

CAPITOLUL VII. TEHNOLOGII DE STABILIZARE A PRODUSELOR LIPIDICE CU EXTRACTE VEGETALE LIPOSOLUBILE

Violina POPOVICI, Tatiana CAPCANARI, Rodica STURZA, Aliona GHENDOV-MOȘANU, Iurie SUBOTIN, Raisa DRUȚĂ

Oxidarea lipidelor este una dintre cauzele majore ale deteriorării calității în alimentele naturale și procesate. Deteriorarea oxidativă este o mare preocupare economică în industria alimentară, deoarece afectează multe caracteristici de calitate, cum ar fi aroma, culoarea, textura și valoarea nutrițională a alimentelor, compuși potențial toxici.

Prođușii oxidării fac produsele lipidice mai puțin acceptabile sau inacceptabile pentru consumatori sau pentru uz industrial ca ingredient alimentar. Oxidarea distruge, de asemenea, acizii grași esențiali și produce compuși toxici și polimeri oxidați. Oxidarea produselor lipidice este foarte importantă în ceea ce privește gustul, calitatea nutrițională și toxicitatea produselor lipidice comestibile. Diferite mecanisme chimice, autoxidarea și fotooxidarea, sunt responsabile de oxidarea produselor lipidice comestibile în timpul procesării și depozitării, în funcție de tipurile de oxigen. Două tipuri de oxigen pot reacționa cu uleiurile comestibile: oxigenul triplet atmosferic, $^3\text{O}_2$ și oxigenul singlet, $^1\text{O}_2$. $^3\text{O}_2$ atacă catenele hidrocarbonate lipidice și provoacă autoxidarea, care este o reacție în lanț a radicalilor liberi.

Hidroxitoluenul butilat (BHT), hidroxianisolul butilat (BHA), terț-butilhidrochinona (TBHQ) și α -tocoferolul, sunt cei mai des utilizați antioxidanți în industria alimentară pentru a preveni oxidarea acizilor grași polinesaturați (PUFA) [1]. Cu toate acestea, antioxidanții scad treptat din favoarea consumatorilor dacă sunt de natură sintetică [2]. Incapsularea poate proteja în mod eficient PUFA-urile împotriva oxidării.

Cercetătorii au stabilit faptul că antioxidanții naturali și sintetici oferă o protecție variabilă împotriva oxidării uleiurilor vegetale induse de lumină, unde antioxidanții sintetici oferă o protecție mai bună pe toată perioada de tratament și depozitare [3].

Uleiurile comestibile conțin în mod natural antioxidanți precum tocoferoli, tocotrienoli, carotenoizi, compuși fenolici și steroli. Antioxidanții sunt uneori adăugați în mod intenționat în ulei pentru a îmbunătăți stabilitatea oxidativă. Antioxidanții sunt compuși care prelungesc perioada de inducție a oxidării sau încetinesc rata de oxidare. Antioxidanții elimină radicalii liberi, cum ar fi radicalii lipidici alchil sau radicalii peroxi lipidici, controlul metalelor de tranziție, inhibarea oxigenului singlet și inactivarea sensibilizatorilor. Antioxidanții pot dona atomi de hidrogen radicalilor liberi, convertindu-i în produse non-radicale mai stabile [4].

Substanțele biologice active sunt necesare organismului în cantități moderate pentru funcționarea optimă, întrucât puține dintre ele sunt sintetizate în corp, este nevoie de un aport continuu de produse naturale care să satisfacă aceste nevoi [5]. Fabricația produselor funcționale cu compuși biologic activi de origine naturală este mai mult decât actuală pentru industria alimentară [6].

Scopul acestui studiu a fost de a evalua efectul stabilizator al extractelor liposolubile din cătină, păducel și măceșe asupra uleiului de floarea soarelui și produselor alimentare cu conținut lipidic sporit. A fost efectuată o analiză a produselor și mecanismelor de oxidare a uleiului de floarea soarelui. Aceasta a inclus determinarea modificărilor chimice care apar în procesul oxidării forțate a lipidelor și a evoluției parametrilor de stabilitate a produselor cu conținut lipidic sporit îmbogățite cu extracte liposolubile, stabilirea condițiilor optime pentru obținerea extractelor liposolubile din fructe de pădure, analiza evoluției indicatorilor de stabilitate a uleiurilor stabilizate pe parcursul a 12 luni, modelarea matematică a proceselor de oxidare și stabilirea factorilor de influență.

Drept sursă de antioxidanți naturali a fost utilizată materia primă vegetală autohtonă, recoltată în nordul Republicii Moldova, Complexul natural Rudi-Arionești în anii 2017-2019, și anume:

- cătină (*Hippophae rhamnoides* L.), ISO 4125:1991;

- păducel (*Crataegus*), HG 1523, 2007;
- măceșe (*Rosa Canina* L.), ISO 23391:2006.

Fructele de pădure au fost uscate la 65 ± 1 °C până la un conținut de umiditate de $6,8 \pm 0,4\%$, măcinate fin și cernute. Pentru obținerea extractelor liposolubile a fost folosit ulei de floarea soarelui rafinat și dezodorizat „Floris” (Bălți, Republica Moldova).

Extractele liposolubile au fost obținute prin metoda descrisă de Ghendov-Moșanu et al. [7]. Toate extracțiile au fost efectuate în triplicate.

Conținutul total de carotenoide, conținutul de acid *L*-ascorbic, conținutul total de polifenoli, activitatea antioxidantă au fost determinate conform metodelor descrise de Popovici et.al [8]. Toate determinările au fost efectuate în triplicate.

Determinarea activității antioxidante a compușilor biologic activi în condițiile digestiei gastro-intestinale *in vitro* s-a realizat conform metodei descrise de Pavan et. al [9].

Indicatorii de calitate a uleiurilor vegetale (indice de aciditate - IA, indice de peroxid - IP, indice de *p*-anisidină - Ip-A, diene și triene conjugate - DC și TC) au fost analizați prin metode descrise de Popovici et. al. [10,11].

Cercetarea parametrilor de culoare CIELab a extractelor liposolubile a fost efectuată conform metodei descrise de Tesfaye et. al. [12].

Identificarea produșilor oxidării lipidice s-a realizat prin spectrometria de masă tandem LC-MS/MS. Metoda aplicată v-a permite identificarea produselor oxidării lipidice atât cu masă moleculară mare cât și a produselor oxidării lipidice cu masă moleculară mică [13–16].

Analiza statistică a rezultatelor a fost realizată prin programul Microsoft Office Excel, versiunea 2010. Toate testele au fost efectuate în triplicate, la temperatura camerei de 20 ± 1 °C. Rezultatele experimentale sunt exprimate ca media \pm SD (abaterea standard).

7.1. Cercetarea caracteristicilor fizico-chimice și a potențialului antioxidant a uleiurilor îmbogățite cu extracte liposolubile

Stabilitate oxidativă este rezistența uleiurilor la oxidare în timpul procesării și depozitării [17]. Rezistența la oxidare poate fi exprimată ca perioada de timp necesară pentru a atinge punctul critic de oxidare, indiferent dacă este vorba de o schimbare senzorială sau de o accelerare bruscă a procesului oxidativ [18]. Stabilitatea oxidativă este un indicator important pentru a determina calitatea uleiului și durata de valabilitate [19] deoarece compușii cu masă moleculară scăzută (LPP) sunt produși în timpul oxidării.

Produșii oxidării fac uleiul mai puțin acceptabil sau inacceptabil pentru consumatori sau pentru uz industrial ca ingredient alimentar. Oxidarea uleiului distruge, de asemenea, acizii grași esențiali și produce compuși toxici și polimeri oxidați. Oxidarea uleiului este foarte importantă în ceea ce privește gustul, calitatea nutrițională și toxicitatea uleiurilor comestibile. Diferite mecanisme chimice, autoxidarea și fotooxidarea, sunt responsabile de oxidarea uleiurilor comestibile în timpul procesării și depozitării, în funcție de tipurile de oxigen. Două tipuri de oxigen pot reacționa cu uleiurile comestibile: oxigenul triplet atmosferic, $^3\text{O}_2$ și oxigenul singlet, $^1\text{O}_2$. $^3\text{O}_2$ atacă catenele hidrocarbonate lipidice și provoacă autooxidarea, care este o reacție în lanț a radicalilor liberi.

Fotooxidarea uleiurilor comestibile are loc în prezența luminii, a sensibilizatorilor și a oxigenului atmosferic, în care este produs $^1\text{O}_2$. Oxigenul electrofil nonradicalic reacționează ușor cu compuși cu densități mari de electroni, cum ar fi legăturile duble ale acizilor grași nesaturați. $^1\text{O}_2$ are o energie de 93,6 kJ deasupra stării fundamentale de $^3\text{O}_2$ [20]. $^1\text{O}_2$ cu energie ridicată în soluție este dezactivat prin transferul energiei sale în solvent, iar durata sa de viață depinde de solvent. Durata de viață a oxigenului singlet este de aproximativ 2,17 și 700 μs în apă, hexan și, respectiv, tetraclorură de carbon [21].

Oxidarea uleiurilor comestibile este influențată de un aport de energie, cum ar fi lumina sau căldura, compoziția acizilor grași, tipurile de oxigen și compuși minori, cum ar fi metalele, pigmenții, fosfolipidele, acizi grași, mono- și diacilgliceroli, compușii oxidați termic și

Ameliorarea calității și siguranței alimentelor prin biotehnologie și inginerie alimentară

antioxidanții. S-au făcut multe eforturi pentru a îmbunătăți stabilitatea oxidativă a uleiurilor prin studii sistematice asupra efectelor acestor factori.

7.2. Mecanismul oxidării lipidelor

Autoxidarea uleiurilor, reacția în lanț a radicalilor liberi, include etapele de inițiere, propagare și întrerupere (terminare) redate în Tabelul 7.1 **Error! Reference source not found.**

Tabelul 7.1

Mecanismul general de oxidare a lipidelor	
Inițiere	$RH \rightarrow R\cdot + H\cdot$
Propagare	$R\cdot + {}^3O_2 \rightarrow ROO\cdot$
	$ROO\cdot + RH \rightarrow ROOH + R\cdot$
Terminare	$ROO\cdot + R\cdot \rightarrow ROOR$
	$R\cdot + R\cdot \rightarrow RR$

Nota: R - lipid alchil.

Autooxidarea uleiurilor este condiționată de apariția radicalilor liberi ai acizilor grași sau ai acilglicerolilor. Acizii grași sau acilglicerolii se află în stări singulare nonradicale, iar reacția acizilor grași cu starea radicală a 3O_2 atmosferic este termodinamic nefavorabilă datorită conservării electronice a spinului [22,23]. Atomul de hidrogen din acizii grași sau din acilgliceroli este îndepărtat și radicalii alchil lipidici sunt produși în *etapa de inițiere*. Căldura, catalizatorii metalici și lumina ultravioletă și vizibilă pot accelera formarea radicalilor liberi de acizi grași sau acilgliceroli. Energia necesară pentru îndepărtarea hidrogenului din acizii grași sau din acilgliceroli depinde de poziția hidrogenului. Atomii de hidrogen din pozițiile alilice sunt scindați cu ușurință.

Tabelul 7.2

Hidroperoxizii acizilor grași formați la autooxidare [24,25]		
Acid gras	Poziția alilică a hidrogenului scindat	Cantitatea relativă, %
Acid oleic	C8	26-28
	C9	22-25
	C10	22-24
	C11	26-28
Acid linoleic	C9	48-53
	C13	48-53
	C9	28-35
Acid linolenic	C12	8-13
	C13	10-13
	C16	28-35

Hidrogenul de la C11 al acidului linoleic este îndepărtat la 50 kcal/mol. Energia necesară pentru îndepărtarea hidrogenului în C8 și C14 a acidului linoleic este de 75 kcal/mol și energia de disociere homolitică între hidrogen și C17 sau C18 este de aproximativ 100 kcal/mol [26]. După scindarea hidrogenului din poziția alilică favorabilă C11 se formează radicalul liber stabilizat prin efecte electromere. Hibrizii de rezonanță (Figura 7.1) explică schimbarea poziției legăturilor duble și formarea sistemelor conjugate. Odată cu schimbarea poziției, are loc și schimbarea configurației geometrice la legătura dublă din *cis*- în *trans*-. Autooxidarea acizilor linoleici și linolenici produce numai produse cu legături duble conjugate. Cantitatea izomerilor poziționali hidroperoxidici formați în autooxidarea acizilor oleici, linoleici și linolenici sunt prezentați în Tabelul 7.2.

Radicalul lipidic alchil format (cu legături duble conjugate) reacționează cu $^3\text{O}_2$ și formează un radical peroxid lipidic, un alt radical reactiv. Reacția dintre radicalul lipidic alchil și $^3\text{O}_2$ are loc foarte rapid la presiunea normală a oxigenului și, în consecință, concentrația radicalului lipidic alchil este mult mai mică decât cea a radicalului lipidic peroxidic [27,28]. Radicalul lipidic peroxidic extrage hidrogenul din alte molecule lipidice și reacționează cu hidrogenul pentru a forma hidroperoxid și un alt radical alchil lipidic. Acești radicali catalizează reacția de oxidare, iar autooxidarea este numită reacție în lanț a radicalilor liberi. Figura 7.1. prezintă formarea hidroperoxidului în autooxidarea acidului linoleic.

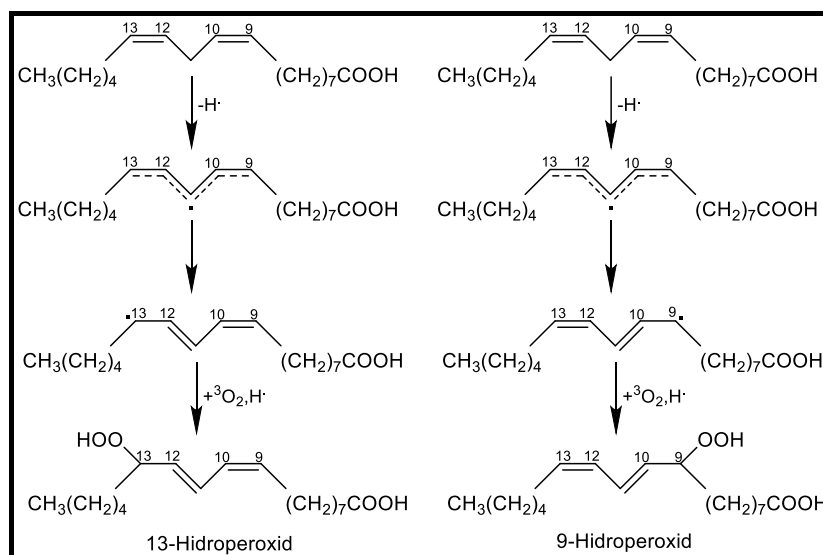


Figura 7.1 Formarea hidroperoxidului din acidul linoleic la autooxidare [28,29].

Ratele de formare a radicalului lipidic peroxidic și a hidroperoxidului depind doar de disponibilitatea oxigenului și temperatură [30]. Când radicalii reacționează între ei, se produc specii non-radicale și reacția se întrerupe. Produsele primare de oxidare, hidroperoxizii lipidici, sunt relativ stabile la temperatura camerei și în absența metalelor. Cu toate acestea, în prezența metalelor sau la temperaturi ridicate, acestea sunt ușor descompuse în radicali alcoxi și apoi formează aldehide, cetone, acizi, esteri, alcoolii și hidrocarburi cu catene scurte. Cea mai probabilă cale de descompunere a hidroperoxidului este un clivaj homolitic a legăturilor dintre atomii de oxigen, în rezultat sunt produși radicali alcoxi și hidroxi. Energia de activare pentru scindarea legăturii oxigen-oxigen este cu 46 kcal/mol mai mică decât cea pentru scindarea legăturii oxigen-hidrogen [25]. Radicalul alcoxi suferă apoi β -scisiunea homolitică a legăturii carbon-carbon și produce compuși oxo și radicali alchil saturați sau nesaturați, Figura 7.2. După rearanjarea electronică, adăugarea radicalului hidroxil sau transferul de hidrogen, ultimii produși secundari de oxidare a lipidelor sunt în mare parte aldehide cu greutate moleculară mică, cetone, alcoolii și hidrocarburi cu lanț scurt, așa cum se arată în Tabelul 7.3. Timpul pentru formarea produsului secundar din produsul principal de oxidare, hidroperoxidul, variază în funcție de diferite uleiuri. Produsele secundare de oxidare se formează imediat după formarea hidroperoxidului în uleiurile de măsline și rapiță. Cu toate acestea, în uleiurile de floarea-soarelui și de sofrânel, se formează produse secundare de oxidare atunci când concentrația de hidroperoxizi este apreciabilă [17].

Majoritatea produșilor de descompunere ai hidroperoxidului sunt responsabili pentru aroma rancedă din uleiul comestibil oxidat. Compușii carbonil alifatici au o influență mai mare asupra aromei uleiului oxidat datorită valorilor lor scăzute. Pragul de valori pentru hidrocarburi, alcanal, alca-2-enal și *trans*-alca-2,4-dienal sunt de la 90 la 2150; de la 0,04 la 1; de la 0,04 la 2,5 și respectiv de la 0,04 la 0,3 ppm [31]. Hexanal (23,5 %) și dec-2-enal (34,3%) și hept-2-enal (29,5 %) și *trans*-oct-2-enal (18,1 %), au fost principalii compuși volatili detectați prin metoda microextracției în fază solidă în uleiuri de soia și porumb (valoarea peroxidului de 5 $m_{\text{echiv O}_2/\text{kg}}$) [32].

