



**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ
VETERINARĂ CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE ZOOTEHNIE ȘI BIOTEHNOLOGII
ȘCOALA DOCTORALĂ: RESURSE VEGETALE ȘI ANIMALE
DOMENIU: BIOTEHNOLOGII**

Ing. PAG ANDREEA IOANA

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

**CARACTERIZAREA ȘI VALORIFICAREA LIGNANILOR
DIN SEMINȚELE DE IN**

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC
Prof. univ. dr. CARMEN SOCACIU**

CLUJ-NAPOCA

2014

CUPRINS

INTRODUCERE: SCOP ȘI OBIECTIVE	IV	
REZULTATE EXPERIMENTALE	VI	
CAPITOLUL I.		
OPTIMIZAREA METODEI DE EXTRAȚIE A LIGNANILOR	VII	
I.1	Probe analizate, proceduri și optimizări	VII
I.1.1	Caracterizarea materialului vegetal: aspect morfologic, proveniență	VII
I.1.2	Obținerea cocăi din semințe de in	VII
I.1.3	Pregătirea materialului vegetal pentru extracție	VII
I.1.3.1	Proceduri de extracție	VIII
I.2	Caracterizarea extractelor hidroalcoolice din semințe de in degresate	IX
I.2.1	Materiale și metode	IX
I.3	Rezultate și discuții	X
	Caracterizarea extractelor prin analiză spectrometrică UV-VIS	X
	Determinarea compușilor fenolici totali prin metoda Folin Ciocâlteu	XIV
	Determinarea activității antioxidante a extractelor	XVI
I.4	Concluzii	XVIII
I.5.1	Analiza cromatografică a extractelor	XVIII
I.5.2	Rezultate și discuții	XVIII
I.6.1	Activitatea antimicrobiana a extractelor	XXI
I.6.2	Rezultate și discuții	XXII
I.7	Concluzii	XXII
CAPITOLUL II.		
CARACTERIZAREA COMPARATIVĂ A COMPOZIȚIEI ÎN LIGNANI A EXTRACTELOR OBTINUTE DIN DIFERITE TIPURI DE SEMINȚE DE IN PRIN ANALIZA SPECTROMETRICĂ	XXIV	
II.1	Probe analizate, proceduri de obținere	XXV
II.1.1	Selectarea materialului vegetal	XXV
II.2	Obținerea extractelor din diferite tipuri de semințe de in	XXV
II.3	Caracterizarea extractelor hidroalcoolice din semințe de in degresate	XXVI
II.3.1	Materiale și metode	XXVI
II.3.2	Rezultate și discuții	XXVII
	Amprenta spectrometrică UV-VIS a extractelor	XXVII
	Determinarea compușilor fenolici totali prin metoda Folin	XXVII

	Ciocâlteu	
	Determinarea activității antioxidante a extractelor	XXVIII
	Caracterizarea extractelor prin analiza spectrometrică FT-MIR	XXIX
	Analiza tip Principal Component Analysis (PCA)	XXXI
II.3.3	Concluzii	XXXI
CAPITOLUL III.		
	ANALIZA VARIABILITĂȚII DE COMPOZIȚIE ÎN LIGNANI A EXTRACTELOR OBȚINUTE DIN DIFERITE TIPURI DE SEMINȚE DE IN INVESTIGATE PRIN CROMATOGRAFIE	XXXIII
III.1	Materiale și metode	XXXIV
III.2	Rezultate și discuții	XXXIV
III.3	Concluzii	XXXVI
CAPITOLUL IV.		
	OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA UNOR PRODUSE CE VALORIFICĂ POTENȚIALUL BIOMEDICAL AL LIGNANILOR	XXXVIII
IV.1	Obținerea alimentelor funcționale	XXXVIII
IV.2	Caracterizarea alimentelor funcționale	XL
IV.2.1	Materiale și metode	XL
IV.2.2	Rezultate și discuții	XL
IV.2.3	Concluzii	XLI
	Concluzii generale	XLII
	BIBLIOGRAFIE	XLIII

INTRODUCERE: SCOP ȘI OBIECTIVE

Descoperirile arheologice sugerează ca inul (*Linum usitatissimum L.*) a fost folosit de oameni încă de acum aproximativ 10.000 de ani. Acesta a fost, probabil, una dintre primele plante care au fost domesticite, acum aproximativ 6.000 de ani î.Hr. în Mesopotamia.

Conform datelor arheologice, semințele de in au fost încorporate în pâine în Iordania și în Grecia în urmă cu 3000 ani. Uleiul din semințe de in a fost utilizat ca aliment, în scopuri medicale încă din antichitate (Vaisey-Genser and Morris, 2003), dar și pentru fabricarea de vopsele. Semințele de in prezintă și acum un interes sporit datorită conținutului ridicat de conținut ridicat de compuși bioactivi fenolici (acizi fenolici și lignani), fibre alimentare și acizi grași esențiali omega 3, omega 6 și omega 9 (Dean, 2003).

Datorită componentelor bioactive și a nutrienților din semințele de in, acestea au devenit ingrediente folosite în dieta umană. Semințele de in sunt utilizate pe scară largă pentru realizarea de produse alimentare funcționale. Cererea crescândă a pieței pentru produse alimentare dietetice, cu conținut sporit de fibre și alte substanțe biologice active poate fi echilibrată prin diversificarea sortimentelor de produse, trend în care se înscriu și produsele cu formulări inovative propuse. Componentele din semințele de in, care conferă o serie de beneficii pentru sănătate sunt fibrele, lignanii și acizii grași (Omega-3 și omega 6). (Oomah, 2001).

Scopul cercetărilor a fost caracterizarea variabilității de compoziție în lignani a șapte soiuri diferite de semințe de in, optimizarea sistemelor de extracție, de identificare și dozare cromatografică și formularea unor produse cu valoare nutrițională superioară care valorifică potențialul biomedical al lignanilor.

Obiectivele punctuale ale cercetărilor proprii au urmărit:

1. Optimizarea sistemelor de extracție, de identificare și dozare cromatografică a lignanilor
2. Caracterizarea comparativă a variabilității de compoziție a extractelor de tip hidroalcoolic, din cele șapte soiuri de in investigate, utilizând metode analitice avansate (spectrometrie de tip UV-VIS, spectrometrie în Infraroșu Mediu (FT-MIR), LC-DAD-MS, HPLC și GC-MS)
3. Obținerea și caracterizarea unor preparate care valorifică potențialul biomedical al lignanilor

Teza este împărțită în două părți .

Prima parte este de studiu bibliografic și include două capitole (1-2):

Capitolul I. Semințele de in potențială sursă de lignani

Capitolul II. Metode de extracție și analiză a lignanilor

Partea a doua este partea de cercetări proprii și cuprinde patru capitole (3-6):

Capitolul III. Metode de extracție a lignanilor. Optimizarea extracției

Capitolul IV. Caracterizarea comparativă a compoziției extractelor obținute din diferite tipuri de semințe de in prin analiza spectrometrică

Capitolul V. Analiza variabilității de compoziție în lignani a extractelor obținute din diferite tipuri de semințe de in investigate prin cromatografie

Capitolul VI. Obținerea și caracterizarea unor produse ce valorifică potențialul biomedical al lignanilor

REZULTATE EXPERIMENTALE

Utilizările semințelor de in pot fi clasificate în trei grupe principale: (1) producția de uleiuri în scopuri comestibile (ca produs natural consumat ca atare, pentru gătit, ca ingredient de panificație, ingredient în produse de tip margarină) și aplicații industriale (ca întărire agent, pictură, cerneală de imprimantă și a vopselurilor), (2) producția de fibre pentru industria textilă, și (3) utilizarea semințelor ca materie primă pentru obținerea de produse cu valoare adăugată (coca de in, suplimente alimentare cu conținut ridicat în lignani), ca ingredient în industria alimentară (intră în componența produselor de panificație, paste și cereale pentru micul dejun), ca aliment funcțional (pentru a oferi protecție împotriva anumitor tipuri de cancer, boli de inimă, hiperglicemie, accident vascular cerebral și tromboză), ca hrană pentru animale, în formă de cocă rezultată din presarea semințelor (pentru bivoli, vite, cai, păsări de curte, pisici și câini) (Jhala and Hall, 2010; Oomah, 2001; Singh *et al.*, 2011).

Mai recent, a crescut interesul pentru încorporarea semințelor de in într-o serie de produse alimentare și ingrediente bioactive pentru sănătatea umană, inclusiv lignani, secoisolariciresinol diglucozid (SDG), acid α -linolenic (ALA) și polizaharide non-amidon (gumă sau fibre) (Hall *et al.*, 2006). De exemplu, făina din semințe de in a fost introdusă ca hrană pentru multe animale din ferme (pentru lapte și ouă) și pește, pentru a îmbogăți produsele lor cu acizi grași omega-3 (Jiang *et al.*, 1991; Kennelly, 1996; Thompson and Cunnane, 2003).

În ceea ce privește conținutul în lignani, semințele de in reprezintă cea mai însemnată sursă de lignani (conținutul în lignani este de 800 de ori mai mare decât în orice altă sursă alimentară) (Meagher and Beecher, 2000; Milder *et al.*, 2005; Smeds *et al.*, 2007; Cornwell *et al.*, 2004).

CAPITOLUL I.

METODE DE EXTRACȚIE A LIGNANILOR. OPTIMIZAREA EXTRACȚIEI

I.1 PROBE ANALIZATE, PROCEDURI ȘI OPTIMIZĂRI

I.1.1 Caracterizarea materialului vegetal: aspect morfologic, proveniență

Materia primă a constat în semințele de in din soiul “Cosmin”, cunoscut ca soi și pentru obținerea de fibre de bună calitate, provenite de la “Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare Agricolă Livada” din județul Satu-Mare.



Figura I.1 Semințe de in (soi Cosmin)

Coca de in obținută în urma presării la rece a semințelor de in a constituit materia primă pentru obținerea extractelor, deoarece valorifică un subprodus rezultat din industria uleiurilor și prezintă o serie de avantaje la condiționarea materialului vegetal: măcinarea și degresarea este mai facilă deoarece cea mai mare parte din ulei este îndepărtat și valorificat superior.

I.1.2 Obținerea cocăi din semințe de in

Semințele presate cu o presă de capacitate 8-10 kg/oră, produsă de SC GAMM SRL, România. Coca obținută, a fost lăsată la temperatura camerei să se răcească, apoi a fost depozitată în condiții de refrigerare până la utilizare.

I.1.3. Pregătirea materialului vegetal pentru extracție

Pregătirea materialului vegetal a constat supunerea acestuia unei serii de operații: măcinare, uscare și degresare, deoarece în literatura de specialitate se menționează că prin degresare, cantitatea de polifenoli și implicit și lignani se poate dubla, sau în unele cazuri chiar se poate tripla (Hall *et al.*, 2006).

I.1.3.1 Proceduri de extracție a lignanilor

15 grame de cocă de in, măcinată, uscată și degresată a fost supusă operației de extracție prin adăugarea proporției de solvent aferentă fiecărei probe conform planului de lucru, timp de 3-4 ore, la 60⁰C.

Parametrii variați în scopul optimizării extracției lignanilor au fost: raportul etanol:apă (v:v) și anume 100:0; 80:20; 60:40.

I.1.3.2 Hidroliza

A) Hidroliza acidă a extractelor brute

10 ml extract brut, a fost hidrolizat acid prin adăugarea a 1,644 ml acid clorhidric 37%, timp de 2 ore.

Deoarece în literatura de specialitate, datele existente menționează mai multe tipuri de hidroliză, s-a încercat optimizarea acesteia prin varierea temperaturii de hidroliză (60-80⁰C).

B) Hidroliza enzimatică

Deoarece lignanii din semințele de in se află localizați în invelișul exterior al semințelor, s-a încercat o prehidroliză enzimatică - o fermentare în stare solidă (solide state fermentation, SSF) a cocăi de in, înainte de extracția cu solvent propriu-zisă, cu lacaze provenite de la mucegaiuri: *Phanerochaete chrysosporium* și *Trichoderma reesei*.

Parametrii variați în scopul optimizării extracției au fost: timpul de expunere al materialului vegetal la prehidroliza enzimatică (*Trichoderma reesei*) și o comparație între prehidroliza enzimatică cu *Phanerochaete chrysosporium* și *Trichoderma reesei*.

C) Neutralizarea

A fost necesară în scopul neutralizării acidului clorhidric prezent în extracte, dar și pentru oprirea procesului hidrolitic.

D) Filtrarea

Filtrarea are ca scop obținerea unei soluții limpezi din suspensia extractelor hidrolizate. Extractele au fost filtrate prin filtre cu membrană polisulfon:poliflorură de vinilen (PSF:PVDF) cu dimensiunea porilor 0,45 μm.

