

**UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE
ASACHI" DIN IAȘI**

**ȘCOALA DOCTORALĂ A FACULTĂȚII DE
INGINERIE CHIMICĂ ȘI PROTECȚIA MEDIULUI**



***CONTRIBUȚII PRIVIND ELUCIDAREA MECANISMELOR IMPLICATE
ÎN PROCESELE DE EXTRAȚIE ȘI CARACTERIZARE A POLIFENOLILOR
CU ACTIVITATE BIOLOGICĂ FOLOSIND TEHNICI
NECONVENȚIONALE***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Doctorand: ing. Adina Iulia Talmaciu

Conducător de doctorat : Profesor univ. emerit. dr. ing. Valentin I. Popa

Către

Vă facem cunoscut că, în ziua de 24 martie 2017 la ora 10:00 în Sala de Consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și protecția Mediului , va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

**"CONTRIBUȚII PRIVIND ELUCIDAREA MECANISMELOR IMPLICATE ÎN PROCESELE DE EXTRAȚIE ȘI
CARACTERIZAREA A POLIFENOLILOR CU ACTIVITATE BIOLOGICĂ FOLOSIND TEHNICI
NECONVENȚIONALE"**

elaborată de doamna **drd. Ing Talmaciu Adina Iulia** în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

- | | |
|--|------------------------|
| 1. Prof. univ. dr. ing. Măluțan Teodor
Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași | președinte |
| 2. Prof. univ. emerit dr. ing. Popa I. Valentin
Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași | conducător de doctorat |
| 3. Prof. univ. dr. ing. Bahrim Gabriela
Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați | referent oficial |
| 4. Prof. univ. dr. ing. Volf Irina
Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași | referent oficial |
| 5. Cercetător științific II dr. ing. Spiridon Iuliana
Institutul de Chimie Macromoleculară Petru Poni din Iași | referent oficial |

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



RECTOR,
Prof.univ.dr.ing. **DAN CAȘCAVAL**

Secretar universitate,

Ing. Cristina Nagiț

**CONTRIBUȚII PRIVIND ELUCIDAREA MECANISMELOR IMPLICATE ÎN
PROCESELE DE EXTRACȚIE ȘI CARACTERIZARE A POLIFENOLILOR CU
ACTIVITATE BIOLOGICĂ FOLOSIND
TEHNICI NECONVENȚIONALE**

Adina Iulia Talmaciu
domeniul Inginerie Chimică

Președinte comisie doctorat:

Prof. dr. ing. Teodor Măluțan

Conducător de doctorat:

Prof. dr. ing. Valentin I. Popa

Referenți oficiali:

Prof. dr. ing. Gabriela Bahrim

Prof. dr. ing. Irina Volf

Dr. ing. Iuliana Spiridon

MULȚUMIRI

Doresc să adresez cele mai profunde mulțumiri domnului profesor universitar dr. ing. Valentin I. Popa pentru sprijinul, răbdarea și îndrumările neconținute oferite pe parcursul celor trei ani de pregătire universitară avansată de doctorat.

Îmi exprim gratitudinea față de distinșii membrii ai Comisiei de doctorat, domnului președinte profesor dr. ing. Teodor Măluțan și referenților oficiali, doamna profesor dr. ing. Bahrim Gabriela, doamna cercetător științific principal II dr. ing. Spiridon Iuliana.

Profundă recunoștință adresez doamnei conferențiar Irina Volf, tutore și membru al Comisiei de Doctorat, pentru sfaturile mereu prietenoase și motivante oferite pe întreg parcursul pregătirii mele universitare dar și pentru șansa de lucra sub îndrumarea dumneaei, într-unul dintre cele mai performante laboratoare de procesare complexă și integrată a biomasei.

De asemenea, mii de gânduri bune și mulțumiri le îndrept către sursa mea continuă de încredere în sine-mi și dorință de perseverență, dar totodată un sprijin real în desfășurarea cercetării experimentale și interpretarea rezultatelor, domnișoara Șef lucr. dr. ing. Liliana Lazăr.

Mulțumiri alese transmit de asemenea, doamnei profesor universitar dr. ing. Maria Gavrilescu, pentru șansa oferită de a beneficia de un stagiu de cercetare, prin intermediul programului Erasmus+ pe baza acordului avut cu Universitatea din Maribor, Slovenia. Pe aceiași cale, aduc mulțumirile mele colectivului laboratorului Procese de separare și designului produselor, condus de domnul profesor dr. Željko Knez, tutorele meu pe durata stagiului de cercetare. Mulțumesc Elena Markočič și Matej Ravber.

Gânduri alese transmit doamnei lect. dr. Csilla Iuliana Bâra de la Facultatea de Biologie a Universității Alexandru Ioan Cuza din Iași, și domnului lect. dr. ing. Corneliu Tănase de la Universitatea de Medicină și Farmacie din Târgu Mureș, pentru suportul acordat în realizarea studiilor experimentale privind aplicabilitatea extractelor polifenolice obținute asupra proceselor fiziologice și metabolice ale plantelor, dar și testarea activităților antibacteriene ale nanoparticulelor de argint sintetizate.

Nu în ultimul rând aduc mulțumiri, familiei mele, soțului meu drag, colegilor și prietenilor pentru întreg suportul moral și permanenta susținere oferite la orice pas făcut în formarea profesională.

Gânduri bune și mulțumiri alese tuturor, de la mic la mare, celor care m-au sprijinit!

Iași, Februarie 2017

CUPRINS

INTRODUCERE	5
--------------------------	----------

PARTEA I-A STUDIU DE LITERATURA

Capitolul 1. BIORAFINAREA - PROCEDEU PENTRU OBTINEREA DE COMPUȘI CU ACTIVITATE BIOLOGICĂ	11
1.1. Aspecte generale privind compușii activi din biomasă - compuși cu structură polifenolică	11
1.2. Surse naturale de compuși cu structură polifenolică - specii vegetale studiate	18
1.3. Procedee folosite pentru extracția compușilor cu structură polifenolică din biomasă.....	21
1.3.1. Tehnici convenționale	21
1.3.2 Tehnici neconvenționale	23
1.4. Metode de identificare, separare și caracterizare a compușilor cu structură polifenolică	28
1.4.1. Metode spectrofotometrice	29
1.4.2. Metode cromatografice	30
1.5. Studii privind analiza cinetică a proceselor de extracție	32
1.5.1. Cinetica proceselor de extracție asistată de ultrasunete	34
1.5.2. Cinetica proceselor de extracție cu fluide supercritice	37
1.6. Direcții de utilizare a extractelor polifenolice	39
1.6.1. Bioregulatori de creștere a plantelor	39
1.6.2. Sinteza nanoparticulelor de argint folosind extractele polifenolice	41

PARTEA II-A CONTRIBUȚII PROPRII

Capitolul 2. MATERIALE ȘI METODE	45
2.1. Metode aplicate pentru caracterizarea materialului vegetal	45
2.1.1. Mărunțirea materialului și determinarea distribuției granulometrice	45
2.1.2. Determinarea umidității	45
2.2. Metode aplicate pentru extracția compușilor polifenolici	47
2.2.1. Extracția cu etanol (Eth E)	46
2.2.2. Extracția asistată de ultrasunete (UAE)	46
2.2.3. Extracția cu fluide supercritice (SFE)	47
2.3. Metode spectrofotometrice și cromatografice de analiză cantitativă a compușilor polifenolici	48
2.3.1. Determinarea conținutului total de polifenoli, flavonoide și taninuri	48
2.3.2. Determinarea capacității antioxidante a extractelor din coaja de molid	50

2.3.3. Caracterizarea extractelor prin cromatografie lichidă de înaltă performanță.....	50
2.4. Teste privind aplicarea extractelor polifenolice ca regulatori de creștere a plantelor de busuioc	51
2.4.1. Teste de germinare. Acumularea pigmentilor clorofilieni și carotenoizi	51
2.4.2. Teste citogenetice	52
2.4.3. Studii histoanatomice	52
2.5. Sinteza nanoparticulelor de argint folosind extracte polifenolice	53
2.5.1. Sinteza nanoparticulelor de argint (NPAg)	53
2.5.2. Caracterizarea nanoparticulelor de argint	53
2.5.2.1. Analiza UV-VIS	53
2.5.2.2. Caracterizarea morfologică și structurală a nanoparticulelor de argint	53
2.5.3. Teste privind activitatea antimicrobiană/ antifungică a nanoparticulelor de argint	54
Capitolul 3. REZULTATE ȘI DISCUȚII	55
3.1. Caracterizarea materialului vegetal	55
3.2. Separarea compușilor polifenolici din coaja de molid prin extracție etanolică.....	55
3.3. Separarea compușilor polifenolici din coaja de molid prin extracție asistată de ultrasunete	56
3.3.1. Influența ultrasunetelor în procesul de extracție	56
3.3.2. Influența suprafeței de contact dintre solvent și materialul vegetal supus extracției	57
3.3.3. Influența temperaturii asupra procesului de extracție	58
3.4. Modelarea cinetică a procesului de extracție asistată de ultrasunete	59
3.4.1. Descrierea modelului matematic aplicat - modelul reacție de ordin doi	59
3.4.2. Determinarea parametrilor specifici modelului aplicat	60
3.4.3. Determinarea energiei de activare (E_a)	62
3.4.4. Validarea modelului aplicat	63
3.5. Separarea compușilor polifenolici din coaja de molid prin extracție cu fluide supercritice	64
3.5.1. Extracția compușilor lipofilici	65
3.5.2. Influența parametrilor de proces asupra randamentelor de extracție	66
3.5.2.1. Influența temperaturii	66
3.5.2.1. Influența presiunii	67
3.5.2.3. Influența debitului de co-solvent (EtOH-70%)	68
3.5.3. Studiu privind consumul de solvenți	70
3.5.4. Studiu privind influența parametrilor de proces asupra conținutului total de polifenoli, taninuri și flavonoide	71
3.5.4.1. Influența temperaturii	72
3.5.4.2. Influența presiunii	73
3.5.4.3. Influența debitului de co-solvent	73
3.5.5. Influența temperaturii, presiunii și debitului de co-solvent asupra activității antioxidante a extractelor polifenolice	74

3.6. Profilul cromatografic al extractelor polifenolice obținute	76
3.7. Analiza comparativă a conținutului total de polifenoli extras prin extracție etanolică, extracție asistată de ultrasunete și extracție cu fluide supercritice	77
3.8. Studii privind aplicarea extractelor polifenolice ca regulatori de creștere a plantelor de busuioc	79
3.8.1. Influența extractelor asupra germinării	80
3.8.2. Influența extractelor asupra intensității fotosintezei și acumulării de pigmenți fotoasimilatori	81
3.8.3. Influența extractelor asupra diviziunii celulare	83
3.8.4. Influența extractelor polifenolice asupra aspectelor histologice	86
3.9. Studii privind aplicarea extractelor polifenolice în sinteza nanoparticulelor de argint	88
3.9.1. Caracterizarea nanoparticulelor	89
3.9.1.1. Analiza UV-VIS	89
3.9.1.2. Caracterizarea morfologică și structurală a nanoparticulelor de argint	92
3.9.2. Activitatea antimicrobiană/ antifungică	94
CONCLUZII GENERALE	98
BIBLIOGRAFIE	102
ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ PERSONALĂ	111
ANEXE – LUCRĂRI PERSONALE	113

În rezumatul tezei de doctorat de prezintă cele mai reprezentative rezultate obținute în urma cercetărilor experimentale proprii, concluziile generale și bibliografie selectivă. La redactarea rezumatului s-au păstrat aceleași notații pentru capitole, paragrafe, tabele, figuri și ecuații ca în textul tezei de doctorat.

INTRODUCERE

În ultimii ani, o atenție deosebită a fost acordată proceselor de valorificare a resurselor vegetale, cercetările fiind focalizate pe proiectarea și implementarea unor procese inovatoare, care să respecte politicile europene bazate pe principiile de prevenire și control integrat al poluării și pe conceptele de dezvoltare durabilă, cu asigurarea sustenabilității. Pentru îndeplinirea acestor condiții este absolut necesară adoptarea unor tehnologii care să respecte cerințele proceselor de tip „biorefinery”, sau „verzi”, bazate pe principiile conceptului de „Green chemistry”. Astfel, în ultimul timp noi tehnologii au fost implementate pentru creșterea eficienței proceselor de extracție utilizând ultrasunetele, microundele sau acțiunea fluidelor supercritice pentru intensificarea acestora. Aceste tehnici sunt considerate a fi nepoluante și au marele avantaj că reduc consumul de energie și materii prime și oferă randamente mari de extracție a diferiților compuși cu activitate biologică din diverse bioresurse.