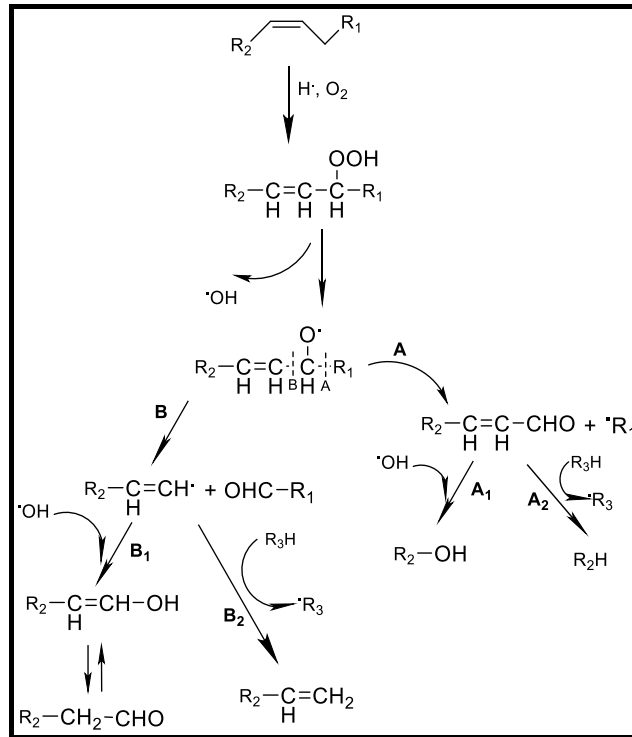


Figura 7.2 Mecanismul de descompunere a hidroperoxizilor și de formare a produșilor secundari [36].

Tabelul 7.3

Produsele secundare ale oxidării acizilor grași [36]

Clasa	Acid oleic	Acid linoleic	Acid linolenic
Aldehyde	Octanal	Pentanal	Propanal
	Nonanal	Hexanal	Butanal
	Dec-2-enal	Oct-2-enal	But-2-enal
		Non-2-enal	Pent-2-enal
		Deca-2,4-dienal	Hex-2-enal
			Nona-3,6-dienal
		Decatrienal	
Derivații acizilor carboxilici	Heptanoat de metil	Heptanoat de metil	Heptanoat de metil
	Octanoat de metil	Octanoat de metil	Octanoat de metil
	8-oxooctanoat de metil	8-oxooctanoat de metil	Nonanoat de metil
	9-oxononanoat de metil	9-oxononanoat de metil	9-oxononanoat de metil
	10-oxodecanoat de metil	10-oxodecanoat de metil	10-oxodecanoat de metil
	10-oxodec-8-enoat de metil		
	11-oxoundec-9-enoat de metil		
Alcoolii	Heptan-1-ol	Pentan-1-ol	
		Oct-1-en-3-ol	
Hidrocarburi	Heptan	Pentan	Etan
	Octan		Pentan

Pentanalul, hexanalul, propenalul și deca-2,4-dienal sunt prezenți în cantități mari în ulei de rapiță depozitat neacoperit la 60 °C [33]. Oamenii de știință au raportat că *trans*, *cis*-deca-2,4-dienal a fost cel mai semnificativ compus în determinarea aromei oxidate a uleiului, urmat de *trans*-deca-2,4-dienal, *trans*, *cis*-hepta-2,4-dienal, oct-1-en-3-ol, butanal și hexanal [31]. Indicii de hexanal, pentanal și deca-2,4-dienal au fost utilizați ca indicatori pentru a determina gradul de oxidare a uleiului [34,35].

S-a raportat că *trans*-hex-2-enal și *trans*-, *cis*-deca-2,4,7-trienal și oct-1-en-3-ona dau aromă de iarbă și de pește în ulei de soia oxidat, respectiv [25]. Niciun compus aromatic unic nu este în principal responsabil pentru aroma oxidată a uleiurilor vegetale.

Oxidarea uleiului este accelerată de lumină, în special în prezența sensibilizatorilor precum clorofilele. Sensibilizatorii în stare singlet absorb lumina foarte rapid, în picosecunde și devin excitați. Sensibilizatorii singlet excitați pot reveni la starea lor de bază prin emisie de lumină, conversie internă sau traversare intersistemică.

Fluorescența și căldura sunt produse prin emisia de lumină și, respectiv, prin conversie internă. Trecerea intersistemului are ca rezultat starea de triplet excitată a sensibilizatorilor. Sensibilizatorii triplet excitați pot accepta hidrogen sau un electron din substrat și pot produce radicali (tip I).

Sensibilizatorii triplet excitați reacționează cu $^3\text{O}_2$ și produc anion superoxid prin transfer de electroni. Anionul superoxid produce peroxid de hidrogen, una dintre speciile reactive de oxigen prin dismutație spontană, iar reacția peroxidului de hidrogen cu superoxizi are ca rezultat formarea oxigenului singlet prin reacția Haber-Weiss în prezența metalelor de tranziție precum fierul sau cuprul [37]. Când se formează hidroperoxidul, se produce migrarea dublei legături și formarea acidului gras *trans*-, producând atât hidroperoxizi conjugați, cât și neconjugați, așa cum se arată în Tabelul 7.4.

Tabelul 7.4

Hidroperoxizii acizilor grași formați prin oxidarea oxigenului singlet [36]

Acizi grași	Poziția alilică a hidrogenului scindat	Cantitatea relativă, %	Tipul de acid
Acid oleic	C9	48	
	C10	52	
Acid linoleic	C9	32	Conjugat
	C10	17	Neconjugat
	C12	17	Neconjugat
	C13	34	Conjugat
Acid linolenic	C9	23	Conjugat
	C10	13	Neconjugat
	C12	12	Conjugat
	C13	14	Conjugat
	C15	13	Neconjugat
	C16	25	Conjugat

Producerea de hidroperoxizi neconjugați nu este observată în autooxidare. Figura 7.3 prezintă calea de oxidare a acidului linoleic cu $^1\text{O}_2$.

Hidroperoxizii formați prin oxidarea $^1\text{O}_2$ sunt descompuși prin aceleași mecanisme ca și pentru hidroperoxizii formați prin $^3\text{O}_2$ în autooxidare. Oxidarea cu $^1\text{O}_2$ în acidul oleic produce mai mult dec-2-enal și octan, doi dintre produșii de descompunere ai hidroperoxizilor, decât o face autooxidarea [25].

Conținutul de octanal și 10-oxodecanoat în oleatul autooxidat a fost mai mare decât cel al oleatului oxidat de $^1\text{O}_2$. Hept-2-enal și but-2-enal au fost vizibili în acizii linoleici și linolenici $^1\text{O}_2$ -oxidați, în timp ce erau neglijabili în acizii linoleici și linolenici autooxidați. Heptenal s-a format numai în ulei de soia oxidat cu $^1\text{O}_2$ în prezența clorofilei și a luminii [38]. O aromă de fasole, care

este o aromă unică și nedorită în uleiul de soia cu o valoare scăzută a peroxidului, a fost o problemă la nivel internațional [39].

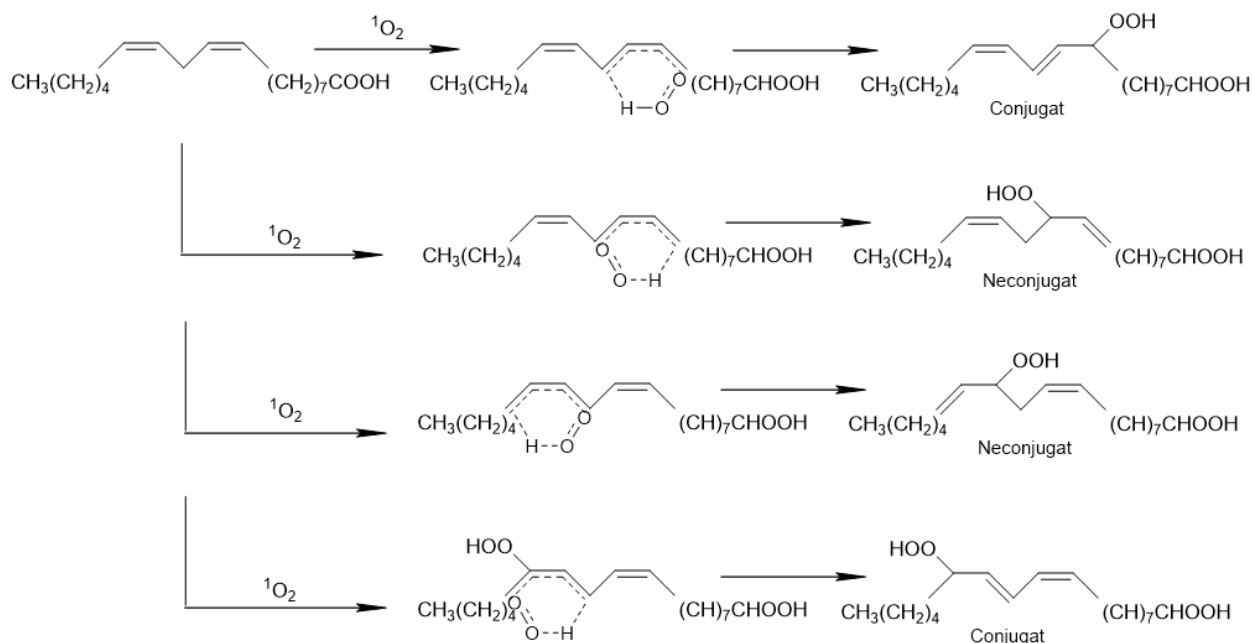


Figura 7.3 Mecanismul oxidării acidului linoleic cu oxigen singlet [30].

Cercetătorii au indicat cu tărie că aroma neplăcută a uleiului de soia poate fi redusă sau eliminată prin îndepărtarea clorofilor din ulei în timpul procesării. În prezent, industria uleiului de soia îndepărtează eficient clorofilele din uleiul de soia folosind materiale de înălbire în timpul procesului de rafinare, iar aroma de fasole nu mai este o problemă serioasă în uleiul de soia [38].

7.3. Caracteristica fizico-chimică a extractelor liposolubile din fructe de pădure

În extractele liposolubile de măceșe, cătină, păducel analizate a fost determinat spectrofotometric conținutul de clorofila α și β , β -caroten, licopen și zeaxantină.

Datele prezentate (Tabelul 7.5) denotă că extractele liposolubile de măceșe, păducel și cătină cercetate se caracterizează printr-un conținut bogat de carotenoide.

Tabelul 7.5

Evoluția conținutului de carotenoide în extracte liposolubile din fructe de pădure

Nr.	Conținut carotenoide	Durata de păstrare	ELM	ELC	ELP
1.	β -caroten, mg/L	0 luni	17,04±0,09	6,41±0,06	10,55±0,02
		3 luni	14,64±0,15	6,11±0,02	7,36±0,26
2.	Licopen, mg/L	0 luni	18,09±0,15	7,37±0,22	9,47±0,26
		3 luni	16,08±0,02	6,55±0,24	8,43±0,02
3.	Zeaxantină, mg/L	0 luni	19,08±0,15	7,18±0,39	8,24±0,02
		3 luni	16,39±0,33	6,84±0,15	8,15±0,15
4.	Clorofila α , mg/L	0 luni	1,81±0,01	3,30±0,04	0,85±0,01
		3 luni	1,21±0,01	3,09±0,04	0,64±0,01
5.	Clorofila β , mg/L	0 luni	3,01±0,04	4,82±0,04	1,12±0,01
		3 luni	2,24±0,03	3,77±0,03	1,03±0,01

Notă: rezultatele sunt prezentate ca medie \pm abatere standard; Notă: ELM – Extract liposolubil de măceșe; ELP – extract liposolubil de păducel; ELC – extract liposolubil de cătină.

Extract liposolubil de măceșe (ELM) conține o cantitate esențială de β -caroten (17,04 mg/L), pe când extract liposolubil de păducel (ELP) conține de 1,6 ori mai puțin și extract liposolubil de cătină (ELC) de 2,6 ori mai puțin. După o durată de păstrare de 3 luni conținutul de β -caroten a scăzut pentru ELM cu 15%, ELC cu 5 % și ELP cu 30 %. După 3 luni de stocare a extractelor liposolubile cantitatea de carotenoide s-a modificat neesențial datorită condițiilor de păstrare. Modificările cantitative de carotenoide pot avea loc datorită proceselor oxidative ce au loc pe parcurs, dar sunt încetinite în cazul în care extractele sunt păstrate în vase ermetice închise pentru a exclude accesul de oxigen, la temperaturi joase și în spații întunecate [40–42]. Conținutul de clorofilă β a scăzut pentru ELM cu 30 %, ELC cu 6 % și ELP cu 25 %. După o durată de păstrare de 3 luni conținutul de clorofilă α a scăzut pentru ELM cu 25%, ELC cu 22 % și ELP cu 8 %.

Conținutul de acid *L*-ascorbic în extractele liposolubile de cătină, păducel și măceșe au fost determinate prin metoda RP-HPLC. Pentru toate cele trei tipuri de extracte, valorile pentru acid *L*-ascorbic (Figura 7.4) au fost apropiate, de rezultatele raportate anterior de la alți cercetători și aceste diferențe pot fi atribuite condițiilor de cultivare, stării de maturitate, metodelor de extracție și determinare a acidului ascorbic [43]. Valorile obținute sunt pentru ELC–19,32±0,70 mg/100g plantă ; ELP-12,04±0,70 mg/100g plantă ; ELM–10,75±0,70 mg/100g plantă.

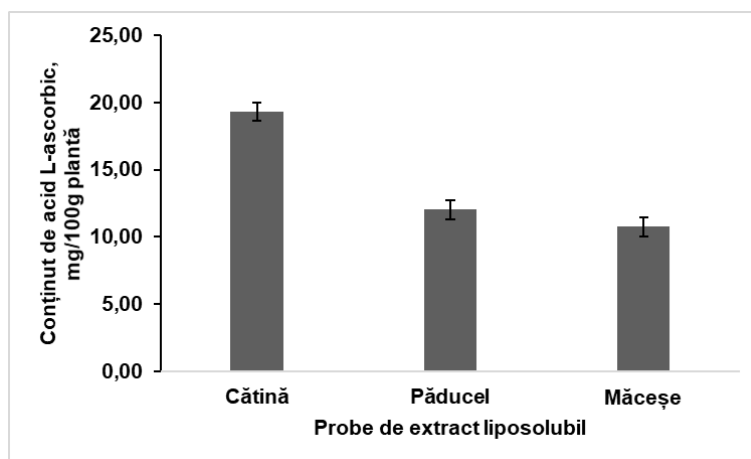


Figura 7.4 Conținutul de acid *L*-ascorbic în extracte vegetale cercetate

Polifenolii reprezintă metaboliți secundari caracterizați prin una sau mai multe grupări hidroxil care se leagă de unul sau mai multe inele aromatice [44]. Cantități impunătoare de compuși polifenolici au fost identificați în sursele horticoale, inclusiv în fructele de cătină, păducel, măceșe. După [7,45,46] concentrația totală de polifenoli determinată în fructele de cătină variază între 270,50 și 477,00 mg GAE/100 g plantă. Pentru fructele de păducel, conținutul total de polifenoli variază între 21,19 și 69,12 mg GAE/g [47]. Fructele de măceșe sunt caracterizate printr-un conținut de polifenoli ce variază între 534,5 și 575,0 mg GAE/100 g plantă [48].

În Figura 7.5 sunt prezentate rezultatele obținute pentru extractele din cătină, măceșe și păducel cercetate. Pentru ELC valorile obținute constituie 947,14 ± 12,0 mg AG/100 g plantă; ELP: 888,92±12,0 mg GAE/100 g plantă; ELM: 305,35±12,0 mg GAE/100 g plantă. Conținutul compușilor fenolici arată că fructele de pădure cercetate (cătină, păducel și măceșe) ar putea fi considerate o sursă foarte bună de compuși biologic activi în comparație cu alte specii de fructe.

Antioxidanții reprezintă substanțe care încetinesc sau opresc acțiunea dăunătoare a oxidanților. Principala caracteristică a substanțelor antioxidante reprezintă abilitatea de a capta radicalii liberi. Compușii cu caracter antioxidant așa ca compușii fenolici, polifenolii, carotenoidele, flavonoidele inhibă radicalii liberi (peroxizi, hidroperoxizi) și respectiv inhibă și mecanismul oxidării propriu-zise [49]. Pomușoarele de pădure se consideră foarte bogate în compuși cu caracter antioxidant.

În vederea estimării potențialului antioxidant a extractelor liposolubile din surse vegetale studiate a fost efectuată analiza activității antioxidante cu ajutorul radicalului liber DPPH, iar rezultatele obținute sunt prezentate în Figura 7.6.

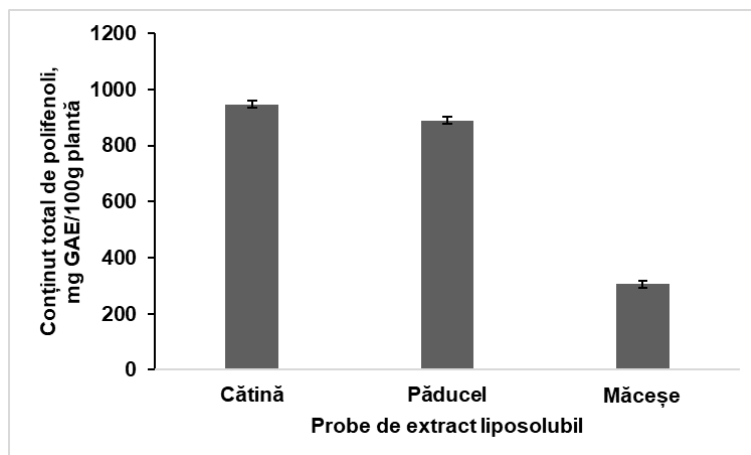


Figura 7.5 Conținutul total de polifenoli în extracte vegetale cercetate.

