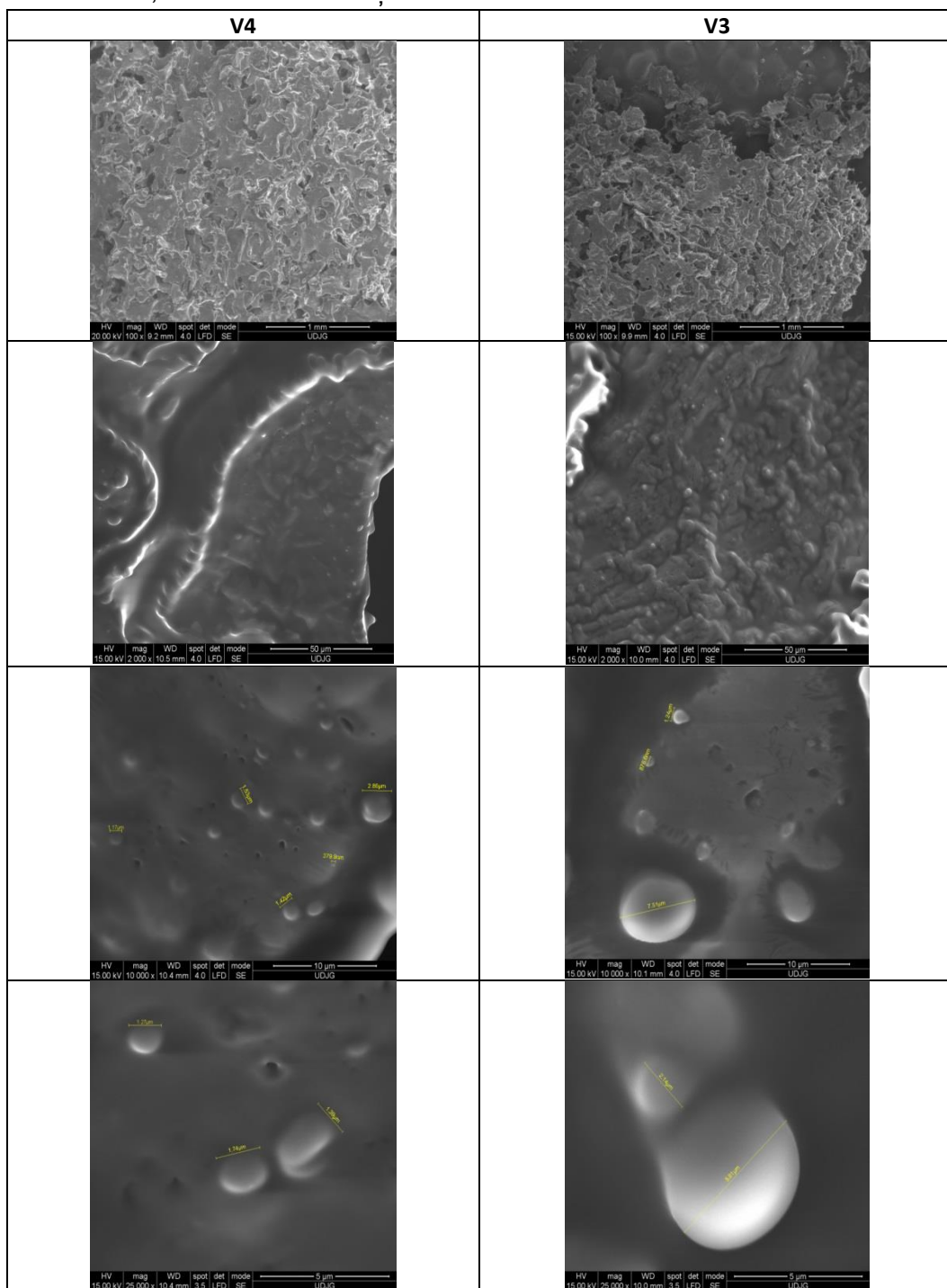


**Figura 5.11.** Imagini obținute cu ajutorul microscopiei confocale, ale pudrelor microîncapsulate cărora li s-au aplicat coloranți: V1(a), V2 (b), V4 (c), V3 (d)

În probele de pudre microîncapsulate la care s-au aplicat coloranții s-au putut observa prezența compușilor lipofili. Aceștia au formă sferică cu diametre cuprinse între 10-30 micrometri (**Figura 5.11.**), În proba V3, sferulele au valorile cele mai mici, majoritatea având diametrul mai mic de 10 μm (**Figura 5.11. d**). În celelalte probe, 20% din sferulele au diametrele mai mari de 60 μm (**Figura 5.11. a, b, c**). Mai mult decât atât, printre sferulele gigant se pot observa microvezicule (săgețile din **Figura 5.11. a**), prezența acestora putând sugera o posibilă dublă încapsulare.

### 5.8.5. Analiza morfologică și structurală a variantelor microîncapsulate prin microscopia de scanare cu electroni (SEM)

Microscopia de scanare electronică s-a realizat pentru variantele V3 și V4 la diferite grade de magnitudine. În **Figura 5.12.** sunt prezentate imagini SEM ale celor două variante la magnitudine diferite, variind între x100 și x25000.



**Figura 5.12.** Imagini SEM ale variantelor microîncapsulate V3 (a) și V4 (b) la magnitudine X100

În **Figura 5.12.** se poate observa că ambele variante au structuri spongioase, cu forme sferice sau ovale, cu dimensiuni cuprinse între 582 nm și 7,51 μm în V3 și mai mici în varianta 4, cuprinse între 380 nm și 2,86 μm.

### 5.8.6. Dimensionarea particulelor

Analizând rezultatele prezentate în **Tabelul 5.5.**, se poate observa că pentru toate pulberile microîncapsulate, dimensiunea particulelor mai grosiere este mai mare în comparație cu particulele fine. Valorile D[3,2] scad în următoarea ordine: varianta 4>varianta 2>varianta 3>varianta 1.

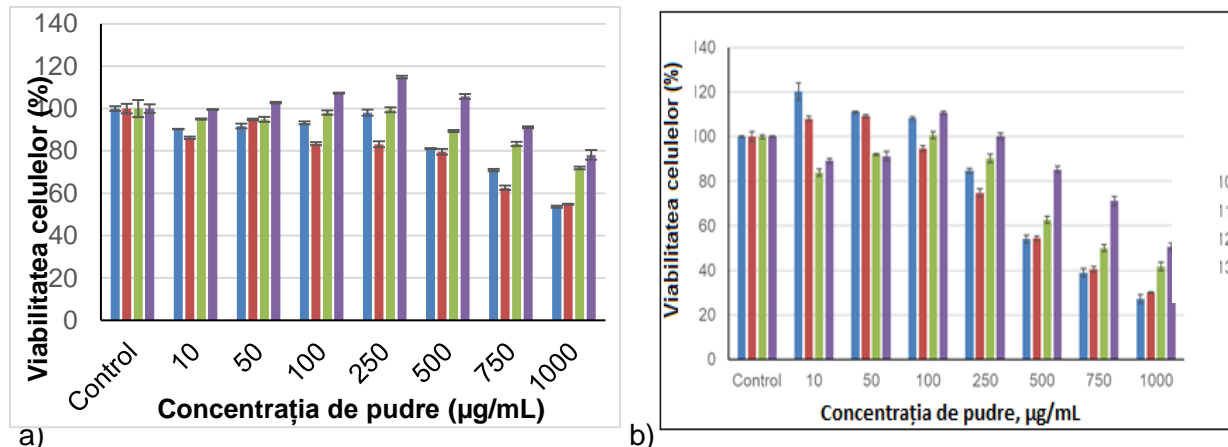
**Tabel 5.5.** Caracterizarea dimensiunii particulelor în variantele experimentale

