

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Universitatea de Științele Vieții “Regele Mihai I” din Timișoara
Facultatea de Inginerie Alimentară

Ing. GLIGOR (căs. PANE) Dina

Cercetări privind modularea activității antioxidante și stabilizarea unor extracte și ingrediente din fructe

- REZUMAT -

Conducător științific:
Prof. Dr. Habil. Ing. HĂDĂRUGĂ Daniel-Ioan

CUPRINS - Rezumat

<i>Componența Comisiei de doctorat</i>	2
<i>Rezumatul tezei de doctorat</i>	3
A. INTRODUCERE	4
A.1. <i>Motivația alegerii temei de cercetare</i>	4
A.2. <i>Obiectivele științifice propuse pentru rezolvare în cadrul cercetării științifice</i>	4
A.3. <i>Comentarii sintetice privind noutatea/gradul de inovare a metodei/metodologiei de cercetare</i>	4
B. CONȚINUTUL TEZEI DE DOCTORAT	5
B.1. Parte generală – Studiu bibliografic	5
B.1.1. <i>Introducere</i>	5
B.1.2. <i>Fructe și produse din fructe</i>	5
B.2. Parte specială – Contribuții proprii	7
B.2.1. <i>Introducere. Fructe, ingrediente din fructe, modularea activității antioxidante, stabilizare</i>	7
B.2.2. <i>Studiul activității antioxidante și cinetică de reacție pentru extracte din fructe ale speciilor Prunus</i>	7
B.2.3. <i>Modularea activității antioxidante și studii cinetice pentru compușii antioxidanți standard și extractele din specii Vitis vinifera L. în prezența ciclodextrinelor</i>	8
B.2.4. <i>Stabilizarea unor ingrediente lipidice din fructe autohtone prin complexare ternară cu ciclodextrine și antioxidanți naturali</i>	9
C. CONCLUZII	11

CUVINTE CHEIE: fructe autohtone, *Prunus domestica* - prune, *Vitis vinifera* - struguri, *Corylus avellana* – alune de pădure, activitate antioxidantă, cinetică de reacție, ciclodextrine, nanoîncapsulare, cromatografie de lichide de înaltă presiune HPLC, spectrofotometrie UV-Vis, spectroscopie de infraroșu cu transformată Fourier FTIR, difractometrie de raze X, XRD, termogravimetrie TG-DTG, calorimetrie cu scanare diferențială DSC

A. INTRODUCERE

A.1. Motivația alegerii temei de cercetare

Tema tezei de doctorat cu titlul “Cercetări privind modularea activității antioxidante și stabilizarea unor extracte și ingrediente din fructe” face parte din domeniile de studiu ale grupurilor de cercetare din cadrul Universității de Științe Vieții “Regele Mihai I” din Timișoara, dintre care sunt de menționat:

- Studiul compușilor naturali cu activitate biologică: extracte și izolate din plante / fructe / legume etc., fracțiuni cu efecte biologice specifice, analiza profilului compușilor bioactivi (UV-Vis, HPLC analitic și preparativ, GC-FID/MS, FTIR,), formulări alimentare, cosmetice și farmaceutice, aplicații;
- Studiul micro- și nanoîncapsulării compușilor bioactivi naturali sau modificați prin metode “environmental friendly”, respectiv a sistemelor bioactive naturale, prin utilizarea în special a ciclodextrinelor naturale sau modificate (“food grade” și “pharmaceutical grade”), analize specifice prin metode spectroscopice (UV-Vis, FTIR, ¹H- și ¹³C-RMN), termice (TG-DTG, DSC, STA), sau difractometrie de raze X, microscopie electronică (SEM și TEM) etc.;
- Evaluarea activității biologice / antioxidante a unor compuși și sisteme micro- și nanoîncapsulate;
- Studii teoretice de modelare moleculară și docarea sistemelor supramoleculare, modelări matematice ale proceselor de eliberare controlată, respectiv modelarea reacțiilor care implică substanțele naturale studiate (de exemplu, cinetică de reacție).

A.2. Obiectivele științifice propuse pentru rezolvare în cadrul cercetării științifice

Obiectivul principal al tezei de doctorat a fost de evaluare și modulare a activității biologice / antioxidante a unor sisteme naturale obținute din fructe autohtone, respectiv de stabilizare prin intermediul unor sisteme supramoleculare.

Obiectivele specifice:

- Selecția unor specii de fructe autohtone cu impact important din punct de vedere al efectelor biologice, precum și științific, aplicativ sau economic;
- Studiul separării sistemelor biologice active/antioxidante din specii de fructe și analiza compozițională;
- Studiul activității antioxidante și coroborarea rezultatelor cu profilul compușilor antioxidanți;
- Studiul cinetic al interacțiunii compușilor antioxidanți cu radicali liber model;
- Studii de modulare a activității antioxidante prin intervenția unor compuși ce permit interacțiuni necovalente;
- Studiul cinetic al sistemelor în prezența modulatorilor de activitate antioxidantă;
- Studiul unor sisteme ternare ciclodextrine / uleiuri din sămburi de fructe / antioxidanți naturali – obținere și analize specifice, posibile aplicații alimentare și farmaceutice;
- Studii statistice clasice și de statistică multivariată pentru discriminarea probelor și sistemelor bioactive, respectiv stabilirea influenței diversilor factori/parametri asupra clasificării acestora.

A.3. Comentarii sintetice privind nouitatea / gradul de inovare a metodei / metodologiei de cercetare

Noutatea și gradul de inovare se remarcă atât pentru produsele noi obținute, cât și pentru unele dintre metodele inovative utilizate în aceste studii, care pot fi rezumate astfel:

- S-a realizat pentru prima dată un studiu privind cinetica de reacție a compușilor antioxidanți din fructe în prezența unor modulatori de activitate, în speță ciclodextrinele naturale și modificate, acceptate pentru utilizări alimentare și/sau farmaceutice (“food grade” și “pharmaceutical grade”);
- S-au obținut materiale inovative pentru prima dată, pe bază de sisteme ternare ciclodextrine / uleiuri din semințe de fructe / antioxidanți naturali, cu posibile aplicații alimentare, cosmetice și farmaceutice;
- S-au dezvoltat metode ce permit cuplarea tehnicilor experimentale FTIR sau UV-Vis cu tehnicile de analiză statistică multivariată, care au fost aplicate cu succes și au permis discriminarea sistemelor supramoleculare și a materialelor de tip complecși ternari.

B. CONȚINUTUL TEZEI DE DOCTORAT

B.1. PARTE GENERALĂ – STUDIU BIBLIOGRAFIC

B.1.1. INTRODUCERE

Fructele sunt o parte foarte importantă a dietei umane, acestea aducând atât aport energetic prin carbohidrații conținuți, cât și aport de vitamine (vitamina C, vitamine E, vitamine din complexul B sau carotenoide ca provitamine A) și polifenoli antioxidanți. În țara noastră, suprafața totală cultivată în vederea producției de fructe diverse, la nivelul anului 2021, a fost de 318300 ha, conform ultimelor date actualizate de FAOSTAT (Food and Agriculture Organization's Corporate Statistical Database) în data de 24 martie 2023. În ceea ce privește producția totală de fructe pentru același an evaluat, aceasta a fost de $3,06 \cdot 10^6$ tone. În funcție de suprafața cultivată, strugurii (suprafața cultivată cu vie) ocupă primul loc în România, cu 163610 ha, urmați de prune și fructe similare (66730 ha), mere (53820 ha), iar cu suprafețe cultivate semnificativ mai mici cireșe, pere, vișine, căpșuni, caise, sau piersici (suprafețe cultivate pentru producția din aceste fructe variind între 3510 ha pentru cireșe și 1370 ha pentru piersici). În plus, producția de nuci se datorează unei suprafețe cultivate de 2400 ha, pentru alune de pădure de 820 ha, sau alte fructe cu sămburi comestibili pe o suprafață totală de 1250 ha. De asemenea, importante sunt fructele de pădure, cum sunt afinele, cu o suprafață cultivată de 710 ha, zmeură – 110 ha, coacăze – 40 ha, sau alte fructe de pădure, respectiv fructe din genul *Vaccinium*, cu o suprafață totală cultivată de 680 ha.

B.1.2. FRUCTE ȘI PRODUSE DIN FRUCTE

În ceea ce privește producția de fructe în România, pentru anul 2021, aceasta a fost de peste 10^6 tone de struguri, urmată de prune și mere cu producții anuale de $8,07 \cdot 10^5$ tone, respectiv $5,94 \cdot 10^5$ tone. O producție mai redusă s-a obținut pentru pere – 49460 tone, cireșe și vișine – 40670 și 34260 tone, caise – 26840 tone, căpșuni – 18430, piersici – 14120 tone. De asemenea, fructele pentru sămburi (nuci, alune de pădure etc.) au totalizat 83930 tone, dintre care două treimi sunt reprezentate de nuci. Pentru fructele de pădure producția pentru anul 2021 a fost de 3200 tone, cu 1930 tone pentru afine, și doar 180 tone zmeură sau 40 tone coacăze. Clasamentul realizat pe baza productivității situează pe primele locuri fructele cultivate pentru sămburi, cum sunt nucile, cu o productivitate de 22604 kg/ha, urmate de pere, caise, vișine, prune și cireșe, cu productivități între 15603 și 11587 kg/ha. Productivitatea pentru mere este mult mai mică, situându-se la valori ușor peste 11000 kg/ha, iar pentru căpșuni și struguri productivitățile au fost chiar mai mici (7228 și 6144 kg/ha). Productivități sub 3 tone/ha au fost obținute în special pentru fructele de pădure (afine, zmeură, coacăze), iar cea mai mică productivitate dintre fructele luate în calcul a fost obținută pentru alunele de pădure – 805 kg/ha.

Sucurile din fructe sau băuturile răcoritoare din fructe sunt cele mai consumate produse din fructe. Acestea pot fi clasificate în funcție de aspect ca sucuri tulburi sau clare. De asemenea, pot conține 100% fructe, însă multe au un conținut mai redus de fructe și adaosuri de compuși aromatizanți. În principiu, sucurile de fructe nu ar trebui să conțină conservanți, zaharuri adăugate, arome artificiale sau alte ingrediente similare. Pot să fie obținute dintr-un singur fruct, sau pot să fie sucuri multifruct. În ceea ce privește tehnologia de obținere, acestea pot fi obținute direct prin presarea fructelor cu diverse echipamente, urmate de procese specifice cum sunt filtrarea, dar pot fi și sucuri reconstituite (de exemplu, din sucuri concentrate și congelate din fructe).