Unele studii au arătat că activitatea antioxidantă a extractelor horticoale este corelată cu substanțele fenolice totale mai degrabă decât cu compusul fenolic individual [50]. Este important de menționat că diferiți fenoli dezvoltă activități diferite, în funcție de structura lor chimică (acizi fenolici, flavonoli, antocianidine, stilbeni) și de capacitatea de eliminare a radicalilor liberi din aceste clase de compuși diferă.

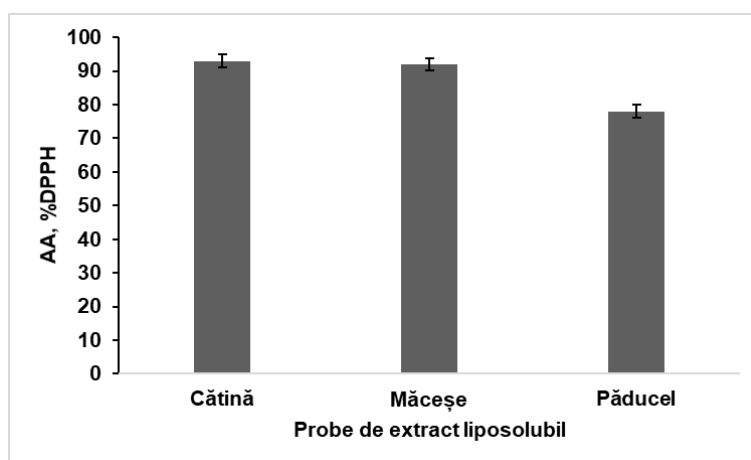


Figura 7.6 Activitatea antioxidantă în extracte liposolubile de cătină, păducel și măceșe.

În urma analizei rezultatelor din Figura 7.6 s-a stabilit că extractele liposolubile din pudre de măceșe, cătină și păducel se caracterizează prin capacitate antioxidantă ridicată, și anume că valoarea capacității de inhibare a radicalului liber DPPH variază de la $72,05 \pm 1,90$ % până la $90,84 \pm 1,90$ %. Acest fapt se explică prin conținutul bogat a compușilor biologic activi cu caracter antioxidant din extractele analizate și respectiv nemijlocit în pudrele vegetale din fructe de pădure autohtone [51,52].

Cercetarea parametrilor de culoare CIELab a extractelor liposolubile. Culoarea extractelor liposolubile horticoale reprezintă o caracteristică importantă care poate influența calitatea produsului finit, dar și percepția consumatorului. Pentru ca ochiul uman să poată percepe o oarecare modificare a culorii, structura carotinoidei trebuie să conțină cel puțin 7 legături duble conjugate.

Au fost analizate modificările de culoare în toate probele de extracte liposolubile. Parametrii cromatici determinați sunt prezentați în Tabelul 7.6.

Tabelul 7.6

Parametri de culoare CIELab ai extractelor liposolubile

Indicator	Denumirea probei			
	PM	ELM	ELP	ELC
L*	74,00±0,56	49,00±0,42	72,00±0,09	64,00±0,26
a*	0±0,13	53,00±0,52	4,00±0,56	26,00±0,46
b*	17,00±0,34	47,00±0,56	61,00±0,98	58,00±0,71
ΔE*	-	12,41±0,32	11,75±0,51	9,06±0,56

Notă: rezultatele sunt prezentate ca medie ± abatere standard; PM – proba martor; ELM – Extract liposolubil de măceșe; ELP – extract liposolubil de păducel; ELC – extract liposolubil de cătină; temperatura de extracție 45°C; durata de extracție 180 min; L* - luminozitate; a* - parametru de culoare pe axă verde-roșie ; b* - parametru de culoare pe axă albastră-galbenă; ΔE* - diferența de culoare.

Parametrul L* indică intensitatea luminii sau întinericului. Analizând valorile obținute pentru parametrul L*, observăm că probele de extract (ELC, ELP și ELM) se caracterizează prin valori mai mici, constituind ELM- (49,00±0,42); ELP- 72,00±0,09 și respectiv ELC- 64,00±0,26, în comparație cu PM: 74,00, ceea ce ne indică că în PM prevalează culoarea albă, ceea ce se datorează etapei de decolorare în procesul de fabricare a uleiului vegetal. Micșorarea valorii parametrului L* va indica că extractele vor căpăta culori mai închise, astfel cum putem observa în cazul ELM (49,00±0,42). Parametrul a* indică prezența nuanței de roșu sau verde. Analizând valorile obținute pentru parametrul a* observăm că extractul de măceșe este caracterizat prin cea mai ridicată valoare ELM: 53,00±0,52, demonstrând prezența nuanței roșii în extract. Extractul de cătină, de păducel au valori considerabil mai scăzute a parametrului a*. În cazul extractelor de cătină observăm că parametrul a* constituie 26,00±0,46, iar pentru extractul de păducel se atestă valori de 4,00±0,56, dar esențial mai reduse în comparație cu ELM, ceea ce ne indică că parametrii cromatici în cazul fructelor de cătină și păducel tind să varieze spre culoarea verde. Culorile de roșu caracteristic fructelor de pădure poate fi explicat prin conținutul sporit de carotenoide de culoare roșie/portocalie așa ca licopenul sau β-carotenul. Valorile parametrului b* ne arată prezența nuanțelor galbene în extractele cercetate. Cea mai ridicată valoare a parametrului b* este caracteristică extractului de păducel (61,00±0,98), urmat de extractul de cătină (58,00±0,71) și respective de măceșe (47,00±0,56). Valorile crescute pentru extractele vegetale demonstrează prezența carotenoizilor, ceea ce în comparație cu PM (17,00±0,34) observăm că conținutul acestora este considerabil mai scăzut.

Aceste rezultate denotă, că extractele liposolubile de cătină, păducel și măceșe conțin pigmenți de culoare roșie, galbenă și portocalie, în special β-caroten, licopen și zeaxantină.

7.4.Cercetarea stabilității oxidative a uleiurilor cu extracte liposolubile pe parcursul stocării

Lipidele sunt supuse diferitor reacții de degradare, care pot produce deteriorarea prematură a produselor alimentare. În cazul râncezirii hidrolitice, trigliceridele sunt scindate și are loc eliberarea acizilor grași, deci aciditatea materiei grase crește. Drept consecință scade considerabil calitatea produsului alimentar și se modifică esențial proprietățile senzoriale și fizico-chimice. Dinamica oxidării lipidice depinde în mare parte de structura și tipul acizilor grași, de acțiunea antioxidantilor și a compușilor cu caracter prooxidant (oxigen, acid ascorbic, lumină).

Aceste procese pot fi evaluate cu ajutorul unor indicatori de calitate ai lipidelor, care caracterizează starea materiei grase. Din acest motiv, este important de a studia evoluția indicatorilor fizico-chimici și de calitate a uleiului cu extracte liposolubile pe parcursul stocării timp de 3 luni. În acest sens au fost analizate un șir de indicatori de calitate printre care: indicele de aciditate, indice de peroxid, conținut de diene și triene conjugate, indice de p-anisidină. S-a studiat stabilitatea

uleiului vegetal cu extract liposolubil din fructe de pădure adăugat în cantitate de 10%. Rezultatele cărora sunt prezentate în Tabelul 7.7.

Indicele de aciditate (IA) pentru PM se află în limitele admisibile (0,6 mg KOH/g) pentru uleiul vegetal. În cazul uleiului cu ELM (0,17±0,01 mg KOH/g) și ELC (0,21±0,01 mg KOH/g), indicele de aciditate depășește valoarea PM, iar pentru uleiul cu ELP (0,13±0,01 mg KOH/g) se atestă o scădere neesențială. Această variație se datorează acumulării acizilor grași liber din pulpa fructelor de cătină, păducel și măceșe. După o perioadă de 3 luni de stocare se atestă a creștere a valorilor IA pentru toate probele cercetate de ulei și extracte liposolubile, dar care nu depășesc valoarea maximă de 0,6 mg KOH/g ulei, prevăzut conform reglementărilor tehnice în vigoare pentru uleiul vegetal de floarea-soarelui [53–55].

Primii produși de oxidare ai lipidelor sunt peroxizii, care ulterior scindează în produse secundare de oxidare: aldehide, cetone, acizi organici oxidați și hidrocarburi. De asemenea, peroxizii generează apariția radicalilor liberi (particule extrem de ofensive, care pun în pericol sănătatea consumatorului). Este bine cunoscut faptul că radicalii liberi provoacă autooxidarea lipidelor nesaturate din uleiuri. Moleculele antioxidante previn sau inhibă aceste reacții dăunătoare [56]. Deoarece peroxizii sunt primele substanțe formate la degradarea lipidelor, determinarea cantității lor este metoda utilizată pentru determinarea gradului de oxidare a materiei grase [57].

Indicele de peroxid (IP) pentru PM se află în limitele admisibile (max. 10 $m_{echiv} O_2/kg$). În uleiurile îmbogățite cu extracte IP este considerabil mai redus – în cazul ELM - cu 0,5 $m_{echiv} O_2/kg$, iar în cazul ELC și ELP – cu aproximativ 1,0 $m_{echiv} O_2/kg$ în raport cu indicele de peroxid pentru PM.

Tabelul 7.7

**Indicatori de calitate și inofensivitate a uleiurilor cu
extracte liposolubile din fructe de pădure**

Nr.	Indice de calitate	Durata de păstrare				
			PM	ELM	ELC	ELP
1	Indice de aciditate, mg KOH/g	0 luni	0,07±0,01	0,17±0,01	0,21±0,01	0,13±0,01
		3 luni	0,48±0,04	0,58±0,04	0,55±0,04	0,42±0,04
2	Indice de peroxid, $m_{echiv} O_2$ activ/kg	0 luni	2,30±0,05	1,70±0,04	1,30±0,05	1,70±0,05
		3 luni	4,68±0,13	4,13±0,13	3,66±0,13	3,68±0,13
3	Conținut de diene conjugate – DC $\mu mol/g$	0 luni	13,81 ±0,11	6,13±0,11	7,66±0,11	9,76±0,11
		3 luni	18,96±0,11	14,22±0,11	14,30±0,11	15,03±0,11
4	Conținut de triene conjugate – TC $\mu mol/g$	0 luni	4,63±0,11	4,68±0,11	4,33±0,11	7,50±0,11
		3 luni	8,39±0,11	5,34±0,11	4,96±0,11	6,42±0,11
5	Indice de <i>p</i> - anisidină, u.c.	0 luni	9,65±0,12	9,93±0,13	8,49±0,13	9,32±0,13
		3 luni	13,97 ±0,13	10,61±0,13	9,83±0,13	10,94±0,13

Notă: rezultatele sunt prezentate ca medie ± abatere standard; PM – proba-martor; ELM – extract liposolubil de măceșe; ELP – extract liposolubil de păducel; ELC – extract liposolubil de cătină; temperatura de extracție 45 °C; durata de extracție 180 min.

S-a constatat că la momentul obținerii extractelor liposolubile din surse horticoale, acestea se caracterizează printr-o valoare a IP mai mic comparativ cu IP al PM de ulei vegetal, ceea ce indică că compușii biologic activi din sursele horticoale încetinesc considerabil formarea peroxizilor, respectiv are loc încetinirea procesului de oxidare a produsului cercetat. Uleiul cu ELC indică cea mai scăzută valoare a IP (3,66±0,13 $m_{echiv} O_2/kg$), uleiurile cu ELP și ELM la fel prezintă o valoare scăzută comparativ cu proba martor, ceea ce demonstrează că atestă o activitate de încetinire a procesului de oxidare [58].

După o durată de stocare de 3 luni, se observă că valorile IP pentru uleiurile cu ELP, ELC și ELM este mai redus în comparație cu PM. Pentru uleiurile cu extracte liposolubile IP a crescut pentru ELM cu 40 %; pentru ELC cu 35 %; pentru EPC cu 46 % și pentru PM cu 49 %.

Valorile pentru uleiurile îmbogățite sunt considerabil mai reduse în comparație cu PM, fapt ce se datorează compușilor biologic activi liposolubili extrași din pulpa fructelor cercetate de cătină, păducel și măceșe, care au caracter antioxidant și inhibă acțiunea radicalilor liberi, respectiv încetinind reacțiile de peroxidare din produs.

Determinarea conținutului dienelor și trienelor conjugate (DC și TC) prezintă o tehnică utilă în studierea oxidării lipidelor, anume pentru caracterizarea procesului de autooxidare a acizilor grași polinesaturați, care este asociată de conjugarea legăturilor duble. Astfel, hidroperoxizii acidului linoleic și alte sisteme diene conjugate formate prin autooxidare prezintă o bandă de absorbție specifică la 232-237 nm. Producții secundari ai oxidării, în particular α -dicetonele și α -cetonele nesaturate prezintă un maximum de absorbție la lungimile de undă de 268-274 nm [59]. În consecință, cu cât absorbanța la 237 nm este mai intensă, cu atât mediul lipidic (ulei, sos) este mai oxidat (DC), cu cât absorbanța la 274 nm este mai înaltă, cu atât conținutul produselor secundare ale oxidării (TC) este mai mare. Variația absorbanței în domeniul UV reflectă formarea produșilor primari de oxidare a uleiurilor și grăsimilor și prezintă una dintre cele mai importante caracteristici ale materiei grase.

În urma cercetării conținutului de diene și triene conjugate în uleiurile vegetale și extractele liposolubile studiate s-a stabilit că pe parcursul a 3 luni de stocare PM atestă o variație considerabilă a conținutului de diene (13,81–18,96 $\mu\text{mol/g}$) și triene conjugate (4,63–8,39 $\mu\text{mol/g}$) comparativ cu probele de ulei cu extract de cătină, de păducel și măceșe. Cea mai scăzută valoare a conținutului de diene conjugate îl are uleiul cu ELP: diene conjugate - 9,76–15,03 $\mu\text{mol/g}$; triene conjugate - 6,42–7,50 $\mu\text{mol/g}$; urmat de ulei cu ELC: diene conjugate - 7,66–14,30 $\mu\text{mol/g}$; triene conjugate - 4,33–4,96 $\mu\text{mol/g}$ și respectiv ulei cu ELM: diene conjugate - 6,13–14,22 $\mu\text{mol/g}$; triene conjugate - 4,68–5,34 $\mu\text{mol/g}$.

Pe baza datelor obținute s-a stabilit că PM atestă valori maxime atât pentru diene conjugate cât și triene conjugate și considerabil mai ridicate decât a uleiurilor îmbogățite cu extracte liposolubile cercetate. Probele de ulei îmbogățite cu extract se caracterizează prin valori mult mai mici, care între ele variază neesențial și exprimă faptul că procesul de formare a produșilor primari ai oxidării este încetinit.

Indicele de p -anisidină indică cantitatea produselor secundare ale oxidării lipidice (aldehide, cetone și derivații acestora), care afectează negativ caracteristicile organoleptice a uleiurilor vegetale așa ca gustul sau mirosul. Acești compuși sunt capabili să interacționeze cu reagentul p -anisidină. Acest reagent este în particular predestinat pentru uleiurile tratate termic, deoarece majoritatea peroxizilor sunt distruși în timpul oxidării termice la temperaturi ridicate [60]. Analizând valorile obținute pentru PM și uleiurilor îmbogățite cu extracte liposolubile (tabelul 7.7 **Error! Reference source not found.**) se observă că pe durata stocării de 3 luni valorile indicelui de p -anisidină au crescut neesențial în comparație cu PM. Astfel pentru proba de ulei vegetal se atestă o creștere ce variază de la 9,65–13,97 u.c.; pe când valoarea indicelui de p -anisidină pentru uleiurile îmbogățite cu extracte liposolubile variază între 10,61–10,94 uc.

Rezultatele obținute demonstrează, că extractele liposolubile de măceșe, cătină și păducel pot fi utilizate pentru obținerea produselor alimentare cu conținut lipidic sporit.

Activitatea antioxidantă a uleiului cu extracte liposolubile în condițiile digestiei gastro-intestinale *in vitro*. Utilizarea pudrelor vegetale cu caracter antioxidant la obținerea extractelor liposolubile vor manifesta activitate antioxidantă (AA). Astfel a fost determinată AA în condițiile digestiei gastrice și intestinale *in vitro*. Digestia gastrică și intestinală a fost simulată *in vitro* timp de 2h. Pe parcursul simulării au fost extrase alicote 2h de digestie, care ulterior au fost supuse cercetărilor și determinării AA prin reacția cu radicalul liber DPPH, iar rezultatele obținute sunt prezentate în Figura 7.7.

Evaluarea activității antioxidante în urma digestiei gastrice induse (mediu acid) atestă o creștere esențială pentru uleiurile cu extracte liposolubile de cătină, păducel și măceșe în comparație

cu PM a cărei valori constituie 17,58 %. Pentru uleiurile îmbogățite cu extracte liposolubile valorile constituie: pentru ELC – 46,43 %; pentru ELM - 37,08 % pentru ELP- 39,29 %.

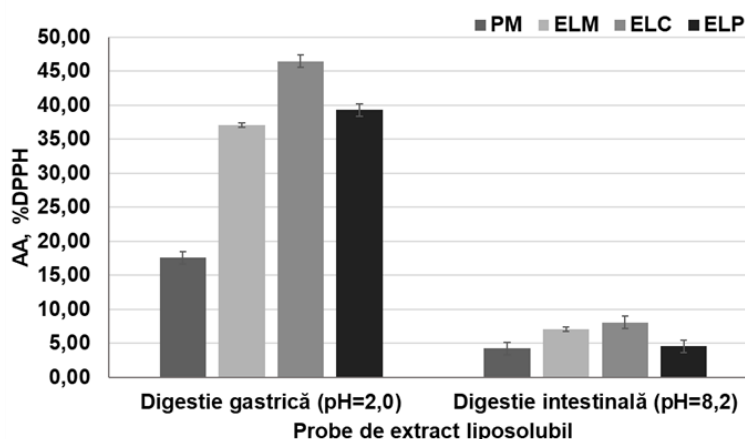


Figura 7.7 Activitatea antioxidantă a uleiului cu extracte liposolubile *in vitro*: PM – proba martor; ELC – extract liposolubil de cătină; ELM – extract liposolubil de măceșe; ELP – extract liposolubil de păducel.