	Varianta 1	Varianta 2	Varianta 3	Varianta 4
D [3,2], μm	4,494	4,701	4,620	4,738
D [4,3], μm	4,684	5,048	4,909	5,108
D10, μm	3,613	3,648	3,635	3,654
D50, μm	4,497	4,608	4,563	4,629
D90, μm	5,698	7,612	6,665	7,860

Aceeași tendință a fost observată pentru mărimea particulelor grosiere prezente în pulberile microîncapsulate, valorile D[4,3] variind de la 4,684 μm înregistrate pentru varianta 1 și 5,108 μm pentru varianta 4. Cea mai mare variație a mărimii particulelor a fost înregistrată în cazul variantei 4, când 80% din volumul eșantionului a avut diametre de particule cuprinse între 3,654 și 7,860 μm. Pe de altă parte, cea mai uniformă pulbere microîncapsulată din punct de vedere al mărimii particulelor a fost varianta 1, cu cea mai îngustă variație a dimensiunilor D10-D90 de la 3,613 la 5,698 μm.

### 5.8.7. Analiza citotoxicologică a variantelor microîncapsulate

Viabilitatea celulelor fibroblaste L929 cultivate în prezența diferitelor concentrații din variantele experimentale a fost determinată, inițial, prin testul cu Roșu Neutru. Rezultatele obținute după 24 de ore și 48 de ore de cultivare sunt prezentate în **Figura 5.13.**



**Figura 5.13.** Viabilitatea celulară pe fibroblaste L929 cultivate în prezența pulberilor microîncapsulate a extractelor de lavandă

(Varianta 1 albastru, varianta 2 rosu, varianta 3 verde și varianta 4 mov) după 24 ore (A) și 48 ore (B), prin metoda Roșu Netru, Rezultatele au fost exprimate ca procent relativ față de proba control netratată, considerată 100% viabilă, Valorile indicate reprezintă valori medii ± SD (n = 3), \*p<0,05 comparativ cu proba control

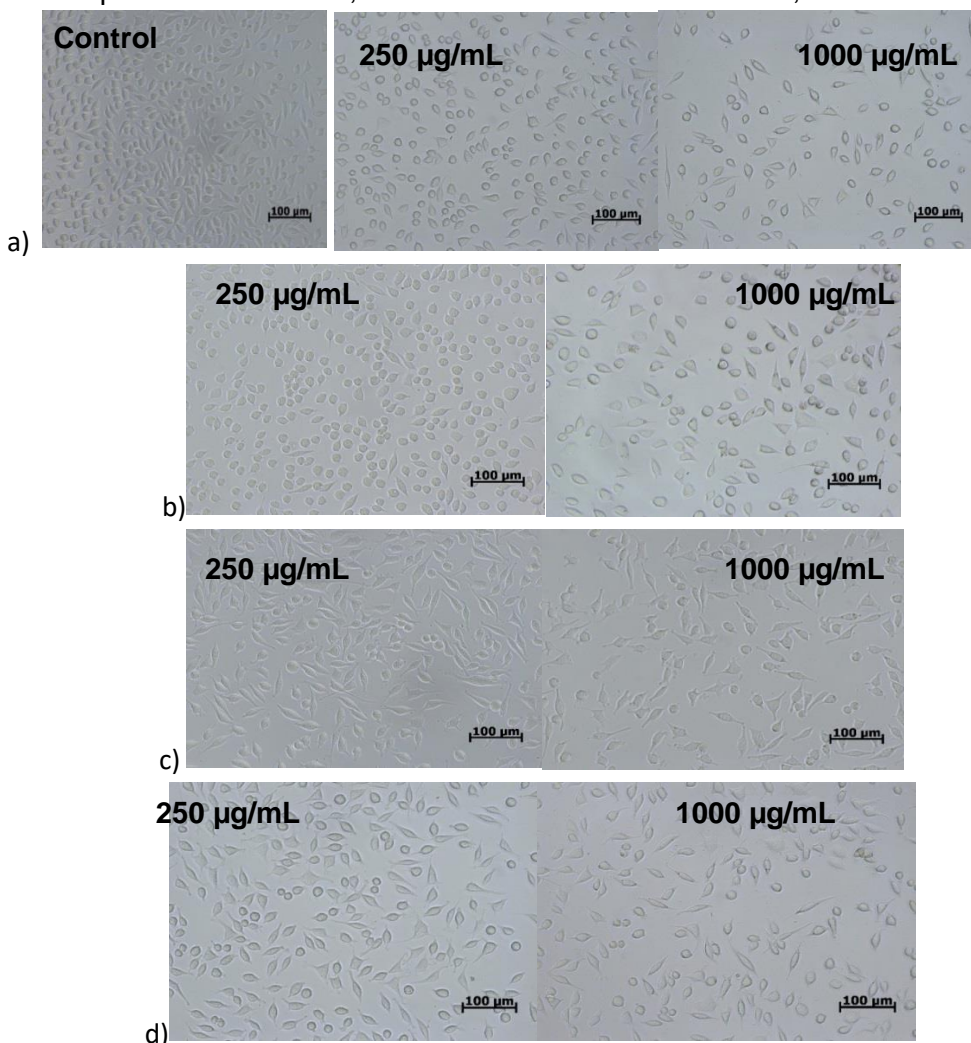
Se poate observa că variantele 1 și 2 au avut un comportament asemănător, după 24 de ore de cultivare, variantele 1 și 2 au fost citocompatibile în intervalul de concentrație 10-500 μg/mL, iar valorile pentru viabilitatea celulară au variat între 80-98%. Valorile pentru viabilitatea celulară au fost semnificativ mai mari decât cele pentru control (p<0,05), variind între 108-120%. Acest comportament poate fi corelat cu eliberarea compușilor biologic active din matricile de încapsulare.



Varianta microîncapsulată 3 a fost citocompatibilă în intervalul de concentrație 10-750  $\mu\text{g/mL}$  după 24 ore de cultivare (83-99% viabilitate celulară) și 10-250  $\mu\text{g/mL}$  după 48 ore de cultivare (90-101% viabilitate celulară). La concentrații mai mari, viabilitatea celulară a scăzut până la 42% după 48 de ore de cultivare.

După 24 de ore de cultivare, varianta 4 a fost citocompatibilă în tot intervalul de concentrație testat de 10-1000  $\mu\text{g/mL}$ , dar după 48 de ore de cultivare, intervalul de citocompatibilitate se diminuează la 10-500  $\mu\text{g/mL}$ .

Morfologia celulelor a fost analizată după 48 de ore de cultivare (**Figura 5.14.**). Se poate observa că celulele tratate cu variantele încapsulate în concentrații de 250-1000  $\mu\text{g/mL}$  și-au menținut fenotipul fusiform normal, caracteristic celulelor fibroblaste, similar celulelor netratate.



