UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE
”POLITEHNICA” BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ DE INGINERIE CHIMICĂ ȘI BIOTEHNOLOGII
DOMENIUL DE DOCTORAT: INGINERIE CHIMICĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

Tehnici neconvenționale utilizate în obținerea suplimentelor alimentare

Unconventional techniques used in obtaining food supplements

Rezumatul tezei

Autor: ing. Cristina Luciana NEGREA (MEREUȚĂ)

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

BUCUREȘTI 2025

Cuprins

OBIECTIVELE ŞI STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT 5
Partea I – STUDIU DE LITERATURĂ .....**Error! Bookmark not defined.**
1. Metodele de extracție ale principiilor bioactive din plante .....**Error! Bookmark not defined.**
1.1. Metode convenționale de obținere a compușilor bioactivi nevolatili ....**Error! Bookmark not defined.**
1.1.1. Macerarea ..... **Error! Bookmark not defined.**
1.1.2. Extracția la reflux și extracția Soxhlet ... **Error! Bookmark not defined.**
1.1.3. Presarea la rece ..... **Error! Bookmark not defined.**
1.2. Metode convenționale de obținere a compușilor bioactivi volatili .....**Error! Bookmark not defined.**
1.2.1 Antrenarea cu abur ..... **Error! Bookmark not defined.**
1.2.2. Hidrodistilarea ..... **Error! Bookmark not defined.**
1.3. Metode neconvenționale de obținere a compușilor nevolatili .....**Error! Bookmark not defined.**
1.3.1 Extracție cu lichide supercritice ..... **Error! Bookmark not defined.**
1.3.2. Extracția cu lichide subcritice ..... **Error! Bookmark not defined.**
1.3.3. Extracția asistată de microunde (MAE) . **Error! Bookmark not defined.**
1.3.4. Extracția asistată de ultrasunete (UAE) . **Error! Bookmark not defined.**
1.3.5. Tehnologia ultrasunetelor combinată cu cea a microundelor.....**Error! Bookmark not defined.**
1.3.6. Concluzii ..... **Error! Bookmark not defined.**
2. Intensificarea proceselor de extracție prin intermediul microundelor și ultrasunetelor
……**Error! Bookmark not defined.**
2.1. Principii ale intensificării proceselor ..... **Error! Bookmark not defined.**
2.1.1 Utilizarea solvenților alternativi ..... **Error! Bookmark not defined.**
2.1.2 Utilizarea resurselor regenerabile ..... **Error! Bookmark not defined.**
2.1.3 Reducerea consumului de energie prin recuperarea acesteia .....**Error! Bookmark not defined.**
2.1.4 Imbunătăţirea operațiilor unitare ..... **Error! Bookmark not defined.**
2.2. Intensificarea proceselor prin tehnologia ultrasunetelor**Error! Bookmark not defined.**
2.2.1 Mecanismul de intensificare la utilizarea ultrasunetelor**Error! Bookmark not defined.**
2.2.2 Metode de aplicare ale ultrasunetelor ..... **Error! Bookmark not defined.**
2.2.3 Forma și dimensiunea reactoarelor ultrasonice**Error! Bookmark not defined.**
2.2.4 Impactul puterii de US asupra procesului .... **Error! Bookmark not defined.**
2.2.5 Impactul frecvenței asupra procesului ..... **Error! Bookmark not defined.**
2.2.6 Impactul intensității ultrasunetelor asupra procesului**Error! Bookmark not defined.**

2.2.7 Parametrii mediului de reacție ..... **Error! Bookmark not defined.**
2.3. Intensificarea proceselor prin tehnologia microundelor**Error! Bookmark not defined.**
2.3.1 Mecanismele de intensificare cu microunde **Error! Bookmark not defined.**
2.3.2 Tipuri de reactoare cu microunde ..... **Error! Bookmark not defined.**
2.3.3 Încălzirea dielectrică cu microunde..... **Error! Bookmark not defined.**
2.3.4 Efecte termice..... **Error! Bookmark not defined.**
2.3.5 Efectele specifice microundelor..... **Error! Bookmark not defined.**
2.3.6 Efecte atermice..... **Error! Bookmark not defined.**
2.4. Tehnologia ultrasunetelor versus tehnologia microundelor**Error! Bookmark not defined.**
3. Prepararea suplimentelor alimentare..... **Error! Bookmark not defined.**
3.1. Introducere..... **Error! Bookmark not defined.**
3.2. Clasificare..... **Error! Bookmark not defined.**
3.3. Complexitatea suplimentelor alimentare..... **Error! Bookmark not defined.**
3.3. Tipuri de formulări a suplimentelor alimentare**Error! Bookmark not defined.**
3.4. Condiționarea suplimentelor alimentare..... **Error! Bookmark not defined.**
3.5. Siguranța și calitatea suplimentelor alimentare**Error! Bookmark not defined.**
3.6. Concluzii..... **Error! Bookmark not defined.**
PARTEA A II A – STUDIUL EXPERIMENTAL ..**Error! Bookmark not defined.**
4. EXTRACȚIA COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN *HEDERA HELIX L.* 6
4.1. Aspecte botanice morfologice și compoziționale ale plantei .....**Error! Bookmark not defined.**
4.2. Fitocompuși din iederă..... **Error! Bookmark not defined.**
4.3. Proprietăți farmaceutice ..... **Error! Bookmark not defined.**
4.3.1 Activitate hemolitică..... **Error! Bookmark not defined.**
4.3.2 Activitate moluscicidă..... **Error! Bookmark not defined.**
4.3.3 Activitate antiinflamatorie ..... **Error! Bookmark not defined.**
4.3.4 Activitate antibacteriană..... **Error! Bookmark not defined.**
4.3.5 Activitate antiparazitară ..... **Error! Bookmark not defined.**
4.3.6 Activitate citotoxică și antitumorală ..... **Error! Bookmark not defined.**
4.3.7 Activitate antifungică..... **Error! Bookmark not defined.**
4.4. Dezvoltarea unor tablete cu eliberare prelungită pe bază de extract de iederă ……**Error! Bookmark not defined.**
5. MATERIALE SI METODE ..... **Error! Bookmark not defined.**
5.1. Materiale utilizate..... **Error! Bookmark not defined.**
5.2. Metode de analiză a extractelor obținute **Error! Bookmark not defined.**
5.2.1. Determinarea conținutului total de saponine**Error! Bookmark not defined.**
5.2.2. Determinarea conținutului total de carbohidrați**Error! Bookmark not defined.**

5.2.3. Determinarea conținutului total de polifenoli**Error! Bookmark not defined.**
5.2.4. Determinarea activității antioxidante prin metoda CUPRAC .....**Error! Bookmark not defined.**
5.2.5. Analiza HPLC-MS/MS a saponinelor principale**Error! Bookmark not defined.**
5.2.6. Analiza statistică a rezultatelor ..... **Error! Bookmark not defined.**
6. EXTRACȚIA ASISTATĂ DE ULTRASUNETE A COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN *HEDERA HELIX* 6
6.1. Proceduri de extractie si echipamentele de extractie 6
6.2. Intensificarea procesului de extractie a compusilor bioactivi din frunzele de iedera cu ajutorul ultrasunetelor 6
6.2.1. Influența puterii ultrasunetelor 6
6.2.2. Influența temperaturii și a timpului de extracție 7
6.2.3. Influența raportului plantă-solvent 8
6.2.4. Influența concentrației de etanol 8
6.2.5. Teste in vitro de biocompatibilitate..... **Error! Bookmark not defined.**
6.3. Concluzii ..... **Error! Bookmark not defined.**
7. EXTRACȚIA ASISTATĂ DE MICROUNDE A COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN FRUNZELE DE *HEDERA HELIX* 9
7.1. Proceduri și echipamente de extractie 9
7.2. Influența tipului de extracție 9
7.3. Influența timpului de extracție 10
7.4. Influența temperaturii de extracție 10
7.5. Influența raportului plantă/solvent 11
7.6. Influența concentrației de etanol 12
7.7. Concluzii..... **Error! Bookmark not defined.**
8. STUDIU COMPARATIV PRIVIND EFICIENȚA EXTRACȚIEI COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN IEDERĂ UTILIZÂND DIFERITE TIPURI DE EXTRACȚIE 13
8.1. Extracții succesive multiple 13
8.2. Influența timpului de extracție 13
8.3. Influența temperaturii..... 14
8.4. Influența concentrației de etanol 15
8.5. Analiza chemometrică PCA 15
8.6. Considerații energetice..... 16
8.7. Activitatea biologică ..... **Error! Bookmark not defined.**
8.8. Concluzii ..... **Error! Bookmark not defined.**
9. EXTRACȚIA COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN FRUNZELE DE *HEDERA HELIX* ÎN SISTEM HIBRID MICROUNDE ȘI ULTRASUNETE 16
9.1. Tehnologia utilizată ..... **Error! Bookmark not defined.**
9.2. Echipamentul de extracție 16
9.3. Interpretarea rezultatelor 17
9.3.1. Extracția saponinelor și a carbohidraților din frunzele de *Hedera helix*..... 17

8.4.2. Extracția polifenolilor și activitatea antioxidantă a acestora obținute din frunzele de *Hedera helix* 17
9.3.3. Analiza componenților principali ..... **Error! Bookmark not defined.**
9.4. Concluzii ..... **Error! Bookmark not defined.**
10. EXTRACȚIA COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN *AZADIRACHTA INDICA* .. 18
10.1. Aspecte botanice morfologice și compoziționale ale plantei neem .....**Error! Bookmark not defined.**
10.1.1. Descrierea plantei ..... **Error! Bookmark not defined.**
10.1.2. Compuși bioactivi ..... **Error! Bookmark not defined.**
10.1.3. Activitatea biologică şi utilizări ..... **Error! Bookmark not defined.**
10.2.1. Procedura de extractie ..... **Error! Bookmark not defined.**
10.2.2. Extracția convențională comparativ cu extracția asistată de ultrasunete **Error! Bookmark not defined.**
10.2.3. Influența timpului de extracție 18
10.2.4. Influența puterii ultrasunetelor 19
10.2.5. Influența raportului plantă/solvent 19
10.2.6. Influența concentrației de solvent 20
10.2.7. Influența temperaturii 21
10.2.8. Analiza componenților principali 22
10.2.9. Concluzii ..... **Error! Bookmark not defined.**
11. CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE DE CERCETARE 22
12. CONTRIBUȚII ORIGINALE .....**Error! Bookmark not defined.**
13. DISEMINAREA REZULTATELOR 24
Bibliografie 25

OBIECTIVELE ŞI STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Obiectivul acestei teze este de a evidenția și de a dezvolta noi metode de obținere a compușilor bioactivi din plante. O gamă variată de ramuri ale industriei prezintă o nevoie acerbă de compuși bioactivi, metodele tradiționale de extracție fiind depășite. Astfel, se va pune accentul pe dezvoltarea și optimizarea metodelor neconvenționale pentru a îmbunătăți procesele de extracție, dar și pentru satisfacerea nevoilor consumatorilor.

Obiectivul general al acestei lucrări este de a optimiza extracția de fitocompuși – saponine, carbohidrați, polifenoli, dar și alți compuși cu activitate antioxidantă - din frunzele de iederă (*Hedera helix*) și de neem (*Azadirachta indica*), urmărindu-se totodată și intensificarea procesului prin tehnici neconvenționale de extracție (extracția asistată de microunde și/sau ultrasunete).

