

**Universitatea „Lucian Blaga” Sibiu**  
**Facultatea de Științe Agricole, Inginerie Alimentară și**  
**Protecția Mediului**

**TEZĂ DE DOCTORAT**  
**REZUMAT**

**Coordonator științific,**  
**Prof. Univ. Dr. Ing. Ovidiu Tița**

**Doctorand,**  
**Adina Frum**

**Sibiu**  
**2017**

**Universitatea „Lucian Blaga” Sibiu**  
**Facultatea de Științe Agricole, Inginerie Alimentară și**  
**Protecția Mediului**

**Analiza compușilor biologic activi din unele  
produse vegetale și utilizarea lor la obținerea  
de suplimente alimentare**

*MENȚIUNE*

*Activități de cercetare din această lucrare au fost realizate în cadrul proiectului POSDRU/159/1.5/133675 “Inovare și dezvoltare în structurarea și reprezentarea cunoașterii prin burse doctorale și postdoctorale (IDSRC -doc postdoc)”, cofinanțat de Uniunea Europeană și Guvernul României din Fondul Social European prin Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013*

**Coordonator științific:**  
**Prof. Univ. Dr. Ing. Ovidiu Tița**

**Doctorand,**  
**Adina Frum**

**Sibiu**  
**2017**

<b>CUPRINS</b>	<b>I</b>
<b>LISTA NOTAȚIILOR ȘI SIMBOLURILOR UTILIZATE</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA FIGURILOR</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA TABELELOR</b>	<b>XVII</b>
<b>DIN PARTEA AUTORULUI</b>	<b>XIX</b>
<b>SCOPUL ȘI OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE ALE TEZEI DE DOCTORAT</b>	<b>XXI</b>
<b>INTRODUCERE</b>	<b>XXII</b>

## **PARTEA I - STUDIU BIBLIOGRAFIC**

### **CAPITOLUL I**

Analiza situației existente pe plan internațional în ceea ce privește compușii activi din produsele vegetale	1
1.1. Compuși fenolici	1
1.1.1. Acizi fenolici	1
1.1.2. Flavonoide	2
1.1.3. Taninuri	3
1.1.4. Lignani	5
1.1.5. Stilbene	5
1.2. Modificările în compoziția materialului vegetal sub acțiunea <i>Botrytis cinerea</i>	6
1.3. Radicali liberi și specii reactive de oxigen	6
1.4. Compuși cu efect antioxidant	7
1.5. Antioxidanți endogeni	8
1.6. Protecție împotriva stresului oxidativ	8
1.7. Afecțiuni umane corelate cu stresul oxidativ	8

### **CAPITOLUL II**

Prezentarea materiilor prime vegetale ce fac obiectul studiului	9
2.1. Produse vegetale	9
2.1.1. <i>Rubus idaeus</i> L.	9
2.1.2. <i>Vaccinium myrtillus</i> L.	9
2.2.2. <i>Ribes rubrum</i> L.	10
2.2.3. <i>Vitis vinifera</i> L.	11
2.2. Culegerea fructelor	12
2.2.1. Afine	12
2.2.1.1. Culegere	12
2.2.1.2. Tratament înainte de depozitare	12
2.2.1.3. Depozitare	13
2.2.2. Zmeura	13
2.2.2.1. Culegere	13
2.2.2.2. Tratament înainte de depozitare	13
2.2.2.3. Depozitare	13
2.2.3. Coacăze roșii	13
2.2.3.1. Culegere	13
2.2.3.2. Tratament înainte de depozitare	13
2.2.3.3. Depozitare	14
2.2.4. Struguri	14
2.2.4.1. Culegere	14
2.2.4.2. Prelucrarea strugurilor și obținerea vinurilor	14
2.2.4.3. Tratament înainte de depozitare	16
2.2.4.4. Depozitare	16
2.3. Valorificarea produselor secundare din industria vinului	18
2.3.1. Recuperarea unor compuși volatili	19

2.3.1.1. Alcooli	19
2.3.1.2. Esteri	19
2.3.1.3. Aldehyde	19
2.3.2. Producerea acidului tartric și sărurilor sale	20
2.3.3. Producerea uleiului alimentar din semințe de struguri	20
2.3.4. Surse de nutrienți	20
2.3.5. Enocolorantul	21
2.3.6. Polifenoli	21
2.4. Conservarea fructelor	21
2.4.1. Conservarea prin refrigerare sau congelare	21
2.4.2. Conservarea cu substanțe antiseptice	22
2.4.3. Conservarea sub presiune de dioxid de carbon	23
2.4.4. Conservarea prin uscare	23
2.5. Mărunțirea produselor vegetale	24
<b>CAPITOLUL III</b>	
Importanța suplimentelor alimentare în menținerea stării de sănătate a organismului	25
3.1. Suplimente alimentare	25
3.2. Acțiunea polifenolilor în domeniul sănătății	26
3.2.1. Acid galic	26
3.2.2. Acid siringic	27
3.2.3. Acidul cinamic	27
3.2.4. Resveratrol	28
3.2.5. Catechina	29
3.2.6. Acid clorogenic	29
3.2.7. Acid cafeic	30
3.2.8. Acid ferulic	30
3.2.9. Quercetin	31
3.2.10. Rutin	31
<b>PARTEA a II-a CERCETARE EXPERIMENTALĂ</b>	
<b>CAPITOLUL IV</b>	
Pregătirea produselor vegetale pentru analiză	34
4.1. Produsele vegetale care fac obiectul studiului	34
4.2. Pregătirea probelor	34
4.2.1. Pregătirea fructelor	34
4.2.1.1. Conservare prin congelare, apoi uscare	35
4.2.1.2. Conservare prin uscare	35
4.2.2. Pregătirea tescovinei	35
<b>CAPITOLUL V</b>	
Metode de extracție	36
<b>CAPITOLUL VI</b>	
Analiza extractelor obținute	38
6.1. Metode de analiză	38
6.1.1. Dozarea spectrofotometrică a polifenolilor totali	38
6.1.2. Identificarea și cuantificarea compușilor fenolici printr-o metodă HPLC proprie	38
6.2. Rezultate și discuții	40
6.2.1. Analiza extractelor obținute din fructe conservate prin intermediul congelării	40

6.2.1.1. Organizarea determinărilor	40
6.2.1.2. Dozarea spectrofotometrică a polifenolilor totali	41
6.2.1.3. Identificarea și cuantificarea compușilor fenolici prin metoda HPLC	43
6.2.1.4. Concluzii	50
6.2.2. Analiza extractelor obținute din fructe conservate prin intermediul uscării	51
6.2.2.1. Organizarea determinărilor	51
6.2.2.2. Dozarea spectrofotometrică a polifenolilor totali	51
6.2.2.3. Identificarea și cuantificarea compușilor fenolici prin metoda HPLC	52
6.2.2.4. Concluzii	56
6.2.3. Analiza comparativă a metodelor de conservare a fructelor	57
6.2.3.1. Dozarea spectrofotometrică a polifenolilor totali	57
6.2.3.2. Identificarea și cuantificarea compușilor fenolici prin metoda HPLC	57
6.2.3.3. Concluzii	59
6.2.4. Analiza extractelor obținute din produse secundare ale procesului de vinificație	60
6.2.4.1. Organizarea determinărilor	60
6.2.4.2. Dozarea spectrofotometrică a polifenolilor totali	60
6.2.4.3. Identificarea și cuantificarea compușilor fenolici prin metoda HPLC	61
6.2.4.4. Concluzii	64

## **CAPITOLUL VII**

Descrierea și alegerea variantei optime în obținerea suplimentelor alimentare cu un conținut optim de compuși fenolici.	65
---	----

## **CAPITOLUL VIII**

Realizarea suplimentului alimentar	66
8.1. Obținerea materiei prime	66
8.2. Analiza materiei prime	66
8.2.1. Distribuția mărimii particulelor	66
8.2.2. Proprietățile de curgere ale pulberii	68
8.2.3. Dozarea polifenolilor totali	69
8.2.3.1. Organizarea determinărilor	69
8.2.4. Dozarea compușilor fenolici	70
8.3. Obținerea produsului finit	71
8.3.1. Încapsularea	71
8.4. Analiza produsului finit	72
8.4.1. Masa medie și uniformitatea masei	72
8.4.2. Dezagregare	74
8.4.3. Dozare polifenoli totali	75
8.4.4. Dozare compuși fenolici	75
8.5. Raport de validarea al metodei de analiză a compușilor fenolici	77
8.5.1. Introducere	77
8.5.2. Scop	77
8.5.3. Descrierea metodei analitice	77
8.5.4. Validarea metodei analitice	77
8.5.4.1. Specificitatea metodei	78
8.5.4.2. Precizia	79
8.5.4.3. Linearitatea	87
8.5.4.4. Testarea conformității sistemului cromatografic	98
8.5.4.5. Stabilitatea soluțiilor	99
8.5.4.6. Robustețea metodei	103
8.6. Suplimentul alimentar obținut în raport cu alte produse cu efect antioxidant	104

<b>CAPITOLUL IX</b>	105
Concluzii și perspective	105
9.1. Concluzii finale	105
9.2. Contribuții personale	106
9.3. Perspective de continuare a cercetărilor	107
Bibliografie	108
Anexe	i
Curriculum vitae	lxvii
Lista lucrărilor publicate și a participărilor la conferințe pe parcursul elaborării tezei de doctorat	lxx

**CUVINTE CHEIE:** produse vegetale, subproduse vinicole, polifenoli, compuși fenolici, suplimente alimentare

### DIN PARTEA AUTORULUI

Prezenta teză de doctorat își propune să ofere informații despre compușii biologic activi cu proprietăți antioxidante din produse vegetale autohtone, astfel valorificându-se și produse secundare obținute în industria vinificației prin obținerea de suplimente alimentare cu potențial bioactiv.

Cercetările s-au desfășurat în perioada 2013-2017, rezultatele fiind sintetizate în prezenta lucrare care conține 119 pagini, 44 de tabele și 101 figuri.

Aceasta este structurată în două părți: o parte de documentare bibliografică, unde se evidențiază cercetări anterioare despre compuși biologic activi determinați în produse vegetale autohtone și importanța acestora în ceea ce privește menținerea stării de sănătate, și o parte experimentală, unde se determină conținutul în astfel de compuși a produselor vegetale autohtone și a produselor secundare obținute din procesul de vinificație și obținerea unui supliment alimentar cu proprietăți antioxidante.

Partea experimentală s-a desfășurat în cadrul Universității "Lucian Blaga" din Sibiu, în laboratoarele Facultății de Științe Agricole, Industrie Alimentară și Protecția Mediului și în Laboratorul Fizico-Chimic din cadrul companiei Poliso Pharmaceuticals din Sibiu.

Teza mai cuprinde și anexe cu cromatograme, spectre de absorbție și tabele cu date brute, referințe bibliografice, liste cu notații și abrevieri folosite și listele figurilor și a tabelelor întâlnite în text.

Realizarea acestei teze de doctorat nu ar fi fost posibilă fără îndrumarea și sprijinul conducătorului de doctorat, domnul **Prof. Univ. Dr. Ing. Ovidiu Tița**, căruia doresc să îi mulțumesc pe această cale.

De asemenea, doresc să mulțumesc pentru ajutorul acordat de către comisia de îndrumare, constituită din: doamna **Prof. Univ. Dr. Farm Felicia Gligor**, domnul **Conf. Dr. Ing. Ioan Mironescu**, și domnul **Prof. Univ. Dr. Ing. Dan Chicea**, care pe parcursul elaborării tezei m-au susținut și m-au îndrumat spre realizarea acesteia.

Doresc să le mulțumesc pentru ajutorul acordat, pentru sfaturi și pentru susținere doamnelor **Prof. Univ. Dr. Farm Felicia Gligor** și **Conf. Dr. Ing. Cecilia Georgescu**, care mi-au fost alături la fiecare pas în vederea finalizării tezei de doctorat.