I. 2 CARACTERIZAREA EXTRACTELOR HIDROALCOOLICE DIN SEMINȚE DE IN DEGRESATE

I.2.1. Materiale si metode

A) Amprenta spectrometrică UV-VIS a extractelor

Extractele au fost diluate 1:110. Din extractele diluate s-a prelevat 3 ml probă, care a fost introdusă într-o cuvă de cuarț (Helma Analytics, de grosime 100 mm). Citirea probelor s-a făcut în intervalul 210-400 nm, în raport cu un blank, care a fost apă distilată. Înregistrarea datelor s-a făcut cu ajutorul programului WinASPECT Versiunea 2.2.1.0.

B) Determinarea compușilor fenolici totali prin metoda Folin Ciocâlteu

1 ml extract a fost adăugat într-un balon cotat de 25 ml care a fost adus la semn cu apă distilată. Balonul a fost agitat și din acesta a fost prelevat 1 ml probă, la care s-a adăugat 0,5 ml reactiv Folin-Ciocâlteu, 2 ml carbonat de sodiu, Na_2CO_3 , 20% și 5 ml apă distilată. Amestecul a fost ținut la întuneric 90 min, absorbanta probelor a fost citită la 765 nm, în raport cu un martor preparat în aceleași condiții, cu ajutorul unui spectofotometru UV-VIS, model Specord 200 (Abdel-Hameed, 2009; Grubestic *et al.*, 2005).

C) Determinarea activității antioxidante a extractelor

A fost determinată activitatea antioxidantă atât pentru extractele brute, cât și pentru cele hidrolizate, astfel: din extractele brute, respectiv cele hidrolizate s-a amestecat o cantitate de 100 μl cu 3 ml DPPH (0,2 mM). Amestecul de reacție a fost agitat și menținut la temperatura camerei, la întuneric pentru o oră. Absorbanta s-a citit la 517 nm față de un blank. Înregistrarea datelor s-a făcut cu ajutorul programului WinASPECT Versiunea 2.2.1.0. S-au identificat absorbțiile specifice la lungimile de undă cu maxim și s-au măsurat intensitățile de absorbție.

I.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

A) Amprenta spectrometrică UV-VIS a extractelor

S-au identificat absorbțiile specifice la lungimile de undă cu maxim și s-au măsurat intensitățile de absorbție.

În funcție de absorbțiile specifice, s-au făcut identificări ale grupurilor de molecule, pe domenii: 212-214 nm pentru compuși lipidici (fitosteroli, lipide polare), unor vitamine (vitamina C, E) și terpenoide (Wrolstad *et al.*, 2005); 275-290 nm pentru compuși fenolici (acizi fenolici liberi sau derivați ai acizilor fenolici) (Wrolstad *et al.*, 2005); 270-290 nm pentru lignani (Amarowicz and Pegg, 2006); 320-330 nm pentru compușilor flavonoidici în forma liberă sau glicozilați (Wrolstad *et al.*, 2005); 390-420 nm pentru compuși flavonoidici și chinone derivate prin oxidarea polifenolilor (Wrolstad *et al.*, 2005).

Figurile I.2-I. 12 reprezintă spectrele suprapuse înregistrate comparativ pentru extracte brute și hidrolizate obținute în 4 și 3 ore:

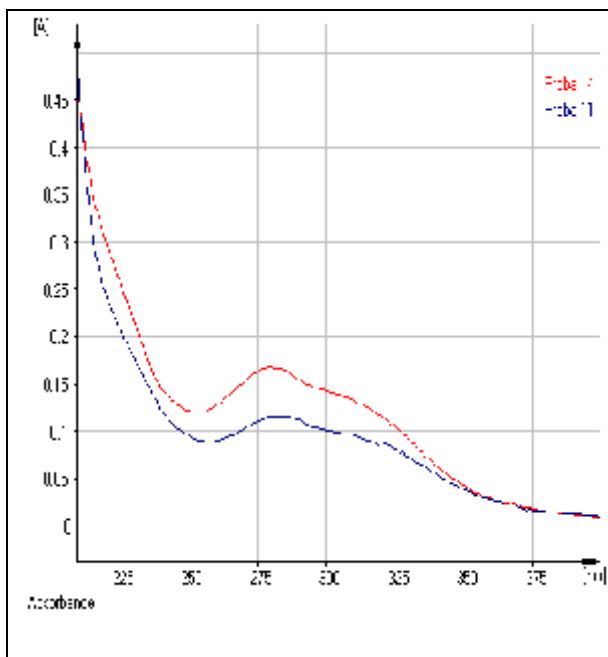


Figura I.2 Spectrele suprapuse înregistrate comparativ pentru extracte brute obținute în 4 (Proba 11) și 3 ore (Proba 14) cu etanol 100%

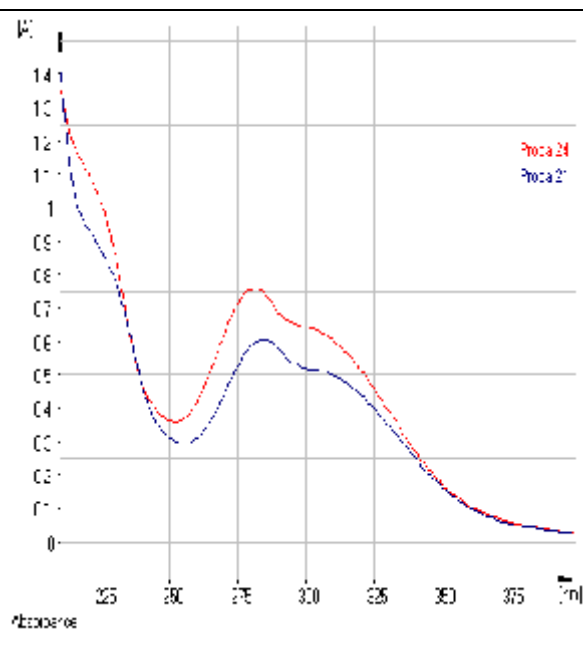


Figura I.3 Spectrele suprapuse înregistrate comparativ pentru extracte brute obținute în 4 (Proba 21) și 3 ore (Proba 24) cu etanol 80%

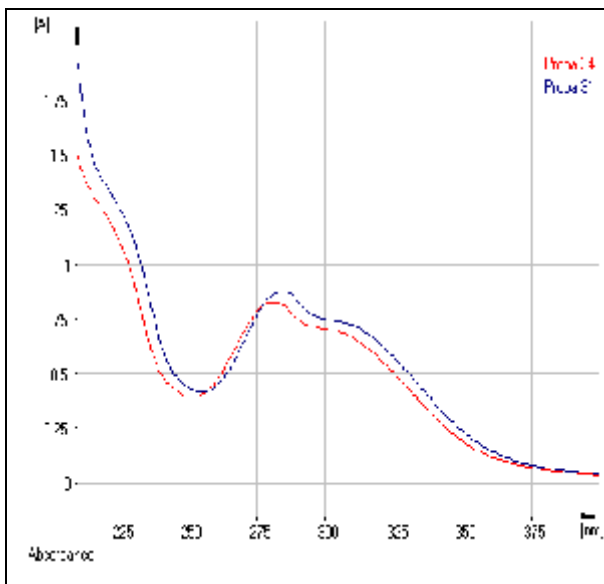


Figura I.4 Spectrele suprapuse înregistrate comparativ pentru extracte brute obținute în 4 (Proba 31) și 3 ore (Proba 34) cu etanol 60%

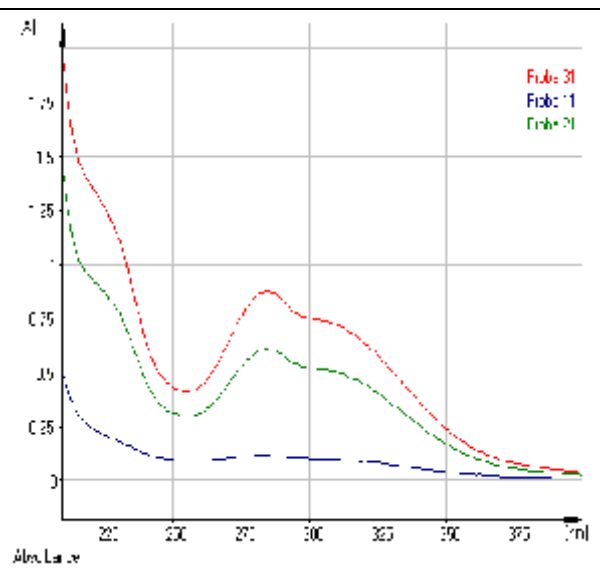


Figura I.5 Spectrele suprapuse înregistrate comparativ pentru extracte brute obținute în 4 ore, cu etanol 100% (Proba 11), cu etanol 80% (Proba 21) și cu etanol 60% (Proba 31)

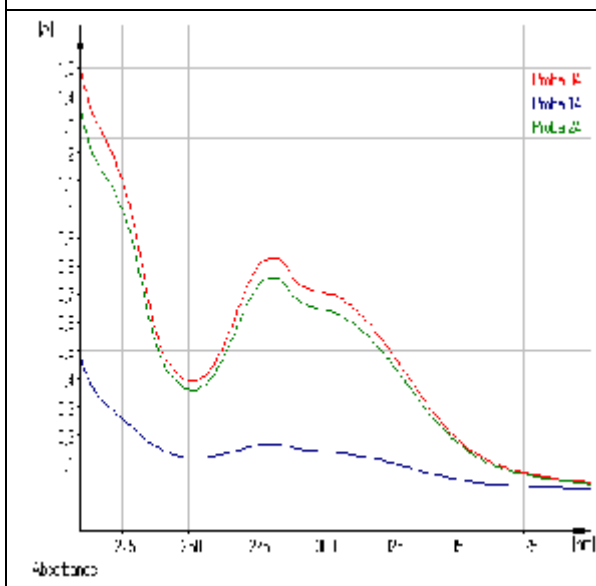


Figura I.6 Spectrele suprapuse înregistrate comparativ pentru extracte brute obținute în 3 ore, cu etanol 100% (Proba 14), cu etanol 80% (Proba 24) și cu etanol 60% (Proba 34)

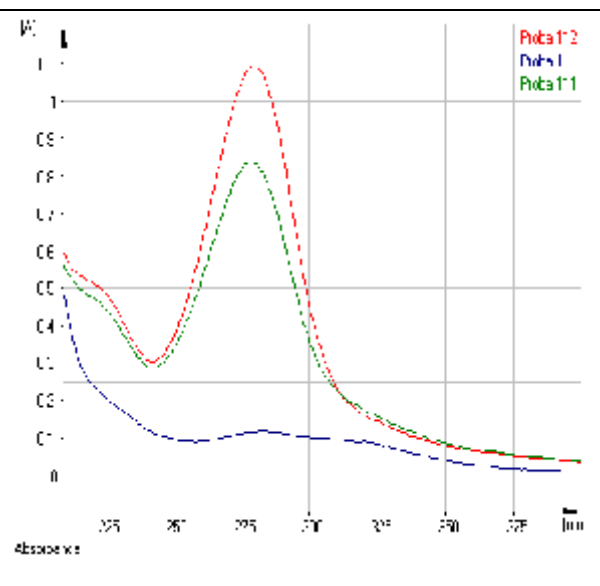


Figura I.7 Spectrele suprapuse înregistrate comparativ pentru extract brut (Proba 11) și extracte hidrolizate la temperatura de 80°C (Proba 111) și 60°C (Proba 112), obținute în 4 ore, cu 100% etanol

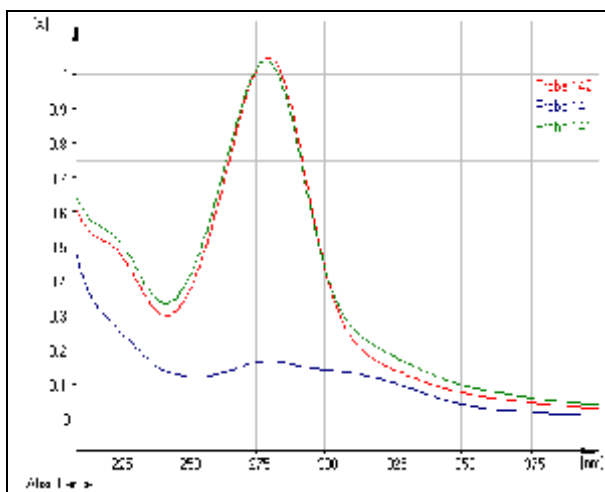


Figura I.8 Spectrele suprapuse înregistrate comparativ pentru extract brut (Proba 14) și extracte hidrolizate la temperatura de 80⁰C (Proba 141) și 60⁰C (Proba 142), obținute în 3 ore, cu 100% etanol