Din obiectivele generale rezultă obiectivele specifice ale acestei lucrări și anume:

❖ Studiul influenței diferiților parametrii pentru selectarea valorilor optime pentru extracția prin tehnici neconvenționale (influența timpului de extracție, a temperaturii, raportul plantă/solvent, concentrația de solvent, influența puterii de ultrasonicare) din frunzele de *Hedera helix* și *Azadirachta indica*;

❖ Determinarea conținutului total de compuși bioactivi din frunzele de *Hedera helix* și *Azadirachta indica*: saponine, carbohidrați, polifenoli, dar și determinarea activității antioxidante;

❖ Influența tipului de extracție asupra conținutului de fitocompuși din plantele studiate (extracția asistată de microunde, extracția asistată de ultrasunete, extracția convențională, extracția asistată de microunde combinată cu ultrasunete);

❖ Evaluarea biocompatibilității *in vitro* a extractelor din frunzele de *Hedera helix;*

❖ Studiul privind citotoxicitatea *in vitro* a extractelor de iederă;

❖ Considerații energetice ale proceselor de extracție;

❖ Analiza statistică a componenților principali din extractele de iederă și neem;

Studiul de literatură din partea I este constituit din primele 3 capitole ale acestei lucrări. În **Capitolul 1** sunt descrise metodele de extracție ale principiilor active din plante. În acest context sunt prezentate atât principiile metodelor convenționale, cât și mecanismele și avantajele metodelor neconvenționale, cele mai cunoscute, dar și utilizate în această lucrare fiind: extracția asistată de microunde, extracția asistată de ultrasunete și tehnologia combinată a celor două metode.

Capitolul 2 conține date din literatură privind intensificarea proceselor de extracție (cu ajutorul ultrasunetelor și microundelor) și principiile de bază ale metodelor de extracție, precum utilizarea solvenților alternativi, a resurselor regenerabile, reducerea consumului de energie, studierea și selectarea parametrilor de extracție optimi.

Capitolul 3 oferă o scurtă introducere asupra complexității suplimentelor alimentare, acestea găsindu-se sub o gamă variată de produse. De asemenea, este prezentată pe scurt importanța condiționării suplimentelor alimentare și ce impact are acest lucru asupra siguranței consumatorului.

Capitolul 4, respectiv **capitolul 9**, cuprind aspectele botanice ale plantelor de interes și anume iedera sau *Hedera helix* și neemul. De asemenea, sunt prezentate proprietățile cele mai notabile, dar și compușii majoritari ai acestora.

Studiul experimental începe de la **capitolul 5**, fiind descrise mai întâi materialele și metodele utilizate pentru procesele de extracție ale compușilor bioactivi, procedurile și echipamentele de extracție, dar și metodele de analiză ale extractelor obținute. Mai departe, se va discuta despre intensificarea procesului de extracție ale compușilor bioactivi din frunzele de iederă cu ajutorul ultrasunetelor și influențele diferiților parametri asupra procesului de extracție.

Capitolul 6 prezintă extracția asistată de microunde a compușilor bioactivi din frunzele de *Hedera helix,* în care s-au studiat aceeași parametri. **Capitolul 7** descrie studiul tehnologiei de extracție asistată de microunde în comparație cu studiul tehnologiei extracției asistată de ultrasunete și impactul asupra conținutului de fitocompuși din iederă, analiza statistică a compoziției extractelor și activitatea biologică.

În **capitolul 8** se prezintă sistemul de extracție hibridă microunde-ultrasunete cu ajutorul căruia s-au putut cuantifica compușii de interes din extractele de iederă: saponinele, carbohidrații, polifenolii, dar și activitatea antioxidantă.

Capitolul 10 descrie extracția compușilor bioactivi din frunzele de neem, în care, două metode de extracție - cea convențională și cea asistată de ultrasunete - sunt comparate. Se urmărește studiul diferiților parametri de extracție precum timpul de extracție, raportul

plantă/solvent, concentrația de etanol, temperatura de extracție, dar și analiza componenților principali.

În final, teza de doctorat prezintă concluziile generale, evidențiind modul în care s-au realizat obiectivele propuse, precum și posibile direcții de dezvoltare în cercetare.

EXTRACȚIA COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN *HEDERA HELIX L.*

6. EXTRACȚIA ASISTATĂ DE ULTRASUNETE A COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN *HEDERA HELIX*

6.1. Proceduri de extractie si echipamentele de extractie

Extracția compușilor bioactivi s-a realizat într-un sistem discontinuu format dintr-un reactor din sticlă cu manta. Pentru menținerea temperaturii la valoarea optimă, s-a recirculat apă între manta si termostat pe toată durata extracțiilor. Aplicarea ultrasunetelor s-a realizat cu o sondă de ultrasunete, Vibracell VCX750. Sonda de ultrasunete s-a introdus în reactorul de extracție, direct în amestec.

6.2. Intensificarea procesului de extractie a compusilor bioactivi din frunzele de iedera cu ajutorul ultrasunetelor

Scopul acestui studiu este de a evalua parametrii de lucru la extracția asistata de ultrasunete a saponinelor din frunzele de *Hedera helix L.* și de a stabili un protocol de extracție pentru principalele hederasaponine extrase.

6.2.1. Influența puterii ultrasunetelor

În **figura 6.2** se prezintă variația TSC în funcție de puterea de sonicare şi de amplitudinea ultrasunetelor, iar în **figura 6.3** sunt prezentate principalele saponine analizate prin HPLC.

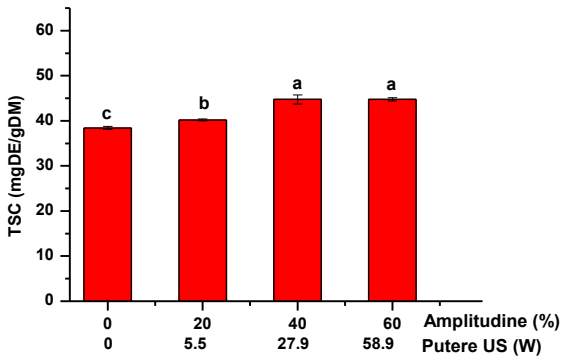


Figura 6.2. Influența puterii de ultrasunete asupra conținutului total de saponine (TSC) din extractele frunzelor de *Hedera helix*

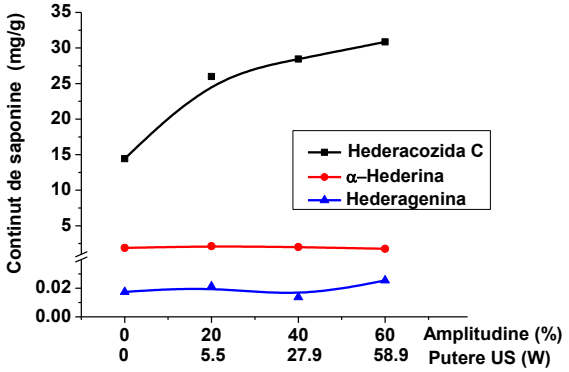


Figura 6.3. Influența puterii de ultrasunete asupra principalelor saponine **(B)** obținute din extractele frunzelor de *Hedera helix*

Așa cum se prezintă în **figura 6.2**, cel mai mic conținut de saponine extras s-a obținut atunci când s-a utilizat metoda convențională (38 mg DE/g DM). La polul opus, cel mai ridicat conţinut de saponine s-a obținut în cazul UAE, la o putere de ultrasonicare de 27.9 W. Pentru a se determina conținutul de saponine din extractele etanolice (hederacozida C, α-hederina și hederagenina) s-a utilizat cromatografia de lichide de înaltă performanță. Așa

cum se observă în **figura 6.3** hederacozida C este extras în cantitatea cea mai mare, urmat fiind de α-hederina.

6.2.2. Influența temperaturii și a timpului de extracție

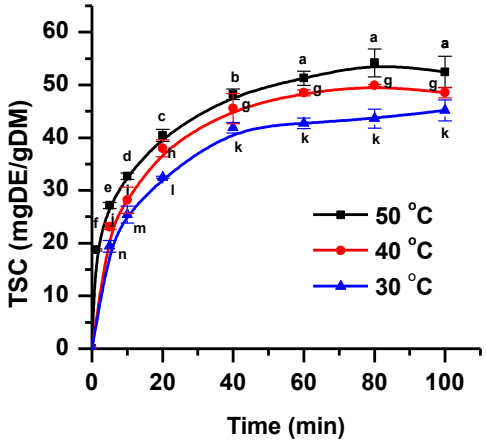


Figura 6.4. Influența timpului de extracție și a temperaturii asupra TSC

În **figura 6.4** se prezintă TSC la diferite temperaturi de extracție: 30, 40 și 50°C. Atunci când se folosesc temperaturi joase, numărul de bule generat este mai mic, însă acestea se sparg violent, crescând transferul de masă dintre materialul vegetal și solvent [1]. Astfel, la o temperatură de 30°C, se obține un conținut maxim de saponine de 42.69 mg DE/g DM.

De asemenea, conținutul de compuși bioactivi a fost supus analizei HPLC. S-au utilizat însă doar extracțiile obținute la 60 min pentru temperaturile date. Rezultate sunt prezentate în **figura 6.5a**. Având în vedere faptul că valorile cele mai mari ale TSC s-au obținut la 50°C, pentru a se dovedi stabilitatea componenților de interes în timp, cele 3 saponine de interes s-au analizat la această temperatură pentru toți timpii de extracție (**figura 6.5b**).

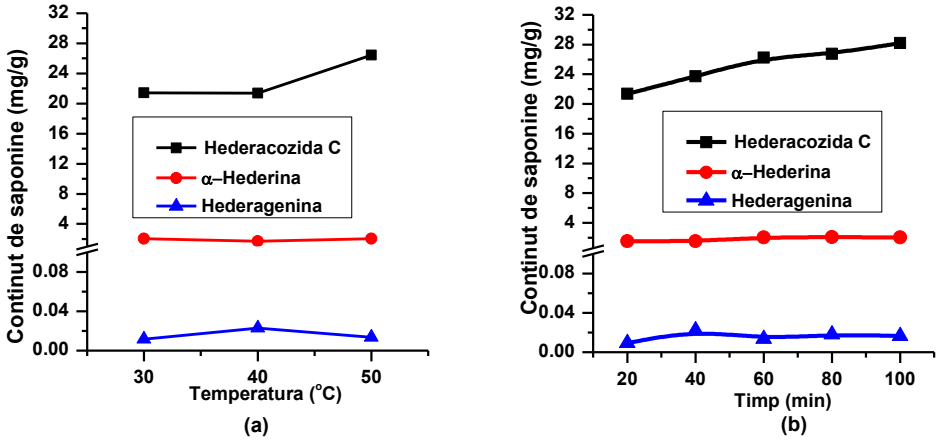


Figura 6.5. Influența temperaturii (a) și a timpului de extracție (b) asupra principalelor saponine din extractele de iederă

6.2.3. Influența raportului plantă-solvent

Un rol fundamental în extracția asistată de ultrasunete a saponinelor este reprezentată de raportul plantă : solvent. Pentru alegerea unui raport planta:solvent optim, s-a realizat

evaluarea variației acestuia de la 1:10 la 1:30 (g/v), celelalte condiții de extracție rămânând constante (**figura 6.6**).

