



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMFOSDRU



Fondul Social European
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI
OIPOSDRU



USAMV
IAȘI

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ
VETERINARĂ „ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI
FACULTATEA DE HORTICULTURĂ**

**DOMENIUL DE DOCTORAT: HORTICULTURĂ
SPECIALIZAREA: TEHNOLOGIA PRODUSELOR AGROALIMENTARE**

Ing. FILIMON Vasile-Răzvan

TEZĂ DE DOCTORAT

**„STUDII PRIVIND UNII PIGMENȚI VEGETALI CU
VALOARE FUNCȚIONALĂ DIN PRODUSELE
HORTICOLE”**

**Conducător științific,
Prof. univ. Dr. Dumitru BECEANU**

IAȘI, 2012



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMFOSDRU



Fondul Social European
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI
OIPOSDRU



USAMV
IAȘI

REZUMAT

Cuvinte cheie: antociani, compuși fenolici, produse horticoale, alimente funcționale, zona Iași.

Tema tezei de doctorat se înscrie în ansamblul cercetărilor realizate pe plan mondial cu privire la dezvoltarea sectorului de obținere a alimentelor cu beneficii pentru sănătate (*alimente funcționale*), fiind rezultatul apariției în societatea contemporană a unui nou concept privind rolul alimentelor în asigurarea sănătății umane și reducerea riscurilor de îmbolnăvire pentru consumatori.

În ultimii ani, a devenit o provocare pentru industria alimentară identificarea unor noi surse vegetale eficiente de pigmenți, non-toxice și non-poluante, în scopul înlocuirii coloranților sintetici, utilizați în prezent pe scară largă, datorită stabilității lor și a prețului scăzut.

Lucrarea are ca scop studiul pigmentilor antocianici, compuși cu o valoare funcțională semnificativă, din fructele unor specii horticoale recoltate din zona de nord-est a României, arealul localității Iași, în anii de studiu 2010 și 2011. Studiile au fost efectuate asupra unor produse horticoale cu un potențial antocianic ridicat, mai puțin studiate în țara noastră, precum fructele de soc (*Sambucus nigra* L.), dunde negre (*Morus nigra* L.), coacăze negre (*Ribes nigrum* L.) sau specii cu perioada limitată de consum în stare proaspătă (*Prunus avium* L. și *Prunus cerasus* L.), dar cu un potențial funcțional dovedit prin cercetări anterioare, datorat în mare măsură compoziției chimice. De asemenea, a fost colectată tescovina provenită în urma vinificării strugurilor negri (*Vitis vinifera* L.), în vederea determinării conținutului antocianic și a randamentului de recuperare a acestor compuși cu rol bioactiv din materialul oenologic prelucrat.

Au fost determinate o serie de caracteristici fizico-chimice și structurale ale fructelor la recoltare, urmate de determinarea acțiunii unor factori cu influență asupra conținutului fenolic al fructelor (enzime din grupa oxidoreductazelor). Analiza a fost continuată prin realizarea profilului antocianic al probelor prin lichid-cromatografie (HPLC-DAD), urmată de identificarea principalilor reprezentanți ai profilului prin spectrometrie de masă (ESI-MS) și cuantificarea individuală a acestora (echivalent cianidină-3-*O*-glucozid). Cunoscându-se tipul și cantitățile de pigmenți disponibili în produsele horticoale, principalii reprezentanți și raportul dintre aceștia, pot fi apreciate calitățile tehnologice, dar mai ales proprietățile funcționale ale acestora, alături de structura și stabilitatea culorii obținute.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI
OIPOSDRU



USAMV
IAȘI

În acest sens au fost stabilite următoarele obiective:

1. **Evaluarea unor însușiri fizico-chimice ale fructelor analizate**, pentru a cunoaște compoziția chimică a acestora în momentul recoltării, precum și condițiile în care au fost obținute cantitățile de compuși raportate și profilul antocianic al probelor.

2. **Studiul antocianilor din produse horticole selectate**, ce începe odată cu obținerea extractelor etanolicе și metanolicе, fiind continuat prin determinarea cantitativă totală a conținutului în antociani, separarea, identificarea și cuantificarea individuală a principalilor reprezentanți ai profilului antocianic și analiza evoluției conținutului total în antociani după 12 luni de păstrare a extractelor.

3. **Studiul compușilor fenolici din produsele horticole analizate**, incluzând aici clasa flavonoizilor, din care face parte subclasa pigmentilor antocianici, existând relații procentuale sau valori cunoscute ale unor raporturi între aceste clase și subclase de compuși fenolici. A fost urmărită determinarea cantitativă totală a conținutului în compuși flavonoidici și a conținutului fenolic total al fructelor, precum și evoluția acestor valori pe parcursul perioadelor de păstrare.

