



UNIVERSITATEA
LUCIAN BLAGA
— DIN SIBIU —

Școala doctorală: Științe Inginerești și Matematică
Domeniul de doctorat: Inginerie Industrială

TEZĂ DE DOCTORAT

CERCETĂRI PRIVIND ANALIZA ȘI AUTENTIFICAREA UNOR PRODUSE DIN PRODUȚIA DE ALIMENTE

Doctorand:

Ing.chim. CORINA TEODORA CIUCURE

Conducător de doctorat:

Prof. univ.dr. ing. OVIDIU TIȚA

SIBIU 2023



SUMAR	I
CUPRINS	III
LISTA NOTAȚIILOR ȘI SIMBOLURILOR UTILIZATE	VIII
LISTA FIGURILOR	IX
LISTA TABELELOR	XII
INTRODUCERE	1
SCOPUL ȘI OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE ALE TEZEI DE DOCTORAT	3
CAPITOLUL 1	5
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Metodologiile curente de autentificare și control ale produselor alimentare	
Mierea de albine	5
Compoziție – notiuni generale	5
Metode de autentificare a mierii de albine.....	6
1.1.2.1. Testarea autenticității producției de miere.....	8
1.1.2.2. Recoltarea mierii necoapte.....	21
1.1.2.3. Manevrare și depozitare necorespunzătoare.....	22
1.1.2.4. Amestecarea mierii.....	23
1.1.2.6. Testarea autenticității originii mierii.....	23
Autentificarea mierii românești.....	28
Vinul	36
Compoziție – notiuni generale.....	36
Metode de autentificare a vinurilor.....	38
Diferențierea vinurilor în funcție de soi.....	40
Diferențierea vinurilor în funcție de anul de producție.....	41
Diferențierea vinurilor în funcție de originea geografică.....	42
Fructe de castan	44
Compoziție chimică.....	44
Principalele clase de compuși din compoziția fructelor de castan.....	45
2. Tehnici avansate de analiză și control al alimentelor	51
2.1. Cromatografia de lichide de înaltă performanță, HPLC-MS/MS.....	51
2.2. Spectrofotometria de absorbție în UV-VIS.....	55
2.3. Spectroscopia de absorbție atomică, AAS.....	57
CAPITOLUL 2	60
CONTRIBUȚII PERSONALE	
2. Profilul compușilor fenolici și proprietățile biochimice ale mierii în relație cu sursele florale din care provin	
2.1 Introducere	60
2.2 Materiale și metode.....	62
2.2.1. Produse chimice, soluții și materiale.....	62
2.2.2. Experimental.....	63
2.3 Analiza compușilor fenolici individuali	65
2.3.1 Izolarea compușilor fenolici din matricea de miere.....	65

2.3.2 Profilul compușilor fenolici prin UHPLC-DAD-ESI/MS.....	66
2.4 Proprietăți bioactive ale mierii.....	68
2.4.1 Conținutul total de polifenolici (TP).....	68
2.4.2 Conținutul total de flavonoizi (TF).....	68
2.4.3 Activitatea de captare a radicalilor liberi.....	69
2.4.4 Analize statistice.....	69
2.5 Rezultate și discuții.....	70
2.5.1 Optimizarea protocolului analitic utilizat pentru determinarea compușilor fenolici individuali.....	70
2.5.2 Determinarea acizilor fenolici și a flavonoizilor în mierea românească prin UHPLC–DAD-ESI/MS.....	71
2.6. Proprietăți bioactive ale mierii.....	78
2.7 Clasificarea florală a mierii folosind analiza multivariată a datelor.....	80
CAPITOLUL 3.....	83
Evaluarea mierii din punct de vedere al calității și autenticității pe baza modelului fizico-chimic, a compoziției majore a zahărului și a amprentei $\delta^{13}\text{C}$	
3.1 Introducere.....	83
3.2 Materiale și metode.....	87
3.2.1 Eșantionarea.....	87
3.2.2 Determinări analitice.....	87
3.2.2.1 Substanțe chimice și reactivi.....	87
3.2.2.2. Parametri fizico-chimici.....	88
3.2.2.3. Determinarea 5-hidroximetilfurfuralului (HMF).....	88
3.2.2.4. Determinarea compoziției de zaharuri.....	88
3.2.2.5. Determinarea raportului ai izotopilor stabili de carbon.....	89
3.2.2.6. Analiza statistică.....	89
3.3. Rezultate și discuții.....	90
3.3.1. Caracterizarea fizico-chimică a mierii.....	90
3.3.2. Caracterizarea izotopică a mierii $\delta^{13}\text{C}$	96
3.3.3. Caracterizarea siropurilor de zahăr.....	98
3.3.4 Autentificare miere prin analiză multivariată.....	102
3.3.4.1 Detectarea mierii adulterate cu zaharuri C4 si mieri neconforme.....	102
3.3.4.2 Originea botanică a probelor de miere.....	105
3.4. Concluzii.....	107
CAPITOLUL 4.....	109
Caracterizarea și clasificarea vinurilor pe baza determinării spectrofotometrice a proprietăților bioactive ale vinului	
4.1 Introducere.....	109
4.2 Materiale și metode.....	111
4.2.1 Produse chimice.....	111
4.2.2 Probe de vin.....	111
4.2.3 Investigații spectrofotometrice.....	112
4.2.4 Analiză statistică.....	113
4.3 Rezultate și discuții.....	114
4.3.1 Proprietăți biochimice (TP, TF, AA) ale vinurilor.....	114
4.3.2 Relația dintre grupele fenolice totale și flavonoizilor totali și activitățile antioxidante ale vinului.....	116
4.3.3 Analiza componentelor principale.....	117
4.4. Concluzii.....	119

CAPITOLUL 5.....	120
Compoziția profilului fitochimic și nutrițional în fructele diferitelor soiuri de castan dulce (Castanea Sativa MILL.)	
5.1 Introducere.....	120
5.2 Materiale și metode.....	124
5.2.1 Materialul vegetal și locul de prelevare.....	124
5.2.2 Standarde și reactivi.....	124
5.2.3 Protocoale de extracție.....	125
5.2.4 Determinări analitice.....	126
5.2.4.1 Determinarea conținutului total de fenolici (TP) și flavonoide totale (TF) și a activității antioxidante (AA) prin determinări spectrofotometrice UV-Vis.....	126
5.2.4.2 Profilul compușilor fenolici de la UHPLC-DAD-ESI/MS.....	126
5.2.4.3 Profilul zaharurilor de HPLC-ELSD.....	127
5.2.4.4 Determinarea conținutului elementar.....	128
5.2.5 Analiza datelor.....	128
5.3 Rezultate.....	128
5.3.1 Evaluarea polifenolicilor totali (TP), a flavonoidelor totale (TF) și a activității antioxidante (AA) a culturilor de castan.....	129
5.3.2 Analiza țintă UHPLC-MS/MS a biomarkerilor compușilor fenolici în culturile de castan investigate.....	131
5.3.3 Analiza nețintă UHPLC-MS/MS a biomarkerilor și a profilurilor metaboliților acestora în fructele diferitelor culturi de castan.....	138
5.3.4. Profilul zaharurilor diferitelor culturi de castan recoltate în doi ani.....	153
5.3.5. Compoziția macro și micronutrienților.....	156
5.4 Concluzii.....	160
CONCLUZII FINALE.....	162
CONTRIBUȚII PERSONALE.....	165
RECOMANDĂRI DE CONTINUARE A CERCETĂRILOR.....	166
REFERINȚE.....	166
ANEXE	

LISTA FIGURILOR

Figura 1: Stabilirea autenticității mierii.

Figura 2: Tipuri de falsificare a mierii, adulteranții tipici găsiți în miere, tehnicile de detectare și markerii specifici pentru fiecare tip de falsificare.

Figura 3: Principalele caracteristici fizico-chimice ale vinului.

Figura 4: Aplicarea principală a tehnicilor electroanalitice în analiza vinului

Figura 5: D-glucoza.

Figura 6: D-fructoza.

Figura 7: Zaharoza.

Figura 8: Lichid cromatograf de înaltă presiune cuplat cu spectrometru de masă UHPLC-MS-ESI (ICSI Rm.Vâlcea).

Figura 9: Spectrofotometru de absorbție moleculară SPECORD 250 PLUS (ICSI Rm.Vâlcea).

Figura 10: Spectrofotometru de absorbție atomică NOVAA 300 (ICSI Rm.Vâlcea).

Figura 11: Schema bloc a procedurilor analitice aplicate probelor de miere.

Figura 12: Schema de preparare a probelor de miere în vederea izolării compușilor fenolici.

Figura 13: Cromatograma picurilor de baza a soluției standardelor de compuși fenolici (A) și a extractului apos din miere de rapiță (B): 1- acid galic, acid 2-3,4-dihidroxibenzoic, 3-catechină, 4-acid 4-hydroxibenzoic, 5- acid clorogenic, 6-epicatechină, 7-acid cafeic, 8-acid syringic, 9-acid p-coumaric, 10-acid ferulic, 11-naringin, 12-rutin, 13-hesperitin, 14-t-resveratrol, 15-acid t-cinnamic, 16-myricetin, 17-quercetin, 18-kaempferol, 19-isorhamnetin, 20-apigenin, 21-pinocembrin, 22-galangin, 23-chrysin, 24-pinostrobin, 25-rhamnetin, 26-acid abscisic, 27-eriodictyol, 28-sakuranetin, 29-alpinetin, 30-pinobanskin, 31-3-O-acetat pinobanskin, 32-luteolin.

Figura 14: (A) Graficul scorurilor analizei componentelor principale (PCA) care arată separarea între tipurile de miere; (B) distribuția variabilelor generate dintr-un PCA cu matrice de corelație.

Figura 15: Dendrograma celor 33 de obiecte (28 de miere autentică și 5 mieri mixte) reprezentate prin profil de compuși fenolici și variabilele proprietăților bioactive obținute prin ierarhia lui Ward metoda de grupare (analiza cluster ierarhică)

Figura 16: Dendrograma celor 62 de eșantioane de miere (de la apicultori și comerciale) reprezentate prin variabile izotopice, obținute prin metoda de grupare ierarhică a lui Ward (HCA).

Figura 17: Dendrograma celor 62 de eșantioane de miere (autentice și comerciale) reprezentate prin parametri fizico-chimici generali, obținute prin metoda de grupare ierarhică a lui Ward (HCA).

Figura 18: Dendrograma celor 62 de eșantioane de miere (autentice și comerciale) reprezentate prin compoziția majoră a zahărului, obținută prin metoda de grupare ierarhică a lui Ward (HCA).

Figura 19: Diagrama procentelor din analiza componentelor principale (PCA) care arată separarea între tipurile de miere.

Figura 20: Conținutul total de polifenolici (TP) și capacitatea antioxidantă (AC) ale vinurilor roșii și albe, în funcție de anul de recoltă

Figura 21: Analiza componentelor principale (PCA) pentru vinurile roșii

Figura 22: Analiza componentelor principale (PCA) pentru vinurile albe

Figura 23: Activitatea antioxidantă (AA) exprimată în μ moli echivalenți Trolox/g, polifenoli totali (TP) exprimați în mg echivalenți GAE/g și flavonoide totale (TF) exprimate în mg echivalenți de rutină/g din cele șase soiuri de castan timp de trei ani consecutivi

Figura 24: Corelație între: (a) Polifenolici totali cu activitate antioxidantă și (b) Flavonoizi totale cu activitate antioxidantă

- Figura 25.** Variația activității antioxidante (AA), polifenolici totali (TP) și flavonoide totale (TF) în fructele de castan din diferite soiuri dulci (Précoce Migoule -PM, Bournette - B, Marsol - MS, Marissard - MRS, Marigoule - MG și Maraval – MV) recoltate în 2015, 2016 și 2017. Litere mari diferite corespunzătoare barelor denotă diferențe conform testului Duncan $p \leq 0,05$
- Figura 26.** Profilul polifenolic al soiurilor de castan analizate recoltate în anii 2016 și 2017
- Figura 27.** Variația compușilor fenolici individuali (acid galic – GA, acid cinamic – CA și rutina – R) în fructele de castan din diferite soiuri dulci (Précoce Migoule -PM, Bournette - B, Marsol - MS, Marissard - MRS, Marigoule - MG și Maraval – MV) recoltate în 2015, 2016 și 2017. Litere mari diferite corespunzătoare barelor indică diferențe conform testului Duncan $p \leq 0,05$.
- Figura 28.** Analiza componentelor principale (PCA) a fructelor din diferite soiuri de castan pe baza compușilor fenolici individuali („Précoce Migoule”—PM, „Bournette”—B, „Marsol”—MS, „Marissard”—MRS, „Marigoule”—MG și „Maraval”—MV)
- Figura 29.** Dendrograma fructelor diferitelor soiuri de castan („Précoce Migoule”—PM, „Bournette”—B, „Marsol”—MS, „Marissard”—MRS, Marigoule—MG și „Maraval”—MV): C1, C2, C3 și C4—clase grupate după criterii de disimilaritate
- Figura 30.** Flux de lucru Metabolomics neîntit: Găsirea și identificarea diferențele dintre probe
- Figura 31.** Identificarea acizilor grași și a unor derivați din extractul de castan prin analiza UHPLC-Q-Exactive de înaltă precizie a precursorilor deprotonați și a ionilor de fragmentare ai componentelor specifice combinate cu prelucrarea datelor folosind software-ul Compound Discoverer
- Figura 32:** TIC și cromatogramele extrase ale principalilor acizi grași saturati (a) și nesaturați (b) identificați în extractul metanolic de castan (cromatogramele au fost extrase din TIC folosind o fereastră de precizie a masei de 5 ppm; modul ion negativ, scanare completă, vârf de bază în interval 75-1000 m/z) Figura 33: Cromatograma HPLC a extractului din fructele de soc.
- Figura 33:** TIC și cromatogramele extrase ale principalilor aminoacizi identificați în extractul metanolic de castan (cromatogramele au fost extrase din TIC folosind o fereastră de precizie a masei de 5 ppm; modul ion negativ, scanare completă, vârf de bază în intervalul 75-1000 m/z)
- Figura 34:** TIC și cromatogramele extrase ale principalilor hormoni vegetali gibereline identificați în extractul metanolic de castan (cromatogramele au fost extrase din TIC folosind o fereastră de precizie a masei de 5 ppm; modul ion negativ, scanare completă, vârf de bază în intervalul 75-1000 m/z)
- Figura 35:** (a) PCA bazată pe amprente UHPLC/MS-MS fitochimice și bioactive ale fructelor diferitelor soiuri de castan recoltate în 2016 și 2017 și (b) Dendrograma fructelor diferitelor soiuri de castan recoltate în 2017 („Précoce Migoule”—PM, „Bournette”—B, „Marsol”—MS, „Marissard”—MRS, „Marigoule”—MG și „Maraval”—MV)
- Figura 36:** (a) PCA pe baza acizilor grași și a unor derivați, amprente UHPLC/MS-MS ale fructelor diferitelor soiuri de castan recoltate în 2016 și 2017 și (b) Dendrograma fructelor diferitelor soiuri de castan recoltate în 2017 („Précoce Migoule”—PM, „Bournette”—B, „Marsol”—MS, „Marissard”—MRS, „Marigoule”—MG și „Maraval”—MV)
- Figura 37:** (a) Profilul zahărului soiurilor de castan analizate recoltate în 2016 și 2017; (b) Analiza componentelor principale (PCA) a fructelor diferitelor soiuri de castan pe bază de compuși fenolici individuali („Précoce Migoule”—PM, „Bournette”—B, „Marsol”—MS, „Marissard”—MRS, „Marigoule”—MG și „Maraval”—MV); (c)

Analiza PCA bazată pe compoziția de zahăr a fructelor de castan recoltate în unele țări europene.

Figura 38: Profilul mineral al soiurilor de castan analizate recoltate în 2016 și 2017: (a) Ca, Mg, Na și K; (b) Fe, Ni și Cu.

Figura 39: (a) Analiza PCA bazată pe compoziția minerală a fructelor diferitelor soiuri de castan recoltate în România în 2016 și 2017 („Précoce Migoule”—PM, „Bournette”—B, „Marsol”—MS, „Marissard”—MRS , „Marigoule”—MG și „Maraval”—MV) și (b) Analiza PCA bazată pe compoziția minerală a fructelor de castan recoltate în unele țări europene

LISTA TABELELOR

Tabelul 1: Rezumatul literaturii relevante referitoare la cele mai importante strategii utilizate pentru a detecta falsificarea mierii cu siropuri de zahăr.

Tabelul 2: Rezumat al literaturii relevante referitoare la cele mai importante strategii utilizate pentru autentificarea mierii în România.

Tabelul 3: Importanța mineralelor în organism.

Tabelul 4: Aplicații ale HPLC în domeniul alimentar.

Tabelul 5: Tipuri de HPLC și detectorii utilizați în analiza alimentelor.

Tabelul 6: Performanțe analitice ale metodei utilizate pentru cuantificarea compușilor fenolici individuali în miere.

Tabelul 7: Numărul picurilor, compușii țintă, timpii de retenție (T_R), masa exactă, masa precisă și acuratețea medie a masei (ppm).

Tabelul 8: Conținutul de acizi fenolici și flavonoizi (mg/kg) și proprietăți bioactive ale diferitelor mieri monoflore pure și amestecuri de miere [medie $\pm$ abatere standard, (minim-maxim)]

Tabelul 9: Parametrii fizico-chimici generali și compoziția majoră a zahărului mierii testate. Pentru fiecare parametru, valorile depășite (marcate cu roșu) nu au fost mediate

Tabelul 10: Rezumarea parametrilor fizico-chimici și izotopici de bază ai mierii românești

Tabelul 11: Parametrii fizico-chimici generali și compoziția majoră a zahărului mierii adulterate

Tabelul 12: Amprenta $\delta^{13}C$ a probelor de miere pură și falsificată

Tabelul 13: Semnătura izotopică $\delta^{13}C$ a mierii și proteinei extrase din miere cu conținut diferit de zahăr C4 (A%).

Tabelul 14: Principalele zaharuri, conținutul de HMF și parametrii $\delta^{13}C$ ai siropurilor de zahăr

Tabelul 15: Parametri fizico-chimici generali ai siropurilor de zahăr

Tabelul 16: Probele de vin investigate și notația specifică

Tabelul 17: Proprietăți bioactive ale vinului: conținutul total de polifenolici (TP), conținutul total de flavonoide (TF) și capacitatea antioxidantă (AC)

Tabelul 18: Matrice de corelație pentru proprietățile bioactive (conținutul total de polifenoli – TPC, conținutul total de flavonoide –TFC și capacitatea antioxidantă – AC) ale vinurilor roșii și albe

Tabelul 19: Date climatice pentru zona Râmnicu Vâlcea în perioada de studio (sursa datelor: www.rp5.ru (accesat la 7 februarie 2022)).

