

INFLUENȚA CONDIȚIILOR DE EXTRACȚIE ASUPRA COMPOZIȚIEI ȘI ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE A EXTRACTELOR LIPOSOLUBILE DE MĂCEȘE

¹V. Popovici, doctorandă UTM, R. Sturza, dr.hab.prof.univ., A. Ghendov-Moșanu, dr.conf.univ.,

²L. Soran, cercet. șt. sup., I. Lung, cercet. șt. sup.,

³A. Patraș, dr.conf.univ.

¹Universitatea Tehnică a Moldovei, FTA, Departamentul Alimentație și Nutriție, str. Studenților 9/9, 2045 Chișinău, MOLDOVA

²Institutul Național de Cercetare Dezvoltare pentru Tehnologii Izotopice și Moleculare, Cluj-Napoca, ROMÂNIA

³Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară "Ion Ionescu de la Brad" din Iași, ROMÂNIA

INTRODUCERE

Actualmente tot mai mulți producători din Industria Alimentară tind să înlocuiască aditivii alimentari sintetici cu substanțe naturale, componenți biologic activi obținuți din resurse naturale de origine vegetală care să prezinte stabilitate și să fie sigure pentru consum [1]. Pomușoarele de pădure sunt cultivate într-un areal larg, sunt bogate în antioxidanți, vitamine și substanțe minerale importante din punct de vedere nutrițional [2]. Fructele de măceșe (*Rosa Canina*) prezintă un interes sporit datorită caracteristicilor organoleptice și fizico-chimice [3]. Obiectivul prezentei cercetări constă în optimizarea procesului de extracție a compușilor liposolubili și obținerea unor extracte uleioase stabile și de înaltă calitate. Cu acest scop a fost urmărit în timp efectul compușilor biologic activi liposolubili din fructe de măceșe asupra caracteristicilor fizico-chimice a extractelor uleioase și cercetarea stabilității oxidative a acestora.

1. MATERIALE ȘI METODE

Pomușoarele de măceșe (*Rosa Canina*) au fost culese în Nordul Republicii Moldova, anul 2016. Reactivii Folin Ciocalteu, DPPH și *p*-anisidină au fost procurate de la Merck, Germania. Pomușoarele de măceșe culese au fost ulterior uscate la aer, măcinate și cernute în pudră. Extracția a fost efectuată în ulei vegetal de floarea soarelui rafinat dezodorizat cu un raport al solventului 1g plantă:15 ml ulei. Procesul de extracție a fost efectuat prin 2 metode: agitare și ultrasonare, respectarea a 2 regimuri de temperatură: 20°C și 45°C și 3 perioade de timp: 0,5h, 1,0h și 1,5h. Pentru decantarea extractelor, probele au fost centrifugate la 7000 rot/min timp de 10 minute.

Extractele obținute au fost păstrate în recipiente din sticlă întunecată la temperatura de +4°C.

Fracțiile hidrofile ale extractelor uleioase au fost preparate prin dozarea a 3g de extract și adăugarea a 5 ml de soluție metanol-apă (80:20) în 3 etape consecutive. Extractele obținute au fost păstrate în recipiente din sticlă de culoare întunecată la temperatura de +4°C.

1.1. Determinarea indicelui de peroxid (IP) [4]

Determinarea IP a fost efectuată prin metoda volumetrică iar rezultatele obținute s-au calculat conform relației următoare:

$$IP = \frac{(V_{pr} - V_{ref}) \cdot N_{titos} \cdot 1000}{m_{pr}(gr)}, [\text{mEq O}_2/\text{kg}] \quad (1)$$

1.2. Determinarea indicelui de aciditate (IA) [5]

Determinarea IA a fost efectuată prin metoda volumetrică iar rezultatele obținute s-au calculat conform relației următoare:

$$IA = \frac{V_{KOH} \cdot N_{KOH} \cdot 5.611}{m}, [\text{mgKOH/g}] \quad (2)$$

1.3. Determinarea Indicelui de *p*-anisidină [6]

Indicele de *p*-anisidină caracterizează gradul de oxidare lipidică a uleiurilor, formarea produșilor secundari stabili ai oxidării lipidice a alimentelor.