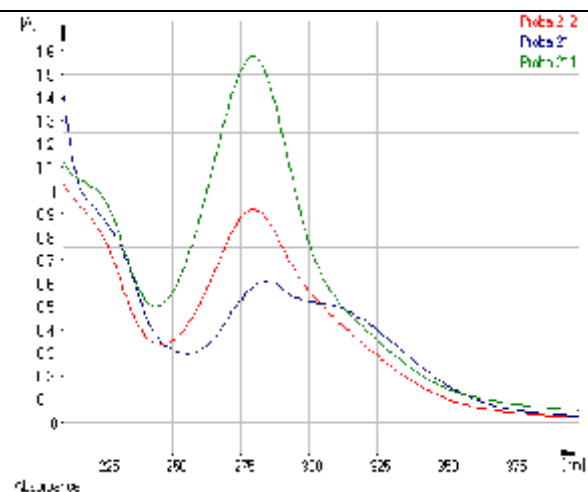


Figura I.9 Spectrele suprapuse înregistrate comparativ pentru extract brut (Proba 21) și extracte hidrolizate la temperatura de 80⁰C (Proba 211) și 60⁰C (Proba 212), obținute în 4 ore, cu 80% etanol

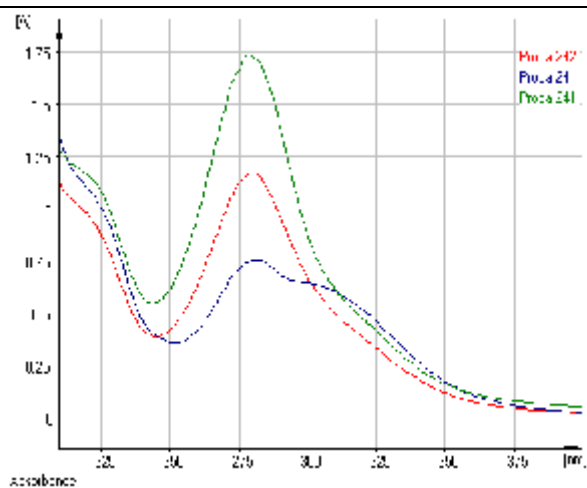


Figura I.10 Spectrele suprapuse înregistrate comparativ pentru extract brut (Proba 24) și extracte hidrolizate la temperatura de 80⁰C (Proba 241) și 60⁰C (Proba 242), obținute în 3 ore, cu 80% etanol

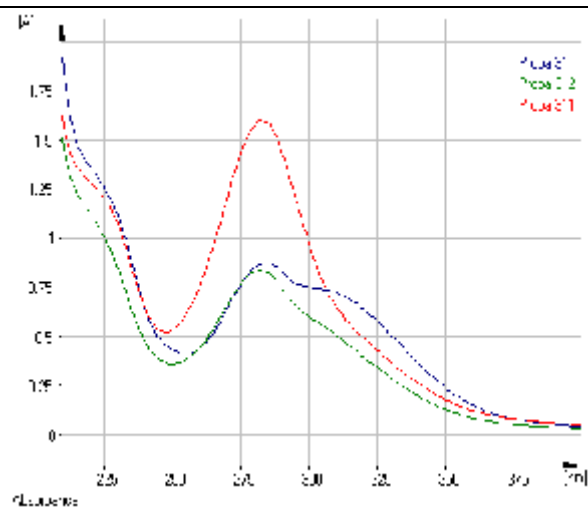


Figura I.11 Spectrele suprapuse înregistrate comparativ pentru extract brut (Proba 31) și extracte hidrolizate la temperatura de 80⁰C (Proba 311) și 60⁰C (Proba 312), obținute în 4 ore, cu 60% etanol

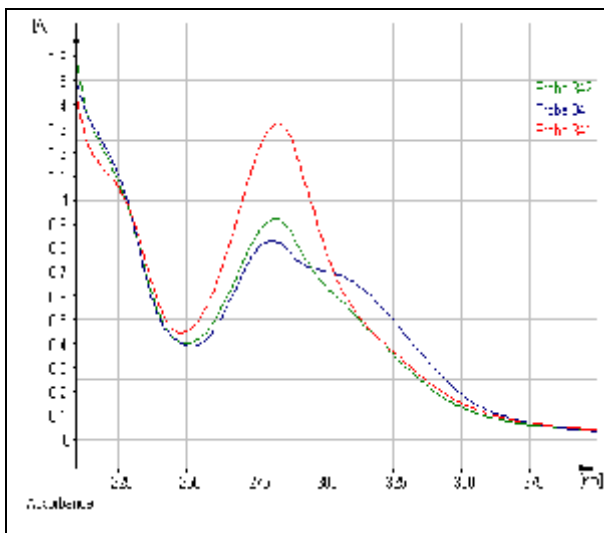


Figura I.12 Spectrele suprapuse înregistrate comparativ pentru extract brut (Proba 34) și extracte hidrolizate la temperatura de 80°C (Proba 341) și 60°C (Proba 342), obținute în 3 ore, cu 60% etanol

Din datele prezentate se pot sublinia următoarele **constatări și concluzii**:

Extracte brute

Solventul este un factor care influențează puternic extracția acizilor fenolici.

Din analiza amprentei UV-VIS a extractelor Figurile I.2-I4, a probelor brute reiese că o dată cu diluarea soluției etanolice, folosită ca solvent, crește cantitatea de compuși fenolici (275-290 nm) și compuși flavonoidici, în formă liberă sau glucozilată (320-330 nm).

Cea mai ridicată valoare în domeniu de absorbție specific acizilor fenolici, a fost înregistrată în cazul extractelor obținute cu 60% etanol (Proba 31) așa cum se poate observa și din Figura. I.5.

Această constatare poate fi explicată prin atingerea unei polarități optime a solventului, deoarece adăugarea apei în etanol duce la o creștere a polarității solventului.

În afară de polaritatea solventului, un alt motiv important pentru care s-a optat pentru utilizarea soluțiilor etanolice în detrimentul soluțiilor metanolice, a fost faptul că ne-am propus să valorificăm extractele obținute prin aplicații din domeniu alimentar.

Timpul nu influențează major extracția de acizi fenolici (275-290 nm), astfel în cazul utilizării etanolului 100% și 80% se obțin extracte mai bogate în 3 ore, iar în cazul utilizării etanolului 60% se obțin extracte asemănătoare atât în 3, cât și în 4 ore.

Extracte hidrolizate

Conform datelor prezentate (Figurile I.2-I.12) se constată că valorile absorbanței sunt mai mici, în cazul extractelor brute decât în cazul extractelor hidrolizate, îndeosebi în domeniul specific absorbției acizilor fenolici (275-290 nm) și flavonoidelor (320-330 nm).

La toate tipurile de extracte, atât cele obținute cu etanol 100%, cu etanol 80%, cât și cu etanol 60%, hidroliza influențează pozitiv cantitatea de acizi fenolici prezentă în extracte.

În cazul extractelor obținute cu etanol 100% în 4 ore (Figura I.7), temperatura optimă de hidroliză pentru obținerea cantității maxime de acizi fenolici este de 60⁰C (Proba 112). La un timp de extracție de 3 ore, cantitățile de acizi fenolici (275-290 nm) sunt aproximativ egale.

Cantitatea maximă de acizi fenolici (275-290 nm) la extractele obținute cu etanol 80% în 3 și 4 ore, s-a obținut în cazul hidrolizei la temperatura de 80⁰C.

La extractele obținute cu etanol 60% în 3 și 4 ore, temperatura optimă pentru obținerea celor mai bogate extracte în acizi fenolici (275-290 nm) este 80⁰C .

În zona specifică acizi fenolici (275-290 nm), absorbanta cea mai ridicată s-a întâlnit în cazul extractelor obținute în 3 ore, cu etanol 80%, hidrolizate la o temperatură de 80⁰C (Proba 241). Deoarece lignanii și derivații lor, ca și acizii fenolici au absorbțiile specifice la lungimile de undă de 270-290 nm, amprentele spectrale UV-VIS obținute, indică și prezența acestora în extracte.

B) Determinarea compușilor fenolici totali prin metoda Folin Ciocâlteu

În scopul determinării compușilor fenolici totali, s-a trasat dreapta de etalonare, s-a determinat ecuația de regresie și coeficientul de corelație pentru acidul galic, iar rezultatele sunt exprimate în mg GAE/L.

a) Determinarea compușilor fenolici totali a extractelor brute

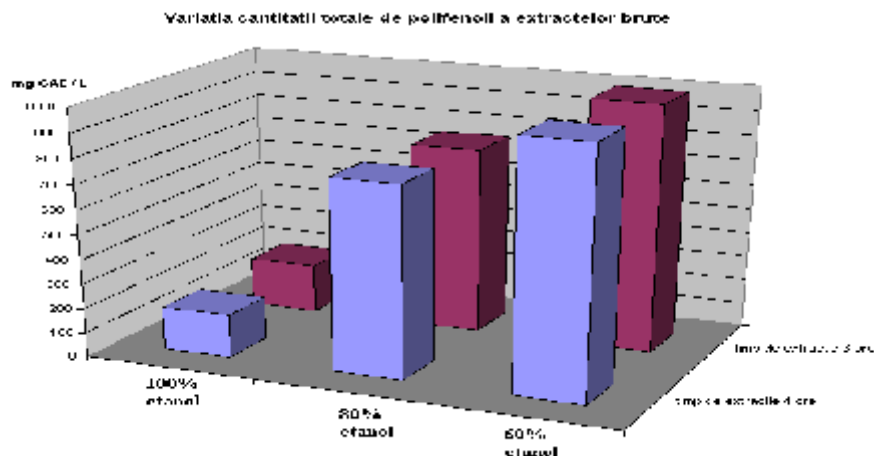


Figura I.13 Cantitatea totală de polifenoli a extractelor brute în funcție de concentrația solventului etanolic și de timpul de extracție

Din datele prezentate se pot sublinia următoarele **constatări și concluzii**:

În cazul extractelor brute, cantitatea de compuși fenolici totali crește o dată cu scăderea concentrației soluției de etanol. Astfel, cea mai scăzută cantitate de compuși fenolici totali o au extractele obținute cu 100%, iar cea mai mare cantitate de compuși fenolici totali o au extractele obținute cu 60%. Timpul nu este un factor care influențează puternic cantitatea de compuși fenolici totali, astfel valorile sunt apropiate atât în cazul extractelor obținute în 3 și 4 ore.

b) Determinarea compușilor fenolici totali din extractele hidrolizate

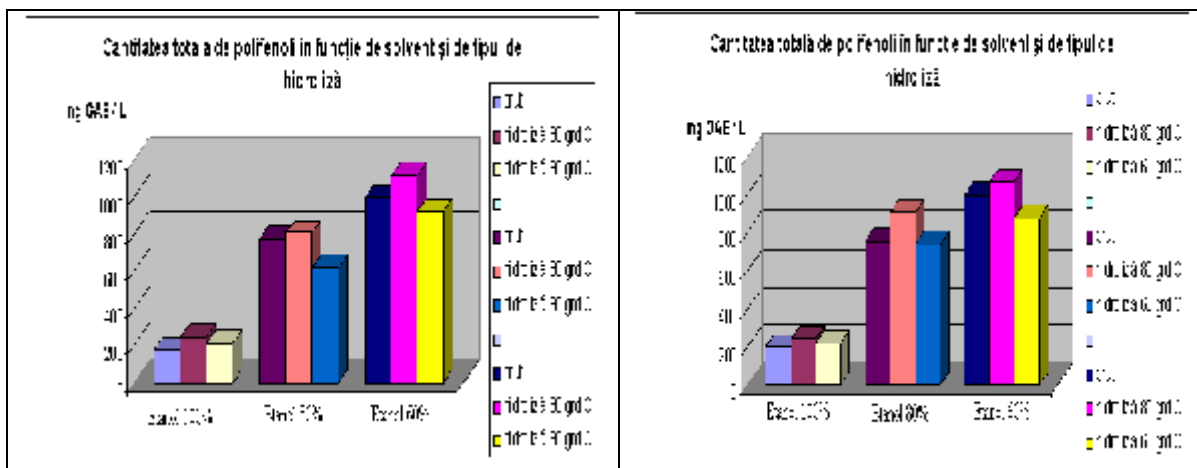


Figura I.14 Cantitatea totală de polifenoli a extractelor obținute în 4 ore, hidrolizate în funcție de concentrația solventului și de temperatura la hidroliză

Figura I.15 Cantitatea totală de polifenoli a extractelor obținute în 3 ore, hidrolizate în funcție de concentrația solventului și de temperatura la hidroliză

Din datele prezentate se pot sublinia următoarele **constatări și concluzii**:

Cantitatea de compuși fenolici totali variază atât în extractele brute cât și în extractele hidrolizate, în funcție de concentrația de etanol, timpul de extracție și temperatura la care s-a realizat hidroliza.

La extractele obținute cu etanol 100% și cu etanol 80%, hidroliza influențează pozitiv cantitatea de compuși fenolici totali prezentă în extracte, dar la extractele obținute cu etanol 60%, hidroliza o influențează negativ.

În cazul tuturor extractelor, temperatura optimă de hidroliză la care se obține valoarea maximă de compuși fenolici totali este de 80°C .

Cel mai mare conținut de compuși fenolici totali, de 908,27 mg GAE / L, s-a întâlnit la extractele obținute în 3 ore, cu etanol 80%, hidrolizate la o temperatură de 80°C (Proba 241), pentru care s-a obținut și cea mai mare valoare a absorbanței la amprenta spectrometrică UV-VIS a extractelor.