Un real ajutor am primit de la doamna **Șef lucrări. Dr. Ing. Ecaterina Lengyel** și de la doamna **Dr. Ing. Diana Stegăruș** căror doresc să le mulțumesc pe această cale.

Mulțumirile mele se îndreaptă și spre **Ing. Laurenția Tiniș**, care m-a susținut pe tot parcursul cercetării mele.

De asemenea doresc să mulțumesc colectivului din cadrul companiei Poliso Pharmaceuticals care mi-au pus la dispoziție laboratorul pentru a-mi efectua cercetările și mi-au oferit sfaturi neprețuite.

## **SCOPUL ȘI OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE ALE TEZEI DE DOCTORAT**

Teza de doctorat are drept scop analiza calitativă și cantitativă a compușilor biologic activi din produse vegetale, extracția și utilizarea lor în alimentație sub formă de suplimente alimentare. În vederea atingerii acestui scop s-au propus a fi realizate următoarele obiective științifice:

1. Identificarea metodelor de analiză și control
2. Punerea la punct a unui sistem eficient de extracție
3. Analiza cantitativă și calitativă a principiilor active extrase
4. Identificarea schemei tehnologice de utilizare a compușilor activi izolați în obținerea de suplimente alimentare
5. Analiza suplimentelor alimentare obținute

### **Capitolul I - Analiza situației existente pe plan internațional în ceea ce privește compușii activi din produsele vegetale**

Substanțele chimice extrase din plante pot fi clasificate în metaboliți primari și secundari (Yanez, și alții 2013).

Metaboliții primari au o răspândire largă în natură și sunt folosiți de către plante pentru dezvoltarea lor fiziologică. Metaboliții secundari sunt derivați din metaboliții primari, distribuția lor este limitată în plante. Aceștia, de obicei, au un rol ecologic. Spre exemplu intră în răspunsul de apărare al plantelor, sunt compuși de adaptare a plantelor împotriva factorilor de stres, sunt sintetizați în celule specializate în stadii diferite ale dezvoltării plantelor, în timpul îmbolnăvirii acestora sau pot fi induse de lumină (Yanez, și alții 2013).

Polifenolii extrași din plante prezintă o diversitate structurală largă. Structura polifenolilor naturali variază de la molecule simple cum ar fi acizii fenolici până la molecule cu grad mare de polimerizare, cum ar fi taninurile (Baruah 2011).

Aceștia sunt divizați în mai multe subclase de substanțe în funcție de structura lor chimică. Astfel putem evidenția acizii fenolici, flavonoidele, lignanii și stilbenele (Xu 2012).

Creșterea cantității de substanțe capabile să apere plantele împotriva infecțiilor se poate realiza prin infectarea acestora cu fungul *Botrytis cinerea* (Pour Nikfardjam, Laszlo și Dietrich 2006).

Antioxidanții, ca și constituenți ai alimentelor, funcționează ca un factor de protejare a sănătății, reducând riscul de afecțiuni cronice incluzând bolile cardio-vasculare sau cancerul (Mehta 2015).

### **Capitolul II - Prezentarea materiilor prime vegetale ce fac obiectul studiului**

Compușii cu efect antioxidant se găsesc în diverse specii de plante. Dintre acestea o parte au fost studiate mai amănunțit și s-a observat aplicabilitatea lor.

Fructele de zmeur (*Rubus idaeus* L.) sunt consumate crude sau sub formă de suc, compot, marmeladă, jeleu, cremă, lichior sau coloranți naturali (Pârvu 2006).

Fructele de afin (*Vaccinium myrtillus* L.) sunt consumate în stare crudă sau sub formă de marmeladă, sirop, suc sau băuturi alcoolice (afinată) (Pârvu 2006).

În alimentație, fructele de coacăz roșu (*Ribes rubrum* L.) se consumă proaspete sau servesc la fabricarea de marmeladă, jeleu, dulceață, gem, pastă, compot, sirop, suc (Pârvu 2006).

Industrial, strugurii (*Vitis vinifera* L.) reprezintă materie primă în procesul de vinificație, din care se obțin vinuri de diferite sortimente, distilate, musturi și sucuri naturale sau concentrate

necesare industriei. Strugurii sunt folosiți în fabrici de conserve, compoturi, marmelade, dulcețuri, stafide (Pârvu 2006).

Pentru valorificarea acestor produse vegetale trebuie să se cunoască modalitățile de culegere, de depozitare și de tratament înaintea depozitării pentru a le putea menține proprietățile perioadă cât mai îndelungată.

În industria vinului, în afara produselor de bază, rezultă și alte produse care se numesc produse secundare și reprezintă aproximativ 25% din cantitatea de struguri prelucrați. Valorificarea acestora este de un real interes în cercetare datorită produselor obținute care se dovedesc utile în numeroase sectoare industriale. Din produsele secundare procesului de vinificație se pot extrage compuși biologic activi (enzime, vitamine, polifenoli) și nu în ultimul rând se evită poluarea mediului (Tița 2002).

### **Capitolul III - Importanța suplimentelor alimentare în menținerea stării de sănătate a organismului**

”Alimentul înseamnă orice substanță sau produs, indiferent dacă este prelucrat, parțial prelucrat sau neprelucrat, destinat consumului uman, cu excepția tutunului, produselor medicinale, narcoticelor și a substanțelor psihotrope care sunt controlate de Statele Membre și care sunt supuse condițiilor internaționale” (Banu 2010).

Suplimentele alimentare sunt definite ca produse alimentare al căror scop este de a suplimenta regimul alimentar și care reprezintă surse concentrate de nutrienți sau alte substanțe cu efect nutritiv sau fiziologic, singure sau în combinație, comercializate sub formă de doză, respectiv în forme de prezentare cum ar fi capsulele, pastilele, comprimatele, pilulele sau alte forme similare, cașete cu pulbere, fiole de lichid, flacoane cu picurător și alte forme similare de lichide și prafuri destinate să fie luate în cantități mici dozate individual (Directiva 2002/46/CE 2002).

Studii arată că un consum regulat de fructe și legume poate asigura protecție împotriva dezvoltării sau progresiei a unor afecțiuni cronice, cum ar fi: cancer, diabet, afecțiuni neuro-degenerative sau afecțiuni cardiovasculare (Pandey și Rizvi 2011).

Polifenolii sunt metaboliți activi ai plantelor, aceștia fiind constituenți importanți dintr-o dietă echilibrată. Consumul de polifenoli s-a demonstrat a fi invers proporțional cu dezvoltarea sau progresul unor afecțiuni cronice (Pandey și Rizvi 2011).

### **Capitolul IV - Pregătirea produselor vegetale pentru analiză**

Probele folosite pentru analize au fost afinele (*Vaccinium myrtillus* L.), zmeura (*Rubus idaeus* L.), coacăza roșie (*Ribes rubrum* L.), culese din jud. Sibiu și tescovina fermentată, varietatea Cabernet Sauvignon și Fetească Neagră (*Vitis vinifera* L.), struguri culeși din jud. Alba.

Fructele au fost culese în luna iulie, aceasta fiind perioada în care ajung la maturitate (Fig. 25), iar conservarea acestora a fost realizată prin congelare și apoi uscare sau prin uscare și conservare la temperatura camerei până în momentul analizei.

Prin analiza acestor moduri de conservare se poate concluziona stabilitatea polifenolilor din fructele analizate la conservare prin congelare.

În ceea ce privește tescovina fermentată, după procesarea strugurilor, în vederea obținerii vinului, tescovina obținută a fost uscată, mărunțită și apoi congelată și păstrată timp de 6 luni.



## Capitolul V - Metode de extracție

Metodele de extracție propuse pentru acest studiu sunt metode folosite pentru extracția diferiților compuși fenolici din produse vegetale. Acestea au fost adaptate pentru a nu inactiva compușii termolabili și pentru a eficientiza extracția, astfel obținându-se un randament cât mai bun cu un consum cât mai redus de resurse materiale sau de timp.

Pentru realizarea probelor, s-au folosit 4 tipuri de extracții. Extracția numărul 1 fiind o extracție la pânzie de separare cu solvenți organici, iar extracțiile 2-4 sunt realizate cu ajutorul ultrasunetelor și a temperaturii, solvenții cu ajutorul cărora s-au efectuat acestea fiind diferiți.

## Capitolul VI - Analiza extractelor obținute

### Metode de analiză

#### *Dozarea spectrofotometrică a polifenolilor totali*

Dozarea polifenolilor a fost realizată prin intermediul metodei Folin- Ciocâlțeu adaptată după Farmacopeea Europeană ediția 8.0.

Rezultatele obținute la citirea absorbanțelor probelor la spectrofotometru au fost extrapolate din curba de calibrare obținută prin citirea absorbanțelor concentrațiilor crescătoare de acid galic și reprezentarea grafică a acestora.

#### *Identificarea și cuantificarea compușilor fenolici printr-o metodă HPLC proprie*

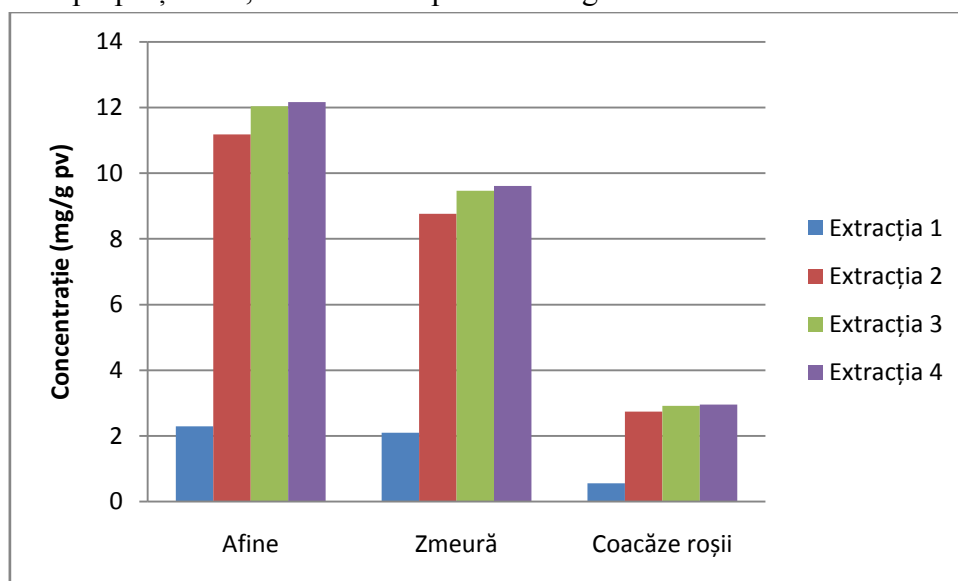
Metoda a fost adaptată după metoda lui Iacopini și colab., utilizată pentru analiza resveratrolului, rutinului și quercetinelui din coajă de struguri (Iacopini 2008), pentru a identifica și cuantifica 10 compuși fenolici de interes.

### Rezultate și discuții

#### *Analiza extractelor obținute din fructe conservate prin intermediul congelării*

Concentrația maximă de polifenoli totali exprimați în mg acid galic/g p.v. regăsită în toate probele analizate s-a înregistrat pentru extracția 4, aceasta fiind urmată de extracția 3, apoi extracția 2 și concentrația cea mai mică s-a regăsit pentru extracția 1 (Fig. 1).

Concentrațiile de polifenoli totali, deși diferite pentru fiecare produs în parte, acestea urmăresc un model în ceea ce privește metodele de extracție. Astfel se observă faptul că extracția polifenolilor este proporțională, indiferent de produsul vegetal analizat.