Necesitatea cercetărilor în acest domeniu este justificată pe de o parte de dorința valorificării complexe a materiilor prime vegetale rezultate ca subproduse și deșeuri din tehnologiile actuale de prelucrare, iar pe de altă parte de creșterea accentuată a cererii pentru produse naturale obținute prin procedee ieftine și nepoluante.

Ca urmare a acestui fapt, în ultimii ani interesul în acest domeniu de cercetare a crescut, numeroase studii privind stabilirea condițiilor optime de extracție a diferiților compuși din surse diverse de biomasă fiind realizate prin procedee neconvenționale (Talmaciu ș.a., 2015a). Cu toate acestea, datele privind operarea, simularea și eficientizarea acestora, prin prisma parametrilor cinetici specifici fiecărui proces, sunt încă insuficiente.

În literatura de specialitate datele privind modelarea cinetică a proceselor ce folosesc fluide supercritice sunt puține (Oliveira ș.a., 2011; Hasan și Farouk 2013; Huang ș.a., 2012) și vizează în principal determinarea influenței parametrilor de operare asupra extracției. În cercetările privind extracția compușilor polifenolici din biomasă, foarte puține studii au fost conduse în sensul investigării cinetice a acestor tipuri de procese, datele privind atât extracția polifenolilor din coaja de molid folosind extracția cu fluide supercritice (SFE), cât și condițiile de modelare cinetică a acestora fiind inexistente.

În acest context prin subiectul ales, teza de doctorat intitulată *Contribuții privind elucidarea mecanismelor implicate în procesele de extracție și caracterizare a polifenolilor cu activitate biologică folosind tehnici neconvenționale* are ca **obiectiv fundamental** realizarea unui studiu aprofundat asupra posibilităților de aplicare a proceselor de biorafinare, pentru valorificarea superioară a unor resurse de biomasă, larg accesibile la noi în țară, până în prezent insuficient valorificate, și anume a *deșeurilor de coajă de molid* provenite din industria de prelucrare a lemnului.

Ca procedee de valorificare prin *conversie în componenți cu valoare adăugată – polifenolii* - s-au studiat unele tehnici neconvenționale, și anume extracția asistată de ultrasunete și extracția cu fluide supercritice. Totodată, cercetările s-au îndreptat cu precădere asupra aspectelor de inginerie implicate în astfel de procese, dar și asupra aplicabilității extractelor obținute în diverse domenii, cum ar fi cel al sistemelor vegetale sau de sinteză utilizând agenți de reacție de proveniență vegetală.

Pentru realizarea acestui obiectiv fundamental s-au propus și urmărit o serie de *obiective specifice*, și anume:

- stabilirea unor **condiții preliminare de operare** a proceselor de **extracție folosind ultrasunete și fluide supercritice**;

Adina Talmaciu – Contribuții privind elucidarea mecanismelor implicate în procesele de extracție și caracterizarea a polifenolilor cu activitate biologică folosind tehnici neconvenționale

- realizarea unui **studiu cinetic** asupra procesului de **extracție asistat de ultrasunete** care să ofere date ce pot fi folosite pentru optimizarea și creșterea eficienței acestuia pe baza parametrilor cinetici specifici determinați;
- realizarea unei **analize comparative**, cu avantaje, dezavantaje și recomandări privind cele două **tehnici neconvenționale** studiate pentru **extracția compușilor polifenolici** din coaja de molid;
- **caracterizarea extractelor vegetale** obținute din punct de vedere al conținutului total de compuși polifenolici separați (cantitativ și calitativ) și a activității antioxidante a acestora;
- efectuarea unui studiu privind **influența extractelor polifenolice** obținute **asupra** principalelor **processe fiziologice și metabolice din sistemele vegetale**;
- identificarea și studierea unor noi **posibilități de utilizare** a **extractelor polifenolice** din coaja de molid - **sinteza nanoparticulelor de argint**.

Toate aceste obiective sunt prezentate de-a lungul celor trei mari capitole în care teza de doctorat a fost structurată.

În prima parte a tezei, în **Capitolul 1. Biorafinarea - procedeu pentru obținerea de compuși cu activitate biologică** se analizează stadiul actual al cercetărilor în domeniul extracției compușilor cu proprietăți biologice active, îndeosebi a compușilor polifenolici, atât la nivel național (inclusiv în cadrul grupului nostru de cercetare), cât și internațional. În acest capitol este sintetizată o selecție de date din literatura de specialitate, în care se prezintă informații referitoare la principalele tehnici de extracție utilizate global atunci când se întrebuintează materiale vegetale, de asemenea se descriu cele mai avansate metode de separare, identificare și cuantificare a compușilor polifenolici din plante, se prezintă principalele aspecte ce trebuie luate în considerare în realizarea studiilor cinetice, și se specifică câteva dintre direcțiile de aplicabilitate a extractelor vegetale obținute și caracterizate.

În cel **de-al doilea capitol - Materiale și metode**, se expun contribuțiile personale, fiind detaliată metodologia utilizată pentru realizarea cercetărilor experimentale. Acest capitol cuprinde cinci subcapitole, și anume:

- Subcapitolul *Metode aplicate pentru caracterizarea materialului vegetal*, include prezentarea modului de lucru urmărit în realizarea operațiilor preliminare privind utilizarea materialului vegetal, și anume mărunțirea, analiza granulometrică și determinarea umidității;
- Subcapitolul *Metode aplicate pentru extracția compușilor polifenolici*, conține descrierea procedeele de lucru și parametrilor studiați pentru extracția asistată de ultrasunete și cea cu fluide supercritice, în comparație cu metoda clasică bazată pe folosirea solvenților;
- Subcapitolul *Metode spectrofotometrice și cromatografice de analiză cantitativă a compușilor polifenolici*, include tehnicile de determinare a conținutului total de polifenoli, flavonoide și taninuri, a capacității antioxidante și de caracterizare a extractelor prin cromatografie lichidă de înaltă performanță;
- Subcapitolul *Teste privind aplicarea extractelor polifenolice ca regulatori de creștere a plantelor de busuioc*, oferă informații privind metodele de lucru folosite pentru studiul testelor de germinare, acumulare de pigmenți clorofilieni și carotenoizi, precum și a testelor citogenetice și studiilor histoanatomice;

- Subcapitolul *Sinteza nanoparticulelor de argint (NPAg) folosind extracte polifenolice*, cuprinde modul de lucru pentru sinteza NPAg și descrierea metodelor de caracterizare a nanoparticulelor obținute și teste privind activitatea antimicrobiană/ antifungică a NPAg.

În **capitolul 3 – Rezultate și discuții** sunt prezentate rezultatele cercetărilor experimentale realizate. Pe baza acestor rezultate discuțiile aferente se axează pe:

- sublinierea parametrilor optimi găsiți drept favorabili pentru creșterea conținuturilor totale de compuși polifenolici extrași;
- prezentarea unei analize comparative între cele trei tehnici studiate prin evidențierea eficienței celor două metode neconvenționale în raport cu: valoarea conținutului total de polifenoli extrași, puritatea extractelor obținute, selectivitatea metodei față de compușii investigați și aspectele economice;
- caracterizarea extractelor vegetale din punct de vedere al compușilor bioactivi obținuți;
- prezentarea studiilor experimentale privind aplicabilitatea extractelor obținute ca bioregulatori de creștere a plantelor sau agenți de biosinteză a unor nanoparticule metalice;
- prezentarea analizei cinetice a procesului de extracție asistată de ultrasunete, care oferă date ce pot fi folosite pentru simulări de transpunere a procesului de extracție la nivel pilot sau chiar industrial.

Prin prisma direcției de cercetare aleasă, din punct de vedere al **obiectivului general propus**, cel de *aprofundare a cunoștințelor în domeniul tehnologiilor inovatoare de extracție, și din dorința de a dezvolta noi soluții de valorificare complexă a unor deșeuri vegetale (coaja de molid), în vederea obținerii de noi produse cu potențial de comercializare și aplicabilitate*, tema de cercetare poate fi încadrată în domeniul biotehnologiilor axate pe aplicarea principiilor corespunzătoare conceptului de Green chemistry, pentru o dezvoltare durabilă și sustenabilă, până în prezent insuficient dezvoltate la nivel industrial în România.

De asemenea, lucrarea se conectează cu direcțiile de cercetare din domeniul mediului, direcția de cercetare - modalități și mecanisme pentru reducerea poluării mediului.

Importanța cercetărilor în acest sens este justificată pe de o parte de *necesitatea valorificării complexe* (nu numai pentru obținere de energie) a unor *materii prime vegetale* incluse în categoria *subproduselor și deșeurilor* rezultate din tehnologiile actuale de prelucrare, iar pe de altă parte de *creșterea accentuată a cererii pentru produsele naturale obținute din plante*.

Extrapolând rezultatele prezentate în teza de doctorat, se pot proiecta și optimiza noi procese și tehnici de extracție a compușilor bioactivi cu structură polifenolică din biomasă, a căror aplicabilitate în diferite domenii care vizează sectoare precum industria cosmetică și farmaceutică, medicina, industria alimentară, chimică, creșterea plantelor sau bioremedierea solurilor a fost deja certificată (Bujor ș.a., 2015; Tanase ș.a., 2014; Volf ș.a., 2012).

Obținerea unora dintre rezultatele experimentale prezentate în această lucrare de doctorat, a fost posibilă și prin participarea la un stagiul de cercetare, tip internship, accesat prin cadrul programului Erasmus+. Acesta s-a realizat pe parcursul a patru luni (martie - iulie 2015) la Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică din cadrul Universității Maribor din Slovenia și a avut ca scop studierea mecanismelor implicate în procesele de extracție și caracterizarea a polifenolilor folosind fluide supercritice. Datele obținute și prezentate în cadrul tezei de doctorat s-au concretizat în 6 lucrări publicate în reviste cotate ISI (5 lucrări) și CNCSIS (B+), (1 lucrare), precum și 4 comunicări la diverse manifestări științifice naționale și internaționale.

Capitolul 1

BIORAFINAREA - PROCEDEU PENTRU OBTINEREA DE COMPUȘI CU ACTIVITATE BIOLOGICĂ

1.1. Aspecte generale privind compușii activi din biomasă - compuși cu structură polifenolică

Una dintre cele mai mari provocări cu care se confruntă societatea la nivel actual este trecerea de la o economie care se bazează, în mare parte pe folosirea materiilor prime fosile neregenerabile, la o economie care să utilizeze resursele regenerabile și care să asigure, în conformitate cu definiția conceptului de dezvoltare durabilă, satisfacerea nevoilor generației prezente fără a compromite posibilitatea generațiilor viitoare de a-și satisface propriile nevoi.

Dintre diferitele forme de resurse regenerabile (energie solară, eoliană, geotermală), doar *biomasa*, care include culturi agricole (atât alimentare, cât și furajere), culturi energetice cu potențial ridicat, deșeuri din agricultură și silvicultură și plante acvatice, este o *resursă* care reprezintă baza atât pentru obținerea de combustibili, cât și pentru diferiți componenți chimici cu valoare adăugată (Sheldon 2011).

În prezent, pentru utilizarea și valorificarea biomasei pot fi aplicate diverse tehnologii de conversie a acesteia în produși cu valoare adăugată (figura 1.3), în funcție de aplicabilitatea produsului final rezultat. În ultimii ani, cercetările au fost centrate pe proiectarea și implementarea proceselor în concordanță cu politicile europene bazate pe principiile de prevenire și control integrat al poluării, valorificarea deșeurilor și subproduselor rezultate, pe tot ciclul de viață al produselor, care reprezintă una dintre direcțiile fundamentale de acțiune.

