



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI

OIPOS DRU



UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI"
DIN IAȘI



UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI
Școala Doctorală a Facultății de Inginerie
Chimică și Protecția Mediului



**CONTRIBUȚII PRIVIND METODE DE SEPARARE,
IZOLARE ȘI CARACTERIZARE A COMPUȘILOR
POLIFENOLICI BIOACTIVI DIN DIFERITE SURSE DE
BIOMASĂ VEGETALĂ
- TEZĂ DE DOCTORAT –**

Conducători de doctorat:

Prof. univ. dr. Valentin I. Popa

Prof. Patrick Martin

Doctorand:

Ing. Ioana Ignat

IAȘI – 2011

UNIVERSITATEA TEHNICĂ „GHEORGHE ASACHI” DIN IAȘI
R E C T O R A T U L

Către

.....
Vă facem cunoscut că în ziua de.....la ora.....în **Sala de Consiliu a Facultății de Inginerie Chimică** va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

“ Contribuții privind metode de separare, izolare și caracterizare a compușilor polifenolici bioactivi din diferite surse de biomasă vegetală ”

elaborată de d-ra inginer **Ioana IGNAT** în vederea conferirii titlului științific de doctor în domeniul **Inginerie Chimică**.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

- | | |
|---|--|
| 1. Prof. univ. dr. ing. Dan Cașcaval
Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași | - președinte |
| 2. Prof. univ. dr. ing. Valentin I. POPA
Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași | - conducător științific |
| 3. Prof. Patrick MARTIN
Universitatea Artois, Franța | - conducător științific în cotutelă |
| 4. MCf. Ludovic CHAVERIAT
Universitatea Artois, Franța | - membru |
| 5. Prof. Vasile Hulea
Ecole Nationale Supérieure de Chimie, Franța | - membru |
| 6. Prof.dr. Viorica DULMAN
Universitatea “Alexandru Ioan Cuza” din Iași | - membru |

Vă trimitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica, în scris, aprecierile dumneavoastră.

Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.



RECTOR,
Prof.univ.dr.ing.

ION GIURMA

SECRETAR,
Ing. Cristina NAGÎȚ

Mulțumiri

Adresez respectuase mulțumiri domnului prof.dr.ing. Valentin I. Popa, conducătorul științific al lucrării, pentru profesionalismul cu care m-a ghidat pe drumul către obținerea titlului de doctor, pentru competența și permanenta îndrumare științifică și pentru sprijinul real acordat pe întreaga perioadă de desfășurare a doctoratului.

Mulțumiri domnului Prof. Patrick Martin și domnului MCf. Ludovic Chaveriat pentru sprijinul acordat pe parcursul stagiului desfășurat la Universitatea Artois, IUT Bethune.

Mulțumiri doamnei conf.dr.ing. Irina Volf pentru contribuția adusă la formarea mea profesională, pentru sprijinul moral și încrederea acordate pe parcursul elaborării tezei de doctorat.

Mulțumiri tuturor membrilor comisiei pentru acceptul lor de a participa la susținerea publică a acestei teze și pentru efortul depus în citirea și evaluarea manuscrisului.

Sincere mulțumiri tuturor persoanelor cu care am colaborat în perioada desfășurării studiilor doctorale și care mi-au împărtășit cu drag din vastă lor experiență: domnul prof.dr.ing. Marcel-Ionel Popa, doamna ș.l. dr. ing. Carmen Păduraru, doamna cercet. șt. Violeta Neagu, domnul cercet. șt. Ion Bunia, doamna ș.l. dr. chim. Mariana Neamtu, doamna conf.dr.ing. Gabriela Lisa.

Mulțumesc întregului colectiv de cercetare din cadrul catedrei de Polimeri Naturali și Sintetici care au contribuit la formarea mea profesională.

Sincere mulțumiri colegilor care mi-au fost alături în această perioadă și care m-au susținut și încurajat necondiționat.

Alese gânduri de prețuire familiei și prietenilor pentru sprijinul moral, înțelegerea și răbdarea acordate pe parcursul acestor ani de studiu.

Mulțumesc echipei manageriale ce a condus la existența Proiectului „Burse Doctorale - O Investiție în Inteligență (BRAIN)”, ID 6681, al cărui beneficiar am fost și eu în perioada elaborării prezentei teze de doctorat.

Cuprins

Introducere.....	4
Capitolul I. Clasificarea și structura compușilor polifenolici naturali	6
I.1 Flavonoide	9
I.2 Cumarine	12
I.3 Lignine.....	13
I.4 Taninuri	14
I.5 Acizi fenolici	16
Capitolul II. Metode de extracție a compușilor polifenolici.....	18
II.1 Surse de compuși polifenolici naturali	18
II.2 Extracția cu solvenți	21
II.3 Extracția cu fluide supercritice	22
II.4 Alte metode de extracție	23
Capitolul III. Metode de separare, caracterizare și identificare a compușilor polifenolici	25
III.1. Tehnici cromatografice de analiză.....	25
III.1.1 Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC)	25
III.1.2 Cromatografia cu fluide supercritice (SFC)	29
III.1.3 Cromatografia în fază gazoasă (GC)	29
III.1.4 Alte tehnici cromatografice	30
III.2 Separarea prin schimb ionic.....	33
III.3 Noi metode de separare și caracterizare a compușilor polifenolici	36
III.4 Tehnici spectrale de caracterizare și elucidare a structurii moleculare a compușilor aromatici naturali.....	37
Capitolul IV. Proprietăți ale compușilor polifenolici naturali.....	43
IV.1 Rolul polifenolilor ca bioregulatori în creșterea și dezvoltarea plantelor	43
IV.2 Caracterul antioxidant al compușilor polifenolici naturali.....	45
IV.3 Activitatea antibacteriană a compușilor polifenolici.....	48
IV.4 Proprietăți de inhibare a peroxidării lipidelor și a carcinogenezei.....	48
Capitolul V. Metode extracție a compușilor chimici naturali	50
V.1 Materiale vegetale selectate	50
V.2 Precondiționarea materialului vegetal	54
V.3 Tehnologia de extracție a compușilor chimici naturali.....	55
V.4 Extracția substanțelor lipofile	56
V.4.1 Materiale și metode	56
V.4.1.1 Extracția substanțelor cu caracter lipofil	56
V.4.1.2 Analiza GC-MS a fracției lipofile obținute în urma extracției cu hexan	56
V.4.1.3 Analiza HPLC a fracției lipofice obținute în urma extracției cu eter etilic.....	57
V.4.2 Rezultate și discuții	57

V.5 Extracția compușilor polifenolici din materialele vegetale.....	63
V.5.1 Materiale și metode	64
V.5.1.1 Extracția alcoolică.....	64
V.5.1.2 Extracția apoasă.....	64
V.5.1.3 Extracția alcalină.....	64
V.5.1.4 Extracția cu fluide supercritice.....	64
V.5.1.5 Determinarea substanței uscate.....	65
V.5.1.6 Determinarea conținutului de cenușă.....	65
V.5.2 Rezultate și discuții	65
V.5.2.1 Extracția alcoolică	65
V.5.2.2 Extracția apoasă.....	66
V.5.2.2 Extracția alcalină	67
V.5.2.3 Extracția cu fluide supercritice	68
Concluzii.....	71
Capitolul VI. Metode de caracterizare preliminară a extractelor vegetale utilizând tehnici spectrale.....	73
VI.1 Materiale și metode	74
VI.1.1 Determinarea conținutului total de polifenoli	74
VI.1.2 Determinarea conținutului total de taninuri	74
VI.1.3 Determinarea conținutului de flavonoide	74
VI.1.4 Determinarea conținutului de flavani.....	74
VI.1.5 Determinarea conținutului total de antociani	74
VI.1.6 Analiza FTIR a extractelor vegetale	74
VI.1.7 Analiza RMN.....	75
VI.2 Rezultate și discuții	75
VI.2.1 Caracterizarea cantitativă a extractelor prin tehnici spectrofotometrice	75
VI.2.2 Spectroscopia FTIR	77
VI.2.3 Analiza compușilor polifenolici prin spectroscopie RMN.....	80
Concluzii.....	95
Capitolul VII. Metode de separare și identificare a compușilor polifenolici naturali în extractele vegetale	97
VII.1 Materiale și metode.....	97
VII.1.1 Fraționarea extractelor vegetale	97
VII.1.2 Analiza HPLC a acizilor polifenolici.....	97
VII.1.3 Analiza HPLC a flavonoidelor	97
VII.1.4 Analiza GC-MS a extractelor polifenolice	97
VII.2 Rezultate și discuții.....	98
VII.2.1 Fraționarea extractelor	98
VII.2.2 Caracterizarea și identificarea acizilor polifenolici prin analiza HPLC.....	100
VII.2.3 Caracterizarea și identificarea flavonoidelor prin analiza HPLC	112
VII.2.4 Caracterizarea acizilor fenolici din probe vegetale obținute prin extracția cu fluide supercritice	115
VII.2.5 Identificarea și caracterizarea compușilor polifenolici prin tehnica gaz cromatografică cuplată cu spectrometria de masă.....	117
Concluzii.....	120
Capitolul VIII. Separarea compușilor polifenolici prin schimb ionic.....	122
VIII.1 Materiale și metode de sinteză și analiză.....	122
VIII.1.1 Schimbători de ioni comerciali utilizați au fost:	122
VIII.1.2 Schimbătorii de ioni sintetizați în laborator	123

VIII.1.3 Procesul de adsorbție.....	125
VIII.1.4 Analiza HPLC	125
VIII.1.5 Analiza UV-VIS.....	126
VIII.2 Rezultate și discuții.....	126
VIII.2.1 Adsorbția compușilor polifenolici pe schimbători de ioni comerciali	126
VIII.2.2 Adsorbția compușilor polifenolici pe schimbători de ioni sintetizați	130
VIII.2.2.1 Capacitatea de adsorbție a schimbătorilor polimerici cu grupări aminice.....	130
VIII.2.2.2 Studiul cinetic și termodinamic de adsorbție al acidului vanilic pe schimbătorul de ioni P115	132
VIII.2.2.3 Studiul cinetic și termodinamic de adsorbție a acidului galic pe schimbătorul de ioni P115	135
VIII.2.2.4 Studiul cinetic și termodinamic de adsorbție a catehinei pe schimbătorul de ioni P115	136
VIII.2.2.5 Studiul cinetic și termodinamic de adsorbție al acidului ferulic pe schimbătorul de ioni P115	138
VIII.2.2.6 Separarea compușilor polifenolici din amestec	140
Capitolul IX. Proprietăți ale compușilor polifenolici	143
IX.1 Materiale și metode	143
IX.1.1 Analiza stabilității termice	143
IX.1.2 Stabilitatea compușilor sub influența radiațiilor UV (foto-oxidare)	144
IX.1.3 Determinarea capacității antioxidante	144
IX.1.4 Determinarea activității antimicrobiene a unor extracte de plante.....	144
IX.1.5 Influența extractelor polifenolice în procese de germinare, creștere și dezvoltare a plantelor.....	145
IX.2 Rezultate și discuții	146
IX.2.1 Analiza termică	146
IX.2.2 Foto-oxidarea compușilor polifenolici.....	151
IX.2.3 Determinarea capacității antioxidante	156
IX.2.4 Determinarea activității antimicrobiene a unor extracte de plante.....	158
IX.2.5 Influența extractelor polifenolice asupra creșterii și dezvoltării plantelor	159
Concluzii.....	166
Concluzii finale	168
Referințe bibliografice	174

Introducere

Compușii polifenolici reprezintă una dintre cele mai răspândite clase de metaboliți secundari din plante, fiind compuși esențiali în asigurarea creșterii și dezvoltării normale a plantelor și nu numai, unii dintre ei contribuind la pigmentarea și apărarea împotriva agenților patogeni și a prădătorilor (Lapornik și colab., 2005; Tsao și Yang, 2003; Balasundram și colab., 2006)

Multe din proprietățile de activitate biologică ale produselor din plante sunt adesea asociate cu prezența unor polifenoli, motiv pentru care acești compuși sunt intens studiați în prezent și stârnesc un interes deosebit datorită efectelor benefice asupra sănătății.

Rolul lor de antioxidanți naturali devine din ce în ce mai important pentru prevenirea și tratarea diferitelor afecțiuni inflamatorii, a bolilor cardiovasculare, neurodegenerative chiar și a cancerului prezentând o activitate antitumorală caracterizată prin inhibarea proliferării unei varietăți de celule canceroase. De asemenea, unii dintre compușii polifenolici sunt utilizați în industria agroalimentară ca aditivi, conservanți, coloranți, ca și în industria farmaceutică, cosmetică și agricultura.

Toate aceste proprietăți și efecte benefice asupra sănătății umane cât și interesul pentru utilizarea de aditivi naturali în industrie au intensificat și stimulat eforturile cercetătorilor privind testarea și aplicarea unor metode cât mai eficiente de separare și caracterizare a compușilor bioactivi din plante în scopul valorificării acestora.

Stabilirea structurii, proprietăților și a domeniilor de utilizare a acestor compuși presupune utilizarea unor tehnici analitice. Tehnicile cromatografice reprezintă principala metodă utilizată în separarea, izolarea și identificarea compușilor bioactivi. În timp cercetătorii au abordat diverse variante ale metodelor cromatografice (HPLC, GC, GPC), mai mult sau mai puțin complexe, cât și metode spectrale (RMN, MS, FTIR, NIR) pentru elucidarea structurii moleculare.

Obiectivele prezentei teze de doctorat vizează aspecte privind extracția, separarea și caracterizarea compușilor naturali cu structură aromatică având ca materii prime diferite surse vegetale în condițiile valorificării complexe a biomasei vegetale.

Prima parte a acestei teze este dedicată unui amplu studiu bibliografic referitor la principalele clase de polifenoli din plante, sursele naturale de compuși polifenolici, precum și la

cele mai uzuale metode de extracție, separare și caracterizare a acestor compuși pe baza căruia s-au stabilit obiectivele de cercetare.

În cea de a doua parte, sunt evidențiate rezultatele experimentale proprii obținute prin aplicarea diferitelor tehnici în scopul izolării, identificării și cuantificării principalilor compuși polifenolici prezenți în materialele vegetale selectate pentru acest studiu.

De asemenea, în contextul tezei de doctorat sunt abordate și câteva aspecte privind proprietățile și stabilitatea polifenolilor în diferite condiții. Fiind cunoscuți pentru proprietățile antioxidante și efectele benefice asupra sănătății acești compuși au fost îndelung studiați și încă constituie un domeniu activ de cercetare. Până în prezent aspectele privind stabilitatea acestor compuși au fost foarte puțin studiate. Cunoscând faptul că polifenolii sunt termolabili și fotosensibili și sunt susceptibili la degradarea în anumite condiții (pH, expunerea la ultrasunete, lumină, temperatură) ne-am propus realizarea unor studii privind degradarea compușilor standard și a extractelor vegetale în condiții de temperatură ridicată și sub influența radiațiilor UV.

O altă direcție abordată în contextul valorificării compușilor polifenolici a fost aplicarea extractelor vegetale în sisteme biologice, în acest scop studiindu-se influența compușilor naturali cu structură aromatică asupra creșterii și dezvoltării plantelor cât și evaluarea activității antimicrobiene a extractelor vegetale.

Rezultatele experimentale prezentate și abordarea diferitelor tehnici analitice în decursul programul de doctorat au presupus colaborarea cu diverse instituții internaționale prin oportunitatea beneficiarii de stagiul extern de cercetare din cadrul programului de doctorat la Universitatea Artois din Franța, Bethune cât și alte mobilități realizate individual la Universitatea Orleans din Franța, Orleans și Universitatea Tor Vergata din Italia, Roma.

Rezultatele obținute s-au concretizat în 4 publicații în reviste cotate ISI, 14 articole în reviste recunoscute CNCSIS și 18 participări la manifestări științifice interne și internaționale.

Capitolul V. Metode extracție a compușilor chimici naturali

V.I Materiale vegetale selectate

Materiile prime selectate în vederea extracției, separării și identificării compușilor polifenolici au fost: *Asclepias syriaca*, fructe de *Crataegus monogyna*, semințele de *Vitis vinifera* (soiul Merlot) și coajă de *Picea abies*.

Asclepias syriaca a fost în inițial selectată și exploatată din perspectiva conținutului în hidrocarburi, lignină, și fibre celulozice. În contextul valorificării complexe a biomasei s-a abordat valorificarea acestei plante și din prisma conținutului de compuși naturali bioactivi.

Păducelul (*Crataegus Monogyna*) este o plantă cu proprietăți diverse utilizată în medicina curativa, în special în afecțiunile cardiovasculare și cunoscută datorită conținutului bogat în compuși bioactivi naturali.

Semințele de struguri și coaja de molid reprezintă surse importante de sub-produse industriale la nivel național și mondial. Valorificarea deșeurilor sau a produselor secundare rezultate în urma diverselor procese industriale este un aspect foarte important din punct de vedere al impactului de mediu și managementul deșeurilor dar și din punctul de vedere al utilizării unor materii prime ieftine în procesele de biorafinare și valorificare complexă a biomasei vegetale cu scopul izolării compușilor chimici naturali.