Măsurările au fost efectuate la spectrofotometrul HACH-Lange DR-5000 folosind drept etalon izooctanul. Indicele de *p*-anisidină s-a determinat după formula:

$$p - A.V. = \frac{25 \times (1,2As - Ab)}{m}, [u. c] \quad (3)$$

1.4. Dozarea dienelor și trienelor conjugate [7]

Pentru dozarea dienelor și trienelor conjugate s-au cântărit 0,01g de probă analizată și transferată într-un balon cotat de 25ml. Proba a fost adusă la cotă cu hexan și amestecată bine. Absorbția probei dizolvate se măsoară spectrofotometric la 236 nm și 273 nm utilizând cuvetă de cuarț 10×10 mm. Valorile CD-ul și CT au fost calculate folosind următoarele ecuații:

$$C_{CD/CT} = A_{236/273} / (\epsilon \times 1) \quad (4)$$

$$CD/CT_{val} = [C_{CD/CT} \times (2,5 \times 10^4)] / W \quad (5)$$

Rezultatele au fost exprimate în micromoli de diene și triene conjugate pe gram de probă analizată.

1.5. Activitatea antioxidantă prin reacția cu radicalul liber DPPH [8]

Determinarea activității antioxidante a extractelor uleioase a fost efectuată la spectrofotometrul "HACH LANGE DR-5000" și exprimată în procente de reducere a DPPH (Q,%):

$$AA\% = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100\% \quad (6)$$

Valoarea redusă A_t în extractul cercetat indică o activitate antioxidantă sporită.

1.6. Determinarea conținutului total de carotenoide [8, 9]

Pentru determinări extractele au fost dozate cu ajutorul unei pipete automate câte 10 ml de probă în cuva de cuarț. Determinările s-au efectuat în prezența probei martor (ulei rafinat dezodorizat). Pentru fiecare probă au fost măsurate valorile absorbției la lungimile de undă 663 nm, 647 nm și 470 nm. Rezultatelor măsurărilor exprimate în conținutul de carotenoide se determină prin următoarele relații matematice.

$$C_a(mgL^{-1}) = (12,25 \times A_{663,2}) - (2,79 \times A_{646,8}) \quad (7)$$

$$C_b(mgL^{-1}) = (21,5 \times A_{646,8}) - (5,1 \times A_{663,2}) \quad (8)$$

$$C_{a+b}(mgL^{-1}) = \frac{(1000 \times A_{470} - 1,82 \times C_a - 85,02 \times C_b)}{198} \quad (9)$$

1.7. Determinarea conținutului total de polifenoli [10]

Determinarea conținutului total de polifenoli a fost efectuată la spectrofotometrul "HACH LANGE DR-5000" la $\lambda=765$ nm cu o cuvă de cuarț de 10 mm. Rezultatele conținutului total de polifenoli, exprimate în mg AG/100 g plantă au fost obținute cu ajutorul curbei de calibrare a acidului galic ($y=1,4x+0,0037$, $R^2=0,999$).

1.8. Determinarea conținutului de acid ascorbic (vitamina C) [11]

Pentru analiza L-acidului ascorbic din extractele de plante studiate s-a utilizat un sistem HPLC Shimadzu 2010 echipat cu detector PDA și coloană tip Grace Alltima C18 (100 x 3 mm, 3 μ m). Eluția s-a realizat cu gradient, utilizând drept fază mobilă tamponul fosfat 15mM la pH 2,7 (A) și metanolul (B), cu un debit de 0,4 mL/min. Gradientul a fost realizat astfel: min 0: 10% B, min 5: 20% B, min 10: 10% B; temperatura coloanei - 30°C; volumul injectat - 20 μ L. Lungimea de undă UV pentru detecția L-acidului ascorbic - 244 nm, iar timpul de retenție determinat a fost de 1,85 min.