Valorile ridicate a activității antioxidante pentru uleiurile cu extracte liposolubile în comparație cu PM după 2 ore de digestie se explică prin eliberarea treptată a compușilor biologic activi în procesul de digestie gastrică. Un alt factor important ar fi influența pH-ului din soluție și interacțiunilor enzimatică din produsul cercetat. În urma cercetărilor efectuate [61] a fost stabilit că modificările în conținutul substanțelor biologic active cu caracter antioxidant printre care polifenolii, flavonoidele pot spori capacitatea antioxidantă a probelor analizate. Acest fapt ne explică variația esențială a activității probelor îmbogățite extracte liposolubile cu pudră de fructe în comparație cu proba de ulei vegetal (PM). Acest fenomen se explică prin prezența în extractele cercetate a altor substanțe care măresc capacitatea antioxidantă a produsului în urma procesului de digestie *in vitro* a produsului studiat. Acești compuși biologic activi așa ca aminoacizii, peptidele sunt eliberate în timpul digestiei sau au suferit modificări care ulterior pot afecta capacitatea de a capta radicalii liberi. O altă ipoteză ar putea fi pierderea substanțelor volatile în timpul digestiei gastrice datorită capacității antioxidante sporite din produs. Datele studiate ne arată că digestia gastrică nu modifică esențial compoziția calitativă și cantitativă a compușilor biologic activi cu caracter antioxidant din produsul analizat. Acest fapt ne sugerează că acești compuși atestă o stabilitate ridicată în condiții cu pH scăzut ($pH=2,0\pm 0,1$). Mediul acid împreună cu enzimele digestive favorizează eliberarea compușilor biologic activi respectiv ceea ce influențează și capacitatea antioxidantă în creștere a produselor cu adaos de pudre vegetale de cătină, păducel și măceșe studiate [9].

În continuarea procesului de digestie gastrointestinală a fost efectuată simularea fazei de digestie intestinală indusă prin incubarea probelor în mediu alcalin ($pH=8,2\pm 0,1$) și determinarea activității antioxidante după 2 ore de digestie. Datele obținute (Figura 7.7) ne arată că activitatea antioxidantă a uleiului cu extracte liposolubile de cătină, păducel și măceșe este mai ridicată în comparație cu PM. AA a uleiului de floarea-soarelui PM constituie 4,26 %, pe când pentru uleiurile îmbogățite cu extracte liposolubile, valorile AA constituie: pentru ELC– 8,09 %; pentru ELM – 7,06 % pentru ELP 4,56 %. În urma efectuării digestiei intestinale se observă o scădere treptată a activității antioxidante în decurs de 2 ore atât pentru probele cu adaos de extract liposolubil cât și pentru PM. Acest fapt poate fi explicat prin stabilitatea scăzută a compușilor biologic activi în condițiile mediului alcalin ($pH=8,2\pm 0,1$) și formarea metaboliților care inhibă activitatea antioxidantă a compușilor biologic activi din produsele studiate. A fost stabilit de [62,63] că polifenolii sunt extrem de sensibili la condiții ușor alcaline, cum ar fi în intestin, unde o proporție a compușilor biologic activi este transformată în diferite forme structurale cu proprietăți chimice diferite [64].

7.5.Cercetarea intensității de formare a produselor oxidării lipidice

Oxidarea lipidelor constituie principala cauză a deteriorii produselor alimentare în procesul de depozitare a acestora. Totalitatea produșilor oxidării lipidice identificați sunt prezentați în Tabelul 7.8.

Tabelul 7.8

Produși ai oxidării lipidice identificați [65]				
Nr.	LPP	Capul grupării	m/z +CHH	RT, min
<i>LPP cu masa moleculară mică</i>				
1	Pentanal	PC	344,1970	3,11
		PE	344,1970	3,13
2	Hexanal	PC	358,2129	3,73
		PE	358,1759	3,67
3	Hidroxi-hexanal	PC	374,2072	2,62
		PE	374,2075	2,60
4	Hidroxi-hexenal	PC	372,1919	2,05
		PE	372,1918	2,00
5	Heptanal	PC	372,2282	4,54
		PE	372,2281	4,56
6	Hidroxi-heptanal	PC	388,2231	3,11
		PE	388,2229	3,12
7	Heptenal	PC	370,2126	4,30
		PE	370,2126	4,32
8	Octanal	PC	386,2438	5,35
		PE	386,2440	5,35
9	Hidroxi-octanal	PC	402,2389	3,71
		PE	402,2389	3,64
10	Octenal	PC	384,2282	5,09
		PE	384,2283	5,07
11	Hidroxi-octenal	PC	400,2232	2,57
		PE	400,2234	2,27
12	Nonanal	PC	400,2598	6,21
		PE	400,2596	6,20
13	Nonenal	PC	398,2442	5,68
		PE	398,2441	5,55
14	Hidroxi- nonenal	PC	414,2390	3,73
		PE	414,2386	3,69
15	Epoxi-nonenal	PC	412,2231	4,32
		PE	412,2232	4,13
16	Hidroxi-nonadienal	PC	412,2232	3,93
		PE	412,2232	4,13
17	Decadienal	PC	410,2442	6,27
		PE	410,2436	6,24
18	Hidroxi-decadienal	PC	426,2388	4,39
		PE	426,2386	4,57
19	Hidroxi-undecadienal	PC	440,2544	4,52
		PE	440,2546	4,06
20	Epoxi-undecadienal	PC	438,2389	4,42
		PE	438,2390	4,36
21	Dodecadienal	PC	438,2389	4,42
		PE	438,2388	4,36
22	Hydroxi-dodecatrienal	PC	452,2543	4,36
		PE	452,2540	3,87

Continuare Tabelul 7.8

Nr.	LPP	Capul grupării	m/z +CHH	RT, min
23	Heptadecanal	PC	512,3848	12,08
		PE	512,3484	12,14
24	Hidroxi - octadecanal	PC	542,3955	12,59
		PE	542,3953	12,87
<i>LPP cu masa moleculară mare</i>				
25	PC(1:0/20:4 <oxo@C1>)	PC	829,668	25,54
26	PE(1:0/20:4 <oxo@C1>)	PE	787,6218	25,45
27	PC(P-18:0/11:2 OH@C5>)	PC	959,5877	11,41
28	PE(P-18:0/11:2 <OH@C5>)	PE	917,5405	11,61
29	PC(P-18:0/8:1 <OH@C5>)	PC	919,5553	10,62
30	PC(P-18:0/8:1 <OH@C5>)	PE	877,5089	10,61
31	PC(P-18:0/5:0 <oxo@C5>)	PC	863,5298	11,19
32	PE(P-18:0/5:0 <oxo@C5>)	PE	821,4828	11,10
<i>LPP fără derivatizare cu CHH</i>				
33	1-LizoPC	PC	588,3312	4,75
34	1-LizoPE	PE	500,2791	4,88
35	2-LizoPC	PC	552,3672	9,69
36	2-LizoPE	PE	464,3150	9,55
37	PC(P-18:0/20:4 <epoxi@sn2>)	PC	854,5930	16,75
38	PE(P-18:0/20:4 <epoxi@sn2>)	PE	766,5405	16,72
39	PE(P-18:0/20:4 <epoxi@C1,C2>)	PE	766,5404	18,79
40	PC(P-18:0/20:4 <OH@C11>)	PC	854,5928	17,21
41	PE(P-18:0/20:4 <OH@C11>)	PE	766,5406	17,27
42	PE(P-18:0/20:4 <OH@C5>)	PE	766,5406	17,27
43	PC(1:0/20:4 <oxo@C1>)	PC	616,3256	5,62
44	PE(1:0/20:4 <oxo@C1>)	PE	528,2739	5,66
45	PC(P-18:0/13:3 <oxo@C13>)	PC	756,4829	12,24
46	PE(P-18:0/13:3 <oxo@C13>)	PE	668,4305	12,00
47	PC(P-18:0/10:2 <oxo@C10>)	PC	716,4510	10,93
48	PE(P-18:0/10:2 <oxo@C10>)	PE	628,3992	10,76
49	PC(P-18:0/10:2 <epoxy@C5>)	PC	732,4459	9,82
50	PC(P-18:0/8:1 <OH@C5>)	PC	706,4302	9,07
51	PE(P-18:0/8:1 <OH@C5>)	PE	618,3785	10,08
52	PC(P-18:0/7:0 <oxo@C7>)	PC	678,4354	10,34
53	PE(P-18:0/7:0 <oxo@C7>)	PE	590,3837	10,32
54	PC(P-18:0/7:1 <oxo@C7>)	PC	676,4197	10,14
55	PE(P-18:0/7:1 <oxo@C7>)	PE	588,3679	9,96
56	PC(P-18:0/7:1 <OH@C5>)	PC	694,4305	9,39
57	PE(P-18:0/7:1 <OH@C5>)	PE	606,3777	9,29
58	PC(P-18:0/6:1 <oxo@C6>)	PC	662,4039	9,79
59	PE(P-18:0/6:1 <oxo@C6>)	PE	574,3521	9,66
60	PC(P-18:0/5:0 <oxo@C5>)	PC	650,4048	9,99
61	PE(P-18:0/5:0 <oxo@C5>)	PE	562,2522	9,77
62	PC(P-18:0/4:0 <oxo@C4>)	PC	696,4461	9,70
63	PE(P-18:0/4:0 <oxo@C4>)	PE	548,3364	9,57

Notă: S-a aplicat metoda de cromatografie lichidă cuplată cu spectrometrie de masă în tandem (LC-MS/MS) utilizând analizator de tip ESI-LTQ-Orbitrap

Acest proces influențează negativ asupra calității produsului, parametrilor senzoriali cât și a siguranței acestuia. Procesul de oxidare a produselor alimentare nu poate fi în totalitate evitat datorită influenței oxigenului, luminii sau altor specii de oxigen reactiv. Prima etapă de oxidare a lipidelor este de formare a radicalilor liberi. Ratele de formare a radicalului lipidic peroxidic și a hidroperoxidului depind doar de disponibilitatea oxigenului și temperatură [30]. Primii produși ai oxidării lipidice sunt peroxizii, produși primari ai oxidării care sunt instabili și rapid scindează în produși secundari.

Cea mai probabilă cale de descompunere a hidroperoxidului este un clivaj homolitic a legăturii dintre atomii de oxigen, în care sunt produși radicali alcoxi și hidroxi. Radicalul alcoxi suferă apoi β -scisiunea homolitică a legăturii carbon-carbon și produce compuși oxo și radicali alchil saturați sau nesaturați. După rearanjarea electronică, adăugarea radicalului hidroxil sau transferul de hidrogen, ultimii produși secundari de oxidare a lipidelor sunt în mare parte aldehide cu greutate moleculară mică, cetone, alcooli și hidrocarburi cu lanț scurt etc.

Majoritatea produșilor de descompunere ai hidroperoxidizilor sunt responsabili pentru aroma rancedă din uleiul comestibil oxidat. Compușii carbonil alifatici au o influență mai mare asupra aromei uleiului oxidat datorită valorilor lor scăzute.

Produșii secundari ai oxidării au fost analizați prin spectroscopia de masă. Au fost identificați atât produși cu masă moleculară mare cât și cu masă moleculară mică. Așa cum produșii secundari ai oxidării sunt extrem de volatili și imposibil de detectat, s-a efectuat o etapă suplimentară de derivatizare a produșilor cu CHH.

Toate produsele oxidării lipidice au fost identificate manual prin analiza detaliată a spectrelor MS2 generate prin softul XCalibur. În Figurile 7.8 – 7.17 sunt exemplificate câteva spectre de identificare a produselor de reacție atât cu masă moleculară mică cât și masă moleculară mare.

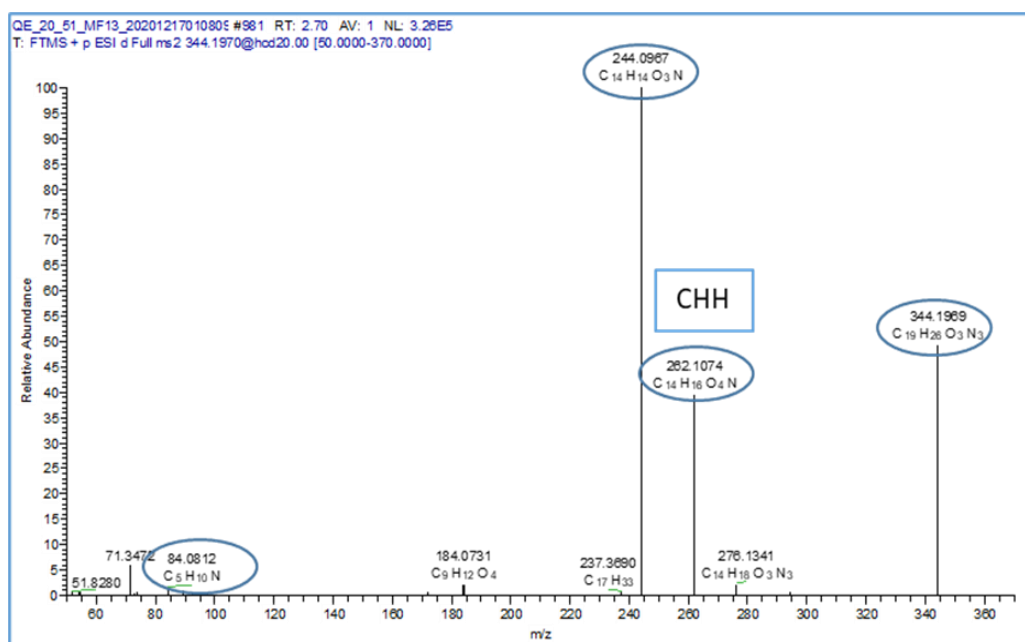


Figura 7.8 Spectrul MS2 al pentanalului.

Spectrul de masă tandem (figura 7.8) al pentanalului derivatizat cu CHH ($m/z = 344,1970$) a arătat un semnal intens la $m/z = 244,0968$ și un alt semnal minor la $m/z = 262,1073$ care confirmă derivatizarea cu CHH. Semnalul la $m/z = 84,0812$ reprezintă ionul fragment pentru pentanal (C₅H₁₀O).

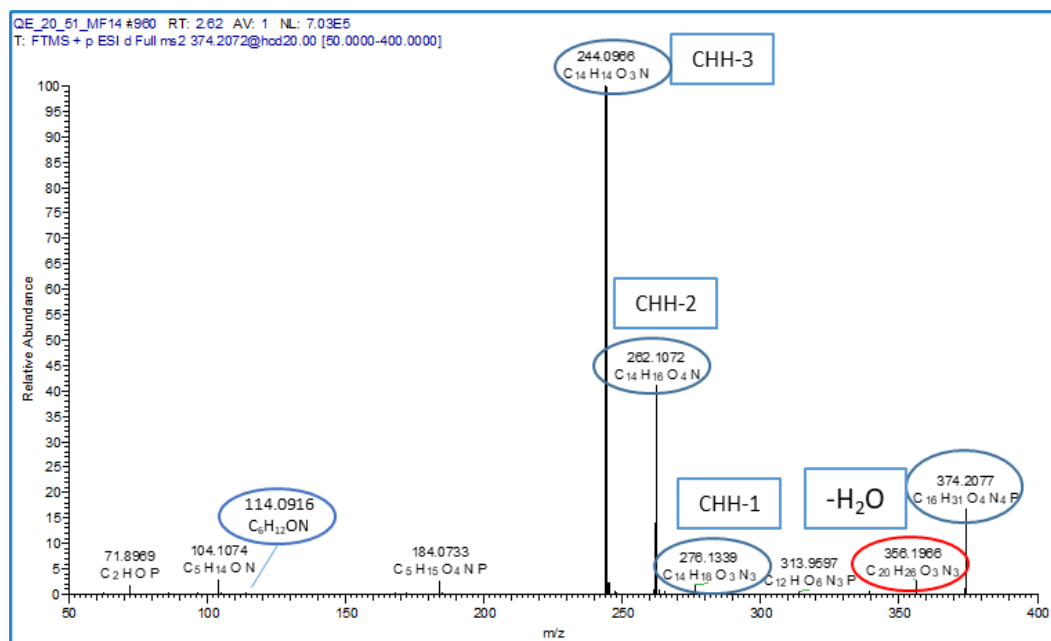


Figura 7.9 Spectrul MS2 pentru hidroxi-hexanal.

Spectrul de masă tandem (figura 7.9) al hidroxi-hexanalului derivat cu CHH ($m/z = 374,2077$) a prezentat un semnal la $m/z=366,1966$ indicând pierderea de apă (-18 Da) corespunzătoare grupului OH. Semnalul intens la $m/z = 244,0966$; un alt semnal la $m/z = 262,1072$ și $m/z=276,1339$ confirmă derivatizarea cu CHH. Semnalul la $m/z = 114,0916$ reprezintă fragmentul ion pentru hidroxi-hexanal ($C_6H_{12}O_2$). Acumularea pentanalului în probele cercetate imprimă probelor analizate miros neplăcut a rănced, amar și cu note de lemn [66].