**Figura 5.14.** Imagini de microscopie optică ale culturii de celule fibroblaste L929 cultivate în prezența variantelor 1-4 (a-d), în concentrații de 250  $\mu\text{g/mL}$  (stânga) și, respectiv, 1000  $\mu\text{g/mL}$  (dreapta), timp de 48 h, în condiții standard (37  $^{\circ}\text{C}$ , atmosfera cu 5%  $\text{CO}_2$ ), Colorație Giemsa.

### 5.9. Concluzii parțiale

Lavanda este o sursă bogată de compuși volatili valoroși, carotenoide, clorofile, polifenoli, flavonoide, compuși volatili cu activități biologice semnificative, cu aplicabilitate diferită. Scopul principal al studiului de față a fost acela de a testa posibilitatea de utilizare a unor materiale de încapsulare a compușilor biologic activi țintă din extractele de lavandă, din perspectiva dezvoltării unor compozite cu aplicabilitate diferită, care să îndeplinească cu succes condițiile necesare pentru utilizarea ca ingrediente cu funcționalitate ridicată.

Rezultatele obținute în prezentul studiu au permis formularea următoarelor concluzii parțiale:

1. Într-o primă etapă, etapele de extracție au fost repetate, cu excepția extracției cu fluide supercritice, cu o succesiune de 5 etape de extracție, urmată de colectarea supernantelor, centrifugare și concentrare sub vid;

2. Cele două extracții asistate de ultrasunete au variat ca solvent utilizat, în prima variantă utilizându-se amestec de n-hexan-acetonă, raport de 3:1, iar în cel de al doilea etanol 70%, pentru a controla profilul predominant (hidrofob sau hidrofil) al extractelor;

3. Pentru microîncapsulare au fost utilizate ca tehnici coacervarea complexă și liofilizarea, utilizând ca materiale de încapsulare polizaharide (carboximetilceluloza, agar agar și gumă de acacia) și izolat proteic din zer;

4. **În prima variantă de încapsulare**, care a utilizat extractul hidrofob obținut prin extracția cu solvenți și ultrasonare în combinații de agar și carboximetilceluloză în raport de 2:1, au fost obținute valori ridicate ale eficienței de încapsulare pentru conținutul total de flavonoide, de circa 74% și circa 62% pentru polifenoli;

5. Această variantă a prezentat o concentrație ridicată de carotenoide totale de  $338,70 \pm 24,60$  mg/g SU, cu o concentrație de polifenoli de  $5,17 \pm 0,42$  mg AG/g SU și respectiv flavonoide de  $4,25 \pm 0,87$  mg EC/g SU, ceea ce a condus la o activitate antioxidantă de  $2,85 \pm 0,12$  mMol/g SU, cu o activitate antifungică de inhibare de 100% împotriva *Penicillium expansum* MIUG M11;

6. **Cea de a doua variantă experimentală**, care a utilizat combinații de agar și gumă acacia în raport de 2:1 și extract hidrofob, fiind obținute valori mai mari pentru eficiența încapsulării clorofilelor și carotenoidelor comparativ cu varianta experimentală 1, dar mai mici pentru polifenoli și flavonoide;

7. Varianta experimentală 2 a avut un conținut mai mare de clorofile totale, fără diferențe semnificative în profilul celorlalți parametri biologic activi, dar a prezentat o activitate antioxidantă mai mare, de  $3,44 \pm 0,32$  mMol/g SU și activitate atât antifungică (*Penicillium expansum* MIUG M11) cât și antibacteriană (*Bacillus subtilis* MIUG B1);

8. **Variantele experimentale 3 și 4** au prezentat cele mai mari valori ale eficienței de microîncapsulare pentru toți compușii analizați, ceea ce sugerează că proteinele din zer sunt materiale încapsulante foarte eficiente;

9. Astfel, **varianta 3** a prezentat o eficiență a microîncapsulării clorofilei a de 98% și de aproape 91% a clorofilei b, în timp ce **varianta 4** a prezentat valori similare, de 97% și respectiv 91%;

10. Profilul fitochimic al celor două variante este diferit, cu un conținut de circa 2 ori mai mic de clorofile totale în varianta 4, care însă a prezentat un conținut relativ mai mare de polifenoli;

11. Variantele 3 și 4 au prezentat activitate antimicrobiană diferită, cu rapoarte de inhibiție mai mare de 50% pentru *Penicillium expansum* MIUG în varianta 4 și *Bacillus subtilis* MIUG B1 în varianta 3;

12. Valorile superioare ale activităților antimicrobiene înregistrate pentru variantele 1 și 2 pot fi un rezultat sinergic al conținutului de acizi grași și carotenoide, efectul antimicrobian semnificativ fiind atribuit prezenței dominante a carotenoidelor, pe lângă complexitatea compoziției în acizi grași și a caracteristicilor microorganismelor;

13. Analiza structurală a evidențiat o distribuție mai uniformă a compușilor biologic activi în interiorul matricelor biopolimerice microîncapsulate pentru variantele 1 și 2, microscopia confocală permițând evidențierea unor formațiuni mari ( $244,57 - 306,93 \mu\text{m}$ ) cu formă neregulată și structură poroasă (precum microcavități sau fisuri cu diametrul de 6-8  $\mu\text{m}$ );



14. În varianta 3 au fost evidențiate sfere cu diametrul mai mic de 10  $\mu\text{m}$ , în timp ce în celelalte probe, 20% din sfere au diametrele mai mari de 60  $\mu\text{m}$ , care conțin microvezicule, prezența acestora putând sugera o posibilă dublă încapsulare;

15. Pentru toate pulberile microencapsulate, dimensiunea particulelor mai grosiere a fost mai mare în comparație cu particulele fine;

16. Studiile de citocompatibilitate au arătat că variantele 1 și 2 au avut un comportament asemănător, după 24 de ore de cultivare, fiind citocompatibile în intervalul de concentrație 10-500  $\mu\text{g/mL}$ , iar valorile pentru viabilitatea celulară au variat între 80-98%;

17. După 48 de ore de cultivare, variantele 1 și 2 au stimulat proliferarea celulară în intervalul de concentrație 10-100  $\mu\text{g/mL}$  și respectiv 10-50  $\mu\text{g/mL}$ , cu o creștere a viabilității celulare între 108-120%, fenomen asociat cu eliberarea compușilor biologic activi din matricile de încapsulare;

18. Varianta microîncapsulată 3 a fost citocompatibilă în intervalul de concentrație 10-750  $\mu\text{g/mL}$  după 24 ore de cultivare (83-99% viabilitate celulară) și 10-250  $\mu\text{g/mL}$  după 48 ore de cultivare (90-101% viabilitate celulară);

19. Varianta 4 a fost citocompatibilă în tot intervalul de concentrație testat de 10-1000  $\mu\text{g/mL}$ , dar după 48 de ore de cultivare, intervalul de citocompatibilitate s-a diminuat la 10-500  $\mu\text{g/mL}$ , cu o stimulare a proliferării celulelor la concentrații cuprinse între 100-500  $\mu\text{g/mL}$ ;

20. Stimularea proliferării celulelor este o consecință a eliberării a compușilor biologic activi din microcapsule, care au exercitat un efect stimulator asupra metabolismului celular.