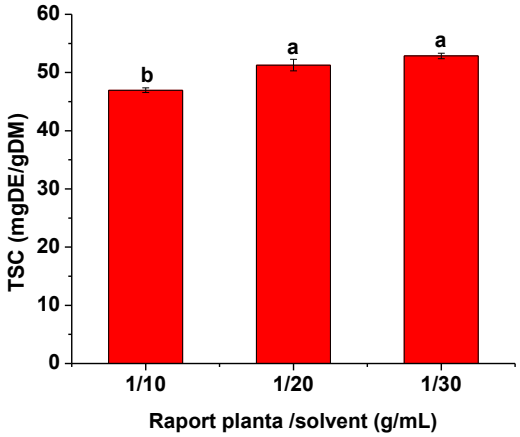


Figura 6.6. Influența raportului planta : solvent asupra TSC

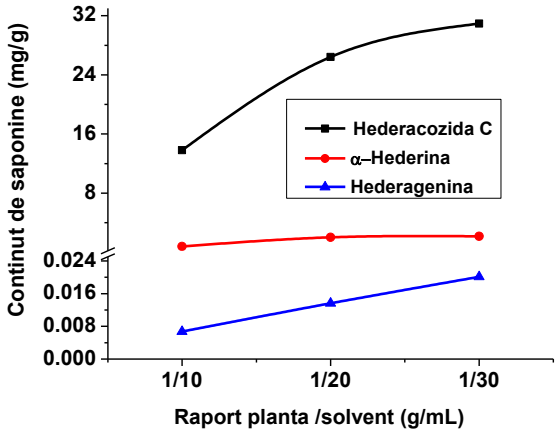


Figura 6.7. Influența raportului planta : solvent asupra saponinelor din extractul de iederă

6.2.4. Influența concentrației de etanol

Un alt parametru semnificativ în extracția saponinelor este alegerea solventului optim, cât și a concentrației acestuia. Așa cum se poate observa în **figura 6.8**, cel mai mare TSC s-a obținut atunci când s-a utilizat o concentrație de etanol de 80% - 56.87 mg DE/g DM. În urma analizei ANOVA s-a remarcat că TSC a crescut semnificativ odată cu mărirea concentrației de etanol de la 20% la 80% ($p<0,05$). În momentul în care materialul vegetal intră în contact cu solventul, acesta îl va înconjura şi are loc un proces lent de umflare [2].

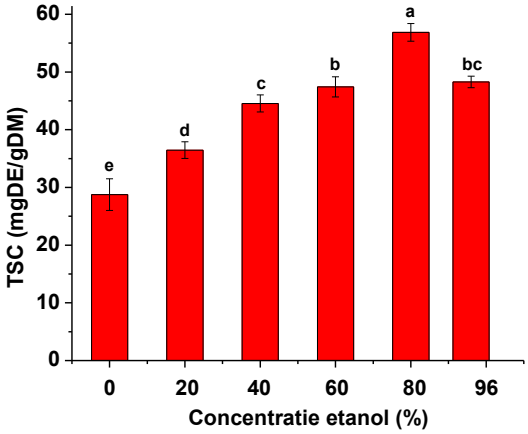


Figura 6.8. Influența concentrației de etanol asupra TSC

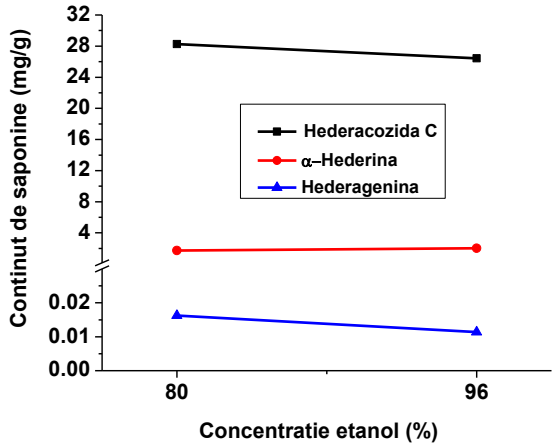


Figura 6.9. Influența concentrației de etanol asupra saponinelor extrase din frunzele de iederă

Extractele obținute la o concentrație a etanolului de 80%, împreună cu cele obținute la o concentrație de 96% au fost analizate prin HPLC. Aceste rezultate sunt prezentate în **figura 6.9**, unde se observă faptul că cel mai mare conținut de hederacozida C s-a obținut la o concentrație de etanol de 80%.

7. EXTRACȚIA ASISTATĂ DE MICROUNDE A COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN FRUNZELE DE *HEDERA HELIX*

7.1. Proceduri și echipamente de extractie

Într-un reactor de extracție cu microunde (Initiator, Biotage, **Figura 7.1A**) se introduce fiola cu un volum de 20 mL ce conține cantitatea corespunzătoare de iederă și de solvent de extracție − alcool etilic de diverse concentrații. Se setează parametrii de extracție: temperatura, timpul, viteza de agitare, durata de preagitare (30 sec), volumul fiolei etc.

5.1. Influența tipului de extracție

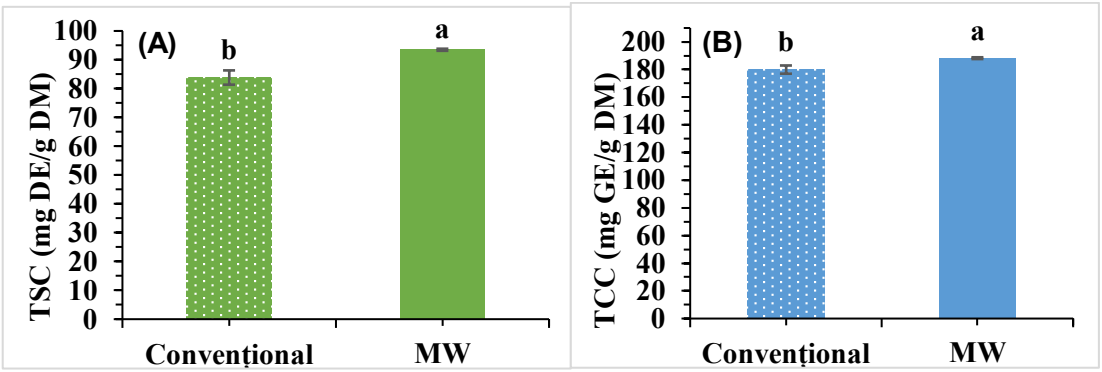


Figura 7.1. Influența tipului de extracție asupra conținutului total de saponine (TSC) **(A)** și a conținutului total de carbohidrați (TCC) **(B)**

Analizând **figurile 7.1. – 7.2.** se poate observa că MAE a condus la rezultate semnificativ mai bune la toate principiile active studiate, dar și în cazul activității antioxidante (ANOVA, $p < 0,05$).

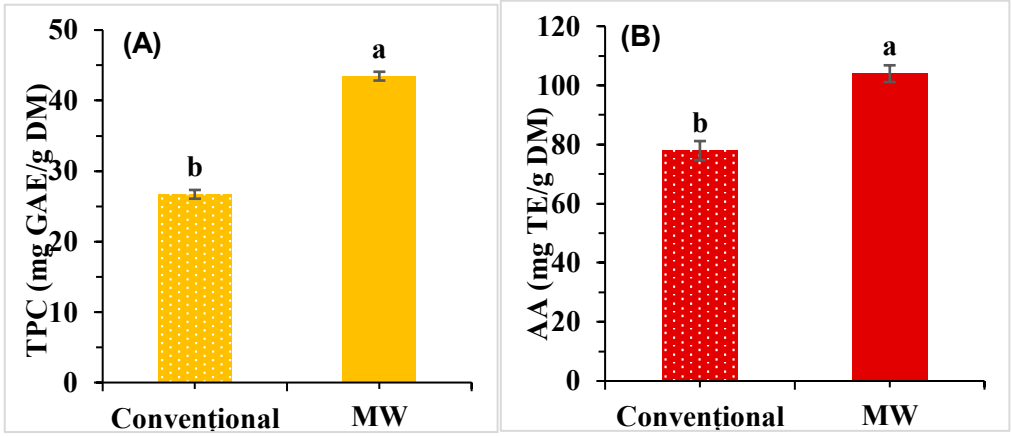


Figura 7.2. Influența tipului de extracție asupra conținutului total de polifenoli (TPC) **(A)** și a activității antioxidante (AA) **(B)**

7.3. Influența timpului de extracție

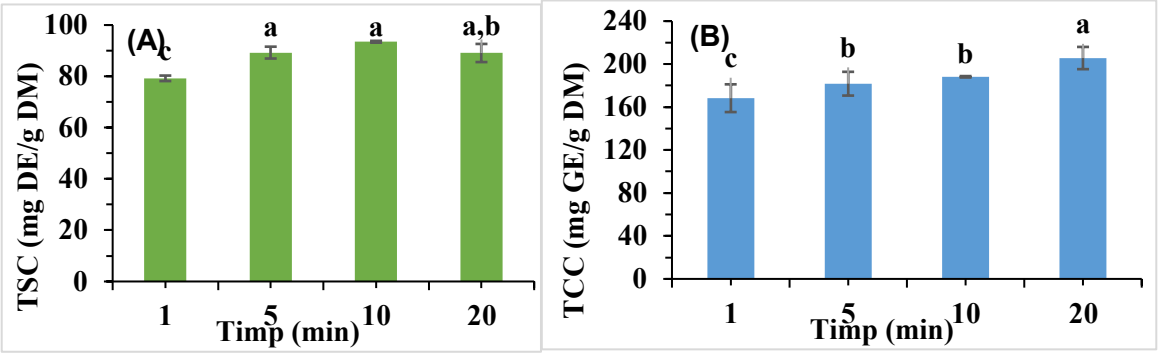


Figura 7.3. Influența timpului asupra conținutului total de saponine (TSC) **(A)** și a conținutului total de carbohidrați (TCC) **(B)**

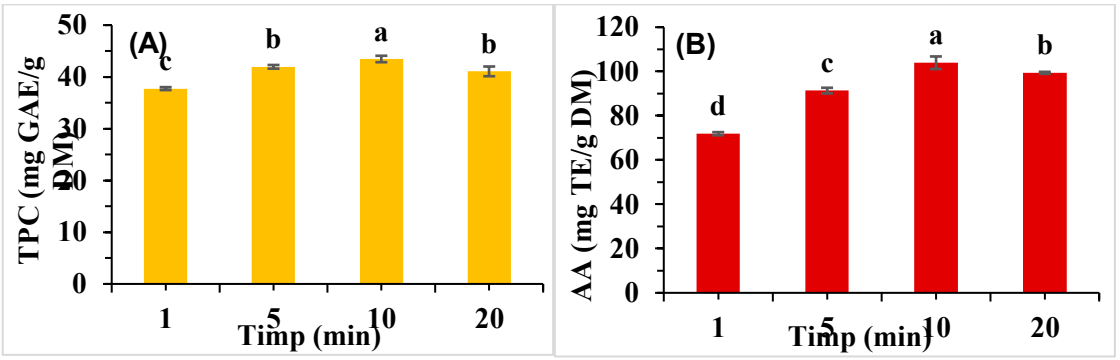


Figura 7.4. Influența timpului asupra conținutului total de polifenoli (TPC) **(A)** și a activității antioxidante (AA) **(B)**

După cum se poate observa, cantitatea de saponine, de polifenoli, respectiv activitatea antioxidantă a extractelor de iederă au crescut semnificativ ($p < 0,05$) în timp atingând valori maxime.

7.4. Influența temperaturii de extracție

Un alt factor cu un impact semnificativ, mai ales în cazul produselor termolabile, este reprezentat de temperatura de extracție [3].