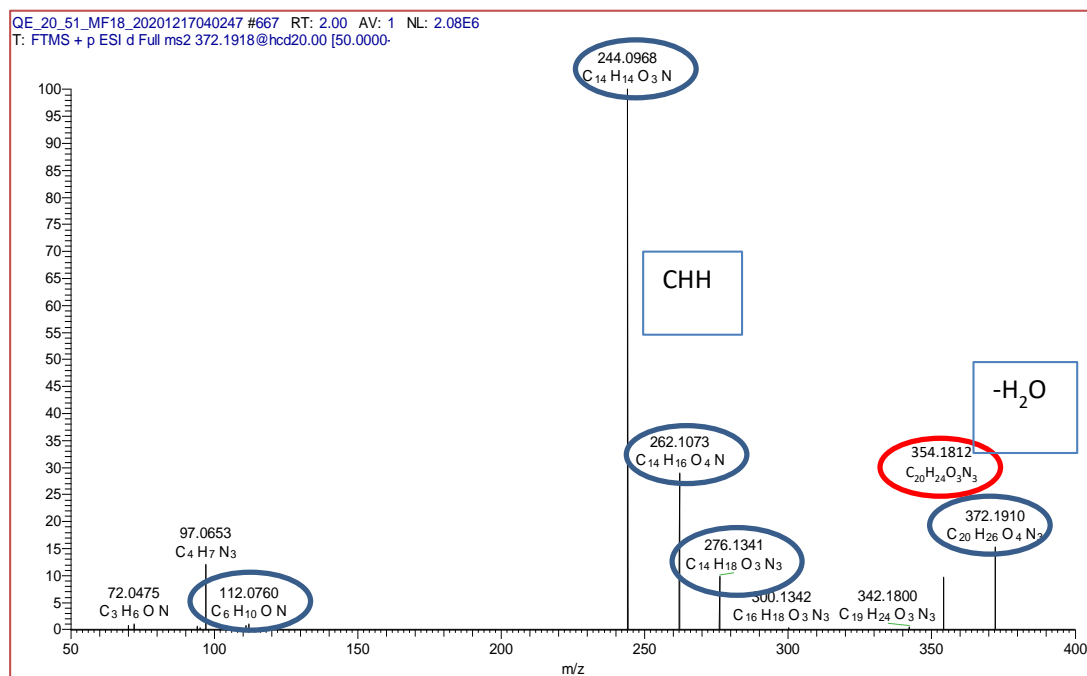


Figura 7.10 Spectrul MS2 pentru hidroxi-hexenal.

Spectrul de masă tandem (figura 7.10) al hidroxi-hexenalului derivat cu CHH ($m/z = 372,1910$) a prezentat un semnal la $m/z=354,1812$ indicând pierderea de apă (-18 Da) corespunzătoare grupului OH. Semnalul intens la $m/z = 244,0968$; un alt semnal la $m/z = 262,1073$

și $m/z=276,1342$ confirmă derivatizarea cu CHH. Semnalul la $m/z=112,0760$ reprezintă fragmentul ion pentru hidroxi-hexenal ($C_6H_{10}O_2$). Acumularea hidroxi-hexenalului în probele cercetate imprimă probelor analizate miros neplăcut a iarbă, a ranced, și vopsea [66].

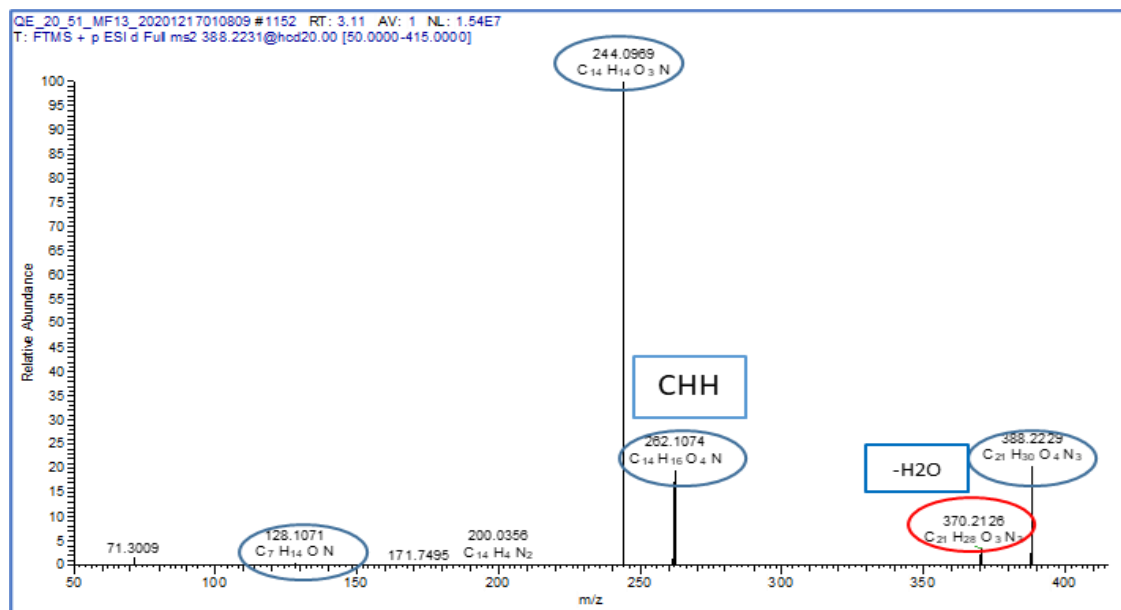


Figura 7.11 Spectrul MS2 pentru hidroxi-heptanal.

Spectrul de masă tandem (Figura 7.11) al hidroxi-heptanalului derivat cu CHH ($m/z = 388,2229$) a prezentat un semnal la $m/z=370,2126$ indicând pierderea de apă (-18 Da) corespunzătoare grupului OH. Semnalul intens la $m/z = 244,0968$; un alt semnal la $m/z=262,1074$ confirmă derivatizarea cu CHH. Semnalul la $m/z = 128,1071$ reprezintă fragmentul ion pentru hidroxi-heptanal ($C_7H_{14}O_2$).

Spectrul de masă tandem (Figura 7.12) al octenalei derivatizate cu CHH ($m/z = 384,2280$) a arătat un semnal intens la $m/z=244,0968$ și un alt semnal minor la $m/z = 262,1073$ care confirmă derivatizarea cu CHH. Semnalul la $m/z=124,1121$ reprezintă ionul fragment pentru octenal ($C_8H_{14}O$).

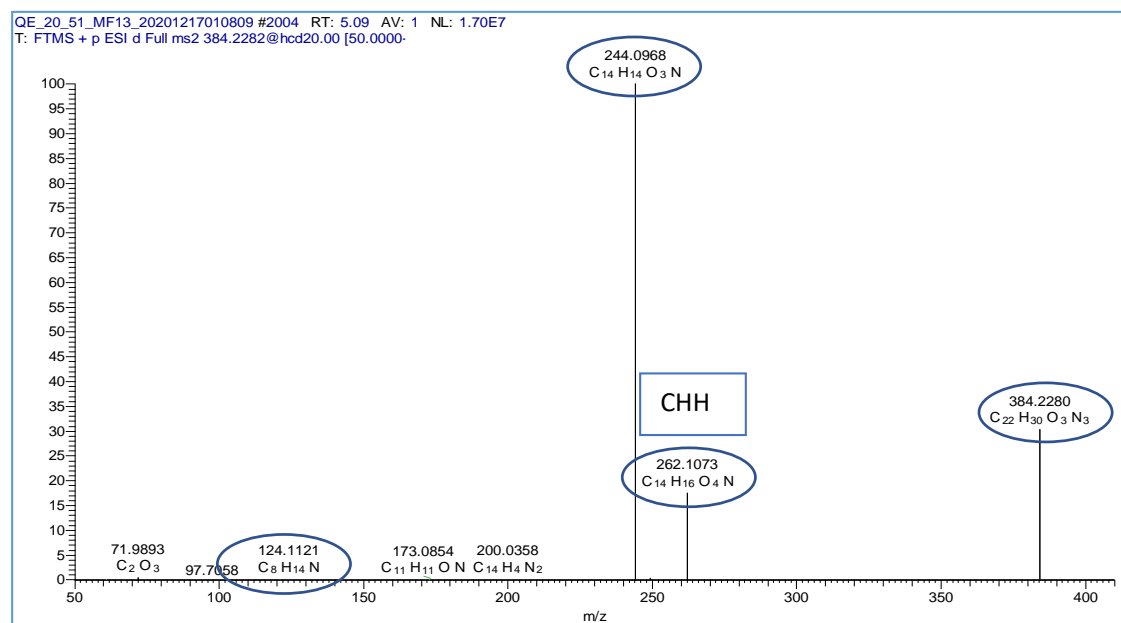


Figura 7.12 Spectrul MS2 pentru octenal.

Spectrul de masă tandem (Figura 12.13) al hidroxi-octadecanalului derivat cu CHH ($m/z = 542,3954$) a prezentat un semnal la $m/z=524,3857$ indicând pierderea de apă (-18 Da) corespunzătoare grupului OH. Semnalul intens la $m/z = 244,0968$ și un alt semnal minor la $m/z = 262,1073$ confirmă derivatizarea cu CHH. Semnalul la $m/z = 282,2792$ reprezintă fragmentul ion pentru hidroxi-octadecanal ($C_{18}H_{36}O_2$).

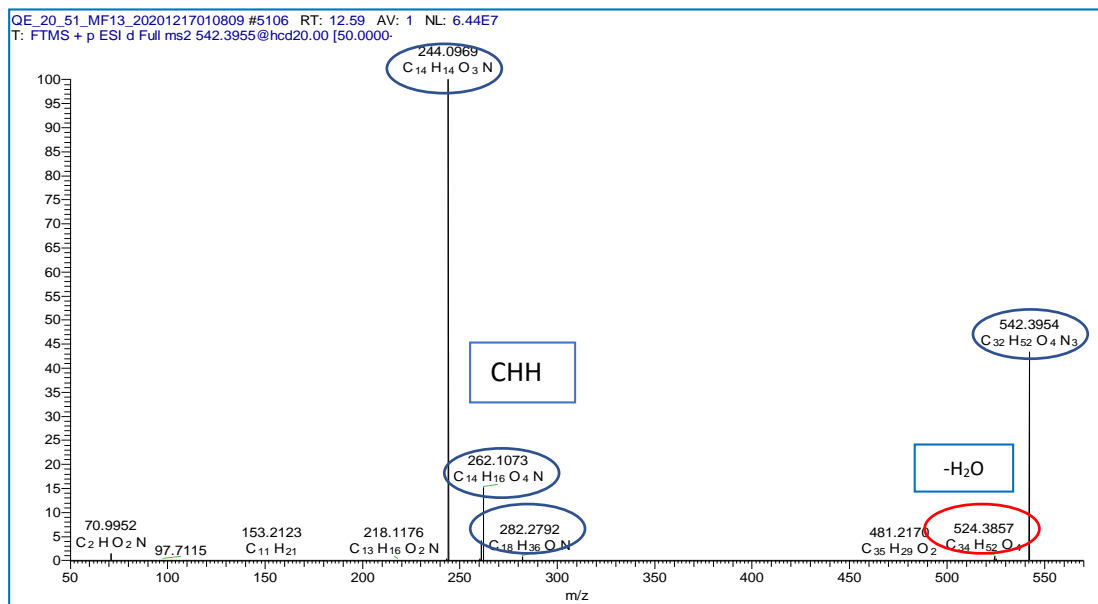


Figura 7.13 Spectrul MS2 pentru hidroxi-octadecanal.

Spectrul de masă tandem (Figura 7.14) al PC-ului derivatizat cu CHH (P-18:1/5:0<oxo@C5>) ($m/z = 863,5293$) a prezentat un semnal relativ intens la $m/z=184,0735$ care reprezintă capul PC. Semnalul intens la $m/z=244,0972$ și un alt semnal minor $m/z=262,1060$ confirmă derivatizarea cu CHH. Semnalul la $m/z=508,3773$ reprezintă ionul fragment pentru 2-LizoPC ($C_{25}H_{51}NO_6P$). Fragmentul ionul la $m/z=86,0972$ indică structura sn-2 a 5C-carbonilului.

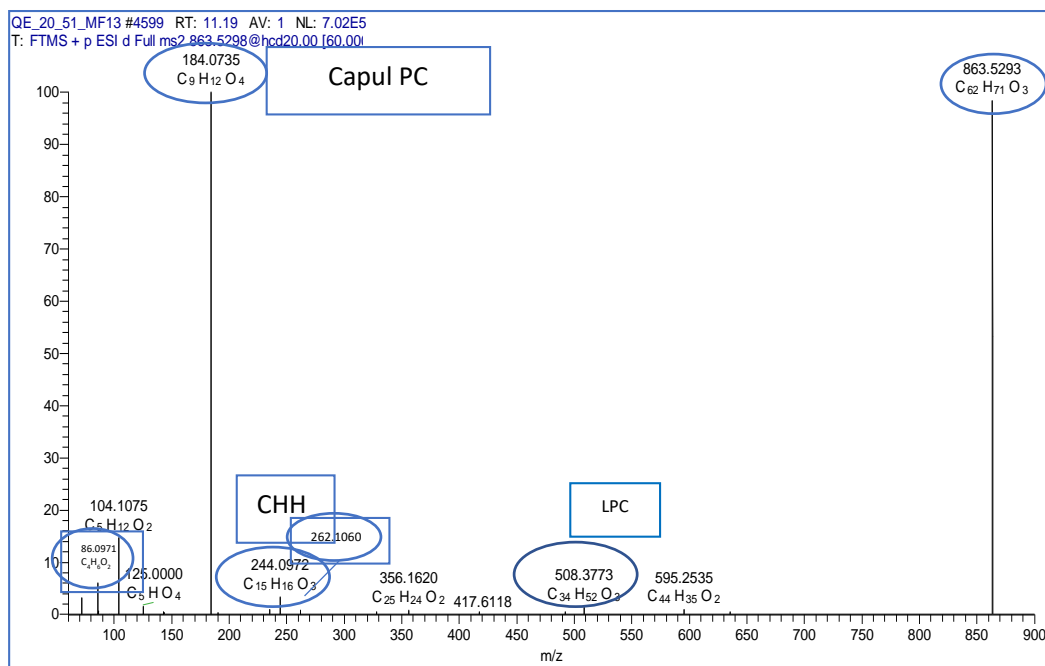


Figura 7.14 Spectrul MS2 pentru PC(P-18:1/5:0 <oxo@C5>).

Spectrul de masă tandem (Figura 7.15) al PE derivatizat cu CHH (P-18:0/8:1<OH@C5>) ($m/z = 877,5077$) a prezentat un semnal la $m/z = 859,4978$ indicând pierderea de apă de 18 Da care corespunde prezenței grupului OH. Semnalul la $m/z = 736,4893$ care indică o pierdere neutră de 141 Da corespunde pierderii grupului de cap PE. Semnalul intens la $m/z = 602,3816$ indică o pierdere neutră de -275Da caracteristică pentru pierderea CHH-1. Celelalte două semnale la $m/z = 244,0967$ (CHH-3) și un alt semnal minor $m/z = 262,1074$ (CHH-2) confirmă derivatizarea CHH. Semnalul la $m/z = 169,0966$ indică structura ionului sn-2 fragment.

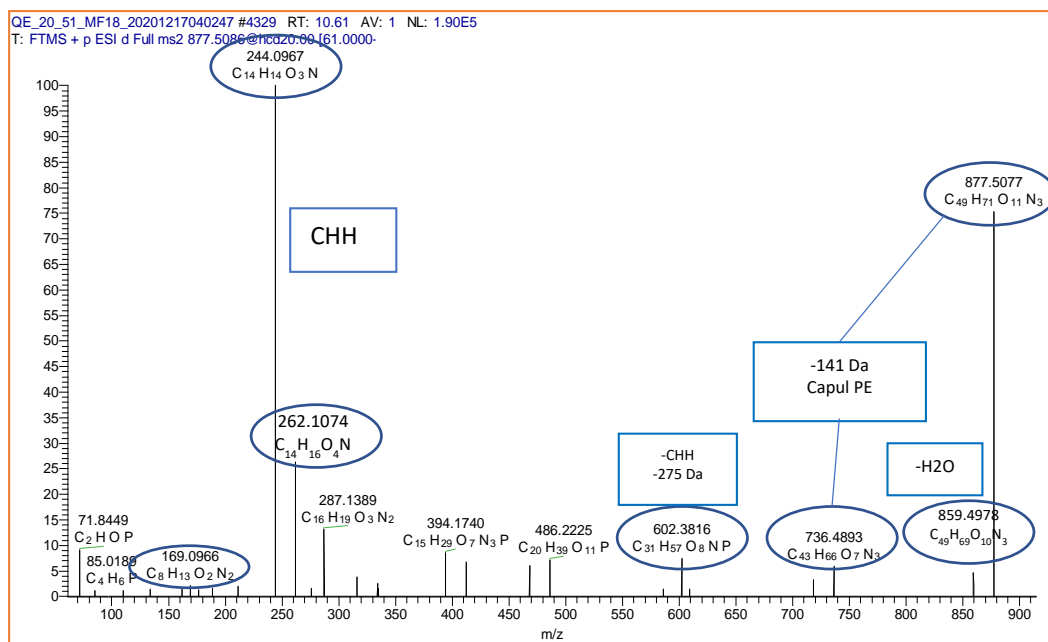


Figura 7.15 Spectrul MS2 pentru PE(P-18:0/8:1 <OH@C5>).

Spectrele de masă în mod negativ în tandem (Figura 7.16) ale PC-ului (P-18:0/7:1 oxo@C7) ($m/z = 676,4197$) au arătat un semnal la $m/z = 616,3969$ indicând pierderea neutră de 60 Da indicând pierderea de formiat și a unui metil. Semnalul la $m/z = 492,3477$ indică fragmentul ion pentru 2-LizoPC-CH₃. Cel mai intens semnal la $m/z = 141,0556$ indică ionul fragment pentru compusul sn-2 carbonilic (C₇H₉O₃) și un alt semnal minor la $m/z = 97,0656$ care indică pierderea de 44Da corespunzătoare pierderii grupării COO.