21. În concluzie, rezultatele obținute în prezentul studiu oferă noi perspective de dezvoltare a unor compozite complexe, cu funcționalitate demonstrată prin activitatea antioxidantă și antimicrobiană selectivă, citocompatibile, pentru noi formulări în produse alimentare.

## CAPITOLUL 6.

# CERCETARE APLICATIVĂ PRIN DEZVOLTAREA DE VARIANTE TEHNOLOGICE DE OBȚINERE A UNOR PRODUSE ALIMENTARE CU VALOARE ADĂUGATĂ

### 6.1. Introducere

Dezvoltarea conceptului de **alimente funcționale** sau **alimente pentru sănătate** în rândul producătorilor, care sunt produse alimentare care au un beneficiu pozitiv, demonstrat pentru sănătate, introduce conceptul de **ingrediente funcționale**, care pot fi percepute ca elemente componente ale produselor alimentare cu rol de a îmbunătăți bunăstarea pe termen scurt, însă multe efecte pentru sănătate se referă la atenuarea pe **termen lung** a anumitor boli.

### 6.2. Obiectivele studiului

**Scopul** acestui studiu a fost elaborarea unor tehnologii pentru brevetarea unor produse cu valoare adăugată, care exploatează potențialul funcțional al lavandei și al extractelor de lavandă microîncapsulate, respectiv o tehnologie pentru obținerea unui produs - înghețată cu adaos de pudre microîncapsulate de extracte de flori de lavandă în izolat proteic din zer, **Obiectivele principale** ale studiului au fost:

- Selectarea unor matrici alimentare în vederea dezvoltării unor alimente cu valoare adăugată, în special în ceea ce privește activitatea antioxidantă;
- Analiza comparativă a caracteristicilor de textură ale produselor și analiza caracteristicilor senzoriale.

### 6.3. Materiale și metode

#### 6.3.1. Caracterizarea activității antioxidante a produselor

Toate variantele de produse au fost analizate pentru activitate antioxidantă, ceea ce a presupus o etapă preliminară de extracție a acestora din matricea alimentară.

#### 6.3.2. Analiza reologică a mixurilor de înghețată

Măsurarea comportamentului reologic al probelor de înghețată realizate la nivel de laborator s-a realizat cel puțin în duplicat cu ajutorul reometrului cu tensiune controlată (AR 2000, TA Instruments, New Castle, DE, **Figura 6.1.**). Pentru analiza rezultatelor obținute s-a utilizat software-ul specific Rheology Advantage Data Analysis Program (TA, New Castle, DE). Temperatura a fost monitorizată și menținută constantă pe parcursul măsurătorilor prin intermediul unui sistem de control al temperaturii de tip Peltier, Toate măsurătorile reologice au fost făcute utilizând un gap de 2000  $\mu\text{m}$ .



**Figura 6.1.** Reometrul AR 2000 (TA Instruments, New Castle, DE)

Caracteristicile reologice ale probelor de înghețată au fost apreciate prin monitorizarea următorilor parametri reologici: modulul de depozitare ( $G'$ ), modulul de relaxare ( $G''$ ), unghiul de deformare ( $\delta$ ), tensiunea de forfecare și viscozitatea aparentă, În acest sens au fost efectuate două tipuri de teste: de forfecare (rotaționale) și oscilatorii.

### 6.3.3. Analiza senzorială

Un panel format din 14 degustători de vârste diferite au participat la analiza senzorială a variantelor experimentale de înghețată, folosind metoda scării de punctaj de la 1-7. Degustătorii au evaluat următoarele atribute: culoare, separare de faze, atribute de aroma și gust, cum ar fi gradul de dulce, amar, aroma, gradul de râncețire, atribute texturale evaluate în momentul introducerii lingurii în cutia de înghețată, cum ar fi: duritate, rugozitate, sfărânciozitate, gumozitate, aerare, atribute texturale evaluate în timpul consumului, cum ar fi: înghețat, duritate (mouthfeel), rugozitate, apoasă, cremozitate, onctuozitate și impresia generală (clasificarea probelor în ordinea preferinței, 1 proba cea mai puțin apreciată - 7 proba cea mai apreciată).

## 6.4. REZULTATE ȘI DISCUȚII

### 6.4.1. Variante tehnologice de obținere a unor produse alimentare cu valoare adăugată

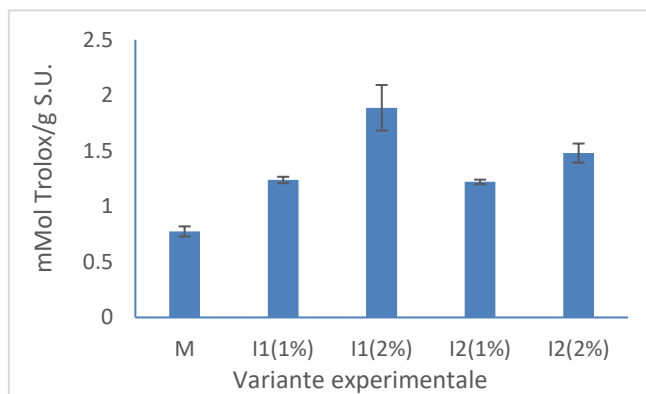
Înghețata s-a realizat după o rețetă clasică, în care variantele 1 și 2 au fost adăugate în lapte ca ingredient. S-au realizat 6 variante de produs (variind cantitatea de pudră de lavandă microîncapsulată de 1%, 1,5% și 2%).

S-a testat valoarea adăugată în termeni de activitate antioxidantă, proprietăți reologice și analiză senzorială.

Variantele microîncapsulate 3 și 4 au fost adăugate într-o rețetă clasică de pricomigdale, cu adaos din variantele experimentale în proporție de 1% față de masa totală de amestec obținută.

### 6.4.2. Evaluarea valorii adăugate ca activitate antioxidantă

Activitatea antioxidantă a variantelor experimentale de înghețată este prezentată în **Figura 6.2**.

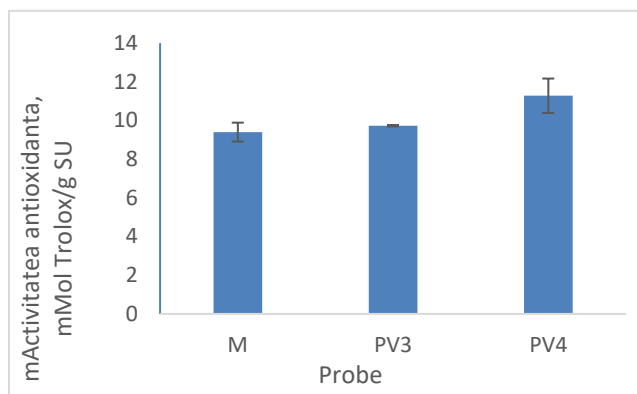


**Figura 6.2.** Activitatea antioxidantă a variantelor de înghețată cu adaos de pudră microîncapsulată

Se poate observa că activitatea antioxidantă a fost mai mare de aproximativ 1,6 ori mai mare în varianta experimentală de înghețată care a utilizat un procent de 1% din varianta microîncapsulată 1 și 2,5 ori mai mare în varianta cu 2%. În cazul variantelor experimentale care au utilizat varianta microîncapsulată 2, s-a obținut o creștere a activității antioxidante de 1,6 ori la un adaos de 1% și 1,9 ori la un adaos de 2%.