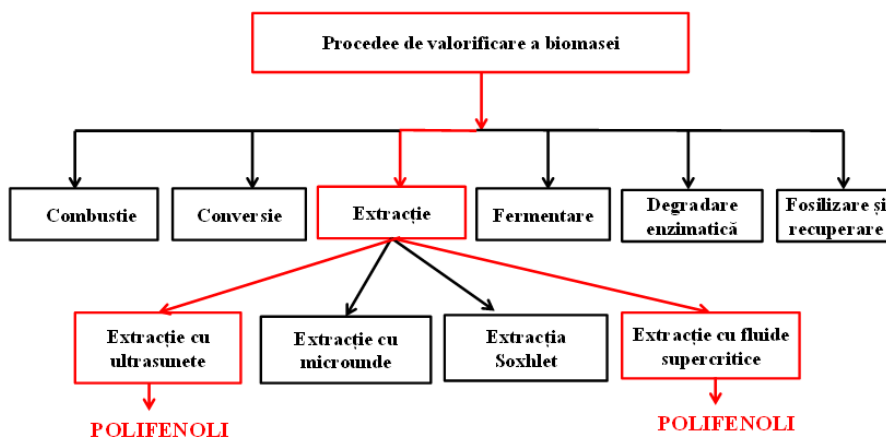


Figura 1.3. Procedee de valorificare a biomasei

1.2. Surse naturale de compuși cu structură polifenolică - specii vegetale studiate

În ultimii ani interesul față de extracția compușilor activi din biosurse, în special a polifenolilor, a crescut ca urmare a faptului că aceștia sunt recunoscuți pentru proprietățile lor biologice valoroase (Popa 2013), reprezentând surse naturale de antioxidanți și bioproduse precum: aditivi alimentari, produse cosmetice și farmaceutice, alelochimicale, ș.a. (Bujor ș.a. 2015, Volf ș.a. 2014, Volf ș.a., 2012, Popa ș.a., 2008).

Speciile de conifere reprezintă de asemenea bine cunoscute și importante surse de compuși polifenolici, în special taninuri, a căror concentrație variază în structura vegetală, în general funcție

de plantă și diferitele părți morfo-anatomice ale acestora (cantități mai mari fiind prezente în general în coajă, rădăcini, noduri și duramen), (Diouf ș.a. 2009), a căror utilizare în industria de prelucrare a pieilor (tăbăcire) este practică din cele mai vechi timpuri.

Pe baza acestor informații, pentru *cercetarea experimentală* a fost aleasă una cele mai comune specii de conifere, și anume: *molidul*, coaja acestuia fiind recunoscută pentru conținutul ridicat de compuși polifenolici.

Cercetările asupra extracției polifenolilor din coajă de molid (figura 1.9) cât și asupra posibilităților de utilizare a acestor extracte s-au intensificat în ultimii ani. Astfel, s-au făcut cercetări pentru a evidenția capacitatea acestor compuși în procesele de dezvoltare a plantelor (Ignat ș.a., 2009; Tanase ș.a., 2011), în procesele de bioacumulare a metalelor grele în plante (Stingu ș.a., 2011; Stingu ș.a., 2012), de utilizare ca agenți de chelatizare (Volf ș.a., 2012) alelochemicale (Popa ș.a., 2008) sau pentru activitățile antifungice (Dănilă și Popa, 2008). De asemenea, au fost realizate studii folosind extracte polifenolice din coaja de molid pentru a analiza capacitatea acestor principii active ca antioxidanți și agenți anti-inflamatori (Diouf ș.a., 2009).

Capitolul 2.

MATERIALE ȘI METODE

2.2. Metode aplicate pentru extracția compușilor polifenolici

Obiectivul general al tezei este cel de realizare a unui studiu aprofundat asupra proceselor neconvenționale de extracție a polifenolilor din coaja de molid, provenite ca deșeuri din industria forestieră și de prelucrare a lemnului, disponibile în cantități însemnate la nivel național, în prezent deloc sau ineficient valorificate din punct de vedere al componentelor chimici.

Astfel, s-au ales pentru studiu două dintre tehnicile neconvenționale de extracție, considerate revoluționare din punct de vedere al eficiențelor oferite și a impactului redus asupra mediului. Aceste tehnici sunt: extracția asistată de ultrasunete (UAE) și extracția folosind fluide supercritice (SFE). Concomitent, s-a aplicat și una dintre tehnicile clasice de extracție, și anume extracția cu solvenți (etanol 70%), rezultatele fiind folosite la realizarea unei analize comparative amănunțite asupra acestor tipuri de procese.

2.3. Metode spectrofotometrice și cromatografice de analiză cantitativă a compușilor polifenolici

2.3.1. Determinarea conținutului total de polifenoli, flavonoide și taninuri

Conținutul total de polifenoli al extractelor din coaja de molid s-a determinat spectrofotometric folosind metoda Folin-Ciocalteu, care se bazează pe proprietatea compușilor fenolici de a reduce molibdenul din reactivul Folin-Ciocalteu (amestec de acid fosfomolibdic și acid fosfowolframic). Conținutul total de polifenoli, exprimat în mg echivalenți acid galic (GAE)/g biomasă, s-a calculat în funcție de absorbanța citită la spectrofotometru pentru lungimea de undă de 765 nm, luând în considerare curba de calibrare a soluției standard de acid galic.

Conținutul total de taninuri a fost determinat folosind o metodă adaptată după metoda Folin-Denis (Ravber ș.a., 2015) care se bazează pe același principiu al oxidării compușilor fenolici în prezența reactivului Folin-Denis, (amestec de wolframat de sodiu și acid molidic). Pentru determinarea CTT s-a utilizat curba de calibrare a acidului tanic (TA), rezultatele finale fiind exprimate în miligrame de acid tanic pe gram extract uscat (mg TA/ g extract uscat).

Conținutul total de flavonoide a fost determinat în conformitate cu metoda colorimetrică a clorurii de aluminiu (cu viraj de culoare spre galben în prezenta flavonoidelor). Aceasta permite depistarea flavonoidelor din extracte vegetale, în prezența etanolului, hexaclorurii de aluminiu și acetatului de sodiu, determinată la 415 nm. Rezultatele obținute au fost exprimate ca miligrame de quercetină pe gram de extract uscat (mg Q/g extract uscat).

2.3.2. Determinarea capacității antioxidante a extractelor din coaja de molid

Activitatea antioxidantă a extractelor din coaja de molid s-a determinat pe baza testului DPPH, folosind radicalul liber stabil 2,2-difenil-1-picrilhidrazil - DPPH. Testul DPPH permite evaluarea capacității unui compus fenolic de a ceda atomi de hidrogen. În urma schimbului de electroni radicalul DPPH, de culoare violet și absorbantă măsurabilă la 515 nm, este redus la fenil picril hidrazină, compus de culoare galbenă.

2.3.3. Caracterizarea extractelor prin cromatografie lichidă de înaltă performanță

Pentru analiza HPLC, extractele lichide obținute au fost fracționate prin extracție lichid-lichid cu acetat de etil (1:2 v/v). Separarea și identificarea acizilor polifenolici, s-a realizat utilizând un sistem cromatografic DIONEX Ultimate 3000, echipat cu un detector UV-VIS PDA, pe o coloana C18 Zorbax RX 4.5x250 mm și 5μm diametrul particulelor, utilizând ca faze mobile (A) - acid acetic 1% în apă ultrapură și (B) - metanol, la temperatura de 30 °C, cu un debit de 1,2 mL/min și gradient de 10 - 40 % B în 40 minute. Metoda folosită, permite identificarea și cuantificarea (pe baza curbelor de calibrare a standardelor) a șapte compuși fenolici și anume: catechina, acizii galic, vanilic, sinapic, *p*-cumaric, siringic și ferulic.

2.4. Teste privind aplicarea extractelor polifenolice ca regulatori de creștere a plantelor de busuioc

Experimentele folosind semințele de busuioc au fost precedate de un număr mare de teste de laborator pentru a se stabili influența compușilor polifenolici asupra principalelor procese fiziologice și de biosinteză implicate în germinarea semințelor și dezvoltarea plantulelor rezultate. În acest scop au fost efectuate teste de germinare a semințelor și analize fiziologice, citogenetice și histoanatomice.

2.5. Sinteza nanoparticulelor de argint folosind extracte polifenolice

Pentru sinteza nanoparticulelor de argint, extractul vegetal din coajă de molid a fost amestecat, în diferite proporții (1:10, 1:50 și 1:100) cu o soluție de azotat de argint 1 mM. Pentru intensificarea reducerii ionilor de AgNO₃, soluțiile preparate au fost ținute sub agitare permanentă și încălzite până la o temperatură maximă de 70 °C pentru timpi variabili de reacție.

Nanoparticulele formate s-au caracterizat din punct de vedere dimensional, morfologic și structural. De asemenea s-a testat activitatea antibacteriană a acestora asupra a cinci culturi bacteriene, atât gram negative (*Staphylococcus aureus* și *Pseudomonas aeruginosa*) cât și gram pozitive (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* și *Klebsiella pneumoniae*).

Capitolul 3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

3.1. Caracterizarea materialului vegetal

Coaja de molid a fost caracterizată din punct de vedere al umidității și distribuției granulometrice. Astfel, coaja de molid folosită în studiile experimentale s-a caracterizat printr-un conținut de umiditate de $10,44 \pm 0,18$ % și o distribuție granulometrică a particulelor după mărunțire, formată din 55% particule cu dimensiunea cuprinsă între 0,25 - 1 mm, 30% particule cu dimensiunea particulelor mai mică de 0,25 mm și 15 % particule cu dimensiunea între 1 și 2 mm. Diametrul mediu determinat al particulelor mărunțite a fost de 0,6 mm.

3.2. Separarea compușilor polifenolici din coaja de molid prin extracție etanolică

Variația în timp a CTP al extractelor din coaja de molid (*Picea abies*) obținute prin extracție etanolică este prezentată în figura 3.1. Maximul concentrației totale de polifenoli de 87,15 mg GAE/g biomasă a fost atins după 6 zile (8640 minute) de extracție. După această perioadă, s-a înregistrat o scădere cu 11,2 % a CTP, fapt ce poate fi pus în seama reabsorbirii acestora în materialul vegetal, după atingerea stării de echilibru.

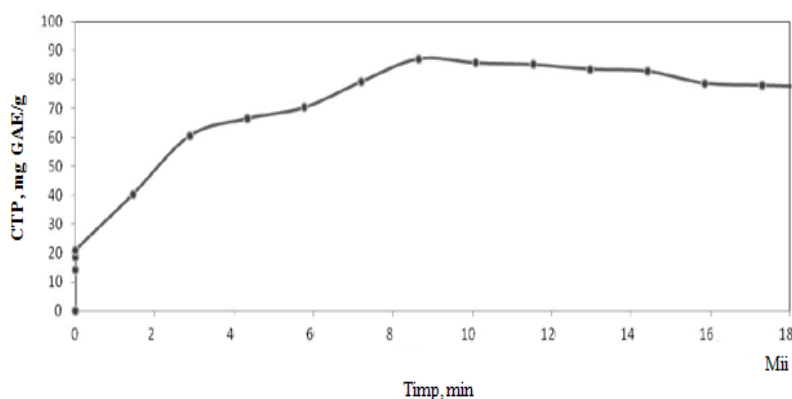


Figura 3.1. Conținutul total de polifenoli al extractelor din coaja de molid (*Picea abies*) obținute prin extracție etanolică

3.3. Separarea compușilor polifenolici din coaja de molid prin extracție asistată de ultrasunete

Pentru aprecierea performanței procesului de extracție asistată de ultrasunete și determinarea conținutului total de polifenoli ce pot fi separați din coaja de molid s-a investigat experimental influența principalilor parametri asupra procesului. În acest sens s-a studiat variația în timp a concentrației totale de polifenoli extrași (TPC, în mg GAE/g coajă de molid) în prezența și în absența ultrasunetelor, suprafața de contact expusă acțiunii ultrasunetelor și temperatura de extracție. Toate aceste date fiind folosite ulterior pentru studiul cinetic realizat asupra procesului de extracție, cu scopul determinării parametrilor critici ce influențează evoluția acestuia.