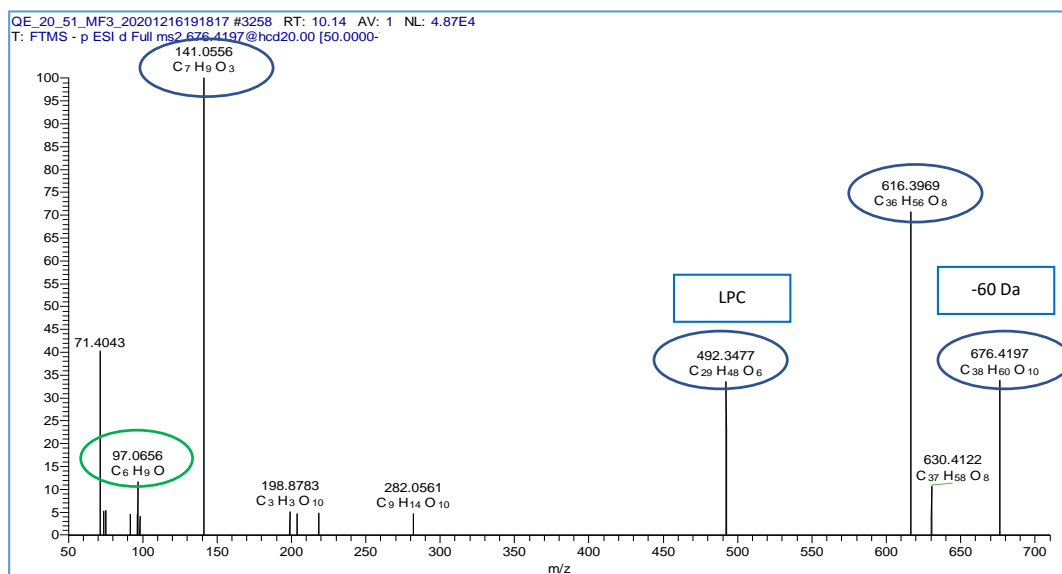


Figura 7.16 Spectrul MS2 pentru PC(P-18:0/7:1 oxo@C7).

Spectrele de masă în tandem cu mod negativ (Figura 7.17) ale PE (P-18:0/20:4<OH>) ($m/z = 766,5382$) au arătat un semnal la $m/z = 464,3144$ indicând fragmentul ion pentru 2- LizoPE. Semnalul la $m/z=319,2282$ indică fragmentul ion la $m/z=319,2282$ indicând acidul gras arahidonic cu adăugarea grupării OH. Semnalul la $m/z=301,2177$ indică o pierdere de -18 Da corespunzătoare pierderii de apă din sn-2 FA. Pe baza semnalului la $m/z = 167,1075$ au fost identificate poziția grupului OH la caracteristica C11 pentru PE (P-18:0/20:4<OH@C11>) și prin semnal la $m/z=115,0398$ au fost identificate poziția grupului OH la caracteristicile C5 pentru al doilea oxoPE izomeric - PE(P-18:0/20:4<OH@C5>).

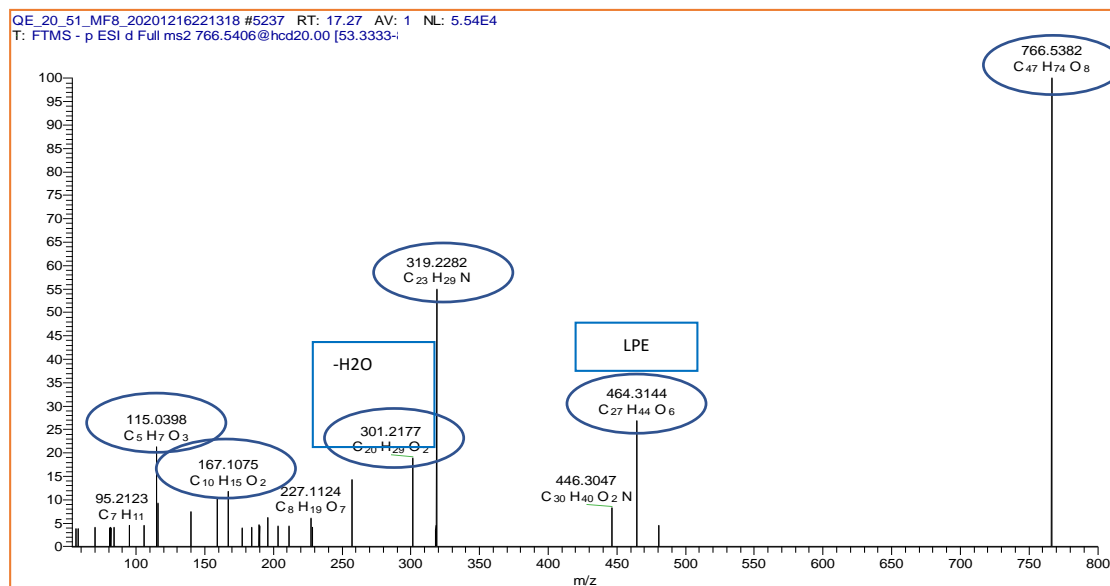


Figura 7.17 Spectrul MS2 pentru PE(P-18:0/20:4 <OH>).

Datorită diversității și complexității compușilor lipidici în natură, încă nici un protocol de analiză nu a fost capabil să extragă toate clasele de lipide cu aceeași eficiență [15]. Separarea LPP-urilor de lipide oxidate a fost efectuată prin cromatografie lichidă în fază inversă pe coloana C18. Evaluarea plasmalogenilor oxoPE și oxoPC a fost realizată cu succes, atât cu ionizare ESI în modul ion-negativ, cât și cu ionizare ESI în modul ion-pozitiv.

În modul ion-pozitiv, ionii „cvasi-moleculari” protonați ($[M+H]^+$) sunt în general observați pe cromatogramă. În modul ion negativ, peak-urile corespund ionilor "cvasi-moleculari" deprotonați ($[M-H]^-$) sau cu aducți de format ($[M+HCOO]^-$).

LPP-urile separate din coloană sunt transferate către sursa de ioni MS. Sursa de ioni convertește și fragmentează moleculele neutre ale probei în ioni care sunt trimiși la analizatorul de masă. Semnalele observate corespund cu LPP-ul eluat la un timp de retenție specific (RT, min). Timpul de retenție al semnalelor LLP depinde de numărul și lungimea lanțurilor de carbon, configurația și poziția legăturilor duble.

Prima treime a semnalelor sunt reprezentate de produsele de oxidare cu lanț scurt și, respectiv, un timp de retenție mai scurt. A doua treime a semnalelor va fi pentru produșii de oxidare cu lanț lung și până la sfârșit vor elua lipidele native și standardul intern dacă a fost injectat la început.

Drept standard intern, în general, se utilizează un compus lipidic complet saturat, care este adăugat ca o cantitate fixă de standard la toate probele înainte de analiză.

În cazul spectrometriei de masă în tandem MS/MS, avem două etape de MS. În prima etapă, ionii de m/z dorit sunt izolați de restul ionilor de la sursa de ioni. Ionii separați sunt numiți ioni precursori. Ionii precursori selectați sunt apoi supuși fragmentării care rezultă în fragmente de ioni.

Tehnicile de ionizare moale sunt utilizate împreună cu celulele de coliziune unde este indusă fragmentarea prin disociere indusă de coliziune (CID) a ionilor precursori. În rezultat, fragmentele ionizate vor fi detectate pe al doilea spectru de MS/MS.

Derivatizarea cu CHH permite identificarea atât a LPP cu greutate moleculară mică, cât și a LPP cu greutate moleculară mare. În urma testărilor au fost identificați produși ai oxidării lipidice formați ca urmare a clivării lanțurilor alchil a hidroperoxidilor și anume: pentanal, hidroxi-hexanal, heptanal, heptenal, hidroxi-nonenal sau hidroxi-decadienal etc. Cromatografia lichidă cu fază inversă a permis separarea produșilor oxidării lipidice în dependență de hidrofobicitatea acestora care este influențată de lungimea lanțului acil și de numărul și poziția legăturilor duble. Separarea eficientă a LLP a fost asigurată prin utilizarea fazei staționare C18 și fazei mobile compuse din apă bidistilată, acetonitril și izopropanol în gradient. Identificarea produșilor oxidării lipidice a fost posibilă datorită prezenței semnalelor distincte cu un anumit raport masă/sarcină (m/z) specific pentru fiecare compus identificat așa ca prezența derivatizării cu CHH confirmate prin semnalele $m/z=262,1074$ și $m/z=244,0967$. Fragmentele ionice pentru fiecare compus identificat au fost confirmate prin semnale distincte ca de exemplu pentru octanal semnalul $m/z=126,1277$; pentru hidroxi-nonenal semnalul $m/z=139,1118$; pentru heptadecanal semnalul $m/z=226,7829$ etc.

O separare eficientă a compușilor analizați în coloană este posibilă datorită respectării unor parametri și optimizarea continuă a metodei de separare utilizate în LC-MS/MS. Compoziția gradientului utilizat în etapa de separare va influența retenția compușilor în coloană. În comparație cu compușii neutri, lipidele ionizate atestă retenție scăzută pe o coloană cu fază inversă datorită polarității ridicate a acestora. La fel utilizarea aditivilor în faza mobilă a coloanei (de ex.: acetatului de amoniu, format) a permis optimizarea eficientă a procesului de separare.

Oxidarea lipidelor se propagă prin diferite căi care includ: reacția Russell, rearanjarea Hock, abstracția de H din structura lipidelor adiacente nemodificate etc.

- Reacția de rearanjare Hock este o rearanjare a hidroperoxidilor care are ca rezultat o scindare a legăturii C-C pentru a forma alcool și aldehydă polinesaturată, de exemplu 2,4 nonadienal.
- Beta-sciziunea radicalului alcoxi care rezultă în ruperea legăturilor C-C în poziția β a catenei.
- Abstracția de hidrogen. Radicalii formați se pot stabiliza prin abstracția de H de la moleculele învecinate, ducând la formarea de noi radicali liberi. Radicalii alcoxi sunt cunoscuți pentru capacitatea lor de a forma o legătură puternică RO-H.
- Reacțiile de reducere a hidroperoxidului induse de metale reprezintă un amplificator eficient al oxidării lipidelor.
- Mecanismul Russel reprezintă o reacție proprie a radicalilor peroxil ($ROO\cdot$) formând ca produse: alcooli, cetone și 1O_2 etc.
- Rearanjarea intramoleculară și formare de epoxid.

În rezultatul testărilor prin metoda de cromatografie lichidă cuplată la spectrometrie de masă în tandem (LC-MS/MS) au fost identificați 83 produși ai oxidării lipidice.

Rezultatele prezentate mai sus demontrează diversitatea de produse al oxidării lipidice formate prin adiția de oxigen (epoxidarea, adiția OH) și clivajul oxidativ (aldehide și acizii carboxilici corespunzători). Rata oxidării lipidice este determinată de un set complex de factori ce includ compoziția acizilor grași a lipidelor analizate sau prezența compușilor cu caracter antioxidant (ex.: tocoferol). Identificarea LPP a permis studiarea mecanismelor de oxidare lipidică și analiza evoluției cantitative a produșilor oxidării lipidice care s-au format în procesul de oxidare.

7.6. Evoluția cantitativă a produșilor oxidării lipidice

S-a analizat cantitatea de LPP formați timp de 30 ore prin mecanismul de oxidare indus de Reacția Fenton la 45 °C. Produșii primari ai reacției de oxidare sunt instabili, se descompun și conduc la scindarea homolitică și formarea compușilor volatili, care reprezintă produși secundari ai oxidării și includ aldehide și cetone. Aceste componente influențează negativ calitatea produsului alimentar prin formarea mirosului de rânțed.

În fază inițială a procesului de oxidare a uleiului vegetal, triacilglicerolii scindează și cantități reduse de acizi grași polinesaturați sunt eliberați. Acești acizi grași servesc drept substrat pentru inițierea reacțiilor de oxidare [67]. Pe parcursul oxidării lipidice, hidroperoxidii se formează drept compuși primari. Peroxizii sunt compuși fără miros și fără gust, dar care în urma descompunerii degradează într-o varietate de produși secundari din diferite clase de compuși așa ca alcani, alcooli, esteri, aldehide și cetone [68].

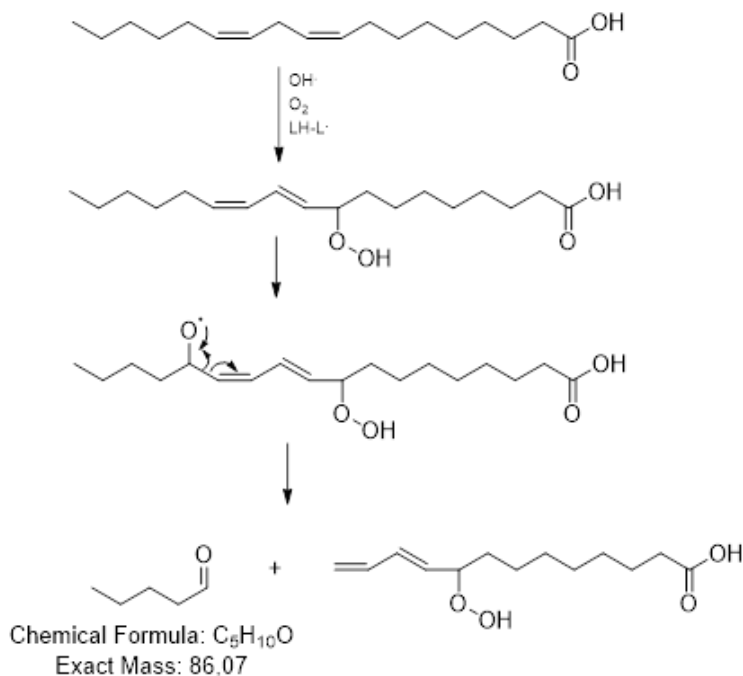


Figura 7.18 Mecanismul de formare a pentanalului [13].

Compuși secundari ai oxidării așa ca hexanalul, octenalul, decadienalul influențează aroma produsului alimentar, chiar și în concentrații reduse. Oxidarea lipidelor, în special a fosfolipidelor care au în structura lor acizi grași nesaturați conduc la formarea unui șir larg de compuși aldehidici. În acest context, în continuare au fost studiate produșii de reacție ai oxidării fosfolipidelor și anume PE (Fosfotidil-etanolamină) și PC (Fosfotidil-colină).

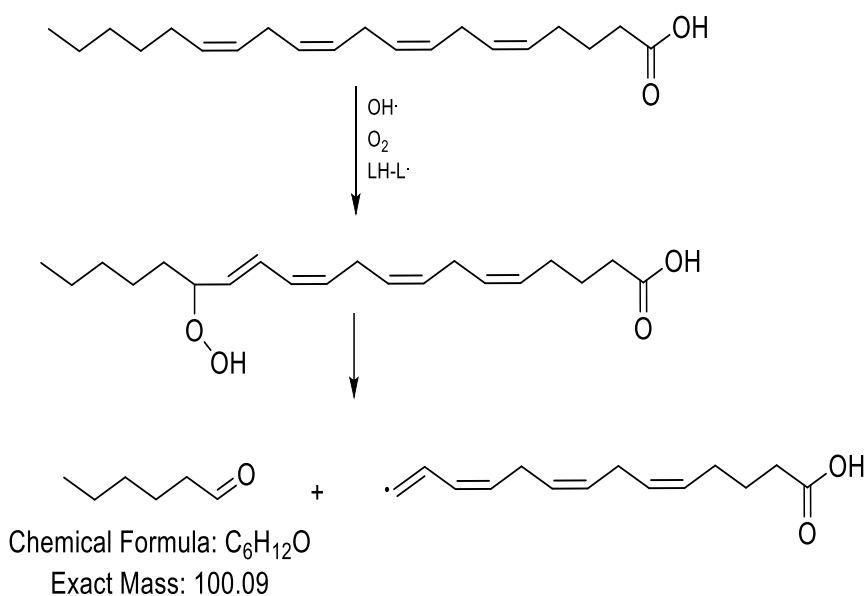


Figura 7.19 Mecanismul de formare a hexanalului [13].

Analizând dinamica formării pentanalului pe parcursul oxidării fosfolipidelor PC și PE observăm că pentanalul format în urma oxidării lipidelor PE are o evoluție constantă pe tot parcursul celor 30 ore de expunere la condiții prooxidante. Valorile inițiale la 0h de oxidare pentru lipidele PC sunt considerabil mai joase în comparație cu PE, dar pe parcursul a 3 h atestă o creștere esențială a conținutului de pentanal format (Figurile 7.18 și 7.20a).