Tabelul 20: Date de performanță de calitate pentru profilul acizilor fenolici și a flavonoidelor prin UHPLC-MS/MS în modul de ionizare negativă

Tabelul 21: Rezultatele analizei cantitative a compușilor fenolici (valori medii $\pm$ abatere standard) în fructele diferitelor soiuri de castan dulce recoltate în anii 2016 și 2017 (mg/g DW).

Tabelul 22: Identificarea compușilor fitochimici bioactivi (flavonoide, calcone, terpenoide și sesquiterpenoide, hormoni vegetali gibereline), acizi organici, aminoacizi și unele

nucleozide din extractul de castan prin UHPLC-Q-Analiza de mare precizie a precursorilor și fragmentelor deprotonate componente specifice combinate cu prelucrarea datelor folosind software-ul Compound Discoverer.

Tabelul 23: Identificarea acizilor grași și a unor derivați din extractul de castan prin analiza UHPLC-Q-Exactive de înaltă precizie a precursorilor deprotonați și a ionilor de fragmentare ai componentelor specifice combinate cu prelucrarea datelor folosind software-ul Compound Discoverer

Tabelul 24: Conținutul de zahăr la diferite soiuri de castan recoltate în 2016 și 2017 (g/kg DW).

Tabelul 25: Condiții climatice (temperatură și precipitații) în principalele țări europene producătoare de castan și în România pe parcursul anilor de recoltare 2016 și 2017 conform <https://climateknowledgeportal.worldbank.org/>.

Tabelul 26: Conținutul de macro și micronutrienți în diferite fructe de castan (*Castanea sativa* Mill) recoltate în 2016 și 2017 (mg/100 g DW).

INTRODUCERE

La nivel internațional, chiar dacă preocupările privind caracterizarea fizico-chimică cât mai completă a unui produs sunt într-un stadiu avansat, utilizarea acestor informații pentru certificarea calității și naturaleții produselor alimentare, și în particular a produselor derivate din fructe, reprezintă încă un domeniu de frontieră. Utilizarea și combinarea mai multor variabile analitice – informații referitoare la compușii biologic activi (compuși fenolici, acizi organici, aminoacizi), zaharuri, micro și macronutrienții, amprenta izotopică pentru caracterizarea produselor naturale în scopul asigurării trasabilității și autenticității acestora, așa cum își propune prezentul proiect, reprezintă o problemă de un real interes.

Plantele sunt foarte importante deoarece conțin substanțe chimice folosite în industria farmaceutică, cosmetică, chimică dar și alimentație și agricultură. Foarte multe plante reprezintă rezerve deosebite pentru obținerea uleiurilor volatile, esențelor, aromelor, parfumurilor, rășinilor, coloranților, pesticidelor, cauciucului, medicamentelor și altor produse speciale.

Studiile arată că mai mult de 1500 de substanțe noi sunt descoperite în fiecare an în plante și multe din substanțele utilizate la prepararea medicamentelor au în compoziția lor compuși din plante. Dar foarte multe plante dispar și astfel se micșorează baza genetică a regnului vegetal pe glob, ceea ce a determinat valorificarea bazei genetice dar și identificarea unor noi surse de obținere a metaboliților de interes.

Un rol hotărâtor în evoluția plantelor îl au compușii primordiali (proteine, glucide și grăsimi) dar pe lângă aceștia se găsesc și produși secundari cum ar fi: terpenele, steroizii, antocianii, antrachinonele, fenolii și polifenolii. Produșii secundari se găsesc la unele plante, putând fi localizați în anumite organe sau țesuturi, într-un anumit moment al dezvoltării plantei sau într-un anumit moment de stres termic când planta este în pericol datorită prezenței unui dăunător. Obținerea acestor compuși poate să nu fie de importanță vitală pentru celulele care îi sintetizează, dar poate avea un rol primordial în creșterea și viabilitatea plantei ca tot unitar.

Plantele rămân principalele surse de extracție ale principiilor biologic active, deoarece multe substanțe secundare sunt importante din punct de vedere terapeutic și nu pot fi obținuți prin sinteză chimică, pentru că au structuri deosebite conținând atomi chirali de o importanță primordială în dezvoltarea plantei.

Consumatorului din ziua de azi, i se oferă o mare gamă de produse alimentare atât nutritive cât și non-nutritive care au potențialul de a îmbunătăți starea de sănătate a populației, precum și de a preveni sau reduce riscul apariției sau dezvoltării unor afecțiuni. În acest context, dieta

diversificată poate fi de o importanță majoră, pentru desfășurarea în parametrii normali a funcțiilor corpului uman, un rol deosebit revenind alimentelor de natură vegetală, cum sunt fructele. Fructele reprezintă o componentă importantă în dieta umană. În alimentația echilibrată se folosesc atât fructe cât și legume, iar compoziția chimică a acestora în ceea ce privește substanțele bioactive este foarte asemănătoare. Importanța fructelor și legumelor este recunoscută încă de la începuturi de către primii oameni care s-au ocupat cu agricultura.

În ultimul timp se acorda o atenție foarte mare alimentelor funcționale din materii prime tradiționale și tototdată se accentuează identificarea unor markeri relevanți care să ateste trasabilitatea și autenticitatea acestor produse, identificarea lor fiind posibilă prin metode UHPLC-MS/MS (Geană et al. 2020).

Pentru a consolida cunoștințele despre compoziția chimică și nutrițională a unor alimente (miere, vin și castane) și pentru a găsi caracteristici distinctive utile pentru autentificarea acestora oferind un avantaj economic important s-au urmărit compușii biologic activi (polifenoli totali, flavonoide totale și activitate antioxidantă) examinați prin metode spectrofotometrice UV-Vis, profilul compușilor fenolici UHPLC-MS/MS (acizi fenolici, flavonoide), împreună cu un UHPLC-MS/MS nețintă, profilul de screening, profilul glucidic (zaharoză, fructoză, glucoză, maltoză) prin HPLC-ELSD și compoziția în elemente minerale (Ca, Mg, Na, K, Fe, Pb, Ni, Cu, Cr) prin F-AAS în soiurile de castan studiate (Ciucure et al. 2022).

Un alt produs alimentar valoros îl reprezintă mierea de albine, care utilizată încă de secole demonstrează importanța în alimentația omului, cu efecte benefice inclusiv în domeniul sănătății fiind în același timp un antibacterian natural.

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE ALE TEZEI DE DOCTORAT

Teza de doctorat *”Cercetări privind analiza și autentificarea unor produse din producția de alimente”* urmărește identificarea și stabilirea unor markeri de origine prin dezvoltarea și implementarea unor metodologii de amprentare inovatoare cu aplicație directă în investigarea unor alimente tradiționale românești. Principalul obiect de studiu îl reprezintă produsele naturale, cu un accent aparte pe miere, vin și castane, având ca scop obținerea de date referențiale privind profilul lor compozițional, izotopic și proteic, care în combinație cu tehnici de analiză statistică multivariată pot conferi informații valoroase cu privire la calitatea și autenticitatea produselor.

Ca și obiective principale teza urmărește:

♦ Stabilirea celor mai utilizate metode analitice de autentificare a originii botanice și geografice a mierii și de identificare a adulterării în vederea identificării celei mai eficiente metode de distingere a fiecărei fraude posibile în special tehnici instrumentale avansate, inclusiv metode spectrometrice, spectroscopice și cromatografice cuplate cu interpretarea chimiometrică a datelor.

♦ Determinarea compoziției compușilor fenolici individuali din mierea de albine provenite din flora românească și utilizarea datelor analitice și a analizei statistice multivariate pentru diferențierea mierii de albine în funcție de origine botanice.

♦ Determinare completă a proprietăților fizico-chimice generale (conținutul de apă, °Brix, conductivitate electrică, aciditatea liberă, pH și conținutul de 5-hidroximetilfurfural (HMF)) a diferitelor tipuri de miere comercială sau de la distribuitori locali.

♦ Caracterizarea mierilor de albine pe baza compoziției majore a zahărului (fructoză, glucoză, zaharoză și maltoză) și evaluarea posibilității diferențierii acestora.

♦ Verificarea autenticității unor mieri de albine comerciale de diferite origini botanice (salcâm, polifloră, miere, floarea soarelui, rapiță și tei), disponibile pe piață, pe baza metodei izotopilor stabili ($\delta^{13}\text{C}$) și evaluarea posibilității de detectare a adaosurilor de siropuri de zahăr din plante C4 (ex. trestie și porumb) și confirmarea originii botanice.

♦ Investigarea proprietăților bioactive (conținutul fenolic total, flavonoizi totali și activitatea antioxidantă) ale diferitelor soiuri de vin roșu și alb românesc cu diferite perioade de îmbătrânire, folosind metode cantitative spectrofotometrice UV-Vis.

♦ Investigarea caracteristicilor bioactive (polifenoli totali, flavonoide totale și activitate antioxidantă) a șase soiuri de castan dulce.

♦ Investigarea profilului polifenolic individual (acizi fenolici, flavonoide), împreună cu profilul de screening UHPLC-MS/MS neșintă a soiurilor de castane analizate pentru a găsi markeri distinctivi utili pentru autentificarea unui anumit soi de castan.

♦ Investigarea profilului zahărului (zaharoză, fructoză, glucoză, maltoză) prin HPLC-ELSD și compoziția elementală (Ca, Mg, Na, K, Fe, Pb, Ni, Cu, Cr) prin F-AAS au fost determinate în soiurile de castan studiate pentru a completa informațiile despre compoziția nutrițională și bioactivă a celor șase soiuri.

♦ Studiarea influenței anului de recoltare asupra caracteristicilor bioactive și a conținutului de compuși bioactivi specifici din diferite soiuri de castane.

♦ Analiza componentelor principale (PCA) și analiza clusterelor ierarhice (HCA) au fost utilizate pentru a face distincția între diferitele soiuri dulci cultivate în România.

♦ Utilizarea izotopilor stabili ca markeri de origine în studiul calității și autenticității mierii de albine și a fructelor de castan și analiza statistică multivariată aplicată parametrilor rezultați

♦ Stabilirea de tehnici noi și precise pentru caracterizarea compozițională a mierii de albine esențiale datorită calităților lor nutritive și terapeutice, prin dezvoltarea unei metode analitice inovative ce va permite verificarea obiectivă a calității, autenticității și trasabilității produselor alimentare

Elementele de noutate ale tezei de doctorat intitulată *"Cercetări privind analiza și autentificarea unor produse din producția de alimente"* constau în abordarea prin metode științifice avansate a compoziției fizico-chimice a produselor alimentare (miere de albine, vin și castane), metode ce conduc la stabilirea autenticității acestora și la posibilitatea de identificare a falsificărilor în domeniu. De asemenea noutatea tezei mai constă și în dezvoltarea unei metode de identificare și cuantificare a compușilor fenolici (UHPLC-MS/MS), stabilindu-se parametri adecvați metodei (recuperare, precizie, liniaritate și validare).

1. METODOLOGIILE CURENTE DE AUTENTIFICARE ȘI CONTROL ALE PRODUSELOR ALIMENTARE

În timpul producției și marketingului global actual, autentificarea alimentelor este o problemă importantă pentru a asigura calitatea alimentelor (Aung, 2014). Prevenirea fraudelor în sectorul alimentar și promovarea unui produs autentic este esențială pentru a asigura succesul comercial al produselor agroalimentare de mare valoare pe piețele interne și internaționale. Practicile frauduloase, cum ar fi înlocuirea componentelor inițiale ale produsului cu substituenți mai ieftini, vor avea un impact negativ asupra încrederii consumatorilor și asupra competitivității și profitabilității producătorilor onești. Cu îngrijorare față de autenticitatea alimentelor, europarlamentarii au introdus mierea pe lista produselor care sunt cele mai expuse riscului de fraudă alimentară, în majoritatea cazurilor prin adăugarea de zaharuri, precum și prin declarația falsă de botanică sau de origine geografică. Prin urmare, trasabilitatea perfectă este esențială pentru miere pentru a asigura un sector apicol echitabil și durabil.

În acest sens, Comisia Europeană, cu sprijinul științific al JRC-Institutul pentru Materiale și Măsurători de Referință (JRC-IRMM), a organizat recent un plan de control al detectării fraudei pentru piețele UE (European Commission, 2015b), dezvăluind că 19% din mierea testată (din aproape 2200 analizate) nu îndeplinea criteriile importante pentru miere. Principalele neconformități identificate au fost: metode de prelucrare incompatibile sau condiții de depozitare inadecvate, identificate pe baza investigațiilor fizico-chimice (2%); declarație falsă de origine botanică (7%) și

geografică (2%), identificată pe baza analizei polenului; alterarea zahărului pe bază de adaos de zahăr exogen (6%); alte aspecte de etichetare (2%). 40% din probele de miere investigate, dovedite a fi în conformitate cu testele preliminare efectuate, au fost supuse analizei JRC-IRMM EA/LC-IRMS pentru a detecta eventuala adăugare a anumitor siropuri de zahăr în miere. Rezultatele planului de control coordonat prezentat în raportul final al JRC indică faptul că 14 % din probele de miere verificate nu au îndeplinit criteriile de puritate (European Commission, 2016).

Conform Directivei Consiliului Uniunii Europene 2001/110/CE (Directiva Consiliului 2001/110/CE, 2001) și FAO/OMS Codex Alimentarius (Codex Stan 12-1981, 1981a), mierea este definită ca un produs dulce natural de *Apis mellifera* albinele rezultate din nectarul plantelor sau din excrețiile plantelor, pe care albinele le colectează, se combină cu substanțe specifice proprii și se depun în fagure pentru maturare. După originea provenienței, mierea se clasifică în: unifloră (ex. rapiță, salcâm , tei , floarea soarelui) sau polifloră (provine din nectarul mai multor tipuri de flori) miere și miere de pădure sau miere de miere (care provine în principal din secreția altor tipuri de flori). părți de plante, în combinație cu flora forestieră (Soares S., 2017).

Pe lângă arome și valori nutriționale, una dintre cele mai valoroase calități ale mierii este potențialul terapeutic, mierea fiind folosită de secole pentru tratarea diferitelor boli umane și, de asemenea, pentru promovarea unui stil de viață sănătos prin consumul de miere (Bogdanov, 2008). Astfel, mierea folosită în acest scop ar trebui să conțină diferiți compuși bioactivi (de exemplu, compuși fenolici , acizi organici, compuși volatili, vitamine, aminoacizi) cu potențial antioxidant și capacități de promovare a sănătății, precum protecția inimii, reducerea cancerului și scăderea sistemului imunitar, și controlul diferitelor procese inflamatorii (Khan et al., 2018). Din păcate, ca și alte produse alimentare nutriționale și medicale de înaltă calitate, cu un preț destul de ridicat, mierea este adesea supusă falsificării directe sau indirecte cu siropuri de zahăr ieftine, ceea ce duce la deteriorarea amprentelor constituenților bioactivi (Soares S., 2017).

Au fost propuse diferite metodologii pentru detectarea încorporării directe a substanțelor străine (siropuri de zahăr) în miere sau a falsificării indirecte a mierii (hrănirea albinelor cu zaharuri industriale) (Ulberth, 2016). Aceste abordări includ determinarea unor caracteristici specifice care sunt importante în evaluarea calității mierii și, implicit, a autenticității acesteia (de exemplu, analiza polenului, analiza organoleptică, umiditatea, conductibilitatea electrică, aciditatea liberă, activitățile diastază și invertază, conținutul de prolină) (Guler et al., 2007), profiluri de carbohidrați (Cordella et al., 2005a; A. Morales et al., 2018; Wang et al., 2015), RMN amprente (Bertelli et al., 2010a; Spiteri et al., 2015b), rapoarte stabile ale izotopilor (Simsek et al., 2012a; Tosun, 2013a). Unii cercetători au subliniat că constituenții minoritari ai mierii (responsabili pentru potențialul ei

terapeutic), au fost folosiți pentru a caracteriza sursa florală de miere, permițând o discriminare clară (R. Dong et al., 2011; Stanimirova et al., 2010a). Alternativ, identificarea unui compus marker pentru fiecare miere monoflorală reprezintă o cale importantă pentru autentificarea unor mieri valoroase (Pita-Calvo & Vázquez, 2018; J. Zhou et al., 2014).

Evaluarea statistică multivariată a datelor analitice este absolut necesară pentru a dezvolta metodologii fiabile care vor fi utilizate pentru controlul autenticității mierii. Instrumente statistice precum analiza varianței (ANOVA), analiza componentelor principale (PCA), analiza clusterului (CA), regresia componentelor principale (PCR), analiza discriminantă în trepte (SDA), analiza funcției discriminante (DFA), liniară parțială a celor mai mici pătrate analiză discriminantă (PLS-LDA), regresie parțială cu cele mai mici pătrate (PLSR), mașini vectori cu suport cel mai mic pătrat (LS-SVM), regresie liniară multiplă (MLR), sistem de inferență neuro-fuzzy adaptiv (ANFIS), testul diferențelor cele mai puțin semnificative (LSD) și rețelele neuronale artificiale (ANN), au fost utilizate pentru evaluările autenticității mierii (Amiry et al., 2017b; Li et al., 2017a; Oroian, Ropciuc, et al., 2018a).

Obiectivul acestui studiu a fost acela de a prezenta o trecere în revistă a metodelor analitice de autentificare a originii botanice și geografice a mierii și de identificare a adulterării în vederea identificării celei mai eficiente metode de distingere a fiecărei fraude posibile. În contextul autenticității mierii au fost evidențiate studii de caracterizare și clasificare a diferitelor mieri botanice românești și sunt sugerate investigații ulterioare care ar identifica cea mai bună metodă antifraudă pentru detectarea și eliminarea practicilor interzise în procesele de producție a mierii.

