

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI**

ȘCOALA DOCTORALĂ

FACULTATEA DE MEDICINĂ



**MODIFICĂRI ALE PROPRIETĂȚILOR ANTIOXIDANTE ALE
ULEIURILOR ALIMENTARE SUPUSE IRADIERII CU MICROUND.
STUDIU BIOFIZIC**

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. KOVACS EUGENIA

Student-doctorand:

IOSIF LIVIU

2017

MOTTO

“Arta vindecării vine de la natură, nu de la medic. Prin urmare, medicul trebuie să pornească de la natură, cu o minte deschisă.”

Paracelsus

MULȚUMIRI

Mulțumesc Prof. Univ. Dr. Kovacs Eugenia, conducătorul științific al acestei teze de doctorat, pentru tot sprijinul acordat.

Mulțumesc mentorului meu, Prof. Univ. Dr. Stoian Irina, care mi-a oferit suportul logistic necesar, și prin ideile și îndrumările sale a făcut posibilă finalizarea cu succes a acestei lucrări.

Mulțumesc tuturor colegilor mei din departamentul de Biochimie care au colaborat cu mine pe parcursul cercetării.

Mulțumesc logodnicei și familiei mele pentru suportul și încurajările lor.

Cuprins

INTRODUCERE	9
Compoziția chimică a uleiurilor vegetale	11
Importanța nutrițională a uleiurilor vegetale	12
Acizii grași și sănătatea umană	12
Utilizarea uleiurilor la gătit	13
Efecte asupra sănătății ale uleiurilor vegetale în stare nativă	14
Prăjirea uleiurilor vegetale	14
Utilizarea antioxidanților naturali în uleiuri	15
Utilizarea antioxidanților sintetici în uleiuri	16
Efecte ale speciilor reactive de oxigen asupra biomoleculelor	16
Modificări oxidative ale uleiurilor vegetale	17
Reacții tipice de oxidare în uleiuri	17
Peroxidarea lipidică	17
Modificări oxidative sub influența microundelor	18
Influența antioxidanților	19
Metode de determinare a modificărilor oxidative	19
Aspecte generale	19
Reacții uzuale	20
Metode de determinare a capacității antioxidante	20
PREZENTARE GENERALĂ A ACTIVITĂȚII EXPERIMENTALE	21
Motivație	21
Caracterizarea fizico-chimică a uleiurilor vegetale luate în studiu	24
Modificări în uleiuri vegetale tratate cu microunde	26
Modificări în uleiuri încălzite în cuptorul electric	34
Diferențe de compoziție, capacitate antioxidantă și procese oxidative între uleiurile rafinate și uleiurile presate la rece	38
Concluzii	43
Contribuții proprii	43
Concluzii generale	47
Direcții de cercetare	49
BIBLIOGRAFIE	50

INTRODUCERE

În zilele noastre gătitul cu microunde este metoda cea mai versatilă la nivel mondial. Este eficient din punct de vedere energetic și reduce timpul de gătire în comparație cu încălzirea convențională. Consumatorii preferă procedura de gătit cu microunde, care se caracterizează prin viteză și timp scurt de gătire, comparativ cu metodele clasice de gătit. Microundele sunt folosite în industria alimentară nu numai pentru încălzirea, uscarea, dezghețarea și coacerea, ci și pentru alte aplicații, cum ar fi pasteurizarea și sterilizarea multor tipuri de alimente.

Procesele de peroxidare pot avea efecte dăunătoare datorita formarii de hidroperoxizi lipidici. Hidroperoxizii lipidici sunt intermediari non-radicalici derivați din acizi grașinesaturați, fosfolipide, glicolipide, colesterol și esterii de colesterol. Formarea lor are loc prin reacțiile enzimatică și ne-enzimatică ce implică speciile chimice cunoscute sub numele de “specii reactive de oxigen”, specii ce sunt responsabile pentru numeroase efecte toxice din corp și diferite vătămări tisulare (Gutteridge and Halliwell, 2000).

Deocamdată relativ puține studii au oferit date despre modul în care tratamentul cu microunde afectează stabilitatea la oxidare a uleiurilor și influențează procesele anti și pro-oxidante ce au loc în timpul încălzirii (Albi et al., 1997). Lassen și Ovesen (Lassen and Ovesen, 1995) au analizat componenții chimici ai uleiurilor care se degradează în timpul încălzirii cu microunde, la viteze care variază în funcție de temperatura și timpul de încălzire, ca și în cazul altor metode de procesare internă (de exemplu, prăjire, aburire și prăjire). Parametrii de calitate adecvați pot fi utilizați ca integratori de temperatură/timp pentru deteriorarea calității uleiurilor în timpul încălzirii cu microunde. Metodele de măsurare a acestor componente pot fi relativ complexe și consumatoare de timp, ceea ce poate constitui un dezavantaj major. Sunt necesare metode care implică tehnici mai simple și mai rapide pentru determinarea modificărilor în ulei.

Având în vedere acestea am considerat ca fiind de interes studiul variației capacității antioxidante în relație cu formarea de peroxizi în timpul tratamentului cu microunde asupra uleiurilor utilizate în mod obișnuit. Au fost selectate din oferta pieței locale câteva tipuri de uleiuri: ulei de floarea-soarelui, ulei de porumb, ulei de soia, ulei mixt (conținând floarea-soarelui, struguri, în și orez), ulei de palmier, ulei de nuc, ulei de cățina, ulei de rapiță, ulei de

măslina, ulei de cocos și ulei de susan. Pentru fiecare dintre aceste uleiuri s-au determinat o serie de markeri: capacitatea antioxidantă echivalent Trolox (TEAC), vitamina E ca α -tocoferol și peroxizi lipidici, substanțe reactive cu acidul tiobarbituric (TBARS), diene conjugate, polifenoli și flavonoide totale. Pentru uleiurile neîncălzite au fost măsurate și capacitatea antioxidantă reducătoare a cuprului (CUPRAC) și puterea antioxidantă reducătoare a fierului (FRAP). Determinarea s-a efectuat atât în stare nativă cât și după tratamentul cu microunde timp de 5, 10 și 15 minute într-un cuptor cu microunde de uz casnic sau într-un cuptor electric cu încălzire prin convecție.

Prima ipoteză a studiului a fost că în timpul încălzirii uleiurilor vegetale utilizate la gătit capacitatea antioxidantă totală va scădea laolaltă cu cantitative de tocoferol, polifenoli și flavonoide, în timp ce nivelurile produșilor de peroxidare lipidică vor crește, aspecte confirmate de experimentele efectuate.

A doua ipoteză a fost că încălzirea cu microunde va produce efecte oxidative mai puternice decât încălzirea în cuptorul electric cu convecție, ducând la o scădere mai accentuată a cantităților de antioxidanți și a capacității antioxidante totale concomitent cu o creștere mai accentuată a produșilor de oxidare. Și această ipoteză a fost confirmată de rezultatele experimentale.

O a treia ipoteză a fost formulată în timpul derulării experimentelor. Compușii antioxidanți din structura uleiurilor în anumite condiții pot manifesta caracter pro-oxidant și acesta poate fi estimat din determinarea CUPRAC și/sau FRAP. Efecte pro-oxidative au fost constatate pentru tocoferoli și flavonoide, dar nu s-a putut stabili o corelație suficient de puternică cu FRAP, CUPRAC sau TEAC care să aibă o putere predictivă în ceea ce privește aceste efecte.

PARTEA GENERALA

Compoziția chimică a uleiurilor vegetale

Dieta umană cuprinde trei clase mari de macronutrienți (proteine, carbohidrați și lipide) și un număr mare, dar necunoscut, de micronutrienți (vitamine, minerale, antioxidanți etc.). O stare de sănătate bună se bazează, în mare parte, pe o aprovizionare adecvată și echilibrată cu aceste componente (Jr et al., 2009). Această lucrare se referă la uleiurile vegetale, ca principalele surse de lipide, și micronutrienții pe care le conțin, precum și la modificările ce au loc în timpul tratamentului acestora cu microunde.

Uleiurile pot fi descrise ca substanțe hidrofobe ce sunt lichide la temperatura camerei și sunt compuse în principal din trigliceride (H.-D. Hans-D. Belitz et al. 2009). În general majoritatea uleiurilor sunt lichide vâscoase, solubile în solvenți organici. Clasificate în mare după sursa de origine le putem împărți în uleiuri organice și minerale.

Uleiurile și grăsimile de origine biologică în diferite forme alcătuiesc peste 40% din dieta umană. Poate cel mai important pentru nutriția umană, sunt sursa principală de acizi grași nesaturați esențiali. Dintre compușii ce intra în alcătuirea uleiurilor vegetale și care fac obiectul lucrării de față enumerăm: acizii grași, trigliceridele, polifenolii, flavonoidele și vitaminele.

Uleiurile au o compoziție complexă. Componenta lipidică le face susceptibile la autooxidare și oxidare, dar în structura lor, deși în cantități reduse, găsim antioxidanți naturali, sub forma compușilor polifenolici și a diferitelor vitamine, care contribuie la rezistența uleiurilor la aceste procese.