Determinarea activității antioxidante a extractelor

c) Determinarea activității antioxidante a extractelor brute

Tabel I.1

Inhibiția (% reducere a DPPH) în funcție de concentrația solventului și timpul de extracție a extractelor brute

Proba	Raport etanol:apă (v:v)	Timp de extracție (ore)	Temperatura hidroliza (grad C)	Inhibiția (%)
11	100:00	4	extracte brute	7,75
14	100:00	3	extracte brute	5,14
21	80:20	4	extracte brute	21,22
24	80:20	3	extracte brute	23,34
31	60:40	4	extracte brute	33,90
34	60:40	3	extracte brute	31,78

Activitatea antioxidantă a extractelor este influențată de concentrația soluției etanolice utilizate. Aceasta crește o dată cu scăderea concentrației soluției etanolice folosite la extracție. Astfel, cea mai scăzută activitate antioxidantă o au extractele obținute cu 100%, iar cea mai ridicată o au extractele obținute cu 60%. Timpul nu este un

factor care influențează puternic activitatea antioxidantă, astfel valorile sunt apropiate atât în cazul extractelor obținute în 3 și 4 ore.

d) Determinarea activității antioxidante a extractelor hidrolizate

Tabel I.2

Inhibiția în funcție de concentrația solventului și timpul de extracție a extractelor hidrolizate

Proba	Raport etanol:apă (v:v)	Timp de extracție (ore)	Temperatura hidroliza (grad C)	Inhibiția (%)
111	100:00	4	80	-13,09
112	100:00	4	60	-26,22
141	100:00	3	80	-13,81
142	100:00	3	60	-12,35
211	80:20	4	80	59,44
212	80:20	4	60	51,78
241	80:20	3	80	51,48
242	80:20	3	60	41,30
311	60:40	4	80	72,95
312	60:40	4	60	62,42
341	60:40	3	80	65,08
342	60:40	3	60	50,56

Din datele prezentate se pot sublinia următoarele **constatări și concluzii**:

La extractele obținute cu etanol 100%, hidroliza influențează negativ activitatea antioxidantă, dar în cazul celorlate tipuri de extracte, hidroliza are o influență pozitivă.

Pentru a obține cea mai ridicată activitate antioxidantă, temperatura optimă este de 80°C, fapt ce se corelează cu rezultatele ampretei UV-VIS și ale determinării cantității de compuși fenolici totali.

Comparând activitatea antioxidantă a extractelor brute cu cea a celor hidrolizate, se poate observa că aceasta se dublează prin hidroliză. Acest fapt se datorează ruperii legăturilor și deglicozilării compușilor fenolici. Aceste constatări sunt susținute de către mulți autori, care au raportat că activitatea antioxidantă a compușilor fenolici este mai mare în cazul agliconilor decât în cazul glicozidelor corespunzătoare (Kim and Lee, 2004; Fukumoto and Mazza, 2000; Rice-Evans *et al.*, 1997).

De asemenea, s-a obținut o corelație bună între conținutul de compuși fenolici totali (mg GAE / L) cu activitatea antioxidantă a extractelor (%), de $R^2=0.9004$.

I.4. CONCLUZII

Cantitatea totală de polifenoli variază în funcție de concentrația soluției etanolice folosită ca solvent și de timpul de extracție, așa cum reiese și din Figura I.14-15.

Experimentele desfășurate pentru determinarea cantității totale de polifenoli din extractele brute și hidrolizate au demonstrat că cea mai mare cantitate totală de polifenoli o au extractele brute, obținute în 3 și 4 ore, cu o concentrație de 60% a soluției etanolice folosite ca solvent.

Cea mai mare cantitate de polifenoli a extractelor hidrolizate se găsește în cel obținut în 3 ore prin extracție cu etanol 80%, hidrolizat la temperatura de 80⁰C, Figura I.15.

I.5.1 Analiza cromatografică a extractelor

A) Identificarea lignanilor prin analiza HPLC

Pentru a identifica și cuantifica lignanii din extracte au fost adaptate metodele folosite de Xin Li et al., 2008 și Muir and Westcott 2000 (Li *et al.*, 2008; Muir and Westcott, 2000). Analiza cromatografică s-a efectuat folosind un sistem HPLC Shimadzu, echipat cu un detector UV-VIS DAD și o coloană Zorbax, C18 4.6x 150 mm, 5μm. Fazele mobile utilizate au fost acid acetic 1% în apă (A) și metanol (B) iar debitul a fost de 1.2 ml/min. Cuplajul este prevăzut cu sistem de injectare automată, volumul de injecție al probei a fost de 20μL. Pentru identificarea și cuantificarea lignanilor, au fost utilizate standarde de lignani SECO, LARI, MATA.

I.5.2. Rezultate si discuții

a) Analiza HPLC a extractului brut si a hidrolizatelor

Pentru identificarea lignanilor din extractele vegetale s-au trasat inițial dreptele de etalonare pentru compușii standard.

Din analiza cromatografică a extractelor brute a rezultat necesitatea etapei de hidroliză a extractelor, deoarece, așa cum reiese și din literatura de specialitate, lignanii nu sunt liberi, ci sunt legați într-un lanț oligomeric.

În urma varierii parametrilor de extracție și de hidroliză au rezultat cantități diferite de lignani, așa cum reiese și din Tabelul I.3, dar care se încadrează în intervalul menționat în literatura de specialitate (Hall *et al.*, 2006; Kasote *et al.*, 2011; Milder *et al.*, 2005; Obermeyer *et al.*, 1995; Oomah, 2002).

Tabel I.3

Cantitatea de SECO, LARI, MATA obținută pentru extracte

Raport etanol:apă (v:v)	Timp de extracție (ore)	Temperatura Hidroliza (grd C)	SECO (μg/100 g semințe)	MATA μg/100 g semințe)	LARI (μg/100 g semințe)
100:00	4	80	21280,37	683,42	579,50
100:00	4	60	9666,36	720,01	673,09
100:00	3	80	19555,24	838,16	727,94
100:00	3	60	10751,79	985,88	852,08
80:20	4	80	155675,16	1129,88	814,96
80:20	4	60	199171,84	3059,37	1078,20
80:20	3	80	191497,16	1794,37	919,38
80:20	3	60	182983,18	1881,29	1135,95
60:40	4	80	208828,87	1977,45	844,29
60:40	4	60	304786,44	2474,36	1240,58
60:40	3	80	164071,39	2124,09	1169,43
60:40	3	60	315604,53	2558,51	1006,23

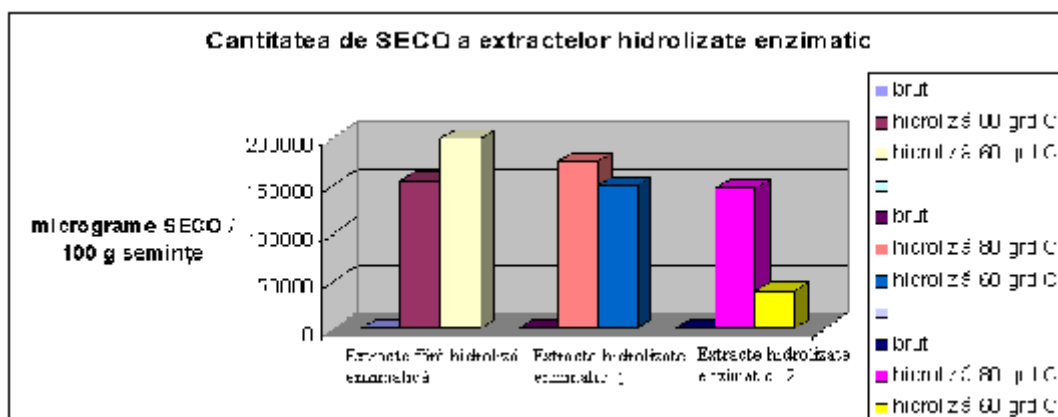


Figura I.16 Cantitatea de SECO a extractelor brute și hidrolizate enzimatic (Extracte hidrolizate 1-*Trichoderma reesei*, Extracte hidrolizate 2-*Phanerochaete crysosporium*)

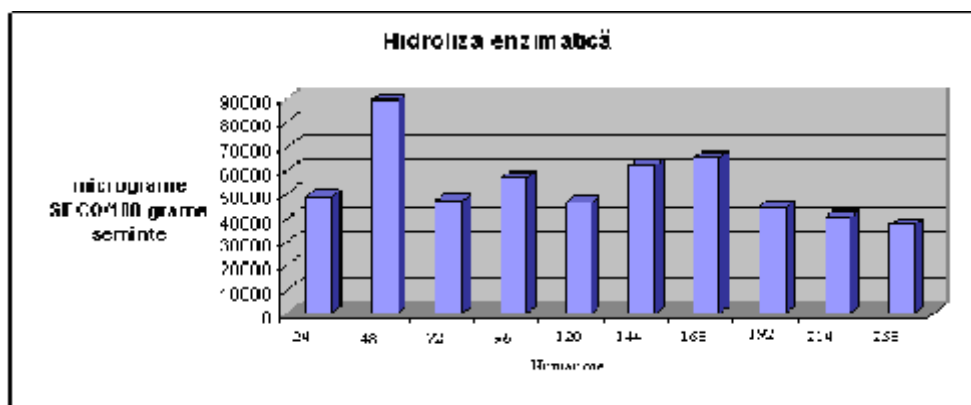


Figura I.17 Variațiile concentrației SECO, obținute prin analiza HPLC a extractelor, în funcție de durata hidrolizei enzimatic aplicate înainte extracției

Așa cum arată și Figura I.17, cantitatea de lignani obținută pentru extractele prehidrolizate enzimatic (24-258 ore) și ulterior supuse hidrolizei acide, la o temperatură de 80°C concentrate și filtrate, este comparabilă cu cea obținută în cazul extractelor clasice (nehidrolizate enzimatic). După cum se poate observa și în graficul din Figura I.17, în cazul hidrolizei enzimatic timpul optim este de 48 ore, obținându-se o valoare similară cu extractul clasic. O prelungire a timpului de hidroliză enzimatică duce la obținerea unei cantități mai mici de SECO datorită activității fenoloxidazice secundare a enzimelor.

În extractele brute analizate prin metoda HPLC, nu au putut fi identificați lignanii SECO, MATA, LARI. Acest fapt sugerează că acești agliconi nu există în formă liberă în semințele de in. Prin urmare, o hidroliză acidă preliminară este necesară pentru a elibera agliconii corespunzători din lanțul oligomeric.

În urma analizei cromatografice a extractelor hidrolizate s-au identificat SECO în concentrația cea mai mare și LARI, respectiv MATA în concentrații mai mici. De asemenea s-a observat și prezența unor alți compusi care absorb la lungimea de 280 nm cu o intensitate ridicată, dar care nu au fost identificați conform etaloanelor. Datele

obținute din analiza calitativă și cantitativă a probelor sunt în conformitate cu literatura de specialitate (lignani totali 330.000 – 370.000 μg/100 g semințe) (Hall *et al.*, 2006; Kasote *et al.*, 2011; Milder *et al.*, 2005; Obermeyer *et al.*, 1995; Oomah, 2002).

Din figurile de mai sus se poate observa trendul ascendent al concentrației de SECO, dinspre probele supuse extracției cu etanol pur către probele obținute cu soluții etanolice de 80%, respectiv 60%, atât în cazul extracției de 4 ore cât și în cazul extracției de 3 ore.

Extractul cel mai bogat în SECO este obținut prin extracție cu 60% etanol. Acest aspect este întărit și de costatarea anterioară, că polifenolii totali sunt în concentrație maximă în acel extract.

În plus, probele obținute cu aceeași concentrație a soluției etanolice, dar hidrolizate la temperaturi diferite ne indică o temperatură optimă de hidroliză de 60°C, pentru obținerea unei cantități maxime de lignani.

Probele obținute prin hidroliză (2M HCl) timp de 2 ore la 80°C au prezentat o activitate antioxidantă crescută comparativ cu cele hidrolizate la 60°C. Acest lucru s-a întâmplat în ciuda scăderii conținutului de SECO, MATA și LARI o dată cu creșterea temperaturii de hidroliză. Acest fapt se poate datora și unei hidrolize avansate care conduce la o deglucozilare totală lignanilor. Probabil în acest fel se pot obține cantități mai mari de anhidro-SECO și alți agliconi, care prezintă o creștere a activității antioxidante în comparație cu SDG, SMG și SECO (Kim and Lee, 2004; Rice-Evans *et al.*, 1997).