3.3.1. Influența ultrasunetelor în procesul de extracție

S-a constatat faptul că prezența ultrasunetelor îmbunătățește semnificativ randamentul de extracție, CTP-ul dublându-și valoarea comparativ cu cel obținut în procedeul clasic (figura 3.2).

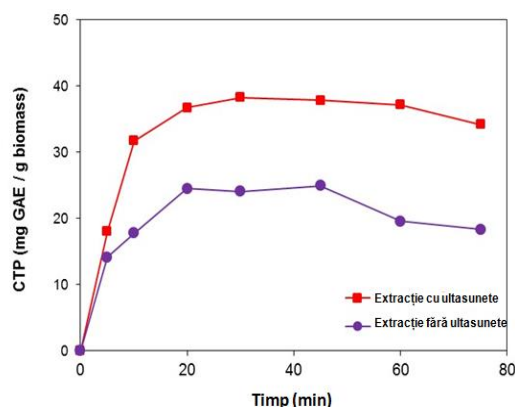


Figura 3.2. Influența prezenței/ absenței ultrasunetelor asupra conținutului total de polifenoli al extractelor din coaja de molid (*Picea abies*)

3.3.3. Influența temperaturii asupra procesului de extracție

După cum se poate observa în figura 3.4, CTP crește odată cu creșterea temperaturii, atingând valoarea maximă de 42,5 mg GAE/g coajă de molid după 30 min de extracție, la temperatura de 60 °C. La această temperatură, conținutul total de polifenoli determinat a fost cu cca. 10 % mai mare decât în cazul extracției efectuate la temperatura de 45 °C, când conținutul total de polifenoli maxim extras a avut valoarea de 33,48 mg GAE/g coajă de molid. Acest comportament poate fi datorat solubilității mai mari a polifenolilor în solventul de extracție, dar totodată și difuziei ridicate a moleculelor extrase sau a transferului de masă mai rapid la temperaturi înalte.

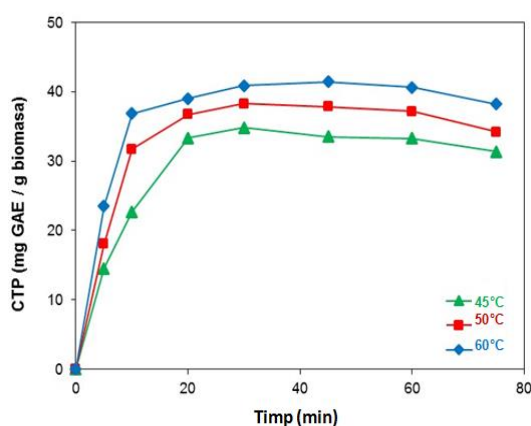


Figura 3.4. Influența temperaturii asupra conținutului total de polifenoli al extractelor din coaja de molid în prezența ultrasunetelor pentru diferiți timpi de extracție

3.4. Modelarea cinetică a procesului UAE

3.4.2. Determinarea parametrilor specifici modelului aplicat

Datele experimentale obținute în urma studiului procesului de extracție a compușilor polifenolici din coaja de molid în prezența ultrasunetelor (prezentate în figura 3.4) au fost prelucrate matematic și reprezentate grafic în coordonatele specifice modelului cinetic al reacției de ordin doi (figura 3.5). Validarea acestui model cu datele experimentale a fost demonstrată de valori ale coeficienților de regresie de $R^2 > 0.98$.

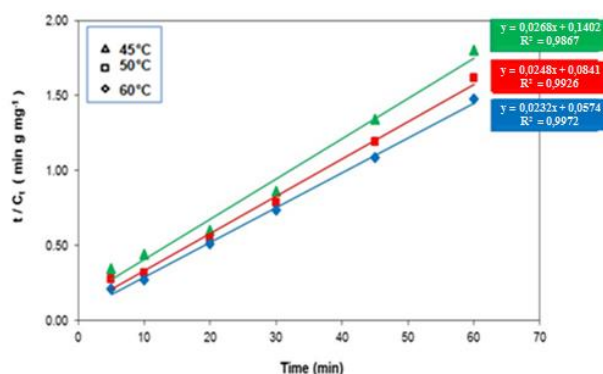


Figura 3.5. Validarea modelului matematic cu datele experimentale obținute

Folosind ecuațiile de regresie matematică stabilite, pentru fiecare temperatură în parte s-au calculat parametrii cinetici specifici modelului și anume capacitatea de extracție (concentrația la saturație – C_s), constanta de viteză de ordin doi (k) și viteza inițială de extracție (h), prezentați în tabelul 3.1. Din acest tabel se observă că parametrii cinetici calculați sunt influențați de temperatura de extracție.

Tabel 3.1. Parametri cinetici specifici modelului reacției de ordin doi

Temperatura (°C)	$B = 1/C_s$	$A = 1/h$	$C_s = 1/B$, (mg/g)	$h = 1/A$	$k = h/(C_s)^2$ (g/mg · min)	R^2
45	0,0268	0,1402	37,31343	7,133	0,0051	0,9867
50	0,0248	0,0841	40,32258	11,891	0,0073	0,9926
60	0,0232	0,0574	43,10345	17,22	0,0094	0,9972

3.4.3. Determinarea energiei de activare (E_a)

Forma liniarizată a ecuației Arrhenius (6) obținută prin extrapolarea $\ln k$ versus $1/T$, arată faptul că viteza de extracție crește cu creșterea temperaturii (figura 3.8). După cum rezultă din această ecuație, dacă k_0 și k sunt cunoscute, poate fi calculată energia de activare.

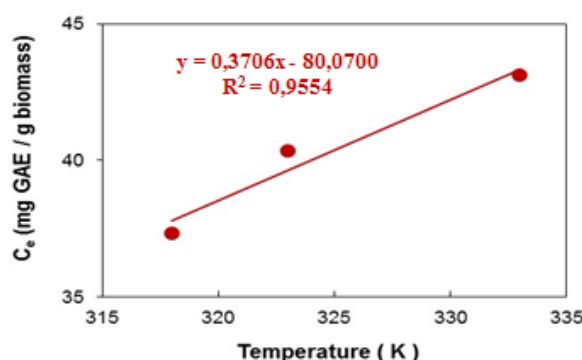


Figura 3.8. Relația dintre temperatură și constanta de viteză de ordin doi

Valoarea energiei de activare obținută este pozitivă ($E_a = 33,726$ kJ/mol), arătând faptul că procesul de extracție a compușilor polifenolici din coaja de molid este un proces endoterm. Această valoare se încadrează între valorile energiei de activare raportate în literatura de specialitate pentru studiile privind extracția solid-lichid a compușilor bioactivi din biomasă. Valoarea E_a este situată între 20 și 40 kJ mol⁻¹, ceea ce înseamnă că procesul de extracție a polifenolilor din scoarță de molid este guvernat după un regim mixt reacție chimică și de difuziune (Wang ș.a. 2013, Gonzalez-Centeno

ș.a.,2015).

3.4.4. Validarea modelului aplicat

Concordanța dintre datele experimentale și cele prezise folosind modelul matematic a fost determinată prin calculul coeficientului de determinare (R^2), folosind relația (11):

$$r^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (11)$$

unde n reprezintă numărul de experimente, y_i reprezintă datele prezente luate în considerare caracteristice experimentului i , $\hat{y}_i$ sunt datele prezise specific experimentului i , $\bar{y}$ reprezintă valoarea medie a datelor experimentale. Valorile acestui coeficient sunt cuprinse între 0 și 1, o valoare a lui R^2 mare indicând o mai bună compatibilitate dintre datele experimentale și cele prezise.

Concentrațiile totale de polifenoli calculate (prezise) folosind ecuația (9) au fost comparate cu conținutul total de polifenoli determinat pentru datele experimentale obținute la temperaturile de extracție de 45 °C și 60 °C (figura 3.9), observându-se o bună concordanță între acestea.

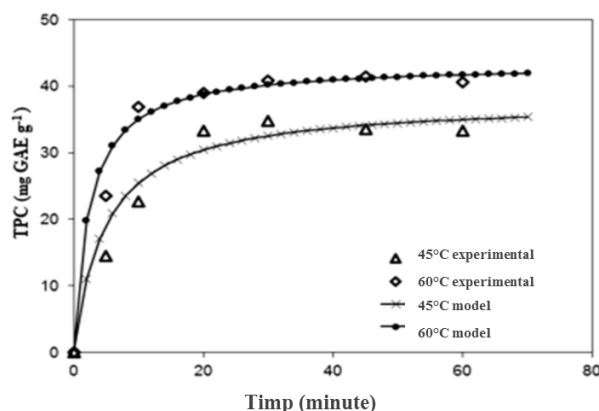


Figura 3.9. Compararea dintre datele experimentale și cele calculate folosind modelul reacției de ordin doi pentru determinarea CTP al extractelor din coaja de molid obținute prin UAE

3.5. Separarea compușilor polifenolici din coaja de molid prin extracție cu fluide supercritice

Procesul de extracție s-a realizat fracționat, în două etape, prin adoptarea parametrilor de proces pentru a separa secvențial compușii lipofilici și volatili de extractul polifenolic.

3.5.1. Extracția compușilor lipofilici

Randamentele obținute în prima etapă de extracție, referitoare la cantitățile de compuși lipofilici și rășini, exprimate ca rapoarte între masa de extract obținută (g) și masa de probă supusă extracției (g), sunt sintetizate în tabelul 3.2.

Tabelul 3.2 Randamentele extracției în condiții supercritice a compușilor lipofilici din coaja de molid

Presiune (bar/ psi)	Temperatură (°C)	Randament de extracție (%)
100/ 1450	40	0,65 ± 0,01
100/ 1450	50	0,80 ± 0,05
100/ 1450	60	0,70 ± 0,01
150/ 2175	50	1,81 ± 0,02
200/ 2900	50	2,08 ± 0,06

3.5.2. Influența parametrilor de proces asupra randamentelor de extracție

3.5.2.1. Influența temperaturii

Pentru a studia efectul temperaturii asupra randamentelor de extracție, experimentele au fost efectuate la trei temperaturi diferite, și anume 40 °C, 50 °C și 60 °C, menținând presiunea de și debitul de CO₂ și EtOH-70 constante la 100 bar și 250 mL CO₂/ min respectiv 1,2 mL EtOH-70/ min. În figura 3.10 este reprezentat efectul temperaturii asupra randamentelor de extracție a compușilor polifenolici, funcție de timp.

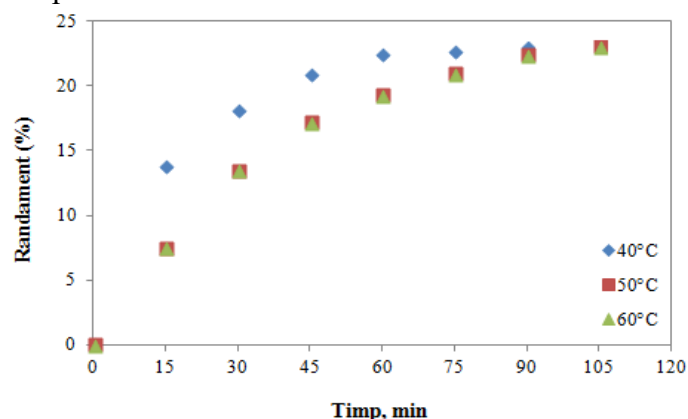


Figura 3.10. Efectul temperaturii asupra randamentelor de extracție a compușilor polifenolici din coaja de molid (P = 100 bar, 250 mL CO₂/ min și 1,2 mL EtOH-70 /min)

3.5.2.2. Influența presiunii

Influența presiunii asupra randamentului de extracție a compușilor polifenolici din coaja de molid funcție de timpul de extracție, poate fi observată în figura 3.11. Experimentele au fost efectuate la trei presiuni de lucru diferite, și anume 100 bar, 150 bar și 200 bar. Temperatura de extracție a fost menținută constantă la 50 °C, debitul utilizat fiind de 250 mL CO₂/min, respectiv 1,2 mL EtOH-70/min.