Antioxidanții naturali, după cum s-a confirmat în ultimii ani, au și potențialul de a stimula procesele oxidative în anumite condiții, iar prezența substanțelor cu efect potențial anti-oxidativ poate provoca un efect contrar celui scontat.

Fiecare tip de antioxidant, care există în mod natural în plantele din care sunt extrase uleiurile vegetale și în uleiurile crude, va fi influențat de procesele tehnologice de rafinare care au loc până la obținerea produsului final pe care consumatorul îl folosește. Vom reveni într-un capitol ulterior asupra acestui aspect.

De aceea modul în care sunt stocate și folosite uleiurile are un impact major asupra proceselor oxidative și a formării de compuși cu potențial toxic pentru sănătatea umană, aspecte pe care le vom urmări în continuare.

Importanța nutrițională a uleiurilor vegetale

Acizii grași și sănătatea umană

Efectele fiziologice ale uleiurilor vegetale se bazează pe compoziția AG. Raportul ridicat între n-6 și n-3 determină preocupări legate de inflamație și bolile cronice asociate, cum ar fi bolile cardiovasculare și diabetul de tip II. Cu toate acestea, asocierea directă nu este încă demonstrată în mod clar. Se știe că bioconversia acidului linolenic absorbit la oameni este foarte scăzută și acest lucru poate contribui la inconsecvența rezultatelor studiilor clinice față de experimentele efectuate în sistem izolat.

Efectul nociv al AG trans asupra sănătății a fost demonstrat în mod clar. Proprietățile fizice ale AG trans (lanțul de hidrocarburi mai liniar și punctul de topire mai mare comparativ cu omologii lor cis) pot contribui la efectul lor biologic. Absorbția AG trans și cis este similară (Emken, 1984), dar izomerii trans sunt metabolizați diferit față de izomerii cis, prin faptul că sunt mai rapid oxidați (Emken et al., 1989). Studiul efectului de creștere a colesterolului de CĂTRE AG trans- a demonstrat că ele au crescut colesterolul total și colesterolul LDL și au redus colesterolul HDL comparativ cu izomerii cis (Judd et al., 1994).

Studiile pe animale au arătat că modificarea distribuției stereospecifice a anumitor acizi grași asupra triacilglicerolilor poate influența potențialul aterogen (Hunter, 2001). S-a arătat că aterogenicitatea a crescut atunci când nivelurile acidului palmitic în poziția sn-2 au crescut. Uleiul de palmier care are în principal acizi grași nesaturați oleic și linoleic în poziția sn-2 a triacilglicerolului, ar putea fi motivul pentru care aceste uleiuri nu prezintă, în general, efecte de creștere a colesterolului. Într-un alt studiu realizat de Forsythe et al. (2007), acidul palmitic în poziția sn-2 a dus la un nivel scăzut de colesterol total față de dietele cu acid palmitic în pozițiile sn- 1,3. În plus față de compoziția de acizi grași, uleiul de palmier are componente minore care au proprietăți nutritive și de îmbunătățire a sănătății. Este suficient să spunem că o abordare comună a utilizării tuturor uleiurilor naturale în doze mici ar trebui să fie ideală pentru o alimentație bună.

Utilizarea uleiurilor la gătit

Uleiul poate fi utilizat pentru gătit fie în stare naturală, fie după prelucrare, în funcție de convingerile personale și nutriționale. În majoritatea părților lumii, uleiul de gătit este prelucrat sau rafinat până la un gust slab. În plus față de utilizările uzuale ale gospodăriei, utilizarea uleiului de gătit în prăjiturile cu adaos de grăsime este foarte importantă, atât pe plan intern, cât și pe scară comercială.

Uleiul de gătit trebuie să fie mai stabil decât uleiul de salată la temperaturi mai ridicate. De exemplu, uleiul de soia conține o cantitate relativ mare de acid linolenic polinesaturat și instabil, acesta este de obicei parțial hidrogenat pentru a produce salata sau uleiuri de gătit. Cu toate acestea, uleiul de soia este, de asemenea, utilizat fără hidrogenare prin adăugarea de antioxidanți cum ar fi hidroxianisol butilat (BHA), hidroxitoluen butilat (BHT), galat de propil (PG), palmitat de ascorbil, și hidrochinona terțbutilică (TBHQ).

Efecte asupra sănătății ale uleiurilor vegetale în stare nativă

Un mare număr de studii clinice (> 30) din ultimii 40 de ani au susținut ipoteza că uleiul de porumb are proprietăți de scădere a colesterolului (Moreau, 2011). Această observație a superiorității uleiului de porumb față de alte uleiuri vegetale în scăderea colesterolului a fost denumită "aberația uleiului de porumb" .

Numeroase studii clinice sugerează că există dovezi care să arate efecte pozitive ale uleiurilor cu acid γ -linolenic și stearidonic în tratarea sau prevenirea mai multor boli umane. Acestea includ modificarea profilurilor lipidelor plasmaticice, reducerea riscului de boală cardiacă aterosclerotică coronariană, agregarea plachetară, artrita reumatoidă, dermatita și tensiunea arterială (Zurier et al., 1996). Alte proprietăți de promovare a sănătății uleiurilor bogate în acid linoleic sunt asociate cu funcția imună, sindromul premenstrual, cancerul, ulcerația gastrică, astmul, bufeurile la menopauză, inflamația și gestionarea greutateii. Schirmer și Phinney (2007) au raportat că subiecții obezi cărora li s-a administrat ulei de porumb 890 mg / zi au reușit să stabilizeze greutatea, deși mecanismul exact pentru acest lucru nu a fost elucidat (Schirmer and Phinney, 2007).

Prăjirea uleiurilor vegetale

Uleiul pentru prăjit este selectat având în vedere următoarele criterii: aromă; textură; gust; stabilitatea (adică durata de viață a uleiului); costul; disponibilitatea și minimizarea conținutului de acizi grași trans (TFA) (Aladedunye et al., 2015). Regulile de etichetare actuale au impus o modificare privind utilizarea uleiurilor hidrogenate pentru prăjirea grăsimilor. Efectele negative asupra sănătății ale grăsimilor trans au fost cunoscute mult timp înainte de punerea în aplicare a noilor reglementări privind etichetarea, dar industria uleiurilor vegetale a rezistat plasării grăsimilor trans ca un element separat pe etichetele produselor alimentare.

Unele studii se bazează pe operații simulate de prăjire fără încorporarea produselor alimentare (Gómez-Alonso et al., 2003). De asemenea, a fost studiată deteriorarea uleiului în

procesele discontinue de prăjire cu încorporarea alimentelor (Chiou et al., 2012). Alți cercetători au studiat procesul continuu folosind rate diferite de rotație a uleiului (Paciulli et al., 2016). De asemenea, a fost studiat uleiul de prăjire recuperat din produsul prăjit (Juárez et al., 2011). Rezultatele arată că uleiul de floarea-soarelui obișnuit ajunge rar la valoarea critică de 25% din compușii polari în timpul proceselor de prăjire continuă, indicând adecvarea uleiului de floarea-soarelui pentru această aplicație.

Utilizarea antioxidanților naturali în uleiuri

Adăugarea de antioxidanți naturali a fost studiată în vederea îmbunătățirii stabilității uleiului obișnuit din floarea-soarelui. Următoarele preparate au fost studiate: levănțică uscată și cimbru (Rodrigues et al., 2012), extract de coriandru (Ramadan et al., 2003) și extract de frunze de măsline polifenolic (Aladedunye et al., 2015). În corelație cu acest aspect un nou interes pentru uleiurile virgine dincolo de uleiul de măsline a apărut ca parte a interesului consumatorilor în produsele alimentare ecologice și naturale.

Uleiurile virgine sunt o parte importantă a pieței de produse alimentare ecologice care se afla în creștere rapidă. Întoarcerea la uleiurile presate la rece se datorează în principal schimbărilor în tendințele nutriționale și percepției consumatorilor asupra alimentelor naturale ca fiind mai nutritive, mai puțin "poluate" și de o calitate mai bună. Consumatorii de astăzi sunt mai educați și sunt obosiți de bombardarea continuă a informațiilor despre problemele legate de sănătate găsite în alimentele prelucrate.

Uleiul virgin oferă avantaje economice și de prelucrare producătorilor de semințe oleaginoase, deoarece aceste produse sunt la prețuri mai ridicate și au o valoare adăugată mai mare. Producția de uleiuri virgine este efectuată, de obicei, în operațiuni mici, cu procesare simplă implicând numai presarea și purificarea prin filtrare pentru a îndepărta substanțele solide. Cu acest sistem simplu nu dispun de multe opțiuni pentru a "corecta" calitatea produsului produs și sunt în totalitate dependente de calitatea semințelor oleaginoase prelucrate.