4. **Analiza parametrilor cromatici ai extractelor obținute**, ce permite o estimare obiectivă a culorii probelor, a calității acestora, precum și posibilitatea urmăririi în dinamică a fenomenelor evolutive, legate în principal de modificările structurale și biochimice ale antocianilor, ca principali compuși participanți la formarea culorii roșii a fructelor. Această analiză este completată prin simularea computerizată a culorii extractelor, pe baza parametrilor cromatici înregistrați.

5. **Studiul unor enzime din grupa oxidoreductazelor** (polifenoloxidaza, peroxidaza, catalaza), ca factori direcți sau indirecti de influență asupra conținutului în antociani al fructelor.

6. **Testarea ipotezelor statistice (analiza varianței - ANOVA)**, pentru a pune în evidență în ce măsură unul sau mai mulți factori (soiul sau factorul genetic, anul de studiu, solvenul utilizat pentru extracție), influențează asupra caracteristicii rezultative, reprezentate de conținutul antocianic total al probelor.

Teza de doctorat cuprinde 266 pagini, în care sunt incluse 91 de tabele, 107 figuri și fotografii color, bibliografia ce conține 217 titluri, precum și 12 documente anexe, fiind structurată în două părți. Prima parte a lucrării, referitoare la *stadiul actual al cunoașterii* problematicii abordate, cuprinde introducerea și trei capitole, iar partea a doua, reprezintă *cercetările proprii*, prezentate în patru capitole, incluzând concluziile finale și recomandările.

Capitolul I, intitulat **Stadiul actual al cercetărilor privind pigmentii antocianici**, prezintă un scurt istoric privind pigmentii vegetali, definirea, clasificarea și caracteristicile fizico-chimice



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMFOSDRU



Fondul Social European
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI
OIPOSDRU



USAMV
IAȘI

ale antocianilor, prezența acestora în produsele horticoale, respectiv factorii de influență ce acționează asupra stabilității lor.

Antocianii (gr. *anthos* - floare și *kyanos* - albastru) sunt pigmenți naturali, principii active aparținând clasei flavonoizilor, produși secundari ai metabolismului vegetal, responsabili pentru nuanțele de roșu-albastru-violet ale fructelor, florilor și a unor legume, fiind cel mai important grup de pigmenți vegetali hidrosolubili vizibil de către ochiul uman (Davies, 2004).

În capitolul al II-lea al lucrării, ***Stadiul actual al cercetărilor privind alimentele funcționale***, este prezentată o sinteză a cunoștințelor la nivel național și internațional, privind conceptul de „*aliment funcțional*”, fiind expuse proprietățile funcționale ale antocianilor din produsele horticoale. Așa cum a fost notificat de *American Dietetics Association*, termenul „*funcțional*” implică faptul că alimentul, prin componentele sale, are o anumită valoare recunoscută, care conduce la un beneficiu de sănătate, inclusiv reducerea riscului de îmbolnăvire pentru consumator.

Capitolul final al primei părți a tezei de doctorat, intitulat ***Stadiul actual al cercetărilor privind metodele de analiză utilizate în studiul antocianilor***, prezintă succint probleme legate de extracția și purificarea antocianilor, utilizarea metodelor spectrofotometrice și cromatografice de investigare a acestora și elemente specifice analizei statistice variaționale (ANOVA).

Capitolul IV, ***Obiectivele cercetării***, face trecerea la cea de a doua parte a tezei, prezentând o serie de considerații privind scopul și obiectivele cercetării, completate prin activitățile întreprinse în cadrul fiecărui obiectiv urmărit.

În capitolul V, sunt prezentate ***materialul biologic și metodele de cercetare*** utilizate. În acest capitol este expus cadrul organizatoric și instituțional de desfășurare a cercetărilor experimentale și arealul de proveniență al materialului biologic, fiind descrise soiurile selectate pentru studiu și metodele de analiză utilizate pentru atingerea obiectivelor menționate.

Materialul biologic a provenit din câmpul experimental al Stațiunii de Cercetare Dezvoltare pentru Pomicultură (S.C.D.P.) Iași, situată ca areal pomicol în regiunea a VIII-a Podișul Moldovei, bazinul Iași-Răducăneni și din câmpul didactic-experimental al Fermei „Vasile Adamachi”, situată în zona Copou Iași, aparținând Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară (U.Ș.A.M.V.) „Ion Ionescu de la Brad”, Iași.

