



UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
DIN BUCUREȘTI



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

**RAPORT ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC
Etapa II**

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, 2019

Etapă II (15.12.2018-31.12.2019):

Caracterizarea fizico-chimică a compușilor fenolici, evaluarea activității antimicrobiene și a capacității de protecție împotriva oxidării lipidice (prima parte) a produselor naturale funcționale *Vaccinium*

Activitate 2.1 - Caracterizarea fizico-chimică a produselor naturale funcționale fenolice

Act. 2.1.1. Separarea și identificarea compușilor fenolici prin UPLC/MS

Act. 2.1.2. Cuantificarea compușilor fenolici prin UPLC

Act. 2.1.3. Analiza procianidinelor din extracte și pulberi prin HPLC după folosirea tioacidolizei

Activitate 2.2 - Evaluarea activității antimicrobiene produselor naturale funcționale fenolice

Act. 2.2.1. Evaluarea activității antifungice împotriva fungilor de degradare a alimentelor

Act. 2.2.2. Evaluarea activității antibacteriene

Activitate 2.3 – Evaluarea capacității de protecție împotriva oxidării lipidice: teste preliminare pe modele alimentare

Act. 2.3.1. Evaluarea capacității de protecție împotriva oxidării lipidice: teste preliminare pe modele alimentare

Activitate 2.4 – Analiza statistică a datelor experimentale

Activitate 2.5 – Exploatarea și diseminarea rezultatelor: participarea la conferințe și publicarea de articole

Activitate 2.6 - Elaborarea raportului științific

Activitate 2.1 - Caracterizarea fizico-chimică a produselor naturale funcționale fenolice

Această activitate vizează caracterizarea calitativă și cantitativă a compușilor fenolici prezenți în produsele naturale fenolice obținute din frunze și lăstari de afin și merișor în prima etapă a proiectului BIOXVACCINI.

Identificarea și cuantificarea compușilor fenolici prin UPLC s-a realizat pentru extractele hidroetanolicе (50%) de afin și merișor obținute prin metoda ASE.

Act. 2.1.1. Separarea și identificarea compușilor fenolici prin UPLC/MS

Act. 2.1.2. Cuantificarea compușilor fenolici prin UPLC

Metodologie

Separarea, identificarea și cuantificarea compușilor fenolici din extractele de afin s-a realizat folosind Cromatografia Lichidă de Ultra Presiune (UPLC) folosind un sistemul cromatografic Waters Acquity I Class cu detector UV-PDA și o coloană de tip CORTECS UPLC C18+; 1.6 μ m, 2.1 X 100 mm (Waters) la 30 °C. Faza mobilă utilizată a constat dintr-un amestec de 0,1% acid formic în apă (solventul A) și acetonitril (solventul B). Gradientul de eluție folosit a fost următorul: 0-2 min, 3% B; 2-15 min, 30% B; 15-17 min, 100% B; 17-18 min, 100% B; 18-19 min, 3% B; revenire la condițiile inițiale, cu un debitul de 0,4 mL/min. Volumul de injecție folosit a fost de 3 μ L extract.

Rezultate și discuții

Compoziția fenolică a extractelor de afin: Analiza calitativă a evidențiat prezența derivaților de cafeoil și *p*-cumaroil, a glicozidelor de quercetină și a (–)-epicatechinei în frunze, în timp ce în lăstari (–)-epigallocatechina și oligomeri ai epicatechinei au fost de asemenea identificate.