**Figura 1.** Concentrația polifenolilor totali a fructelor conservate prin intermediul congelării

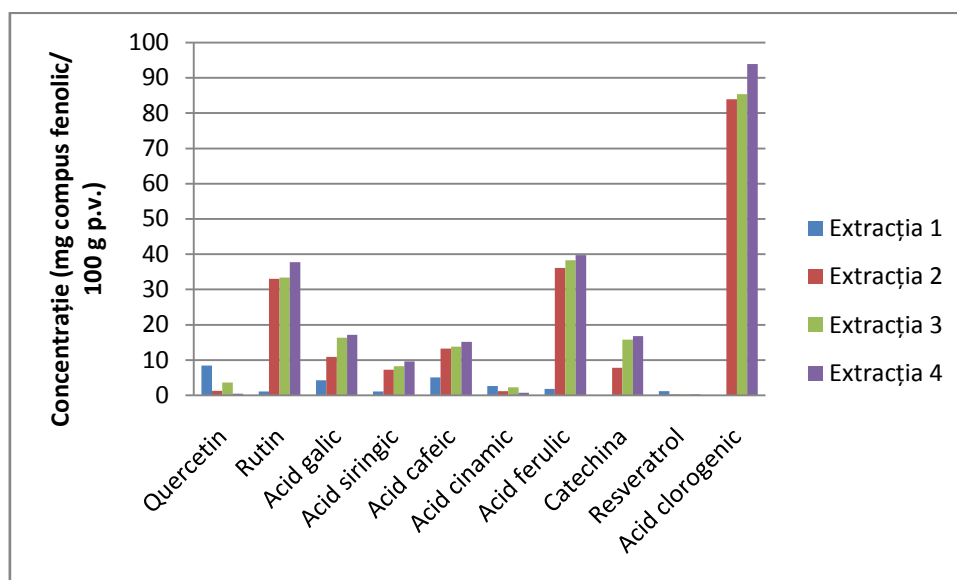
Concentrația maximă de polifenoli totali exprimați în mg acid galic/g p.v. regăsită în toate probele analizate s-a înregistrat pentru extracția 4, aceasta fiind urmată de extracția 3, apoi extracția 2 și concentrația cea mai mică s-a regăsit pentru extracția 1.

Concentrațiile de polifenoli totali, deși diferite pentru fiecare produs în parte, acestea urmăresc un model în ceea ce privește metodele de extracție. Astfel se observă faptul că extracția polifenolilor este proporțională, indiferent de produsul vegetal analizat.

Afinele prezintă cea mai mare cantitate de polifenoli totali extrași, urmate de zmeură, și apoi de coacăzele roșii indiferent de extracția folosită, astfel afinele prezintă o concentrație de 2,29 mg polifenoli totali (exprimați în acid galic)/g p.v. determinată pentru analiza extracției 1 și o concentrație de 12,16 mg polifenoli totali (exprimați în acid galic)/g p.v. determinată pentru analiza extracției 4, aceste valori fiind minimul respectiv maximum de polifenoli totali (exprimați în acid galic)/g p.v. determinate pentru extractele de afine. Zmeura prezintă un minim de 2,09 mg polifenoli totali (exprimați în acid galic)/g p.v. și un maxim de 9,61 mg polifenoli totali (exprimați în acid galic)/g p.v., valori obținute pentru extracția 1 respectiv extracția 4, iar pentru coacăzele roșii valorile de minim și maxim sunt întâlnite pentru aceleași extracții ca și celelalte două fructe, minimul fiind de 0,56 mg polifenoli totali (exprimați în acid galic)/g p.v. iar maximum de 2,95 mg polifenoli totali (exprimați în acid galic)/g p.v (Fig. 1).

### ***Identificarea și cuantificarea compușilor fenolici prin metoda HPLC***

Majoritatea compușilor fenolici analizați au înregistrat cantitatea maximă extrasă cu ajutorul extracției 4. Restul compușilor prezentând cantitatea maximă extrasă cu ajutorul extracției 1. Pentru compușii extrași majoritar prin intermediul extracției 4 se poate observa o tendință de creștere a cantității de compuși fenolici de la extracția 1 spre extracția 4 iar pentru cei extrași majoritar cu extracția 1, o descreștere în aceeași ordine (Fig. 2).

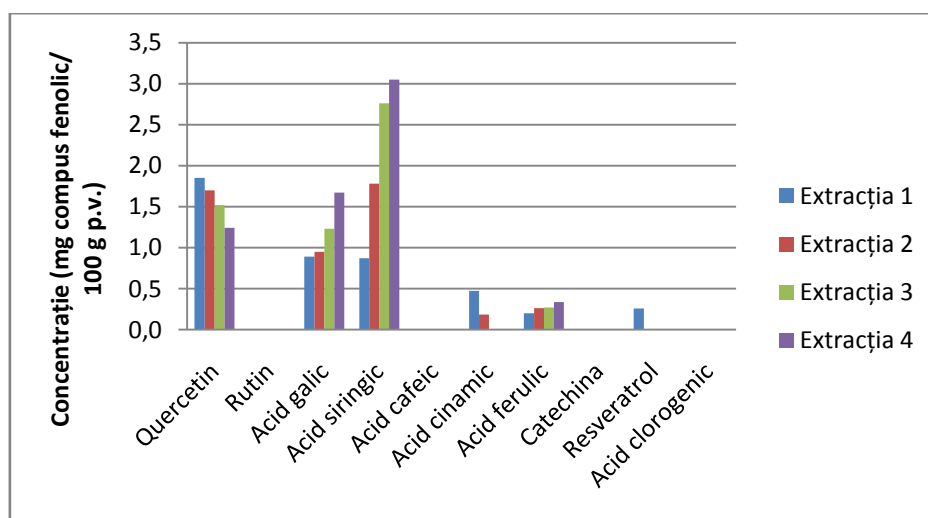


**Figura 2.** Concentrația compușilor fenolici din probele de afine conservate prin intermediul congelării

În ceea ce privește extractele de afine, dintre compușii fenolici analizați cantitatea cea mai mare a fost înregistrată de acidul clorogenic pentru care s-a obținut o valoare de 93,96 mg/100g

p.v., urmată de acidul ferulic și de rutin cu valori de 39,79 mg/100g p.v. respectiv 37,74 mg/100g p.v. Valori cuprinse între 10 și 20 mg/100g p.v. s-au obținut pentru acidul galic, (+)-catechină și acidul cafeic, acidul siringic înregistrând o valoare de 9,66 mg/100g p.v. Aceste valori au fost obținute prin analiza compușilor de interes cu ajutorul extracției 4, aceasta fiind extracția care a oferit cantitatea cea mai importantă din compușii enumerați. Prin intermediul acestei extracții quercetinul, acidul cinamic și resveratrolul au prezentat valori subunitare dar prin intermediul extracției 1: 8,45 mg/100g p.v., 2,62 mg/100g p.v. respectiv 1,21 mg/100g p.v. astfel considerându-se extracțiile propice compușilor fenolici analizați din afine (Fig. 2).

Comportamentul compușilor fenolici extrași din fructele de zmeur, în funcție de tipul de extracție este similar cu a afinelor, astfel vor fi amintite valorile maxime obținute în funcție de tipul de extracție identificat.

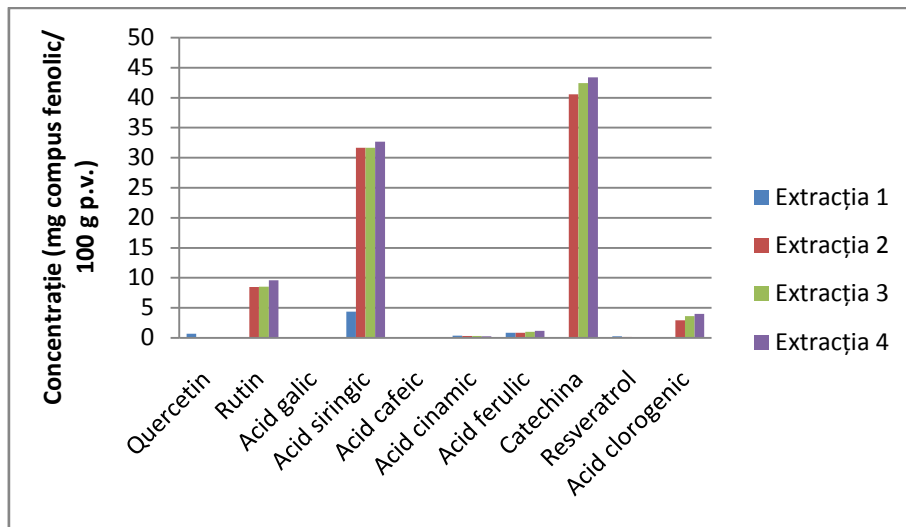


**Figura 3.** Concentrația compușilor fenolici din probele de zmeură conservate prin intermediul congelării

Astfel dintre compușii fenolici analizați, cantitatea de acid siringic s-a dovedit a fi cea mai importantă, urmată de acidul galic și quercetin. Cantitate subunitară a fost înregistrată în cazul acidului cinamic, resveratrolului și acidului ferulic. Rutinul, acidul cafeic, (+)-catechina și acidul clorogenic nu au fost regăsiți în compoziția extractelor de zmeură în nici un extract analizat. Datele prezentate au fost obținute prin intermediul extracției 1 pentru quercetin, acid cinamic și resveratrol și prin intermediul extracției 4 pentru restul compușilor cuantificați (Fig. 3).

Se poate observa că determinarea resveratrolului și a acidului cinamic a fost imposibilă în extractele 3 și 4, resveratrolul fiind nedetectabil și în extractul 2. De asemenea se poate observa și tendința de creștere a cantității acidului galic, acidului siringic și a acidului ferulic de la extracția 1 spre extracția 4. Tendința quercetinului și a acidului cinamic fiind inversă, astfel cantitatea cea mai mare a fost înregistrată în extractul 1, apoi extractul 2, apoi 3 și cantitatea cea mai mică fiind înregistrată în extractul 1 (Fig. 3).

Cantitatea cea mai însemnată de compus fenolic din extractele de coacăze roșii a fost înregistrată de (+)-catechină care a fost urmată de acidul siringic. Valorile acestora fiind 43,37 mg/100g p.v. respectiv 32,66 mg/100g p.v. Pentru restul compușilor analizați valorile înregistrate au fost sub 10 mg/100g p.v. după cum urmează: rutinul 9,61 mg/100g p.v., acidul clorogenic 3,99 mg/100g p.v., acidul ferulic 1,20 mg/100g p.v. iar quercetinul, acidul cinamic și resveratrolul au prezentat valori subunitare, acidul galic și acidul cafeic nefiind detectate (Fig. 4).

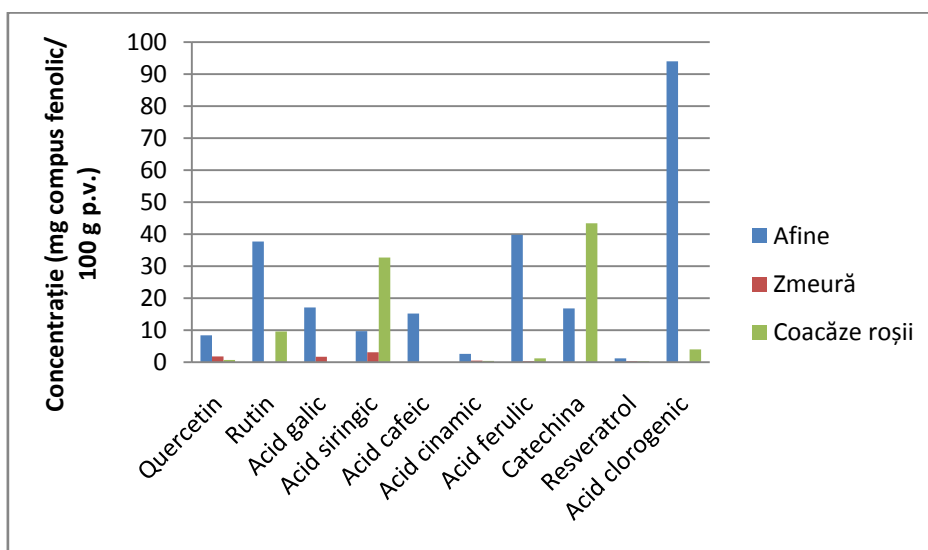


**Figura 4.** Concentrația compușilor fenolici din probele de coacăze roșii conservate prin intermediul congelării

Din punct de vedere al extracțiilor propice pentru analiza compușilor fenolici s-au identificat extracția 1 și extracția 4, acestea fiind extracțiile care au prezentat valorile cele mai mari a diferiților compuși. Extracția 1 a reprezentat extracția propice pentru quercetin, acid cinamic și resveratrol. Se poate observa o scădere a cantității de compus de interes de la extracția 1 spre extracția 4. Restul compușilor analizați pentru care s-a determinat cantitatea cea mai mare în extractul 4 prezintă o tendință de creștere a cantității extrase de la extracția 1 spre extracția 4 (Fig. 4).