Prunele sunt fructele speciei *Prunus domestica* L. (Rosaceae), specie care include multe subspecii și varietăți ce se cultivă în special în Europa și, desigur, în România. Producția ridicată de prune a țării noastre și varietatea de fructe comercializate și procesate au fost baza selecției acestor fructe autohtone în studiul prezent. Prunele "Bistrița" sunt soiul cel mai cunoscut și cultivat în țară, precum și soiurile "Centenar", "Minerva", "Record", "Diana", "Carpatin", "Alutus", "Flora", "Ialomița", sau "Andreea". Se mai cultivă în regiune și subspeciile *domestica*, ssp. *intermedia*, ssp. *damsons*, sau ssp. *italica*, respectiv soiurile "Jefferson", "Mallard", "Opal", "Victoria", "Reine Claude", "President" sau "Stanley". Aproximativ două treimi din producția de prune este consumată sub formă proaspătă, dar fructele se procesează și sub formă de compot, suc, congelate sau uscate. Dintre metodele de procesare cele mai mult aplicate pentru prune sunt de menționat obținerea de sucuri, compoturi, respectiv uscarea, ultima variantă cunoscând o creștere semnificativă în ultimul timp. Alte forme de procesare sunt obținerea de pastă/puree sau sosuri. Uscarea prunelor presupune un conținut de solubile totale de 22%, fermitate și culoare corespunzătoare a cojii și pulpei fructelor. Valoarea energetică a fructelor este similară caiselor și piersicilor (~46 kcal/100 g fruct proaspăt, 107 kcal/100 g fructe uscate, și 63-71 kcal/100 g prune sub formă de compot sau suc). Carbohidrații totali sunt în concentrație de 11,4 g/100 g fruct proaspăt, iar zaharurile totale și

fibrelor totale sunt la valori de 9,9 și 1,4 g/100 g. Atât conținutul de proteine, cât și cel de lipide sunt scăzute (sub 1%). Pe de altă parte, prunele prezintă un conținut ridicat de vitamine A și β -caroten (~345 UI/100 g și 190 mg/100 g), luteină și zeaxantină (73 μ g/100 g), vitamină C (9,5 mg/100 g), sau vitamine K (6,4 mg/100 g). Dintre minerale trebuie menționate potasiul (157 mg/100 g), dar și magneziu, calciu, fosfor și zinc. Dintre antioxidanții prezenți în prunele proaspete sunt de menționat acid 3,4-dihidroxibenzoic, acizii clorogenici, derivații acestora și acizii neoclorogenici (acizii *p*-cumaroilquinic, 3-feruloilquinic, 3-caffeoilquinic), dar și flavonoide și flavonoide glicozilate (catechină, rutin, quercetin-glucozida, quercetin-galactozida, quercetin-ramnozida, acid rosmarinic), sau antocianine și antocianidine (cianidin 3-*O*-glucozidă). În ceea ce privește compușii aromatizanți din prune, s-au identificat mai multe clase de astfel de compuși cum ar fi cetone, aldehide, alcoolii, esterii, lactone și hidrocarburi. S-au identificat compuși volatili aromatizanți ca acetatul de 4-hexen-1-ol, acetatul de hexil și acetatul de butil, dar și aldehidele și alcoolii simpli ca hexanal, 2-hexenal, 1-hexanol, sau nonanal.

Strugurii se află pe primul loc în România în ceea ce privește producția de fructe. Vița de vie (speciile *Vitis*) este originară din Anatolia (Asia Minor), în special din regiunile Mării Negre și Mării Caspice. Există mai multe specii de viță de vie dintre care *Vitis vinifera* L. este cea mai cunoscută, dar se cultivă și speciile *V. amurensis* sau *V. rupestris*. În prezent, vița de vie se cultivă pe tot Globul, în America de Nord existând cele mai multe specii și soiuri cultivate pentru struguri de masă sau pentru obținerea vinului. Soiurile europene aparțin în special speciei *V. vinifera* L., cele mai cunoscute fiind "Cabernet Sauvignon", "Merlot", "Pinot Noir", sau "Syrah" pentru vinuri roșii, respectiv "Chardonnay", "Gewürztraminer", "Pinot Blanc", "Riesling", sau "Sauvignon Blanc" pentru vinuri albe. O mare cantitate de struguri este folosită pentru vinificație (în special vinuri roșii și albe). Procesul de fabricare a vinului alb include separarea mustului și fermentarea în condiții controlate. Pe de altă parte, fabricarea vinului roșu implică o etapă suplimentară de macerare a cojilor de struguri pentru extracția corespunzătoare a pigmentilor antioxidanți. Compoziția chimică a strugurilor este similară cu cea a stafidelor din perspectiva claselor de componente. Concentrațiile în proteine, carbohidrați și în special enzime (polifenoloxidaza nu se mai regăsește în stafide) se modifică în procesele de deshidratare/uscare. Stafidele conțin 79,2 g carbohidrați/100 g (5,3 g fibre/100 g), 3,3 g proteine/100 g, 0,4 g lipide/100 g și doar 15,4 % apă, în comparație cu strugurii, care prezintă un conținut de apă de peste 81%. Conținutul mediu de zaharide al strugurilor maturi ajunge la 15,2%, cu un conținut de fibre dietetice de 1,5%, un conținut de pectine de 0,3 g/100 g (exprimat sub forma pectatului de calciu) și un pH de 3,3. Cei mai importanți compuși bioactivi din struguri, pe lângă minerale (potasiu – 751 mg/100 g, dar și mangan și fosfor) și vitamine (în special acid ascorbic – 3,3 mg/100 g, sau complexul vitaminelor B), sunt compușii polifenolici cu activitate antioxidantă. Principalele clase de compuși polifenolici din struguri, respectiv din produsele procesate cum sunt stafidele și vinul, sunt acizii hidroxicinamici, acizii hidroxibenzoici, flavanolii, flavonolii, stilbenii și derivații (dimeri, trimeri, tetrameri etc.), procianidinele și antocianinele/antocianidinele. Cel mai important compus antioxidant în struguri este resveratrolul, cu derivații glicozilați piceid/polydatin, dar și omologii agliconici sau glicozilați, respectiv oligomeri de tipul viniferinelor și vitisinelor.

Uleiurile vegetale destinate consumului provin din surse vegetale cu productivitate ridicată, cum sunt semințele de floarea soarelui, măslinile, nucile de palmier, semințele de soia, semințele de rapiță, semințele de bumbac sau nucile de cocos. Cel mai mare consum de uleiuri vegetale este pentru cele de palmier, soia, rapiță (inclusiv pentru biocombustibili), sau floarea soarelui. Există însă o serie de resurse vegetale care furnizează uleiuri cu valoare nutritivă ridicată, inclusiv prin utilizarea produselor secundare din industria alimentară / fructelor. Sunt de menționat uleiul din sămburi de struguri, uleiul din semințe de linte, susan / susan negru, chia, cânepă comună, respectiv uleiurile din sămburi ale fructelor specifice – nuci și alune de pădure. Uleiurile din astfel de fructe sămburoase se obțin de obicei prin presare la rece și sunt mai puțin prelucrate pentru a proteja gliceridele acizilor esențiali polinesaturați, inclusiv omega-3, împotriva degradării termice și oxidative. **Alunele de pădure** și nucile au în compoziția uleiului în principal trigliceride ale acizilor grași esențiali, dar și alți componente lipidici (fitosteroli și fitostanoli, tocoferoli și tocotrienoli), respectiv minerale. Trioleina (1,2,3-trioleat de gliceril, *OOO*) este triglicerida majoritară în uleiul de alune de pădure (61-77,5%), urmată de 1,2-oleat 3-palmitat de gliceril (*OOL*, 10,5-22,8%).

Metodele de analiză a fructelor (calitate, autenticitate, falsificări pentru produsele din fructe etc.) sunt foarte diverse, pornind de la cele mai simple metode (pH, aciditatea titrabilă, conținutul total de zaharuri etc.), până la metode moderne complexe (GC-FID/MS, HPLC-MS, UV-Vis, FTIR, NIR, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR, AAS, SNIF-NMR).

B.2. PARTE SPECIALĂ – CONTRIBUȚII PROPRII

B.2.1. INTRODUCERE. FRUCTE, INGREDIENTE DIN FRUCTE, MODULAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE, STABILIZARE

Studiile privind evaluarea activității antioxidante a extractelor din diverse fructe ale unor specii autohtone (diverse părți de fruct), modularea activității antioxidante utilizând compuși naturali cu capacitate de încapsulare moleculară din clasa ciclodextrinelor, utilizând modelarea în studiul cineticii de reacție a antioxidantilor de interes, precum și stabilizarea unor sisteme naturale separate din fructe prin complexare ternară în ciclodextrine, împreună cu antioxidanți naturali pentru acțiune “on site”, au presupus parcurgerea unor etape principale ca obținerea și analiza extractelor, monitorizarea reacțiilor cu compușii antioxidanți, obținerea și analiza sistemelor complexe, analize statistice avansate.

B.2.2. STUDIUL ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE ȘI CINETICĂ DE REACȚIE PENTRU EXTRACTE DIN FRUCTE ALE SPECIILOR *PRUNUS*

Probele din fructe ale speciilor *Prunus domestica* au fost supuse extracțiilor la rece și la cald. S-au realizat extracții în etanol 96% atât din partea de coajă a fructului, cât și din pulpă. Din analizele HPLC s-a observat o stabilitate mai bună a componentilor antioxidanți (în special antocianinele cum sunt cianidin 3-glucozida), astfel că s-au direcționat studiile în special pe evaluarea extractelor efectuate la rece, în condiții menajante.

Evaluarea profilului antocianinelor și antocianidinelor a putut fi realizată eficient pentru cianidin 3-glucozidă și cianidină utilizând curbele de calibrare pentru compușii standard, în timp ce pentru alți antioxidanți de interes s-a reușit doar o tentativă de identificare pe baza unor studii similare care au utilizat aceleași condiții de analiză HPLC pentru petunidină și 3-glucozida acesteia, delphinidin 3-glucozidă, cianidin 3-arabinozidă și peonidin 3-glucozidă. În ceea ce privește conținutul de antocianine/antocianidine în fructele proaspete, acestea au fost determinate la valori maxime într-o probă de fructe “Bistrița” (Măgulicea), la valori de 0,94 mg/kg pentru cianidin 3-glucozidă, respectiv pentru fructe “Bistrița” (Topolovățu Mic), cu valori de 2,70 mg/kg pentru cianidină.

Prezența componentelor antocianinici și flavonoidici în extractele analizate a fost confirmată și de analizele FTIR, în special prin prezența vibrației de valență a legăturii C=O din flavonoide (dar și din acizi organici), $\nu_{(C=O)}$, la 1713-1717 cm^{-1} , precum și vibrației de valență a legăturii CC aromatice, $\nu_{\text{sk}(C=C(\text{ar}))}$, și a vibrației de valență corespunzătoare restului piranic, ν_{sk} , la 1630-1637 și 1233-1258 cm^{-1} .

Evaluarea activității antioxidante și determinarea parametrilor cinetici pentru extractele din pulpă și coajă ale fructelor din specii *Prunus domestica* L., diverse soiuri, s-au realizat prin metoda spectrofotometrică cu radicalul liber DPPH·, care permite monitorizarea concentrației în timpul reacției cu antioxidanții prezenți în extracte. Activitatea antioxidantă s-a evaluat ca și capacitate de captare a acestor radicali liberi (RSA, %) și a fost calculată în funcție de timpii de monitorizare. Activitatea antioxidantă pentru extractele din diverse părți ale fructelor din specii *Prunus domestica* L. a prezentat comportare logaritmică în ceea ce privește variația valorilor RSA momentane în timp, pentru intervalele considerate (15 min). În plus, determinările pentru probe duplicate au indicat reproductibilitate, majoritatea deviațiilor standard fiind sub 3%. În toate cazurile activitățile antioxidante mai mari au fost observate pentru extractele din coajă, în comparație cu cele din pulpă (pentru unele probe chiar valori duble ale RSA). Cele mai mari valori RSA au fost observate pentru probele obținute din livezi ale unor persoane particulare, care nu au fost supuse unor tratamente speciale. Acestea sunt soiuri “Bistrița” colectate din zona de vest a țării, care au prezentat valori RSA între 41-86% pentru extractele din coajă și de 30-70% pentru extractele din pulpă. Pe de altă parte, extractele din soiurile de prune achiziționate din supermarket au prezentat valori mici pentru parametrul RSA.

