



Universitatea Babeș-Bolyai Cluj-Napoca
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică



Teză de Doctorat

Bianca Elena IUORAȘ (MOLDOVAN)

Contribuții la studiul transpozițiilor multiple de hidrogen în spectrele de masă ale esterilor sintetici și la investigarea proprietăților unor compuși naturali cu structuri polifenolice

Coordonator Stiințific,

Prof. Dr. Ioan Oprean

Cluj-Napoca
2013

Comisie de doctorat:

Conducător de doctorat: Prof. Dr. Ioan Oprean, Universitatea “Babes-Bolyai”
Cluj-Napoca

Președinte: Prof. Dr. Luminița Silaghi-Dumitrescu, Universitatea “Babes-Bolyai”
Cluj-Napoca

Referent: Prof. Dr. Carmen Socaciu, Universitatea de Stiinte Agricole si Medicina
Veterinara, Cluj-Napoca

Referent: Prof. Dr. Nicolae Dincă, Universitatea “Aurel Vlaicu”, Arad

Referent: Conf. Dr. Claudia Cimpoi, Universitatea “Babes-Bolyai”
Cluj-Napoca

Cuprins (teză)

Introducere	1
--------------------	----------

PARTEA I *Transpoziții triple de hidrogen în spectrele de masa ale esterilor benzoici superiori*

I.1 Date de literatură	2
I.1.1. Considerații generale	2
I.1.2. Transpoziții de hidrogen în spectrometria de masă	5
I.1.2.1. Traspoziții duble de hidrogen în spectrometria de masă	7
I.1.2.1.1. Esteri. Transpoziții de hidrogen unidirecționale duble	7
I.1.2.1.2. Eteri. Transpoziții de hidrogen unidirecționale duble	14
I.1.2.2 Transpoziții triple de hidrogen în spectrometria de masă	16
I.1.2.2.1. Transpoziții triple de hidrogen în moleculele alchil-vinil eterilor	16
I.1.2.2.2 Transpoziții unidirecționale triple de hidrogen în moleculele esterilor anhidridei trimelitice	18
I.2. Contribuții originale	21
I.2.1. Transpoziții unidirecționale triple de hidrogen în moleculele esterilor benzoici superiori	21
I.2.1.1 Esteri superiori ai acidului <i>p</i>-(4'-clorofenilazo)benzoic	21
I.2.1.1.1. Sinteză	21
I.2.1.1.2. Transpoziții unidirecționale triple de hidrogen	26
I.2.1.1.2.1. Transpoziții unidirecționale triple de hidrogen ale <i>n</i>-alchil esterilor C₄H₉COO	27
I.2.1.1.2.2. Transpoziții unidirecționale triple de hidrogen în moleculele esterilor <i>n</i>-alchenilici, <i>n</i>-alchinilici și <i>n</i>-alcadienilici C₄H₉COO	31
I.2.1.2. Esteri benzoici superiori	34

I.2.1.2.1. Sinteză	34
I.2.1.2.2. Transpoziții unidirecționale triple de hidrogen din moleculele esterilor benzoici superiori	37
I.3. Concluzii	41
I.4. Parte experimentală	43
I.4.1. Generalități	43
I.4.2. Sinteză și analiza compușilor	43
I.5. Bibliografie	73

PARTEA II: Investigarea proprietatilor unor compusi naturali cu structuri polifenolice

II.1. Date de literatură	75
II.1.1. Considerații generale	75
II.1.2. Structura antocianilor	75
II.1.3. Surse naturale de antociani	82
II.1.4. Metode de extracție și purificare	83
II.1.4.1. Metode tradiționale de extracție	83
II.1.4.2. Tehnologii moderne de separare a antocianilor	86
II.1.5. Stabilitatea antocianilor	87
II.2. Contributii originale	95
II.2.1. Introducere	95
II.2.2. Investigarea stabilității antocianilor din diverse fructe indigene	96
II.2.2.1. Stabilitatea antocianilor extrași din fructe de vișin	99
II.2.2.2. Polifenoli extrași din fructe de călin	103
II.2.2.2.1. Stabilitatea antocianilor extrași din fructe de călin	106
II.2.2.2.2. Polifenoli extrași din fructe de călin: stabilitate, activitate antioxidantă	115
II.2.2.3. Antociani extrași din fructe de corn	122
II.2.2.4. Polifenoli extrași din fructe uscate (ceaiuri de fructe)	131
II.3. Concluzii	138

II.4. Parte experimentală	139
II.4.1. Generalități	139
II.4.2. Materialul vegetal	139
II.4.3. Extracția antocianilor din fructe	139
II.4.4. Determinarea antocianilor extrași din fructe	139
II.4.4.1. Prepararea reactivilor	139
II.4.4.2. Determinarea cantitativă a antocianilor din fructe	140
II.4.5. Determinarea conținutului total de fenoli	141
II.4.6. Determinarea activității antioxidante	142
II.5. Bibliografie	143
Anexa 1. Lista compușilor noi sintetizați	150
Anexa 2 Lista lucrărilor publicate	158
Anexa 3 Articole publicate <i>in extenso</i>	160

INTRODUCERE

Chimia organică a înregistrat în ultimii ani o dezvoltare explozivă, fiind orientată din ce în ce mai mult spre obținerea unor compuși cu structură complexă, cu importante aplicații practice în industria chimică și de materiale, medicină, industria farmaceutică sau industria alimentară. Identificarea și investigarea structurală a acestor compuși a impus dezvoltarea și utilizarea exhaustivă a metodelor fizico-chimice moderne de investigare a structurii și reactivității compușilor organici.

Rezultatele activității de cercetare, prezentate în teza de doctorat, sunt structurate pe două direcții principale și accentuează utilitatea/importanța spectroscopiei UV-VIS și a spectrometriei de masă în analiza structurală și investigarea proprietăților unor compuși organici aromatici cu structură de esteri benzoici superiori, respectiv compuși naturali polifenolici (antociani).

În prima parte sunt prezentate rezultatele obținute în sinteza și analiza prin spectrometrie de masă a unor noi derivați esterici superiori ai acidului benzoic, variat substituiți, în vederea evidențierii și elucidării unor noi transpoziții de hidrogen observate în spectrele de masă ale acestor compuși. Natura diferiților factori care influențează aceste procese de transpoziție (lungimea catenei alchilice, prezența și poziția unei legături multiple carbon-carbon, natura și poziția substituenților grefați pe nucleul aromatic) a fost de asemenea investigată.

Cea de a doua parte este dedicată studiului stabilității antocianilor izolați din diverse fructe indigene, în diferite condiții de pH și temperatură, cu sau fără adaos de aditivi alimentari, în timpul procesării și stocării. În ultimii ani, interesul științific pentru îmbunătățirea tehnicilor de separare și identificare a antocianilor din surse vegetale a crescut semnificativ, datorită potențialelor utilizări ca și coloranți naturali, în special în industria alimentară, unde reprezintă o alternativă netoxică a coloranților sintetici.

Cuvinte cheie: spectrometrie de masă, transpoziție triplă de hidrogen, esteri benzoici superiori, polifenoli, antociani, reacții de degradare, călin, coarne,

PARTEA I

**TRANSPOZITII TRIPLE DE HIDROGEN IN SPECTRELE DE MASA ALE
ESTERILOR BENZOICI SUPERIORI**

COSIDERATII TEORETICE

Spectrometria de masă este o metodă fizică de analiză, al cărei început este legat de numele lui Thomson, care în 1912 trasează primele spectre de masă și arată posibilitatea folosirii acestora în analiza substanțelor chimice [Oprean, 1974].

Spectrometria de masă este o tehnică folosită astăzi cu succes în vederea determinării exacte a masei moleculare, la elucidarea structurii moleculare, precum și la studiul unor mecanisme de reacție, oferind astfel importante informații chimice și structurale despre moleculele organice. Principial, metoda are la bază separarea în câmp electrostatic/magnetic a ionilor generați în urma furnizării de energie din exterior asupra moleculelor neutre. Spectrometrul de masă utilizează diferența în raportul dintre masă și sarcină (m/z) a moleculelor sau atomilor ionizați pentru a-i separa.

Formarea ionilor moleculari urmează principiul Franck-Condon [Tate & Lozier, 1932], ionizarea fiind un proces aproape vertical. Atunci când o tranziție electronică este cauzată de un fascicul electronic sau fonic, timpul necesar realizării acesteia este extrem de scurt în comparație cu perioada vibrației legăturilor interatomice, astfel că structura moleculei nu se modifică în procesul de ionizare.

Ca urmare a energiei primite, ionii moleculari formați suferă în continuare procese de fragmentare. Moleculele pot parcurge diverse căi de fragmentare, a căror cunoaștere poate furniza importante informații structurale.

Fragmentările ce au loc în spectrometrul de masă pot fi ușor explicate cu ajutorul teoriei quasi-echilibrului (QET), cel puțin atunci când energia de impact este mai mare decât energia de legătură [Lester, 1963]. Fragmentarea necesită un timp mai îndelungat decât redistribuirea energiei asupra diferitelor grade de libertate. Atunci când ionul molecular primește o cantitate suficientă de energie suferă o reacție de fragmentare. Fragmente formate pot avea suficientă energie pentru a disocia printr-un proces similar sau pentru a suferi reacții de transpoziție [Rosenstock, Wallenstein, Wahrhaftig & Henry Eyring, 1952].

Fragmentarea în EI a ionului molecular duce la apariția unui ion pozitiv și a unui fragment (radical sau moleculă neutră). Fragmentările în EI tipice au loc în urma ruperii

unei legături simple σ prin care un radical se desprinde din ionul molecular printr-o scindare homolitică sau heterolitică.

Încă de la începuturile spectrometriei de masă a compușilor organici s-a observat că formarea unor fragmente nu poate fi explicată numai prin simpla scindare a uneia sau mai multor legături.

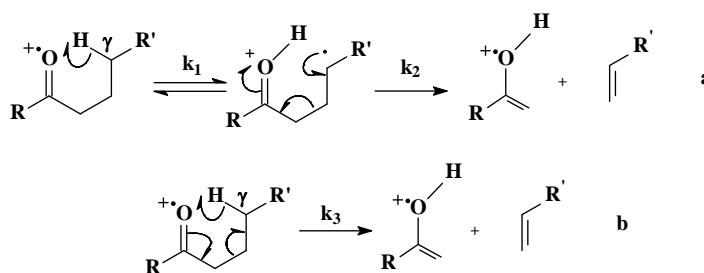
În prezent se cunoaște un număr foarte mare de fragmentări în urma cărora iau naștere ioni de acest tip numiți în general “ioni de transpoziție”. Apariția reacțiilor de transpoziție face spectrele de masă dificil de interpretat, dar în același timp furnizează informații importante din punct de vedere structural.

În funcție de reacțiile de transpoziție ce au loc în procesul de formare al acestor ioni, se pot distinge fragmentări ce implică transpoziția unuia, a doi sau chiar a trei atomi de hidrogen (transpoziția hidrogenului) sau transpozițiile altor atomi sau grupe de atomi de la un centru la altul al ionului (transpoziții de schelet).

Indiferent de natura atomilor care se transpun, procesele de transpoziție a ionilor au la bază următoarele considerații:

- a) transpozițiile decurg prin stări de tranziție ciclice energetic favorizate
- b) forța motrice a procesului constă în scindarea unui fragment neutru foarte stabil (de obicei o moleculă)
- c) ionul de transpoziție rezultat este stabil
- d) stereochemia ionului permite apropierea centrelor între care are loc transpoziția.

Cu aproximativ 50 de ani în urmă, studiind spectrele de masă ale diferitelor clase de substanțe ce conțin o legătură dublă, McLafferty [McLafferty, 1959] pune în evidență existența unei transpoziții de hidrogen la aldehide spre dubla legătură. Cu ajutorul analogilor deuterati s-a constatat faptul că atomul de hidrogen care migrează este legat întotdeauna de un atom în poziția γ față de dubla legătură (transpoziție specifică). Concomitent are loc scindarea legăturii $C_{\alpha}-C_{\beta}$ și formarea unei stări de tranziție ciclice. Mecanismul transpoziției *McLafferty* a fost intens investigat [Djerassi, von Mutzenbecher, Fajkos, Williams, & Budzikiewicz, 1965; Kingston, Bursey & Bursey, 1974] constatându-se faptul că procesul este mai degrabă unul ce decurge în trepte (Schema 1a) decât unul concertat (Schema 1 b).



Schema 1: Căi posibile ale transpoziției McLafferty

În spectrele de masă ale unor compuși organici (în special esteri) s-a observat de asemenea și un pic intens “*McLafferty plus unu*”, corespunzător unei transpoziții duble de hidrogen. Aceste tipuri de transpoziții au fost elucidate tot prin marcarea cu deuteriu. Cele mai multe transpoziții de hidrogen decurg prin pierderea sau câștigarea efectivă a unui sau mai mulți atomi de hidrogen din fragmentul încărcat electric (cationi de fragmentare) atât unidirecțional [Kuck, 2005; Djerassi & Fenselau, 1965] cât și reciproc [Eadon & Djerassi, 1969; Tökes, Jones & Djerassi, 1968]. Aceste migrații intramoleculare a doi atomi de hidrogen, transpoziții duble de hidrogen, au loc fie înainte, după scindarea unor legături slabe din moleculă.

Transpoziții intramoleculare a trei atomi de hidrogen dintr-o parte a cationului de fragmentare către alta au fost de asemenea înregistrate, însă foarte rar [Katoh, Jaeger & Djerassi, 1972; Kuck & Filges, 1988].

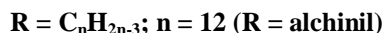
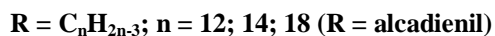
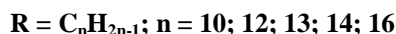
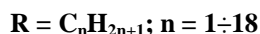
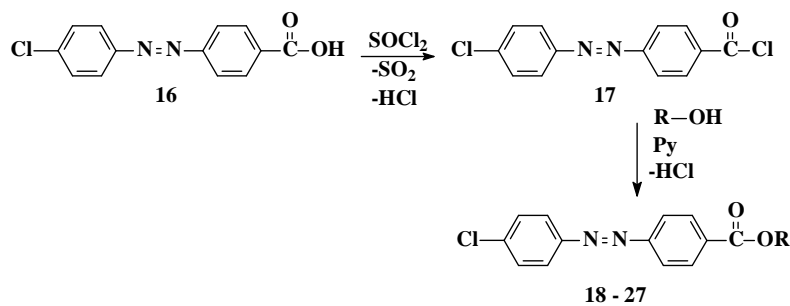
CONTRIBUTII ORIGINALE

După cum s-a precizat anterior, transpoziția unidirecțională triplă este un fenomen foarte rar întâlnit în spectrometria de masă a compușilor organici. Obiectivul prezentului studiu l-a constituit sinteza unor esteri benzoici cu catenă lungă precum și determinarea diverselor tipuri de transpoziții ce au loc în spectrometria de masă a acestora.

Esteri superiori ai acidului *p*-(4'-clorofenilazo)benzoic

Pentru a investiga factorii ce influențează apariția și intensitatea ionilor de transpoziție triplă 3H au fost sintetizați peste 40 de *n*-alchil, *n*-alchenil, *n*-alcadienil și *n*-alchenil esteri ai acidului *p*-(4'-clorofenilazo)benzoic (CABA **16**).

Schema 2 prezintă calea generală de sinteză a unor esteri derivați ai acidului *p*-(4'-clorofenilazo)benzoic, utilizați în studiul proceselor caracteristice de fragmentare induse de impactul electronic.



Schema 2: Sinteza unor esteri derivați ai acidului *p*-(4'-clorofenilazo)benzoic

Tabelul 1 sumarizează structura compușilor obținuți pe această cale.