Se poate observa că afinele prezintă cea mai mare concentrație de compuși fenolici analizați, urmate de coacăzele roșii și apoi de zmeură (Fig. 5).

Rezultatele folosite au fost reprezentate de cele obținute cu ajutorul extracției 1 pentru quercetin, acid cinamic și resveratrol și cu ajutorul extracției 4 pentru rutin, acid galic, acid siringic, acid cafeic, acid ferulic, (+)-catechină și acid clorogenic, acestea reprezentând valorile cele mai mari obținute pentru fiecare compus fenolic în parte.



**Figura 5.** Concentrația compușilor fenolici din probele de fructe conservate prin intermediul congelării

Cantitățile cele mai importante de quercetin, rutin, acid galic, acid cafeic, acid cinamic, acid ferulic, resveratrol și acid clorogenic au fost întâlnite în afine, dar acidul siringic și (+)-catechina au prezentat valori maxime în analiza coacăzilor roșii (Fig. 5).

În extractele de zmeură s-au găsit compușii fenolici menționați mai sus, mai puțin rutinul, acidul cafeic, (+)-catechina și acidul clorogenic. Coacăzilor roșii lipsindu-le acidul galic și acidul cafeic (Fig. 5).

### **Concluzii**

Dintre cele trei fructe analizate cantitatea cea mai mare atât de polifenoli totali cât și de compuși fenolici totali analizați a fost determinată în extractele de afine. Din punct de vedere al polifenolilor totali ca și cantitate urmează zmeura și apoi coacăzele roșii, deși totalitatea compușilor fenolici determinați în coacăzele roșii a prezentat o valoare mai mare decât în zmeură.

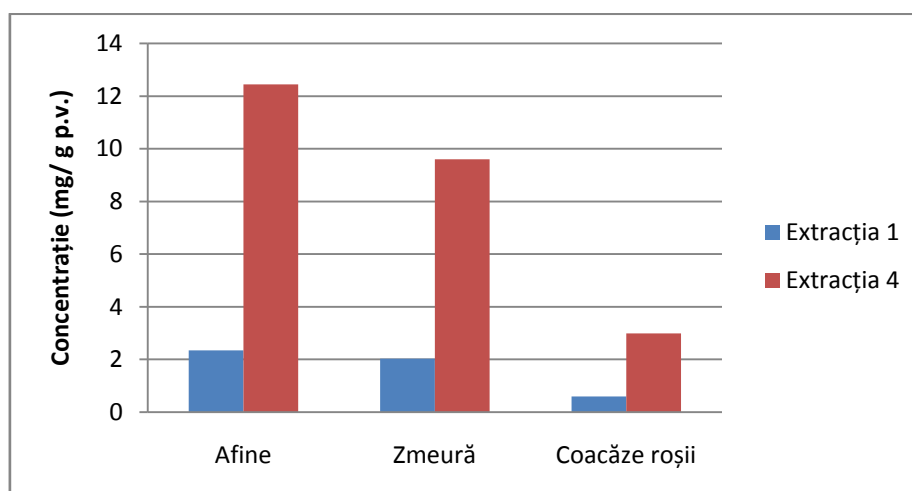
Cantitatea cea mai mare de polifenoli totali a fost extrasă cu ajutorul extracției 4, urmată de extracția 3, apoi 2 iar cantitatea cea mai mică a fost determinată prin extracția 1, aceasta fiind cea mai selectivă.

S-a observat că pentru quercetin, acid cinamic și resveratrol extracția propice pentru a continua analiza este extracția 1 și pentru rutin, acid galic, acid siringic, acid cafeic, acid ferulic, (+)-catechină și acid clorogenic, extracția 4.

### **Analiza extractelor obținute din fructe conservate prin intermediul uscării**

#### **Dozarea spectrofotometrică a polifenolilor totali**

Din figura 6 se poate observa că afinele prezintă cantitatea cea mai mare de polifenoli totali extrași, urmate de zmeură și apoi de coacăzele roșii. Afinele prezintă o concentrație de 2,34 mg polifenoli totali (exprimați în acid galic)/g p.v. determinată pentru analiza extracției 1 și o concentrație de 12,44 mg polifenoli totali (exprimați în acid galic)/g p.v. determinată pentru analiza extracției 4. Zmeura prezintă un minim de 2,03 mg polifenoli totali (exprimați în acid galic)/g p.v. și un maxim de 9,60 mg polifenoli totali (exprimați în acid galic)/g p.v., valori obținute pentru extracția 1 respectiv extracția 4, iar pentru coacăzele roșii minimul fiind de 0,60 mg polifenoli totali (exprimați în acid galic)/g p.v. iar maximum de 2,99 mg polifenoli totali (exprimați în acid galic)/g p.v. (Fig. 6).

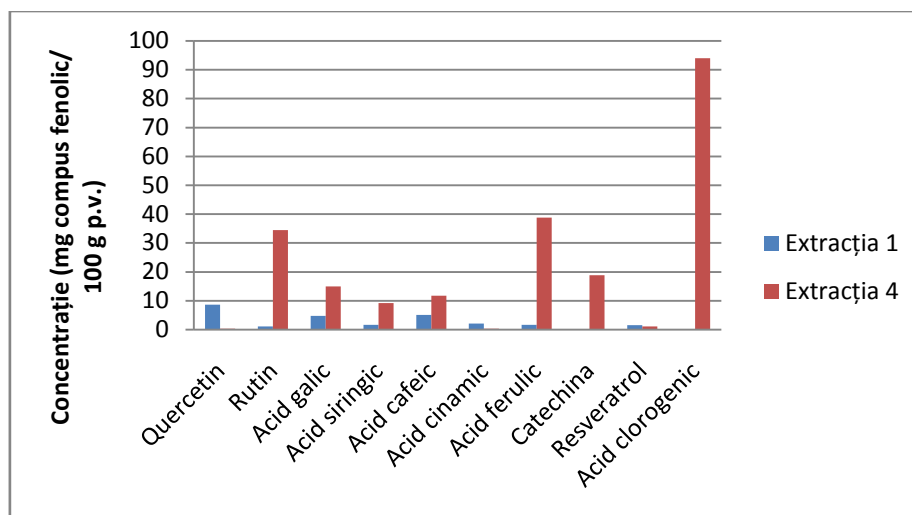


**Figura 6.** Concentrația polifenolilor totali a fructelor conservate prin intermediul uscării

### ***Identificarea și cuantificarea compușilor fenolici prin metoda HPLC***

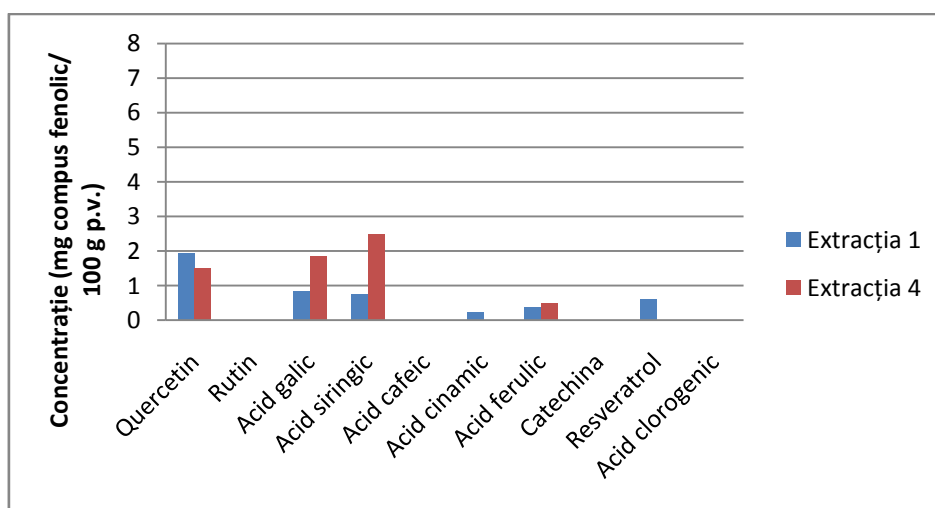
Acidul clorogenic este compusul fenolic determinat din extractele de afine care prezintă cantitatea cea mai mare, 94,00 mg/100g p.v., urmat de acidul ferulic care prezintă o cantitate de 38,80 mg/100g p.v. și apoi de rutin cu 34,43 mg/100g p.v. Acidul galic, (+)-catechină și acidul cafeic prezintă cantități cuprinse între 10 și 20 mg/100g p.v., iar valori mai mici de 10 mg/100g p.v.: acidul siringic, quercetinul, acidul cinamic și resveratrolul.

Valorile exprimate mai sus sunt obținute cu ajutorul extracției 1 pentru quercetin, acid cinamic și resveratrol, iar restul compușilor fenolici cu ajutorul extracției 4.



**Figura 7.** Concentrația compușilor fenolici din afinele conservate prin intermediul uscării

În cazul extractelor de zmeură, s-a observat ca acidul siringic prezintă cantitatea cea mai mare dintre compușii fenolici analizați, urmat de quercetin și de acidul galic. Pentru ceilalți compuși s-au determinat valori subunitare, excepție făcând rutinul, acidul cafeic, acidul clorogenic și (+)-catechina, compuși care nu au fost detectați în acest produs (Fig. 7).



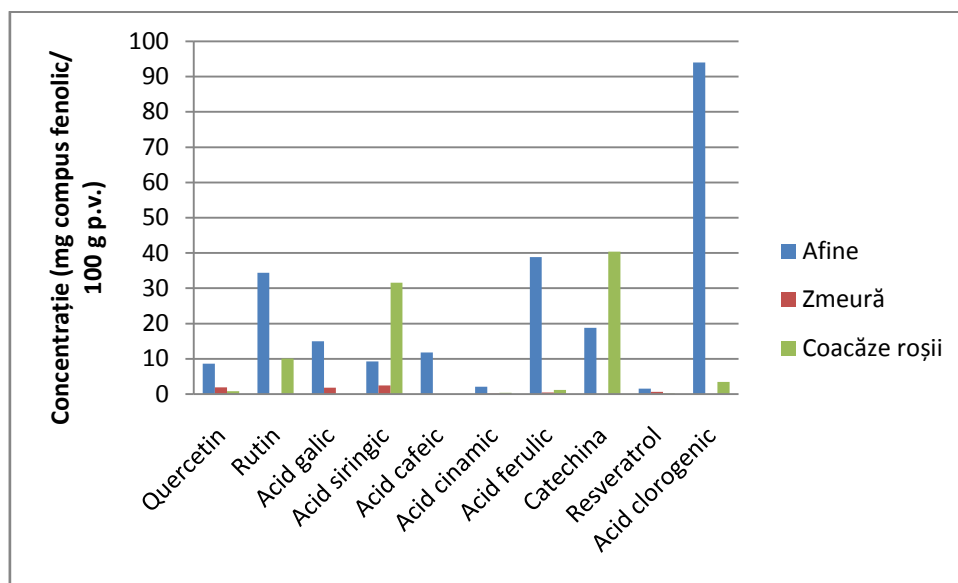
**Figura 8.** Concentrația compușilor fenolici din zmeura conservată prin intermediul uscării

Compușul fenolic predominant în fructele de coacăz roșu este (+)-catechina, în cantitate de 40,38 mg/100g p.v., urmată de acidul siringic, acesta fiind în cantitate de 31,57 mg/100g p.v. rutinul prezintă o cantitate de 10,08 mg/100g p.v. Acidul ferulic și acidul clorogenic au prezentat valori

inferioare a 10 mg/100g p.v. iar quercetinel, acidul cinamic și resveratrolul au prezentat valori subunitare. Acidului galic și a acidului cafeic, au fost nedetectabili (Fig. 8).