Partea cea mai importantă a determinărilor instrumentale a fost desfășurată în cadrul Laboratorului de chimie al Departamentului de Inginerie a Inovației, aparținând Universității Salento din Lecce, Italia și a Centrului de Cercetări pentru Oenologie al Academiei Române, Filiala Iași.



Au fost selectate pentru efectuarea determinărilor experimentale șase specii horticoale:

- șase **soiuri de cireș** (*Prunus avium* L.), pentru a acoperi cât mai bine varietatea de forme existentă în cadrul speciei, trei soiuri de cireșe dulci: *Van*, *Stella*, *Maria*, două elite hibride de cireș: *Oana* (sin. HC-840860) și *Radu* (sin. HC-840836) și un soi de cireșe amare: *Amar de Maxut*, cultivate în poligonul experimental al S.C.D.P. Iași;
- patru soiuri de **vișin** (*Prunus cerasus* L.): *Engleze timpurii*, *Meteor Korai*, *Crișane 2* și *Mocănești 16*, cu aceeași proveniență ca și în cazul cireșelor;
- **dude negre** (*Morus nigra* L.), provenite din zona Copou Iași, ferma „Vasile Adamachi”;
- două soiuri autohtone de **coacăze negre** (*Ribes nigrum* L.), mai nou introduse în sortiment, *Abanos* și *Ronix*, cultivate în câmpul didactic-experimental al U.Ș.A.M.V. Iași;
- două proveniențe de **soc european** (*Sambucus nigra* L.), fructele fiind recoltate din zona Copou, Iași, amplasată în partea de nord a localității și pădurea Cetățuia, situată în zona de sud;
- trei soiuri de **viță de vie** (*Vitis vinifera* L.), un soi autohton: *Fetească neagră* și două soiuri cosmopolite: *Merlot* și *Cabernet Sauvignon*. De asemenea, a fost recuperată și examinată tescovina rezultată în urma proceselor de vinificație, atât în stare proaspătă cât și după uscare.

Pentru realizarea obiectivelor propuse, **metodele de cercetare** utilizate au cuprins:

1. **Determinări fizice și structurale** efectuate asupra probelor la recoltare: masa medie a fructului, masa a 100 de boabe, masa medie a sâmburelui, numărul de boabe.

2. **Determinări chimice** efectuate asupra probelor la recoltare: determinarea umidității (%), substanței uscate totale, substanței uscate solubile, acidității titrabile, acidului ascorbic, determinarea pH-ului și a conținutului în zaharuri reducătoare.

3. **Determinarea activității unor enzime din grupa oxidoreductazelor**: polifenoloxidaza (metoda Ermakov), peroxidaza (metoda Bergmeyer) și catalaza (metoda gazometrică).

4. **Analiza și caracterizarea antocianilor**: determinarea conținutului total în antociani monomerici prin metoda variației de pH, individualizarea și separarea cromatografică a acestora ($\lambda = 520$ nm), identificarea prin spectrometrie de masă (ionizare tip electrospray, mod ion pozitiv) și cuantificarea individuală a antocianilor identificați, pe baza soluțiilor standard.

5. **Determinarea conținutului total în flavonoizi** (metoda Dowd) și **compuși fenolici** (metoda fotocolorimetrică Folin-Ciocalteu).

6. **Determinarea parametrilor cromatici**, prin metoda CIE $L^*a^*b^*$ - 1976.

Capitolul VI, **Rezultate și discuții**, cuprinde cea mai mare parte a tezei de doctorat, fiind prezentate rezultatele experimentale înregistrate pentru fiecare specie analizată, iar în final partea de analiză statistică a datelor și interpretarea acestora.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI
OIPOSDRU



USAMV
IAȘI

Fructele celor șase specii analizate au prezentat o serie de proprietăți fizico-chimice, cu valori specifice pentru fiecare soi, ce nu au putut fi corelate cu o variație a conținutului antocianic și polifenolic. Acțiunea distructivă a acidului ascorbic asupra antocianilor a fost pusă în evidență la vișine, descompunerea pigmentului fiind accelerată de prezența acidului ascorbic. În același context, cantitățile importante de acid ascorbic din coacăzele negre (140-160 mg/100 g fruct), nu au putut fi corelate cu valori reduse ale concentrației antocianice ale fructelor.

