

UNIVERSITATEA „POLITEHNICA” din BUCUREȘTI
FACULTATEA DE CHIMIE APLICATĂ ȘI ȘTIINȚA MATERIALELOR
DEPARTAMENTUL DE BIORESURSE ȘI ȘTIINȚA POLIMERILOR

Nr. Decizie Senat _____ din _____

TEZĂ DE DOCTORAT

Tehnici neconvenționale pentru separarea compușilor valoroși din plante
Nonconventional techniques for the separation of valuable compounds from plants

Autor: ing. Ioana ASOFIEI

Conducător de doctorat: Prof.dr.ing. Ioan CĂLINESCU

Președinte	Prof.dr.ing. Mircea Teodorescu	de la	Universitatea Politehnica din București
Coordonator doctorat	Prof.dr.ing. Ioan Călinescu	de la	Universitatea Politehnica din București
Referent	Prof.dr.ing. Vasile Lavric	de la	Universitatea Politehnica din București
Referent	Conf.dr. Christina Zălaru	de la	Universitatea din București
Referent	Dr.ing. Daniel Ighigeanu	de la	INFLPR Măgurele

BUCUREȘTI

- 2017 -

UNIVERSITATEA „POLITEHNICA” din BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ DE CHIMIE APLICATĂ ȘI ȘTIINȚA MATERIALELOR
DEPARTAMENTUL DE BIORESURSE ȘI ȘTIINȚA POLIMERILOR

Tehnici neconvenționale pentru separarea compuşilor valoroşi din plante

Rezumatul tezei

Autor:

Ing. Ioana ASOFIEI

Conducător de doctorat:

Prof.dr.ing. Ioan CĂLINESCU

CUPRINS

INTRODUCERE.....	6
PARTEA ÎNTÂI - STUDIU DE LITERATURĂ.....	8
CAPITOLUL I – STUDIUL DE LITERATURĂ PRIVIND EXTRAȚIA POLIFENOLILOR.....	9
I.1. Descrierea plantei selecționate.....	9
I.2. Localizarea polifenolilor în structura plantei.....	11
I.3. Clasificarea compușilor polifenolici.....	12
I.4. Metode de extracție a polifenolilor.....	15
I.4.1. Metode convenționale de extracție a polifenolilor.....	16
I.4.2. Metode neconvenționale de extracție a polifenolilor.....	17
I.5. Mecanismul de extracție a compușilor bioactivi.....	25
CAPITOLUL II – STUDIUL DE LITERATURĂ PRIVIND EXTRAȚIA ULEIURILOR ESEȚIALE.....	28
II.1. Descrierea plantelor selecționate.....	28
II.1.1. Rozmarinul și cimbrul.....	28
II.1.2. Ghimbirul.....	29
II.2. Clasificarea uleiurilor esențiale.....	30
II.3. Localizarea uleiurilor esențiale în plante.....	31
II.4. Metode de extracție a uleiurilor esențiale.....	33
II.4.1. Metode convenționale de extracție a uleiurilor esențiale.....	34
II.4.2. Tehnici inovative de extracție a uleiurilor esențiale.....	35
PARTEA A DOUA - STUDIU EXPERIMENTAL	42
OBIECTIVELE STUDIULUI	43
CAPITOLUL III – EXTRAȚIA POLIFENOLILOR DIN FRUNZE DE CĂȚINĂ	46
III.1. Introducere	46
III.2. Materiale și metode utilizate	47
III.2.1. Materiale utilizate	47
III.2.2. Echipamentele de extracție utilizate	47
III.2.3. Procedura de extracție a polifenolilor.....	49
III.2.4. Metode de analiză a extractelor obținute	52
III.3. Extracția asistată de microunde a polifenolilor din frunze de cătină în regim discontinuu	56

III.3.1. Influența diverșilor parametri asupra MAE.....	56
III.3.2. Extracția asistată de microunde vs. extracția convențională	66
III.3.3. Determinarea TPC prin DPV.....	67
III.3.4. Compoziția extractelor de cătină	68
III.3.5. Concluzii parțiale.....	69
III.4. Extracția asistată de microunde a polifenolilor din frunze de cătină în regim semicontinuu	70
III.4.1. Influența diverșilor parametri asupra MAE.....	70
III.4.2. Activitatea antioxidantă a extractelor polifenolice	74
III.4.3. Compoziția extractelor de cătină	74
III.4.4. Concluzii parțiale.....	76
III.5. Extracția asistată de microunde a polifenolilor din frunze de cătină cu ajutorul antenelor coaxiale.....	76
III.5.1. Influența încălzirii neuniforme	76
III.5.2. Conținutul total de polifenoli și activitatea antioxidantă a extractelor	80
III.5.3. Compoziția extractelor de cătină	83
III.5.4. Concluzii parțiale.....	86
CAPITOLUL IV – EXTRACȚIA ULEIURILOR ESENȚIALE DIN PLANTE	87
IV.1. Introducere	87
IV.2. Materiale și metode utilizate	87
IV.2.1. Materiale utilizate.....	87
IV.2.2. Echipamentele de extracție utilizate.....	88
IV.2.3. Procedura de extracție a uleiurilor esențiale.....	93
IV.2.4. Metode de analiză a uleiului esențial și a materialului vegetal	97
IV.3. Extracția integrată asistată de microunde a uleiurilor esențiale și a polifenolilor din rozmarin și cimbru	98
IV.3.1. Extracția uleiului esențial de rozmarin și cimbru.....	98
IV.3.2. Extracția polifenolilor din frunzele pretratate prin MHG	106
IV.3.3. Concluzii parțiale	107
IV.4. Extracția uleiului esențial de ghimbir prin hidrodifuzie gravitațională asistată de microunde – considerente energetice	108
IV.4.1. Determinarea eficienței de extracție și a energiei consumate	108

IV.4.2. Analiza SEM a pulpei de ghimbir	112
IV.4.3. Concluzii parțiale	113
CONCLUZII GENERALE	115
PERSPECTIVE.....	117
CONTRIBUȚII ORIGINALE.....	118
DISEMINAREA REZULTATELOR	119
BIBLIOGRAFIE	121
Anexa 1. Listă de figuri	134
Anexa 2. Listă tabele.....	136
Anexa 3. Notații.....	138

Cuvinte cheie: extracție asistată de microunde, extracție convențională, compuși polifenolici, cătină, antenă coaxială, proces discontinuu de extracție, proces semicontinuu de extracție, hidodifuzie gravitațională asistată de microunde, hidrodistilare asistată de microunde, rozmarin, cimbru, ghimbir, pretratament cu microunde, ulei esențial, eficiență de extracție, energie consumată.

Notă: Notațiile capitolelor, subcapitolelor și respectiv ale figurilor și tabelelor din acest document sunt aceleași cu cele existente în memoriul tezei de doctorat.

OBIECTIVE ȘI STRUCTURA LUCRĂRII

Scopul acestui program de cercetare a fost de a dezvolta metode noi și de a îmbunătății metode existente de extracție a principiilor active din plante (compuși polifenolici și uleiuri esențiale).

Principalele obiective ale studiului sunt: extracția asistată de microunde a polifenolilor din frunze de cătină și extracția asistată de microunde a uleiurilor esențiale din plante aromatice (rozmarin, cimbru și ghimbir).

Lucrarea este structurată în două părți, și anume: în prima parte este prezentat un studiu de literatură cu privire la tema de cercetare, iar în a doua parte este prezentată partea experimentală originală.

Studiul de literatură este structurat mai departe în două capitole. **Capitolul I** prezintă un studiu de literatură cu privire la extracția polifenolilor din frunze de cătină care cuprinde informații despre materia primă aleasă (frunzele de cătină), clasificarea polifenolilor și localizarea acestora în frunzele de cătină, cât și metodele de extracție a acestora, metode convenționale sau metode inovative. De asemenea, este prezentat mecanismul de extracție a polifenolilor făcându-se o comparație între extracția convențională și cea asistată de microunde.

Capitolul al II-lea prezintă un studiu de literatură cu privire la extracția uleiurilor esențiale din plante aromatice. Acesta cuprinde descrierea plantelor selecționate (rozmarin, cimbru și ghimbir), clasificarea uleiurilor esențiale, cât și localizarea acestora în structura plantelor. De asemenea, sunt prezentate metodele convenționale de extracție a uleiurilor esențiale, cât și metodele inovative de extracție a acestora.

A doua parte a lucrării (partea originală) este structurată în două mari capitole.

În **capitolul al III-lea** este prezentată cercetarea efectuată pentru extracția polifenolilor din frunzele de cătină. Acest capitol este împărțit mai departe în trei subcapitole în care se prezintă extracția discontinuă și semicontinuă asistată de microunde a polifenolilor din frunze de cătină din punct de vedere al influenței parametrilor asupra procesului. Mai departe este prezentată o metodă inovativă de extracție ce utilizează antene de tip coaxial, metodă care conduce la îmbunătățirea procesului de extracție datorită utilizării unui sistem eficient de răcire și agitare și a existenței unei încălziri neuniforme în celula de extracție, asigurând astfel condiții blânde de lucru.

În **capitolul al IV-lea** este prezentată cercetarea efectuată pentru extracția uleiurilor esențiale din plante aromatice. Și acest capitol este împărțit la rândul lui în două subcapitole în care se prezintă studiul unui proces integrat de extracție a uleiurilor esențiale de rozmarin și cimbru prin hidrodifuzie gravitațională asistată de microunde, concomitent cu pretratamentul frunzelor în vederea extracției ulterioare a polifenolilor, pretratament care conduce la îmbunătățirea procesului de extracție. Mai departe este prezentată extracția uleiului esențial de ghimbir prin hidrodifuzie gravitațională asistată de microunde, punându-se accentul pe considerentele energetice.

INTRODUCERE

Odată cu creșterea prețului energiei și tendința de a reduce emisiile de dioxid de carbon, este necesară, pentru o economie sustenabilă, dezvoltarea de noi tehnologii și procese alternative care să conducă la minimizarea energiei utilizate și la maximizarea valorificării materiilor prime.

Biorafinăria este un concept definit ca procesarea sustenabilă a biomasei în vederea obținerii diversilor produși finali și a energiei. Biorafinăria este un complex industrial, care acoperă o gamă largă de tehnologii combinate, care vizează o transformare sustenabilă completă a biomasei în intermediari organici (cum ar fi etanolul, furfuralul, acidul lactic, glicerina, acidul levulinic și succinic, 5-hidroximetilfurfuralul, etc. (Gavrila et al. 2017a; Gavrila et al. 2017b), concomitent cu producția de biocombustibili, energie și produse chimice specifice (Rombaut et al. 2014).

Un astfel de concept poate fi aplicat oricărei producții industriale, de exemplu extracția produșilor naturali care pot fi utilizați ca suplimente alimentare sau în industria farmaceutică, cosmetică, medicină și agricultură. Termenul de produși naturali se referă la o gamă foarte largă de compuși chimici derivați și izolați din surse biologice fiind necesară cunoașterea accesului la aceștia și înțelegerea întrebuintării lor. Producții naturale includ: un organism întreg (plantă, animal sau microorganism), o parte a unui organism (frunze și flori ale plantelor, un organ al unui animal), un extract al unui organism sau exudate și compuși puri (alcaloide, flavonoide, glucozide, terpenoide) (Sarker et al. 2006). Deși plantele conțin o varietate de constituenți chimici, metaboliții secundari se găsesc de obicei în concentrații destul de mici, ceea ce reprezintă o provocare în recuperarea și separarea acestora (Zhang et al. 2011).

Dintre produșii naturali prezenți în plante fac parte și compușii polifenolici și uleiurile esențiale.

Polifenolii sunt compuși ce conțin unul sau mai multe inele aromatice cu unul sau mai multe grupări hidroxil. Aceștia se găsesc într-o mare varietate de plante și sunt cei mai abundenți metaboliți secundari (Salas et al. 2010). Polifenolii se găsesc foarte rar sub formă liberă, majoritatea fiind izolați în forme conjugate, cel mai adesea având legate grupări glucozidice (Lattanzio et al. 2006). Compușii fenolici din plante includ acizi fenolici, alcoolii fenolici, flavonoide, taninuri, stilbene și lignani (Naczek et al. 2006; Dai et al. 2010).

Uleiurile esențiale sunt amestecuri complexe de compuși volatili care se găsesc într-o mare varietate de plante aromatice fiind foarte importante în fiziologia și ecologia plantei. Acestea pot fi clasificate în două grupe principale: hidrocarburi și compuși oxigenați. Dintre hidrocarburi fac parte terpenele, sesquiterpenele și diterpenele, iar dintre compușii oxigenați esterii, aldehydele, cetonele, alcoolii, fenolii, oxizii, acizii și lactonele. Unele uleiuri esențiale mai pot conține și compuși cu azot sau sulf (Chemat et al. 2013; El Asbahani et al. 2015)

O definiție generală a “chimiei verzi” ar fi dezvoltarea de strategii care să reducă sau să elimine utilizarea și generarea de substanțe care au un impact negativ asupra mediului. Astfel se poate defini și conceptul de „extracții verzi” care se referă la dezvoltarea unor tehnici de extracție cu consum redus de energie și care să permită utilizarea de solvenți și substanțe

provenite din resurse regenerabile asigurând totodată păstrarea calității extractului obținut (Rombaut et al. 2014).

În cazul extracțiilor la scară industrială, procesele convenționale prezintă câteva inconveniente majore, cum ar fi: recuperarea completă a extractelor, timpi foarte lungi de extracție, consum mare de energie, etc. Astfel, în cazul “extracției verzi” este necesară focalizarea pe intensificarea procesului: utilizarea eficientă a energiei, creșterea transferului de masă, reducerea dimensiunii echipamentelor și reducerea etapelor de procesare, ca timp sau ca număr (Rombaut et al. 2014).

Extracția asistată de microunde (MAE) este una dintre cele mai avansate și promițătoare tehnici de extracție a compușilor bioactivi din plante (Chumnanpaisont et al. 2014). MAE reprezintă una dintre cele mai rapide metode de extracție având o eficiență foarte mare comparativ cu extracțiile clasice. De asemenea, în cazul MAE încălzirea are loc rapid, gradientii termici sunt reduși, echipamentele au dimensiuni mici (Alupului et al. 2012), consumul de energie este scăzut (Wang et al. 2010), timpul de extracție este mic, iar consumul de solvent este foarte redus comparativ cu metodele convenționale. (Chen et al. 2007; Chemat et al. 2015).

Hidrodifuzia gravitațională asistată de microunde (MHG) este o tehnică nouă de extracție a compușilor bioactivi din plante dezvoltată de Chemat și colaboratorii (Vian et al. 2008). Această metodă de extracție combină încălzirea cu microunde cu gravitația, procesul având loc la presiune atmosferică. Bazat pe un principiu destul de simplu, această tehnică nu implică adăugarea apei sau a altui solvent. Încălzirea apei intracelulare permite distrugerea celulelor plantei care conțin compușii bioactivi. Toți componenții, împreună cu apa intracelulară, sunt eliberați și transferați din interiorul matricei plantei către exteriorul acesteia. Acesta reprezintă fenomenul fizic de hidrodifuzie care permite extractului să cadă gravitațional (Chemat et al. 2017).

CAPITOLUL III – EXTRACȚIA POLIFENOLILOR DIN FRUNZE DE CĂȚINĂ

III.2. Materiale și metode utilizate

Frunzele de cătină (*Hippophae Rhamnoides* L.) au fost culese în vara anului 2014 la Hofigal S.A. în Furculești.

Extracțiile asistate de microunde în regim discontinuu și semicontinuu au fost efectuate cu ajutorul unui cuptor cu microunde monomod Biotage®Initiator. Aparatul de microunde a fost adaptat, în cazul extracției semicontinue, astfel încât introducerea solventului în reactor să aibă loc continuu.

Extracția asistată de microunde a polifenolilor cu ajutorul antenelor coaxiale a fost realizată utilizând instalația experimentală inovativă (IEI-1), care utilizează propagarea transversală electromagnetică (MW-TEM) în structură coaxială. Echipamentul se bazează pe operarea discontinuă a extracției polifenolilor într-o celulă de extracție ce conține materialul vegetal (fig. III.2).

