UNIVERSITATEA „POLITEHNICA” DIN BUCUREŞTI
Şcoala Doctorală de Chimie Aplicată şi Ştiinţa Materialelor
Departamentul de Inginerie Chimică și Biochimică

TEZĂ DE DOCTORAT

ÎMBUNĂTĂŢIREA CALITĂŢII CIDRULUI CU AJUTORUL AGENŢILOR ANTIOXIDANŢI NATURALI

(Rezumatul tezei de doctorat)

Doctorand: Boris BREZAN

Conducător doctorat: Prof. dr. ing. Alexandru WOINAROSCHY

BUCUREȘTI
2021

MULŢUMIRI

Adresez pe această cale, sincere mulțumiri conducătorului ştiinţific, domnului **Prof. Dr. Ing. Alexandru WOINAROSCHY** de la Departamentul Inginerie Chimică şi Biochimică, Facultatea de Chimie Aplicată şi Ştiinţa Materialelor, Universitatea POLITEHNICA din Bucuresti, pentru demonstrarea profesionalismului şi disponibilității privind creionarea întregului program de studii doctorale.

În acelaşi timp, doresc să îmi exprim recunoştința față de membrii comisiei de îndrumare: **Conf. Dr. Ing. Chimist Carmen BĂDĂRU, Prof. Dr. Ing. Raluca ISOPESCU, Prof. Dr. Ing. Anicuţa STOICA** pentru sfaturile inspirate şi de asemeni şansei deosebite de a învăţa de la persoane cu o experienţă vastă în domeniul doctoral.

Nu în ultimul rând, mulțumesc managementului Heineken S.A. Miercurea Ciuc pentru suportul moral continuu, acordat pe durata desfăşurării cercetărilor doctorale.

CUPRINS

INTRODUCERE 6

PARTEA I. DATE DE LITERATURĂ 7

PARTEA A-II-A CONTRIBUTII ORIGINALE 10

CAPITOLUL 4 OBŢINEREA CIDRULUI ÎN CONDIŢII DE LABORATOR 11

4.1. Sortimente de cidru obţinute din mere provenite din zona Voineasa 11

4.2. Analize la sortimentele de cidru obţinute în laborator 11

4.2.1. Determinarea concentraţiei alcoolice utilizând metoda ebuliometrică 11

4.2.1.1.Sortimente analizate 11

4.2.1.2.Metoda 11

4.2.1.3.Rezultate 11

4.2.2. Determinarea acidităţii potenţiale a cidrului prin titrare potentiometrică 11

4.2.2.1.Sortimente analizate 11

4.2.2.2. Metoda 11

4.2.2.3. Rezultate 11

4.2.3. Determinarea dioxidului de sulf prin metoda RIPPER 12

4.2.3.1.Sortimente analizate 12

4.2.3.2.Metoda 12

4.2.3.3.Rezultate 12

CAPITOLUL 5 OBŢINEREA ŞI TESTAREA UNOR EXTRACTE VEGETALE ÎN CONDIŢII DE LABORATOR 13

5.1. Materiale şi metode 13

5.1.1. Sursele vegetale utilizate 13

5.1.2. Obţinerea extractelor 13

5.2. Testarea extractelor obţinute 15

5.2.1. Determinarea conţinutului de polifenoli din extract (TPC) 15

5.2.1.1.Metoda 15

5.2.1.2.Rezultate 15

5.2.2. Determinarea conţinutului de flavonoide din extract (TFC) 16

5.2.2.1.Metoda 16

5.2.2.2.Rezultate 16

5.2.3. Proprietăţi antioxidante 17

5.2.3.1.Activitate DPPH 17
5.2.3.2.Rezultate 17
5.3. Discuţii 17
5.3.1. Influenţa solventului pentru fiecare sursă vegetală asupra conţinutului de polifenoli/ flavonoide 17
CAPITOLUL 6 STUDIU EXPERIMENTAL PRELIMINAR PRIVIND INFLUENȚA ADAOSURILOR VEGETALE ȘI A ULTRASONĂRII ASUPRA CAPACITĂȚII ANTIOXIDANTE A CIDRULUI 19
6.1. Obţinerea extractelor lichide în condiţii de laborator 19
6.1.1. Materiale şi metode 19
6.1.2. Variantele experimentale 19
6.2. Testarea extractelor obţinute 19
6.2.1. Determinarea conţinutului de polifenoli din extract (TPC) 19
6.2.1.1.Metoda 19
6.2.1.2.Rezultate 19
6.2.2. Determinarea conţinutului de flavonoide din extract (TFC) 20
6.2.2.1.Metoda 20
6.2.2.2.Rezultate 20
6.3. Proprietaţi antioxidante 21
6.3.1. Activitate DPPH 21
6.3.1.1.Rezultate 21
6.4. Discuţii 21
6.4.1. Influenţa amplitudinii asupra temperaturii probelor 21
6.4.2. Influența tratmentelor asupra acidității, pH-ului probelor 21
CAPITOLUL 7 ASPECTE PRACTICE PRIVIND ÎMBOGĂŢIREA CIDRULUI CU EXTRACTE DIN AFINE ŞI MORCOV NEGRU 22
7.1. Introducere 22
7.2. Materiale şi metode 22
7.2.1. Substanţe chimice şi reactivi 22
7.2.2. Obţinerea cidrului şi procesul de fermentare 22
7.2.3. Extractele adăugate cidrului 23
7.2.4. Tratamentul cu ultrasunete 23
7.2.5. Analiza probelor 23

CAPITOLUL 8 ANALIZA STATISTICĂ A REZULTATELOR 24

8.1. Variantele de cidru şi clasificare 24

8.2. Conţinutul total de polifenoli (TPC) 24

8.3. Conţinutul total de flavonoide (TFC) 25

8.4. Capacitatea de precipitarea a proteinelor (PPC) 26

8.5. Capacitatea antioxidantă a variantelor de cidru 27

CAPITOLUL 9 CONCLUZII GENERALE ŞI DESCHIDERI ALE TEZEI DE DOCTORAT..... 31

9.1. Concluzii generale..... 31

9.2. Deschideri ale tezei de doctorat 32

LUCRĂRI ŞTIINŢIFICE ELABORATE PE PARCURSUL STAGIULUI DE DOCTORAT..... 33

BIBLIOGRAFIE SELECTIV 34

Cuvinte cheie: cidru, extracte vegetale, polifenoli, flavonoide, activitate antioxidanta

INTRODUCERE

Inovaţia este în prezent un factor de o importanţă deosebită în creşterea dorită şi aşteptată a consumului de cidru, o categorie a băuturilor slab alcoolice aflată în continuă dezvoltare, pentru care consumatorul plătește mai mult decât pentru o bere.

Compuşii fenolici sunt responsabili de principalele caracteristici organoleptice în cazul majorității plantelor şi de asemenea a produşilor de transformare a acestora. Ei contribuie în special la culoare, amărăciune şi astringență în cazul băuturilor, aceasta din urmă datorandu-se prezenţei taninurilor. În plus, în funcție de natura lor, acestea pot avea un interes nutrițional şi farmacologic, lucru ce determină îmbunătățirea calității unei băuturi precum cidru, ceea ce şi urmăreşte teza de doctorat.

Obiectivul principal al lucrării, este acela de a contribui într-un mod original, prin studiile prezentate, la valorificarea unor surse naturale bogate în compuşi de tip antioxidant, prin încorporarea cidrului sub forma extractelor lichide. Toate acestea, corelat cu utilizarea ultrasunetelor pentru concentrarea acestor compuşi în extractele sau probele utilizate, urmat bineînteles de o analiză a factorilor adiacenți (condiții de procesare).

Atingerea obiectivului principal, este bineînteles precedată de urmărirea unor puncte secundare, cum ar fi:

- efectuarea unui studiu de literatură de specialitate amănunțit, în acest sens,
- stabilirea unor paşi pentru obținerea cidrului în condiții de laborator, concretizați într-o diagramă de flux tehnologic,
- identificarea şi evaluarea unor surse naturale de antioxidanți, cu potențial în privința extragerii acestora,
- analiza extractelor obţinute din sursele prioritizate pe baza rezultatelor preliminare,
- evaluarea tratamentului cu ultrasunete, asupra conținutului în antioxidanți, şi nu doar, asupra cidrului îmbogățit cu extracte din afine respectiv morcov negru,
- realizarea unor analize statistice în final (TPC, TFC, PPC şi capacitatea antioxidantă a variantelor de cidru).

Teza de doctorat este compusă din două părți: partea de literatură și contribuțiile originale.

PARTEA I. DATE DE LITERATURĂ

Prima parte a tezei de doctorat cumulează o serie de date culese din literatura de specialitate, **pornind de la accepțiunea termenului de cidru** cu tot ceea ce derivă din acesta, de la materie primă, nutrienți și pană la alte ingrediente de care depinde calitatea băuturii (aditivi, culturi de drojdii sau preparate enzimatice), toate acestea detaliate în primul capitol. S-a pus ulterior accent, în cel de al-2lea capitol, pe analiza comparativă a tehnologiilor de obținere a cidrului, concretizand în final o schemă bloc de obținere a acestuia în condiții de laborator și nu în ultimul rand implicațiile utilizării ultrasunetelor aspura compușilor fenolici. Cel de al-3lea capitol s-a focusat pe sursele vegetale cu potențial antioxidant pentru îmbunătățirea calității cidrului, studiindu-se de asemenea metodele de separare din acestea în vederea valorificării.

Comparațiile între metoda tradițională de producere a cidrului (utilizand microflora prezentă pe coaja fructelor) și metodele de fermentare provocată, au condus la sintetizarea drojdiilor și bacteriilor din sucul de mere proaspăt, acestea regăsindu-se enumerate în tabelul 1.11, de la acestea putand concluziona că o cultură de drojdii bine definită (tulpină pură) poate fi utilizată pentru facilitarea procesului de fermentare (prezente fiind în această manieră într-o concentratie suficientă), cea mai raspandită dintre aceastea fiind S. cerevisiae.

Tabelul 1.11 *Microorganisme tipice din sucul de mere proaspăt presat* (Jarvis B, 2003; Tascon N. F., Suarez Valles B.2007)

Tipul	**Specii**	**Abilitatea de creştere la aciditatea din mere (a)**	**Sensibilitatea la sulfiţi (b)**
Drojdii	Saccharomyces cerevisiae	++++	+-/-
	S. uvarum	++++	+-/-
	Saccharomycodes ludwigii	++++	-
	Kloeckera apiculata	++++	+++
	Candida mycoderma	++++c	++++
	Pichia spp.	++++c	++++
	Torulopsis famata	++++	++
	Aereobasidium pullulans	++++	+++
	Rhodoturola spp.	++++	++++
Bacterii	Acetobacter spp.	++++c	++
	Pseudomonas spp.	+	++++
	Escherichia colli	-/+	++++
	Salmonella spp.	-	++++
	Micrococcus spp.	+	++++
	Staphylococcus spp.	+	++++
	Bacillus spp.	-(celule)	-(spori)
	Clostridium spp.	-(celule)	-(spori)

a ++++ capabile de o bună dezvoltare, + capabile de o creştere oarecare, -/+ dependente de tulpini, - nu se dezvoltă

b - insensibile, +/- relativ insensibile, ++,+++,++++ din ce în ce mai sensibile

c =doar în prezența aerului

De aici au rezultat o serie de consecințe, aducand în prim plan necesitatea utilizării diferitelor forme ale sulfului, corelat cu tratatrea sucului de mere înainte de fermentare și pe durata întregului proces, cu efect bineînteles asupra compușilor de culoare (încetinire a

reacţiilor de închidere la culoare etc.). Tabelul 2.3 face o recomandare în privința cantităților de sulf necesare sucului de mere în functie de pH-ul acestuia, în final concretizandu-se o diagramă a fluxului tehnologic de obținere a băuturii, pentru care implicații ale ultrasunetelor reprezintă un punct inovator pentru operațiile de "accelerare" a concentrației compușilor fenolici, cu rol în calitatea cidrului.