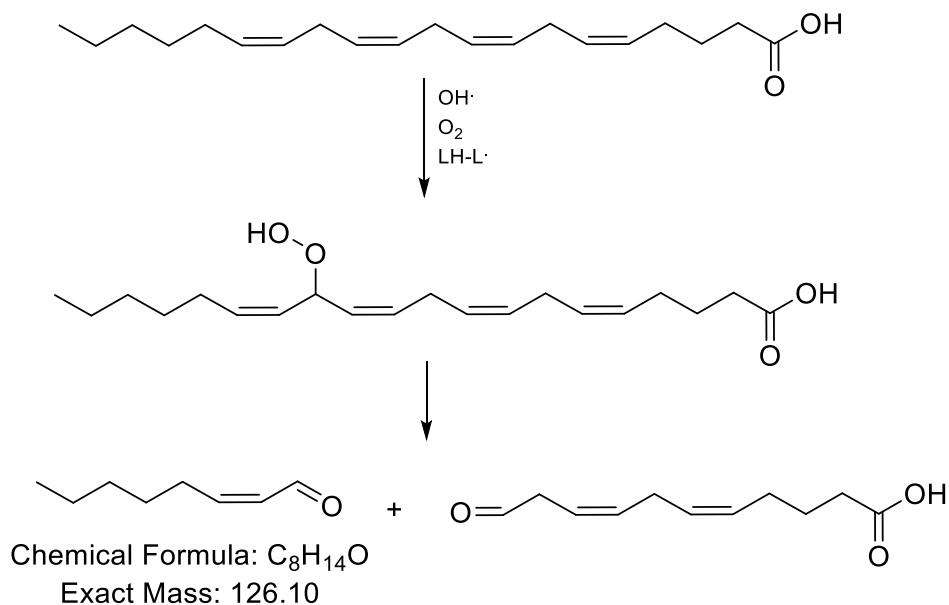
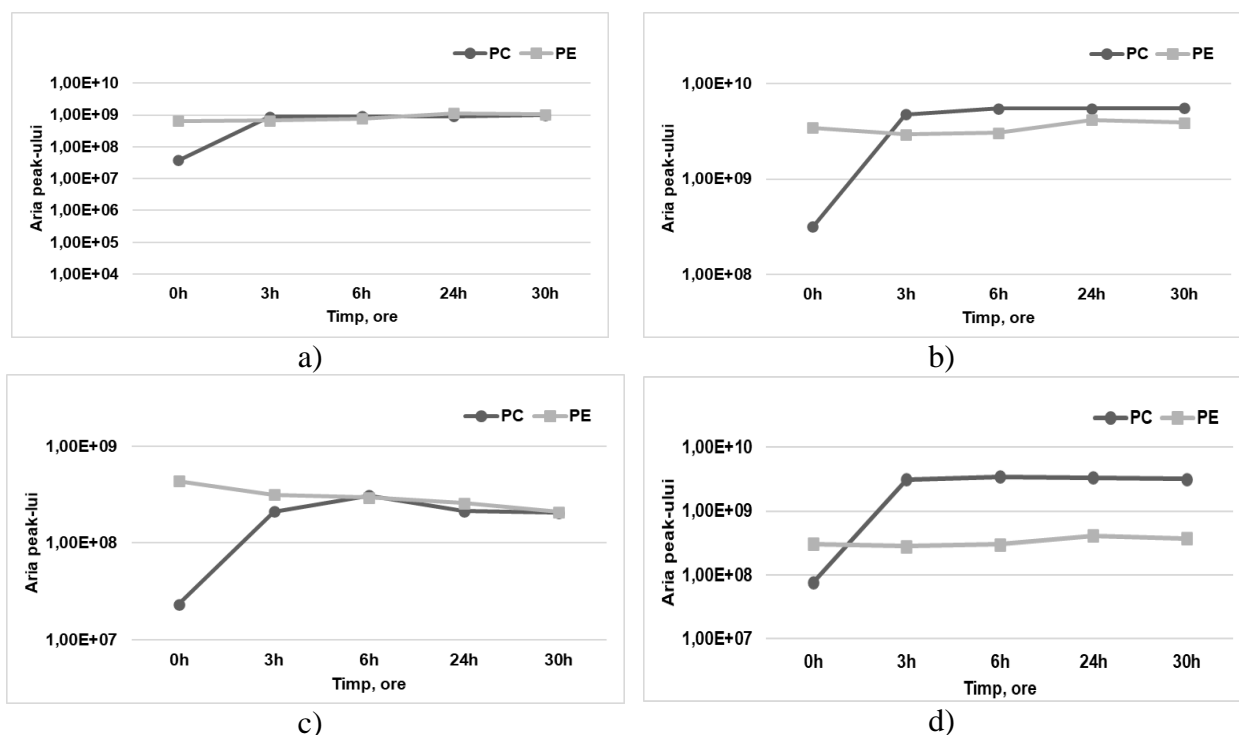
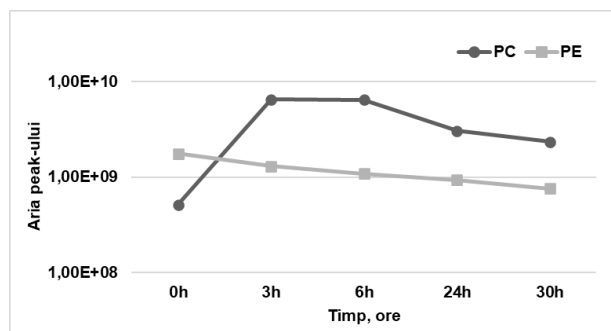


Figura 7.20 Mecanismul de formare a octenalului [13].

Analizând dinamica formării hexanalului pe parcursul oxidării fosfolipidelor PC și PE observăm că hexanalul format în urma oxidării lipidelor PE are o evoluție constantă pe tot parcursul celor 30 ore. Valorile inițiale la 0h de oxidare valorile pentru lipidele PC sunt considerabil mai joase în comparație cu PE, dar pe parcursul a 3 h atestă o creștere esențială a conținutului de hexanal format (Figurile 7.19Error! Reference source not found. și 7.21b).





e)

Figura 7.21 Dinamica formării unor produși ai oxidării lipidice pentru fosfatidilcolină (PC) și fosfatidiletanolamină (PE): a) pentanal; b) hexanal; c) octenal; d) hidroxi-nonenal; e) hidroxi-octadecanal.

Analizând evoluția formării octenalului pe parcursul oxidării lipidelor PE și PC, observăm că la 0h de oxidare conținutul de octenal (PE) format este considerabil mai mare în comparație cu cantitatea de octenal formată de lipidele PC. După 3 ore de oxidare se atestă o creștere esențială a cantității de octenal pentru lipidele PC și o scădere neesențială pentru lipidele PE (**Error! Reference source not found.7.20 și 7.21c**).

Compusul hidroxi-nonenal (HNE) reprezintă un produs mutagenic și citotoxic al oxidării acidului linoleic. Evoluția acestui compus format în urma oxidării lipidelor PE atestă o creștere stabilă pe toată perioada de expunere la temperaturi ridicate. Creșterea conținutului de HNE în cazul lipidelor PC atestă o evoluție considerabilă în primele 3 ore de expunere la temperaturi ridicate. După 24 ore de expunere se atestă o scădere ușoară a conținutului de HNE ceea ce poate fi explicat prin degradarea ulterioară a aldehidelor și formarea unor noi compuși datorită temperaturilor ridicate (Figurile 7.21d și 7.22).

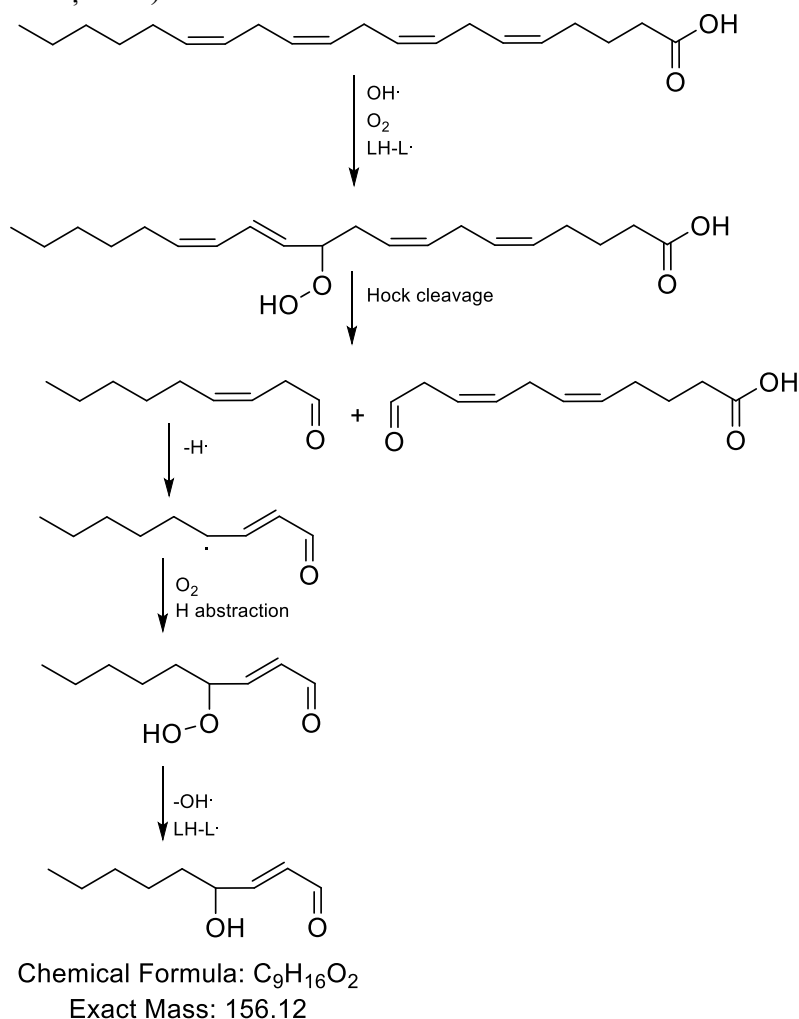


Figura 7.22 Mecanismul de formare a hidroxi-nonenalului [13].

A fost identificat și compusul hidroxi-octadecanal în cazul lipidelor PE și PC. S-a atestat o creștere esențială a produșilor de reacție în primile 3 ore de expunere la temperaturi ridicate. În continuare cantitatea de hidroxi-octadecanal a scăzut treptat pe tot parcursul celor 30 ore. În cazul produșilor de reacție PE cea mai mare valoare de hidroxi-octadecanal format a fost observat inițial la 0h de expunere și apoi s-a urmărit o scădere treptată a cantității de hidroxi-octadecanal. Acest fapt poate fi explicat prin scindarea hidroxi-octadecanalului și formarea produșilor secundari ai reacției de oxidare a lipidelor cercetate (Figurile 7.21e și 7.23).

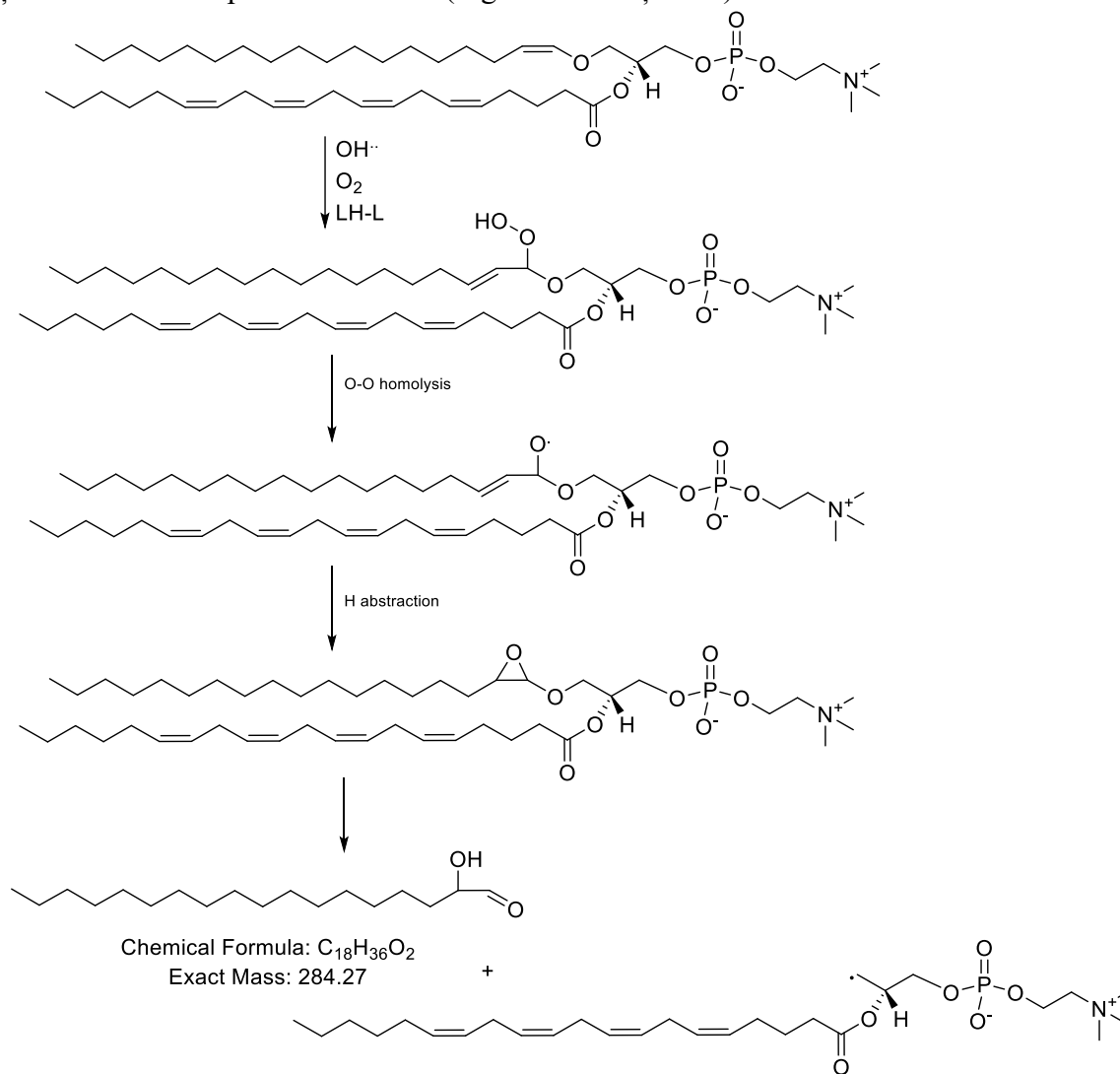


Figura 7.23 Mecanismul de formare a hidroxi-octadecanalului [13].

Acidul linoleic este un precursor esențial al compușilor volatili din uleiurile comestibile și poate fi ușor oxidat pentru a produce hexanal, pentanal, heptanal și *trans*-hept-2-enal [35,68]. Acidul oleic este, de asemenea, un precursor important de oxidare al compușilor volatili, în special nonanal și octanal, care sunt derivate din degradarea oxidativă a acidului oleic [69].

Rata de degradare oxidativă a acidului linolenic este mai rapidă decât cea a acidului linoleic și acidului oleic, iar acidul linolenic este o sursă importantă de *trans*, *trans*-2,4-heptadienal și *trans*-2-hexenal în produșii de oxidare ai uleiurilor comestibile [35]. Compușii volatili prezintă diferite praguri de aromă, ceea ce duce la niveluri diferite de sensibilitate la oameni; ca atare, conținutul relativ al acestor compuși nu poate reflecta contribuția lor reală la întregul profil de aromă.

Autooxidarea acidului linoleic implică ruperea hidrogenului de la C11 alilic și formarea unui radical. Radicalul intermediar reacționează cu oxigenul pentru a produce un amestec de hidroperoxizi

conjugați la C9 și C13 [31]. Scindarea hidroperoxidului (C13) produce hexanal și pentanal, iar descompunerea hidroperoxidului (C11) de acid linoleic generează heptanal.

Pentanalul, hexanalul, heptanalul, octanalul, nonanalul etc. au fost identificați ca compuși cheie de aromă în uleiurile comestibile. Conținutul mai multor aldehide crește odată cu nivelul de oxidare. Prin contrast, conținutul altor aldehide crește inițial, apoi scade, posibil, deoarece acestea au fost transformate în alți compuși de oxidare, cum ar fi compuși cu masă moleculară mică, în etapa ulterioară a oxidării [35].

Pe parcursul cercetărilor efectuate au fost identificate peste 83 de produși de reacție ai oxidării lipidice PE și PC printre care se identifică produși ai oxidării cu masă moleculară mică, care au fost identificați prin derivatizarea cu CHH. La fel, au fost identificați și produși cu masă moleculară mare, atât în modul negativ cât și pozitiv.

Concluzii. A fost cercetată metodologia de obținere a extractelor liposolubile din fructe de pădure autohtone. Fructele de cătină, păducel și măceșe se caracterizează printr-un complex bogat de compuși biologic activi, utilizarea cărora în obținerea extractelor liposolubile sau produselor alimentare cu conținut lipidic sporit va permite încetinirea proceselor oxidative și respectiv asigurarea produselor alimentare cu un termen de valabilitate prelungit. Rezultatele analizei indicatorilor fizico-chimici de calitate (IA, IP, DC și DT) a extractelor liposolubile de cătină, păducel și măceșe în raport cu proba martor de ulei vegetal denotă că procesul de oxidare este încetinit considerabil, atât inițial cât și pe parcursul păstrării acestora. A fost analizată și variația parametrilor de culoare a extractelor în comparație cu proba martor de ulei vegetal. Rezultatele obținute denotă, că extractele liposolubile de cătină păducel și măceșe conțin pigmenți de culoare roșie, galbenă și portocalie în special β -caroten, licopen și zeaxantină.

Cercetarea evoluției de formare a produșilor oxidării lipidice denotă că formarea acestora are loc prin o creștere considerabilă în primele 3 ore de expunere la temperaturi ridicate, iar pe parcurs se atestă o creștere neesențială. După 6 ore de expunere la factori ai oxidării s-a observat o scădere evidențiată a cantității de produși ai oxidării primare, fapt explicat prin scindarea ulterioară a produșilor primari și formarea produșilor secundari ai oxidării lipidice, care au fost analizați prin spectrometria de masă tandem LC-MS/MS.