Utilizarea antioxidantilor sintetici în uleiuri

Antioxidanții sintetici care sunt utilizați, când nu există restricții pentru utilizarea lor, sunt hidroxianisol butilic (BHA), hidroxitoluen butilat (BHT), galat de propil (PG) și butilhidrochinonă terțiară (TBHQ). Cantitățile adăugate sunt de obicei 0,02% (simple sau combinate). Normele care reglementează utilizarea antioxidantilor sintetici diferă de la o țară la alta. Acidul citric este utilizat ca agent de chelare a metalului, de obicei ca citrat de monoacilglicerol 0,01% singur sau împreună cu BHA și BHT. În unele țări, de exemplu, acidul citric poate fi utilizat ca agent de chelatizare fără a fi necesar să se declare pe etichetele produselor atunci când este adăugat la ulei într-o soluție apoasă în faza de răcire a procesului de dezodorizare. Sunt adesea utilizate cantități mai mici de 0,005%. Adăugarea de aditivi și antioxidanți la ulei în faza de răcire a dezodorizării asigură o solubilitate și o distribuție a antioxidantilor corespunzătoare.

Efecte ale speciilor reactive de oxigen asupra biomoleculelor

Acizii grași polinesaturați din fosfolipide sunt expuși fenomenului de peroxidare lipidică prin extragerea unui atom de hidrogen din pozițiile alilice sau bis-alilice. Radicalul centrat pe carbon care se formează fie se adăunează la o legătură dubla vecină, fie reacționează cu O₂ generând radicali peroxidici (LOO•) care vor perpetua seria reacțiilor radicalice. Astfel, peroxidarea acizilor grași polinesaturați generează o gamă foarte variată de compuși.

Modificări oxidative ale uleiurilor vegetale

Reacții tipice de oxidare în uleiuri

Reacția oxigenului cu acizii grași nesaturați din lipide este cauza principală a deteriorării lipidelor și a alimentelor ce conțin lipide, ducând la pierderi a valorii calitative și nutritive și la dezvoltarea de mirosuri neplăcute. Consumul uman de lipide oxidate, în special consumul de radicali liberi formați în timpul procesului de oxidare, este bănuț a fi o cauză a dezvoltării cancerului (Mageed et al., 2011). Oxidarea lipidelor are loc printr-un mecanism complex ce este deseori numit autooxidarea deoarece rata de oxidare crește pe măsura desfășurării reacției.

Autooxidarea implică un mecanism în lanț cu trei pași:

- inițierea – formarea radicalilor liberi,
- propagarea – reacția în lanț a radicalilor liberi și
- terminarea – formarea produșilor non radicalici (Guichardant et al., 2011).

Căldura, lumina, agenții fotosensibilizatori, radicalii liberi și ioni metalici sunt inițiatori ai reacției.

Peroxidarea lipidică

Procesul de peroxidare a acizilor grași polinesaturați cuprinde următoarele etape: un radical liber extrage un atom de hidrogen din poziția alilică, cu transformarea acidului gras polinesaturat într-un radical lipidic; urmează rearanjarea intramoleculară a dublelor legături cu formarea unei diene conjugate; în urma reacției dintre diena conjugată și oxigenul molecular se formează un radical peroxil; radicalul peroxil poate reacționa cu altă moleculă de acid gras polinesaturat, formând radicali lipidici, cu transformarea radicalului peroxil în hidroperoxid lipidic.

Degradarea oxidativă a uleiurilor produce o serie de efecte nedorite:

- modificarea proprietăților senzoriale (gust, miros) definite ca “rânced” care le face improprie consumului alimentar
- modificarea valorii nutritive prin degradarea acizilor grași polinesaturați (Ω -6 și Ω -3) indispensabili organismului uman (acizi grași esențiali) și inactivarea vitaminelor A, D și E.
- formarea de substanțe toxice care lezează mucoasa gastrică cu scăderea coeficientului de utilizare digestivă a alimentelor;
- modificări ale culorii, produșii de oxidare ai grăsimilor producând o închidere a culorii alimentelor.

Modificări oxidative sub influența microundelor

Rezistența uleiurilor vegetale împotriva oxidării cu ajutorul microundelor a fost proporțională cu conținutul în tocoferol (Marinova et al., 2012). Uleiurile vegetale conțin amestecuri de tocoferoli, ceea ce crește rezistența uleiurilor la oxidare. Uleiul de floarea soarelui, fiind înalt nesaturat se oxidează la o rată mai mare datorită unui conținut mai înalt de acid linoleic și datorită prezentei α -tocoferolului, mai puțin activ. Dacă tocoferolii și acidul linoleic au fost mai curând stabili la încălzirea cu microunde a semințelor de floarea-soarelui, oxidarea a fost foarte rapidă în cazul uleiului rafinat (YOSHIDA et al., 1991). Nu s-a observat nicio diferență substanțială în compoziția acizilor grași în timpul încălzirii uleiului de arahide versus uleiului de rapiță pentru 5-20 de minute (Yoshida et al., 2003). Rezultatele au arătat că a fost distrus nu mai mult de 1% din acidul polienoic, altfel o schimbare în compoziția de acizi grași ar fi fost observabilă.

Influența antioxidantilor

Antioxidanții nativi din plante pot scădea semnificativ rata de formare a hidroperoxizilor lipidici (Pérez-Jiménez et al., 2008). Eficacitatea unui antioxidant într-un substrat lipidic depinde de o serie de factori incluzând natura antioxidantului și condițiile de oxidare (Kortenska et al., 2002).

Substanțele cu efect antioxidant împărtășesc o serie de mecanisme generale de acțiune:

- captează oxigenul singlet și astfel inhibă reacția de inițiere a procesului;
- reacționează cu radicalii peroxil și respectiv alchil generând alți radicali mai stabili, care nu sunt capabili să continue lanțul de reacții și deci inhibă reacțiile de propagare;
- descompun peroxizii și deci împiedică continuarea lanțului de reacții ;
- formează chelați cu metalele și astfel împiedică atât reacția de inițiere cât și descompunerea produșilor de reacție, hidroperoxizii.

Metode de determinare a modificărilor oxidative

Aspecte generale

Consumul de ulei și de mâncăruri pe baza de grăsimi a crescut rapid în ultimii ani. Pentru a garanta un control eficient al calității grăsimilor prăjite, metode simple și rapide sunt necesare pentru a măsura efectul tratamentului termic. Câteva dintre testele folosite estimează: modificarea părților polare, numărului de acizi, a culorii, absorbția specifică și proprietățile dielectrice pe perioade prelungite de încălzire. Cu toate acestea, este raportat ca aceste analize de rutină nu pot fi întotdeauna suficiente pentru a caracteriza uleiurile și grăsimile prăjite.

Reacții uzuale

Grăsimile sunt caracterizate chimic folosind indicele de aciditate, indicele de saponificare și indicele de iod.

Metode de determinare a capacității antioxidante

Activitatea antioxidantă nu poate fi estimată pe baza unui singur tip de test antioxidant. În practică, se efectuează mai multe proceduri în vitro de testare pentru evaluarea activităților antioxidante. Metodele de testare variază în diferite privințe. Prin urmare, este dificil să comparăm pe deplin o metodă cu alta. Cercetătorul trebuie să verifice în mod critic metodele de analiză înainte de a le adopta pentru scopul său de cercetare. În general, testele antioxidante în vitro care utilizează capcane cu radicali liberi sunt relativ simplu de efectuat. Printre metodele de curățare a radicalilor liberi, metoda DPPH este rapidă, simplă (adică nu necesită mai multe etape și reactivi) și este ieftină în comparație cu alte modele de testare. Pe de altă parte, testul de decolorare ABTS este aplicabil atât pentru antioxidanții hidrofilici, cât și pentru cei lipofili. În lucrarea de față sunt descrise metodele în vitro TEAC, CUPRAC și FRAP și este important de observat că se poate optimiza logic metoda respectivă pentru a servi obiectivului său experimental.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

PREZENTARE GENERALA A ACTIVITĂȚII EXPERIMENTALE

Motivație

Uleiurile sunt o parte importantă a alimentației umane. Producția anuală și consumul de uleiuri și grăsimi este de aproximativ 119 milioane de tone și crește constant cu o rată de 2-6 milioane de tone pe an. 80% se utilizează pentru alimentele umane - cum ar fi spirtoase, ulei de prajit, ulei de salată, grăsimi de gătit etc. (Gunstone, 2011), de aceea studiul compoziției și modificărilor ce intervin pe parcursul stocării și utilizării uleiurilor, ca și posibilele implicații asupra sănătății umane trebuie studiate în amănunt.