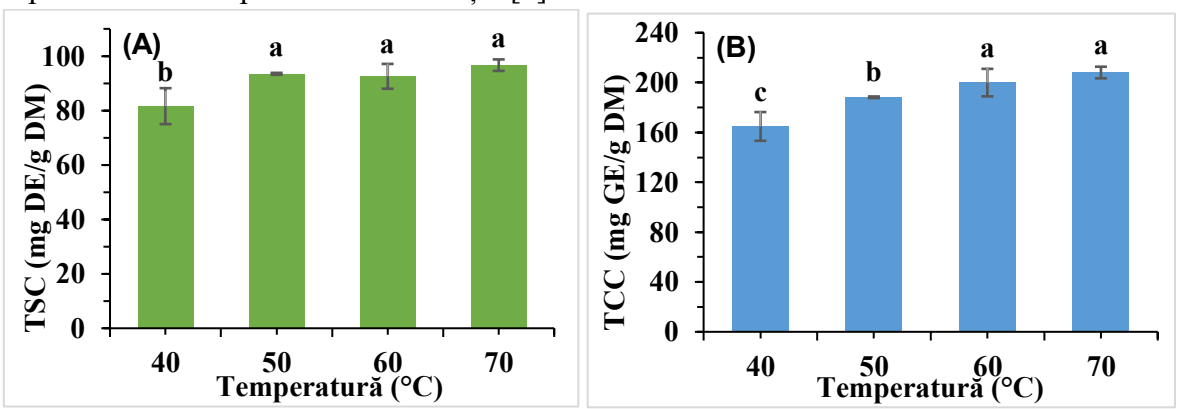


Figura 7.5. Influența temperaturii asupra conținutului total de saponine (TSC) **(A)** și a conținutului total de carbohidrați (TCC) (**B**)

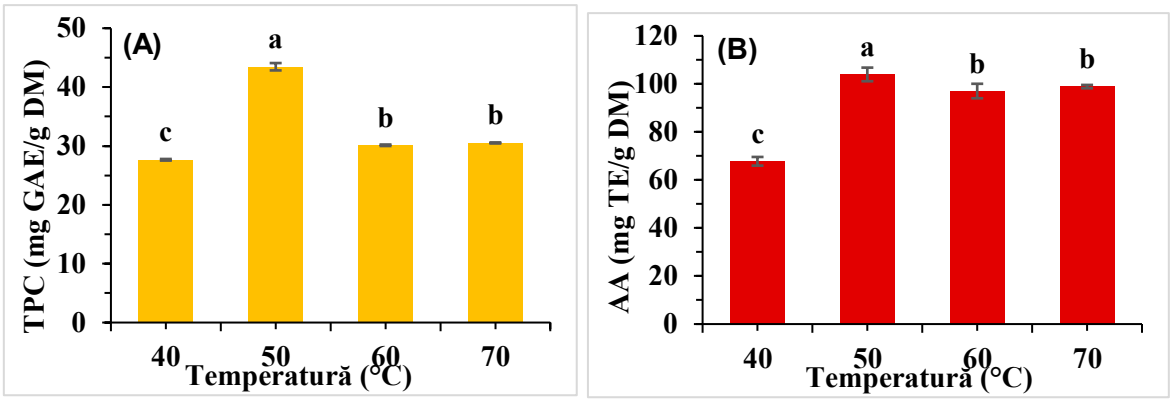


Figura 7.6. Influența temperaturii asupra conținutului total de polifenoli (TPC) **(A)** și a activității antioxidante (AA) **(B)**

Astfel, în **figurile 7.5.-7.6.**, atunci când temperatura este crescută la 70°C se poate observa creșterea conținutului de saponine (cu o ușoară scădere la 60°C) și de carbohidrați până la valorile maxime de 96.66 mg DE/g DM, respectiv 208.05 mg GE/g DM. Cu toate acestea, temperaturile ridicate pot duce la degradarea compușilor chimici și implicit, la scăaderea eficienței extracției. Având în vedere rezultatele obținute asupra compușilor de interes se concluzionează că temperatura optimă de extracție este cea de 50°C.

7.5. Influența raportului plantă/solvent

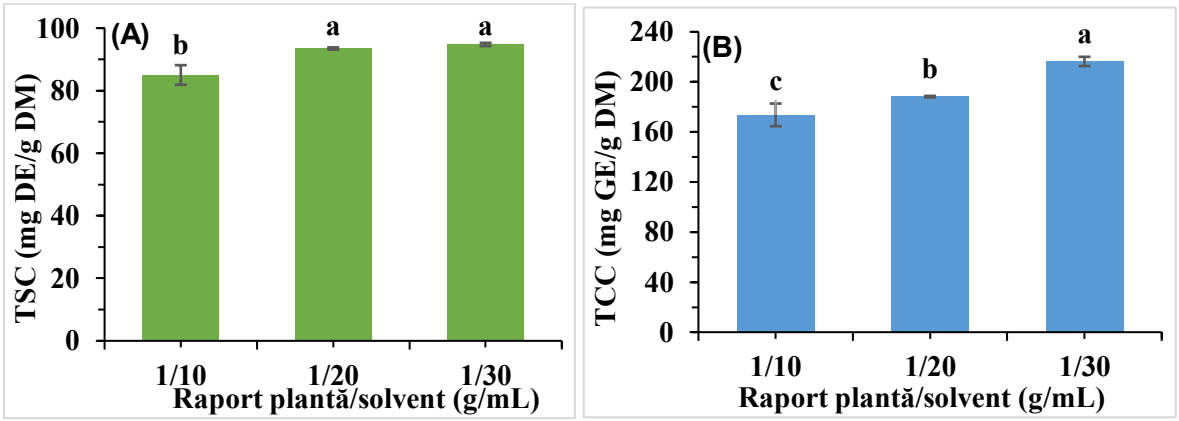


Figura 7.7. Influența raportului planta/solvent asupra conținutului total de saponine (TSC) **(A)** și a conținutului total de carbohidraţi (TCC) **(B)**

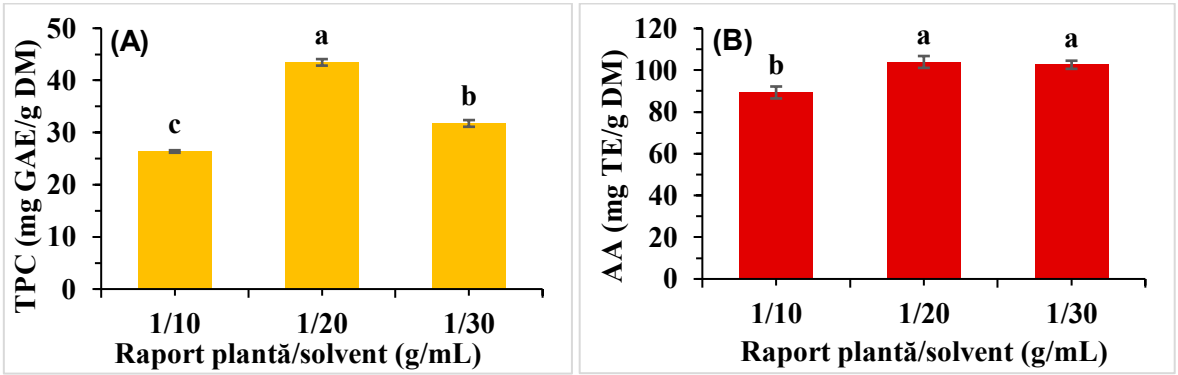


Figura 7.8. Influența raportului planta/solvent asupra conținutului total de polifenoli (TPC) **(A)** și a activității antioxidante (AA) **(B)**

Un alt factor deosebit de important în procedeul de extracție asistată de microunde este raportul plantă/solvent. În general, un volum mai mare de solvent poate dizolva mai eficient componentele active și poate duce la randamente de extracție mai ridicate.

7.6. Influența concentrației de etanol

Etanolul are o toxicitate scăzutăsi este utilizat în cantități mari la extracția compușilor din diferite plante. Pentru îmbunătățirea eficienței extracției asistate de microunde, acesta se folosește în diferite concentrații cu apa (datorită proprietățior dielectrice ridicate) [4].

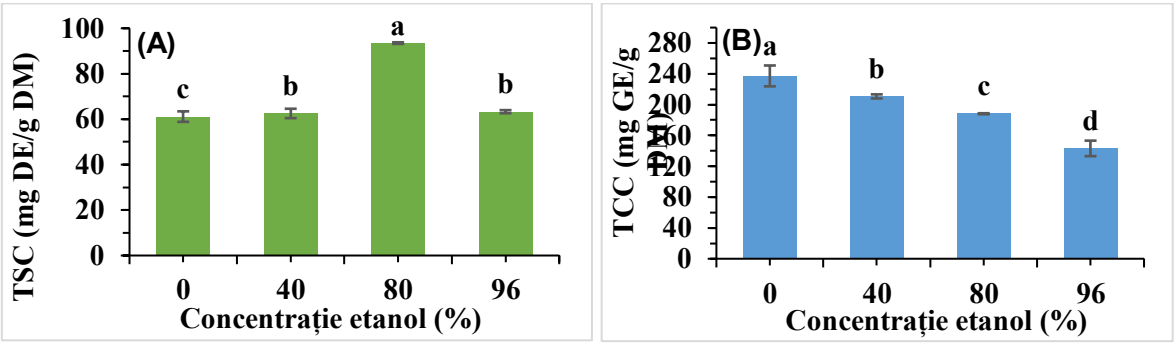


Figura 7.9. Influența concentrației de etanol asupra conținutului total de saponine (TSC) **(A)** și a conținutului total de carbohidrați (TCC) **(B)**

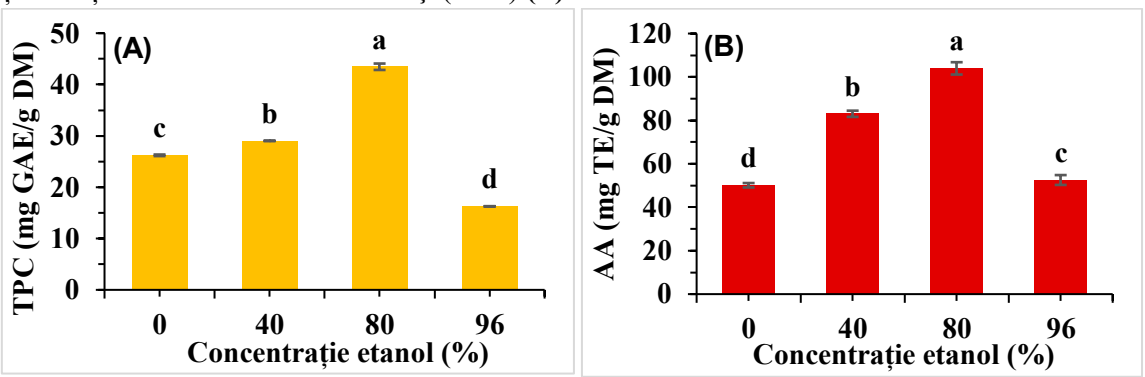


Figura 7.10. Influența concentrației de etanol asupra conținutului total de polifenoli (TPC) **(A)** și a activității antioxidante (AA) **(B)**

Cantitățile totale extrase de saponine, polizaharide și polifenoli, dar și capacitatea antioxidantă au fost raportate la diferite concentrații de etanol. Cele mai mici valori ale cantităților de biocompuși s-au obținut atunci când extracția a avut loc la o concentrație de etanol de 0%, cu excepția carbohidraților, aceștia atingând o valoare maximă.

8. STUDIU COMPARATIV PRIVIND EFICIENȚA EXTRACȚIEI COMPUŞILOR BIOACTIVI DIN IEDERĂ UTILIZÂND DIFERITE TIPURI DE EXTRACȚIE

În continuare, se vor evalua comparativ următoarele metode de extracţie: CHE – metoda de extracție cu încălzire convenţională, UAE – metoda de extracție asistată de ultrasunete şi MAE – metoda de extracție asistată de microunde, cât și parametrii cei mai importanți ai procesului.