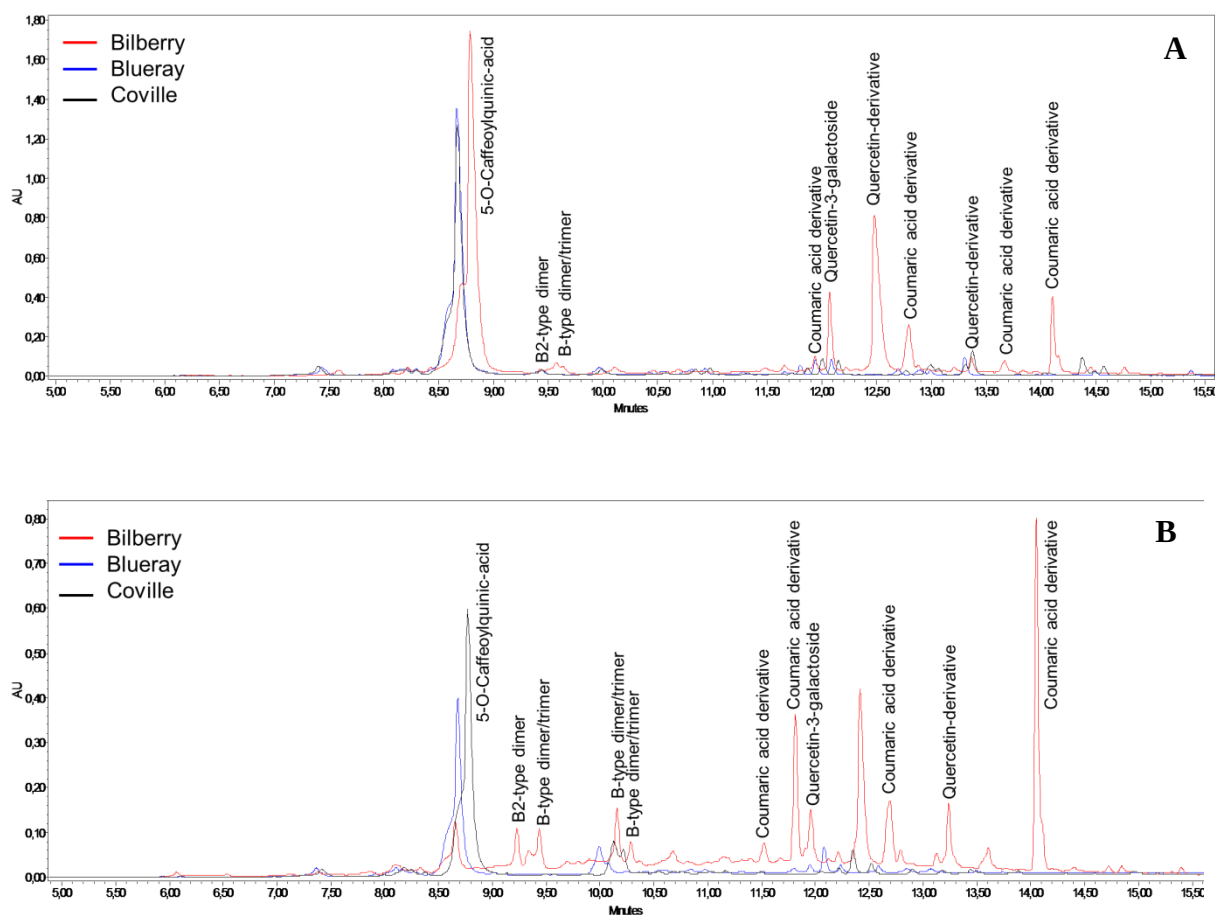


Figura 2.1.1. Profilul cromatografic al extractelor din frunze A) și lăstari (B) de afin la 280 nm

Compoziția fenolică a extractelor de merișor:

Rezultatele obținute au evidențiat prezența predominantă a monomerilor și oligomerilor catechinei și epicatechinei (derivați ai dimerilor/trimerilor de tip B) și a glicozidelor flavonolice (derivați de chercetină) în toate elementele morfologice urmați de derivații acidului cafeic. Arbutina a fost cuantificată în concentrație de 8,37 mg/g SU în frunze și 0,63 mg/g SU în lăstari.

