



ULBS

Universitatea "Lucian Blaga" din Sibiu



Școala doctorală interdisciplinară

Domeniul de doctorat: INGINERIE INDUSTRIALĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

DEZVOLTAREA UNOR EXTRACTE
MULTIFUNCȚIONALE DIN PETALELE DE
HIBISCUS ȘI BUJOR PENTRU UTILIZARE ÎN
TEHNOLOGII ALIMENTARE ȘI TEXTILE

doctorand:

MIRABELA, PERJU

conducător științific:

Prof. univ. dr. habil. SIMONA, OANCEA

SIBIU 2020

Realizarea acestei teze de doctorat nu ar fi fost posibilă fără îndrumarea științifică competentă și sprijinul permanent a conducătorului de doctorat, doamna **Prof. univ. dr. habil. Simona Oancea**, căreia pe această cale doresc să îi mulțumesc pentru consultanța științifică, devotamentul și răbdarea oferite pe tot parcursul realizării cercetărilor tezei de doctorat.

De asemenea, doresc să mulțumesc membrilor comisiei de îndrumare: doamna **Conf. univ. dr. Angela Bănăduc**, **Lector dr. Mihaela Răcuciu** și **Șef lucrări dr. Mariana Păcală**, pentru sfaturile științifice valoroase aduse.

Doresc să aduc mulțumiri doamnei **Conf. univ. dr. ing. Diana Coman** pentru ajutorul esențial oferit pentru elaborarea și finalizarea părții aplicative în domeniul tehnologiilor textile.

Aș dori să mulțumesc doamnei **Șef lucrări dr. ing. Drăghici Olga** pentru sfaturile științifice acordate, doamnelor **ing. Rodica Roșca** și **ing. Laurențiu Timiș** pentru ajutorul în demersurile experimentale de laborator.

Mulțumesc domnului **Lector dr. Horea Olosutean** pentru timpul acordat și sfaturile științifice în domeniul modelării matematice pe care mi le-a oferit.

În mod special doresc le mulțumesc părinților mei și celor apropiați mie pentru sprijinul, înțelegerea și sfaturile oferite pe tot parcursul elaborării cercetării tezei de doctorat.

Vă mulțumesc,

Drd. Mirabela Perju

CUPRINS

CUPRINS.....	3
1. INTRODUCERE	5
2. ANALIZA STADIULUI ACTUAL PRIVIND POTENȚIALUL BIOACTIV AL PLANTELOR BOGATE ÎN PIGMENȚI.....	7
2.1. Florile de <i>Hibiscus</i> și bujorul de grădină – surse de compuși bioactivi	7
2.2. Efecte benefice asupra sănătății umane	8
2.3. Antioxidanți naturali-sursă de stabilizare oxidativă a uleiurilor alimentare.....	8
2.4. Coloranți naturali - aspecte privind utilizarea în vopsiri ecologice ale suporturilor textile.....	9
3.1. Introducere.....	10
3.2. Materiale utilizate	11
3.3. Echipamente utilizate	11
3.4. Metodologia experimentală	11
3.4.1. Determinarea spectrofotometrică a conținutului de compuși bioactivi cu structură polifenolică.....	12
3.5. Modelarea matematică și analiza statistică a parametrilor de extracție.....	12
3.6. Analiza statistică.....	12
3.7. Rezultate și discuții.....	13
3.7.1. Influența parametrilor de extracție prin macerare și asistată de ultrasunete asupra conținutului de antociani din <i>Hibiscus</i>	13
3.8. Modelarea matematică.....	16
3.9. Analiza statistică.....	16
4. UTILIZAREA TEHNOLOGIILOR BAZATE PE ENZIME ÎN SCOPUL EXTRAȚIEI SUPERIOARE A COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN <i>HIBISCUS</i> ȘI BUJORUL DE GRĂDINĂ	19
4.1. Introducere	19
4.2. Materiale utilizate	19
4.3. Echipamente utilizate	20

4.4.	Metodologia experimentală	20
4.5.	Rezultate și discuții	21
4.6.	Analiza statistică.....	25
5.	CERCETĂRI APLICATIVE ALE BIOEXTRACTELOR DE HIBISCUS (<i>Hibiscus sabdariffa</i>) ȘI BUJOR DE GRĂDINĂ (<i>Paeonia officinalis</i>)	26
5.1.	Introducere	26
5.2.	Materiale utilizate	27
5.3.	Echipamentele utilizate.....	27
5.4.	Metodologia experimentală	28
5.4.1.	Metode de lucru privind evaluarea potențialului bioextractului de <i>Hibiscus</i> de protejare a uleiului de cânepă împotriva oxidării.....	28
5.4.2.	Metode de lucru privind vopsirea ecologică a țesăturilor de bumbac cu extractele de <i>Hibiscus</i> și bujor de grădină.....	28
5.5.	Rezultate și discuții.....	29
5.5.1.	Valorificarea bioextractelor de <i>Hibiscus</i> în scopul stabilizării oxidative a uleiului de cânepă.....	29
5.5.2.	Valorificarea bioextractelor de <i>Hibiscus</i> și bujor de grădină prin vopsirea ecologică a țesăturilor de bumbac	31
6.	BIBLIOGRAFIE.....	36
7.	CONCLUZII GENERALE, CONTRIBUȚII ORIGINALE, RECOMANDĂRI ȘI DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE	38
	CONCLUZII GENERALE.....	38
	CONTRIBUȚII ORIGINALE	41
	RECOMANDĂRI ȘI DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE.....	42
	LISTA PUBLICAȚIILOR REZULTATE ÎN URMA CERCETĂRII DOCTORALE, PUBLICATE SAU ACCEPTATE SPRE PUBLICARE.....	43

CUVINTE CHEIE: extracție, compuși bioactivi, ”tehnologie verde”, aplicații tehnologice.

REZUMAT

1. INTRODUCERE

Tot mai multe studii științifice arată faptul că menținerea sănătății populației necesită o gestionare corectă a resurselor sociale, a relațiilor economice dar și mai important, a capitalului natural. Multe dintre problemele de sănătate actuale își au rădăcinile în aceleași inegalități socio-economice și modele de consum imprudente care periclitează atât sănătatea umană actuală, cât și cea viitoare (McMichael și Beaglehole, 2000).

În acest sens, un interes deosebit este acordat plantelor care au fost utilizate în medicina tradițională datorită conținutului bogat în compuși bioactivi din compoziția acestora. O multitudine de compuși bioactivi din compoziția plantelor este disponibilă la scară largă pentru includere în dietele oamenilor ca forme alternative ale medicinei actuale (Cowan, 1999). În proporții semnificative, plantele sunt folosite în industria farmaceutică și a suplimentelor nutritive ca surse primare pentru extracția compușilor naturali cu efecte benefice, în special în scop preventiv, dar uneori și terapeutic.

Printre nevoile fundamentale pe care industria modernă le are ca urmare a supraexploatărilor și globalizării se numără sustenabilitatea și așa numita ”chimie verde” în vederea valorificării și dezvoltării extractelor naturale, cu numeroase aplicații în diferite ramuri industriale, precum: farmaceutică, alimentară, textilă, a cosmeticii etc., pentru înlocuirea compușilor sintetici cu cei naturali. De aceea, prezenta teză de doctorat și-a propus utilizarea unor tehnologii extractive nepoluante, îmbunătățite, ca alternative la tehnologiile clasice de extracție pentru obținerea unor extracte naturale bogate în compuși bioactivi, din *Hibiscus* și bujorul comun, de grădină.

Obiectivele și structura tezei

Obiectivul principal al prezentei teze de doctorat este valorificarea bioextractelor obținute prin tehnologii extractive clasice și moderne din *Hibiscus* și bujorul de grădină în vederea înlocuirii unor aditivi și coloranți sintetici.

Pentru realizarea obiectivului principal al tezei de doctorat s-au propus următoarele obiective științifice:

1. Identificarea și testarea tehnologiilor extractive convenționale (macerare) și ne-convenționale (extractione asistată de ultrasunete) a antocianilor din extractele din *Hibiscus* prin stabilirea parametrilor optimi de extracție și dozarea acestora din extractele obținute.
2. Identificarea, stabilirea și testarea parametrilor optimi de extracție a diferiților compuși bioactivi de tip polifenolic din petalele de bujor de grădină prin tehnologii extractive convenționale (macerare) și ne-convenționale (extractione asistată de ultrasunete) și dozarea acestora din extractele obținute.
3. Dezvoltarea unor tehnologii de extracție asistată de enzime bazate pe utilizarea celulelor fungice în scopul creșterii eficienței extracției compușilor bioactivi din petalele de *Hibiscus* și bujor de grădină.
4. Testarea potențialului antioxidant al extractului de *Hibiscus* asupra uleiului alimentar de cânepă.
5. Testarea capacității tinctoriale a extractelor de *Hibiscus* și bujor de grădină asupra țesăturilor de bumbac.

2. ANALIZA STADIULUI ACTUAL PRIVIND POTENȚIALUL BIOACTIV AL PLANTELOR BOGATE ÎN PIGMENȚI

2.1. Florile de *Hibiscus* și bujorul de grădină – surse de compuși bioactivi

În prezentul studiu, clasa de interes a substanțelor organice sintetizate de plante este cea a compușilor bioactivi cu structură polifenolică, aceștia având o aplicativitate foarte largă și fiind răspândiți în întreaga plantă, adesea fiind acumulați în diferite părți ale plantei, precum rădăcini, fructe, petale, coajă și frunze (Oancea și Grosu, 2013).

Genul *Hibiscus* este un gen larg răspândit care include mai multe specii perene, utilizate sub formă de ceai/infuzie datorită compoziției bogate în compuși bioactivi, în special cei cu structură polifenolică (Sindi și colab., 2014).

Florile de *Hibiscus* au fost utilizate încă din trecut în medicina tradițională și în industria alimentară sub diferite forme, ca aromatizant sau colorant natural pentru realizarea diferitelor produse (Wang și colab., 2001; Oliver, 1960).

Bujorul de grădină este o plantă perenă care face parte din genul *Paeonia*, care include mai multe specii, foarte puțin studiate din punct de vedere al bioactivității. Printre rezultatele cercetărilor se numără și faptul că 256 de compuși bioactivi au fost identificați în diferite părți anatomice ale plantei (Dienaitė și colab., 2019).

Pentru analizarea polifenolilor obținuți, cele mai importante etape sunt prepararea inițială a materialului vegetal și alegerea metodei de extracție. Aceasta din urmă, este un pas important și depinde în principal de natura probei din care se realizează extracția, de proprietățile chimice ale compușilor polifenolici vizați dar și de numărul inelelor aromatice și grupările hidroxil din structura compușilor, polaritatea și concentrația, de aceea este greu de ales o singură metodă de preparare și extracție a compușilor cu structură polifenolică pentru multe plante. Alegerea metodei de extracție a polifenolilor este un pas important în analiza compușilor cu structură polifenolică. Pentru obținerea unui randament crescut al extracțiilor, trebuie ținut cont de următorii parametri: timpul de extracție, temperatura de extracție, tipul de solvent, raportul solid/solvent și numărul de extracții realizate pentru fiecare probă (Khoddami și colab., 2013).

În ultimul timp, cercetările care presupun extracții cu solvenți ale compușilor polifenolici se axează pe utilizarea unui solvent prietenos cu mediul, care să nu aibă implicații negative

asupra sănătății umane sau asupra mediului. Alte studii ilustrează faptul că un mediu de extracție acid favorizează extracția unui conținut mai mare de compuși polifenolici din plante (Davidov-Pardo și colab., 2011; Sindi și colab., 2014).

2.2. Efecte benefice asupra sănătății umane

Principala funcție biologică a compușilor bioactivi cu structură polifenolică este antioxidantă (Oancea și colab., 2011), de aceea studii epidemiologice indică faptul că o dietă bogată în alimente care conțin cantități mari de polifenoli reduce riscul de producere a diferitelor tipuri de cancere și boli cardiovasculare. Această funcție fiind un factor cheie în tratarea multor boli, aceștia având rol anticancerigen, anti-inflamator, antimicrobian, antialergic, antiviral, antitrombotice, hepato-protector și anti-diabetic (Mori și colab., 1999; Rocha și colab., 2014; Ozcan și colab., 2014; Działo și colab., 2016; Khoddami și colab., 2013).

2.3. Antioxidanți naturali-sursă de stabilizare oxidativă a uleiurilor alimentare

Considerând faptul că industria alimentară este în căutare constantă de coloranți naturali eficienți care să prezinte toxicitate scăzută, există studii care demonstrează aplicațiile în industria alimentară ale extractului de *Hibiscus sabdariffa*.