Bibliografie

1. McClements, D.J. *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques*; Third edition.; CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, 2016, p. 714, ISBN 978-1-4987-2668-9.
2. Decker, E.A.; McClements, D.J.; Bourlieu-Lacanal, C.; Durand, E.; Figueroa-Espinoza, M.C.; Lecomte, J.; Villeneuve, P. Hurdles in Predicting Antioxidant Efficacy in Oil-in-Water Emulsions. *Trends in Food Science & Technology* 2017, 67, 183–194, doi:10.1016/j.tifs.2017.07.001.
3. Ullah, J.; . M.H.; . T.A.; . M.A.; . M.Z. Effect of Light, Natural and Synthetic Antioxidants on Stability of Edible Oil and Fats. *Asian J. of Plant Sciences* 2003, 2, 1192–1194.
4. Decker, E. Antioxidant Mechanisms. 2002, *Food lipids*. New York: Marcel Dekker, p 517-42.
5. Crăciun V. I. Studii Asupra Substanțelor Biologic Active Folosite ca Aditivi Și Nutrienți Alimentari În Scopul Creșterii Calității Și Securității Alimentelor. 2011, 5.
6. Ghendov-Moșanu, A. *Compuși biologic activi de origine horticolă pentru alimente funcționale*; Tehnica UTM: Universitatea Tehnică a Moldovei, 2018, 236 p.; ISBN 978-9975-45-531-2.
7. Ghendov-Moșanu, A.; Cristea, E.; Patras, A.; Sturza, R.; Padureanu, S.; Deseatnicova, O.; Turculet, N.; Boestean, O.; Niculaua, M. Potential Application of Hippophae Rhamnoides in Wheat Bread Production. *Molecules* 2020, 25, 1272, doi:10.3390/molecules25061272.
8. Popovici, V.; Sturza, R.; Ghendov-Moșanu, A.; Soran, M.-L.; Lung, I.; Patraș, A. Influența Condițiilor de Extracție Asupra Compoziției Și Activității Antioxidante a Extractelor Liposolubile de Măceșe. *Meridian Ingineresc* 2018, 1, 23–27.
9. Pavan, V.; Sancho, R.A.S.; Pastore, G.M. The Effect of in Vitro Digestion on the Antioxidant Activity of Fruit Extracts (Carica Papaya, Artocarpus Heterophyllus and Annona Marcgravii). *LWT - Food Science and Technology* 2014, 59, 1247–1251, doi:10.1016/j.lwt.2014.05.040.

10. Popovici, V. Evaluation of the Oxidative Stability of Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) Lipophilic Extract. *JES* 2018, 111–115, doi:10.5281/zenodo.2557344.
11. Popovici, V.; Ghendov-Mosanu, A.; Sturza, R.; Deseatnicov, O. *Procedeu de stabilizare a uleiurilor vegetale*. Brevet de invenție de scurtă durată, 9670, 2020.12.02.
12. TESFAYE, B.; ABEBAW, A.; REDDY, M.U. Determination of Cholesterol and β -Carotene Content in Some Selected Edible Oils. *International Journal of Innovative Science and Research Technology* 2017, 2, 14–18.
13. Coliva, G.; Lange, M.; Colombo, S.; Chervet, J.-P.; Domingues, M.R.; Fedorova, M. Sphingomyelins Prevent Propagation of Lipid Peroxidation—LC-MS/MS Evaluation of Inhibition Mechanisms. *Molecules* 2020, 25, 1925, doi:10.3390/molecules25081925.
14. Ni, Z.; Sousa, B.C.; Colombo, S.; Afonso, C.B.; Melo, T.; Pitt, A.R.; Spickett, C.M.; Domingues, P.; Domingues, M.R.; Fedorova, M.; et al. Evaluation of Air Oxidized PAPC: A Multi Laboratory Study by LC-MS/MS. *Free Radic Biol Med* 2019, 144, 156–166.
15. Lange, M.; Ni, Z.; Criscuolo, A.; Fedorova, M. Liquid Chromatography Techniques in Lipidomics Research. *Chromatographia* 2019, 82, 77–100, doi:10.1007/s10337-018-3656-4.
16. Milic, I.; Hoffmann, R.; Fedorova, M. Simultaneous Detection of Low and High Molecular Weight Carbonylated Compounds Derived from Lipid Peroxidation by Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2013, 85, 156–162, doi:10.1021/ac302356z.
17. Guillén, M.D.; Cabo, N. Fourier Transform Infrared Spectra Data versus Peroxide and Anisidine Values to Determine Oxidative Stability of Edible Oils. *Food Chemistry* 2002, 77, 503–510.
18. Silva, F.A.M.; Borges, F.; Ferreira, M.A. Effects of Phenolic Propyl Esters on the Oxidative Stability of Refined Sunflower Oil. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 3936–3941.
19. *Rancidity in Foods*; Allen, J.C., Hamilton, R.J., Eds.; 3rd ed.; Blackie Academic: London, 1994.
20. Ayala, A.; Muñoz, M.F.; Argüelles, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014, 2014, 1–31, doi:10.1155/2014/360438.
21. Thorning, F.; Jensen, F.; Ogilby, P.R. Modeling the Effect of Solvents on Nonradiative Singlet Oxygen Deactivation: Going beyond Weak Coupling in Intermolecular Electronic-to-Vibrational Energy Transfer. *J. Phys. Chem. B* 2020, 124, 2245–2254, doi:10.1021/acs.jpccb.0c00807.
22. Zielinski, Z.A.M.; Pratt, D.A. Lipid Peroxidation: Kinetics, Mechanisms, and Products. *J. Org. Chem.* 2017, 82, 2817–2825, doi:10.1021/acs.joc.7b00152.
23. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*; Shahidi, F., Ed.; 1st ed.; Wiley, 2005.
24. Yin, H.; Xu, L.; Porter, N.A. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chem. Rev.* 2011, 111, 5944–5972, doi:10.1021/cr200084z.
25. Frankel, E.N. Hydroperoxide Decomposition. In *Lipid Oxidation*; Elsevier, 2012, 67–98.
26. *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biochemistry*; Akoh, C.C., Min, D.B., Eds.; Food science and technology; 2nd ed., rev.expanded.; M. Dekker: New York, 2002; ISBN 978-0-8247-0749-1.
27. Aidos, I.; Lourenco, S.; Padt, A.; Lutten, J.B.; Boom, R.M. Stability of Crude Herring Oil Produced from Fresh Byproducts: Influence of Temperature during Storage. *J Food Science* 2002, 67, 3314–3320, doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb09585.x.
28. Collin, F. Chemical Basis of Reactive Oxygen Species Reactivity and Involvement in Neurodegenerative Diseases. *IJMS* 2019, 20, 2407, doi:10.3390/ijms20102407.
29. Frenette, M.; Scaiano, J.C. Evidence for Hydroxyl Radical Generation During Lipid (Linoleate) Peroxidation. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 9634–9635, doi:10.1021/ja801858e.
30. Velasco, J.; Andersen, M.L.; Skibsted, L.H. Evaluation of Oxidative Stability of Vegetable Oils by Monitoring the Tendency to Radical Formation. A Comparison of Electron Spin Resonance Spectroscopy with the Rancimat Method and Differential Scanning Calorimetry. *Food Chemistry* 2004, 85, 623–632, doi:10.1016/j.foodchem.2003.07.020.
31. Frankel, E. *Chemistry of Autoxidation: Mechanism, Products and Flavor Significance.*; American Oil Chemists' Society.; Min DB, Smouse TH, editors, 1985, 1-37.
32. Steenson, D.F.; Lee, J.H.; Min, D.B. Solid Phase Microextraction of Volatile Soybean Oil and Corn Oil Compounds. *J Food Science* 2002, 67, 71–76, doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb11361.x.

33. Gawrysiak-Witulska, M.; Rudzińska, M.; Wawrzyniak, J.; Siger, A. The Effect of Temperature and Moisture Content of Stored Rapeseed on the Phytosterol Degradation Rate. *J Am Oil Chem Soc* 2012, 89, 1673–1679, doi:10.1007/s11746-012-2064-4.
34. Sionek, B.; Krygier, K.; Ukalski, K.; Ukalska, J.; Amarowicz, R. The Influence of Nitrogen and Carbon Dioxide on the Oxidative Stability of Fully Refined Rapeseed Oil: The Influence of Nitrogen and Carbon Dioxide. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2013, 115, 1426–1433, doi:10.1002/ejlt.201200328.
35. Xu, L.; Yu, X.; Li, M.; Chen, J.; Wang, X. Monitoring Oxidative Stability and Changes in Key Volatile Compounds in Edible Oils during Ambient Storage through HS-SPME/GC–MS. *International Journal of Food Properties* 2017, 20, 1-13, S2926–S2938, doi:10.1080/10942912.2017.1382510.
36. Choe, E.; Min, D.B. Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Comp Rev Food Sci Food Safety* 2006, 5, 169–186, doi:10.1111/j.1541-4337.2006.00009.x.
37. Krumova, K.; Cosa, G. Chapter 1. Overview of Reactive Oxygen Species. In *Comprehensive Series in Photochemical & Photobiological Sciences*; Nonell, S., Flors, C., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2016; Vol. 1, pp. 1–21 ISBN 978-1-78262-038-9.
38. Min, D.B.; Callison, A.L.; Lee, H.O. Singlet Oxygen Oxidation for 2-Pentylfuran and 2-Pentenylfuran Formation in Soybean Oil. *J Food Science* 2003, 68, 1175–1178, doi:10.1111/j.1365-2621.2003.tb09620.x.
39. Wszelaki, A.L.; Delwiche, J.F.; Walker, S.D.; Liggett, R.E.; Miller, S.A.; Kleinhenz, M.D. Consumer Liking and Descriptive Analysis of Six Varieties of Organically Grown Edamame-Type Soybean. *Food Quality and Preference* 2005, 16, 651–658, doi:10.1016/j.foodqual.2005.02.001.
40. Popovici, V. The Impact of Hawthorn Lipophilic Extract on Oxidative Stability of Food Products.; Chisinau, 2018; pp. 198–202.
41. Popovici, V.; Sturza, R.; Ghendov-Moșanu, A.; Rosca, I.; Soran, M.-L.; Lung, I.; Opreș, O. Total Carotenoid Content of Local Berries Lipophilic Extracts.; TUM, Chisinau, 2018; p. 228.
42. Popovici, V.; Boaghi, E.; Radu, O.; Capcanari, T.; Rubtov, S. Evaluation of Total Carotenoid Content in Functional Food Products with Rosehip Powder (R.Canina).; Chișinău, October 17 2019.
43. Hernández, Y.; Lobo, M.G.; González, M. Determination of Vitamin C in Tropical Fruits: A Comparative Evaluation of Methods. *Food Chemistry* 2006, 96, 654–664, doi:10.1016/j.foodchem.2005.04.012.
44. Stagos, D. Antioxidant Activity of Polyphenolic Plant Extracts. *Antioxidants* 2019, 9, 19, doi:10.3390/antiox9010019.
45. Wani, T.A.; Wani, S.M.; Ahmad, M.; Ahmad, M.; Gani, A.; Masoodi, F.A. Bioactive Profile, Health Benefits and Safety Evaluation of Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.): A Review. *Cogent Food & Agriculture* 2016, 2, doi:10.1080/23311932.2015.1128519.
46. Ghendov-Moșanu, A.; Sturza, R.; Opreș, O.; Lung, I.; Popescu, L.; Popovici, V.; Soran, M.-L.; Patraș, A. Effect of Lipophilic Sea Buckthorn Extract on Cream Cheese Properties. *J Food Sci Technol* 2020, 57, 628–637, doi:10.1007/s13197-019-04094-w.
47. Alirezalu, A.; Ahmadi, N.; Salehi, P.; Sonboli, A.; Alirezalu, K.; Mousavi Khaneghah, A.; Barba, F.J.; Munekata, P.E.S.; Lorenzo, J.M. Physicochemical Characterization, Antioxidant Activity, and Phenolic Compounds of Hawthorn (*Crataegus* Spp.) Fruits Species for Potential Use in Food Applications. *Foods* 2020, 9, 436, doi:10.3390/foods9040436.
48. Roman, I.; Stănilă, A.; Stănilă, S. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of *Rosa Canina* L. Biotypes from Spontaneous Flora of Transylvania. *Chemistry Central Journal* 2013, 7, 73.
49. Biehler, E.; Mayer, F.; Hoffmann, L.; Krause, E.; Bohn, T. Comparison of 3 Spectrophotometric Methods for Carotenoid Determination in Frequently Consumed Fruits and Vegetables. *Journal of Food Science* 2010, 75, C55–C61, doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01417.x.
50. Wenzig, E.M.; Widowitz, U.; Kunert, O.; Chrubasik, S.; Bucar, F.; Knauder, E.; Bauer, R. Phytochemical Composition and in Vitro Pharmacological Activity of Two Rose Hip (*Rosa Canina* L.) Preparations. *Phytomedicine* 2008, 15, 826–835, doi:10.1016/j.phymed.2008.06.012.

51. Popovici, V.; Sturza, R. Antioxidant Capacity of Local Berries in Complex Food Products.; Suceava, 2018, 27 (1), 32-36.
52. Popovici, V.; Rosca, I.; Ciobanu, C.; Soran, M.-L.; Lung, I. Stabilitate Oxidative et Activite Antioxydante Des Extraits Liposolubles d'eglantier.; Bacau, ROMANIA, June 27 2018; p. p.95.
53. Popovici, V. Evaluarea Impactului Extractelor Horticole Asupra Stabilității Oxidative a Complexului Lipidic Din Alimente.; Chișinău, May 4 2017; p. p.31-33.
54. Popovici, V. The Oxidative Stability of Vegetable Oils Enriched with Caratenoids.; UTM, Chișinău, March 26 2019, 1, 509-510.
55. Popovici, V. The Oxidative Stability of Seabuckthorn Lipophilic Extracts.; UTM, Chișinău, April 1 2020, 1, 411-414.
56. Wang, N.; Ma, T.; Yu, X.; Xu, L.; Zhang, R. Determination of Peroxide Values of Edible Oils by Ultraviolet Spectrometric Method. *Food Anal. Methods* 2016, 9, 1412–1417.
57. Jaarin, K.; Kamisah, Y. Repeatedly Heated Vegetable Oils and Lipid Peroxidation. In *Lipid Peroxidation*; Catala, A., Ed.; InTech, 2012 ISBN 978-953-51-0716-3.
58. Popovici, V.; Rosca, I.; Ganta, D.-L.; Esanu, N. Diminuarea Impactului Oxidării Lipidelor Cu Adaosuri Vegetale de Antioxidanți.; Chisinau, 2016.
59. Javidipour, I.; Erinç, H.; Baştürk, A.; Tekin, A. Oxidative Changes in Hazelnut, Olive, Soybean, and Sunflower Oils during Microwave Heating. *International Journal of Food Properties* 2017, 20, 1582–1592, doi:10.1080/10942912.2016.1214963.
60. Andina, L.; Riyanto, R.; Rohman, A. Determination of Anisidine Value of Red Fruit Oil under Elevated Temperature Using FTIR Spectroscopy and Multivariate Calibration. *International food research journal* 2014, 21, 2325–2330.
61. Baker, I.; Chohan, M.; Opara, E.I. Impact of Cooking and Digestion, In Vitro, on the Antioxidant Capacity and Anti-Inflammatory Activity of Cinnamon, Clove and Nutmeg. *Plant Foods Hum Nutr* 2013, 68, 364–369, doi:10.1007/s11130-013-0379-4.
62. Bermudezsoto, M.; Tomasbarberan, F.; Garciaconesa, M. Stability of Polyphenols in Chokeberry (*Aronia Melanocarpa*) Subjected to in Vitro Gastric and Pancreatic Digestion. *Food Chemistry* 2007, 102, 865–874, doi:10.1016/j.foodchem.2006.06.025.
63. Mihaylova, D.; Desseva, I.; Stoyanova, M.; Petkova, N.; Terzyiska, M.; Lante, A. Impact of In Vitro Gastrointestinal Digestion on the Bioaccessibility of Phytochemical Compounds from Eight Fruit Juices. *Molecules* 2021, 26, 1187, doi:10.3390/molecules26041187.
64. Bouayed, J.; Deußer, H.; Hoffmann, L.; Bohn, T. Bioaccessible and Dialysable Polyphenols in Selected Apple Varieties Following in Vitro Digestion vs. Their Native Patterns. *Food Chemistry* 2012, 131, 1466–1472, doi:10.1016/j.foodchem.2011.10.030.
65. Popovici, V. Stabilizarea uleiurilor vegetale cu compuși biologic active din surse regenerabile, teză de doctorat, Universitatea Tehnică a Moldovei, Chișinău, Republica Moldova, iunie 2022.
66. Sarolić, M.; Gugić, M.; Tuberoso, C.I.G.; Jerković, I.; Suste, M.; Marijanović, Z.; Kuš, P.M. Volatile Profile, Phytochemicals and Antioxidant Activity of Virgin Olive Oils from Croatian Autochthonous Varieties Mašnjača and Krvavica in Comparison with Italian Variety Leccino. *Molecules* 2014, 19, 881–895, doi:10.3390/molecules19010881.
67. Nawar, W.W. Thermal Degradation of Lipids. *J. Agric. Food Chem.* 1969, 17, 18–21.
68. Frankel, E.N.; Selke, E.; Neff, W.E.; Miyashita, K. Autoxidation of Polyunsaturated Triacylglycerols. IV. Volatile Decomposition Products from Triacylglycerols Containing Linoleate and Linolenate. *Lipids* 1992, 27, 442–446, doi:10.1007/BF02536386.
69. Vichi, S.; Romero, A.; Tous, J.; Tamames, E.L.; Buxaderas, S. Determination of Volatile Phenols in Virgin Olive Oils and Their Sensory Significance. *Journal of Chromatography A* 2008, 1211, 1–7, doi:10.1016/j.chroma.2008.09.067.