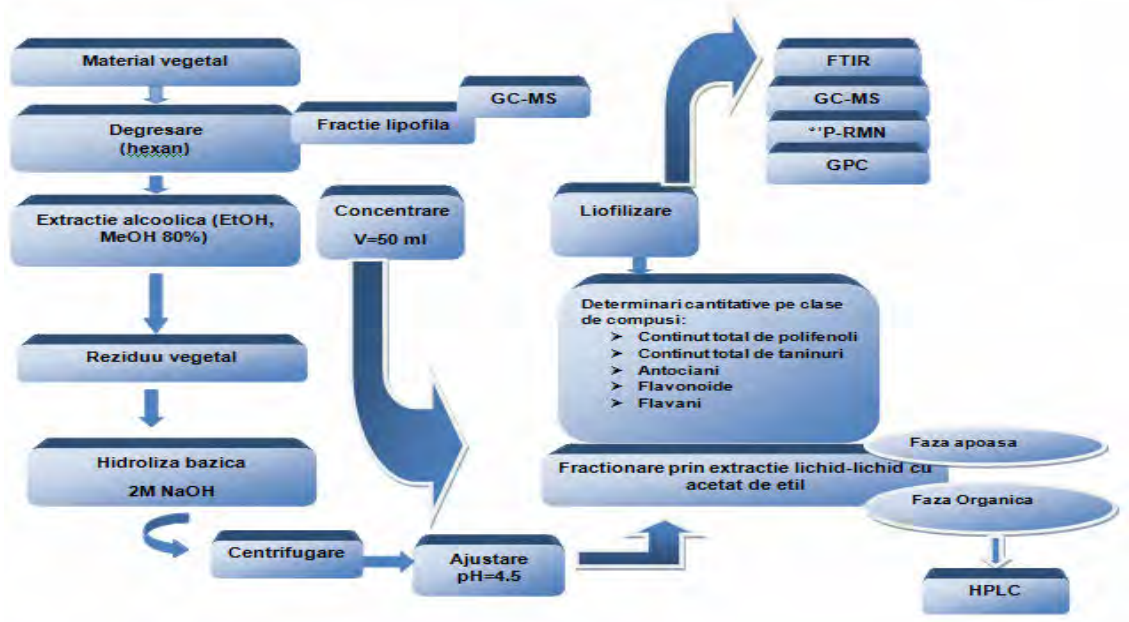


Fig.8 Schema de ansamblu a etapelor experimentale parcurse pentru extracția, separarea și caracterizarea compușilor polifenolici naturali

V.4 Extracția substanțelor lipofile

O etapă importantă în procesul de extracție o constituie eliminarea substanțelor lipofile prezente în materialul vegetal substanțe care pot îngreuna ulterior extracția compușilor polifenolici sau a altor compuși cu solubilitate ridicată în solvenți de tipul alcoolilor.

V.4.1 Materiale și metode

În vederea degresării materialului vegetal s-au utilizat ca agenți de extracție eterul etilic și hexanul. Frația lipofilă obținută după extracția cu hexan a fost caracterizată în vederea stabilirii principalilor acizi grași prin GC-MS iar fracția eterică a fost supusă analizei HPLC.

V.4.2 Rezultate și discuții

În urma etapei de extracției a substanțelor lipofile utilizând diferiți solvenți s-a constatat că deși eterul etilic este un bun agent de extracție al substanțelor lipofile acesta prezintă afinitate și față de compușii polifenolici. Extracția cu eter etilic a semințelor de struguri și analiza HPLC a fracției eterice a confirmat prezența compușilor de interes în extractul obținut.

Pentru a evita extracția polifenolilor în etapa de degresare a materialului vegetal s-a utilizat hexanul ca solvent de extracție.

În Fig.10 sunt prezentate randamentele extracției cu hexan pentru toate cele patru materiale vegetale.

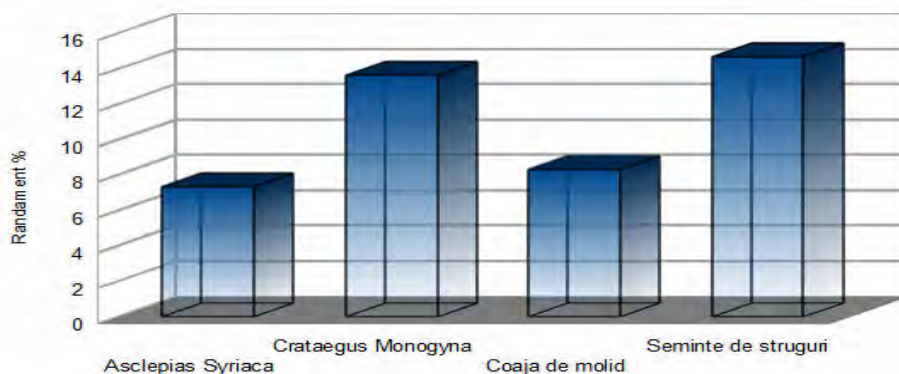


Fig. 10 Randamentul extracției cu hexan

Putem observa, astfel, că randamentele cele mai ridicate s-au înregistrat în cazul semințelor de struguri și a fructelor de păducel atingând valori de până la 15% în timp ce pentru extractele obținute din coajă de molid și *Asclepias Syriaca* randamentul extracției a fost de aproximativ 8%.

În urma analizei GC-MS s-a constatat că în cazul extractului din *Asclepias Syriaca* compușii majoritari prezenți sunt acizii linoleic (21%), oleic (19%) și palmitic (39%).

În extractul de păducel, acidul linoleic reprezintă aproximativ 50% din totalul compușilor prezenți în timp ce acidul oleic se găsește într-un procent de aproximativ 33% iar acidul palmitic reprezintă 13%.

Pe de altă parte, în extractul din coajă de molid compușii majoritari sunt acidul beheric (34%), metil lignocerat (36%) și într-o proporție mai mică acidul palmitic (12%). De asemenea și în cazul acestui extract se poate constata prezența unui compus caracteristic doar acestui tip de material vegetal și anume acidul arahidic care reprezintă aproximativ 9% din totalul compușilor identificați.

În extractul de semințe de struguri ponderea cea mai ridicată aparține acidului linoleic (65%) urmat de acizii oleic (13%) și palmitic (10%).

V.5 Extracția compușilor polifenolici din materialele vegetale

Extracția compușilor naturali bioactivi a presupus utilizarea a trei solvenți de extracție: apa, etanol 80% și metanol 80%. Datorită stabilității termice relativ reduse a compușilor naturali cu structură aromatică, procesul s-a desfășurat în prezența acidului ascorbic (0,5 % w/v) ca agent antioxidant. Temperatura de extracție a fost de 80°C

Extracția alcalină (NaOH 2M) s-a realizat pe materialul vegetal obținut ulterior extracției alcoolice și a avut ca scop eliberarea acizilor polifenolici legați în matricea vegetală de alte grupări funcționale și care nu sunt extractibili în solvenți organici.

Extracția cu fluide supercritice este una dintre cele mai versatile tehnici de extracție aplicată în cazul separării compuşilor polifenolici.

Dioxidul de carbon (0.5 ml/min) în condiții supercritice a fost folosit ca agent de extracție iar etanolul de concentrație 80% a reprezentat cosolventul utilizat pentru modificarea polarității. Temperaturile de lucru au fost 40, 60 respectiv 80°C iar presiunile de 150, 300 și 400 atm.

Înainte de etapele propriu zise de separare, identificare și caracterizare utilizând diverse tehnici analitice extracțele obținute au fost caracterizate din punct de vedere fizico-chimic. Această etapă a presupus calcularea randamentului de extracție, determinarea conținutului în substanța organică și minerală, determinarea pH-ului și stabilirea densității probelor.

În urma unei analize preliminare a extractelor vegetale s-a constatat că acestea prezintă un pH între 3,8 și 5 indiferent de solventul utilizat iar densitatea a fost cuprinsă între 0,7-0,9 g/cm³.

Randamentele cele mai ridicate s-au înregistrat pentru extractele etanolice din semințe de struguri (9%) și fructe de *Crataegus monogyna* (19%).

În ceea ce privește extracția cu fluide supercritice a celor din urmă materiale randamentele calculate au fost ușor mai ridicate decât în cazul extracției alcoolice (12 % și respectiv 22%).

Determinările cantitative a principalelor clase de compusi din probele vegetale cat și cuantificarea individuala a compusilor sunt prezentate în următoarele capitole.

Capitolul VI. Metode de caracterizare preliminară a extractelor vegetale utilizând tehnici spectrale

VI.1 Materiale și metode

În acest capitol sunt prezentate rezultatele aplicării unor tehnici spectrale de analiză a compușilor polifenolici.

Cu toate că aceste metode nu permit separarea, identificarea și cuantificarea individuală a compușilor, acestea sunt foarte utile pentru a realiza o estimare cantitativă a diferitelor grupe de compuși naturali cu structură aromatică ce se găsesc în extractele vegetale.

În acest studiu metodele colorimetrice aplicate au fost determinarea conținutului total de polifenoli (metoda Folin-Ciocalteu), determinarea conținutului de taninuri totale (metoda bazată pe reacția de precipitare selectivă a taninurilor în prezența caseinei), conținutul total de flavonoide și flavani (metode bazate pe reacția compușilor cu clorura de aluminiu în prezența diferiți reactivi) și metoda diferențială de pH pentru determinarea antocianilor.

Alte tehnici spectrale aplicate pentru caracterizarea extractelor vegetale cat și a polifenolilor standard au fost spectroscopia FTIR și RMN (^1H - NMR și ^{31}P -RMN).

VI.2 Rezultate și discuții

VI.2.1 Caracterizarea cantitativă a extractelor prin tehnici colorimetrice

Din analiza datelor experimentale s-a constatat că în extractele analizate s-au înregistrat concentrații diferite ale claselor de compuși polifenolici care variază în funcție de natura materialului vegetal și solventul de extracție utilizat.

În cazul extractelor polifenolice din coajă de molid conținutul total de polifenoli a variat de la aproximativ 5.17 mg GAE/g în extractul apos până la 23.66 mg/g în extractul metanolic în timp ce

concentrația în taninuri totale a avut valori cuprinse în intervalul 1.64-5.27 mg/g, taninurile fiind compuși caracteristici ai acestui material vegetal.

În **tabelul 16** sunt prezentate rezultatele obținute pentru determinarea principalelor clase de compuși din extractele de *Crataegus Monogyna*.

Tabel 16. Conținutul total de polifenoli, taninuri, flavonoide, flavani și antociani pentru extractul din *Crataegus monogyna*

Tip extract	Conținut total de polifenoli mg GAE/100g	Conținut total de taninuri mg GAE/100g	Flavonoide totale mgRE/100g	Conținut de flavani mgRE/100g	Conținut de antociani
Extract apos	10,32	3,45	0,29	0,13	0,37
Extract metanolic	66,41	41,06	2,06	0,19	0,81
Extract etanolic	57,22	40,78	2,02	0,16	0,76

Comparativ cu celelalte produse analizate, extractele din păducel (*Crataegus monogyna*) prezintă cele mai mari concentrații în compuși naturali cu structură aromatică. Conținutul total de polifenoli având valori cuprinse între 10.32 mg/g în cazul extractului apos și 66.41 mg/g pentru extractul metanolic.

În cazul extractelor din semințe de struguri s-au înregistrat de asemenea valori ridicate ale conținutul total de polifenoli (18.22 mg/g) și taninuri totale (5.70 mg/g). Pe de altă parte concentrații relativ ridicate se pot observa și în cazul flavonoidelor (1.86 mg/g), flavanilor (0.16 mg/g) și antocianilor (0.66 mg/g), cele din urmă fiind clase de compuși caracteristice produselor viticole și nu numai.

Pentru extractele din *Asclepias syriaca* conținutul total de polifenoli a variat între 28.7 și 11.27 mg/g. *Asclepias syriaca* este o plantă cu un conținut relativ scăzut în compuși naturali polifenolici comparativ cu celelalte specii de plante analizate, îndeosebi în ceea ce privește flavonoidele, flavanii și antocianii.

VI.2.2 Spectroscopia FTIR

Spectroscopia FTIR poate fi folosită ca o metodă adițională pentru investigarea grupărilor funcționale caracteristice extractelor vegetale.

Spectrele FTIR s-au înregistrat atât pentru compuși standard cât și pentru extractele obținute în formă liofilizata. Benzile caracteristici standardelor au fost asociate și comparate cu benzile caracteristice din extractele analizate. Spectrul FTIR și benzile de absorbție caracteristice catehinei sunt prezentate în **Fig. 18**.

În ceea ce privește extractele vegetale (**Fig.20**) analizate spectrele au confirmat prezența grupărilor glicozidice la lungimea de undă 3500 cm^{-1} în timp ce grupări complexe C-O au fost înregistrate între $1400\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$. Nucleul aromatic a fost identificat la 1515 cm^{-1} , legătura C-H str. a compușilor aromatici între $3000\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$, iar legătura C-H def. la 750 cm^{-1} (Gorinstein și colab., 2009). Benzile de absorbție caracteristice grupărilor C-O str. și O-H def. ale polifenolilor au fost observate între $1250\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$.

De asemenea, s-a identificat prezența zaharurilor cu benzi de absorbție caracteristice între $750\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$ și a substituenților carbonil la $1750, 1626, 1599\text{ cm}^{-1}$ (Soriano și colab., 2007).

Conform studiilor de literatură, benzile de absorbție la $3385\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$; 1612 și $1067\text{--}1072\text{ cm}^{-1}$ sunt atribuite grupărilor funcționale caracteristice poliflavonoidelor (Meenakshi și colab., 2009), în timp ce cele la 1517 și 723 cm^{-1} semnifică prezența nucleului aromatic și a grupării CH def. indicând existența predominantă a procianidinelor (Foo 1981).

De asemenea, vibrațiile caracteristice legăturii -C-O alcoolice și a grupării -OH aromatice s-au identificat în extractele vegetale la 1032 cm^{-1} respectiv 1147 cm^{-1} .

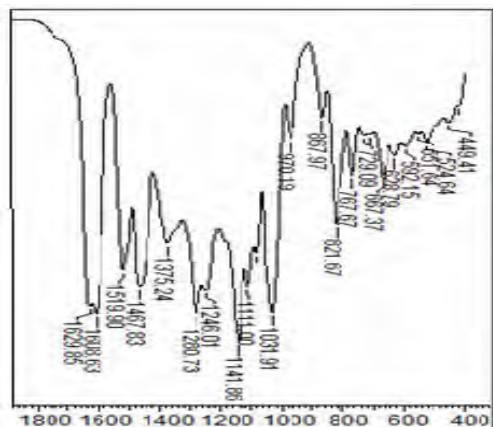


Figura 18. Spectrul FTIR înregistrat pentru catehina

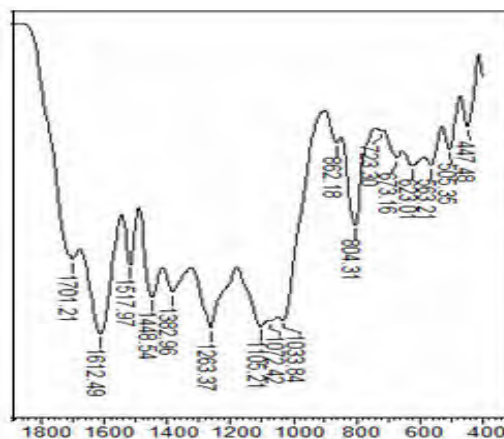


Figura 20. Spectrul FTIR înregistrat pentru extractul din coaja de molid

VI.2.3 Analiza compușilor polifenolici prin spectroscopie RMN

Analiza RMN a presupus aplicarea a două variante ale spectroscopiei RMN și anume ^1H -NMR și ^{31}P -RMN.

În **tabelul 18** sunt sistematizate semnalele corespunzătoare protonilor din probele standard de polifenoli și din extractele vegetale.

Tabel 18. Semnalele ^1H -RMN specifice polifenolilor standard și extractelor vegetale

Semnal, ppm	Grupări caracteristice
7,6-7,4 7,2-6,8 6,8-6,2 4,5-6,0 4,1-4,95	Protoni etilenici și aromatici din structura acizilor fenolici ArH (unități guaiacil) ArH (unități siringil și guaiacil condensat) Protoni ai grupării $-\text{C}=\text{CH}-$ Protoni H_β din unitatile $\beta\text{-O-4}$, protoni H_γ din diferite grupări functionale și protoni H_α din structuri moleculare condensate.
4,1-3,3	Protoni metoxil
2,6-2,2	Protoni ai grupării acetat aromatice
2,2-1,5	Protoni ai grupării acetat alifatic

În **Fig.23** este prezentat spectrul ^1H -RMN înregistrat pentru acidul vanilic în timp ce **Fig.27** reprezintă spectrul caracteristic extractului etanolic din coaja de molid.

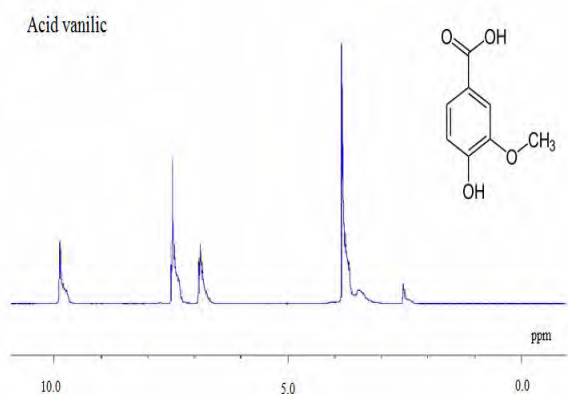


Fig.23 Spectrul ^1H -RMN al acidului vanilic

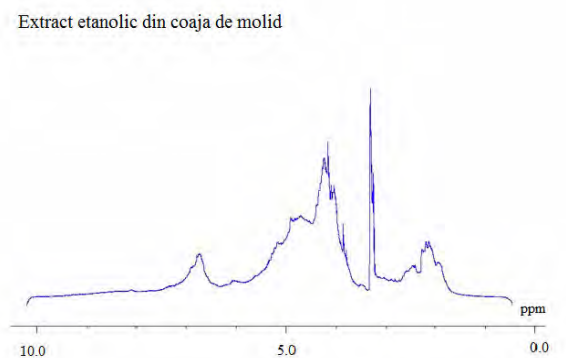


Fig.27 Spectrul ^1H -RMN al extractului etanolic obținut din coajă de molid

Spectrele acizilor polifenolici standard au evidențiat prezența grupării acetat caracteristica compușilor în zona 2,6-2,2 ppm în timp ce semnalele din regiunea 4,1-3,3 sunt atribuite protonilor din gruparea metoxi, grupare funcțională prezenta în structura acidului vanilic și ferulic.