Pe lângă consumul de legume și fructe recomandat de organizațiile de sănătate, omul are nevoie de un aport crescut de acizi grași polinesaturați pe care corpul uman nu îi poate produce, în special acidul α -linoleic (Omega-3), acidul linoleic (Omega-6) și acidul oleic (Omega-9), aceștia fiind regăsiți cu preponderență în uleiurile de pește. Semințele de cânepă conțin aproximativ 25% proteine și 35% grăsimi sub formă de ulei. Uleiul de cânepă conține de obicei 50–70% acid linoleic (Omega-6), 15–25% acid α -linolenic (Omega-3), care este aproximativ raportul de 3:1, fiind raportul optim nevoilor nutriționale umane (Da Porto și colab., 2012).

Grăsimile, uleiurile și produsele alimentare bazate pe grăsimi în general sunt foarte sensibile la oxidare în urma depozitării îndelungate și prin expunere la căldură, ceea ce duce la limitarea perioadei de valabilitate, afectând nu numai calitățile senzoriale, dar afectează și valoarea nutritivă a acestora. În consecință, acestea au nevoie de o protecție antioxidantă, iar

aceasta se poate realiza prin diferite metode printre care și utilizarea antioxidanților ca inhibitori ai oxidării (Oancea și colab., 2013).

Chiar dacă antioxidanții sintetici au fost preferați în industria alimentară și au avut un succes mare, recent există o îngrijorare tot mai mare în ceea ce privește toxicitatea acestora. Tot mai mulți oameni de știință testează utilizarea antioxidanților naturali pentru conservarea diferitelor produse alimentare care să înlocuiască antioxidanții sintetici (Oancea și colab., 2013; Oancea și colab., 2015).

2.4. Coloranți naturali - aspecte privind utilizarea în vopsiri ecologice ale suporturilor textile

Vopsirea materialelor textile cu coloranți naturali era un proces costisitor, pigmenții sintetici fiind mult mai ieftini, mai ușor de produs și de aceea aplicațiile acestora au devenit accesibile tuturor. Cu toate acestea, în ultimii ani testele specifice demonstrează efectele alergice și toxice ale coloranților sintetici, astfel că pigmenții naturali devin tot mai apreciați și înlocuiesc pe cei sintetici (Abel, 2012).

Coloranții naturali nu au efecte cancerigene și produc culori liniștitoare și calde. De asemenea, aceștia au o biodegradabilitate și compatibilitate cu mediul mult mai mare comparativ cu cei sintetici. Plantele sunt surse potențiale pentru extracția coloranților naturali datorită disponibilității largi în natură (Chandravanshi și Upadhyay, 2013).

3. CONTRIBUȚII PRIVIND INFLUENȚA TEHNOLOGIILOR DE EXTRACȚIE ASUPRA CONȚINUTULUI DE COMPUȘI BIOACTIVI DIN *HIBISCUS* ȘI BUJORUL DE GRĂDINĂ

3.1. Introducere

Compușii bioactivi polifenolici prezintă în structura lor mai mult de un inel aromatic, cu una sau mai multe grupări hidroxil, fiind clasificați în compuși flavonoidici și ne-flavonoidici. Potențialul aplicativ al acestor compuși biochimici cu structură polifenolică, precum și abundența lor în flori sunt câteva dintre motivele selectării lor în vederea îndeplinirii obiectivelor prezentei teze de doctorat.

Pe lângă diferitele aplicații medicinale, acești compuși bioactivi cu structură polifenolică sunt folosiți în diferite sectoare industriale, de exemplu în industria alimentară, cosmetică, farmaceutică și a celulelor pentru panourile solare (Martínez și colab., 2017; Wang și colab., 2001).

Unul dintre cele mai importante aspecte în ceea ce privește performanța extracției compușilor bioactivi cu structură polifenolică din materialele vegetale este identificarea condițiilor optime de extracție, deoarece acești compuși chimici pot deveni instabili și sensibili la degradare. Stabilitatea lor este afectată de mai mulți factori cum ar fi: pH-ul, temperatura de depozitare, temperatura de extracție, structura chimică, concentrația, lumina, oxigenul și solvenții utilizați pentru extracția lor. (Moța și colab., 2016).

Obiectivele prezentului capitol de cercetare constau în testarea tehnologiilor extractive convenționale (macerare) și ne-convenționale (extracții asistate de ultrasunete) a unor compuși cu structură polifenolică din *Hibiscus* și bujorul de grădină, stabilirea parametrilor optimi de extracție și dozarea acestora din extractele obținute.

Compușii bioactivi cu structură polifenolică vizați în acest studiu sunt: antocianii, flavonoidele, polifenolii și taninurile.

Pentru atingerea acestor obiective, s-au realizat seturi experimentale privind macerarea la diferiți parametri și extracția asistată de ultrasunete, variind parametrii de mediu, de proces și de instrument.

Dozarea compușilor bioactivi cu structură polifenolică din extractele obținute în urma aplicării tehnicilor de extracție, atât a celor convenționale cât și a celor ne-convenționale, s-a realizat prin tehnici spectrofotometrice UV-VIS.

3.2. Materiale utilizate

S-au utilizat petale de *Hibiscus* și bujor de grădină, uscate și mărunțite. Iar pentru realizarea experimentelor de extracție și dozare a compușilor chimici din extracte s-au utilizat solvenți și reactivi chimici specifici care au fost de puritate analitică iar toate soluțiile utilizate au fost realizate cu apă distilată.

3.3. Echipamente utilizate

Partea experimentală a studiului actual a fost realizată utilizând aparatura din dotarea laboratoarelor Centrului de Cercetare în Biotehnologii Alimentare a Facultății de Științe Agricole, Industrie Alimentară și Protecția Mediului din cadrul Universității „Lucian Blaga” din Sibiu.

3.4. Metodologia experimentală

Extracția antocianilor din petalele uscate de *Hibiscus* și bujor de grădină s-a realizat atât prin metode ne- convenționale, cât și prin metode convenționale, conform Figurii 1. Atât pentru extracția prin macerare, cât și pentru cea asiatată de ultrasunete, au fost aleși 2 solvenți de extracție prietenoși cu mediul.

Pentru realizarea unui studiu comparativ a eficienței extracției din florile de *Hibiscus* între metodele clasice și cele ne-convenționale, s-a ales solventul care s-a dovedit cel mai eficient în experimentele unde extracția s-a realizat prin macerare. În plus, datorită eficienței crescute a extracției antocianilor în mediu acid (Nollet, 2000) s-a testat și eficiența solventului acidifiat.

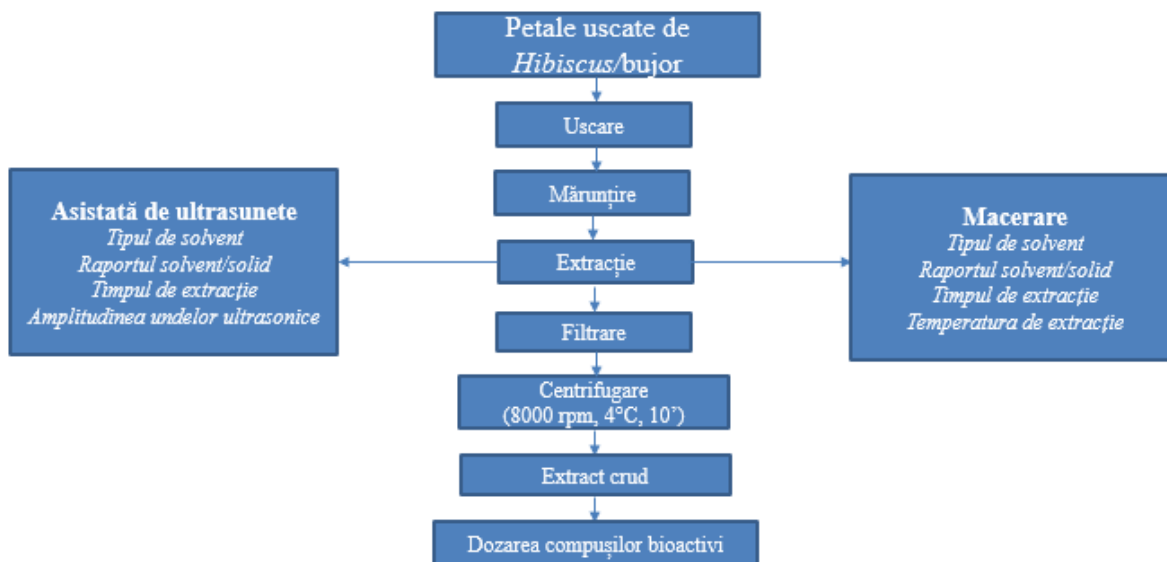


Figura 1. Etapele extracției antocianilor din petalele florilor de *Hibiscus* și bujor de grădină prin macerare și asistată de ultrasunete.

3.4.1. Determinarea spectrofotometrică a conținutului de compuși bioactivi cu structură polifenolică

Determinarea cantitativă a compușilor cu structură polifenolică din probele analizate s-a realizat prin metode spectrofotometrice specifice fiecăruia.

3.5. Modelarea matematică și analiza statistică a parametrilor de extracție

În urma rezultatelor analizelor spectrofotometrice, s-a realizat modelarea matematică cu ajutorul regresiiilor multiple prin analiza influenței factorilor experimentali, considerați variabile independente asupra cantităților de compuși extrași.

3.6. Analiza statistică

Testarea statistică a diferențelor între conținutul de antociani obținut pentru ambele metode de extracție a fost realizată cu ajutorul testului (analizei de varianță) Kruskal-Wallis (Kruskal și Wallis, 1952).

De asemenea, a mai fost aplicat Testul t-student și Testul F (Fisher-Snedecor).

3.7. Rezultate și discuții

3.7.1. Influența parametrilor de extracție prin macerare și asistată de ultrasunete asupra conținutului de antociani din *Hibiscus*

Parametrii de extracție, precum temperatura de extracție, timpul de extracție, tipul de solvent utilizat, raportul solvent/solid, amplitudinea undelor ultrasonice și mediul de extracție (pH-ul) au o influență semnificativă asupra conținutului de compuși polifenolici extrași din petalele florilor de *Hibiscus*.

Din rezultatele obținute în urma analizelor realizate pentru extracția antocianilor din petalele de *Hibiscus* prin macerare la temperatura de 40°C, s-au identificat următorii parametrii optimi de extracție prezentați în Figura 2:

- Solvent de extracție: etanol 70% acidifiat 1% cu acid acetic
- Raport solvent/solid: 20/1
- Timp de extracție: 20 de minute

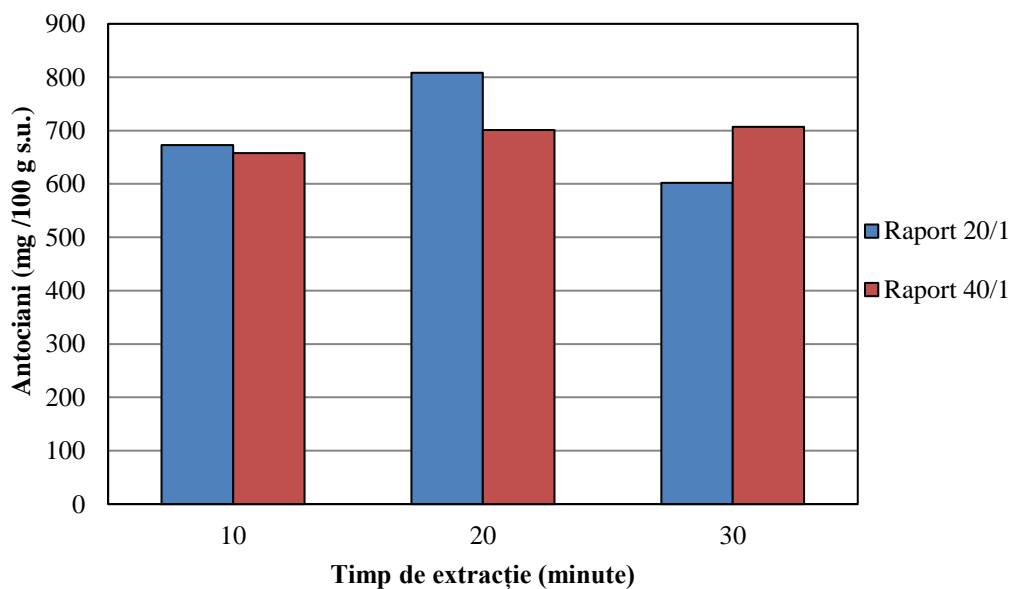


Figura 2. Conținutul antocianilor din extractele etanolice de *Hibiscus* acidificate 1% cu acid acetic, în funcție de timpul de extracție, la 40°C (extracție prin macerare).