Tabelul 1: Esteri superiori ai acidului *p*-(4'-clorofenilazo)benzoic

Compus	R = alchil	Compus	R = alchenil
18a	CH ₃	19	C ₁₀ H ₁₉ ; Z 7*
18b	C ₂ H ₅	20a	C ₁₂ H ₂₃ ; Z 3
18c	C ₃ H ₇	20b	C ₁₂ H ₂₃ ; E 7
18d	C ₄ H ₉	20c	C ₁₂ H ₂₃ ; Z 7
18e	C ₅ H ₁₁	20d	C ₁₂ H ₂₃ ; Z 8
18f	C ₆ H ₁₃	20e	C ₁₂ H ₂₃ ; E 8

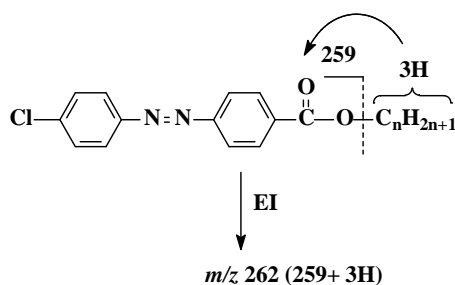
18g	C ₇ H ₁₅	20f	C ₁₂ H ₂₃ ; E 10
18h	C ₈ H ₁₇	21	C ₁₃ H ₂₅ ; Z 6
18i	C ₉ H ₁₉	22a	C ₁₄ H ₂₇ ; Z 5
18j	C ₁₀ H ₂₁	22b	C ₁₄ H ₂₇ ; E 7
18k	C ₁₁ H ₂₃	22c	C ₁₄ H ₂₇ ; Z 7
18l	C ₁₂ H ₂₅	22d	C ₁₄ H ₂₇ ; Z 8
18m	C ₁₃ H ₂₇	22e	C ₁₄ H ₂₇ ; Z 9
18n	C ₁₄ H ₂₉	22f	C ₁₄ H ₂₇ ; Z 11
18o	C ₁₅ H ₃₁	22g	C ₁₄ H ₂₇ ; E 11
18p	C ₁₆ H ₃₃	23a	C ₁₆ H ₃₁ ; Z 5
18q	C ₁₇ H ₃₅	23b	C ₁₆ H ₃₁ ; Z 7
18r	C ₁₈ H ₃₇	23c	C ₁₆ H ₃₁ ; Z 9
	R = alcadienil	23d	C ₁₆ H ₃₁ ; Z 11
24	C ₁₂ H ₂₁ ; E 7, Z 9		
25	C ₁₄ H ₂₅ ; Z 9, E 12		
26	C ₁₈ H ₃₃ ; E 2, Z 13		
	R = alchinil		
27	C ₁₂ H ₂₁ ; Y 8 ^{**}		

* Geometria și poziția dublei legături; ** Poziția legăturii triple

Structura compușilor astfel obținuți a fost confirmată cu ajutorul spectroscopiei RMN și a spectrometriei de masă.

Transpoziții unidireționale triple de hidrogen

Prin analiza EI-MS a esterilor cu catenă lungă ai acidului *p*-(4'-clorofenilazo)benzoic s-a constatat prezența unei reacții de transpoziție unidirecțională triplă de hidrogen (schema 3), transpoziție ce are loc cu o mai mare probabilitate decât în cazurile menționate anterior în literatură.



Schema 3: Formarea ionului de transpoziție unidirecțională triplă de hidrogen în *p*-(4'-clorofenilazo)benzoați

Originea atomilor de hidrogen implicați în transpoziția unidirecțională triplă a fost investigată prin marcarea cu deuteriu a pozițiilor din catena alchilică, dar după cum era precizat și în literatură pentru cazul esterilor anhidridei trimelitice, nu se poate precizia poziția exactă a celor trei hidrogeni care se transpun, procesul neavând o specificitate

prea ridicată. În nici unul dintre cazuri, nu a fost observată transpoziția hidrogenului de la atomul de carbon terminal al catenei alchilice, ceea ce este în concordanță cu dificultatea îndepărtării unui atom de hidrogen de la un atom de carbon primar, datorată instabilității radicalului rezultat.

Transpoziții unidirecționale triple de hidrogen ale *n*-alchil esterilor ai CABB

Spectrele de masă EI (70 eV) ale *n*-butil (C₄-CABB) și *n*-tetradecil (C₁₄-CABB) sunt redate în figurile 1 și 2.

În figura 1 se observă că, în cazul *n*-butil-*p*-(4'-clorofenilazo)benzoatului **18d** (C₄-CABB), ionii cei mai abundenți sunt generați de scindarea alternativă C-N a grupei fenilazo (*m/z* 111, 139, 177, 205).

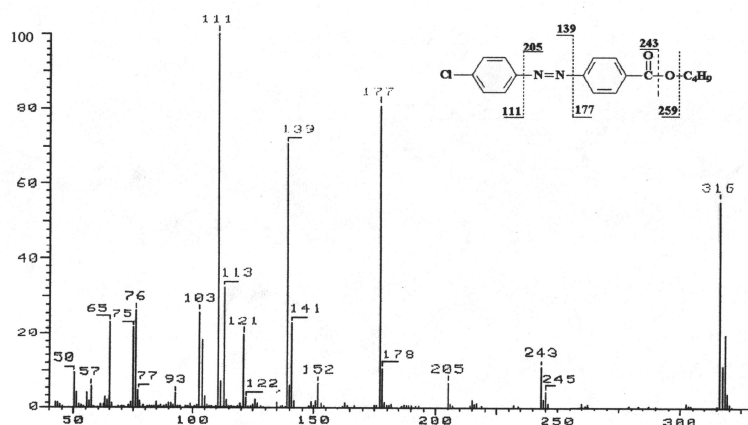


Figura 1: Spectrul de masă al *n*-butil-*p*-(4'-clorofenilazo)benzoatului **18d**

Scindarea legăturii C-O acil din ester generează ionul *m/z* 243 (10%), în timp ce scindarea O-alchil însoțită de transferul unuia sau a doi atomi de hidrogen (*m/z* 260, respectiv *m/z* 261) caracteristică *n*-butil benzoatilor [Djerassi & Fenselau, 1965] are o importanță minimă (*I*<1%).

Din contră, în figura 2 se observă că, în cazul *n*-tetradecil *p*-(4'-clorofenilazo)benzoatului (C₁₄-CABB), picul ionului de la *m/z* 281 (28%) corespunzător scindării O-C alchil cu transferul a doi atomi de hidrogen este însoțit de un pic mai intens la *m/z* 262 (53%) corespunzând unui triplu transfer de hidrogen. Interesant de remarcat este faptul că

nu s-a observat nici o scindare C-C a restului alchilic, scindare prezentă în spectrele de masă ale altor esteri [Meyerson, Kuhn, Puskas, Fields, Leitch & Sullivan, 1983].

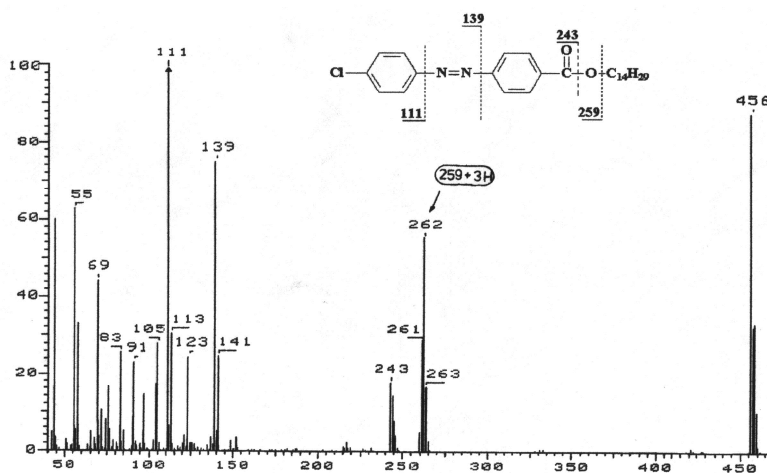


Figura 2: Spectrul de masă al *n*-tetradecil-*p*-(4'-clorofenilazo)benzoatului **18n**

Datele parțiale ale spectrelor de masă EI ale C₁-C₁₈ alchil-*p*-(4'-clorofenilazo)benzoaților sunt redată în tabelul 2.

Analizând datele, se poate constata că derivații **18a-18d** prezintă spectre de masă foarte asemănătoare cu cel al *n*-butil-*p*-(4'-clorofenilazo)benzoatului (C₄-CABE) prezentat în figura 1. În spectrele EI-MS ale compușilor **18e-18g** (C₅-C₇ CABE) picul *m/z* 260, corespunzător unei transpoziții simple de hidrogen (1H), devine mai intens decât în cazurile precedente și apare însoțit de un nou pic la *m/z* 261 generat în urma transpoziției duble de hidrogen (2H). Spectrele celorlalți compuși din seria studiată **18h-18r** au scos în evidență apariția picului de la *m/z* 262 cu o intensitate variabilă, cu valori de la 0,5 la 70%, corespunzător unui transfer de trei atomi de hidrogen din catena hidrocarbonată spre restul acidului.

Abundența acestor ioni crește odată cu creșterea numărului de atomi de carbon din catenă. Aceeași dependență de lungimea catenei o prezintă și ionii de la *m/z* 261 (transpoziția a 2H) și *m/z* 244 (*m/z* 262-H₂O).

Tabelul 2: Spectrele parțiale EI-MS ale *n*-alchil-*p*-(4'-clorofenilazo)benzoaților **18** (*R*=alchil) (C_1 - C_{18} CABE)

Compus	R	Intensitatea relativă a ionilor (%) (picul de bază=100)	
		261* (2H)	262* (3H)
18a	CH ₃	-	-
18b	C ₂ H ₅	-	-
18c	C ₃ H ₇	-	-
18d	C ₄ H ₉	-	-
18e	C ₅ H ₁₁	0,6	-
18f	C ₆ H ₁₃	1,0	-
18g	C ₇ H ₁₅	1,7	-
18h	C ₈ H ₁₇	3,4	0,5
18i	C ₉ H ₁₉	6,0	8,0
18j	C ₁₀ H ₂₁	7,2	7,0
18k	C ₁₁ H ₂₃	14,0	35,0
18l	C ₁₂ H ₂₅	19,2	30,0
18m	C ₁₃ H ₂₇	27,0	60,0
18n	C ₁₄ H ₂₉	27,0	53,0
18o	C ₁₅ H ₃₁	41,0	92,0
18p	C ₁₆ H ₃₃	35,0	70,0
18q	C ₁₇ H ₃₅	31,0	62,0
18r	C ₁₈ H ₃₇	42,0	87,0

* Corectate conform contribuției izotopilor naturali

Din figura 3 se observă că această dependență este mai accentuată în cazul ionilor corespunzători transpoziției triple de hidrogen.

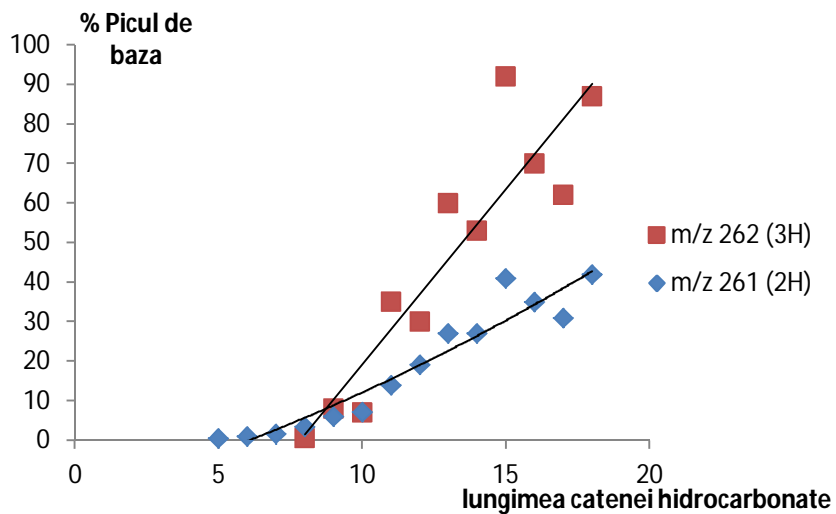
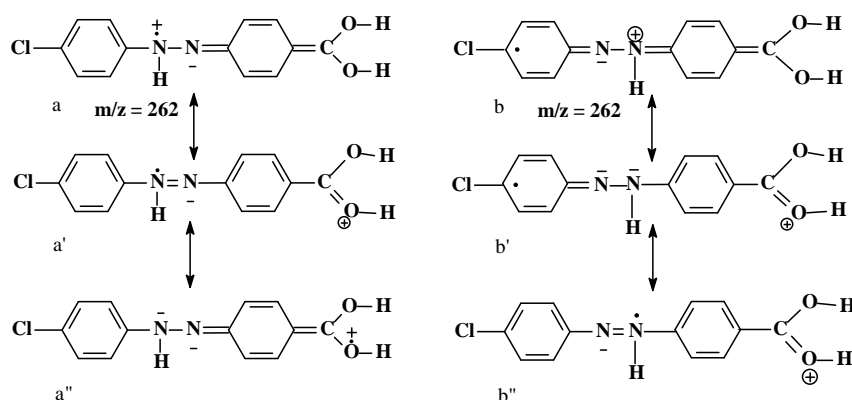


Figura 3: Efectul lungimii catenei asupra intensității relative a ionilor de transpoziție din C_1 - C_{18} CABE

Geneza ionilor de la m/z 262 (3H) poate fi explicată printr-o interacțiune intramoleculară la distanță mare “long range” între lanțurile alchilice din moleculă și atomii de azot ai grupării azo, urmată de transferul a doi atomi de hidrogen caracteristic esterilor acizilor carboxilici, într-un mod similar celui prezentat în literatură pentru anhidrida trimelitică [Cable & Djerassi, 1971], propunându-se astfel mecanismul transpoziției unidirecționale triple de hidrogen pentru cazul esterilor superiori ai acidului *p*-(4'-clorofenilazo)benzoic (Schema 4).



Schema 4: Mecanismul formării ionilor de transpoziție triplă

Multitudinea formulelor de rezonanță ale acestor ioni (a, a', a'' sau b, b', b'') explică probabil abundența ridicată a acestora.

Rezultatele obținute au dus la concluzia că transferul atomilor de hidrogen are loc dinspre catena alchilică înspre grupările azo și carbonil, fiind nevoie de o catenă suficient de lungă pentru ca cele două grupări să ajungă la distanța minimă necesară pentru a se realiza transferul [Oprean, **Moldovan** & Oprean, 2003a; Oprean, **Moldovan** & Oprean, R., 2003b].

Transpoziții unidirecționale triple de hidrogen în moleculele esterilor *n*-alchenilici, *n*-alchinilici și *n*-alcadienilici ai CAGE

Inregistrarea spectrelor de masă a 19 esteri nesaturați cu catenă lungă ai acidului *p*-(4'-clorofenilazo)benzoic CAGE a avut drept scop confirmarea fenomenului de transpoziție triplă a hidrogenului observat în cazul esterilor saturați, precum și investigarea influenței dublei legături asupra acestui fenomen sau eventuala observare a

unei fragmentări specifice în funcție de poziția nesaturării [Oprean, **Moldovan** & Oprean, R., 2003a].

Tabelul 3 prezintă spectrele parțiale ale *n*-alchenil CABE. Din datele acestuia se poate observa că comportamentul esterilor nesaturați în EI-MS este similar cu cel al analogilor saturați ai acestora. Toți compușii nesaturați prezintă picul molecular mai puțin intens decât esterii saturați cu același număr de atomi de carbon. De asemenea, toți compușii prezintă un pic remarcabil la *m/z* 262 corespunzător transpoziției triple de hidrogen.

Din studiul datelor obținute s-a constatat că intensitatea picului acestei transpoziții nu este influențată de geometria dublelor legături din moleculă.