În regiunea 7,4-7,6 ppm s-au identificat protonii aromatici și etilenici din structura acizilor fenolici iar semnalele din regiunea 6,2-7,2 sunt reprezentate de unitățile siringil și guaiacil. Protonii caracteristici grupărilor -OH fenolice pot fi de asemenea identificați în regiunea 6,5-8 ppm.

În cazul extractelor vegetale deși produsele prezintă un grad de complexitate ridicat spectrele confirmă prezența unor grupări caracteristice polifenolilor care pot fi corelate și cu spectrele produselor standard.

În regiunea 1,1-1,5 ppm sunt prezente semnale ale contaminanților alifatici iar în zona 1,5-2,2 semnalele sunt atribuite protonilor din grupările acetat alifactice. Pe de altă parte semnalele în zona 2,2-2,6 ppm sunt caracteristice grupării acetat legată de nucleul aromatic atribuită acizilor fenolici.

Picul prezent la 3,3 ppm este caracteristic protonilor din grupările metoxi. Semnalul în această regiune a fost intens și poate fi corelat cu prezența acizilor ferulic și vanilic, gruparea metoxi caracteristică acestor compuși fiind identificată și în probele martor.

În zona 4,1-4,95 se găsesc protoni H_β din unitățile β -O-4, protoni H_γ din diferite grupări funcționale și protoni H_α din structuri moleculare condensate. Protonii asociați grupărilor -OH fenolice au fost identificați în zonă 6,5-8 ppm.

Pentru **analiza ^{31}P -RMN** s-a realizat derivatizarea probelor cu 2-chloro-4,4',5,5'-tetramethyl-1,3,2- dioxaphospholan. Această derivatizare a compușilor a făcut posibilă identificarea grupărilor OH caracteristice diferitor clase de compuși și anume grupările -OH alifactice, cateholice, condensate sau acidice.

Spectrele ^{31}P -RMN ale compușilor standard (Fig. 29) evidențiază prezența unor benzi caracteristice compușilor polifenolici diferite în funcție de natura produsului analizat.

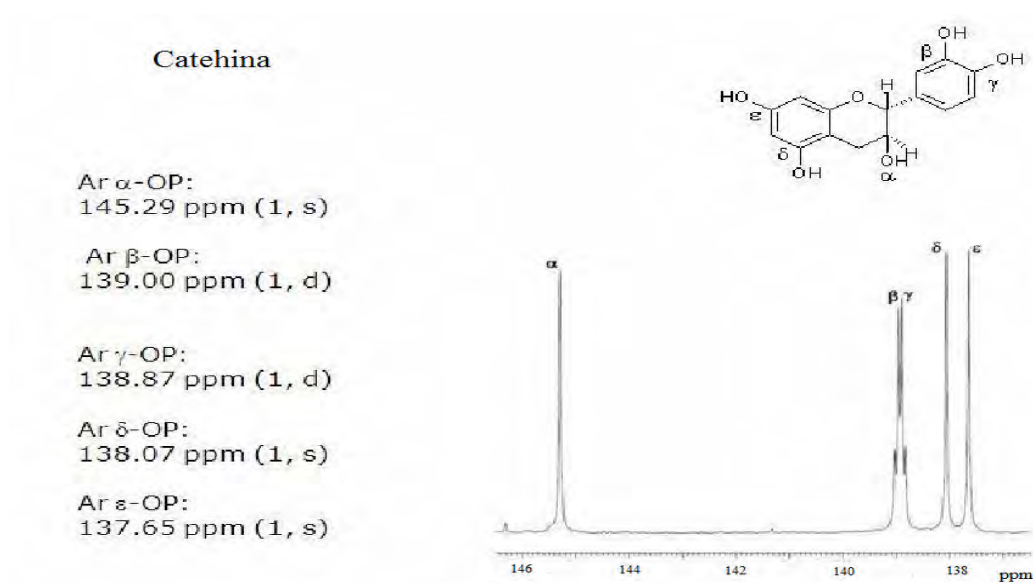


Fig.29 Spectrul ^{31}P -RMN al catehinei

În cazul extractelor vegetale se poate observa o intensitate ridicată a -OH-ului alifatic pentru toate probele analizate.

Cu toate acestea spectrele înregistrate și estimarea cantitativă au arătat că în cazul extractelor din fructele de *Crataegus monogyna* (**Fig. 38**) benzi puternice de absorbție s-au identificat în regiunea -OH-ului condensat, cateholic și o-fenolic.

Pentru extractul etanolic din semințe de struguri grupările caracteristice au fost cele corespunzătoare -OH-ului cateholic, o-fenolic cât și condensat în timp ce în cazul extractului apos au fost prezente aceleași grupări cateholice și o-fenolice însă nu s-au înregistrat grupările în zonă reprezentată de -OH-ul condensat.

Extracetele din *Asclepias syriaca* și coajă de molid au prezentat spectre similare cu precădere în cazul probelor alcoolice, manifestându-se o intensitate ridicată a grupărilor condensate, o-fenolice și acidice.

Pe baza spectrelor înregistrate putem asocia grupările caracteristice extractelor vegetale cu cele ale compușilor standard. Astfel, se poate constata că pentru toate extracetele analizate s-au identificat semnale în zona grupărilor acidice (134-135 ppm) care au fost identificate și în cazul acizilor hidroxibenzoici și hidroxicinamici.

Extracatele din fructe de *Crataegus monogyna* au prezentat semnale ce pot fi atribuite catehinei și epicatehinei în regiunile 137,6; 138,04; 138,8 și 145,9 ppm iar cele de la 139,33; 141,36 și 137,84 ppm sunt reprezentate de prezența acizilor galic, ferulic și a resveratrolului.

În ceea ce privește extracatele din semințe de struguri prezența catehinei și a epicatehinei este confirmată de semnalele caracteristice standardelor în zonele 138,87; 138,08; 137,7 și 145,9 ppm. Picul ce apare la 137,8 ppm pentru extractul alcoolic poate fi atribuit și în acest caz resveratrolului iar semnalele în regiunea -OH-ului fenolic o-disubstituit sunt caracteristice acizilor fenolici.

În cazul extractelor alcoolice din coajă de molid și *Asclepias syriaca* s-a constatat prezența semnalelor caracteristice acizilor fenolici la 140,9 ppm și 141-142 ppm. De asemenea o parte din picurile caracteristice catehinei au fost identificate la 138,1 ppm și 145,9 ppm.

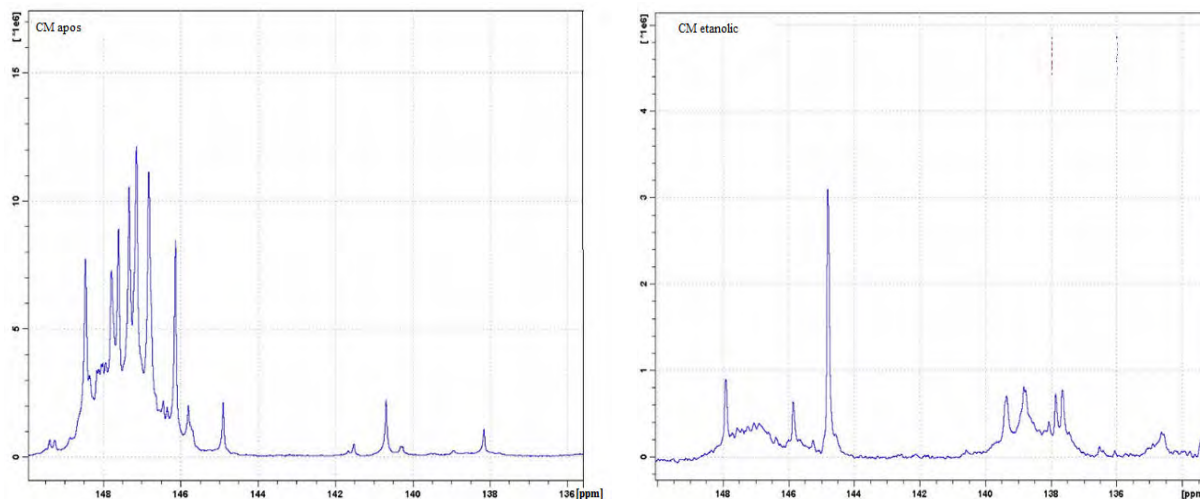


Figure 38. Spectrele ^{31}P -RMN ale extractelor (apos și etanolic) din fructele de *Crataegus monogyna*

În Tabelul 20 sunt prezentate determinările cantitative realizate în urma analizei RMN a extractelor vegetale. Exceptând valorile ridicate ale concentrației pentru grupările alifatice datele cantitative ale analizei RMN evidențiază valori ridicate ale concentrației și în cazul grupărilor caracteristice compușilor polifenolici.

Tabel 20. Determinările cantitative pe clase de compuși în urma analizei ^{31}P -NMR

Grupari	Semnal ppm	mmoli/g							
		CMw	CMEt	SBw	SBEt	GSw	GSEt	ASw	ASEt
OH alifatic	150-145,5	20,26	16,31	4,36	6,21	4,91	8,74	4,43	11,65
OH o-disubstituit (condensat)	144,0-140,24	0,65	0,52	0,16	1,94	0	0,5	0,09	1,47
OH cateholic	140,24-138,8	0,13	0,10	0,41	0,65	0,22	0,8	0,061	2,78
OH o-substituit (o-fenol)	138,8-137,9	0,27	0,22	0,22	0,34	0,21	0,54	0,05	0,10
OH o-nesubstituit	137,9-137,4	0,049	0,039	0,10	0,13	0,07	0,29	0	0
COOH	135,5-134,0	0,17	0,13	0,45	0,69	0,07	0,29	0,67	0,40

CMw, CM Et- extracte apoase respective etanolice din fructe de *Crataegus monogyna*

SB w, SB Et- extracte apoase respective etanolice din coaja de molid

GSw, GS Et- extracte apoase respective etanolice din seminte de struguri

ASw, AS Et- extracte apoase respective etanolice din *Asclepias syriaca*

Concluzii

- Extractele obținute au prezentat un conținut ridicat de compuși polifenolici totali, variind în funcție de materia primă și solventul de extracție între 5,06mg/g pentru extractul din semințe de struguri și 66 mg/ g în cazul extractului de păducel.
- După cum era de așteptat, s-a constatat că extractele alcoolice conțin o cantitate considerabil mai mare de compuși polifenolici comparativ cu extractele apoase.
- Analiza FTIR, cu toate că nu oferă informații asupra compușilor individuali prezenți în extracte și nici nu poate fi folosită pentru identificarea sau cuantificarea compușilor, poate fi o tehnică utilă pentru o caracterizare calitativă a extractelor. În comparație cu spectrele compușilor standard, pot fi identificate benzi caracteristice polifenolilor.
- Analiza polifenolilor prin spectroscopia ^1H -RMN și ^{31}P - RMN a oferit informații valoroase referitoare la compoziția probelor vegetale corelând spectrele compușilor standard cu cele ale extractelor obținute. Mai mult, varianta ^{31}P -RMN a permis și evaluarea cantitativă a principalelor clase de metaboliți secundari din materialele analizate.

Capitolul VII. Metode de separare și identificare a compușilor polifenolici naturali în extractele vegetale

VII.1 Materiale și metode

Extractele brute obținute din cele patru materiale vegetale selectate au fost concentrate și supuse unei etape de fracționare prin extracția lichid-lichid cu acetat de etil în vederea purificării și izolării polifenolilor în faza organică înaintea analizei HPLC.

Separarea, identificarea și cuantificarea individuală a polifenolilor din probele vegetale s-a realizat prin cromatografie lichidă de înaltă performanță.

Această etapă a presupus identificarea acizilor polifenolici din extractele alcoolice, apoase, alcaline și a probelor obținute în urma extracției cu fluide supercritice cât și identificarea flavonoidelor din extractele alcoolice.

În urma analizei HPLC extractele alcoolice au fost supuse analizei GC-MS care a avut ca scop confirmarea prezentei polifenolilor identificați anterior beneficiind de precizia și versatilitatea spectrometriei de masă.

VII.2 Rezultate și discuții

VII.2.2 Caracterizarea și identificarea acizilor polifenolici prin analiza HPLC

Câteva din cromatogramele înregistrate pentru extractele vegetale și compușii identificați alături de profilul polifenolilor standard sunt prezentate în Figurile 47, 49 și 53.

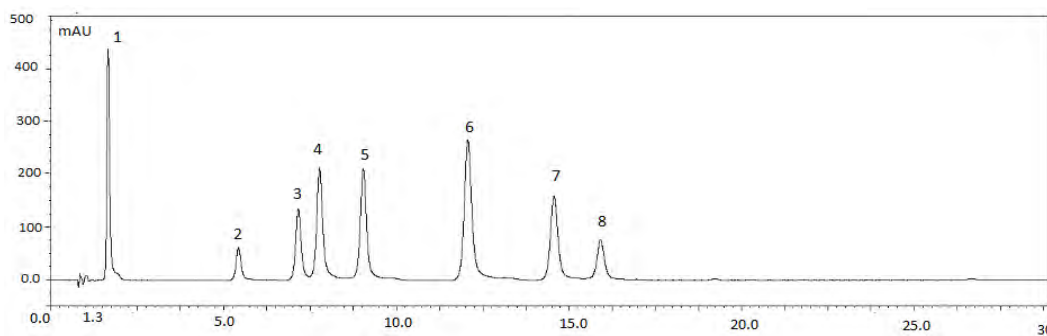


Fig.47 Profilul cromatografic al polifenolilor standard înregistrat la 280 nm 1- acid galic; 2- catehina; 3- acid vanilic; 4- acid cafeic; 5- acid siringic; 6- acid p-cumaric; 7- acid ferulic; 8- acid sinapic

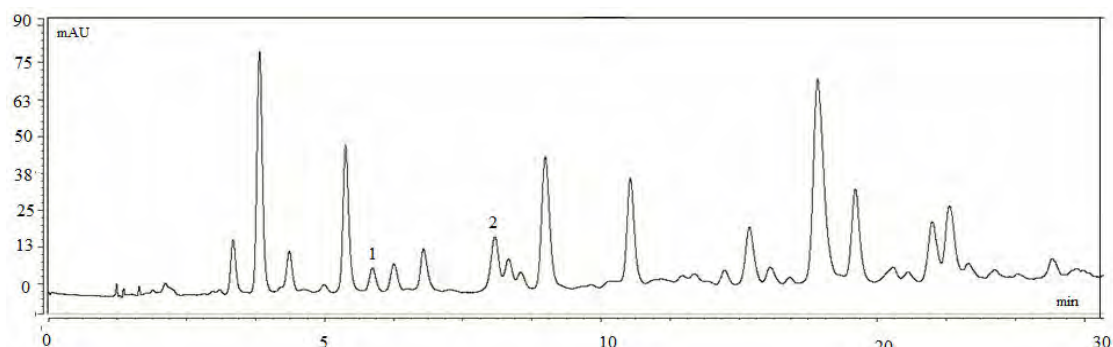


Fig. 49 Profilul cromatografic al extractului apos din coajă de molid: 1- catehina, 2- acid vanilic

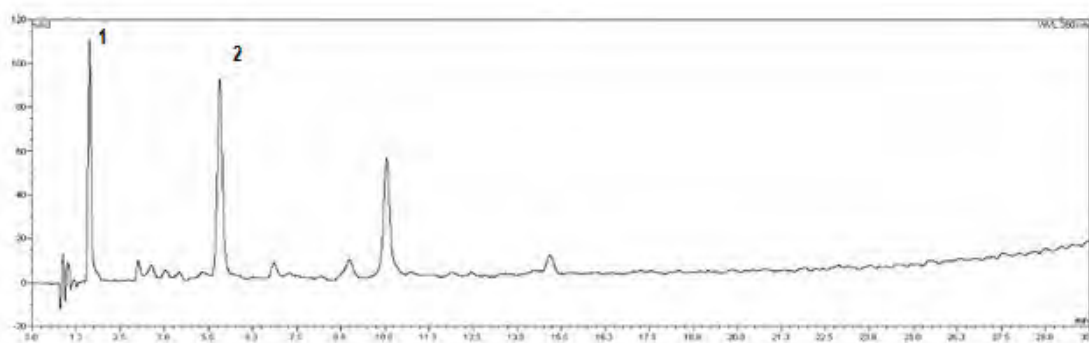


Fig. 53 Profilul cromatografic al extractului etanolic din semințe de struguri: 1- acid galic; 2- catehina

În **Tabelul 23** sunt prezentate concentrațiile calculate în urma analizei HPLC pentru fiecare compus identificat în extractele obținute. După cum era de așteptat extracția cu apă a condus la cele mai scăzute randamente atât din punct de vedere al compușilor prezenți cât și a concentrațiilor obținute.

În cazul de față s-a constatat prezența unor compuși polifenolici (acid galic, catehina, acid vanilic) în concentrații relativ ridicate în toate extractele apoase, chiar dacă rezultatele au fost inferioare celor oferite de extracția alcoolică.

În ceea ce privește extractele alcoolice, o diferență semnificativă între etanol și metanol nu a fost observată. În unele situații concentrațiile calculate pentru o serie de compuși au fost mai mari în cazul extractelor metanolice, dar acest fapt nu justifică utilizarea preferențială a metanolului. De asemenea profilul cromatografic obținut a fost același, identificându-se același număr de compuși în ambele tipuri de extracte chiar dacă în termeni de concentrație, rezultatele au fost diferite.

Extracția alcalină cu soluție de NaOH 2M, s-a realizat cu scopul eliberării compușilor bioactivi care se găsesc legați în matrice vegetală de alte grupări funcționale. Unii compuși

polifenolici nu sunt extractibili în solvenți organici sau recuperarea lor nu se produce în totalitate. În astfel de situații este necesară o etapă de hidroliză bazică sau acida, sau chiar ambele. În acest caz, aplicarea acestei tehnici de extracție a avut efecte pozitive realizându-se eliberarea unor compuși polifenolici ce nu au fost extractibili în alcool sau care nu au fost separați în totalitate.