- **Un prim aspect** – este reprezentat de faptul că metodele actuale de determinare a capacității antioxidante în uleiuri nu oferă certitudinea exprimării capacității reale. Majoritatea sunt nespecifice sau surprind doar o fracțiune a capacității reale. (Apak et al., 2007)
- **Un doilea aspect** - consumatorii sunt din ce în ce mai interesați de rapoartele asupra compusilor daunatori ce apar în urma tratării alimentelor cu microunde. Uleiurile fac deseori subiectul tratamentului cu microunde în timpul gătitului. În timpul acestor proceduri, uleiurile vegetale, conținând acizi grași nesaturați, sunt susceptibile la procesul de oxidare care duce la formarea de peroxizi lipidici ce pot avea efecte daunatoare sănătății umane. Antioxidanții prezenți în uleiurile vegetale (polifenoli, flavonoide, vitamine etc) pot proteja împotriva proceselor oxidative și pot întârzia procesul de peroxidare, dar cercetări recente arată că ele pot manifesta și efect prooxidant. (Hassanein et al., 2003)

- **Un al treilea aspect** - este raspândirea concepției cum că produsele “naturale” (definite ca suferind cât mai puține interventii în timpul producerii) sunt net superioare celor “chimice” (care suferă intervenții extinse fizico-chimice pe parcursul producerii lor) inclusiv în ceea ce privește uleiurile. Nu există încă dovada științifică indiscutabilă a acestui fapt.(Kalantzakis et al., 2006)

State of the art

- modificările ce apar în cursul tratamentului cu microunde și procesele anti și pro-oxidante sunt încă studiate și sunt incomplet cunoscute.
- superioritatea uleiurilor virgine față de cele rafinate rămâne un subiect de dezbateri.
- încă se caută metode sau modalități de utilizare a celor existente în așa fel încât să se obțină determinări cât mai aproape de realitate ale capacității antioxidante în uleiuri comestibile.

Scopurile studiului

- de a evalua trei dintre metodele de determinare a capacității antioxidante (TEAC, CUPRAC, FRAP) în corelație cu compușii antioxidanți și compușii de oxidare primară și secundară pentru a vedea care dintre ele poate fi utilizată pentru predicția comportamentului uleiurilor la oxidare.
- de a evalua parametrii de oxidare a lipidelor împreună cu parametrii antioxidanți în uleiurile încălzite în cuptorul cu microunde și cuptorul electric pentru a estima comparativ gradul de deteriorare a uleiurilor în aceste condiții și pericolele potențiale asupra sănătății.
- de a evalua parametrii de oxidare a lipidelor împreună cu parametrii antioxidanți în uleiurile încălzite în uleiurile rafinate față de cele virgine (obținute prin presarea la rece).

S-au masurat prin metode spectrofotometrice:

Capacitatea antioxidantă:

- capacitatea antioxidantă reducătoare a cuprului (CUPRAC),
- puterea antioxidantă reducătoare a fierului (FRAP),
- capacitatea antioxidantă echivalentă Trolox (TEAC),

Compușii antioxidanți:

- vitamina E ca α -tocoferol,
- flavonoide totale,
- polifenoli totali,

Compuși de oxidare:

- Primari - dienele conjugate
- Secundari - peroxizii lipidelor ca substanțe reactive tiobarbiturice (TBARS).

Rezultatele determinărilor au fost interpretate statistic.

Aspecte inovative

- Comparația celor trei metode de determinare a activității antioxidante (TEAC, FRAP, CUPRAC) și corelația lor cu compuși antioxidanți alături de compuși de oxidare primară și secundară în scopul evaluării capacității de predicție a comportamentului la oxidare.(Alam et al., 2013)
- Compararea comportamentului la oxidare a uleiurilor încălzite într-un cuptor cu microunde cu cele încălzite într-un cuptor electric cu convecție ambele de larg consum de pe piața locală din România.(Tan et al., 2001)
- Utilizarea a 11 uleiuri vegetale folosite pe scara largă de consumatorii din România, dintre care 7 uleiuri rafinate și 4 obținute prin presarea la rece.

La nivel internațional există studii comparative între metode de determinare a capacității antioxidante, dar nu au urmărit corelarea acestei combinații de markeri în scopul aprecierii capacității de predicție a comportamentului la oxidare.

Utilizarea cuptoarelor de uz casnic și a uleiurilor de larg consum specifice pentru piața locală din România permite estimarea situației locale și contemporane a riscurilor la care este supus consumatorul obișnuit.

REZULTATE

Rezultatele relevante pentru concluziile studiilor obținute sunt prezentate în tabelele și graficele următoare.

Caracterizarea fizico-chimica a uleiurilor vegetale luate în studiu

Tabel 1 Valori PUFA, MUFA, SFA, FAT, sare si fibre declarate de producător

per 100 ml	KCAL	PUFA (g)	MUFA (g)	SFA (g)	FAT (g)	SALT (g)	FIBER (g)
PORUMB	900	56	30	14	100	0	0
SOIA	900	63	23	14	100	0	0
FL.SOAR.	900	55	34	11	100	0	0
MIXT	828	27	56	9	92	0	0
PALMIER	810	0	0	42	90	0.2	2.5
MĂSLINE (EV)	828	73	6	13	92	0	0
RAPIȚĂ	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
SUSAN	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

Tabel 2 Valori specifice pentru uleiul de măsline extravirgin (aciditate, DK, K270, K232, valoare peroxid (PV), ceruri)

per 100 ml	Aciditate	DK	K270	K232	Peroxid	Ceruri
MASLINE (EV)	0.5	0	0.15	1.98	12	43

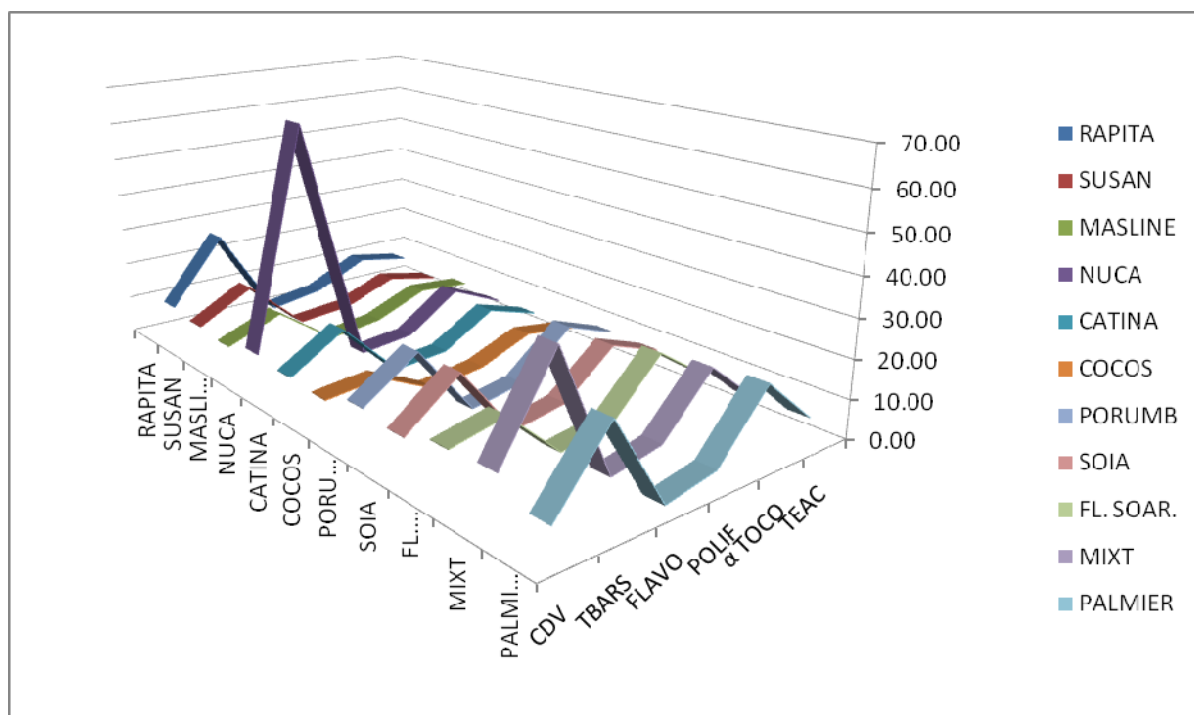


Figura. 1 Reprezentare grafica a influenței compușilor de oxidare și a celor antioxidanți asupra capacității antioxidante măsurate prin metoda TEAC