Parametrii statistici pentru cinetica de reacție a DPPH· de pseudo-ordin întâi în interacțiunea cu compușii antioxidanți din extractele de pulpă și coajă de prune “Bistrița” au prezentat cele mai bune valori. Coeficienții de determinare r^2 au avut valori de 0,902-0,976 pentru extractele din pulpă de fructe și de 0,955-0,979 pentru extractele din coajă, în cazul soiurilor “Bistrița” – Măgulicea, în timp ce acești parametri statistici au fost de doar 0,642-0,695 și, respectiv, 0,713-0,741. Pentru aceste extracte constantele de viteză de reacție de pseudo-ordin întâi au fost în domeniul 0,0015-0,003 1/s pentru 30 s și 0,0017-0,0033 1/s pentru 180 s în cazul soiurilor “Bistrița” – Măgulicea, respectiv de doar 0,0012-0,0015 1/s pe ultimul interval pentru soiurile “Hekman”, cu valorile mai mari pentru extractele din coajă. Timpii de înjumătățire însă nu diferă semnificativ în acest ultim caz pentru coajă sau pulpă, însă sunt de 4-5 ori mai mari la determinările pe intervalul 180 s (462-577 s). Pentru soiul “Bistrița”, timpii de

înjumătățire sunt la valori aproximativ duble sau triple pentru intervalul 180 s, în comparație cu intervalul de 30 s (cu unele excepții pentru soiurile “Bistrița” – Sânnandrei). S-a constatat că pentru soiurile care au prezentat activități antioxidante reduse, timpii de înjumătățire au fost mult mai mari, în special pentru intervalul de 180 s, ca în cazul soiurilor “Stanley”, “Zuchella”, “President”, “D’Agen” sau “Vinete Românești”, de multe ori peste 1000 s.

Analiza statistică multivariată a datelor de activitate antioxidantă (valori RSA la 30, 180 și 900 s) și a celor cinetice (constante de viteză și timpii de înjumătățire corespunzătoare cineticii de reacție de ordin zero, întâi și al doilea) a relevat clasificări mult mai bune în comparație cu analiza similară pentru FTIR. Rezultate bune se observă la utilizarea atât a variabilelor corespunzătoare activității antioxidante, cât și a celor din cinetica de reacție a DPPH. Clasificarea în zona central-dreapta pentru probele de pulpă și coajă din fructe obținute din livezi particulare apare în ambele grafice ale scorurilor PC2 vs. PC1 și PC3 vs. PC1. Influența parametrilor este înspre partea pozitivă a componentei PC1 în cazul parametrilor k și RSA, respectiv înspre partea negativă pentru timpii de înjumătățire. În plus, timpul de înjumătățire, calculat la 30 s, a avut influența în partea negativă a componentei PC2. Primele două componente principale explică peste 88% din varianța datelor.

B.2.3. MODULAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE ȘI STUDII CINETICE PENTRU COMPUȘII ANTIOXIDANȚI STANDARD ȘI EXTRACTELE DIN SPECII *VITIS VINIFERA* L. ÎN PREZENȚA CICLODEXTRINELOR

Modularea activității antioxidante a unor compuși din clasa stilbenilor respectiv a extractelor care conțin astfel de compuși, din fructe ale speciilor *Vitis vinifera* L. (struguri), s-a realizat în soluție, prin utilizarea ciclodextrinelor naturale și modificate. S-a urmărit modularea activității antioxidante atât prin studiul variației capacității de captare a radicalilor liberi de către resveratrol sau extracte din struguri în prezența ciclodextrinelor, cât și prin valorile parametrilor cinetici calculați pentru reacții de pseudo-ordin zero, întâi sau doi.

În toate cazurile, variația valorilor RSA în timp a prezentat o alură logaritmică, atât resveratrol de diverse concentrații (0,1-1,0 mM), cât și pentru extractele din pulpă de struguri din soiul “Moldova”. Se observă o comportare similară a acestor extracte în prezența soluției de DPPH· 1 mM, ca în cazul soluției de resveratrol de concentrație 0,2 mM. Dacă se compară valorile RSA pentru diferite momente din analiză se constată echivalența celor două tipuri de probe: soluție standard de resveratrol 0,2 mM și extract brut din pulpă de struguri. La momentul $t = 3$ min valorile RSA au fost de 15,63 și 14,40 %, la $t = 15$ min de 27,73 și 25,35 %, iar la $t = 30$ min de 33,37 și 27,87 %. Pe de altă parte, activitatea antioxidantă a fost semnificativ mai mare pentru soluția de resveratrol de concentrație 1 mM și mult mai mică pentru soluția de 0,1 mM (86,78 și, respectiv, 19,01 %). Acesta a fost și motivul pentru care s-a utilizat extract din pulpă de struguri, cu un conținut mai redus de resveratrol (și alți compuși antioxidanți polifenolici), determinat în prealabil prin analiză HPLC, cu o valoare de 23 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pulpă de struguri proaspătă. Pe de altă parte, extractul din pulpă de struguri efectuat la rece a condus la extracție incompletă, 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pulpă de struguri, în timp ce extractele din coajă de struguri efectuate la rece sau la cald au condus la un conținut de *trans/cis*-resveratrol cuprins între 1422-1833 $\mu\text{g}/\text{kg}$ coajă de struguri. Deși se pot utiliza și astfel de extracte în analiza modulării activității antioxidante, totuși concentrația extractelor este prea mare și necesită diluții mult mai mari, care pot conduce și la erori mai mari. În plus, s-au efectuat studii preliminare pentru vin roșu din soiul “Moldova”, la care concentrația de resveratrol calculată a fost de respectiv 4948 $\mu\text{g}/\text{L}$, de asemenea o concentrație prea mare pentru studii cinetice (datele nu sunt prezentate în acest studiu).

Studiul activității antioxidante pentru soluția de resveratrol standard și pentru extractele din pulpă de struguri, în prezența modulatorilor din clasa ciclodextrinelor a indicat o comportare interesantă. Dacă pentru resveratrol α -, β - și γ -ciclodextrina par că nu influențează prea mult variația valorilor RSA, acestea fiind apropiate de comportarea soluției de resveratrol fără ciclodextrine (în valori relative), pentru 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrină comportarea este complet diferită. Astfel, dacă se raportează valorile RSA obținute la intervalele succesive considerate (la 3, 15 și 30 min), acest raport este în intervalul 1,59-1,75 pentru sistemele resveratrol-ciclodextrine naturale, apropiat de valoarea de 1,77 pentru resveratrol fără modulatori, pentru momentele 3 și 15 min. În schimb, raportul este semnificativ mai mare pentru cazul resveratrol-HP β CD (2,11). De asemenea, pentru momentele 15 și 30 min, raportul valorilor RSA pentru cazul ciclodextrinelor naturale α și γ este 1,15-1,20, apropiat de resveratrol (1,20), în timp ce pentru sistemul resveratrol-HP β CD este mult mai mare (1,58). Acest fapt indică o activitate antioxidantă prelungită în cazul utilizării 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrinei ca modulator de activitate antioxidantă. Un studiu similar privind activitățile antioxidante relative se poate face și pentru extractele din pulpă de struguri. În acest caz nu s-au observat diferențe semnificative ale acestor rapoarte, acestea fiind situate în intervalele 1,37-

1,90 și 1,14-1,24, mai mici în cazul ciclodextrinelor mai solubile (γ - și 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina). Această comportare diferită se datorează faptului că pe lângă resveratrolul conținut în extracte, o proporție mai mare o au alți compuși (antioxidanți sau non-antioxidanți) care sunt în echilibru competitiv la procesele de asociere-disociere cu ciclodextrinele.

Parametrii cinetici pentru reacția DPPH \cdot cu compușii antioxidanți standard sau cu cei din extractele din pulpă de struguri pot oferi informații suplimentare în ceea ce privește influența modulatorilor din clasa ciclodextrinelor asupra activității antioxidante. În plus, se poate estima ordinul de reacție pentru compușii puri, în absența și în prezența ciclodextrinelor, dar și în cazul reacției cu amestecuri de compuși antioxidanți, cum sunt extractele din struguri. S-au efectuat mai întâi determinări ale parametrilor cinetici pentru reacții de ordin zero, întâi și al doilea în cazul utilizării antioxidanților/extractelor fără modulatori ai activității. În toate cazurile s-au obținut corelări excelente pentru ecuațiile de regresie, cu valori ale coeficienților de determinare r^2 de peste 0,95. Modelele cinetice de pseudo-ordin întâi au fost cele mai bune din punct de vedere statistic, atât pentru intervalul reacțiilor rapide, cât și pentru intervalul reacțiilor mai lente ($r^2 > 0,98$). Pentru aceste modele cinetice, constantele de viteză au fost în intervalul $0,86-5,3 \cdot 10^{-3}$ 1/s pentru modelul cinetic de ordinul întâi și în intervalul $5,69-37,8 \cdot 10^{-3}$ 1/(mM·s) pentru cinetica de ordin doi, dacă se consideră determinările în domeniul 0-30 s. Pentru extractele din pulpă de struguri, valorile constantelor de viteză au fost, respectiv $1,9 \cdot 10^{-3}$ 1/s și $12,79 \cdot 10^{-3}$ 1/(mM·s). Pentru intervalul 0-180 s, aceste constante de viteză au fost considerabil mai mici (la aproximativ jumătate din valoarea obținută pentru intervalul 0-30 s). Aceeași comportare se observă și pentru timpii de înjumătățire, însă în sens contrar și anume valorile acestui parametru sunt de 1-1,5 ori mai mari pentru intervalul 0-180 s.

Compararea valorilor parametrilor cinetici pentru interacțiunea resveratrolului sau compușilor antioxidanți din extractele de pulpă de struguri cu radicalul liber DPPH \cdot în prezența modulatorilor din clasa ciclodextrinelor a condus la diferențe semnificative în ceea ce privește valorile constantelor de viteză, dar și pentru valorile timpilor de înjumătățire. De obicei, coeficienții de determinare r^2 au avut valori mai mici în prezența modulatorilor, cel mai probabil datorită echilibrelor de asociere-disociere care nu permit decât interacțiuni/reacții în funcție de anumite orientări ale reactanților. Acest fapt este relevat și de barele de erori, care sunt mai mari în cazul utilizării ciclodextrinelor. Totuși, ecuațiile cinetice sunt semnificative din punct de vedere statistic, cu valori $r^2 > 0,88$ în cazul reacțiilor resveratrolului în intervalul 0-30 s, respectiv $r^2 > 0,90$ pentru aceleași cazuri dar pe intervalul de reacții mai lente (0-180 s). Constantele de viteză pe primul interval sunt în general mai mari în condițiile utilizării ciclodextrinelor, atât în cazul resveratrolului, cât și al extractului din pulpă de struguri, cele mai mari valori fiind observate la utilizarea 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrinei ($4,27 \cdot 10^{-3}$ 1/s și $30,3 \cdot 10^{-3}$ 1/(mM·s) pentru resveratrol, $4,51 \cdot 10^{-3}$ 1/s și $30,8 \cdot 10^{-3}$ 1/(mM·s) pentru extractul de struguri). În schimb, valorile maxime pentru reacția lentă se observă în cazul utilizării a două ciclodextrine (α - și hidroxiopropil- β -ciclodextrina) drept modulator de activitate, cu valori de $\sim 1,3 \cdot 10^{-3}$ 1/s și $\sim 10,5 \cdot 10^{-3}$ 1/(mM·s) pentru resveratrol, însă mai mare doar pentru ciclodextrina modificată în cazul extractelor de struguri. Timpii de înjumătățire au fost în general de 2-5 ori mai mari pentru reacția lentă (0-180 s) în prezența ciclodextrinelor, comparativ cu valorile pentru reacția rapidă (0-30 s), ceea ce sugerează un efect retard al ciclodextrinelor în interacțiunea antioxidanților cu radicalii liberi.