### 6.4.3. Testarea pudrelor microîncapsulate în alte matrici alimentare

Variantele experimentale de pricomigdale au prezentat valori net superioare ale activității antioxidante,  $9,40 \pm 0,49$  mMol Trolox/g SU în martor,  $9,73 \pm 0,04$  mMol Trolox/g SU pentru varianta care a utilizat pudră microîncapsulată V3 și  $11,28 \pm 1,08$  mMol Trolox/g SU pentru varianta care a utilizat V4 (**Figura 6.3**).



**Figura 6.3.** Activitatea antioxidantă a variantelor de pricomigdale cu adaos de pudra microîncapsulată

Spre deosebire de înghețată, în acest caz creșterea în valoarea antioxidantă a fost doar de 3,5% în cazul primei variante și de 20% în varianta 2.

#### 6.4.4. Analiza reologică a produselor alimentare cu valoare adăugată

Analizând rezultatele prezentate în **Tabelul 6.1.** se poate observa faptul că valorile  $G'$  au variat semnificativ în funcție de tipul probei supusă analizei. Se remarcă probele cu adaos de 1 și 2% din varianta 1, care au prezentat valori ale modulului  $G'$  de aproximativ 25 ori mai mari față de proba control la frecvența de 1 Hz.

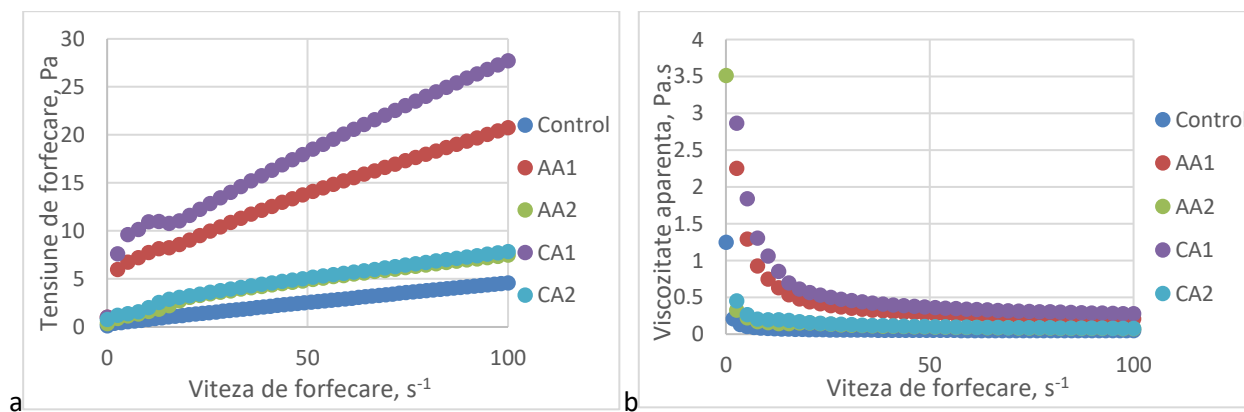
Punctul de intersecție a curbelor  $G'$  și  $G''$  pentru probele analizate a variat în funcție de tipul ingredientului utilizat pentru suplimentare (**Tabelul 6.1.**).

**Tabel 6.1.** Parametrii reologici înregistrați pentru probele de înghețată la temperatura de 4°C

Parametri reologici	Control	I.2.1	I.2.2	I.1.1.	I.1.2
<i>Scanarea frecvenței</i>					
$G'$ la frecvența de 1Hz, Pa	2,42	43,66	13,78	60,77	59,29
Relația dintre $G'$ și $G''$ la frecvență redusă	$G' > G''$	$G' > G''$	$G' < G''$	$G' > G''$	$G' > G''$
Frecvența de inversare a modurilor $G'$ și $G''$ , Hz	2,51	10	-	15,85	39,81
<i>Test de forfecare</i>					
Viscozitatea aparentă la 50 s <sup>-1</sup> , Pa.s,	0,051	0,282	0,098	0,368	0,103
T, %	0	20,92	1,02	19,84	2,91

I.1.1 – variantă experimentală de înghețată cu adaos de 1% din varianta încapsulată 1, I. 1.2. - variantă experimentală de înghețată cu adaos de 2% din varianta încapsulată 1, I. 2.1. - variantă experimentală de înghețată cu adaos de 1% din variant încapsulată 2, I.2.2. - variantă experimentală de înghețată cu adaos de 2% din variant încapsulată 2,

Tensiunea de forfecare a crescut, iar vâscozitatea aparentă a scăzut odată cu creșterea vitezei de forfecare în intervalul 0,1 – 100 s<sup>-1</sup> (**Figura 6.4.**).



**Figura 6.4.** Evoluția tensiunii de forfecare și a vâscozității aparente în funcție de viteza de forfecare (AA1 – I.2.1. AA2 – I.2.2. CA 1 – I.1.1. CA2 – I.1.2.)

Independent de valoarea vitezei de forfecare, s-a remarcat creșterea tensiunii de forfecare și implicit a vâscozității aparente odată cu adăugarea ingredientului functional pe bază de compuși biologici active din lavandă.

#### 6.4.5. Analiza senzorială a produselor alimentare cu valoare adăugată

În **Tabelul 6.2.** sunt prezentate scorurile medii obținute la analiza senzorială a înghețatei cu adaos de diferite variante experimentale de pudră microîncapsulată și pentru martor.