Tabelul 2.3 *Concentraţia de sulf recomandată în sucul de mere la diferite valori ale pH-ului*

(Johansen K, 2012)

Ph-ul sucului	**Concentraţia de sulf**
<3,0	0 ppm
3,0-3,3	75 ppm
3,3-3,5	100 ppm
3,5-3,8	150 ppm
3,8-4,0	200 ppm
>4,0	Acid malic la pH de 3,8 si adăugare de sulf 150 ppm

Aşadar, eliberarea de compuşi fenolici şi a antocianinelor, pe baza utilizării ultrasunetelor, aplicate în partea practică a lucrării asupra extractelor lichide din surse vegetale cu conținut ridicat în acest sens, reprezintă interesul părții de contribuții originale. Figura 3.7 a sintetizat o serie de metode de separare, identificare şi izolare a unor astfel de compuşi **(polifenoli)**, utilizate cu precădere la scară mai largă.

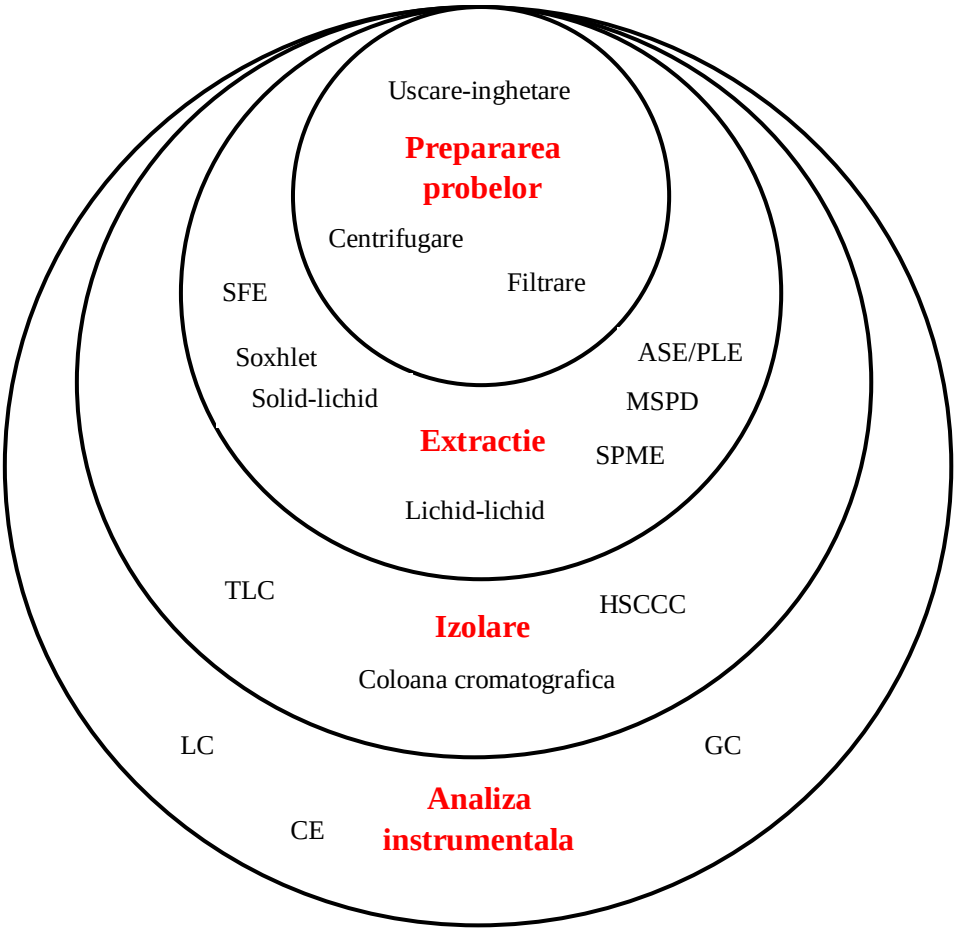


Fig. 3.7 *Metode utilizate în separarea, identificarea şi analiza polifenolilor* (Syed S. H. Rizvi, 2010)

Abrevieri: SFE-supercritical fluid extraction; SPME-solid phase microextraction; MSPD-matrix solid-phase dispersion; ASE/PLE-accelerated solvent extraction/pressurized solid lichid extraction; TLC-thin layer chromatography; HSCCC-high-speed counter-current chromatography; LC-electrochemical detector; GC-electron capture detection; CE-capillary electrophoresis

PARTEA A-II-A CONTRIBUTII ORIGINALE

În cea de a doua parte a lucrării, sunt prezentate în primă fază cercetările ştiinţifice privind obținerea sortimentului de cidru în condiții de laborator, ținand cont de aspectele menționate anterior, ca şi bază de plecare pentru efectuarea părții practice a lucrării. Prin urmare, capitolul 4 relevă o serie de aspecte din timpul fermentației sucurilor de mere, urmat de o serie de analize la cidrul final.

În capitolul 5, se pune accent pe valorificarea unor surse vegetale cu potențial antioxidant, în vederea obținerii unor extracte lichide, pe baza unor solvenți diverşi. Se relevă astfel, condițiile de extracție pentru fiecare sursă vegetală utilizată, acestea împărțindu-se în două mari categorii: medii apoase şi medii pe bază de etanol. O dată definitivată schema de extracție şi aplicată surselor alese, s-a procedat la testarea acestora în vederea determinării conținutului de polifenoli (TPC) respectiv flavonoide (TFC) din acestea, cele mai bune rezultate fiind obținute în cazul afinelor floră spontană şi H. sabdariffa în ambele cazuri. Măsurătorile nu s-au oprit aici, fiind estimată şi activitatea antioxidantă a extractelor obținute, şi interpretări ale influenței solventului asupra fiecărei sursele vegetale alese.

Variantele de cidru supuse testelor de ultrasonare, au presupus în primă fază obținerea extractelor din afine (cultură, stare proaspătă) utilizand ca şi solvent apă cu acid citric 2%, respectiv a celor utilizand un concentrat de morcov negru, şi îmbogățirea acestora. În capitolul 6, sunt prezentate influența ultrasunetelor asupra creşterii TPC şi TFC de la o măsurătoare la alta, pentru probele supuse testelor.

Capitolul 7 face trimitere directă la aspectele practice din timpul operațiilor de îmbogățire a cidrului cu aceste extracte (afine şi morcov negru), subliniind faptul că cercetările experimentale ale studiului, s-au focusat deopotrivă pe evaluarea efectului tratamentului cu ultrasunete (amplitudini diferite, timpi de aplicare diferiti) asupra TPC, TFC, puterii antioxidante cât şi asupra evaluării capacității antioxidante şi activității DPPPH a cidrurilor analizate.

Toate acestea, urmate în capitolul 8 de o serie de analize statistice a rezultatelor obținute in final, inclusiv capacitatea de precipitare a proteinelor fiind luată în calcul pentru variantele studiate, şi o serie de concluzii în capitolul 9.

CAPITOLUL 4
OBŢINEREA CIDRULUI ÎN CONDIŢII DE LABORATOR

4.1. Sortimente de cidru obţinute din mere provenite din zona Voineasa

Producerea cidrului propriu-zis, pentru realizarea experimentelor, a presupus utilizarea metodei de fermentație provocată prin utilizarea unei culturi de drojdii adăugată "mustului" de mere, concomitent cu o serie de aspecte practice ce rezultă din aceasta (implicații ale metabisulftului ca de exemplu). Drojdia folosită la demararea fermentației a fost din genul Saccharomyces cerevisiae (vezi aspecte din timpul fermentației în figura 4.2).



Fig. 4.2 *Aspecte din timpul fermentaţiei sucurilor de mere (Brezan, 2018)*

Privitor la sortimentele de mere utilizate la obținerea cidrului, s-a dorit punerea în valoare a soiului Royal Gala, proveniență Voineasa, acesta conducand la obținerea unui cidru cu particularități organoleptice complexe (vezi conținut acid malic în subcapitolul următor).

4.2. Analize la sortimentele de cidru obţinute în laborator

4.2.1. Determinarea concentraţiei alcoolice utilizând metoda ebuliometrică

4.2.1.1.Sortimente analizate

4.2.1.2.Metoda.

4.2.1.3.Rezultate

4.2.2. Determinarea acidităţii potenţiale a cidrului prin titrare potentiometrică

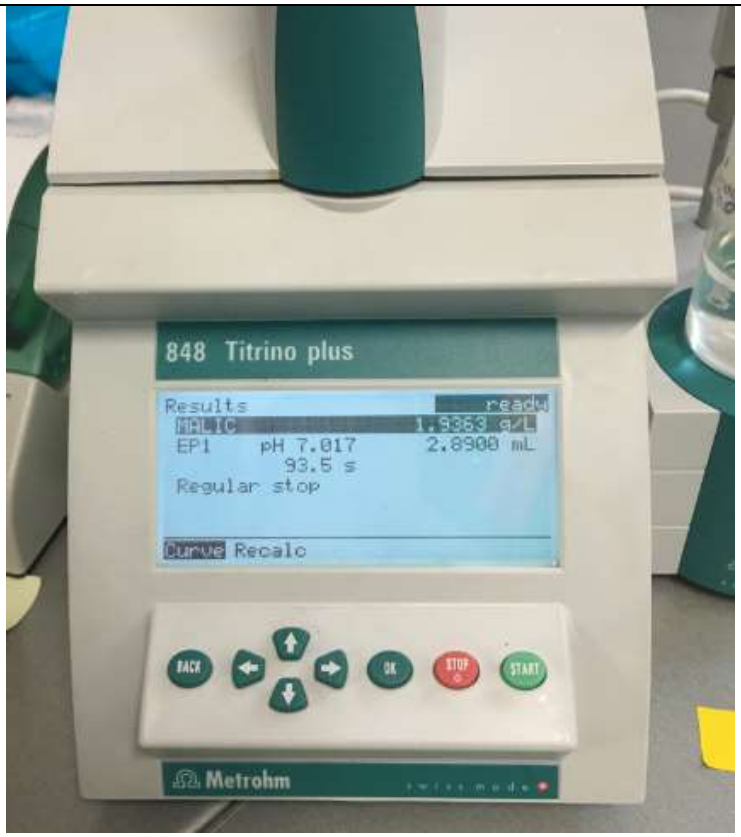
4.2.2.1.Sortimente analizate

S-a dorit determinarea acidității potențiale a cidrului, ulterior măsurării concentrației alcoolice (5.13% v/v alcool prin metoda ebuliometrică) şi opririi din fermentație prin adăugare de metabisulfit. Aciditatea exprimată în g/L acid malic, a confirmat corelarea valorii redate în tabelul 4.2, încadrarea soiului de mere utilizat pentru cidru în categoria "sweet", întrucât proba de cidru titrată şi analizată, a furnizat o valoarea de mai putin de 4,5 g/L acid malic.