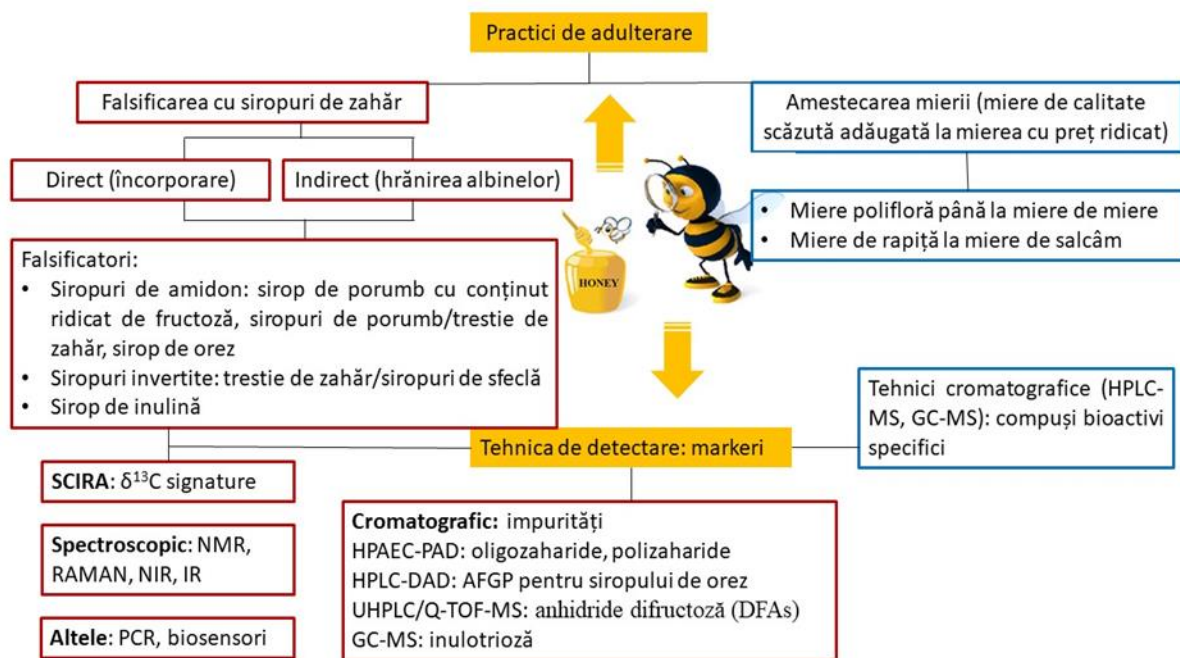


Figura 1. Tipuri de falsificare a mierii, adulteranții tipici găsiți în miere, tehnicile de detectare și markerii specifici pentru fiecare tip de falsificare.

2. Profilul compușilor fenolici și proprietățile biochimice ale mierii în relație cu sursele florale din care provin

Mierea este produsă și prelucrată de albinele melifere (*Apis mellifera*) din nectarul și mierea plantelor. Astfel, mierea poate fi considerată un produs natural care conține predominant un amestec complex de carbohidrați și cantități mici de alți constituenți, inclusiv minerale, proteine, vitamine, acizi organici, compuși fenolici, enzime și alte substanțe fitochimice (Bertoncelj et al. 2011; Machado De-Melo et al. 2018). Compușii fenolici, în principal acizii fenolici și flavonoidele, au fost recunoscuți ca constituenții majori responsabili pentru proprietățile de promovare a sănătății ale mierii, inclusiv antimicrobiene, antiinflamatorii, antimutagene, antitumorale, antivirale, activitate antioxidantă și multe alte efecte asupra sănătății umane (Khan et al. 2018). Potențialul mierii este asociat cu capacitatea antioxidantă împotriva radicalilor liberi de oxigen, astfel încât mierea este bine cunoscută ca un antioxidant alimentar natural (Meo et al. 2017).

Identificarea și cuantificarea compușilor fenolici din miere prezintă un mare interes deoarece aceștia aduc o contribuție semnificativă la bioactivitatea totală a mierii, concentrația lor reflectând calitatea mierii și fiind responsabili pentru culoarea, caracteristicile senzoriale și activitatea antioxidantă a acesteia (Ciulu et al. 2016). Există o literatură abundentă privind evaluarea

capacităților antioxidante ale mierii uniflore la nivel mondial (Moniruzzaman et al. 2012; Petretto, Cossu, and Alamanni 2015). Aceste contribuții descriu, de asemenea, corelarea cu unii parametri spectrofotometrici, cum ar fi totalul polifenolic și total flavonoid, culoarea și profilul fenolic cromatografic (Can et al. 2015; Mărghițaș et al. 2009).

În ultimii ani, numeroase studii au investigat amprente de acid fenolic și flavonoide ale diferitelor tipuri de miere pentru a identifica compuși specifici care pot fi utilizați ca markeri florali pentru a discrimina originea florală a mierii (Consonni and Cagliani 2015; Gašić et al. 2015; Kaškonienė and Venskutonis 2010). Identificarea acestor compuși fenolici pare a fi una dintre cele mai promițătoare tehnici de determinare a originii florale a mierii, deoarece aceste fitochimice depind în principal, de originea florală a plantelor melifere (Bertoncelj et al. 2011), pe lângă originea din propolis (Kečkeš et al. 2013; da Silva et al. 2013). Se practică asocierea profilului fenolic al mierii cu analiza polenului și alte analize fizico-chimice (Can et al. 2015; da Silva et al. 2013). Acidul elagic și pinocembrina au fost identificați ca markeri florali pentru mierea polifloră belgiană (Jasicka-Misiak et al. 2012), în timp ce kaempferolul, morinul și acidul ferulic au fost utilizați ca markeri florali pentru a distinge mierea de rapiță chineză (Zhou et al. 2014). Bertoncelj et al. (Bertoncelj et al. 2011) și Oroian și colab. (Oroian and Ropciuc 2017) nu au indicat niciun compus specific care să fie utilizat ca marker pentru determinarea originilor florale ale diferitelor tipuri de miere slovenă și românească.

Determinarea profilului fenolic al mierii este o abordare complexă, de aceea este esențială dezvoltarea tehnicilor de separare și detecție care să permită determinarea fără ambiguitate a numeroși compuși. Procedurile analitice utilizate pentru determinarea polifenolilor din miere implică extragerea acestora din matricea de miere și separarea lor cromatografică urmată de cuantificare (Pascual-Maté et al. 2018). Numeroase studii asupra acizilor fenolici și flavonoizilor din miere s-au concentrat pe extracția compușilor fenolici din miere folosind Amberlite XAD- 2 rășini (Mattonai et al. 2016; Zhao et al. 2016), proceduri de extracție în fază solidă (SPE) cu cartușe comerciale (Bond Elut octadecyl C18, Sep-Pak RP C18, Oasis HLB și Strata-X) (Moniruzzaman et al. 2012; Sergiel, Pohl, and Biesaga 2014; Zhou et al. 2014) sau metode de extracție lichid-lichid (Karabagias et al. 2014; Kivrak and Kivrak 2017) înainte de identificarea și cuantificarea acestora. Cromatografia de lichide (LC) este considerată a fi cea mai utilă tehnică de separare pentru analiza polifenolilor din miere, inclusiv HPLC-DAD (Campone et al. 2014; Jasicka-Misiak et al. 2012; Oroian and Ropciuc 2017) și HPLC-MS pentru măsurători cantitative (Gašić et al. 2014; Kečkeš et al. 2013; Zhou et al. 2014).

Pentru modelarea statistică a datelor analitice, tehnicile chimiometrice au fost acceptate pe scară largă drept cele mai puternice instrumente de caracterizare și clasificare a mierii în funcție de originile florale, dintre care analiza componentelor principale (PCA) (Gašić et al. 2015; Kečkeš et al. 2013), analiza discriminării parțiale cu cele mai mici pătrate (PLSDA) (Gašić et al. 2014), analiza discriminantă liniară (LDA) (Bertoncelj et al. 2011) și analiza grupării ierarhice (HCA) (Shen et al. 2018) sunt utilizate în mod obișnuit.

Comisia Europeană a recomandat crearea unor baze de date cu date fiabile ale caracteristicilor diferitelor tipuri de miere (European Commission 2015). În consecință, scopul acestei cercetări a fost de a studia profilul compușilor fenolici (acizi fenolici și flavonoide) și proprietățile bioactive (conținutul total de fenolici (TP), conținutul total de flavonoizi (TF) și activitatea de captare a radicalilor DPPH) ale mierilor uniflorale pure (salcâm și rapiță), poliflore, miere de mană și miere mixtă românească în relație cu plantele florale vizitate de albine, astfel încât să contribuie la autentificarea mierii. A fost examinată posibilitatea verificării originii florale a amestecurilor de miere pe bază de compuși fenolici specifici, folosind metode statistice multivariate. Au fost identificate variabilele care discriminează diferite probe de miere pură și au fost dezvoltate modele de succes pentru predicții ulterioare.

În acest studiu, cuantificarea acizilor fenolici și a flavonoizilor din miere a fost realizată prin tehnica UHPLC-DAD-ESI/MS după o etapă preliminară de izolare a compușilor de interes din matricea de miere. Un total de 31 de compuși rezultați din polen, propolis și nectar de flori au fost identificați în probe de miere și 24 dintre aceștia au fost cuantificați prin compararea timpilor de retenție și a spectrelor MS cu standardele disponibile. Figura 13 prezintă o cromatogramă reprezentativă a vârfului de bază a soluției standard de compuși fenolici (A) și extract apos de miere de rapiță (B).

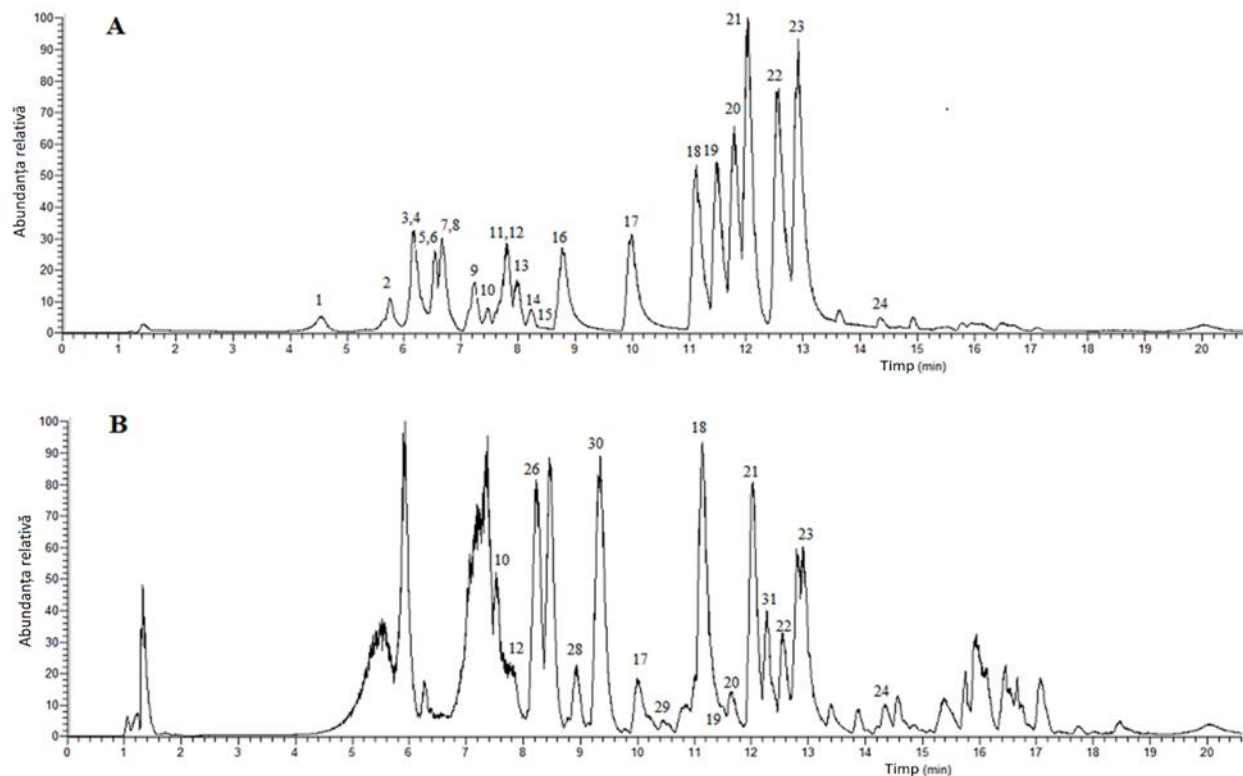


Figura 13: Cromatograma picurilor de baza a soluției standardelor de compuși fenolici (A) și a extractului apos din miere de rapiță (B): 1- acid galic, acid 2-3,4-dihidroxibenzoic, 3- catechină, 4-acid 4-hydroxibenzoic, 5- acid clorogenic, 6-epicatechină, 7-acid cafeic, 8-acid syringic, 9-acid *p*-coumaric, 10-acid ferulic, 11-naringin, 12-rutin, 13-hesperitin, 14-*t*-resveratrol, 15-acid *t*-cinnamic, 16-myricetin, 17-quercetin, 18-kaempferol, 19-isorhamnetin, 20-apigenin, 21-pinocembrin, 22-galangin, 23-chrysin, 24-pinostrobin, 25-rhamnetin, 26-acid abscisic, 27-eriodictyol, 28-sakuranetin, 29-alpinetin, 30-pinobanskin, 31-3-O-acetat pinobanskin, 32-luteolin.

Din cei 24 de compuși țintă, doar 17 au fost identificați și cuantificați în toate probele de miere studiate, opt acizi fenolici (acizii 3,4-dihidroxibenzoic, *p*-hidroxibenzoic, clorogen, cafeic, syringic, *p*-coumaric, ferulic și *t*-cinamic) și nouă flavonoide (rutin, quercetin, kaempferol, izoramnetin, apigenin, pinocembrin, galangin, crizin, pinostrobin), în timp ce catechina și epicatechina au fost găsite în cantitate neglijabilă în miere, mierea polifloră și de rapiță, iar acidul galic a fost găsit în cantitate neglijabilă în floarea soarelui și în mierea de mână. Naringin, hesperitin, miricetin și *t*-resveratrolul nu au fost identificate. În absența standardelor, identificarea altor compuși din extractul de miere s-a bazat pe căutarea moleculei deprotonate, $[M - H]$ și literatura de specialitate (Biesaga and Pyrzynska 2009; Gašić et al. 2015). Căutarea exactă a masei folosind biblioteca de referință ChemSpider ne-a permis să identificăm ramnetinul, acid abscisic, luteolinul, pinobanskinul și 3-O-acetylpinobanksin în toate probele de miere studiate. Eriodictyol

a fost identificat doar la mierea de rapiță, în timp ce sakuranetinul și alpinetinul au fost identificate în mierea de salcâm și rapiță.

Printre numeroșii constituenți antioxidanți, compușii fenolici ar putea fi identificați ca componente care reprezintă capacitatea antioxidantă reducătoare totală a probelor de miere investigate. Mierea de mană a prezentat un conținut total mai mare de polifenolici, conținut total de flavonoizi și valori medii ale capacității antioxidante reducătoare – DPPH, în comparație cu celelalte mieri florale.

Valorile medii ale TP și TF au fost ușor mai mari decât cele raportate pentru mierea românească de salcâm, rapiță și miere (Bobis et al. 2008; Dobre et al. 2014; Mărghițaș et al. 2009), mierea polifloră sârbească (Gašić et al. 2014), mierea de salcâm malaeziană (Chua et al. 2013) și mierea poliflorală, de miere și de salcâm din Burkina Faso (Meda et al. 2005). Chiar dacă probele de miere investigate sunt probe vechi, proprietățile bioactive sunt în intervalul natural de variație, starea de depozitare afectând doar într-o măsură minoră potențialul terapeutic al mierii (Chua et al. 2013).

Tabelul 1. Matricea de corelație între profilul compușilor fenolici ai mierii și proprietățile bioactive

	Σ Acizi fenolici	Σ Flavonoide	TP	TF	DPPH
Σ Acizi fenolici	1.0000				
Σ Flavonoide	-0.3081	1.0000			
TP	0.3082	-0.2845	1.0000		
TF	0.5616	0.1430	0.7512	1.0000	
DPPH	0.4943	-0.1691	0.9093	0.9150	1.0000

Analiza PCA permite reducerea dimensiunii datelor, arătând gruparea în două grupe principale, miere colorată (miere și polifloră) și miere mai puțin colorată sau necolorată (salcâm și rapiță) (Fig. 2A). Ciorchinii de mostre de miere de salcâm și rapiță se suprapun parțial, dar o anumită separare poate fi observată și aici. Mierea în amestec cu nectarul și/sau polenul din alte surse florale se pot distinge de mierea de salcâm sau de rapiță pură, mai puțin la mierea AR, AT și RFT, la care, probabil, procentul de impurități din mierea de rapiță este foarte scăzut. S-a realizat o diferențiere clară a mierii RS și RA de mierea de rapiță, indicând prezența unor cantități suplimentare de compuși fenolici în mierea de rapiță contaminată, comparativ cu mierea de rapiță pură.

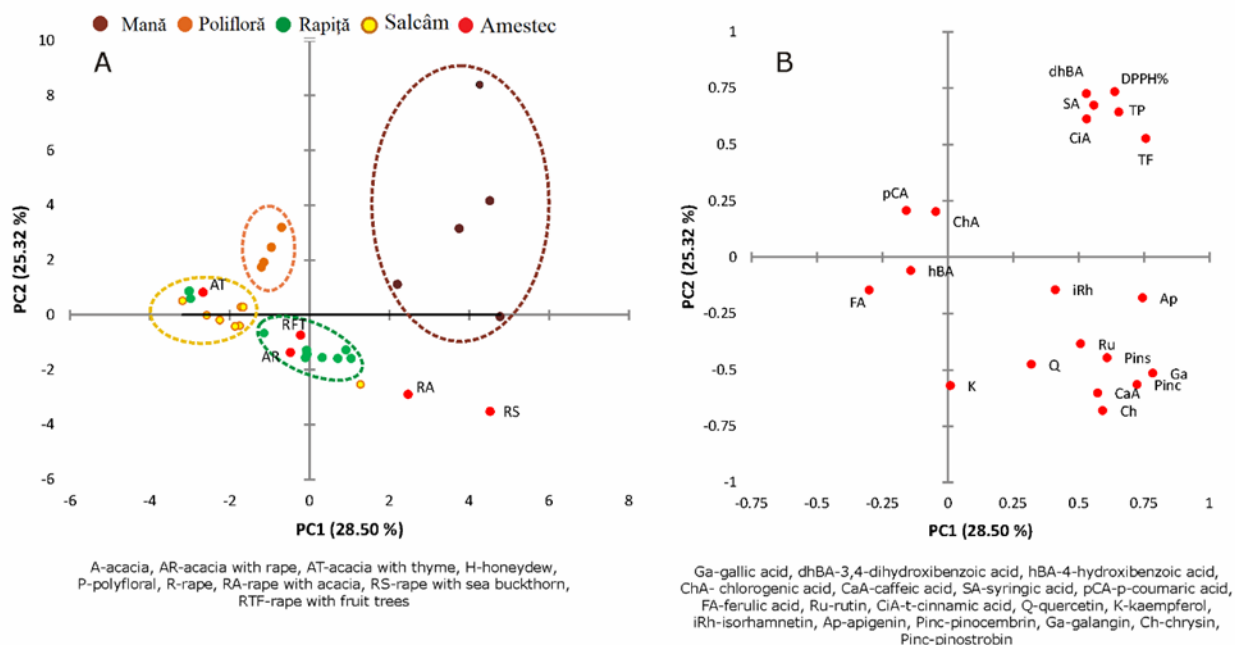


Figura 2: (A) Graficul scorurilor analizei componentelor principale (PCA) care arată separarea între tipurile de miere; (B) distribuția variabilelor generate dintr-un PCA cu matrice de corelație.