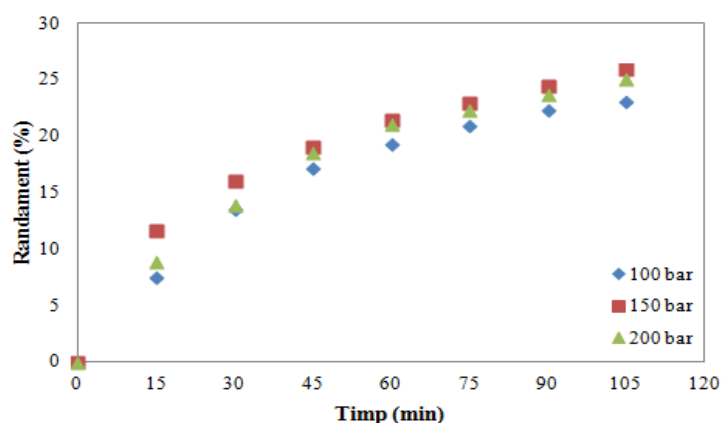


Figura 3.11. Efectul presiunii asupra randamentului de extracție a compușilor polifenolici din coaja de molid (T= 50 °C, debite de 250 mL CO₂/ min și 1,2 mL EtOH-70/min)

Se poate observa faptul că, volumul de co-solvent utilizat are o influență pozitivă asupra randamentului de extracție. Randamentele maxime de $31,18 \pm 0,50\%$ și $30,56 \pm 0,80\%$ au fost recuperate la debitul maxim de EtOH-70 introdus în sistem (2,5 mL/ min) pentru presiunea de 100 bar și temperatura de 40 °C. Acest comportament poate fi atribuit faptului că la concentrații mai mari de co-solvenți solubilitatea compușilor fenolici crește semnificativ (Benelli ș.a., 2010).

3.5.3. Studiu privind consumul de solvenți

Folosind datele experimentale obținute, s-au construit curbele globale de extracție ca medie a două experimente individuale, efectuate în aceleași condiții de lucru. Pe baza acestor curbe grafice, a fost monitorizat consumul de CO₂ și EtOH-70 în funcție de randamentele de extracție înregistrate. Consumul de solvenți calculat (Figura 3.13) a fost exprimat în kg solvent necesar pentru extragerea unui kg de coajă de molid.

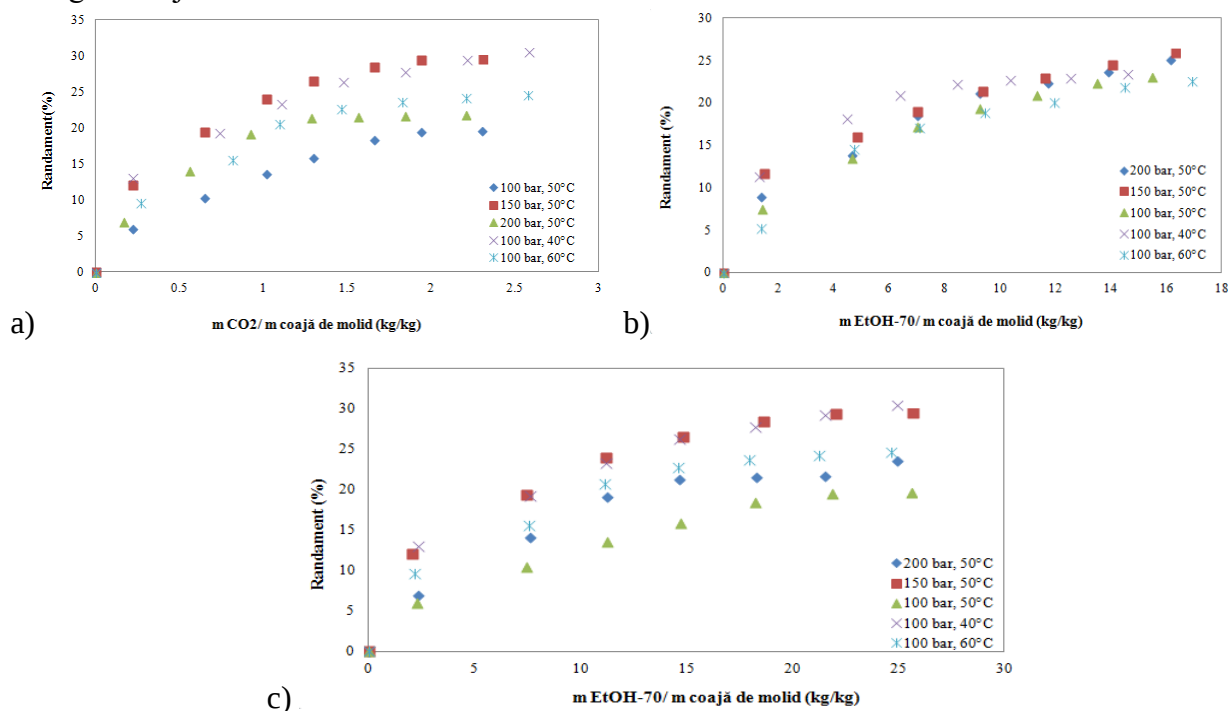


Figura 3.13. Consumul de solvenți înregistrat pentru extracția supercritică a polifenolilor din coaja de molid: a) consumul de CO₂; b) consumul de EtOH-70 pentru debitul de lucru de 1,2 mL/min; c) consumul de EtOH-70 pentru debitul de lucru de 2,5 mL/min

Datele experimentale au arătat un consum de CO₂ (kg CO₂/ kg coajă de molid) mai mic, comparativ cu, consumul de EtOH-70 (kg EtOH-70/ kg coajă de molid). Astfel pentru obținerea randamentului maxim de extracție (30,46 %) este necesar un consum total de aproximativ 2,5 kg CO₂ (cu o variație de $\pm 0,5$ kg, cauzată de abaterea de la debit) și respectiv 24,94 kg EtOH-70/kg coajă molid.

3.5.4. Studiu privind influența parametrilor de proces asupra conținutului total de polifenoli, taninuri și flavonoide

După studierea impactului pe care principalii parametri de proces îl au asupra randamentelor globale de extracție, s-a dorit stabilirea modului în care aceștia acționează individual asupra conținutului total de polifenoli, flavonoide și taninuri, dar și asupra proprietăților antioxidante ale extractelor obținute, rezultatele înregistrate fiind prezentate în cele ce urmează.

3.5.4.1. Influența temperaturii

În tabelul 3.3 sunt prezentate valorile conținutului total de polifenoli (CTP), conținutului total de flavonoide (CTF) și conținutul total de taninuri (CTT) al extractelor din coaja de molid prelevate la fiecare 15 min de extracție, pentru cele trei temperaturi de lucru studiate.

Se poate observa că, pentru condițiile studiate (la toate cele trei temperaturi investigate) valorile CTP, CTF și TTC variază în cea mai mare parte în primele 15 - 30 min de extracție. După această perioadă, o scădere semnificativă a conținutului de compuși fenolici poate fi observată odată cu creșterea suplimentară a timpului de extracție.

Tabelul 3.3 Efectul temperaturii asupra conținutului total de polifenoli, flavonoide și taninuri al extractelor din coaja de molid obținute prin extracție supercritică

Temperatură	Conținut fenolic (mg/ g extract uscat)	Timp (min)						
		15	30	45	60	75	90	105
40 °C	CTP ^a	679,26	690,94	163,91	87,78	4,08	38,19	27,26
	CTF ^b	120,40	119,83	22,20	31,45	36,83	32,46	19,09
	CTT ^c	129,94	111,47	26,02	10,43	3,72	1,45	0,98
50 °C	CTP ^a	422,22	477,16	333,91	189,05	132,55	128,45	71,73
	CTF ^b	33,58	36,83	31,95	26,68	23,16	22,98	17,34
	CTT ^c	73,06	71,71	50,58	31,52	18,26	13,24	9,49
60 °C	CTP ^a	997,61	829,35	260,88	102,90	69,95	35,28	23,96
	CTF ^b	39,95	32,83	10,44	8,16	6,11	5,86	5,18
	CTT ^c	131,74	253,64	161,17	119,68	69,36	55,80	23,01

^a mg GA/ g extract uscat; ^b mg Q/ g extract uscat; ^c mg TA/ g extract uscat
(GA - acid galic, Q - quercitin, TA - acid tanic)

3.5.4.2. Influența presiunii

Influența presiunii asupra conținutului total de polifenoli, flavonoide și taninuri, s-a studiat prin variația presiunii de la 100 la 200 bar, la o temperatură constantă de 50 °C și debit constant de solvent de 250 mL CO₂/ min, respectiv co-solvent de 1,2 mL EtOH-70/ min.

În tabelul 3.4. se poate observa, că valoarea conținutului total de polifenoli recuperată crește de la 422,22 mg/g extract uscat la 525,02 mg/g extract uscat, atunci când presiunea este mărită de la 100 bar la 150 bar, în primele 15 min de extracție. O creștere suplimentară a presiunii la 200 bar determină o scădere a CTP extras, până la 377,44 mg/g extract uscat.

Tabelul 3.4 Efectul presiunii asupra conținutului total de polifenoli (CTP), flavonoide (CTF) și taninuri (CTT) extrași din coaja de molid prin extracție supercritică

Presiune	Conținut fenolic (mg/g extract uscat)	Timp (min)						
		15	30	45	60	75	90	105
100 bar	CTP ^a	422,22	477,16	333,91	189,05	132,55	128,45	71,73
	CTF ^b	33,58	36,83	31,95	26,68	23,16	22,98	17,34
	CTT ^c	73,06	71,71	50,58	31,52	18,26	13,24	9,49
150 bar	CTP ^a	525,02	447,90	172,26	130,26	61,43	64,25	30,75
	CTF ^b	21,96	23,35	29,01	39,91	21,72	18,55	6,47
	CTT ^c	109,64	82,92	36,52	17,65	7,96	4,40	3,10
200 bar	CTP ^a	377,44	399,09	263,12	137,11	80,84	52,36	9,33
	CTF ^b	17,90	17,43	18,08	26,85	21,79	20,97	19,95
	CTT ^c	86,57	62,91	39,94	18,69	10,85	6,75	3,36

^a mg GA/ g extract uscat; ^b mg Q/ g extract uscat; ^c mg TA/ g extract uscat
(GA - acid galic, Q - quercitin, TA - acid tanic)

3.5.4.3. Influența debitului de co-solvent

Studiul influenței cantității de co-solvent adăugată ca modificador la solventul principal de extracție, s-a realizat la doua valori ale debitului introdus în sistem, și anume la 1,2 mL EtOH-70/min, respectiv 2,5 mL EtOH-70/min. Pentru determinarea conținutului total de polifenoli, flavonoide și taninuri, extracțiile s-au desfășurat la temperatură și presiune constantă de 50 °C și 150 bar, probele fiind la fiecare 15 min de extracție.

După cum se poate observa în tabelul CTP, CTF și CTT cresc odată cu creșterea debitului de EtOH-70. Adăugarea unor cantități mai mari de co-solvent, îmbunătățește solubilitatea polifenolilor, flavonoidelor și taninurilor, și în același timp, aceștia fiind recuperați într-un ritm mai rapid, materialul ajungând la epuizare în primele 30 - 45 minute de extracție.

Tabelul 3.5. Efectul debitului de co-solvent asupra conținutului total de polifenoli, flavonoide și taninuri al extractelor din coaja de molid (extracție supercritică, T = 50 °C, P = 150 bar)

Condiții de lucru		Timp (min)						
		15	30	45	60	75	90	105
1,2 mL/ min EtOH-70, 150 bar, 50 °C	CTP ^a	525,02	447,90	172,26	130,26	61,43	64,25	30,75
	CTF ^b	21,96	23,35	29,01	39,91	21,72	18,55	6,47
	CTT ^c	109,64	82,92	36,52	17,65	7,96	4,40	3,10
2,5 mL/ min EtOH-70, 150 bar, 50 °C	CTP ^a	907,52	776,54	298,34	279,59	142,97	49,54	24,88
	CTF ^b	63,72	66,52	22,96	27,30	24,72	18,63	8,86
	CTT ^c	129,88	86,81	52,73	45,50	19,02	2,03	0,47

^a mg GA/ g extract uscat; ^b mg Q/ g extract uscat; ^c mg TA/ g extract uscat
(GA - acid galic, Q - quercitin, TA - acid tanic)

3.7. Analiza comparativă a conținutului total de polifenoli extrași prin Eth E, UAE și SFE

În tabelul 3.8 este prezentată o analiză comparativă a rezultatelor obținute prin cele trei tehnici de extracție studiate ținând cont de: timpul de extracție necesar, raportul solvent/ biomasă utilizat, conținutul total de polifenoli extrași analizat spectrofotometric și cantitatea de compuși polifenolici identificați și cuantificați folosind cromatografia lichidă de înaltă performanță.