**Tabel 6.2.** Valorile medii obținute la analiza senzorială a probelor de înghețată cu adaos de pudre microîncapsulate

Atribut senzorial	Proba				
	M	I.1.1.	I.1.2.	I.2.1.	I.2.2.
Culoarea	5,28±0,72 <sup>a</sup>	4,14±0,86 <sup>a</sup>	5,35±1,15 <sup>a</sup>	1,85±1,65	5,28±1,20 <sup>a</sup>
Separarea de faze	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu
Dulce	5,57±0,75 <sup>a</sup>	5,71±1,06 <sup>a</sup>	5,28±1,26 <sup>a</sup>	5,35±1,39 <sup>a</sup>	5,35±1,15 <sup>a</sup>
Amar	1,14±0,36 <sup>a</sup>	1,28±1,61 <sup>a</sup>	1,35±1,08 <sup>a</sup>	1,28±0,72 <sup>a</sup>	1,50±1,16 <sup>a</sup>
Aroma	1,21±1,18 <sup>a</sup>	1,21±0,57 <sup>ab</sup>	4,35±2,20 <sup>c</sup>	3,50±1,74 <sup>d</sup>	5,42±1,45 <sup>d</sup>
Rancezire	1,14±0,36 <sup>a</sup>	1,14±0,53 <sup>a</sup>	1,14±0,36 <sup>a</sup>	1,14±0,36 <sup>a</sup>	1,07±0,26 <sup>a</sup>
Duritate	5,00±1,24 <sup>a</sup>	4,14±1,79 <sup>a</sup>	4,50±1,34 <sup>a</sup>	4,00±1,46 <sup>a</sup>	4,35±1,69 <sup>a</sup>
Rugozitate	4,14±1,70 <sup>a</sup>	2,85±1,91 <sup>ab</sup>	4,71±1,43 <sup>ab</sup>	2,78±1,47 <sup>b</sup>	3,67±1,78 <sup>b</sup>
Sfaramiciozitate	3,71±1,59 <sup>a</sup>	2,71±1,63 <sup>a</sup>	3,35±1,82 <sup>a</sup>	2,85±1,79 <sup>a</sup>	3,35±1,86 <sup>a</sup>
Gumozitate	1,85±1,16 <sup>a</sup>	2,42±1,74 <sup>a</sup>	2,78±1,88 <sup>a</sup>	2,28±1,68 <sup>a</sup>	5,57±1,82 <sup>a</sup>
Aerare	3,57±1,74 <sup>a</sup>	4,00±1,88 <sup>ab</sup>	3,28±1,43 <sup>ab</sup>	5,00±0,96 <sup>ab</sup>	4,21±1,42 <sup>a</sup>
Înghetat	5,07±1,59 <sup>a</sup>	5,79±1,05 <sup>a</sup>	5,14±1,51 <sup>a</sup>	4,78±1,84 <sup>a</sup>	4,71±1,81 <sup>a</sup>
Duritate (mouthfeel)	3,92±1,85 <sup>a</sup>	3,78±1,04 <sup>a</sup>	3,92±1,59 <sup>a</sup>	4,07±2,12 <sup>a</sup>	3,57±1,91 <sup>a</sup>
Rugozitate (mouthfeel)	4,14±1,83 <sup>a</sup>	4,28±1,63 <sup>a</sup>	3,07±1,97 <sup>a</sup>	3,57±1,55 <sup>a</sup>	3,78±1,92 <sup>a</sup>
Apoasă	3,21±1,57 <sup>a</sup>	3,28±1,77 <sup>a</sup>	2,78±1,52 <sup>a</sup>	3,07±1,59 <sup>a</sup>	3,14±1,40 <sup>a</sup>
Creozitate	3,35±1,78 <sup>a</sup>	4,85±0,94 <sup>a</sup>	4,28±1,54 <sup>a</sup>	4,78±1,36 <sup>a</sup>	4,28±1,54 <sup>a</sup>
Onctuozitate	4,42±1,34 <sup>a</sup>	3,92±1,63 <sup>a</sup>	4,64±1,27 <sup>a</sup>	4,57±1,15 <sup>a</sup>	4,42±1,47 <sup>a</sup>
Impresie generala	4,35±1,21 <sup>a</sup>	5,50±1,09 <sup>a</sup>	5,28±0,61 <sup>a</sup>	5,71±0,72 <sup>ab</sup>	5,50±1,02 <sup>b</sup>

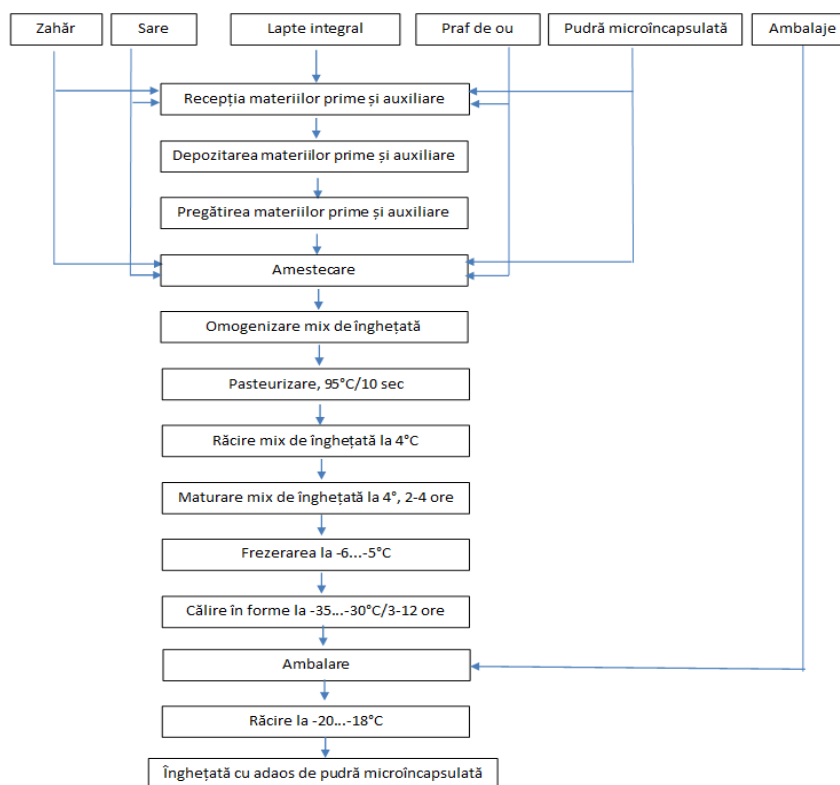
\*Mediile care pe același rand nu conțin aceeași literă sunt semnificativ diferite din punct de vedere statistic,

Degustătorii nu au semnalat diferențe semnificative pentru culoare ( $p > 0,001$ ) între variantele experimentale. Diferențe semnificative au fost semnalate de degustători în privința aromei, unde variantele cu adaos de extracte încapsulate de lavandă au prezentat o aromă mai pronunțată, în special pentru probele cu adaos de 2%. Per ansamblu, proba cea mai apreciată din punct de vedere senzorial ( $p < 0,001$ ) a fost înghețata cu adaos de 1% din varianta experimentală 2, la polul opus situându-se proba martor.

#### 6.4.6. Dezvoltarea unei tehnologii de obținere a înghețatei pe bază de lapte cu adaos de pudră microîncapsulată cu extract din flori de lavandă

În cadrul acestui subcapitol, se propune o schemă tehnologică adaptată de obținere a înghețatei pe bază de lapte cu adaos de pudră microîncapsulată cu extract de flori de lavandă, în proporție variabilă, dar nu mai mult de 2%, raportat la mixul de înghețată. Înghețata pe bază de lapte poate prezenta un conținut de grăsime variabil, cuprins între 2 și 5%.

Schema tehnologică adaptată de obținere a înghețatei pe bază de lapte cu adaos de pudră microîncapsulată cu extract de flori de lavandă, în proporție variabilă este prezentată în **Figura 6.5.**



**Figura 6.5.** Schema tehnologică adaptată de obținere a înghețatei pe bază de lapte cu adaos de pudră microîncapsulată cu extract de flori de lavandă

### 6.5. Concluzii parțiale

În acest capitol, s-a testat posibilitatea de valorificare a variantelor experimentale obținute prin microîncapsularea extractelor din flori de lavandă, cu scopul principal de a contribui la dezvoltarea unor tehnologii inovative de obținere a unor produse alimentare cu funcționalitate ridicată.

Rezultatele obținute în acest capitol au permis formularea următoarelor concluzii parțiale:

1. Ținând cont de proprietățile specifice ale celor 4 variante experimentale de pudre microîncapsulate, respectiv culoare, aromă și conținut de compuși biologic activi, prima etapă a constat în selectarea unor matrici alimentare optime, care să permită evidențierea proprietăților specifice de aromă ale compușilor volatili precum și eliberarea acestora în timpul consumului, cu scopul dezvoltării unor alimente cu funcționalitate ridicată, în special în ceea ce privește activitatea antioxidantă.