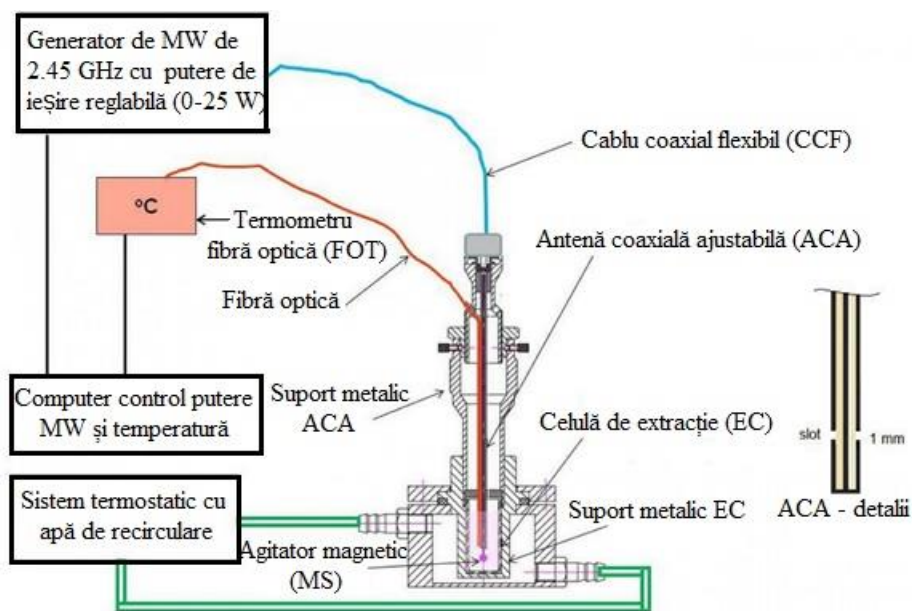


Fig. III.2. Schema echipamentului experimental (IEI-1) construit pentru extracția polifenolilor cu ajutorul antenelor coaxiale.

Experimentele au fost efectuate în triplicat, utilizând un raport solvent/plantă de 20/1 (v/w) în cazul tuturor metodelor de extracție utilizate.

Extracția asistată de microunde în regim discontinuu a compușilor polifenolici a fost realizată la diferite temperaturi, timpi de extracție, putere de microunde și viteze de agitare. Extracțiile au avut loc într-un amestec de etanol și apă la diferite concentrații de etanol. Extracțiile au avut loc utilizând 2 tipuri de reactoare prezentate în fig. III.3. Comparativ s-au efectuat și extracții convenționale utilizând aceleși condiții.



A – Reactor 1

B – Reactor 2

Fig. III.3. Tipuri de reactoare

Extracția semicontinuă asistată de microunde a compușilor polifenolici a fost realizată utilizând un reactor standard modificat astfel încât procesul să aibă loc în regim semicontinuu. Extracțiile asistate de microunde au fost efectuate aplicând două proceduri diferite, și anume: preîncălzirea solventului la o temperatură de 60°C înainte ca acesta să intre în reactor și introducerea solventului în reactor la temperatura camerei. Experimentele au avut loc în diferite tipuri de reactoare, prezentate în fig. III.4 (în fig. III.4A și III.4B sunt prezentate reactoarele

utilizate pentru extracția semicontinuă asistată de microunde, iar în fig. III.4C este prezentat reactorul utilizat la extracția semicontinuă convențională). Comparativ s-au efectuat și extracții convenționale utilizând aceleași condiții. Pe parcursul tuturor experimentelor temperatura a fost monitorizată, profilul acesteia fiind similar pentru ambele metode de extracție.



A – Reactor 3 B – Reactor 4

C – Reactor 5

Fig. III.4. Tipurile de reactoare utilizate pentru extracția semicontinuă (reactoarele 3 și 4 – extracția asistată de microunde; reactorul 5 – extracția convențională)

În scopul determinării eficienței extracției semicontinue, este necesară o informație asupra conținutului maxim de polifenoli care se găsește în frunzele de cătină. Astfel, s-a realizat o extracție discontinuă multiplă utilizând aceleași condiții de extracție ca în cazul procesului semicontinuu. După 8 cicluri cantitatea maximă cumulată de polifenoli din frunzele de cătină a fost 216.37 mg GAE/g DM.

Extracțiile în regim semicontinuu au fost realizate utilizând drept solvent un amestec de etanol și apă de concentrație 50%, la o temperatură de 60°C, diferite puteri de microunde și viteze de agitare. Experimentele au avut loc la diferite debite de solvent și implicit timpi diferiți de staționare. Pentru fiecare experiment s-au colectat 8 fracții de extract care au fost proaspăt analizate de fiecare dată.

În cazul extracției asistate de microunde a polifenolilor cu ajutorul antenelor coaxiale, experimentele au fost efectuate utilizând un amestec de apă/etanol de concentrație 50%, la o temperatură de 75°C, diferite viteze de agitare și timpi diferiți de extracție. Extracțiile au avut loc la diferite puteri de microunde (0 și 25 W) pentru toți timpii de extracție. Pentru a menține temperatura la valoarea dorită s-a utilizat un sistem termostatic cu recircularea apei. Pentru a obține același profil de temperatură pentru ambele metode (extracție convențională și MAE), încălzirea convențională a fost realizată cu apă fierbinte în sistem termostatat.

Extractele obținute au fost analizate în scopul determinării conținutului total de polifenoli (TPC) prin metoda Folin-Ciocalteu și prin voltametrie impulsională diferențială și a activității antioxidante prin metoda TEAC. De asemenea, s-a determinat compoziția chimică a extractelor (compuși fenolici majoritari) prin metoda HPLC.

III.3. Extracția asistată de microunde a polifenolilor din frunze de cătină în regim discontinuu

III.3.1. Influența diversilor parametri asupra MAE

a) Influența vitezei de agitare asupra extracției polifenolilor în câmp de microunde

Un prim studiu s-a realizat pentru urmărirea influenței agitării mediului de extracție asupra conținutului total de polifenoli extras, rezultatele fiind prezentate în fig. III.8 (Asofiei et al. 2016).

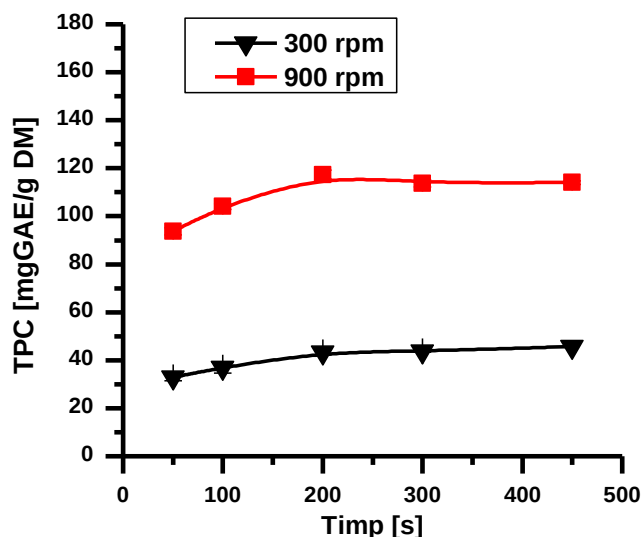


Fig. III.8. Influența vitezei de agitare asupra TPC pentru MAE în regim discontinuu (solvent 50% etanol în apă, temperatură 60°C, reactor 1) (Asofiei et al. 2016).

Din fig. III.8 se poate observa că, odată cu creșterea vitezei de agitare, cantitatea de polifenoli extrasă este aproape triplă la 900 rpm față de 300 rpm. În plus, creșterea timpului de extracție la 300 rpm nu permite obținerea unor concentrații echivalente cu cele obținute la 900 rpm. De asemenea, se observă că la 900 rpm, odată cu creșterea timpului de extracție peste 200 s, are loc o ușoară scădere a TPC-ului, de aceea este de dorit utilizarea unei metode de extracție în care agitarea să permită extracția completă a polifenolilor la timpi de extracție relativ scurți (Asofiei et al. 2016).

b) Influența tipului de reactor asupra extracției polifenolilor în câmp de microunde

Procesul de extracție este mai eficient cu cât viteza de agitare este mai mare. O metodă de îmbunătățire a vitezei de amestecare a mediului de extracție este modificarea geometriei reactorului. Așadar, reactorul a fost modificat astfel încât să permită utilizarea unui agitator magnetic cu dimensiuni mai mari. Pentru acest studiu, extracția compușilor polifenolici a fost realizată folosind două tipuri de reactoare (reactor normal pentru Biotage® Initiator - 1 și un reactor modificat - 2 așa cum este prezentat în fig. III.3). Cele două reactoare permit extracția polifenolilor utilizând același volum de solvent (5 mL). Rezultatele studiului influenței tipului de reactor asupra concentrației de polifenoli sunt prezentate în fig. III.9 (Asofiei et al. 2016).

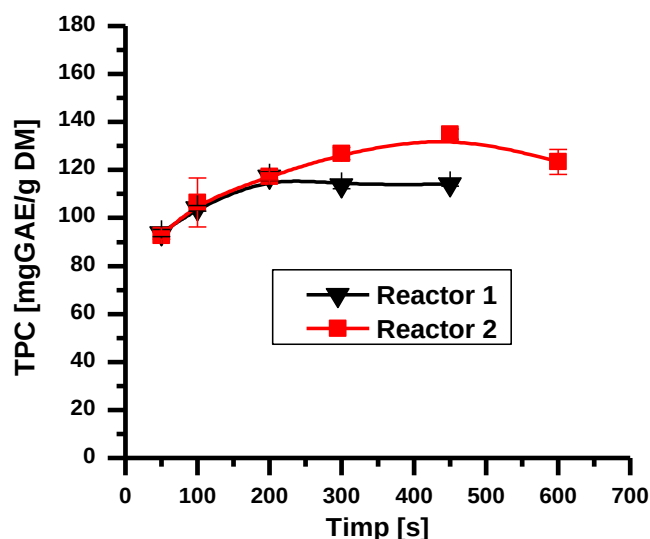


Fig. III. 9. Influența tipului de reactor asupra TPC pentru MAE în regim discontinuu (solvent 50% etanol în apă, temperatură 60°C, viteză agitare 900 rpm) (Asofiei et al. 2016).

Din fig. III.9 se observă că modificarea geometriei reactorului și utilizarea unui agitator cu dimensiuni mai mari conduce la îmbunătățirea procesului de extracție a polifenolilor. Deși pentru timpi mici de extracție concentrația de polifenoli este aproximativ aceeași pentru ambele reactoare, se poate observa că, după 200 s, în cazul utilizării reactorului 2 concentrația de polifenoli este semnificativ mai mare (cu aproximativ 20%). Ținând cont că cele mai mari cantități de polifenoli s-au obținut pentru reactorul modificat, următoarele studii de optimizare a procesului de extracție a polifenolilor din frunzele de cătină s-au realizat utilizând acest reactor (Asofiei et al. 2016).

c) *Influența concentrației de etanol asupra extracției polifenolilor*

Eficiența extracției polifenolilor poate fi influențată și de solubilitatea acestora în solventul utilizat. Parametrul de solubilitate al unui lichid (δ), definit ca rădăcina pătrată a densității energiei de coeziune, este o mărime care permite estimarea mai multor proprietăți termodinamice ale soluțiilor. Densitatea energiei de coeziune este definită ca raportul dintre energia de vaporizare și volumul molar pentru o anumită temperatură. Conceptul parametrului de solubilitate se referă la formularea unei expresii pentru energia molară parțială a amestecului, sau pentru cazul special al unui volum cu sarcina zero, pentru căldura amestecului dintre două lichide. Această metodă de estimare a parametrului de solubilitate permite estimarea atât a δ cât și a volumului molar pentru lichide și pentru compuși cu mase moleculare mari, fiind necesară doar cunoașterea structurii chimice a compusului (Fedors 1973).

În tabelul III.1 sunt prezentați parametrii de solubilitate Hildebrand pentru compușii fenolici din frunzele de cătină.

Studiul influenței solventului asupra procesului de extracție s-a realizat prin efectuarea experimentelor de extracție utilizând diferite concentrații de etanol în apă (fig. III.10).

Tabelul III. 1. Parametrii de solubilitate Hildebrand pentru polifenolii din frunzele de cătină (*media ponderată a fost calculată funcție de concentrațiile procentuale obținute în urma analizei HPLC pentru extracția asistată de microunde – vezi subcap. III.5.3. Analiza HPLC a fost efectuată singular)

Solvent	
Etanol	26.1
Apă	48
50% Etanol	37.1
Compus fenolic	
Acid galic	39.08
Catechină	32.72
Epicatechină	32.72
Epigallocatechină	33.35
Acid cafeic	31.74
Rutin	42.70
Acid cumaric	27.79
Acid ferulic	29.68
Kaempferol-3-O-glucozid	41.24
Izoramnetin-3-O-glucozid	42.87
Quercetină	40.98
Kaempferol	37.88
Izoramnetin	36.23
Media ponderată*	37.1

Din analiza datelor experimentale prezentate în fig. III.10 se poate observa că odată cu creșterea concentrației de etanol în mediul de extracție, crește și conținutul total de polifenoli. Așadar, adăugarea unei cantități de 25% etanol în apă conduce la obținerea unor concentrații cu aproximativ 30 mgGAE/g DM mai mari față de utilizarea doar a apei drept solvent. În plus creșterea concentrației de etanol în apă la 50% conduce la dublarea cantității de polifenoli extrasă comparativ cu extracția în apă. Această comportare poate fi explicată prin diferența de solubilitate a compușilor în apă și etanol. Pentru a valida această comportare s-au calculat parametrii de solubilitate Hildebrand pentru compușii polifenolici și pentru solventul utilizat. Astfel, urmărind datele prezentate în tabelul III.1, se poate observa că amestecul de apă/etanol de concentrație 50% și compușii polifenolici (media ponderată a acestora) au aceeași valoare a parametrului de solubilitate Hildebrand, ceea ce înseamnă că polifenolii vor fi extrași cu o eficiență mai mare utilizând un amestec de apă/etanol de 50% decât utilizând doar unul dintre solvenți. Așadar, alegerea raportului solvent-apă depinde de compoziția de polifenoli. În concluzie, o concentrație de 50% etanol în apă conduce la extracția eficientă a polifenolilor din frunzele de cătină la temperatura de 60°C (Asofiei et al. 2016).

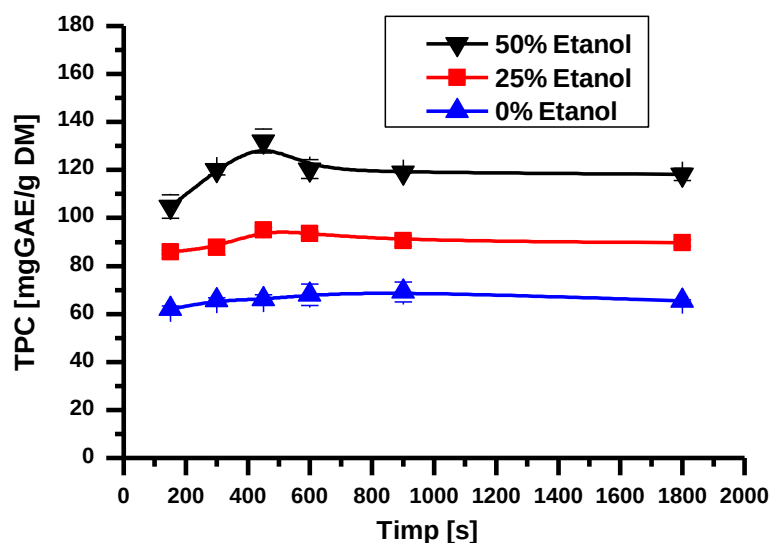


Fig. III. 10. Influența concentrației etanolului asupra TPC pentru MAE în regim discontinuu (temperatură 60°C, viteză agitare 900 rpm, reactor 2) (Asofiei et al. 2016).

d) *Influența temperaturii și a timpului asupra extracției polifenolilor*

Un alt parametru studiat în cazul extracției polifenolilor din frunze de cătină este influența temperaturii asupra conținutului total de polifenoli.