Tabel 3.8 Analiză comparativă între tehnicile clasice și cele neconvenționale aplicate pentru extracția compușilor polifenolici din coaja de molid

Parametru studiat	Eth E	UAE	SFE
Timpul de extracție până la atingerea concentrației maxime (h)	144	1	1
Cantitatea de material folosită (g)	5	5	2
Volum de solvent folosit (mL)	50	50	20
Conținutul total de polifenoli (mg GAE/g coajă de molid)	14,48*	33,48	122,41
Conținut total de polifenoli identificați prin HPLC (mg/ L)	14,83	269,20	491,73

* Conținutul total de polifenoli după 1 h de extracție

3.8. Studii privind aplicarea extractelor polifenolice ca regulatori de creștere a plantelor de busuioc

Pentru investigațiile privind acțiunea compușilor polifenolici asupra proceselor fiziologice induse în plantele de busuioc, extractele apoase au fost utilizate în patru variante folosind soluții de lucru cu diferite concentrații și conținut de polifenoli (CTP), (tabelul 3.9). Folosind aceste soluții de

concentrații diferite s-a urmărit evaluarea modului în care compușii polifenolici pot acționa ca stimulator sau inhibitor asupra proceselor de dezvoltare a plantelor de busuioc.

Tabelul 3.9. Soluții ale extractelor de coajă de molid utilizate ca regulator de creștere pentru plantele de busuioc

Soluția de lucru	Abreviere	Concentrație coajă de molid (g/L)	CTP (mg GAE/mL)
Extract apos pe baie de apă	SB1	5	0,06 ± 0,01
Extract apos pe baie de apă	SB2	10	0,13 ± 0,05
Extract apos obținut cu ultrasunete	SB3	5	0,35 ± 0,08
Extract apos obținut cu ultrasunete	SB4	10	0,65 ± 0,04

3.8.1. Influența extractelor asupra germinării

Influența compușilor polifenolici asupra procesului de germinare a semințelor de busuioc a fost evaluată prin estimarea matematică a energiei și a capacității de germinare. Luând în considerare valorile înregistrate, s-a observat o influență pozitivă asupra procesului de germinare, în cazul aplicării tratamentului semințelor cu soluții ale extractelor din coaja de molid, comparativ cu proba martor (figura 3.15). Valori mai ridicate s-au obținut atunci când drept tratament au fost aplicate soluții de concentrații mai mici (SB1 și SB3).

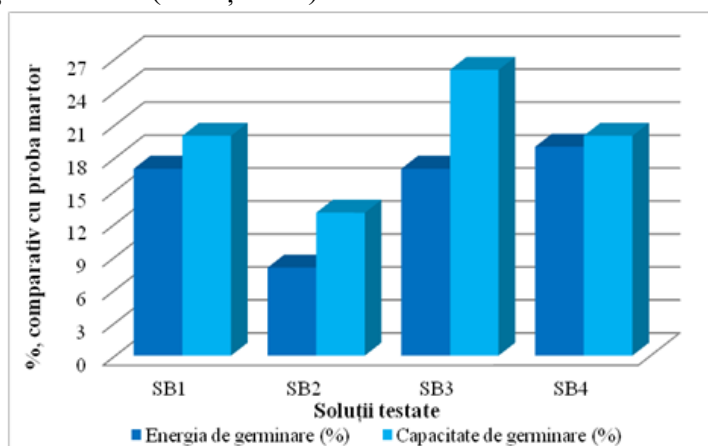


Figura 3.15. Influența extractelor de coajă de molid asupra energiei și capacității de germinare ale semințelor de busuioc (*Ocimum basilicum* L.)

3.8.2. Influența extractelor asupra intensității fotosintezei și acumulării de pigmenți fotoasimilatori

În figura 3.16, se prezintă influența extractelor de coajă de molid asupra alungirii rădăcinilor și tulpinilor. Pentru variantele experimentale utilizate nu s-au raportat diferențe semnificative, lungimile rădăcinilor și tulpinilor atingând o valoare medie de $15 \pm 1,8$ mm, respectiv de $40 \pm 1,5$ mm.

În ceea ce privește acumularea de biomasă (figura 3.17), un efect pozitiv a fost semnalat în cazul aplicării tratamentului semințelor cu extractele polifenolice, pentru toate experimentele înregistrându-se o creștere a cantității totale de biomasă proaspătă acumulată. Cea mai mare valoare de $0,019 \pm 0,005$ g biomasă, a fost înregistrată pentru varianta SB1 (0,06 mg GAE/ mL), însă se poate observa că valori apropiate au fost înregistrate și pentru celelalte condiții studiate.

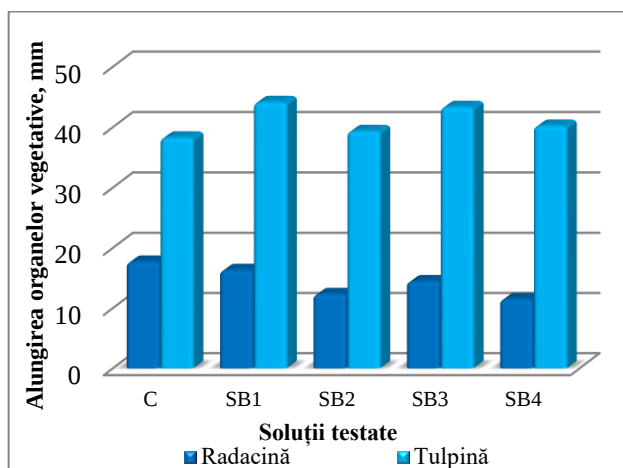


Figura 3.16. Influența extractelor de coajă de molid asupra alungirii organelor vegetative ale plantelor de busuioc (*Ocimum basilicum* L.)

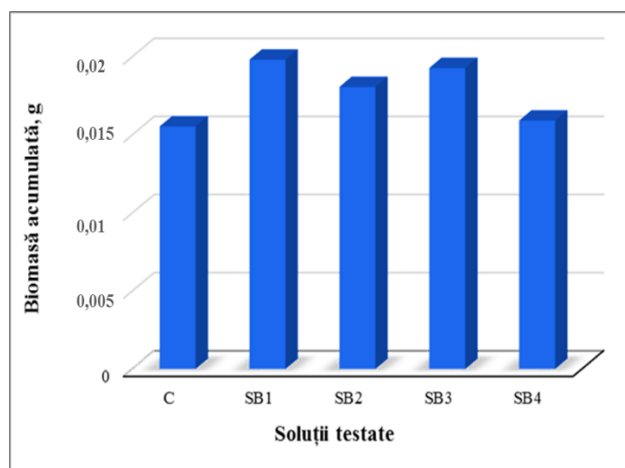


Figura 3.17. Influența extractelor de coajă de molid asupra acumulării de biomasă

În cazul pigmentilor fotoasimilatori (tabelul 3.10) se poate observa că prezența extractelor de coajă de molid stimulează biosinteza clorofilei și pigmentilor carotenoidici, mai ales în cazul variantelor SB1 și SB3.

Tabelul 3.10. Cantitățile de pigmenți fotoasimilatori sintetizate de plantele de busuioc (*Ocimum basilicum* L.) după tratamentul semințelor cu extracte de coajă de molid

Proba	Chl a $\mu\text{g/g}$	Chl b $\mu\text{g/g}$	Chl a+b $\mu\text{g/g}$	Chl a/b $\mu\text{g/g}$	Carotenoide $\mu\text{g/g}$
C	123,68 $\pm$ 2,23	29,96 $\pm$ 0,51	153,64	4,12	62,22 $\pm$ 0,73
SB1	133,98 $\pm$ 2,47	38,72 $\pm$ 0,63	172,69	3,46	80,42 $\pm$ 0,86
SB2	96,63 $\pm$ 1,45	26,08 $\pm$ 0,22	122,71	3,70	88,46 $\pm$ 0,81
SB3	127,94 $\pm$ 2,65	34,84 $\pm$ 0,55	162,78	3,67	83,41 $\pm$ 0,79
SB4	108,76 $\pm$ 2,01	25,11 $\pm$ 0,21	133,87	4,33	61,83 $\pm$ 0,53

3.8.3. Influența extractelor asupra diviziunii celulare

În tabelul 3.11 și figura 3.18, se prezintă frecvența fazelor diviziunii mitotice celulare, precum și indicii mitotici înregistrați în apexul radicular de busuioc determinate după tratamentul semințelor cu extracte polifenolice de coajă de molid.

Tabelul 3.11. Frecvența diviziunii celulare în apexul radicular de busuioc (*Ocimum basilicum* L.) sub influența soluțiilor de polifenoli testate

Proba	Nr. total celule	Celule în interfază	Celule în diviziune	Profază (%)	Metafază (%)	Anafază (%)	Telofază (%)
Control	6608	6239	369	38,75	26,02	12,20	23,04
SB1	4654	6010	399	42,36	22,31	13,53	21,80
SB2	5726	5391	365	36,16	24,66	9,86	29,32
SB3	7946	7533	593	33,39	26,48	12,98	27,15
SB4	8054	7655	443	37,92	22,57	15,80	23,70

În toate variantele experimentale, procentul de distribuție a principalelor faze de diviziune mitotică este similar cu cel înregistrat pentru proba martor, o mare parte dintre acestea fiind la

începutul diviziunii celulare (profază) iar celelalte în faze mai avansate (metafază, anafază și telofază), după cum se poate observa în figura 3.19.

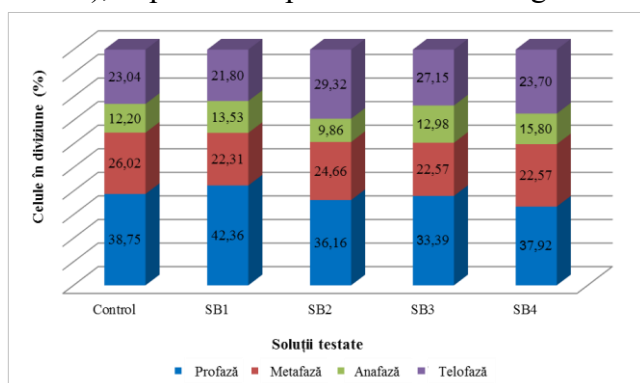


Figura 3.19. Frecvența fazelor de diviziune celulară mitotică identificate în apexul radicular de busuioc

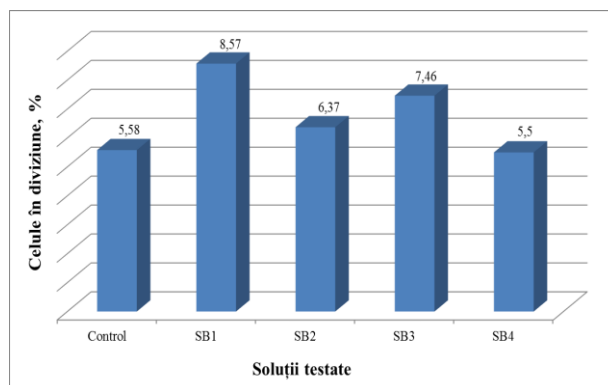


Figura 3.18. Variația indicelui mitotic în apexul radicular de busuioc

Pentru stabilirea modului în care este afectată desfășurarea procesului de diviziune, determinarea principalelor tipuri de aberații și a frecvenței acestora constituie un alt obiectiv al studiului nostru, știut fiind faptul că orice agent, fizic sau chimic, poate exercita un efect clastogen (este capabil să producă rupturi cromozomiale) sau turbagen, adică are capacitatea de a induce dereglări mitotice sau meiotice, fără afectarea directă a ADN-ului. Cele mai multe aberații cromozomiale s-au înregistrat în cazul variantelor SB2 și SB4 și sunt de tipul aberațiilor ana-telofazice (tabel 3.12).