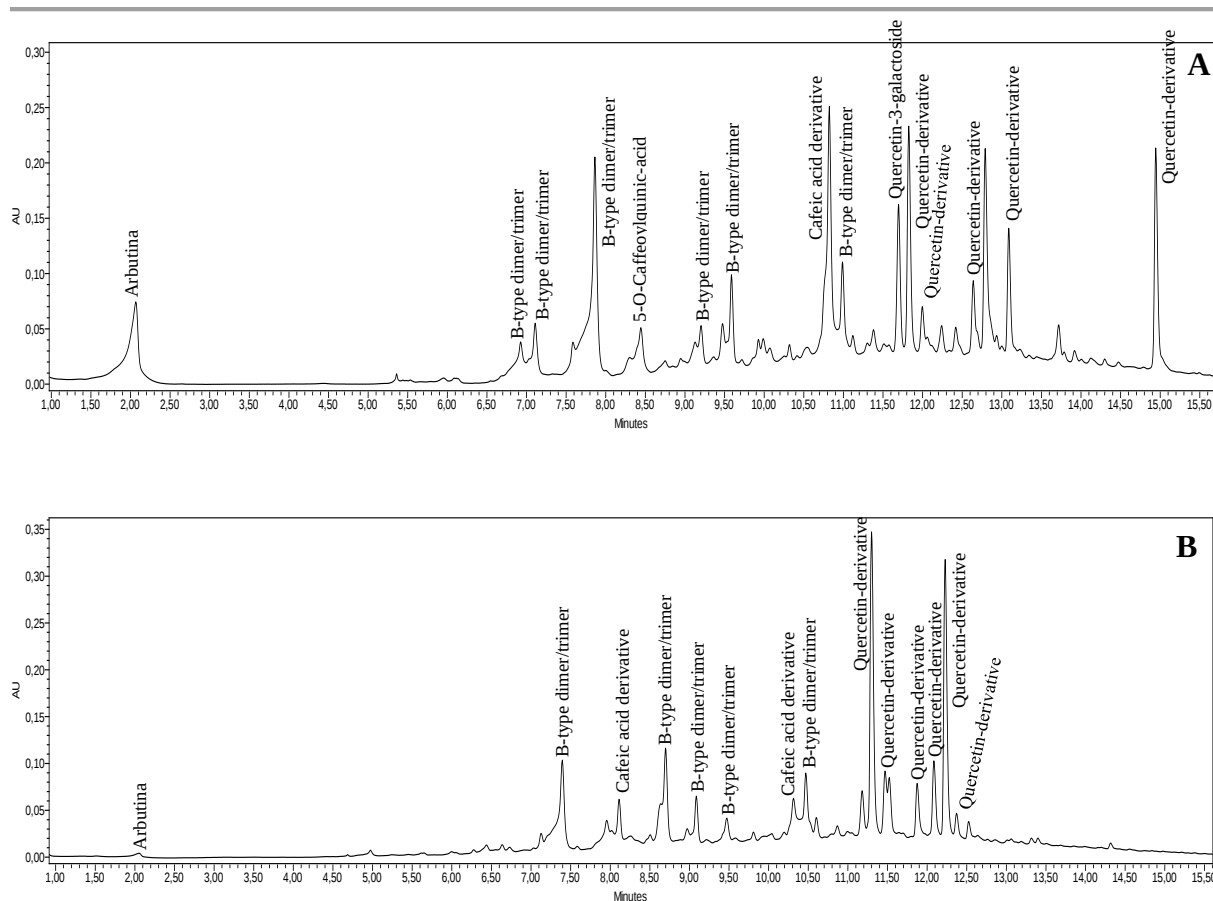


Figura 2.1.3. Profilul cromatografic al extractelor din frunze A) și lăstari (B) de merișor la 280 nm

Act. 2.1.3. Analiza procianidinelor din extracte și pulberi prin HPLC după folosirea tioacidolizei

Metodologie

Procianidinele au fost analizate prin Cromatografia Lichidă de Înaltă Presiune (HPLC/DAD) după tioacidoliză folosind o metodă utilizată în Bujor și colab. (2016). Pentru acest studiu s-au utilizat pulberi din frunze și lăstari de afin și merișor. Separarea și cuantificarea procianidinele (PCA) s-a realizat folosind un sistemul cromatografic Agilent Technologies 1200 cu detector UV-DAD utilizând o coloană de tip Licrocart Licrospher PR-18, 250 x 4.0 mm, 5 μm (Merck, Darmstadt, Germany) la 30 °C.

Procianidinele din pulberi de frunze și lăstari de afin și merișor au fost caracterizate pentru identificarea subunităților constitutive și determinarea gradului de polimerizare mediu (mDP). Gradului de polimerizare mediu a fost determinat prin calcularea raportului molar dintre unitățile flavan-3-ol (aducți de tioeter plus unități terminale) și unitățile terminale corespunzătoare (-)-epicatechinei și (+)-catechinei.

Rezultate și discuții

În frunzele de afin, epicatechina a fost principala unitate de constituire a oligomeri flavanolici reprezentând ca unitate terminală eliberată în urma tioacidolizei, iar diferența ca unitate de extensie. În lăstari, catechina a fost de asemenea identificată atât ca unitate terminală cât și ca unitate de extensie.