Rezultatele noastre au arătat că kaempferolul, quercetinel, izoramnetin, rutin și apigenin ar putea fi sugerate ca markeri florali pentru mierea de rapiță, în timp ce acizii ferulic și p-hidroxibenzoic reprezintă markeri floral ai mierii de salcâm, acizii p-cumaric și clorogenic caracterizează mierea polifloră, în timp ce acizii 3,4-dihidroxibenzoic, siringic și *t*-cinamic împreună cu proprietățile bioactive TP, TF și DPPH % sunt reprezentative pentru mierea de mană (Figura 2B).

În special, acidul cafeic și flavonoidele precum crizina, galangina, pinocembrina și pinostrobină sunt considerate componente semnificative care pot fi utilizate pentru a discrimina mierea de rapiță contaminată cu nectar și polen din alte surse florale. S-au obținut rezultate relevante pentru discriminarea originii florale a mierii pentru mierea de rapiță contaminată cu nectar și polen provenind din alte surse florale, cum ar fi cătină.

3. Evaluarea mierii din punct de vedere al calității și autenticității pe baza modelului fizico-chimic, a compoziției majore a zahărului și a amprentei $\delta^{13}\text{C}$

Mierea este definită ca substanța dulce naturală produsă de albinele melifere (*Apis mellifera*), din nectarele și exsudația plantelor (Codex Stan 12-1981, 1981b) care posedă multiple proprietăți terapeutice, precum antibacteriene, prebiotice, antioxidante și antimutagene (Meo et al., 2017b). Acest produs natural este o soluție apoasă de zahăr suprasaturat, compusă în principal din

fructoză și glucoză și alți constituenți minori, cum ar fi acizi organici, aminoacizi, proteine, minerale, vitamine, lipide, compuși aromatici, flavonoide, vitamine, pigmenți, ceară, boabe de polen. , mai multe enzime și alte substanțe fitochimice (Amiry, Esmaili, & Alizadeh, 2017; de Almeida-Muradian et al., 2013; URAN, AKSU, & DÜLGER ALTINER, 2017). Proprietățile și compoziția mierii depind de tipul de flori de la care albinele colectează nectarul, originea geografică și condițiile climatice, precum și practicile de apicultură, maturitatea mierii, condițiile de prelucrare și depozitare (de Almeida et al., 2016a; El Sohaimy et al., 2015b; Kukurova et al., 2008).

Pe lângă proprietățile naturale valoroase, mierea este folosită ca îndulcitor într-un număr mare de produse alimentare procesate, dar valoarea sa de piață este semnificativ mai mare decât alți îndulcitori utilizați în mod obișnuit, cum ar fi siropurile de zahăr rafinat din porumb, trestia de zahăr, sfecla de zahăr și siropurile de origine naturală (orez, fructe, struguri) (Amiry et al., 2017b). Așadar, pentru câștiguri economice, există tentația de a adultera mierea prin diluare cu siropuri industriale ieftine de zahăr (care simulează profilul glucidic al mierii), afectând astfel negativ nu doar alimentația și sănătatea consumatorilor, ci și apicultorii cinstiți din cauza impactului. a acestei fraude asupra economiei și pieței (M. F. Cengiz, Durak, & Ozturk, 2014). Astfel, falsificarea mierii este o falsificare motivată economic pentru câștig financiar. Într-un top zece produse alimentare care prezintă cel mai mare risc de fraudă, mierea ajunge pe locul șase, subliniind că mierea este foarte vulnerabilă la fraudă alimentară. Pe lângă falsificarea mierii cu siropuri de zahăr, urmărirea originilor botanice și geografice ale mierii reprezintă probleme importante de autenticitate (Jandrić et al., 2017; Karabagias, Louppis, et al., 2018). Astăzi, garantarea autenticității și calității mierii a devenit o problemă foarte imperativă pentru piața internațională a mierii (procesatori, detailist și apicultori), autoritățile de reglementare și consumatorii, și, prin urmare, stabilirea unei proceduri analitice cuprinzătoare pentru detectarea falsării mierii este o necesitate (Çinar et al., 2014; Sobrino-Gregorio et al., 2017).

Regulamentul UE prevede criterii generale de calitate pe care trebuie să le îndeplinească mierea, precum caracteristici organoleptice (aspect, culoare, gust, consistență, aromă și aromă) și parametri fizico-chimici de compoziție (conținut de zaharuri, conținut de umiditate, substanțe minerale, aciditate, vitamine, acizi anorganici, proteine, prolină, activitate enzimatică, conductivitate electrică, conținut de hidroximetilfurfural (HMF)) (Directiva Consiliului European 2001/110/EC, 2002).

În ultimii ani, s-au făcut mai multe eforturi pentru a aborda autenticitatea, trasabilitatea și calitatea intrinsecă a mierii prin aplicarea tehnicilor statistice multivariate pentru prelucrarea

diferitelor tipuri de date analitice. Rezumând cercetările în această direcție, detectarea adulterării mierii în ceea ce privește adăugarea de siropuri de zahăr nu este ușor de realizat. În acest sens, au fost exploatate diferite tehnici analitice, inclusiv cromatografia (TLC, cromatografia în strat subțire; HPLC, cromatografia lichidă de înaltă performanță; GC, cromatografia în gaz; HPAEC, cromatografia cu schimb anionic de înaltă performanță) (Cordella et al., 2005b; Puscas et al., 2013b; Ruiz-Matute, Weiss, et al., 2010), rezonanță magnetică nucleară (RMN) (Bertelli et al., 2010c), spectrometrie de masă cu rapoarte izotopice (IRMS) (Simsek et al., 2012b; Tosun, 2013b; Vetrova et al., 2017).

SCIRA (Analiza Rapoartelor Izotopilor Stabile de Carbon) reprezintă metoda standardizată capabilă să detecteze falsificarea mierii cu siropuri din trestie de zahăr sau porumb și se bazează pe faptul că plantele au rapoarte distincte ale izotopilor de carbon care sunt produse prin diferite cicluri de fotosinteză. Există un acord general că plantele cu ciclul fotosintetic Calvin Benson (plante C₃: sfeclă, grâu, struguri, fructe, plante melifere) au valori $\delta^{13}\text{C}$ de la -22‰ la -32‰, iar plantele cu ciclul fotosintetic Hatch-Slack (Plantele C₄: porumb, trestie) au valori de la -9‰ la -18‰ (Vetrova et al., 2017). Aceste diferențe în raporturile izotopice sunt folosite pentru a detecta mierea falsificată cu siropuri de zahăr care provin din plante C₄. Deoarece albinele produc în principal miere din plante C₃, probele de miere cu valori $\delta^{13}\text{C}$ mai mici de -23,5‰ ar putea fi suspecte (Simsek et al., 2012). Pentru a stabili gradul de adulterare cu siropurile de zahăr C₄ este necesară determinarea valorii $\delta^{13}\text{C}$ a proteinelor extrase din miere. Chiar dacă valoarea $\delta^{13}\text{C}$ a fracției de miere se modifică odată cu adăugarea de zahăr, valoarea $\delta^{13}\text{C}$ a fracției de proteine nu va fi afectată, iar diferența dintre aceste două fracții va crește. Diferența minimă de $\delta^{13}\text{C}$ între miere și extractul proteic asociat este de așteptat să fie de -1,0‰, ceea ce corespunde la 7% zahăr adăugat (M. F. Cengiz et al., 2014; Çinar et al., 2014). În schimb, $\delta^{13}\text{C}$ ca parametru unic nu este potrivit pentru a detecta adaosul de sfeclă de zahăr la miere, deoarece sfecla și plantele melifere aparțin aceleiași familii de plante (plante C₃) și, prin urmare, valoarea maximă a $\delta^{13}\text{C}$ în miere este anticipată a fi de -23,5‰ (Çinar et al., 2014).

Aceste instrumente analitice sofisticate sunt consumatoare de timp și costisitoare, fiind folosite pentru a detecta falsificarea mierii doar în laboratoare de renume. Sunt disponibile mai multe metode accesibile, deși aceste metode necesită sistematizare și validare ca o parte importantă a evaluărilor autenticității (de Almeida et al., 2016b). În acest sens, caracteristicile chimice ale mierii, în combinație cu analiza statistică multivariată, s-au dovedit a fi capabile să clasifice mierea în funcție de originile geografice și botanice și eventuala falsificare. Parametrii fizico-chimici precum umiditatea, cenușa, pH-ul, aciditatea totală, conductivitatea electrică, numărul de diastază,

conținutul de prolină, suma de fructoză și glucoză, raportul fructoză/glucoză, conținutul de HMF sunt luați în considerare pentru a determina autenticitatea și calitatea mierii (Amiry et al., 2017; GULER, BAKAN, NISBET, & YAVUZ, 2007; KIVRAK et al., 2016; Popek, Halagarda, & Kurs, 2017; URAN et al., 2017). Noua tendință în autentificarea mierii se concentrează pe dezvoltarea unor metode analitice alternative precum metodele spectroscopice (Spectroscopie în infraroșu apropiat (NIR), Spectroscopie în infraroșu mediu (MIR) și RAMAN) (Li et al., 2017a; Oroian, Ropciuc, et al., 2018a; Rios-Corripio et al., 2012), care permit un screening rapid, reducând timpul și restricțiile financiare. Mai mult, pentru a obține rezultate concludente pentru o probă ar fi necesar să se utilizeze rezultatele obținute prin aplicarea combinației mai multor dintre aceste tehnici.

Comisia Europeană (European Commission, 2016) a recomandat dezvoltarea sau construirea de baze de date cu informații privind anumiți parametri fizico-chimici pentru mierea pure, precum și pentru siropul obișnuit de zahăr și produsele pentru hrănirea albinelor utilizate pentru stimularea familiilor de albine în perioadele acceptate. În consecință, scopul acestui studiu a fost acela de a studia caracteristicile fizico-chimice, conținutul major de zahăr și amprenta izotopică $\delta^{13}\text{C}$ a mierii de la apicultori și a mierii comerciale de diferite origini botanice (salcâm, polifloră, mană, floarea soarelui și tei) și diferite tipuri de siropuri industriale de zahăr, astfel încât să poată contribui la îmbunătățirea procesului de autenticitate a mierii. Au fost comparate capacitățile parametrilor fizico-chimici generali (aciditate, pH, conductivitate electrică, indice de refracție, Brix, conținut de umiditate, conținut de HMF), compoziția majoră a zahărului și amprenta izotopică $\delta^{13}\text{C}$ pentru a face distincția între mierea pure și cea adulterată, evidențiind avantajele și limitările fiecăreia. Rezultatele analitice au fost prelucrate prin analiză statistică multivariată pentru a distinge alterarea unor probe de miere în raport cu adăugarea de siropuri de zahăr sau nerespectarea standardelor de calitate.

Datele izotopice $\delta^{13}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{CH}$ and $\delta^{13}\text{CP}$) împreună cu parametrii calculați (conținutul de zahăr C4, C4% și diferența dintre $\delta^{13}\text{CP}$ - $\delta^{13}\text{CH}$) ai probelor investigate au fost prelucrate folosind metoda de grupare ierarhică a lui Ward cu distanțele euclidiene ca măsură a disimilarității, în pentru a grupa mostrele pe categorii. La un nivel de diferență de 60%, dendrograma (Figura 3) prezintă gruparea mierii în grupe separate, cu Grupa 2 și Grupa 3 care se referă la mierea pure, în timp ce mierii adulterate au fost grupate separat în funcție de gradul de alterare. .

Mierea adulterată se referă la mierea cu conținut de zahăr C4 care depășește limita maximă de 7%, astfel: mierea R3 cu 46,19% zaharuri C4, mierea A6 cu 23,78% zaharuri C4 și mierea A8, C10 și C11 cu 12,26%, 16,73% și 16,73% și % conținut de zahăr C4, respectiv. Mierea R8 cu conținut de zahăr C4 de 9,30% a fost grupată ca miere pură, acest procent de falsificare fiind foarte aproape de

limita maximă. Mierii identificate ca mieri adulterate corespund Grupului 1 și Grupului 4 definit prin diferența dintre $\delta^{13}\text{CP} - \delta^{13}\text{CH}$, cu valori în afara intervalului permis.

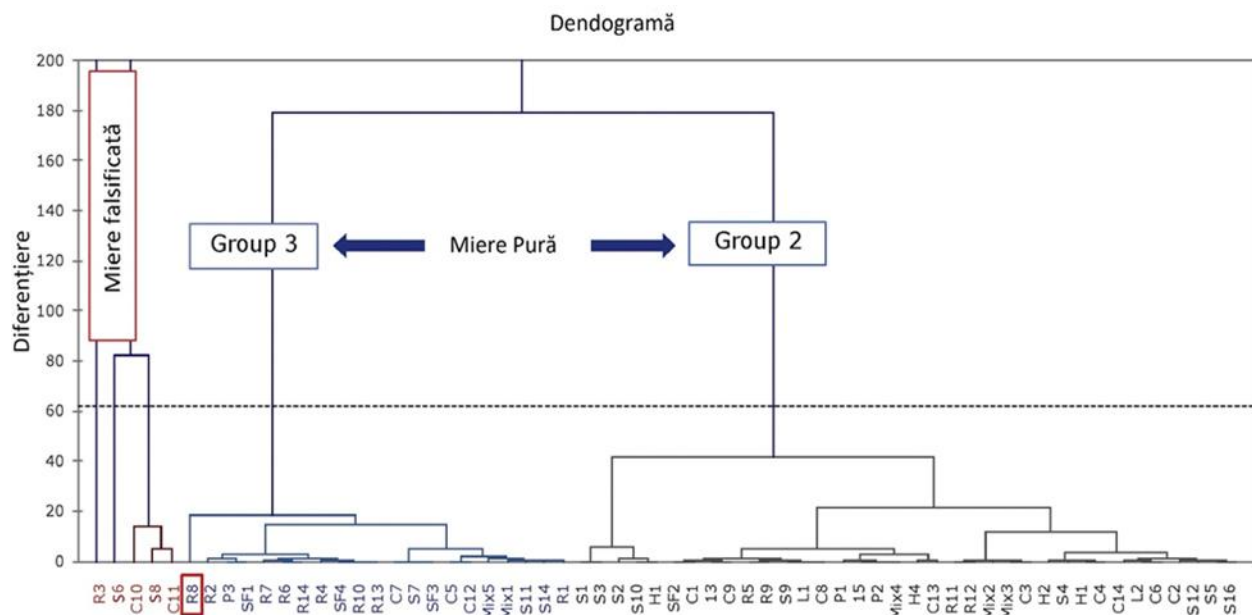


Figura 3: Dendrograma celor 62 de eșantioane de miere (de la apicultori și comerciale) reprezentate prin variabile izotopice, obținute prin metoda de grupare ierarhică a lui Ward (HCA).

Metoda de analiză a raportului izotop al carbonului stabil (SCIRA) este o tehnică puternică pentru detectarea mierii adulterate cu zaharuri C4 (porumb sau trestie), dar nu este capabilă să detecteze mierea care nu respectă standardele de calitate. De asemenea, metoda SCIRA nu este capabilă să detecteze falsificarea mierii cu siropuri de zahăr din surse C3 (sfecă, grâu, orez etc.), acest tip de falsificare a mierii fiind identificată prin analiza unor compuși specifici prezentați ca impurități rezultate din siropurile de zahăr (Du et al. 2015; Xue et al. 2013) sau prin analiza valorilor $\Delta\delta^{13}\text{C}$ între fructoză și glucoză din miere și analiza valorilor $\delta^2\text{H}$ a mierii (Luo et al. 2016).

Pentru a putea face diferența între mierile cu origini botanice diferite și pentru a identifica markeri specifici, la datele analitice obținute au fost aplicate metode statistice multivariate. Mierile care au fost identificate ca adulterate cu zaharuri C4 au fost excluse din această diferențiere. Analiza componentelor principale (PCA) a fost efectuată ca o analiză exploratorie a datelor și a rezultat în două componente principale care explică 46,01 % din variația totală a datelor. Prima componentă principală (PC1) a reprezentat 27,23 % din variabilitatea totală a datelor, în timp ce a doua a reprezentat 18,78 % (Figura 4).

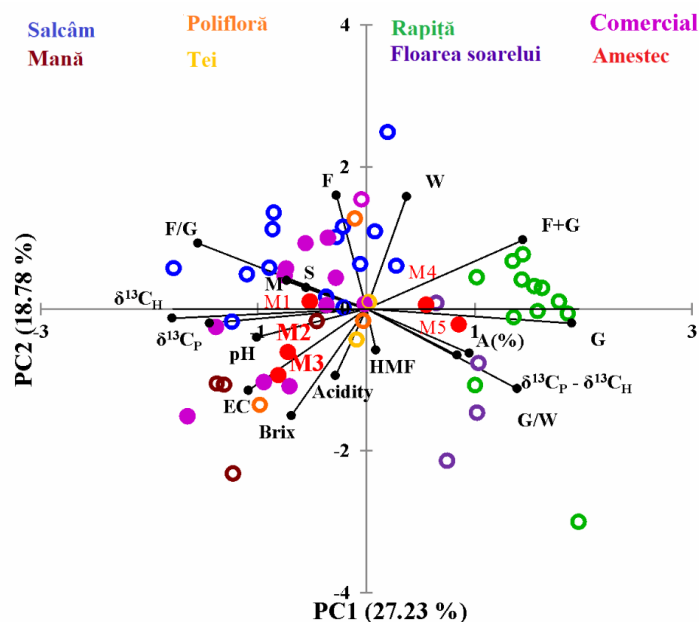


Figura 4: Diagrama procentelor din analiza componentelor principale (PCA) care arată separarea între tipurile de miere.