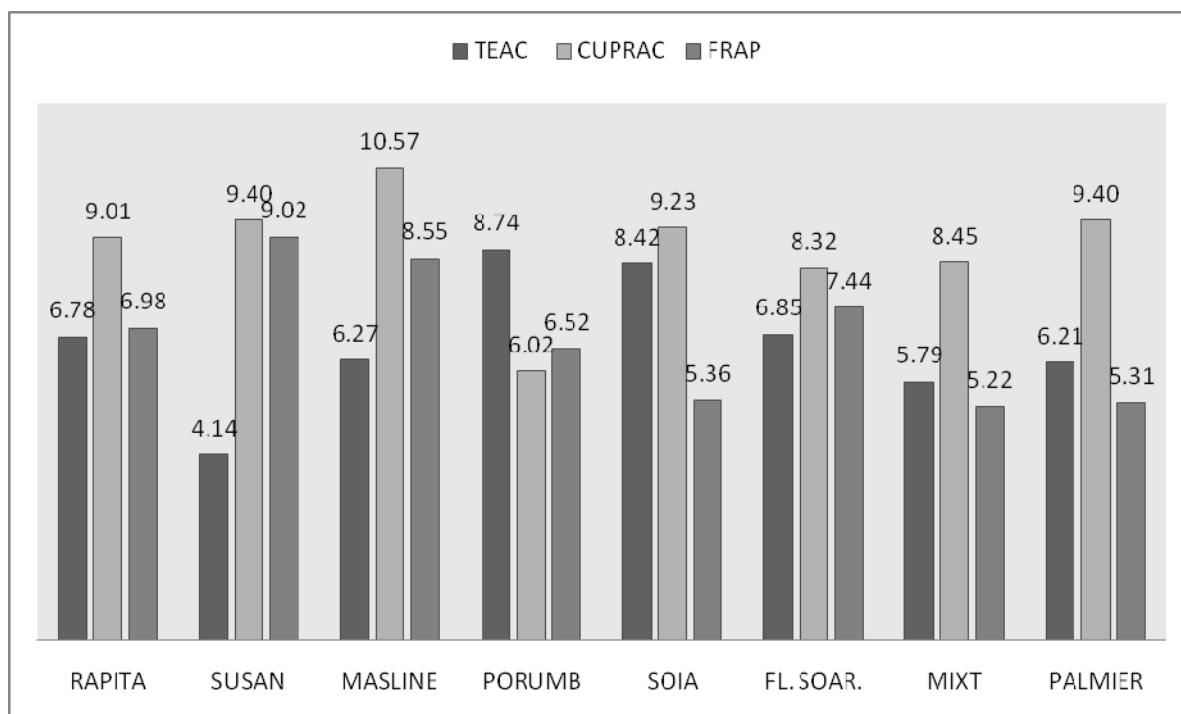


Figura. 2 Compararea capacității antioxidante măsurate prin TEAC, CUPRAC și FRAP

Discuții

Putem observa ca în compoziția uleiurilor vegetale exista o varietate surprinzătoare de compuși ce pot influența jocul între procesele oxidative, prooxidative și antioxidante și o prima estimare a acestora vine pe cale vizuala prin inspectarea culorii.

O modificare observata constant a fost în ceea ce privește culoarea uleiului care este diferita între diferitele eșantioane în timpul încălzirii. În general, uleiurile mai închise la culoare în stare nativă au fost mai stabile oxidativ decât cele în culori mai deschise. Uleiurile cu retenție scăzută de antioxidanți au fost de culoare galben deschis și mai clare, în timp ce uleiurile cu retenție ridicată au fost în paleta galben-vernil (excepții notabile sunt uleiul de palmier și uleiul de nucă de cocos, care nu au fost colorate la temperatura de pornire, uleiul de porumb, care a avut o culoare ușor portocalie și uleiul de cătină care a fost portocaliu). Acest lucru ar putea fi un indiciu asupra corelației între culoarea uleiului și stabilitatea oxidantă la încălzire. De asemenea, uleiurile cu niveluri de polifenoli și flavonoide mai ridicate au avut o tentă verde (uleiul de măsline mai ales).

Modificări în uleiuri vegetale tratate cu microunde

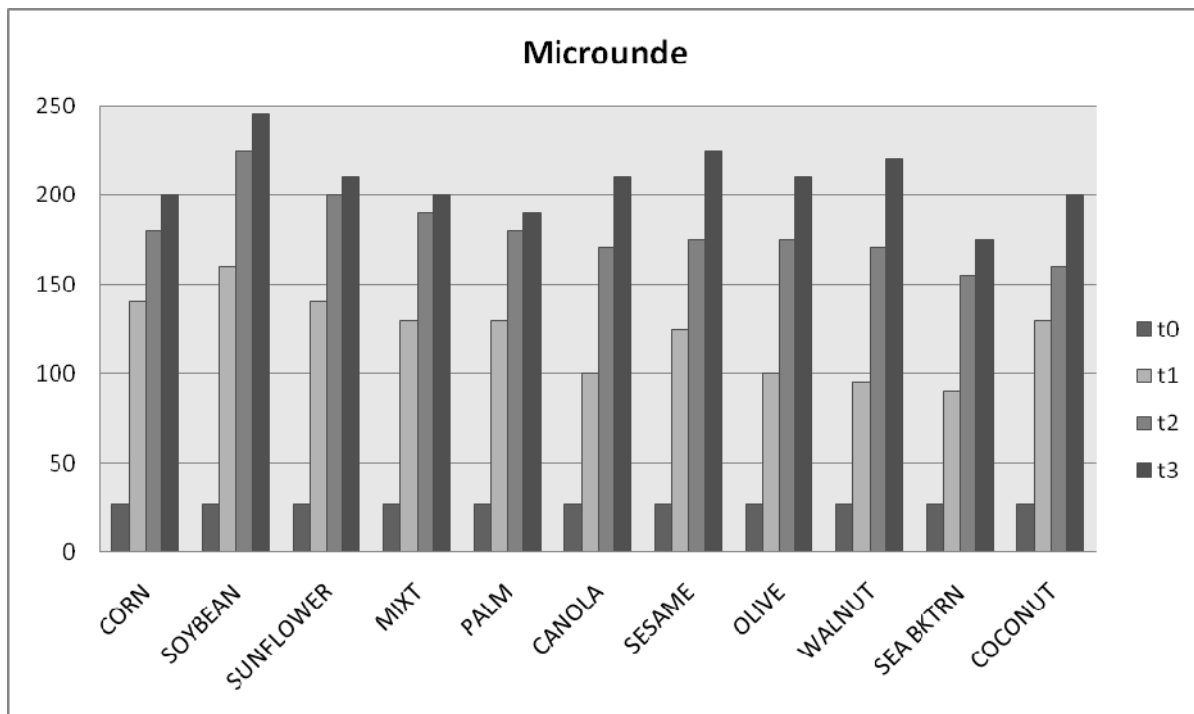


Figura 3 Evoluția temperaturii în corelație cu timpul de expunere la microunde și tipul de ulei (t0-temp. camerei, t1-5 minute încălzire, t2-10 minute încălzire, t3-15 minute încălzire)

