

R E Z U M A T

EXTRACȚIA ȘI IZOLAREA PRINCIPIILOR ACTIVE DIN MATERII PRIME VEGETALE

Doctorand: ARLET Andrei Constantin Ioan

Conducător științific: Prof. univ.Dr. Florentina ISRAEL-ROMING

**CUVINTE CHEIE: porumb pigmentat, extracție, polifenoli, proprietăți
antioxidante, flavone**

Lucrarea de față, prin studiile de cercetare cuprinse, a avut ca scop valorificarea superioară a tărâțelor de porumb pigmentat din hibridul Bloody Butcher (porumb roșu), un subprodus din resurse cerealiere, prin obținerea de extracte bogate în specii fenolice și testarea acestora ca aditiv cu rol antioxidant pentru emulsii dermato-cosmetice, un sector de interes pentru societatea modernă. În realizarea studiilor propuse au fost considerate aspectele referitoare la ameliorarea impactului asupra mediului înconjurător, prin utilizarea de procese cu consum redus de energie și materiale cu toxicitate redusă, și cel mai important, prin dezvoltarea unei strategii de valorificare a unui subprodus utilizat exclusiv ca hrană pentru animale (tărâțele de porumb roșu, cu structură dură, sticloasă).

Analizând stadiul actual al cercetărilor în domeniul, **originalitatea** acestei teze de doctorat constă în:

- *valorificarea unui subprodus derivat din boabele de porumb roșu, cultivat pe teritoriul României, pentru obținerea de extracte polifenolice.* Există un volum redus de raportări de literatură exclusiv pentru porumbul roșu, prin comparație cu alte variante de porumb pigmentat (precum porumbul mov sau albastru). De asemenea, volumul de publicații privind valorificarea unor soiuri/hibridi de porumb pigmentat cultivat pe teritoriul țării este redus.
- *elementele de noutate care derivă din investigarea tărâțelor de porumb roșu, cu structură sticloasă, utilizat exclusiv ca hrană pentru animale.* Astfel, se pune în evidență utilitatea acestei materii prime cerealiere într-o strategie de cercetare care poate conduce la produse cu valoare adăugată – extractele polifenolice – adaptabile industriilor cu impact asupra societății (domeniul farmaceutic, cosmetic, biomedical, alimentar).

- *testarea exclusivă a mediilor de extracție prietenoase mediului și utilizarea de procedee cu impact scăzut și consum energetic redus.* Angajamentul pentru procese reponsabile a condus la un plan de lucru armonizat la strategiile de sustenabilitate. Mai mult decât atât, alegerea materiei prime ce constituie un subprodus, este armonizată conceptului de sustenabilitate.
- *utilizarea extractelor polifenolice din tărâțele de porumb roșu Bloody Butcher într-o aplicație la granița dintre domeniul farmaceutic și cel cosmetic - ingredient activ cu rol de antioxidant pentru emulsii dermato-cosmetice.* Literatura de specialitate nu prezintă o astfel de abordare.

În acest context, pentru realizarea scopului propus, teza de doctorat cuprinde trei obiective principale, ce constituie trei capitole de cercetare experimentală:

- **Obiectiv 1:** *Valorificarea unui subprodus (tărâțe) derivat din porumb colorat pentru izolarea unor extracte polifenolice, stabilirea procedurii optim de extracție și optimizarea parametrilor de lucru, prin procese responsabile în raport cu mediul înconjurător.*
- **Obiectiv 2:** *Fracționarea extractului polifenolic prin procese membranare, prietenoase mediului, în vederea izolării unor fracții valoroase, cu conținut diferențiat din punct de vedere fitochimic și evaluarea biochimică a fracțiilor rezultate.*
- **Obiectiv 3:** *Valorificarea unei selecții de fracții polifenolice obținute din tărâțele de porumb roșu ca ingredient activ cu rol antioxidant pentru emulsii dermato-cosmetice.*

Obiectivul 1, realizat prin activitățile detaliate în Capitolul III al tezei a vizat optimizarea parametrilor de extracție în vederea obținerii unei fracții bogat în compuși fenolici, pornind de la tărâțe de porumb roșu Bloody Butcher. Selecția acestei materii prime s-a realizat într-o manieră rațională, ținând cont, pe de o parte, de strategia de valorificare a unui subprodus și, pe de altă parte, datorită conținutului ridicat în specii fenolice asociat stratului aleuronic și pericarpului boabelor de porumb pigmentat.