I.6 ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A EXTRACTELOR

I.6.1 Caracterizarea activității antimicrobiene a unor extracte de lignani din semințe de in brute și hidrolizate

O investigare tip screening a extractelor obținute prin metoda difuzimetrică a fost aleasă pentru a determina activitatea antimicrobiană pe trei specii bacteriene *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, precum și pe drojdia *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

I. 6.2 Rezultate și discuții

Tabel I.4

Zonele de inhibiție a extractelor și a antibioticelor de referință

Microorganismele de referință	Zonele de inhibiție (mm)			
	Inhibition areas (mm)			
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019
Extract 11	6	10	9	-
Extract 21	12	14	15	-
Extract 31	12	13	15	-
Extract 41	10	12	12	-
Gentamicină	17	19	ND	ND
Ofloxacină	21	19	22	ND
Amikacină	ND	21	21	ND
Kanamycină	18	-	18	ND
Cefuroxim	26	-	17	ND
Eritromicină	20	10	11	ND
Fluconazol	ND	ND	ND	-
Nistatin	ND	ND	ND	25

ND – nedeterminat

S-au observat zone de inhibiție semnificative în cazul tuturor celor 4 extracte brute proaspete nehidrolizate, neconcentrate, atât asupra *S. aureus* (bacterie Gram pozitivă), cât mai ales asupra bacteriilor Gram negativ (*Escherichia coli* și *Pseudomonas aeruginosa*), comparabil cu activitatea antibacteriană exercitată de antibioticele de referință.

În ceea ce privește activitatea antimicotică, se constată că extractele brute, neconcentrate, nu manifestă acțiune împotriva *Candida parapsilosis*.

I.7 CONCLUZII

Din concluziile referitoare la datele prezentate în acest capitol se pot constata următoarele aspecte:

1. Metoda spectrometrică UV- VIS este adecvată pentru a face amprenta specifică și comparativă a extractelor.

2. Extractele cu cel mai mare conținut de polifenoli totali și cea mai mare activitate antioxidantă au fost cele care s-au evidențiat și prin amprenta UV-VIS cu cea mai mare valoare a absorbanței (270-290nm).
3. Extractele brute și hidrolizate obținut cu etanol 60% și 80% au prezentat o activitate antioxidantă remarcabilă între 21,22 și 72,95%, corelarea dintre aceasta și conținutul de compuși fenolici totali este bună ($R^2 = 0.9004$). Probele extrase utilizând etanol 100%, au fost ineficiente în exprimarea unei activități antioxidante semnificative, această constatare fiind explicabilă prin conținutul lor scăzut de polifenoli totali (206-241 mg GAE / L).
4. Similar cu conținutul total de polifenoli, concentrațiile SECO și LARI din extracte cresc pe măsură ce concentrația etanolică scade, de la 0,9 mg SECO / 100 g semințe pentru extractele etanolicе 100% până la 315 mg SECO / 100 g semințe pentru extractele etanolicе 60% și de la 0,57 mg LARI / 100 g semințe pentru extractele etanolicе 100% la 1,2 mg LARI / L pentru extractele etanolicе 60% (Tabel I.3). În schimb, cel mai mare conținut de MATA (3,05) corespunde probei obținute cu soluție etanolică 80%.
5. Putem trage concluzia că în vederea aplicațiilor practice, unde este vizat preponderent efectul antimicrobian, pot fi folosite atât extractele hidrolizate (cu conținut superior de lignani) cât și extractele brute (cu conținut semnificativ de polifenoli totali).

CAPITOLUL II.

CARACTERIZAREA COMPARATIVĂ A COMPOZIȚIEI ÎN LIGNANI A EXTRACTELOR OBȚINUTE DIN DIFERITE TIPURI DE SEMINȚE DE IN PRIN ANALIZA SPECTROMETRICĂ

OBIECTIVE ȘI EXPERIMENTE

Pentru a caracteriza comparativ compoziția și cantitatea de lignani din diferite soiuri de semințe de in, s-au urmărit două obiective, și anume :

- I. stabilirea variabilității conținutului de lignani și acizi fenolici în diferite soiuri de in
- II. stabilirea metodelor optime (de tip spectrometrie UV-VIS, FT-MIR) pentru evaluarea corectă a concentrațiilor de lignani și acizi fenolici

II.1 PROBE ANALIZATE, PROCEDURI DE OBȚINERE

II.1.1. Selectarea materialului vegetal

S-au utilizat 7 soiuri de semințe de in: Amon din Cehia; Bukoz, Modran și Szafir, Oliwin din Polonia; Cosmin din România, Omega din Canada. Anul în care aceste semințe au fost cultivate a fost 2011. În Fig. 1 Sunt prezentate cele 7 soiuri de semințe.



Figura II.1 Soiurile de semințe de in selectate

În scopul realizării unui studiu comparativ, s-au utilizat atât soiuri cunoscute pentru obținerea de fibre cu aplicabilitate preponderent în industria textilă, cât și soiuri cunoscute pentru obținerea de semințe, care au ca destinație industria alimentară. Soiurile, cunoscute pentru obținerea de fibre, utilizate în acest studiu au fost: Cosmin, care este un hibrid obținut în România, în anul 1985 din soiurile Lazurnii și Lintex (Ilea, 2009) și Modran (Heller, 2013); iar soiurile, care au ca destinație industria alimentară, utilizate au fost: Bukoz, Oliwin, Amon, Szafir, Omega (Ganorkar and Jain, 2013; Heller, 2013).

a) Obținerea extractelor brute

Extractele au fost obținute din 15 g semințe de in măcinate, uscate și degresate, la care s-au adăugat 100 ml amestec alcool:apă (60:40), timp de 3 ore, la temperatura de 60°C.

b) Hidroliza extractelor brute

20 ml extract brut a fost hidrolizat cu 3,288 ml HCl, 37%, la temperatura de 60°C,

timp de 2 ore.

c) Neutralizarea extractelor hidrolizate

Acidul clorhidric utilizat la hidroliza extractelor brute, a fost neutralizat cu NaOH, până la pH 7.

d) Filtrarea

S-a realizat cu ajutorul filtrelor cu membrană polisulfon:poliflorură de vinilen (PSF:PVDF) cu dimensiunea porilor de 0,45 μm .

II. 3 CARACTERIZAREA EXTRACTELOR HIDROALCOOLICE DIN SEMINȚE DE IN DEGRESATE

II.3.1. Materiale și metode

a) Amprenta spectrometrică UV-VIS a extractelor

Extract hidroalcoolic hidrolizat, obținut conform procedurii de mai sus, a fost diluat 1:110. Procedul de obținere a amprentelor spectrometrice este descris în capitolul anterior.

b) Determinarea compușilor fenolici totali prin metoda Folin Ciocâlțeu

Determinarea compușilor fenolici totali prin metoda Folin Ciocâlțeu a fost descrisă în capitolul anterior.

c) Determinarea activității antioxidante a extractelor

Procedul de determinare a activității antioxidante a extractelor este descris în capitolul anterior.

d) Caracterizarea extractelor prin analiza spectrometrică FT-MIR

Spectrometria în infraroșu cu transformantă Fourier (FTIR) este o metodă rapidă de caracterizare a extractelor din plante, cu ajutorul căreia s-a determinat prezența legăturilor chimice proprii polifenolilor, care au în infraroșu, frecvențe și intensități de absorbție specifice.

e) Analiza tip Principal Component Analysis (PCA)

Pentru analiza calitativă și cantitativă a fost folosit programul Unscrambler X (Camo, Norvegia). Modelul de calibrare a fost elaborat folosind normalizarea spectrelor. Domeniul spectral 650-1800 cm^{-1} a fost folosit pentru procesele de calibrare și predicție.

II.3.2. Rezultate și discuții

a) Amprenta spectrometrică UV-VIS a extractelor

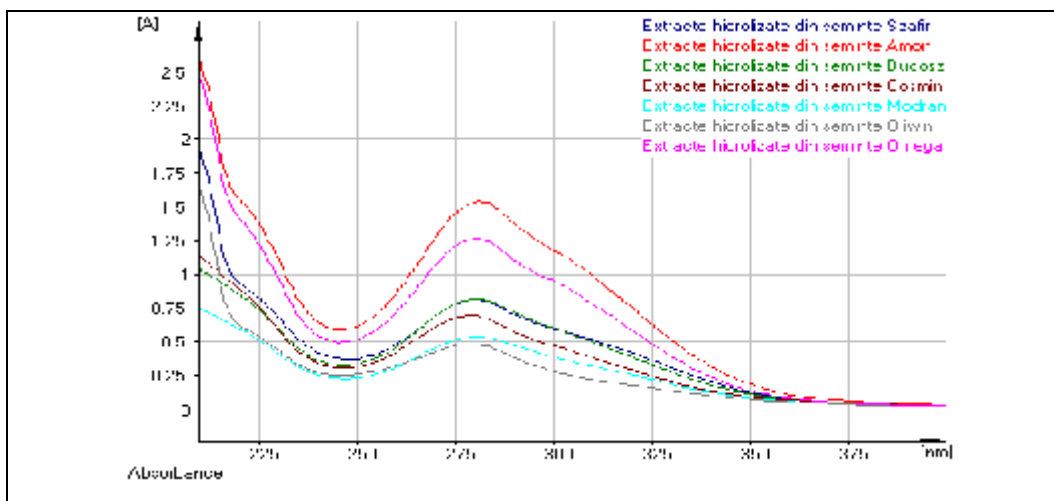


Figura II.2 Spectrele UV-VIS ale extractelor hidrolizate obținute din diferite soiuri de semințe de in (210-400 nm)

De asemenea s-a înregistrat absorbanta extractelor, diluate 1:110, la 280 nm.

Ampretele UV- VIS cu cea mai mare intensitate a absorbantei (275-290 nm) au fost cele obținute din semințe Amon, urmate de Omega, Bukoz, Szafor, Cosmin, Modran, Oliwin.

Deoarece lignanii și derivații lor absorb la lungimile de undă de 270-290 nm, ampretele spectrale UV-VIS obținute, poate indica și prezența acestora în extracte.

b) Determinarea compușilor fenolici totali prin metoda Folin Ciocâlțeu

Tabel II.1

Cantitatea de compuși fenolici totali a extractelor

Denumire semințe	Compuși fenolici totali (mg GAE / L)	Compuși fenolici totali (mg GAE / 100 materie primă degresată)	Compuși fenolici totali (mg GAE / 100 semințe)
Amon	1145,95	1197,07	784,26
Bukoz	567,55	589,084	399,39

Cosmin	638,88	693,99	468,51
Modran	462,22	484,38	369,74
Oliwin	483,45	505,82	368,47
Omega	1141,73	1188,843	729,58
Szafir	725,73	752,05	505,78

Cel mai mare conținut de compuși fenolici totali, de 1145,95 mg GAE / L, s-a întâlnit la extractele obținute din semințe Amon, urmat de Omega (1141,73 mg GAE / L), Szafir (725,73 mg GAE / L), Cosmin (638,88 mg GAE / L), Bukoz (567,55 mg GAE / L), Oliwin (483,45 mg GAE / L) și Modran (462,22 mg GAE / L).

Ampronta UV-VIS a extractelor se corelează pozitiv cu cantitatea de compuși fenolici totali, astfel că în extractele cu cea mai mare intensitate a absorbanței (275-290 nm) s-a obținut și cea mai mare cantitate de compuși fenolici totali.

c) Determinarea activității antioxidante a extractelor hidrolizate

Tabel II.2
Activitatea antioxidantă a extractelor

Denumire semințe	Inhibiția (%)
Amon	66,19
Bukoz	47,97
Cosmin	45,03
Modran	38,13
Oliwin	30,57
Omega	61,84
Szafir	52,81

Extractele hidrolizate din diferite tipuri de semințe de in au prezentat o activitate antioxidantă remarcabilă, oscilând de la un minim de 30,57 % pentru extractele obținute din semințe Oliwin la 66,19 % la extractele obținute din semințe Amon.

Activitatea antioxidantă a extractelor hidrolizate se corelează cu conținutul total de polifenoli, obținând un coeficient de corelație R^2 de 0,8489.

d) Spectrele FT- MIR pentru extracte din diferite tipuri de semințe de in

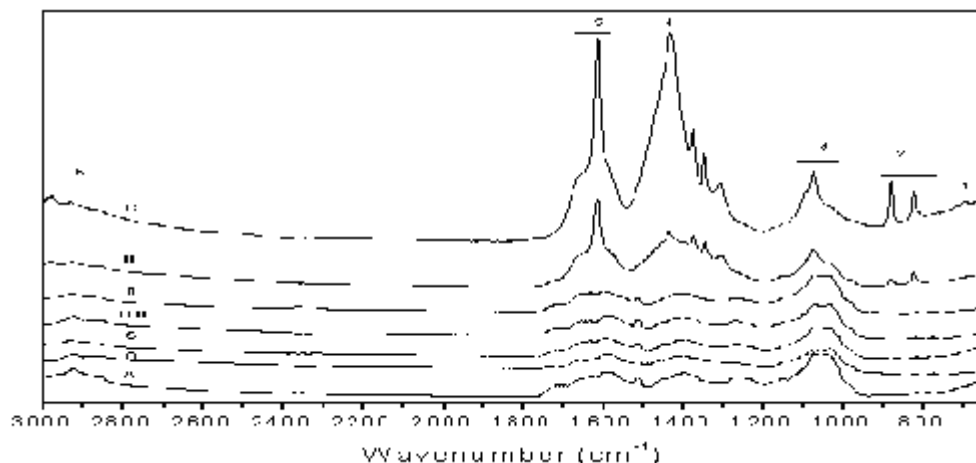


Figura II. 3 Spectrele IR comparative, cu regiunile specifice pentru fiecare tip de extract (A - extract obținut din semințe Amon, B - extract obținut din semințe Bukoz, C - extract obținut din semințe Cosmin, M - extract obținut din semințe Modran, O - extract obținut din semințe Oliwin, OM - extract obținut din semințe Omega, S - extract obținut din semințe Szafir)

Pe lângă spectrele FTIR înregistrate pentru extracte, s-au înregistrat și spectrele pentru trei substanțe etalon: acid ferulic, SECO și SDG. Acestea sunt prezentate în Figura II.4..