Pentru extracția asistată cu ultrasunete a antocianilor din petalele de *Hibiscus*, s-au identificat următorii parametrii optimi de extracție prezentați în Figura 3:

- Solvent de extracție: etanol 70% acidifiat 1% cu acid acetic
- Raport solvent/solid: 40/1
- Timp de extracție: 30 de minute
- Amplitudinea undelor ultrasonice: 70%

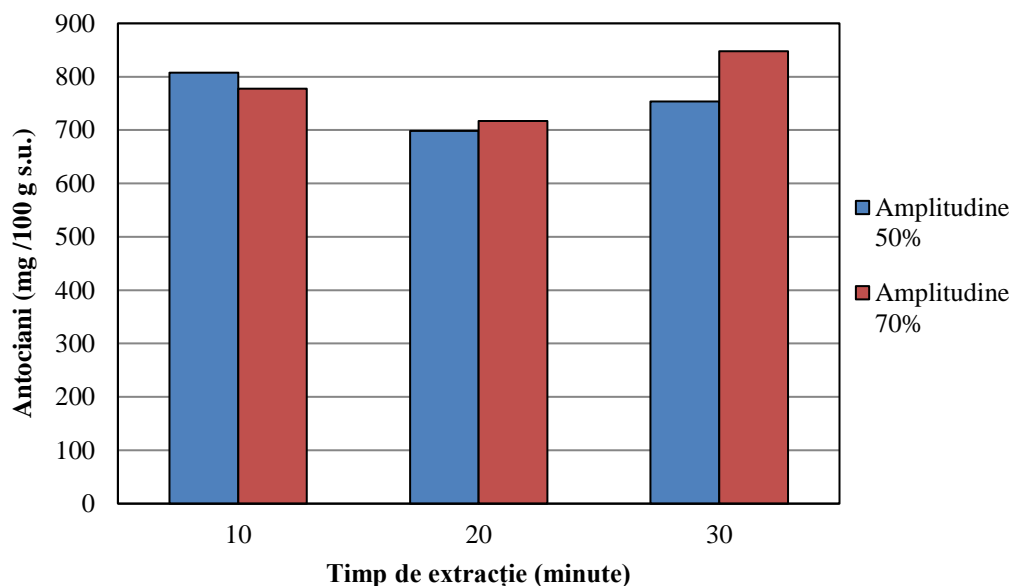


Figura 3. Conținutul antocianilor din extractele etanolice 70% de *Hibiscus* acidificate 1% cu acid acetic, în funcție de timpul de extracție, amplitudine și raportul solid/solvent de 40/1 (extracție asistată de ultrasunete).

În urma rezultatelor obținute după aplicarea celor două metode de extracție a compușilor bioactivi din petalele de *Hibiscus*, putem afirma faptul că metoda cea mai eficientă de extracție a fost cea asistată de ultrasunete.

3.7.2. Influența parametrilor de extracție prin macerare și asistată de ultrasunete asupra conținutului polifenolic din bujorul de grădină

În ceea ce privește studiul influenței parametrilor de extracție prin macerare a unor compuși bioactivi din petalele de bujor comun (*Paeonia officinalis*), pentru extracția eficientă a antocianilor, polifenolilor și taninurilor, s-au identificat următoarele condiții optime:

- Solvent de extracție: etanol 70%
- Raport solvent/solid: 48/1
- Temperatura de extracție: 40°C

iar pentru extracția eficientă a flavonoidelor, condițiile optime au fost:

- Solvent de extracție: etanol 70%
- Raport solvent/solid: 24/1
- Temperatura de extracție: 40°C.

În cazul extracției asistate de ultrasunete a antocianilor și taninurilor din petalele de bujor, s-au stabilit următoarele condiții optime:

- Solvent de extracție: etanol 70%
- Raport solvent/solid: 40/1
- Timp de extracție: 30 de minute
- Amplitudinea undelor ultrasonice: 50%.

Pentru extracția asistată de ultrasunete a polifenolilor din petalele de bujor, s-au stabilit următorii parametri optimi de extracție:

- Solvent de extracție: etanol 70% acidifiat 1% cu acid citric
- Raport solvent/solid: 50/1
- Timp de extracție: 30 de minute
- Amplitudinea undelor ultrasonice: 50%.

Pentru extracția asistată de ultrasunete a flavonoidelor din petalele de bujor, s-au stabilit următorii parametri optimi de extracție:

- Solvent de extracție: etanol 70%
- Raport solvent/solid: 50/1
- Timp de extracție: 20 de minute
- Amplitudinea undelor ultrasonice: 50%.

3.8. Modelarea matematică

Adecvarea diferitelor modele matematice a fost testată pentru a putea identifica relațiile între conținutul de antociani obținut și variabilele independente.

Rezultatele obținute în urma modelării matematice confirmă faptul că un conținut ridicat de antociani din extractele de *Hibiscus* este influențat de variabilele independente în funcție de parametrii utilizați și variați în timpul extracțiilor.

De asemenea, în urma modelării matematice a rezultatelor obținute, confirmă faptul că un conținut ridicat de compuși polifenolici din extractele de bujor de grădină este influențat de asemenea de variabilele independente în funcție de parametrii utilizați și variați în timpul extracțiilor.

S-a observat că împreună cu timpul de extracție, amplitudinea undelor ultrasonice este un factor important pentru extracția asistată de ultrasunete. De asemenea, se poate observa că o amplitudine mare, la o temperatură mai ridicată duce la creșterea conținutului de polifenoli în timpul extracției cu ultrasunete pentru ambele tipuri de solvent utilizat.

3.9. Analiza statistică

Rezultatele celor două teste statistice aplicate indică faptul că nu există diferențe semnificative statistic privind conținutul mediu de antociani din extractele de *Hibiscus* pentru cele două metode de extracție utilizate.

Conform analizei statistice, conținutul mediu de fenoli totali și taninuri condensate din bujorul de grădină nu au distribuție normală pentru extracția realizată prin macerare. Astfel, aceștia nu pot fi testați cu Testul t-student sau Testul F-Fisher. În consecință, în funcție de solventul de extracție utilizat, conținutul de fenoli totali și taninuri condensate a fost testat utilizând Testul Kruskal Wallis. Pentru fenolii totali, valoarea lui $p = 0,508$, diferențele fiind ne semnificative statistic, iar pentru taninurile condensate valoarea lui $p = 0,085$, diferențele fiind semnificative statistic între aceste medii ale conținutului pentru solventul utilizat.

Pentru conținutul mediu antocianic obținut în funcție de solventul utilizat din extractele de bujorul de grădină există diferențe semnificative statistic între mediile valorilor ($p = 0,012$), acestea fiind reprezentate în Figura 4.

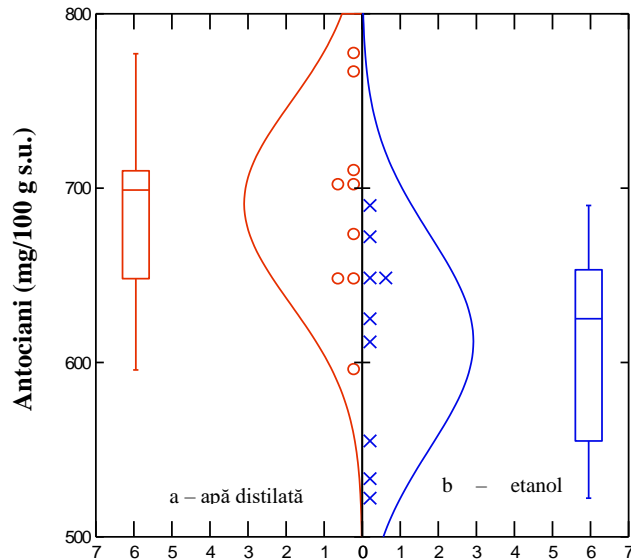


Figura 4. Repartiția datelor experimentale ca distribuție normală pentru antociani, extrași cu apă distilată (a) și etanol 70% (b).

Conform analizei statistice, conținutul de polifenoli nu are distribuție normală, fiind testat cu Testul Kruskal iar valoarea $p = 0,773$, fiind diferențe nesemnificative statistic în funcție de solventul utilizat pentru extracția acestora.

Restul compușilor bioactivi analizați (antociani, flavonoide și taninuri) au avut distribuție normală, în consecință au fost testați statistic cu Testul t-student.

În funcție de solventul utilizat, se observă că există diferențe semnificative statistic între valorile medii ale conținutului antocianic ($p = 0,003$), acestea fiind reprezentate în Figura 5.

Analiza statistică demonstrează că valorile medii ale conținutului antocianic obținute prin extracția asistată de ultrasunete din petalele de bujor de grădină sunt diferite statistic în funcție de solventul de extracție utilizat. Astfel, pentru extracția asistată de ultrasunete realizată cu etanol 70%, valorile medii de antociani obținute sunt semnificativ mai mari, comparativ cu cele obținute cu etanol 70% acidifiat 1% cu acid citric.

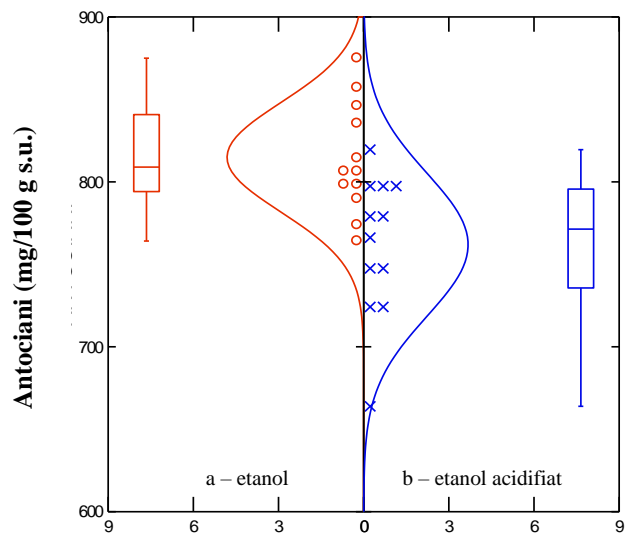


Figura 5. Repartiția datelor experimentale ca distribuție normală pentru flavonoide, obținute cu etanol 70% (a) și etanol 70% acidifiat 1% cu acid citric (b).

Pentru conținutul de taninuri condensate obținut în funcție de solventul de extracție utilizat, există diferențe semnificative statistic între mediile valorilor obținute ($p = 0,000$), acestea fiind reprezentate în Figura 6.

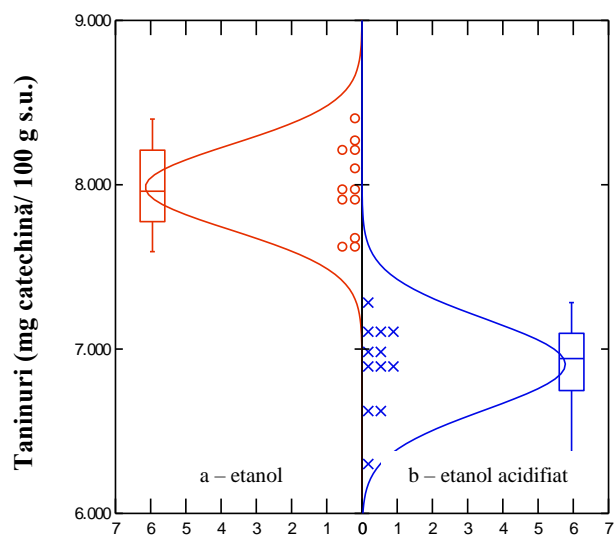


Figura 6. Repartiția datelor experimentale ca distribuție normală pentru taninurile condensate, obținute cu etanol 70% (a) și etanol 70% acidifiat 1% cu acid citric (b).

4. UTILIZAREA TEHNOLOGIILOR BAZATE PE ENZIME ÎN SCOPUL EXTRAȚIEI SUPERIOARE A COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN *HIBISCUS* ȘI BUJORUL DE GRĂDINĂ

4.1. Introducere

O parte din compușii polifenolici sunt atașați peretelui celular, astfel, pentru extracția acestora, este necesară distrugerea peretelui celular fără a afecta compușii cu structură polifenolică. De aceea este necesară dezvoltarea unei tehnologii bazate pe enzime în scopul extracției superioare a compușilor biologic activi din plante.