Prin compararea cantității de compuși fenolici existenți în fructele analizate (Fig. 9), supuse uscării și mărunțirii imediat după culegere s-au putut identifica afinele ca deținând cea mai mare cantitate de compuși fenolici totali analizați, urmate de coacăzele roșii și apoi de zmeură.

Datele folosite sunt atribuite extracțiilor care prezintă cea mai mare cantitate de compuși fenolici, individual analizați.



**Figura 9.** Concentrația compușilor fenolici din fructele conservate prin intermediul uscării

Quercetinel, rutinul, acidul galic, acidul cafeic, acidul cinamic, acidul ferulic, resveratrolul și acidul clorogenic sunt compușii fenolici pentru care a fost determinată cea mai mare cantitate existentă în afine. Dintre aceștia rutinul, acidul cafeic și acidul clorogenic nu au putut fi identificați în zmeură la fel ca acidul galic și acidul cafeic în coacăzele roșii.

Pentru acidul siringic și (+)-catechină s-a determinat cea mai mare cantitate existentă în coacăzele roșii, (+)-catechina neregăsindu-se în zmeură.

### **Concluzii**

Dintre cele trei fructe analizate, polifenolii totali au prezentat cea mai mare cantitate în afine, urmate de zmeură și apoi coacăze roșii. Totalul compușilor fenolici analizați a fost determinat în cantitatea cea mai mare în afine, fiind urmat de coacăze roșii și apoi zmeură. Deci, compușii fenolici determinați în coacăzele roșii prezintă o pondere mai mare din polifenolii totali decât în zmeură sau afine și zmeura prezintă ponderea cea mai mică de compuși fenolici analizați dintre cele trei fructe analizate.

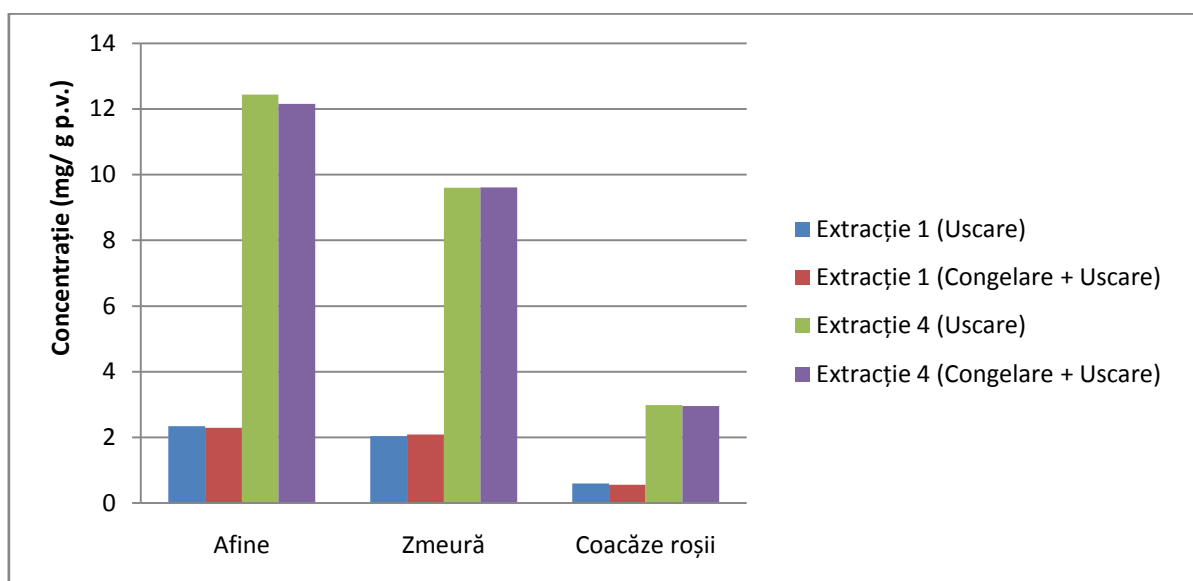
Extracțiile folosite au fost extracția 1 și extracția 4. Cantitatea cea mai mare de polifenoli totali a fost extrasă prin extracția 4, extracția 1 fiind considerată mai selectivă. Din punct de vedere al compușilor fenolici analizați, quercetinel, acidul cinamic și resveratrolul au prezentat o cantitate mai mare prin extracția 1, iar rutinul, acidul galic, acidul siringic, acidul cafeic, acidul ferulic, (+)-catechina și acidul clorogenic prin extracția 4. Acestea fiind extracțiile propice pentru compușii analizați.

## ***Analiza comparativă a metodelor de conservare a fructelor***

### ***Dozarea spectrofotometrică a polifenolilor totali***

Am comparat cantitatea de polifenoli totali obținută pentru conservarea fructelor prin congelare apoi uscare respectiv uscare imediat după recoltare în funcție de tipul de extracție.

Din figura 10 se poate observa că în analiza afinelor pentru ambele extracții cantitatea de polifenoli totali este mai mare în cazul conservării prin uscare imediat după recoltare decât prin conservarea prin congelare și apoi uscare, diferențele dintre acestea nu depășesc 0,28 mg/g p.v. În cazul zmeurei, se observă o ușoară creștere a cantității de polifenoli totali pentru ambele extracții ale fructelor congelate și apoi uscate față de cele uscate imediat după recoltare, diferențele fiind mai mici decât cele înregistrate în cazul afinelor, valoarea lor nedepășind 0,06 mg/g p.v. Coacăzele roșii prezintă diferențe mai mici de 0,04 mg/g p.v., conservarea prin uscare imediat după recoltare prezentând valorile superioare în cazul ambelor tipuri de extracții (Fig. 10).



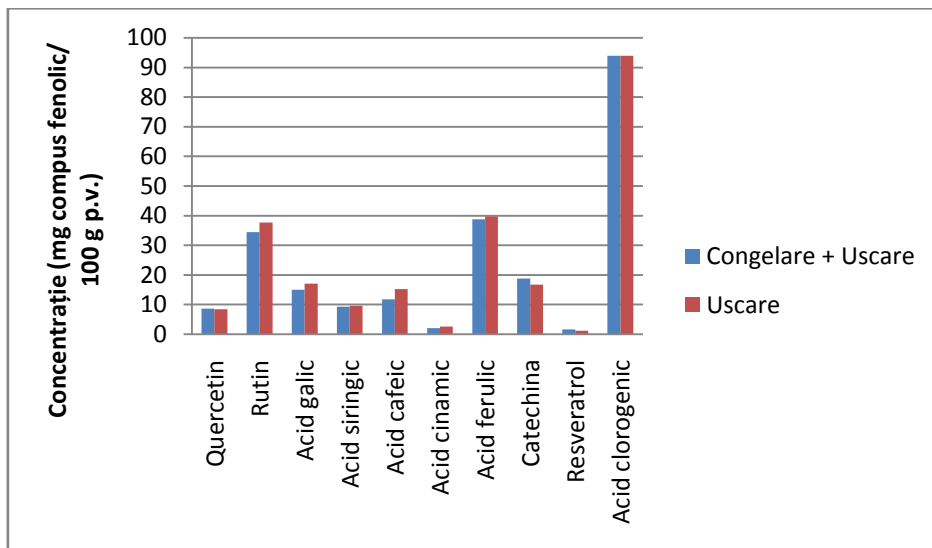
**Figura 10.** Concentrația polifenolilor totali a fructelor în funcție de extracție și modul de conservare

### ***Identificarea și cuantificarea compușilor fenolici prin metoda HPLC***

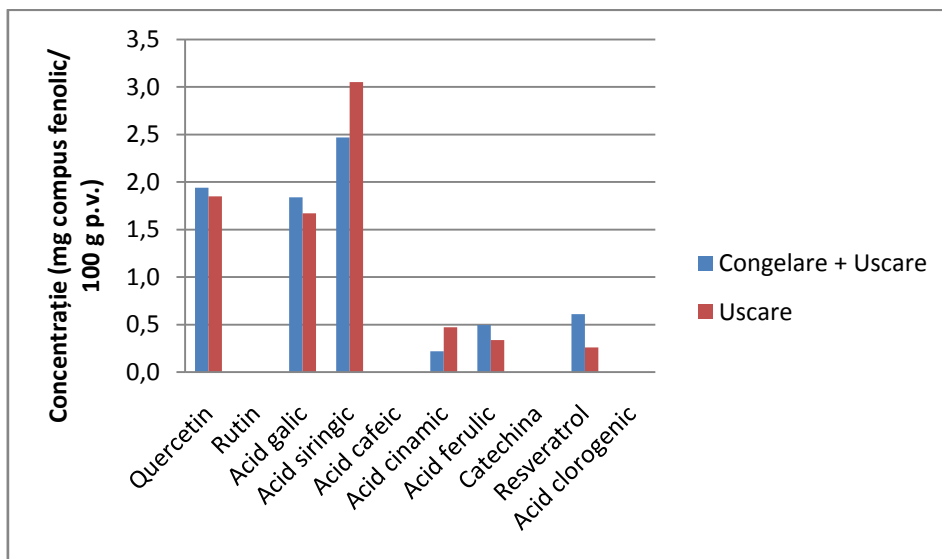
Valorile utilizate pentru efectuarea comparației au fost cele identificate ca fiind propice pentru cuantificarea fiecărui compus fenolic în parte prin intermediul analizelor efectuate.

Se poate observa că variațiile compușilor fenolici analizați în ceea ce privește cele două metode de conservare utilizate sunt minore pentru toate cele trei fructe analizate (Fig. 11-13).

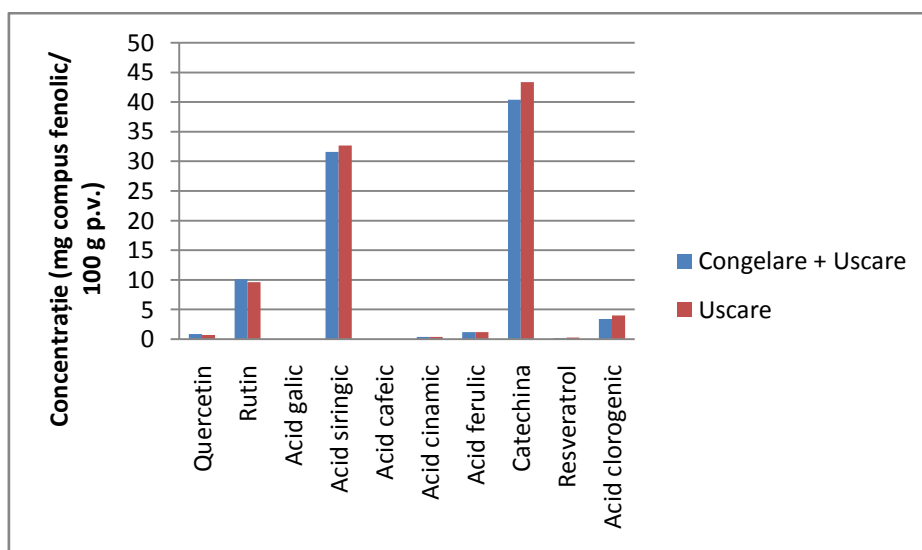




**Figura 11.** Concentrația compușilor fenolici din afine în funcție de modul de conservare



**Figura 12.** Concentrația compușilor fenolici din zmeură în funcție de modul de conservare



**Figura 13.** Concentrația compușilor fenolici din coacăze roșii în funcție de modul de conservare

### **Concluzii**

Analiza a fost efectuată pentru polifenolii totali atât pentru extracția 1 cât și pentru extracția 4 pentru a se putea observa similitudinea între rezultatele ambelor metode de conservare pentru ambele extracții de interes. Valorile comparate pentru cele două metode de conservare în cazul compușilor fenolici au fost cele specifice pentru metodele de extracție identificate ca fiind propice pentru fiecare compus analizat.