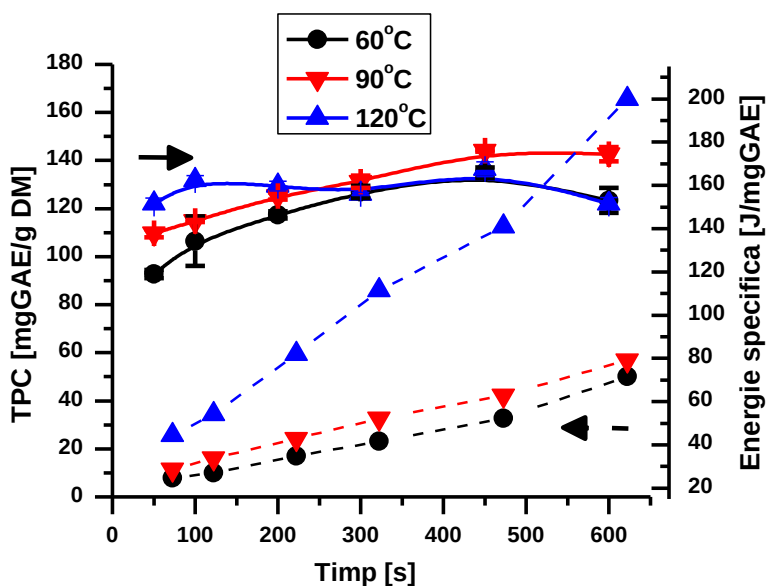


Fig. III.12. Influența temperaturii asupra TPC și asupra energiei specifice pentru MAE în regim discontinuu (solvent 50% etanol în apă, viteză agitare 900 rpm, reactor 2) (Asofiei et al. 2016).

În fig. III.12 sunt prezentate influența timpului și a temperaturii de extracție asupra TPC și asupra energiei specifice pentru MAE în regim discontinuu. După cum se poate observa din fig. III.12, energia specifică cea mai mică corespunde experimentelor efectuate la temperatura de 60°C. La 90°C se poate observa o ușoară creștere a energiei specifice comparativ cu valorile obținute la 60°C. În plus, cantitatea de polifenoli extrasă la 90°C este mai mare decât în cazul

extracțiilor la 60°C sau 120°C. Din acest motiv, extracția la 90°C poate fi considerată a fi mai eficientă atât din punct de vedere al conținutului total de polifenoli obținut, cât și din punct de vedere al energiei specifice.

Luând în considerare ridicarea la scară industrială este de așteptat ca aceste valori ale energiei specifice să scadă. Această comportare este tipică instalațiilor pilot și industriale unde este necesar un raport mare între energia de microunde absorbită de sistem și cea furnizată. În studiul nostru experimental, datorită utilizării unor reactoare cu volume mici, raportul între energia furnizată și cea absorbită este de doar 1 la 4 (Asofiei et al. 2016).

III.3.2. Extracția asistată de microunde vs. extracția convențională

Pentru a pune în evidență efectul microundelor asupra extracției polifenolilor din frunze de cătină în regim discontinuu s-au efectuat experimente în aceleași condiții, pentru diverse temperaturi, atât în cazul extracției asistată de microunde, cât și în cazul extracției convenționale (fig. III.13).

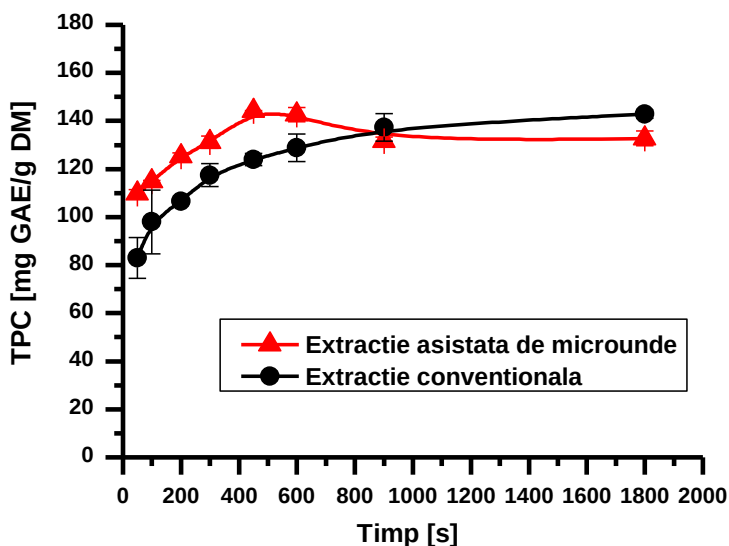


Fig. III. 13. Influența timpului de extracție asupra TPC pentru extracția convențională și în câmp de microunde în regim discontinuu (solvent 50% etanol în apă, temperatură 90°C, viteză agitare 900 rpm, reactor 2) (Asofiei et al. 2016).

Din fig. III.13 se observă că odată cu creșterea timpului de extracție, creștere și conținutului de polifenoli, atingându-se un maxim după 450 s la extracția în câmp de microunde și în primele 1800 s în cazul extracției convenționale. În orice caz, o creștere în continuare a timpului de extracție conduce la scăderea conținutului de polifenoli. Așadar, deși concentrația maximă de polifenoli este aproximativ aceeași pentru ambele metode, în cazul MAE timpul de extracție este redus semnificativ (Asofiei et al. 2016).

III.3.3. Determinarea TPC prin DPV

Abilitatea compușilor de a dona electroni, care se poate măsura și prin voltametrie impulsională-diferențială, ar putea fi asociată cu capacitatea antioxidantă a compușilor polifenolici. Pentru potențiale mai mici ale picului de oxidare, aceasta are loc mai ușor, astfel că activitatea antioxidantă a câmpului este mai mare (Abou Samra et al. 2011).

În tabelul III.3 sunt prezentate comparativ rezultatele analizei TPC prin metoda Folin-Ciocalteu și prin DPV. Se poate observa că valorile DPV sunt mai mici decât cele obținute prin metoda Folin-Ciocalteu. Acest lucru poate fi explicat prin faptul că reactivul Folin-Ciocalteu este mai puțin selectiv putând fi redus și de alți compuși non-fenolici prezenți în extractul de analizat (Șeruga et al. 2011).

Tabelul III. 3. Conținutul total de polifenoli determinat prin metodele Folin-Ciocalteu și DPV (Asofiei et al. 2016).

Nr. Exp.	Condiții experimentale			TPC (mg GAE/g DM)	
	Concentrație etanol [%]	Timp extracție [s]	Tip încălzire	Folin-Ciocalteu	DPV
1	50	450	Microunde	134.96	93.71±3.2
2	25	450	Microunde	95.02	70.34±2.5
3	0	450	Microunde	66.00	47.90±1.1
4	0	150	Microunde	62.13	41.40±0.8
5	50	450	Convențional	123.93	86.49±2.9

III.3.4. Compoziția extractelor de cătină

Conținutul total de polifenoli poate fi influențat și de alți compuși cu caracter reducător care sunt extrași din plantă (așa cum s-a prezentat în subcap. III.3.3.). Din acest motiv extractele polifenolice au fost supuse analizei HPLC în scopul cuantificării conținutului de compuși polifenolici (tabelul III.4). Compușii polifenolici din frunzele de cătină identificați sunt: acidul galic, catechina, acidul cafeic și rutinul. În acest caz, compusul fenolic majoritar a fost catechina, urmată de acidul galic și rutin (Asofiei et al. 2016).

Tabelul III. 4. Analiza cantitativă a compușilor polifenolici din frunzele de cătină (MAE, temperatură 90°C, viteză agitare 900 rpm, reactor 2, solvent 50% etanol în apă) (Asofiei et al. 2016).

Nr. Exp.	Timp [s]	Compus [mg/gDM]				TPC [mgGAE/g DM]
		Acid galic	Catechină	Acid cafeic	Rutin	
1.	50	3.24	9.37	1.51	3.94	109.75±1.6
2.	100	3.34	10.09	1.64	3.79	114.84±0.5
3.	200	3.31	9.24	1.44	4.02	125.31±1.5
4.	300	3.13	9.02	1.4	3.01	131.14±2.6

Urmărind rezultatele prezentate în tabelul III.4 se poate observa că o creștere a timpului de extracție conduce la creșterea conținutului total de polifenoli. Cu toate acestea, conținutul în compuși majoritari prezintă o oarecare scădere la timpi mari de extracție (Asofiei et al. 2016).

III.4. Extracția asistată de microunde a polifenolilor din frunze de cătină în regim semicontinuu

III.4.1. Influența diversilor parametri asupra MAE

a) Influența vitezei de agitare și a debitului de solvent asupra extracției asistată de microunde a polifenolilor în regim semicontinuu

Pentru a determina factorii care influențează procesul semicontinuu al extracției asistate de microunde a polifenolilor, s-au studiat o serie parametri. Astfel, un prim parametru studiat a fost influența vitezei de agitare asupra TPC.

Viteza de agitare reprezintă un factor important asupra extracției polifenolilor. După cum se poate observa din fig. III.14, o viteză de agitare mare conduce la creșterea TPC atât în prima fracție extrasă cât și a concentrației totale de polifenoli în cele 8 fracții. Contactul dintre materialul vegetal și solvent este mai bun atunci când agitarea mediului de extracție este eficientă. Astfel va crește implicit și TPC. În plus, o viteză mare de agitare determină distrugerea mecanică a pereților celulari ai plantei, fiind facilitat accesul solventului în celulă, ceea ce favorizează extracția polifenolilor.

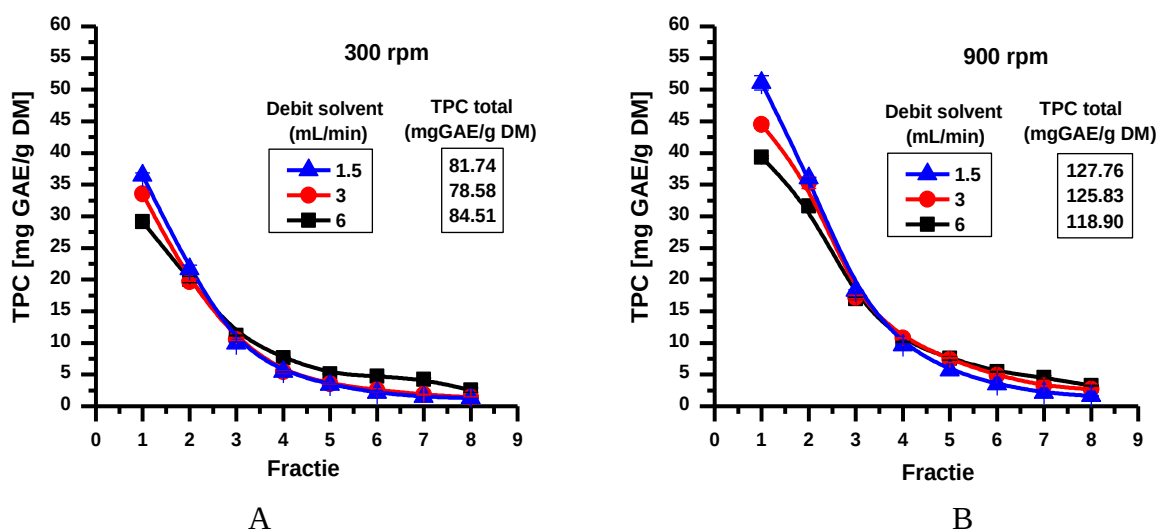


Fig. III. 14. Influența vitezei de agitare și a debitului de solvent asupra procesului semicontinuu de extracție asistată de microunde a polifenolilor (reactor 3; A – viteză agitare 300 rpm; B – viteză agitare 900 rpm).

Debitul de solvent reprezintă un alt parametru care influențează procesul semicontinuu de extracție asistată de microunde a polifenolilor. Descreșterea debitului de solvent conduce la o creștere importantă a conținutului de polifenoli în prima fracție (de la 39.34 mgGAE/g DM pentru un debit de 6 mL solvent/min la 51.06 mgGAE/g DM pentru un debit de 1.5 mL solvent/min) la o viteză de agitare de 900 rpm (fig. III.14B). În plus, descreșterea debitului de solvent conduce și la creșterea cantității totale de polifenoli în cele 8 fracții (de la 118.90 mgGAE/g DM pentru un debit de 6 mL solvent/min la 127.76 mgGAE/g DM pentru un debit de 1.5 mL solvent/min). Acest lucru poate fi explicat prin faptul că extracția polifenolilor este mai eficientă la un timp de staționare mai mare (creșterea debitului de staționare de la 50 la 200 s).

b) Influența tipului de reactor asupra procesului semicontinuu de extracție asistată de microunde a polifenolilor

După cum s-a demonstrat la subpunctul anterior, creșterea vitezei de agitare conduce la obținerea unei concentrații mai mare de polifenoli pentru cele 8 fracții (de la 78.58 mgGAE/g DM pentru o viteză de agitare de 300 rpm la 125.83 mgGAE/g DM pentru o viteză de agitare de 900 rpm, la un debit de solvent de 3 mL/min). O metodă pentru a obține o amestecare eficientă a mediului de extracție este utilizarea unui agitator magnetic cu dimensiuni mai mari. Așadar, reactorul utilizat pentru extracții a fost modificat astfel încât să permită utilizarea unui agitator mai mare.

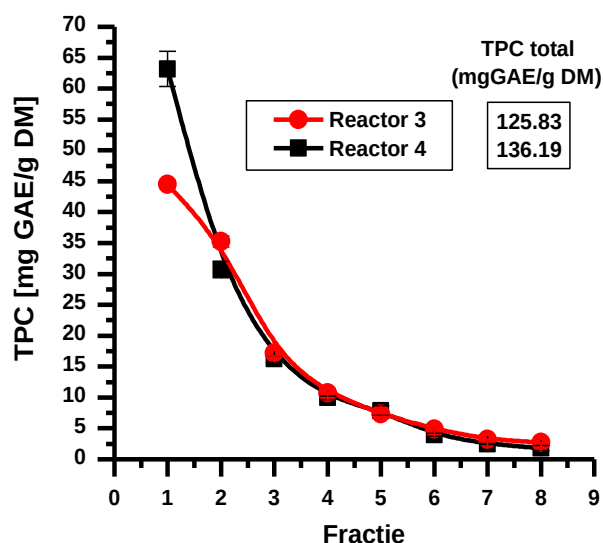


Fig. III. 15. Influența tipului de reactor asupra procesului semicontinuu de extracție asistată de microunde a polifenolilor (viteză agitare – 900 rpm, debit solvent – 3 mL/min).

Reactoarele utilizate pentru extracția asistată de microunde a polifenolilor în regim semicontinuu sunt prezentate în fig. III.4 (reactorul 3 – fig. III.4A Și reactorul 4 – fig. III.4B). Influența tipului de reactor asupra procesului semicontinuu de extracție asistată de microunde a polifenolilor a fost studiată pentru un debit de solvent de 3 mL/min pentru ambele reactoare, rezultatele fiind prezentate în fig. III.15.

Intensificarea agitării mediului de extracție prin utilizarea unui agitator magnetic mai mare conduce la obținerea unui TPC mai mare în prima fracție extrasă (fig. III.15). Deși diferența între valorile TPC ale celorlalte fracții este nesemnificativă, concentrația totală a polifenolilor pentru cele 8 fracții este mai mare în cazul reactorului 4. Această creștere a TPC-ului poate fi explicată printr-un transfer de masă mai bun pentru reactorul 4 comparativ cu reactorul 3.

c) Influența preîncălzirii solventului asupra procesului semicontinuu de extracție asistată de microunde a polifenolilor

O strategie pentru a îmbunătăți cantitatea de polifenoli în prima fracție a procesului semicontinuu este preîncălzirea solventului. Înainte de introducerea în vasul de extracție care

conține frunzele de cătină, solventul este încălzit la 60°C, circulând apoi continuu prin reactorul de extracție. Influența preîncălzirii solventului asupra TPC-ului pentru fiecare fracție la diferite debite de solvent este prezentată în fig. III.16.