De aceea, **obiectivul principal** al acestui studiu urmărește dezvoltarea unor tehnologii enzimice bazate pe utilizarea celulelor în scopul creșterii eficienței extracției compușilor bioactivi din petalele de *Hibiscus* și bujor de grădină. Se aplică pentru prima dată extracția asistată cu enzime (celulază) pentru valorificarea unor compuși din petalele plantelor luate în studiu.

Se studiază astfel influența unor parametri de extracție asistată de enzime (timp de incubare) urmată de extracția asistată de ultrasunete asupra conținutului de compuși bioactivi și proprietățile bioactive ale extractelor finale (capacitatea antioxidantă totală).

Cercetarea a fost realizată în perspectiva dezvoltării unor ingrediente naturale eficiente pentru utilizare în produse sau suplimente alimentare naturale și în vopsirea țesăturilor.

4.2. Materiale utilizate

În prezentul studiu, pentru realizarea extracțiilor compușilor bioactivi cu structură polifenolică, s-au utilizat petale de *Hibiscus* și petale de bujor de grădină.

Pentru realizarea pre-tratamentului enzimatic s-a folosit enzima celulază din *Aspergillus niger*, realizându-se soluții enzimice în tampon acetat pH 4,6.

Toți solvenții și reactivii chimici specifici utilizați pentru realizarea acestui studiu au fost de puritate analitică.

4.3. Echipamente utilizate

Partea experimentală a fost realizată utilizând aparatura din dotarea Laboratorului de Biochimie și a laboratoarelor Centrului de Cercetare în Biotehnologii Alimentare a Facultății de Științe Agricole, Industrie Alimentară și Protecția Mediului, din cadrul Universității „Lucian Blaga” din Sibiu.

4.4. Metodologia experimentală

După stabilirea parametrilor optimi de extracție asistată de ultrasunete din experimentele realizate anterior pentru *Hibiscus* și bujorul de grădină, s-a testat creșterea eficienței extractive prin aplicarea unui pre-tratament enzimatic conform Figurii 7.

Extracția s-a realizat cu solvenții de extracție optimi pentru fiecare material în parte, aceștia fiind aleși în urma prelucrării rezultatelor obținute după realizarea experimentelor anterioare, macerare și extracția asistată de ultrasunete.

Determinarea conținutului polifenolic din extractele obținute a fost realizată conform metodelor spectrofotometrice specifice. De asemenea, determinarea activității antioxidante a extractelor s-a realizat conform metodelor specifice (FRAP, DPPH).

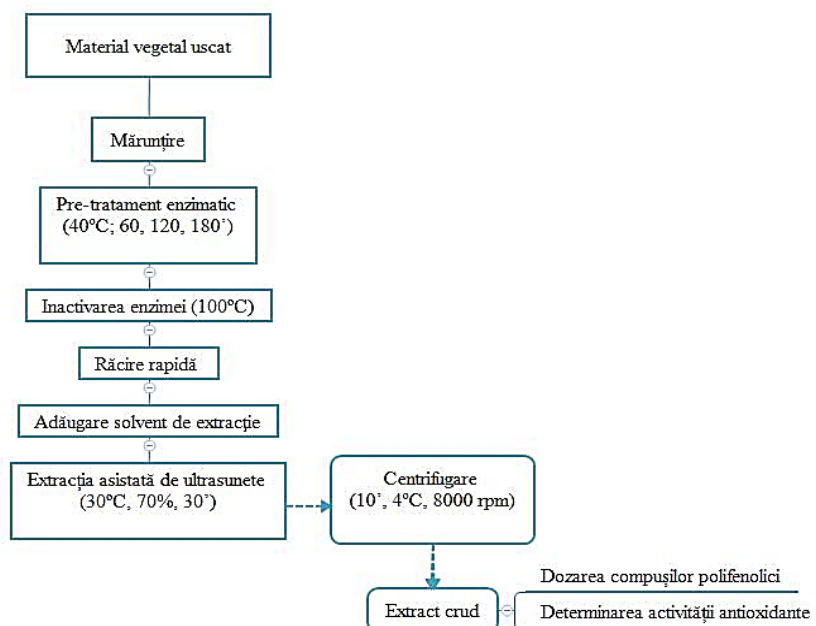


Figura 7. Schema tehnică experimentală de extracție asistată de enzime și ultrasunete a compușilor bioactivi cu structură polifenolică din petalele florilor selectate.

4.5. Rezultate și discuții

Dintre metodele neconvenționale de extracție a compușilor bioactivi cu structură polifenolică, extracția asistată de enzime a căpătat o importanță deosebită, fiind aplicată cu succes în ultimii ani (Kalcheva-Karadzova și colab., 2014; Wang și colab., 2010).

În prezentul studiu, s-a aplicat pentru prima dată extracția asistată cu enzime pentru valorificarea unor compuși bioactivi din petalele de *Hibiscus* și bujorul de grădină.

Rezultatele obținute în urma analizelor demonstrează faptul că metoda de extracție asistată de celuloze este mai eficientă pentru obținerea unor cantități ridicate de compuși bioactivi din *Hibiscus* (Tabel 1) și bujor de grădină (Tabel 2).

Tabel 1. Conținutul de compuși bioactivi cu structură polifenolică din probele de *Hibiscus*, în prezența și absența pre-tratamentului enzimatic (60 minute).

Tip tratament	Antociani (mg cianidină/ 100g)	Polifenoli (mg GAE/ 100 g)	Flavonoide (mg quercetină/100 g)	Taninuri (mg catechină/100 g)
Enzimatic	668,115	1336,743	2715,513	6561,118
Martor	676,035	1338,169	2533,792	6271,147

Tabel 2. Conținutul de compuși bioactivi cu structură polifenolică din probele de bujor de grădină, în prezența și absența pre-tratamentului enzimatic (60 minute).

Tip tratament	Antociani (mg cianidină/ 100g)	Polifenoli (mg GAE/ 100 g)	Flavonoide (mg quercetină/100 g)	Taninuri (mg catechină/100 g)
Enzimatic	720,481	3985,507	2056,833	8917,8120
Martor	647,961	3428,178	1973,354	8605,0230

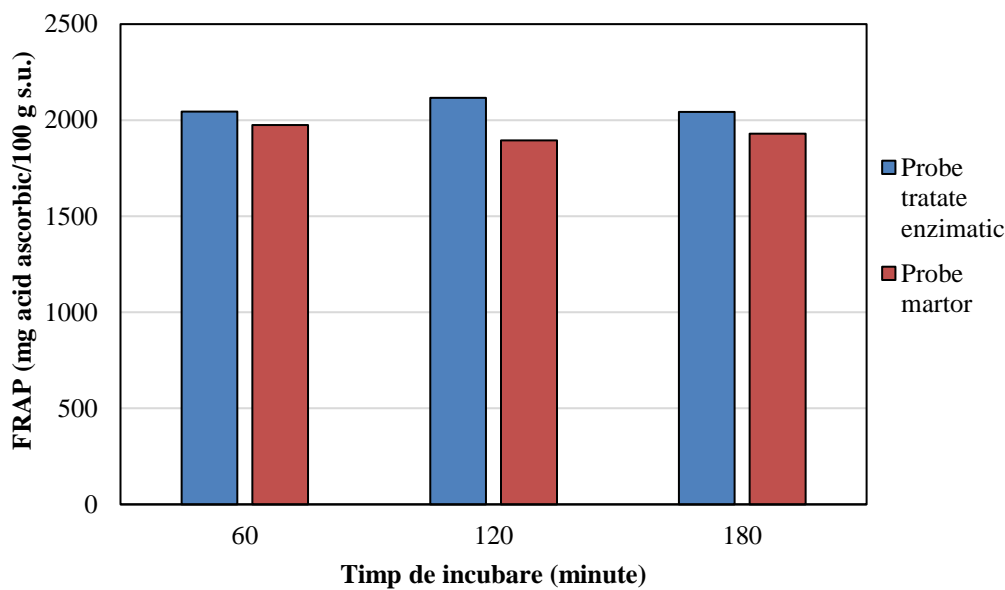


Figura 8. Influența timpului de incubare cu celulaze, la 40°C asupra activității antioxidante FRAP a extractelor de *Hibiscus*.

Rezultatele obținute în cazul probelor unde extracția asistată de ultrasunete a fost precedată de tratamentul enzimatic sunt prezentate din *Hibiscus* (Fig. 8) ne indică o activitate antioxidantă ridicată, cu valori medii cu mai mari decât cele fără tratament enzimatic.

Pentru activitatea antioxidantă FRAP, analiza statistică prin testul Kruskal-Wallis, arată diferențe semnificative ($p = 0,050$) între probele pre-tratate cu celulază și probele martor.

Pentru activitatea antioxidantă DPPH (Fig. 9), s-au obținut rezultate care ne indică faptul că în cazul probelor unde extracția asistată de ultrasunete a fost precedată de tratamentul există o activitate antioxidantă medie mai mare comparativ cu cele fără tratament enzimatic.

Diferențele între valorile medii ale activității antioxidante DPPH pentru cele două metode de extracție nu sunt semnificative statistic.

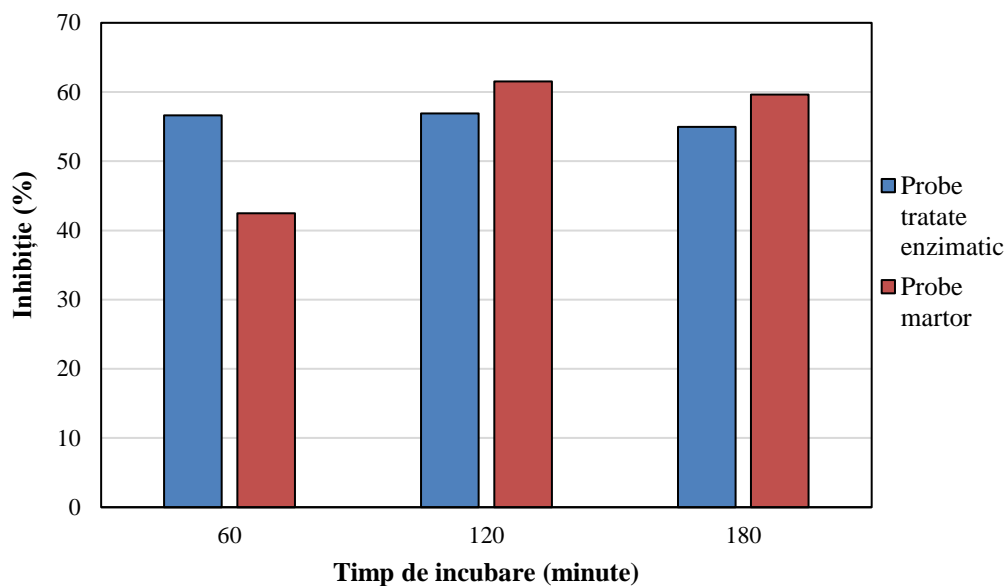


Figura 9. Influența timpului de incubare cu celulază, la 40°C asupra activității antioxidante DPPH a extractelor de *Hibiscus*.

Rezultatele obținute în cazul probelor obținute din bujor de grădină la care extracția asistată de ultrasunete a fost precedată de tratamentul enzimatic indică o valoare medie a activității antioxidante mai mare cu 55,92% comparativ cu cea a probelor fără tratament enzimatic (Fig. 10).

Rezultatele obținute indică o activitate antioxidantă prin metoda DPPH mai eficientă în probele martor, la care extracția s-a realizat doar cu ajutorul ultrasunetelor, fără combinarea cu extracția asistată de celulaze (Fig. 11).

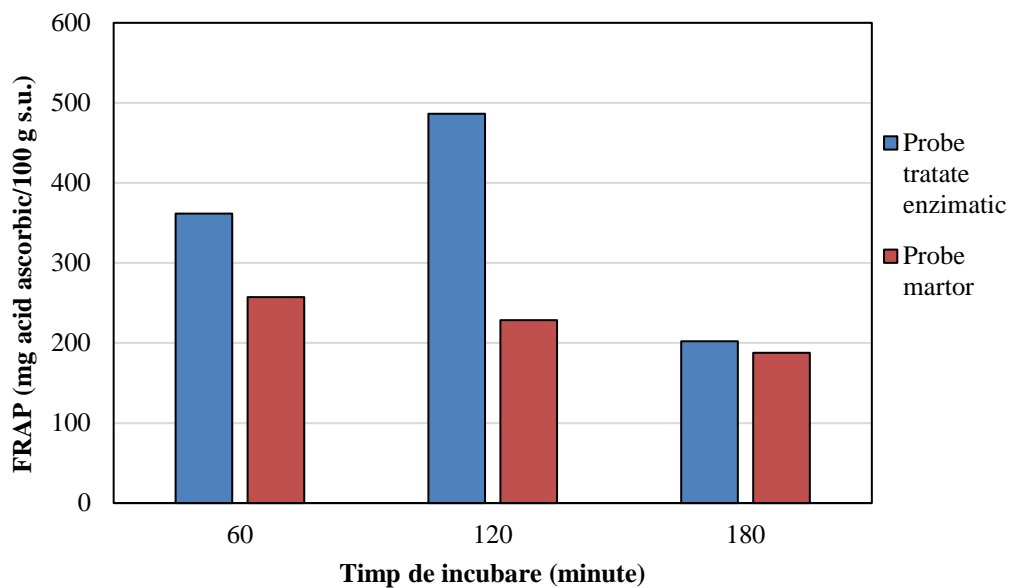


Figura 10. Influența timpului de incubare cu celulaze, la 40°C asupra activității antioxidante (FRAP) a extractelor de bujor.