Probele de miere de salcâm, rapiță și mană au fost grupate separat, prezentând o variabilitate internă mică, în timp ce rapiță cu floarea-soarelui și tei cu miere polifloră au fost suprapuse indicând o compoziție similară. Mierile comerciale analizate în acest studiu par să fie de origine botanică de salcâm, polifloră sau meliferă, datorită suprapunerii lor cu regiunile corespunzătoare din spațiul de scor PC1-PC2. Probele de mieri mixte au fost reprezentate astfel: M1 (declarat de apicultori ca salcâm cu alte impurități florale) a fost grupat în regiunea salcâmului, M2 (declarat ca miere polifloră cu cantitate mică de mană) și M3 (declarat salcâm cu surse florale) au fost grupate în regiunea polifloră/mană, în timp ce M4 (declarat ca rapiță cu surse florale de tei) și M5 (declarat ca rapiță cu surse florale poliflore) au fost situate între rapiță și regiunea tei/polifloră. Dintre parametrii investigați, amprenta izotopică $\delta^{13}\text{C}$, conținutul de fructoză (F) și apă (W) și raportul F/G sunt markeri specifici pentru mierea de salcâm; Conținutul de glucoză (G), conținutul de F+G, raportul G/W, pot fi considerați markeri pentru mierea de rapiță și floarea soarelui, în timp ce conductivitatea electrică (EC), pH-ul, °Brix și aciditatea au caracterizat mierea de mană. Astfel, parametrii fizico-chimici generali, compoziția majoră a zahărului și amprenta izotopică $\delta^{13}\text{C}$ cuplată cu analiza statistică multivariată ar putea fi instrumente promițătoare pentru trasabilitatea botanică a mierii, așa cum au arătat alte studii (Dinca et al. 2014; Oroian, Ropciuc, Paduret, et al. 2017; Oroian, Ropciuc, and Buculei 2017). Explorarea unui set mai mare de mostre cu diferite origini florale în studiile viitoare va permite validarea și predicția modelului.

4. Caracterizarea și clasificarea vinurilor pe baza determinării spectrofotometrice a proprietăților bioactive ale vinului

Societatea modernă încurajează consumul de alimente care pot trata și preveni diferite boli și pot crește longevitatea, cum ar fi alimentele și băuturile bogate în compuși antioxidanți (Tarapatsky et al., 2019; Wurz, 2019). Vinul este una dintre cele mai vechi băuturi și a fost folosit ca medicament din cele mai vechi timpuri în numeroase țări. În Franța, s-a concluzionat că un consum moderat de vin duce la o rată scăzută a mortalității din cauza bolii cardiace ischemice și la prevalența altor factori de risc, cum ar fi fumatul (Paradoxul francez) (Renaud & de Lorgeril, 1992).

Calitatea vinurilor este dictată de culoarea, mirosul și gustul acestuia, mai degrabă decât de conținutul de compuși bioactivi (Stratil et al., 2008). Din punct de vedere chimic, vinul este o soluție hidroalcoolică (~78% apă) cu o mare complexitate chimică, incluzând numeroși constituenți fitochimici bioactivi minoritari și metaboliții acestora care acționează sinergic asupra sănătății umane (Banc et al., 2014).

O mare varietate de compuși contribuie la beneficiile vinului pentru sănătate, printre care: compuși fenolici, proteine solubile, zaharuri, vitamine, substanțe volatile, cetone, lipide și acizi organici, cei mai reprezentativi fiind compușii fenolici. Compușii polifenolici sunt cunoscuți în mod obișnuit ca metaboliți secundari ai plantelor și sunt direct asociați cu proprietățile vinurilor de promovare a sănătății (Fernandes et al., 2017; Sartor et al., 2017). Dintre aceștia, acizii fenolici, stilbenele (de exemplu, resveratrolul), flavonolii (de exemplu, quercetina și miricetina), flavan-3-olii (de exemplu, catechina și epicatechina), procianidinele și antocianinele reprezintă cele mai valoroase fitochimice fenolice, (Banc et al., 2014; Snopek et al., 2018).

În aceste ultime zile, compușii fenolici sunt subiectul unui interes științific din ce în ce mai mare datorită efectelor lor benefice asupra sănătății umane (Tarapatsky et al., 2019), printre: cardio-protector, anticancer, antidiabetic, anti-îmbătrânire și neuro. - efecte protectoare (Fernandes et al., 2017) ca urmare a caracterului antioxidant al acestora, asociat cu prezența a numeroase vinuri antioxidante. Antioxidanții pot fi definiți ca inhibitori pentru inițierea și propagarea reacției oxidative în lanț, inhibând procesul de oxidare a diferitelor molecule și protejând celulele de stresul oxidativ. De asemenea, ele pot proteja omul prin lupta împotriva radicalilor liberi din organism care provoacă boli și îmbătrânire.

Compoziția fenolică a vinurilor este dependentă de mai mulți factori; precum soiul de struguri, practicile de cultivare, tehnicile de vinificație, procesul de îmbătrânire și factorii de mediu (Fotakis et al., 2012; Sartor et al., 2017). De asemenea, compușii fenolici joacă un rol major în

calitatea vinului, contribuind la proprietățile organoleptice precum culoarea, aroma, astringența și stabilitatea oxidativă (Fotakis et al., 2012).

Polifenolii sunt extrași în timpul zdrobirii și fermentației atunci când sucul este în contact cu cojile și semințele strugurilor. Astfel, cantitatea de compuși fenolici din vinul roșu este mai mare în comparație cu vinul alb, deoarece sucul roșu are timp de contact mai lung cu cojile și semințele strugurilor (Yoo et al., 2010). Conținutul fenolic variază semnificativ în diferite tipuri de vin, în funcție de prezența diferitelor clase de compuși fenolici (Snopek et al., 2018), conducând la diferențe în proprietățile bioactive măsurate, inclusiv conținutul total de fenolici, conținutul total de flavonoide și capacitatea antioxidantă (Fotakis et al., 2012), permițând astfel clasificarea a vinurilor în funcție de originile geografice și varietale și anul de recoltă.

Concentrația de compuși fenolici în vinuri a putut fi determinată prin metode spectrofotometrice cu cost redus, cele mai utilizate fiind pentru conținutul total de fenolici (metoda Folin- Ciocâlțu), testul conținutului total de flavonoide, pentru testul de cuantificare a antocianilor totale și pentru estimarea capacității antioxidante (Cassino et al., 2016; Pandeya et al., 2018).

Evaluarea capacității antioxidante a vinului este un indice indirect al compusilor fenolici prezenți în vin. Au fost propuse mai multe metode analitice bine consacrate pentru evaluarea capacității antioxidante: spectroscopice (colorimetrice: DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic). acid), FRAP (putere antioxidantă reducătoare ferică), CUPRAC (putere antioxidantă reducătoare cuprică); fluorescență - ORAC (capacitate de absorbție a radicalilor de oxigen) și chemiluminiscență), electrochimic (voltametrie ciclică, amperometrie), cromatografic – HPLC (determinarea antioxidantilor țintă) (Pisoschi & Negulescu, 2012). Au fost publicate mai multe studii privind capacitatea antioxidantă a vinurilor, iar printre diferitele metode analitice de evaluare a capacității antioxidante totale a vinurilor au fost de obicei preferate metodele DPPH, ABTS și FRAP (Sartor et al., 2017; Stratil et al., 2008).

Ca orice altă matrice alimentară, vinul necesită strategii de autentificare bazate pe investigații analitice adecvate calitative și cantitative ale constituenților naturali ai vinului care reprezintă amprenta specifică a fiecărui vin (Palade & Popa, 2018). Diverse abordări analitice (cromatografice, spectroscopice, spectrometrice, electrochimice) au fost aplicate pentru a evalua profilurile constituenților bioactivi ai vinului, inclusiv compuși fenolici și volatili, aminoacizi, astfel, în combinație cu abordări chimimetrice adecvate, contribuind la dezvoltarea diferitelor metodologii de evaluare a autenticității vinului (Rocchetti et al., 2018; Villano et al., 2017b).

Prezenta cercetare a avut ca scop evaluarea proprietăților biochimice a vinului (conținutul total de polifenolici, conținutul total de flavonoide și capacitatea antioxidantă DPPH) ale diferitelor

soiuri de vin roșu, roz și alb cu timpi de învechire diferiți, produse la SCDVV Murfatlar, România pe parcursul a 9 ani de producție. Toate datele colectate au fost analizate prin metoda statistică multivariată a analizei componentelor principale (PCA) pentru a găsi posibila corelație între activitatea antioxidantă totală măsurată și concentrația fiecărei clase de antioxidanți analizate și pentru clasificarea diferitelor roșu și alb au fost investigate soiurile de vin și anii de recoltă.

Rezultatele sunt în acord cu literatura disponibilă pentru vinurile românești (cu 2455,9 mg/L GAE pentru vinurile roșii și 255,6 mg/L GAE pentru vinurile albe) (Hosu et al. 2016; Hosu, Cristea, and Cimpoiu 2014), vinurile spaniole (1613,2 mg/L). GAE pentru vinurile roșii și 240,8 mg/L GAE pentru vinurile albe) (Gómez-Plaza et al. 2000) și vinuri din Republica Cehă (1544,8 mg/L GAE).

Cei mai mulți compuși fenolici din vinuri provin din coaja strugurilor și, prin urmare, se pot aștepta concentrații mai mari de fenolici în vinurile roșii (Pandeya et al. 2018). Conform tabelului 17, proprietățile bioactive ale vinurilor roșii au fost mai mari în comparație cu vinurile roz și albe, ceea ce este în concordanță cu lucrările anterioare raportate (Pandeya et al. 2018; Stratil, Kubáň, and Fojtová 2008). Diferențele mari în conținutul de compuși fenolici din vinurile albe și roșii indică faptul că antocianinele (care sunt absente în vinurile albe) reprezintă cea mai importantă fracțiune a compușilor fenolici din vinurile roșii (Stratil et al. 2008).

TP este un parametru important utilizat pe scară largă pentru evaluarea vinurilor și a altor alimente. Vinurile cu TPC mai mare sunt considerate a fi de calitate mai bună, în cazul nostru, Pinot Noire și Feteasca Neagră pentru vinurile roșii și Muscat Ottonel și Riesling italian pentru vinurile albe. Vinurile cu TP mai mare tind să ofere o capacitate antioxidantă mai mare, ceea ce indică faptul că TP este responsabil pentru capacitatea antioxidantă a vinului.

Activitatea antioxidantă este un parametru foarte relevant pentru evaluarea calității vinului și a proprietăților sale bioactive. Pentru vinurile analizate capacitatea antioxidantă a vinurilor roșii (exprimată în $\mu\text{moli/L}$ Trolox) scade în ordinea: Fetească Neagră > Cabernet Sauvignon > Pinot Noire > Merlot, în timp ce la vinurile albe scade în ordinea: Muscat Ottonel > Riesling Italian > Fetească Regală > Chardonnay > Pinot Gris > Columna > Sauvignon Blank.

În cazul vinurilor roșii, concentrațiile de polifenolici totali și capacitatea antioxidantă au fost mai mari la vinurile din anii de recoltă 2010 și 2011, cu excepția vinului Pinot Noire din 2015. Vinurile tinere din 2017 au prezentat cele mai scăzute valori ale capacității antioxidante (Figura 20).

Pentru vinurile albe Muscat Ottonel și Fetească Regală, TP și capacitatea antioxidantă au fost mai mari la vinurile vechi, în timp ce la Columna, Pinot Gris și Riesling italian, TP și

capacitatea antioxidantă au fost mai mari la vinurile tinere. Nu s-au observat diferențe semnificative între vinurile Sauvignon Blanc și Chardonnay obținute în ani diferiți (Figura 5).

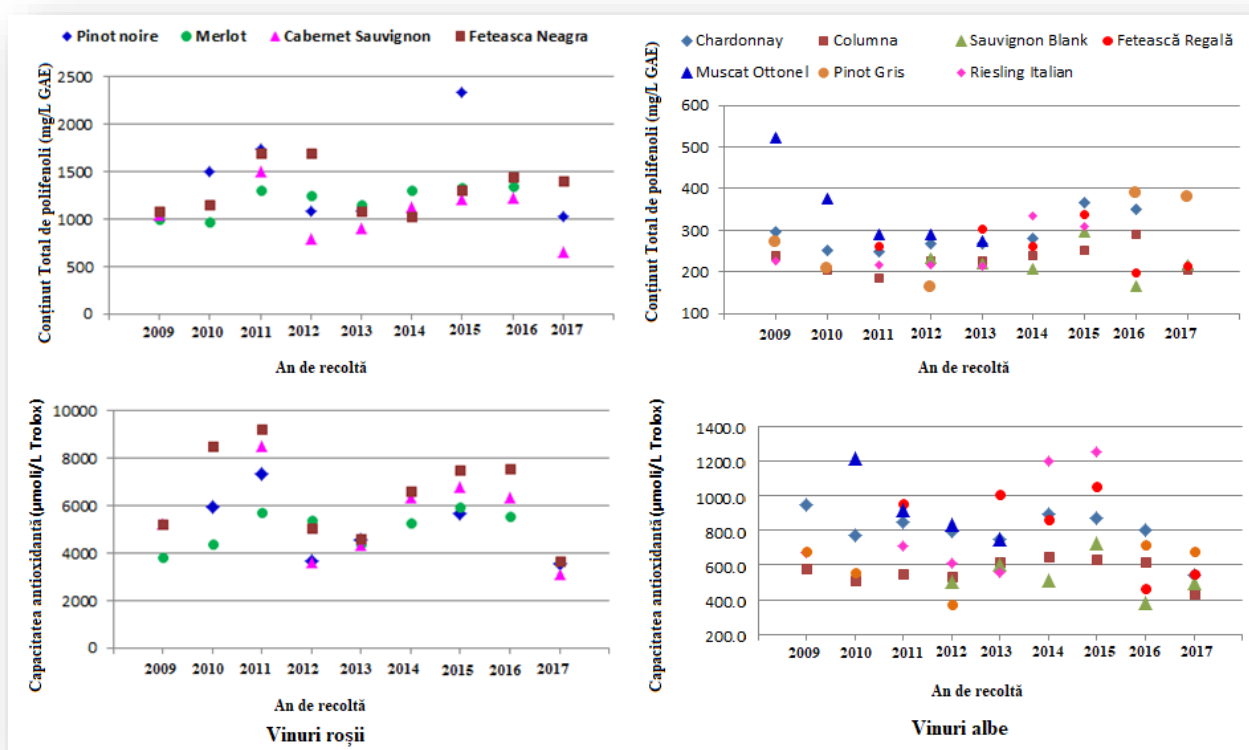


Figura 5. Conținutul total de polifenolici (TP) și capacitatea antioxidantă (AC) ale vinurilor roșii și albe, în funcție de anul de recoltă

5. Compoziția profilului fitochimic și nutrițional în fructele diferitelor soiuri de castan dulce (Castanea Sativa MILL.)

Castana este fructul castanului, arbore care aparține genului *Castanea*, din familia Fagaceae, întâlnit cu precădere în Europa mediteraneană (Míguez-Soto et al., 2019). Castanul este o resursă importantă în Europa datorită valorii sale peisagistice, economice (fructe, lemn, miere și tanin) și culturale (Beccaro et al., 2020a). Specia *Castanea sativa* Mill. cunoscută în mod obișnuit ca „castanul european” are o distribuție mare în Spania, Franța, Grecia, Italia, Portugalia și Turcia (Choupina, 2019). Din punct de vedere nutrițional, castanele au caracteristici interesante, conținând niveluri ridicate de carbohidrați și niveluri apreciable de fibre alimentare, dar cantități mici de proteine brute (2–4%) și niveluri scăzute de grăsimi brute (predominate de acizi grași nesaturați) (2–5%) în comparație cu nucile tipice (nuci, migdale, alune) (Akbulut et al., 2017; Otles & Selek,

2012a), fiind astfel o bună sursă de energie cu multiple efecte benefice pentru sănătate. Castanele sunt, de asemenea, fără colesterol și conțin o cantitate mare de vitamina C, macro- (K, P, Mg, Ca, Na) și micro-nutrienți (Mn, Fe, Zn și Cu) (Poljak et al., 2021). Fructele au, de asemenea, o activitate antioxidantă semnificativă asociată cu conținutul polifenolic (acid galic și acidul elagic fiind predominant) și acizi organici (ex. acizi oxalic, cis-aconitic, citric, ascorbic, malic, chinic și fumaric) (B. Gonçalves et al., 2010). Astfel, fructele de castan au devenit din ce în ce mai importante în alimentația umană datorită compoziției lor nutritive și a potențialelor efecte benefice asupra sănătății, de exemplu, ca parte a unei diete fără gluten în cazurile de boală celiacă (El Khoury et al., 2018), reduce adipozitatea abdominală (Rodrigues et al., 2020) și în reducerea bolilor coronariene și a ratei cancerului (Choupina, 2019). Cererea în creștere pentru alimente tradiționale a transformat castanele într-o resursă cu valoare adăugată cu un potențial considerabil ca alimente funcționale sau ingrediente alimentare. Nucile sunt consumate direct în formă prăjită sau fiartă sau evaluate ca produse cu valoare adăugată în industria prăjiturii și bomboanelor (Mert & Ertürk, 2017a). Având în vedere faptul că castanele fierte sunt o sursă bună de fenolici (acizi galic și elagic) și acizi organici (acid citric) și au un conținut scăzut de grăsimi (B. Gonçalves et al., 2010), proprietăți care sunt asociate cu beneficii pozitive pentru sănătate, dezvoltarea de noi produse pe bază de castane ar trebui încurajată (da & Silva, 2016). Prin urmare, în ultimele decenii, industria castanelor a crescut semnificativ în Europa, în special în producția de marron glacé, piureuri și făină de castane, care găsesc din ce în ce mai multă aplicație ca ingredient în dietele fără gluten (Vella et al., 2017), cum ar fi producția de paste prin încorporarea făinii de castane și a polenului de albine (Brochard et al., 2021). În plus, industria alimentară poate beneficia de extractele de castane ca ingrediente funcționale și conservanți naturali care vizează înlocuirea celor sintetici capabili să îmbunătățească durata de valabilitate și valoarea nutritivă a produselor (Pinto et al., 2017; V. Silva et al., 2020). În plus, cojile de castan ca principal produs secundar generat din prelucrarea castanelor sunt utilizate în prezent drept combustibili (You et al., 2014), pentru coproducția de biopolimer lignină și bioetanol după o abordare de biorafinărie (A. Morales et al., 2018), dar pot fi și sursă de taninuri hidrolizabile ca pigmenți naturali. pentru industria alimentară și farmaceutică (Pinto et al., 2021), ca ingredient potențial pentru industriile nutraceutice și cosmetice (Pinto et al., 2017).

Prin urmare, un interes economic crescut pentru castanul dulce în industria alimentară a crescut cererea pentru soiuri selectate cu potențial enorm asupra sănătății umane, asociată cu consumul de produse din castan proaspete și procesate (Corona et al., 2021). De asemenea, pentru

a îmbunătăți producția de castan și rezistența la anumite boli comune ale arborelui, de-a lungul anilor au apărut unii hibrizi (da & Silva, 2016).

