

**SISTEME NATURALE FENOLICE DE PROTECȚIE ANTIOXIDANTĂ  
PENTRU LIPIDE ALIMENTARE OBTINUTE DIN SPECII DE ARBUȘTI DIN  
GENUL *VACCINIUM* ȘI EVALUAREA BIOACCESIBILITĂȚII PE  
PARCURSUL DIGESTIEI GASTROINTESTINALE  
- BIOXVACCINI -**

**RAPORT ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC  
Etapa I**

**Director de proiect:**

CS dr.chim. Oana-Crina Bujor Nenița

**Tip proiect:** Proiecte de Cercetare Postdoctorală (PD)

**Cod proiect:** PN-III-P1-1.1-PD-2016-1060

**Contract nr.:** 94/2018

Decembrie, 2018

**Etapa I (31.05.2018 – 14.12.2018):**

**Dezvoltarea de noi produse naturale funcționale fenolice din frunze și tulpini ale speciilor *Vaccinium* și stabilirea de metode inovatoare de extracție a compușilor fenolici**

**Activitate 1.1** - Identificarea și caracterizarea materialelor vegetale ale plantelor de *Vaccinium* recoltate din flora spontană și cultura convențională

Act 1.1.1. Colectarea, depozitarea și conservarea materialelor vegetale

Act 1.1.2. Determinarea parametrilor de calitate ale materialelor vegetale

**Activitate 1.2** - Obținerea produselor naturale funcționale bogate în compuși fenolici din materiale vegetale ale plantelor de *Vaccinium*: extracte și pulberi

Act 1.2.1. Obținerea pulberilor din materiale vegetale ale plantelor de *Vaccinium*

Act 1.2.2. Obținerea extractelor fenolice prin utilizarea de metode neconventionale de extracție: SFE și ASE

Act 1.2.3. Fraționarea și purificarea extractelor pentru separarea procianidinelor

**Activitate 1.3** - Exploatarea și diseminarea rezultatelor: creare website proiect

**Activitate 1.4** - Elaborarea raportului științific

## Activitatea 1.1 - Identificarea și caracterizarea materialelor vegetale ale plantelor de *Vaccinium* recoltate din flora spontană și cultura convențională

### Act 1.1.1. Colectarea, depozitarea și conservarea materialelor vegetale

În cadrul Activității 1.1.1 materiale vegetale (frunze și tulpini) ale plantelor de *Vaccinium* au fost colectate din habitate montane naturale și cultura convențională pe parcursul anului 2018 astfel:

✓ **din flora spontană (habitate montane naturale):** probe de frunze și tulpini de afin (*Vaccinium myrtillus* L.) și merișor (*Vaccinium vitis-idaea* L.) au fost colectate în lunile iulie și septembrie (doar merișor) din zona localității Borca, județul Neamț.

✓ **din cultura convențională:** probe de frunze și tulpini de afin (*Vaccinium corymbosum* L.) din soiurile Coville și Blueray au fost colectate în luna iunie fiind obținute din colecția pomologică personală de soiuri de afin situată în Sat Crovu, Com. Odobești, Jud. Dâmbovița.



Zona de colectare a afinului și merișorului, localitatea Borca, jud. Neamț

Afin  
(*V. myrtillus* L.)

Merișor  
(*V. vitis-idaea* L.)

Afin: Blueray (A)  
Coville (B)

După colectare, au fost aplicate două procedee pentru **conservarea materialelor vegetale** ale plantelor de *Vaccinium* și anume:

1. congelare la temperatura de - 80°C;
2. uscare la temperatura camerei (20 – 24°C), în condiții normale de aerare, în întuneric, pentru o durată cuprinsă între 7 și 10 zile.

### Act 1.1.2. Determinarea parametrilor de calitate pentru materialele vegetale

După recoltare, materialul vegetal a fost analizat pentru parametrii de calitate precum *substanța uscată și umiditatea*.

Substanța uscată și umiditatea materialului vegetal s-au determinat utilizând o termobalanță tip PARTNER MAC 50. Aproximativ 1 g de material vegetal proaspăt, frunze și tulpini de afin și merișor, au fost supuse încălzirii la o temperatură de 105°C timp de 10 - 30

minute, până la eliminarea completă a apei. Substanța uscată și procentul de apă existent în frunzele și tulpinile plantelor de *Vaccinium* (Tabelul 1) s-a exprimat ca valoare medie a trei determinări consecutive. Pentru toate materialele vegetale umiditatea reziduală a variat între 35% și 55%.