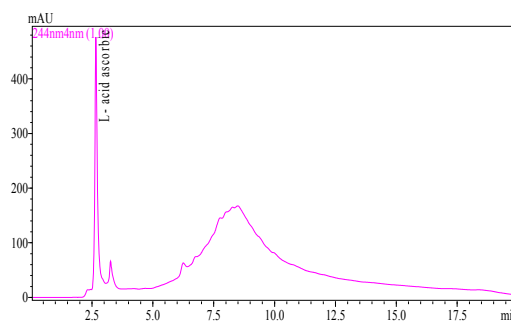


Figura 1. Cromatograma extractului din măceșe.

Rezultatele conținutului total de polifenoli, exprimate în mg/mL au fost obținute cu ajutorul curbei de calibrare a acidului galic ($y=5E+0,7x+62453$, $R^2=0,999$). Cromatogramele extractelor obținute pentru fructele de pădure studiate sunt prezentate în figura 1.

2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Compoziția fizico-chimică a extractelor cercetate, conținutul de pigmenți, caroteni, clorofilă [8] au fost determinate în conformitate cu metode standardizate de analiză și prezentate în tabelul 1.

Analiza conținutului de vitamina C și polifenoli în extractele de măceșe indică valori diferite pentru cele două metode de tratare prealabilă - ultrasonare și agitare, ceea ce se explică prin impactul metodei de extracție asupra conținutului de compuși organici bioactivi extrași, datele fiind prezentate în tabelul 2.

Tabelul 1. Conținutul total de clorofilă și carotenoide, mg/L

Pigmenți	Valori, mg/L
Clorofila a	0,047±0,006
Clorofila b	0,28±0,01
β caroten	13,58±0,05
Lycopen	14,39±0,38
Zeaxantina	15,19±0,06

Tabelul 2. Conținutul total de polifenoli și vitamina C, mg/L

Caracteristica fizico-chimică	Agitare	Ultrasonare
Conținut total de vit. C, mg/L	11,67±0,32	12,00±0,19
Conținut total de polifenoli, mg/100g plantă	319,45±9,49	191,63±5,25

Parametrii de bază ai calității (IA, IP, *p*-anisidină, K_{236} , K_{273} , $K_{236/273}$) ai extractelor cercetate au fost determinate în conformitate cu metode standardizate de analiză [7] și sunt prezentate în tabelul 3.

Conform documentelor normative, valoarea IA nu trebuie să depășească 0,6 mg KOH/g [12]. Valoarea IA în probele cercetate variază de la 0,070±0,001 ml KOH/g până la 0,080±0,018 ml KOH/g. Proba cu extract de măceșe a indicat cea mai redusă valoare a IA, ceea ce se explică prin acțiunea compușilor biologic activi asupra încetinirii procesului de oxidare.

IP exprimă gradul de oxidare lipidică a extractelor și nu trebuie să depășească 10 mEq O₂/kg [12]. Rezultatele obținute pentru probele cercetate variază de la 1,86±0,20 până la 2,23±0,07mEq O₂/kg, unde cea mai mică valoare este caracteristică pentru proba cu extract de măceșe.

Pentru a determina conținutul de produse secundare ai oxidării lipidelor (aldehide și cetone) a fost determinat indicele de *p*-anisidină. Valorile experimentale variază de la 8,69±0,30 până la 9,44±0,27 u.c. Cea mai mică valoare este caracteristică pentru proba cu extract de măceșe,

ceea ce confirmă efectul antioxidant al compușilor biologic activi din fructe de măceșe.

Indicele K_{236} indică conținutul de diene conjugate și produși secundari ai oxidării care absorb la $\lambda=236$ nm. Proba cercetată indică valori ce variază de la 0,162±0,018 până la 0,27±0,05.

Tabelul 3. IA și IP, indicele de *p*-anisidină, K_{236} , K_{273} și raportul K_{236}/K_{273} .

Indici	Extract de măceșe*	Ulei tratat*
IA, mg KOH/1g	0,070±0,001	0,080±0,018
IP, mEq O ₂ /kg	1,86±0,20	2,23±0,07
<i>p</i> -anisidină, u.c.	8,69±0,3	9,44±0,27
K_{236}	0,162±0,018	0,27±0,05
K_{273}	0,127±0,031	0,08±0,01
K_{236}/K_{273}	1,28±0,16	3,38±0,01

*temperatura de extracție/tratare - 45°C.