4.2.2.2. Metoda

4.2.2.3. Rezultate

Tabel 4.2 *Determinarea acidităţii cidrului (Brezan, 2019)*

Metoda titrare	**Valoare aciditate**
Titrare utilizând - apă distilată -	1.93 g/L 
Densitate cidru [g/cm3] *	***0,99776***

4.2.3. Determinarea dioxidului de sulf prin metoda RIPPER

4.2.3.1.Sortimente analizate

4.2.3.2.Metoda

4.2.3.3.Rezultate

În concluzie, compoziția băuturilor fermentate, ca şi a celorlalte produse derivate din plante, este mai presus de toate funcție de materia primă. Tocmai de aceea, o prezentare sumară a constituenților principali (acizi, taninuri) din materialul vegetal utilizat pentru dezvoltarea de băuturi fermentate şi localizarea lor în cadrul plantei propriu-zise, reprezintă un punct de interes întrucât o parte din aceşti compuşi sunt extraşi în suc. O clasificare a varietăților de mere, utilizate în producția cidrului, atât franțuzești cât şi englezeşti, a fost stabilită pe baza acidității şi conținutului global de polifenoli (criteriul <<taninuri totale>>), motiv pentru care a facut şi obiectul acestei parți.

CAPITOLUL 5
OBŢINEREA ŞI TESTAREA UNOR EXTRACTE VEGETALE ÎN CONDIŢII DE LABORATOR

5.1. Materiale şi metode

5.1.1. Sursele vegetale utilizate

De interes tehnologic cand discutăm despre principalii polifenoli din măr şi alte materiale de natură vegetală sunt flavonele, pe cand atunci cand discutăm despre pigmenții de culoare roşie vorbim practic despre antociani. Aceste componente, utile pentru îmbogățirea cidrului din "exterior", sunt mai mult sau uneori mai putin extrase cu uşurință, în functie de solubilitatea lor şi de mediul de extracție bineînțeles, alături de factori precum localizarea în cadrul plantei. Din aceste considerente, şi datorită transformărilor structurale prin care trec, sunt corelate cu reacții chimice intrinseci, care încep de altfel prin segmentarea integrității celulare a materialului vegetal (precum zdrobire, mărunțire, etc. operații realizate dar necuprinse în acest rezumat) şi continuă pe durata procesului de conservare.

Tabelul 5.1 relevă sursele vegetale de interes lucrării, pentru îmbogățirea cidrului, în vederea cuantificării şi comparării conţinutului de polifenoli şi flavonoide, în primă fază. Acestea pe langă aprecierea activității antioxidante în final.

Tabel 5.1. *Sursele utilizate la obţinerea extractelor (Bădărău şi Brezan, 2018)*

Sursa vegetală	Proveniență	Soi/Regiune	Stare
afine	cultură	Duke	proaspătă
	floră spontană	Valea Prahovei	proaspătă
zmeură	cultură	Polka	proaspătă
	floră spontană	Valea Prahovei	proaspătă
mure	cultură	Thornfree	proaspătă
	floră spontană	Valea Prahovei	proaspătă
H.sabdariffa	comerţ	-	uscată, pulbere
cartof violet	cultură	Albastru violet Galanesti	proaspătă
		Blue Congo	proaspătă
		Blue de la Manche	proaspătă
		Patraque Auvergne	proaspătă

5.1.2. Obţinerea extractelor

În privința solvenților utilizați, se regăsesc în tabelul 5.2. atât variantele ce au fost testate cât şi notificările aferente acestora.

Tabel 5.2. *Condiţiile de extracţie aplicate surselor vegetale (Bădărău şi Brezan, 2018)*

Sursa	Proveniența	Proba	Solventul utilizat			Timp [h]
Afine	Flora spontană	1.1.	ETANOL			24
		1.1. I	ETANOL	AC CITRIC	2%	24
		1.1 II	APA			24
		1.1. III	APA	AC CITRIC	2%	24
		1.1. IV	APA	VIT C	2ml	24
		1.1. V	APA	AC CITRIC	4%	24

Afine	Cultură	1.2	ETANOL			24
		1.2. I	ETANOL	AC CITRIC	2%	24
		1.2. II	APA			24
		n/a	APA	AC CITRIC	2%	n/a
		n/a	APA	VIT C	2ml	n/a
		n/a	APA	AC CITRIC	4%	n/a
Zmeură	Flora spontană	2.1.	ETANOL			24
		2.1. I	ETANOL	AC CITRIC	2%	24
		2.1. II	APA			24
		2.1. III	APA	AC CITRIC	2%	24
		2.1. IV	APA	VIT C	2ml	24
		2.1. V	APA	AC CITRIC	4%	24
Zmeură	Cultură	2.2.	ETANOL			24
		2.2. I	ETANOL	AC CITRIC	2%	24
		2.2. II	APA			24
		n/a	APA	AC CITRIC	2%	n/a
		n/a	APA	VIT C	2ml	n/a
		n/a	APA	AC CITRIC	4%	n/a
Mure	Floră spontană	3.1.	ETANOL			24
		3.1. I	ETANOL	AC CITRIC	2%	24
		3.1. II	APA			24
		3.1. III	APA	AC CITRIC	2%	24
		3.1. IV	APA	VIT C	2ml	24
		3.1. V	APA	AC CITRIC	4%	24
Mure	Cultură	3.2.	ETANOL			24
		3.2. I	ETANOL	AC CITRIC	2%	24
		3.2. II	APA			24
		3.2. III	APA	AC CITRIC	2%	24
		3.2. IV	APA	VIT C	2ml	24
		3.2. V	APA	AC CITRIC	4%	24
Hibiscus	n/a	4	ETANOL			24
		4 I	ETANOL	AC CITRIC	2%	24
		4 II	APA			24
		4 III	APA	AC CITRIC	2%	24
		4 IV	APA	VIT C	2ml	24
		n/a	APA	AC CITRIC	4%	n/a

Etapele principale urmărite în vederea extragerii polifenolilor şi flavonoidelor, sunt redate în figura 5.3.

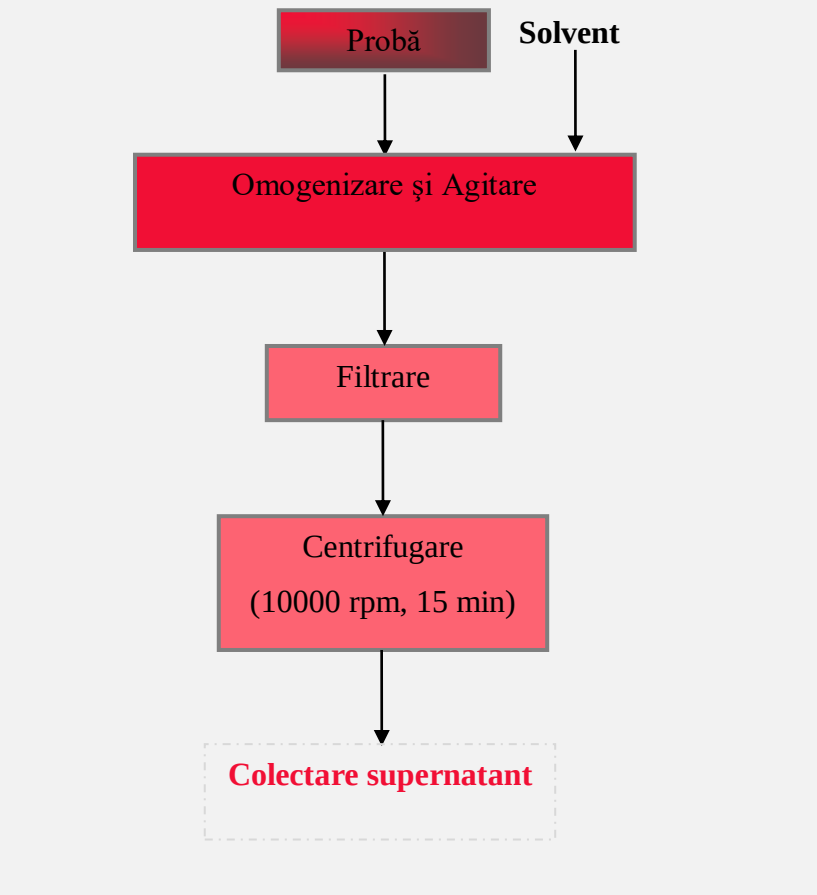


Fig. 5.3. *Operațiile principale din procesul de obținere a variantelor de extracte vegetale*

Toate aceste experimente au fost realizate în câte trei repetiţii, în final rezultatele fiind exprimate ca valoare medie ± deviaţia standard.

5.2. Testarea extractelor obţinute

5.2.1. Determinarea conţinutului de polifenoli din extract (TPC)

5.2.1.1.Metoda

5.2.1.2.Rezultate

Ajutandu-ne de rezultatele obținute în urma testelor privind fiecare substrat fenolic implicat în discuție, pentru extractele enumerate anterior, am dezvoltat câte un comparativ sub formă tabelară al valorilor obținute în cazul fiecărei surse vegetale testate, în funcție de solventul utilizat.

Prin urmare, tabelul 5.4. scoate în evidență faptul că afinele floră spontană au furnizat cele mai bune valori ale conținutului în polifenoli dintre extractele pe bază de etanol, în timp ce H. sabdariffa au livrat cele mai bune valori pentru extractele apoase.

Tabel 5.4. *Valori TPC vs solvent utilizat (Woinaroschy, Bădărău şi Brezan, 2018)*

SURSA	SOLVENT					
	ETANOL	**Etanol ac citric 2%**	**APĂ**	**Apă ac citric 2%**	**Apă ac citric 4%**	**Apă vit C**
Afine floră spontană	829.529	1037.072	403.673	594.009	700.885	818.241
Afine cultură	682.754	945.905	358.140	-	-	-
Zmeură floră spontană	804.048	922.518	289.737	411.141	497.501	823.402
Zmeură cultură	619.876	810.257	256.423	-	-	-
Mure floră spontană	743.561	889.658	376.576	606.765	746.207	927.260
Mure cultură	663.222	762.504	323.176	486.219	588.237	872.541
Hibiscus	816.940	1012.183	531.429	839.290	-	885.204

5.2.2. Determinarea conţinutului de flavonoide din extract (TFC)

5.2.2.1.Metoda

5.2.2.2.Rezultate

De cealaltă parte, extracția flavonoidelor, responsabile în general pentru caracteristicile de aromă, culoare sau activități cu caracter farmacologic, a presupus utilizarea aceloraşi tipuri de extracte, în aceleaşi condiții. Rezultate favorabile, au fost obținute bineînțeles în cazul aceloraşi surse vegetale, după cum reiese din tabelul 5.6. de mai jos, unde sunt prezentate sintetic valorie medii TFC.