Compoziția nutrițională și bioactivitatea castanelor dulci proaspete arată diferențe între soiuri (Barreira, Casal, et al., 2009; Beccaro et al., 2020a), regiuni producătoare, anul de recoltare (Barreira et al., 2012), condiții pedoclimatice (temperatură, lumină solară și precipitații) (Peña-Méndez et al., 2008), dar și inputuri de cultură, de exemplu nutrienți, minerale, irigații și boli și dăunători (M. C. B. M. de Vasconcelos et al., 2010; Mota et al., 2018).

Cererea crescută a pieței și conștientizarea consumatorilor impun dezvoltarea unor metode fiabile, capabile să distingă diferitele soiuri, evidențiind produse de înaltă calitate în ceea ce privește proprietățile senzoriale și calitative dar și compoziția bioactivă ridicată. În ultimele decenii, s-au folosit diferite metodologii pentru a caracteriza și a distinge între diferitele soiuri de castan dulce, inclusiv caracteristicile morfologice (Furones-Pérez & Fernández-López, 2009) și compoziția chimică care abordează analiza proximală, inclusiv masa uscată, cantitatea de cenușă, grăsimea totală, proteinele totale (M. D. C. B. M. De Vasconcelos et al., 2007; B. Gonçalves et al., 2010), carbohidrați totali, zahăr total, zahăr invertit, amidon, zaharoză (Choupina, 2019), dar și conținuturi de minerale (Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, P, Na și K) (Akbulut et al., 2017; Choupina, 2019; Ertürk et al., 2006), polifenoli totali (mg GAE/g) și activitate antioxidantă (μmol echivalent Trolox/g) pe baza greutateii uscate (Akbulut et al., 2017; Otles & Selek, 2012a) și acizi organici (acizi oxalic, cis-aconitic, citric, ascorbic, malic, chinic și fumaric) (Delgado et al., 2018; B. Gonçalves et al., 2010), aminoacizi liberi (M. D. C. B. M. De Vasconcelos et al., 2007), profil zaharuri (Barreira, Pereira, et al., 2009; Hernández Suárez et al., 2012a).

Timp de zeci de ani, metodele convenționale de extracție, inclusiv macerarea sau extracția Soxhlet folosind diferiți solvenți polari (metanol, etanol, cloroform și eter de petrol) au fost cele mai utilizate pentru extragerea compușilor bioactivi dintr-o matrice naturală și care, din cauza preocupărilor de mediu, economice și de siguranță, prezintă o limitare uriașă pentru o aplicație industrială. Având în vedere aceste dezavantaje, metode de extracție mai durabile, inclusiv extracția cu ultrasunete, extracția cu microunde, extracția fluidului supercritic și extracția enzimatică au fost promovate pentru extracția compușilor bioactivi polari din surse naturale (Leichtweis et al., 2021; Pinto et al., 2021).

Suprafețele de cultivare a castanului din România acoperă o suprafață totală de 3160 ha distribuite pe o suprafață discontinuă, formată din benzi lungi situate la poalele Carpaților, mai ales în partea de vest a României, unde clima moderat-continentală are o ușoară influență mediteraneană. Distribuția naturală a castanului acoperă două centre principale și anume

Maramureș (poalele deluroase ale Baia Mare) și Oltenia (dealurile subcarpatice ale Olteniei pe teritoriul județelor Gorj, Mehedinți și Vâlcea) și alte câteva zone mici de la sud-estul Carpaților Orientali și nord-vest și La sud-vest de platoul Transilvaniei (Chira et al., 2013). Flora semispontană a Olteniei de Nord conține multe biotipuri de castan dulce (*Castanea sativa* Mill). Din 1998, mai multe soiuri franceze, care sunt hibrizi între castanul japonez (*Castanea crenata* Siebold & Zucc.) și castanul european (*Castanea sativa* Mill.) au fost introduse la Stația de Cercetare-Extensiune Pomicultură (SCDP) Vâlcea pentru testare și s-au dovedit. sa cedeze bine în condițiile date. Caracteristici fizice (diametre, înălțime, indice de formă și indice de mărime, masă, volum și greutate specifică), compoziție nutrițională (apă (%), aciditate titrabilă (g acid malic/100 g), lipide (%), proteine (%)) și caracteristicile bioactive (polifenoli totali, flavonoide totale, activitate antioxidantă și unii compuși polifenolici individuali) ale acestor soiuri au fost abordate anterior (Cosmulescu et al., 2020a) și caracteristici suplimentare sunt necesare pentru a face o caracterizare și o comparație detaliată a acestor șase soiuri de castan, pentru a oferi informații valoroase pentru selecția soiului de castan cu caracteristici bioactive de înaltă calitate care pot fi cultivate pentru dezvoltarea diferitelor soiuri cu valoare adăugată. produse alimentare cu multiple beneficii asupra sănătății umane.

Prin urmare, această lucrare își propune să ne consolideze cunoștințele despre compoziția chimică și nutrițională a celor șase soiuri de castan dulci de origine franceză, și anume „Marsol”, „Maraval”, „Bournette”, „Précoce Migoule” și „Marissard” pentru a găsi caracteristici distinctive utile pentru autentificarea unui anumit soi de castan, oferind un avantaj economic important. Pentru aceasta, caracteristicile bioactive (polifenoli totali, flavonoide totale și activitate antioxidantă) examinate prin metode spectrofotometrice UV-Vis, profilul compusului fenolic UHPLC-MS/MS (acizi fenolici, flavonoide), împreună cu un UHPLC-MS/MS nețintă. profilul de screening, profilul zahărului (zaharoză, fructoză, glucoză, maltoză) prin HPLC-ELSD și compoziția elementară (Ca, Mg, Na, K, Fe, Pb, Ni, Cu, Cr) prin F-AAS au fost determinate în soiurile de castan studiate pentru a completa informațiile despre compoziția nutrițională și bioactivă a tuturor acestor soiuri. În plus, am studiat influența anului de recoltare asupra caracteristicilor bioactive și a conținutului de compuși bioactivi specifici. Analiza componentelor principale (PCA) și Analiza clusterelor ierarhice (HCA) au fost utilizate pentru a discrimina între diferitele soiuri dulci cultivate în România.

Proprietățile bioactive ale materialelor vegetale sunt în stransă legătură cu diferitele clase de compuși chimici biologic activi aflați în compoziția naturală a acestora. Acestea se exprimă prin conținutul total de polifenoli exprimați în echivalenți acid galic, conținutul total de flavonoizi

exprimat în unități de rutin sau quercetin și activitatea antioxidantă, exprimată de cele mai multe ori în echivalenți Trolox.

Valorile medii TP, TF și AA pentru soiurile de castan studiate pe parcursul a doi ani consecutivi, 2016 și 2017, investigate în acest studiu și pentru 2015 raportate într-un studiu anterior (Cosmulescu et al. 2020) sunt prezentate în Figura 6.

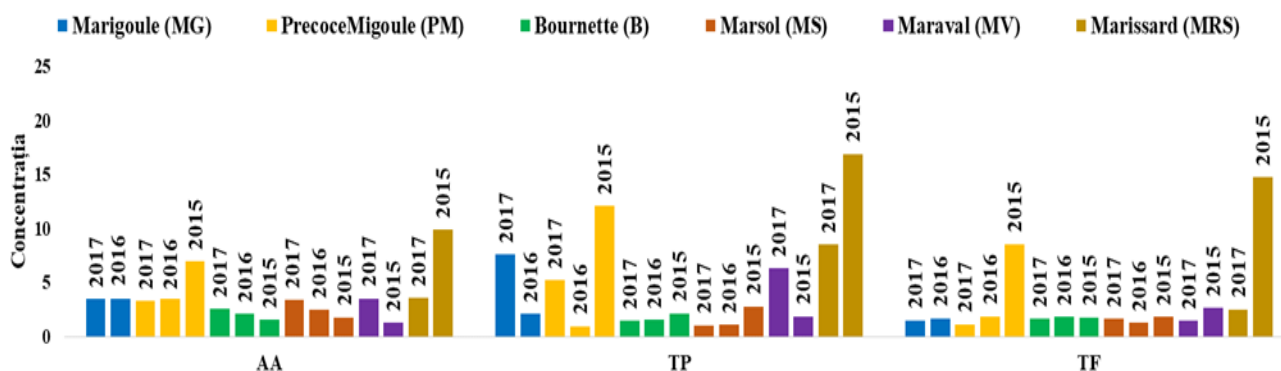


Figura 6: Activitatea antioxidantă (AA) exprimată în μ moli echivalenți Trolox/g, polifenoli totali (TP) exprimați în mg echivalenți GAE/g și flavonoide totale (TF) exprimate în mg echivalenți de rutină/g din cele șase soiuri de castan timp de trei ani consecutivi

Conținuturi mari de TP corespund „Marissard”, cu valori medii de 12,69 mg echivalent GAE/g greutate uscată (DW), urmat de soiurile „Précoce Migoule”, „Marigoule” și „Maraval” cu valori medii de 6,11, 4,84 și 4,10 11 mg GAE echivalent/g DW, respectiv. Valorile obținute au fost în acord cu datele din alte studii (Otles and Selek 2012a). Valorile medii ale TF au variat între 1,57 mg echivalent rutină/g DW în „Marsol” și 8,64 mg echivalent rutină/g DW în „Marissard”.

Pentru a evalua contribuția fiecărei clase la compoziția polifenolică totală, compușii fenolici bioactivi au fost grupați în următoarele clase : acizi benzoici (acizi galic, 3,4-dihidroxibenzoic, p-hidroxibenzoic și siringic), acizi cinamici (cafeic, p-cumaric, ferulic, cinamic și clorogenic), catechine ((+) catechină și (-) epicatechină) și flavanoli (naringin, rutin, miricetin, quercetin, izorhamnetin, apigenin, pinocembrin și t-resveratrol) (Figura 7). Apigenina, hesperidina și kaempferolul nu au fost identificate în extractele de castan, în timp ce crisinul și galanginul au fost cuantificate în cantități foarte mici numai în „Marigoule” sau cuantificate sub LOQ-uri.

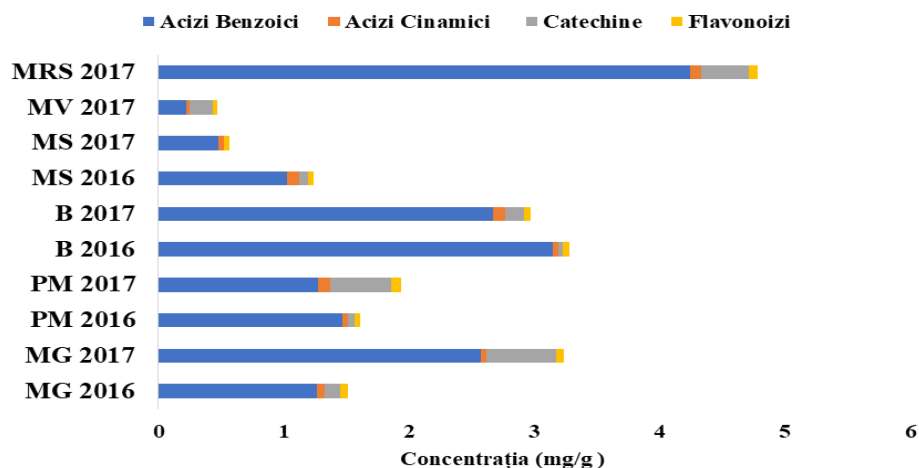


Figura 7: Profilul polifenolic al soiurilor de castan analizate recoltate în anii 2016 și 2017

În cadrul grupelor polifenolice, s-au observat diferențe între soiul de castan și anul de recoltare, cantități mai mari de compuși polifenolici corespunzând soiurilor „Marissard”, „Bournette” și „Précoce Migoule”.

Acizii benzoici și catechinele, recunoscute pentru potențialul lor antioxidant, anticancerigen, antiinflamator și antimicrobian (Dinis et al. 2011; Zavalloni, Andresen, and Flore 2006), a reprezentat componenta principală a extractului polifenolic de castan și dintre aceștia, acizii galic și elagic au fost cuantificați între 0,162–2,077 mg/g DW și 0,046–2,928 mg/g DW, în timp ce (+)-catechina a fost cuantificată între n.d. și 0,547 mg/g DW. Acizii p-cumaric, ferulic și cinamic au fost reprezentativi pentru clasa acizilor cinamici, cu valori cuprinse între 0,008–0,045 mg/g DW pentru acidul p-cumaric, 0,008–0,036 mg/g DW pentru acidul ferulic și 0,002–0,028 mg/g DW pentru acid cinamic. Dintre flavanoli, miricetina, naringina, rutina și quercetina au fost cuantificate în cantități mai mari, cu valori variind între 0,036–0,051 mg/g DW pentru miricetin, n.d.–0,018 mg/g DW pentru naringină, n.d.–0,011 mg/g DW pentru rutină și n.d.–0,009 mg/g DW pentru quercetină. t-Resveratrolul a fost cuantificat cu valori cuprinse între 0,001 și 0,014 mg/g DW, cu cantități mai mari în „Marigoule” și „Marissard” în anul de recoltă 2017. Rezultatele analizei cantitative sunt similare cu cele obținute în alte studii (Beccaro et al., 2020a; da & Silva, 2016; Otles & Selek, 2012a).

Identificarea și cuantificarea polifenolilor din fructe sunt de o importanță majoră datorită impactului lor benefic asupra sănătății umane datorită efectelor aditive și sinergice asupra captării radicalilor (Hohrenk et al. 2020). Astfel, a fost realizată o abordare analitică bazată pe o metodă non-țintă UHPLC-Q-Orbitrap HRMS care urmărește identificarea altor compuși bioactivi și metaboliți specializați care apar în extractele metanolice din fructele de castan, care sunt

responsabile pentru activitățile lor antioxidante și antiinflamatorii, și să evidențieze diferențele dintre extractele diferitelor soiuri de castan. Analiza procesării datelor a folosit software-ul Compound Discoverer folosind un șablon de lucru metabolomic neîntit, care cuprinde un flux de lucru neîntit care include opțiuni pentru alegerea vârfulor, efectuează alinierea RT, predicția formulei moleculare, evaluarea aducților, atribuirea și compararea modelului de fragmentare (inclusiv dealchilare și produse de dearilare și produse de bio-transformare), adnotare de fundal, o bibliotecă automată și căutare în baze de date pentru scopuri de identificare, inclusiv mzCloud (ddMS2), Chemspider, MzVault și Mass List Matches (Hohrenk et al. 2020). O prezentare generală a fluxului de lucru și a parametrilor Compound Discoverer poate fi găsită în Figura 30. Rezultatul este o listă de caracteristici, care include masa precisă, timpul de retenție, aducții m/z și zonele și intensitățile acestora. Au fost luate în considerare doar caracteristicile care au fost de cinci ori intensitatea blankului.

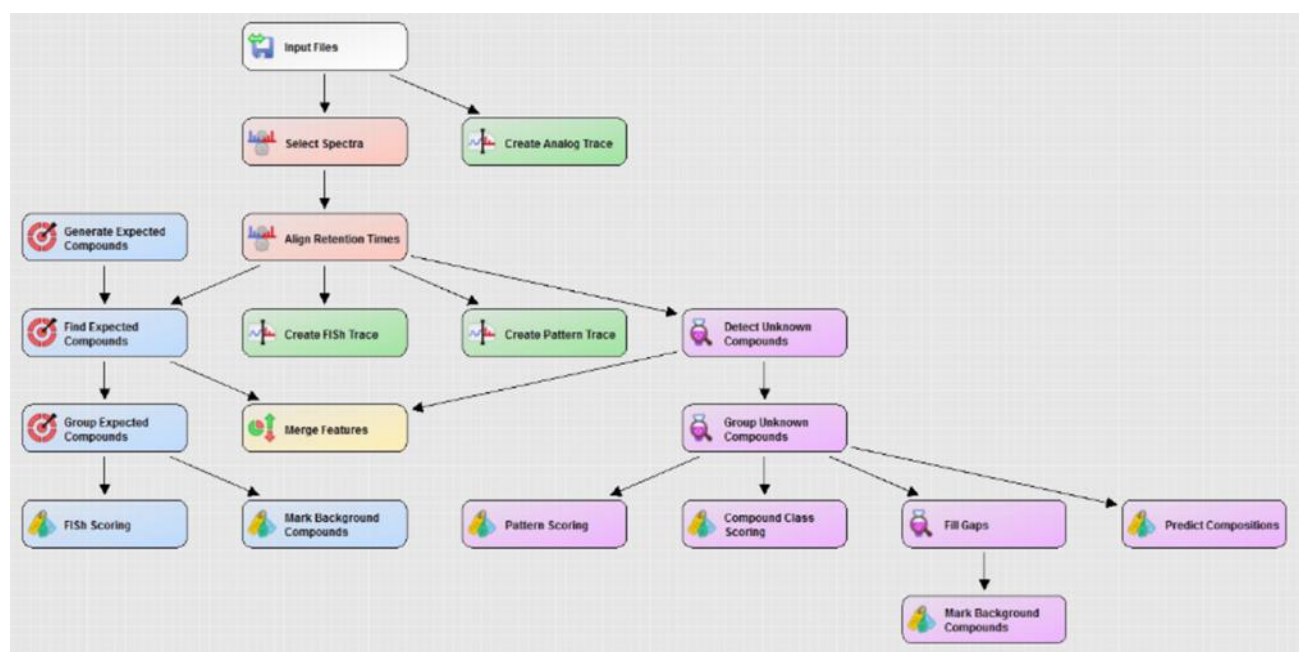


Figura 8: Flux de lucru Metabolomics neîntit: Găsirea și identificarea diferențele dintre probe

Pe baza rezultatelor procesării softului Compound Discoverer, a fost atribuită identitatea majorității picurilor. În special, cinci clase principale de compuși, adică **compuși fitochimici** (flavanoli, izoflavone, calconi, derivați de antocianidină, terpenoide și sesquiterpenoide, vitamine, hormoni vegetali gibereline, metaboliți), **acizi grași** (saturați și nesaturați), **acizi grași și derivați aminoacizi**, **acizi organici**, dar și diverse **zaharuri** și derivați de zahar au putut fi identificate în extractele hidro-metanolice de castan.