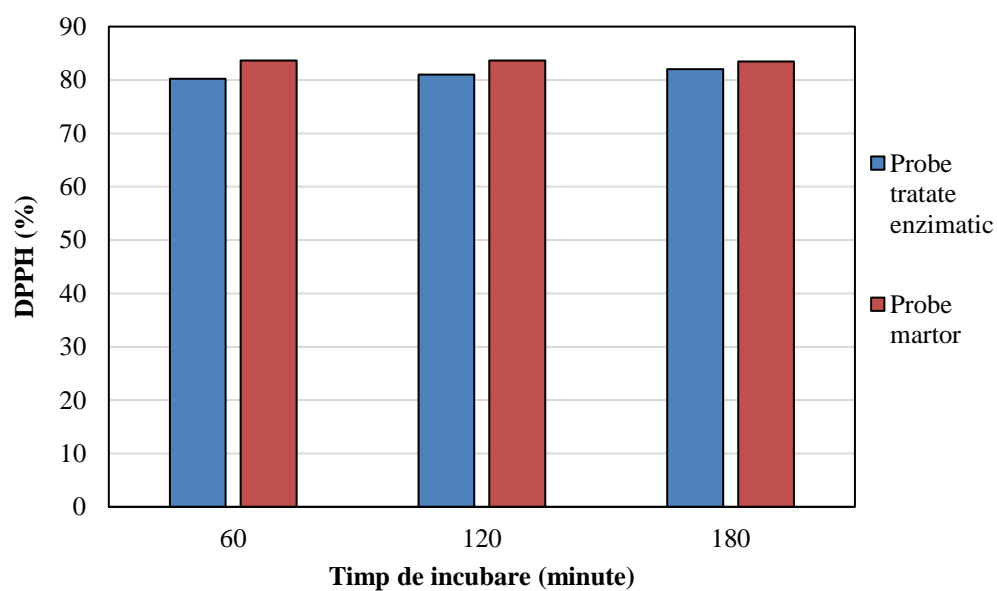


Figura 11. Influența timpului de incubare cu celulaze, la 40°C asupra activității antioxidante (DPPH) a extractelor de bujor.

4.6. Analiza statistică

Analiză statistică a datelor obținute în urma extracțiilor a fost realizată prin testul Kruskal-Wallis unde s-au observat diferențe semnificative ($p = 0,046$) între probele pre-tratate cu celuloză și probele martor pentru metoda de determinare a activității antioxidante DPPH.

Pentru analiza coeficientului de corelație a conținutului diferiților compuși bioactivi a fost realizat testul Pearson pentru rezultatele obținute și s-au observat o corelație pozitivă semnificativă între taninuri și antociani ($r = 0,877$) și corelații pozitive marginal semnificative între taninuri și flavonoide ($r = 0,757$), între antociani și flavonoide ($r = 0,746$).

5. CERCETĂRI APLICATIVE ALE BIOEXTRACTELOR DE HIBISCUS (*Hibiscus sabdariffa*) ȘI BUJOR DE GRĂDINĂ (*Paeonia officinalis*)

5.1. Introducere

Nevoia unui consum bazat pe alimente sănătoase este una dintre cele mai importante probleme cu care se confruntă omenirea și a determinat o tendință de creștere a diversității produselor alimentare și a prelucrărilor moderne.

Cannabis sativa, este o plantă cunoscută sub numele de cânepă, care s-a utilizat în decursul anilor pentru realizarea diferitelor produse, în special fibre textile. O nouă oportunitate este dată de utilizarea semințelor acesteia în obținerea unui ulei alimentar, bogat în acizi grași polinesaturați, recunoscut pentru efectele curative și benefice (Da Porto și colab., 2014).

Deoarece corpul uman nu poate produce acizii alfa-linolenic (Omega 3), linoleic (Omega 6) și oleic (Omega 9), semințele de cânepă pot constitui o alternativă bună la uleiurile de proveniență animală. Acesta conține acizi grași polinesaturați, dar și alți compuși precum: minerale, vitamine (A, C și E), tocoferol, β -caroten. Datorită raportului optim de acizi grași polinesaturați Omega 3 și Omega 6 (1:3), sunt considerați „grăsimi sănătoase”.

Din cauza unor preocupări în ceea ce privește siguranța aditivilor sintetici, s-au realizat cercetări care arată faptul că antioxidanții artificiali utilizați în industria alimentară trebuie înlocuiți cu cei naturali, din cauza potențialelor efecte negative asupra sănătății umane (Carocho și colab, 2014). Florile de *Hibiscus* sunt bogate în compuși bioactivi cu structură polifenolică, cu proprietăți antioxidante confirmate în cercetările din această teză de doctorat, care permit orientarea cercetărilor spre utilizarea lor în produse de stabilizare termo-oxidativă a uleiurilor alimentare, respectiv uleiul de cânepă, care face obiectul studiului de cercetare prezent.

În prezent, industria textilă se orientează spre înlocuirea pigmentilor sintetici cu cei naturali, astfel încât capacitatea de bun colorant a extractelor de *Hibiscus*, face ca aceștia să fie pretabili în vopsirea materialelor textile precum bumbac, in, lână sau mătase, având un impact negativ minim asupra mediului și sănătății umane, comparativ cu cei sintetici (Haddar și colab., 2014).

Existența unui număr mic de studii care au ca obiectiv capacitatea tinctorială și conținutul mare de compuși bioactivi cu structură polifenolică din florile bujorului de grădină obținut în experimentele precedente, au contribuit la realizarea unui studiu în care s-a testat capacitatea tinctorială a acestor extracte naturale.

Obiectivul principal al studiului urmărește valorificarea extractelor bogate în compuși bioactivi cu structură polifenolică, în special antociani, în vederea obținerii unor produse noi sau îmbunătățite destinate tehnologiilor alimentare și vopsirilor ecologice în tehnologia textilă.

5.2. Materiale utilizate

În prezentul studiu, s-au utilizat extractele de *Hibiscus* și bujor de grădină, preparate prin utilizarea parametrilor optimi descriși anterior (Capitolul 3).

Pentru realizarea experimentului în vederea valorificării potențialului antioxidant al extractelor de *Hibiscus* s-a utilizat uleiul de cânepă (*Cannabis sativa*).

În vederea realizării vopsirilor ecologice cu extractul obținut din petale de *Hibiscus* și bujor de grădină, s-au folosit epruvete din suport textil celulozic (bumbac) spălate și albite, cu masa de 180 g/m², cu compoziția de 100% bumbac.

5.3. Echipamentele utilizate

Partea experimentală a fost realizată utilizând aparatura din dotarea Laboratorului de Biochimie și a laboratoarelor Centrului de Cercetare în Biotehnologii Alimentare a Facultății de Științe Agricole, Industrie Alimentară și Protecția Mediului, din cadrul Universității “Lucian Blaga” din Sibiu.

Analiza acizilor grași s-a realizat prin metoda GC-MS, utilizând spectrometrul Clarus 600 T (Perkin Elmer) în cadrul laboratoarelor de cercetare de la Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Cluj-Napoca.

5.4. Metodologia experimentală

În urma extracțiilor realizate din experimentele realizate anterior pentru petelele de *Hibiscus* și bujor, s-au identificat și ales acei parametrii optimi care au fost utilizați în vederea obținerii unui conținut superior de compuși bioactivi cu structură polifenolică (în special antociani), care a fost folosit la realizarea aplicațiilor industriale.

5.4.1. Metode de lucru privind evaluarea potențialului bioextractului de *Hibiscus* de protejare a uleiului de cânepă împotriva oxidării

În vederea realizării unui produs nou pentru industria alimentară, uleiul de cânepă stabilizat cu extract de *Hibiscus*, s-a determinat inițial capacitatea antioxidantă a extractului de *Hibiscus* prin metoda spectrofotometrică FRAP (Benzie și Strain, 1996), iar rezultatele s-au exprimat în mg echivalenți acid ascorbic/100 g s.u.

Pentru evaluarea potențialului antioxidant utilizând uleiul de cânepă, s-a realizat un sistem lipidic de 0,2% antociani (din extractele de *Hibiscus*) și 0,5% lecitină, adăugată cu rol de emulgator. În paralel, s-a realizat proba martor (fără extract de *Hibiscus*) și o probă de ulei cu α -tocoferol (0,1%).

Probele aplicate în straturi de 2 cm în pahare Berzelius, au fost depozitate în etuvă timp de 10 zile la o temperatură de 60°C pentru accelerarea procesului de oxidare. Periodic, la intervale regulate de 2 zile, probele au fost analizate pentru determinarea indicelui de peroxid, compoziției în acizi grași, analizei FTIR și a stabilității termice prin metoda DSC.

5.4.2. Metode de lucru privind vopsirea ecologică a țesăturilor de bumbac cu extractele de *Hibiscus* și bujor de grădină

Extractele de *Hibiscus* și bujor de grădină, bogate în antociani, s-au realizat conform condițiilor optime identificate în procesele anterioare.

S-au aplicat două metode de vopsire a țesăturilor de bumbac: metoda de vopsire clasică prin epuizare și cea ne-convențională de ultrasonare. Condițiile de vopsire care au variat sunt următoarele: pentru fixarea pigmentilor naturali s-au utilizat printr-un tratament simultan 3 tipuri

de mordanți, printre care 2 mordanți prietenoși cu mediul și un mordant clasic, 2 concentrații diferite ale mordanților utilizați, la un raport de flotă de 50:1.

În urma rezultatelor obținute, s-au realizat analize ale paramterilor cromatici, analize FT-IR și de rezistență la spălare.

5.5. Rezultate și discuții

5.5.1. Valorificarea bioextractelor de *Hibiscus* în scopul stabilizării oxidative a uleiului de cânepă

Activitatea antioxidantă *in vitro* realizată conform metodei FRAP a fost de 5146,24 mg acid ascorbic /100 g s.u. Rezultatele obținute din extractul de *Hibiscus* indică faptul că acesta este un bun antioxidant, dovedit și de inhibiția radicalilor liberi (metoda DPPH) de 87,77%.

Rezultate analitice indică faptul că tipul de uleiul de cânepă studiat conține o cantitate mare de acizi grași nesaturați (>90%), în mare parte constituit din acidul linoleic (86,53% din totalul de acizi grași existenți în ulei).

În primele 7 zile au fost observate schimbări majore în compoziția majorității acizilor grași din probele de ulei:

- Nivelul de acizi grași saturați a crescut cu 31% pentru probele martor, cu 92% pentru probele de ulei tratate cu α -tocoferol, iar pentru probele tratate cu extract de *Hibiscus* acesta a scăzut cu 16,5%.
- Conținutul de acizi grași mononesaturați a scăzut cu 50,66% după 7 zile de depozitare la temperatura de 60°C pentru probele tratate cu extract de *Hibiscus*, comparativ cu probele tratate cu α -tocoferol.
- Cantitatea de acizi grași polinesaturați a scăzut în probele martor și în cele tratate cu α -tocoferol, corelată cu o creștere concomitentă a acizilor grași mononesaturați, după 7 zile de depozitare la o temperatură de 60°C; cantitatea de acizi grași polinesaturați a scăzut cu 10% în probele de ulei tratate cu α -tocoferol. Comparativ, probele tratate cu extract de *Hibiscus*, au prezentat o creștere a conținutului de acizi grași polinesaturați cu 2,7% după 7 zile de depozitare.

Procentul de acizi grași nesaturați totali în probele martor și în uleiul tratat cu α -tocoferol, a scăzut după 7 zile la 60°C, în timp ce acesta a rămas similar în probele de ulei de cânepă cu extract de *Hibiscus*, demonstrând efectul protector al extractului de *Hibiscus* împotriva degradării oxidative a uleiului de cânepă.