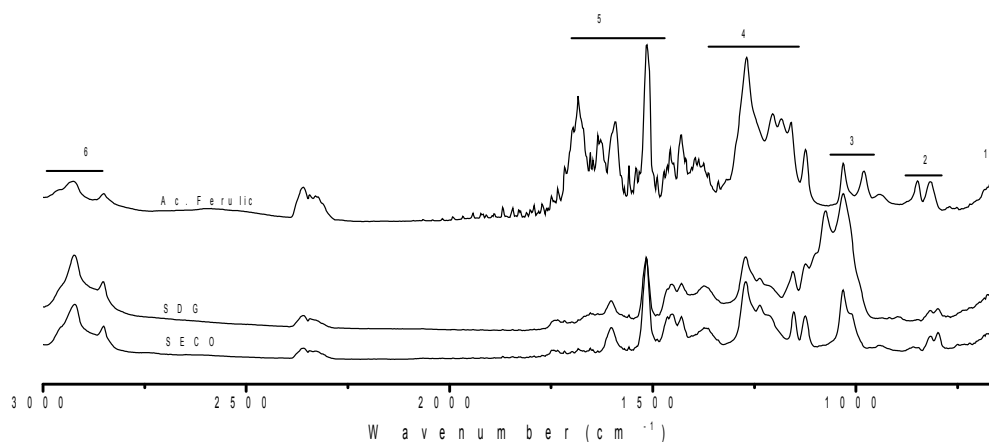


Figura II.4 Spectrele IR cu regiunile specifice pentru standarde de acid ferulic, SDG, SECO

S-au remarcat diferențe între amprenta FTIR a extractelor realizate din soiurile destinate obținerii de fibre, C (extract din semințe Cosmin) și M (extract obținut din semințe Modran) față de celelalte extracte A (Amon), B (Bukoz), O (Oliwin), OM (Omega), S (Szafir), realizate din soiuri destinate obținerii de semințe.

Din analiza comparativă a aspectului spectrelor FTIR se constată că:

- În zona 1 ($600-670\text{ cm}^{-1}$) apare un semnal atât în cazul standardelor, cât și în cazul extractelor obținute, mai proeminent în cazul extractului din semințe Cosmin, ceea ce poate indica o prezență mai abundentă a acidului ferulic.

- În zona 2 ($750-900\text{ cm}^{-1}$) apar 2 semnale caracteristice atât pentru toate cele trei substanțe standard (acid ferulic, SECO, SDG). Ele pot fi regăsite și în spectrul extractului obținut din semințe Cosmin și Modran, indicând încă o dată că în aceste tipuri de extracte există posibilitatea identificării acestora.

- În zona 3 ($1000-1150\text{ cm}^{-1}$) apar semnale caracteristice atât pentru toate cele trei substanțe standard (acid ferulic, SECO, SDG) cât și pentru probe, ce pot fi atribuite glucozei rezultate din hidroliza lignanilor și a polifenolilor, sau din SDG.

- În zona 4 ($1200-1450\text{ cm}^{-1}$) și zona 5 ($1500-1700\text{ cm}^{-1}$) apar diferențe care identifică conținutul de acizi fenolici ai probelor, respectiv pot fi recunoscute probele care au o cantitate mai mare de acizi fenolici printr-o intensitate și arie mai mare a semnalelor, semnificativ în cazul extractului obținut din semințe Cosmin.

- În zona 6 ($2800-3000\text{ cm}^{-1}$) apar 2 semnale caracteristice atât pentru toate cele trei substanțe standard (Acid ferulic, SECO, SDG) cât și pentru probe, ce pot fi atribuite grupărilor metil din compușii metoxilați sau lanțuri alchil, precum și prezenței unor aldehide.

e) Analiza tip Principal Component Analysis (PCA)

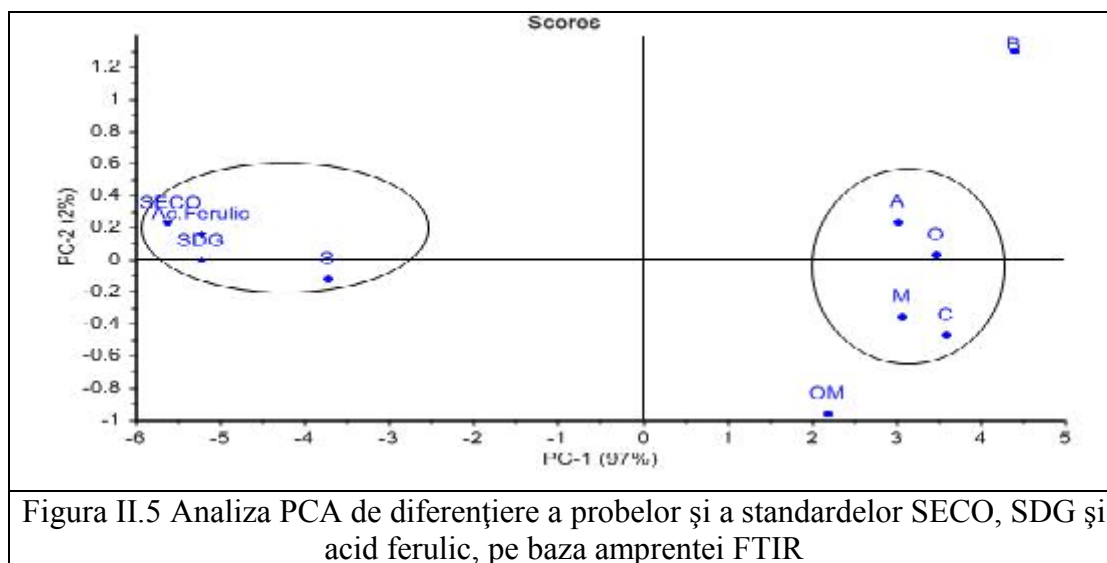


Figura II.5 Analiza PCA de diferențiere a probelor și a standardelor SECO, SDG și acid ferulic, pe baza amprentei FTIR

Prin analiza PCA a diferențelor între profilurile spectrelor s-a obținut gruparea probelor după structura acestora. Probele A, O, M, C prezintă o grupare satisfăcătoare, probele B și OM sunt în afara grupului caracteristic, în opoziție (corelație negativă). O corelație bună există între proba S și toate cele 3 standarde analizate (SECO, acid ferulic, SDG), avându-le pe toate în compoziția ei.

II.3.3 Concluzii

Cu ajutorul analizei spectrometrice UV-VIS s-au putut diferenția toate cele 7 extracte obținute din diferite soiuri de semințe de in. La extractele care au avut cea mai mare intensitate a absorbanței ($275-290\text{ nm}$) s-a obținut și cea mai mare cantitate de compuși fenolici totali.

Conținutul total de polifenoli se corelează bine (coeficient de corelație, R^2 de 0,8489) cu activitatea antioxidantă a extractelor hidrolizate.

Prin analiza spectrometrică UV-VIS, nu se pot face diferențieri între cele 2 tipuri de semințe, pentru obținere de fibre și cele care au ca scop consum alimentar.

Tehnica FT-MIR reprezintă o metodă rapidă și nedistructivă pentru determinarea ampretei specifice a extractelor hidrolizate din semințele degresate, dar și pentru determinarea acizilor fenolici și a lignanilor din extracte.

Spectrometria FT-MIR a permis evidențierea „ampretei” specifice a extractelor investigate, evidențiind zonele care sunt specifice și cu intensități care să permită evaluarea comparativă a grupelor funcționale specifice din fiecare extract.

În evaluarea extractelor hidrolizate au fost identificate benzi IR specifice acizilor fenolici și a lignanilor, în regiunile 4 ($1200-1450\text{ cm}^{-1}$) și 5 ($1500-1700\text{ cm}^{-1}$).

Cu ajutorul metodei FT-MIR, regiunea 3 ($1000-1150\text{ cm}^{-1}$) și regiunea 6 ($2800-3000\text{ cm}^{-1}$), pot fi deosebite extractele obținute din tipuri destinate obținerii de fibre, de soiurile destinate consumului alimentar.

CAPITOLUL III.

ANALIZA VARIABILITĂȚII DE COMPOZIȚIE ÎN LIGNANI A EXTRACTELOR OBȚINUTE DIN DIFERITE TIPURI DE SEMINȚE DE IN INVESTIGATE PRIN CROMATOGRAFIE

OBIECTIVE ȘI EXPERIMENTE

Pentru a evalua variația cantității de lignani și acizi fenolici din semințele de in, s-au utilizat comparativ tipuri de semințe pentru fibre, respectiv pentru obținerea de ulei. S-au urmărit două obiective, și anume:

- I. Stabilirea importanței tipului de semințe utilizate în evaluarea cantităților de lignani prezenți în semințele investigate.
- II. Evaluarea cantității de lignani și acizi fenolici prezenți în extractele din diferite tipuri de semințe de in.

III.1 MATERIALE ȘI METODE

Caracterizarea extractelor prin analiza cromatografică LC-DAD-MS

În Capitolul I, s-au observat compuși care alături de lignani absorb la 280 nm, care pot fi acizi fenolici, iar pentru caracterizarea cât mai riguroasă a extractelor din punct de vedere al compoziției, s-a decis optimizarea metodei astfel încât atât lignanii cât și acizii fenolici să poată fi cuantificați. Analiza cromatografică descrisă în Capitolul III, a fost modificată și s-a efectuat folosind un sistem LC-MS Agilent 6110, echipat cu un detector UV-VIS DAD și MS cu un cuadropol. Coloana de separare a fost Agilent Eclipse XDB-C18 4.6x 150 mm, 5 μ m. Fazele mobile utilizate au fost apă, acetonitril și acid acetic (99:1:0,1) (v:v:v) (A) și acetonitril și acid acetic (100:0,1) (v:v) (B) iar debitul a fost de 0,5 ml/min. Volumul de injecție al probei: 20 μ L.

III.2 REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pentru identificarea lignanilor din extractele vegetale s-au utilizat ca standarde SDG, SECO, MATA, LARI și PINO - produse comerciale de puritate HPLC, $\geq 99\%$, achiziționate de la Sigma-Aldrich.

Pentru identificarea lignanilor din extractele vegetale s-au trasat inițial dreptele de etalonare pentru compușii standard. În acest scop, s-a preparat o soluție inițială de lignani (SDG, SECO, MATA, LARI, PINO) cu concentrații cunoscute din fiecare compus și diluțiile intermediare. S-au efectuat 5 injecții succesive pentru fiecare concentrație cu scopul stabilirii dreptelor de etalonare pentru fiecare compus.

În extractele obținute din diferite tipuri de semințe de in, au rezultat cantități diferite de lignani, așa cum reiese și din Figura III.1, care se încadrează în intervalul menționat în literatura de specialitate. (Hall și colab., 2006; Jennifer și colab., 2010; Kasote și colab., 2011; Milder și colab., 2005; Obermeyer și colab., 1995; Oomah și colab., 2001; Oomah și colab., 1993).

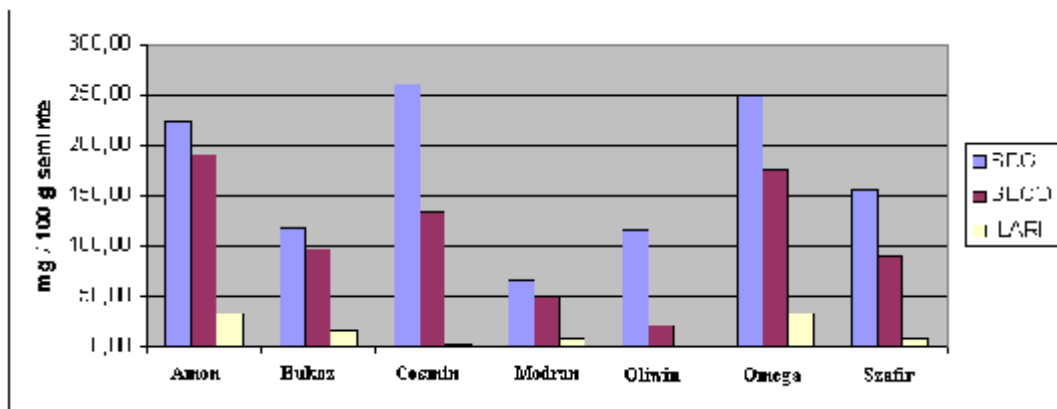


Figura III.1 Variația cantității de lignani din extractele în funcție de semințele utilizate

În Figura III.2 sunt prezentate valorile comparative ale acizilor fenolici din extractele hidrolizate, pentru toate probele examinate.