Cele mai importante cantități de antociani din cadrul studiului au fost înregistrate la specia *Vitis vinifera* L., în pielile proaspete ale strugurilor soiului Cabernet Sauvignon, depășind 1560 mg cy-3-gl/100 g, la extracția cu metanol. Următoarele specii ca importanță, în ceea ce privește conținutul în antociani al extractelor metanolice obținute din fructele proaspete, au fost: *Ribes nigrum* L., soiul Ronix (452,82±6,15 mg cy-3-gl/100 g fruct), *Sambucus nigra* L., proveniența Copou (428,60±6,02 mg cy-3-gl/100 g fruct), *Prunus avium* L., soiul Amar de Maxut (193,07 ±0,54 mg cy-3-gl/100 g fruct), *Morus nigra* L. (159,26±1,17 mg cy-3-gl/100 g) și *Prunus cerasus* L., soiul Engleze timpurii (66,29±0,17 mg cy-3-gl/100 g fruct).

Odată cu utilizarea metanolului ca solvent, cantitățile de antociani extrase au fost în toate cazurile mai ridicate față de cele înregistrate în cazul extractelor etanolice. Procentual, cantitățile suplimentare determinate nu au justificat utilizarea acestui compus toxic în toate cazurile. Astfel, la duduile negre, cantitățile suplimentare de antociani extrase cu ajutorul metanolului, nu au depășit 5%, la soc fiind între 6 și 8,5%, iar în cazul strugurilor, variind între 20 și 25%.

A fost constatată o corelație pozitivă generală între conținutul în compuși flavonoidici, fenolici totali și valorile conținutului antocianic. Au făcut excepție extractele obținute din vișine, unde soiurile cu un conținut mai important în compuși fenolici totali nu au deținut și cele mai ridicate cantități de antociani, raportul între cele două clase de compuși fiind specific fiecărui soi.

În cazul speciei *Vitis vinifera* L., tescovina proaspătă a soiului Merlot a reținut cel mai important procent de antociani după presarea strugurilor, cuprins între 43 și 46% din concentrația existentă în materia primă. Variațiile între anii de studiu pot fi puse și pe seama tehnologiilor de vinificare, mai exact, pe imposibilitatea obținerii unui randament constant de presare al strugurilor de la un an la altul, în sistemul experimental de cercetare.

Odată cu uscarea în condiții naturale a fructelor de soc și coacăz negru, precum și a tescovinei proaspete obținută prin prelucrarea strugurilor, a avut loc o concentrare a cantităților de compuși fenolici, cu precizarea că randamentul la uscare al probelor a variat în jurul valorii de 20%, cu o umiditate medie remanentă de 7%. Tescovina uscată a soiului Cabernet Sauvignon a



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMFOSDRU



Fondul Social European
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI
OIPOSDRU



USAMV
IAȘI

concentrat cele mai importante cantități de compuși fenolici totali, $5,1074 \pm 0,03$ g EAG/100 g produs uscat, antocianii deținând $1568,87 \pm 3,13$ mg cy-3-gl/100 g produs uscat.

Au fost identificate corelații negative majore, între conținutul în antociani și activitatea polifenoxidazei și peroxidazei (cu excepția speciei *Prunus cerasus* L.). Unei activități enzimatică ridicată a corespuns un conținut scăzut în antociani, demonstrând acțiunea negativă a enzimelor din grupa oxidoreductazelor asupra acestei clase de compuși fenolici.

În cazul catalazei, la soiurile cu un conținut ridicat de antociani, activitatea acesteia a fost și ea mai importantă, fiind invers relaționată cu activitatea celorlalte enzime analizate, datorită capacității acesteia de a descompune peroxidii, compuși cu acțiune distructivă asupra structurii antocianilor.

Antocianii izolați din plante sunt instabili și foarte dispuși la degradare. Datorită faptului că stabilitatea culorii unui produs este unul din factorii esențiali în autorizarea la comercializare a acestuia, au fost înregistrate degradările antocianice ale extractelor etanolice nepurificate, după 12 luni de păstrare a acestora în condiții optime de pH (1), temperatură și lumină. În cadrul studiului, extractele cu cea mai ridicată stabilitate a antocianilor au fost cele obținute din fructele speciei *Prunus cerasus* (degradare 13-23%), urmate de cele ale speciei *Morus nigra* (26%) și *Ribes nigrum* (29%). Stabilitatea ridicată a antocianilor a putut fi corelată cu o concentrație inițială mai importantă a acestora în soluțiile în care se găsesc, cu unele excepții. Astfel, pielețele strugurilor soiului Cabernet Sauvignon, deși au deținut cele mai importante concentrații antocianice din cadrul studiului, au suferit și cele mai importante degradări ale acestor compuși după perioada de păstrare (76%), pe fondul unui procent ridicat de antociani acilați (19% din total), cantitățile finale rămânând însemnate ($773,51 \pm 5,86$ mg cy-3-gl/100 g).