2. Astfel, au fost selectate două matrici: **înghețată**, deoarece senzație de rece accentuează nuanță de aromă specifică lavandei și **pricomigdale**. Pentru ambele produse au fost selectate tehnologii simple, ușor de aplicat, în care variantele experimentale 1 și 2 au fost adăugate în proporție de 1 și 2% în înghețată și variantele 3 și 4 în proporție de 1% în mixul de pricomigdale.

3. În probele de înghețată, funcționalitatea ridicată a fost demonstrată printr-o valoare de 1,6 ori mai mare în varianta experimentală de înghețată care a utilizat un procent de 1% din varianta microîncapsulată 1 și 2,5 ori mai mare în varianta cu 2%.

4. În cazul variantelor experimentale care au utilizat varianta microîncapsulată 2, s-a obținut o creștere a activității antioxidante de 1,6 ori la un adaos de 1% și 1,9 ori la un adaos de 2%.

5. Pricomigdalele au prezentat valori net superioare ale activității antioxidante,  $9,40 \pm 0,49$  mMol Trolox/g SU în martor,  $9,73 \pm 0,04$  mMol Trolox/g SU pentru varianta care a utilizat pudra microîncapsulată V3 și  $11,28 \pm 1,08$  mMol Trolox/g SU pentru varianta care a utilizat V4, cu o creștere în valoarea antioxidantă a fost doar de 3,5% în cazul primei variante și de 20% în varianta 2.

6. Mixurile de înghețată au fost testate pentru proprietățile reologice, cu evidențierea faptului că probele cu adaos de 1 și 2% din varianta 1 au prezentat valori ale modulului  $G'$  de aproximativ 25 ori mai mari față de proba control la frecvența de 1 Hz.

7. Independent de proba analizată, valorile  $G'$  au fost superioare lui  $G''$ , sugerând faptul că, la temperatura de 4°C, toate probele de înghețată păstrează din structura specifică, prezentând comportament specific solidelor la valori mici ale frecvenței.

8. De asemenea, pentru toate probele analizate, independent de valoarea vitezei de forfecare, s-a remarcat creșterea tensiunii de forfecare și implicit a vâscozității aparente odată cu adăugarea ingredientului functional pe bază de compuși biologic active din lavandă.

9. Analiza senzorială a diferențiat semnificativ probele de înghețată în ceea ce privește aroma, în special pentru probele cu adaos de 2%.

10. Per ansamblu, proba cea mai apreciată din punct de vedere senzorial a fost înghețata cu adaos de 1% din varianta experimentală de pudră microîncapsulată 2.

11. A fost dezvoltată o schema tehnologică adaptată de obținere a înghețatei pe bază de lapte cu adaos de pudră microîncapsulată cu extract de flori de lavandă.



## CAPITOLUL 7. CONCLUZII FINALE

În contextul socio-economic actual, se manifestă un interes din ce în ce mai mare, atât din partea mediului științific, economic și industrial, dar și din partea consumatorilor, orientat către legătura dintre aliment și sănătate, cu impact semnificativ asupra cererii de produse alimentare funcționale, pentru care s-a demonstrat potențialul de a preveni apariția unor efecte nedorite.

Numeroase studii din literatura de specialitate au evidențiat, *in vitro* și *in vivo* rolul pozitiv al unor metaboliți secundari din fructe, legume și diferite plante, cu impact asupra reducerii ratei deceselor din cauza bolilor cardiovasculare, a cancerelor comune etc, efectele pozitive se datorează prezenței unei game variate de compuși, în combinații eficiente.

Astfel, interesul pentru compuși ca polifenoli, carotenoide, steroli, flavonoide, antociani, fibre, peptide, acizi grași polinesaturați, compuși volatili etc se datorează în principal efectelor biologice multiple, care includ activitate antioxidantă, antiinflamatoare, anti-mutagene și anticancerigene, pentru a enumera doar câteva.

În acest context se încadrează și abordările prezentate în teza de doctorat, intitulată **Caracterizarea în compuși bioactivi a unor plante în vederea utilizării în industria alimentară**, care a urmărit identificarea, cuantificarea și valorificarea superioară a compușilor biologic activi din florile de lavandă, pentru dezvoltarea unor potențiale ingrediente funcționale, care ulterior să poată fi utilizate în dezvoltarea de alimente cu beneficii pentru sănătate.

Lavanda este intens studiată, în principal datorită conținutul în uleiuri esențiale, și mai puțin pentru conținutul în polifenoli, clorofile, carotenoide, acizi fenolici, flavonoide sau acizi grași. De asemenea, lavanda are aplicații multiple în cosmeceutice și farmaceutice, prin prisma uleiurilor esențiale, și este mai puțin cunoscută pentru aplicații în produse alimentare.

Prin urmare, obiectivele tezei de doctorat au constat în:

- Stabilirea profilului fitochimic al extractelor din flori de lavandă (*Lavandula angustifolia*) obținute comparativ prin tehnici diferite de extracție în corelație cu proprietățile antioxidante și stabilitatea la procesare, din perspectiva stabilirii condițiilor optime de extracție și păstrare;
- Microîncapsularea compușilor biologic activi din extracte în ingrediente cu funcționalitate ridicată din perspectiva integrării în alimente funcționale, prin îmbunătățirea stabilității și a caracteristicilor de eliberare controlată;
- Dezvoltarea a două tehnologii de obținere a unor produse cu valoare adăugată prin adăugarea de ingrediente funcționale microîncapsulate.

Toate cele trei obiective au fost îndeplinite, fapt care a permis formularea unor concluzii parțiale prezentate la finalul fiecărui capitol din partea experimentală, și a unor concluzii generale, prezentate sumativ, după cum urmează:

- A. Din analiza literaturii de specialitate, a rezultat un studiu comprehensiv care evidențiază importanța compușilor biologic activi pentru sănătate. Lavanda reprezintă o sursă importantă de uleiuri esențiale, cu aplicabilitate în special în cosmeceutică. La considerarea compușilor biologic activi din diferite surse ca elemente de promovare a stării de sănătate a omului, trebuie să se ia în considerație o serie de factori, cum ar fi: structura chimică și biodisponibilitatea acestuia, factori genetici, factori culturali și de producție, stabilitate, extracție, concentrație etc.
- B. Florile de lavandă sunt bogate în compuși biologic activi cu potențial fiziologic ridicat, un aspect important fiind dat de menținerea activității fiziologice a acestor compuși și după separarea din matricea naturală, procesare, conservare.
- C. Florile de lavandă s-au pretat la extracției prin tehnici diferite, convenționale, asistate, cu fluide supercritice, prin manipularea condițiilor de extracție putându-se controla profilul fitochimic al extractelor, controlându-se astfel compoziția țintă și proprietățile antioxidante.