Din rezultatele privind tioacidoliza s-a constatat că lăstarii și frunzele de merișor conțin (+)-catechina și (-)-epicatechina atât ca unități de extensie și cât și ca unități terminale

Activitate 2.2 - Evaluarea activității antimicrobiene produselor naturale funcționale fenolice

Act. 2.2.1. Evaluarea activității antifungice împotriva fungilor de degradare a alimentelor

Metodologie

Evaluarea activității antifungice a fost realizată prin testarea extractelor de afin și merișor asupra a doi fungi, *Aspergillus niger* și *Penicillium expansum*. Probele analizate sunt extracte de afin și merișor obținute prin extracția ASE în prima etapă a proiectului

Pentru evaluarea activității antifungice a extractelor luate în studiu, fungii *Aspergillus niger* și *Penicillium expansum* au fost crescuți pe mediu de cultură Malt Extract Agar (30 g extract de malt, 3 g peptonă de soia, 15 g agar) în plăci Petri cu diametrul de 90 mm, timp de 7-9 zile la temperatura de 25 °C. Suspensia de spori a fost obținută în condiții aseptice; numărul de spori fiind determinat prin citirea la camera Thoma. Concentrația de spori utilizată a fost de 10^6 spori/ml.

Rezultate și discuții

Evaluarea activității antifungice împotriva fungilor de degradare a extractelor de afin: Creșterea *Aspergillus niger* a fost inhibată prin extractul de frunze de afin din flora spontană cu o rată de inhibare de ~ 10%. În ceea ce privește ciupercile *Penicillium expansum*, toate probele testate au prezentat activitate antifungică, cu o inhibare a creșterii între ~ 10% și ~ 23%.

Evaluarea activității antifungice împotriva fungilor de degradare a extractelor de merișor: extractele de merișor au prezentat o activitate antifungică mai puternică împotriva *Penicillium expansum*, comparativ cu *Aspergillus niger*.

Act. 2.2.2. Evaluarea activității antibacteriene

Metodologie

Pentru evaluarea activității antibacteriene a extractelor luate în studiu, *Bacillus subtilis* a fost inoculat pe mediu de cultura Nutrient agar în plăci Petri cu diametrul de 90 mm, timp de 24 de ore la temperatura de 35 °C. Suspensia bacteriană a fost apoi obținută în condiții aseptice.

Metoda de lucru folosită a fost metoda difuziei cu discuri.

Rezultate și discuții

Rezultatele obținute în urma determinării activității bacteriene au arătat că probele au prezentat zona de inhibiție în jurul discurilor impregnate cu 50, respectiv 70 µl extract.

Activitate 2.3 – Evaluarea capacității de protecție împotriva oxidării lipidice: teste preliminare pe modele alimentare

Act. 2.3.1. Evaluarea capacității de protecție împotriva oxidării lipidice: teste preliminare pe modele alimentare

Scopul acestui studiu a fost de a evalua activitatea antioxidantă a extractelor din frunze și lăstari de afin și merișor privind oxidarea linoleatului de metil (MeLo), ca parte a unei încercări de a optimiza utilizarea antioxidantilor care apar în mod natural în produsele vegetale.

Metodologie

Condițiile experimentale pentru testarea oxidării linoleatului de metil au fost realizate în conformitate cu metoda propusă de Heinonen și colab. (1998) și Kähkönen și colab. (2003), cu mici modificări. Pentru acest studiu au fost folosite extractele hidroetanolice (50%) obținute în prima etapă a proiectului prin tehnica extracției accelerată cu solvent (ASE).

Rezultate și discuții

Evaluarea procesului de peroxidare lipidică s-a realizat prin determinarea dienei conjugate ca produși ai oxidării lipidelor. Au fost testate doar extractele de afin și merișor care au prezentat conținutul cel mai mare de compuși fenolici și anume cele din flora spontană.

Acest studiu arată o activitate antioxidantă ridicată a extractelor din lăstari și frunze de afin comparativ cu cele de merișor, trolox și vitamina C. Extractele din lăstari au prezentat o

activitate antioxidantă mai mare decât cea a extractelor din frunze. La merisor, nu exista diferențe semnificative între extractul de frunze și cel de lăstari.