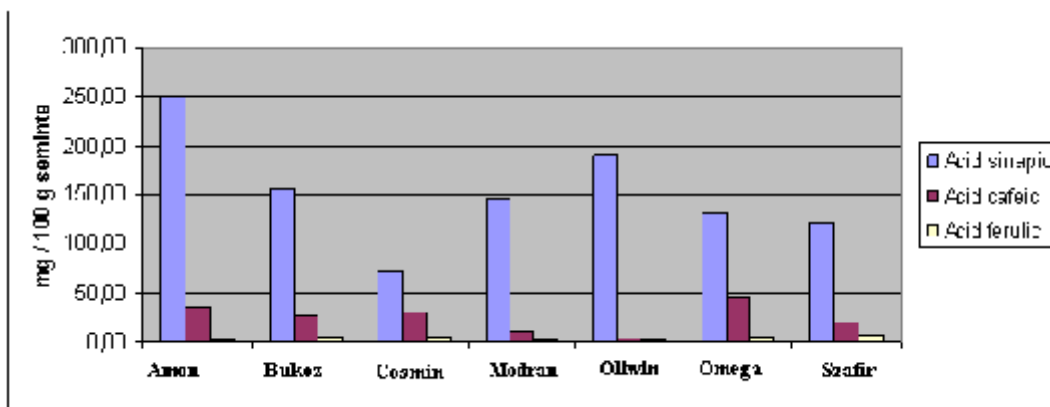


Figura III.2 Variația cantității de acizi fenolici din extracte în funcție de semințele utilizate

Referitor la compoziția în compuși fenolici:

- Cea mai mare concentrație de acid sinapic a fost obținută pentru extractul obținut din semințe Amon, și anume 248,55 mg acid sinapic/100 grame semințe.
- Concentrația maximă de acid cafeic a fost obținută pentru extractul obținut din semințe Omega, și anume 45,17 mg acid cafeic/100 grame semințe.
- Cantitatea cea mai mare de acid ferulic a fost obținută pentru extractul obținut din semințe Szafir, 6,77 mg acid ferulic/100 grame semințe.

- Extractul cu concentrația cea mai mare de fenoli (acid sinapic, acid cafeic și acid ferulic) a fost cel obținut din semințe Amon, și anume 286,77 mg acizi fenolici/100 grame semințe.

Referitor la compoziția în lignani:

- Cantitatea cea mai mare de SDG a fost obținută pentru extractul obținut din semințe Cosmin 259,43 mg SDG/100 grame semințe, urmată de extractul din semințe Amon 224,45 mg SDG/100 grame semințe.
- Cea mai mare cantitate de SECO a fost obținută pentru extractul obținut din semințe Amon, 190,51 mg SECO/100 grame semințe.
- Cea mai mare cantitate de LARI a fost obținută pentru extractul obținut din semințe Omega, 33,57 mg LARI/100 grame semințe.
- Extractul cu cantitatea cea mai mare de lignani (SDG, SECO, LARI) a fost cel obținut din semințe Omega, cu un conținut 459,00 mg lignani/100 grame semințe.
- În capitolul 4, s-a determinat cu ajutorul metodei UV-VIS, absorbanta extractelor la 280 nm și s-a observat o corelație pozitivă ($R^2=0,8908$) cu cantitatea totală de acizi fenolici și lignani

III.3 CONCLUZII

Ca și concluzii la datele prezentate în acest capitol putem constata că:

Acizii fenolici și lignanii pot fi cuantificați calitativ și cantitativ, în extractele obținute din semințe de in, cu ajutorul cromatografiei LC-DAD-MS.

Prin corelarea datelor obținute prin spectrometrie UV-VIS (Capitolul II) cu cromatografie LC-DAD-MS, s-a putut elabora o metodă simplă, rapidă, ieftină de evaluare a extractelor din punct de vedere a cantității de acizi fenolici și lignani, care poate fi utilizată atât în laborator cât și în industrie.

Nu au putut fi determinate diferențe între cele 2 tipuri de semințe de in (pentru obținerea de fibre și cel destinat industriei alimentare) cu metodă de determinare a acizilor fenolici și a lignanilor prin cromatografie LC-DAD-MS.

Faptul că extractele din semințe de in conțin acizi fenolici, inclusiv lignani, le recomandă pentru utilizarea lor drept aditivi în industria alimentară și cosmetică.

Soiul românesc Cosmin, care este un soi hibrid destinat preponderent obținerii de fibre de calitate superioară, dar semințe din acest soi, pot fi utilizate cu succes pentru obținerea de extracte bogate în acizi fenolici și lignani. În acest mod planta întreagă de *Linum usitatissimum* ar putea fi procesată ca o resursă regenerabilă de fibre textile, uleiuri comestibile și extracte antioxidante și antibacteriene. Aceste extracte ar putea înlocui cu succes aditivi sintetici în produsele alimentare și cosmetice.

CAPITOLUL IV.

OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA UNOR PRODUSE CE VALORIFICĂ POTENȚIALUL BIOMEDICAL AL LIGNANILOR

Proverbul "Să ne fie hrana medicament, iar medicamentul să ne fie hrană", formulat de Hippocrate acum aproape 2500 de ani, este valabil și acum și dorește să atragă atenția în special în promovarea ingredientelor sănătoase sau componente fiziologice active, cunoscute sub numele de alimente funcționale (Hasler, 1998).

Semințele de in, datorită beneficiilor pentru sănătate aduse, în special în ceea ce privește cancerul și bolile cardiovasculare, au primit, în ultimul timp, o atenție deosebită din partea nutriționiștilor și a cercetătorilor.

Datorită componentelor bioactive și a nutrienților din semințele de in, acestea au devenit ingrediente folosite în dieta umană. Semințele de in sunt utilizate pe scară largă pentru realizarea de produse alimentare funcționale. Componentele din semințele de in, care conferă o serie de beneficii pentru sănătate sunt fibrele, lignanii și acizii grași (Omega-3 și omega 6). Mai mult decât atât semințele de in este o sursă excelentă de proteine, fibre solubile de calitate superioară și compuși fenolici (Oomah, 2001).

IV.1 OBȚINEREA DE ALIMENTE FUNCȚIONALE

Premixurile propuse ca tehnologii de valorificare a compușilor bioactivi cu valoare funcțională din cocă de in, sunt amestecuri care conțin o parte sau toate ingredientele din rețetă, cu excepția lichidului de hidratare. Se prezintă sub formă pulverulentă și sunt folosite la prepararea pâinii și respectiv a produselor de desert. Indiferent dacă sunt destinate utilizării industriale sau casnice, prezintă o serie de avantaje legate de eliminarea timpului de dozare a ingredientelor și a riscurilor de dozare eronată, aspect agreat de consumatori pentru scurtarea procesului de preparare.

Pâinea este un produs destinat consumului uman direct care stă la baza piramidei nutriționale și poate afecta sănătatea consumatorilor. Pâinea este unul din cele mai consumate produse din cadrul industriei alimentare din România.

Datorită acestor aspecte, dar și pentru îmbogățirea pâinii cu fibre alimentare și compuși biologic activi (acizi grași esențiali, lignani și polifenoli) s-a optat pentru

introducerea cocăi de in în compoziția acesteia, prin formularea unor produse alimentare funcționale.

Dulciurile de bucătărie sunt preparate culinare care se pot servi în momente diferite ale zilei, astfel ele se servesc ca desert la dejun sau cină, la gustarea de la ora 10:00 sau la ora 17:00. Servite la sfârșitul mesei, conferă senzația de sațietate. Dulciurile de bucătărie au rolul de a completa valoarea nutritivă 24 de ore, aducând organismului un plus de glucide atât simple (zaharoză, glucoză, fructoză), proteine valoroase și grăsimi ușor asimilabile, substanțe minerale și vitamine.

Datorită gustului dulce, plăcut, pe care îl au și aspectului deosebit, dulciurile de bucătărie sunt preparate solicitate de toate categoriile de consumatori, unele dintre ele fiind recomandate în diferite diete.

De cele mai multe ori, conținutul mare în glucide al dulciurilor, impune consumarea lor în mod rațional, excesul de glucide din organism se transformă în lipide, care se depun, favorizând apariția obezității și a diabetului.

Desertul aduce toate beneficiile pe care le poate aduce un desert obișnuit, dar în plus, el vine cu un conținut ridicat de fibre alimentare, acizi grași esențiali, lignani, polifenoli și un conținut scăzut de glucide.

S-au formulat două premixuri care valorifică potențialul biomedical al lignanilor și al acizilor fenolici din cocă de in:

1. Produs 1: premix pentru pâine cu adaos de cocă măcinată de in
2. Produs 2: premix pentru desert.

Produsul 2, premixul pentru desert, face subiectul unui brevet care a apărut în luna aprilie 2013, în Buletinul Oficial de Proprietate Industrială, număr cerere brevet: a 2012 00737.

Prin adăugarea unor cantități diferite de apă, din varianta premix se pot obține două varietăți de desert, astfel prin adăugarea a 100 mL apă la temperatura de 90-100°C, urmată de o omogenizare de aproximativ 5 min, s-a obținut Desertul 1 (de tip Budincă), iar prin adăugarea a 46 mL apă la temperatura de 90-100°C, urmată de o omogenizare de aproximativ 3 min, s-a obținut Desertul 2 (de tip Baton).

IV.2 CARACTERIZAREA ALIMENTELOR FUNCȚIONALE

IV.2.1 Materiale și metode

- a) Determinarea conținutului de apă s-a realizat utilizând metoda STAS 9065/3-73.
- b) Determinarea conținutului de lipide s-a realizat prin metoda Soxhlet.
- c) Analiza cromatografică a uleiurilor s-a realizat cu ajutorul metodei GC-MS.
- d) Determinarea conținutului de proteină s-a realizat prin metoda Kjeldahl.

IV.2.2 Rezultate și discuții

Premixul obținut are o compoziție caracterizată de un raport masic între carbohidrați, proteine și grăsimi de 1,8:0,66:0,27. Carbohidrații, proteinele și lipidele, precum și acizii grași esențiali (omega 3, omega 6, omega 9) și acizii fenolici din compoziția produsului provin atât din surse vegetale (coca de in, pudra de cacao, fructoză) cât și din surse animale (laptele praf), pentru a asigura o compoziție cât mai echilibrată și calități organoleptice superioare, fără a se adăuga coloranți, agenți de îngroșare sau aromatizanți.

După amestecarea cu apă a premixului în proporție de 1:0,59 în 100 g desert 1 se găsesc aproximativ 10 g fibre totale alimentare, reprezentând 28,57-50% din cantitatea nutrițională recomandată de 20-35 g fibre din alimentația zilnică.

Conținutul ridicat de fibre sporește senzația de sațietate, produsul putând fi indicat la persoanele care doresc să slăbească sau să își mențină o greutate corporală constantă, asigurând astfel un management al greutateii corporale. De asemenea, prin conținutul ridicat de fibre, îmbunătățește peristaltismul intestinal, previne constipația, are efect prebiotic, abilitatea consumatorului de a procesa hrana, de a elimina toxinele și a diminua colesterolemia fiind diminuate; contribuie la prevenția unor tipuri de cancer.

Carbohidrații care intră în compoziția produsului de tip desert sunt reprezentați de fructoză și lactoză (60,2%), glucide simple care îndulcesc alimentul fără a produce variații bruște ale glicemiei și care prelungesc senzația de sațietate după consumarea alimentului. (Marcus, 2013)

În compoziția produselor formulate intră și acizii grași esențiali (omega 3 și omega 6), cu un raport masic de 1,90:1. Prezența acizilor grași esențiali, precum și raportul masic dintre ei ajută la prevenirea bolilor cardiovasculare, a accidentelor vasculare

cerebrale, a unor tipuri de cancer, menține sănătatea sistemului nervos, osos și modulează răspunsul imun al organismului.(Amiano *et al.*, 2014)

În coca de in, care se regăsește în compoziția produselor formulate, s-a constatat prezența semnificativă a acizilor fenolici (225,78 mg GAE/100 g cocă) și a lignanilor (de până la 473,40 mg SECO/100 g cocă, 4,58 mg MATA/100 g cocă, 1,75 mg LARI/100 g semințe). Acești compuși au prezentat o activitate antioxidantă (de până la 72,95%) și activitate antimicrobiană remarcabilă (de până la 15 mm). Toți acești produși, pe lângă contribuția lor în prevenirea unor tipuri de cancer (Saarinen *et al.*, 2003), a bolilor coronariene (Penumathsa *et al.*, 2008), a hipercolesteolemiei (Prasad, 1997), reprezintă conservanți naturali eficienți în păstrarea calităților produselor.