Tabelul 3: Spectrele parțiale EI-MS ale *n*-alchenil-*p*-(4'-clorofenilazo)benzoaților (*R*=alchenil) (*C*₁-*C*₁₉ CABE)

Compus nr.	R	Intensitatea relativă a ionilor (%) (picul de bază=100)	
		261* (2H)	262* (3H)
19	Z 7** -10***	27	19
20a	Z 3-12	6	1
20b	E 7-12	33	36
20c	Z 7-12	27	26
20e	E 8-12	42	47
20d	Z 8-12	32	39
20f	E10-12	50	52
21	Z 6-13	44	55
22a	Z 5-14	11	13
22b	E 7-14	31	39
22c	Z 7-14	33	34
22d	Z 8-14	38	50
22e	Z 9-14	36	47
22g	E11-14	60	78
22f	Z11-14	56	73
23a	Z 5-16	18	27
23b	Z 7-16	35	49
23c	Z 9-16	45	61
23d	Z11-16	51	72

* Corectate conform contribuției izotopilor naturali

** Geometria și poziția legăturii duble

*** Lungimea catenei

Un deosebit interes îl prezintă studiul influenței poziției dublelor legături asupra intensității picurilor corespunzătoare ionilor formați prin transfer de hidrogen. In acest

context, au fost analizate intensitățile relative în % ale fiecărui pic format prin transpoziție de hidrogen: m/z 260 (1H), m/z 261 (2H), respectiv m/z 262 (3H) ale esterilor C_{12} , C_{14} și C_{16} *n*-alchenilici ai acidului *p*-(4'-clorofenilazo)benzoic. S-a observat că în toate cele 3 serii de compuși intensitatea picurilor m/z 260 (1H) descrește cu creșterea distanței dintre funcțiunea carbonil și poziția dublei legături în lanțul catenei esterului. În mod contrar, intensitățile relative ale picurilor m/z 261 (2H) și m/z 262 (3H) cresc odată cu depărtarea dublei legături de funcțiunea carbonil. În toate cazurile studiate, abundența ionilor m/z 262, corespunzător transpoziției triple de hidrogen este mai mare decât abundența ionilor m/z 261 generați în urma transpoziției duble.

A fost investigat de asemenea și efectul cumulat al lungimii catenei și al poziției dublei legături asupra intensității ionului de transpoziție triplă, m/z 262, constatându-se că intensitățile relative ale picurilor 3H din spectrele esterilor alchenilici sunt întotdeauna mai scăzute decât cele ale compușilor analogi cu catenă saturată.

Aceeași comportare, mai accentuată însă, a fost remarcată și în spectrele de masă ale câtorva esteri alchilici și alcadienilici analogi (tab. 4).

Tabelul 4: Spectrele parțiale EI-MS ale unor *n*-alchil- și *n*-alcadienil-*p*-(4'-clorofenilazo)benzoați

Com pus Nr.	R	Intensitatea relativă a ionilor* (%) (picul de bază=100)	
		261* (2H)	262* (3H)
24	E 7, Z 9-12**	32	37
27	Y 8-12***	20	20
25	Z 9, E 12-14	47	50
26	E 2, Z 13-18	100	19

* Corectate conform contribuției izotopilor naturali

** geometria și poziția legăturii duble

*** Y-prescurtarea pt. legătura triplă

O explicație posibilă a acestei comportări constă într-o flexibilitate redusă a catenei hidrocarbonate datorată rigidității legăturilor duble și triple, astfel încât cele două grupări nu pot ajunge la distanța minimă necesară pentru a se realiza transferul cu aceeași ușurință ca și în cazul esterilor alchilici.

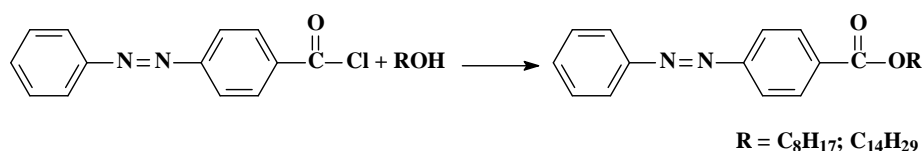
Esteri benzoici superiori

Transpoziția unidirecțională triplă de hidrogen nu este limitată doar la cazurile spectrelor de masă ale esterilor superiori ai acidului *p*-(4'-clorofenilazo)benzoic descrise în capitolele anterioare.

În vederea determinării eventualei influențe pe care atomul de clor, grupa azo sau nucleul aromatic o au asupra apariției și intensității ionului de transpoziție unidirecționale triple de hidrogen, studiul a fost extins asupra unor esterii alchilici ai acidului fenilazobenzoic, esterii cu gruparea azo modificată precum și a altor benzoați superiori.

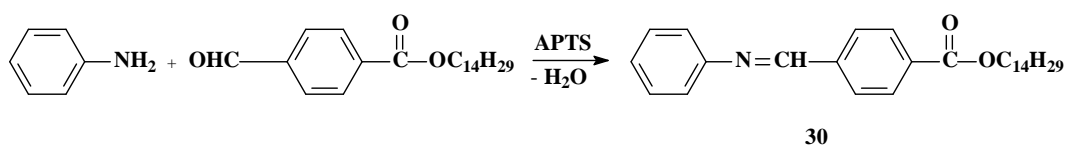
Sinteză

Esterii alchilici ai acidului fenilazobenzoic au fost sintetizați prin reacția de esterificare dintre clorura de fenilazobenzoil și alcoolul corespunzător (Schema 5):



Schema 5: Obținerea fenilazobenzoaților

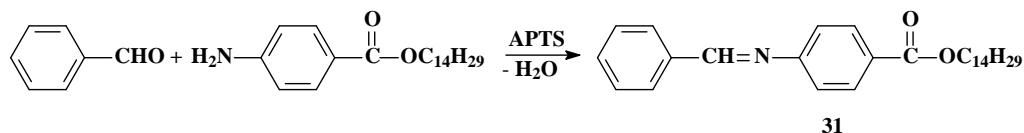
Esterii cu structură similară dar cu gruparea azo modificată au fost obținuți prin reacții de condensare. Esterul tetradecilic al acidului 4-(fenilimino)metil-benzoic (**30**) a fost obținut prin condensarea anilinei cu esterul tetradecilic al acidului 4-formilbenzoic, în prezența acidului *p*-toluensulfonic [Johnston, Smart & Smith, 1984] (schema 6)



Schema 6: Obținerea esterului tetradecilic acidului 4-(fenilimino)metil-benzoic

Structura compusului a fost confirmată prin spectroscopie RMN și spectrometrie de masă.

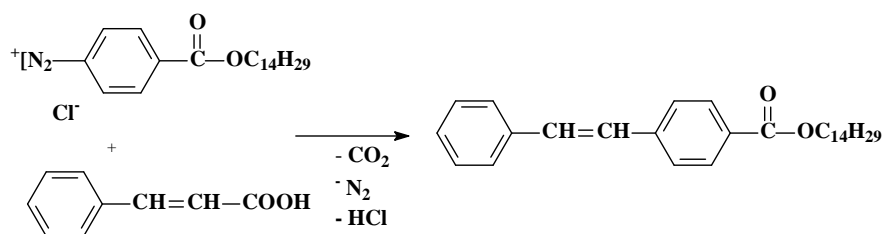
În vederea obținerii derivatului similar **31**, s-a recurs la condensarea benzaldehidei cu esterul tetradecilic al acidului *p*-aminobenzoic (Schema 7) [Johnston, Smart & Smith, 1984].



Schema 7: Obținerea esterului tetradecilic al acidului 4-amino-(N-benziliden) benzoic

Rezonanța magnetică nucleară și spectrometria de masă au fost utilizate pentru confirmarea structurii compusului obținut.

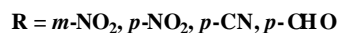
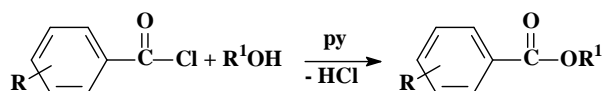
Reacția de condensare a sării de diazoniu a *p*-aminobenzoatului de tetradecil cu acid cinamic a condus la obținerea esterului corespunzător al 4-carboxi stilbenului (Schema 8) [Merweein, Büchner & vanEmster, 1939]:



Schema 8: Obținerea esterului tetradecilic al 4-carboxistilbenului

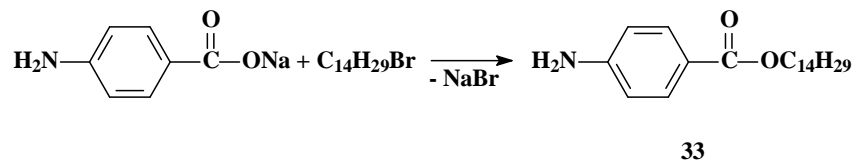
Inregistrarea spectrelor RMN și a spectrelor de masă a ajutat la confirmarea structurii compusului sintetizat.

Esterificarea unor cloruri acide cu o serie de alcooli alifatici superiori a fost utilizată pentru sinteza unei serii de esteri superiori ai acidului benzoic diferit substituiți (Schema 9):



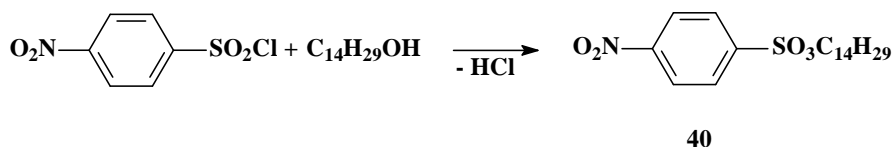
Schema 9: Sinteza benzoaților superiori

Obținerea derivatului similar **33** cu gruparea NH_2 în poziția *para*, s-a realizat prin reacția dintre sarea de sodiu a acidului *p*-aminobenzoic cu bromură de miristol (Schema 10), utilizând ca și solvent dimetilformamida [Winnik & Kwong, 1976]:



Schema 10: Obținerea tetradecil-*p*-aminobenzoatului

Compusul **40** a fost sintetizat prin reacția *p*-nitrobenzensulfoclorurii cu alcool miristic, conform ecuației [Shirley, Smith, Brown & Reedy, 1952]:



Schema 11: Obținerea tetradecil-*p*-nitrobenzensulfonatului

Structura compușilor sintetizați a fost confirmată prin spectroscopie RMN și spectrometrie de masă.

Transpoziții unidirecționale triple de hidrogen din moleculele esterilor benzoici superiori

În tabelul 5 sunt prezentate câteva date selecționate din spectrele de masă ale unor esteri aromatici cu catenă lungă [Moldovan, Oprean & Oprean, 2003].

Din aceste exemple se poate concluziona că prezența atomului de clor nu este obligatorie pentru producerea reacției de tranpoziție triplă de hidrogen observată în spectrele de masă ale fenilazobenzoatilor superiori, atomul de clor fiind însă util la identificarea fragmentelor formate.

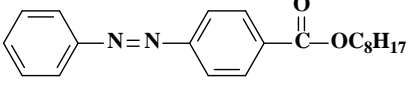
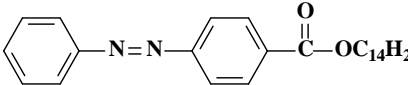
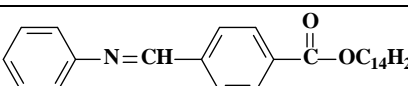
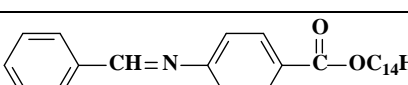
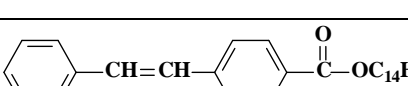
Prin înlocuirea alternativă a unuia dintre atomii de azot ai grupării N=N din esterii superiori ai acidului fenilazobenzoic cu gruparea CH, intensitatea ionilor de la m/z 227, corespunzători transpozițiilor unidirecționale triple de hidrogen, descrește (compușii **30** și **31**). Prin substituirea ambilor atomi de azot cu gruparea CH=CH ionul de tranpoziție triplă de hidrogen dispare din spectrul de masă, semn că fenomenul nu mai are loc (compusul **32**).

Această observație sugerează faptul că substituenții din poziția *para* a esterilor acidului benzoic pot influența apariția ionului de tranpoziție triplă de hidrogen, în mod

asemănător cu influența pe care aceștia o exercită asupra transpoziției simple și duble [Tobita, Tajima & Tsuchiya, 1984] cunoscută din literatură. Pentru a elucida această supoziție au fost studiate spectrele de masă ale unor benzoați cu catenă lungă având diferiți substituenți pe nucleul aromatic.

Este cunoscut din literatură faptul că esterii acidului benzoic nesubstituit precum și *p*- și *m*-metoxi benzoații cu catenă lungă [Oprean, **Moldovan** & Oprean, 2003b] nu prezintă transpoziții multiple de hidrogen. Același fenomen a fost observat și în cazul esterilor superiori ai acidului *p*-amino benzoic **33** [**Moldovan**, & Oprean, 2006].

Tabelul 5: Intensitatea relativă a ionilor transpozițiilor de hidrogen în spectrele de masă ale unor esteri superiori ai acidului fenildiazobenzoic

Nr. crt.	Structura	Intensitate relativă* (%)		
		[1H]	2[H]	3[H]
28		1.5	1	0.7
29		4	24	33
30		24	100	2
31		27	42	13
32		1	0.5	-

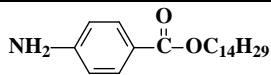
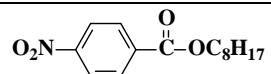
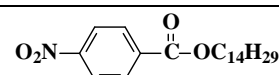
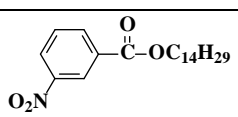
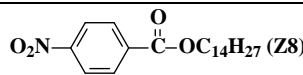
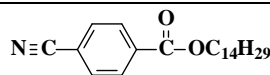
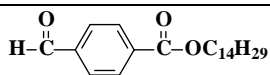
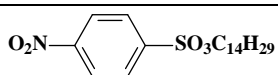
* Corectate conform contribuției izotopilor naturali

Prezența grupărilor NO₂, CN sau CHO în pozițiile *p*- sau *m*- ale nucleului aromatic din molecula benzoaților cu catenă lungă pare a fi esențială pentru producerea fenomenului de transpoziție triplă de hidrogen în spectrele de masă ale acestor compuși (tab. 13).

S-a observat că substituenții respingători de electroni favorizează formarea ionului [M-C_nH_{2n}][†] generat în urma unei reacții de transfer al unui singur atom de

hidrogen (transpoziție *McLafferty*), în timp substituenții atrăgători de electroni favorizează formarea ionilor $[M-C_nH_{2n-1}]^{\ddagger}$ rezultați în urma transpoziției a doi atomi, precum și a ionilor $[M-C_nH_{2n-2}]^{\ddagger}$ corespunzători transpoziției triple de hidrogen. Această observație poate fi explicată rezonabil prin considerente termochimice bazate pe suma căldurilor standard de formare ale acestor fragmente.

Tabelul 6: Intensitatea relativă a ionilor transpozițiilor de hidrogen în spectrele de masă ale unor esteri superiori ai acidului benzoic

Nr. crt.	Structura	Intensitate relativă* (%)		
		[1H]	2[H]	3[H]
33		100	8	-
34		1	34	17
35		1	37	81
36		4	8	23
37		1	29	76
38		2	93	22
39		2	100	57
40		-	5	3

* Corectate conform contribuției izotopilor naturali

De asemenea, s-a constatat faptul că efectul acestor substituenți este în majoritatea cazurilor bine corelat cu valorile constantelor Hammet σ_p .

Corelația dintre efectul substituenților din poziția *para* asupra intensității ionului de transpoziție triplă, raportată la intensitatea ionului de transpoziție dublă observat în

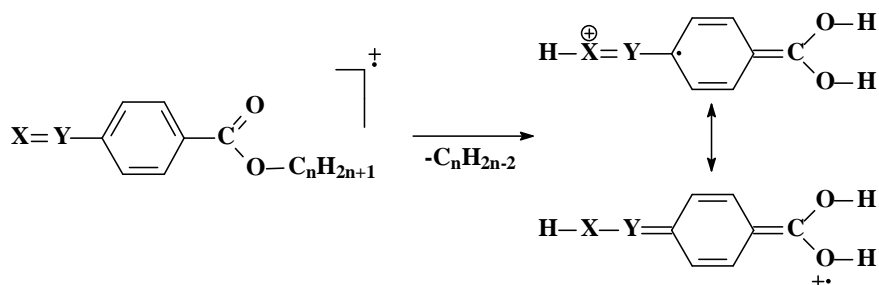
spectrele de masă ale unor esteri superiori ai acidului benzoic, cu valorile constantelor Hammet σ_p este redată în tabelul 7.

Din datele prezentate se poate constata că substituenții atrăgători de electroni grefați pe nucleul aromatic al unor alchilbenzoați cu catenă lungă favorizează formarea ionilor de transpoziție triplă de hidrogen. Același fenomen a fost observat și în cazul alchilbenzosulfoaților superiori.