Activitate 2.4 – Analiza statistică a datelor experimentale

Toate experimentele și determinările au fost efectuate în triplicat. Rezultatele sunt exprimate ca medie $\pm$ deviația standard (SD). Calculul rezultatelor a fost efectuat utilizând instrumentul MS Excel. Diferențe semnificative la un interval de încredere de 95% au fost evaluate prin analiza ANOVA cu testul Tukey-Kramer de comparații multiple folosind software-ul XLStat.

Activitate 2.5 - Exploatarea și diseminarea rezultatelor: participarea la conferințe și publicarea de articole

Rezultatele obținute pe durata Etapei II a proiectului BIOXVACCINI au fost diseminate prin participarea la 4 manifestări internaționale și în cadrul a 1 publicație științifică, astfel:

Manifestări internaționale:

1. **Oana-Crina Bujor**, Mona Elena Popa, Prezentare orală a proiectului "*BIOXVACCINI - Sisteme naturale fenolice de protecție antioxidantă pentru lipide alimentare obținute din specii de arbuști din genul *Vaccinium* și evaluarea bioaccesibilității pe parcursul digestiei gastrointestinale*", Colloque Francophone "Aliments Fonctionnels et Produits Écologiques", 18 decembre 2018, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară « Ion Ionescu de la Brad » din Iași, Iași, România.

2. **Oana-Crina Bujor**, Mona Elena Popa, *Phenolic profile and content of aerial parts of lingonberry (*Vaccinium Vitis-idaea* L.)*, "4th International Conference on Natural Products Utilization: from Plants to Pharmacy Shelf (ICNPU-2019)", 29.05.2019 – 01.06.2019, Albena, Bulgaria (prezentare tip poster).

3. **Oana-Crina Bujor**, Elisabeta Elena Popa, Mona Elena Popa, *Procyanidins characterization and antifungal activity of lingonberry leaves and stems*, "13th World Congress on Polyphenols Applications: Malta Polyphenols 2019", 30.09.2019 – 01.10.2019, Valletta, Malta (prezentare tip poster).

4. **Oana – Crina Bujor**, Ioana Oprică, Adrian Asănică, Liliana Bădulescu, Mona Elena Popa, *Phenolic content and antioxidant activity of leaves and stems of selected *Vaccinium* species*, 15th International Symposium „Young people and agriculture research”, USAMV

Timișoara, Facultatea de Horticultură și Silvicultură Timișoara, 28 - 29 noiembrie 2019, Timișoara, România (prezentare tip poster).

Articole științifice:

1. **Oana-Crina Bujor**, Corneliu Tanase, Mona Elena Popa, *Phenolic antioxidants in aerial parts of wild Vaccinium species: towards pharmaceutical and biological properties*, Antioxidants (ISSN 2076-3921, IF: 4,520) – în evaluare.

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

Bibliografie

1. Heinonen I. Marina, Lehtonen Pekka J., Hopia Anu I., *Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors*, J. Agric. Food Chem. 1998, 46, 25-31.
2. Kähkönen Marja P., Heinonen I. Marina, *Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons*, J. Agric. Food Chem. 2003, 51, 628-633.
3. Oana-Crina Bujor, Christian Giniès, Valentin I. Popa, Claire Dufour, 2018. Phenolic compounds and antioxidant activity of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) leaf, stem and fruit at different harvest periods, Food Chemistry, 252, 356-365 (IF 4.529).
4. Oana-Crina Bujor, Carine Le Bourvellec C., Irina Volf, Valentin I. Popa, Claire Dufour, 2016. Seasonal variations of the phenolic constituents in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves, stems and fruits and their antioxidant activity, Food Chemistry, 213, 58-68 (IF 4.052).
5. Oana-Crina Bujor, Iulia Adina Talmaciu, Irina Volf, Valentin I. Popa, 2015. Biorefining to recover aromatic compounds with biological properties, Tappi Journal, 14(3), 187-193. (IF 0.732).
6. Fishwick, M. J.; Swoboda, P. A. T. *Measurement of oxidation of polyunsaturated fatty acids by spectrophotometric assay of conjugated derivatives*. J. Sci. Food Agric. 1977, 28, 387-393.
7. 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.
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.