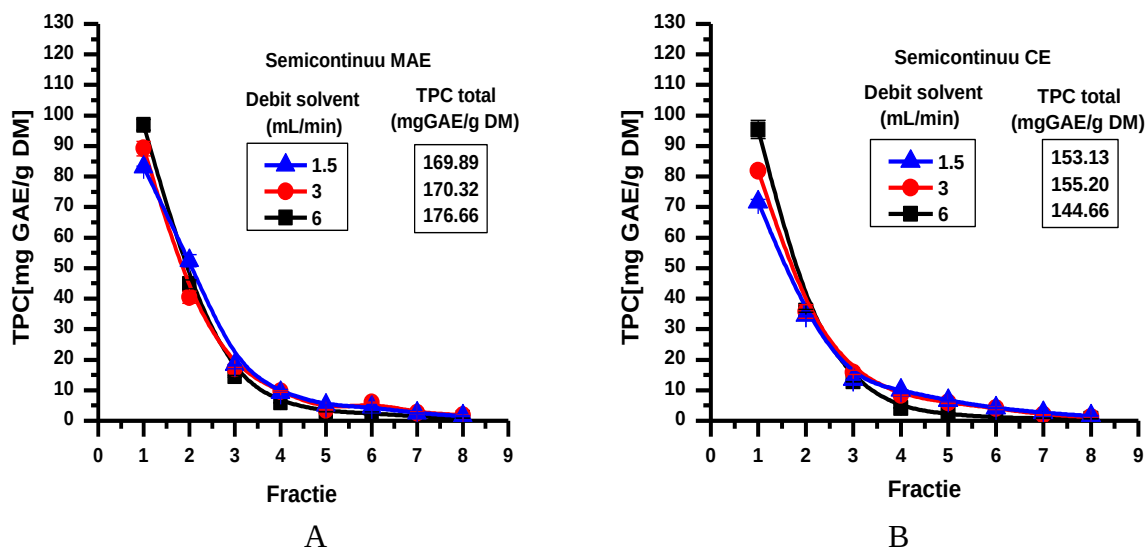


Fig. III. 16. Influența preîncălzirii solventului asupra procesului semicontinuu de extracție la o viteză de agitare de 900 rpm (A – extracția asistată de microunde - reactor 4 și B – extracția convențională - reactor 5)

Preîncălzirea solventului influențează în mod favorabil extracția semicontinuu asistată de microunde a polifenolilor, TPC-ul crescând în prima fracție cu aproximativ 30%, iar concentrația totală de polifenoli cu aproximativ 20% față de extracția fără preîncălzirea solventului pentru un debit de 3 mL/min (fig. III.15 și III.16A). De asemenea, preîncălzirea solventului permite creșterea debitului de solvent de la 1.5 mL/min la 6 mL/min fără a afecta eficiența extracției. Această strategie a preîncălzirii solventului conduce extracția a 80% din cantitatea totală de polifenoli din frunzele de cătină (176.66 mgGAE/g DM pentru extracția semicontinuu asistată de microunde și 216.37 mgGAE/g DM pentru extracția discontinuu repetată – vezi fig. III.16A și subcap. III.2.3.

Pentru a pune în evidență influența microundelor asupra extracției polifenolilor, s-au efectuat, de asemenea, extracții convenționale (CE) în regim semicontinuu (fig. III.16B). Experimentele au avut loc în aceleași condiții ca și în cazul extracției semicontinue asistată de microunde cu preîncălzirea solventului, utilizând reactorul 5 (fig. III.4C).

După cum se poate observa din fig. III.16A și III.16B, TPC-ul are o tendință similară pentru toate cele 8 fracții în cazul ambelor metode de extracție. Cu toate acestea, concentrația totală de polifenoli pentru cele 8 fracții este mai mare în cazul extracției asistată de microunde comparativ cu extracția convențională pentru care doar aproximativ 65-70% din polifenolii din frunzele de cătină sunt extrași.

III.4.2. Activitatea antioxidantă a extractelor polifenolice

Determinarea activității antioxidante a fost realizată pentru extracția asistată de microunde și convențională cu preîncălzirea solventului, la un debit de 3 mL/min și o viteză de agitare de 900 rpm. Activitatea antioxidantă pentru toate cele 8 fracții colectate este în concordanță cu valorile TPC obținute în aceleași condiții de extracție (fig. III.16 și III.17). Extractele obținute prin extracția asistată de microunde prezintă o activitate antioxidantă mai mare comparativ cu extracția convențională, atât în prima fracție cât și pentru cele 8 fracții cumulate (fig. III.17).

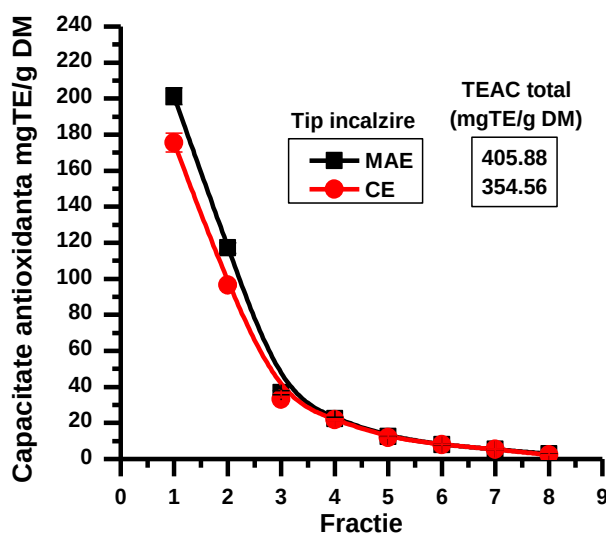


Fig. III. 17. Activitatea antioxidantă a extractelor în cazul MAE și CE cu preîncălzirea solventului la un debit de 3 mL/min și o viteză de agitare de 900 rpm.

III.4.3. Compoziția extractelor de cătină

Analiza cantitativă a compușilor fenolici majoritari din frunzele de cătină este prezentată în tabelul III.5. Analiza HPLC a fost efectuată pentru extractele colectate în prima și a patra fracție în cazul MAE și CE cu preîncălzirea solventului la un debit de 3 mL/min și o viteză de agitare de 900 rpm. Principalii polifenoli prezenți în frunzele de cătină pentru cele două fracții colectate sunt: acidul galic, catechina, acizii *p*-cumaric și ferulic, rutinul, kaempferol-3-O-glucozidul, isorhamnetin-3-O-glucozidul și quercitina. Toți compușii identificați s-au obținut în cantitate mai mare în cazul extracției semicontinue asistată de microunde. Pentru ambele fracții analizate, polifenolul predominant a fost acidul galic urmat de catechină.

După cum se poate observa din tabelul III.5, concentrația compușilor polifenolici este mult mai mică în fracția a patra comparativ cu prima fracție pentru ambele metode (MAE și CE). Cu toate acestea, quercitina se extrage mai greu comparativ cu ceilalți compuși identificați. Concentrația quercitinei în fracția a patra este aproximativ 60-70% comparativ cu concentrația obținută în prima fracție.

Tabelul III. 5. Analiza cantitativă a compușilor fenolici majoritari pentru extractele obținute prin MAE și CE cu preîncălzirea solventului (debit solvent – 3 mL/min, viteză agitare – 900 rpm) - analiza a fost efectuată singular.

Compus polifenolic	Concentrația compusului polifenolic [mg/g DM]			
	Tipul încălzirii			
	MAE		CE	
	Fracția 1	Fracția 4	Fracția 1	Fracția 4
Acid galic	18.02	3.67	12.37	3.42
Catechină	14.62	2.43	9.86	1.62
Acid <i>p</i> -cumaric	0.31	0.03	0.28	0.03
Acid ferulic	0.60	0.07	0.52	0.07
Rutin	3.37	0.28	2.69	0.22
Kaempferol-3- <i>O</i> -glucozid	2.49	0.19	2.19	0.16
Isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucozid	2.09	0.27	1.96	0.30
Quercitină	1.64	0.93	1.24	0.88
Total	43.14	7.88	31.11	6.71

III.5. Extracția asistată de microunde a polifenolilor din frunze de cătină cu ajutorul antenelor coaxiale

III.5.1. Influența încălzirii neuniforme

a) Profilul de temperatură în celula de extracție

Toate experimentele, atât cele prin metoda convențională, cât și cele prin încălzire cu microunde, au fost efectuate în aceeași celulă de extracție. Încălzirea convențională a fost realizată prin recircularea apei preîncălzite la o anumită temperatură prin mantaua ce înconjoară vasul de extracție. Acest lucru permite ca viteza de încălzire a amestecului de extracție să fie aceeași cu cea obținută la încălzirea cu microunde. În timpul încălzirii cu microunde, prin mantaua ce înconjoară vasul de extracție, s-a recirculat apă termostată la 25°C pentru a menține temperatura medie de extracție la valoarea prestabilită, chiar dacă vasul de extracție este în mod continuu încălzit cu microunde.

În timpul încălzirii cu microunde s-a măsurat temperatura în două zone diferite ale vasului de extracție, în imediata apropiere a antenei coaxiale și lângă peretele celulei de extracție (vezi fig.III.18).

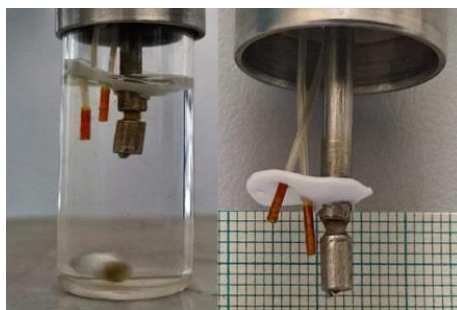


Fig. III. 18. Dispozitiv de măsurare a temperaturii în vasul de extracție.

S-au dezvoltat modele numerice pentru a simula, cu ajutorul software-ului COMSOL Multiphysics 5.2a, profilul de temperatură și profilul câmpului electric în curgerea newtoniană, în timpul încălzirii continue cu microunde, prin cuplarea unidirecțională a electromagnetismului și a transferului de căldură. Rezultatele sunt prezentate în fig. III.19 și III.20.

Rezultatele prezentate în fig. III.19 arată distribuția temperaturii și a vitezei specifice de absorbție când antena coaxială încălzește celula de extracție înconjurată de un aplicator metallic sau nu. În cazul prezenței unui aplicator metallic cu dimensiune suficient de mică (diametrul 20 mm, înălțimea 40 mm) se observă că viteza specifică de absorbție este mult mai concentrată, în special în partea superioară a slotului (SAR maxim = 9×10^6 W/kg), față de cazul în care celula de extracție nu este conținută într-un aplicator metallic (SAR maxim 2.4×10^6 W/kg). Distribuția diferită a vitezei specifice de absorbție produce și o distribuție diferită a temperaturii lichidului, chiar dacă s-a considerat aceeași valoare pentru viteza specifică de absorbție medie și pentru coeficientul global de transfer termic (Calinescu et al. 2017b).

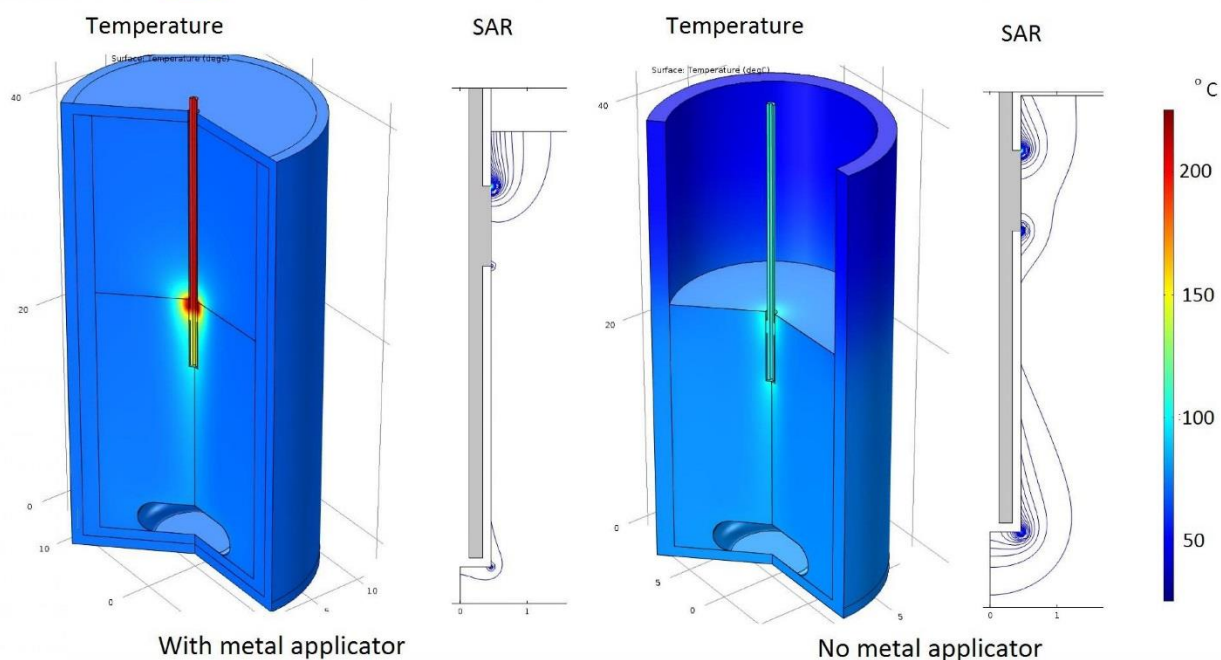


Fig. III. 19. Rezultatele obținute în COMSOL pentru distribuția temperaturii și a vitezei specifice de absorbție în celula de extracție înconjurată sau nu de un aplicator metallic (putere microunde – 25 W, viteză agitare – 350 rpm, coeficient de transfer termic – $10 \text{ W}/(\text{m}^2 \cdot \text{K})$) (Calinescu et al. 2017b).

În fig. III.20 sunt prezentate rezultatele obținute în urma modelării pentru distribuția temperaturii în interiorul celulei de extracție, conținută într-un aplicator metallic (ca și în cazul instalației utilizate și prezentate în fig. III.2). Se poate observa că neuniformitatea încălzirii este puternic influențată de viteza de agitare. La viteze de agitare mici (350 rpm) încălzirea este destul de neuniformă, în timp ce la viteze de agitare mari (850 rpm) neuniformitatea încălzirii se micșorează mult, chiar dacă neuniformitatea câmpului electric și a vitezei specifice de absorbție este aceeași indiferent de viteza de agitare (Calinescu et al. 2017b).

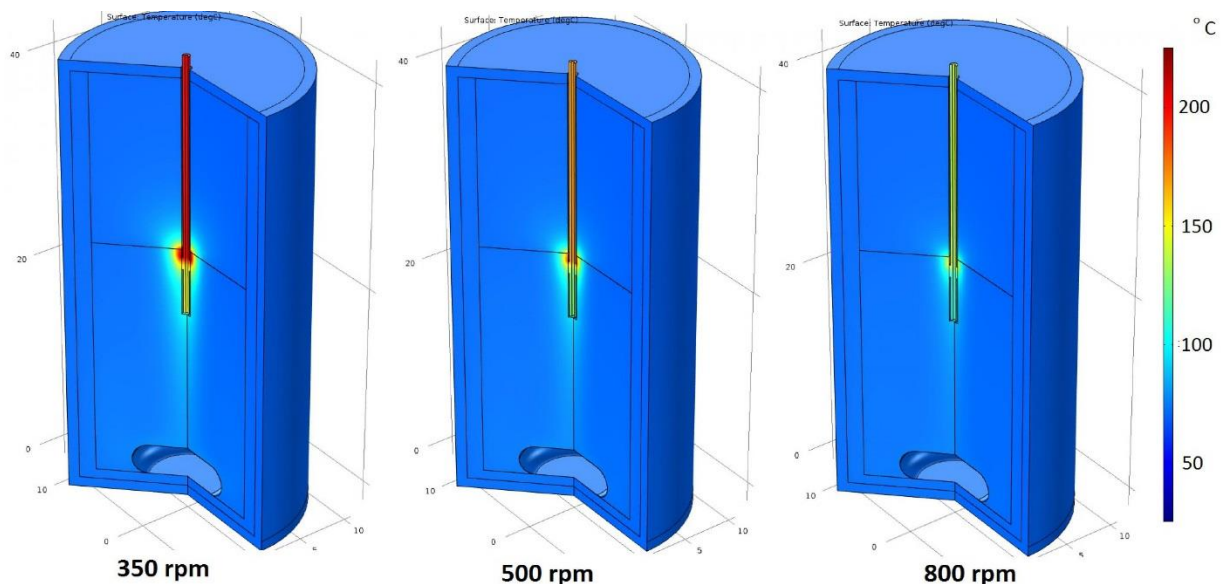


Fig. III. 20. Rezultatele obținute în COMSOL pentru distribuția temperaturii în celula de extracție, înconjurată de un aplicator metalic, la diferite viteze de agitare (putere microunde – 25 W, coeficient de transfer termic – $10 \text{ W}/(\text{m}^2 \cdot \text{K})$) (Calinescu et al. 2017b).

Pentru a verifica existența încălzirii neuniforme, s-au efectuat o serie de experimente utilizând o putere de microunde de 25 W și diferite viteze de agitare. Temperatura a fost măsurată utilizând doi senzori cu fibră optică, montați unul în imediata apropiere a antenei și celălalt lângă peretele vasului de extracție (fig. III.19).