B.2.4. STABILIZAREA UNOR INGREDIENTE LIPIDICE DIN FRUCTE AUTOHTONE PRIN COMPLEXARE TERNARĂ CU CICLODEXTRINE ȘI ANTIOXIDANȚI NATURALI

În această parte s-au realizat studii privind sinteza și analiza complexelor ternari β -ciclodextrină/ulei de alune de pădure (*Corylus avellana* L.)/flavonoid glicozide sau flavonolignani și discriminarea acestor complexe prin cuplarea metodei FTIR cu analiza statistică multivariată PCA. Complexele ternari obținuți pentru prima dată pot oferi protecție “on site” împotriva degradării oxidative a componentelor uleiului de alune de pădure, în combinație cu protecția/stabilizarea prin nanoîncapsularea în ciclodextrine. Mai mult, solubilitatea aparentă în apă, bioaccesibilitatea, biodisponibilitatea și eliberarea controlată a compușilor bioactivi încapsulați pot fi, de asemenea, îmbunătățite prin complexarea ternară.

Complexitatea materiilor prime, în special cea a uleiului de alune, precum și diferențele dintre caracteristicile acestora (hidrofobicitate și solubilitate în apă) sugerează că metoda în pastă este cea mai potrivită pentru obținerea complexelor ternari β -ciclodextrină/ulei de alune de pădure (*Corylus avellana* L.)/flavonoide glicozilate sau flavonolignani. Pastificarea permite recuperarea mult mai bună a complexelor ciclodextrinelor în comparație cu metoda de co-cristalizare din cauza volumelor mai mici de solvenți utilizați pentru obținere. Pe de altă parte, metode similare cum este pulverizarea-uscarea, nu asigură un contact intim pentru cele trei tipuri de

componente și nici un timp suficient pentru a se atinge echilibrul de asociere-disociere dintre aceste componente și ciclodextrine. Randamentele de recuperare obținute în urma pastificării au fost în intervalul 51,5-85,3%, semnificativ mai mari pentru complecșii la raport molar de 3:1:1. Complecșii ternari la raport molar de 1:1:1, ce utilizează hesperidină, naringină, rutină și silimarină, au fost obținuți cu randamente de 57,7, 54,6, 74,3 și, respectiv, 64,7%. Pentru complecșii ternari obținuți la rapoarte molare de 3:1:1 aceste randamente au fost în intervalul 74,5-85,3%, diferențele față de valorile anterioare fiind susținute de nivelul conținutului de apă/umiditate pentru cele două tipuri de complecși, care este mult mai mic pentru complecșii 1:1:1 și care sunt confirmate de analizele termice ulterioare.

Complecșii ternari și materialele de start au fost supuse analizelor termice, în speță termogravimetrie-termogravimetrie diferențială (TG-DTG) și calorimetrice cu scanare diferențială (DSC), care pot furniza informații privind incluziunea moleculară a compușilor bioactivi în cavitatea ciclodextrinei. Conform analizelor TG-DTG și DSC, complecșii ternari sunt foarte stabili până la ~200 °C. Se observă o corelare bună între termogramele obținute pentru complecșii ternari obținuți la raport molar de 1:1:1, în comparație cu β -ciclodextrina hidrat până la această temperatură. Apare totuși o diferență semnificativă în ceea ce privește valoarea pierderii de masă corespunzătoare eliberării de moleculele de apă de cristalizare (posibil și molecule de etanol utilizate în sinteză), pierdere care pe domeniul <110 °C are valori de 6,37-7,38% pentru complecși și de 9,45% pentru β -ciclodextrina hidrat. Diferența de 2-3% pentru complecșii ternari la raporturi molare de 1:1:1 poate fi explicată prin înlocuirea parțială a moleculelor de apă în timpul încapsulării moleculare a compușilor bioactivi (în principal trigliceride ale acizilor grași și flavonoid glicozide sau flavonolignani). Pe de altă parte, pierderea de masă pentru complecșii ternari obținuți la rapoarte molare de 3:1:1 este similară cu β -ciclodextrina hidrat sau chiar mai mare. Aceasta înseamnă că o fracțiune importantă de β -ciclodextrină nu este implicată în formarea complecșilor și rămâne ca în forma inițială. Rezultatele TG sunt în concordanță cu datele DSC, unde efectul calorimetric endoterm corespunzător eliberării moleculelor de apă (posibil și a unor molecule de etanol utilizat în sinteză) este mai scăzut pentru complecșii ternari (378 J/g față de 432 J/g pentru β -ciclodextrină hidrat). Analizele XRD pot să ofere informații privind gradul de cristalinitate al materialelor, tipul de cristalizare și aranjarea moleculelor în cristale. Pentru sistemele supramoleculare complexe obținute, unde pe lângă moleculele unitare de β -ciclodextrină, respectiv flavonoide (hesperidină, naringină și rutină), în complecșii ternari apar și amestecuri complexe de trigliceride, mono- și digliceride ale acizilor grași liberi, dar și amestecuri de flavonolignani în cazul silimarinei, nu se poate evalua modul de interacțiune al acestor componenți multipli, dar se poate observa modificarea modului de cristalizare în complecși, comparativ cu β -ciclodextrina hidrat și antioxidanții inițiali, respectiv formarea complexului parțial amorf ca urmare a complexării. Pentru complexul β -ciclodextrină/ulei de alune/hesperidină, picul principal apare la 12,4°, dar mai apar picuri difractometrice la 10,6, 15,3, 18,7 sau 19,5°. Pe de altă parte, β -ciclodextrina prezintă picul majoritar la 8,9°, dar mai apar picuri importanți la 12,4, 12,6 sau 17,9°. Dacă se compară alura difractogramei complexului ternar cu cea a β -ciclodextrinei și a hesperidinei se observă că în primul caz există un grad avansat de material amorf. Aceleași comportări se observă pentru complecșii β -ciclodextrină/ulei de alune/naringină sau rutină, însă o comportare puțin diferită pentru complexul ternar β -ciclodextrină/ulei de alune de pădure/silimarină, cu structură parțial amorfă, inclusiv pentru silimarină.

Analiza FTIR este o metodă rapidă și ieftină care permite evaluarea prezenței unui compus într-un complex prin benzile specifice. Benzile specifice pentru β -ciclodextrină apar în special pentru legăturile și grupările OH, CC și CH/CH₂, dar și pentru legătura CH din unitățile glucozidice, respectiv pentru legăturile de tip α -glucozidic. Benzile caracteristice pentru complecșii ternari sunt datorate prezenței componentelor inițiale, în special pentru benzile de intensitate medie sau mare, dar și benzile care nu prezintă interferențe cu cele ale altor componenți, care pot fi relevante pentru prezența compusului în complex. Este cazul benzii slabe corespunzătoare vibrațiilor simetrice pentru grupările =CH din gliceridele nesaturate ale uleiului de alune de pădure la ~3006-3007 cm⁻¹. Valorile sunt puțin mai mari pentru complecșii ternari obținuți la rapoarte molare de 3:1:1. Complexitatea benzilor FTIR din spectrele complecșilor ternari, dar și din componentele inițiale a necesitat aplicarea unei tehnici de analiză statistică multivariată PCA pentru discriminarea acestor probe și identificarea variabilelor importante pentru astfel de clasificări. S-au utilizat aici numerele de undă și intensitățile corespunzătoare benzilor FTIR caracteristice din complecșii ternari, respectiv din β -ciclodextrina hidrat, uleiul de alune de pădure, flavonoidele glicozilate și flavonolignani. Complecșii ternari și β -ciclodextrina hidrat au fost clasificați în funcție de numerele de undă și de intensitățile benzilor FTIR specifice ciclodextrinelor. Probele de β -ciclodextrină hidrat au fost clasificate în cadranul drept-superior al graficului scorurilor PC₂ vs. PC₁, în timp ce toți complecșii ternari sunt

situați în zona central-negativă corespunzătoare celor două componente principale. Pentru discriminarea complexilor ternari și a flavonoidelor s-au utilizat 18 variabile FTIR de tipul numerelor de undă și intensităților benzilor caracteristice comune, dar s-a apelat și la analiza PCA doar cu numerele de undă drept variabile independente. Flavonoidele au fost clasificate clar în partea negativă a graficului scorurilor PC₂ vs. PC₁. Cele mai importante variabile pentru această clasificare au fost numerele de undă pentru banda corespunzătoare vibrațiilor de valență a legăturilor CO și CC pentru partea pozitivă, precum și intensitatea benzii corespunzătoare vibrației de valență asimetrică a legăturii CH pentru partea negativă a PC₁. Rezultate mult mai bune s-au obținut dacă s-au folosit doar numerele de undă ca variabile de intrare pentru analiza FTIR-PCA. Flavonoidele au fost grupate în partea pozitivă a reprezentării scorurilor PC₂ vs. PC₁, hesperidina, naringina și rutina fiind similare, în comparație cu silimarina, care a fost disimilară față de flavonoidele glicozilate. Complecșii ternari au fost localizați în partea negativă a reprezentării. Mai mult, acești complecși au fost subclasificați în acord cu tipul de antioxidanți utilizați.

C. CONCLUZII

În urma cercetărilor privind evaluare și modulare a activității antioxidante a unor sisteme naturale obținute din fructe autohtone, respectiv de stabilizare prin intermediul unor sisteme supramoleculare, care au presupus determinări de compoziție a compușilor antioxidanți de tipul antocianinelor și stilbenilor din extracte de fructe, dar și de evaluare a activității antioxidante și de modulare a acestora prin interacțiuni cu matrici de tipul ciclodextrinelor, precum și de stabilizare a unor compuși și ingrediente din surse vegetale prin co-nanoîncapsulare moleculară, se pot trasa concluziile de mai jos.

Studiul activității antioxidante și cinetică de reacție pentru extracte din fructe ale speciilor Prunus

- ✓ S-au obținut extracte la cald și la rece din diverse părți ale fructelor speciilor *Prunus domestica* L., care au fost analizate din punct de vedere al profilului antocianinic dar și al capacității de captare a radicalilor liberi, utilizând inclusiv studii de cinetică de reacție;
- ✓ S-a determinat un conținut de antocianine și antocianidine ridicat în extractele/fructele provenite din livezi particulare, în comparație cu cele provenite din supermarket sau din livezi ale unor producători comerciali, în special pentru soiurile “Bistrița” provenite din mai multe surse din zona de vest a României;
- ✓ Analizele de spectroscopie de infraroșu au fost în acord cu rezultatele obținute prin cromatografie de lichide, evidențiind prezența antocianinelor antioxidante (dar și a flavonoidelor) prin benzile caracteristice grupărilor carbonil, respectiv structurilor aromatice și piranice;
- ✓ Analiza PCA aplicată datelor FTIR pentru extractele din diverse părți de fructe ale speciilor *Prunus domestica* L. a permis doar o discriminare parțială a probelor, în special a celor aparținând soiului “Bistrița”;
- ✓ Activitatea antioxidantă exprimată prin capacitatea de captare a radicalilor liberi a fost mult mai importantă pentru soiurile “Bistrița”, ceea ce este în acord cu observațiile anterioare;
- ✓ Cinetica de reacție a radicalului liber model (DPPH·) utilizat în acest studiu în prezența compușilor antioxidanți din extractele de fructe a indicat o reacție de pseudo-ordin întâi și mai ales al doilea pentru cazul soiurilor de prune cu activitate antioxidantă mare, conform rezultatelor statistice;
- ✓ Parametrii cinetici au permis discriminarea soiurilor de fructe obținute din livezi particulare, față de fructele soiurilor comercializate în zona de vest a țării.