Cercetarea a fost realizată pornind atât de la tărâțe brute, materie primă referențiată ca porumb măcinat (not. PM), cât și de la tărâțele cernute, materie primă referențiată ca porumb măcinat cernut (not. PMC). Pentru comparație, au fost efectuate experimente de extracție a polifenolilor din tărâțe de porumb galben, din hibridul KWS Kashmir. Materiile prime au fost obținute la măcinarea boabelor de porumb cultivate în anii 2021 și 2022, în regiunea Brăila, România.

Cele două tipuri de porumb se diferențiază prin structură. Porumbul galben are o structură făinoasă/semisticloasă, endospermul aderent tărâțelor fiind în cantitate mica, în timp ce porumbul roșu are o structură sticloasă (o duritate ridicată), iar în acest caz, tărâțele prezintă o fracție amidonoasă semnificativă atașată de pericarp; de asemenea, PM și PMC sunt mult mai dure prin comparație cu tărâțele de porumb galben.

Pentru PM și PMC, a fost realizată o succesiune de faze experimentale, iar extractele obținute au fost ulterior investigate prin tehnici de caracterizare moderne,

fiind stabilită metoda optimă de extracție, precum și parametrii optimi de lucru (mediul și timpul de extracție).

Extracția polifenolilor din PM și PMC a fost realizată utilizând ca medii de extracție apă distilată (not. DW), amestec apă-etanol (1/1, v/v, not. DW-EtOH,) și DW-EtOH acidifiat cu acid clorhidric (1%, sol HCl 1N). Raportul masic de material vegetal/solvent utilizat a fost de de 1/10.

Într-o primă secvență de lucru, PM și PMC au fost supuse extracției timp de 60 de minute prin două metode: agitare magnetică și respectiv tratament cu ultrasunete, la temperatura camerei, ferit de lumină.

Cea de-a doua fază a experimentului a vizat identificarea timpului optim de extracție pentru PM și PMC, între 1 min și 60 min.

Cea de-a treia fază experimentală a utilizat o tehnică neconvențională de extracție a compușilor fenolici din PM și PMC și anume extracția asistată de microunde. Au fost testați timpi de extracție între 5 și 20 de secunde, precum și două niveluri de putere diferite, 350 și 700 W.

Toate extractele rezultate în cele 3 secvențe experimentale au fost investigate prin determinarea conținutului total de fenoli, în baza rezultatelor obținute fiind stabilită varianta optimă de solvent capabilă să izoleze o fracție bogată în specii fenolice, timpul optim de extracție, în acord cu strategia utilizării de procese responsabile, precum și cea mai eficientă metodă.

Cuantificarea conținutului total de polifenoli (CTP) prin metoda spectrofotometrică Folin-Ciocalteu a arătat că amestecul DW-EtOH conduce la extractele cele mai bogate în polifenoli atunci când este utilizat tratamentul cu ultrasunete, pentru ambele materii prime testate, PM și PMC. De asemenea, un timp mai lung de extracție (60 de minute) indică un randament mai bun, însă, în acord cu principiile sustenabilității, vizând un consum energetic redus, s-a stabilit timpul optim de extracție, 20 de minute. S-a ținut cont de creșterea concentrației de compuși fenolici în extractele obținute, determinând proporțional valoarea CTP la diferenții timpi de extracție testați, prin comparație cu valoarea CTP pentru extractul rezultat la 1 minut de procesare (fie prin agitare magnetică, fie prin tratament cu ultrasunete).

Pentru extractele din tărâțele de porumb galben (KWS Kasmir) au fost obținute valori ale CTP inferioare, fiind validată strategia de selecție tărâțelor de porumb roșu pentru extracția de specii polifenolice.

În ceea ce privește extracția asistată de microunde, ca tehnică modernă și prietenoasă mediului, deosebit de utilă în izolarea moleculelor bioactive din surse vegetale, efectuarea procesului la o putere mai mare (700 W), precum și o expunere mai lungă (20 de secunde), duc la un conținut total de polifenoli mai ridicat.