8.1. Extracții succesive multiple

Pentru a evalua eficiența extracției compușilor bioactivi sunt necesare mai multe informații cu privire la cantitatea totală de compuşi fitochimici extractibili din frunzele de

iederă [5]. Astfel, s-au efectuat extracții succesive, multiple, discontinue, utilizându-se condițiile cele mai favorabile pentru fiecare metodă de extracție. S-au determinat conținutul total de fitocompuși și activitatea antioxidantă așa cum se prezintă în **figura 8.1.**

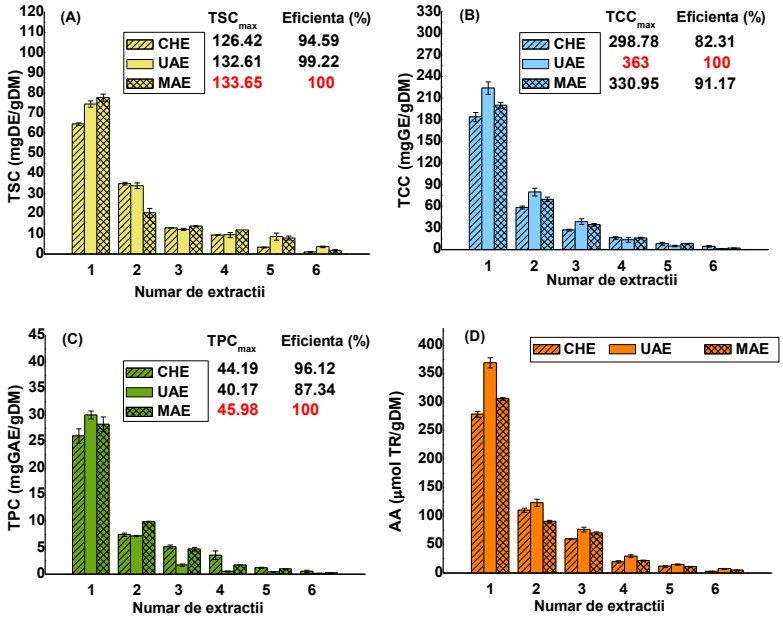


Figura 8.1. Conținutul de fitocompuși rezultat din extracțiile succesive multiple: (**A**) conținutul total de saponine (TSC), (**B**) conținutul total de carbohidrați (TCC), (**C**) conținutul total de polifenoli (TPC) și (**D**) activitatea antioxidantă (AA)

8.2. Influența timpului de extracție

Timpul de extracție reprezintă un parametru important, care influențează cantitatea de compus extras. Această cantitate extrasă crește în timp până când se atinge un echilibru între compușii solubilizați de solvent și cei care nu s-au extras din celulele vegetale. Efectul timpului de extracție asupra conținutului total de compuși bioactivi și a activității antioxidante este prezentat în **figura 8.2**. În fiecare reprezentare grafică s-au introdus valorile maxime de compuși bioactivi obținute la extracția succesivă.

Utilizându-se ANOVA, testele post-hoc Duncan și având în vedere cel mai bun timp de extracție de 10 min, se pot face următoarele observații: conținutul total de saponine și de polifenoli (**figura 8.2A și C**) crește până la un timp de extracție de 10 min, apoi nu se mai observă nicio diferență semnificativă atunci când timpul se prelungește până la 20 min; conținutul total de carbohidrați (**figura 8.2B**) are o creștere semnificativă până la 20 min; activitatea antioxidantă (**figura 8.2D**) este corelată cu conținutul de fitocompuși, iar cea mai mare valoare se obține dupa 10 min.

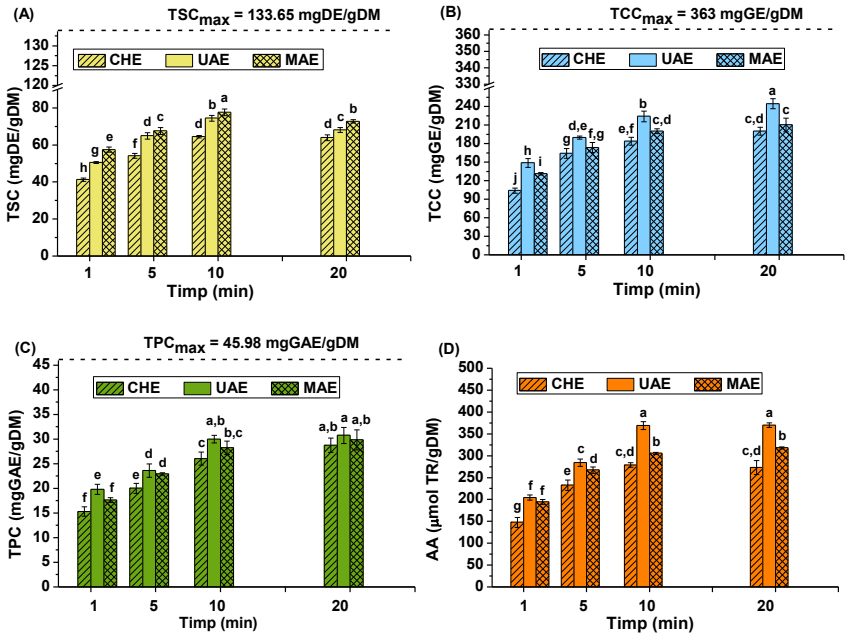


Figura 8.2. Influența timpului de extracție asupra conținutului total de compuși bioactivi: (**A**) conținutul total de saponine (TSC), (**B**) conținutul total de carbohidrați (TCC), (**C**) conținutul total de polifenoli (TPC) și (**D**) activitatea antioxidantă (AA)

8.3. Influența temperaturii

Un alt factor extrem de important este temperatura de extracție. Datorită limitărilor date de metodele neconvenționale, temperaturile de 40 și 50°C au fost alese pentru a evalua acest parametru.

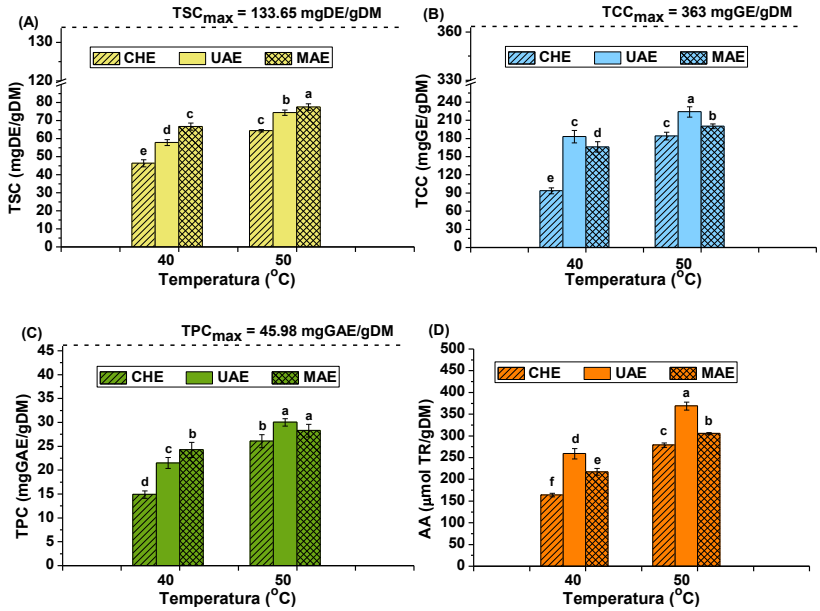


Figura 8.3. Influența temperaturii asupra conținutului total de compuși bioactivi: (**A**) conținutul total de saponine (TSC), (**B**) conținutul total de carbohidrați (TCC), (**C**) conținutul total de polifenoli (TPC) și (**D**) activitatea antioxidantă (AA)

Așa cum arată și **figura 8.3**, temperatura optimă pentru a se obține cea mai mare cantitate de compuși este de 50°C. Creșterea temperaturii duce la o creștere a solubilității

compușilor și mărește viteza de transfer de masă între solvent și materialul vegetal. Eficiența extracției asupra compușilor de interes este mai mare cu 55% față de metoda convențională.

8.4. Influența concentrației de etanol

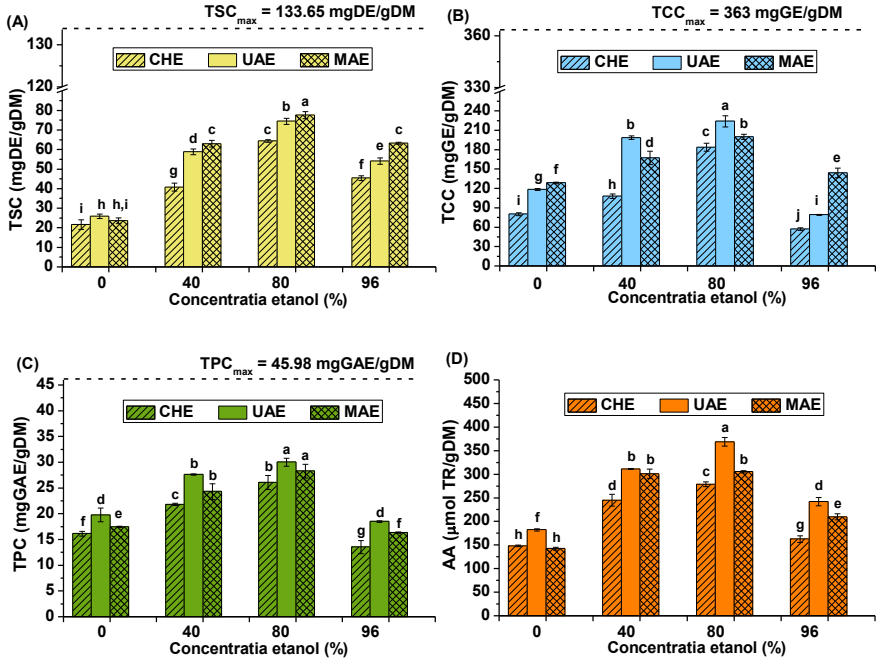


Figura 8.4. Influența concentranției de etanol asupra conținutului total de compuși bioactivi: (**A**) conținutul total de saponine (TSC), (**B**) conținutul total de carbohidrați (TCC), (**C**) conținutul total de polifenoli (TPC) și (**D**) activitatea antioxidantă (AA)

Pentru îmbunătățirea eficienței extracției, etanolul se utilizează în diferite concentrații în apă. În acest studiu, s-au folosit diferite amestecuri de etanol-apă, iar influența acestor amestecuri asupra proceselor, se observă în **figura 8.4**. Conţinutul total de compuși bioactivi în extract crește odată cu creşterea concentrației de etanol, atingând un nivel maxim la o concentraţie de 80% etanol.

8.5. Analiza chemometrică PCA

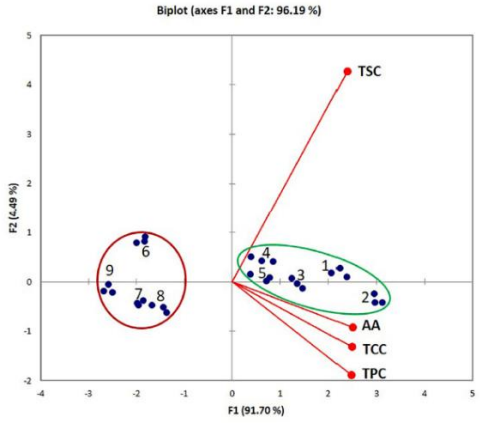


Figura 8.5. Proiecțiile variabilelor (TSC, TCC, TPC, AA) și a metodelor de extracție (1-9) pe axele PC1-PC2.

Analiza chemometrică PCA (analiza componentelor principale) a fost efectuată pentru a studia posibilele corelații între TSC, TCC, TPC, AA și metodele de extracție (CHE,

UAE, şi MAE) a acestora. Compușii bioactivi și activitatea antioxidantă în planul format de primele două componente principale (PC1 și PC2) prezintă 96.11% din variația totală (valori proprii > 1), precum și 91.7% pe prima axă și 4.41% pe a doua axă.