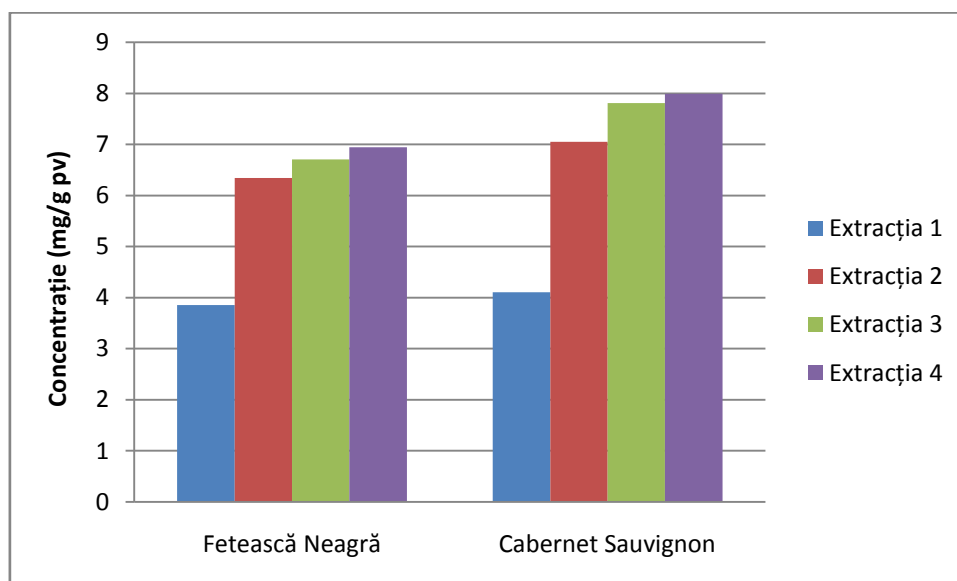
În cazul polifenolilor totali, deși nu s-a putut identifica o concordanță între tipul de extracție și metoda de conservare utilizate, se poate concluziona faptul că fructele de afine, zmeură și coacăze roșii prezintă stabilitate ridicată la congelare datorită diferențelor foarte mici existente între valorile obținute între cele două metode de conservare.

O concordanță între compusul fenolic analizat și metoda de conservare nu s-a putut identifica nici în cazul compușilor fenolici identificați și cuantificați. De asemenea, diferențele foarte mici dintre metodele de conservare determinate pentru fiecare compus fenolic în parte ne duc la concluzia că din punct de vedere al compușilor fenolici determinați, fructele analizate sunt stabile la procesul de congelare.

### **Analiza extractelor obținute din produse secundare ale procesului de vinificație**

#### **Dozarea spectrofotometrică a polifenolilor totali**

Concentrația maximă de polifenoli totali (exprimați în mg acid galic)/g p.v. regăsită în probele analizate s-a înregistrat pentru extracția 4, aceasta fiind urmată de extracția 3, apoi extracția 2 și concentrația cea mai mică s-a regăsit pentru extracția 1 (Fig. 14).



**Figura 14.** Concentrația polifenolilor totali a tescovinei fermentate

Ambele tipuri de tescovină au prezentat valori între 3 și 5 mg polifenoli totali (exprimați în mg acid galic)/g p.v. pentru extracția 1 și valori între 6 și 8 mg polifenoli totali (exprimați în mg acid galic)/g p.v. pentru extracțiile 2, 3 și 4.

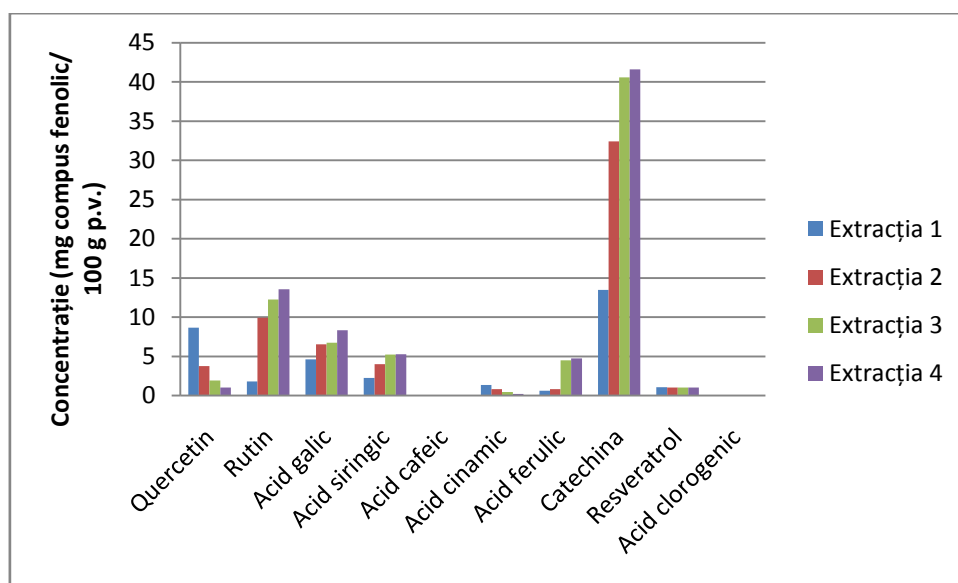
Varietatea de tescovină Cabernet Sauvignon a prezentat 4,10 mg polifenoli totali (exprimați în mg acid galic)/g p.v. pentru extracția 1 și 7,99 mg polifenoli totali (exprimați în mg acid galic)/g p.v. pentru extracția 4, iar varietatea Fetească Neagră 3,85 mg polifenoli totali

(exprimați în mg acid galic)/g p.v. pentru extracția 1 și 6,95 mg polifenoli totali (exprimați în mg acid galic)/g p.v. pentru extracția 4 (Fig. 14).

### ***Identificarea și cuantificarea compușilor fenolici prin metoda HPLC***

Cantitatea cea mai mare de rutin, acid galic, acid siringic, acid cafeic, acid ferulic, (+)-catechină și acid clorogenic a fost extrasă cu ajutorul extracției 4. Se poate observa o scădere a cantității acestor compuși de la extracția 4 spre extracția 1, extracția 4 fiind extracția unde s-a extras cea mai mare cantitate din acești compuși iar extracția 1, cantitatea cea mai mică (Fig. 15).

Quercetinul, acidul cinamic și resveratrolul sunt compușii care au prezentat cea mai mare cantitate cu ajutorul extracției 1. Pentru acești compuși se poate observa o scădere a cantității de compus fenolic de la extracția 1 spre extracția 4.

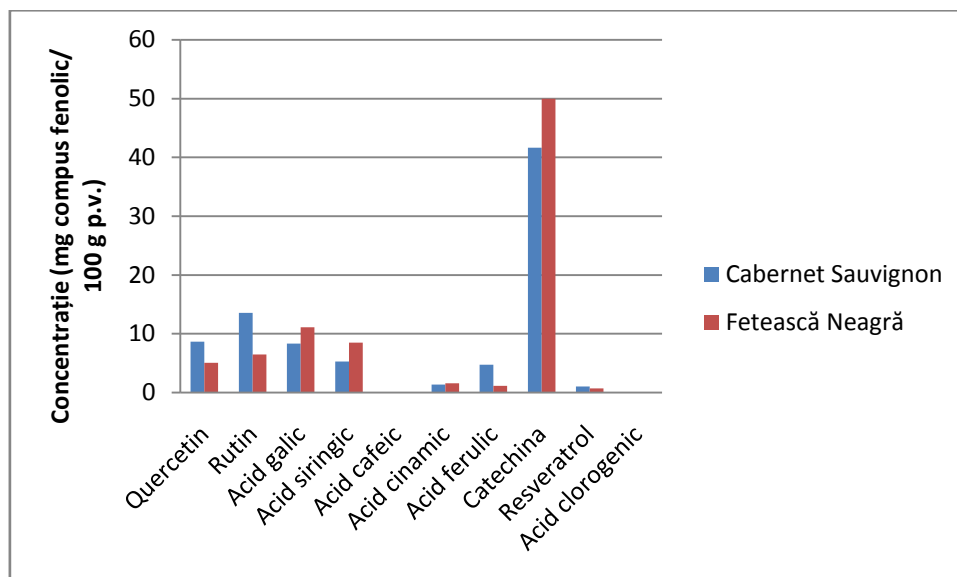


**Figura 15.** Concentrația compușilor fenolici din tescovina fermentată varietatea Cabernet Sauvignon

Tescovina fermentată varietatea Cabernet Sauvignon a prezentat o cantitate de 41,63 mg/100g p.v. de (+)-catechină și 13,57 mg/100g p.v. de rutin. Quercetinul, acidul galic, acidul siringic, acidul ferulic, acidul cinamic și resveratrolul au prezentat cantități între 1 și 10 mg/100g p.v. Acidul cafeic și acidul clorogenic nu au fost identificați în acest produs vegetal. Aceste valori au fost determinate pentru extracția propice fiecărui compus.

Comportamentul compușilor fenolici extrași din tescovina roșie fermentată, varietatea Fetească Neagră, în funcție de tipul de extracție, este similar cu a tescovinei fermentate varietatea Cabernet Sauvignon, astfel vor fi amintite valorile maxime obținute în funcție de tipul de extracție identificat.

(+)-Catechina este compusul cu cea mai mare cantitate din tescovina fermentată varietatea Fetească Neagră. Acesta prezintă 49,96 mg/100g p.v. iar acidul galic 11,09 mg/100g p.v. Acidul siringic, rutinul, quercetinul, acidul cinamic, acidul ferulic și resveratrolul au prezentat cantități mai mici de 10 mg/100g p.v. Acidul cafeic și acidul clorogenic nu au fost identificați (Fig. 16).



**Figura 16.** Concentrația compușilor fenolici din tescovina fermentată

Din figura 16 se poate observa că ambele varietăți de tescovină fermentată nu prezintă acid cafeic sau acid clorogenic. Quercetinel, rutinul, acidul ferulic și resveratrolul au prezentat valori mai mari în tescovina fermentată varietatea Cabernet Sauvignon, iar acidul galic, acidul siringic, acidul cinamic și (+)- catechina în varietatea Fetească Neagră.

### **Concluzii**

Dintre cele două varietăți de tescovină fermentată analizate, cantitatea cea mai mare atât de polifenoli totali cât și de compuși fenolici totali analizați a fost determinată în varietatea Cabernet Sauvignon, valorile fiind apropiate.

Metodele de extracție propuse au fost utilizate pentru a o determina pe cea mai potrivită pentru extracția polifenolilor totali, respectiv compușilor fenolici de interes din tescovina fermentată. Astfel extracția 4 a fost determinată a fi propice pentru extracția polifenolilor totali din tescovina fermentată, precum și a rutinului, a acidului galic, a acidului siringic, a acidului ferulic și a (+)-catechinei. O scădere a cantității acestor compuși a fost observată de la extracția 4 spre extracția 1, care a prezentat cantitatea cea mai mică din acești compuși.