Astfel, în urma analizei cromatografice a acestor extracte s-a constatat prezența acidului siringic în toate extractele analizate, prezența acidului ferulic în cazul extractului din coajă de molid și a acidului galic și a catehinei în extractele din semințe de struguri.

VII.2.3 Caracterizarea și identificarea flavonoidelor prin analiza HPLC

Pentru identificarea flavonoidelor din extractele vegetale s-au utilizat ca standarde quercitin, rutin, kaempferol și apigenin.

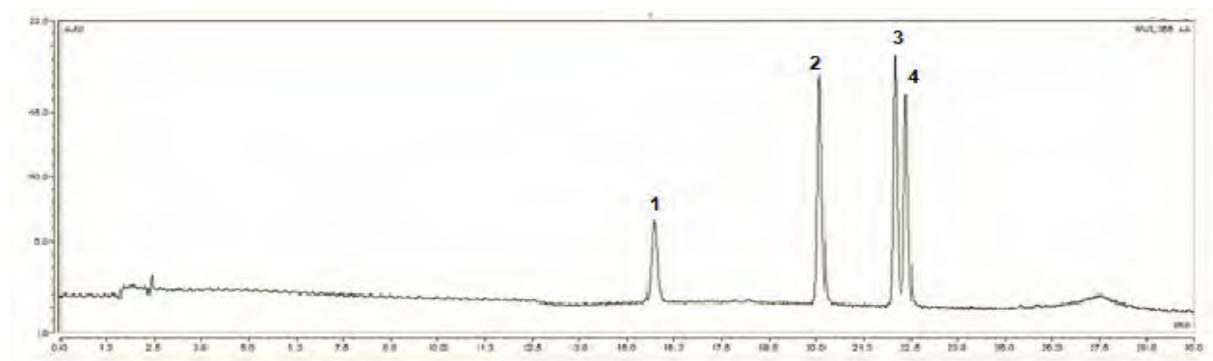


Fig. 61 Profilul cromatografic al flavonoidelor standard; 1- rutin, 2- quercitin, 3- kaempferol, 4- apigenin

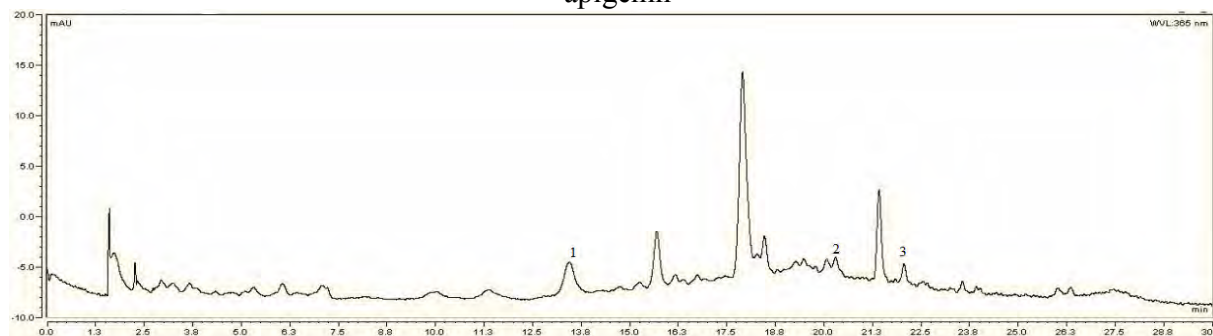


Fig.63 Profilul cromatografic al flavonoidelor din extractul etanolic de *Asclepias syriaca*: 1- rutin; 2-quercitin; 3- kaempferol

Tabel 23. Concentrațiile calculate pe baza datelor analizei HPLC pentru compușii polifenolici identificați în extractele vegetale

Material vegetal	Tip extract	Acid galic	Catehina	Acid vanilic	Acid cafeic	Acid siringic	Acid p-cumaric	Acid ferulic	Acid sinapic
Seminte de struguri	Extract apos	6,12±0,2	44,36±0,1	-	-	-	-	-	-
	Extract metanolic	14,87±0,4	88,42±2,3	-	-	-	-	-	-
	Extract etanolic	12,54±0,8	63,60±1,7	-	-	-	-	-	-
	Extract NaOH în urma extracției cu etanol	38,20±0,5	21,05±0,9	-	-	63,30±1,5	-	-	-
	Extract NaOH în urma extracției cu metanol	41,52±0,9	19,81±2,1	-	-	42,19±1,2	-	-	-
<i>Crataegus monogyna</i>	Extract apos		23,42±0,9	-	-	2,14±0,09	-	-	-
	Extract metanolic	9,19±0,3	56,64±1,2	-	-	2,91±1,1	2,39±0,6	0,58±1,1	-
	Extract etanolic	10,98±0,7	89,52±2,1	-	-	2,95±1,1	3,59±0,4	2,25±1,4	-
	Extract NaOH în urma extracției cu etanol	-	-	-	-	19,23±1,3	-	-	-
	Extract NaOH în urma extracției cu metanol	-	-	-	-	22,51±1,6	-	-	-
Coaja de molid	Extract apos	-	31±1,9	39,4±0,2	-		-		-
	Extract metanolic	7,1±0,7	70,8±2,3	62,4±0,5	-		-		-
	Extract etanolic	10,2±0,3	71,9±2,7	71,9±0,8	-		-		-
	Extract NaOH în urma extracției cu etanol	-	-	-	-	42,3±3,2	-	45,08±1,6	-
	Extract NaOH în urma extracției cu metanol	-	-	3,93±0,1	-	42,87±2,9	-	42,91±1,3	-
<i>Asclepias syriaca</i>	Extract apos	-	-	0,87±0,1	-	0,98±0,09	0,11±0,1	-	-
	Extract metanolic	0,66±0,2	-	3,72±0,9	-	2,85±1,1	0,41±0,12	-	-
	Extract etanolic	0,65±0,4	-	2,94±1,1	-	1,94±0,9	0,40±0,09	-	-
	Extract NaOH în urma extracției cu etanol	-	-	-	-	25,44±1,2	0,14±0,1	-	-
	Extract NaOH în urma extracției cu metanol	-	-	-	-	17,17±1,4		-	-

Figurile 61 și 63 reprezintă profilul cromatografic al flavonoidelor standard și al extractului alcoolic din *Asclepias syriaca*. Trebuie menționat faptul că analiza flavonoidelor s-a efectuat numai în cazul extractelor etanolice deoarece acest tip de compuși sunt parțial solubili sau chiar insolubili în apă. Din aceste considerente prezența lor în extractele apoase nu este posibilă.

În **tabelul 25** sunt prezentate concentrațiile pentru fiecare compus exprimate ca și în cazul acizilor fenolici în mg/100g de material vegetal.

S-a constatat că extractul etanolic din *Asclepias syriaca* a prezentat un număr mai mare de flavonoide comparativ cu celalalte probe analizate. Deși această plantă nu este recunoscută pentru conținutul în flavonoide și nu a fost studiată până acum în această direcție în proba analizată s-au identificat rutinul, quercitina și kaempferolul. De asemenea se poate observa din cromatogramă prezența a încă trei compuși cu intensitate relativ ridicată dar care nu au fost identificați conform etaloanelor.

În extractul din fructe de *Crataegus monogyna* s-au identificat rutinul și quercitina primul compus având o concentrație ridicată de aproximativ 30 mg/100g.

În extractele din semințe de struguri și coajă de molid s-a identificat quercitina însă concentrațiile calculate au fost relativ scăzute. Extractele din semințe de struguri sunt cunoscute ca având un conținut bogat de antociani și acizi fenolici în special dar și flavonoide. În cazul de față s-a identificat un singur compus din cei patru investigați.

Tabel 25. Concentratia flavonoidelor în extractele alcoolice analizate

Extract	Concentrație mg/100g			
	Rutin	Quercitin	Kaempferol	Apigenin
Extract etanolic din semințe de struguri	-	2,38	-	-
Extract etanolic din coajă de molid	-	-	-	-
Extract etanolic din <i>Asclepias syriaca</i>	2,25	0,14	0,17	-
Extract etanolic din <i>Crataegus monogyna</i>	30,32	0,64	-	-

VII.2.4 Caracterizarea acizilor fenolici din probele vegetale obținute prin extracția cu fluide supercritice

Pe baza cromatogramelor înregistrate s-a constatat că profilul polifenolilor a fost similar pentru ambele materiale vegetale cu cel obținut în cazul extracției alcoolice clasice (Soxhlet).

În funcție de condițiile de lucru aplicate valorile concentrațiilor au variat semnificativ crescând proporțional cu temperatura și presiunea.

Atunci când temperatura de extracție a fost de 40°C concentrațiile cele mai ridicate s-au înregistrat la presiunea de 400 atm. La 60°C concentrațiile au fost superioare temperaturii de 40°C iar în ceea ce privește presiunea ca și în cazul anterior valorile cele mai mari s-au obținut la presiunea de 400 atm (**Tabel 27**).

Tabel 27. Concentrațiile acizilor fenolici din extractele vegetale pentru diferite condiții de operare

Temperatură °C	Presiune atm	Extract din semințe de struguri Concentrație compuși mg/100g		Extract din <i>Crataegus monogyna</i> Concentrație compuși mg/100g			
		Acid galic	Catehina	Acid galic	Catehina	Acid siringic	Acid ferulic
40	150	6,81	58,73	6,34	17,00	2,48	2,32
	300	7,13	61,60	7,12	18,52	3,46	4,76
	400	7,72	65,19	7,89	25,51	3,72	6,02
60	150	6,92	61,14	6,43	23,91	3,49	4,46
	300	7,91	63,24	7,26	24,39	3,74	5,02
	400	8,92	66,78	8,23	26,14	3,81	8,12

VII.2.5 Identificarea și caracterizarea compușilor polifenolici prin tehnica gaz cromatografică cuplată cu spectrometria de masă

Analiza GC-MS efectuată ulterior analizei HPLC, a fost o determinare calitativă ce a avut ca scop confirmarea prezenței compușilor identificați anterior. De obicei, în cazul analizei HPLC pot interveni erori de interpretare a spectrelor, în special când probele analizate sunt de origine vegetală. Pentru a înlătura aceste dezavantaje și pentru a avea o certitudine a prezenței compușilor identificați prin HPLC s-a optat pentru analiza GC cuplată cu spectrometria de masă care are un rol foarte important în elucidarea structurii moleculare.

În **figurile 70 și 73** sunt prezentate cromatograma GC înregistrată pentru polifenolii standard respectiv profilul compușilor din extractul etanolic de *Crataegus monogyna*.

Analiza GC-MS a confirmat prezența unor compuși ce au fost identificați și cuantificați anterior prin cromatografie lichidă de înaltă performanță. În extractele etanolice obținute din păducel și semințe de struguri s-au identificat acidul galic și catehina. Intensitatea ridicată a picurilor obținute confirmă prezența acestor compuși în concentrații ridicate. De asemenea s-a constatat prezența unui alt compus majoritar- epicatehina, cu intensitate ridicată care s-a înregistrat și în cazul analizei HPLC dar care nu a fost identificat. În ceea ce privește extractul obținut din coajă de molid compușii identificați au fost: acid vanilic, acid gentisic, acid galic, acid p- cumaric acid cafeic și catehina

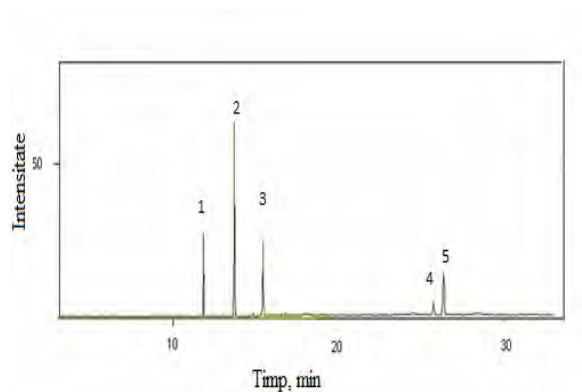


Fig. 70 Cromatograma GC-MS pentru acizii polifenolici standard 1- acid vanilic, 2- acid galic, 3- acid ferulic, 4- catehina, 5- epicatehina

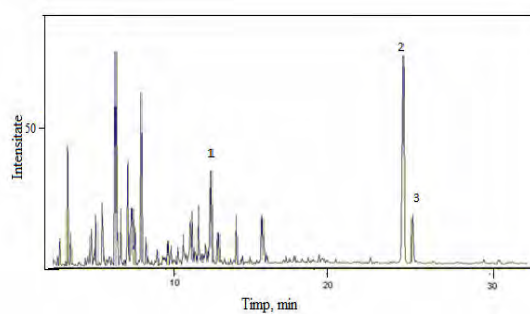


Fig. 73 Cromatograma GC-MS a extractului etanolic din *Crataegus monogyna*: 1- acid galic acid; 2-catehina; 3- epicatehina

În cele din urmă, putem afirma că analiză GC-MS a fost utilă confirmându-se prezența compușilor majoritari care au fost identificați în prealabil. Pe de altă parte în cazul extractului din coajă de molid, s-au identificat și alți compuși și anume acidul gentisic, acidul cafeic și acidul p- cumaric însă după intensitatea picurilor concentrațiile nu sunt foarte ridicate.

Concluzii

- Analiza HPLC utilizând standarde externe a permis identificarea și cuantificarea compușilor polifenolici din extractele vegetale pe baza dreptelor de calibrare realizate.
- În urma acestor studii s-a demonstrat prezența compușilor polifenolici în toate tipurile de extracte analizate. Compușii majoritari identificați în extractele alcoolice și apoase analizate au fost acidul galic, catehina și acidul vanilic.
- Hidroliza bazică aplicată cu scopul eliberării acizilor fenolici legați în matricea vegetală de alte grupări funcționale a avut un efect benefic, în urma acesteia identificându-se o serie de compuși polifenolici în toate extractele alcaline realizate pe materialele vegetale extrase în prealabil cu etanol.
- În extractele alcoolice s-a identificat de asemenea și prezența unor flavonoide. Extractul alcoolic din *Asclepias syriaca* a avut cel mai complex profil al flavonoidelor identificându-se prezența a trei compuși (rutin, quercitin și kaempferol) din cei patru folosiți ca standard iar în extractul din fructe de *Crataegus monogyna* s-a identificat rutinul în concentrație ridicată (20mg/100g).
- Extracția cu fluide supercritice s-a realizat în condiții diferite de temperatură și presiune constatând că acești parametri influențează semnificativ procesul extractiv, concentrațiile compușilor crescând proporțional cu presiunea și temperatura. Astfel, concentrațiile cele ridicate în compuși polifenolici s-au obținut la temperatura de 60°C și presiunea de 400 atm.
- Analiza GC-MS a confirmat prezența compușilor identificați anterior prin cromatografie lichidă de înaltă performanță. În plus s-a constatat și prezența epicatehinei în extractele din semințe de struguri și păducel cât și a altor acizi fenolici în extractele din coajă de molid.

Capitolul VIII. Separarea compușilor polifenolici prin schimb ionic

VIII.1 Materiale și metode de sinteză și analiză

Separarea compușilor polifenolici prin schimb ionic a presupus testarea a diferite rășini comerciale sau sintetizate în laborator cu scopul izolării polifenolilor din probe vegetale.

În studiul de față s-a urmărit capacitatea de adsorbție a schimbătorilor de ioni utilizând soluții standard de polifenoli.

În ceea ce privește utilizarea schimbătorilor comerciali s-a evaluat capacitatea de adsorbție a 7 rășini utilizând o soluție de 9 polifenoli standard. Studiul cinetic desfășurat în condiții diferite de pH s-a realizat utilizând aceiași compuși și 2 dintre cele mai eficiente rășini.

În cea de a doua etapă a acestui studiu s-a realizat sinteza a 4 schimbători de ioni cu grupări funcționale aminice, testați de asemenea pentru separarea compușilor polifenolici.

Caracteristicile schimbătorilor utilizați și metodele de sinteză sunt descrise detaliat în contextul tezei de doctorat.

Evaluarea capacității de adsorbție în ceea ce privește probele sintetizate în laborator a presupus un studiu mai amplu având în vedere că aceste probe au fost special create și prima oară testate în această direcție.

Astfel, capacitatea de adsorbție s-a testat utilizând soluții de diferite concentrații conținând 4 compuși standard din clase diferite (acid galic și vanilic reprezentând acizii hidroxibenzoici, acid ferulic aparținând acizilor hidroxicinamici și catehina din categoria taninurilor). În urma stabilirii randamentelor de reținere s-au realizat studii cinetice și termodinamice pentru fiecare compus individual utilizând schimbătorul de ioni cel mai eficient.

În final, pentru toate probele sintetizate s-a realizat un studiu cinetic similar cu cel efectuat în cazul schimbătorilor de ioni comerciali.

VIII.2 Rezultate și discuții

VIII.2.1 Adsorbția compușilor polifenolici pe schimbători de ioni comerciali

Randamentul adsorbției celor 9 polifenoli pentru rășinile comerciale după un timp de contact de 5 ore este prezentat în **Tabelul 30**.

Rășinile Amberlite A21 și Amberlite IRA-93 ambele schimbători de anioni slab bazici au fost singurele probe care au manifestat o capacitate de adsorbție foarte ridicată reținerea

compușilor fiind completă la finalul reacției.

În cazul probelor Amberlite IRA-904 și Dowex 1x2Cl randamentul de reținere al polifenolilor a fost de asemenea ridicat ajungând până la 100% pentru unii compuși.

Pentru schimbători de ioni Dowex 50w8-100, Amberlite XAD 2 și Amberlite XAD 1180 capacitatea de adsorbție variază semnificativ în funcție de natura compușilor polifenolici între 38% și 100%.

Se poate observa că în cazul acestor probe s-au înregistrat randamente ridicate indicând adsorbția completă a acizilor hidroxicinamici. Dacă reținerea acizilor hidroxibenzoici a fost relativ scăzută afinitate deosebită manifestată pentru gruparea cinamică a condus la randamente de 90-100% pentru acizii p-cumaric, ferulic sinapic și anisic.