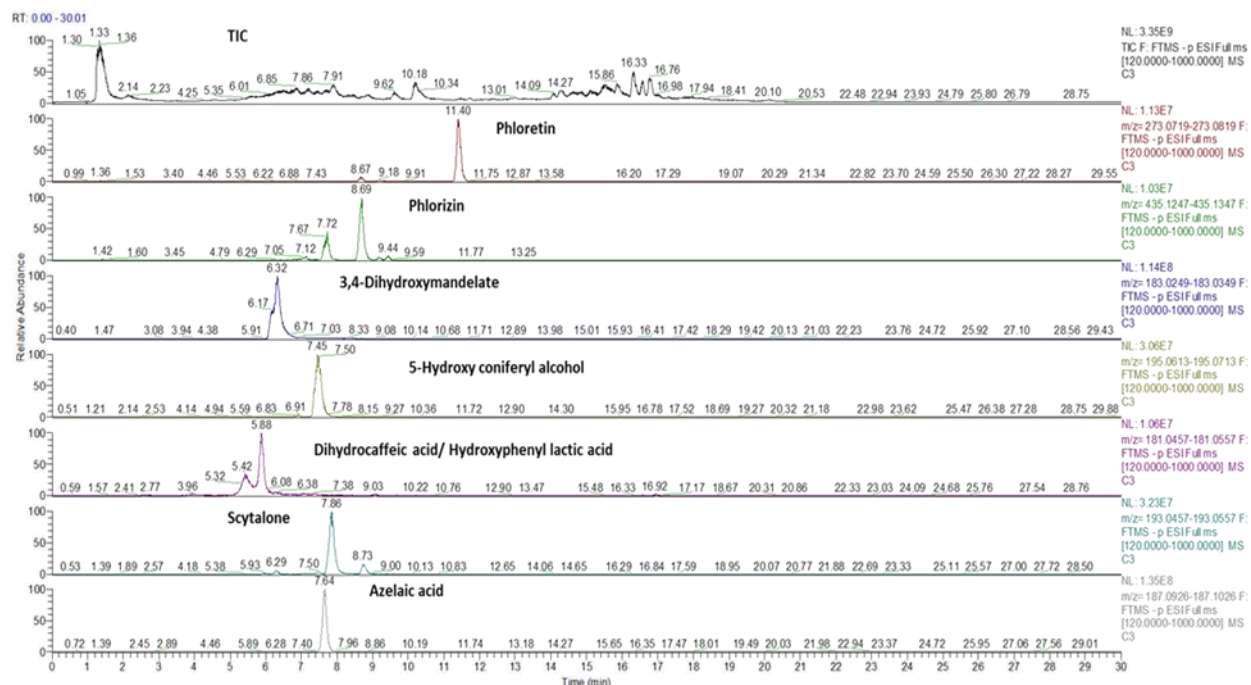


Figura 9. Identificarea acizilor grași și a unor derivați din extractul de castan prin analiza UHPLC-Q-Exacte de înaltă precizie a precursorilor deprotonați și a ionilor de fragmentare ai componentelor specifice combinate cu prelucrarea datelor folosind software-ul Compound Discoverer

Carbohidrații sunt componente relevante în castan, sucroza fiind un parametru important în evaluarea calității fructului. Sucroza împreună cu glucoza și fructoza sunt prezente în cantități semnificative în castan, profilul zaharurilor libere contribuind la identificarea soiurilor de castan. Profilul zahărului poate fi influențat de mai multe condiții, cum ar fi soiuri, genotipuri, factori de mediu (condițiile climatice, caracteristicile solului), practicile tehnice și culturale și timpul de recoltare (Mert & Ertürk, 2017).

Cea mai mare cantitate de zaharuri a fost observată pentru „Bournette” în 2017, urmată de „Marigoule” și „Précoce Migoule” în anul de recoltă 2016 (Figura 10a). Sucroza a fost cel mai abundent zahăr la castanele analizate cu valori cuprinse între 20,34–154,94 g/kg DW, valoarea inferioară corespunzând lui „Maraval”, în timp ce cea mai mare valoare corespunde „Bournette” în 2017. Nivelul de zaharoză al fructelor de castan cultivate în România este similară cu cele cultivate în Turcia (68,20–174,00 g/kg DW) (Mert & Ertürk, 2017), dar mai scăzută comparativ cu fructele de castan cultivate în Italia (2,98–245,09 g/kg DW) (Beccaro et al., 2020) și Portugalia (40,30–233,00 g. /kg DW) (Beccaro et al., 2020) și mai mare în comparație cu fructele de castan cultivate în Tenerife (Spania) (31,10–99,40 g/kg DW) (Hernández Suárez et al., 2012).

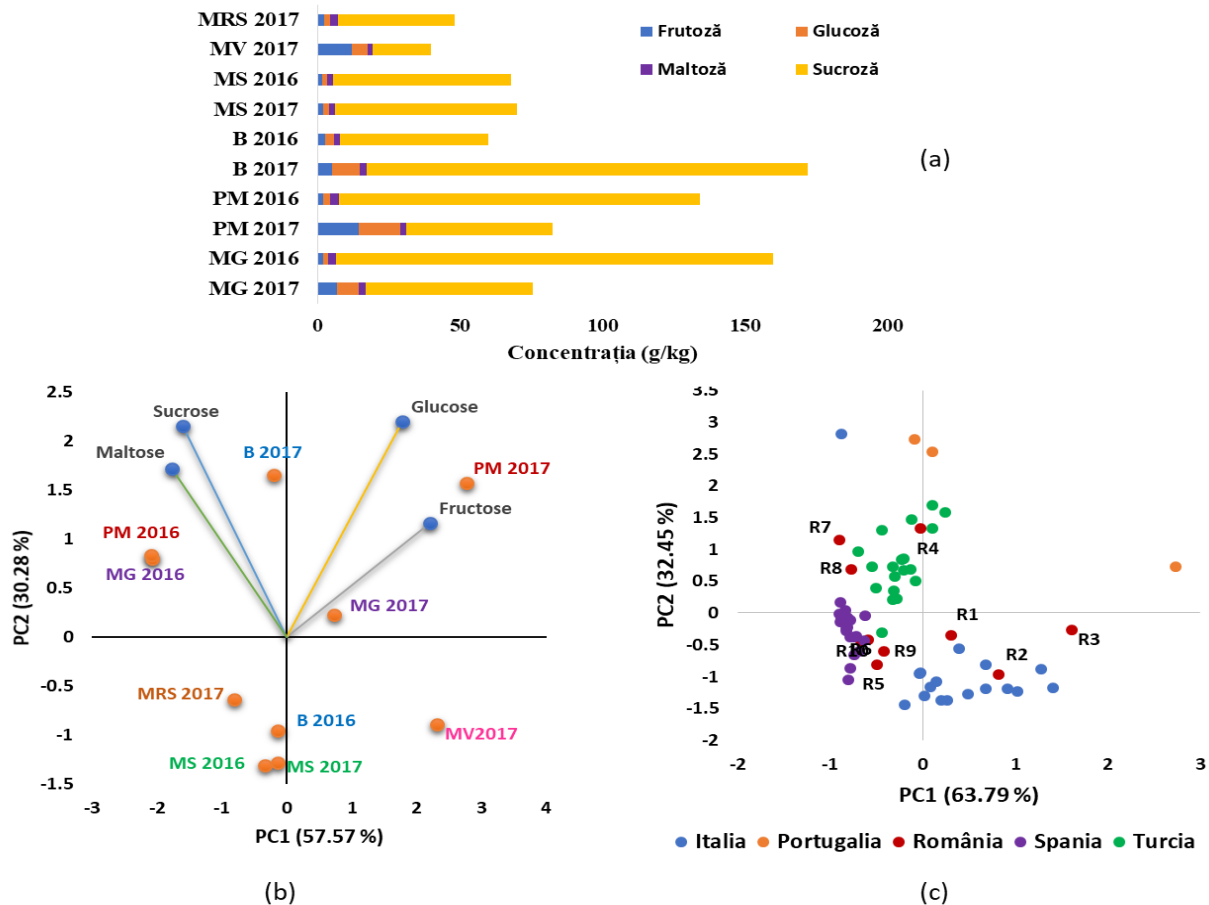


Figura 10. (a) Profilul zahărului soiurilor de castan analizate recoltate în 2016 și 2017; (b) Analiza componentelor principale (PCA) a fructelor diferitelor soiuri de castan pe bază de compuși fenolici individuali („Précoce Migoule”—PM, „Bournette”—B, „Marsol”—MS, „Marissard”—MRS, „Marigoule”—MG și „Maraval”—MV); (c) Analiza PCA bazată pe compoziția de zahăr a fructelor de castan recoltate în unele țări europene.

În general, fructoza și glucoza au fost cuantificate în cantități egale în soiurile de castane studiate, fructoza variind între 1,55–14,35 g/kg DW și glucoză variind între 1,56–14,46 g/kg DW, cel mai mare conținut corespunzând „Précoce Migoule” recoltat în 2017 (Figura 10a). Datele noastre au fost mai mari decât cele raportate de alți autori care au găsit concentrații de glucoză și fructoză între nedetectate și 3,1 g/kg DW pentru ambele monozaharide (De La Montaña Míguel, Míguez Bernárdez, and García Queijeiro 2004) sau între 0,56–2,40 g/kg DW pentru fructoză și 0,49–1,90 g/kg DW pentru glucoză (Hernández Suárez et al., 2012), dar în același interval ca Mert și colab. care raportează fructoză între 1,5–8,0 g/kg DW și glucoză între 4,0–11,3 g/kg DW (Mert

& Ertürk, 2017). Maltoza a fost cuantificată în cantități mici, cu valori cuprinse între 1,77 și 3,16 g/kg DW. Se poate concluziona că anul de recoltă 2017, în care au fost temperaturi mai ridicate și precipitații mai abundente, a fost mai favorabil pentru acumularea de zaharuri în „Bournette”, în timp ce anul de recoltă 2016 a fost mai favorabil pentru soiurile „Marigoule” și „Précoce Migoule”.

Analiza PCA bazată pe profilul zahărului (zaharoză, fructoză și glucoză) al fructelor de castan cultivate în principalele țări europene producătoare de castan (Italia, Portugalia, Turcia, Spania) și al castanului cultivat în România (Figura 10c), indică o bună corelație între conținutul de zahăr al castanelor și condițiile climatice, temperat continentale corespunzătoare în România și Turcia (în jurul Mării Negre) caracterizate printr-o temperatură medie de 11,94°C și 566,07 mm precipitații în Turcia și 10,51°C și 669,15 mm precipitații în România, comparativ cu clima temperat oceanică din Portugalia (temperatura medie de 16,11°C și 677,93 mm precipitații), clima mediteraneană din Italia (temperatura medie de 13,35°C și 791,32 mm precipitații) și climatul subtropical cu unele influențe din Sahara în Tenerife (Spania) (temperatura medie de 14,47°C și 518,24 mm precipitații). Castanele din Portugalia Italia, Spania și Turcia au fost grupate în grupuri distincte, în timp ce castanele cultivate în România s-au suprapus peste celelalte.

CONCLUZII FINALE

Toate probele de miere au prezentat valori substanțiale de compuși bioactivi, valorile de polifenoli și flavonozi fiind într-un raport optim, lucru demonstrat de rezultatele privind activitatea antioxidantă a acestora. S-a remarcat faptul că există o corelație între cele trei tipuri de analize, iar faptul că în toate probele analizate au rezultate promițătoare, practic mierea din țara noastră este de calitate optimă. Valorile rezultate sunt în concordanță cu sortimentul de miere, anul de recoltă și zonă, rezultatele cele mai semnificative fiind remarcate în probele provenite din nordul și vestul țării. Rezultatele obținute au arătat că profilul compușilor fenolici din mierea românească pare a fi utilă pentru determinarea originii lor florale, deoarece acești compuși demonstrează o variație semnificativă a compoziției lor cantitative la miere cu origine florală diferită. Este dificil de diferențiat mierea contaminată cu compuși fenolici originari din alte surse florale datorită asemănării amprentelor compușilor fenolici.

Autentificarea mierii de albine și identificarea falsificărilor prin determinări fizico-chimice a demonstrat faptul că raportul fructoză/glucoză a fost în intervalul 0,32-1,97, cu o valoare sub 1 pentru mierea de rapiță care indică cristalizarea sa rapidă.

Autentificarea mierii de albine și identificarea falsificărilor prin determinări izotopice a stabilit faptul că 3 probe (R3, C10 și C11), reprezentând 4,8% din mierea analizată au avut un conținut de zahăr $C4 > 7\%$, acestea fiind clasificate imediat ca miere adulterată, restul de probe de miere fiind considerate pure.

Analiza statistică multivariată aplicată parametrilor izotopici s-a dovedit a fi adecvată pentru a diferenția mierea adulterată, dar nu a permis identificarea de miere neconformă cu standardele de calitate. Valorile $\delta^{13}C$ ale proteinei extrase din miere ($\delta^{13}CP$), parametrii fizico - chimici generali și compoziția majoră de zahăr depinde de originea botanică a mierii.

Pe baza profilului polifenolic și a diferitelor rapoarte dintre polifenoli și flavonoizi totali s-a reușit și diferențierea unor soiuri de vin roșu, separă vinurile Feteasca Neagră și Pinot Noire de vinurile Cabernet Sauvignon și Merlot fiind vinuri în care se găsesc importante cantități de compuși fenolici totali.

Se poate observa că vinurile mai vechi, în principal soiurile de vin roșu Fetească Neagră și Pinot Noire și soiurile de vin alb Muscat Ottonel și Riesling Italian prezintă un conținut mai mare de polifenoli și capacitate antioxidantă și sunt considerate a fi de mai bună calitate.

Acest studiu evidențiază, pentru prima dată, o caracterizare bioactivă cuprinzătoare a soiurilor de castan dulce „Marsol”, „Maraval”, „Bournette”, „Précoce Migoule” și „Marissard” cultivate la Stația de Cercetare Pomicultură—Extensie (SCDP) Vâlcea, în Oltenia de Nord, România pentru a oferi informații valoroase pentru selecția soiului de castan cu caracteristici bioactive de înaltă calitate care poate fi cultivat pentru dezvoltarea diferitelor produse alimentare cu valoare adăugată și beneficii multiple asupra sănătății umane.

Pe baza conținutului total de polifenoli, a flavonoidelor totale, a activității antioxidante și a profilului individual al compușilor fenolici, nu s-au observat diferențe semnificative între soiurile studiate, un potențial bioactiv mai mare corespunzător lui „Marissard”, fiind urmat de „Précoce Migoule”, „Marigoule” și „Bournette”. Pe baza acizilor galic și cinamic și a rutinului pot fi observate unele diferențe între variabilele soiurilor studiate, „Bournette” prezentând un conținut mai mare de acid galic și un acid cinamic mai mic, în timp ce „Marissard” a prezentat cele mai mari cantități de acid cinamic și rutin. Analiza discriminantă indică o discriminare clară între fructele de castan recoltate în diferiți ani, indicând faptul că condițiile climatice au o contribuție semnificativă la sinteza compușilor bioactivi ai fructelor de castan.

Screeningul HRMS cuplat cu procesarea statistică a datelor folosind software-ul Compound Discoverer bazat pe un șablon de lucru metabolomic neînțit permite identificarea altor compuși bioactivi din extractele hidro-metanolice de castane, cum ar fi compuși fitochimici (flavanoli, izoflavone, calchoni, derivați de antocianidină, terpenoide și sesquiterpenoide), vitamine, hormoni vegetali giberelina, metaboliți, acizi grași (acizi grași saturați și nesaturați și derivați), aminoacizi și acizi organici care sunt probabil responsabili pentru activitățile lor antioxidante și antiinflamatorii.

Analiza statistică bazată pe datele calitative referitoare la amprentele fitochimice și amprentele acizilor grași saturați și nesaturați indică o discriminare clară a fructelor de castan recoltate în diferiți ani, indicând faptul că amprentele fitochimice și de acizi grași ale castanului depind în primul rând de condițiile climatice și ulterior de genotip. Pe baza amprentelor fitochimice HRMS, „Marigoule” și „Marissard” au fost grupate separate de celelalte soiuri, în timp ce, pe baza amprentelor digitale de acizi grași și derivați, „Précoce Migoule” și „Bournette” formează un grup distinct de celelalte soiuri. Datele cantitative ar fi foarte utile pentru identificarea soiurilor de castan cu compoziție fitochimică și acizi grași ridicate.

Diferențe mari și semnificative ($p < 0,0001$) în zahăr și compoziție minerală au fost detectate printre soiuri și ani de recoltă diferiți. Soiul și condițiile climatice influențează compoziția zahărului, cea mai mare cantitate de zaharuri fiind observată la soiul „Bournette” în 2017, care a fost mai cald și mai ploios față de 2016, în timp ce anul de recoltă 2016 a fost mai favorabil pentru acumularea de zaharuri în Soiurile „Marigoule” și „Précoce Migoule”. Soiul și condițiile climatice influențează compoziția elementară a fructelor de castan, compoziția minerală a solului fiind aceeași pentru toate soiurile studiate. Soiul „Précoce Migoule” prezintă un conținut mai mare de macro și micronutrienți, K fiind cel mai abundent nutrient. Au fost identificate cantități mai mari de Na în „Bournette” și „Marissard”.

Analiza PCA bazată pe profilul zahărului (zaharoză, fructoză și glucoză) și compoziția minerală a fructelor de castan cultivate în România și a celor cultivate în principalele țări europene producătoare de castan (Italia, Portugalia, Turcia, Spania) indică o bună corelație între zahăr și minerale. conținutul de castani și condițiile climatice corespunzătoare diferitelor zone geografice. Se poate, astfel, concluziona că caracteristicile climatice și pedoclimatice corespunzătoare Nordului Olteniei, România favorizează acumularea de zaharuri și minerale, și astfel, se pot obține culturi cu caracteristici nutriționale similare cu cele obținute în zona specifică de cultură.

Investigațiile analitice au relevat faptul că soiurile de castan dulce cultivate în România prezintă o compoziție bioactivă, fitochimică și nutrițională similară cu soiurile cultivate în marile țări europene producătoare de castan, indicând potențialul mare de adaptare al castanului în zona temperat continentală cu mici influențe mediteraneene caracteristice, din zona de sud-vest a României.

Rezultatele prezentate în cadrul tezei de doctorat constituie punctul de plecare pentru construirea unor baze de date pentru fructele de castane din România, bazându-ne pe diferite clase de compuși chimici aflați în compoziția chimică naturală a castanelor (compuși fenolici individuali, zaharuri, minerale, polifenoli totali, flavonoizi totali).

Metodologiile de clasificare a mierii de albine, vinuri și castane propuse în cadrul prezentei teze de doctorat pot fi aplicate și pentru produsele provenite din alte varietăți (soiuri, origine florală) din România, oferind astfel o amprentă relevantă a produselor românești, fiind utile pentru prevenirea practicilor frauduloase din industria alimentară.