Tabelul 7: Raportul intensităților relative ale ionilor transpozițiilor de hidrogen p -X- $C_6H_4COOH_3/p$ -X- $C_6H_4COOH_2$ și valorile σ_p ale unor esteri superiori ai acidului benzoic

Substituent	[3H]/[2H]	σ_p
NH ₂	0	-0,66
OCH ₃	0	-0,27
H	0	0
CN	0,24	0,66
CHO	0,57	0,22
N=N-C ₆ H ₅	1,37	0,64
NO ₂	2,19	1,27

Mecanismul transpoziției triple de hidrogen din ionul molecular al acestor compuși este redat în schema 12.



Schema 12: Mecanismul transpoziției triple de hidrogen din ionul molecular

Datorită interesului crescut asupra elucidării acestui fenomen, precum și a implicațiilor sale mecanistice semnificative se are în vedere continuarea investigațiilor asupra transpoziției triple de hidrogen rezultate sub impact electronic în analiza prin spectrometrie de masă a altor clase de compuși cu catenă hidrocarbonată lungă.

CONCLUZII

- Transpoziția unidirecțională triplă de hidrogen este foarte rar întâlnită în spectrometria de masă a compușilor organici. Fenomenul de transpoziție triplă a fost pus în evidență pentru prima dată în seriile de alchil-aril esterii cu catenă lungă sintetizate. A fost propus de asemenea și un mecanism care generalizează procesul de fragmentare cu transpoziție triplă de hidrogen.
- Pentru dovedirea acestui fenomen și pentru elucidarea mecanismului de transpoziție au fost sintetizată și caracterizată structural o serie omoloaga de **18** esteri saturați ai acidului *p*-(4'-clorofenilazo)benzoic, conținând resturi *n*-alchil de la C1-C18 dintre care **15** sunt compuși noi. În cazul benzoaților de *n*-alchil saturați ionul de transpoziție triplă apare doar în spectrele de masă ale compușilor cu catenă mai lungă de 4 atomi, intensitatea acestuia crescând odată cu creșterea numărului de atomi de carbon din moleculă.
- Transferul atomilor de hidrogen are loc dinspre catena alchilică înspre grupările azo și carbonil, fiind însă nevoie de o catenă suficient de lungă pentru ca cele două grupări să ajungă la distanța minimă necesară pentru a se realiza transferul.
- Studiul a fost extins și asupra esterilor superiori nesaturați în vederea investigării influenței dublei legături asupra acestui fenomen sau a unei fragmentări specifice în funcție de poziția nesaturării. În acest scop a fost sintetizată și caracterizată structural o serie de **23** de noi esteri nesaturați ai acidului *p*-(4'-clorofenilazo)benzoic, constatându-se că dacă nesaturarea se află mai aproape de 3 atomi de carbon față de gruparea esterică, ionul de transpoziție triplă nu apare datorită lipsei de flexibilitate a catenei impusă de rigiditatea dublei legături.
- S-a urmărit de asemenea și studiul influenței substituenților greșiți în pozițiile *meta* și *para* ale nucleului aromatic asupra apariției și intensității ionului de triplă transpoziție. În acest scop au fost sintetizați și caracterizați structural **5** noi esteri superiori, analogi celor sintetizați anterior, cu gruparea azo modificată, precum și **8** noi esteri benzoici superiori. Analizându-se spectrele de masă ale acestora, s-a constatat că substituenții respingători de electroni favorizează formarea ionului de

transpoziție *McLafferty*, în timp ce substituenții atrăgători de electroni favorizează formarea ionilor corespunzători transpoziției triple de hidrogen.

- S-a realizat corelația dintre raportul intensității ionilor de transpoziție unidirecțională triplă respectiv dublă de hidrogen observați în spectrele de masă ale unor esteri superiori ai acidului benzoic substituit cu valorile constantelor Hammet σ_p ale substituenților greșiți pe nucleul aromatic.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVA

- Biemann, K., "Mass Spectrometry", McGraw-Hill Book Co., New-York, **1962**, p.125
- Bowen, R. D., Williams, D. H., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1981**, 836
- Budzikiewicz, H., Djerassi, C., Williams, D. H., *Mass Spectrometry of Organic Compounds*, Holden-Day Inc., San-Francisco, **1967**, p.18, 155-162, 184-187.
- Cable, J., Djerassi, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 93, 3905
- Carpenter, W., Duffield, A. M., Djerassi, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 89, 6164
- Djerassi, C., Fenselau, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, 87, 5756
- Djerassi, C., von Mutzenbecher, G., Fajkos, J., Williams, H., Budzikiewicz, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, 87, 817
- Eadon, G., Djerassi, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, 91, 2724
- Halim, H., Schwarz, H., Terlouw, J. K., Levsen, K., *Org. Mass Spectrom.*, **1983**, 18, 147
- Hecker, E., *Chem.Ber.*, **1955**, 88, 1666
- Holmes, J. L., *Adv. Mass Spectrom.*, **1988**, 11, 53
- Johnston, D., Smart, V. W., Smith, D., *Org. Mass. Spectrom.*, **1984**, 11, 609
- Katoh, M., Jaeger, D. A., Djerassi, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, 94, 3107
- Kingston, D. G. I., Bursey, J. T., Bursey, M. M., *Chem. Rev.* **1974**, 74, 215
- Kuck, D., "The Encyclopedia of Mass Spectrometry", Vol. 4: "Fundamentals of and Applications to Organic Compounds", Ed. N.M.M. Nibbering, Elsevier, Oxford, **2005**, p.97
- Kuck, D., Filges, U., *Org. Mass Spectrom.*, **1988**, 23, 623
- Kuck, D., Fliges, U., *Org. Mass Spectrom.*, **1988**, 24, 643
- Kuck, D., Salameh, L., Onwuka, K., Letzel, M., 17th International Mass Spectrometry Conference, Prague, **2006**
- Lester, G. R., *Brit. J. Appl. Phys.*, **1963**, 14, 414–421
- MacLeod, J. K., Djerassi, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 89, 5182
- McLafferty, F. W., Hamming, M. C., *Chem. Ind.*, **1959**, 1366
- McLafferty, F. W., *Anal. Chem.*, **1957**, 29, 1782
- McLafferty, F. W., *Anal. Chem.*, **1959**, 31, 82

- Merweein, H., Büchner, E., vanEmster, K., *J. Prakt. Chem.*, **1939**, 152, 237
- Meyerson, S., Kuhn, E. S., Puskas, I., Fields, E. K., Leitch, L., Sullivan, T. A., *Org. Mass Spectrom.*, **1983**, 18, 110
- Meyerson, S., Puskas, I., Fields, E. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, 95, 6056
- Moldovan, B.**, Oprean, I., 5th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, September **2006**, Ohrid, Macedonia
- Moldovan, B.**, Oprean, I., Oprean, R., *Studia Univ. "Babeş-Bolyai", Chemia*, **2003**, 48, 145
- Oprean I., *Spectrometria de Masă a Compuşilor organici*, Ed. Dacia, Bucureşti, **1974**
- Oprean, I., **Moldovan, B.**, Oprean, R., *Plant's Health*, **2003a**, 61, 20
- Oprean, I., **Moldovan, B.**, Oprean, R., *Studia Univ. "Babeş-Bolyai", Chemia*, **2003b**, 48, 139
- Pakarinen, J. M. H., Vainiotalo, P., Pakkanen, T. A., Kenttamaa, H. I., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 12431
- Rosenstock, H. M., Wallenstein, M. B., Wahrhaftig, A. L., Henry Eyring, H., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **1952**, 38, 667–678
- Shirley, D. A., Smith, G. A., Brown, M., Reedy, W., *J. Org. Chem.*, **1952**, 17, 199-203
- Stevenson, D. P., *Discuss. Faraday Soc.*, **1951**, 10, 35–45.
- Stringer, M. B., Underwood, D. J., Bowie, J. H., Allison, C. E., Donchi, K. F., Derrick, P. J., *Org. Mass Spectrom.*, **1992**, 27, 270
- Tate, J. T., Lozier, W. W., *Phys. Rev.*, **1932**, 39, 254–269
- Tobita, S., Tajima, S., Ishihara, Y., Kojima, M., Shigihara, A., *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1994**, 132, 129
- Tobita, S., Tajima, S., Tsuchiya, T., *Org. Mass Spectrom.*, **1984**, 19, 326
- Tökes, L., Jones, G., Djerassi, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, 90, 5465
- Winnik, M., Kwong, P. T., *Org. Mass Spectrom.*, **1976**, 10, 346

PARTEA II

INVESTIGAREA PROPRIETATILOR UNOR COMPUSI NATURALI CU STRUCTURI POLIFENOLICE

CONSIDERATII TEORETICE

Antocianii sunt compuși polifenolici larg răspândiți în regnul vegetal, fiind pigmentii cei mai importanți identificați în plantele superioare, răspunzători de culoarea celor mai multe flori, fructe, frunze și tulpini. Culoarea acestora variază de la roz, trecând prin roșu, apoi violet, până la albastru închis. Reprezintă cea mai numeroasă clasă de pigmenți vegetali hidrosolubili.

Termenul “antocian” derivă din cuvintele grecești anthos = floare și cyanos = albastru, fiind utilizat pentru prima dată în anul 1835 de către Marquart pentru a denumi pigmentul din florile de albăstrele, *Centaurea cyanus* [Marquart, 1835]

La ora actuală, literatura de specialitate indică existența unui număr de aproximativ 600 de compuși antocianici, a căror structură a fost complet elucidată [Andersen & Jordheim, 2006], din care doar șase sunt întâlniți frecvenți în plantele superioare.

În ultimii ani, interesul științific pentru îmbunătățirea tehnicilor de separare și identificare a antocianilor din surse vegetale a crescut semnificativ, datorită potențialelor utilizări ca și coloranți naturali, în special în industria alimentară, unde reprezintă o alternativă netoxică a coloranților sintetici. Pe lângă proprietățile lor tinctoriale, antocianii prezintă o activitate biologică semnificativă, având, în special, remarcabile proprietăți antioxidante, ce joacă un rol vital în prevenirea bolilor neuronale, cardiovasculare, a unor anumite tipuri de cancer, a diabetului [Lule & Xia, 2005; Konczak & Zhang, 2004; Kong, Chia, Goh, Chia & Brouillard, 2003].

Din punct de vedere structural, antocianii reprezintă una dintre cele douăsprezece clase principale de flavonoide.

Antocianii sunt glicozide ale antocianidinelor, agliconi la baza cărora se află cationul flaviliu, format dintr-un nucleu benzopirilic și un inel fenolic [Konczak & Zhang, 2004]. Toate antocianidinele conțin grupări hidroxilice: de regulă în pozițiile 3, 5, 7 pe nucleul benzopirilic, respectiv în pozițiile 3', 4', 5' pe cel fenolic (fig. 1).

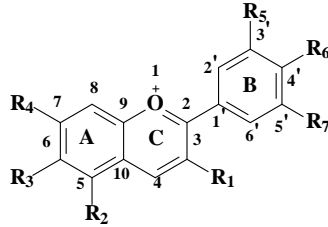


Figura 1: Structura generală a antocianilor

Până în prezent au fost identificate în jur de 30 de antocianidine diferite [Kong, Chia, Goh, Chia & Brouillard, 2003].

Aproximativ 90% din numărul total de antociani conțin ca și aglicon una dintre cele șase cele mai răspândite antocianidine, a căror denumiri provin de la speciile vegetale în care agliconii respectivi s-au izolat și identificat pentru prima dată: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina și malvidina, a căror structură diferă doar prin poziția grupărilor hidroxil și metoxi pe nucleul flavanic (fig. 1) [Clifford, 2000].

Dintre cele șase antocianidine majoritare în plantele superioare, cianidina este de departe cea mai răspândită, cele mai rar întâlnite fiind malvidina și petunidina [Kong, Chia, Goh, Chia & Brouillard, 2003].

Marea majoritate a antocianilor sunt mono-, di- sau triglicozide ale grupării hidroxil din poziția 3 a antocianidinelor.

Dintre fructele cultivate, cea mai importantă sursă de antociani o reprezintă strugurii, aparținând genului *Vitis*, speciei *Vitis vinifera*, din familia *Vitaceae*. Alte familii de plante a căror fructe sunt bogate în antociani aparțin genului *Fragaria* (căpșuni) și *Rubus* (zmeură), *Vaccinium* (afine, merișoare) și *Ribes* (coacăze negre).

Antocianii izolați prezintă o instabilitate ridicată, fiind foarte susceptibili la procese de degradare. Literatura de specialitate din ultimii ani prezintă numeroase studii dedicate influențelor diversilor factori asupra degradării antocianilor, atât în extracte naturale cât și în sisteme model [Hernandez-Herrero & Frutos, 2011; Kirka, Özkan & Cemeroglu, 2007; Pliszka, Huszcza-Ciołkowska, Mielezsko & Czaplicki, 2009]. Principalii factori care afectează stabilitatea antocianilor sunt: structura chimică, concentrația, temperatura, pH-ul, lumina, prezența oxigenului, natura solventului, prezența unor enzime, flavonoide, proteine sau ioni metalici [Iacobucci & Sweeny, 1983; Francis, 1989; Cabrita, 1999].

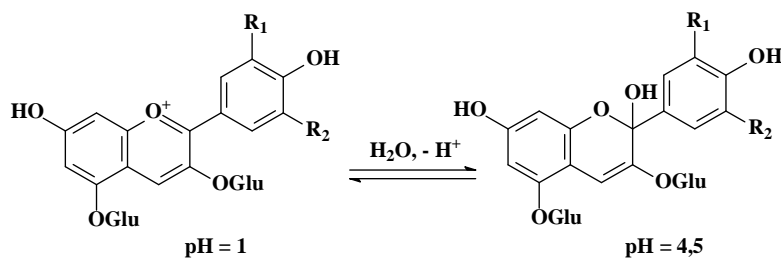
CONTRIBUTII ORIGINALE

Obiectivul prezentului studiu a fost investigarea stabilității antocianilor izolați din diverse fructe indigene, în diferite condiții de pH și temperatură, în timpul procesării și stocării, în scopul determinării condițiilor de utilizare a acestora ca și coloranți alimentari.

Investigarea stabilității antocianilor din diverse fructe indigene

Prezentul studiu se bazează pe investigarea extractelor naturale din fructe proaspete sau congelate bogate în antociani și anume: vișine, coarne, călin, precum și a extractelor obținute din amestecuri de fructe uscate, aflate în proporții variabile (ceaiuri de fructe).

Metodele de evaluare cantitativă a antocianilor pot aborda trei căi majore, în funcție de complexitatea matricei în care se găsesc aceștia. Au fost dezvoltate în acest scop metode spectrale specifice pentru probe ce conțin în cantitate mică sau nu conțin deloc compuși de interferență, metode pentru probe cu compuși de interferență aflați în cantități semnificative, respectiv metode de cuantificare individuală a compușilor antocianici din probă. Având în vedere faptul că extractele naturale sunt probe complexe, ce conțin numeroși compuși cu structură asemănătoare, care pot absorbi în același interval de lungimi de undă (480-550 nm), metoda cea mai adecvată pentru determinarea cantitativă a antocianilor din aceste extracte este metoda pH-ului diferențial [Giusti & Wrolstad, 2001]. Această metodă implică măsurarea absorbției la două valori diferite ale pH-ului și se bazează pe transformările structurale ale cromoforului antocianic în funcție de acesta (schema 1).



Schema 1: Forme structurale ale antocianilor la pH = 1, respectiv pH = 4.5

Culoarea antocianilor monomerici se modifică reversibil de la roșu intens (la pH = 1) la incolor (la pH = 4.5). Măsurarea absorbantei la λ_{max} a extractelor la cele două valori de pH menționate, permite anularea interferențelor altor compuși care pot absorbi la aceeași lungime de undă. Antocianinele cu structură polimerică nu prezintă transformări reversibile la variații ale pH-ului, astfel încât nu vor influența valorile absorbanțelor obținute. Metoda implică de asemenea determinarea valorii absorbanțelor la 700 nm, pentru a anula efectul turbidității asupra măsurătorilor. Diferența dintre valorile absorbanțelor înregistrate la $\lambda_{\text{vis-max}}$ pentru cele două valori ale pH-ului se datorează exclusiv pigmenților antocianici monomerici prezenți în proba analizată.