Conform informațiilor din **figura 8.5**., este posibilă corelarea metodelor de extracție și a condițiilor de extracție față de conținutul total de compuși bioactivi și față de activitatea antioxidantă.

8.6. Considerații energetice

Pe durata experimentelor, s-a înregistrat puterea ultrasunetelor și a microundelor. Puterea pentru agitatorul magnetic cu încălzire utilizat în extracția convențională a fost măsurată cu un wattmetru. Aceste puteri înregistrate au fost folosite pentru a determina energia totală introdusă în sisteme [6]. De asemenea, energia specifică a fost calculată folosind ecuația:

$$E_S = \frac{E_{total}}{m_{Phc}} \left[\frac{kJ}{g\ fitocompuși}\right], \qquad (1)$$

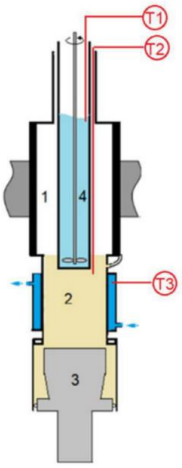
Unde E_s reprezintă energia specifică [kJ/g fitocompus], E_{total} este energia totală introdusă în sistem [kJ] și m_{Phc} reprezintă cantitatea totală de fitocompuși (suma dintre saponine, carbohidrați și polifenoli) obținută în urma fiecărei extracții.

Consumul de energie pentru extracția convențională este cuprinsă între 360 și 378 kJ, iar pentru MAE și UAE de la 7.1 – 9.2 kJ; respectiv 16.2 – 28 kJ. În teorie, cea mai mică energie consumată în extracții ar trebui să se obțină la temperatura de 40°C, atât pentru MAE, cât și pentru UAE, însă, în urma studiilor, s-a demonstrat că cea mai scăzută energie specifică s-a realizat la o temperatură de 50°C, cu o concentrație de etanol de 80%.

9. EXTRACȚIA COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN FRUNZELE DE *HEDERA HELIX* ÎN SISTEM HIBRID MICROUNDE ȘI ULTRASUNETE

9.2. Echipamentul de extracție

Echipamentul hibrid utilizat pentru UMAE a fitocompușilor din *Hedera helix* a fost descris anterior de Călinescu și colab. [7] şi este prezentat schematic în **figura 9.1**.



1 – aplicator cu microunde monomod,
2 – baie ultrasonică termostatată cu fluid de cuplare,
3 – convertor ultrasunete,
4 – reactor de extracție,
T1, T2, T3 – termocupluri.

Figura 9.1. Instalaţie hibridă de extracţie cu ultrasunete şi microunde [7, 8]

Acest sistem încorporează un generator de ultrasunete Bandelin Sonopuls HD 4200 alături de un aplicator monomod pentru microunde Miniflow 200SS.

9.3. Interpretarea rezultatelor

9.3.1. Extracția saponinelor și a carbohidraților din frunzele de *Hedera helix*

Unul dintre parametrii care influențează semnificativ randamentele compușilor de interes este timpul de extracție [9]. În **figurile 9.2**. şi **9.3** sunt prezentate TSC(A) și TCC(B) ale extractelor din frunzele *Hedera helix* obținute cu ajutorul ultrasunetelor, microundelor și cu ajutorul extracţiei hibride.

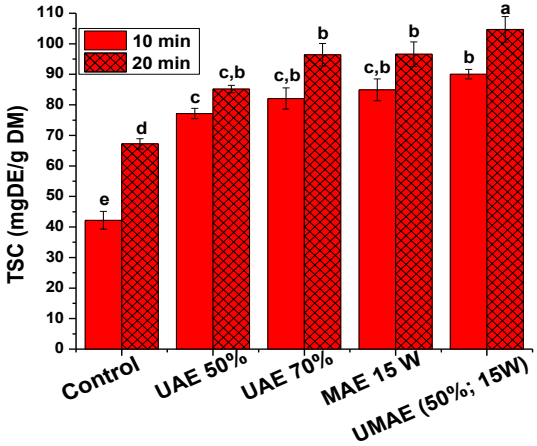


Figura 9.2. Influența metodei de extracție asupra continutului total de saponine (TSC).

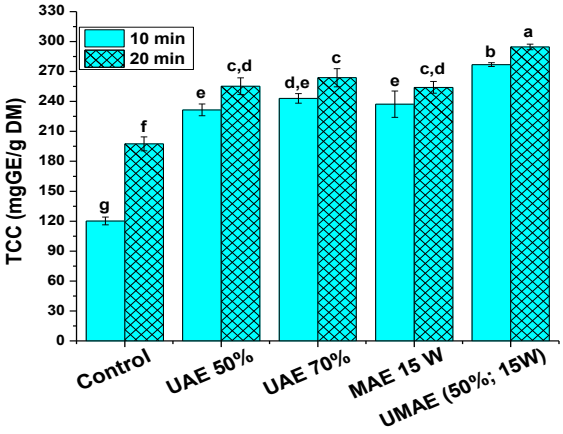


Figura 9.3. Influența metodei de extracție asupra continutului total de carbohidraţi (TCC).

După cum se observă în **figura 9.2**., metoda convențională a produs o cantitate semnificativ mai mică de saponine ($p < 0,05$). La fel ca în cazul extracției saponinelor, folosirea metodei convenționale de extracție a carbohidraților nu este cea mai bună opțiune deoarece, după cum se vede în **figura 9.3**, rezultatele nu sunt favorabile. TCC mai mare s-a obținut atunci când extracțiile au fost efectuate în prezența microundelor și ultrasunetelor.

8.4.2. Extracția polifenolilor și activitatea antioxidantă a acestora obținute din frunzele de *Hedera helix*

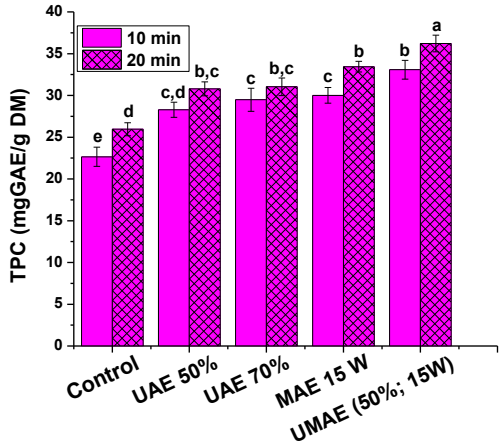


Figura 9.4. Influența metodei de extracție asupra continutului total de polifenoli (TPC).

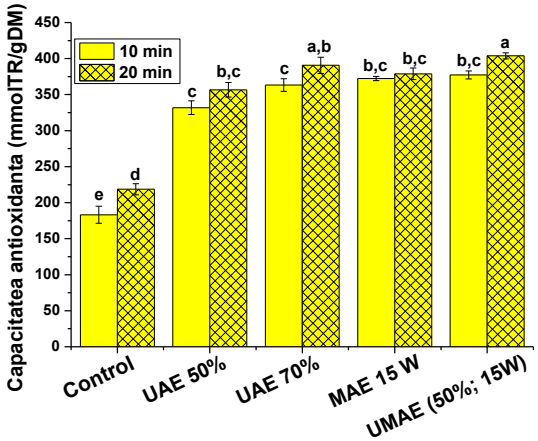


Figura 9.5. Influența metodei de extracție asupra activității antioxidante.

Tehnologia UMAE poate optimiza randamentele de polifenoli și activitatea antioxidantă datorită acțiunii sinergice dintre cavitație și transferul de căldură rapid.

Analiza statistică a indicat faptul că timpul de extracție și tehnicile de extracție au influențat puternic TPC și capacitatea antioxidantă, cu rezultate semnificativ mai mari pentru UMAE ($p < 0,05$). Utilizarea tehnologiei hibride UMAE aduce împreună avantajele tehnologiilor cu ultrasunete și cu microunde: cavitația (indusă de ultrasunete) perturbă peretele celular, în timp ce schimbul rapid de căldură derivat din microunde accelerează transferul de masă [10].

10. EXTRACȚIA COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN *AZADIRACHTA INDICA*

10.2. EXTRACȚIA ASISTATĂ DE ULTRASUNETE A COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN FRUNZELE DE NEEM

10.2.3. Influența timpului de extracție

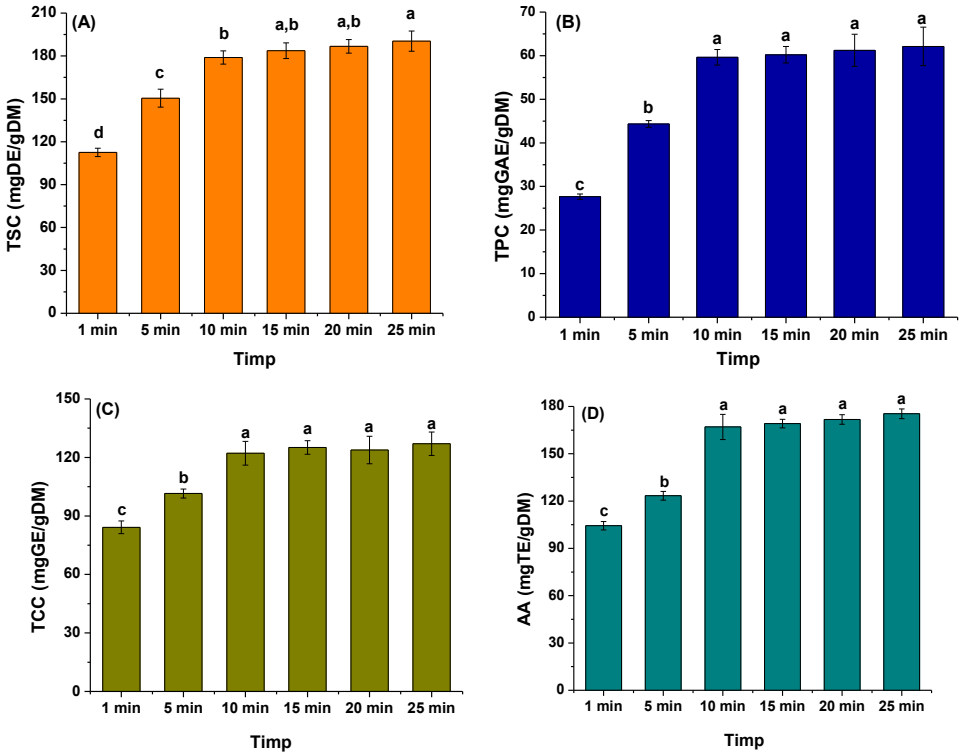


Figura 10.4. Influența timpului de extracție asupra conținutului total de compuși bioactivi: A)TSC, B)TPC, C)TCC și D)AA

Figura 10.4. prezintă rezultatele obținute la diferiți timpi de extracție, în aceleași condiții de extracție. Se poate observa că atât conținutul total de saponine, de polifenoli, dar și activitatea antioxidantă a extractelor de neem a crescut în timp, atingând valori maxime dupa 10 min de extracție: 182.8 mg DE/g DM, 59.6 mg GAE/g DM și 167 mg TE/ g DM; după acest timp de extracție se observă o scădere a compușilor la 15 min.

10.2.4. Influența puterii ultrasunetelor

Un alt parametru deosebit de important este puterea ultrasunetelor, întrucât arată cantitatea de energie, care se consumă efectiv către solvent.