Tabel 30. Randamentul adsorbției polifenolilor standard în funcție de schimbătorul de ioni utilizat

Compus standard	Amberlite A21	Amb. IRA-904	Amb. IRA-93	Dowex 1x2 Cl	Dowex 50wx8-100	Amb. XAD 2	XAD 1180
Acid galic	100	96	100	97	46	48	61
Catehina	100	100	100	100	58	68	91
Acid p-hidroxi benzoic	100	93	100	96	38	50	72
Acid vanilic	100	98	100	99	50	66	88
Acid siringic	100	85	100	96	59	84	95
Acid p-cumaric	100	100	100	100	74	88	97
Acid ferulic	100	98	100	100	78	96	100
Acid sinapic	100	96	100	100	83	98	100
Acid anisic	100	100	100	100	72	100	100

Ținând cont de rezultatele obținute privind randamentele de adsorbție a schimbătorilor utilizați s-au selectat în vederea efectuării studiului cinetic de adsorbție, un schimbător de anioni puternic bazic (Dowex 1x2 Cl) și slab bazic (Amberlite 21).

În continuare sunt relatate date referitoare la cinetica de adsorbție a celor 9 polifenoli cât și comportamentul compușilor în condiții variate de pH.

În **figurile 76 și 77** este prezentată evoluția adsorbției în timp pentru cei doi schimbători selectați studiul desfășurându-se la pH neajustat.

Pentru proba Amberlite 21 echilibrul de sorbție a fost atins după 60 de minute adsorbția compușilor fiind completă. În cazul schimbătorului Dowex 1x2 Cl reținerea completă s-a obținut pentru acizii hidroxicinamici și catehina în timp ce adsorbția acizilor hidroxi benzoici a fost mai scăzută, concentrația în soluție fiind de aproximativ 15 mg/L după 60 de minute și menținându-se constantă până la finalul reacției.

Atunci când procesul s-a desfășurat la pH acid reținerea completă a polifenolilor s-a atins după 60 min în cazul rășinii Amberlite 21, procesul fiind similar cu cel desfășurat la pH-ul natural al polifenolilor.

În ceea ce privește adsorbția utilizând schimbătorul Dowex 1x2 Cl pH-ul acid a avut o influență negativă. Afinitatea față de acizii hidroxicinamici s-a manifestat și în acest caz însă adsorbția completă nu s-a atins pentru toți compușii până la finalul reacției. Pe de altă parte concentrațiile acizilor hidroxi benzoici în soluție au variat între 15 și 22 mg/L după 180 minute de contact.

Adsorbția polifenolilor în mediu bazic a fost relativ scăzută comparativ cu adsorbția la pH neajustat și chiar cu cea la pH acid. În această situație numai doi dintre compuși (catehina și acid vanilic) au fost adsorbiți complet după aproximativ 60 de minute în timp ce reținerea celorlalți polifenoli nu a fost completă nici după 180 de minute.

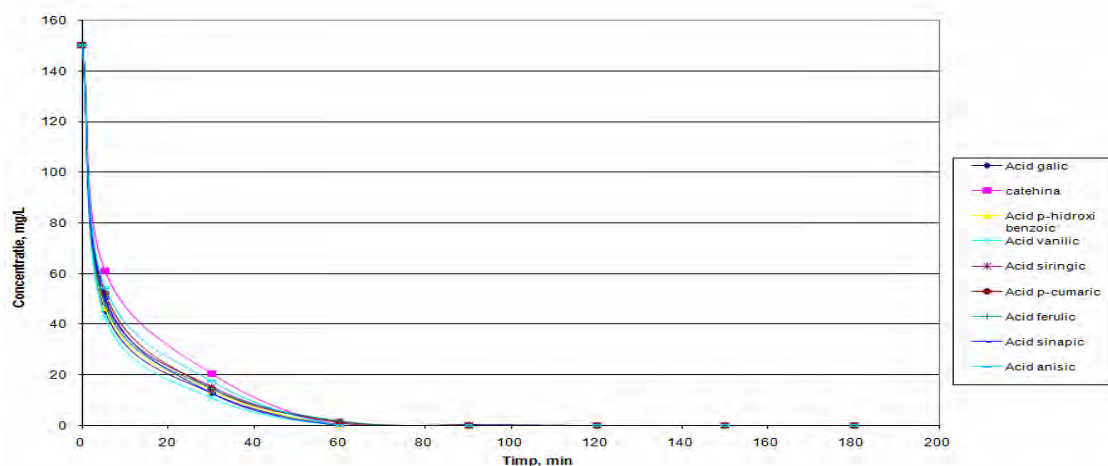


Fig.76 Cinetica adsorbției acizilor fenolici la pH neajustat în cazul schimbătorului comercial A21

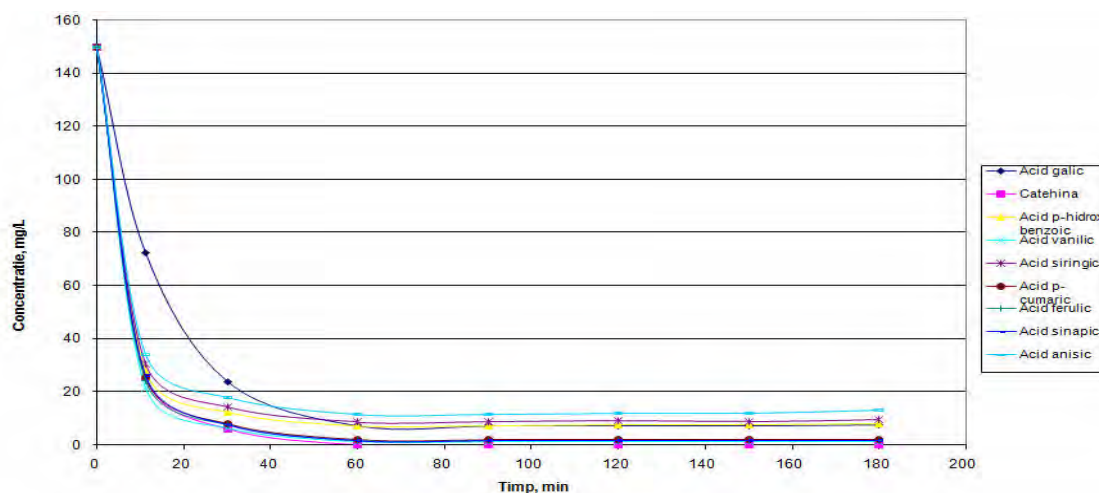


Fig.77 Cinetica adsorbției acizilor fenolici la pH neajustat în cazul schimbătorului comercial Dowex 1x2

VIII.2.2 Adsorbția compușilor polifenolici pe schimbători de ioni sintetizați

Testarea capacității de reținere a probelor sintetizate P1, P115, PBa-2 și PHH utilizând soluții polifenolice de concentrații diferite a evidențiat faptul că schimbătorul de ioni P115 a fost cel mai eficient, randamentele înregistrate pentru concentrația de 200 ppm fiind de 91% pentru acidul galic, 61% pentru catehina, 65% în cazul acidului vanilic.

În continuare este prezentat unul din studiile cinetice și termodinamice utilizând schimbătorul de ioni cu capacitatea de adsorbție cea mai mare și compusul standard cu randamentul de reținere cel mai ridicat.

V.2.2.3 Studiul cinetic și termodinamic de adsorbție a acidului galic pe schimbătorul de ioni P115

În **Figura 85** este prezentat efectul timpului de contact asupra reținerii acidului galic de către schimbătorul polimeric P 115, pentru două concentrații 104 și 160 mg/L.

În urmă studiului cinetic se poate concluziona că echilibrul de sorbție se stabilește suficient de rapid, pentru ca metoda de concentrare să fie convenabilă pentru sistemul de sorbție în condiții dinamice. Cantitatea maximă adsorbită, în 8 ore de contact, în cazul concentrație de 320 mg/L a fost de 73.8 mg/g. Concentrația obținută are o valoare foarte apropiată de cea obținută în cazul timpului de contact de 24 ore (74.95 mg/g) pentru aceeași concentrație. Acest

lucru sugerează faptul că afinitatea acidului galic față de schimbătorul polimeric P 115 este foarte mare, iar echilibrul de sorbție se stabilește în aproximativ 240 min.

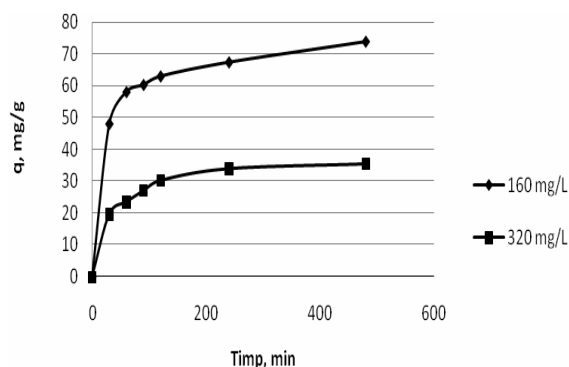


Figura 85 Cinetica adsorbției în cazul acidului galic (condiții de adsorbție: concentrația inițială a acidului galic 160 mg/L ; 320 mg/L , (cantitatea de schimbator utilizata, 0.1 g ; volumul soluției, 25 mL ; temperatura $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$)

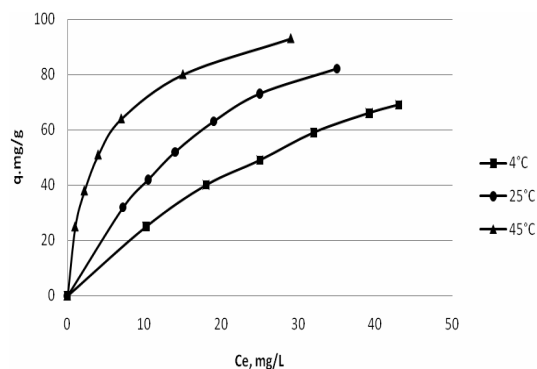


Fig. 86 Izotermele de adsorbție în cazul acidului galic (condiții – concentrația acidului galic $104\text{--}400 \text{ mg/L}$; cantitatea de schimbator, 0.1 g ; volumul soluției, 25 mL ; temperatura, $4, 25$ și 50°C ; timp de adsorbție, 6 h).

În **Figura 86** sunt redată izotermele de sorbție ale acidului galic, la temperaturi diferite (4°C , 25°C și respectiv 45°C). Se poate observa că în cazul temperaturii de 45°C , cantitatea maximă de acid galic adsorbită (95.3 mg/g) în 6 ore a fost mai mare decât în cazul adsorbției la temperatură camerei pentru un timp de contact de 24 ore (94.7 mg/g).

Tabel 38 Prelucrarea izotermelor de sorbție ale acidului galic conform modelului Langmuir

T, K	q_∞	K_L
	mmol/g	L/mol
277	0.685	5195.2
293	0.759	8391.86
318	0.912	12183.23

Tabel 39 Mărimile termodinamice caracteristice procesului de sorbție al acidului galic

T, K	Parametri termodinamici		
	ΔG	ΔH	ΔS
	(KJ/mol)	(KJ/mol)	(J/mol·K)
277	-19.68	14.81	124.5
293	-21.98		125
318	-24.82		125

Caracteristicile termodinamice ale procesului de sorbție și prelucrarea izotermelor conform modelului Langmuir sunt prezentate în **tabelele 38 și 39**.

Valorile ridicate ale constantelor de sorbție, K_L , sugerează o puternică interacțiune între grupele funcționale ale acidului galic și cele ale sorbentului, care se intensifică odată cu creșterea temperaturii.

Valorile negative ale energiei libere (ΔG) obținute pentru toate temperaturile de sorbție indică o afinitate moderată a sorbentului pentru acidul galic (proces spontan de sorbție).

Valoarea pozitivă a entalpiei aparente de sorbție, ΔH , indică faptul că procesul de sorbție pentru acidul galic este endoterm facilitat de creșterea temperaturii iar interacțiunea dintre sorbat și sorbent are loc prin legături puternice.

Valoarea pozitivă a entropiei ΔS , reflectă, creșterea dezordinii sistemului determinată de pierderea apei structurate din jurul ionilor de schimb.

VIII.2.2.6 Separarea compușilor polifenolici din amestec a presupus utilizarea unor soluții ce au conținut cei patru polifenoli fiecare în concentrație de 150 mg/L. Cantitatea de schimbător utilizată în acest caz a fost de 1 g iar volumul soluției de 100 ml. Studiul cinetic s-a desfășurat pentru toți schimbătorii sintetizați.

Ca și în cazul schimbătorilor comerciali, pentru a urmări evoluția adsorbției pornind de la concentrația inițială graficele prezintă concentrația la echilibru în funcție de timpul de contact.

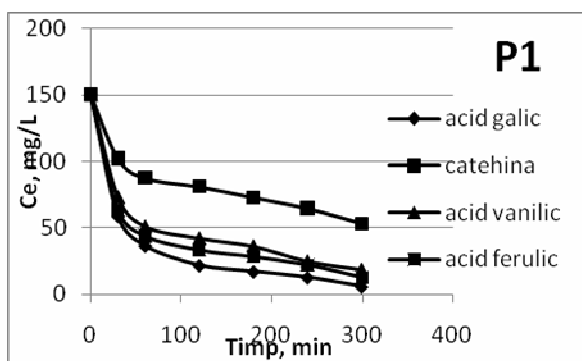


Fig.94 Cinetica adsorbției celor 4 acizi fenolici în cazul schimbătorului P1 (condiții de adsorbție: concentrație inițială 150 mg/L; cantitate schimbător 1g; volumul soluției 100 ml, temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$)

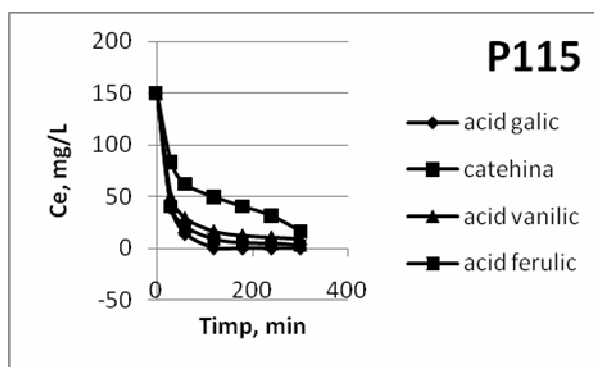


Fig.95 Cinetica adsorbției celor 4 acizi fenolici în cazul schimbătorului P115 (condiții de adsorbție: concentrație inițială 150 mg/L; cantitate schimbător 1g; volumul soluției 100 ml, temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$)

Conform figurilor prezentate putem afirma că în ceea ce privește schimbătorul P1 (**Fig.94**) capacitatea de adsorbție a acestuia a fost relativ ridicată pentru acidul galic, acidul vanilic și acidul ferulic concentrațiile acestora în urma adsorbției situându-se sub 20 mg/L. Randamentul de

adsorbție al catehinei a fost mai scăzut iar procesul de adsorbție a decurs mai lent, concentrațiile după 300 min de contact fiind de aproximativ 58 mg/L.

Atunci când schimbătorul P115 a fost utilizat ca adsorbant (**Fig. 95**) randamentele de reținere ale polifenolilor au fost mult mai ridicate comparativ cu celelalte probe. Adsorbția completă după 120 de minute s-a atins pentru acidul galic și după 180 de minute pentru ferulic în timp ce concentrația finală în soluție a acidului vanilic a fost de 10 mg/L iar a catehinei de aproximativ 19 mg/L.

În cazul folosirii probei PBa-2 adsorbția completă a avut loc pentru acidul galic după 240 de minute în timp ce concentrațiile celorlalți compuși au fost de aproximativ 20 mg/L la finalul reacției.

Randamentele de adsorbție cele mai scăzute s-au înregistrat pentru proba PHH. Pe tot parcursul reacției reținerea completă nu s-a realizat pentru niciun compus polifenolic. Mai mult, concentrațiile finale cuprinse între 80-100 mg/L sugerează faptul că randamentul adsorbție a fost mai mic de 50% pentru toți polifenolii implicați în proces.

Concluzii

- Separarea prin schimb ionic este o metodă nouă ce prezintă numeroase avantaje cum ar fi, o bună stabilitate, capacitate ridicată de adsorbție, selectivitate și nu în ultimul rând diversitate structurală.
- Utilizarea schimbătorilor de ioni în procesul de separare al compușilor polifenolici a presupus testarea unor schimbători comerciali și sintetici.
- În ceea ce privește probele comerciale s-a constatat că Amberlite A21 și Dowex 1x2 Cl au avut capacitate de adsorbție cea mai ridicată randamentul fiind de 100% pentru fiecare compus. Celelalte probe comerciale au prezentat randamente ridicate (80-100%) îndeosebi în cazul acizilor hidroxicinamici.
- În urma studiului cinetic s-a constatat că reținerea completă a compușilor are loc în aproape 60 de minute de contact.
- În ceea ce privește pH-ul mediului de adsorbție s-a constatat că la pH 1 procesul decurge similar ca cel desfășurat la pH neajustat iar în mediu bazic adsorbția este mult mai scăzută.

- Testarea capacității de adsorbție a schimbătorilor sintetizați în laborator a permis selectarea rășinii cele mai eficiente (P115) în vederea efectuării studiilor de cinetică și termodinamică pentru evaluarea comportamentului fiecărui compus individual.
- Dintre toți compușii polifenolici studiați (acid galic, catehina, acid vanilic, acid ferulic) adsorbția cea mai bună s-a realizat în cazul acidului galic și vanilic. Structura mai simplă și afinitatea compușilor față de schimbătorului polimeric au facilitat procesul de adsorbție obținând randamente ridicate.
- Temperatura de 45° C a facilitat procesul de adsorbție, valorile concentrațiilor fiind considerabil mai mari decât în cazul desfășurării procesului la temperatură ambiantă. În unele cazuri cantitatea adsorbită în 8 ore la 45°C a fost apropiată de cea obținută în 24 de ore la temperatura camerei.