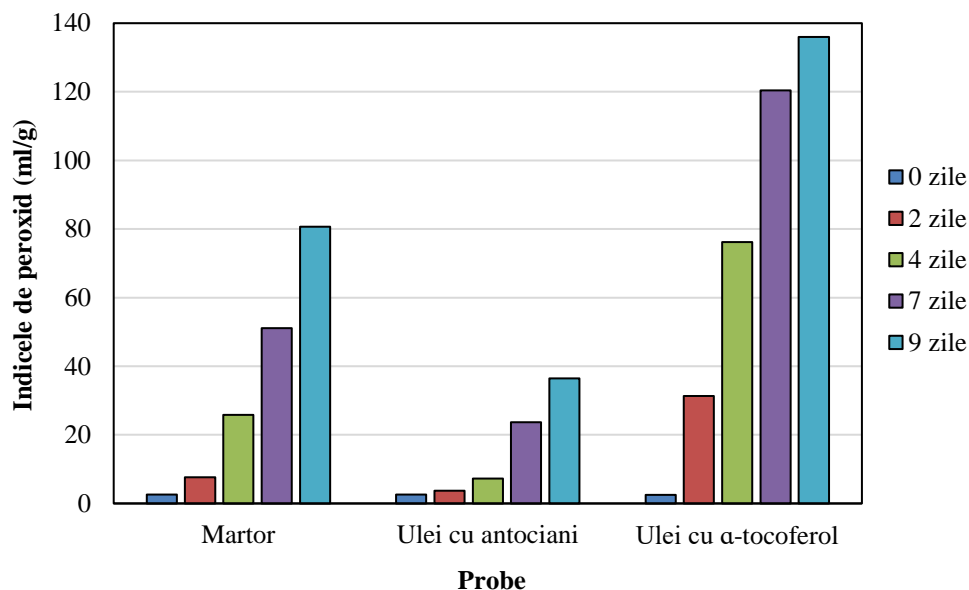


Figura 12. Variația în timp a indicelui de peroxid pentru probele de ulei de cânepă investigate.

Pe toată perioada de depozitare, probele de ulei de cânepă cu extract de *Hibiscus* indică o creștere lentă a Ip comparativ cu celelalte probe investigate, ceea ce indică eficiența în protecția uleiului împotriva oxidării (Fig. 12).

Pentru probele de ulei de cânepă cu extract de *Hibiscus* și respectiv cu α -tocoferol, analiza ATR-FT-IR a fost realizată pentru a monitoriza spectral schimbările în grupările funcționale rezultate din timpul degradării oxidative accelerate.

Rezultatele au arătat că după 9 zile de oxidare la o temperatură de 60°C, diferențele absorbanelor hidroperoxidilor față de proba martor scad după cum urmează: Uleiul cu α -tocoferol > Martor > Uleiul cu antociani. Conținutul mic de hidroperozixi identificați în spectrul ATR-FTIR confirmă rezultatele anterioare din analiza Ip de stabilitate crescută a uleiului de cânepă în prezența extractului de *Hibiscus*.

În prezenta lucrare s-a studiat și cinetica procesului de degradare termo-oxidativă a probelor de ulei de cânepă înainte și după depozitarea la 60°C, monitorizată prin metoda DSC, calculându-se parametrii cinetici folosind metoda Ozawa-Flynn-Wall.

Rezultatele obținute confirmă faptul că extractul de *Hibiscus* adăugat în probele de ulei de cânepă cresc stabilitatea termo-oxidativă la temperatura de 60°C, în concordanță cu rezultatele privind I_p și evoluția compoziției în acizi grași prin GC-MS (Fig. 13).

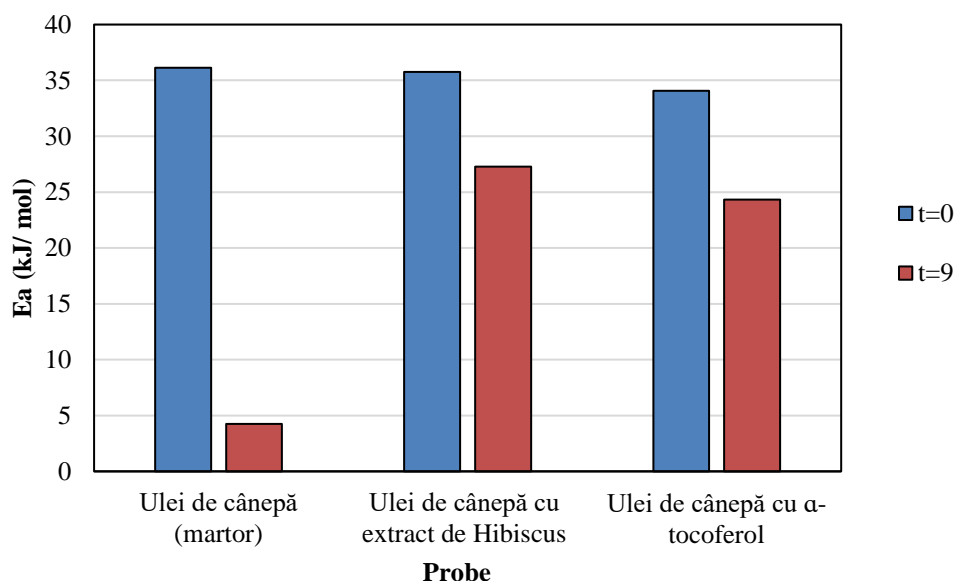


Figura 13. Variația energiei de activare calculate pentru probele de ulei de cânepă, înainte și după termo-oxidarea la 60°C.

5.5.2. Valorificarea bioextractelor de *Hibiscus* și bujor de grădină prin vopsirea ecologică a țesăturilor de bumbac

În acest capitol se prezintă rezultatele privind capacitatea de vopsire a țesăturii din bumbac cu extractele de *Hibiscus* și respectiv de bujor roșu comun, având antocianii ca principale specii de colorant.

După realizarea vopsirilor cu extractul natural de *Hibiscus*, prin tehnici clasice și moderne de vopsire, probele de bumbac au fost analizate prin spectroscopie FT-IR pentru identificarea prezenței grupărilor funcționale caracteristice în substratele celulozice și extractele de *Hibiscus* unde s-au identificat diferite benzi de absorbție.

În urma măsurătorile cromatice ale țesăturilor vopsite cu extract de *Hibiscus* s-a observat faptul că valorile luminozității și diferențele culorilor se modifică în raport cu mordanții folosiți în procesul de vopsire.

Imaginile de microscopie optică a probelor de bumbac vopsite cu extract de *Hibiscus* sunt prezentate în Figura 14 completând rezultatele analizelor de culoare realizate.

Rezistența la spălare cu soluție de săpun a probelor de bumbac vopsite în diferite condiții cu extract de *Hibiscus* a fost evaluată prin comparație cu probele martor, vopsite prin cele două metode dar netratate cu mordant.

În general, rezistențele la spălarea cu soluție de săpun prezintă valori scăzute. Cele mai mari rezistențe ale probelor de bumbac vopsite cu extract de *Hibiscus* au fost obținute în cazul probei 12, dar și în cazul probelor 4, 6, 8, vopsite cu extract de *Hibiscus* și simultan tratate cu acid tanic, citric 3 sau respectiv sulfat de cupru în concentrație de 3%, atât prin ultrasonare, cât și prin epuizare.

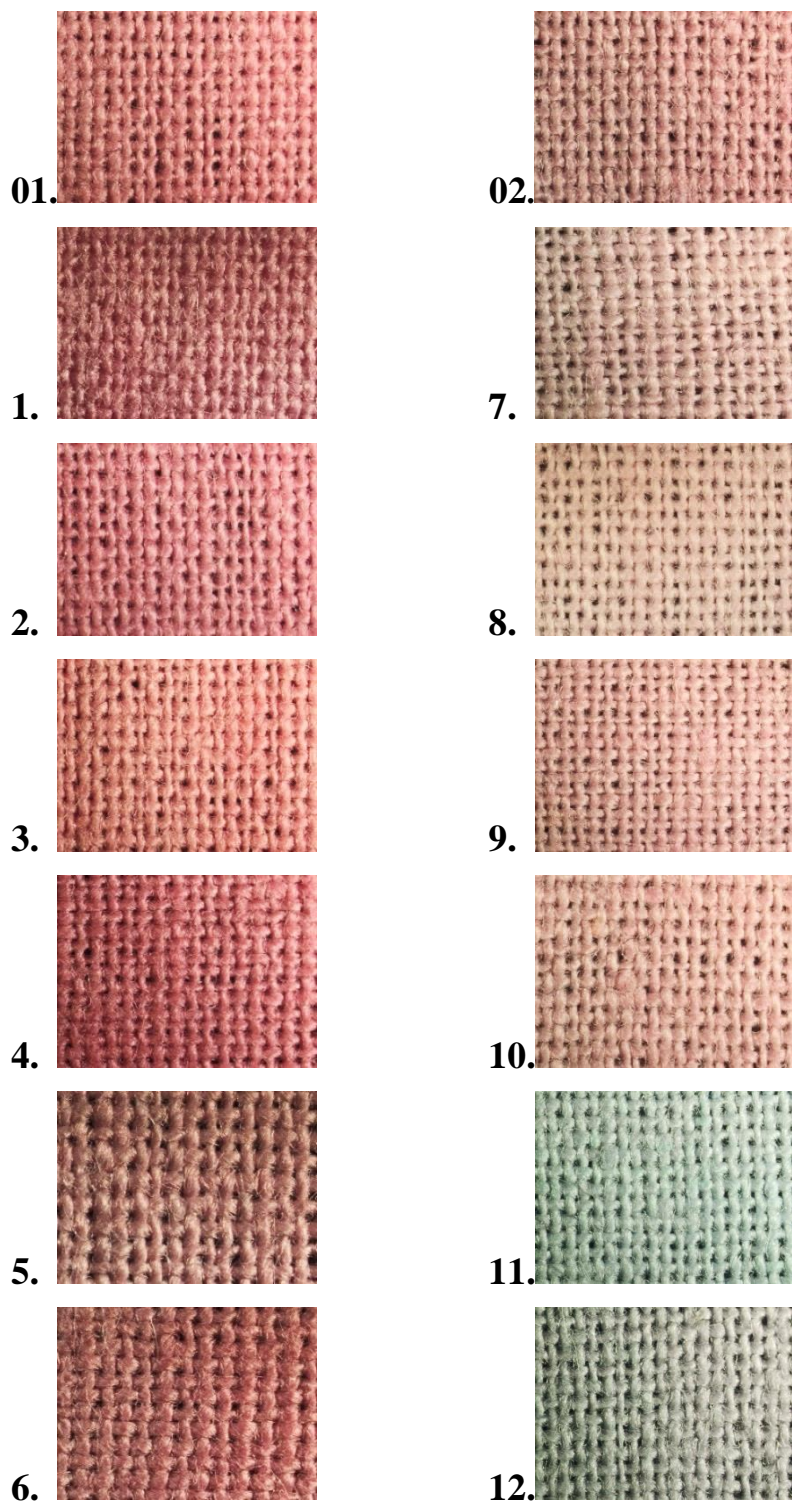


Figura 14. Imagini de microscopie optică a suporturilor textile vopsite cu extract de *Hibiscus*.

De asemenea, după realizarea vopsirilor cu extractul natural de bujor de grădină, s-au realizat analize spectroscopice FT-IR pentru identificarea prezenței grupărilor funcționale caracteristice în substratele celulozice și extractul de bujor de grădină, unde au fost identificate diferite benzi de absorbție.

Rezultatele modificărilor de culoare măsurate prin sistemul CIELAB pentru diferențele de coordonate cromatice ale epruvetelor vopsite cu extract de bujor de grădină au arătat că valorile luminozității (L^*) și diferențele de culoare (ΔE^*) s-au schimbat în raport cu tipul de mordant utilizat în procesul de vopsire al probelor de bumbac.

Imaginile de microscopie optică a probelor de bumbac vopsit cu extracte de bujor de grădină, prin diferite metode, în prezența sau absența mordanților (acid citric 1 și 3%, acid tanic 1 și 3% și sulfat de cupru 1 și 3%) sunt prezentate în Figura 15.

Rezistențele la spălare a probelor de bumbac vopsite cu extract de bujor de grădină obținut prin diferite procese s-au evaluat prin comparație cu probele martor, vopsite și netratate cu mordant. În general, rezistențele la spălarea cu soluție de săpun (5g/l) a probelor din studiul prezent prezintă valori medii, cuprinse între 2 și 4.