Antocianii prezintă două benzi distincte în spectrul UV-VIS: una în regiunea UV, la lungimi de undă între 260 și 280 nm iar cealaltă în regiunea vizibilă, la valori cuprinse între 490 – 550 nm (figura 2). Alura spectrului furnizează de asemenea informații în ceea ce privește numărul și poziția substituenților glicozidici.

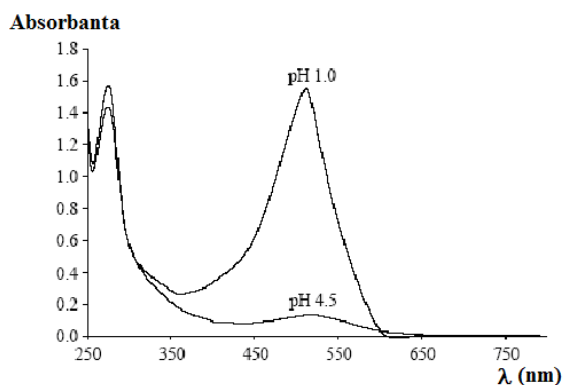


Figura 2. Spectrul UV-VIS al antocianilor în soluții tampon la pH = 1 și pH = 4,5

Conținutul total de pigmenți antocianici monomerici din probă se calculează utilizând formula:

$$TA = \frac{A \cdot M \cdot F \cdot 1000}{\epsilon \cdot l} \quad (1)$$

unde: TA = conținut total de antociani în probă (mg/L)

A = absorbanta calculată conform relației :

$$A = (A_{\lambda_{\text{vis-max}} - A_{700}})_{\text{pH}=1} - (A_{\lambda_{\text{vis-max}} - A_{700}})_{\text{pH}=4,5} \quad (2)$$

M = masa moleculară a compusului antocianic majoritar din probă

F = factorul de diluție

ϵ = coeficientul molar de extincție ($\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

l = lungimea cuvei (= 1 cm)

Stabilitatea antocianilor extrași din fructe de vișin

Vișinele, fructe globuloase, de culoare roșie-purpurie, cu nuanțe spre negru, cu gust acru-dulce, sunt fructele vișinului (*Prunus cerasus L.*), arbore fructifer din familia *Rosaceae*, originar din Europa și Asia de sud-vest. Vișinele conțin zaharuri, taninuri, proteine, pectine, acizi organici, săruri minerale, flavonoizi și vitamine. Prezintă efecte terapeutice diverse, contribuind la întârzierea procesului de îmbtrânire, în special datorită conținutului ridicat de substanțe cu proprietăți antioxidante. De asemenea, joacă un rol important în ameliorarea sau chiar vindecarea bolilor renale, hepatice, cardiovasculare, a diabetului, precum și în atenuarea stresului psihic și anemiei.



Figura 3: Flori și fructe de vișin (Prunus cerasus L.)

Stabilitatea la stocare a antocianilor monomerici din vișine a fost investigată în extract apos, respectiv alcoolic, la temperatura camerei (25°C), la o valoare a pH-ului de 1.9 [Moldovan, David, Donca & Chișbora, 2011]. Reprezentarea grafică a conținutului total de antociani extrași din vișine în funcție de timp ilustrează o dependență liniară, fapt ce demonstrează că degradarea antocianilor decurge după o cinetică de ordinul 1. Rezultatele obținute sunt în concordanță cu datele din literatură, care indică faptul că degradarea antocianilor obținuți din diverse surse urmează acest tip de cinetică [Kirka, Özkan & Cemeroğlu, 2007; Wang & Xu, 2007]. Cu toate că stabilirea tipului de cinetică al procesului de degradare al pigmentilor antocianici este relativ puțin importantă din punct de vedere practic, determinarea parametrilor cinetici corespunzători acestei reacții este definitorie pentru utilizările acestor compuși în industria alimentară. Valorile acestor parametri cinetici (constanta de viteză și timpul de înjumătățire) s-au determinat conform următoarelor ecuații:

$$\ln[\text{TA}] = \ln[\text{TA}_0] - kt \quad (3)$$

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k} \quad (4)$$

în care: [TA] = conținut total de antociani (mg/l) la timpul t

[TA₀] = conținut total de antociani (mg/l) la momentul inițial

k = constanta de viteză(h⁻¹)

t = timp de reacție(h)

t_{1/2} = timp de înjumătățire(h)

Variația concentrației de antociani în funcție de timp, pentru extractul apos, respectiv alcoolic, este reprezentată grafic în figura 4. Din panta dreptei obținute s-a determinat valoarea constantei de viteză, respectiv a timpului de înjumătățire în cazul ambelor extracte investigate, valorile obținute fiind sumarizate în tabelul 2.

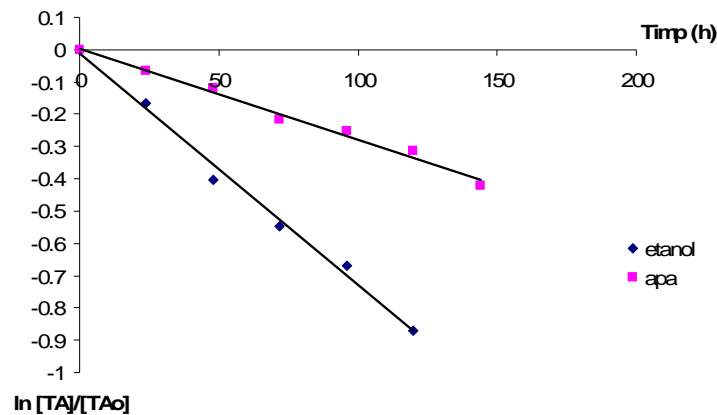


Figura 4: Degradarea antocianilor din vișine în extract apos, respectiv alcoolic, la stocare la 25°C

Tabelul 2: Parametri cinetici ai degradării antocianilor din vișine

Solvent	k (h ⁻¹)	t _{1/2} (h)	Coefficient de corelare (R ²)
Apă	2.8x10 ⁻³	247.5	0.9879
Etanol	7.2x10 ⁻³	96.25	0.9927

Compararea valorilor obținute indică o influență semnificativă a solventului de stocare asupra stabilității antocianilor investigați. În cazul utilizării etanolului ca și solvent, procesul de degradare este considerabil accelerat comparativ cu cazul utilizării apei ca solvent de extracție și stocare, având loc cu o viteză de 2.6 ori mai mare. Datele de literatură indică o valoare de 38 de zile a timpului de înjumătățire pentru degradarea antocianilor din suc concentrat de vișine păstrat la 20°C [Cemeroğlu, Velioglu & Işik,

1994]. În comparație cu acesta, extractele antocianice, atât în mediu apos cât și alcoolic, prezintă o stabilitate sensibil mai redusă ($t_{1/2}$ apă = ~ 10 zile; $t_{1/2}$ alcool = ~ 4 zile), fapt ce sugerează că stocarea antocianilor din vișine este recomandabil a se realiza sub formă de suc concentrat de fructe.

Cu toate că vișinele reprezintă o sursă considerabilă de antociani, aceste fructe, consumate în stare proaspătă, prezintă o valoare nutrițională și economică ridicată, fapt ce nu le recomandă pentru utilizarea ca materie primă în vederea extragerii antocianilor. Din acest motiv, am considerat indicată investigarea unor alte fructe, mai puțin consumate ca atare, ca potențiale surse de compuși antocianici utilizabili în industria alimentară.

Polifenoli extrași din fructe de călin

Călinul (*Viburnum opulus L.*), cunoscut și sub numele de *Bulgăre de zăpadă*, este un arbust din familia *Adoxaceae*, cultivat în special ca și plantă ornamentală, larg răspândit în estul Europei, Turcia, Asia de Nord și Africa de Nord. Este unul dintre simbolurile naționale ale Ucrainei. Arbustul de călin are fructe sub formă de drupe globuloase de culoare roșu-aprins, care se coc în lunile august-septembrie. Important din punct de vedere practic este faptul că fructele pot fi culese și în timpul iernii, datorită rezistenței lor ridicate la temperaturi scăzute.



Figura 5: Flori și fructe de călin (Viburnum opulus L.)

Fructele sunt comestibile, dar, datorită faptului că sunt amare și puternic astringente, sunt puțin consumate ca atare [Jordheim, Giske & Andersen, 2007]. Cel mai cunoscut produs alimentar obținut din fructe de călin este sucul; fructele se pot utiliza și sub formă de gem, marmeladă, jeleu sau pentru obținerea unei băuturi alcoolice. Fructele sunt de asemenea bine cunoscute pentru proprietățile lor biologice, fiind utilizate în medicina populară pentru tratarea crampelor stomacale, durerilor menstruale și renale, a

hipertensiunii arteriale, bolilor cardiace, răcelii și tusei [Altun, Citoğlu, Yilmaz & Özbek, 2009; Dennehy, 2006; Velioglu, Ekici & Poyrazoglu, 2006].

Extractul de antociani obținut din fructe de călin a fost utilizat cu succes pentru sinteza unor noi biomateriale hibride bazate pe nanoparticule metalice (Au și Ag) cu aplicații remarcabile în terapia proceselor inflamatorii cutanate [Crisan, David, **Moldovan**, et al., 2013].

În vederea utilizării antocianilor extrași din fructele de călin ca și coloranți alimentari, s-au investigat modificările calitative intervenite pe parcursul procesării și stocării extractelor obținute din aceste fructe. Acest demers este motivat și de faptul că literatura de specialitate nu prezintă date referitoare la cinetica procesului de degradare a antocianilor izolați din fructe de călin. Scopul acestui studiu a fost determinarea stabilității termice, respectiv a stabilității la stocare a acestor compuși, în diferite condiții. Astfel, a fost investigată influența solventului de stocare, a pH-ului și temperaturii asupra degradării antocianilor. Cunoașterea aprofundată a cineticii acestui proces este esențială pentru prezicerea modificărilor ce pot apare atât în timpul depozitării în diferite condiții cât și în timpul procesării termice a produselor alimentare ce conțin acești pigmenți naturali. Condițiile investigate au fost alese astfel încât să asigure o compatibilitate ridicată cu stocarea, respectiv metodele de procesare aplicate în industria alimentară.

Izolarea antocianilor din fructe s-a realizat prin extracția acestora în solvent (apă sau etanol 96%) acidulat cu 0.1% acid clorhidric.

Conținutul total de antociani monomerici din fructele de *Viburnum opulus L.* a fost determinat cu ajutorul metodei pH-ului diferențial, valoarea obținută fiind de 0.356 ± 0.014 g/kg fruct congelat, exprimat în echivalenți de cianidin-3-glucozidă.

Degradarea termică a extractelor apoase și alcoolice, a fost investigată în diferite condiții de temperatură (2°C , 37°C respectiv 75°C) și pH (pH = 3 și pH = 7). Tabelul 3 prezintă variația concentrației de antociani, în funcție de timp, în condițiile termice și de pH investigate, în cazul stocării antocianilor extrași în apă.

Tabelul 3 : Conținut total de antociani monomerici în extract apos

Timp (ore)	Conținut total de antociani monomerici (mg/l)					
	pH = 7 t = 37°C	pH = 3 t = 37°C	pH = 7 t = 2°C	pH = 3 t = 2°C	pH = 7 t = 75°C	pH = 3 t = 75°C
0	42.72	42.72	42.72	42.72	42.72	42.72
2	nd	nd	nd	nd	29.74	42.18

4	nd	nd	nd	nd	12.62	38.16
6	nd	nd	nd	nd	3.81	34.51
12	nd	nd	nd	nd	1.21	25.23
24	19.39	30.05	38.39	41.53	nd	12.96
36	nd	nd	nd	nd	nd	nd
48	11.45	27.53	34.52	40.95	nd	5.59
72	5.36	25.21	33.02	40.66	nd	1.49
97	2.08	20.20	29.60	40.30	nd	nd
122	1.20	19.44	29.21	40.13	nd	nd
145	nd	16.05	28.45	38.78	nd	nd
167	nd	12.75	25.33	38.23	nd	nd

Conținutul total de antociani din extractul apos obținut din fructe de *Viburnum opulus L.*, a fost reprezentat grafic în funcție de timp. Regresia liniară a concentrației de pigmenți antocianici în timpul stocării confirmă faptul că degradarea acestora decurge după o cinetică de ordinul întâi (vezi figura 6). Rezultatele obținute sunt în concordanță cu datele de literatură [Kirka, Özkan & Cemeroglu, 2007; Wang & Xu, 2007; **Moldovan**, David, Donca, Chișbora, 2011] care indică faptul că degradarea antocianilor din diferite surse este descrisă de acest tip de cinetică.

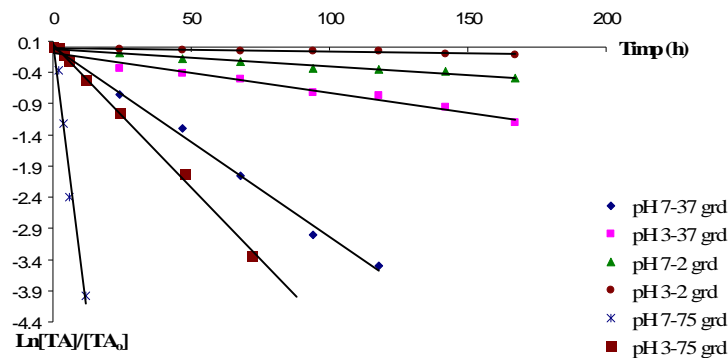


Figura 6: Degradarea antocianilor din extract apos de călin, în timpul stocării în condiții diferite de temperatură și pH

Pentru reacțiile de ordinul întâi, legea de viteză poate fi exprimată cu ajutorul relațiilor (3) și (4) (pag. 25). Valorile parametrilor cinetici ai reacției de degradare a antocianilor din extractul apos de fructe de călin, au fost calculați prin aplicarea acestor relații și sunt prezentați în tabelul 6.

Tabelul 4: Parametri cinetici ai degradării antocianilor din fructe de călin în extract apos

pH	Temp. (°C)	k x10 ³ (h ⁻¹)	t _{1/2} (h)	Coefficient de corelare R ²
3	2	0.6	1155	0.9503
3	37	6.4	108.28	0.9740
3	75	46.1	15.03	0.9971
7	2	2.8	247.5	0.9680
7	37	30.5	22.72	0.9944
7	75	348.8	1.98	0.9762

Valorile constantelor de viteză și a timpilor de înjumătățire prezentate în tabelul 4 indică o influență semnificativă a pH-ului soluției de stocare asupra stabilității antocianilor, fapt corelat cu dependența structurii acestor compuși de valoarea pH-ului. În concordanță cu datele altor studii de literatură ce investighează influența pH-ului asupra stabilității antocianilor [Kirka, Özkan & Cemeroglu, 2007], s-a observat că mediul acid determină creșterea stabilității acestor compuși în extractul apos obținut din fructe de *Viburnum opulus L.*, fapt indicat de valori mai ridicate ale timpilor de înjumătățire (de exemplu, la $t = 2^{\circ}\text{C}$, valorile timpilor de înjumătățire la pH = 3 și pH = 7 sunt de $t_{1/2} = 1155$ h și respectiv $t_{1/2} = 247.5$ h). Comparând valorile acestor parametri, se poate concluziona că, la temperaturi scăzute, antocianii din călin, stocați în extract apos, sunt de 4.7 ori mai stabili la valori scăzute ale pH-ului decât în mediu neutru. Cea mai mare stabilitate a fost observată la pH = 3, indiferent de temperatura de păstrare a extractului. La temperaturi ridicate (75°C), influența pH-ului asupra procesului de degradare al antocianilor devine și mai importantă, stabilitatea acestor pigmenți la pH = 3 fiind de 7.6 ori mai mare decât la pH = 7.