- D. S-au analizat comparativ diferite tehnici de extracție din perspectiva conținutului în compuși biologic activi, punând accent pe compușii carotenoidici, clorofilici, polifenolici, de aromă și acizii grași polinesaturați.
- E. Odată extrași din matricea de bază, compușii biologic activi sunt instabili la procesarea termică specifică aplicațiilor industriale, efect observat pentru marea majoritate a compușilor studiați, cu excepția flavonoidelor, care au prezentat o stabilitate ridicată.
- F. Termoinstabilitatea compușilor biologic activi din lavandă invită la dezvoltarea unor metode de stabilizare, cea mai utilizată metodă în acest sens fiind microîncapsularea. Coacervarea complexă și liofilizarea au permis dezvoltarea de pudre fine, cu activități biologice remarcabile, în special antioxidantă și antimicrobiană selectivă. Pulberile au prezentat structuri morfologice și dimensiuni diferite, în funcție de tipul de extract utilizat și matricea de încapsulare.
- G. Pudrele microîncapsulate au fost testate pentru proprietățile de citocompatibilitate, fiind evidențiat un efect de proliferare a viabilității celulelor în funcție de concentrație.
- H. Proprietățile funcționale ale pulberilor au fost testate în înghețată și pricomigdale. S-a demonstrat că variantele de produse cu adaos de pudre microîncapsulate au valoare adăugată în ceea ce privește activitatea antioxidantă.
- I. Analizele texturale realizate pe produse au concluzionat că adăugarea pudrei microîncapsulate cu extract de lavandă în produse prezintă efecte benefice asupra sănătății umane și îmbunătățește proprietățile reologice și texturale ale produsului finit.
- J. A fost propusă o schemă tehnologică de obținerea a unei înghețate pe bază de lapte cu adaos de pudră microîncapsulată cu extract de flori de lavandă, care poate contribui la dezvoltarea unor produse alimentare inovative, brevetabile, cu potențial de transfer tehnologic.

## CAPITOLUL 8. CONTRIBUȚII PERSONALE ȘI PERSPECTIVE DE CONTINUARE A STUDIILOR

Elementele de noutate ale abordărilor prezentate în teza de doctorat intitulată *Caracterizarea în compuși bioactivi a unor plante în vederea utilizării în industria alimentară*, derivă din următoarele:

S-a analizat comparativ compoziția în compuși biologic activi și activitatea antioxidantă a diferitelor tipuri de extracte obținute din florile de lavandă, în ceea ce privește conținutul de clorofile, carotenoide, acizi grași, compuși volatili, flavonoide și activitate antioxidantă. Până în prezent, nu a fost identificat nici un profil sau studiu asemănător realizat în literatura de specialitate și de aici și originalitatea tezei de doctorat.

S-au utilizat și comparat diferite tehnici, spectrofotometrice, cromatografice (lichidă și gazoasă) pentru caracterizarea comparativă a profilurilor, ceea ce a permis o analiză detaliată, cuplată cu studiul parametrilor cinetici de degradare a compușilor biologic activi în perspectiva corelației structură-funcție-proces, în vederea menținerii proprietăților biochimice în produsele finite procesate.

Parametrii cinetici de degradare a compușilor biologic activi din extractele obținute sunt necesari pentru optimizarea condițiilor de procesare industrială, din perspectiva minimizării pierderilor și/sau degradării componentelor bioactive.

Instabilitatea termică a deschis premisele identificării unor metode de stabilizare a compușilor biologic activi, fiind selectate coacervarea și liofilizarea ca metode de dezvoltare a unor pudre stabile. Rezultatele obținute furnizează suficiente informații științifice, care au fost exploatate în în design-ul de ingrediente inovative pentru alimente funcționale.

Prin urmare, teza se remarcă ca elemente de originalitate printr-o abordare completă a relației **proces-structură-funcție-produs**, care deschide ca perspective de continuare a studiilor direcții noi, de exploatare și a altor plante aromatice (mentă, lămâiță, rozmarin, busuioc etc), insuficient studiate până în prezent, ce prezintă importanță majoră în creșterea calității vieții. În perspectiva unor cercetări viitoare se profilează ideea utilizării produselor derivate (extracte, pudre) ca ingrediente funcționale pentru formularea unor produse alimentare diverse (băuturi, produse de panificație, produse lactate fermentate, produse de patiserie și cofetărie, produse zaharoase etc).

## CAPITOLUL 9. LISTA PUBLICAȚIILOR

Diseminarea rezultatelor cercetărilor efectuate pe întreaga durată a studiilor doctorale s-au concretizat în următoarele lucrări științifice publicate sau comunicate la conferințe naționale și internaționale după cum urmează:

### 9.1. Articole în reviste ISI cu factor de impact

1. Stănciuc, N., Radu (Lupoae), D., Aprodu, I., Mihalcea, L., Socaci, S.A., Cotârleț, M., Enachi, E., Barbu, V., Dulf, F.V. *Fostering lavender as a functional source for food applications through extraction and microencapsulation of phytochemicals*. International Food Research Journal, accepted for publication, **Factor de impact 0,662**.

### 9.2. Articole în reviste ISI fără factor de impact

1. Radu (Lupoae), D., Alexe, P., Stănciuc, N. Attempts to understand the Potential Role of Lavender as Functional Ingredient – Focus on Phytochemical Contents, Extraction Methods and Applications – A Review. The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI - FOOD TECHNOLOGY, under review.

2. Radu (Lupoae), D., Râpeanu, G., Bahrim, G.E., Stănciuc, N. (2019), Investigations on thermal degradation of phytochemicals from lavender extract. The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI - FOOD TECHNOLOGY 43(2), 33-47.

### 9.3. Prezentări la conferințe și simpozioane internaționale

Radu (Lupoae), D., Enachi, E., Aprodu, I., Mihalcea, L., Socaci, S.A., Cotârleț, M., Barbu, V., Dulf, F.V., Stănciuc, N. (2019). *Lavender as a Valuable Source of Biologically Active Compounds*, The 9th International Symposium EuroAliment, 2019, [http://www.euroaliment.ugal.ro/Programme-EuroAliment-2019-B5\\_03,09.pdf](http://www.euroaliment.ugal.ro/Programme-EuroAliment-2019-B5_03,09.pdf), oral presentation,

### 9.4. Prezentări la conferința Școlilor Doctorale

Radu (Lupoae), D., Alexe, P., Stănciuc, N. (2017), *Exploring the functional potential of lavender*, 5<sup>th</sup> Edition of CSSD-UDJG, 8<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> of June, Book of abstracts, p.120.

Radu (Lupoae), D., Alexe, P., Aprodu, I., Râpeanu, G., Stănciuc, N. (2018), *Phytochemical profile and thermal degradation kinetics of Chlorophylls and Carotenoids from lavender Extracts*, 6<sup>th</sup> Edition of CSSD-UDJG, 7<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> of June, Book of abstracts, p.174.

Radu (Lupoae), D., Râpeanu, G., Alexe, P., Stănciuc, N. (2019), *Microencapsulation biologically active compounds from lavender extract*, 6<sup>th</sup> Edition of CSSD-UDJG, 13<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> of June, Book of abstracts p. 224.

Radu (Lupoae), D., Mihalcea, L., Râpeanu, G., Stănciuc, N. (2020). *Supercritical CO<sub>2</sub> fluid extraction of selected phytochemicals from lavender flowers: focus of volatiles and fatty acids composition of the extracts*, 8<sup>th</sup> Edition of SCDS-UDJG, 18<sup>th</sup> and 19<sup>th</sup> of June 2020, p. 230.