Tabel 5.6. *Valori TFC vs solvent utilizat (Woinaroschy, Bădărău şi Brezan, 2018)*

SURSA	SOLVENT					
	ETANOL	**Etanol ac citric 2%**	**APĂ**	**Apă ac citric 2%**	**Apă ac citric 4%**	**Apă vit C**
Afine floră spontană	33.440	34.455	13.554	12.688	16.592	11.608
Afine cultură	21.814	17.180	11.427			
Zmeură floră spontană	15.356	9.294	7.697	8.386	4.657	6.459
Zmeură cultură	16.345	6.665	8.252			
Mure floră	34.171	15.863	10.169	12.669	10.167	10.678
Mure cultură	26.944	13.615	9.821	10.483	9.023	10.882
Hibiscus	86.856	26.548	24.593	41.807		43.033

5.2.3. Proprietăţi antioxidante

5.2.3.1.Activitate DPPH

5.2.3.2.Rezultate

5.3. Discuţii

Este evident faptul că în cazul conținutului de polifenoli din extracte [TPC], s-au obținut valori semnificativ mai mari în comparație cu celelalte extracte, în cazul testului care a utilizat amestecul de etanol cu acid citric 2% ca şi mediu de extracție. În această situație, cele mai bune rezultate au fost livrate de către afinele floră spontană, aşa cum am amintit anterior, valoarea conținutului în această sursă şi folosind ca solvent, amestecul menționat, fiind de 1037.07 mgAGE/100gr.

De cealaltă parte, pentru determinarea conținutului de flavonoide, rezultate bune au fost furnizate de către extractele pe bază de etanol, utilizat ca şi atare. Ca şi observație majoră, în toate cazurile, H. sabdariffa a demonstrat cele mai ridicate valori în acest sens.

5.3.1. Influenţa solventului pentru fiecare sursă vegetală asupra conţinutului de polifenoli/ flavonoide

Privind influența solventului asupra acestor conținuturi deja detaliate, condițiile de aplicare au fost asemănătoare în ceea ce priveşte temperatura de lucru (20^0C) sau raportul probă:solvent (1:20). Comparații ale valorilor [TPC] respectiv [TFC] privind nişte teste experimentale utilizand apa distilată ca şi solvent, versus variantele de solvenți utilizați la extracțiile anterioare, sunt redate sugestiv în cele de mai jos (Fig. 5.10, Fig. 5.11). Nu se observă diferente semnificative, conținutul de biocompuşi fiind relativ asemănător.

Tabel 5.8 *Valori medii TPC şi TFC la extractele obținute utilizând apa ca solvent (Woinaroschy, Bădărău şi Brezan, 2018)*

	Sursa vegetală pentru obținerea extractului	TPC (mgAGE/100g)	TFC (mg QE/100g)
1	Albastru Violet Gălăneşti	**538.17**	**8.95**
2	Blue Congo	**549.61**	**7.45**
3	Blue de la Manche	**698.49**	**6.50**
4	Patraque Auvergne	**519.22**	**4.35**
5	Afine floră spontană	**956.98**	**112.02**
6	Afine cultură	**1041.68**	**84.52**
7	Zmeură floră spontană	**716.41**	**9.35**
8	Zmeură cultură	**732.58**	**6.13**
9	Mure floră spontană	**658.75**	**14.84**
10	Mure cultură	**1088.61**	**16.56**
11	Hibiscus	**573.79**	**16.18**

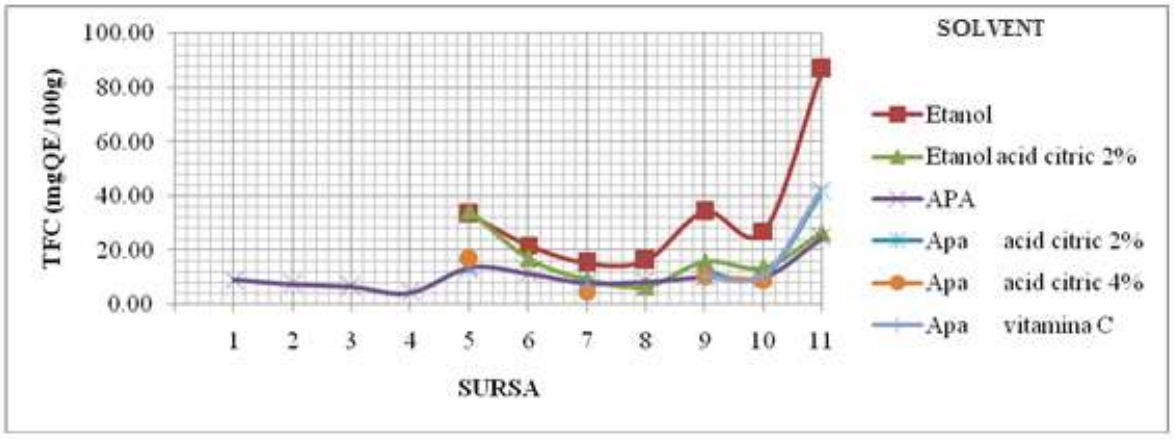


Fig. 5.10 *Valori medii ale conţinutului total de polifenoli din extracte în funcţie de solventul şi de sursa vegetală utilizate*

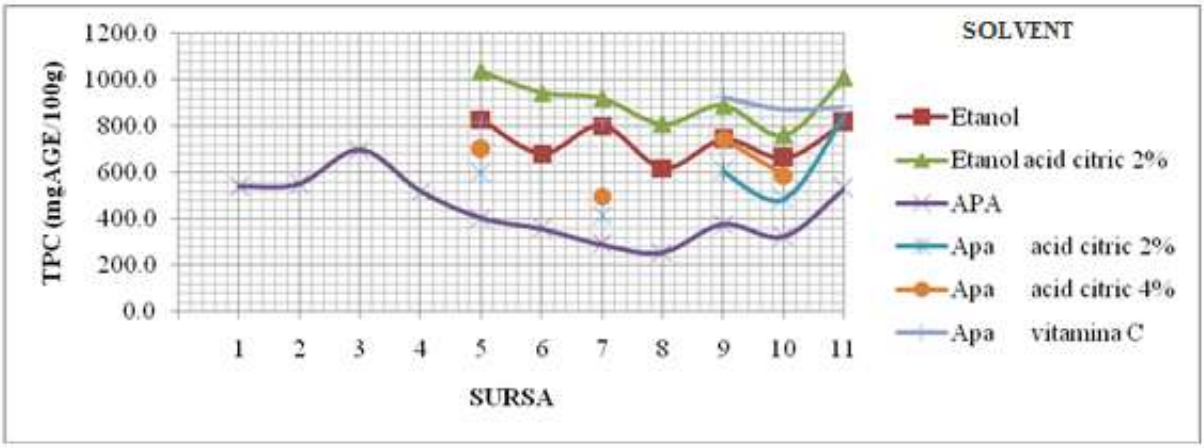


Fig. 5.11 *Influenţa solventului pentru fiecare sursă vegetală asupra conţinutului de flavonoide*

CAPITOLUL 6
STUDIU EXPERIMENTAL PRELIMINAR PRIVIND INFLUENȚA ADAOSURILOR VEGETALE ŞI A ULTRASONĂRII ASUPRA CAPACITĂȚII ANTIOXIDANTE A CIDRULUI

6.1. Obţinerea extractelor lichide în condiţii de laborator

6.1.1. Materiale şi metode

Avand în vedere rezultatele obținute în fază preliminară, s-a procedat la utilizarea afinelor de cultură, din soiul Duke şi în stare proaspătă. Explicativ, probele proaspete (50 gr.) au fost mojarate peste cantitatea de solvent ce s-a dozat inițial (200 ml) în vederea omogenizării în recipiente special destinate acestui scop. Dupa o perioadă de contact de 24 h la o temperatură de 20 °C (vezi tabel 6.2), acestea au fost supuse operațiilor precedente (agitare, filtrare, centrifugare) colectării extractului propriu-zis.

6.1.2. Variantele experimentale

Utilizandu-se cidrul obținut anterior în condiții de laborator, s-a dorit pentru desfăşurarea părții experimentale a lucrării, îmbogățirea acestuia cu un extract lichid concentrat în astfel de compuşi de tip antioxidant, concomitent cu aplicarea ultrasunetelor. În tabelul 6.1 sunt redate variantele experimentale, codificate în funcție de tratamentul aplicat și de sursa vegetală utilizată pentru obținerea extractului utilizat.

Tabel 6.1 *Codificarea variantelor experimentale supuse tratamentelor cu ultrasunete (Bădărău şi Brezan, 2019)*

Sursa vegetală din care s-a obținut extractul		
Afine	**Extract morcov negru**	**Amplitudine [%]**
AM	MM	-
A1	M1	20
A2	M2	30
A3	M3	40
A4	M4	50

AM, MM – martori netratați (amestecuri extracte/cidru în raport de 1/20)

6.2. Testarea extractelor obţinute

Bineînteles, s-au analizat variantele de cidruri în vederea determinării conținutului de polifenoli, respectiv flavonoide. În cazul conținutului de polifenoli din extract (TPC), au fost sumarizate media valorilor citite pentru absorbanța probelor la lungime de unde de 725 nm, respectiv valorile (TPC) asa cum reiese din figura 6.1, acestea fiind exprimate în mgAGE/100gr şi reprezentand punctul de plecare pentru reprezentarea grafica de mai jos (în timp ce se modifică doar solventul).

6.2.1. Determinarea conţinutului de polifenoli din extract (TPC)

6.2.1.1.Metoda

6.2.1.2.Rezultate

Din figura 6.1 reiese faptul că valori ridicate ale amplitudinii ultrasunetelor furnizează şi valori mai mari ale conținutului total de polifenoli în variantele testate.