În ceea ce privește quercetinel, acidul cinamic și resveratrolul, acești compuși au prezentat cantitatea cea mai mare prin extracția 1, observându-se o scădere a cantității acestor compuși spre extracția 4.

Acidul cafeic și acidul clorogenic nu au fost determinați în analiza tescovinei fermentate.

## **Capitolul VII - Descrierea și alegerea variantei optime în obținerea suplimentelor alimentare cu un conținut optim de compuși fenolici.**

Pentru a putea realiza un supliment alimentar care să satisfacă nevoile și cerințele consumatorilor s-a efectuat un studiu pentru a se putea observa opinia publică în ceea ce privește definirea suplimentelor alimentare, modul de administrare preferat, efectele benefice asupra organismului uman și cunoștințele dobândite referitoare la efectele antioxidante și produsele care ar putea exercita acest efect (Frum 2015).

Studiul a fost realizat cu ajutorul unui chestionar (Anexa 13) care a fost aplicat pe 144 persoane din medii sociale diferite iar interpretarea rezultatelor a fost făcută cu programul IBM SPSS Statistics varianta 20 (Frum 2015).

În urma acestui studiu, s-a putut determina forma farmaceutică preferată a consumatorilor în care va putea lua naștere suplimentul alimentar care urmează să fie realizat. Astfel acest supliment alimentar poate fi condiționat în capsule, pentru a asigura o complianță superioară a consumatorilor.

Din analizele efectuate pentru cele 3 tipuri de fructe și cele 2 tipuri de tescovină evidențiate în capitolul 6, se poate determina varianta optimă de materie primă care urmează să fie folosită pentru obținerea unui supliment alimentar cu efect antioxidant. Astfel am ales să asociem afinele, coacăzele roșii și tescovina (ambele variante) în proporții egale pentru a beneficia atât de o varietate mare de compuși fenolici individuali cât și o cantitate ridicată de polifenoli totali. Deși zmeura a prezentat o cantitate mai mare de polifenoli totali decât coacăzele roșii aceasta beneficiază de o varietate de compuși fenolici analizați mai restrânsă.

## **Capitolul VIII - Realizarea suplimentului alimentar**

### **Obținerea materiei prime**

Materia primă a fost obținută prin amestecarea produselor vegetale uscate și mărunțite. Păstrarea produselor vegetale, până la formarea materiei prime, a fost făcută prin uscare în curent de aer cald la 40° C pentru afine și coacăze roșii, iar tescovina roșie fermentată prin uscare la 20° C și apoi mărunțite.

Amestecarea a fost efectuată prin agitare energetică timp de 10 minute. Pulberea obținută poate fi descrisă ca o pulbere roșie- maronie (Fig. 72), cu miros și gust caracteristic.

Materia primă obținută a fost supusă unor analize pentru a determina dacă aceasta este adecvată pentru încapsulare.

### **Analiza materiei prime**

#### ***Distribuția mărimii particulelor***

Această analiză a fost efectuată cu ajutorul sitelor cu ochiuri de mărimi diferite. Aceasta fiind una dintre cele mai folosite metode pentru clasificarea pulberilor prin intermediul distribuției mărimii particulelor.

**Tabel 1.** Rezultate distribuția mărimii particulelor

Sita ( $\mu\text{m}$ )	Masa (g)	Masa (%)
710	4,25	4,27
224	94,93	95,36
125	0,37	0,37
90	0,00	0,00
63	0,00	0,00

Din analiza datelor obținute (Tab. 1), se poate concluziona că materia primă propusă este o pulbere grosieră, datorită faptului că 95,36% din masa adăugată a trecut prin sita cu ochiuri de 710  $\mu\text{m}$  și 0,37% prin sita cu ochiuri de 224  $\mu\text{m}$ .

### ***Proprietățile de curgere ale pulberii***

Pentru determinarea proprietăților de curgere ale pulberilor se pot folosi mai multe metode. Cea mai folosită este reprezentată de calcularea indicelui Carr sau indicele de compresibilitate și a raportului Hausner.

**Tabel 2.** Rezultate proprietăți de curgere

Număr bătăi	Volum citit (mL)	Indice Carr	Raport Hausner
0	208	14,71%	1,17
10	184		
500	174		
1000	174		

Curgerea materiei prime analizate este considerată bună conform rezultatelor obținute (Tab. 2). Acest parametru arată proprietatea curgerii materiei prime, astfel încapsularea poate fi realizată fără a întâmpina probleme sau fără ca materia primă să fie amestecată cu excipienți care îmbunătățesc aceste proprietăți.

### ***Dozarea polifenolilor totali***

Probele au fost realizate utilizând probe de materie primă, extrase prin intermediul extracțiilor 1 și 4. Dozarea spectrofotometrică a polifenolilor totali a fost realizată spectrofotometric.

Curba de calibrare și metoda de calcul folosite pentru interpretarea rezultatelor obținute prin intermediul acestei analize sunt expuse la analiza polifenolilor totali din fructe.

**Tabel 3.** Dozarea polifenolilor totali din materie primă

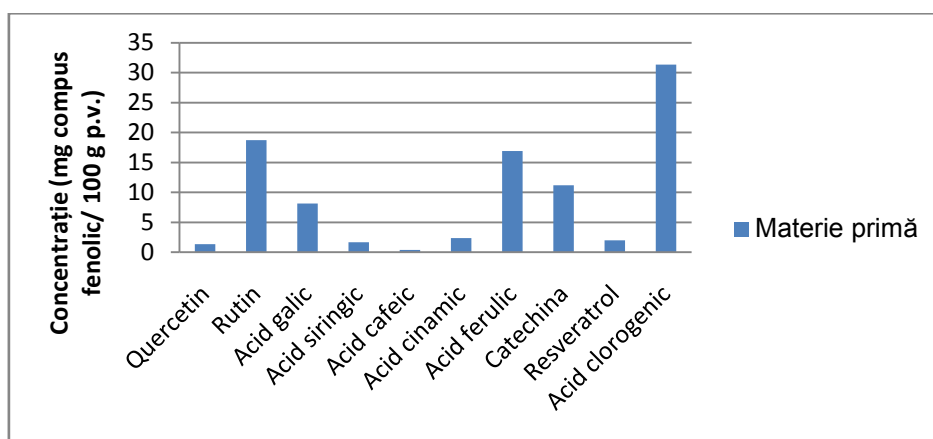
Absorbanță	Concentrație (mg/1000mL)	Concentrație (mg/g m.p.)
0,787	2,97	9,07

**Rezultate:** Materia primă obținută din amestecul de părți egale de afine, coacăze roșii și tescovină fermentată (varietățile Fetească Neagră și cabernet Sauvignon 1:1), prezintă o concentrație de polifenoli totali (exprimați în acid galic) de 9,07 mg/g materie primă (Tab. 3).

### ***Dozarea compușilor fenolici***

Extracția 1 a fost folosită pentru analiza quercetinului, acidului cinamic și resveratrolului. Extracția 4 pentru analiza rutinului, acidului galic, acidului siringic, acidului cafeic, acidului ferulic, (+)-catechinei și acidului clorogenic.

Cantitatea cea mai însemnată dintre compușii fenolici determinați în materia primă obținută a reprezentat-o acidul clorogenic, având o cantitate de 33,37 mg / 100g materie primă (m.p.). Valori între 10 și 20 mg/ 100g m.p. au prezentat rutinul, acidul ferulic și (+)-catechina cu 19,89 mg/100g m.p., 17,98 mg/100g m.p. respectiv 11,87 mg/100g m.p. Acidul galic, acidul cinamic, resveratrolul, acidul siringic, quercetinul și acidul cafeic au prezentat valori sub 10 mg/100g m.p. (Fig. 17).



**Figura 17.** Compușii fenolici analizați din materia primă

**Rezultate:** Din cantitatea totală de compuși fenolici analizați acidul clorogenic a prezentat 33,53%, rutinul 19,98%, acidul ferulic 18,06%, (+)- catechina 11,93%, acidul galic 8,72%, acidul cinamic 2,53%, resveratrolul 1,62%, acidul siringic 1,8%, quercetinul 1,43% și acidul cafeic 0,40%.

### ***Obținerea produsului finit***

#### ***Încapsularea***

Pentru umplerea capsulelor tari se folosește un dispozitiv special pentru acest proces care este format dintr-un schelet metalic pe care sunt fixate diferite plăci: placa de exercitare a presiunii, placa de ghidare a capsulelor și placa de acoperire (Leucuța, și alții 2010).

### ***Analiza produsului finit***

#### ***Masa medie și uniformitatea masei***

#### **Cerințe:**

Masa medie a capsulelor pline trebuie să se încadreze în intervalul 820,0 mg/cps.  $\pm$  7,5% (758,5 – 881,5 mg/cps.).

Masa medie a conținutului capsulelor trebuie să se încadrează în intervalul 700,0 mg/cps.  $\pm$  7,5% (647,5 - 752,5 mg/cps.).

Cel puțin 18 capsule au o abatere de maxim  $\pm$  7,5% față de masa medie determinată și cel mult 2 capsule pot avea o abatere de maxim  $\pm$  15% față de masa medie determinată.

**Tabel 4.** Rezultatele analizei masei medii

	<b>Capsula plină (mg)</b>	<b>Conținut capsulă (mg)</b>
<b>Medie</b>	822,95	704,4

**Rezultat:** Capsulele analizate corespund din punct de vedere al masei medii și a uniformității masei, rezultatele obținute încadrându-se în intervalele declarate (Tab. 4).

### ***Dezagregare***

Acest test este realizat pentru determinarea timpului necesar descompunerii capsulelor în particule mici la introducerea acestora într-un mediu lichid, prezentând parametri indicați în monografia capsulelor corespunzătoare (European Pharmacopoeia 2014).

**Cerințe:** Testul este conform, dacă timpul de dezagregare este de maxim 30 minute, pentru toate comprimatele (6 comprimate). Dacă 1 sau 2 comprimate nu s-au dezagregat complet, testul se repetă pe încă 12 comprimate. Testul îndeplinește criteriile de acceptanță dacă minim 16 din 18 comprimate s-au dizolvat în 30 de minute.

**Rezultat:** Dezagregarea capsulelor s-a realizat în mai puțin de 3 minute, acestea fiind conforme din punct de vedere al dezagregării.

#### **Dozare polifenoli totali**

500 mg pulbere produs finit, obținută prin triturarea conținutului a 20 de capsule se extrag și se analizează spectrofotometric.

Rezultatele obținute se întâlnesc în tabelul 5.

**Tabelul 5.** Dozarea polifenolilor totali din materie primă

Absorbanță	Concentrație (mg/1000mL)	Concentrație (mg/capsulă)
0,812	3,06	6,60

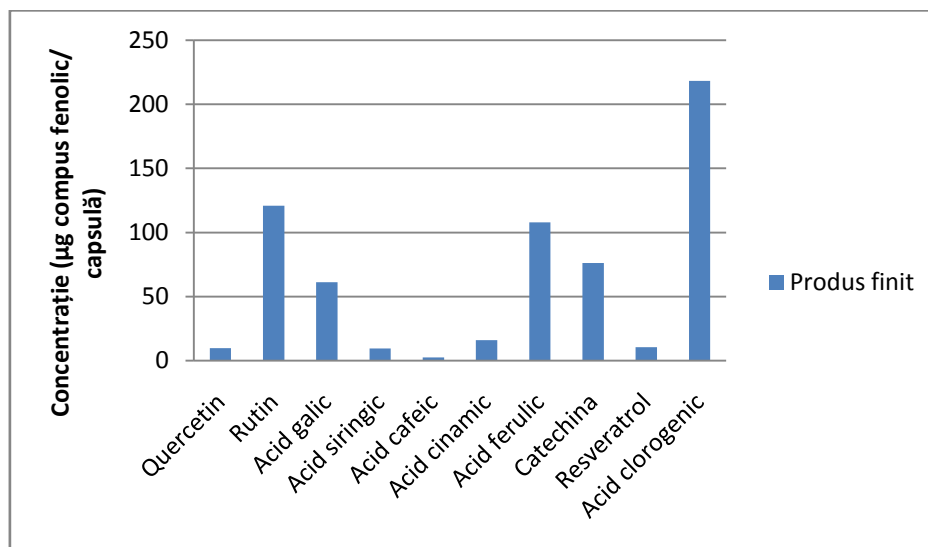
**Cerințe:** Cantitatea de polifenoli totali (exprimați în acid galic) trebuie să fie 6,50 mg/capsulă ± 10% (5,85 - 7,15 mg/capsulă).