REFERINȚE

- Beccaro, Gabriele L., Dario Donno, Guglielmo Gianni Lione, Marta De Biaggi, Giovanni Gamba, Sabrina Rapalino, Isidoro Riondato, Paolo Gonthier, and Maria Gabriella Mellano. 2020a. "Castanea Spp. Agrobiodiversity Conservation: Genotype Influence on Chemical and Sensorial Traits of Cultivars Grown on the Same Clonal Rootstock." *Foods* 2020, Vol. 9, Page 1062 9(8):1062. doi: 10.3390/FOODS9081062.
- Beccaro, Gabriele L., Dario Donno, Guglielmo Gianni Lione, Marta De Biaggi, Giovanni Gamba, Sabrina Rapalino, Isidoro Riondato, Paolo Gonthier, and Maria Gabriella Mellano. 2020b. "Castanea Spp. Agrobiodiversity Conservation: Genotype Influence on Chemical and Sensorial Traits of Cultivars Grown on the Same Clonal Rootstock." *Foods* 2020, Vol. 9, Page 1062 9(8):1062. doi: 10.3390/FOODS9081062.
- Bertoncelj, Jasna, Tomaž Polak, Urška Kropf, Mojca Korošec, and Terezija Golob. 2011. "LC-DAD-ESI/MS Analysis of Flavonoids and Absciscic Acid with Chemometric Approach for the Classification of Slovenian Honey." *Food Chemistry* 127(1):296–302. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2011.01.003.
- Biesaga, Magdalena, and Krystyna Pyrzynska. 2009. "Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Studies of the Phenolic Compounds in Honey." *Journal of Chromatography A* 1216(38):6620–26. doi: 10.1016/j.chroma.2009.07.066.

- Bobis, O., L. Marghitas, I. K. Rindt, M. Niculae, and D. Dezmirean. 2008. "Honeydew Honey: Correlations between Chemical Composition, Antioxidant Capacity and Antibacterial Effect." *Lucrări Stiințifice Zootehnie Si Biotehnologii* 41(2):271–77.
- Campone, Luca, Anna Lisa Piccinelli, Imma Pagano, Sonia Carabetta, Rosa Di Sanzo, Mariateresa Russo, and Luca Rastrelli. 2014. "Determination of Phenolic Compounds in Honey Using Dispersive Liquid–Liquid Microextraction." *Journal of Chromatography A* 1334:9–15. doi: 10.1016/J.CHROMA.2014.01.081.
- Can, Zehra, Oktay Yildiz, Huseyin Sahin, Emine Akyuz Turumtay, Sibel Silici, and Sevgi Kolayli. 2015. "An Investigation of Turkish Honeys: Their Physico-Chemical Properties, Antioxidant Capacities and Phenolic Profiles." *Food Chemistry* 180:133–41. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2015.02.024.
- Chua, Lee Suan, Norul Liza A. Rahaman, Nur Ardawati Adnan, and Ti Tjih Eddie Tan. 2013. "Antioxidant Activity of Three Honey Samples in Relation with Their Biochemical Components." *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2013:1–8. doi: 10.1155/2013/313798.
- Ciucure, Corina Teodora, Elisabeta Irina Geana, Claudia Sandru, Ovidiu Tita, and Mihai Botu. 2022. "Phytochemical and Nutritional Profile Composition in Fruits of Different Sweet Chestnut (*Castanea Sativa* Mill.) Cultivars Grown in Romania." *Separations* 9(3). doi: 10.3390/separations9030066.
- Ciulu, Marco, Nadia Spano, Maria Pilo, and Gavino Sanna. 2016. "Recent Advances in the Analysis of Phenolic Compounds in Unifloral Honeys." *Molecules* 21(4):451. doi: 10.3390/molecules21040451.
- Consonni, Roberto, and Laura Ruth Cagliani. 2015. "Recent Developments in Honey Characterization." *RSC Advances* 5(73):59696–714. doi: 10.1039/C5RA05828G.
- Cosmulescu, S., I. Trandafir, V. Nour, and M. Botu. 2020. "Physical and Compositional Characteristics of Chestnut Fruits." *Romanian Journal of Horticulture* 1:51–58. doi: DOI 10.51258/RJH.2020.07.
- da, Luís Rodrigues., and Branca Maria. Silva. 2016. "Natural Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables As Health Promoters."
- Dinca, Oana-Romina, Roxana Elena Ionete, Raluca Popescu, Diana Costinel, and Gabriel-Lucian Radu. 2014. "Geographical and Botanical Origin Discrimination of Romanian Honey Using Complex Stable Isotope Data and Chemometrics." *Food Analytical Methods* 8(2):401–12. doi: 10.1007/s12161-014-9903-x.
- Dinis, L. T., F. Peixoto, T. Pinto, R. Costa, R. N. Bennett, and J. Gomes-Laranjo. 2011. "Study of Morphological and Phenological Diversity in Chestnut Trees ('Judia' Variety) as a Function of Temperature Sum." *Environmental and Experimental Botany* 70(2–3):110–20. doi: 10.1016/J.ENVEXPBOT.2010.08.003.

- Dobre, Irina, Olga Escuredo, Shantal Rodriguez-Flores, and Maria Carmen Seijo. 2014. "Evaluation of Several Romanian Honeys Based on Their Palynological and Biochemical Profiles." *International Journal of Food Properties* 17(8):1850–60. doi: 10.1080/10942912.2012.752379.
- Du, Bing, Liming Wu, Xiaofeng Xue, Lanzhen Chen, Yi Li, Jing Zhao, and Wei Cao. 2015. "Rapid Screening of Multiclass Syrup Adulterants in Honey by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography/Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(29):6614–23. doi: 10.1021/acs.jafc.5b01410.
- European Commission. 2015. "Commission Recommendation on a Coordinated Control Plan with a View to Establishing the Prevalence of Fraudulent Practices in the Marketing of Certain Foods." *Commission Recommendation C(2015) 1558 Final*.
- Gašić, Uroš, Silvio Kečkeš, Dragana Dabić, Jelena Trifković, Dušanka Milojković-Opsenica, Maja Natić, and Živoslav Tešić. 2014. "Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Serbian Polyfloral Honeys." *Food Chemistry* 145:599–607. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.08.088.
- Gašić, Uroš M., Maja M. Natić, Danijela M. Mišić, Darija V. Lušić, Dušanka M. Milojković-Opsenica, Živoslav Lj. Tešić, and Dražen Lušić. 2015. "Chemical Markers for the Authentication of Unifloral *Salvia Officinalis* L. Honey." *Journal of Food Composition and Analysis* 44:128–38. doi: 10.1016/J.JFCA.2015.08.008.
- Geană, Elisabeta Irina, Corina Teodora Ciucure, Victoria Artem, and Constantin Apetrei. 2020. "Wine Varietal Discrimination and Classification Using a Voltammetric Sensor Array Based on Modified Screen-Printed Electrodes in Conjunction with Chemometric Analysis." *Microchemical Journal* 159. doi: 10.1016/j.microc.2020.105451.
- Gómez-Plaza, E., R. Gil-Muñoz, J. M. López-Roca, and A. Martínez. 2000. "Color and Phenolic Compounds of a Young Red Wine. Influence of Wine-Making Techniques, Storage Temperature, and Length of Storage Time." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(3):736–41. doi: 10.1021/jf9902548.
- Hernández Suárez, M., B. Rodríguez Galdón, D. Ríos Mesa, C. Díaz Romero, and E. Rodríguez Rodríguez. 2012a. "Sugars, Organic Acids and Total Phenols in Varieties of Chestnut Fruits from Tenerife (Spain)." *Food and Nutrition Sciences* 3:705–15. doi: 10.4236/fns.2012.36096.
- Hernández Suárez, M., B. Rodríguez Galdón, D. Ríos Mesa, C. Díaz Romero, and E. Rodríguez Rodríguez. 2012b. "Sugars, Organic Acids and Total Phenols in Varieties of Chestnut Fruits from Tenerife (Spain)." *Food and Nutrition Sciences* 3:705–15. doi: 10.4236/fns.2012.36096.
- Hohrenk, Lotta L., Fabian Itzel, Nicolai Baetz, Jochen Tuerk, Maryam Vosough, and Torsten C. Schmidt. 2020. "Comparison of Software Tools for Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry Data Processing in Nontarget Screening of Environmental Samples." *Analytical Chemistry* 92(2):1898–1907. doi: 10.1021/acs.analchem.9b04095.

- Hosu, Anamaria, Vasile-Mircea Cristea, and Claudia Cimpoiu. 2014. "Analysis of Total Phenolic, Flavonoids, Anthocyanins and Tannins Content in Romanian Red Wines: Prediction of Antioxidant Activities and Classification of Wines Using Artificial Neural Networks." *Food Chemistry* 150:113–18. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.10.153.
- Hosu, Anamaria, Veronica Floare-Avram, Dana Alina Magdas, Ioana Feher, Mihai Inceu, and Claudia Cimpoiu. 2016. "The Influence of the Variety, Vineyard, and Vintage on the Romanian White Wines Quality." *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2016:1–10. doi: 10.1155/2016/4172187.
- Jasicka-Misiak, Izabela, Anna Poliwoda, Małgorzata Dereń, and Paweł Kafarski. 2012. "Phenolic Compounds and Absciscic Acid as Potential Markers for the Floral Origin of Two Polish Unifloral Honeys." *Food Chemistry* 131(4):1149–56. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2011.09.083.
- Karabagias, Ioannis K., Maria V. Vavoura, Christos Nikolaou, Anastasia V. Badeka, Stavros Kontakos, and Michael G. Kontominas. 2014. "Floral Authentication of Greek Unifloral Honeys Based on the Combination of Phenolic Compounds, Physicochemical Parameters and Chemometrics." *Food Research International* 62:753–60. doi: 10.1016/J.FOODRES.2014.04.015.
- Kaškonienė, Vilma, and Petras R. Venskutonis. 2010. "Floral Markers in Honey of Various Botanical and Geographic Origins: A Review." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9(6):620–34. doi: 10.1111/j.1541-4337.2010.00130.x.
- Kečkeš, Silvio, Uroš Gašić, Tanja Ćirković Veličković, Dušanka Milojković-Opsenica, Maja Natić, and Živoslav Tešić. 2013. "The Determination of Phenolic Profiles of Serbian Unifloral Honeys Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography/High Resolution Accurate Mass Spectrometry." *Food Chemistry* 138(1):32–40. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2012.10.025.
- Khan, Shahid Ullah, Syed Ishtiaq Anjum, Khaista Rahman, Mohammad Javed Ansari, Wasim Ullah Khan, Sajid Kamal, Baharullah Khattak, Ali Muhammad, and Hikmat Ullah Khan. 2018. "Honey: Single Food Stuff Comprises Many Drugs." *Saudi Journal of Biological Sciences* 25(2):320–25. doi: 10.1016/J.SJBS.2017.08.004.
- Kivrak, Şeyda, and İbrahim Kivrak. 2017. "Assessment of Phenolic Profile of Turkish Honeys." *International Journal of Food Properties* 20(4):864–76. doi: 10.1080/10942912.2016.1188307.
- De La Montaña Míguez, J., M. Míguez Bernárdez, and J. M. García Queijeiro. 2004. "Composition of Varieties of Chestnuts from Galicia (Spain)." *Food Chemistry* 84(3):401–4. doi: 10.1016/S0308-8146(03)00249-8.
- Luo, Donghui, Haiying Luo, Hao Dong, Yanping Xian, Xindong Guo, and Yuluan Wu. 2016. "Hydrogen (2H/1H) Combined with Carbon (13C/12C) Isotope Ratios Analysis to Determine the Adulteration of Commercial Honey." *Food Analytical Methods* 9(1):255–62. doi: 10.1007/s12161-015-0202-y.

- Machado De-Melo, Adriane Alexandre, Ligia Bicudo de Almeida-Muradian, María Teresa Sancho, and Ana Pascual-Maté. 2018. "Composition and Properties of *Apis Mellifera* Honey: A Review." *Journal of Apicultural Research* 57(1):5–37. doi: 10.1080/00218839.2017.1338444.
- Mărghitaş, Al. Liviu, Daniel Dezmirean, Adela Moise, Otilia Bobis, Laura Laslo, and Stefan Bogdanov. 2009. "Physico-Chemical and Bioactive Properties of Different Floral Origin Honeys from Romania." *Food Chemistry* 112(4):863–67. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.06.055.
- Mattonai, Marco, Erica Parri, Diletta Querci, Ilaria Degano, and Erika Ribechini. 2016. "Development and Validation of an HPLC-DAD and HPLC/ESI-MS2 Method for the Determination of Polyphenols in Monofloral Honeys from Tuscany (Italy)." *Microchemical Journal* 126:220–29. doi: 10.1016/J.MICROC.2015.12.013.
- Meda, Aline, Charles Euloge Lamien, Marco Romito, Jeanne Millogo, and Odile Germaine Nacoulma. 2005. "Determination of the Total Phenolic, Flavonoid and Proline Contents in Burkina Fasan Honey, as Well as Their Radical Scavenging Activity." *Food Chemistry* 91(3):571–77. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2004.10.006.
- Meo, Sultan Ayoub, Saleh Ahmad Al-Asiri, Abdul Latief Mahesar, and Mohammad Javed Ansari. 2017. "Role of Honey in Modern Medicine." *Saudi Journal of Biological Sciences* 24(5):975–78. doi: 10.1016/J.SJBS.2016.12.010.
- Mert, Cevriye, and ümran Ertürk. 2017a. "Chemical Compositions and Sugar Profiles of Consumed Chestnut Cultivars in the Marmara Region, Turkey." *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 45(1):203–7. doi: 10.15835/NBHA45110729.
- Mert, Cevriye, and ümran Ertürk. 2017b. "Chemical Compositions and Sugar Profiles of Consumed Chestnut Cultivars in the Marmara Region, Turkey." *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 45(1):203–7. doi: 10.15835/NBHA45110729.
- Moniruzzaman, M., M. I. Khalil, S. A. Sulaiman, and S. H. Gan. 2012. "Advances in the Analytical Methods for Determining the Antioxidant Properties of Honey: A Review." *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines : AJTCAM* 9(1):36–42.
- Oroian, M., and S. Ropciuc. 2017. "Honey Authentication Based on Physicochemical Parameters and Phenolic Compounds." *Computers and Electronics in Agriculture* 138:148–56. doi: 10.1016/J.COMPAG.2017.04.020.
- Oroian, M., S. Ropciuc, and A. Buculei. 2017. "Romanian Honey Authentication Based on Physico-Chemical Parameters and Chemometrics." *Journal of Food Measurement and Characterization* 11(2):719–25. doi: 10.1007/s11694-016-9441-x.
- Oroian, M., S. Ropciuc, S. Paduret, and E. T. Sanduleac. 2017. "Authentication of Romanian Honeys Based on Physicochemical Properties, Texture and Chemometric." *Journal of Food Science and Technology* 54(13):4240–50. doi: 10.1007/s13197-017-2893-0.

- Otles, Semih, and Ilknur Selek. 2012a. "Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Chestnut (*Castanea Sativa* Mill.) Fruits." *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods* 4(4):199–205. doi: 10.1111/J.1757-837X.2012.00180.X.
- Otles, Semih, and Ilknur Selek. 2012b. "Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Chestnut (*Castanea Sativa* Mill.) Fruits." *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods* 4(4):199–205. doi: 10.1111/J.1757-837X.2012.00180.X.
- Pandeya, Ankit, Sagar Rayamajhi, Pravin Pokhrel, and Basant Giri. 2018. "Evaluation of Secondary Metabolites, Antioxidant Activity, and Color Parameters of Nepali Wines." *Food Science & Nutrition* 6(8):2252–63. doi: 10.1002/fsn3.794.
- Pascual-Maté, Ana, Sandra M. Osés, Miguel A. Fernández-Muiño, and M. Teresa Sancho. 2018. "Analysis of Polyphenols in Honey: Extraction, Separation and Quantification Procedures." *Separation & Purification Reviews* 47(2):142–58. doi: 10.1080/15422119.2017.1354025.
- Sergiel, Iwona, Pawel Pohl, and Magdalena Biesaga. 2014. "Characterisation of Honeys According to Their Content of Phenolic Compounds Using High Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry." *Food Chemistry* 145:404–8. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.08.068.
- Shen, Shi, Jingbo Wang, Qin Zhuo, Xi Chen, Tingting Liu, and Shuang-Qing Zhang. 2018. "Quantitative and Discriminative Evaluation of Contents of Phenolic and Flavonoid and Antioxidant Competence for Chinese Honeys from Different Botanical Origins." *Molecules* 23(5):1110. doi: 10.3390/molecules23051110.
- da Silva, Isnandia Andréa Almeida, Tania Maria Sarmiento da Silva, Celso Amorim Camara, Neide Queiroz, Marciane Magnani, Jaílson Santos de Novais, Luiz Edmundo Bastos Soledade, Edeltrudes de Oliveira Lima, Antonia Lucia de Souza, and Antonio Gouveia de Souza. 2013. "Phenolic Profile, Antioxidant Activity and Palynological Analysis of Stingless Bee Honey from Amazonas, Northern Brazil." *Food Chemistry* 141(4):3552–58. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2013.06.072.
- Stratil, P., V. Kubáň, and J. Fojtová. 2008. "Comparison of the Phenolic Content and Total Antioxidant Activity in Wines as Determined by Spectrophotometric Methods." *Czech Journal of Food Sciences* 26(No. 4):242–53. doi: 10.17221/1119-CJFS.
- Xue, Xiaofeng, Qiang Wang, Yi Li, Liming Wu, Lanzhen Chen, Jing Zhao, and Fengmao Liu. 2013. "2-Acetylfuran-3-Glucopyranoside as a Novel Marker for the Detection of Honey Adulterated with Rice Syrup." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(31):7488–93. doi: 10.1021/jf401912u.
- Zavalloni, Costanza, Jeffrey A. Andresen, and J. A. Flore. 2006. "Phenological Models of Flower Bud Stages and Fruit Growth of 'Montmorency' Sour Cherry Based on Growing Degree-Day Accumulation." *Journal of the American Society for Horticultural Science* 131(5):601–7. doi: 10.21273/JASHS.131.5.601.

Zhao, Jing, Xiaojing Du, Ni Cheng, Lanzhen Chen, Xiaofeng Xue, Jing Zhao, Liming Wu, and Wei Cao. 2016. "Identification of Monofloral Honeys Using HPLC–ECD and Chemometrics." *Food Chemistry* 194:167–74. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.08.010.

Zhou, Jinhui, Lihu Yao, Yi Li, Lanzhen Chen, Liming Wu, and Jing Zhao. 2014. "Floral Classification of Honey Using Liquid Chromatography–Diode Array Detection–Tandem Mass Spectrometry and Chemometric Analysis." *Food Chemistry* 145:941–49. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.08.117.