Tabelul 3.12. Frecvența celulelor cu aberații cromozomiale ana-telofazice din apexul radicular la busuioc (*Ocimum basilicum* L.) sub influența produselor testate

	Total celule analizate	Celule în diviziune	Indice mitotic (%)	Anafaze+ Telofaze (%)	Aberații A-T (%)
Control	6608	369	5,58	35,23	5,38
SB1	4654	399	8,57	35,34	6,38
SB2	5726	365	6,37	39,18	13,29
SB3	7946	593	7,46	40,13	6,72
SB4	8054	443	5,50	39,50	14,29

Prezența aberațiilor se corelează cu numărul mare de celule aflate în anafază și telofază, creșterea procentală fiind acompaniată și de lărgirea gamei acestora. Astfel, dacă în probele martor predomină punțile simple și multiple și rareori cromozomii retardați, în cazul celorlalte variante de studiu, o pondere însemnată o au ana-telofazele (A-T) cu punți simple sau multiple, A-T cu cromozomi întârziați sau retardați, precum și aberațiile complexe de tipul: A-T + punți + cromozomi întârziați și/sau expulzați sau A-T multipolare + punți. În figura 3.21, se pot observa câteva tipuri de aberații cromozomiale întâlnite în cazul probelor analizate.

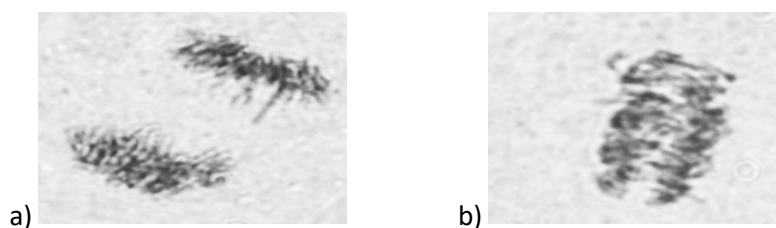


Figura 3.21. Tipuri de aberații cromozomiale: a) ana-telofază cu cromozomi întârziați, b) ana-telofază cu punți multiple și cromozomi expulzați

3.9. Studii privind aplicarea extractelor polifenolice în sinteza nanoparticulelor de argint

3.9.1.1. Analiza UV-VIS

Având confirmarea că folosind extractul vegetal din coaja de molid are loc reducerea ionilor Ag^+ din azotatul de argint la Ag^0 (așa cum se constată din figura 3.27), s-au realizat studii pentru a se stabili timpul optim de reacție, raportul extract vegetal/ agent reducător și concentrația acestuia la care se poate obține cea mai mare acumulare de NP de Ag.

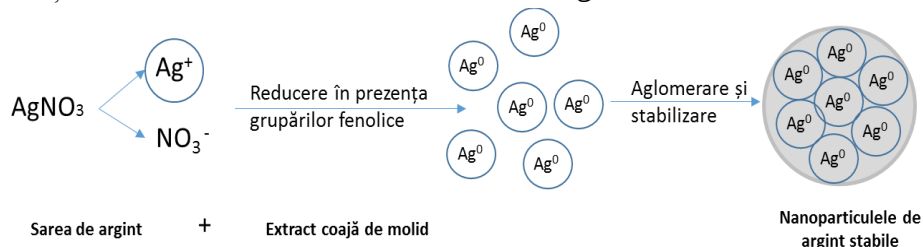


Figura 3.27. Mecanismul propus pentru reacția de sinteză a nanoparticulelor de argint folosind extractul din coaja de molid

3.9.1.2. Caracterizarea morfologică, structurală și compozițională a nanoparticulelor de argint

În graficul din figura 3.31, se poate observa că nanoparticulele sintetizate au dimensiuni cuprinse între 0,1 și 0,5 μm (100-500 nm) cu un diametru mediu de 0,226 μm (226 nm). Rezultate similare au fost raportate și în cazul sintezei nanoparticulelor folosind extracte din cânepă în studiul realizat de Manjamadha și Muthukumar, 2016.

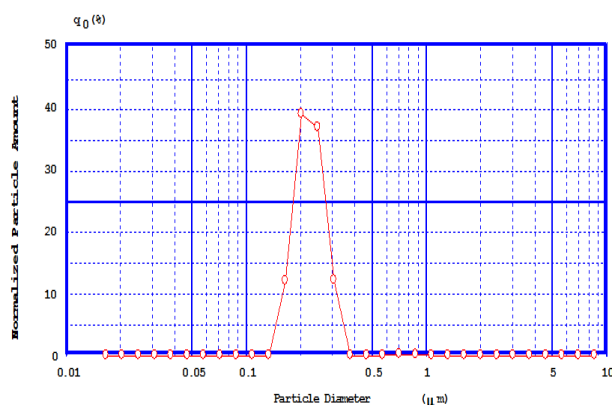


Figura 3.31. Caracterizarea dimensională a nanoparticulelor de argint sintetizate

3.9.2. Activitatea antimicrobiană/ antifungică a nanoparticulelor de argint sintetizate

Activitatea antibacteriană, determinată prin metoda microplăcilor a fost testată utilizând un număr de 12 diluții ale soluțiilor studiate (figura 3.34 b).

Analizele efectuate au arătat faptul că soluțiile cuprinzând nanoparticulele de argint au o activitate de inhibare mai mare, pentru toate cele cinci bacterii testate (3 bacterii gram pozitive (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* și *Klebsiella pneumoniae*) și pe 2 bacterii gram negative (*S. aureus* (-) și *Pseudomonas aeruginosa*)), comparativ cu soluțiile de extract și azotat de argint folosit ca proba martor.

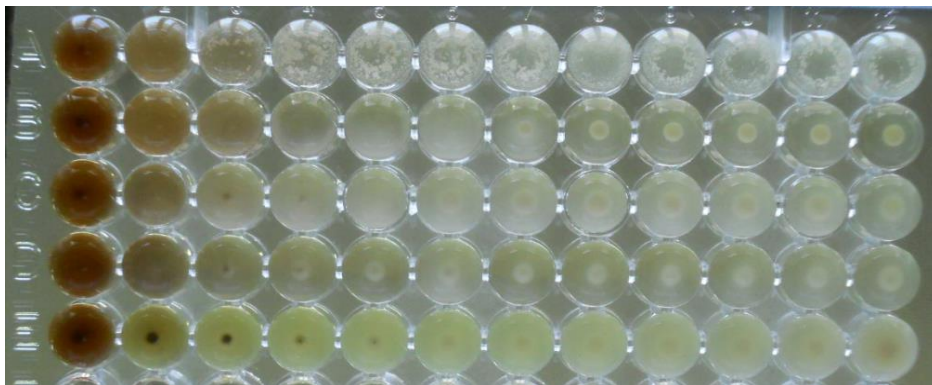


Figura 3.34b. Capacitatea de inhibare a soluțiilor care conțin NP de Ag asupra culturilor bacteriene de: A – *Staphylococcus aureus* (+); B – *S. aureus* (-); C – *Escherichia coli* (+); D – *Klebsiella pneumoniae* (+); E – *Pseudomonas aeruginosa* (-)

Concluzii generale

Prin subiectul ales, teza de doctorat intitulată *Contribuții privind elucidarea mecanismelor implicate în procesele de extracție și caracterizare a polifenolilor cu activitate biologică folosind tehnici neconvenționale* a avut ca obiectiv fundamental, realizarea unui studiu aprofundat asupra posibilităților de aplicare a proceselor de biorafinare, pentru valorificarea superioară prin conversie în componenți cu valoare adăugată a unor resurse de biomasă. Aceste resurse - *deșeurile de coajă de molid* sunt larg accesibile la noi în țară, până în prezent insuficient valorificate și provin din industria forestieră și de prelucrare a lemnului.

Ca *procedee de conversie a biomasei vegetale* alese, s-au studiat atât tehnicile neconvenționale de *extracție asistate de ultrasunete și fluide supercritice*, dar și metodele clasice de extracție cu solvenți organici. Cercetările experimentale s-au îndreptat cu precădere asupra studiului aspectelor de inginerie implicate în astfel de procese, dar și asupra aplicabilității extractelor obținute în diverse domenii, parcurgându-se o serie de etape:

1. Studiul cinetic al procesului de extracție asistat de ultrasunete

O importanță deosebită s-a acordat procesului de extracție asistată cu ultrasunete în scopul stabilirii mecanismelor cinetice implicate în astfel de procese. Acest studiu s-a realizat având la bază ipotezele și principiile modelării cinetice a proceselor solid-lichid. În urma studiului cinetic s-a remarcat faptul că temperatura și timpul de extracție sunt principalii factori care influențează în mod direct concentrațiile totale de polifenoli extrași și modelarea cinetică.

Pentru *modelarea cinetică* au fost propuse mai multe modele cinetice dintre care *modelul reacție de ordin doi* a arătat o bună concordanță între datele experimentale obținute și cele calculate folosind coeficienții cinetici specifici. Validarea acestui model cu datele experimentale a fost demonstrată de valori ridicate ale coeficienților de regresie ($R^2 > 0.98$).

Folosind acest model a putut fi determinată energia de activare a procesului, pe lângă parametrii specifici modelului (concentrația la saturație - C_s , constanta de viteză de ordin doi - k și viteza inițială de extracție - h), a cărei valoare pozitivă ($E_a = 33.726$ kJ/mol), arată faptul că procesul de extracție a compușilor polifenolici din coaja de molid este un proces endoterm.

2. Un alt obiectiv propus, a fost realizarea unui *studiu aprofundat asupra tehnicii de extracție cu fluide supercritice* a compușilor polifenolici din coaja de molid, folosind ca solvenți de extracție dioxidul de carbon supercritic și etanol 70 % pentru intensificarea procesului.

În acest sens s-a studiat în ce măsură principalii parametri de proces (presiunea, temperatura,

debitul de solvent) influențează atât randamentele globale de extracție, cât și conținuturile totale de compuși polifenolici (polifenoli totali, taninuri și flavonoide). Totodată, au fost monitorizate și consumurile de solvenți și activitatea antioxidantă a extractelor obținute la diferitele condiții de lucru studiate.

În prima etapă a procesului SFE, compușii lipofilici au fost eliminați din coaja de molid folosind doar CO₂ la presiuni înalte, atingându-se astfel randamente de extracție de până la 2,08 % substanțe lipofile pentru cele 20 g coajă de molid extrasă. În a doua etapă, folosind drept co-solvent etanol 70 % s-au putut extrage compușii polifenolici.

3. Studiile realizate au arătat că un randament maxim extracție SFE (de 30,46 %) se poate obține derulând procesul la o presiune de 100 bar și temperatură de 40 °C. Pentru acest randament s-a înregistrat un consum de solvenți de cca. 2,5 kg CO₂/kg coajă de molid, respectiv 24,94 kg EtOH -70/ kg coajă de molid. La aceste condiții de lucru, *conținutul total polifenoli* determinat a fost de 314,49 mg/g extract uscat, în timp ce *conținutul total de flavonoide* a fost de 100,67 mg/g extract uscat iar *conținutul total de taninuri* a fost 26,38 mg/g extract uscat. Totodată, testul DPPH a arătat faptul că extractele polifenolice din coajă de molid prezintă o activitate antioxidantă însemnată, procente de inhibare obținute fiind în medie cuprinse între 80 - 90 %.

4. Datele obținute prin cele două tehnici de extracție au fost folosite pentru efectuarea unei analize prin comparație cu tehnica clasică extracție cu solvenți. *Analiza comparativă* a luat în considerare aspecte precum: timpul de extracție necesar, raportul solvent/ biomasă utilizat, conținutul total de polifenoli extrași analizat spectrofotometric și cantitatea de compuși polifenolici identificați și cuantificați prin HPLC. Rezultatele acestei analize, recomandă SFE ca cea mai bună tehnică pentru extracția compușilor polifenolici din coaja de molid, având randamente de extracție cu cca. 73 % mai mari față de extracția asistată de ultrasunete și cu cca. 88 % față de extracția clasică cu solvenți.