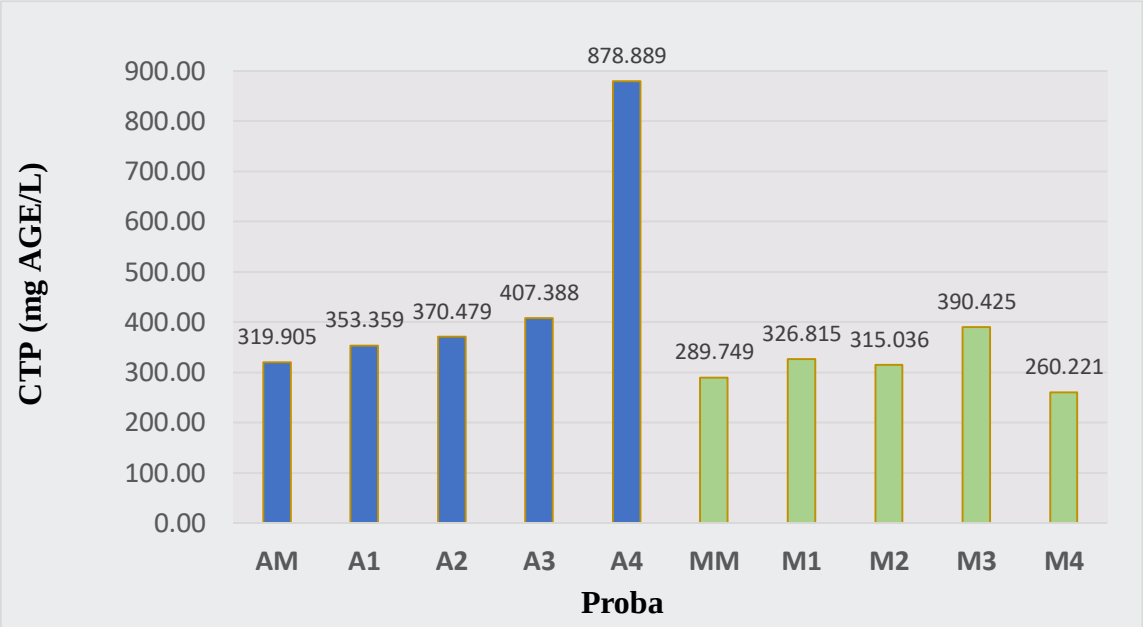


Fig. 6.1 *Valori medii TPC la variantele experimentale de cidru obținute cu extracte de afine [2% acid citric] și extractele de morcov negru, tratate cu ultrasunete*

6.2.2. Determinarea conținutului de flavonoide din extract (TFC)

6.2.2.1.Metoda

6.2.2.2.Rezultate

De cealaltă parte, pentru determinarea conținutului de flavonoide (TFC) au fost citite valorile pentru absorbanța probelor la lungime de unde de 510 nm, în figura 6.2 regăsindu-se valorile (TFC) pentru cidrurile analizate.

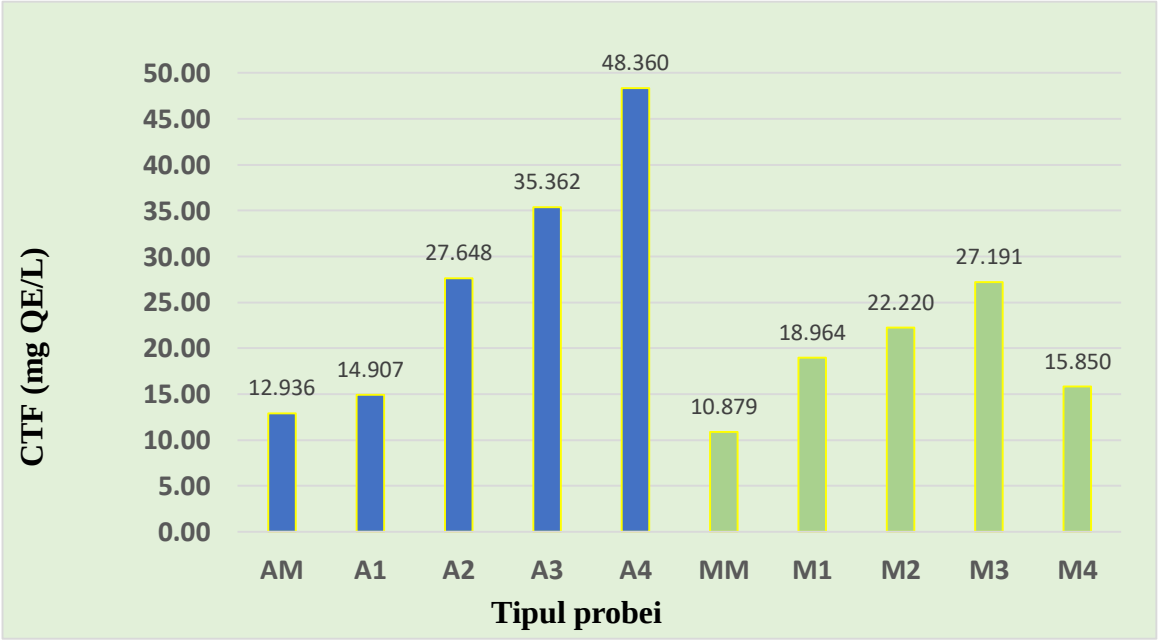


Fig. 6.2 *Valori medii TFC la variantele experimentale de cidru obținute cu extracte de afine [2% acid citric] și extractele de morcov negru, tratate cu ultrasunete*

6.3. Proprietaţi antioxidante

6.3.1. Activitate DPPH

6.3.1.1.Rezultate

6.4. Discuţii

6.4.1. Influenţa amplitudinii asupra temperaturii probelor

Se observă o creştere a valorilor atât în privința TPC cât şi în privința TFC, de la o măsurătoare la alta, luand aici în discuție fiecare dintre cidrurile îmbogățite cu ambele tipuri de extracte. Aşadar, putem nota un prim efect al utilizării ultrasunetelor. Aceste rezultate se datorează modificării (creşterii) amplitudinii ultrasunetelor în mediul nostru de propagare (cidru+extract lichid).

Concluzionand asupra utilizării ultrasunetelor, putem afirma faptul ca cele mai bune valori ale acestor conținuturi, au fost obținute prin supunerea probelor la o amplitudine de 50% a acestora.

Discutand despre influența amplitudinii asupra temperaturii probelor, putem observa în figura următoare temperaturile rezultate la finalul ultrasonării cidrului, fiind usor de concluzionat că o dată cu creşterea amplitudinii are loc şi creşterea temperaturii mediului ultrasonat.

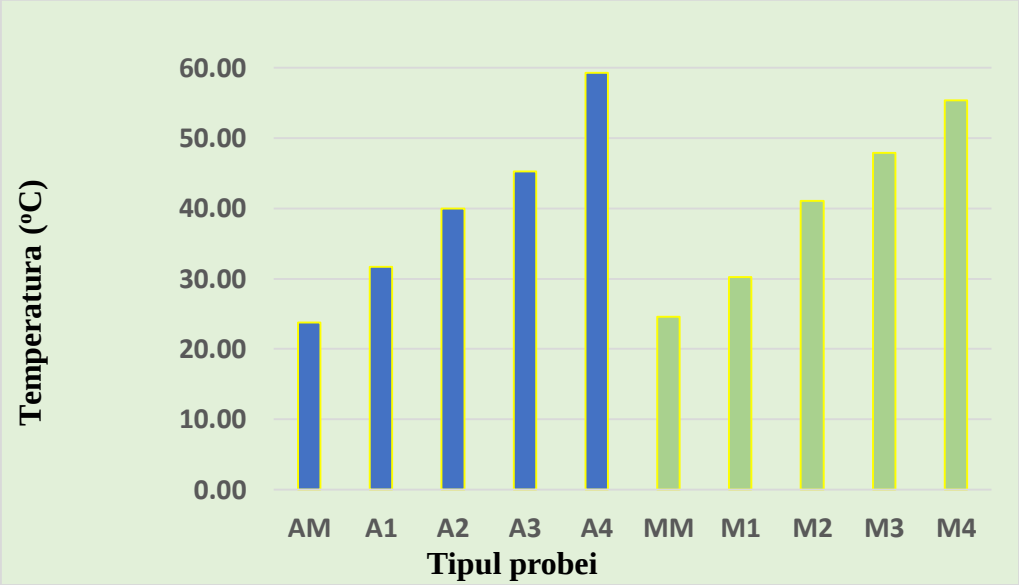


Fig. 6.5 *Modificările de temperatură pe durata ultrasonării probelor de cidru cu adaos de extracte vegetale*

6.4.2. Influența tratmentelor asupra acidității, pH-ului probelor

CAPITOLUL 7
ASPECTE PRACTICE PRIVIND ÎMBOGĂŢIREA CIDRULUI CU EXTRACTE DIN AFINE ŞI MORCOV NEGRU

7.1. Introducere

Focusul lucrarii este de a evidenția efectul extractelor testate şi bineînțeles al ultrasunetelor, asupra TPC, TFC, proprietăților antioxidante cât şi asupra capacității de precipitare a proteinelor din aceste variante de cidru. Îmbogățirea conținutului în polifenoli în cidrul obținut în condiții de laborator (aceştia avand o importanță covarşitoare din punct de vedere senzorial, cu implicații asupra capacității de conservare a acestuia) face subiectul părții practice, lucrarea dorind să valorifice câteva surse vegetale şi beneficiile utilizării ultrasunetelor în acest sens.

De-a lungul timpului, extracția asistată cu ultrasunete cât şi oportunitățile sale în industria procesării alimentelor a dovedit o serie de avantaje, ca urmare a clasificării acesteia ca şi metodă de procesare non-termală, de aici rezultand multe beneficii (minimizarea procesării sau protejarea sigurantei alimentare ca de exemplu). Acestea au fost câteva considerente luate în calcul, înainte de implicarea lor în realizarea părții practice a lucrării, studiile experimentale concentrandu-se pe următoarele aspecte:

- evaluarea efectului tratamentului cu ultrasunete (diferite amplitudini şi timpi de aplicare) asupra TPC, TFC, puterii antioxidante şi capacităţii de precipitare a proteinelor, pe cidrul îmbogăţit cu extracte din morcov negru şi afine;
- evaluarea capacităţii antioxidante a variantelor de cidru, utilizând: testul FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), testul ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) şi activitate DPPH (diphenylpicrylhydrazyl).

Nu în ultimul rand, s-a considerat şi capacitatea de precipitare a proteinelor, ca fiind importantă, întrucât tendința compuşilor polifenolici din cidru este de a forma compuşi solizi conținători de proteine (formarea turbidității în băuturi în principal).

7.2. Materiale şi metode

7.2.1. Substanţe chimice şi reactivi

7.2.2. Obţinerea cidrului şi procesul de fermentare

Obținerea mustului de mere din varietatea Royal Gala a fost precedată de utilizarea vitaminii C, compus care poate avea efect degradant asupra drojdiei prezente în mod natural în must, şi deci inclusiv întarzieri ale procesului de fermentare.
În vederea pornirii fermentației mustului de mere colectat în vase de sticlă, i s-a adăugat drojdie de natură exogenă, genul Saccharomyces cerevisiae. S-a luat în calcul şi siguranța pornirii fermentației din moment ce folosirea adjuvantului menționat anterior ar putea compromite activitatea microflorei indigene.

Oprirea fermentației desfăşurate la o temperatură de 19 °C, cand concentrația alcoolică a atins 5% alc./vol (5.13%v.v) a fost de dorit, cidrul fiind tratat cu dioxid de sulf şi supus operației de maturare (depozitare la temperatura de refrigerare). Cantitatea de sulf folosită la fiecare decantare a fost de 50 ppm, nedepăsind pe total 200 ppm prin sumarizarea tuturor adițiilor.