Capitolul IX. Proprietăți ale compușilor polifenolici

IX.1 Materiale și metode

Studiul efectuat oferă informații referitoare la stabilitatea unor compuși polifenolici standard și a unor extracte vegetale cu conținut de polifenoli în diferite condiții.

În acest scop s-a urmărit stabilitatea termică a produselor standard și a extractelor vegetale în intervalul de temperatură cuprins între 25-900°C .

Comportamentul degradării polifenolilor sub influența radiațiilor UV a presupus un studiu cinetic folosind o soluție standard de polifenoli, într-un reactor prevăzut cu lampă de mercur de presiune joasă, care emite radiații cu lungimea de undă de 254 nm (UVC).

De asemenea s-a urmărit stabilitatea compușilor privind expunerea la radiații UV în asociere cu câțiva dintre cei mai utilizați aditivi alimentari (clorura de sodiu, azotatul de sodiu și acidul citric).

Capacitatea antioxidantă a extractelor obținute din coajă de molid, *Asclepias syriaca*, *Crataegus monogyna* și semințe de struguri a fost evaluată utilizând metoda bazată pe reducerea radicalului liber DPPH de către compușii cu caracter antioxidant prezenți în reacție.

Activitatea antimicrobiană, determinată prin metoda difuziei în agar cu discuri impregnate (metoda difuzimetrică), a fost testată pe trei specii bacteriene *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, precum și pe drojdia *Candida parapsilosis*.

Influența extractelor polifenolice în procesele de germinare, creștere și dezvoltare a plantelor a presupus aplicarea extractelor apoase și etanolice obținute din materialele vegetale menționate în procesul de germinare al semințelor de fasole și în cel de cultivare al plantelor în vase de vegetație.

Măsurătorile biometrice și determinarea cantității de biomasă umedă la finalul experimentelor a permis evaluarea efectului de inhibare sau stimulare a produselor polifenolice.

IX.2 Rezultate și discuții

IX.2.1 Analiza termică

Datele obținute și prezentate în figurile 98, 100 și tabelul 45, evidențiază faptul că procesul de degradare termică se desfășoară în trei, patru sau chiar cinci etape, însoțite de efecte endo- și exoterme în funcție de structura produsului investigat.

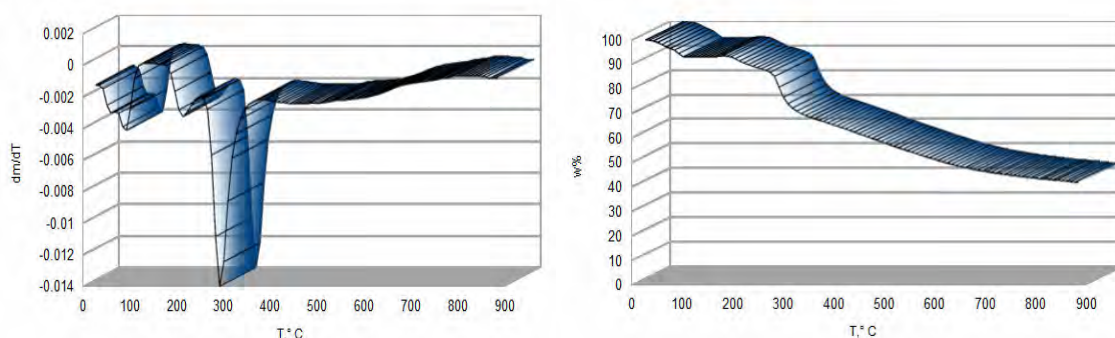


Fig.98 Curbele termogravimetrice (TG și DTG) pentru catehina

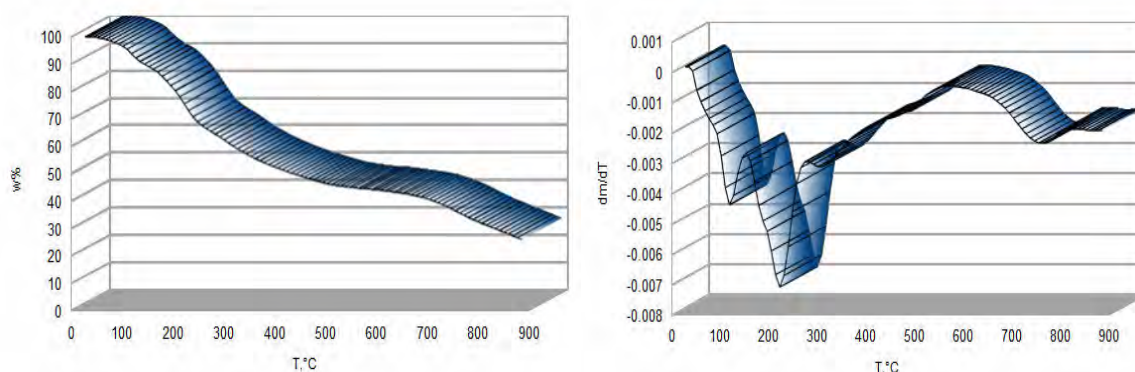


Fig.100 Curbele termogravimetrice (TG și DTG) pentru extractul metanolic din semințe de struguri

Analizând energiile de activare aparente ale probelelor analizate (**Tabel 45**) se poate observa că există diferențe semnificative atât pentru standardele analizate cât și pentru produsele vegetale.

Stabilitatea extractelor studiate, este diferită în concordanță cu compușii specifici ai fiecărui extract cât și concentrația acestora în probă.

Astfel, extractele obținute din păducel și *Asclepias syriaca* prezintă valori ale energiei de activare relativ mari indicând o stabilitate termică ridicată în timp ce produsele obținute din coajă de molid și semințe de struguri au prezentat valori ale energiei de activare pentru ultima etapă de aproximativ 50KJ/mol. În cazul extractului din semințe de struguri acest fapt este explicabil ținând cont de faptul că compușii polifenolici predominanți sunt acidul galic, catehina și epicatehina.

Tabel 45. Caracteristicile cinetice ale procesului de degradare termică

Proba	Etapa degradare	lnA	Ea(KJ/mol)	n
Acid galic	I	36.16±1.19	123.63±3.54	0.59±35.01e ⁻⁰³
	III	63.58±1.10	341.61±5.5	0.85±18.24 e ⁻⁰³
Catehina	I	7.47±1.06	34.43±2.93	0.53±36.68 e ⁻⁰³
	II	9.07±1.27	57.89±5.02	1.04±60.43 e ⁻⁰³
	III	43.72±1.34	226.04±6.23	1.54±30.64 e ⁻⁰³
<i>Crataegus Monogyna</i>	I	0.63±0.63	19.15±1.88	0.59±45.66 e ⁻⁰³
	II	22.51±0.53	104.59±2.00	1.31±21.50 e ⁻⁰³
	III	19.55±0.31	114.40±17.38	1.00±17.38 e ⁻⁰³
<i>Asclepias syriaca</i>	I	51.25±0.93	178.80±2.93	2.00±32.78 e ⁻⁰³
	II	23.29±1.08	105.74±3.95	1.92±60.59 e ⁻⁰³
Semințe de struguri	I	23.60±1.21	92.65±3.72	3.25±0.13
	II	6.70±0.44	50.29±1.71	0.84±35.25 e ⁻⁰³
Molid	I	14.62±1.03	54.74±2.82	1.23±56.81 e ⁻⁰³
	II	7.00±0.20	56.79±0.80	1.18±24.12 e ⁻⁰³

IX.2.2 Foto-oxidarea compușilor polifenolici

Pentru evaluarea stabilității extractelor vegetale obținute, s-a realizat inițial un studiu cinetic folosind o soluție de polifenoli standard și anume acizii galic, vanilic și catehina.

În **Fig.104** este prezentată evoluția degradării în timp a compușilor standard menționați. Timpul de expunere a fost în acest caz 480 min. Timpul reprezintă un parametru important în procesul de degradare a compușilor polifenolici și nu numai. În studiul propus evaluarea degradării compușilor s-a realizat prin analiza HPLC, iar urmărindu-se scăderea continuă a concentrației în soluția expusă iradierii. În cazul catehinei s-a constatat spre finalul

experimentului (300, 360, 420 și 480min) ca în descompunerea efectivă a compusului la analiza HPLC se înregistrează trei picuri caracteristice unor compuși de degradare, cu arii diferite ce au prezentat o creștere constantă a intensității în timp.

Astfel pe parcursul celor 480 min, catehina a fost singurul compus degradat aproape complet, urmat de acidul galic degradat în proporție de 85%. Acidul vanilic, pe de altă parte a prezentat o stabilitate destul de ridicată, concentrația finală în soluție după iradiere fiind de aproximativ 50%.

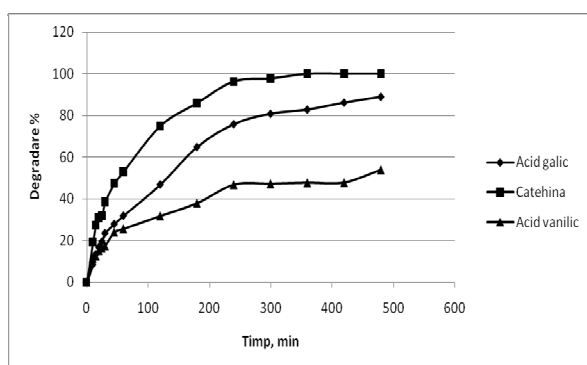


Fig.104 Evoluția concentrației compușilor polifenolici în timp sub influența radiațiilor UV

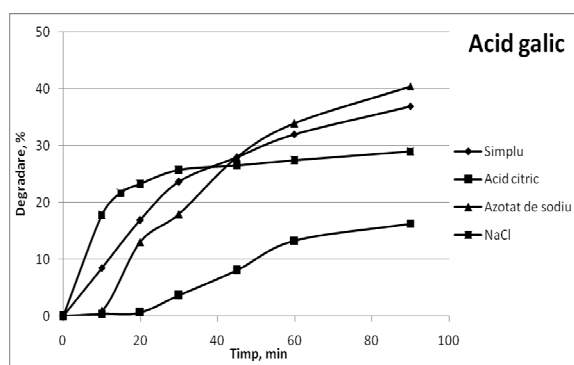


Fig.105 Degradarea în timp a acidului galic în prezența acidului citric, azotatului de sodiu și a clorurii de sodiu, sub acțiunea radiațiilor UV

Utilizarea produselor vegetale în industria alimentară ca aditivi (coloranți, conservați) presupune pe lângă procesele de fabricare și interferența cu alți compuși chimici necesari conservării, îmbunătățirii calității produsului sau a termenului de valabilitate. Unii din acești compuși sunt practic inofensivi cum ar fi sarea/clorura de sodiu, bicarbonatul de sodiu, acidul ascorbic etc. în timp ce alții sunt extrem de nocivi și consumați în cantități ridicate pot aduce prejudicii majore sănătății umane. Dintre aceștia enumerăm: azotații de sodiu și potasiu, azotiții de sodiu și potasiu, acidul citric, glutamatul de potasiu etc.

Scopul acestui studiu a fost evaluarea comportamentului compușilor polifenolici naturali în asociere cu câțiva dintre cei mai utilizați aditivi alimentari și anume sarea, azotatul de sodiu și acidul citric la tratamentul cu radiații UV.

În **Fig.105** sunt prezentate rezultatele studiului cinetic privind degradarea acidului galic asociat cu acidul citric, clorura de sodiu și azotatul de sodiu. Se poate observa că în urma

timpului de expunere de 90 de minute sub influența azotatului de sodiu s-a produs o degradare a acidului galic de aproximativ 40% comparativ cu soluția standard unde degradarea a fost de 37%. În același timp, degradarea acidului galic în prezența acidului citric (18%) și a cloruri de sodiu (29%) a fost mult mai scăzută comparativ proba martor indicând o stabilitate mai ridicată a compusului în asocieră cu acești aditivi.

În **Fig. 108** și **109** sunt prezentate rezultatele înregistrate pentru degradarea acidului galic și a catehinei din extractul apos din semințe de struguri și a acidului vanilic din extractul apos din coajă de molid comparativ cu rezultatele degradării pentru compușii standard la același timp de expunere.

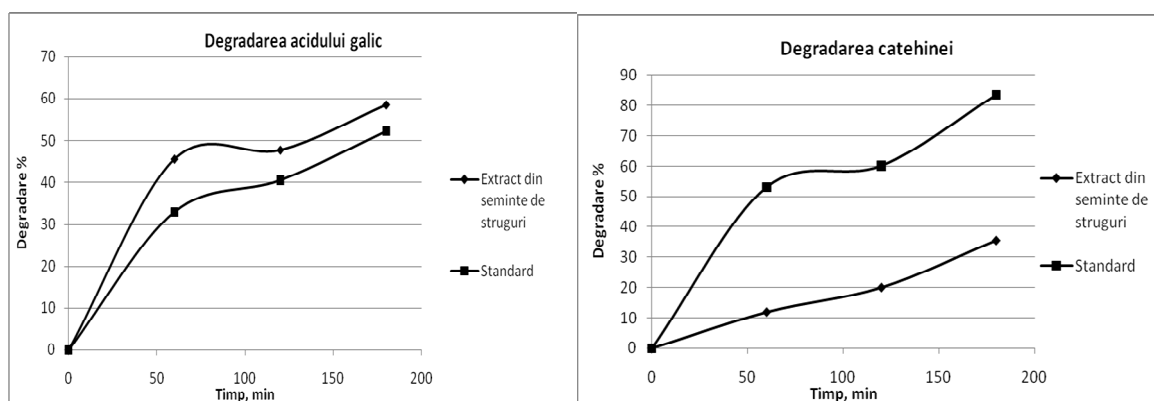


Fig.108 Degradarea polifenolilor în extractul apos din semințe de struguri comparativ cu degradarea compușilor standard

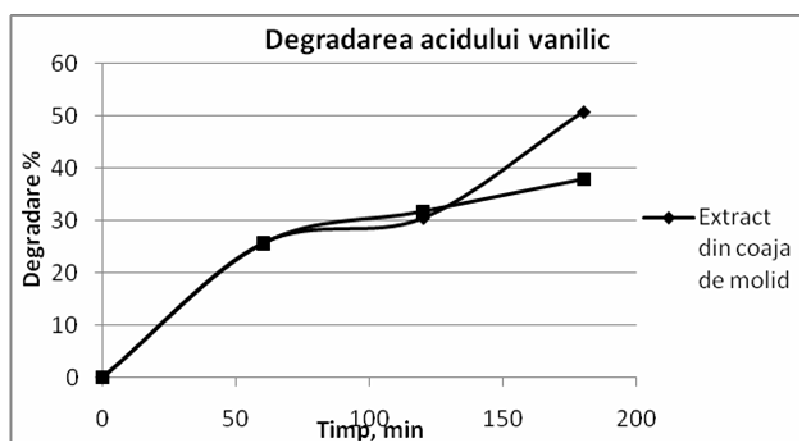


Fig.109 Degradarea acidului vanilic în soluția standard și în extractul din coajă de molid

Expunerea la acțiunea radiațiilor UV a extractului din semințe de struguri a condus la degradarea catehinei până la aproximativ 40% în timp ce în soluția standard degradarea a ajuns până la 90%. Acest fapt se datorează concentrației ridicate de catehina în extractul analizat. Concentrația inițială a catehinei în extractul analizat a fost de 240mg/L în timp ce concentrația în soluția standard a fost de 100mg/L. Putem afirma astfel, că degradarea este mai lentă atunci când concentrațiile sunt mai mari.

În ceea ce privește acidul galic, procesul de degradare a fost similar în soluția standard și în extractul de struguri, concentrațiile în urma expunerii fiind de 55%.

În cazul acidului vanilic din extractul din coaja de molid s-a constatat că degradarea produsului în extractul vegetal (50%) a fost mai rapidă decât în cazul probei martor (40%).

IX.3 Capacitatea antioxidantă

Tabel 46. Activitatea antioxidantă a extractelor vegetale alcoolice

Probe	EC50 μg	R ²
Acid ascorbic	4,6	0,998
Acid galic	1,7	0,907
Acid cafeic	42,1	0,939
Catehină	12,7	0,999
Extract din semințe de struguri	45,75	0,994
Extract din coaja de molid	159,15	0,983
Extract din <i>Crataegus monogyna</i>	17,8	0,998
Extract din <i>Asclepias syriaca</i>	212,45	0,981

Tabelul 46 prezintă capacitățile antioxidante determinate pentru fiecare tip de extract. După cum se observă caracterul antioxidant cel mai pronunțat s-a înregistrat în cazul extractului de păducel valoarea capacității antioxidante fiind de 17.8 μg/mL. Extractul alcoolic obținut din semințe de struguri are de asemenea un caracter antioxidant puternic, valoarea calculată a parametrului EC fiind de 45.75μg/ml.

Capacitatea antioxidantă cea mai scăzută s-a obținut în cazul extractului alcoolic obținut din plantă *Asclepias syriaca*.

IX.4 Influența extractelor polifenolice asupra creșterii și dezvoltării plantelor

Influenta extractelor alcoolice în procesul de germinare

Având în vedere că extractele vegetale cu rol de bioregulatori pot stimula sau inhiba creșterea și dezvoltarea plantelor în funcție de concentrațiile aplicate, s-au testat pentru fiecare tip de extract analizat 3 concentrații diferite și anume 0.05 g GAE/L, 0.1 g GAE/L, 0.2 g GAE/L.