Modularea activității antioxidante și studii cinetice pentru compușii antioxidanți standard și extractele din specii Vitis vinifera L. în prezența ciclodextrinelor

- ✓ S-au realizat cercetări privind modularea activității antioxidante a compușilor antioxidanți standard (resveratrol) și al antioxidanților din extractele din fructe ale speciilor *Vitis vinifera* L. de către ciclodextrinele naturale și modificate în reacția cu radicalii liberi (utilizând ca model radicalul DPPH·);
- ✓ Activitatea antioxidantă a extractelor din pulpă de struguri (cu un conținut de ~23 μg/kg fruct și de 8 μM în extract) a fost similară cu cea a soluției de resveratrol de concentrație 0,2 mM, atât prin valorile absolute, cât și prin variația în timp;

- ✓ Extractele din struguri conțin și alți compuși antioxidanți (în concentrații chiar mai mari) care sunt implicați în aceste reacții, ceea ce explică diferența dintre cele două concentrații în resveratrol; aceste afirmații sunt susținute și de analizele cromatografice;
- ✓ Studiile cinetice privind reacția antioxidanților cu radicalii liberi în prezența modulatorilor din clasa ciclodextrinelor au relevat un efect retard al acestora, atât prin valorile mai mari ale constantelor de viteză la intervalele de timp corespunzătoare reacțiilor mai lente, cât și prin timpii de înjumătățire crescuți pentru aceste intervale;
- ✓ Efectul retard este mult mai important pentru ciclodextrinele cu solubilitate mult mai mare în apă sau ce conțin mai multe grupări hidroxil formatoare de legături de hidrogen, cum este 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina și în unele cazuri α -ciclodextrina.

Stabilizarea unor ingrediente lipidice din fructe autohtone prin complexare ternară cu ciclodextrine și antioxidanți naturali

- ✓ Complecși ternari de tip β -ciclodextrină/ulei din alune de pădure/antioxidanți naturali din clasa flavonoidelor glicozilate și a flavonolignanilor au fost obținute cu randamente de recuperare mari prin metoda pastificării, atât la rapoarte molare 1:1:1, cât și 3:1:1;
- ✓ Complecșii ternari prezintă avantaje multiple prin creșterea solubilității aparente în apă a componentelor uleiului de alune de pădure (în principal trigliceride ale acizilor grași), dar și a antioxidanților naturali;
- ✓ Aceste sisteme supramoleculare permit o bioaccesibilitate și biodisponibilitate mărite pentru compușii co-nanoîncapsulați pentru creșterea solubilității aparente în apă a gliceridelor din uleiul de alune de pădure, respectiv a flavonoidelor glicozilate și flavonolignanilor;
- ✓ Compușii antioxidanți co-nanoîncapsulați în ciclodextrine acționează ca protectori “on site” pentru componenții uleiului de alune de pădure, în special a gliceridelor pe bază de acizi grași mono- și polinesaturați;
- ✓ S-a dovedit că acești complecși ternari prezintă stabilitate termică ridicată, asemănătoare β -ciclodextrinei hidrat utilizate pentru obținere;
- ✓ Formarea complecșilor de incluziune moleculară a fost evaluată prin analize calorimetrice, spectroscopie de infraroșu (prezența componentelor principale din uleiul de alune, respectiv a antioxidanților în produsele solide pulbere), dar și prin difractometrie de raze X, care au relevat formarea complecșilor ternari amorfi în special pentru rapoarte echimolare;
- ✓ Pentru discriminarea eficientă a complecșilor ternari pe baza antioxidantului utilizat sau a raportului molar pentru componenți, respectiv a ciclodextrinei inițiale, s-a folosit metoda combinată FTIR-PCA, ce include o tehnică de spectroscopie de infraroșu rapidă, ieftină și nedistructivă;
- ✓ Complecșii ternari β -ciclodextrină/ulei de alune de pădure/antioxidanți la raport molar de 3:1:1 au avut un comportament spectroscopic și termic mai apropiat de β -ciclodextrina hidrat, în comparație cu complecșii obținuți la raport molar de 1:1:1;
- ✓ Complecșii ternari și compușii antioxidanți (chiar și flavonoid glicozidele față de flavonolignani) au fost foarte clar discriminați prin tehnica FTIR-PCA; cele mai interesante rezultate s-au obținut pe baza tipului de antioxidant folosit pentru co-nanoîncapsulare;
- ✓ Noi materiale supramoleculare bioactive obținute prin metode “environmental friendly” utilizând doar componente naturale, își găsesc aplicabilitate ca ingrediente bioactive și stabile din punct de vedere termic și oxidativ în suplimente alimentare sau alimente funcționale, dar și în produse farmaceutice și cosmetice care necesită compuși naturali, “food grade” și “pharmaceutical grade”; vor fi însă necesare cercetări suplimentare pentru optimizarea acestor materiale supramoleculare și de formulare corespunzătoare a acestora pentru aplicațiile propuse.

ABSTRACT OF THE Ph.D. THESIS

University of Life Sciences “King Mihai I” from Timișoara
Faculty of Food Engineering

Eng. GLIGOR (b. PANE) Dina

Studies regarding the modulation of the antioxidant activity and the stabilization of some fruit extracts and ingredients

- ABSTRACT -

Scientific promoter:
Prof. Dr. Habil. Eng. HĂDĂRUGĂ Daniel-Ioan

CONTENTS - Abstract

Committee for the examination of the Ph.D. Thesis	2
Abstract of the Ph.D. Thesis	3
A. INTRODUCTION	4
A.1. Motivation of the research theme	4
A.2. Scientific objectives to be achieved for the research	4
A.3. Short remarks on the novelty / innovation level for methods / research methodology	4
B. CONTENT OF THE Ph.D. THESIS	5
B.1. General section – Literature survey	5
B.1.1. Introduction	5
B.1.2. Fruits and fruit products	5
B.2. Special section – Personal contributions	7
B.2.1. Introduction. Fruit, fruit ingredients, modulation of antioxidant activity, stabilization	7
B.2.2. Antioxidant activity and kinetic studies on Prunus fruit extracts	7
B.2.3. Modulation of the antioxidant activity and kinetic studies for standard antioxidant compounds and extracts from species <i>Vitis vinifera</i> L. in the presence of cyclodextrins	8
B.2.4. Stabilization of lipid ingredients from autochthonous fruits through ternary complexation with cyclodextrins and natural antioxidants	9
C. CONCLUSION	11

KEYWORDS: autochthonous fruits, *Prunus domestica* - plums, *Vitis vinifera* - grapes, *Corylus avellana* – hazelnuts, antioxidant activity, reaction kinetics, cyclodextrins, nanoencapsulation, high pressure liquid chromatography HPLC, UV-Vis spectrophotometry, Fourier transform infrared spectroscopy FTIR, X-ray diffractometry XRD, thermogravimetry TG-DTG, differential scanning calorimetry DSC

A. INTRODUCTION

A.1. Motivation of the research theme

The topic of the doctoral thesis with the title “*Studies regarding the modulation of the antioxidant activity and the stabilization of some fruit extracts and ingredients*” is part of the study areas of the research groups within the University of Life Sciences “King Mihai I” from Timișoara, among which are worth mentioning:

- Study of natural compounds with biological activity: extracts and isolates from plants / fruits / vegetables, etc., fractions with specific biological effects, profiles of bioactive compounds (UV-Vis, analytical and preparative HPLC, GC-FID/MS, FTIR, food, cosmetic and pharmaceutical formulations, applications);
- The study of micro- and nanoencapsulation of natural or modified bioactive compounds by “environmentally friendly” methods, respectively of natural bioactive systems, by using natural or modified cyclodextrins (“food grade” and “pharmaceutical grade”), specific analyzes by spectroscopic methods (UV-Vis, FTIR, ¹H- and ¹³C-NMR), thermal analyses (TG-DTG, DSC, STA), or X-ray diffractometry, electron microscopy (SEM and TEM), etc.;
- Evaluation of the biological / antioxidant activity of some micro- and nano-encapsulated compounds and systems;
- Theoretical studies of molecular modeling and docking of supramolecular systems, mathematical modeling of controlled release processes, respectively modeling of reactions involving the studied natural substances (for example, reaction kinetics).

A.2. Scientific objectives to be achieved for the research

The **main objective** of the Ph.D. thesis was to evaluate and modulate the biological / antioxidant activity of some natural systems obtained from autochthonous fruits, respectively stabilization by means of supramolecular systems.

Specific objectives:

- The selection of autochthonous fruit species with significant impact in terms of biological effects, as well as scientific, applied or economic;
- Study of the separation of biologically active/antioxidant systems from fruits and compositional analysis;
- The study of the antioxidant activity and the corroboration of the results with the profile of the antioxidant compounds;
- Kinetic study of the interaction of antioxidant compounds with model free radicals;
- Studies on modulation of antioxidant activity through the intervention of compounds that allow non-covalent interactions;
- Kinetic study of systems in the presence of antioxidant activity modulators;
- The study of cyclodextrin / oils from fruit seeds / natural antioxidants ternary systems – obtaining and specific analyses, possible food and pharmaceutical applications;
- Classical and multivariate statistical studies for the discrimination of samples and bioactive systems, respectively establishing the influence of various factors/parameters on their classification.

A.3. Short remarks on the novelty / innovation level for methods / research methodology

The novelty and the degree of innovation stand out both for the new products obtained and for some of the innovative methods used in these studies, which can be summarized as follows:

- A study was carried out for the first time on the reaction kinetics of antioxidant compounds from fruits in the presence of activity modulators, in this case natural and modified cyclodextrins, accepted for food and/or pharmaceutical uses;
- Innovative materials were obtained for the first time, based on cyclodextrin / fruit seed oils / natural antioxidants ternary systems, with possible food, cosmetic and pharmaceutical applications;
- Methods were developed that allow the coupling of FTIR or UV-Vis experimental techniques with multivariate statistical analysis techniques, which were successfully applied and allowed the discrimination of supramolecular systems and ternary complexes.

B. CONTENT OF THE Ph.D. THESIS

B.1. GENERAL SECTION – LITERATURE SURVEY

B.1.1. INTRODUCTION

Fruits are a very important part of the human diet. They provide energy through the carbohydrates, as well as vitamins (vitamin C, vitamins E, vitamins from the B complex or carotenoids such as provitamin A) and antioxidant polyphenols. In our country, the total area cultivated for the production of various fruits, at the level of 2021, was 318,300 ha, according to the latest data updated by FAOSTAT (Food and Agriculture Organization's Corporate Statistical Database) on March 24, 2023. As for regarding the total fruit production for the same evaluated year, it was $3.06 \cdot 10^6$ tons. Depending on the cultivated area, grapes (the area cultivated with vines) occupy the first place in Romania, with 163,610 ha, followed by plums and similar fruits (66,730 ha), apples (53,820 ha), and with significantly smaller cultivated areas, cherries, pears, cherries, strawberries, apricots, or peaches (areas cultivated for the production of these fruits varying between 3510 ha for cherries and 1370 ha for peaches). In addition, the production of nuts is due to a cultivated area of 2400 ha, for hazelnuts of 820 ha, or other edible stone fruits on a total area of 1250 ha. Forest fruits are also important, such as blueberries, with a cultivated area of 710 ha, raspberries – 110 ha, currants – 40 ha, or other forest fruits, respectively fruits of the genus *Vaccinium*, with a total cultivated area of 680 Ha.