7.2.3. Extractele adăugate cidrului

Așa cum s-a menționat, s-a procedat la utilizarea a două extracte pentru îmbunătățirea capacității antioxidante a cidrului, după cum a reieşit din tabelele explicative din capitolele anterioare:

- **colorant morcov negru (extract gata de folosit, de natură comercială, adăugat în proporţie 0.3%, v/v),**
- **extract de afine (obţinut în condiţii de laborator şi adăugat variantelor de cidru în proporţie de 5% v/v).**

Lucru deja ştiut, ambele extracte au fost adăugate înaintea tratamentului cu ultrasunete.



Fig. 7.1 *Aspecte din timpul adăugării extractelor în cidru (Badarau şi Brezan, 2019)*

7.2.4. Tratamentul cu ultrasunete

Rezultatele prezentate reflectă valorile pentru variantele de cidru îmbogățite cu extracte tratate cu ultrasunete (VCX-750, Sonics & Materials, Inc.Newtown, CT, SUA) la 750 W, cu o frecvenţă constantă de 20 kHz, la 20 %, 30 % și 40 % amplitudine pentru perioade de timp de 5 minute, folosind o sondă de 19 mm şi un eșantion de 500 ml cidru. Această combinaţie de amplitudine și timp a fost stabilită pentru a realiza o comparare a eliberarii de compuşi antioxidanți în diferite conditii. Am folosit valori scăzute pentru amplitudine şi timp, pentru a nu îmbunătăţi valorile capacităţii de precipitare a proteinelor.

7.2.5. Analiza probelor

CAPITOLUL 8
ANALIZA STATISTICĂ A REZULTATELOR

8.1. Variantele de cidru şi clasificare

În vederea analizării statistice a rezultatelor testelor efectuate pe variantele de cidru prezentate în tabelul 8.1, s-a folosit software-ul SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), analizate fiind de ANOVA si Duncan's Multiple Range Test. Privind corelația dintre variabile, a fost şi aceasta analizată folosind coeficienții de corelație Pearson. Datele experimentale privind adăugările de extracte, respectiv amplitudini şi timpi de aplicare ai ultrasuntelor, sunt prezentate mai jos:

Tabel 8.1 *Codarea (ID) variantelor de cidru obţinute utilizând adăugările de extracte şi tratamentul cu ultrasunete (Bădărău şi Brezan, 2020)*

Extractele adăugate	Amplitudine (%)	Timp (min)	ID variante cidru
Extracte din morcov negru	-	-	C
(0.3%, v/v)	A 20%	2	C202
		5	C205
		7	C207
	A30%	2	C302
		5	C305
		7	C307
	A40%	2	C402
		5	C405
		7	C407
Extracte din afine	-	-	B
(5%, v/v)	A 20%	2	B202
		5	B205
		7	B207
	A30%	2	B302
		5	B305
		7	B307
	A40%	2	B402
		5	B405
		7	B407
Cidru fără extract adăugat			M

8.2. Conţinutul total de polifenoli (TPC)

Tabelul 8.2 relevă faptul că probele care au urmat tratamente cu ultrasunete la valori mai scăzute ale amplitudinii, au raportat valori mai ridicate în privința TPC-ului. Lucrul bine de ştiut, faptul că ultrasunetele pot îmbunătăți eliberarea acestor compuşi găsiți în formă solubilă în vacuol sau legați de pectină, din peretele celular prin intermediul fenomenului de cavitație.

După cum reiese, din datele de mai jos, cea mai ridicată valoare a TPC-ului în cazul cidrurilor analizate, a fost obținută utilizand amplitudinea A 20% şi 5 minute ca timp de aplicare, în cazul ambelor variante, atât îmbogățind cu morcov negru cât şi cu afine.

Tabel 8.2 *Conţinutul Total de Polifenoli al variantelor de cidru testate (Bădărău şi Brezan 2020)*

	Cod	TPC (mg GAE/L)[1]	±	SD	*Duncan*[2]
Extracte din morcov negru şi tratament cu ultrasunete	C202	503.8	±	101.9	*b*
	C205	730.5	±	38.6	*a*
	C207	423.6	±	51.2	*bc*
	C302	303.6	±	35.4	*d-g*
	C305	411.0	±	84.8	*c*
	C307	294.1	±	91.5	*d-g*
	C402	287.9	±	68.0	*d-G*
	C405	339.3	±	36.6	*cde*
	C407	208.5	±	38.2	*fghi*
Extracte din afine şi tratament cu ultrasunete	B202	279.5	±	25.0	*d-h*
	B205	415.6	±	21.4	*bc*
	B207	167.6	±	39.2	*i*
	B302	296.5	±	30.1	*d-g*
	B305	312.8	±	23.9	*d-e*
	B307	155.5	±	95.7	*i*
	B402	174.3	±	38.5	*i*
	B405	184.0	±	28.8	*hi*
	B407	152.5	±	18.0	*i*
Probe de tip "Control" netratate	M Cider	191.1	±	32.7	*ghi*
	C	368.3	±	24.7	*cd*
	B	242.3	±	21.9	*e-i*

[1]Datele se referă la ± SD ale unui nr de 3 experimente (n=3).[2]Valori cu diferite litere diferă semnificativ de testele ANOVA şi Duncan (P<0.05). Abreviaţii: TPC=Conţinutul Total de Polifenoli; GAE=Echivalent Acid Galic; SD=Deviaţie Standard

Prin urmare se observă o eficacitate dovedită a tratamentelor cu ultrasunete, şi nu doar prin îmbunătățirea recuperării randamentului compus, dar ajută şi la reducerea timpului de extracție, de aici rezultand avantaje economice.

8.3. Conţinutul total de flavonoide (TFC)

Bineînteles, şi in cazul conținutului de flavonoide, probele tratate cu ultrasunete au dovedit valori mai mari comparativ cu probele de tip "Control". Raportandu-ne la proba control C (30.42 ±3.154 mg QE / L) de exemplu, pentru cidrul îmbogățit cu morcov negru, avem valori semnificativ mai bune, ce au fost furnizate pe baza tratamentului cu ultrasunete la o amplitudine de 20% (43,82 ± 7,843 mg QE/ L timp de 2 minute; 45,13±1,655 mg QE/L timp de 5 minute și, respectiv, 40,62 ±1,450 mg QE / L timp de 5 minute), aşa cum reiese şi din tabelul de mai jos.

Tabel 8.4 *Conţinutul Total de Flavonoide al variantelor de cidru testate*

(Bădărău şi Brezan, 2020)

	Cod	TFC (mg QE/L) [1]	±	SD	*Duncan*[2]
Extracte din morcov negru şi tratament cu ultrasunete	C202	43.82	±	7.843	*a*
	C205	45.13	±	1.655	*a*
	C207	40.62	±	1.450	*a*
	C302	28.05	±	2.437	*cd*
	C305	31.28	±	3.776	*bc*
	C307	18.76	±	1.490	*ef*
	C402	12.45	±	1.022	*gh*
	C405	11.45	±	1.442	*h*
	C407	12.02	±	2.853	*h*
Extract din afine şi tratament cu ultrasunete	B202	31.99	±	3.387	*bc*
	B205	35.85	±	1.618	*b*
	B207	15.82	±	0.535	*eh*
	B302	13.34	±	2.400	*gh*
	B305	19.62	±	2.664	*e*
	B307	14.45	±	0.907	*fgh*
	B402	15.28	±	2.520	*e-h*
	B405	11.68	±	1.543	*h*
	B407	11.45	±	1.442	*h*
Probe de tip "Control" netratate	M Cider	17.42	±	0.858	*e-g*
	C	30.42	±	3.514	*c*
	B	25.68	±	1.371	*d*

[1]Datele se referă la ± SD ale unui nr de 3 experimente (n=3).[2]Valori cu diferite litere diferă semnificativ de testele ANOVA şi Duncan (P<0.05). Abreviaţii: TPC=Conţinutul Total de Polifenoli; GAE=Echivalent Acid Galic; SD=Deviaţie Standard

8.4. Capacitatea de precipitarea a proteinelor (PPC)

În scopul acestei cercetări, privind determinarea valorii PPC, s-au avut în vedere valorile absorbanței la 510 nm. În tabelul 8.6 sunt prezentate valorile acestui parametru, acestea fiind corelate cu valorile TPC şi TFC. În concluzie, variantele de cidru care au furnizat cele mai mari valori TPC şi TFC, au dovedit şi valori mai bune în cazul PPC din cauza tratamentelor aplicate.

Aceste rezultate sunt totuşi în contradictoriu cu teoria conform căreia interactiunea dintre polifenoli şi proteine reprezintă cauza cea mai frecventă pentru turbiditatea prezentă în băuturi. De regulă, procianidinele (flavonoli) sunt considerați principalii contributori la formarea turbidității, însă variantele de cidru cu valori mari ale TFC au demonstrat şi o bună capacitate de precipitare a proteinelor, aceste mecanisme nefiind cercetate.

Tabel 8.6 *Capacitatea de Precipitare a Proteinelor pentru variantele de cidru cu adăugări de extracte şi tratate cu ultrasunete*
(Bădărău şi Brezan, 2020)

	Cod	PPC (A510nm) [1]	±	SD	*Duncan*[2]
Extracte din morcov negru şi	C202	1.033	±	0.074	*b*
	C205	1.404	±	0.054	*a*

tratament cu ultrasunete	C207	1.089	±	0.128	*b*
	C302	1.129	±	0.134	*b*
	C305	1.033	±	0.074	*b*
	C307	1.077	±	0.226	*b*
	C402	0.510	±	0.130	*def*
	C405	0.587	±	0.074	*c-f*
	C407	0.440	±	0.044	*fg*
Extract din afine şi tratament cu ultrasunete	B202	0.677	±	0.038	*cd*
	B205	0.698	±	0.136	*c*
	B207	0.659	±	0.039	*cde*
	B302	0.491	±	0.041	*e-g*
	B305	0.560	±	0.120	*c-f*
	B307	0.246	±	0.083	*h*
	B402	0.326	±	0.058	*gh*
	B405	0.262	±	0.052	*h*
	B407	0.184	±	0.060	*h*
Probe de tip "Control" netratate	M Cider	0.736	±	0.120	*c*
	C	0.959	±	0.039	*b*
	B	0.660	±	0.115	*efg*
LSD 5%0.148		LSD 1%0.199		LSD 0.1%	0.262

[1]Datele se referă la ± SD ale unui nr de 3 experimente (n=3).[2]Valori cu diferite litere diferă semnificativ de testele ANOVA şi Duncan (P<0.05). Abreviaţii: PPC=Capacitatea de Precipitare a Proteinelor

8.5. Capacitatea antioxidantă a variantelor de cidru

Tabelul 8.7 sumarizează capacitatea antioxidantă a variantelor experimentale de cidru , evaluată utilizand testele FRAP, ABTS şi DPPH. După cum reiese din acest tabel, valorile inhibării FRAP, ABTS și DPPH au fost semnificativ diferite între cidrurile testate (p<a0.05). Şi de această dată, cidrului căruia i s-a adaugat morcov negru fiind ulterior tratat cu ultrasunete la o amplitudine de 20% timp de 5 min, i se atribuie şi cele mai mari valori în privința capacității antioxidante exprimată prin toate testele (14.69 ± 0.09 Trolox mmol/L pentru FRAP test, 25.79 ± 0.89 Trolox mmol/L pentru ABTS test, respectiv 65.35 ± 2.59 % pentru inhibarea radicalilor DPPH %). La capătul opus, se află variantele de cidru (cu extracte din afine) tratate la cea mai mare aplitudine şi perioadă de timp (B407), (2,16± 0,18 Troloxmmol/L pentru test FRAP, 5,48 ± 1,75 Trolox mmol/L pentru testul ABTS, respectiv 25,94± 4,309 % pentru inhibarea radicalilor DPH).