**Tabelul 1. Substanța uscată și umiditatea determinate pentru frunze și tulpini ale plantelor de *Vaccinium***

| Specii vegetale<br><i>Vaccinium</i>             | Organ vegetal | Data recoltării | Umiditate<br>(%) | Substanță<br>uscată (%) |
|-------------------------------------------------|---------------|-----------------|------------------|-------------------------|
| <i>Afin (Vaccinium myrtillus L. - VM)</i>       | Frunze        | august 2018     | 53.43            | 46.24                   |
|                                                 | Tulpini       | august 2018     | 45.01            | 54.70                   |
| <i>Merisor (Vaccinium vitis idaea L. - VVI)</i> | Frunze        | august 2018     | 54.85            | 45.15                   |
|                                                 | Tulpini       | august 2018     | 40.89            | 54.46                   |
|                                                 | Frunze        | septembrie 2018 | 40.17            | 59.83                   |
|                                                 | Tulpini       | septembrie 2018 | 35.71            | 64.29                   |
| <i>Afin soi Coville</i>                         | Frunze        | iunie 2018      | 42.31            | 57.69                   |
|                                                 | Tulpini       | iunie 2018      | 37.05            | 62.95                   |
| <i>Afin soi Blueray</i>                         | Frunze        | iunie 2018      | 53.22            | 46.78                   |
|                                                 | Tulpini       | iunie 2018      | 43.61            | 56.39                   |

## **Activitate 1.2 - Obținerea produselor naturale funcționale bogate în compuși fenolici din materiale vegetale ale plantelor de *Vaccinium*: extracte și pulberi**

### *Act 1.2.1. Obținerea pulberilor din materiale vegetale ale plantelor de *Vaccinium**

Două formulări diferite de frunze și tulpini vor fi dezvoltate: pulberi și extracte. Pulberea se obține prin măcinarea materialului uscat.

Pentru **obținerea pulberilor** din materiale vegetale ale plantelor de *Vaccinium*, probele de frunze și tulpini uscate la temperatura camerei au fost mărunțite cu o moara tip Grindomix GM200, (Retsch GmbH, Germania). Materialele vegetale au fost mărunțite la 10000 rpm, timp de 20 secunde în cazul frunzelor și timp 80 secunde în cazul tulpinilor.

#### *Determinarea culorii pulberilor din frunze și tulpini*

Parametrii CIELAB'76 determinați pentru **culoarea pulberilor din frunze și tulpini de afin și merișor** sunt: **L\*** (luminanța), **a\*** (coordonata roșu-verde: valori pozitive ale parametrului a\* indică zona roșu, valori negative ale lui a\*, componenta verde) și **b\*** (coordonata galben-albastru: valori pozitive ale lui b\* indica zona galbenă, iar valorile

negative ale lui  $b^*$  indică componenta albastră).

În Tabelul 2 este rezumată analiza statistică descriptivă pentru parametrii  $L^*$ ,  $a^*$  și  $b^*$ .

Pentru toate probele *Vaccinium* intensitatea luminanței ( $L^*$ ) prezintă valori cuprinse în intervalul 45 și 65. Așa cum era de așteptat toate probele de frunze de afin și merișor și cele de tulpini de afin din flora spontană au prezentat valori negative ale lui  $a^*$  specifice componentei verzi. Prin contrast, pentru tulpinile de afin din cultura au fost determinate valori pozitive ale lui  $a^*$  și anume: 5.90 pentru frunze de afin soi Blueray și 5.32 pentru frunze de afin soi Coville. Parametrul  $b^*$  a variat de la 22 la 27 pentru toate probele de afin și merișor. Nu au fost determinate diferențe semnificative între probele de frunze, fie ele din flora spontană sau din cultura.

#### *Act 1.2.2. Obținerea extractelor fenolice prin utilizarea de metode neconventionale de extracție: SFE și ASE*

În acest studiu, pentru obținerea extractelor fenolice din frunze și tulpini de afin și merișor s-au ales două tehnicile neconvenționale de extracție, considerate revoluționare din punct de vedere al eficiențelor oferite și a impactului redus asupra mediului. Aceste tehnici sunt: extracția accelerată cu solvent (ASE) și extracția folosind fluide supercritice (SFE). Diferite condiții experimentale au fost evaluate și testate pentru a stabili parametrii optimi de extracție a compușilor fenolici.

Pentru stabilirea parametrilor de extracție ASE, într-un test preliminar, au fost evaluate condițiile optime de extracție a compușilor fenolici din *pulberi de frunze și tulpini de afin și merișor colectate din flora spontană* în funcție de conținutul total de polifenoli (CTP).