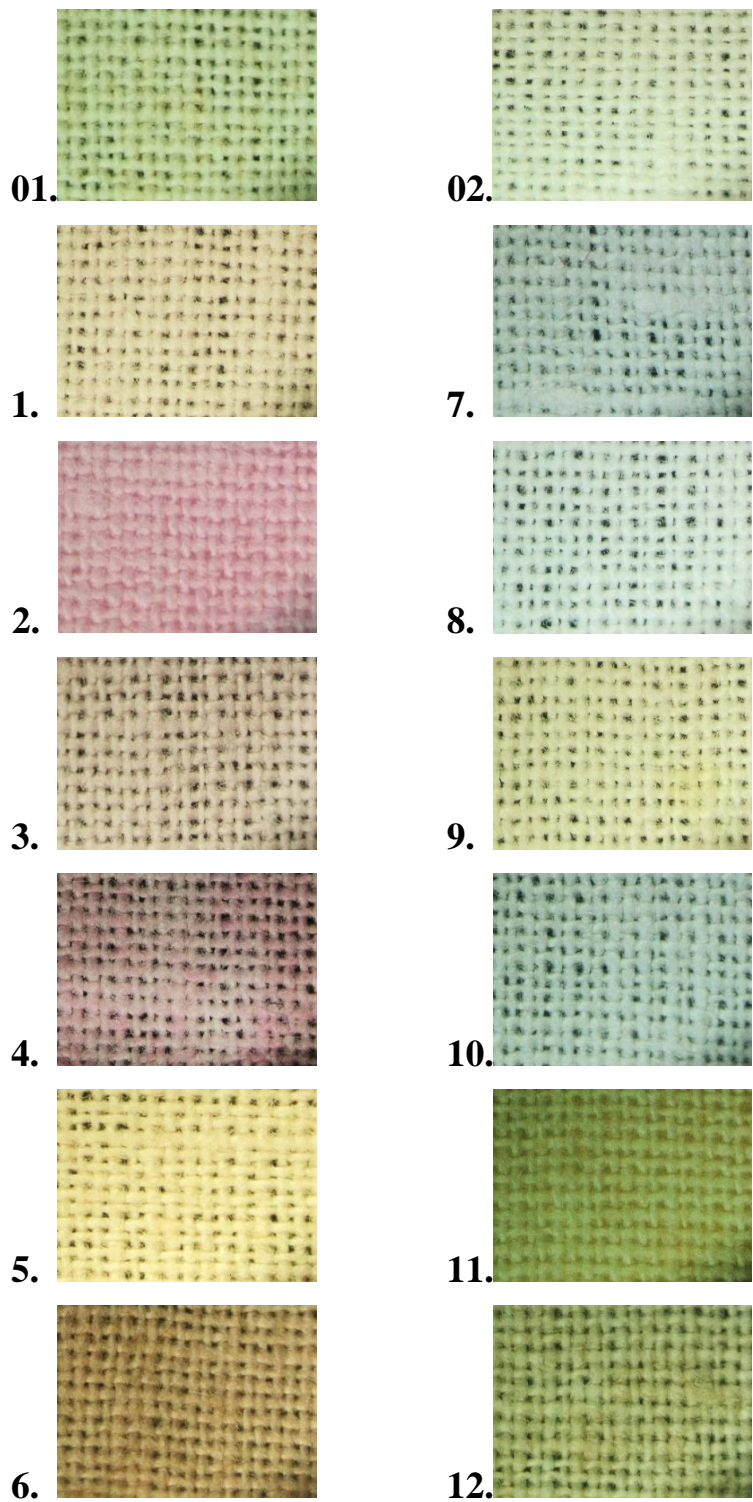


Figura 15. Imagini de microscopie optică a probelor de material textil vopsit prin diferite metode cu extract de bujor de grădină.

6. BIBLIOGRAFIE

1. Abel, A., *The history of dyes and pigments: From natural dyes to high performance pigments, Colour Design Theories and Applications*, 2nd edition, in Best, J., eds., UK, (2017).
2. Carochi, M., Barreiro, M., F., Morales, P., Ferreira, I., C., F., R., Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 13, pp. 377-399, (2015).
3. Chandravanshi, S., Upadhyay, S., K., Interaction of natural dye (*Allium cepa*) with ionic surfactants, *Journal of Chemistry*, Vol. 2013, pp. 1-6, (2013).
4. Cowan, M., M., Plant products as antimicrobial agents, *Clinical Microbiology Review*, Vol. 12, pp 564-582, (1999).
5. Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., Heinrich, M., *Hibiscus sabdariffa* L. - a phytochemical and pharmacological review, *Food Chemistry*, Vol. 165, pp. 424-443, (2014).
6. Davidov-Pardo, G., Iñigo, A., Marín, R., Kinetics of thermal modifications in a grape seed extract, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 59, pp. 7211-7217, (2011).
7. Dienaitė, L., Pukalskienė, M., Pukalskas, A., Pereira, C., V., Matias, A., A., Venskutonis, P., R., Isolation of strong antioxidants from *Paeonia officinalis* roots and leaves and evaluation of their bioactivities, *Antioxidants*, Vol. 8, pp. 249, (2019).
8. Działo, M., Mierziak, J., Korzun, U., Preisner, M., Szopa, J., Kulma, A., The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 16, (2016).
9. Haddar, W., Ticha, M., B., Guesmi, A., Khoffi, F., Durand, B., A novel approach for a natural dyeing process of cotton fabric with *Hibiscus Mutabilis* (Gulzuba): Process development and optimization using statistical analysis, *Journal of Cleaner Production*, Vol. 68, pp. 114-120, (2014).
10. Kalcheva-Karadzova, K., Shikov, V., Mihalev, K., Dobrev, G., Ludneva, D., Penov, N., Enzyme-assisted extraction of polyphenols from rose (*Rosa damascena* mill.) petals, *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: FOOD TECHNOLOGY*, Vol. 18, (2014).
11. Khoddami, A., Wilkes, M., A., Roberts, T., H., Techniques for analysis of plant phenolic compounds, *Molecules*, Vol. 18, pp. 2328-2375, (2013).
12. Kruskal, W., Wallis, W., A., Use of ranks in one-criterion variance analysis, *Journal of the American Statistical Association*, Vol., 47, no. 260, pp. 583-621, (1952). Martínez, A., Vegara, S., Herranz-López, M., Marti, N., Valero, M., Micol, V., Saura, D., Kinetic changes of polyphenols, anthocyanins and antioxidant capacity in forced aged hibiscus ale beer, *Journal of Institute of Brewing*, Vol. 123, pp. 58-65, (2017).
13. McMichael, A., J., Beaglehole, R., The changing global context of public health, *Lancet, Public health*, Vol. 36, pp 495-499, (2000).
14. Mori, K., Goto-Yamamoto, N., Kitayama, M., Hashizume, K., Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature, *Journal of Experimental Botany*, Vol. 58, no. 8, pp. 1935-1945, (2007).
15. Moța, C., Roșu, A., Câmpeanu, Gh., *Compuși bioactivi de origine vegetală. Abordări biotehnologice*. Ed. Universității București, (2016).
16. Nollet, L., M., L., Antioxidant and neuroprotective properties of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*, calyx) and green tea (*Camellia sinensis*) on some prooxidant-induced lipid peroxidation in brain in vitro, *Food Biophysics*, Vol 3, no. 4, pp. 382-389, (2008).
17. Oancea, S., Oprean, L., Anthocyanins, from biosynthesis in plants to human health benefits, *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: FOOD TECHNOLOGY*, Vol. 9, no. 1, pp. 3-7, (2011).
18. Oancea, S., Drăghici, O., pH and thermal stability of anthocyanin-based optimised extracts of Romanian red onion cultivars, *Czech Journal of Food Sciences*, Vol. 31, pp. 283-291, (2013). Oancea, S., Grosu, C., Effect of *Vaccinium myrtillus* anthocyanin extract on lipid oxidation in cod liver oil, *Romanian Biotechnological Letter*, Vol. 18, no. 1, pp: 7897-7902, (2013).
19. Oancea, S., Grosu, C., Ketney, O., Stoia, M., Oxidative stabilisation of rapeseed oil with synthetic α -tocopherol and anthocyanin extracts of blackberry, bilberry and sweet cherry fruits, *Oxidation Communications*, Vol. 38, pp., 77-84, (2015).
20. Oliver, B., Medicinal plants in Nigeria, *Nigerian College of Arts, Science and Technology*, pp. 16, (1960).
21. Ozcan, T., Akpınar-Bayizit, A., Yilmaz-Ersan, L., Delikanli, B., Phenolics in Human Health, *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, Vol. 5, pp. 393-396, (2014).
22. Sindi, H., A., Marshall, L., J., Morgan, M., R., A., Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of *Hibiscus sabdariffa*, *Food Chemistry*, Vol. 164, pp. 23-29, (2014).

23. Wang, L.-S., Shiraishi, A., Hashimoto, F., Aoki, N., Shimizu, K., Sakata, Y., Analysis of petal anthocyanins to investigate flower coloration of Zhongyuan (Chinese) and Daikon Island (Japanese) tree peony cultivars, *Journal of Plant Research*, Vol. 114, pp. 33-43, (2001).
24. Wang, T., Jonsdottir, R., Kristinsson, H., G., Hreggvidsson, G., O., Jonsson, J., T., Thorkelsson, G., Olafsdóttir, G., Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from red algae *Palmaria palmata*, *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 43, pp. 1387-1393, (2010).

7. CONCLUZII GENERALE, CONTRIBUȚII ORIGINALE, RECOMANDĂRI ȘI DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE

CONCLUZII GENERALE

Prezentul studiu de cercetare al tezei a presupus realizarea unor ipoteze, testarea acestora prin realizarea unor serii experimentale, îmbunătățirea proceselor de extracție prin modificarea parametrilor de proces și aplicația practică. Rezultatele obținute au permis realizarea unor interpretări și modelări matematice prin care se pot formula următoarele concluzii:

- Identificarea condițiilor optime de extracție a compușilor bioactivi prin testarea diferiților parametri experimentali. Extracția s-a realizat prin utilizarea unor “tehnologii verzi” bazate pe utilizarea unor solvenți “prietenosi” cu mediul (apa, soluții etanoliche), având în vedere scopul aplicativ al extractelor finale obținute.
- Prelucrarea inițială a probelor are efect pozitiv asupra conținutului de compuși bioactivi cu structură polifenolică obținut în urma extracțiilor din petalele de bujor, prin facilitarea extracției. Mărunțirea materialului vegetal uscat facilitează extracția prin creșterea suprafeței de contact între materialul vegetal și solventul de extracție, astfel randamentul de extracție este mai mare.
- În urma studiului comparativ al eficienței extractive a antocianilor din petalele de *Hibiscus sabdariffa* utilizând cele două tehnici, extracția asistată de ultrasunete și extracția prin macerare, cea din urmă s-a dovedit mai puțin eficientă. Între cele două metode aplicate, au existat diferențe semnificative statistice. Metoda de extracție asistată de ultrasunete poate prezenta avantaje din punct de vedere economic.
- Pentru seria de experimente de extracție prin macerare utilizând două tipuri de solvenți, conținutul de antociani extrași cu etanol 70% acidifiat 1% cu acid acetic, valoarea medie obținută a fost cu 19,21% mai mare, comparativ cu probele în care extracția s-a realizat cu apă acidifiată 1% cu acid acetic.
- Pentru seria de experimente de extracție asistată de ultrasunete utilizând cele două tipuri de solvenți, valoarea medie a conținutului de antociani extrași cu apă acidifiată 1% cu acid acetic a fost cu 2,33% mai mare comparativ cu probele unde s-a utilizat etanol 70% acidifiat 1% cu acid acetic.