Indicele K_{273} indică conținutul de triene conjugate și produși secundari ai oxidării care absorb la $\lambda=273$ nm, iar proba analizată indică valori ce variază de la 0,08±0,01 până la 0,127±0,031.

Indicii K_{236} și K_{273} pentru produse alimentare lipidice nu trebuie să depășească valorile de 2,50 și respectiv 0,25 [7]. Datele prezentate mai sus se încadrează în limitele admisibile, fiind chiar considerabil mai reduse, fapt ce argumentează valoarea biologică a extractelor de măceșe.

Conținutul de carotenoide în probele de extracte cercetate este prezentat în figura 2. În vederea evaluării condițiilor de extracție, metodei utilizate și influenței acestora asupra conținutului de carotenoide au fost efectuate extracții prin două metode. S-a stabilit, că cel mai mare conținut de carotenoide (4,8 ±0,12 mg/L) a fost extras prin metoda de ultrasonare cu respectarea unui regim de temperatură de 45°C.

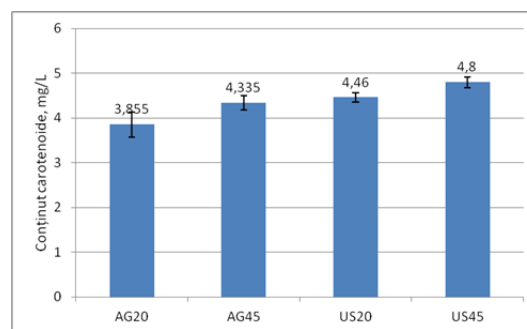


Figura 2. Variația în timp a conținutului total de carotenoide (mg/L) în funcție de metoda de extracție și regimul de temperatură.

Cea mai mică valoare a conținutului de carotenoide a fost obținut la extracția prin metoda de agitare cu regim termic de 20°C, constituind respectiv 3,855±0,28 mg/L.

Carotenoidele prezintă compuși ce manifestă un rol deosebit în încetinirea fotooxidării și poate oferi produselor stabilitate oxidativă. Variația conținutului de carotenoide extrase în ulei este influențat în mare măsură de metodele utilizate și condițiile de extracție. Conform surselor bibliografice [9], conținutul de carotenoide poate să varieze între 1-20 mg/L, dar de regulă nu depășește valoarea de 10 mg/L.

Cercetarea extractelor de măceșe cu ajutorul radicalilor liberi DPPH permite evaluarea capacității antioxidante a compușilor biologic activi. Extractele de măceșe prezintă o capacitate antioxidantă marcantă în comparație cu probele de ulei tratat, valorile pentru extractele de măceșe fiind de cca 63,52±0,72% (figura 3). La evaluarea activității antioxidante peste o perioadă de 3 luni s-a constatat o reducere esențială a capacității antioxidante atât pentru extractele de măceșe, cât și pentru proba de ulei tratat. Însă extractul de măceșe este caracterizat de o capacitate antioxidantă considerabil mai mare decât a uleiului, constituind respectiv 34,29±0,3% și 20,26±0,3%.

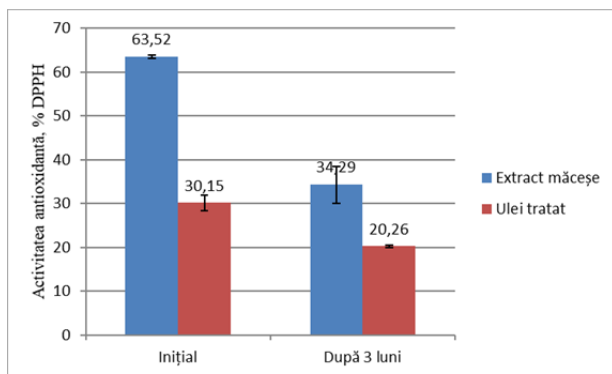


Figura 3. Variația în timp a activității antioxidante, % DPPH inhibat.

Activitatea antioxidantă sporită a extractelor de măceșe se datorează compoziției fizico-chimice, bogat în carotenoide, vitamina C și compuși fenolici care au capacitatea de a capta radicalii. Acești compuși cedează radicalilor liberi atomii de hidrogen de la grupa hidroxil, formând compuși fenolici stabili cu un rol important pentru stabilitatea antioxidantă a extractelor.