Extracția compușilor fenolici s-a realizat cu ajutorul Extractorului Thermo Scientific ASE 350 (Figura 4) echipat cu celule de extracție de 10 mL.

**Condițiile optime de extracție ASE stabilite au fost:** concentrația etanolului de 50% în apă, durata unui ciclu de extracție de 10 minute.



**Figura 4. Extractorul Thermo Scientific ASE 350**

#### *Extracția cu fluide supercritice*

Având în vedere ca extracția cu fluide supercritice este tot o extracție sub presiune ca și extracția ASE s-a stabilit aplicarea parametrilor de extracție ASE și în cazul extracției SFE și

anume: **temperatura de extracție de 40 °C, etanol 50% în apă ca și cosolvent, presiunea de operare de 1500 psi.**

*Act 1.2.3. Fraționarea și purificarea extractelor pentru separarea procianidinelor*

Pentru fracționarea și purificarea extractelor s-a utilizat **extracția în fază solidă (SPE – „solid-phase extraction”)**.

Fracționarea și purificarea extractelor din frunze și tulpini de afin și merișor s-a realizat prin folosit un sistem SPE Manifold cu 12 posturi care mărește randamentul de lucru și coloane de tip Sep-Park-C18 (360 mg, Waters, Milford, MA), protocolul stabilit desfășurându-se după cum urmează:

- Într-o primă etapă, s-a condiționat coloana cu echivalentul a două volume de coloană de HCl 0,01% în metanol.
- În a doua etapă coloana s-a spălat cu trei volume de coloană de HCl 0,01% în apă (v/v) pentru a îndepărta metanolul rămas.
- În următoarea etapă s-a trecut prin coloană extractul de analizat după care s-a spălat cu două volume de coloană de HCl 0,01% în apă (v/v) pentru a elimina compușii care nu au fost adsorbiți. În final, compușii fenolici, precum procianidinele, au fost eluați cu acetat de etil.

**Activitate 1.3 - Exploatarea și diseminarea rezultatelor: creare website proiect**

Pentru diseminarea rezultatelor proiectului BIOXVACCINI a fost elaborată o pagina web a proiectului, dezvoltată atât în limba română cât și în limba engleza. Pagina web poate fi accesată la următoarea adresă: <https://www.usamv.ro/index.php/ro/697-bioxvaccini>.

**Bibliografie**

1. Casas Cardoso, L.C., Mantell, Serrano C., Torrez Quintero, E., Pereyra López, C., Medrano Antezana, R., & Martínez de la Ossa, E.J. (2013). High pressure extraction of antioxidants from *Solanum stenotomum* peel. *Molecules*, 18, 3137-3151.
2. Duarte, C. A. R, & Duarte, M. M. C. (Eds.) (2009). Current trends of supercritical fluid technology in pharmaceutical, nutraceutical and food processing industries, *Bentham Science Publishers*, Bussum, The Netherlands, ISBN: 978-1-60805-046-8.
3. Erdogan, E., Ates, B., Durmaz, G., Yilmaz, I., & Seckin, T. (2011). Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia propolis and their radical scavenging capacities. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1592–1597.
4. Escribano-Bailon, M. T., & Santos-Buelga, C. (2003). Polyphenols extraction from foods. in: *Methods in polyphenol analysis* (eds. C. Santos-Buelga, G. Williamson). *Royal Society of Chemistry*, Cambridge, United Kingdom, pp. 1–16.
5. Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples, *Molecules*, 15, 8813-8826.
6. Georgé S., Brat P., Alter P., Amiot M.J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products, *J Agric Food Chem.*, 53, 1370-3.
7. Kaufmann, B., & Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction, *Phytochemical Analysis*, 13, 105–113.
8. Khoddami, A., Wilkes, A. M., & Roberts, H. T. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds, *Molecules*, 18, 2328-237.
9. Lorrain, B., Ky, I., Pechamat, L., & Teissedre, P. L. (2013). Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines, and extracts. *Molecules*, 18, 1076-1100.
10. Mahugo Santana, C., Sosa Ferrera, Z., Torres Padrón, M. E., & Santana Rodríguez, J. J. (2009). Methodologies for the extraction of phenolic compounds from environmental samples: new approaches. *Molecules*, 14, 298-320.
11. Xia E.Q, Cui B., Xu X.R., Song Y., Ai X.X., Li H.B. (2011). Microwave-Assisted Extraction of Oxymatrine from *Sophora flavescens*, *Molecules*, 16, 7391-7400.