Evaluarea capacității antioxidante a fost realizată prin metoda TEAC (capacitate antioxidantă echivalentă Trolox). Rezultatele au indicat rezultate mai bune pentru PMC, atât în cazul extracției cu agitare magnetică, cât și în cazul extracției cu

ultrasunete. Cea mai ridicată activitate antioxidantă (451,71 mM TE/100 g DM) a fost observată la extractul rezultat după 60 de minute de procesare, prin agitare magnetică. Un rezultat apropiat a fost înregistrat și pentru extractul PMC rezultat după 60 de minute de tratament cu ultrasunete (430.71 mM TE/100 g DM).

Fracțiile obținute prin extracția asistată de microunde (20 secunde la 350W) prezintă o capacitate antioxidantă moderată în timp ce extractele PM și PMC rezultate după 20 de secunde de iradiere cu microunde, la o putere de 700 W au înregistrat o activitate antioxidantă foarte bună, 385.34 mM TE/100 g DM și respectiv 396.67 mM TE/100 g DM.

Astfel, pe baza rezultatelor experimentale obținute s-a concluzionat că porumbul roșu Bloody Butcher poate fi considerată în experimente viitoare pentru izolarea unor fracții bogate în compuși fenolici și izolarea unor fracții cu conținut diferențiat. De asemenea, extractele obținute arată potențial pentru studii viitoare și testarea lor în diferite domenii de aplicație (domeniul cosmetic, farmaceutic, nutraceutic, biomedical, alimentar), ca aditivi cu activitate antioxidantă. Acest lucru este încurajat și prin procedeele selectate pentru obținerea fracțiilor bogate în specii fenolice antioxidante, fiind utilizați doar solvenți compatibili cu celulele (apă și etanol). Aceste aspecte legate de protocoalele experimentale stabilite în acest studiu sunt armonizate și strategiilor privind sustenabilitatea.

Obiectivul 2 a fost realizat prin rezultatele prezentate și discutate în Capitolul IV al acestei lucrări, care s-a concentrat pe extractul optim de tărațe de porumb roșu din hibridul Bloody Butcher, așa cum a fost detaliat pentru Capitolul III, în vederea separării unor fracții cu conținut diferențiat de compuși fenolici prin procese membranare.

Au fost efectuate separări ale extractului optim (așa cum a fost stabilit în Capitolul III, not. P0) prin experimente de separare ce utilizează diferite tipuri de membrane și, de asemenea, diferiți parametri experimentali:

- Membrane din celuloză regenerată (RC), cu un diametru mediu al porilor (cut-off) de 5KDa, la o presiune de lucru de 5 bar;
- Membrane din polietersulfonă (PES), cu un diametru mediu al porilor (cut-off) de 5KDa, la o presiune de lucru de 5 bar;
- Membrane din polietersulfonă (PES), cu un diametru mediu al porilor (cut-off) de 10KDa, utilizând două presiuni de lucru, 2 bar (prima trecere) și respectiv 3 bar (a doua trecere).

- Fracțiile obținute, denumite *fracție concentrat* (not. C) și *fracție permeat* (not. P) au fost caracterizate din punct de vedere al conținutului total de compuși fenolici, al conținutului total de flavone, al activității antioxidante. De asemenea, pentru fracțiile de extract rezultate au fost cuantificați acizii fenolici, rutinul și quercetina, molecule cu efect biologic recunoscut, conform datelor de literatură.

Fracțiile de extract evaluate privind determinarea conținutului total de polifenoli (CTP) au arătat o dependență a acestor conținuturi de experimentul de

separare utilizat (tipul membranei, dimensiunea porilor, presiunea de lucru). Diferențele obținute pot fi atribuite pe de o parte dimensiunii porilor membranelor, care sunt capabile să separe polifenolii prezenți în extractul P0 în raport cu greutatea lor moleculară medie, dar pe de altă parte, acestea pot fi atribuite unei afinități mai mici sau mai mari a extractului față de membrana utilizată.