Conținutul de carotenoide determinat, atât datele obținute inițial cât și rezultatele obținute după o perioadă de 3 luni sunt prezentate în figura 4.

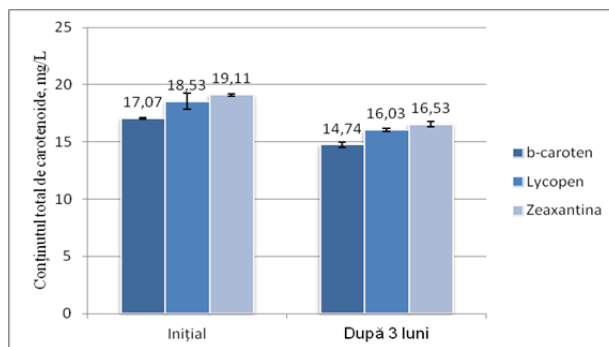


Figura 4. Conținutul total de carotenoide, mg/L.

Se constată, că conținutul carotenoidelor analizate variază în timp, fiind influențat de diverși factori (condiții de păstrare, temperatură) cât și în funcție de natura lui. Concentrația de lycopen, β-caroten și zeaxantină scade neesențial după o perioadă de păstrare de 3 luni.

Pentru a evalua în timp modificările caracteristicilor fizico-chimice și de calitate au fost efectuate determinări a probelor analizate după o perioadă de 3 luni. Datele obținute atestă, că prezența compușilor biologic activi din extractele de măceșe joacă un rol pozitiv în vederea încetării procesului oxidativ și, respectiv, mărirea termenului de păstrare.

Conform datelor obținute (tabelul 4) IP și IA prezintă o creștere neînsemnată cu valori de 1,86±0,2 mEq O₂/kg și respectiv 0,166±0,009 mgKOH/g ceea ce se explică prin acțiunea inhibitoare a procesului oxidativ de către compușii biologic activi din extractul de măceșe.

Tabelul 4. Variația în timp a indicelui de aciditate și de peroxid, indicelui de p-anisidină, K₂₃₆, K₂₇₃ și raportului K₂₃₆/K₂₇₃, activitatea antioxidantă, DPPH.

Caracteristica fizico-chimică	Inițial	După 3 luni
IA, mg KOH/1g materie grasă	0,165±0,016	0,166±0,009
IP, mEq O ₂ /kg	1,83±0,2	1,86±0,2
p-anisidină, u.c.	10,87±0,5	9,89±0,46
K ₂₃₆	0,163±0,018	0,162±0,019
K ₂₇₃	0,127±0,031	0,060±0,003
K ₂₃₆ /K ₂₇₃	1,27±0,16	2,68±0,25
DPPH, %	63,52±0,32	34,29±4,15

Gradul de oxidare a probelor exprimate prin cantitatea de produși primari și secundari formați în

timpul depozitării pe o perioadă de 3 luni au fost evaluate prin determinarea indicilor de *p*-anisidină, K_{236} și K_{273} . Valorile obținute ($9,89 \pm 0,46$ u.c., $0,162 \pm 0,019$ și respectiv $0,060 \pm 0,003$) indică stagnarea procesului de oxidare lipidică datorită îmbogățirii uleiului cu componente biologice active, care prezintă caracter antioxidant.

Evaluarea capacității antioxidante a extractelor de măceșe indică o scădere esențială după o perioadă de păstrare de 3 luni, valorile variind de la $63,52 \pm 0,32$ % până la $34,29 \pm 4,15$ % ceea ce se explică prin epuizarea parțială a substanțelor antioxidante din extracte. Însă comparativ cu valorile probelor de ulei tratat (figura 3), extractul de măceșe prezintă calități superioare, ceea ce îi oferă un interes sporit pentru industria alimentară și consum.