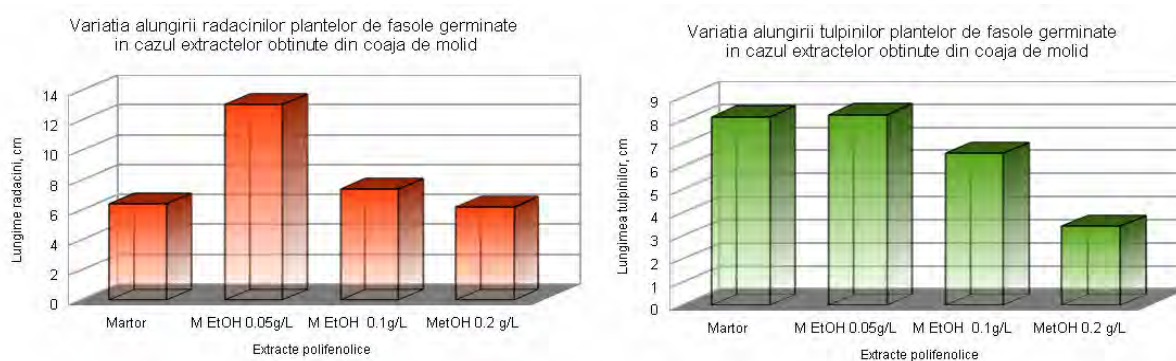


Fig.111 Variația alungirii tulpinilor și rădăcinilor plantelor de fasole germinate sub influența extractului etanolic din coajă de molid

În cazul extractului din coajă de molid s-a constatat o ușoară stimulare în prezența extractului de concentrație 0.05 g GAE/L în ceea ce privește alungirea tulpinilor plantelor de fasole. Pentru același tip de extract o stimulare semnificativă s-a observat la alungirea rădăcinilor, efectul stimulator fiind de aproximativ 100% comparativ cu proba martor.

În ceea ce privește extractele din *Asclepias syriaca* alungirea tulpinilor a fost stimulată în prezența extractelor de concentrație 0.05g GAE/L și 0.1 g GAE/L în timp ce un efect stimulator general s-a înregistrat în cazul alungirii rădăcinilor pentru toate cele trei concentrații testate.

Aplicarea extractelor de păducel în germinarea semințelor de fasole a produs o inhibare a dezvoltării plantelor manifestat la nivelul tulpinilor pentru toate concentrațiile aplicate cât și la nivelul rădăcinii. Un caz singular de stimulare a lungimii rădăcinilor cu mai mult de 100% față de martor s-a observat la aplicarea extractului cu concentrația 0.05 g GAE/L.

Prezența extractelor din semințe de struguri în procesul de germinare a avut un caracter general inhibitor cu excepția extractului cu concentrația 0.05 g GAE/L care a stimulat alungirea tulpinilor cât și a rădăcinilor.

După analiza rezultatelor obținute în urma proceselor de germinare, se poate concluziona faptul că extractele cu concentrație redusă 0.05 g GAE/L au avut un efect de stimulare a alungirii tulpinilor cât și rădăcinilor, în timp ce la concentrații mai mari 0.1 respectiv 0.2 g GAE/L se manifesta un efect general de inhibare.

Dacă în cazul alungirii tulpinilor de fasole extractele polifenolice au manifestat un efect evident de stimulare în cazul cantității de biomasă efectul este unul de inhibare. Un efect ușor stimulator s-a observat totuși asupra cantității de biomasă a rădăcinilor. Deși efectul nu a fost pronunțat acesta s-a manifestat pentru toate extractele de concentrație minimă.

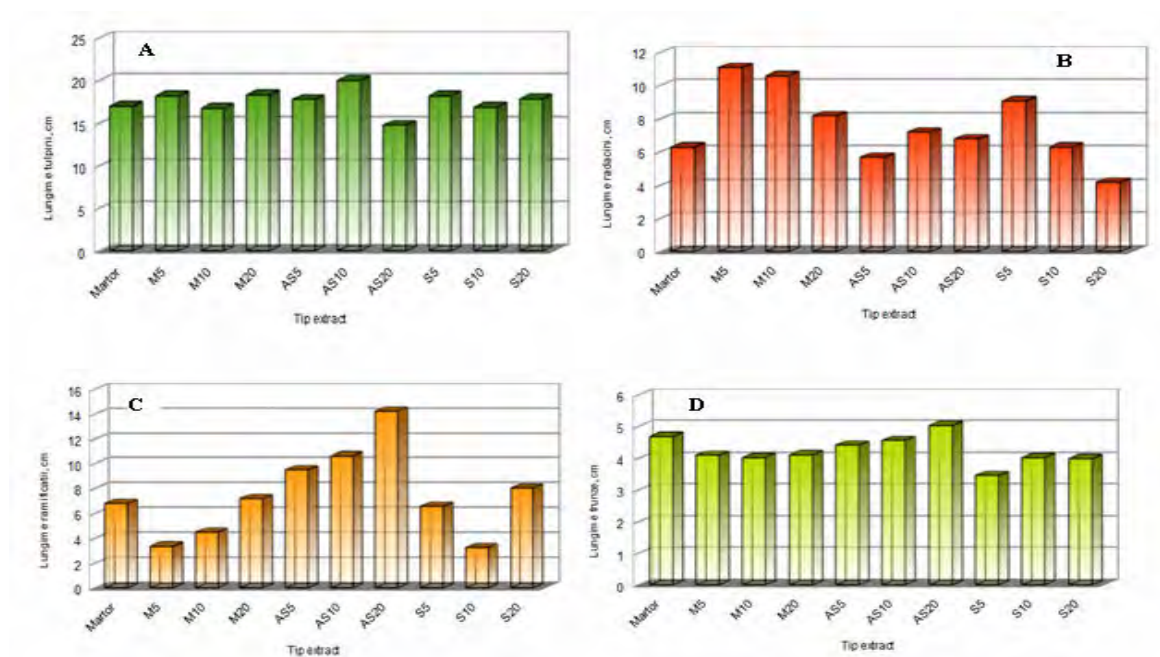
Teste de cultivare a plantelor în vase de vegetație

În ceea ce privește lungimea tulpinilor plantulelor de fasole cultivate în ghivece se poate observa că nu se înregistrează efecte majore sub acțiunea extractelor utilizate, acest parametru înregistrând aproape în toate cazurile valori aproximativ similare cu proba martor (**Fig.121 A**). Cu toate acestea putem menționa că un efect slab de stimulare a alungirii tulpinilor s-a înregistrat în cazul probeleor M5, M20, AS10, S5 în timp ce proba AS20 a avut un efect de inhibare asupra dezvoltării tulpinilor de fasole.

Valorile alungirii rădăcinilor plantulelor de fasole (**Fig. 121B**) în cazul aplicării celor trei tipuri de extracte polifenolice sunt semnificativ mai mari comparativ cu proba martor fapt ce confirmă stimularea alungirii rădăcinilor sub influența extractelor polifenolice.

În aceeași măsură se constată că lungimea ramificațiilor plantulelor de fasole este influențată pozitiv de extractele polifenolice obținute din *Asclepias syriaca*, crescând odată cu concentrația acestora (**Fig. 121 C**). Extractele obținute din coajă de molid și din semințe de struguri prezintă și ele un efect stimulator însă doar în cazul utilizării soluțiilor cu concentrații maxime.

Cele trei tipuri de extracte polifenolice aplicate plantulelor de *Phaseolus vulgaris* nu influențează semnificativ dimensiunile frunzelor. Se poate remarca doar un ușor efect stimulator în cazul utilizării probei AS20 și un efect inhibitor în cazul aplicării extractului din semințele de struguri (**Fig.121 D**). Aceste influențe particulare ar putea fi corelate cu compoziția extractelor, în cazul semințelor de struguri prezența antocianilor ar explica manifestarea unui efect inhibitor al acestora.



M5, M10, M20 (extracte din coaja de molid obținute din 5, 10, 20 g material vegetal),
 AS5, AS10, AS20 (Extracte din *Asclepias Syriaca* obținute din 5, 10, 20g material vegetal),
 S5, S10, S20 (extracte din semințe de struguri obținute din 5, 10, 20g material vegetal).

Fig.121 Măsurători biometrice ale plantulelor de fasole cultivate în vase de vegetație (A- alungire tulpini, B- alungire rădăcini, C- alungire ramificații, D- alungire frunze)

IX.5 Determinarea activității antimicrobiene a unor extracte de plante

Activitatea antimicrobiană, determinată prin metoda difuziei în agar cu discuri impregnate (metoda difuzimetrică), a fost testată pe trei specii bacteriene *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, precum și pe drojdia *Candida parapsilosis*.

Cele mai largi zone de inhibiție (15 mm) au fost în cazul extractelor etanolice de coajă de molid, *Crataegus monogyna* și semințe de struguri pentru *S. aureus* (bacterie Gram pozitivă). Față de bacteriile Gram negative (*Escherichia coli* și *Pseudomonas aeruginosa*) manifestă o oarecare activitate antimicrobiană extractele alcoolice din *Asclepias syriaca* și coajă molid. Zone de inhibiție mai mici, și deci mai puțin semnificative au fost înregistrate pentru extractele apoase și etanolice de *Asclepias syriaca* în cazul testării contra *E. coli* (Tabel 47).

Tabel 47. Activitatea antibacteriană a extractelor vegetale comparativ cu substanțe antibacteriene de referință

Microorganisme de referință	Zonele de inhibiție (mm)			
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
Extract apos din <i>Asclepias syriaca</i>	-	6	6	-
Extract etanolic din <i>Asclepias syriaca</i>	-	12	6	-
Extract apos din coajă de molid	-	-	-	-
Extract etanolic din coajă de molid	15	10	10	-
Extract apos din <i>Crataegus monogyna</i>	-	-	-	-
Extract etanolic din <i>Crataegus monogyna</i>	15	-	-	-
Extract apos din semințe de struguri	-	-	-	-
Extract etanolic din semințe de struguri	12	-	-	-
Gentamicină	17	19	ND	ND
Ofloxacină	21	19	22	ND
Amikacină	ND	21	21	ND
Kanamycină	18	-	18	ND
Cefuroxim	26	-	17	ND
Eritromicină	20	10	11	ND
Fluconazol	ND	ND	ND	-
Nistatin	ND	ND	ND	25

ND – nedeterminat

Rezultatele sugerează că activitatea antibacteriană exprimată împotriva microorganismelor bacteriene Gram-pozitive patogene este puțin mai redusă decât cea a substanțelor antibacteriene de referință pentru *Staphylococcus aureus*.

Activitatea antibacteriană împotriva bacteriilor Gram negative (*Escherichia coli*, *P. aeruginosa*) a fost însă mai puțin comparabilă cu activitatea antibacteriană exercitată de substanțele de referință.

În ceea ce privește activitatea antimicotică, se constată că niciunul dintre extracte nu manifestă acțiune împotriva *Candida parapsilosis*.

Concluzii

- În ceea ce privește degradarea termică a compușilor, datele obținute evidențiază faptul că procesul de degradare termică se desfășoară în trei, patru sau chiar cinci etape, însoțite de efecte endo- și exoterme în funcție de structura produsului investigat.
- Stabilitatea termică a extractelor studiate, este diferită în concordanță cu compușii specifici ai fiecărui extract cât și concentrația acestora în probă, situându-se în ordinea: Extract din *Crataegus Monogyna* < Extract din coajă de molid < Extract din *Asclepias Syriaca* < Extract din semințe de struguri.

- În urma studiului privind foto-oxidarea compușilor polifenolici se poate concluziona că polifenolii testați au prezentat o stabilitate ridicată la acțiunea radiațiilor UV chiar și în cazul asocierii lor cu diferiți aditivi, catehina fiind singurul compus degradat aproape complet, urmat de acidul galic degradat în proporție de 85%. Acidul vanilic, pe de altă parte a prezentat o stabilitate destul de ridicată, concentrația finală în soluție după iradiere fiind de aproximativ 50%.
- Procesul de degradare sub acțiunea radiațiilor UV a fost mult mai lent pentru toți compușii polifenolici în prezența aditivilor menționați.
- Datele rezultate în urma efectuării testelor de germinare au evidențiat că influența extractelor utilizate se manifestă în mod specific în funcție de natura extractului cât și a materialului vegetal din care s-au obținut.
- Rezultatele obținute pentru testele de germinare și cele de creștere și dezvoltare a plantulelor de fasole în vase de vegetație au evidențiat că o concentrație ridicată de compuși polifenolici are un efect inhibitor asupra creșterii și dezvoltării plantelor în timp ce concentrațiile mai scăzute au un efect de stimulare.
- Efectul de inhibare mai pronunțat s-a observat în cazul extractelor din semințe de struguri care prezintă cel mai ridicat conținut de compuși polifenolici. Cu toate că aceste extracte au influențat negativ alungirea la nivelul rădăcinilor și tulpinilor, un efect stimulator s-a observat în ceea ce privește cantitatea de biomasă verde determinată.
- Pentru testele de creștere și dezvoltare a plantelor în vase de vegetație, s-a observat un efect stimulator al extractelor apoase din *Asclepias syriaca* în toate cele trei concentrații, mai pregnant în cazul AS10 asupra înălțimii plantulelor de fasole în timp ce extractele din coajă de molid și semințe de struguri prezintă un efect inhibitor.
- În urma evaluării activității antibacteriene a extractelor polifenolice s-a constatat că extractele alcoolice din coajă de molid, semințe de struguri și *Crataegus monogyna* au un efect de inhibare asupra microorganismelor Gram pozitive, valorile zonelor de inhibiție fiind apropiate de cele ale substanțelor de referință. Un efect inhibitor s-a constatat și în cazul microorganismelor gram negative pentru extractele din *Asclepias syriaca* și coajă de molid însă zonele de inhibiție au fost relativ mici comparativ cu produsele comerciale aplicate.

Concluzii finale

Teza de doctorat intitulată “Contribuții privind metode de separare, izolare și caracterizare a compușilor polifenolici bioactivi din diferite surse de biomasă vegetală” aduce contribuții fundamentale în domeniul izolării și caracterizării unor produse polifenolice din următoarele surse: *Asclepias syriaca*, fructe de *Crataegus monogyna*, coaja de molid și semințe de struguri.

În prima parte sunt prezentate informații de literatură privind clasificarea și structura compușilor polifenolici naturali, metode analitice utilizate pentru separarea și caracterizarea compușilor aromatici naturali ca și proprietăți și potențiale aplicații ale acestora.

În a doua parte a tezei de doctorat sunt prezentate rezultatele experimentale care au condus la următoarele concluzii:

- În domeniul extracției compușilor polifenolici

- Pentru degresarea materialului vegetal studiul comparativ al folosirii eterului etilic și hexanului a condus la recomandarea celui din urma datorită caracterului sau selectiv în extracția compușilor lipofili. Eterul etilic deși este un bun agent de degresare a probelor vegetale s-a constatat că prezintă afinitate ridicată și față de compușii polifenolici.
- În contextul procesului de valorificare complexă a biomasei utilizarea hexanului a condus la un randament de extracție a substanțelor lipofile cuprins între 7-15%. Analiza GC-MS a permis identificarea principalilor acizi grași din extractele obținute.
- Pentru extracția polifenolilor s-au utilizat ca agenți de extracție apa, soluții apoase de etanol și metanol (80%), soluții de hidroxid de sodiu 2M și CO₂ în condiții supercritice.
- Randamentele de recuperare a compușilor polifenolici au fost variate în funcție de natura solventului de extracție și a materiei prime folosite. Randamentele cele mai ridicate s-au înregistrat pentru extractele metanolice din semințele de struguri (9%) și fructele de *Crataegus monogyna* (19%). Pe de altă parte, randamentele extracției cu fluide supercritice au fost ușor mai ridicate decât în cazul extracției alcoolice și apoase.
- Pentru potențialele aplicații ale extractelor naturale în domenii industriale se recomandă extracția cu apă, alcool etilic și fluide supercritice care oferă produse lipsite de toxicitate.

- **În domeniul caracterizării preliminare a extractelor vegetale utilizând tehnici spectrale**

- Extractele polifenolice globale au fost inițial supuse unei caracterizări fizico-chimice în vederea determinării pH-ului, densității și a randamentului de extracție.
- Metodele colorimetrice s-au aplicat pentru determinarea conținutului total de polifenoli, taninuri, flavonoide, flavani și antociani.
- Extractele obținute au prezentat un conținut ridicat de compuși polifenolici totali, variind în funcție de materia primă și solventul de extracție între 5,06mg/g pentru extractul din semințe de struguri și 66 mg/ g în cazul extractului de păducel.
- Spectroscopia FTIR, ^1H -RMN și ^{31}P - RMN a permis evidențierea unor caracteristici funcționale referitoare la compoziția probelor vegetale corelând spectrele compușilor standard cu cele ale extractelor obținute. Mai mult, varianta ^{31}P -RMN a permis și evaluarea cantitativă a principalelor clase de metaboliți secundari din materialele analizate.

- **În domeniul separării și caracterizării compușilor polifenolici din extractele vegetale**

- Folosirea cromatografiei lichide de înaltă performanță alături de cromatografia în fază gazoasă asociată cu spectrometria de masă a permis identificarea și cuantificarea polifenolilor în probele vegetale pe baza standardelor utilizate.
- În urma acestor studii s-a demonstrat prezența compușilor polifenolici în toate tipurile de extracte analizate. Compușii majoritari identificați în extractele alcoolice și apoase analizate au fost acidul galic, catehina și acidul vanilic.
- Hidroliza bazică aplicată cu scopul eliberării acizilor fenolici legați în matricea vegetală de alte grupări funcționale a avut un efect benefic, în urma acesteia identificându-se o serie de compuși polifenolici în toate extractele alcaline realizate pe materialele vegetale extrase în prealabil cu etanol.
- În extractele alcoolice s-a identificat de asemenea și prezența unor flavonoide. Extractul alcoolic din *Asclepias syriaca* a avut cel mai complex profil al flavonoidelor identificându-se prezența a trei compuși (rutin, quercetin și kaempferol) din cei patru

folosiți ca standard iar în extractul din fructe de *Crataegus monogyna* s-a identificat rutinul în concentrație ridicată (20mg/100g).