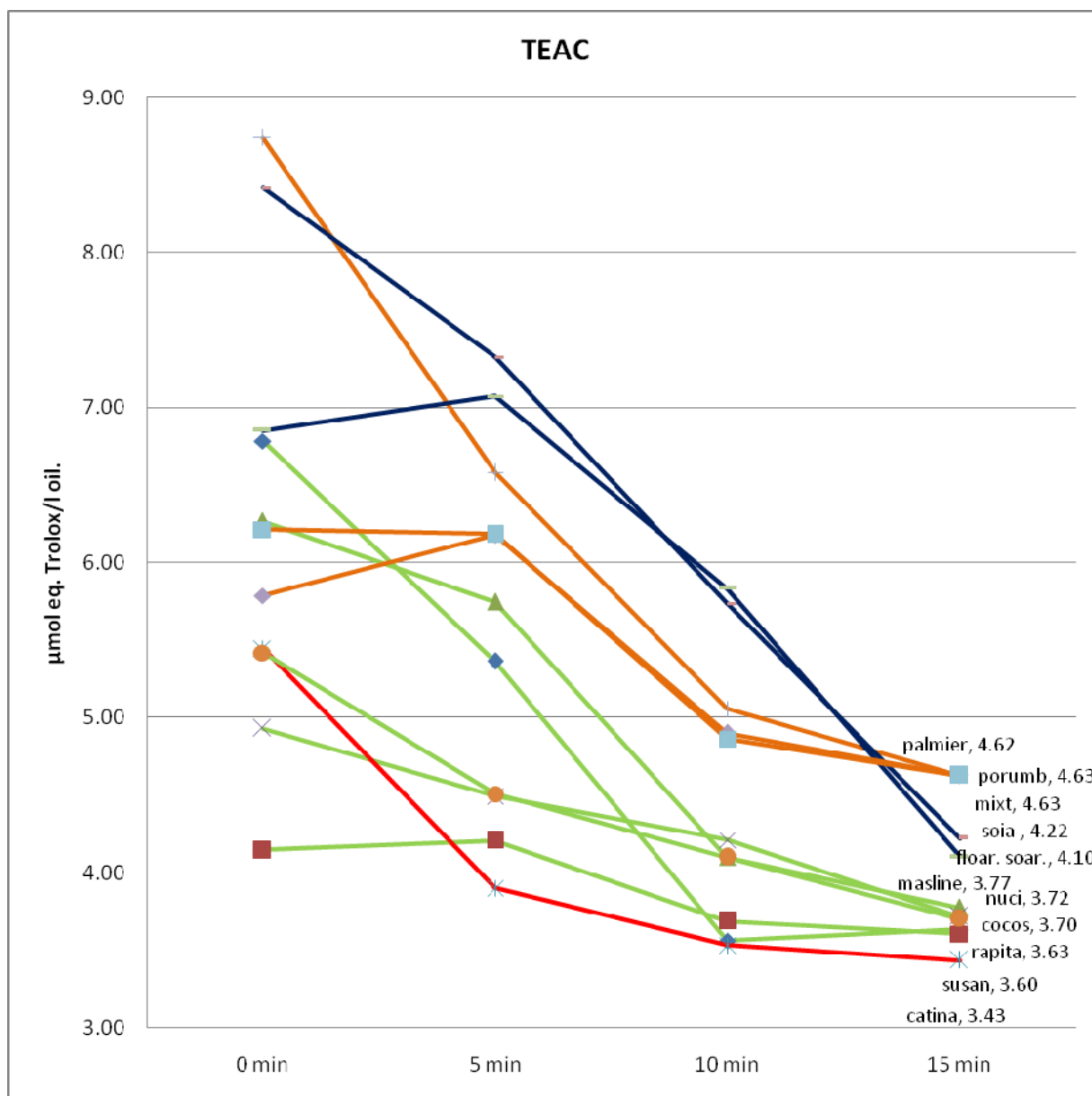


Figura 4. Evoluția TEAC în uleiuri tratate în cuptorul cu microunde

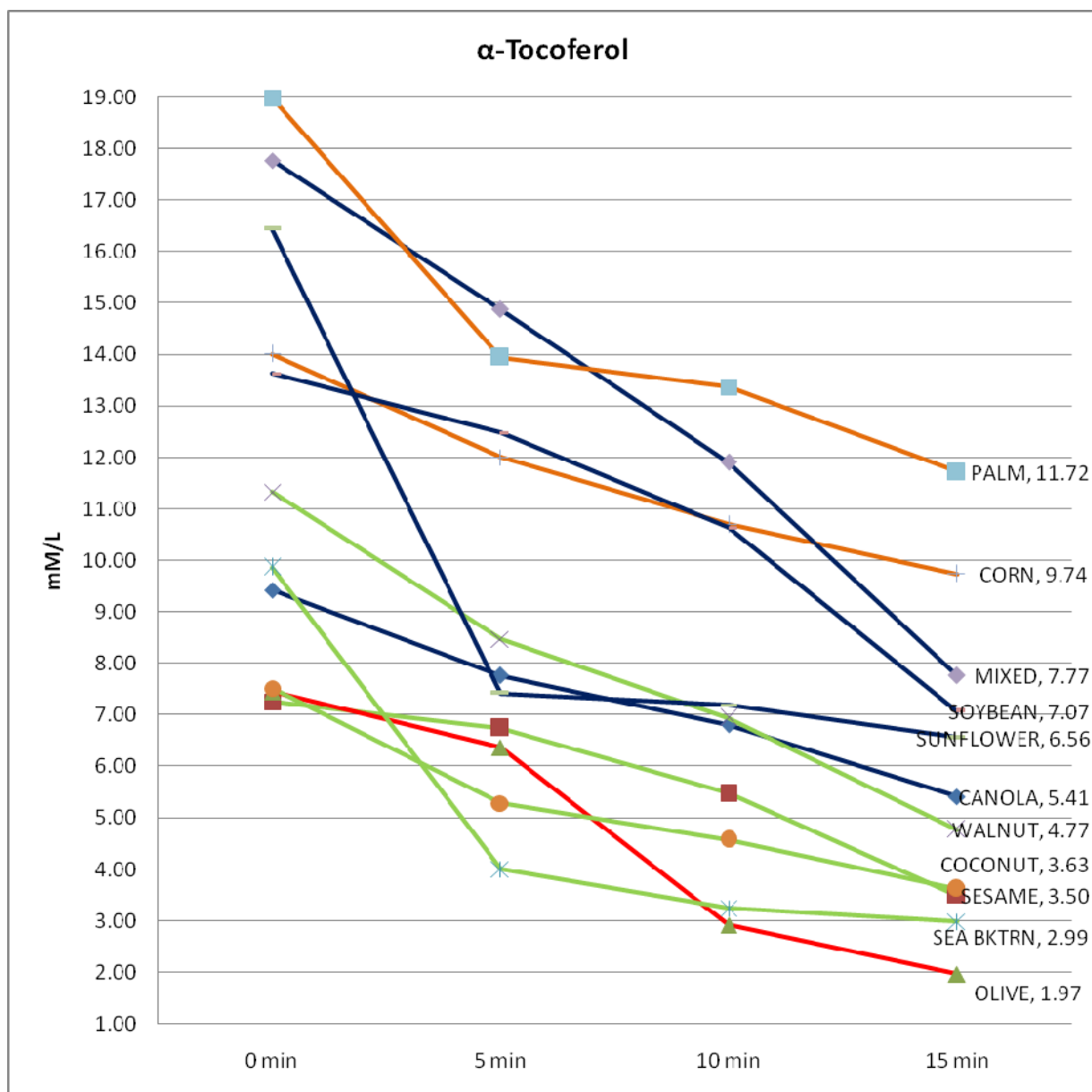


Figura 5. Variația α -tocoferolului în uleiuri tratate cu microunde

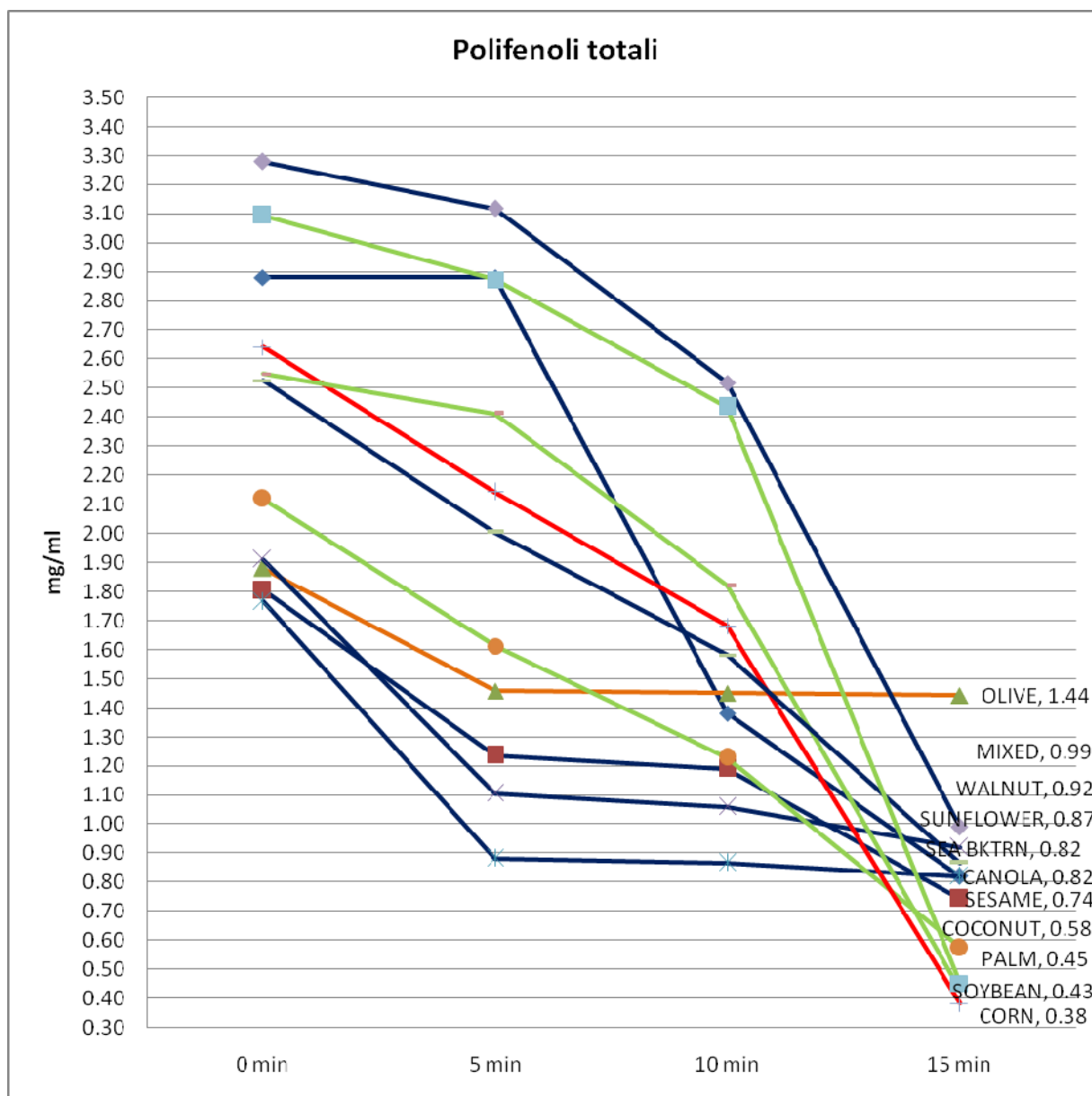


Figura 6. Variația polifenolilor totali în uleiuri tratate cu microunde

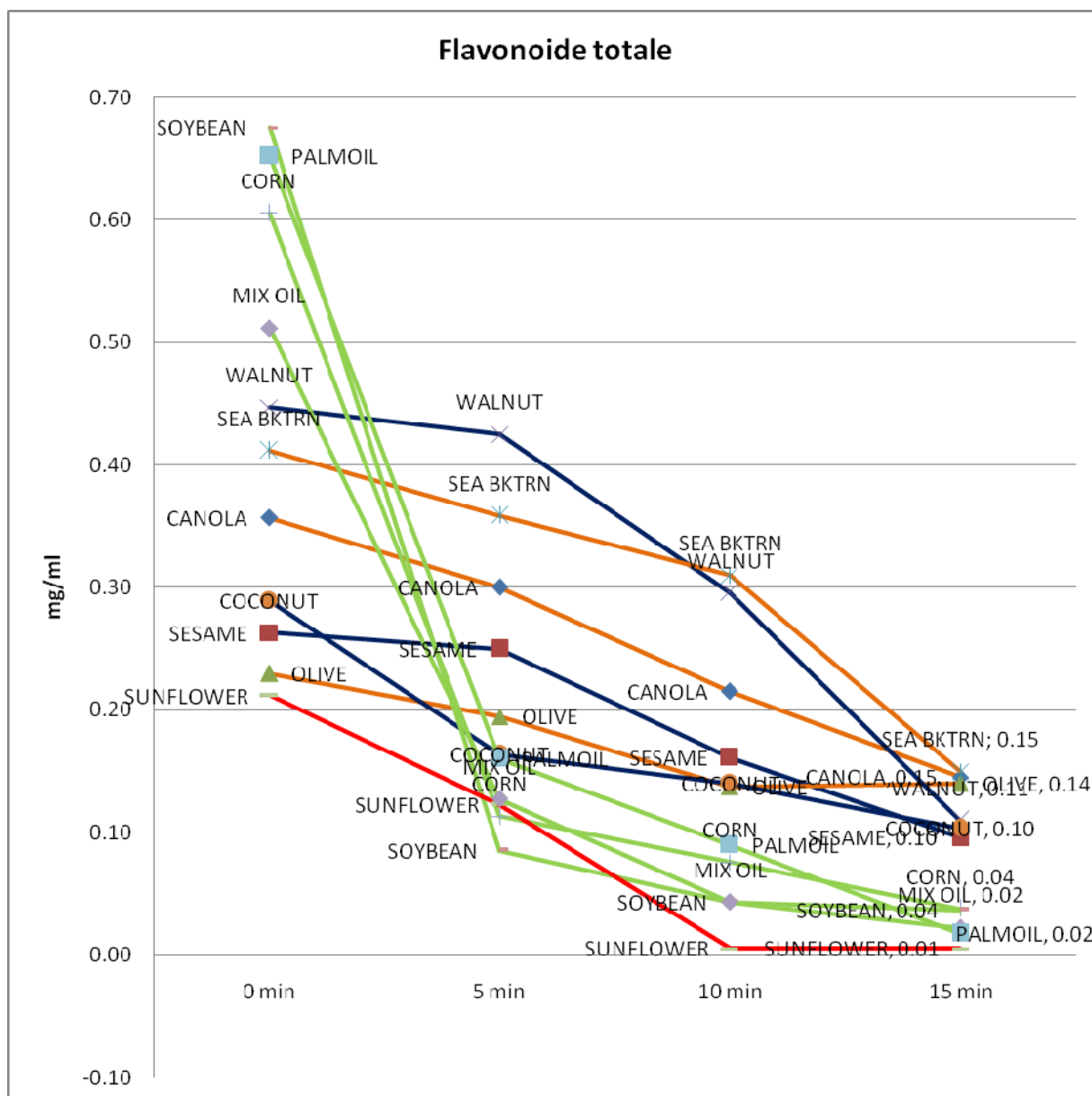


Figura 7. Variația flavonoidelor în uleiuri tratate cu microunde

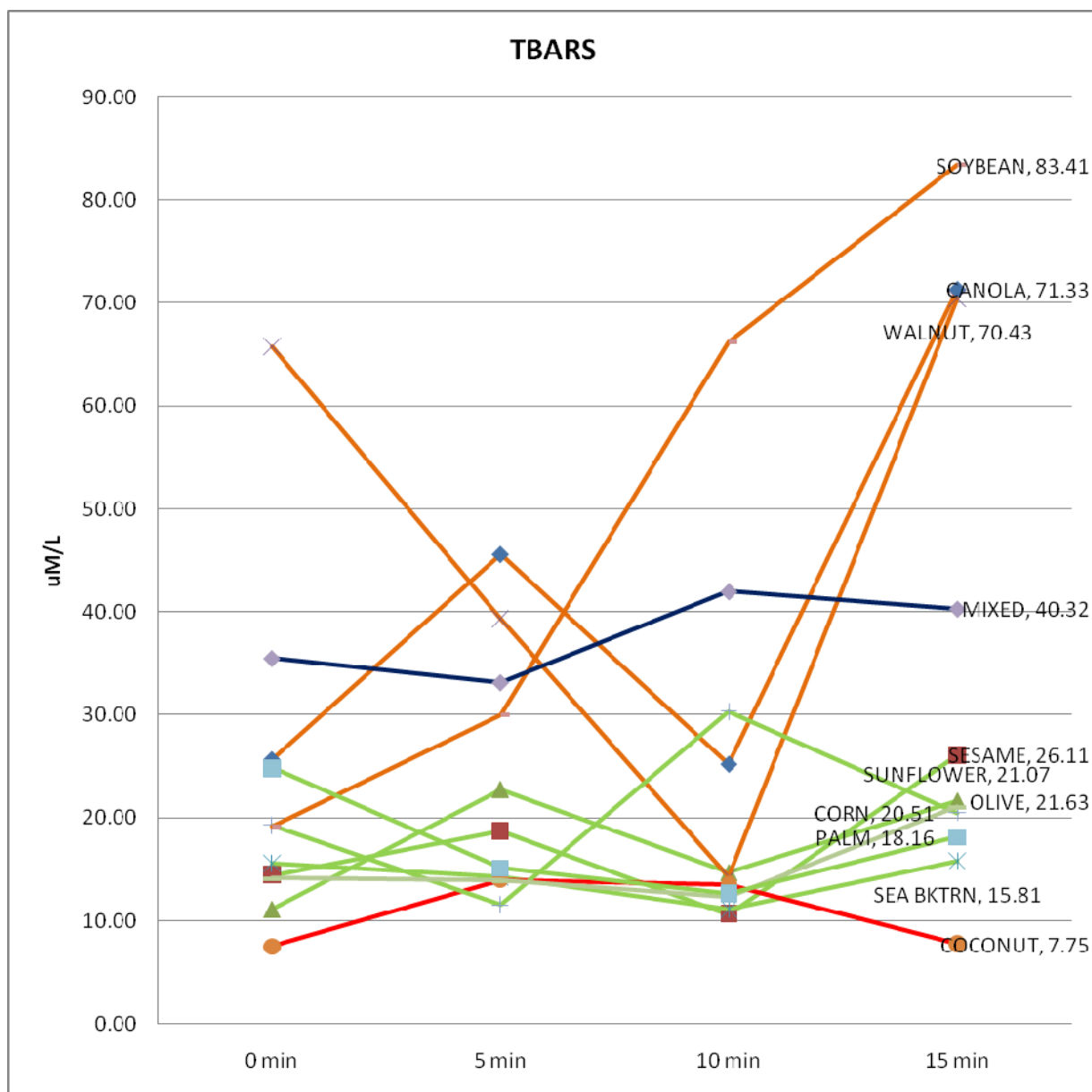


Figura 8. Variația TBARS în uleiuri tratate cu microunde

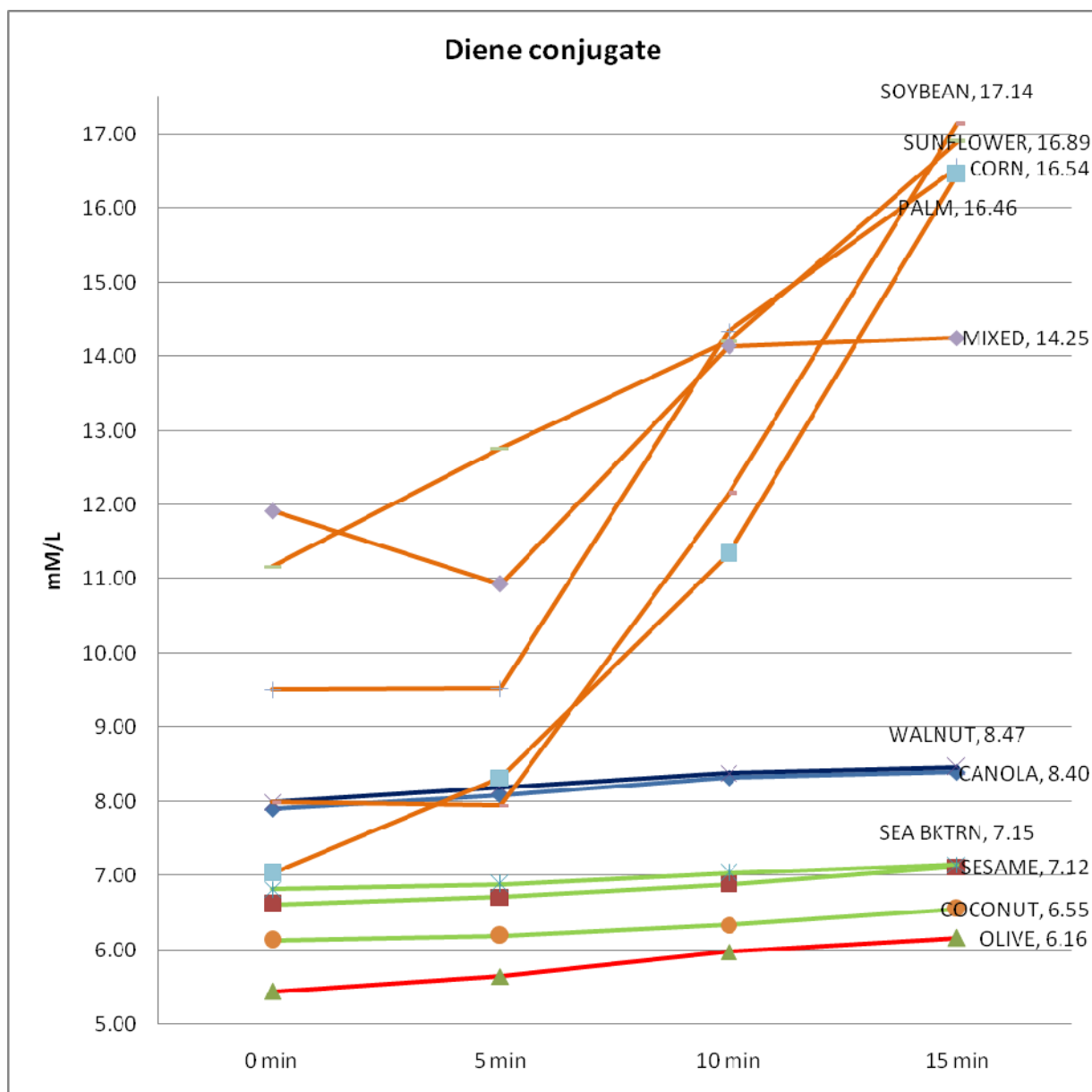


Figura 9. Variația dienelor conjugate în uleiuri tratate cu microunde

Discuții

Temperaturile au crescut în mod diferit pentru diferitele tipuri de uleiuri, uleiul de porumb având din nou cea mai mare temperatură pentru fiecare durată de încălzire (fig.1).

Microundele au încălzit uleiurile în 15 minute la temperaturi de peste 200 ° C. De asemenea, temperaturile atinse de uleiuri nu au fost uniforme pentru cuptorul cu microunde, cel mai probabil pentru că microundele influențează toate moleculele uleiurilor.

Studiul nostru confirmă mai multe ipoteze și observații din experimente anterioare ale altor autori, dar aduce și elemente de noutate.