O analiză comparativă a datelor obținute arată că membrana RC 5 KDa ajută la o retenție mai mare a polifenolilor, promovând îmbogățirea fracției de extract rezultate (not. P1-C) în molecule fenolice valoroase, în comparație cu membrana PES 5 KDa. De asemenea, s-a stabilit că membrana PES 10 KDa (la o presiune de lucru de 3 bar) favorizează conținutul de polifenoli pentru fracția concentrată (not. P3-C2), permițând probabil suspendarea în mediul hidroalcoolic a compuși cu greutate moleculară mai mare, evitând pierderea lor prin depunere/captare pe suprafața/în porii membranei.

Pentru membranele RC 5 KDa (5 bar) și PES 10 KDa (2 bar) s-au obținut fracții de concentrat cu conținut ridicat de specii fenolice, în timp ce membranele PES 5 KDa (5 bar) și PES 10 KDa (3 bar) duc la fracții de concentrat și permeat cu conținut diferențiat de specii fenolice, fiind considerate cele mai eficiente procese de separare conform strategiei propuse.

Conținutul total de polifenoli și activitatea antioxidantă a fracțiilor de extract de porumb roșu arată rezultate foarte bune în special pentru părțile concentrate, care au înregistrat niveluri comparabile cu alte raportări din literatură.

De asemenea, s-au observat niveluri semnificative de flavonoide și acizi fenolici pentru fracțiile concentrate derivate din extractul de porumb Bloody Butcher. Din categoria acizilor fenolici, acidul siringic a fost reprezentantul predominant în toate variantele de extract supuse analizei. Nu mai puțin semnificative sunt concentrațiile de acid clorogenic și acid 4-cumaric, acizi fenolici cunoscuți pentru efectele lor terapeutice. Rutinul și quercetina, flavonoli deosebit de importanți cu potențiale aplicații în industria farmaceutică și în cea a suplimentelor alimentare se regăsesc în concentrații destul de scăzute dar, profilul fitochimic general poate contribui la întreaga activitate biologică a fracțiilor de extract izolat din tărâțele de porumb roșu.

Astfel, s-a concluzionat că fracțiile concentrate de extract P2-C și P3-C2 rezultate prin separare utilizând membrana PES (5 KDa, 5 bar și 10 KDa, 3 bar) reprezintă cele mai bune variante, cu o activitate antioxidantă notabilă și, prin urmare, merită studiate și investigate mai departe.

Obiectivul 3, care a presupus valorificarea celor mai promițătoare variante de extract din tărâțele de porumb roșu Bloody Butcher în dezvoltarea unui preparat dermato-cosmetic, a fost realizat prin activitățile detaliate în Capitolul V al acestei lucrări. Astfel, fracția concentrată de extract rezultată prin separarea utilizând membrana PES 5 KDa (5 bar) – not. P2-C (capacitate antioxidantă ~ 40 mg TE/ g DM)

și fracția de concentrat rezultată prin separarea utilizând membrana PES 10 KDa (3 bar, a doua trecere) – not. P2-C2 (capacitate antioxidantă peste 36 mg TE/ g DM) au fost utilizate ca ingredient antioxidant pentru o emulsie dermato-cosmetică de tip ulei în apă (U/A), cu un adaos de 0.5%.

A fost stabilită o formulare de bază pentru un preparat dermato-cosmetic de tip emulsie, păstrând lista de ingrediente cât mai simplă, pentru a putea dacă extractele propuse cu rol de antioxidant exercită rol protector pentru respectivele emulsii.

Emulsiile rezultate (1 emulsie martor, not. M și 2 preparate cu adaos de extract, not. P2C și P3C2) au fost testate prin diferite metode, specifice industriei cosmetice/dermato-cosmetice, fiind estimată stabilitatea probelor rezultate (creme), în corelație cu adaosul de extract polifenolic de porumb (ingredient antioxidant, 0.5%).

Testul de stabilitate la rece (4 °C, frigider), indică stabilitatea tuturor preparatelor studiate după 6 săptămâni de stocare în aceste condiții, nefiind percepute modificări ale caracteristicilor organoleptice (aspect, culoare, miros).

Un alt test de stabilitate pentru emulsiile preparate a fost efectuat prin expunere directă la radiație solară. În primele 2 săptămâni de expunere nu au fost observate modificări organoleptice, însă după 6 săptămâni de expunere a fost perceput mirosul de rânced pentru emulsia M, neaditivată cu ingredient antioxidant.