CONCLUZII

Indicii de calitate ai probelor cercetate în lucrare se află în limitele admisibile conform documentelor normative pentru uleiuri vegetale [12]. Analiza comparativă a extractului de măceșe și a uleiului vegetal tratat a arătat diferențe semnificative pentru mai mulți indici de calitate studiați. Extractul de măceșe este caracterizat prin valori mai mici ai IP ($1,86 \pm 0,20$ mEq O_2 /kg) și a IA ($0,07 \pm 0,001$ mgKOH/1g) în comparație cu valorile obținute pentru probele de ulei vegetal tratat. Acest fapt se explică prin acțiunea antioxidantă a compușilor biologici activi din măceșe care contribuie la încetinirea procesului oxidativ.

În urma optimizării metodelor de extracție s-a stabilit, că extragerea unui conținut ridicat de compuși biologici activi liposolubili poate fi efectuată prin ultrasonare la temperatura de 45°C . Conținutul de carotenoide extrase constituie $4,8 \pm 0,12$ mg/L și conținutul de AA este de $12,00 \pm 0,19$ mg/L.

Capacitatea antioxidantă a extractului de măceșe în comparație cu proba de ulei tratat și conținutul compușilor biologici activi - vitamina C, polifenoli, β -caroten au fost măsurate după 3 luni de păstrare. Este argumentată acțiunea antioxidantă a compușilor biologici activi, care stagnează esențial oxidarea uleiului.

Prezenta cercetare demonstrează posibilitatea de utilizare a extractelor uleioase de măceșe în producerea alimentelor cu conținut lipidic sporit. Un interes aparte îl constituie și oportunitatea substituirii antioxidantilor sintetici cu cei naturali obținuți din surse horticoale autohtone în vederea oferirii consumătorilor unor produse alimentare stabile și sigure pentru consum.

MULȚUMIRI

Cu multă recunoștință aducem mulțumiri proiectului bilateral MD-RO cu cifrul 16.80013.5107.22/Ro pentru susținere financiară.

Bibliografie

1. **Teneva I., Petkova N., Dimov I.,** Characterization of Rose Hip (*Rosa Canina L.*) Fruits extracts and evaluation of their in vitro antioxidant activity, *Journal of Pharmacognasy and Phytochemistry*, 2016, p. 35-38.
2. **Roman I., Stănilă A., Stănilă S.,** Bioactive compounds and antioxidant activity of *Rosa canina L.* biotypes from spontaneous flora of Transylvania, *Chem Cent J.*, 2013.
3. **Ersoy N.; Ozen M.S.,** Some physico-Chemical Characteristics in fruits of Rose Hip genotypes from Bolu Province in Western part of Turkey, *Agro-knowledge Journal*, vol.17, n.2, 2016, p.191-201.
4. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. Method Cd 8-53. Peroxid value. Campaign: AOCS Press, 2003.*
5. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. Method Cd 3d-63. Acid Value. Campaign: AOCS Press, 1999.*
6. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. Method Cd 18-90. P-anisidine value. Campaign: AOCS, 1997.*
7. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. Method Ti 1a-64. Conjugated diene and triene content. Campaign: AOCS Press 1993.*
8. **Mladenka Sarolic, Mirko Gugic, Carlo Ignazio Giovanni Tuberoso,** Volatile Profile, Phytochemicals and Antioxidant activity of Virgin Olive Oils from Croatian Autochthonous Varieties Masnjaca and Krvavica in comparison with Italian Variety Leccino., *Molecules*, 19., 2014., 881-895p.
9. **Tesfaye B., Abebaw A., Reddy M.U.,** Determination of Cholesterol and β -Carotene content in some selected Edible Oils; *International Journal of Innovative Science and Research Technology; Volume 2, Issue 7, July 2017, 14-18p.*
10. **Sturza R.,** Principii moderne de analiză a alimentelor, *Monografie, UTM, Chișinău, 2016.*
11. **Stan M., Soran M. L., Marutoiu C.,** Extraction and HPLC determination of the ascorbic acid content of three indigenous spice plants., *Journal of Analytical Chemistry, Vol.69, No.10, 2014, 998-1002 p.*
12. *HG nr.434 din 27.05.2010 cu privire la aprobarea cerințelor "Uleiuri vegetale comestibile".*

Recomandat pentru publicare: 02.02.2018