Tabel 8.7 *Capacitatea antioxidantă a variantelor experimentale de cidru, îmbogăţite cu extracte şi tratate cu ultrasunete, exprimată prin valori FRAP, ABTS şi inhibrare DPPH% (Bădărău şi Brezan, 2020)*

ID	**FRAP (Trolox mmol/L)**	**±SD**	***Duncan***	**ABTS (Trolox mmol/L)**	**±SD**	***Duncan***	**DPPH %inh**	**±SD**	***Duncan***
C202	11.02	±0.33	*b*	19.13	±0.70	*cd*	61.90	±3.570	*ab*
C205	14.69	±0.09	*a*	25.79	±0.89	*a*	65.35	±2.587	*a*
C207	9.76	±0.09	*d*	10.58	±0.05	*gh*	53.94	±7.377	*b-e*
C302	10.23	±0.34	*c*	17.45	±0.93	*e*	55.44	±6.648	*a-d*
C305	7.75	±0.18	*f*	21.57	±1.06	*b*	59.28	±1.108	*a-c*
C307	4.02	±0.23	*ij*	15.84	±1.13	*e*	43.43	±5.561	*efgh*

C402	3.10	±0.12	*m*	9.57	±0.58	*gh*	46.41	±2.453	*d-g*
C405	3.37	±0.19	*lm*	7.60	±0.89	*i*	44.99	±5.685	*d-g*
C407	2.51	±0.09	*n*	7.40	±0.49	*i*	37.24	±6.416	*fghi*
B202	8.52	±0.23	*e*	13.36	±0.52	*f*	51.10	±8.628	*a-d*
B205	9.44	±0.19	*d*	18.41	±1.48	*cd*	56.29	±2.884	*b-e*
B207	5.63	±0.26	*g*	10.96	±0.82	*gh*	45.34	±3.208	*d-g*
B302	3.80	±0.34	*jk*	7.40	±0.49	*ij*	45.91	±4.309	*d-g*
B305	4.43	±0.23	*hi*	9.09	±0.65	*h*	48.40	±1.398	*c-f*
B307	3.57	±0.04	*kl*	5.80	±0.79	*j*	29.21	±7.221	*ij*
B402	3.16	±0.27	*m*	6.48	±0.60	*ij*	23.67	±5.685	*j*
B405	2.34	±0.07	*n*	7.64	±0.22	*i*	29.50	±4.560	*ij*
B407	2.16	±0.18	*n*	5.48	±1.75	*j*	25.94	±4.309	*j*
M	3.28	±0.10	*lm*	6.60	±0.32	*ij*	26.58	±8.805	*ij*
C	5.91	±0.16	*g*	14.88	±0.84	*e*	46.23	±3.375	*d-g*
B	4.31	±0.14	*hi*	9.57	±0.58	*gh*	36.60	±1.303	*ghi*
LSD 5%		0.345		1.431			8.542		

[1]Datele se referă la ± SD ale unui nr de 3 experimente (n=3).[2]Valori cu diferite litere diferă semnificativ de testele ANOVA şi Duncan (P<0.05). Abreviaţii: (DPPH= Diphenyl picrylhydrazyl, FRAP = Ferric Reducing Antioxidant Power, ABTS = 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)).

Studiile noastre denotă valori mai mari ale capacității antioxidante raportate de către Picinelli (2009). Comparativ cu alte băuturi alcoolice şi nealcoolice, puterea antioxidantă a multora dintre aceste variante de cidru, a fost semnificativ mai mare.

În studiul de fată, valorile TPC şi TFC au fost corelate cu activitatea antioxidantă, estimată utilizând testele FRAP, ABTS și inhibarea DPPH%. Cea mai mică valoare a coeficientului de corelaţie (r2) a fost obţinută în cazul DPPH. Studiul nostru arată că valorile testului FRAP au fost corelate cu valorile TFC (r2 = 0.873). În toate cazurile, cele mai bune corelaţii au fost identificarea în cazul valorilor TFC, comparativ cu TPC (vezi tabel 8.9).

Tabel 8.9 *Coeficienţii de corelaţie Pearson pentru interacţiunea TPC, TFC, PPC şi capacitatea antioxidantă a variantelor de cidru (exprimate de testele ABTS, FRAP şi valorile de inhibare DPPH%)*
(Bădărău şi Brezan, 2020)

	TFC (mg QE/L)	**FRAP (Troloxmmol/L)**	**ABTS (Troloxmmol/L)**	**DPPH (% inhibare)**	**PPC (A 510nm)**
TPC (mg GAE/L)	0.795**	0.798**	0.766**	0.746**	0.759**
TFC (mg QE/L)		0.934**	0.795**	0.753**	0.763**
FRAP (Trolox mmol/L)			0.849**	0.787**	0.817**
ABTS (Trolox mmol/L)				0.778**	0.839**
DPPH (% inhibare)					0.776**
Sig. (2-tailed)	.000	.000	.000	.000	.000
N	54	54	54	54	54
**Corelaţia este semnificativă la nivel de 0.01(2-tailed)					

Privind testul DPPH, % de inhibare radicală DPPH de către antioxidanți, a fost atribuit capacității acestora de a dona hidrogenul. În figura 8.2 sunt evidențiate activitățile de scavenging pentru radicalii DPPH, inhibarea radicalilor liberi DPPH crescând de la 37,24 ± 6,416 % la 65,9 ± 2,587 % pentru cidru îmbogăţit cu extracte de morcovi negri şi de la 25,94 ± 4,309 % la 56,29 ± 2,884 % pentru variantele cu extracte de afine (Woinaroschy, Bădărău şi Brezan, 2020).

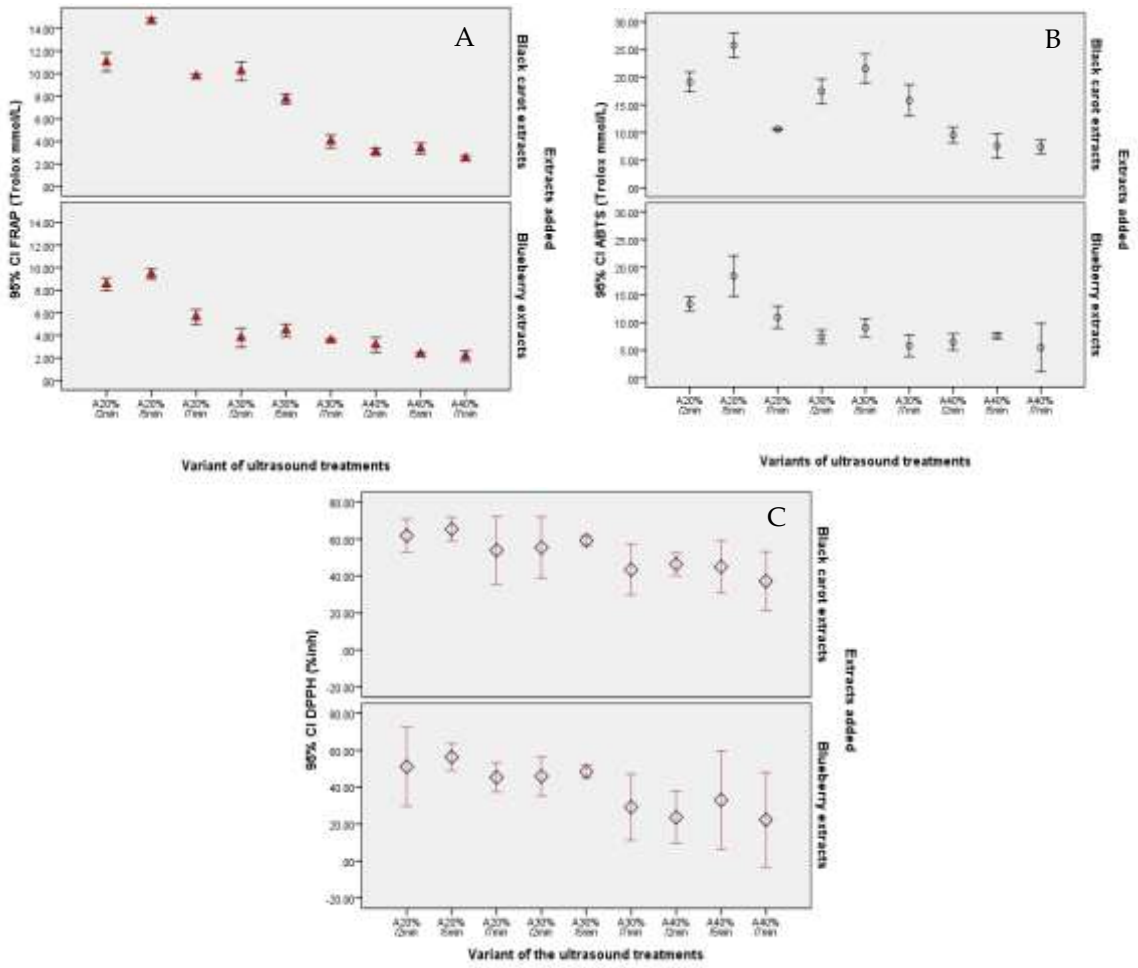


Fig.8.2 *Efectele tratamentului cu ultrasunete şi adăugării de extracte (pentru obţinerea cidrului bogat în antioxidanţi) pe rezultatele testului FRAP (Troloxmmol/L) (A), rezultatele testului ABTS (Troloxmmol/L) (B), respectiv asupra inhibării DPPH % (C) pentru variantele de cidru obţinute*

După cum se arată în Figura 8.2 A & B, condiţiile de ultrasonare pentru cidrul cu extracte adăugate a avut o influenţă semnificativă a activităţii antioxidante testate prin FRAP şi ABTS.

Rezultate bune ale capacității antioxidante, s-au dovedit folosind o amplitudine mai mică (în cazul nostru A 20%) și o perioadă de timp de 5 minute aplicabilitate, lucru ce se datorează probabil sensibilității ridicate a compușilor de tip polifenol la amplitudinile mai ridicate ale ultrasunetelor (Woinaroschy și Brezan, 2020). Observația este aliniată cu niște constatări anterioare făcute de Nayak și Rastogi (2011), aceștia demonstrand că o amplitudine de 10...14% a fost optimă pentru îmbunătățirea activității antioxidante, concluziile conducand la a merge mai departe în experimente noastre pentru optimizarea procesului.