Datele colectate confirmă faptul că, în majoritatea cazurilor, capacitatea antioxidantă a uleiurilor este legată de cantități crescute de α -tocoferol, polifenoli și flavonoide. Datele actuale au arătat că, înainte de a pierde polifenoli și flavonoizi în timpul încălzirii, uleiurile vor pierde mai întâi conținutul de α -tocoferol.

Am putut identifica o clasă de uleiuri rezistente la oxidare datorită retenției ridicate a α -tocoferolului (și probabil al altor tocoferoli care nu au fost măsurați) - ulei de palmier, porumb și amestec. Aceste uleiuri au prezentat o creștere mai mare a produselor de oxidare (TBARS și diene conjugate) după 15 minute de încălzire cu microunde. Un caz special este uleiul de măsline care, având una dintre cele mai mici retenții în capacitatea antioxidantă și α -tocoferol, a arătat o retenție excelentă în polifenoli și flavonoide, ceea ce a cauzat una dintre cele mai mici creșteri ale produselor de oxidare.

În majoritatea cazurilor, în urma evoluției produselor de oxidare cu timpul de încălzire am observat că, de obicei, după 5 minute de încălzire nu există creșteri semnificative. După 10 minute de tratament cu microunde, atât TBARS, cât și dienele conjugate au început să crească. După 15 minute de încălzire cu microunde am găsit creșteri de peste 100% în ambele TBARS și diene conjugate. Așadar putem concluziona că o scurtă încălzire de maxim 10 minute nu va afecta dramatic calitatea uleiurilor. La 15 minute și după ce am descoperit că o serie de