- În urma rezultatelor obținute pe *Hibiscus* privind studiul influenței metodei de extracție, a tipului de solvent, raportului solvent/solid, a timpului de extracție și a amplitudinii undelor ultrasonice asupra conținutului de pigmenți antocianici, s-au identificat condițiile optime de extracție.
- Deși prin utilizarea etanolului acidifiat s-au obținut valori mai mari ale conținutului de antociani comparativ cu cele rezultate din utilizarea apei acidifiata, interpretarea statistică a datelor arată faptul că nu există diferențe semnificative statistic între cele două tipuri de solvenți utilizați.
- În ceea ce privește studiul influenței parametrilor de extracție prin macerare a unor compuși bioactivi din petalele de bujor comun (*Paeonia officinalis*), și anume tipul de solvent, raportul solvent/solid, temperatura de extracție și timpul de extracție, pentru extracția eficientă a compușilor polifenolici, s-au identificat condițiile optime de extracție.
- În cazul extracției asistate de ultrasunete compușilor bioactivi din petalele de bujor, prin testarea tipului de solvent, raportului solvent/solid, timpului de extracție și amplitudinii undelor ultrasonice s-au stabilit condițiile optime de extracție.
- Dezvoltarea unei metode moderne extractive eficiente care combină extracția asistată de ultrasunete cu tehnologia bazată pe enzime, pentru obținerea unor cantități mari de compuși bioactivi cu activitate antioxidantă din sursele vegetale de interes în prezentul studiu.
- Rezultatele obținute din petalele de *Hibiscus* și bujorul roșu de grădină prin aplicarea acestei metode combinate arată un conținut mediu de compuși bioactivi cu structură polifenolică mai mare obținute pentru ambele tipuri de material biologic analizat, evidențiind eficiența metodei de extracție asistată de ultrasunete precedată de tratamentul enzimatic cu celulază.
- Pentru extracția compușilor biologic activi cu structură polifenolică din *Hibiscus sabdariffa* – Hibiscus, valorile medii ale conținutului de antociani obținute cu pre-tratament enzimatic au fost mai mari comparativ cu cele ale probelor. Totuși, diferențele nu sunt semnificative din punct de vedere statistic.
- Pentru extracția compușilor biologic activi cu structură polifenolică din *Paeonia officinalis* – bujorul comun de grădină, valorile medii ale compușilor bioactivi cu

structură polifenolică obținute au fost mai mari în cazul extracției asistate de enzime combinate cu cea asistată de ultrasunete, comparativ cu ale probelor martor.

- De asemenea studiul a urmărit și testarea *in vitro* a activității antioxidante a extractelor obținute prin metoda combinată de extracție, asistată de enzime + ultrasunete. Astfel, pentru probele la care extracția a fost precedată de tratamentul enzimatic, activitatea antioxidantă prin metoda FRAP este semnificativ mai mare față de cea pentru probele martor, pentru ambele tipuri de flori studiate.
- Investigarea stabilității oxidative a unui ulei alimentar de interes (uleiul de cânepă) în prezența extractului antocianic de *Hibiscus* și respectiv de bujor de grădină s-a realizat utilizând metode clasice și moderne de analiză (CG-MS, Ip, FTIR, DSC).
- Extractul de *Hibiscus* a condus la o stabilitate termo-oxidativă îmbunătățită la 60°C, timp de 9 zile a uleiului de cânepă comparativ cu probele de ulei martor (netratat) și cele tratate cu α -tocoferol.
- Rezultatele analizei GC-MS privind nivelul acizilor grași saturați, mononesaturați și polinesaturați din probele de ulei de cânepă arată diferențe între probele tratate cu antioxidanți și cele netratate. S-a înregistrat o creștere a acizilor grași saturați cu până la 92% pentru probele martor și o scădere a acestora cu 16,5% pentru probele tratate cu extract de *Hibiscus*, indicând eficiența adaosului de antioxidant natural din petale de *Hibiscus*. Creșteri ale nivelului acizilor grași mononesaturați cu 50,66% s-au înregistrat în cazul probelor tratate cu extract de *Hibiscus* comparativ cu probele de ulei tratate cu α -tocoferol.
- Rezultatele analizei indicelui de peroxid indică o eficiență ridicată a extractului de *Hibiscus* adăugat în uleiul de cânepă comparativ cu proba martor, de protejare împotriva oxidării primare a lipidelor; mai mult, după 2 zile de oxidare accelerată la 60°C, α -tocoferolul a dovedit un efect pro-oxidant.
- Rezultatele analizei termice prin tehnica DSC, a parametrilor cinetici (Ea) ai procesului de degradare termică a probelor de ulei confirmă rezultatele precedente privind eficiența extractului de *Hibiscus* în protejarea uleiului de cânepă împotriva termo-oxidării testate la 60°C.
- Testarea extractului de *Hibiscus* în tehnologiile textile de vopsire ecologică a țesăturilor de bumbac, în prezența și absența mordanților metalici (CuSO₄) și a biomordanților

(acidul citric, acidul tanic) a dus la obținerea unor probe vopsite în diferite nuanțe, fiind evaluate prin măsurători de culoare și teste de spălare standard. Rezultatele indică diferențe de culoare ale probelor vopsite cu extract natural (ΔE^*) în funcție de diferitele condiții ale procesului de vopsire. Spectrele FT-IR confirmă vopsirea cu extract natural, prin identificarea benzilor caracteristice ale diferitelor grupări funcționale.

- Vopsirea țesăturilor de bumbac cu extractul de bujor roșu de grădină prin două procedee, convențional și ne-convențional, în prezența și absența mordantului clasic și a biomordanților a fost confirmată prin spectrele FT-IR, prin prezența benzilor caracteristice ale diferitelor grupări funcționale. Caracteristicile cromatice ale substraturilor celulozice vopsite, determinate în sistemul CIELAB, au arătat valori mai mari ale coordonatei de roșu (a^*) și diferențe pozitive mari de intensitate a culorii (ΔC^*) pentru probele vopsite prin epuizare în prezența unei concentrații mai mari de acid citric (3%). Diferențe mari de culoare (ΔE^*) au fost observate pentru probele vopsite ecologic în prezența unei concentrații mari de sulfat de cupru (3%), urmate de probele vopsite în prezența acidului citric și a acidului tannic folosind ambele tipuri de vopsire.

CONTRIBUȚII ORIGINALE

Prin prezenta lucrare de cercetare s-au adus contribuții importante la nivel teoretic, experimental și aplicativ în domeniul extractelor naturale din petale de plante larg cultivate, cu potențial de a se constitui în produse valoroase pentru dezvoltarea unor produse alimentare îmbogățite sau a unor pigmenți utilizați în vopsirile textile ecologice:

- Contribuții la îmbogățirea bazei teoretice de cunoștințe privind potențialul bioactiv și extractiv al plantelor de interes studiului de cercetare prin identificarea claselor de compuși bioactivi prezenți în petalele speciilor studiate.
- Studii asupra principalelor tehnici de extracție, convenționale și neconvenționale, a compușilor de tip polifenolic, asupra potențialului antioxidant și de colorare a extractelor din plantele de interes din prezentul studiu de cercetare doctorală.
- Cercetări privind influența tipului de extracție (macerare, extracție asistată de ultrasunete, tehnologii bazate pe utilizarea enzimelor) și a parametrilor de extracție a compușilor bioactivi de tip polifenolic din petalele de Hibiscus și bujorul roșu de grădină.

- Studii privind condițiile optime de extracție pentru fiecare specie în parte, modelarea matematică a datelor din experimentele de extracție.
- Caracterizarea proprietăților antioxidante ale bioextractelor obținute, atât prin metode clasice (FRAP, DPPH) cât și prin introducerea acestora într-un sistem lipidic pe bază de ulei de cânepă.
- Îmbunătățirea stabilității oxidative a uleiului de cânepă prin adaos de extract de Hibiscus; caracterizarea procesului degradativ cu ajutorul tehnicilor analitice moderne (spectrofotometrice, GC-MS, FT-IR).
- Utilizarea extractului de bujor roșu de grădină în tehnologiile ecologice de vopsire a țesăturilor de bumbac, prin metode clasice (epuizare) și moderne (ultrasonare), în prezența și absența mordanților metalici și biomordanților; caracterizarea prin determinări de culoare și rezistența la spălare prin teste standard.

RECOMANDĂRI ȘI DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE

Principalele direcții de studiu de continuare a cercetărilor în domeniu sunt:

- extinderea cercetărilor experimentale pentru alte materii prime vegetale, alimentare sau medicinale, din surse sustenabile;
- cercetări asupra mecanismelor de acțiune ale extractelor naturale în sistemele evaluate;
- extinderea cercetărilor aplicative ale extractelor naturale asupra altor tipuri de produse alimentare și altor suporturi textile.

LISTA PUBLICAȚILOR REZULTATE ÎN URMA CERCETĂRII DOCTORALE, PUBLICATE SAU ACCEPTATE SPRE PUBLICARE

Articole publicate/ acceptate spre publicare în reviste cotate ISI cf. WoS:

1. Oancea, S., **Perju, M.**, Olosutean, H., Influence of enzyme-aided extraction and ultrasonication on phenolics content and antioxidant activity of *Paeonia officinalis* L. petals, *Journal of the Serbian Chemical Society*, Vol. 85, pp. 1-12, 2020, DOI: <https://doi.org/10.2298/JSC1908071200>
2. Oancea, S., Drăghici, O., **Perju, M.**, Dulf, Francisc V., Effect of roselle extract on the oxidative stability of hempseed oil, *Journal of Food and Nutrition Research*, Vol. 59, nr. 2, pp. 98–107, 2020.
3. Oancea, S., **Perju, M.**, Coman, D., Olosutean, H., Optimization of conventional and ultrasound-assisted extraction of *Paeonia officinalis* anthocyanins, as natural alternative for a green technology of cotton dyeing, *Romanian Biotechnological Letters*, acceptat 2020, <https://www.rombio.org/>

Articole publicate în Proceedings ISI (indexate WoS):

1. **Perju, M.**, Coman, D., Oancea, S., An experimental study on conventional and ultrasound-assisted extraction of *Hibiscus* anthocyanins for eco-dyeing of cotton substrates, Proceedings of the 19th International Multidisciplinary Scientific Geoconference SGEM 2019, Conference Proceedings, Vol. 19, issue 6.1, pp. 523-533, section Advances in Biotechnology, 2019, Albena, Bulgaria, <https://www.sgem.org/index.php/elibrary?view=publication&task=show&id=6418>
2. Bibicu, M., **Perju, M.**, Olosutean, H., Oancea, S., The influence of UV-C radiation on anthocyanins recovery from *Hibiscus sabdariffa* flower and *Ribes nigrum* fruit extracts, 17th INTERNATIONAL MULTIDISCIPLINARY SCIENTIFIC GEOCONFERENCE SGEM 2017: ADVANCES IN BIOTECHNOLOGY, SGEM2017 Vienna GREEN Conference Proceedings, 2017, Vol. 17, Issue 63, pp. 381-388; DOI: 10.5593/sgem2017H/63/S25.049
<https://www.sgem.org/sgemlib/spip.php?article11256&lang=en>

Articole publicate în reviste de specialitate indexate BDI/ SCOPUS:

1. Oancea, S., **Perju, M.**, Influence of enzymatic and ultrasonic extraction on phenolics content and antioxidant activity of *Hibiscus sabdariffa* L. flowers”, *Bulgarian Chemical Communications*, Vol. 52, issue D, 2020, <http://www.bcc.bas.bg/>

Lucrări publicate în volumele conferințelor naționale/ internaționale:

1. **Perju, M.**, Oancea, S., Valorisation of some indigenous plant extracts for industrial applications, Proceedings of the International Conference "Agri-Food Sciences, Processes and Technologies" AGRI-FOOD 2017 – Agriculture and Food for the XXI Century, May 11-13, 2017, Sibiu, Romania, pp. 7-15, 2017. ISSN 1843-0694 <http://saiapm.ulbsibiu.ro/index.php/agri-food-2017>
2. Radu, M., **Perju, M.**, Oancea, S., Valorificarea unor deșeuri hortice prin extracția de compuși biologic activi, Conferința națională studențească “Provocări și oportunități privind valorificarea deșeurilor agro-alimentare”, Sibiu, 17-18 mai 2018. <http://saiapm.ulbsibiu.ro/index.php/2018/03/13/conferinta-nationala-studenteasca-provocari-si-oportunitati-privind-valorificarea-deseurilor-agro-alimentare/>

Brevete de invenție (propunere OSIM):

1. Oancea, R., S., Drăghicil, O., **Perju, M.**, Procedeu de obținere a uleiului de cânepă îmbogățit cu extract de *Hibiscus*, rezistent la degradarea termo-oxidativă, propunere de brevet OSIM, Nr. Cerere de brevet invenție A/01008, din 29.11.2018; Premiat la *Salonul internațional al cercetării științifice, inovării și inventicii “PRO-INVENT” 2019*, ediția XVII, Cluj-Napoca.

Membru în proiect de cercetare-dezvoltare:

1. Membru în proiectul de cercetare-dezvoltare PN-III-P2-2.2-CI-2018-1401, ”Hempseed oil enriched with *Hibiscus* extract, innovative product resistant to oxidative degradation”, 2018-2019, director de proiect prof. univ. dr. habil. Simona Oancea.