- Extracția cu fluide supercritice s-a realizat în condiții diferite de temperatură și presiune constatând că acești parametri influențează semnificativ procesul extractiv, concentrațiile compușilor crescând proporțional cu presiunea și temperatura. Astfel, concentrațiile cele ridicate în compuși polifenolici s-au obținut la temperatura de 60°C și presiunea de 400 atm.
- Utilizarea unor condiții menajate de temperatură și presiune, evitarea degresării în prealabil a materialului vegetal și a utilizării unui antioxidant cât și timpul de extracție considerabil mai redus (2h) comparativ cu cel al extracției clasice (10h) face ca extracția în condiții supercritice să fie o metodă viabilă și avantajoasă pentru separarea compușilor naturali bioactivi.
- Analiza GC-MS a confirmat prezența compușilor identificați anterior prin cromatografie lichidă de înaltă performanță și a permis identificarea unor compuși suplimentari (epicatehina în extractele din semințe de struguri și păducel cât și a altor acizi fenolici în extractele din coajă de molid).
- În scopul utilizării schimbătorilor de ioni în recuperarea compușilor polifenolici s-a efectuat un studiu comparativ folosind atât produse comerciale cât și unele sintetizate în laborator.
- Studiile cinetice și termodinamice folosind diferiți schimbători de ioni a permis stabilirea celor mai performanți și a condițiilor experimentale în care se asigură eficiența în separare (timp de contact, temperatură, pH, concentrație), precum și afinitatea suporturilor polimerice pentru diferiți compuși polifenolici.

- În domeniul stabilirii unor proprietăți și potențiale aplicații ale compușilor polifenolici

- S-a studiat stabilitatea termică a unor compuși polifenolici individuali din categoria celor prezenți în probele vegetale, precum și a extractelor obținute.
- Stabilitatea termică se situează în ordinea: Extract din *Crataegus Monogyna* < Extract din coajă de molid < Extract din *Asclepias Syriaca* < Extract din semințe de struguri.

- S-a investigat comportamentul compușilor polifenolici și a extractelor vegetale sub influența radiațiilor UV în absența și în prezența unor aditivi (clorura de sodiu, acid citric și azotat de sodiu) cu care ar putea intra în contact în cazul unor potențiale aplicații în domeniul industriei alimentare.
- Datele obținute au evidențiat faptul că stabilitatea compușilor și a produselor studiate depinde de natura lor și este modulată de prezența aditivilor.
- Aplicarea extractelor vegetale în procesele de germinare și în cele de creștere și dezvoltare a plantelor de fasole s-a realizat în vederea funcționării lor ca bioregulatori de creștere.
- Datele rezultate au evidențiat că influența extractelor utilizate se manifestă în mod specific în funcție de natura extractului cât și a materialului vegetal din care s-au obținut.
- S-a constatat că o concentrație ridicată de compuși polifenolici prezintă un efect general inhibitor asupra creșterii și dezvoltării plantelor în timp ce concentrațiile mai scăzute au un efect de stimulare.
- Extracetele polifenolice au fost caracterizate și din punct de vedere al activității antimicrobiene.
- Extracetele alcoolice din coajă de molid, semințe de struguri și *Crataegus monogyna* au prezentat un efect de inhibare asupra microorganismelor Gram pozitive apropiat de cel al produselor antibacteriene de referință în timp ce un efect slab inhibitor s-a constatat în cazul microorganismelor Gram negative pentru extracetele din *Asclepias syriaca* și coajă de molid.

ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ

I. Articole publicate în reviste cotate ISI

1. **Ignat Ioana**, Volf Irina, Popa Valentin I., (2011), A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, Food Chemistry, 126 (4), 1821-1835.
2. **Ioana Ignat**, Alina Stîngu, Irina Volf, Valentin I. Popa, (2011), Characterization of grape seeds aqueous extract and possible application in biological systems, The influence of natural polyphenolic extracts in plant copper bioaccumulation, Cellulose Chem. Technol., 45 (3-4), 205-209;
3. Hainal Anca-Roxana, **Ioana Ignat**, Irina Volf, Valentin I. Popa, (2011), Transformation of polyphenolic products from biomass by some yeast species, Cellulose Chem. Technol., 45 (3-4), 211-219.
4. **Ioana Ignat**, Violeta Neagu, Ion Bunia, Carmen Paduraru, Irina Volf and Valentin I. Popa, (2011), A comparative study concerning the adsorption of gallic acid onto polymeric adsorbents with amine functional groups, Cellulose Chem. Technol., 45 (3-4), 251-256.

II. Articole publicate în reviste naționale și internaționale recunoscute CNCSIS

1. Alina Stîngu, **Ioana Ignat**, Irina Volf, Valentin I. Popa, 2009, Spruce bark aqueous extract as modulator in copper induced stress, Lucrări științifice- vol. 52, seria Agronomie, 271- 276;
2. **Ioana Ignat**, Alina Stîngu, Irina Volf, Valentin I. Popa, 2009, Natural bioactive compounds as plant growth regulator, Lucrări științifice- vol. 52, seria Agronomie, 187- 192;
3. Anca Hainal, **Ioana Ignat**, Alina Stîngu, Irina Volf, Valentin I. Popa, 2009, The influence of some polyphenols on *Rhodothorula* spp. Growth in the presence of copper ions, Proceedings of the 9th International symposium on metal elements in environment, medicine and biology, 79-83;
4. Alina Stîngu, **Ioana Ignat**, Anca Hainal, Irina Volf, Valentin I. Popa, 2009, Behavior of tomato plant during cultivation in the presence of copper in forest and sandy soils, Proceedings of the 9th International symposium on metal elements in environment, medicine and biology, 90-93;

5. **Ioana Ignat**, Fauduet H., Bostyn S., Popa M.I, Volf I., Popa V.I, 2009, Study on isolation and characterization of some polyphenols from agro-industrial by-products, Buletinul Institutului Politehnic din iasi, Tomul LV(LIX), Fasc.4, 199-207;
6. Anca Hainal, **Ioana Ignat**, Irina Volf, Valentin I.Popa,2010, Study of the influence of aqueous extracts from *Asclepias syriaca* on the development of species of *Rhodotorula sp.*, Lucrări științifice USAMV Iași, seria Horticultură, vol. 53, p. 603-608;
7. Anca Hainal, **Ioana Ignat**, Irina Volf, Valentin I.Popa, 2010, Research on the influence of aqueous extracts from the grape seeds on the development of some specie of *Rhodotorula sp.* Lucrări științifice USAMV Iași, seria Horticultură, vol. 53, p. 661-666;
8. Valentin I. Popa, **Ioana Ignat**, Irina Volf,2010, A comparison concerning separation and characterization of polyphenols from spruce wood bark, Proceedings of the 11th European Workshop on Lignocellulosics and Pulp, Hamburg 529-532;
9. Hainal A. R., **Ignat I.**, Volf I., Popa I. V., 2010, Transformation of polyphenolic products from biomass by some yeast species, Proceedings of The 14th International symposium on Cellulose Chemistry and Technology, Iasi, Romania;
10. **Ioana Ignat**, Alina Stingu, Irina Volf and Valentin I. Popa , 2010,Characterization of grape seeds aqueous extract and possible application in biological system, prezentare orala, Proceedings of The 14th International symposium on Cellulose Chemistry and Technology, pg. 25-31;
11. **Ioana Ignat**, Violeta Neagu, Ion Bunia, Carmen Paduraru, Irina Volf and Valentin I. Popa, 2010, A comparative study concerning the adsorption of gallic acid onto polymeric adsorbents with amine functional groups, prezentare tip poster Proceedings of The 14th International symposium on Cellulose Chemistry and Technology, pg. 352-358;
12. **Ioana Ignat**, Irina Volf, Valentin I. Popa, 2011, Assesement on phenolic profile of hawthorn (*Crataegus spp.*). The third Nordic Wood Biorefinery Conference NWBC 2011 (cu ISBN 978-91-86018-17-7), 377-378;
13. Alina Stîngu, **Ioana Ignat**, Valentin I. Popa, Irina Volf, 2011, Phenolics profile of *Aesculus Hippocastanum* extract and possibilities to use them in phytoremediation process, Proceeding of Italic 6 Science & Technology of Biomasses: Advances and challenges from forest and agricultural biomasses to high added value products: processes and materials, Viterbo, ISBN 978-88-95688-65-7, 133-136

14. **Ioana Ignat**, Mariana Neamtu, Irina Volf, Valentin I. Popa, Stability of plant polyphenols against uv radiation, Proceeding of Italic 6 Science & Technology of Biomasses: Advances and challenges from forest and agricultural biomasses to high added value products: processes and materials, Viterbo, ISBN 978-88-95688-65-7, 141-145.

III. Participări la manifestări științifice, conferințe naționale și internaționale

1. Alina Stîngu, **Ioana Ignat**, Irina Volf, Valentin I. Popa, Spruce bark aqueous extract as modulator in copper induced stress, Ecological agriculture, priorities and perspectives, Section: Fundamental research, 22-24 Octombrie 2009, Iași, **România**;
2. **Ioana Ignat**, Alina Stîngu, Irina Volf, Valentin I. Popa, Natural bioactive compounds as plant growth regulator, Ecological agriculture, priorities and perspectives, Section: Fundamental research, 22-24 Octombrie 2009, Iași, **România**;
3. Alina Stîngu, **Ioana Ignat**, Anca Hainal, Irina Volf, Valentin I. Popa, Behavior of tomato plant during cultivation in the presence of copper in forest and sandy soils, The 9th International symposium on metal elements in environment, medicine and biology, 16-17 Octombrie 2009, Cluj- Napoca, **România**;
4. Anca Hainal, **Ioana Ignat**, Alina Stîngu, Irina Volf, Valentin I. Popa, The influence of some polyphenols on *Rhodotorula* spp. growth in the presence of copper ions, The 9th International symposium on metal elements in environment, medicine and biology, 16-17 Octombrie 2009, Cluj- Napoca, **România**;
5. Anca Hainal, **Ioana Ignat**, Irina Volf, Valentin I. Popa, Study of the influence of aqueous extracts from *Asclepias syriaca* on the development of species of *Rhodotorula* sp., Simpozionul științific anual cu participare internațională: "Horticultură- știință, calitate, diversitate și armonie", 27-28 Mai 2010, Iași, **România**;
6. Anca Hainal, **Ioana Ignat**, Irina Volf, Valentin I. Popa, Research on the influence of aqueous extracts from the grape seeds on the development of some specie of *Rhodotorula* sp. Simpozionul științific anual cu participare internațională: "Horticultură- știință, calitate, diversitate și armonie", 27-28 Mai 2010, Iași, **România**;
7. **Ioana Ignat**, Stephane Bostyn, Henry Fauduet, Separation de polyphenols dans des co-produits d'origine vegetale, Colloque Franco-Roumain de chimie appliqué, CoFrRoCA- 2010, 7-10 Iulie 2010, Orleans, **Franța**;

8. **Ioana Ignat**, Irina Volf, Valentin I. Popa, L'écorce d'épicéa- source naturelle de composés polyphénoliques, Colloque Franco-Roumain de chimie appliquée, CoFrRoCA- 2010, 7-10 Iulie 2010, Orleans, **Franța**;
9. Valentin I. Popa, **Ioana Ignat**, Irina Volf, A comparison concerning separation and characterization of polyphenols from spruce wood bark The 11th European workshop on lignocellulosics and pulp, 16-19 August 2010, Hamburg, **Germania**;
10. **Ioana Ignat**, Alina Stîngu, Irina Volf, Valentin I. Popa, Characterization of grape seeds aqueous extract and possible application in biological systems, The 14th International symposium on cellulose chemistry and technology, 8-10 Septembrie 2010, Iași , **România**;
11. Hainal Anca-Roxana, **Ignat Ioana**, Volf Irina, Popa Valentin I., 2010c, Transformation of polyphenolic products from biomass by some yeast species, The 14th International symposium on cellulose chemistry and technology, 8-10 Septembrie 2010, Iași , **România**;
12. **Ioana Ignat**, Violeta Neagu, Ion Bunia, Carmen Paduraru, Irina Volf and Valentin I. Popa, A comparative study concerning the adsorption of gallic acid onto polymeric adsorbents with amine functional groups, The 14th International symposium on cellulose chemistry and technology, 8-10 Septembrie 2010, Iași , **România**;
13. **Ioana Ignat**, Irina Volf, Valentin I. Popa, Assesment on phenolic profile of hawthorn (*Crataegus* spp.). The 3rd Nordic Wood Biorefinery Conference (NWBC), 22-24 Martie 2011, Stockholm, **Suedia**;
14. **Ioana Ignat**, Irina Volf, Valentin I. Popa, Characterization of extractives from some raw materials processed by biorefining, COST FP0901 meeting, 25-26 Ianuarie, Paris, **Franta**
15. Alina Stîngu, **Ioana Ignat**, Valentin I. Popa, Irina Volf, Phenolics profile of *Aesculus hippocastanum* extract and possibilities to use them in phytoremediation process, Italic 6 Science & Technology of Biomasses: Advances and challenges from forest and agricultural biomasses to high added value products: processes and materials, 5-8 Septembrie 2011, Tuscia University, Viterbo, **Italia**;
16. Alina Stîngu, **Ioana Ignat**, Irina Volf, Valentin I. Popa, Valorization of *Picea abies* and *Aesculus hipocastanum* woody residues through possible application in bioremediation, COST FP0901 meeting, 7-8 Septembrie 2011, Viterbo, **Italia**.

17. **Ioana Ignat**, Claudia Crestini, Federica Melone, Irina Volf, Valentin I. Popa, Characterization of natural polyphenols by ³¹P-NMR and GPC, COST FP0901 meeting, 7-8 Septembrie 2011, Viterbo, **Italia**
18. **Ioana Ignat**, Mariana Neamtu, Irina Volf, Valentin I. Popa, Stability of plant polyphenols against uv radiation, Italic 6 Science & Technology of Biomasses: Advances and challenges from forest and agricultural biomasses to high added value products: processes and materials, 5-8 Septembrie 2011, Tuscia University, Viterbo, **Italia**;

Bibliografie selectivă

- Achamlale, S., Rezzonico, B., & Grignon-Dubois, M., (2009). Rosmarinic acid from beach waste: Isolation and HPLC quantification in *Zostera detritus* from Arcachon lagoon. Food Chemistry, 113, 878–883.
- Adlercreutz, H., & Mazur W., (1997). Phyto-oestrogens and Western diseases, Ann Med, 29, 95-120.
- Agarwal, C., Sharma, Y., Zhao, J., and Agarwal, R., (2000), A Polyphenolic Fraction from Grape Seeds Causes Irreversible Growth Inhibition of Breast Carcinoma MDA-MB468 Cells by Inhibiting Mitogen-activated Protein Kinases Activation and Inducing G1 Arrest and Differentiation, Clinical Cancer Research, 6, 2921–2930.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S., (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry, 99, 191–203.
- Berthod, A., Billardello, B., & Geoffroy, S., (1999). Polyphenols in counter current chromatography. An example of large scale separation. Analysis 27, 750-757
- Caridi, D., Trenerry, V.C., Rochfort, S., Duong, S., Laughner, D., & Jones, R., (2007). Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. Food Chemistry, 105, 691–699.
- Castañeda-Ovando, A., Ma. de Lourdes Pacheco-Hernández, Ma. Elena, Pérez-Hernández, Rodríguez, J.A., & Galán-Vidal, C.A., (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. Food Chemistry, 113, 859–871.
- Kamangerpour, A., Ashraf-Khorassani, M., Taylor, L. T., McNair, H. M., & Chorida L., (2002). Supercritical Fluid Chromatography of polyphenolic compounds in grape seed extract. Chromatographia, 55, 417-421.
- Kammerer, D., Carle, R., & Schieber A., (2004). Quantification of anthocyanins in black carrot extracts (*Dacus carota* ssp. *Sativus* var. *atrorubens* Alef.) and evaluation of their color properties. European Food Research and Technology, 219, 479–486
- Naczki, M., & Shahidi, F., (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41, 1523–1542.
- Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., Robards, K., & Stockmann, R., (2005). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 823–837.
- Palenzuela, B., Arce, L., Macho, A., Munoz, E., Rios, A., & Valcarcel, M., (2004). Bioguided extraction of polyphenols from grape marc by using an alternative supercritical-fluid extraction method based on a liquid solvent trap. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 378, 2021–2027
- Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., & Nunez, M. J. (2004). Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). Food Chemistry, 85, 267–273.
- Popa, V.I., Dumitru, M., Volf, I., & Anghel, N., (2008). Lignin and polyphenols as allelochemicals. Industrial Crops and Products, 27, 144-149.

Tsao, R., & Yang, R., (2003). Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1018, 29–40.

Volf, I., Mamaliga, I., & Popa, V.I., (2006). Active principia with antioxidant character from vegetal by products, Equilibrium study of the polyphenolic compounds extraction from wood *Vitis sp.*, *Cellulose Chemistry and Technology*, 40, 205-209.

Wang, Z.-H., Hsu, C.-C., & Yin, M.-C., (2009). Antioxidative characteristics of aqueous and ethanol extracts of glossy privet fruit. *Food Chemistry*, 112, 914–918.

Zadernowski, R., Czaplicki, S., & Naczki, M., (2009). Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (*Garcinia mangostana*). *Food Chemistry*, 112, 685–689.

Zhang, Z., Chang, Q., Zhu, M., Huang, Y., Hoa, W. K.K., Chena, Z.Y., (2001), Characterization of antioxidants present in hawthorn fruits, *Journal of Nutritional Biochemistry* 12, 144–152

Wolfe, K. L., & Liu, R. H., (2003). Apple peels as a value-added food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1676–1683.

Wu, J.J., Lin, J.C., Wang, C.H., Jong, T.T., Yang, H.L., Hsu, S.L., Chang, C.M.J., (2009), Extraction of antioxidative compounds from wine lees using supercritical fluids and associated anti-tyrosinase activity, *Journal of Supercritical Fluids* 50, 33–41

Yanagida, A., Shoji, A., Shibusawa, Y., Shindo, H., Tagashira, M., Ikeda, M., & Ito, Y., (2006). Analytical separation of tea catechins and food-related polyphenols by high-speed counter-current chromatography. *Journal of chromatography A*, 1112, 195-201.