CAPITOLUL 9
CONCLUZII GENERALE ŞI DESCHIDERI ALE TEZEI DE DOCTORAT

9.1. Concluzii generale

Teza de doctorat intitulată **„ Îmbunătățirea calității cidrului cu ajutorul agenților antioxidanți naturali "** reprezintă rezultatul unor cercetări proprii efectuate atât în cadrul Universităţii Politehnica Bucureşti, Facultatea de Chimie Aplicată şi Ştiinţa Materialelor, Catedra de Inginerie Chimică şi Biochimică, cat şi in cadrul Institutului Naţional de Cercetare Dezvoltare pentru Cartof şi Sfeclă de Zahăr – INCDCSZ Braşov

Studiile ce sunt prezentate au vizat valorificarea unor surse vegetale bogate în antioxidanți prin încorporarea acestora cidrului, sub forma extractelor lichide obținute în laborator, şi efectele asupra îmbunătățirii conținutului în polifenoli şi flavonoide. Pentru desfăşurarea experimentelor, s-a procedat şi la implicarea ultrasunetelor, cu implicații în creşterea conținutului în astfel de compuşi în variantele de cidru testate.

În vederea atingerii obiectivului principal al lucrării, şi anume acela de a aduce contribuții originale privind îmbogățirea cidrului cu compuşi de tip antioxidant de natură exogena, în sensul îmbunătățirii calității acestuia, lucrarea fructifică şi utilizarea ultrasunetelor, ce pot fi utilizate la scară largă în industria alimentară, aducand un plus de valoare cercetărilor întreprinse.

Din aceste considerente, a fost necesară trasarea unor obiective secundare în vederea îndeplinirii obiectivului principal al lucrării, si anume:

- studiu asupra datelor existente în literatura de specialitate privind accepțiunea termenului de cidru, particularități ale materiei prime, tehnologii de obținere etc.,
- stabilirea paşilor pentru obținerea cidrului în condiții de laborator, concretizați într-o diagramă de flux tehnologic,
- cercetări asupra utilizării ultrasunetelor în domeniul alimentar, cu referire directă către cidru,
- obținerea unor extracte lichide în condiții de laborator, pe diverse medii şi din diferite surse vegetale (afine, zmeură, mure respectiv flori de H. Sabdariffa) bogate în antioxidanți,
- prioritizarea obținerii şi testării unor extracte (afine, respectiv morcov negru), cu adăugare ulterioară cidrului, pe baza rezultatelor inițiale,
- valorificarea utilizării ultrasunetelor la diverse amplitudini, în vederea creşterii valorilor TPC şi TFC din variantele de cidru testate,
- realizarea unei analize statistice a rezultatelor obținute pe această temă.

În urma cercetărilor experimentale, au fost evidențiate atât nivelul de polifenoli totali şi cât şi conținutul de flavonoide, corelat cu capacitatea antioxidantă (testare FRAP, ABTS şi DPPH) pentru mai multe variante de cidru îmbogățite prin adăugarea de extract din morcov negru, respectiv afine, şi tratate ulterior prin ultrasonare. S-au evidențiat în acest fel şi implicațiile ultrasunetelor în creşterea conținutului în astfel de compuşi.

Evaluarea impactului ultrasunetelor asupra compuşilor de tip antioxidant, s-a facut prin utilizarea acestora la diferite amplitudini şi de fiecare dată alți timpi de aplicare probelor ultrasonate. Compuşii vizați, au fost detectați în cantitate semnificativă în variantele tratate folosind o frecvență de 20 kHz, la o amplitudine de 20% şi pentru o perioadă de aplicabilitate de 5 minute în cazul tuturor determinărilor.

Lucrarea încorporează şi efectele secundare ale utilizării ultrasunetelor (cum ar fi influente asupra temperaturii probelor), dorind sa fie un studiu cât mai complex. Tocmai din aceast motiv, sunt relevate implicit activitatea antioxidantă a probelor ultrasonate.

9.2. Deschideri ale tezei de doctorat

Studiile realizate denotă valoare de cercetare fundamentală şi de asemenea aplicativă, rezultatele obținute in urma cercetărilor experimentale putand constitui elemente de referință pentru potențiale utilizări ale surselor vegetale menționate, în consolidarea accepțiunii de aliment funcțional în cazul mulor produse alimentare şi nu doar a cidrului.

Modul de abordare, nu doar că a permis atingerea mai multor subpuncte, ci a şi convins asupra unor deschidere în domeniul obținerii şi utilizării unor astfel de extracte lichide, bogate în compuşi antioxidanți. Aici putem enumera printre cele mai importante, testarea puterii antioxidante a pigmenților antocianici din sursele vegetale utilizate cât şi influența solventului asupra conținutului extras din aceste surse, alături de aplicarea ultrasunetelor la diferite amplitudini, pentru creşterea conținutului în antioxidanți şi efectele secundare ce rezultă din aceasta.

LUCRĂRI ŞTIINŢIFICE ELABORATE PE PARCURSUL STAGIULUI DE DOCTORAT

Pe parcursul stagiului doctoral, rezultatele cercetărilor științifice au fost publicate în reviste de specialitate și exprimate în cadrul unor comunicări de lucrări științifice după cum urmează:

A. Articole în reviste indexate ISI:

1. Effects of blueberry and black carrot extracts addition on antioxidant properties and protein-precipitating capacity of ultrasound-treated cider, Boris Brezan, Carmen Bădărău, Alexandru Woinaroschy, **Processes, 2020, 8, 812; doi:10.3390/pr8070812 - 10 July 2020 , ISI Factor de impact: 2,753;**
2. Effects of ultrasound treatments on antioxidant content of cider, enriched previously with natural extracts, Boris Brezan, Carmen Bădărău, Aleandru Woinaroschy, Vasile Padureanu, **Revista de Chimie, 2020, 71(4), 263-268, ISI Factor de impact: 1,755. (Articol trimis in data 10.11.2019)**
3. The total content of polyphenols and flavonoids of some plants extracts, as potential additions for cider obtaining, Alexandru Woinaroschy, Carmen Bădărău, Boris Brezan, **U.P.B. Sci. Bull., Series B, 81, 4, 23-30, 2019.**

B. Conferinţe Internaţionale:

1. Usage of ultrasound treatment in case of experimental variants of cider, 21th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering – RICCCE 2019, Constanta 4-7 Septembrie 2019, Boris Brezan, Alexandru Woinaroschy, Carmen Bădărău.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

[1] ***Consumption of alcoholic beverages, accesat noiembrie 2019 la adresa [http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol96/mono96-6A.pdf]

[2] Andrew G., Jarvis B., Lea H., ´´*Sulphite binding in ciders* ´´ , International Journal of Food Science and Technology 2000, 35, pg. 113-127.

[3] Badarau C. L., Marculescu A., *Biochimia produselor alimentare,* Editura Universitatii din Brasov, 2013

[4] Caso-Garcıa Lourdes M., Javier Moreno, Mangas P., Picinelli A., Suarez B., ´´*Chemical Characterization of Asturian Cider*´´, J. Agric. Food Chem. 2000, 48, pg. 3997-4002.

[5] Davenport B., Dobson A.D.W., Morrissey W.F., Quero A., ´´*The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations*´´, Journal of Applied Microbiology 2004, 97, pg. 647–655.

[6] Heikefelt C., *Chemical and sensory analyses of juice, cider and vinegar produced from different apple cultivars,* Faculty of Landscape Planning, Horticulture and Agricultural Sciences Department of Plant reeding and Biotechnology, Alnarp, 2011

[7] Jarvis B., *Chemistry and Microbiology of Cidermaking* ,Cider (Cyder; Hard Cider), Ross Biosciences Ltd, Ross-on-Wye, UK, Copyright 2003, Elsevier Science Ltd.

[8] Jarvis B., *The Product and its Manufacture*, (Cyder; Hard Cider), Ross Biosciences Ltd, Ross-on-Wye, UK, Copyright 1999, London, Academic Press.

[9] Johansen K., *Cider Production in England and France – and Denmark?*, *Danbrew Ltd. A/S*, pg. 2-8, accesat noiembrie 2012 la adresa [http://www.pomona.dk].

[10] Joslyn M. A. ,Tresler D., *Fruit and Vegetable Juice- Processing Technology*, The Avi publisher Company, Inc. 1961

[11] *Manning D., Cider - Making On The Farm* by the County Horticultural Superintendent, Devon County Agricultural Committee, Bulletin No. 2. , [http://www.cider.org.uk/farm.htm], accesat noiembrie 2012.

[12] MSU Product Center for Agriculture and Natural Resources, *Cider Making From traditional to modern,* Michigan Apple Committee, [http://productcenter.msu.edu/uploads/files/makecider.pdf], accesat noiembrie 2012

[13] NACM(10th Revision, January 2008), *Code of Practice for Cider & Perry*, The National Association of Cider Makers, [http://www.cidersfuture.com/assets/CODE-OF-PRACTICE-10th-Edition-Jan-08.pd], accesat noiembrie 2012.

[14] Radu I. F., *Tratat de tehnologia fructelor si legumelor Vol 1- Fructele si legumele ca materie prima*, Editura Scrisul Romanesc , Craiova , 1985

[15] Tascon N. F., Suarez Valles B. ., *Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider*, Food Microbiology 24 (2007) pg. 25–31.

[16] McGhie, T.K. and Walton, M.C. The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. Molecular Nutrition and Food Research 51: 702713, 2007

[17] Parashar, S., Sharma, H. and Garg, M. Antimicrobial and antioxidant activities of fruits and vegetable peels: A review. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 3(1): 160-164, 2014

[18] K. V. Peter, Handbook of herbs and spices, Volume 2, 2000

[19] http://apjcn.nhri.org.tw/server/info/books-phds/books/foodfacts/html/data/data4i.html

[20] Syed S. H. Rizvi, "Separation, extraction and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries", 2010

[21] Liuqing Yang, Ying Gou, Ting Zhao, Jiangli Zhao, Fang Li, Bingtao Zhang and Xiangyang Wu, Antioxidant capacity of extracts from calyx fruits of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), African Journal of Biotechnology Vol. 11, 28 Februay, 2012

[22] M. Carocho and I. C. F. R. Ferreira, "A Review on Anti-oxidants, Prooxidants and Related Controversy: Natural and synthetic compounds. Screening and Analysis Metho-dologies and Future Perspectives," *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 51, 2013

[23] Adel Abdelrazek Abdelazim Mohdali, M.Sc. from El FayoumEvaluation of some food processing by-products as sources for natural antioxidants, Berlin 2010http://www.gradina.acasa.ro

[24] Jan Pokorny, Nedyalka Yanishlieva and Michael Gordon, Antioxidants in foods, Practical applications, 2001

[25] Akbarirad, H., Gohari Ardabili, A., 3Kazemeini, S. M., and Mousavi Khaneghah, A., An overview on some of important sources of natural antioxidants, 2016