B.1.2. FRUITS AND FRUIT PRODUCTS

Regarding fruit production in Romania, for the year 2021, it was more than 10^6 tons of grapes, followed by plums and apples with annual productions of $8.07 \cdot 10^5$ tons and $5.94 \cdot 10^5$ tons, respectively. A lower production was obtained for pears – 49,460 tons, cherries – 40,670 and 34,260 tons, apricots – 26,840 tons, strawberries – 18,430, peaches – 14,120 tons. Also, fruits for stone (walnuts, hazelnuts, etc.) totaled 83,930 tons, of which two thirds are walnuts. For forest fruits, the production for the year 2021 was 3200 tons, with 1930 tons for blueberries, and only 180 tons of raspberries or 40 tons of currants. The ranking based on productivity places first the fruits grown for pits, such as walnuts, with a productivity of 22,604 kg/ha, followed by pears, apricots, sour cherries, plums and cherries, with productivity between 15,603 and 11,587 kg/ha. Productivity for apples is much lower, standing at values slightly above 11,000 kg/ha, and for strawberries and grapes the productivities were even lower (7,228 and 6,144 kg/ha). Productivities below 3 tons/ha were obtained especially for forest fruits (blueberries, raspberries, currants), and the lowest productivity among the fruits taken into account was obtained for hazelnuts - 805 kg/ha.

Fruit juices or fruit soft drinks are the most consumed fruit products. They can be classified according to appearance as cloudy or clear juices. They can also contain 100% fruit, but many have a lower content of fruit and added flavoring compounds. In principle, fruit juices should not contain preservatives, added sugars, artificial flavors or other similar ingredients. They can be obtained from a single fruit, or they can be multi-fruit juices. Regarding the production technology, they can be obtained directly by pressing the fruits with various equipment, followed by specific processes such as filtering, but they can also be reconstituted juices (for example, from concentrated and frozen fruit juices).

Plums are the fruits of the species *Prunus domestica* L. (Rosaceae), a species that includes many subspecies and varieties that are cultivated especially in Europe and, of course, in Romania. The high production of plums in our country and the variety of commercialized and processed fruits were the basis for the selection of these autochthonous fruits in the present study. “Bistrița” plums are the most famous and cultivated variety in the country, as well as the “Centenar”, “Minerva”, “Record”, “Diana”, “Carpatin”, “Alutus”, “Flora”, “Ialomița”, or “Andreea”. The subspecies *domestica*, ssp. *intermedia*, ssp. *damsons*, or ssp. *italica* are also cultivated in the region, respectively the varieties “Jefferson”, “Mallard”, “Opal”, “Victoria”, “Reine Claude”, “President” or “Stanley”. Approximately two-thirds of the plum production is consumed fresh, but the fruits are also processed in the form of compote, juice, frozen or dried. Among the processing methods most applied for plums, it is worth mentioning the obtaining of juices, compotes, respectively drying, the last variant experiencing a significant increase recently. Other forms of processing are obtaining paste/purée or sauces. The drying of plums requires a content of total solubles of 22%, firmness and appropriate color of the peel and flesh of the fruit. The energy value of the fruit is similar to apricots and peaches (~46 kcal/100 g fresh fruit, 107 kcal/100 g dried fruit, and 63-71 kcal/100 g plums in the form of compote or juice). Total carbohydrates are at a concentration of 11.4 g/100 g of

fresh fruit, and total sugars and total fibers are at values of 9.9 and 1.4 g/100 g. Both the protein and lipid content are low (under 1%). On the other hand, plums have a high content of vitamins A and β -carotene (~345 IU/100 g and 190 mg/100 g), lutein and zeaxanthin (73 μ g/100 g), vitamin C (9.5 mg /100 g), or vitamins K (6.4 mg/100 g). Among the minerals, we should mention potassium (157 mg/100 g), but also magnesium, calcium, phosphorus and zinc. Among the antioxidants present in fresh plums, we should mention 3,4-dihydroxybenzoic acid, chlorogenic acids, their derivatives and neochlorogenic acids (*p*-coumaroylquinic, 3-feruloylquinic, 3-caffeoylquinic acids), but also flavonoids and glycosylated flavonoids (catechin, rutin, quercetin-glucoside, quercetin-galactoside, quercetin-rhamnoside, rosmarinic acid), or anthocyanins and anthocyanidins (cyanidin 3-*O*-glucoside). Regarding the aroma compounds in plums, several classes of such compounds have been identified such as ketones, aldehydes, alcohols, esters, lactones and hydrocarbons. Aromatic volatile compounds such as 4-hexen-1-ol acetate, hexyl acetate and butyl acetate were identified, but also aldehydes and simple alcohols such as hexanal, 2-hexenal, 1-hexanol, or nonanal.

Grapes are in first place in Romania in terms of fruit production. The grapevine (*Vitis* species) is native to Anatolia (Asia Minor), especially in the regions of the Black Sea and the Caspian Sea. There are several species of vine, of which *Vitis vinifera* L. is the best known, but the species *V. amurensis* or *V. rupestris* are also cultivated. Currently, the grapevine is cultivated all over the globe, in North America there are the most species and varieties cultivated for table grapes or for obtaining wine. The European varieties belong especially to the species *V. vinifera* L., the best known being “Cabernet Sauvignon”, “Merlot”, “Pinot Noir”, or “Syrah” for red wines, respectively “Chardonnay”, “Gewürztraminer”, “Pinot Blanc”, “Riesling”, or “Sauvignon Blanc” for white wines. A large amount of grapes are used for winemaking (especially red and white wines). The white wine manufacturing process includes must separation and fermentation under controlled conditions. On the other hand, the production of red wine involves an additional step of maceration of grape skins for the proper extraction of antioxidant pigments. The chemical composition of grapes is similar to that of raisins from the perspective of component classes. The concentrations of proteins, carbohydrates and especially enzymes (polyphenoloxidase is no longer found in raisins) change during the dehydration/drying processes. Raisins contain 79.2 g carbohydrates/100 g (5.3 g fiber/100 g), 3.3 g protein/100 g, 0.4 g lipids/100 g and only 15.4 % water, compared to grapes, which has a water content of over 81%. The average sugar content of ripe grapes reaches 15.2%, with a dietary fiber content of 1.5%, a pectin content of 0.3 g/100 g (expressed as calcium pectate) and a pH of 3.3. The most important bioactive compounds from grapes, in addition to minerals (potassium - 751 mg/100 g, but also manganese and phosphorus) and vitamins (especially ascorbic acid - 3.3 mg/100 g, or the complex of B vitamins), are the compounds polyphenols with antioxidant activity. The main classes of polyphenolic compounds from grapes, respectively from processed products such as raisins and wine, are hydroxycinnamic acids, hydroxybenzoic acids, flavanols, flavonols, stilbenes and derivatives (dimers, trimers, tetramers, etc.), procyanidins and anthocyanins/anthocyanidins. The most important antioxidant compound in grapes is resveratrol, with glycosylated piceid/polydatin derivatives, but also aglyconic or glycosylated homologues, respectively oligomers of the viniferin and vitisin types.

Vegetable oils intended for consumption come from vegetable sources with high productivity, such as sunflower seeds, olives, palm nuts, soybean seeds, rapeseeds, cotton seeds or coconuts. The highest consumption of vegetable oils is palm, soybean, rapeseed (including for biofuels), or sunflower. However, there are a number of plant resources that provide oils with high nutritional value, including through the use of food/fruit by-products. We should mention grape seed oil, lentil seed oil, sesame / black sesame, chia, common hemp, respectively the oils from the seeds of specific fruits – walnuts and hazelnuts. Oils from such stone fruits are usually obtained by cold pressing and are less processed to protect the glycerides of polyunsaturated fatty acids, including omega-3, against thermal and oxidative degradation. **Hazelnuts** and walnuts mainly contain triglycerides of essential fatty acids, but also other lipid components (phytosterols and phytostanols, tocopherols and tocotrienols), respectively minerals. Triolein (1,2,3-glycerol trioleate, OOO) is the major triglyceride in hazelnut oil (61-77.5%), followed by glycerol 1,2-oleate 3-palmitate (OOL, 10.5 -22.8%).

The methods of fruit analysis (quality, authenticity, falsifications for fruit products, etc.) are very diverse, starting from the simplest methods (pH, titratable acidity, total sugar content, etc.), up to complex modern methods (GC -FID/MS, HPLC-MS, UV-Vis, FTIR, NIR, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR, AAS, SNIF-NMR).

B.2. SPECIAL SECTION – PERSONAL CONTRIBUTIONS

B.2.1. INTRODUCTION. FRUIT, FRUIT INGREDIENTS, MODULATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY, STABILIZATION

The studies regarding the evaluation of the antioxidant activity of the extracts from various fruits of some autochthonous species (various parts of the fruit), the modulation of the antioxidant activity using natural compounds with molecular encapsulation capacity from the class of cyclodextrins, using modeling in the study of the reaction kinetics of the antioxidants of interest, as well as the stabilization of some natural systems separated from fruits by ternary complexation in cyclodextrins, together with natural antioxidants for “on site” action, required the completion of some main steps such as obtaining and analyzing extracts, monitoring reactions with antioxidant compounds, obtaining and analyzing complex systems, advanced statistical analyses.

B.2.2. ANTIOXIDANT ACTIVITY AND KINETIC STUDIES ON *PRUNUS* FRUIT EXTRACTS

Fruit samples of *Prunus domestica* species were subjected to cold and hot extractions. Extractions were made in 96% ethanol both from the peel part of the fruit and from the pulp. From the HPLC analyses, a better stability of the antioxidant components (especially anthocyanins such as cyanidin 3-glucoside) in cold extracts was observed, so the studies were directed especially to the evaluation of the extracts carried out cold, under moderate conditions.

The evaluation of the profile of anthocyanins and anthocyanidins could be efficiently carried out for cyanidin 3-glucoside and cyanidin using the calibration curves for standard compounds, while for other antioxidants of interest only an attempt at identification was made based on similar studies that used the same conditions of HPLC analysis for petunidin and its 3-glucoside, delphinidin 3-glucoside, cyanidin 3-arabinoside and peonidin 3-glucoside. Regarding the content of anthocyanins/anthocyanidins in fresh fruits, they were determined at maximum values in a sample of “Bistrița” fruits (Măgulecea), at values of 0.94 mg/kg for cyanidin 3-glucoside, respectively for “Bistrița” fruits (Topolovațu Mic), with values of 2.70 mg/kg for cyanidin.