Pe lângă investigarea efectului pH-ului, a fost de asemenea evaluată și stabilitatea termică a extractelor. După cum era de așteptat, procesul degradativ se intensifică odată cu creșterea temperaturii. Indiferent de valoarea pH-ului soluției, stocarea la temperaturi relativ scăzute (2°C și 37°C) a condus la o degradare a antocianilor din extractul apos de aproximativ 10.8 ori mai rapidă la 37°C comparativ cu viteza aceluiași proces la temperatura de 2°C . Efectul temperaturii asupra stabilității pigmentilor a fost mai accentuat la stocarea acestora în soluție apoasă de pH = 7, procesul de degradare decurgând de 125 de ori mai rapid la 75°C decât la 2°C (raportul vitezelor aceluiași proces la valori scăzute de pH fiind 76.8).

Degradarea antocianilor monomerici din fructele de călin în extract etanolic a fost investigată în aceleași condiții de pH și temperatură. Scăderea conținutului total de antociani în timp este redată în tabelul 5.

Tabelul 5 : Conținut total de antociani monomerici în extract etanolic

Timp (ore)	Conținut total de antociani monomerici (mg/l)					
	pH = 7 t = 37°C	pH = 3 t = 37°C	pH = 7 t = 2°C	pH = 3 t = 2°C	pH = 7 t = 75°C	pH = 3 t = 75°C
0	58.14	58.14	58.14	58.14	58.14	58.14
2	nd	nd	nd	nd	43.60	57.40
4	nd	nd	nd	nd	27.23	54.40
6	nd	nd	nd	nd	16.56	45.72
12	39.54	nd	nd	nd	7.62	32.47
14	nd	nd	nd	nd	3.54	nd
24	24.62	37.79	54.07	54.12	nd	17.13
36	13.36	nd	nd	nd	nd	nd
48	10.46	29.07	46.55	55	nd	6.31
72	3.48	25.58	45.02	53.48	nd	nd
97	1.1	20.19	42.99	50.87	nd	nd
122	nd	11.04	41.49	50.11	nd	nd
145	nd	6.97	39.98	47.65	nd	nd
167	nd	nd	nd	45.68	nd	nd

Reprezentarea grafică a $\ln [TA]/[TA_0]$ în funcție de timpul de stocare a extractului etanolic a condus la concluzia că și în acest caz procesul de degradare a antocianilor decurge după o cinetică de ordinul întâi (vezi figura 7).

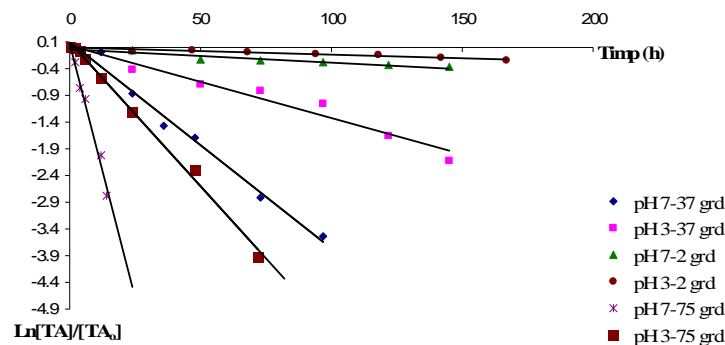


Figura 7: Degradarea antocianilor din extract alcoolic de călin, în timpul stocării în condiții diferite de temperatură și pH

Calculul parametrilor cinetici ai procesului de degradare a pigmentilor obținuți din fructe de călin, la stocarea în etanol, a condus la valorile prezentate în tabelul 6.

Tabelul 6: Parametri cinetici ai degradării antocianilor din fructe de călin
în extract etanolic

pH	Temp. (°C)	k x10 ³ (h ⁻¹)	t _{1/2} (h)	Coefficient de corelare R ²
3	2	1.3	533.07	0.9575
3	37	13.6	50.95	0.9602
3	75	53.9	12.86	0.9948
7	2	2.5	277.2	0.9298
7	37	38.5	18.0	0.9867
7	75	189.3	3.66	0.9824

După cum s-a observat și în cazul extractului apos, antocianii din fructele de călin prezintă două profile distincte de stabilitate: la valori ridicate ale pH-ului, respectiv la valori scăzute ale acestuia. Valorile ridicate ale pH-ului au ca rezultat scăderea stabilității antocianilor în extract etanolic, valoarea timpului de înjumătățire fiind influențată de temperatură. La 2°C $t_{1/2 \text{ pH}=3} / t_{1/2 \text{ pH}=7} = 1.9$, în timp ce același raport, la 37°C, are valoarea de 2.8 iar la 75°C de 3.5, fapt ce indică o influență mai mare a pH-ului asupra stabilității antocianilor din călin, la temperaturi ridicate.

Temperatura de stocare prezintă o influență semnificativă asupra vitezei de degradare a antocianilor în extract alcoolic. Păstrarea acestor extracte la 37°C a condus la o degradare mai rapidă decât în cazul stocării lor la 2°C, raportul valorilor timpilor de înjumătățire depinzând de valoarea pH-ului soluției. La pH = 3, $t_{1/2 \text{ 2°C}} / t_{1/2 \text{ 37°C}} = 10.5$ în timp ce la pH = 7, valoarea acestui raport este egală cu 15.4. Creșterea temperaturii de stocare la 75°C, a condus la o degradare accelerată a antocianilor (la pH = 3, $t_{1/2 \text{ 2°C}} / t_{1/2 \text{ 75°C}} = 41.4$, în timp ce la pH=7 valoarea acestui raport este 75.7).

Conform datelor sumarizate în tabelul 5 și tabelul 6, la pH = 7, valorile determinate pentru constantele de viteză și timpii de înjumătățire corespunzătoare procesului de degradare în etanol la 2°C și 37°C sunt similare cu cele obținute în aceleași condiții pentru degradarea în extractele apoase, astfel că influența solventului de stocare în aceste condiții este mai puțin semnificativă. Spre deosebire de această situație, la temperaturi ridicate (75°C) solventul manifestă o importanță crescută asupra stabilității extractelor de antociani din călin, viteza de degradare fiind de 1.8 ori mai mare în apă decât în etanol. La valori scăzute ale pH-ului și temperaturii, degradarea antocianilor prezenți în extractul alcoolic decurge cu o viteză de 2 ori mai mare decât cea determinată

în cazul extractelor apoase. La 75°C și pH = 3, s-a observat o degradare puțin mai accentuată în extract etanolic comparativ cu cel apos, astfel că putem concluziona că, în medii acide și la temperaturi ridicate, influența solventului de stocare asupra stabilității antocianilor monomerici din *Viburnum opulus L.*, este mai puțin importantă.

Pentru a determina efectul temperaturii asupra cineticii procesului de degradare, valorile constantelor de viteză obținute din ecuația (3) au fost introduse într-o ecuație de tip Arrhenius:

$$k = K_0 e^{-E_a/RT} \quad (5)$$

în care:

E_a = energia de activare (kJ/mol)

K_0 = factor de frecvență (h^{-1})

R = constanta universală a gazelor (8.314 J/mol.K)

T = temperatura (K)

Reprezentarea grafică a valorilor constantelor de viteză corespunzătoare degradării antocianilor în cazul fiecărui extract sunt redată în figura 8.

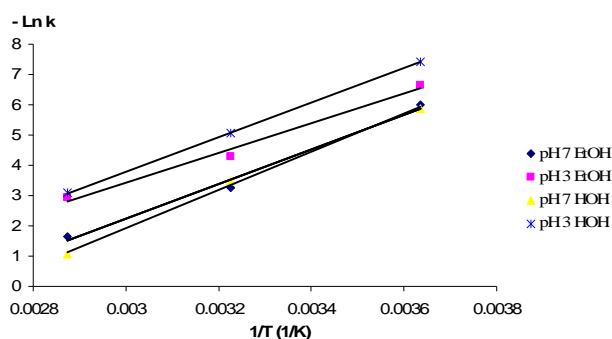


Figura 8: Reprezentarea grafică a constantelor de viteză ale reacției de degradare ale antocianilor din călin în funcție de temperatură

Valorile energiilor de activare obținute sunt prezentate în tabelul 7. Energii de activare ridicate se traduc printr-o susceptibilitate mărită la degradare a antocianilor din extractele investigate la expunere la temperaturi ridicate. Influența cea mai puternică a temperaturii asupra acestui proces degradativ (cea mai ridicată valoarea a energiei de activare) a fost observată pentru antocianii păstrați în apă la pH = 7, în timp ce valoarea cea mai mică a E_a (corespunzătoare unei susceptibilități mai reduse la degradarea termică) s-a determinat în cazul antocianilor stocați în soluție etanolică, la pH = 3. Influența combinată a pH-ului și a naturii solventului asupra stabilității antocianilor extrași din fructe de *Viburnum opulus L.* pare a fi mai importantă în cazul stocării

acestora în apă la pH = 3, respectiv în etanol/apă la pH = 7 (caz în care energiile de activare au valori practic identice).

Tabelul 7: Efectul temperaturii asupra degradării antocianilor din fructele de călin

pH	Solvent	E _a (kJ/mol)	R ²	K _o (h ⁻¹)	Q ₁₀	
					2-37°C	37-75°C
3	Apă	47.39	0.9886	5.94x10 ⁵	1.018	1.681
7		52.47	0.9975	2.43x10 ⁷	1.978	1.898
3	Etanol/Apă	40.79	0.9890	8.08x10 ⁴	1.956	1.436
7		47.34	0.9999	2.84x10 ⁶	2.184	1.52

Dependența de temperatură a constantelor de viteză ale reacției de degradare a fost de asemenea evaluată prin calcularea coeficientului de temperatură Q₁₀, conform ecuației:

$$Q_{10} = \left(\frac{k_2}{k_1} \right)^{10/(T_2 - T_1)} \quad (6)$$

în care:

Q₁₀ = coeficient de temperatură (K⁻¹)

k₁, k₂ = constante de viteză (h⁻¹) la temperatura T₁, respectiv T₂ (K)

Valori aproximativ egale ale coeficientului de temperatură Q₁₀ au fost obținute pentru procesul de degradare a antocianilor în apă la pH = 7, demonstrând faptul că influența creșterii temperaturii asupra stabilității antocianilor este aceeași în cazul ambelor intervale de temperatură studiate (2-37°C respectiv 37-75°C). Cel mai scăzut coeficient de temperatură (1.018 K⁻¹ pe intervalul 2-37°C) a fost obținut în cazul pigmentilor din extract apos la pH = 3, indicând faptul că temperaturi de păstrare scăzute și mediu acid sunt necesare pentru a inhiba procesele de degradare ale antocianilor din extractele de fructe de călin.

Pe lângă posibila utilizare a fructelor de călin ca și sursă alternativă de pigmenți naturali, acestea sunt cunoscute și ca o sursă remarcabilă de compuși cu activitate antioxidantă [Rop et al., 2010].

În vederea determinării conținutului total de polifenoli din extractul etanolic obținut din fructe de călin, s-a folosit metoda Folin-Ciocalteu [Singleton, Orthifer &

Lamuela-Raventos, 1999], cea mai populară dintre metodele bazate pe reacții cu transfer de electron.

Determinarea conținutului total de polifenoli se realizează spectrofotometric, prin măsurarea absorbanței la lungimea de undă de 765 nm. Rezultatele sunt exprimate în echivalenți grame de acid galic (GAE)/l extract, cu ajutorul unei curbe de etalonare.

Măsurătorile relevă un conținut ridicat de polifenoli în fructele de călin, cantitatea determinată fiind de 4.22 g echivalenți acid galic / kg fruct. Această valoare a fost mai mare decât cea determinată de Akbulut și colaboratorii care au obținut 3.25 g echivalenți acid galic/kg [Akbulut, Causir, Marakoglu & Coklar, 2008].

Variația nivelului de compuși fenolici din extractul etanolic obținut din fructe de călin a fost urmărită în timpul stocării acestuia la 4°C, timp de opt zile; rezultatele obținute sunt redată în figura 9.

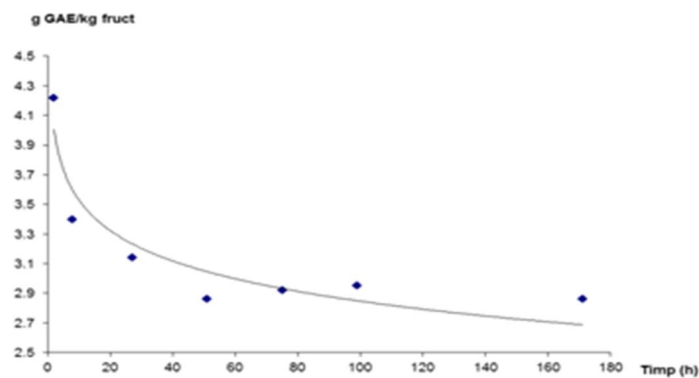


Figura 9: Variația conținutului total de fenoli din extractul etanolic de fructe de călin

Scăderea bruscă a conținutului de fenoli din extract în primele 51 de ore de stocare (cu 32.2%) este urmată de o ușoară creștere a cantității acestora în următoarele 48 de ore, după acest interval înregistrându-se o stabilizare a valorii până la finele perioadei investigate.

În paralel cu investigarea variației conținutului total de fenoli în timpul stocării, la temperatură scăzută, a extractului etanolic obținut din fructe de călin, s-a studiat și variația activității antioxidante a acestui extract în aceleași condiții.

Conținutul ridicat de polifenoli din fructele de călin a fost factorul determinant pentru investigarea activității antioxidante a extractului obținut din acestea. Metoda utilizată pentru măsurarea capacității antioxidante a fost testul ABTS, metodă bazată pe

reacții cu transfer de electron și frecvent utilizată în cercetările din domeniul industriei alimentare.

Capacitatea de captare a radicalilor liberi a extractului etanolic obținut din fructe de călin a fost evaluată prin măsurarea absorbției probei tratate cu $ABTS^{+}$ la 734 nm. Capacitatea antioxidantă a fost determinată utilizând formula (7):

$$A = A_0 - A_1 \quad (7)$$

unde: A = absorbanța rezultată

A_0 = absorbanța soluției de $ABTS^{+}$

A_1 = absorbanța amestecului conținând probă și $ABTS^{+}$

Valorile de absorbanță obținute au fost convertite în echivalenți de acid ascorbic (AAE) cu ajutorul unei curbe de calibrare.

Valoarea capacității antioxidante a fructelor de călin a fost determinată ca fiind 7.05 g AAE/kg fruct congelat. Datele obținute sunt în concordanță cu cele raportate în literatura de specialitate [Rop & al., 2010], care menționează valori cuprinse între 9.1 și 11.0 g AAE/kg fruct de călin, în funcție de varietatea investigată. Un interes deosebit a fost acordat determinării variației activității antioxidante în extractul etanolic obținut din fructele de călin în timpul stocării la 4°C (figura 10).

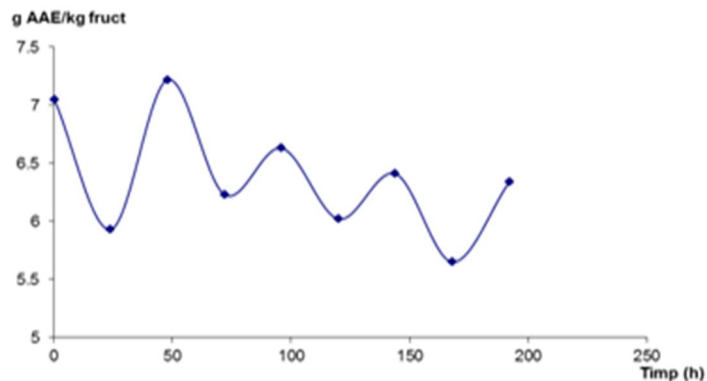


Figura 10: Variația în timp a activității antioxidante a extractului alcoolic obținut din fructe de călin

După primele 24 de ore de stocare, s-a observat o scădere cu 16% a activității antioxidante, tendință care nu s-a menținut pe parcursul următoarelor 24 de ore, interval în care s-a înregistrat o creștere de 22% a capacității de reținere a radicalilor liberi. Acest model al variației activității antioxidante (descreștere-creștere) a fost înregistrat în timpul întregii perioade de stocare. Creșterea activității antioxidante în timpul stocării a

fost observată și pentru extracte obținute din alte fructe (cum ar fi strugurii [Pinelo, Manzocco, Nunez & Nicoli, 2004]).