**Rezultate:** Cantitatea de polifenoli totali (exprimați în acid galic) analizată în produsul final este de 6,60 mg/capsulă, rezultatul fiind conform.

#### **Dozare compuși fenolici**

500 mg pulbere produs finit, obținută prin triturarea conținutului a 20 de capsule se extrag conform extracțiilor 1 și 4 și se analizează prin metoda HPLC.

Rezultatele obținute sunt reprezentate în figura 18.



**Figura 18.** Compușii fenolici analizați din produsul finit

Extracția 1 a fost folosită pentru analiza quercetinului, acidului cinamic și resveratrolului. Extracția 2 pentru analiza rutinului, acidului galic, acidului siringic, acidului cafeic, acidului ferulic, (+)-catechinei și acidului clorogenic.



Cantitatea cea mai însemnată dintre compușii fenolici determinați în produsul finit obținut a reprezentat-o acidul clorogenic, având o cantitate de 218,33 μg / capsulă. Valori între 100 și 200 μg / capsulă au prezentat rutinul și acidul ferulic cu 121,03 μg / capsulă, respectiv 107,75 μg / capsulă. (+)-Catechina, acidul galic, acidul cinamic, resveratrolul, acidul siringic, quercetinul și acidul cafeic au prezentat valori sub 100 μg / capsulă.

**Cerințe:** Din cantitatea totală de compuși fenolici analizați/ capsulă acidul clorogenic trebuie să fie peste 30,00%, rutinul și acidul ferulic peste 15,00%, (+)- catechina și acidul galic peste 7,00%, acidul cinamic, resveratrolul, acidul siringic și quercetinul peste 1,40% și acidul cafeic peste 0,40%.

**Rezultate:** Din cantitatea totală de compuși fenolici analizați/ capsulă acidul clorogenic a prezentat 34,51%, rutinul 19,13%, acidul ferulic 17,03%, (+)- catechina 12,04%, acidul galic 9,66%, acidul cinamic 2,54%, resveratrolul 1,65%, acidul siringic 1,50%, quercetinul 1,55% și acidul cafeic 0,40%, rezultatele fiind conforme.

#### ***Raport de validarea al metodei de analiză a compușilor fenolici***

Acest raport a fost realizat conform normelor în vigoare și certifică validitatea metodei de analiză pentru identificarea și cuantificarea compușilor fenolici de interes (Bliesner 2006).

Parametri analizați au fost specificitatea metodei, precizie, liniaritate, testarea conformității sistemului cromatografic, stabilitatea soluțiilor și robustețea metodei.

#### ***Suplimentul alimentar obținut în raport cu alte produse cu efect antioxidant***

Produsul dezvoltat în această lucrare este un produs 100% natural, care nu conține coloranți sau conservanți. De asemenea este un produs care nu conține lactoză, astfel fiind indicat și persoanelor care prezintă intoleranță la acest compus.

Materia prima fiind constituită din fructe uscate și mărunțite, respectiv din produse secundare a procesului de vinificație uscate și mărunțite, nu pune problema existenței unor solvenți reziduali toxici care ar putea rămâne în produs în urma extracției principiilor active.

Conținutul atât în polifenoli totali, cât și în anumiți compuși fenolici, cum ar fi: acidul galic, (+)-catechina, acidul siringic, acidul cinamic, resveratrolul, acidul clorogenic, acidul cafeic, acidul ferulic, rutinul și quercetinul, este bine cunoscut, astfel putându-se identifica cu exactitate doza ingerată din fiecare compus în parte.

### **Capitolul IX - Concluzii și perspective**

#### **Concluzii finale**

Plantele au fost folosite încă de la începutul omenirii, acestea fiind singurele metode de a întreține starea de sănătate și de a ameliora starea de boală. Folosirea remediilor naturiste în prezent pentru profilaxia și tratamentul anumitor afecțiuni arată eficacitatea mărită a produselor naturale în creșterea calității vieții.

Astfel s-au analizat trei tipuri de fructe: afinele (*Vaccinium myrtillus* L.), zmeura (*Rubus idaeus* L.) și coacăza roșie (*Ribes rubrum* L.), și un produs secundar din procesul de vinificație: tescovina roșie, fermentată, varietatea Cabernet Sauvignon și Fetească Neagră (*Vitis vinifera* L.).

Conservarea produselor vegetale a fost realizată prin congelare apoi uscare sau uscare imediată după recoltare în cazul fructelor, iar tescovina a fost uscată, mărunțită și apoi congelată.

Astfel s-a determinat faptul că din punct de vedere al polifenolilor și compușilor fenolici analizați, cele două tipuri de conservare aplicate fructelor nu influențează cantitatea acestora.

Izolarea compușilor de interes a fost efectuată prin intermediul a patru tipuri de extracții. Astfel cantitatea cea mai mare de polifenoli totali a fost extrasă cu ajutorul extracției 4, urmată de extracția 3, apoi 2 iar cantitatea cea mai mică a fost determinată prin extracția 1, aceasta fiind cea mai selectivă.

În ceea ce privește compușii fenolici analizați s-a observat că pentru quercetin, acid cinamic și resveratrol extracția propice este extracția 1 și pentru rutin, acid galic, acid siringic, acid cafeic, acid ferulic, (+)-catechină și acid clorogenic, extracția 4.

Toate produsele analizate prezintă compuși cu proprietăți antioxidante și pot fi folosite pentru efectele acestora benefice asupra organismului.

Pentru realizarea suplimentului alimentar propus s-au realizat o serie de operații și analize premergătoare.

Materia primă utilizată a fost realizată din pulberi uscate de afine (*Vaccinium myrtillus* L.), coacăze roșii (*Ribes rubrum* L.) și un amestec 1:1 de tescovină fermentată roșie varietatea Cabernet Sauvignon și Fetească Neagră (*Vitis vinifera* L.). Aceasta a fost analizată din punct de vedere al distribuției mărimii particulelor, proprietăților de curgere și dozare a polifenolilor totali și a compușilor fenolici.

Încapsularea materiei prime a fost realizată în capsule tari, iar analiza acestora a constat în analizele farmacotehnice: masa medie a capsulelor pline și a conținutului capsulelor și dezagregare și dozarea polifenolilor totali și compușilor fenolici.

Metoda HPLC de dozare a compușilor fenolici a fost validată pentru analiza produsului finit. Validarea metodei a fost realizată din punct de vedere al specificității, preciziei, linearității, conformității sistemului, stabilității soluțiilor și a robusteții.

Suplimentul alimentar astfel obținut este comparabil cu suplimente alimentare deja existente pe piața românească, avantajele majore ale acestuia fiind faptul că este 100% natural, nu conține coloranți sau conservanți și poate fi administrat persoanelor care prezintă intoleranță la lactoză.

### **Contribuții personale**

Contribuțiile personale regăsite în această lucrare constau în:

- Identificarea și cuantificarea unor compuși fenolici din produse vegetale autohtone.
- Identificarea unor metode de extracție propice pentru compușii fenolici analizați.
- Dezvoltarea unei metode de analiză HPLC, calitativă și cantitativă a zece compuși fenolici cu potențial bioactiv regăsiți în produse vegetale autohtone.
- Validarea metodei de analiză HPLC.
- Obținerea unui supliment alimentar cu proprietăți bioactive 100% natural din produse vegetale autohtone.
- Valorificarea unor produse secundare din industria vinului pentru obținerea de suplimente alimentare.
- Aplicarea metodei de analiză HPLC pentru analiza suplimentului alimentar obținut.

### **Perspectivă de continuare a cercetărilor**

În continuarea cercetărilor propun următoarele subiecte:

- Înaintarea unui dosar de notificare în ceea ce privește suplimentul alimentar obținut, către Institutul Național de Cercetare- Dezvoltare pentru Bioresurse Alimentare, în vederea punerii pe piață a acestuia. Datele necesare întocmirii dosarului se regăsesc în această teză de doctorat.
- Analiza altor produse vegetale cu potențial bioactiv cu ajutorul metodelor descrise în această teză.
- Determinarea altor metode de analiză a potențialului bioactiv din produsele vegetale propuse.
- Valorificarea altor produse secundare pentru obținerea de suplimente alimentare cu potențial bioactiv.

## Bibliografie selectivă

- \*\*\*. *European Pharmacopoeia*. 8. Strasbourg Cedex: The Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare of the Council of Europe (EDQM), 2014.
- Banu, C. (coordonator). *Alimente funcționale, suplimente alimentare și plante medicinale*. București: ASAB, 2010.
- Baruah, J.B. *Chemistry of Phenolic Compounds. State of the Art*. New York: Nova Science, 2011.
- Bliesner, D. *Validating chromatographic methods, A Practical Guide*. New Jersey: Wiley-Interscience, 2006.
- Frum, A. „Percepția consumatorilor asupra suplimentelor alimentare și a efectelor antioxidante.” În *Proceedings of the International Conference "Humanities and Social Sciences Today. Classical and Contemporary Issues": Economics*, de A.P., Gâlea, M. Haller, 53-76. București: Pro-Universitaria, 2015.
- Iacopini, P., Baldi M., Stoechi P., Sebastian L. „Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions .” *Journal of Food Composition and Analysis*, nr. 21 (2008): 589-598.
- Leucuța, S., M. Achim, I. Tomuță, A. Porfire, și R. Iovanov. *Tehnologie Farmaceutică Industrială. Procedee de laborator*. 2. Cluj-Napoca: Editura Medicală Universitară ”Iuliu Hațieganu”, 2010.
- Mehta, A. *Plants as a source of natural antioxidants*. Editor N.K. Dubey. Croydon: CAB International, 2015.
- Pandey, K.B., și S.I. Rizvi. „Biological Activity and Mechanism of Action of Plant Polyphenols: Relevance to Human Health and Disease.” În *Phytochemicals and Human Health. Pharmacological and Molecular Aspects*, de A.A. Farooqui și T. Farooqui, 483-500. New York: Nova Science Publishers, 2011.
- Pârvu, C. *Universul plantelor, Ediția a IV-a*. București: ASAB, 2006.
- Pour Nikfardjam, M.S., G. Laszlo, și H. Dietrich. „Resveratrol-derivatives and antioxidative capacity in wines made from botrytized grapes.” *Food Chemistry* 96 (2006): 74-79.
- Tița, O. *Obținerea vinurilor speciale și a distilatelor din vin*. Sibiu: Editura Universității "Lucian Blaga", 2002.
- Xu, Z. *Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals. In: Important Antioxidant Phytochemicals*. Editor Z. Xu și L.R. Howard. Chichester: Wiley-Blackwell, 2012.
- Yanez, A.J., și alții. *Flavonoid pharmacokinetics. Methods of analysis, preclinical and clinical pharmacokinetics, safety and toxicology*. Editor N.M Davies și J.A. Yanez. Hoboken: John Wiley and Sons, Inc., 2013.