Datorită posibilității pregătirii Desertului 2 sub forma unui baton, ambalat ca porție individuală, acesta poate fi încadrat într-un stil de viață activ. Prin acest mod, se previne oxidarea compușilor prezenți expunerea la aer și la umiditate nemaifiind o problemă, comparativ cu ambalarea unei porții mai mari din care consumatorul să servească câte o porție.

IV.3 CONCLUZII

Cererea crescândă a pieței pentru produse alimentare dietetice, cu conținut sporit de fibre și alte substanțe biologice active poate fi echilibrată prin diversificarea sortimentelor de produse, trend în care se înscriu și produsele cu formulări inovative propuse. Acestea valorifică fibrele solubile și insolubile, acizii grași polinesaturați omega 3 și omega 6, precum și compușii cu valoare funcțională ridicată (acizii fenolici și lignanii) ai semințelor de in.

CONCLUZII GENERALE

Conform scopului lucrării, activitatea experimentală inclusă prezentei teze a fost optimizarea extracției lignanilor, studiul variabilității în compoziție a lignanilor din diferite soiuri de semințe de in, precum și formularea de alimente funcționale care valorifică potențialul biomedical al acestora.

În raport cu obiectivele cercetărilor proprii putem formula următoarele concluzii:

A fost optimizată metoda de extracție a lignanilor, metodele utilizate au inclus spectrometria UV-VIS, spectrometria în infraroșu de tip FTIR, cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC), precum și analiza potențialului microbiologic al lignanilor.

S-a stabilit variabilitatea de compoziție în lignani și acizi fenolici a extractelor provenite din diferite soiuri de semințe de in. A fost stabilit profilul specific fiecărui extract utilizând metode de analiză complementare, și anume metode spectrometrice de tip UV-VIS, spectrometrie în Infraroșu Mediu (FT-MIR) și metode cromatografice LC-DAD-MS.

S-au obținut două tipuri de premixuri și trei tipuri de preparate care valorifică potențialul biomedical al lignanilor. Compoziția acestora a fost caracterizată din punct de vedere al conținutului de fibre totale, solubile și insolubile, cantitatea de uleiuri, conținut de acizi grași omega 3, omega 6 și omega 9, glucide, proteine.

Cercetările efectuate sunt un punct de plecare util pentru investigarea *in vitro* sau *in vivo* a acțiunii acestor preparate.

Originalitatea studiilor este conferită de:

- Design-ul și adaptarea unor tehnici de extracție și analiză a probelor noi
- Analiza detaliată prin metode analitice performante a compoziției celor șapte soiuri de semințe de in, acordând o atenție deosebită acizilor fenolici și lignanilor
- Elaborarea unor produse care valorifică potențialul biomedical al lignanilor, fiind coautor al unui produs cu caracter inovativ (Radu and Pag, 2013)

BIBLIOGRAFIE

1. Abdel-Hameed, E.-S. S. (2009). Total Phenolic Contents And Free Radical Scavenging Activity Of Certain Egyptian Ficus Species Leaf Samples. *Food Chem* 114(4): 1271-1277.
2. Amarowicz, R. & Pegg, R. B. (2006). Content Of Proanthocyanidins In Selected Plant Extracts As Determined Via N-Butanol/Hcl Hydrolysis And A Colorimetric Assay Or By Hplc – A Short Report. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 15(56): 319-322.
3. Amiano, P., Machon, M., Dorronsoro, M., Dolores Chirlaque, M., Barricarte, A., Sanchez, M. J., Navarro, C., Huerta, J. M., Molina-Montes, E., Sanchez-Cantalejo, E., Urtizberea, M., Arriola, L., Larranga, N., Ardanaz, E., Quiros, J. R., Moreno-Iribas, C. & Gonzalez, C. A. (2014). Intake Of Total Omega-3 Fatty Acids, Eicosapentaenoic Acid And Docosahexaenoic Acid And Risk Of Coronary Heart Disease In The Spanish Epic Cohort Study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 24(3): 321-327.
4. Cornwell, T., Cohick, W. & Raskin, I. (2004). Dietary Phytoestrogens And Health. *Phytochem* 65(8): 995-1016.
5. Dean, J. (2003). Current Market Trends And Economic Importance Of Oilseed Flax. In *Flax- The Genus Linum* (Eds A. Muir And N. D. Westcott). Taylor & Francis Crc Press.
6. Fukumoto, L. R. & Mazza, G. (2000). Assessing Antioxidant And Prooxidant Activities Of Phenolic Compounds *J. Agric. Food Chem.* 48(8): 3597-3604.
7. Ganorkar, P. M. & Jain, R. K. (2013). Flaxseed -- A Nutritional Punch. *Intern Food Res J* 20(2): 519.
8. Grubestic, R. J., Vukovic, J., Kremer, D. & Vladimir-Knezevic, S. (2005). Spectrophotometric Method For Polyphenols Analysis: Prevalidation And Application On *Plantago L.* Species. *J Pharm Biomed Anal.* 39(3-4): 837-842.
9. Hall, C., Tulbek, M. C., Xu, Y. & Steve, L. T. (2006). Flaxseed. In *Advances In Food And Nutrition Research*, Vol. Volume 51, 1-97: Academic Press.
10. Hasler, C. M. (1998). A New Look At The Ancient Concept. *Chem. Industry* 2: 84-89.
11. Heller, K. (2013). Crop Management Of Fibre Flax In Europe. In *Summer School*. Catania-Italy.
12. Ilea, V. (2009). Genetic Resources And Breeding Fiber Flax For Next Century. *Sci Bull Escorena* 1: 9-12.
13. Jhala, A. J. & Hall, L. M. (2010). Flax (*Linum Usitatissimum L.*): Current Uses And Future Applications. *Austr J Of Basic & Appl Sci.* 4(9): 4304-4312.
14. Jiang, Z. R., Ahn, D. U. & Sim, J. S. (1991). Effects Of Feeding Flax And Two Types Of Sunflower Seeds On Fatty Acid Compositions Of Yolk Lipid Classes. *Poult Sci.* 70(12): 2467-2475.
15. Kasote, D. M., Hegde, M. V. & Deshmukh, K. K. (2011). Antioxidant Activity Of Phenolic Components From N-Butanol Fraction (Pc-Bf) Of Defatted Flaxseed Meal. *Am. J. Food Technol.* 6(7): 604-612.
16. Kennelly, J. J. (1996). The Fatty Acid Composition Of Milk Fat As Influenced By Feeding Oilseeds. *Anim Feed Sci Tech.* 60(3-4): 137-152.

17. Kim, D. O. & Lee, C. Y. (2004). Comprehensive Study On Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (Vceac) Of Various Polyphenolics In Scavenging A Free Radical And Its Structural Relationship. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 44(4): 253-273.
18. Li, X., Yuan, J. P., Xu, S. P., Wang, J. H. & Liu, X. (2008). Separation And Determination Of Secoisolariciresinol Diglucoside Oligomers And Their Hydrolysates In The Flaxseed Extract By High-Performance Liquid Chromatography. *J Chromatogr A.* 1185(2): 223-232. Doi: 210.1016/J.Chroma.2008.1001.1066. Epub 2008 Jan 1031.
19. Marcus, J. B. (2013). Carbohydrate Basics: Sugars, Starches And Fibers In Foods And Health: Healthy Carbohydrate Choices, Roles And Applications In Nutrition, Food Science And The Culinary Arts. In *Culinary Nutrition*, 149-187 San Diego: Academic Press.
20. Meagher, L. P. & Beecher, G. R. (2000). Assessment Of Data On The Lignan Content Of Foods. *J Food Comp Anal* 13(6): 935-947.
21. Milder, I. E., Arts, I. C., Van De Putte, B., Venema, D. P. & Hollman, P. C. (2005). Lignan Contents Of Dutch Plant Foods: A Database Including Lariciresinol, Pinoresinol, Secoisolariciresinol And Matairesinol. *Br J Nutr* 93(3): 393-402.
22. Molist, F., De Segura, A. G., Gasa, J., Hermes, R. G., Manzanilla, E. G., Anguita, M. & Perez, J. F. (2009). Effects Of The Insoluble And Soluble Dietary Fibre On The Physicochemical Properties Of Digesta And The Microbial Activity In Early Weaned Piglets. *Anim Feed Sci Tech* 149(3&4): 346-353.
23. Muir, A. D. & Westcott, N. D. (2000). Quantitation Of The Lignan Secoisolariciresinol Diglucoside In Baked Goods Containing Flax Seed Or Flax Meal. *J Agric Food Chem* 48(9): 4048-4052.
24. Obermeyer, W. R., Musser, S. M., Betz, J. M., Casey, R. E., Pohland, A. E. & Page, S. W. (1995). Chemical Studies Of Phytoestrogens And Related Compounds In Dietary Supplements: Flax And Chaparral. *Proc Soc Exp Biol Med* 208(1): 6-12.
25. Ogborn, M. R. (2003). Flaxseed And Flaxseed Products In Kidney Disease. In *Flaxseed In Human Nutrition, Second Edition*: Aocs Publishing.
26. Oomah, B. D. (2001). Flaxseed As A Functional Food Source. *J Sci Food Agri* 81(9): 889-894.
27. Oomah, B. D. (2002). Phytoestrogens. In *Methods Of Analysis For Functional Foods And Nutraceuticals*: Crc Press.
28. Penumathsa, S. V., Koneru, S., Zhan, L., John, S., Menon, V. P., Prasad, K. & Maulik, N. (2008). Secoisolariciresinol Diglucoside Induces Neovascularization-Mediated Cardioprotection Against Ischemia-Reperfusion Injury In Hypercholesterolemic Myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 44(1): 170-179. Epub 2007 Oct 2004.
29. Prasad, K. (1997). Dietary Flax Seed In Prevention Of Hypercholesterolemic Atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 132(1): 69-76.
30. Radu, D. G. & Pag, A. I. (2013). Aliment Funcțional Pentru Managementul Greutății Corporale. 1-8 Romania.
31. Rice-Evans, C., Miller, N. & Paganga, G. (1997). Antioxidant Properties Of Phenolic Compounds. *Trends Plant Sci* 2(4): 152-159.
32. Saarinen, N., Santti, R. & Makela, S. (2003). Mechanism Of Anticancer Effects Of Lignans With A Special Emphasis On Breast Cancer. In *Flaxseed In Human Nutrition, Second Edition*: Aocs Publishing.

33. Singh, K. K., Mridula, D., Rehal, J. & Barnwal, P. (2011). Flaxseed: A Potential Source Of Food, Feed And Fiber. *Crit Rev Food Sci Nutr* 51(3): 210-222.
34. Smeds, A. I., Eklund, P. C., Sjöholm, R. E., Willfor, S. M., Nishibe, S., Deyama, T. & Holmbom, B. R. (2007). Quantification Of A Broad Spectrum Of Lignans In Cereals, Oilseeds, And Nuts. *J Agric Food Chem.* 55(4): 1337-1346. Epub 2007 Jan 1330.
35. Thompson, L. U. & Cunnane, S. C. (2003). *Flaxseed In Human Nutrition*. Aocs Press.
36. Vaisey-Genser, M. A. & Morris, D. H. (2003). Introduction History Of The Cultivation And Uses Of Flaxseed. In *Flax-The Genus Linum* (Eds A. D. Muir And N. D. Westcott). Taylor & Francis.
37. Wrolstad, R. E., Acree, T. E., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Smith, D. & Sporns, P. (2005). Strategies For Measurements Of Colors And Pigments. In *Handbook Of Food Analytical Chemistry*, 201-215: John Wiley & Sons, Inc.

Activitatea experimentală din cadrul stagiului de doctorat și finalizarea acestei teze s-au efectuat în cadrul Proiectului POS-CCE 210/2010, „Plantele liberiene, resurse regenerabile strategice pentru economia europeană”, acronim BASTEURES, desfășurat în cadrul Institutului de Cercetare-Dezvoltare-Inovare în Științe Tehnice și Naturale al Universității Aurel Vlaicu din Arad, finanțat din fonduri structurale de către Comunitatea Europeană și Guvernul României în perioada 2010-2013.



**Proiect cofinanțat de UNIUNEA EUROPEANĂ prin Fondul European de Dezvoltare Regională
Programul Operațional Sectorial “Creșterea Competitivității Economice”**

“Investiții pentru viitorul dumneavoastră”

Proiect POS-CCE, Axa 2, Operațiunea .2.1.2.

“Plantele liberiene - resurse regenerabile strategice pentru economia europeană”

Contract nr. 210/2010

Valoarea proiectului : 6.842.915 RON

Termen de finalizare : 20 Iulie 2013

Valoarea contribuției comunitare : 4.979.998,34 RON

Valoarea contribuției Guvernului României : 1.019.999,66 RON

Beneficiarul proiectului : UNIVERSITATEA AUREL VLAICU ARAD

INSTITUTUL DE CERCETARE-DEZVOLTARE-INOVAR

ÎN ȘTIINȚE TEHNICE ȘI NATURALE AL UAV