Privită pe ansamblu, pe toată perioada de stocare investigată, capacitatea antioxidantă a polifenolilor din fructele de călin prezintă o ușoară tendință descrescătoare în primele trei zile, valoarea acesteia putând fi considerată mai degrabă constantă la stocarea la 4°C după un interval de timp egal cu 72 de ore.

Antociani extrași din fructe de corn

Cornul este un arbust din familia *Cornaceae* (*Cornus mas L.*), specific climei temperate din Europa și unele zone ale Asiei. La noi în țară este frecvent în toate regiunile din zona pădurilor de stejar până în etajul fagului. Fructul este cornos, drupă elipsoidală, lucios, de culoare roșie ce prezintă un gust acrișor și astringent, bogat în vitamina C [Tural & Koca, 2008].



Figura 11: Flori și fructe de corn (*Cornus mas L.*)

Extractul bogat în antociani obținut din fructe de corn poate fi folosit ca și colorant alimentar natural. Literatura de specialitate nu prezintă nici un studiu referitor la susceptibilitatea la degradare a antocianilor extrași din fructele de corn, determinarea parametrilor cinetici ai reacțiilor de degradare a acestor compuși prezentând un interes deosebit în vederea utilizării lor în industria alimentară.

Variația concentrației antocianilor în funcție de timp, la stocarea extractelor apoase la temperatură scăzută (frigider, 2°C), este reprezentată grafic în figura 12.

Valorile parametrilor cinetici ai procesului de degradare a antocianilor din extractul apos de fructe de corn, stocat la 2°C (tabelul 8), ilustrează stabilitatea ridicată a acestor compuși, prezentând un timp de înjumătățire de ~ 58 zile, superior celui

determinat pentru procesul de degradare al antocianilor din extractul apos obținut din fructe de călin (~ 48 zile) [Moldovan, David, Chișbora & Cimpoiu, 2012].

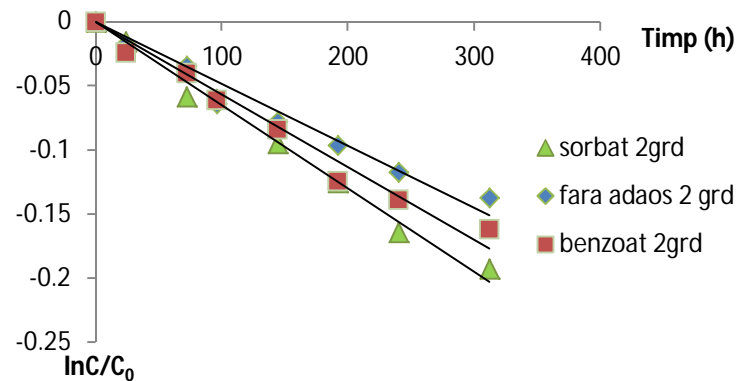


Figura 12: Variația concentrației antocianilor din extract apos de fructe de corn la stocarea la 2°C

Adăugarea conservanților alimentari are ca efect scăderea stabilității coloranților antocianici, efect mai pronunțat în cazul utilizării sorbatului de sodiu, caz în care timpul de înjumătățire determinat a fost de 1.4 ori mai mic decât la stocarea extractului fără adaos ($t_{1/2} = 41$ zile). Benzoatul de sodiu prezintă un efect destabilizator mai puțin pronunțat, timpul de înjumătățire calculat în acest caz fiind de doar 1.2 ori mai mic decât în cazul extractului care nu conține aditivi ($t_{1/2} = 48$ zile).

Tabelul 8: Parametri cinetici ai degradării antocianilor din fructele de corn în diferite condiții

Probă	Temp. (°C)	$k \cdot 10^{-3} (h^{-1})$	$t_{1/2} (h)$	R^2
Fără adaos	2	0.5	1386	0.9568
Cu adaos de benzoat (0.1%)	2	0.6	1155	0.969
Cu adaos de sorbat (0.1%)	2	0.7	990	0.9893
Fără adaos	25	0.9	770	0.9474
Cu adaos de benzoat (0.1%)	25	0.9	770	0.9684
Cu adaos de sorbat (0.1%)	25	1.1	630	0.9629
Cu adaos de vitamina C (0.1%)	25	7.7	90	0.9039
Fără adaos	75	82.8	8.3	0.9923
Cu adaos de benzoat (0.1%)	75	79.1	8.7	0.9911
Cu adaos de sorbat (0.1%)	75	77.6	8.9	0.9917
Cu adaos de vitamina C (0.1%)	75	125.3	5.5	0.9982

Compararea valorii concentrațiilor antocianilor din extractele apoase păstrate la 25°C a arătat că stabilitatea acestor pigmenți a fost puternic influențată de tipul aditivului utilizat (figura 13).

Astfel, spre deosebire de stocarea la frigider, unde conservanții utilizați (atât benzoatul, cât și sorbatul de sodiu) au accelerat procesul de degradare al antocianilor, la stocarea la temperatura camerei, benzoatul de sodiu nu influențează acest proces, parametri cinetici determinați pentru reacțiile de degradare ce au loc în prezența acestui compus fiind egali cu cea obținuți pentru degradarea în lipsa oricărui adaos. Influența sorbatului de sodiu a fost mai scăzută decât în cazul stocării la temperatură joasă, constanta de viteză în acest caz fiind de doar 1.2 ori mai mare decât în cazul extractului în care nu s-au adăugat aditivi.

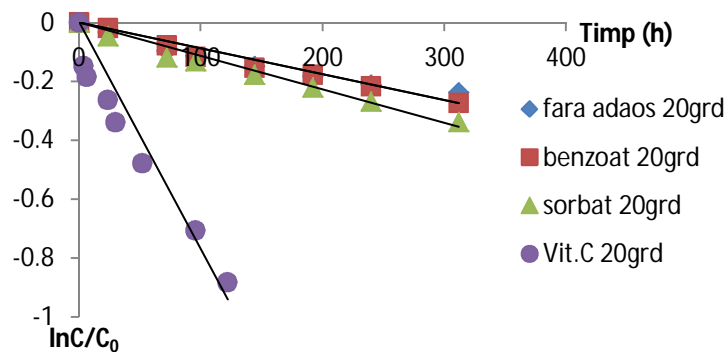


Figura 13. Degradarea antocianilor în extract apos din fructe de corn, în timpul stocării la 25°C

Stabilitatea termică a extractelor a fost evaluată și la temperatură ridicată (75°C). După cum era de așteptat, procesul degradativ se intensifică odată cu creșterea temperaturii (figura 14). Indiferent de conservantul utilizat, stocarea la temperaturi relativ scăzute (2°C și 25°C) a condus la o degradare a antocianilor din extractul apos de aproximativ 1.5 ori mai rapidă la 25°C comparativ cu viteza aceluiași proces la temperatura de 2°C. Creșterea temperaturii de stocare la 75°C, a condus la o degradare accelerată a antocianilor (în prezența benzoatului de sodiu, $t_{1/2\ 2^\circ\text{C}} / t_{1/2\ 75^\circ\text{C}} = 132.7$, în timp ce în cazul utilizării sorbatului de sodiu, valoarea acestui raport este 111.2), în timp ce degradarea antocianilor în lipsa oricărui adaos a fost de 167 de ori mai rapidă la 75°C decât la 2°C. Spre deosebire de stocarea la temperaturi scăzute, adaosul conservanților în cazul stocării la 75°C a avut ca efect o ușoară stabilizare a pigmentilor antocianici. În comparație cu aceștia, acidul ascorbic a prezentat același efect destabilizator, procesul

degradativ decurgând cu o viteză de 1.5 ori mai mare decât în cazul antocianilor din extractul fără aditivi.

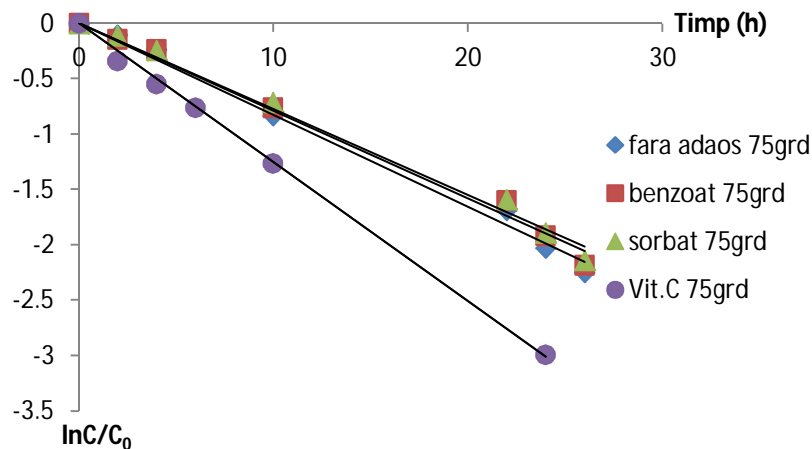


Figura 14. Degradarea antocianilor în extract apos din fructe de corn, în timpul stocării la 75 °C

Pentru a determina efectul temperaturii asupra cineticii procesului de degradare, valorile constantelor de viteză obținute din ecuația (3) au fost introduse într-o ecuație de tip Arrhenius.

Reprezentarea grafică a valorilor constantelor de viteză corespunzătoare degradării antocianilor în cazul fiecărui extract este redată în figura 15.

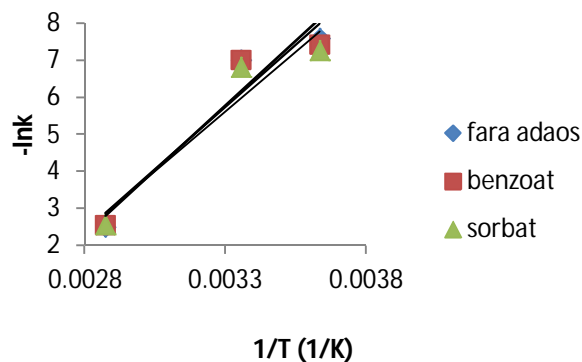


Figura 15: Reprezentarea grafică a constantelor de viteză ale reacției de degradare ale antocianilor din coarne în funcție de temperatură

Valorile energiilor de activare obținute sunt prezentate în tabelul 9. Energii de activare ridicate se traduc printr-o susceptibilitate mărită la degradare a antocianilor din extractele investigate la expunere la temperaturi ridicate. Influența cea mai puternică a temperaturii asupra acestui proces degradativ (cea mai ridicată valoarea a energiei de activare) a fost observată pentru antocianii păstrați în soluție apoasă fără adaos de aditivi,

în timp ce valoarea cea mai mică a E_a (corespunzătoare unei susceptibilități mai reduse la degradarea termică) s-a determinat în cazul antocianilor stocați în soluție apoasă cu adaos de sorbat.

Tabelul 9: Efectul temperaturii asupra degradării antocianilor din fructele de corn

Extract	E_a (kJ/mol)	R^2	K_0 (h ⁻¹)	Q_{10}	
				2-25 °C	25-75 °C
Fără adaos	58.11	0.9304	3.46x10 ⁷	1.290	2.47
Cu adaos de benzoat (0.1%)	55.82	0.9142	1.45x10 ⁷	1.192	2.447
Cu adaos de sorbat (0.1%)	53.72	0.9209	7.06x10 ⁶	1.216	2.342

Dependența de temperatură a constantelor de viteză ale reacției de degradare a fost de asemenea evaluată prin calcularea coeficientului de temperatură Q_{10} .

Pentru fiecare dintre cele două intervale de temperatură studiate, pentru procesul de degradare a antocianilor din extractele investigate s-au obținut valori aproximativ egale ale coeficientului de temperatură Q_{10} , demonstrând faptul că influența creșterii temperaturii asupra stabilității antocianilor este aceeași în cazul ambelor intervale (2-25 °C respectiv 25-75 °C), indiferent dacă se adaugă sau nu conservanți. În același timp, valorile coeficientului de temperatură indică faptul că influența creșterii temperaturii asupra procesului de degradare a antocianilor din extractele de coarne este de două ori mai accentuată pe intervalul 25-75 °C, comparativ cu intervalul 2-25 °C, demonstrând stabilitatea mai mare a acestor compuși la temperaturi scăzute.

Polifenoli extrași din fructe uscate (ceaiuri de fructe)

Alături de apă, ceaiul este una din cele mai consumate băuturi. Cu toate că cele mai populare ceaiuri sunt cele produse din frunzele plantei *Camelia sinensis* L. (ceai verde, negru, alb sau oolong) o largă utilizare o au și diferite tipuri de ceaiuri din plante și fructe. Acest fapt se datorează atât efectului lor terapeutic cât și aromei acestora precum și lipsei cofeinei din aceste infuzii.

Infuziile de fructe uscate reprezintă o sursă importantă de antioxidanți, cum ar fi: polifenoli, vitamine (C și E) și carotenoide [Belščak, Bukovac & Piljac-Žegarac, 2011]. Cu toate că ceaiul obținut din frunzele plantei de ceai este unul din cele mai studiate

produse alimentare, infuziile din fructe uscate sunt puțin investigate, deși reprezintă un produs de larg consum și reprezintă o sursă importantă de compuși biologic activi.

Luând în considerare acest fapt, scopul studiului de față a constat în determinarea conținutului total de polifenoli și antociani precum și a capacității antioxidante a 12 tipuri de ceai de fructe comercializate pe piața autohtonă, precum și a caliciului florilor de hibiscus (*Hibiscus sabdariffa L.*), ingredient prezent în toate ceaiurile investigate (conform tabelului 10).

În vederea determinării conținutului total de polifenoli din infuziile de fructe studiate s-a folosit metoda Folin-Ciocalteu, metodă bazată pe proprietățile reducătoare ale acestor compuși.

Tabelul 10: Tipul și compoziția ceaiurilor analizate

Nr. crt.	Tipul ceaiului	Producător	Compoziție
1	Zmeură	1	Zmeură, hibiscus, coacăze negre, afine
2	Zmeură	2	Zmeură, coacăze negre, hibiscus
3	Afine	1	Afine, hibiscus, coacăze negre
4	Afine	2	Afine, coacăze negre, căpșuni, hibiscus
5	Măceșe	1	Măceșe, hibiscus, coacăze negre
6	Măceșe	2	Măceșe, coacăze negre, hibiscus
7	Căpșuni	2	Căpșuni, coacăze negre, hibiscus
8	Căpșuni și frăguțe	3	Hibiscus, măceșe, căpșuni, zmeură, cireșe, frăguțe
9	Fructe de pădure	1	Afine, coacăze negre, mure, hibiscus
10	Fructe de pădure	1	Mure, zmeură, frăguțe, afine, măceșe, hibiscus
11	Fructe de pădure	2	Afine, coacăze negre, zmeură, căpșuni, hibiscus
12	Fructe de pădure	3	Hibiscus, măceșe, zmeură, afine, mure, căpșuni, cireșe

Conținutul total de fenoli determinat pentru cele trei serii de ceaiuri (serii definite în funcție de producător) este redat în tabelul 11. Pentru infuziile de fructe provenite de la producătorul 1, conținutul cel mai ridicat de polifenoli a fost determinat în cazul ceaiului de afine (23.229 mg GAE/g ceai), valoarea cea mai scăzută prezentând-o ceaiul de zmeură (15.844 mg GAE/g). În ce privește ceaiurile obținute de la producătorul 2, infuzia de măceșe a prezentat cea mai ridicată valoare a conținutului total de polifenoli (28.179 mg GAE/g ceai) în timp ce infuzia de zmeură prezintă valoarea cea mai scăzută (12.531 mg GAE/g) a acestui parametru, la fel ca și în cazul ceaiurilor din prima serie. În această serie, raportul dintre conținutul maxim de polifenoli și conținutul minim determinat este egal cu 2.2, valoarea fiind mai ridicată decât în cazul producătorului 1, unde acest raport este de doar 1.4. Dintre toate ceaiurile investigate, cel mai ridicat conținut de polifenoli a fost determinat în cazul ceaiului de căpșuni provenit de la producătorul 3. În cazul

infuziei obținute din caliciu uscat de flori de hibiscus, valoarea conținutului total de polifenoli a fost determinată ca fiind 19.054 mg GAE/g, valoare apropiată de cele determinate pentru ceaiurile aparținând producătorului 1.