The presence of anthocyanin and flavonoid components in the analyzed extracts was also confirmed by FTIR analyses, especially by the presence of the valence vibration of the C=O bond from flavonoids (but also from organic acids), $\nu_{(C=O)}$, at 1713-1717 cm^{-1} , as well as the stretching vibration of the aromatic CC bond, $\nu^{\text{sk}}_{(C=C(\text{ar}))}$, and the stretching vibration corresponding to the pyranic residue, ν^{sk} , at 1630-1637 and 1233-1258 cm^{-1} . The evaluation of the antioxidant activity and the determination of the kinetic parameters for the pulp and peel extracts of the fruits of *Prunus domestica* L. species, various varieties, were carried out by the spectrophotometric method with the free radical DPPH·, which allows monitoring the concentration during the reaction with the antioxidants present in the extracts. The antioxidant activity was evaluated as the capacity to capture these free radicals (radical scavenging activity – RSA, %) and was calculated according to the monitoring times. The antioxidant activity for the extracts from various parts of the fruits of the species *Prunus domestica* L. presented a logarithmic behavior regarding the variation of the actual RSA values over time, for the intervals considered (15 min). In addition, determinations for duplicate samples indicated reproducibility, with most standard deviations below 3%. In all cases, higher antioxidant activities were observed for extracts from the peel, compared to those from the pulp (for some samples even double values of RSA values). The highest RSA values were observed for the samples obtained from the orchards of some private individuals, which were not subjected to any special treatments. These are “Bistrița” varieties collected from the western part of the country, which presented RSA values between 41-86% for peel extracts and 30-70% for pulp extracts. On the other hand, extracts from plum varieties purchased in the supermarket showed low values for the RSA parameter.

The statistical parameters for the pseudo-first-order kinetics of DPPH· reaction in the interaction with the antioxidant compounds from the “Bistrița” plum pulp and peel extracts presented the best values. The coefficients of determination r^2 had values of 0.902-0.976 for the fruit pulp extracts and 0.955-0.979 for the peel extracts, in the case of the “Bistrița” - Măgulecea varieties, while these statistical parameters were only 0.642-0.695 and, respectively, 0.713-0.741. For these extracts, the pseudo-first-order reaction rate constants were in the range 0.0015-0.003 1/s for 30 s and 0.0017-0.0033 1/s for 180 s in the case of the “Bistrița” – Măgulecea varieties, respectively of only 0.0012-0.0015 1/s on the last interval for the “Hekman” varieties, with the higher values for the peel extracts. However, the half-life times do not differ significantly in this last case for the peel or pulp, but they are 4-5 times higher in the determinations over the 180 s interval (462-577 s). For the “Bistrița” variety, the

half-life times are approximately double or triple for the 180 s interval, compared to the 30 s interval (with some exceptions for the “Bistrița” - Sânanndrei varieties). It was found that for the varieties that presented reduced antioxidant activities, the half-lives were much higher, especially for the 180 s interval, as in the case of the varieties “Stanley”, “Zuchella”, “President”, “D’Agen” or “Vinete Românești”, many times over 1000 s.

Multivariate statistical analysis of antioxidant activity data (RSA values at 30, 180 and 900 s) and kinetic data (rate constants and half-lives corresponding to zero, first and second order reaction kinetics) revealed much better classifications compared to the similar analysis for FTIR. Good results are observed when using both the variables corresponding to the antioxidant activity and those from the reaction kinetics of DPPH·. The classification in the center-right zone for pulp and peel samples from fruits obtained from private orchards appears in both graphs of PC2 vs. PC1 and PC3 vs. PC1 scores. The influence of the parameters is towards the positive side of the PC1 component in the case of the k and RSA parameters, respectively towards the negative side for the half-lives. In addition, the half-life, calculated at 30 s, had the influence in the negative part of the PC2 component. The first two principal components explain over 88% of the variance of the data.

B.2.3. MODULATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY AND KINETIC STUDIES FOR STANDARD ANTIOXIDANT COMPOUNDS AND EXTRACTS FROM SPECIES *VITIS VINIFERA* L. IN THE PRESENCE OF CYCLODEXTRINS

The modulation of the antioxidant activity of some compounds from the class of stilbenes, respectively of extracts containing such compounds, from fruits of *Vitis vinifera* L. species (grapes), was achieved in solution, by using natural and modified cyclodextrins. The modulation of the antioxidant activity was monitored both by studying the variation of the free radical scavenging capacity by resveratrol or grape extracts in the presence of cyclodextrins, as well as by the values of the kinetic parameters calculated for pseudo-zero, first or second order reactions.

In all cases, the variation of RSA values over time presented a logarithmic pattern, both for resveratrol of various concentrations (0.1-1.0 mM), and for the extracts from grape pulp of the “Moldova” variety. A similar behavior of these extracts is observed in the presence of the 1 mM DPPH· solution, as in the case of the 0.2 mM resveratrol solution. If the RSA values for different moments in the analysis are compared, the equivalence of the two types of samples is found: standard solution of resveratrol 0.2 mM and raw grape pulp extract. At $t = 3$ min the RSA values were 15.63 and 14.40%, at $t = 15$ min 27.73 and 25.35%, and at $t = 30$ min 33.37 and 27.87% . On the other hand, the antioxidant activity was significantly higher for the 1 mM resveratrol solution and much lower for the 0.1 mM solution (86.78 and 19.01%, respectively). This was also the reason why grape pulp extract was used, with a lower content of resveratrol (and other polyphenolic antioxidant compounds), previously determined by HPLC analysis, with a value of 23 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of fresh grape pulp. On the other hand, the cold grape pulp extract led to incomplete extraction, 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ grape pulp, while the cold or hot grape skin extracts led to a content of *trans/cis*-resveratrol between 1422-1833 $\mu\text{g}/\text{kg}$ grape skin. Although such extracts can also be used in the analysis of the modulation of antioxidant activity, the concentration of the extracts is too high and requires much higher dilutions, which can also lead to larger errors. In addition, preliminary studies were carried out for red wine from the “Moldova” variety, where the calculated concentration of resveratrol was respectively 4948 $\mu\text{g}/\text{L}$, also a concentration too high for kinetic studies (the data are not presented in this study).

The study of the antioxidant activity for the standard resveratrol solution and for the grape pulp extracts, in the presence of modulators from the class of cyclodextrins, indicated an interesting behavior. If for resveratrol α -, β - and γ -cyclodextrin do not seem to influence much the variation of RSA values, being close to the behavior of the resveratrol solution without cyclodextrins (in relative values), for 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin the behavior is completely different. Thus, if the RSA values obtained at the successive intervals considered (at 3, 15 and 30 min) are reported, this ratio is in the range of 1.59-1.75 for the natural resveratrol-cyclodextrin systems, close to the value of 1.77 for resveratrol without modulators, for moments 3 and 15 min. In contrast, the ratio is significantly higher for the case of resveratrol-HP β CD (2.11). Also, for the moments 15 and 30 min, the ratio of RSA values for the case of natural cyclodextrins α and γ is 1.15-1.20, close to resveratrol (1.20), while for the resveratrol-HP β CD system it is much higher (1.58). This fact indicates a prolonged antioxidant activity when using 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin as an antioxidant activity modulator. A similar study regarding the relative antioxidant activities can be done for grape pulp extracts. In this case, no significant differences of these ratios were observed, they being located in the ranges of 1.37-1.90 and 1.14-1.24, lower in the case of more soluble

cyclodextrins (γ - and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin). This different behavior is due to the fact that, in addition to the resveratrol contained in the extracts, a larger proportion of other compounds (antioxidants or non-antioxidants) are in competitive balance during the association-dissociation processes with cyclodextrins.

The kinetic parameters for the reaction of DPPH· with standard antioxidant compounds or with those from grape pulp extracts can provide additional information regarding the influence of cyclodextrin class modulators on antioxidant activity. In addition, the reaction order can be estimated for pure compounds, in the absence and in the presence of cyclodextrins, but also in the case of the reaction with mixtures of antioxidant compounds, such as grape extracts. First, determinations of the kinetic parameters for zero, first and second order reactions were performed in the case of using antioxidants/extracts without activity modulators. In all cases, excellent correlations were obtained for the regression equations, with values of the coefficients of determination r^2 above 0.95. Pseudo-first-order kinetic models were statistically the best, both for the fast reaction range and for the slower reaction range ($r^2 > 0.98$). For these kinetic models, the rate constants were in the range $0.86\text{--}5.3 \cdot 10^{-3}$ 1/s for the first-order kinetic model and in the range $5.69\text{--}37.8 \cdot 10^{-3}$ 1/(mM·s) for second-order kinetics, if we consider the determinations in the range 0-30 s. For grape pulp extracts, the values of the rate constants were, respectively, $1.9 \cdot 10^{-3}$ 1/s and $12.79 \cdot 10^{-3}$ 1/(mM·s). For the interval 0-180 s, these rate constants were considerably lower (at about half of the value obtained for the interval 0-30 s). The same behavior is observed for the half-life, but in the opposite sense, namely the values of this parameter are 1-1.5 times higher for the interval 0-180 s.

Comparing the values of the kinetic parameters for the interaction of resveratrol or antioxidant compounds from grape pulp extracts with the free radical DPPH· in the presence of modulators from the class of cyclodextrins led to significant differences regarding the values of the rate constants, but also for the half-life values. Usually, the coefficients of determination r^2 had lower values in the presence of modulators, most likely due to association-dissociation equilibria that only allow interactions/reactions depending on certain orientations of the reactants. This fact is also revealed by the error bars, which are larger in the case of using cyclodextrins. However, the kinetic equations are statistically significant, with values of $r^2 > 0.88$ in the case of resveratrol reactions in the range 0-30 s, respectively $r^2 > 0.90$ for the same cases but in the range of slower reactions (0-180 s). The rate constants on the first interval are generally higher under the conditions of using cyclodextrins, both in the case of resveratrol and grape pulp extract, the highest values being observed when using 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin ($4.27 \cdot 10^{-3}$ 1/s and $30.3 \cdot 10^{-3}$ 1/(mM·s) for resveratrol, $4.51 \cdot 10^{-3}$ 1/s and $30.8 \cdot 10^{-3}$ 1/(mM·s) for grape extract). Conversely, the maximum values for the slow reaction are observed in the case of using two cyclodextrins (α - and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin) as activity modulators, with values of $\sim 1.3 \cdot 10^{-3}$ 1/s and $\sim 10.5 \cdot 10^{-3}$ 1/(mM·s) for resveratrol, but higher only for modified cyclodextrin in the case of grape extracts. The half-lives were generally 2-5 times higher for the slow reaction (0-180 s) in the presence of cyclodextrins compared to the values for the fast reaction (0-30 s), suggesting a retarding effect of the cyclodextrins in the interaction of antioxidants with free radicals.

B.2.4. STABILIZATION OF LIPID INGREDIENTS FROM AUTOCHTHONOUS FRUITS THROUGH TERNARY COMPLEXATION WITH CYCLODEXTRINS AND NATURAL ANTIOXIDANTS

In this part, studies were carried out on the synthesis and analysis of β -cyclodextrin/hazelnut oil (*Corylus avellana* L.)/flavonoid glycosides or flavonolignans ternary complexes and the discrimination of these complexes by coupling the FTIR method with PCA multivariate statistical analysis. The ternary complexes obtained for the first time can provide “on site” protection against the oxidative degradation of hazelnut oil components, in combination with protection/stabilization by nanoencapsulation in cyclodextrins. Furthermore, the apparent water solubility, bioaccessibility, bioavailability and controlled release of encapsulated bioactive compounds can also be improved by ternary complexation.

The complexity of the raw materials, especially that of hazelnut oil, as well as the differences between their characteristics (hydrophobicity and solubility in water) suggest that the kneading method is the most suitable for obtaining β -cyclodextrin/hazelnut (*Corylus avellana* L.)/glycosylated flavonoids or flavonolignans ternary complexes. Kneading allows a much better recovery of cyclodextrin complexes compared to the co-crystallization method due to the smaller volumes of solvents used for the preparation. On the other hand, similar methods such as spray-drying do not ensure an intimate contact for the three types of components and no sufficient time to reach the equilibrium of association-dissociation between these components and cyclodextrins. The recovery yields obtained after kneading were in the range of 51.5-85.3%, significantly higher for complexes at a molar ratio of

3:1:1. The ternary complexes at a molar ratio of 1:1:1, using hesperidin, naringin, rutin and silymarin, were obtained with yields of 57.7, 54.6, 74.3 and 64.7%, respectively. For the ternary complexes obtained at molar ratios of 3:1:1, these yields were in the range of 74.5-85.3%, the differences compared to the previous values being supported by the level of water/moisture content for the two types of complexes, which is much smaller for the 1:1:1 complexes and which are confirmed by subsequent thermal analyses.