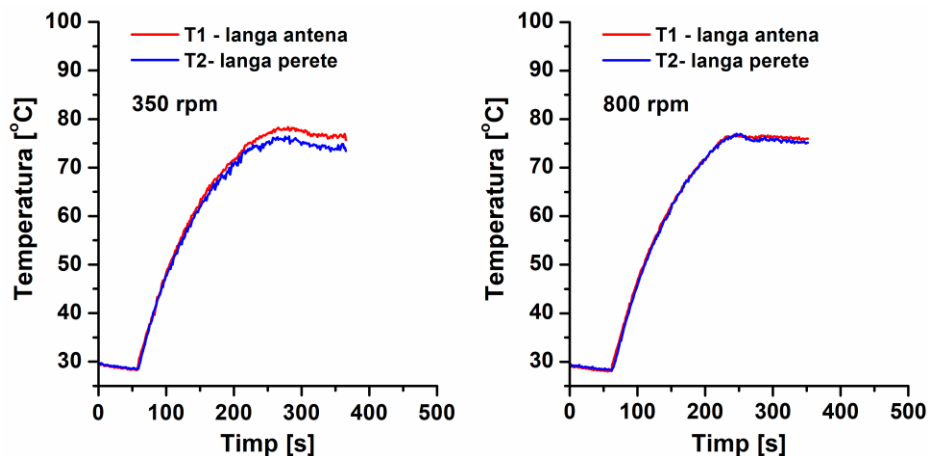


Fig. III.21. Temperatura înregistrată de doi senzori în celula de extracție încălzită cu microunde la o putere de 25 W (Calinescu et al. 2017b).

Rezultatele înregistrate, prezentate în fig. III.21, confirmă existența unei diferențe de temperatură între cele două zone măsurate. Această diferență de temperatură nu este atât de mare ca cea determinată în modelarea din COMSOL, datorită dificultăților de măsurare a temperaturii în zona foarte îngustă unde modelarea indică temperatura maximă. În modelare această zonă are o dimensiune de câțiva zeci de micrometri, în timp ce senzorul utilizat are 0.6 mm, iar poziția lui este foarte dificil de fixat în zona de temperatură maximă. Introducerea senzorului în suspensie

schimbă semnificativ modelul de curgere, și implicit profilul de temperatură, acționând astfel ca generatori secundari de turbulență, intensificând amestecarea (Calinescu et al. 2017b).

III.5.2. Conținutul total de polifenoli și activitatea antioxidantă a extractelor obținute

Pentru a putea efectua experimente la viteze de agitare relativ mici, la care încălzirea să fie neuniformă, s-au utilizat pentru extracție frunze de cătină fin măcinate și sitate la o dimensiune maximă de 0.16 mm. Pentru astfel de probe, influența vitezei de agitare, la extracția convențională nu este foarte importantă (vezi fig.III.22).

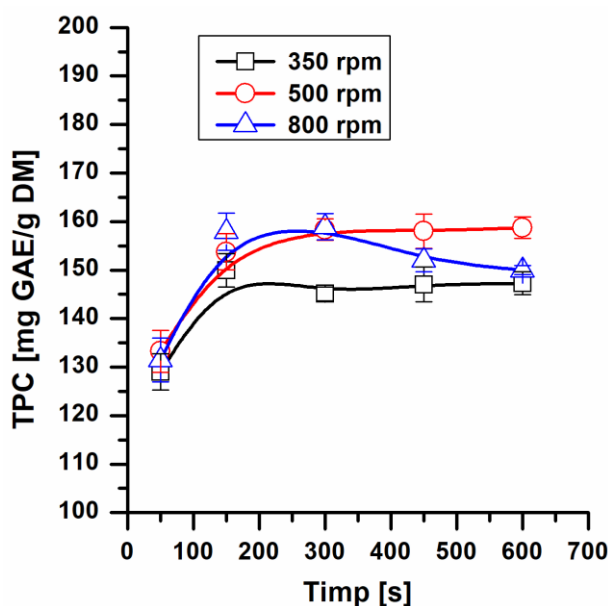


Fig. III.22. Influența vitezei de agitare asupra TPC pentru extracția convențională (Calinescu et al. 2017b).

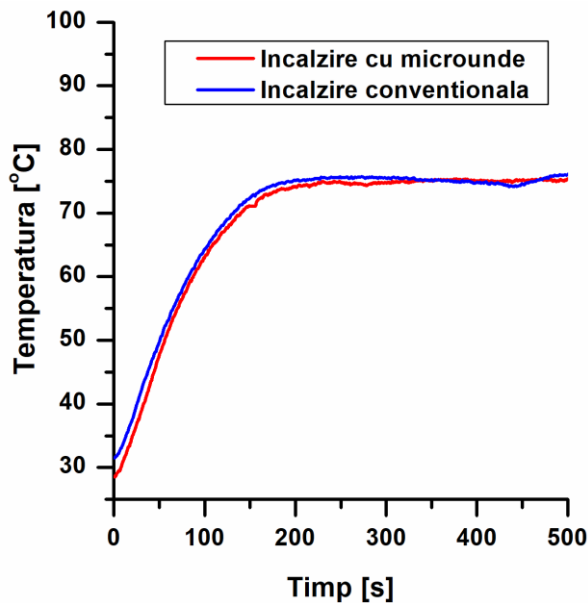


Fig. III.23. Profilul de temperatură pentru încălzirea cu microunde și convențională, 500 rpm (Calinescu et al. 2017b).

Extracția convențională s-a realizat în aceeași celulă de extracție ca și în cazul extracției asistată de microunde, cu mențiunea că, în mantaua ce înconjoară celula de extracție, s-a recirculat apă cu o temperatură de 80°C. Profilul temperaturilor medii înregistrate pentru extracția convențională și pentru cea asistată de microunde au fost foarte apropiate (vezi fig. III.23). În acest caz s-a utilizat un singur senzor de temperatură montat la jumătatea distanței dintre antenă și peretele cilindric al vasului de extracție (Calinescu et al. 2017b).

Extracția polifenolilor din frunze de cătină a avut loc prin metoda convențională și prin extracția asistată de microunde. Fig. III.24 și III.25 prezintă comparația dintre extracția convențională și cea asistată de microunde la o temperatură de 75°C și diferite viteze de agitare.

Din analiza rezultatelor obținute în urma determinării conținutului total de polifenoli se poate observa că efectul microundelor este mai pronunțat pentru viteze mici de agitare, datorită încălzirii neuniforme. Cele mai bune valori s-au obținut pentru o viteză de agitare de 500 rpm și un timp de extracție de 150 s (Calinescu et al. 2017b).

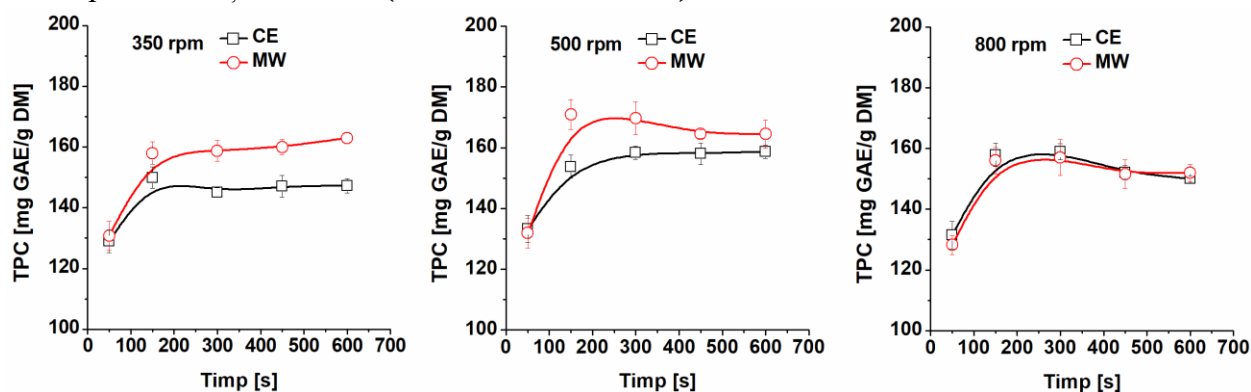


Fig. III.24. Valorile TPC obținute în cazul extracției polifenolilor din frunze de cătină prin metoda convențională vs. MAE la diferite viteze de agitare (Calinescu et al. 2017b).

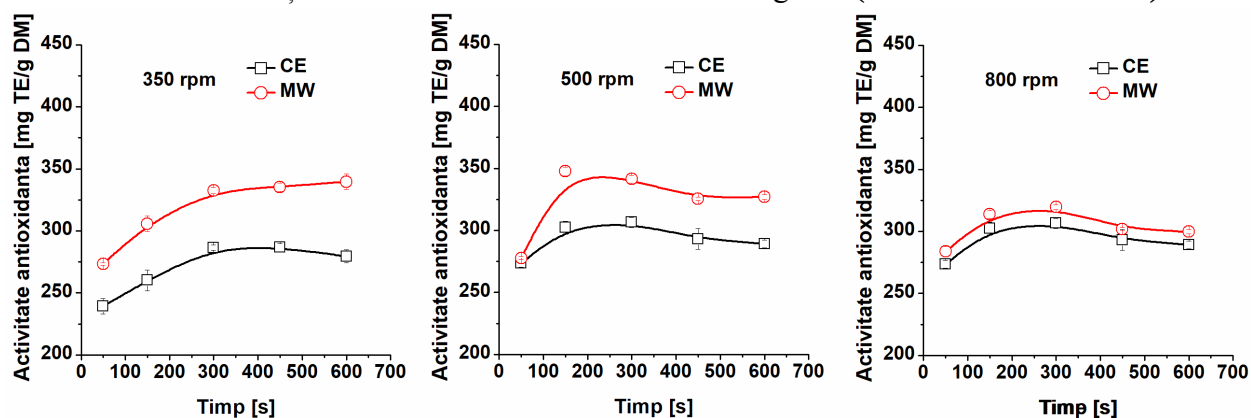


Fig. III.25. Valorile activității antioxidante obținute în cazul extracției polifenolilor din frunze de cătină prin metoda convențională vs. MAE la diferite viteze de agitare (Calinescu et al. 2017b).

În fig. III.25 sunt prezentate rezultatele obținute pentru activitatea antioxidantă. Se poate observa că și în acest caz există un efect favorabil al încălzirii neuniforme cu microunde. Se confirmă că cele mai bune rezultate sunt obținute la 500 rpm, în intervalul de timp de extracție de 150-300 s (Calinescu et al. 2017b).

III.5.3. Compoziția extractelor de cătină

Pentru a confirma rezultatele obținute, s-a realizat o analiză calitativă a extractelor obținute. Din rezultatele prezentate în tabelul III.6 se poate observa că extracția asistată de microunde afectează într-o foarte mică măsură compoziția polifenolilor extrași. Doar concentrația acidului galic liber este semnificativ mai mare în cazul extracției asistate de microunde. Acest lucru poate fi explicat de hidroliza glicozidelor acidului galic care este favorizată de microunde (Calinescu et al. 2017b).

Valorile cumulative ale concentrației compușilor polifenolici identificați prin analiza HPLC sunt semnificativ mai mici comparativ cu cele ale determinării directe ale TPC prin metoda Folin-Ciocalteu. Acest lucru se datorează existenței anumitor polifenoli complexați cu legături glicozidice care nu pot fi determinați prin analiză cromatografică (Arimboor et al. 2008).

Tabelul III. 6. Analiza HPLC a compușilor polifenolici pentru experimentele realizate la 300 s (MW – extracție asistată de microunde și CE – extracție convențională) - analiza a fost efectuată singular (Calinescu et al. 2017b).

Compus polifenolic	Concentrația compusului polifenolic [mg/g DM]	
	Tip încălzire	
	MW	CE
Acid galic	67.33	31.02
Catechin	22.66	24.49
Epicatechin	8.70	9.24
Epigallocatechin	18.48	26.21
Acid <i>p</i> -cumaric	0.57	0.52
Acid ferulic	0.99	0.60
Rutin	5.68	5.90
Kaempferol-3- <i>O</i> -glicozid	5.07	5.16
Isorhamnetin-3- <i>O</i> -glicozid	3.77	3.80
Quercitin	2.91	2.90
Kaempferol	0.37	0.32
Isorhamnetin	0.81	0.78
Total	137.33	110.95

CAPITOLUL IV – EXTRAȚIA ULEIURILOR ESENȚIALE DIN PLANTE

IV.2. Materiale și metode

Extracția uleiurilor esențiale a fost realizată utilizând mai multe tipuri de materie primă, și anume: frunze și tulpini de rozmarin și cimbru și rizomi de ghimbir. Rozmarinul și cimbrul (frunze și tulpini proaspete) au fost culese la începutul lunii octombrie 2015 la Hofigal S.A în București. Conținutul de apă al rozmarinului și cimbrului a fost de 65.2%, respectiv 71.5%. Rizomii proaspeți de ghimbir au fost achiziționați de la un market local din București. Experimentele au fost realizate fie utilizând rizomi de ghimbir răzuți, fie pulpa rezultată în urma stoarcerii mecanice a rizomilor. Conținutul inițial de apă a rizomilor de ghimbir proaspeți a fost de aproximativ 90%. Prin stoarcerea mecanică a 100 g rizomi, rezultă 75 g pulpă cu un conținut inițial de apă de aproximativ 70%.

Tratarea plantelor proaspete prin hidrodifuzie gravitațională asistată de microunde a fost realizată utilizând instalația experimentală inovativă, construită special, (IEI-2) prezentată în fig. IV.1.

După cum se poate observa din fig. IV.1, inovația instalației IEI-2 comparativ cu echipamentele clasice care utilizează MHG, constă în prezența unui sistem de agitare (în scopul iradierii uniforme cu microunde și pentru a evita supraîncălzirile și degradările locale). Tratamentul plantei proaspete conduce la separarea apei intracelulare și a uleiului esențial.

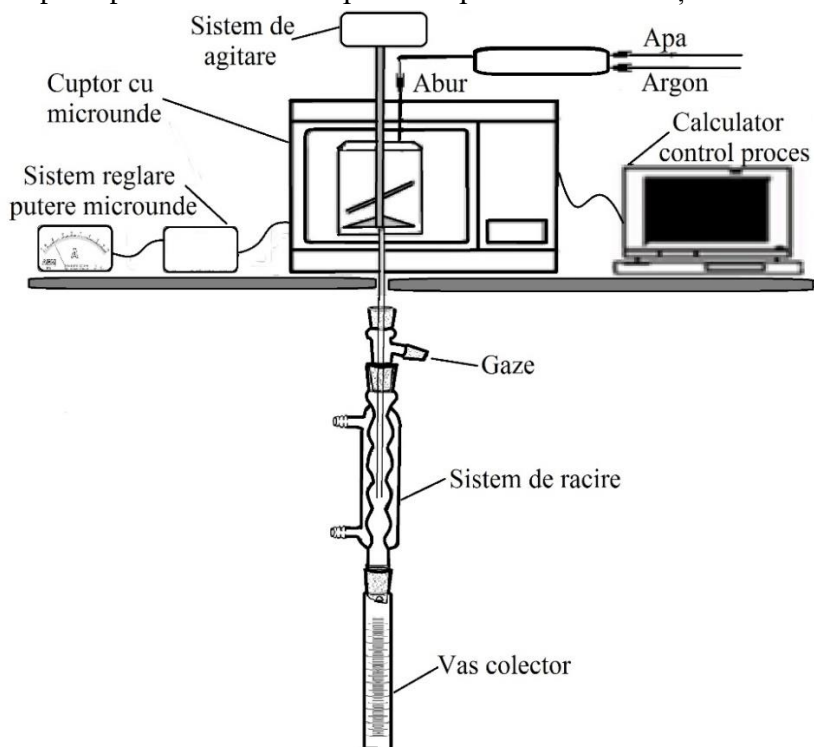


Fig. IV. 1. Instalația experimentală inovativă – IEI-2

Comparativ s-au efectuat extracții ale uleiului esențial prin hidrodistilare asistată de microunde - realizată utilizând un cuptor cu microunde multimod (Plazmatronika, Polonia) prevăzut cu un sistem de tip Clevenger – și prin hidrodistilare clasică – realizată utilizând un cuib de încălzire prevăzut cu un sistem de tip Clevenger.

Extracția uleiului esențial de rozmarin și cimbru a fost realizată utilizând trei metode: extracția convențională (CHD), hidrodistilarea asistată de microunde (MHD) și hidrodifuzia gravitațională asistată de microunde (MHG).

În cazul experimentelor realizate prin hidrodifuzie gravitațională asistată de microunde, condițiile de extracție au fost alese luând în considerare faptul că extracția asistată de microunde este mai eficientă când timpul de extracție este mic și puterea specifică de microunde este mare (Li et al. 2013). Deoarece echipamentul IEI-2 este prevăzut cu un sistem de agitare, extracția uleiurilor esențiale poate fi efectuată la puteri specifice mai mari, ceea ce conduce mai departe la rezultate mai bune.