Profilul antocianic al extractelor metanolice, determinat prin tehnica LC/MS, a fost unic, caracteristic fiecărei specii, procentele de arie și cantitățile individuale ale antocianilor identificați fiind specifice fiecărui soi, dar cu tendințe generale în cadrul speciilor.

Antocianul cianidină-3-O-glucozid, cel mai răspândit în natură și pe baza căruia au fost cuantificate cantitățile totale și individuale de antociani, a fost identificat în profilul tuturor speciilor selectate pentru studiu, deținând poziția de antocian principal în fructele a doar două dintre acestea, *Morus nigra* L. și *Sambucus nigra* L.

Forme diglicozidice ale antocianilor au fost identificate în profilul speciilor *Prunus cerasus* L. (cianidină-3-O-glucozil-5-O-rutinozid) și *Sambucus nigra* L. (cianidină-3-O-sambubiozid-5-O-glucozid și cianidină-3,5-O-diglucozid), toate având în componență cianidina ca aglicon.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMFOSDRU



Fondul Social European
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI
OIPOSDRU



USAMV
IAȘI

A fost remarcată degradarea selectivă a unor antociani, odată cu uscarea materialului vegetal, indicând stabilitatea mai ridicată a unor specii antocianice, precum: malvidină-3-O-glucozid, delfinidină-3-O-rutinozid, pelargonidină-3-O-glucozid, ca o caracteristică tehnologică decisivă în alegerea speciei antocianice utilizate în rețetele alimentelor funcționale.

Valorile conținutului în antociani, obținute prin metoda spectrofotometrică a variației de pH, au fost, la majoritatea speciilor studiate (cu excepția speciei *Morus nigra* L.), mai ridicate decât cele individuale cumulate, obținute prin lichid-cromatografie, cu un procent general ce atinge un maxim de 15% la probele proaspete și aproximativ 30%, la probele uscate.

Odată cu creșterea concentrației fenolice a extractelor, valorile clarității psihometrice au fost afectate negativ, fapt sesizat și prin analiza senzorială a simulărilor computerizate ale culorii. Toate probele au prezentat valori pozitive, medii și ridicate, ale parametrului a^* , corespunzătoare coordonatei culorii complementare roșu, confirmând participarea antocianilor ca principali componenți ai culorii fructelor. Valorile parametrului b^* au fost, în general, pozitive, nuanțele de galben fiind preponderente față de cele albastre. Odată cu utilizarea metanolului, valorile parametrilor cromatici au suferit schimbări importante, având loc o extracție suplimentară a altor compuși fenolici decât antocianii (pigmenți flavonici galbeni, taninuri), etanolul fiind mai selectiv față de alte clase de compuși fenolici, implicit extrăgând preponderent pigmentul roșu.

Analiza statistică a varianței (ANOVA), aplicată valorilor experimentale ale conținutului total în antociani, la o probabilitate de transgresiune de 5%, a sugerat faptul că la toate speciile, valorile au fost influențate nesemnificativ de anul de studiu ($p\text{-value} > p = 0,05$; $F_{calc.} < F_{crit.}$), iar în raport cu factorul genetic au fost înregistrate variații semnificative (struguri) și foarte semnificative (cireșe, vișine) ($p\text{-value} < p = 0,001$; $F_{calc.} \gg F_{crit.}$) ale concentrației antocianice. Solventul utilizat pentru extracția antocianilor a influențat semnificativ și distinct semnificativ ($p\text{-value} < p = 0,01$) conținutul total în antociani al cireșelor și respectiv al vișinelor.

Capitolul VII al tezei de doctorat, prezintă **concluzii și recomandări** ce s-au desprins din analiza datelor experimentale.

Cantitățile importante de antociani identificate în fructele speciilor analizate, justifică extracția acestor compuși fenolici din materialul considerat și demonstrează faptul că fructele provenind din arealul municipiului Iași, atât în stare proaspătă cât și uscată, sau ca deșeuri în urma prelucrării acestora, reprezintă surse valoroase și accesibile de pigment, cu un imens potențial funcțional, cu utilizare în industria alimentară și farmaceutică. Aceștia pot înlocui cu succes compușii de sinteză, extractele obținute păstrându-și proprietățile biologice active, chiar și după perioade lungi de păstrare.