The ternary complexes and the starting materials were subjected to thermal analyses, in this case thermogravimetry-differential thermogravimetry (TG-DTG) and differential scanning calorimetry (DSC), which can provide information on the molecular inclusion of bioactive compounds in the cyclodextrin cavity. According to TG-DTG and DSC analyses, the ternary complexes are very stable up to ~200 °C. A good correlation is observed between the thermograms obtained for the ternary complexes obtained at a molar ratio of 1:1:1, compared to β -cyclodextrin hydrate up to this temperature. However, a significant difference appears in terms of the value of the mass loss corresponding to the release of water of crystallization molecules (possibly also ethanol molecules used in the synthesis), a loss that in the <110 °C range has values of 6.37-7.38 % for complexes and 9.45% for β -cyclodextrin hydrate. The difference of 2-3% for ternary complexes at molar ratios of 1:1:1 can be explained by the partial replacement of water molecules during the molecular encapsulation of bioactive compounds (mainly triglycerides of fatty acids and flavonoid glycosides or flavonolignans). On the other hand, the mass loss for the ternary complexes obtained at molar ratios of 3:1:1 is similar to β -cyclodextrin hydrate or even higher. This means that an important fraction of β -cyclodextrin is not involved in the formation of complexes and remains as in the initial form. The TG results are consistent with the DSC data, where the endothermic calorimetric effect corresponding to the release of water molecules (possibly also of some ethanol molecules used in the synthesis) is lower for the ternary complexes (378 J/g compared to 432 J/g for β -cyclodextrin hydrate). XRD analyses can provide information on the degree of crystallinity of the materials, the type of crystallization and the arrangement of the molecules in the crystals. For the complex supramolecular systems obtained, where in addition to the unitary molecules of β -cyclodextrin, respectively flavonoids (hesperidin, naringin and rutin), complex mixtures of triglycerides, mono- and diglycerides of free fatty acids, but also mixtures of flavonolignans appear in the ternary complexes in the case of silymarin, the mode of interaction of these multiple components cannot be evaluated, but the modification of the crystallization mode in complexes can be observed, compared to β -cyclodextrin hydrate and the initial antioxidants, respectively the formation of the partially amorphous complex as a result of complexation. For the β -cyclodextrin/hazelnut oil/hesperidin complex, the main peak appears at 12.4°, but diffractometric peaks also appear at 10.6, 15.3, 18.7, or 19.5°. On the other hand, β -cyclodextrin shows the main peak at 8.9°, but important peaks also appear at 12.4, 12.6 or 17.9°. If the diffraction pattern of the ternary complex is compared with that of β -cyclodextrin and hesperidin, it is observed that in the first case there is an advanced degree of amorphous material. The same behaviors are observed for the β -cyclodextrin/hazelnut oil/naringin or rutin complexes, but a slightly different behavior for the β -cyclodextrin/hazelnut oil/silymarin ternary complex, with a partially amorphous structure, including silymarin.

FTIR analysis is a fast and cheap method that allows the evaluation of the presence of a compound in a complex through the specific bands. The specific bands for β -cyclodextrin appear especially for the OH, CC and CH/CH₂ bonds and groups, but also for the CH bond in the glucosidic units, respectively for the α -glucosidic type bonds. The characteristic bands for the ternary complexes are due to the presence of the initial components, especially for the bands of medium or high intensity, but also the bands that do not show interference with those of other components, which may be relevant for the presence of the compound in the complex. This is the case of the weak band corresponding to the symmetric vibrations for the =CH groups in the unsaturated glycerides of hazelnut oil at ~3006-3007 cm⁻¹. The values are slightly higher for the ternary complexes obtained at molar ratios of 3:1:1. The complexity of the FTIR bands from the spectra of the ternary complexes, but also from the initial components required the application of a PCA multivariate statistical analysis technique for the discrimination of these samples and the identification of important variables for such classifications. The wavenumbers and intensities corresponding to the characteristic FTIR bands from the ternary complexes, respectively from β -cyclodextrin hydrate, hazelnut oil, glycosylated flavonoids and flavonolignans were used here. The ternary complexes and β -cyclodextrin hydrate were classified according to the wavenumbers and the intensities of the FTIR bands specific to cyclodextrins. The β -cyclodextrin hydrate samples were ranked in the upper-right quadrant of the PC2 vs. PC1 scores plot, while all ternary complexes are located in the central-negative zone corresponding to the two main components. For the discrimination of ternary complexes and flavonoids, 18 FTIR variables of

the type of wavenumbers and intensities of the common characteristic bands were used, but PCA analysis was also used with only the wavenumbers as independent variables. Flavonoids were clearly classified in the negative side of the PC2 vs. PC1 scores plot. The most important variables for this classification were the wavenumbers for the band corresponding to the stretching vibrations of the CO and CC bonds for the positive side, as well as the intensity of the band corresponding to the asymmetric stretching vibration of the CH bond for the negative side of PC1. Much better results were obtained if only wavenumbers were used as input variables for FTIR-PCA analysis. Flavonoids were grouped in the positive side of the representation of PC2 vs. PC1 scores, hesperidin, naringin and rutin being similar, compared to silymarin, which was dissimilar to glycosylated flavonoids. The ternary complexes were located in the negative part of the representation. Moreover, these complexes were subclassified according to the type of antioxidants used.

C. CONCLUSION

Following the research on the evaluation and modulation of the antioxidant activity of some natural systems obtained from autochthonous fruits, respectively stabilization by means of supramolecular systems, which involved determinations of the composition of antioxidant compounds such as anthocyanins and stilbenes from fruit extracts, but also evaluation of the antioxidant activity and its modulation through interactions with matrices such as cyclodextrins, as well as stabilization of some compounds and ingredients from plant sources through molecular co-nanoencapsulation, the following conclusions can be drawn.

The study of antioxidant activity and reaction kinetics for fruit extracts of Prunus species

- ✓ Hot and cold extracts were obtained from various parts of the fruits of the *Prunus domestica* L. species, which were analyzed from the point of view of the anthocyanin profile but also of the free radical scavenging capacity, using also reaction kinetics studies;
- ✓ A high content of anthocyanins and anthocyanidins was determined in the extracts/fruits from private orchards, compared to those from the supermarket or from the orchards of some commercial producers, especially for the “Bistrița” varieties from several sources in the western area of Romania;
- ✓ The infrared spectroscopy analyses were in agreement with the results obtained by liquid chromatography, highlighting the presence of antioxidant anthocyanins (as well as flavonoids) through the characteristic bands of carbonyl groups, respectively aromatic and pyranic structures;
- ✓ PCA analysis applied to FTIR data for extracts from various parts of fruits of *Prunus domestica* L. species allowed only a partial discrimination of the samples, especially those belonging to the “Bistrița” variety;
- ✓ The antioxidant activity expressed by the free radical scavenging capacity was much more important for the “Bistrița” varieties, which is in agreement with the previous observations;
- ✓ The reaction kinetics of the model free radical (DPPH·) used in this study in the presence of antioxidant compounds from fruit extracts indicated a pseudo-first-order reaction and especially second-order for the case of plum varieties with high antioxidant activity, according to the results statistics;
- ✓ The kinetic parameters allowed the discrimination of the fruit varieties obtained from private orchards, compared to the fruits of the varieties commercialized in the western part of the country.

Antioxidant activity modulation and kinetic studies for standard antioxidant compounds and extracts from Vitis vinifera L. species in the presence of cyclodextrins

- ✓ Research has been carried out on the modulation of the antioxidant activity of standard antioxidant compounds (resveratrol) and antioxidants from fruit extracts of *Vitis vinifera* L. species by natural and modified cyclodextrins in the reaction with free radicals (using the DPPH· radical as a model);
- ✓ The antioxidant activity of grape pulp extracts (with a content of ~23 µg/kg fruit and 8 µM in the extract) was similar to that of the 0.2 mM resveratrol solution, both in absolute values and through time variation;
- ✓ Grape extracts also contain other antioxidant compounds (in even higher concentrations) that are involved in these reactions, which explains the difference between the two concentrations in resveratrol; these statements are also supported by the chromatographic analyses;

- ✓ Kinetic studies on the reaction of antioxidants with free radicals in the presence of modulators from the class of cyclodextrins have revealed their prolonged effect, both by the higher values of the rate constants at the time intervals corresponding to slower reactions, and by the increased half-lives for these intervals;
- ✓ The retardation effect is much more important for cyclodextrins with much higher solubility in water or containing more hydroxyl groups forming hydrogen bonds, such as 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and in some cases α -cyclodextrin.

Stabilization of lipid ingredients from native fruits by ternary complexation with cyclodextrins and natural antioxidants

- ✓ Ternary complexes of β -cyclodextrin/hazelnut oil/natural antioxidant from the class of glycosylated flavonoids and flavonolignans were obtained with high recovery yields by the kneading method, both at 1:1:1 and 3:1:1 molar ratios;
- ✓ Ternary complexes present multiple advantages by increasing the apparent solubility in water of the components of hazelnut oil (mainly triglycerides of fatty acids), but also of natural antioxidants;
- ✓ These supramolecular systems allow an increased bioaccessibility and bioavailability for co-nanoencapsulated compounds to increase the apparent solubility in water of the glycerides from the hazelnut oil, respectively of the glycosylated flavonoids and flavonolignans;
- ✓ Antioxidant compounds co-nanoencapsulated in cyclodextrins act as “on site” protectors for the components of hazelnut oil, especially glycerides based on mono- and polyunsaturated fatty acids;
- ✓ It has been proven that these ternary complexes present high thermal stability, similar to β -cyclodextrin hydrate used for the preparation;
- ✓ The formation of the molecular inclusion complexes was evaluated by calorimetric analyses, infrared spectroscopy (the presence of the main components of hazelnut oil, respectively of antioxidants in the solid powder products), but also by X-ray diffractometry, which revealed the formation of amorphous ternary complexes, especially for equimolar ratios;
- ✓ For the effective discrimination of the ternary complexes based on the antioxidant used or the molar ratio for the components, respectively the initial cyclodextrin, the combined FTIR-PCA method was used, which includes a fast, cheap and non-destructive infrared spectroscopy technique;
- ✓ The β -cyclodextrin/hazelnut oil/antioxidant ternary complexes at a molar ratio of 3:1:1 had a spectroscopic and thermal behavior closer to β -cyclodextrin hydrate, compared to the complexes obtained at a molar ratio of 1:1:1;
- ✓ Ternary complexes and antioxidant compounds (even flavonoid glycosides versus flavonolignans) were very clearly discriminated by the FTIR-PCA technique; the most interesting results were obtained based on the type of antioxidant used for co-nanoencapsulation;
- ✓ New bioactive supramolecular materials obtained by “environmentally friendly” methods using only natural components, find their applicability as bioactive and thermally and oxidatively stable ingredients in dietary supplements or functional foods, but also in pharmaceutical and cosmetic products that require natural compounds, “food grade” and “pharmaceutical grade”; however, additional research will be needed to optimize these supramolecular materials and their appropriate formulation for the proposed applications.