Experimentele au avut loc la o putere constantă (putere furnizată în sistem). Temperatura maximă, pentru fiecare extracție, a fost aproximativ aceeași. Pentru a îmbunătății randamentul de ulei esențial, înainte de extracție, s-a pulverizat apă distilată peste materialul vegetal.

Materialul vegetal rezultat în urma extracției uleiului esențial de rozmarin și cimbru prin MHG a fost utilizat mai departe pentru extracția asistată de microunde a polifenolilor, utilizând un cuptor cu microunde monomod (Biotage®Initiator). Comparativ, s-a efectuat extracția asistată de microunde a polifenolilor din planta netratată. Experimentele au avut loc utilizând condițiile optime de extracție din subcap. III.3.3.

Extracția uleiului esențial de ghimbir a fost realizată prin două metode, și anume: MHD și MHG. MHD a fost utilizată ca metodă de referință pentru compararea cantității de ulei esențial obținut în cazul extracției prin MHG. Datorită cantității mici de ulei esențial obținut, cuantificarea acestuia a fost realizată prin extracția cu hexan a amestecului rezultat (apă și ulei esențial).

Extracțiile au avut loc la o putere constantă sau modificând puterea în timpul procesului. Temperatura maximă a fost aproximativ aceeași pentru toate experimentele. În timpul extracțiilor temperatura, puterea de microunde și timpul au fost înregistrate cu ajutorul unei console de operare (software LabView).

Cuantificarea și determinarea compoziției chimice a uleiurilor esențiale de rozmarin, cimbru și ghimbir au fost realizate prin analiză GS/MS. Conținutului total de polifenoli din frunzele de cimbru și de rozmarin s-a determinat utilizând metoda Folin-Ciocalteu. Pulpa de ghimbir proaspătă și cea obținută în urma tratamentului prin MHG au fost supuse analizei SEM.

IV.3. Extracția integrată asistată de microunde a uleiurilor esențiale și a polifenolilor din rozmarin și cimbru

IV.3.1. Extracția uleiului esențial de rozmarin și cimbru

a) Protocolul pentru tratamentul rozmarinului și cimbrului

Reziduul rezultat în urma extracției uleiului esențial de rozmarin și cimbru prin MHG a fost mai departe suspus extracției polifenolilor. Aceștia au fost extrași utilizând drept solvent un amestec de etanol și apă (apa reziduală obținută în urma procesului MHG) de concentrație 50%. Protocolul pentru tratamentul rozmarinului și cimbrului este prezentat în fig. IV.4 (Calinescu et al. 2017a).

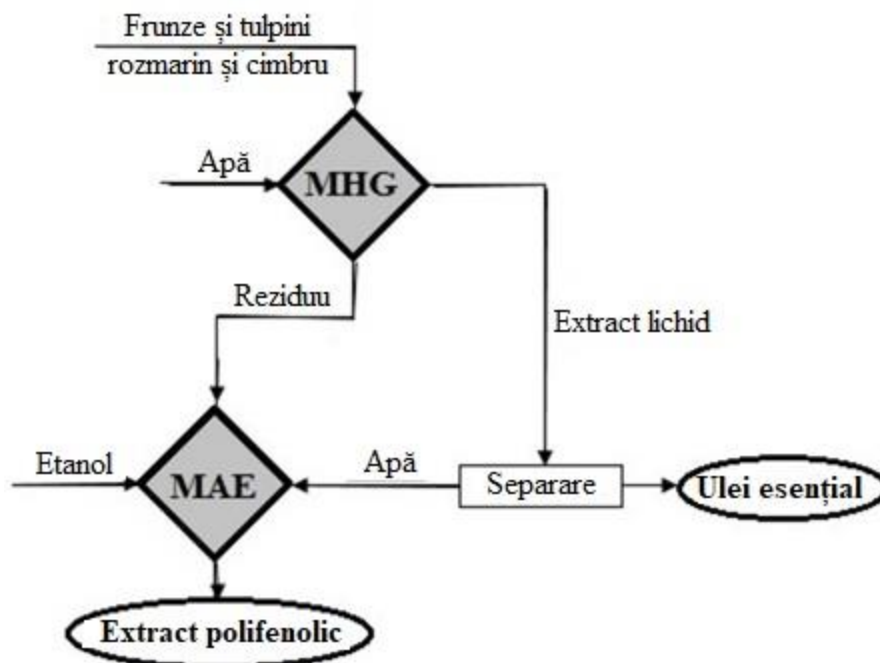


Fig. IV.4. Protocolul pentru tratamentul rozmarinului și cimbrului

b) Calculul puterii și energiei specifice și a cantității de ulei

Experimentele efectuate prin MHG au fost comparate cu metodele clasice de extracție (MHD și CHD). În timpul experimentelor s-a înregistrat profilul de temperatură pe întregul interval de extracție. S-au calculat, de asemenea, puterea specifică și energia specifică.

Cantitatea fiecărui component al uleiului esențial a fost calculată, pentru toate experimentele, utilizând următoarea ecuație:

$$m_{compus} = m_{UE} \times \frac{C_{compus}}{100} \times 1000 \quad (IV.10)$$

Unde: m_{compus} – cantitatea fiecărui component al uleiului esențial, mg; m_{UE} – masa uleiului esențial, g (vezi tabelele IV.3 și IV.4); C_{compus} – concentrația fiecărui component al uleiului esențial, % (vezi tabelele IV.6 și IV.7). Utilizând această ecuație s-a calculat, mai departe, cantitatea compușilor cu punct de fierbere sub sau peste 200 °C prin însumarea compușilor corespunzători.

c) Rezultatele cantitative ale uleiului esențial de rozmarin și cimbru

Rezultatele cantitative obținute pentru extracția uleiului esențial din frunze și tulpini de rozmarin și cimbru sunt prezentate în tabelele IV.3 și IV.4. Condițiile experimentale au fost alese în scopul îmbunătățirii extracției compușilor bioactivi (presiune sub-atmosferică și adăugarea apei). Așadar, așa cum se poate observa din aceste tabele, cantitatea de ulei esențial pentru ambele tipuri de plantă este dependentă de metoda de extracție: CHD, MHD și MHG (aproximativ 200-300 mg UE/100 g plantă pentru cimbru și 700-800 mg UE/100 g plantă pentru rozmarin). Diferența între aceste trei metode constă în timpul de extracție mai scurt pentru MHG (aproximativ 10 min cu o energie specifică mai mică) comparativ cu 105 min pentru MHD, respectiv 150 min pentru CHD (Calinescu et al. 2017a).

Tabelul IV. 3. Rezultatele și condițiile de extracție pentru uleiul esențial de cimbru (Calinescu et al. 2017a).

Exp	Metodă	Apă adăugată [g]	Presiune [atm]	Timp extracție ^a [s]	UE [mg/100 g plantă]	Putere specifică [W/g plantă]	Energie specifică [KJ/g UE]	Cantitate componenteți, [mg/100 g plantă]	
								p.f < 200°C	p.f > 200°C
1	MHG	-	1	612	184±25	3.60	1.2	78.9	97.6
2	MHG	25.3	1	686	262±23	2.87	0.94	89.8	162.4
3	MHG	24.5	0.7	768	313±22	2.89	0.88	148.9	153.0
4	MHD	400	1	6300	299±17	0.43 ^b	4.5	129.0	156.8
5	CHD	400	1	9000	305±19	0.76 ^b	11.2	132.8	159.5

^a Timpul de extracție reprezintă timpul până când s-a atins temperatura de 106-108 °C

^b Puterea specifică pentru MHD și CHD (exp. 4 și 5) a fost calculată luând în considerare masa totală (plantă și apă)

Tabelul IV. 4. Rezultatele și condițiile de extracție pentru uleiul esențial de rozmarin (Calinescu et al. 2017a).

Exp	Metodă	Apă adăugată [g]	Presiune [atm]	Timp extracție ^a [s]	UE [mg/100 g plantă]	Putere specifică [W/g plantă]	Energie specifică [KJ/g UE]	Cantitate componenteți, [mg/100 g plantă]	
								p.f < 200°C	p.f > 200°C
6	MHG	-	1	579	691±32	3.60	0.3	273.6	347.3
7	MHG	23.8	1	518	762±31	2.90	0.24	270.6	423.5
8	MHG	23.4	0.7	781	825±37	2.91	0.34	357.8	398.2
9	MHD	400	1	6300	769±22	0.43 ^d	1.76	355.1	329.7
10	CHD	400	1	9000	837±24	0.76 ^d	4.08	371.8	372.9

^c Timpul de extracție reprezintă timpul până când s-a atins temperatura de 106-108 °C

^d Puterea specifică pentru MHD și CHD (exp. 9 și 10) a fost calculată luând în considerare masa totală (plantă și apă)

După cum se poate observa din tabelele IV.3 și IV.4 adăugarea apei și o ușoară scădere a presiunii conduc la obținerea unei cantități mai mari de ulei esențial pentru ambele tipuri de plantă. Pentru extracțiile când s-a pulverizat apă distilată peste materialul vegetal proaspăt, cantitatea de ulei esențial a fost mai mare decât în cazul extracțiilor fără adăugarea apei. Conținutul de apă al plantei proaspete (71.5% pentru cimbru și 65.2% pentru rozmarin) nu este îndeajuns de mare pentru a antrena toți constituenții uleiului esențial, în special cei cu punct de fierbere relativ ridicat (vezi tabelele IV.6 și IV.7). Așa cum era de așteptat, adăugarea apei a condus la creșterea cantității componentelor uleiului esențial, în special a celor cu punct de fierbere mai mare de 200 °C (66% pentru cimbru și 22% pentru rozmarin). Reducerea presiunii

la 0.7 atm favorizează extracția componentilor uleiului esențial cu punct de fierbere sub 200 °C, cantitatea acestora fiind mai mare (cu 65% pentru cimbru, respectiv 32% pentru rozmarin) decât în cazul extracției la presiune atmosferică. Reducerea presiunii conduce la o viteză mai mare de evaporare a apei intracelulare, astfel că degradarea membranei celulare are loc mai ușor. Așadar, componentii uleiului esențial cu mase moleculare mai mici (mobilitate mai mare datorită energiei interne) sunt extrași mai rapid decât componentii cu mase moleculare mari. În consecință, pentru același timp de extracție, concentrația compușilor grei este mai mare (Calinescu et al. 2017a).

Un avantaj al acestui echipament este consumul de energie. Energia specifică este mai mică comparativ cu metodele MHD și CHD. Deși puterea specifică pentru MHG este de câteva ori mai mare decât pentru metodele clasice, energia specifică este de 5-15 ori mai mică datorită timpului de extracție mult mai mic în cazul metodei MHG (Calinescu et al. 2017a).

Tabelul IV. 5. Presiunea de vapori pentru un amestec de apă – α -pinene – thymol la 95 °C (presiune totală = 1 atm) și 85.7 °C (presiune totală = 0.7 atm) (webbok.nist.gov).

Temperatură [°C]	Presiune totală [mmHg]	Presiune vapori apă, [mmHg]	Presiune vapori α -pinene, [mmHg]	Presiune vapori thymol, [mmHg]	Fracție molară α -pinene	Fracție molară thymol
95	760.3	633.6	121.2	5.5	0.1605	0.0073
85.7	533.8	444.9	85.5	3.4	0.1612	0.0064

În tabelul IV.5. sunt prezentate valorile calculate ale presiunii de vapori pentru un amestec de apă, α -pinene (un component foarte volatil al uleiului esențial) și thymol (un component mai puțin volatil al uleiului esențial). Influența apei adăugate și a presiunii reduse asupra cantității uleiului esențial de cimbru este mai mare decât în cazul rozmarinului datorită conținutului mai scăzut de ulei esențial care se găsește în frunze (300 mg/100 g plantă pentru cimbru comparativ cu 800 mg/100 g plantă pentru rozmarin) (Calinescu et al. 2017a).

d) Rezultatele calitative ale uleiului esențial de cimbru și rozmarin

- *Rezultate ulei esențial de cimbru*

Pentru toate metodele s-au identificat prin analiză GC/MS aproximativ 30 de compuși. Rezultatele sunt prezentate în tabelul IV. 6. Constituenții majoritari ai uleiului esențial sunt thymolul, γ -terpinene-ul și *p*-cymene-ul. Acești compuși reprezintă aproximativ 75% din cantitatea totală de ulei esențial obținut. Așa cum se poate observa din tabelul IV. 6, din punct de vedere al compoziției uleiului esențial, există doar o mică diferență între cele trei metode. Cu toate acestea, adăugarea apei conduce la creșterea procentului de compuși extrași (în special compuși cu masă moleculară mare; thymol de exemplu). Compoziția uleiului esențial pentru extracția prin MHG la presiune redusă este similară cu cea obținută prin metodele clasice (vezi exp. 3) (Calinescu et al. 2017a).

Tabelul IV.6. Compoziția chimică a uleiului esențial de cimbru extras prin MHG, MHD și CHD (Calinescu et al. 2017a).

RT	Compus	CAS	Punct fierbere, [°C]	Compoziție, [%]				
				Exp.				
				1	2	3	4	5
9.23	α -Pinene	80-56-8	155	0.52	0.38	0.99	0.62	0.68
9.49	Camphene	79-92-5	159	0.30	0.31	0.58	0.46	0.64
9.78	Sabinene	3387-41-5	163	0.06	0.05	0.08	0.07	-
10.07	β -Pinene	127-91-3	165	1.73	1.42	2.15	2.04	2.08
10.38	α -Phellandrene	99-83-2	171	0.21	0.19	0.33	0.29	0.27
10.59	α -Terpinene	99-86-5	173	1.50	1.41	2.05	1.96	2.06
10.63	<i>p</i> -Cymene	99-87-6	177	13.90	8.62	15.48	13.98	14.37
10.81	Eucalyptol	470-82-6	176	2.43	1.04	2.61	1.72	1.18
11.25	γ -Terpinene	99-85-4	183	18.55	17.92	20.78	19.62	19.75
11.36	trans-Sabinene hydrate	17699-16-0	201	1.38	1.07	0.77	0.58	0.62
11.77	α -Terpinolene	586-62-9	187	2.14	1.73	1.66	1.74	1.82
11.85	Linalool	78-70-6	198	0.18	0.14	0.09	0.07	0.08
12.51	Camphor	76-22-2	204	0.70	0.09	1.28	1.47	0.94
12.93	Borneol	507-70-0	213	0.70	1.88	0.86	1.25	1.13
13.09	Terpinen-4-ol	562-74-3	209	0.23	0.23	0.22	0.31	0.36
13.24	α -Terpineol	98-55-5	219	0.37	0.21	0.32	0.29	0.21
13.43	Verbenone	1196-01-6	227	-	-	0.22	0.33	0.11
13.79	Thymol methyl ether	1076-56-8	214	0.12	0.30	0.12	0.87	0.34
13.95	Isothymol methyl ether	31574-44-4		-	0.13	-	0.43	0.50
14.50	Thymol	89-83-8	232	41.73	52.02	39.43	41.28	42.16
14.64	Carvacrol	499-75-2	236	2.66	2.79	2.43	2.25	2.26
15.36	Thymol acetate	528-79-0	241	0.21	0.08	0.14	0.10	0.08
16.75	β -(E)-Caryophyllene	87-44-5	254	2.78	2.93	2.47	2.38	2.17
17.16	α -Curcumene	644-30-4	275	0.11	0.12	0.11	0.11	0.10
17.34	Germacrene D	23986-74-5	236	0.06	0.05	0.08	0.07	0.06
17.46	β -Curcumene	-	273	1.51	0.63	0.45	0.68	0.98
17.64	γ -Cadinene	39029-41-9	271	1.35	0.18	0.45	0.22	0.44
17.80	δ -Cadinene	523-47-7	279	0.44	0.19	0.16	0.21	0.40
17.86	Caryophyllene oxide	1139-30-6	279	0.01	0.08	0.12	0.08	-
18.56	γ -Eudesmol	1209-71-8	301	0.07	0.08	-	0.09	0.08
	Total main components			74.17	78.57	75.69	74.88	76.29

Pentru condițiile experimentale, vezi tabelul IV.3. Analiza GC/MS a fost efectuată singular.