5. Un alt obiectiv urmărit, a avut ca scop identificarea unor *direcții*, compatibile cu mediul înconjurător *de utilizare a extractelor polifenolice* de coajă de molid obținute. Una dintre direcțiile propuse și studiate în acest sens, a fost cea de *utilizare a extractelor vegetale ca tratament al semințelor de busuioc*, cu scopul stimulării principalelor procese fiziologice și metabolice ale plantei. Rezultatele obținute au indicat faptul că în comparație cu probele martor, în cazul aplicării tratamentului cu soluții polifenolice s-a înregistrat o intensificare cu peste 26,5 % pentru energia de germinare și de 18,5 % pentru capacitatea de germinare. O creștere semnificativă a numărului de celule aflate în diviziune celulară (de la 369 pentru proba martor la 593) a fost de asemenea observată, sugerând astfel o accelerare a procesului de înmulțire ale plantei.

Un alt studiu privind aplicabilitatea extractelor obținute a fost cel de ca agent reducător în procesele de sinteză a unor nanoparticule metalice (de argint), de mare însemnătate în medicina și farmacie prin proprietățile antibacteriene și antimicrobiene ce le prezintă. Rezultatele obținute în urma *studiului privind biositeza nanoparticulelor de argint*, afirmă potențialul extractului de coajă de molid de a reduce ioni Ag⁺ din sarea de azotat de argint la ioni Ag⁰ cu formarea de nanoparticule metalice. Studiile spectrofotometrice preliminare au arătat faptul că un raport de 1:10 mL extract/ mL sare de argint, la o concentrație de 1 mM sunt cele mai bune condiții de conducere a procesului de sinteză a NP de Ag, folosind extractul polifenolic din coajă de molid ca agent reducător.

De asemenea, nanoparticulele sintetizate prezintă o capacitate de inhibare ridicată, testată pe 5 culturi bacteriene (*Staphylococcus aureus* (+); *S. aureus* (-); *Escherichia coli* (+); *Klebsiella pneumoniae* (+); *Pseudomonas aeruginosa* (-)). Această capacitate de inhibare demonstrată pe un număr relativ mare de culturi bacteriene, susține posibilitatea de utilizare a acestor tipuri de nanoparticule metalice în domeniul medical și farmaceutic.

Prin urmare se poate aprecia că teza de doctorat aduce contribuții fundamentale și aplicative în domeniul valorificării unor resurse pentru recuperarea, caracterizarea și evaluarea unor posibilități de utilizare practică a unor compuși cu activitate biologică, și:

- oferă date preliminare privind condițiile de operare a proceselor de extracție folosind fluide supercritice și ultrasunete;
- prezintă un studiu cinetic amănunțit asupra procesului de extracție asistat de ultrasunete ale cărui rezultate pot fi folosite pentru optimizarea ulterioară a procesului, pentru creșterea eficienței dar și pentru o posibilă transpunere la nivel pilot sau industrial, prin raportare la parametrii cinetici specifici determinați;
- prezintă o analiză comparativă detaliată cu avantaje, dezavantaje și recomandări privind cele două tehnici neconvenționale de extracție a compușilor polifenolici din coaja de molid;
- oferă o caracterizare amănunțită a extractelor polifenolice separate, incluzând atât conținuturile totale de compuși polifenolici, flavonoidici și taninici separați (cantitativ și calitativ) cât și activitățile antioxidante ale acestora;
- propune noi direcții de utilizare și aplicabilitate a compușilor polifenolici din extractele vegetale, și anume ca bioregulatori de creștere sau ca agenți reducători în procesele de sinteză a unor nanoparticule metalice.

Rezultatele prezentate în teza de doctorat, pot constitui baza pentru proiectarea și optimizarea unor noi procese și tehnici de extracție a compușilor bioactivi cu structură polifenolică din biomasă, a căror aplicabilitate în diferite domenii vizează sectoare precum industria cosmetică și farmaceutică, medicina și creșterea plantelor.

Bibliografie selectivă

- Benelli P., Riehl C., Smânia A., ș.a., (2010). Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: Mathematical modelling and extract composition. *The Journal of Supercritical Fluids* 55 (1), 132 - 141.
- Bujor O.C., **Talmaciu A.I.**, Volf I., Popa V.I., (2015), Biorefining as a possibility to recover aromatic compounds with biological properties. *TAPPI Journal* 4 (3), 187-193.
- Diouf P. N., Stevanovic T. și Cloutier A., (2009). Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Picea mariana* bark and its proanthocyanidin-rich fractions. *Food Chemistry* 113(4), 897–902.
- González-Centeno M.R., Comas-Serra F., ș.a., (2015). Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): experimental kinetics and modeling. *Ultrasonics Sonochemistry* 22, 506–514.
- Hasan N. și Farouk B., (2013). Mass transfer enhancement in supercritical fluid extraction by acoustic waves. *The Journal of Supercritical Fluids* 80, 60–70.
- Huang Z., Shi X.-H., Jiang W.-J., (2012). Theoretical models for supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography. A* 1250, 2–26.
- Ignat I., Stingu A., Volf I., Popa V. I., (2009). Natural bioactive compounds as plant growth regulators. *Lucrări științifice, Seria agronomie* 52, 187-192.
- Manjamadha V.P. și Muthukumar K., (2016). Ultrasound assisted green synthesis of silver nanoparticles using weed plant. *Bioprocess Biosynthesis Engineering* 39, 401 – 411.

- Oliveira E., Silvestre A., Silva C. M., (2011). Review of kinetic models for supercritical fluid extraction. *Chemical Engineering Research and Design* 89(7), 1104–1117.
- Popa V. I., Dumitru M., Volf I., Anghel N., (2008). Lignin and polyphenols as allelochemicals. *Industrial Crops and Products* 27(2), 144–149.
- Popa V.I., (2013). Biorefining and the Pulp and Paper Industry, în *Pulp Production and Processing: From Papermaking to High-Tech Products*. Smithers Rapra Technology Ltd, U.K.
- Sheldon R., (2011). Utilisation of biomass for sustainable fuels and chemicals: Molecules, methods and metrics. *Catalysis Today* 167(1), 3–13.
- Stingu A., Ignat I., Volf I., Popa V. I., (2011). Spruce bark aqueous extracts as modulator in copper induced stress. *Cellulose Chemistry and technology* 45, 281-286.
- Stingu A., Volf I., Popa V. I., Gostin I., (2012). New approaches concerning the utilization of natural amendments in cadmium phytoremediation. *Industrial Crops and Products* 35(1), 53–60.
- Talmaciu A.I.**, Volf I., Popa V.I., (2015a). A comparative analysis of the „green” techniques applied for polyphenols extraction from bioresources, *Chememistry Biodiversity* 12, 1635–1651.
- Tanase C., Boz I., Stingu A., Volf I., Popa V.I., (2014). Physiological and biochemical responses induced by spruce bark aqueous extract and deuterium depleted water with synergistic action in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. *Industrial Crops and Products* 60, 160–167.
- Tanase C., Stingu A., Volf I., Popa V. I., (2011). The effect of spruce bark polyphenols extract in combination with deuterium depleted water (DDW) on *Glycine max* L. and *Helianthus annuus* L. development. *Analele științifice ale Univ. Al. I. Cuza, Iași*, 115–120.
- Volf I., Ignat I., Neamtu M., Popa V.I., (2014). Thermal stability, antioxidant activity, and photo-oxidation of natural polyphenols. *Chemical papers* 68 (1), 121–129.
- Wang X., Wu Y., Chen G., Yue W., ș.a., (2013). Optimisation of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *Sparganii rhizoma* with response surface methodology, *Ultrasonics Sonochemistry* 20, 846–854.

Activitate științifică personală

Rezultatele obținute de-a lungul celor trei ani de activitate de cercetare științifică au fost prezentate și concretizate prin:

- elaborarea a 5 articole publicate în reviste cotate ISI, elaborarea unui articol publicat în reviste CNCSIS (B+);
- participarea la o conferință națională și doua internaționale (cu 2 comunicări orale și 2 postere)
- efectuarea unui stagiu de cercetare de 4 luni la Universitatea din Maribor, Slovenia – Facultatea de Chimie și Inginerie chimică, Laboratorul Procese de Separare și Designul Produselor (martie - iulie 2015), în cadrul programului Erasmus+.

Lucrări științifice publicate în reviste cotate ISI (Web of Science cu factor de impact):

1. Liliana Lazăr, **Adina Iulia Talmaciu**, Irina Volf, Valentin I. Popa: *Kinetic modeling of the ultrasound-assisted extraction of polyphenols from Picea abies bark*, *Ultrasonics Sonochemistry*, 32 (2016) 191–197 (FI: 4,556), (Anexa 1).
2. **Adina Iulia Talmaciu**, Matej Ravber, Irina Volf, Željko Knez, Valentin I. Popa: *Isolation of bioactive compounds from spruce bark waste using sub- and supercritical fluids*, *The Journal of Supercritical Fluids* 117 (2016) 243–251 (FI: 2,579), (Anexa 2).

Adina Talmaciu – Contribuții privind elucidarea mecanismelor implicate în procesele de extracție și caracterizarea a polifenolilor cu activitate biologică folosind tehnici neconvenționale

3. **Adina Talmaciu**, Irina Volf, Valentin Popa: *A comparative analysis of the "green" techniques applied for polyphenols extraction from bioresources - a Review*, Chemistry & Biodiversity 12(11) (2015) 1595 – 1776 (FI: 1,515), (Anexa 3).
4. **Adina Talmaciu**, Irina Volf, Valentin Popa: *Supercritical fluids and ultrasound assisted extractions applied to spruce bark conversion*, Environmental engineering and management journal 14(3) (2015) 615-623 (FI: 1,008), (Anexa 4).
5. Oana – Crina Bujor, **Iulia Adina Talmaciu**, Irina Volf, Valentin I. Popa: *Biorefining to recover aromatic compounds with biological properties*, Tappi Journal 14(3) (2015) 187-193 (FI:0,734), (Anexa 5).

Lucrări științifice publicate în reviste cotate CNCSIS (B+):

1. **Adina Talmaciu**, Corneliu Tanase, Irina Volf, Valentin Popa: *Influence of polyphenolic compounds on Ocimum basilicum L. Development*, Analele Științifice ale Universității „Alexandru Ioan Cuza”, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară TOM XVI, Fascicula 2 (2015), (cotat B+), (Anexa 6).

Comunicări la conferințe naționale și internaționale:

1. **Talmaciu, A.I.**, Tanase, C., Bâra, C.I., Volf, I., Popa, V.I.: *New aspects in biomass wastes valorisation: spruce bark as plants growth regulators*, 8th International Conference on Environmental Engineering and Management, 9 – 12 September 2015, Iasi, Romania (prezentare orală).
2. **A.I. Talmaciu**, L. Lazăr, I.Volf, V.I. Popa: *Kinetic investigation of the ultrasound assisted extraction of polyphenols from spruce bark*. Prezentare orală, 2nd International Conference on Chemical Engineering, Inovative Materials and Processes - ICCE 2014, Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, Universitatea „Gheorghe Asachi” din Iași, Iași 5-8 noiembrie 2014 (prezentare orală).
3. **Adina Talmaciu**, Corneliu Tanase, Irina Volf, Valentin Popa: *Influence of polyphenolic compounds on Ocimum basilicum L. development*. Poster, Sesiunea Științifică anuală a Facultății de Biologie - Conservarea biodiversității, în contextul dezvoltării durabile, organizată la Facultatea de Biologie, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași, Iași 23 - 25 octombrie 2014 (poster).
4. **A.I. Talmaciu**, I.Volf, I. Mamaliga, V.I. Popa: *Supercritical fluid technology applied for polyphenols extraction from Picea abies bark: a preliminary study*. Poster, 2nd International Conference on Chemical Engineering, Inovative Materials and Processes - ICCE 2014, Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, Universitatea „Gheorghe Asachi” din Iași, Iași 5-8 noiembrie 2014 (poster).

Stagiu de cercetare prin programul Erasmus+:

1. Stagiu de cercetare de 4 luni la Universitatea din Maribor, Slovenia – Facultatea de Chimie și Inginerie chimică, Laboratorul Procese de Separare și Designul Produselor, sub îndrumarea Prof. dr. ing. Željko Knez, tema de cercetare: *Contribuții privind mecanismele implicate în extracția și caracterizarea polifenolilor utilizând fluide supercritice* (martie - iulie 2015).