Tabelul 11: Valorile TAC, TPC și AA pentru ceaiurile investigate

Nr. Crt.	Conținut total de antociani (TAC) mg Cy-3-glu/g ceai	Conținut total de polifenoli (TPC) mg GAE/g ceai	Capacitatea antioxidantă (AA) mg AAE/g ceai
1	4.486±0.286	15.844±0.218	12.948±1.619
2	3.646±0.092	12.531±0.154	15.194±2.503
3	5.572±0.516	23.229±0.419	18.268±0.165
4	4.394±0.206	13.892±0.199	12.961±1.621
5	5.264±0.013	18.605±0.221	15.408±0.332
6	2.844±0.116	28.179±0.399	10.96±0.418
7	4.58±0.463	15.537±0.066	13.134±1.957
8	4.161±0.089	29.326±0.198	19.022±0.22
9	5.138±0.076	18.222±0.110	13.416±0.295
10	2.624±0.335	16.358±0.463	11.243±0.036
11	3.607±0.206	13.275±0.166	10.871±2.508
12	4.039±0.332	14.127±0.132	19.060±1.955
13	3.892±0.006	19.054±0.6185	12.672±0.276

Rezultatele obținute prin metoda Folin-Ciocalteu au variat pe o scară largă, atât în ceea ce privește tipul de ceai, cât și producătorul. Acest fapt ar putea fi explicat atât prin compoziția diferită a aceluiași tip de ceai provenit de la producători diferiți cât și prin timpi de infuzie diferiți (recomandați de fiecare producător în parte) pentru același tip de ceai. În unele cazuri, acest timp ar putea fi prea scurt pentru extracția totală a polifenolilor hidrosolubili. Conținutul total de polifenoli determinat în ceaiurile investigate a variat în intervalul 126.07 mg GAE/l infuzie până la 295.02 mg GAE/l infuzie, în concordanță cu datele din literatură [Belščak, Bukovac & Piljac-Žegarac, 2011] care raportează valori între 323.4 și 1549.1 mg GAE/l infuzie pentru o infuzie de două ori mai concentrată, preparată din ceaiuri de fructe cu compoziție similară. După cum era de așteptat, aceste valori sunt mult mai scăzute decât cele determinate pentru sucuri de fructe (căpșuni 1302; coacăze negre 1919 mg GAE/l suc) [Piljac-Žegarac, Valek, Martinez & Belščak, 2009], fapt datorat în principal operațiilor tehnologice ce intervin în prepararea ceaiurilor de fructe (uscarea, măcinare) care pot determina degradarea compușilor fenolici în timpul procesării materiilor prime.

Pe lângă alți polifenoli, toate ceaiurile investigate reprezintă o sursă importantă de antociani, compuși ce joacă un rol esențial în culoarea acestor ceaiuri. Conținutul total de antociani (TAC) a infuziilor de fructe a fost determinat cu ajutorul metodei pH-ului diferențial. Rezultatele obținute din măsurătorile spectrofotometrice sunt redată în tabelul 11 și au fost exprimate în mg Cy-3-glu/g ceai.

Nivelul concentrației de antociani determinat în infuziile de fructe provenite de la producătorul 1 a fost similar în toate cazurile analizate (în intervalul $4.486 \div 5.572$ mg Cy-3-glu/g ceai) cu excepția ceaiului de fructe de pădure nr. 10 care a prezentat un nivel foarte scăzut al concentrației pigmentilor antocianici (2.624 mg Cy-3-glu/g).

Analizând valorile determinate ale TPC și TAC, se poate constata faptul că, în cazul producătorului 1, există o bună corelare a acestor parametri.

În cazul ceaiurilor obținute de la producătorul 2, conținutul total de antociani a prezentat valori apropiate pentru toate ceaiurile investigate (în intervalul $3.607 \div 4.58$ mg Cy-3-glu/g ceai), cu excepția ceaiului de măceșe nr. 6, în cazul căruia valoarea TAC a fost de 2.84 mg Cy-3-glu/g.

Ca și în cazul seriei anterioare, valorile TAC au urmat aceeași tendință ca și valorile TPC.

Pentru ceaiurile provenite de la producătorul 3, s-a obținut aproximativ aceeași valoare a conținutului total de antociani (4 mg Cy-3-glu/g ceai), valoare similară cu cea determinată în cazul infuziei obținute din flori de hibiscus (3.892 mg Cy-3-glu/g).

Conținutul cel mai scăzut de antociani a fost observat în cazul ceaiului de măceșe nr. 6 (producătorul 2), valoare ce a fost de 1.85 ori mai scăzută decât valoarea TAC determinată în cazul ceaiului de măceșe nr. 5 (producătorul 1). La compararea acestor valori, este important de luat în considerare faptul că ceaiul nr. 6 conține o cantitate mai mare de fructe de maces, spre deosebire de ceaiul nr. 5, care conține o cantitate mai mare de coacăze negre (fructe ce se remarcă printr-un conținut mai ridicat de antociani, comparativ cu măceșele). Aceste diferențe pot de asemenea explica și conținutul mai scăzut decât cel estimat al polifenolilor totali determinat în cazul ceaiului nr. 5.

Literatura de specialitate nu prezintă date referitoare la conținutul de antociani din infuziile preparate din ceaiuri de fructe uscate, acesta fiind primul studiu care investighează acest parametru de importanță deosebită pentru nutriția umană.

Alături de conținutul total de polifenoli, capacitatea antioxidantă este un indice definitoriu pentru valoarea nutritivă și activitatea biologică a extractelor naturale/alimentelor funcționale.

Activitatea antioxidantă a celor 12 ceaiuri investigate a fost evaluată cu ajutorul metodei ABTS. Capacitatea de captare a radicalilor liberi a infuziilor obținut din ceaiurile de fructe uscate a fost determinată prin măsurarea absorbției probei tratate cu ABTS⁺ la 734 nm. Valorile de absorbție obținute au fost convertite în echivalenți de acid ascorbic (AAE) cu ajutorul unei curbe de calibrare

În cazul ceaiurilor analizate, s-au observat diferențe semnificative în ceea ce privește activitatea antioxidantă. Capacitatea cea mai ridicată de consum a radicalilor liberi s-a înregistrat în cazul ceaiului de afine de la producătorul 1 (18.268 mg AAE/g ceai), valoare comparabilă cu cea obținută în cazul ceaiului de zmeură de la producătorul 2 (15.194 mg AAE/g). Valoarea cea mai scăzută a activității antioxidante a fost observată în cazul ceaiurilor de fructe de pădure, ceaiul nr. 10 din seria 1 prezentând o valoare de 11.243 mg AAE/g iar ceaiul nr. 11 din seria 2, 10.871 mg AAE/g.

Pentru ceaiurile provenite de la producătorul 1, raportul dintre valoarea maximă și cea minimă a capacității antioxidante este egal cu cel dintre valorile extreme ale conținutului total de polifenoli și este egal cu 1.4. Totodată, se constată o bună corelare a conținutului total de polifenoli cu activitatea antioxidantă, fapt ce recomandă acest parametru ca un bun indicator al capacității de captare a radicalilor liberi al ceaiurilor investigate. În mod surprinzător, această corelație nu se observă în cazul ceaiurilor provenite de la producătorul 2. Capacitatea antioxidantă a infuziilor de fructe uscate din seria 3 are aproximativ aceeași valoare pentru toate ceaiurile din această serie (~ 19 mg AAE/g ceai), fiind totodată și cea mai ridicată valoare a acestui parametru pentru toate cele 12 probe analizate. După cum era de așteptat, infuziile de fructe studiate prezintă o activitate antioxidantă semnificativ mai scăzută (în intervalul 21.8 ÷ 30.8 mg AAE/100 ml infuzie) decât cele obținute din frunzele plantei de ceai (negru: 106 mg AAE/100 ml infuzie, verde: 131 mg AAE/100 ml infuzie respective 83 mg AAE/100 ml infuzie oolong) reprezentând totuși o sursă remarcabilă de compuși cu activitate antioxidantă.

CONCLUZII

- A fost investigată pentru prima dată stabilitatea antocianilor izolați din diverse fructe indigene, în diferite condiții de pH și temperatură precum și în prezența unor aditivi alimentari uzuali, în timpul procesării și stocării, în scopul determinării condițiilor optime de utilizare a acestor pigmenți ca și coloranți alimentari.
- S-au stabilit parametrii cinetici ai reacțiilor de degradare ale pigmentilor antocianici din extracte obținute din vișine, fructe de călin și fructe de corn, în diferite condiții de stocare. În condiții similare de temperatură și pH, cei mai stabili s-au dovedit a fi antocianii separați din fructe de corn. Studiul influenței solventului a relevat stabilitatea mai ridicată a antocianilor la stocarea în apă, comparativ cu stocarea în etanol. Adăugarea unor conservanți și antioxidanți alimentari a condus la scăderea stabilității antocianilor.
- În cazul extractului obținut din fructe de călin, s-a investigat conținutul de fenoli totali, respectiv activitatea antioxidantă, la stocarea la temperatura camerei. Studiile au indicat o scădere pronunțată a conținutului de fenoli din extract în primele 4 zile, urmată de o stabilizare a acestui conținut pe tot restul perioadei investigate. Activitatea antioxidantă a variat sinusoidal, indicând prezența unor posibile reacții de echilibru.
- A fost investigat conținutul total de antociani, cel de fenoli totali și activitatea antioxidantă pentru un set de 12 ceaiuri de fructe uscate, provenite de la trei producători diferiți. Cu toate că s-a observat o bună corelare între valorile TAC și TPC pentru ceaiurile provenite de la același producător, nu a s-a putut stabili o corelare între valorile TPC și AA, decât în cazul ceaiurilor provenite de la un singur producător.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVA

- Akbulut, M., Causir, S., Marakoglu, T., Coklar, H., *Assian J. Chem.*, **2008**, 20, 1875
- Altun, M. L., Citoğlu, G. S., Yilmaz, B. S., Özbek, H., *Pharm. Biol.* **2009**, 47, 653
- Andersen, O.M., Jordheim, M., *Flavonoids* (2nd ed. *Chemistry, biochemistry and applications*), CRC Press, Boca Raton, Fl, **2006**, pp. 452
- Belščak, A., Bukovac, N., Piljac-Žegarac, J., *J. Food Biochem.* **2011**, 35, 195
- Cabrita, L. Analysis and Stability of Anthocyanins. Ph.D. thesis, Dept. of Chemistry, University of Bergen, Bergen, Norway **1999**
- Cemeroğlu, B., Velioglu, S., Işik, S., *J. Food Sci.*, **1994**, 59, 1216
- Clifford, M. N., *J. Sci. Food Agric.*, **2000**, 80, 1063
- Crisan, M., David, L., **Moldovan, B.**, Vulcu, A., Dreve, S., Perde-Schrepler, M., Tatomir, C., Filip, A. G., Bolfa, P., Achim, M., Chiorean, I., Kacso, I., Berghian Grosan, C., Olenic, L., *J. Mater. Chem. B*, **2013**, 1, 3152
- Dennehy, C. *J. Midwifery Womens Health* **2006**, 51, 402
- Dey, P. M., Harborne, J. B., 1. Plant phenolics methods in plant biochemistry (2nd ed.). London: Academic Press Limited, 1993, pp. 326–341
- Francis, F. J., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1989**, 28, 273
- Giusti, M.M., Wrolstad, R.E., *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Wiley, New York, **2001**, F.1.2.1-F1.2.13
- Hernandez-Herrero, J. A., Frutos, M. J., *Int. J. Food Sci. Tech.*, **2011**, 46, 2550
- Kirka, A., Özkan, M., Cemeroğlu, B., *Food Chem.*, **2007**, 101, 212
- Iacobucci, G. A., Sweeny, J. G., *Tetrahedron*, **1983**, 39, 3005
- Jordheim, M., Giske, N. H., Andersen, Ø. M., *Biochem. Syst. Ecol.*, **2007**, 35, 153
- Konczak, I., & Zhang, W. , *J. Biomed. Biotechnol.*, **2004**, 5, 239
- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., Brouillard, R., *Phytochemistry*, **2003**, 64, 923
- Lule, S. U., Xia, W., *Food Rev. Int.*, **2005**, 21, 367
- Moldovan, B.**, David, L., Chişbora, C., Cimpoiu, C., *Molecules*, **2012**, 17, 11655
- Moldovan, B.**, David, L., Donca, R., Chişbora, C., *Stud. U. Babeş-Bol. Che.* **2011**, 56, 189

Moldovan, B., Ghic, O., David, L., Chişbora, C., *Rev. Chim. Bucharest*, **2012**, 63

Moldovan, B., David, L. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **2013**, manuscript submitted, under review

Piljac-Žegarac, J., Valek, L., Martinez, S., Belščak, A., *Food Chem.*, **2009**, 113, 394

Pinelo, M., Manzocco, L., Nunez, M. J., Nicoli, M. C., *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 1177

Pliszka, B., Huszcza-Ciołkowska, G., Mielezsko, E., Czaplicki, S., *J. Sci. Food Agric.*, **2009**, 89, 1154

Rop, O., Reznicek, V., Valsikova, M., Jurikova, T., Mlcek, J., Kramarova, D., *Molecules*, **2010**, 15, 4467

Singleton, V. R., Orthifer R., Lamuela-Raventos R. M., *Methods Enzymol.*, **1999**, 299, 152

Tural, S., Koca, I., *Sci. Hortic.*, **2008**, 116, 362

Velioğlu, Y. S., Ekici, L., Poyrazoglu, E. S., *Int. J. Food Sci. Technol.*, **2006**, 41, 1011

Wang, W. D., Xu, S. Y., *J. Food Eng.*, **2007**, 82, 271

Lista de publicații

1. I.Oprean, **B. Moldovan**, R.Oprean “Unidirectional Triple Hydrogen Rearrangement , a Useful Method in Insect’s Pheromones Structure Determination” *Plant’s Health*, **2003**, 61, 20-22
2. I.Oprean, **B. Moldovan**, R.Oprean “EI-MS Unidirectional Triple Hydrogen Rearrangement. I. The case of Long Chain Phenylazobenzoates” *Stud. Univ. “Babeș-Bolyai”, Ser. Chemia*, **2003**, 2, 139-144
3. **B.Moldovan**, I.Oprean, R. Oprean “EI-MS Unidirectional Triple Hydrogen Rearrangement. II. The case of Long Chain Benzoates” *Stud. Univ. “Babeș-Bolyai”, Ser. Chemia*, **2003**, 2, 145-148
4. **B. Moldovan**, L. David, R. Donca, C. Chișbora, “Degradation Kinetics of Anthocyanins from Crude Ethanolic Extract from Sour Cherries”, *Stud. Univ. “Babes-Bolyai”, Chemia*, **2011**, 56, 189-194
5. **B. Moldovan**, O. Ghic, L. David, C. Chișbora, The influence of storage on the total phenols content and antioxidant activity of the Cranberrybush (*Viburnum opulus L.*) fruits extract”, *Rev. Chim.*, **2012**, 63, 463-464
6. **B. Moldovan**, L. David, C. Chișbora, C. Cimpoiu, “Degradation kinetics of anthocyanins from European Cranberrybush (*Viburnum opulus L.*) fruits extracts. Effects of temperature, pH and storage solvent”, *Molecules.*, **2012**, 17, 11655-11666
7. M. Crisan, L. David, **B. Moldovan**, A.Vulcu, S. Dreve, M. Perde-Schrepler, C. Tatomir, A. G. Filip, P. Bolfa, M. Achim, I. Chiorean, I. Kacso, C. Berghian Grosan, L. Olenic, “New Nanomaterials for the Improvement of Psoriatic Lesions”, *J. Mater. Chem. B*, **2013**, 1, 3152-3158

Postere la conferinte internationale:

1. I.Oprean, **B. Moldovan**, R.Oprean “Unidirectional Triple Hydrogen Rearrangement , a Useful Method in Insect’s Pheromones Structure Determination” 47th CIPAC Meeting & 2nd FAO/WHO Joint Meeting of Pesticide Specification, București , June **2003**

2. **B. Moldovan**, I. Oprean, “The Substituent Effect on the triple hydrogen rearrangement un EI-MS of para-substituted long chain benzoic acid esters”, 5th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries” (ICOSECS 5), September 10-14, **2006**, Ohrid, Macedonia