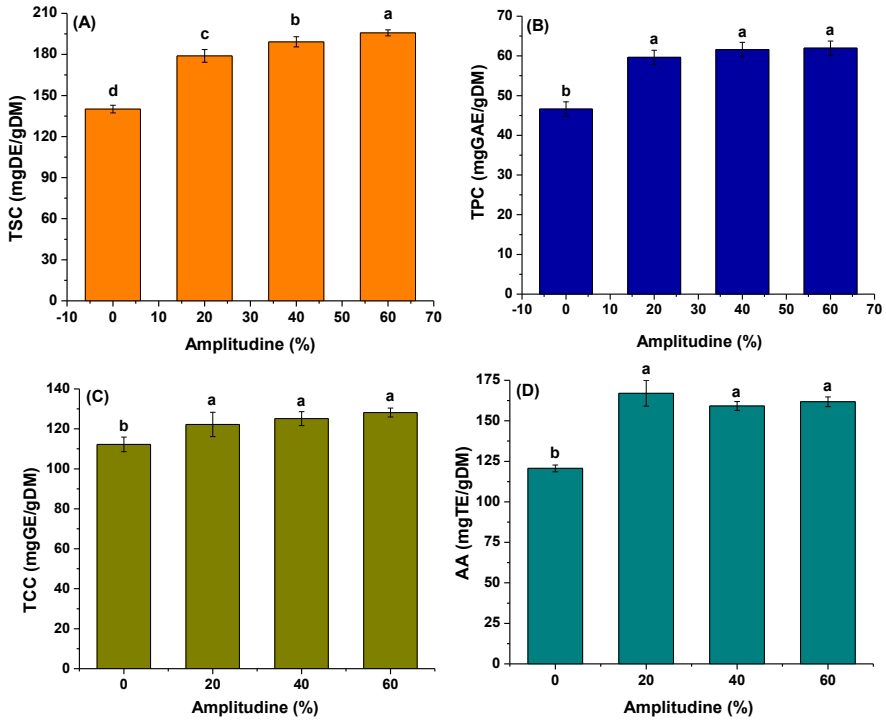
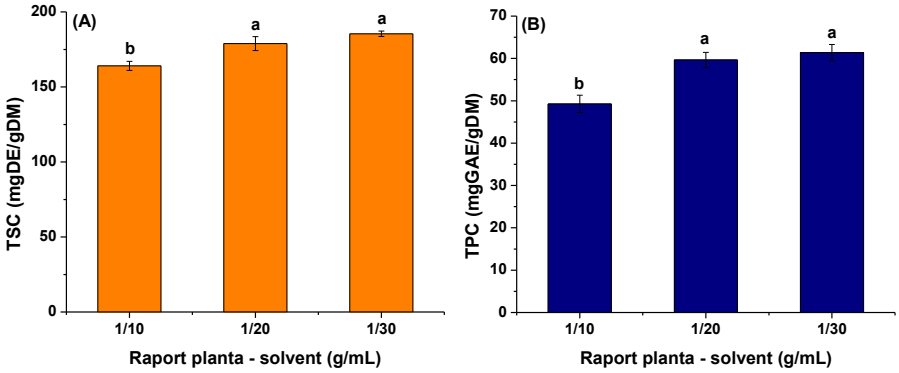


Figura 10.5. Influența amplitudinii asupra conținutului total de compuși bioactivi: A)TSC, B)TPC, C)TCC și D)AA

Din **Figura 10.5** se observă că o amplitudine mai mare a undelor ultrasonice contribuie la formarea unei cantități mai mari de bule de cavitație și astfel, se creează colapsul. Randamentul și extracția saponinelor, polifenolilor şi carbohidraţilor din frunzele de neem a crescut odată cu creșterea amplitudinii ultrasonice în timpul extracției, dar s-a observat că o creştere prea mare a puterii de ultrasunete nu conduce la o mărire semnificativă a conţinutului total de fitocompuşi extraşi.

10.2.5. Influența raportului plantă/solvent

Un alt parametru analizat în extracțiile asistate de ultrasunete este raportul plantă/solvent. În procesele industriale, este esențial să se maximizeze randamentul de extracție și să se reducă consumul de solvent de extracție; raportul plantă/solvent jucând un rol deosebit în procesul de extracție.



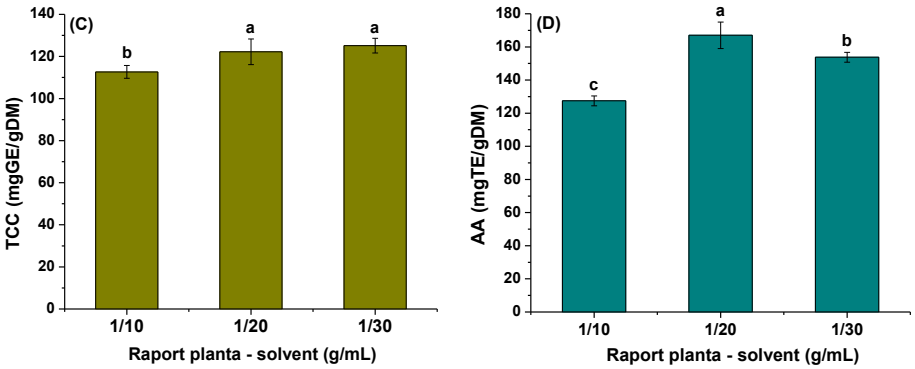


Figura 10.6. Influența raportului plantă/solvent asupra conținutului total de compuși bioactivi: A)TSC, B)TPC, C)TCC și D)AA

Rezultatele reprezentate grafic în **figura 10.6.** demonstrează că la un raport plantă/solvent de 1/10 s-au obținut valori semnificativ mai mici ($p < 0,05$) ale tuturor parametrilor analizați deoarece materialul vegetal este mult prea concentrat, iar ultrasunetele nu sunt suficient de bine adsorbite de matricea organică.

10.2.6. Influența concentrației de solvent

Datorită toxicității sale scăzute, etanolul a fost utilizat pe scară largă în extracția compușilor bioactivi din plante. În extracția asistată de ultrasunete, etanolul este utilizat în diferite concentrații în apă pentru a se îmbunătăți eficiența extracției. Apa este un bun co-solvent în extracția asistată de ultrasunete datorită proprietății sale dielectrice ridicate. **Figura 10.7** ilustrează influența concentrației de etanol asupra cantităților extrase de saponine, carbohidrați, polifenoli, dar și a capacității antioxidante.

După cum se poate observa, la o concentrație de EtOH de 0% s-a obținut un conținut total de saponine de 125.6 mg DE/g DM, un conținut total de polifenoli de 15.8 mg GAE/g DM și 85.4 mg TE/g DM pentru activitatea antioxidantă. Creșterea ulterioară a concentrației la 25% a dus la o ușoară creștere a conținutului de compuși, valorile maxime fiind înregistrate la o concentrație de 50% EtOH – 182.2 mg DE/g DM pentru saponine, 59.6 mg GAE/g DM pentru polifenoli și 167 mg TE/g DM pentru activitatea antioxidantă. La o concentrație de 75% se observă o scădere semnificativă, de unde rezultă concentrația optimă a etanolului în procesul de extracție este de 50%.

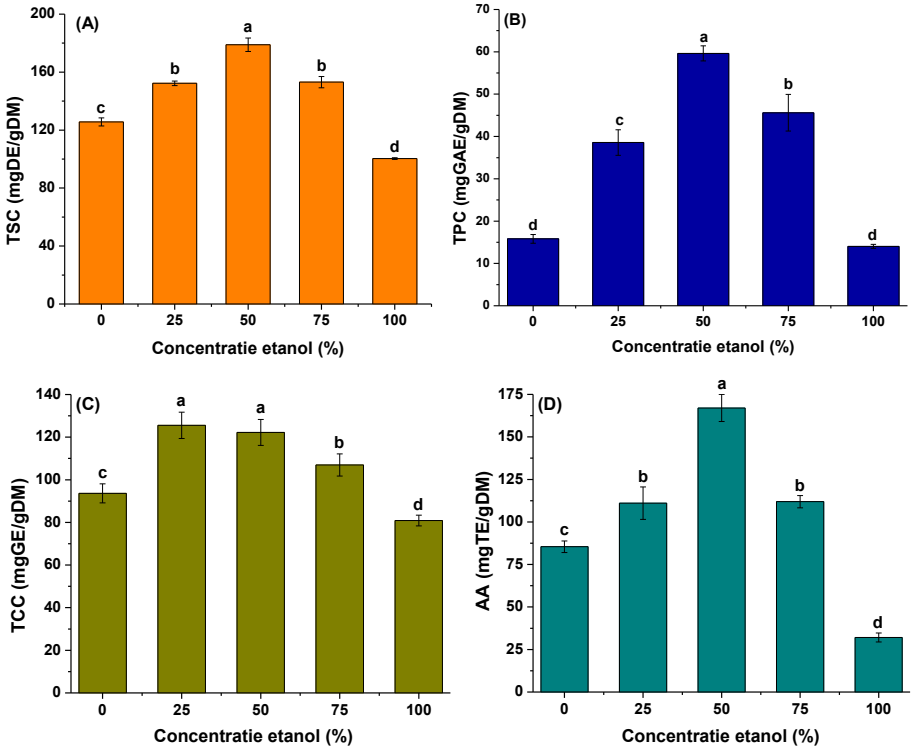


Figura 10.7. Influența concentrației de solvent asupra conținutului total de compuși bioactivi: A)TSC, B)TPC, C)TCC și D)AA

10.2.7. Influența temperaturii

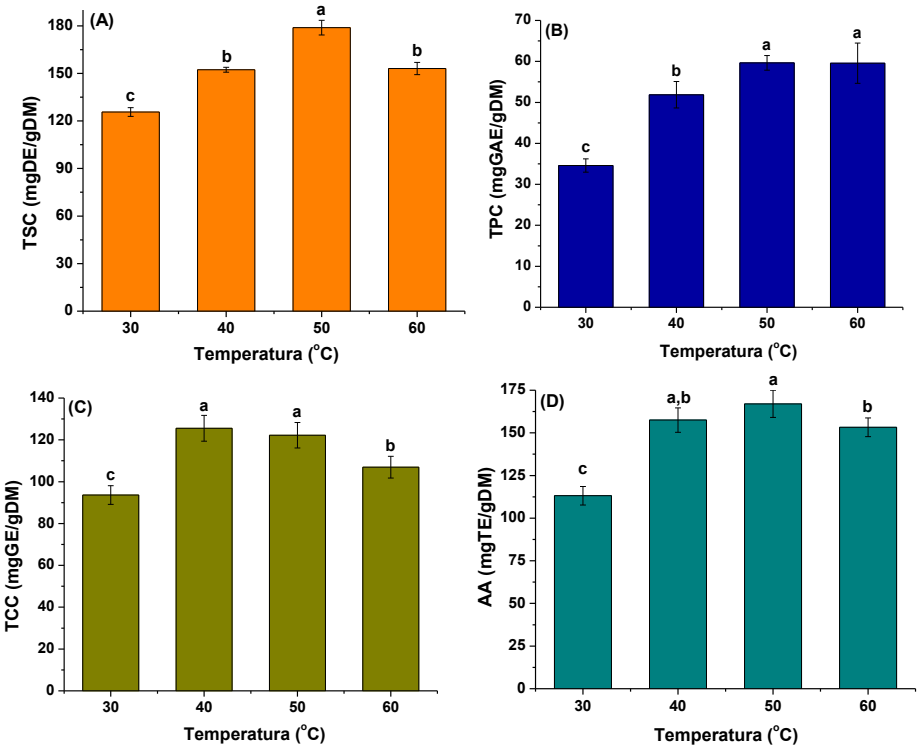


Figura 10.8. Influența temperaturii asupra conținutului total de compuși bioactivi: A)TSC, B)TPC, C)TCC și D)AA

Temperatura are un impact semnificativ în extracția compușilor termolabili, în special a saponinelor. După cum se poate observa și din grafice, creșterea conținutului total de saponine este destul de scăzut, iar pentru a se obține randamente maxime de extracție ale tuturor compușilor și luând în vedere și factorul economic – consum de energie crescut la temperaturi de reacție mai ridicate – se ajunge la concluzia că temperatura optimă pentru procesul de extracție asistată de ultrasunete este de 50°C.