- *Rezultate ulei esențial de rozmarin*

Pentru toate metodele s-au identificat prin analiză GC/MS aproximativ 23 de compuși. Rezultatele sunt prezentate în tabelul IV.7. Compușii majoritari ai uleiului esențial de rozmarin sunt camphorul, eucalyptolul, α -pinene-ul, verbenona și camphene-ul. Acești patru constituenți reprezintă aproximativ 72% din cantitatea totală a uleiului esențial obținut. Așa cum se poate observa din tabelul IV.7 există doar o mică diferență între probele obținute prin cele trei metode. Aceste rezultate prezintă un comportament similar cu cele obținute în cazul cimbrului. Cel mai mare procent al compușilor majoritari a fost obținut pentru extracția la presiune scăzută și în prezența apei (75.13%) (Calinescu et al. 2017a).

Tabelul IV.7. Compoziția chimică a uleiului esențial de rozmarin extras prin MHG, MHD și CHD (Calinescu et al. 2017a).

RT	Compus	CAS	Punct fierbere, [°C]	Compoziție, [%]				
				Exp.				
				6	7	8	9	10
9.23	α -Pinene	80-56-8	155	5.56	3.96	9.01	9.45	8.29
9.49	Camphene	79-92-5	159	3.57	2.33	4.84	6.77	5.60
9.78	β -Pinene	127-91-3	165	2.47	2.79	2.65	2.33	2.47
9.96	α -Phellandrene	99-83-2	171	1.76	1.15	2.05	2.27	2.55
10.81	Eucalyptol	470-82-6	176	21.39	20.49	21.02	21.56	21.33
11.25	γ -Terpinene	99-85-4	183	1.03	0.86	0.79	0.82	1.11
11.36	trans-Sabinene hydrate	17699-16-0	201	0.20	0.15	0.15	0.13	0.18
11.66	α -Terpinolene	586-62-9	187	0.07	0.08	0.08	0.08	0.07
11.77	Linalool	78-70-6	198	3.55	3.71	2.79	2.77	2.81
12.51	Camphor	76-22-2	204	37.41	40.79	33.90	29.93	31.81
12.93	Borneol	507-70-0	213	1.87	2.28	1.53	2.00	1.61
13.09	Terpinen-4-ol	562-74-3	209	0.72	0.87	0.66	0.68	0.71
13.24	α -Terpineol	98-55-5	219	1.74	2.13	1.76	1.75	1.77
13.43	Verbenone	80-57-9	227	3.21	3.62	6.36	5.49	5.92
14.64	Bornyl acetate	76-49-3	228	1.25	1.04	0.68	0.79	0.90
15.92	α -Copaene	3856-25-5	246	0.16	0.20	0.09	0.10	0.13
16.15	Methyleugenol	93-15-2	254	0.20	0.25	0.18	0.11	0.09
16.75	β -(E)-Caryophyllene	87-44-5	254	2.65	3.06	2.21	1.28	1.13
17.15	Humulene	6753-98-6	166	0.48	0.59	0.42	0.26	0.23
17.64	γ -Cadinene	39029-41-9	271	0.04	0.05	-	0.16	-
17.80	δ -Cadinene	483-76-1	279	0.14	0.19	0.13	0.13	0.09
17.86	Caryophyllene oxide	1139-30-6	279	0.34	0.47	0.32	0.14	0.13
18.56	γ -Eudesmol	1209-71-8	301	0.04	0.06	0.04	0.06	0.04
	Total main constituents			71.15	71.18	75.13	73.19	72.96

Pentru condițiile experimentale, vezi tabelul IV.4. Analiza GC/MS a fost efectuată singular.

IV.3.2. Extracția polifenolilor din frunzele pretratate prin MHG

A doua parte a acestui studiu este reprezentată de extracția polifenolilor din materialul vegetal. Așadar, reziduul material uscat rezultat în urma extracției uleiului esențial prin MHG este mai departe utilizat pentru extracția asistată de microunde a polifenolilor. Pe lângă avantajul

extracției uleiului esențial într-MHG poate fi considerată o metodă de pretratament pentru materialele vegetale.

Pentru a determina eficiența pretratamentului prin MHG a frunzelor și tulpinilor de rozmarin și cimbru înaintea extracției polifenolilor, s-a efectuat un experiment prin MAE cu material vegetal netratat. Rezultate obținute în cazul determinării TPC-ului pentru extractele din planta pretrată sau netratată sunt prezentate în tabelele IV.8 și IV.9. Se poate observa că frunzele și tulpinile de rozmarin și cimbru conțin o cantitate semnificativă de polifenoli. Concentrația de compuși polifenolici a extractelor obținute din materialul vegetal pretrat este mai mare decât a extractelor obținute prin planta netratată (cu aproximativ 40% mai mare în cazul cimbrului, respectiv 36% în cazul rozmarinului). Pretratamentul cu microunde al materialului vegetal înaintea extracției propriu-zise determină degradarea pereților celulari, eliberându-se astfel mai ușor compușii polifenolici (Calinescu et al. 2017a).

Tabelul IV.8. Condițiile de extracție și rezultate pentru TPC în cazul cimbrului (Calinescu et al. 2017a).

Exp.	Metodă pretratament	Apă adăugată [g]	Presiunea de pretratament [atm]	Timpul de pretratament [s]	TPC [mgGAE/g DM]
1	MHG	-	1	612	38.28±0.6
2	MHG	25.3	1	686	36.21±0.0
3	MHG	24.5	0.7	768	32.36±0.0
5	No	-	1	-	23.12±0.9

Tabelul IV.9. Condițiile de extracție și rezultate pentru TPC în cazul rozmarinului (Calinescu et al. 2017a).

Exp.	Metodă pretratament	Apă adăugată [g]	Presiunea de pretratament [atm]	Timpul de pretratament [s]	TPC [mgGAE/g DM]
6	MHG	-	1	579	55.5±2.0
7	MHG	23.8	1	518	43.39±0.5
8	MHG	23.4	0.7	781	48.43±6.1
5	No	-	1	-	35.29±1.1

Deoarece solubilitatea polifenolilor în apă este scăzută, concentrația lor în apa reziduală rezultată de la extracția prin MHG a uleiului esențial este mică (aproximativ 1.2 mg GAE/g DM pentru cimbru și doar 0.04 mg GAE/g DM pentru rozmarin). Cu toate acestea, pentru a îmbunătăți eficiența extracției polifenolilor, este recomandat să se utilizeze drept solvent un amestec de etanol și apă reziduală rezultată de la MHG (Calinescu et al. 2017a).

IV.4. Extracția uleiului esențial de ghimbir prin hidrodifuzie gravitațională asistată de microunde – considerente energetice

IV.4.1. Determinarea eficienței de extracție și a energiei consumate

Pentru a pune în evidență avantajul procesului MHG comparativ cu MHD, s-au calculat diverși parametri (energia specifică de microunde furnizată de magnetron, energia specifică de

microunde absorbită de probă, eficiența totală pentru uleiul esențial obținut din pulpă de ghimbir și eficiența de separare a uleiului esențial în distilat). Puterea efectiv absorbită a fost apreciată pe baza experimentărilor calorimetrice prin care s-a determinat puterea absorbită funcție de puterea produsă de magnetron, pentru diferite volume de apă. Relațiile utilizate pentru calculul parametrilor sunt prezentate în continuare:

$$E_{magn_sp} = \frac{E_{magn}}{V_{UE_d}} \quad (IV.12)$$

Unde: E_{magn} – energia de microunde furnizată de magnetron (kJ), E_{magn_sp} – energia specifică de microunde furnizată de magnetron pentru obținerea uleiului esențial din 100 g materie primă (J/mL), V_{UE_d} – volumul de ulei esențial în distilat obținut din 100 g materie primă (mL/100 g).

$$E_{ab_sp} = \frac{E_{ab}}{V_{UE_d}} \quad (IV.14)$$

Unde: E_{ab} - energia de microunde absorbită de probă (kJ), E_{ab_sp} - energia specifică de microunde absorbită de probă în cazul uleiului esențial obținut din 100 g materie primă (kJ/mL).

$$Ef_1 = \frac{UE_{MHG_d} + UE_{MHG_p}}{UE_{MHD}} \quad (IV.15)$$

$$Ef_2 = \frac{UE_{MHG_d}}{UE_{MHG_d} + UE_{MHG_p}} \quad (IV.16)$$

Unde: Ef_1 – eficiența totală de extracție a uleiului esențial din pulpă de ghimbir (%), UE_{MHG_d} – volumul de ulei esențial în distilat obținut prin MHG (mL), UE_{MHG_p} – volumul de ulei esențial rămas în pulpa tratată (mL), UE_{MHD} – volumul de ulei esențial obținut prin MHD (mL), Ef_2 – eficiența de separare a uleiului esențial în distilat (%).

a) Extracția uleiului esențial de ghimbir prin MHD

Cantitatea totală de ulei esențial care se găsește în rizomii de ghimbir răzuți sau în pulpa de ghimbir a fost determinată prin hidrodistilare asistată de microunde (vezi tabelul IV. 10). Această metodă de extracție a fost utilizată ca referință pentru a compara cantitatea de ulei esențial rezultată în urma extracției prin hidrodifuzie gravitațională asistată de microunde. Așadar, eficiențele de extracție pentru cantitatea totală de ulei esențial din rizomii de ghimbir răzuți sau în pulpa de ghimbir s-a presupus a fi 100%.

Tabelul IV.10. Condițiile experimentale și rezultatele pentru extracția prin MHD a uleiului esențial din rizomi de ghimbir răzuți și pulpă de ghimbir. Analiza GC/MS a fost efectuată singular.

Exp.	Tip ghimbir	P* [W]	SAR** [W/kg]	E_{magn_sp} [kJ/mL UE]	E_{ab_sp} [kJ/mL UE]	V_{UE_d} [mL/100g]
A.	Pulpă	380	$0.8-0.5 \times 10^3$	2284	2284	0.599
B.	Rizomi răzuți	380	$0.5-0.3 \times 10^3$	6080	6080	0.225

*P – puterea de microunde furnizată în timpul extracției;

**SAR – viteză specifică absorbție în cazul materiei prime

b) Extracția uleiului esențial de ghimbir prin MHG

În această parte a studiului experimental s-a urmărit influența vitezei specifice de absorbție (SAR) și adăugarea de abur saturat în sistem asupra eficienței de extracție a uleiului

esențial de ghimbir prin MHG. Condițiile experimentale și rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul IV.11. Evoluția valorilor SAR-ului sunt prezentate în fig. IV.5.

Tabelul IV.11. Condițiile experimentale și rezultatele pentru extracția uleiului esențial din rizomi răzuți și pulpă de ghimbir prin MHG. Analiza GC/MS a fost efectuată singular.

Exp.	Tip ghimbir	P [W]	$SAR \times 10^3$ [W/kg]	E_{magn_sp} [kJ/mL UE]	E_{ab_sp} [kJ/mL UE]	$V_{UE_d}^{***}$ [mL/100g]	V_{UE_p} [mL/100g]
1.	Rizomi răzuți	678	3.41-5.5	2487.5	1216.7	0.21	0.054
2.	Rizomi răzuți	678-366	3.46-3.94	2421.3	1059.9	0.191	0.103
3.	Pulpă	460	2.3-3.5	1268	923.1	0.447	0.283
4.	Pulpă	432-205	2.16-1.45	650.4	494.2	0.64	0.394
5.	Pulpă	615-423	3.07-2.55	1370	904.1	0.376	0.521
6.	Pulpă	460	2.3-3.2	960.3	759.9	0.619	0.417
7.	Pulpă	435-209	2.34-3.29	699.5	533.6	0.648	0.359
8.	Pulpă	615-441	3.07-3.42	1064.5	826.4	0.504	0.291

*** V_{UE_p} – volumul de ulei esențial rămas în pulpa tratată, obținut din 100 g materie primă.

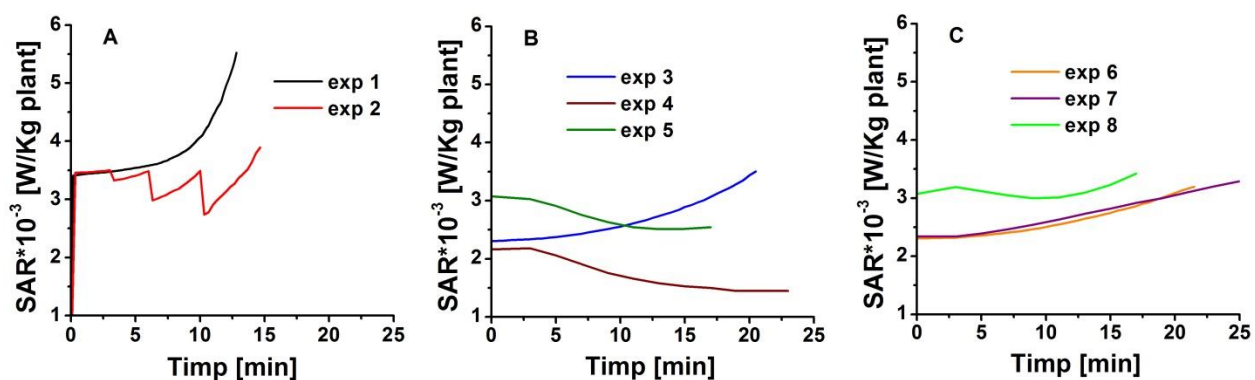


Fig. IV.5. Evoluția SAR-ului în timpul procesului MHG (A – experimente efectuate cu ghimbir răzuțit, B- experimente efectuate cu pulpă de ghimbir fără adăugarea aburului saturat în sistem, C- experimente efectuate cu pulpă de ghimbir și adăugare de abur saturat în sistem).

Menținerea puterii magnetronului la o valoare constantă în timpul procesului de extracție conduce la o scădere dramatică a masei probei (de la 200 g la aproximativ 60 g pentru pulpa de ghimbir), ceea ce determină o creștere semnificativă a SAR-ului (vezi fig. IV.5 exp. 1). Analiza acestor date arată că experimentele efectuate la un SAR variabil, dar la valori limitate, conduc la rezultate mai bune din punct de vedere al eficienței de extracție a uleiului esențial (fig. IV.6).

Eficiența totală pentru obținerea uleiului esențial din pulpă de ghimbir și eficiența de separare a uleiului esențial în distilat, determinate pentru toate experimentele, sunt prezentate în fig. IV.6. Pentru cele mai bune condiții de lucru (exp. 4 și 7), energia consumată este de aproximativ 3 ori mai mică decât în cazul extracției clasice prin MHD sau în cazul experimentelor efectuate prin MHG la putere constantă.

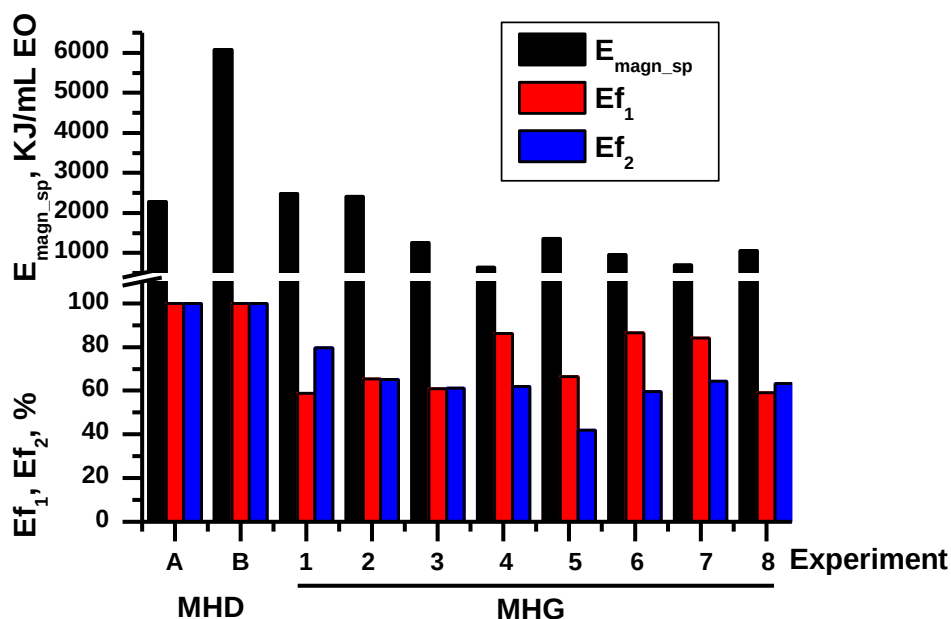


Fig. IV.6. Eficiențele de extracție și energia specifică de microunde pentru MHG comparativ cu MHD.