Diferențe semnificative de comportament au fost remarcate între emulsia martor (M) și cele două emulsii cu adaos de extract antioxidant (P2C și P3C2, 0.5% adaos de extract polifenolic) în timpul testului de stabilitate care implică aport de temperatură (testul de îmbătrânire accelerată/test Swing). În acest caz, pentru emulsia M au fost percepute modificări ale caracteristicilor organoleptice la începutul ciclului 2 de testare (dintr-un total de 4 cicluri, în condiții prestabilite). Emulsia prezintă destabilizare, prin separarea în fazele componente și, implicit, modificări dramatice de aspect, precum și modificări de culoare și apariția mirosului rânced.

În mod contrar, emulsiile aditivate cu extract antioxidant (ambele variante de extract, adăugate în proporție de 0.5%) și-au păstrat caracteristicile pe tot parcursul testelor de stabilitate, inclusiv pe tot parcursul testului Swing (4 cicluri, echivalente a 4 săptămâni de expunere la stres termic), fiind evidențiat efectul antioxidant al extractelor de porumb roșu.

Timpul de utilizare în siguranță pentru preparatele cosmetice a fost estimată utilizând un protocol de calcul adaptat după ecuația lui Arrhenius, conform căreia procesul de îmbătrânire accelerată se bazează pe relația dintre temperatură și viteza de reacție, unde o creștere a temperaturii de testare cu 10 °C crește viteza de reacție de aproximativ 2-3 ori. Pentru acest calcul au fost folosite datele obținute în urma testului Swing, fiecare preparat dezvoltat și studiat primind o anumită perioadă de "valabilitate"/utilizare în siguranță. Pentru produsele aditivate cu extract polifenolic, P2C și P3C2, timpul de utilizare în siguranță a fost stabilit ca fiind de peste 2.5 ori mai mare decât cel estimat pentru emulsia M, conform rezultatelor obținute (35 zile pentru M și 76 zile pentru emulsiile P2C și P3C2).

Evaluarea pH-ului emulsiilor inițiale a indicat un nivel optim de utilizare, cu pH compatibil cu pielea (5-5.5) iar în urma testelor de stabilitate au fost observate modificări dramatice pentru emulsia neaditivată cu extract antioxidant, în special după testul Swing (M, pH 2-3). S-a stabilit că expunerea la stres termic favorizează procesele de degradare oxidativă a uleiurilor vegetale din compoziția cremei, formându-se specii acide (cel mai probabil acizi grași liberi), răspunzători de scăderea valorilor de pH.

Prin toate testele efectuate în cadrul acestui capitol, s-a pus în evidență rolul protector împotriva proceselor de oxidare, exercitat de extractele din tărâțe de porumb roșu, selectate în cadrul studiului cu rol de ingredient antioxidant.

Astfel, rezultatele cuprinse în această teză de doctorat, validează strategia de cercetare propusă privind valorificarea superioară a tărâțelor de porumb roșu (subprodus) din hibridul Bloody Butcher.

În contextul unor procese sustenabile, în vederea obținerii de produse cu valoare adăugată într-o abordare de *conomie circulară*, pentru această strategie de cercetare au fost identificate și posibilități de continuare prin valorificarea tărâțelor până la nivel 0 al deșeurilor de proces. În acest sens, deșeul de tărâțe rezultat după procesele de extracție ar putea fi transformat în cărbune activ, cu largi aplicații în diferite segmente industriale. De asemenea, extractele polifenolice din tărâțele de porumb roșu ar putea fi testate și în alte aplicații din diferite domenii industriale (precum industria alimentară, industria farmaceutică/biomedicală, domeniul veterinar, ca aditiv pentru hrana animalelor).

Astfel, prin integrarea acestor subproduse în strategii sustenabile conectate diferitelor domenii de producție, poate fi lărgită aria de utilizare a subproduselor/deșeurilor cerealiere și pot fi implementate procese adaptate conceptului de *conomie circulară*, prin care un produs vegetal, trecut prin etape de prelucrare eficiente, poate fi revalorificat până la niveluri minime/zero de deșeuri.