10.2.8. Analiza componenților principali

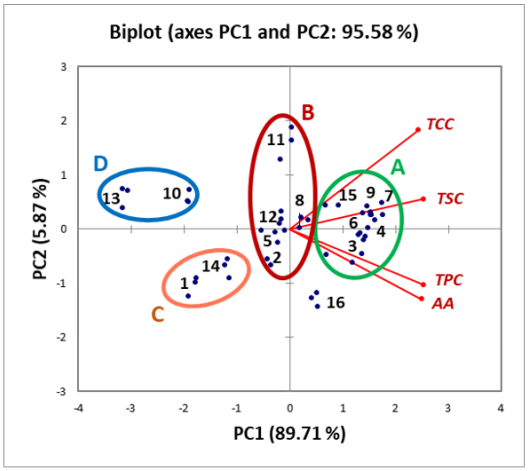


Figura 10.9. PCA-ul fitocompușilor obținuți din extractele de neem și a condițiilor de extracție

S-a efectuat analiza chemometrică PCA pentru evaluarea corelațiilor dintre tehnicile de extracție – convenționale și extracția asistată de ultrasunete, conținutul total de compuși bioactivi – TPC, TSC și TCC și activitatea antioxidantă a extractelor din neem (**figura 10.9**).

PC1 a arătat o corelație pozitivă puternică pentru toate variabilele măsurate TPC, TSC, TCC și AA. Îndeosebi, AA prezintă o corelație puternică cu toți compușii bioactivi: TPC ($r = 0.925$) și o corelație pozitivă cu TSC ($r = 0.852$) și TCC ($r = 0.806$).

11. CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE DE CERCETARE

Fiecare capitol a fost dedicat unor studii individuale, reprezentând în final obiectivele principale ale acestei teze:

1. Determinarea unei metode eficiente de extracție a saponinelor din iederă și a parametrilor cei mai importanți, care influențează procesul de extracție; Evaluarea biocompatibilității *in vitro* a extractelor din frunze de *Hedera helix* și influența acestora asupra conținutului de ADN al fibroblastelor L929;

Luând în considerare datele experimentale obținute în urma studiilor s-au concluzionat următoarele:

- Extracția asistată de ultrasunete a fost evaluată ca o alternativă mai simplă și mai eficientă față de metoda convențională de extracție;
- Cea mai mare cantitate totatală de saponine, de hederacozid C și de α-hederin s-au obținut atunci, cand s-a utilizat o temperatură de 50°C, timp de 60 de min de extracție, la o amplitudine a ultrasunetelor de 40%, un raport plantă solvent de 1:20 (g/v) și o concentrație de etanol de 80%;

- Testul de toxicitate al probelor a indicat că până la 200 µg/mL, ambele extracte etanolice au fost biocompatibile cu celulele fibroblaste L929;

2. Stabilirea celei mai bune metode de extracție a fitocompușilor din frunzele de iederă, prin compararea metodei convenționale de extracție cu extracția asistată de microunde; Evaluarea timpului de extracție, a temperaturii, raportul plantă/solvent și a concentrației de etanol;

- În urma interpretării datelor experimentale, se evidențiază faptul că extracția asistată de microunde a condus la randamente de extracție mult mai ridicate, într-un timp mai scurt. Astfel, condițiile optime de extracție determinate au fost: temperatura de 50°C, un raport P/S de 1/20 și o concentrație a etanolului de 80%, când s-a obținut cel mai mare conținut de saponine de 93 mg DE/g DM, având o activitate antioxidantă maximă de 103 mg TE/g DM.

3. Evaluarea celei mai eficiente metode de extracție a principiilor din iederă dintre metoda convențională, extracția asistată de ultrasunete și de microunde;

- O serie de parametri au fost studiați precum: timpul de extracție, concentrația etanolului în solventul de extracție, temperatura și extracția multiplă succesivă. UAE și MAE s-au dovedit alternativele cele mai atractive, rezultatele indicând cei mai buni parametri: timp de extracție de 10 min, o temperatură de 50°C și 80% etanol ca solvent;
- Cel mai mare conținut de saponine s-a obținut prin MAE – 77.64 ± 1.79 mg DE/g DM;
- În ceea ce privește carbohidrații și polifenolii, cele mai bune rezultate s-au obținut prin UAE (TCC = 224.17 ± 8.53 mg GE/g DM și TPC = 30.02 ± 0.75 mg GAE/g DM);
- Metoda PCA a fost utilizată pentru a evalua potențialele corelații între TSC, TCC, TPC și AA și metodele de extracție ale compușilor bioactivi din frunzele de *Hedera helix*. O corelație pozitivă între activitatea antioxidantă și TSC (r= 0,867), între AA și TCC (r=0,928) și între AA și TPC (r=0,922) ;

4. Dezvoltarea unor tehnologii de extracție și combinații ale acestora; determinarea celei mai eficiente metode de extracție a compușilor bioactivi din frunzele de iederă, fiind investigate UAE, MAE, UMAE;

- Efecte sinergice au fost observate atunci când aceste tehnologii au fost combinate, conducând la randamente sporite ale compușilor bioactivi totali și activitatea antioxidantă a extractelor. Mai exact, abordarea hibridă – UMAE a fost identificată ca strategie inovatoare pentru optimizarea performanței de extracție.
- Rezultatele evidențiază faptul că tehnologiile de extracție emergente, în special atunci când sunt combinate, pot produce extracte din frunze de *Hedera helix* cu proprietăți funcționale îmbunătățite, făcându-le potrivite pentru aplicații viitoare ca agenți farmacologici și suplimente alimentare;

5. Extracția compușilor bioactivi din frunzele de neem;

- Datele experimentale au arătat faptul că extracția asistată de ultrasunete prezintă avantaje majore față de extracția convențională, obținându-se rezulte incontestabil mai valoroase;
- Studiul influenței diferiților parametri de lucru au arătat că cele mai bune condiții de reacție pentru obținerea unor cantități maxime de fitocompuși au fost: timp de extracție 10 min, temperatura 50°C, amplitudine ultrasonica 20%, sonicare continuă, raport plantă:solvent 1/20 (g/v), solvent 50% EtOH în apă;

- Respectându-se aceste condiții de reacție, s-a obținut cel mai mare conținut de saponine de 195.5 mg DE/g DM, 60.5 mg GAE/g DM pentru polifenoli și 173.3 mg TE/ g DM în cazul activității antioxidante.

Principalele obiective/direcții de cercetare vizate în continuare se referă la:

- Studiul experimental poate fi continuat în special în direcţia concentrării extractelor de iederă şi neem în vederea creşterii conţinutului de componente bioactive utilizate în suplimentele alimentare pentru prevenţia diferitelor boli.
- Optimizarea procesului de extracţie al compuşilor importanţi din frunzele de neem şi stabilirea unor metode de separare din extractele obţinute.
- Extracţia fitocompuşilor din frunzele de neem prin utilizarea extracţiei asistate de microunde şi a metodei de extracţie hibride (microunde combinate cu ultrasunete).

13. DISEMINAREA REZULTATELOR

❖ Articole publicate în reviste ISI

1. A. I. Gavrila, R. Tatia, A.M. Seciu-Grama, I. Tarcomnicu, **C.L. Negrea**, I. Calinescu, C.M. Zalaru, L. Moldovan, A.D. Raiciu, I. Popa*, *Ultrasound Assisted Extraction of Saponins from Hedera helix L. and an In Vitro Biocompatibility Evaluation of the Extracts*, Pharmaceuticals, 15(10), nr. 1197 (13 pag), **2022**, eISSN 1424-8247, WOS:000873732500001 (ISI, **Q1, IF = 4.8**).
2. A. I. Gavrila, C.M. Zalaru, R. Tatia, A.M. Seciu-Grama, **C.L. Negrea,** I. Calinescu, P. Chipurici, A. Trifan*, I. Popa, *Green Extraction Techniques of Phytochemicals from Hedera helix L. and In Vitro Characterization of the Extracts*, Plants, 12(9), nr. 3908 (17 pag), **2023**, ISSN: 2223-7747, WOS:001114597100001 (ISI, **Q1, IF = 4.1**).
3. **C. L. Negrea** , I. Popa , I. Calinescu*, C. M. Zalaru , A. I. Gavrila, *A hybrid ultrasound – microwave system for phytocompounds extraction from Hedera helix L.,* UPB Sci. Bull., Series B, **2025**, ISSN 1454 – 2331, **acceptat spre publicare**. (ISI, **Q4, IF = 0.3**)

❖ Conferințe internaționale

1. A. I. Gavrilă, I. Popa, C.L. Negrea, I. Călinescu, A. Trifan, E. Feizula, *Hybrid green extraction of phytoextracts from Hedera Helix* L, International Chemical Engineering and Material Symposium (SICHEM), 17–18 noiembrie **2022**, București, România (**Prezentare orală**).
2. A. I. Gavrilă., I. Popa, C. M. Zălaru, I. Călinescu, **C. L. Negrea**, *Comparison of different techniques for the extraction of bioactive compounds with immunostimulatory activity from ivy leaves*, 22nd Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE 22), 7–9 septembrie **2022**, Sinaia, România (**Poster**).
3. A. I. Gavrilă, I. Popa, **C.L. Negrea,** I. Călinescu, A. Trifan, E. Feizula, *Hybrid green extraction of phytoextracts from Hedera Helix* L, International Chemical Engineering and Material Symposium (SICHEM), 11–12 aprilie, **2024**, București, România (**Poster**).

Bibliografie

1. Chemat, F., et al., *Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review.* Ultrason Sonochem, 2017. **34**: p. 540-560https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035.
2. Hiai, S., H. Oura, and T. Nakajima, *Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfur1c acid.* Planta medica, 1976. **29**(02): p. 116-122https://doi.org/10.1055/s-0028-1097639.
3. Gavrila, A.I., et al., *Ultrasound assisted extraction of saponins from Hedera helix L. and an in vitro biocompatibility evaluation of the extracts.* Pharmaceuticals, 2022. **15**(10): p. 1-12https://doi.org/10.3390/ph15101197.
4. Kim, J.H., *Extraction time and temperature affect the extraction efficiencies of coumarin and phenylpropanoids from Cinnamomum cassia bark using a microwave-assisted extraction method.* Journal of Chromatography B, 2017. **1063**: p. 196-2023https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.08.008.
5. Gavrila, A.I., et al., *Green Extraction Techniques of Phytochemicals from Hedera helix L. and In Vitro Characterization of the Extracts.* Plants, 2023. **12**(22): p. 1-17https://doi.org/doi.org/10.3390/plants12223908.
6. Capelo-Martínez, J.L., *Ultrasound in chemistry: analytical applications*. 2009: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
7. Călinescu, I., et al., *A new reactor for process intensification involving the simultaneous application of adjustable ultrasound and microwave radiation.* Ultrasonics Sonochemistry, 2021. **77**: p. 1-5https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105701.
8. Staicu, V., et al., *The efficient extraction of β-carotene from sea buckthorn berries using a novel solvent, fatty acid ethyl esters, and a combination of ultrasound and microwave.* Agronomy, 2024. **14**(3): p. 416https://doi.org/10.3390/agronomy14030416.
9. Akbari, S., et al., *Microwave-assisted extraction of saponin, phenolic and flavonoid compounds from Trigonella foenum-graecum seed based on two level factorial design.* Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 2019. **14**: p. 1-119https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.06.021.
10. Capaldi, G., et al., *New trends in extraction-process intensification: Hybrid and sequential green technologies.* Industrial Crops and Products, 2024. **209**: p. 1-22https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117906.