IV.4.2. Analiza SEM a pulpei de ghimbir

În fig. IV.7 sunt prezentate imaginile SEM ale pulpei de ghimbir după tratamentul prin MHG și a celei netratate. Uleiul esențial este biosintetizat în celule specializate, cum ar fi tricomi glandulari, osmoforele sau diferite canale și cavități (Rehman et al. 2016). După cum se poate observa din fig. IV.7A, uleiul esențial poate fi găsit în acele vacuole mici sferice conținute de tricomi glandulari. După tratamentul prin MHG vacuolele nu mai sunt prezente în pulpa de ghimbir (vezi fig. IV.7B).

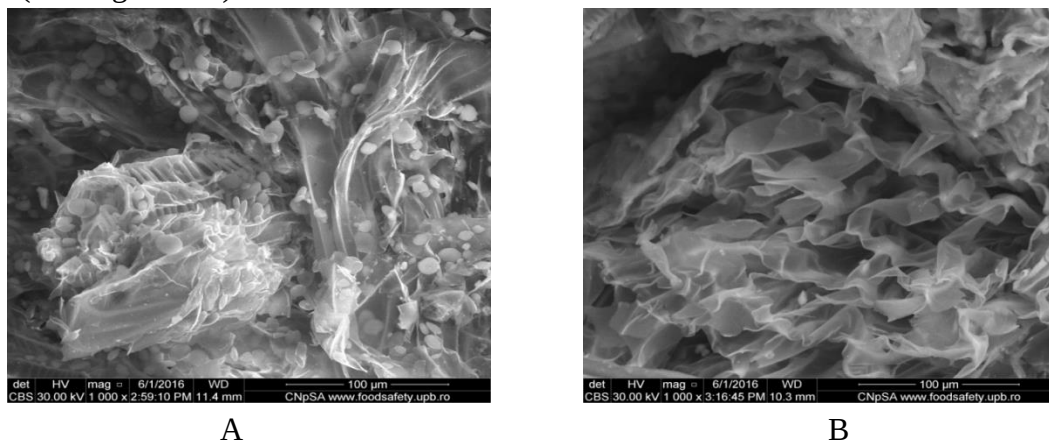


Fig. IV.7. Imaginile SEM ale pulpei de ghimbir (A – pulpă netratată, B – după tratamentul prin MHG)

CONCLUZII GENERALE

Scopul acestei teze de cercetare a fost de a dezvolta strategii noi pentru extracția eficientă a principiilor active din plante (compuși polifenolici și uleiuri esențiale).

Principalele obiective ale studiului au fost:

- Extracția asistată de microunde a polifenolilor din frunze de cătină,
- Extracția asistată de microunde a uleiurilor esențiale din plante aromatice (rozmarin, cimbru și ghimbir).

Astfel, în urma strategiilor dezvoltate și a datelor experimentale obținute s-a ajuns la concluzia că:

- Parametrii optimi de extracție a polifenolilor din frunze de cătină în regim discontinuu au fost: o viteză de agitare de 900 rpm, o concentrație a amestecului apă/etanol de 50%, un timp de extracție de 450 s și o temperatură de 90°C pentru MAE în reactorul modificat care a permis o agitare puternică a mediului de extracție.

- Extracția polifenolilor din frunze de cătină în regim semicontinuu a fost mai eficientă tot în cazul MAE, parametrii optimi fiind: o viteză de agitare de 900 rpm, un debit de solvent de 6 mL/min cu un timp de staționare de 50 s cu preîncălzirea acestuia, în reactorul modificat care a permis o agitare puternică a mediului de extracție.

- Procesul de extracție a fost intensificat prin utilizarea combinată a unui aplicator de microunde prevăzut cu antenă coaxială și a unor sisteme eficiente de răcire și de agitare obținând astfel valori mari ale vitezei specifice de absorbție menținând totodată temperatura medie la valori joase; în plus încălzirea neuniformă care a avut loc într-un astfel de echipament a permis extracția eficientă a polifenolilor în zona din jurul antenei, unde câmpul de microunde a fost foarte intens, concomitent cu protejarea acestora împotriva degradării termice în zona în care câmpul de microunde a fost foarte slab.

- Procesul de extracție a uleiurilor esențiale de rozmarin și cimbru a fost intensificat prin utilizarea unui sistem inovativ, bazat pe hidrodifuzia gravitațională asistată de microunde, prevăzut un sistem eficient de agitare care a permis iradierea uniformă a materialului vegetal.

- Pulverizarea apei peste materialul vegetal proaspăt și utilizarea unei presiuni sub-atmosferice a condus la creșterea randamentului de ulei esențial de rozmarin și cimbru.

- Reziduul rezultat în urma extracției uleiului esențial de rozmarin și cimbru a fost utilizat mai departe pentru extracția polifenolilor, astfel că hidrodifuzia gravitațională asistată de microunde poate fi considerată o metodă eficientă de pretratament a materiilor vegetale.

- Extracția prin MHG a uleiului esențial de ghimbir a fost mai eficientă când puterea magnetronului a fost modificată în timp, evitând astfel valori excesive ale SAR-ului, și când s-a introdus abur pentru o antrenare mai rapidă a vaporilor, evitând astfel pierderile din sistem.

- Eficiențele de extracție ale uleiului esențial de ghimbir au fost suficient de bune comparativ cu metodele clasice luând în considerare timpul de extracție mai scurt și consumul de energie mai scăzut.

PERSPECTIVE

O parte din teza de doctorat a fost realizată în cadrul proiectului PN-II-PT-PCCA-2013 nr. 172/2014, Procese ecologice de extracție a compușilor valoroși din plante” – ECOVALUEPLANT, nr. intern UPB CH391406/2014. Proiectul îi are ca parteneri pe SC HOFIGAL SA, partener care a furnizat materia primă, și Institutul INFLPR Măgurele, partener care a proiectat și construit echipamentele de extracție utilizate (instalațiile IEI-1 și IEI-2 prezentate în capitolele III și IV).

Luând în considerare aceste aspecte, perspectivele tezei se referă la ridicarea și utilizarea la scară industrială a procedeelor dezvoltate împreună cu partenerii proiectului.

CONTRIBUȚII ORIGINALE

Elementele de originalitate care se disting în urma acestei cercetări sunt:

- Stabilirea importanței unei agitări eficiente a mediului de extracție prin modificarea geometriei reactorului,
- Determinarea temperaturii optime de extracție în regim discontinuu din punct de vedere al consumului de energie,
- Efectuarea, pentru prima dată, a extracției polifenolilor din frunze de cătină în regim semicontinuu stabilindu-se influența diversilor parametri de extracție astfel încât să se obțină o concentrație cât mai mare de polifenoli în cât mai puține fracții colectate,
- Utilizarea, pentru prima dată, a antenelor de tip coaxial pentru extracția polifenolilor din frunze de cătină, intensificând procesul de extracție prin utilizarea combinată a antenei coaxiale cu un sistem eficient de răcire și agitare,
- Utilizarea unui echipament inovativ, bazat pe principiul hidrodifuziei gravitaționale, prevăzut cu un sistem eficient de agitare pentru o iradiere uniformă a materiei prime,
- Dezvoltarea unui proces integrat de obținere a uleiurilor esențiale de rozmarin și cimbru prin hidrodifuzie gravitațională asistată de microunde concomitent cu pretratamentul materiei prime în vederea extracției polifenolilor și implicit a îmbunătățirii randamentului de extracție a acestora,
- Determinarea considerentelor energetice ale extracției uleiului esențial de ghimbir prin hidrodifuzie gravitațională comparativ cu metodele clasice de extracție.

DISEMINAREA REZULTATELOR

Articole publicate

1. **I. Asofiei**, I. Călinescu, A. Trifan, I. G. David, A. I. Gavrilă, 2016, Microwave Assisted Batch Extraction of Polyphenols from Sea Buckthorn Leaves, *Chemical Engineering Communications*, 203 (12), 1547-1553. **(IF – 1.29) – ISI**
2. I. Călinescu, V. Lavric, **I. Asofiei**, A. I. Gavrilă, A. Trifan, D. Ighigeanu, D. Martin, C. Matei, 2017, Microwave Assisted Extraction of Polyphenols using a coaxial antenna and a cooling system, *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2017.02.003>. **(IF – 2.23) – ISI**

3. I. Călinescu, **I. Asofiei**, A. I. Gavrilă, A. Trifan, D. Ighigeanu, D. Martin, C. Matei, M. Buleandă, 2017, Integrating microwave assisted extraction of essential oils and polyphenols from rosemary and thyme leaves, *Chemical Engineering Communications*, 204 (8), 965-973. (IF – 1.29) – ISI
4. **I. Asofiei**, I. Călinescu, A. I. Gavrilă, D. Ighigeanu, D. Martin, C. Matei, 2017, Microwave hydrodiffusion and gravity, a green method for the essential oil extraction from ginger – energy considerations, *Buletinul UPB*, articol acceptat - ISI
5. A. I. Gavrilă, **I. Asofiei**, A. Trifan, P. Chipurici, E. Rusen, 2017, Microwave assisted synthesis of 5-hydroxymethylfurfural using mild reaction conditions, *Revista de Chimie*, 68 (3), 435-438. (IF – 1.23) – ISI
6. A. I. Gavrilă, **I. Asofiei**, P. Chipurici, 2017, Factorial Design for Optimization of Microwave Assisted Synthesis of 5-Hydroxymethylfurfural, *Revista de Chimie*, 68 (4), 639-641. (IF – 1.23) – ISI

Conferințe internaționale

1. Conferință **AMPERE 2015**, Cracovia, Polonia - I. Călinescu, A. M. Popescu, **I. Asofiei**, A. Gavrilă, A. Trifan, D. Ighigeanu, D. Martin, C. Matei, Microwave Assisted Extraction of Polyphenols Using an Open-end Coaxial Applicator and a Cooling System.
2. Conferință **RICCCE 2015**, Sibiu, România - **I. Asofiei**, I. Călinescu, A. Trifan, A.I. Gavrilă, D. Ighigeanu, D. Martin, Microwave Assisted Extraction of Polyphenols from Sea Buckthorn Leaves.
3. Conferință **RICCCE 2015**, Sibiu, România - I. Călinescu, **I. Asofiei**, A. Trifan, A.I. Gavrilă, D. Ighigeanu, D. Martin, A Semi-Continuous Process for Polyphenols Extraction from Sea Buckthorn Leaves.
4. Conferință **IUPAC 2016**, Venetia, Italia - I. Călinescu, V.Lavric, **I. Asofiei**, A.I. Gavrilă, D. Ighigeanu, D. Martin, C. Matei, Microwave Assisted Extraction Using an Open-end Coaxial Antenna and a Cooling System.
5. Conferință **IUPAC 2016**, Venetia, Italia - D. Ighigeanu, I. Călinescu, **I. Asofiei**, A.I. Gavrilă, D. Martin, C. Matei, Extraction of Essential Oil from Ginger Using Microwave Hydrodiffusion and Gravity Method – Energy Considerations.
6. Conferință **RICCCE 2017**, Poiana Brașov, România - **I. Asofiei**, I. Călinescu, A.I. Gavrilă, D. Ighigeanu, D. Martin, Microwave pretreatment of plant materials to improve the maceration process.

REFERINȚE

1. Abou Samra M., Chedea V. S., Economou A., Calokerinos A. and Kefalas P. (2011). "Antioxidant/prooxidant properties of model phenolic compounds: Part I. Studies on equimolar mixtures by chemiluminescence and cyclic voltammetry." *Food Chemistry* 125(2): 622-629.
2. Alupului A., Calinescu I. and Lavric V. (2012). "Microwave extraction of active principles from medicinal plants." *UPB Scientific Bulletin* 74(2): 129-142.

3. Arimboor R., Kumar K. S. and Arumughan C. (2008). "Simultaneous estimation of phenolic acids in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) using RP-HPLC with DAD." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **47**(1): 31-38.
4. Asofiei I., Calinescu I., Trifan A., David I. G. and Gavrilă A. I. (2016). "Microwave-Assisted Batch Extraction of Polyphenols from Sea Buckthorn Leaves." Chemical Engineering Communications **203**(12): 1547-1553.
5. Calinescu I., Asofiei I., Gavrilă A. I., Trifan A., Ighigeanu D., Martin D., Matei C. and Buleandra M. (2017a). "Integrating Microwave Assisted Extraction of Essential Oils and Polyphenols from Rosemary and Thyme Leaves." Chemical Engineering Communications.
6. Calinescu I., Lavric V., Asofiei I., Gavrilă A. I., Trifan A., Ighigeanu D., Martin D. and Matei C. (2017b). "Microwave assisted extraction of polyphenols using a coaxial antenna and a cooling system." Chemical Engineering and Processing: Process Intensification.
7. Chemat F. and Cravotto G., Eds. (2013). Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds. Food Engineering Series, Springer.
8. Chemat F., Fabiano-Tixier A. S., Abert Vian M., Allaf T. and Vorobiev E. (2017). "Solvent-Free Extraction." Comprehensive Analytical Chemistry **76**: 225-254.
9. Chemat F., Fabiano-Tixier A. S., Vian M. A., Allaf T. and Vorobiev E. (2015). "Solvent-free extraction of food and natural products." TrAC Trends in Analytical Chemistry **71**: 157-168.
10. Chen Y., Xie M.-Y. and Gong X.-F. (2007). "Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*." Journal of Food Engineering **81**(1): 162-170.
11. Chumnansapont N., Niamnuy C. and Devahastin S. (2014). "Mathematical model for continuous and intermittent microwave-assisted extraction of bioactive compound from plant material: Extraction of beta-carotene from carrot peels." Chemical Engineering Science **116**: 442-451.
12. Dai J. and Mumper R. J. (2010). "Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties." Molecules **15**(10): 7313-7352.
13. El Asbahani A., Miladi K., Badri W., Sala M., Ait Addi E. H., Casabianca H., El Mousadik A., Hartmann D., Jilale A., Renaud F. N. and Elaissari A. (2015). "Essential oils: from extraction to encapsulation." International Journal of Pharmaceutics **483**(1-2): 220-243.
14. Fedors R. F. (1973). "A Method for Estimating Both the Solubility Parameters and Molar Volumes of Liquids." JPL Quarterly Technical Review **3**(1): 45-53.
15. Gavrilă A. I., Asofiei I., Trifan A. and Chipurici P. (2017a). "Factorial Design for Optimization of Microwave Assisted Synthesis of 5-Hydroxymethylfurfural." Revista de Chimie **68**(4): 639-641.
16. Gavrilă A. I., Asofiei I., Trifan A., Chipurici P. and Rusen E. (2017b). "Microwave Assisted Synthesis of 5-hydroxymethylfurfural Using Mild Reaction Conditions." Revista de Chimie **68**(3): 435-438.

17. Lattanzio V., Lattanzio V. M. T. and Cardinali A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. Phytochemistry: Advances in Research. Imperato F. Kerala, India, Research Signpost: 23-67.
18. Li Y., Fabiano-Tixier A. S., Vian M. A. and Chemat F. (2013). "Solvent-free microwave extraction of bioactive compounds provides a tool for green analytical chemistry." Trac-Trends in Analytical Chemistry **47**: 1-11.
19. Naczek M. and Shahidi F. (2006). "Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **41**(5): 1523-1542.
20. Rehman, Rafia, Hanif, Muhammad Asif, Mushtaq, Zahid, Mochona, Bereket, Qi and Xin (2016). "Biosynthetic Factories of Essential Oils: The Aromatic Plants." Natural Products Chemistry & Research **4**(4): 1-11.
21. Rombaut N., Tixier A.-S., Bily A. and Chemat F. (2014). "Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery." Biofuels, Bioproducts and Biorefining **8**(4): 530-544.
22. Salas P. G., Soto A. M., Carretero A. S. and Gutierrez A. F. (2010). "Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples." Molecules **15**(12): 8813-8826.
23. Sarker S. D., Zahid Latif and Gray A. I. (2006). Natural Products Isolation. Totowa, New Jersey, Humana Press.
24. Šeruga M., Novak I. and Jakobek L. (2011). "Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods." Food Chemistry **124**(3): 1208-1216.
25. Vian M. A., Fernandez X., Visinoni F. and Chemat F. (2008). "Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils." Journal of Chromatography A **1190**(1-2): 14-17.
26. Wang L., Qin P. and Hu Y. (2010). "Study on the microwave-assisted extraction of polyphenols from tea." Frontiers of Chemical Engineering in China **4**(3): 307-313.
27. Zhang H. F., Yang X. H. and Wang Y. (2011). "Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions." Trends in Food Science & Technology **22**(12): 672-688.