uleiuri au creșteri uriașe în produsele de oxidare atât din uleiuri cu retenție antioxidantă mai scăzută - ulei de nucă, rapiță, soia și floarea-soarelui cât și uleiurile cu cea mai mare retenție în TEAC și α -tocoferol - palmier, porumb și ulei mixt.

Apariția unor efecte pro-oxidative în timpul încălzirii cu microunde a fost evidențiată în cazul α -tocoferolului și flavonoidelor

Stabilitatea antioxidantă a uleiurilor este în final stabilită de echilibrul care se atinge între procesele antioxidante și pro-oxidative care sunt influențate atât de condițiile de încălzire cât și de concentrația de tocoferoli și flavonoide.

Ar fi de interes aprofundarea studiului acestor procese prin determinarea contribuției individuale a diverselor flavonoide și a tipurilor de tocoferoli implicate în echilibrul proceselor antioxidante/prooxidante ce apar în timpul încălzirii cu microunde a uleiurilor alimentare.

Cunoașterea acestor interacțiuni ar putea duce la îmbunătățirea uleiurilor alimentare astfel încât acestea să aibă o rezistență crescută la procesele oxidative și implicit o utilizabilitate mai îndelungată la gătit și posibile efecte nedorite asupra sănătății consumatorilor cât mai reduse.

Modificări în uleiuri încălzite în cuptorul electric

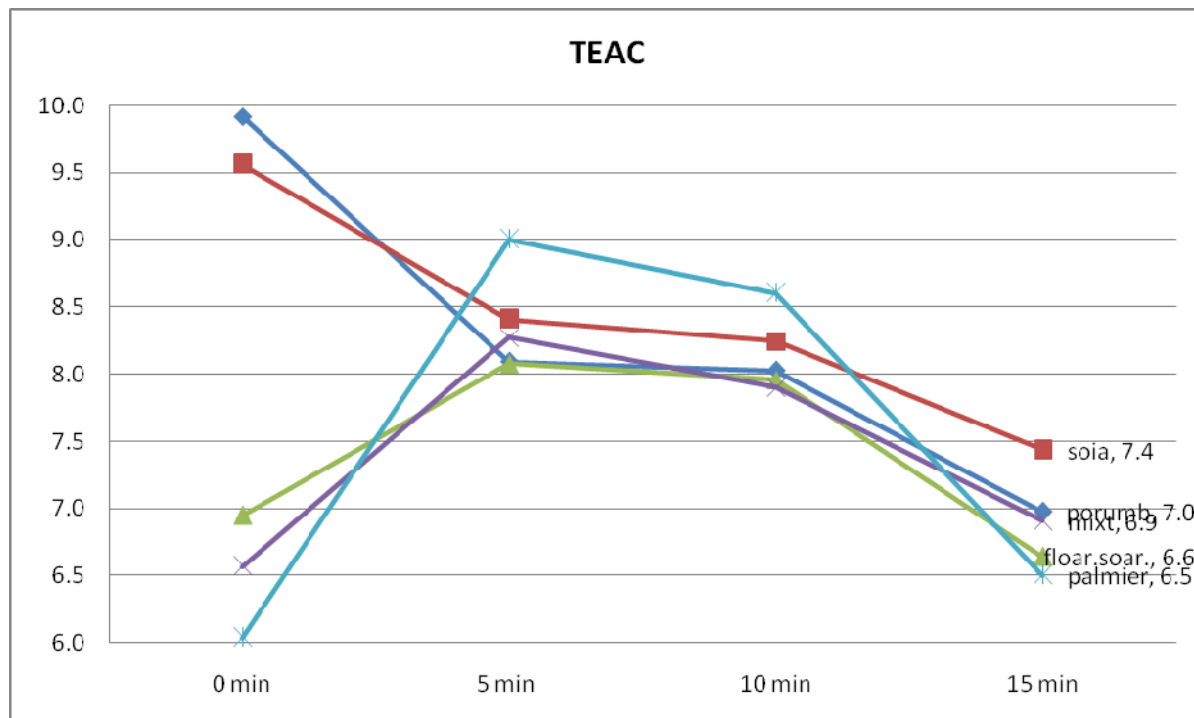


Figura 10. Evoluția TEAC în uleiuri tratate în cuptorul cu convecție

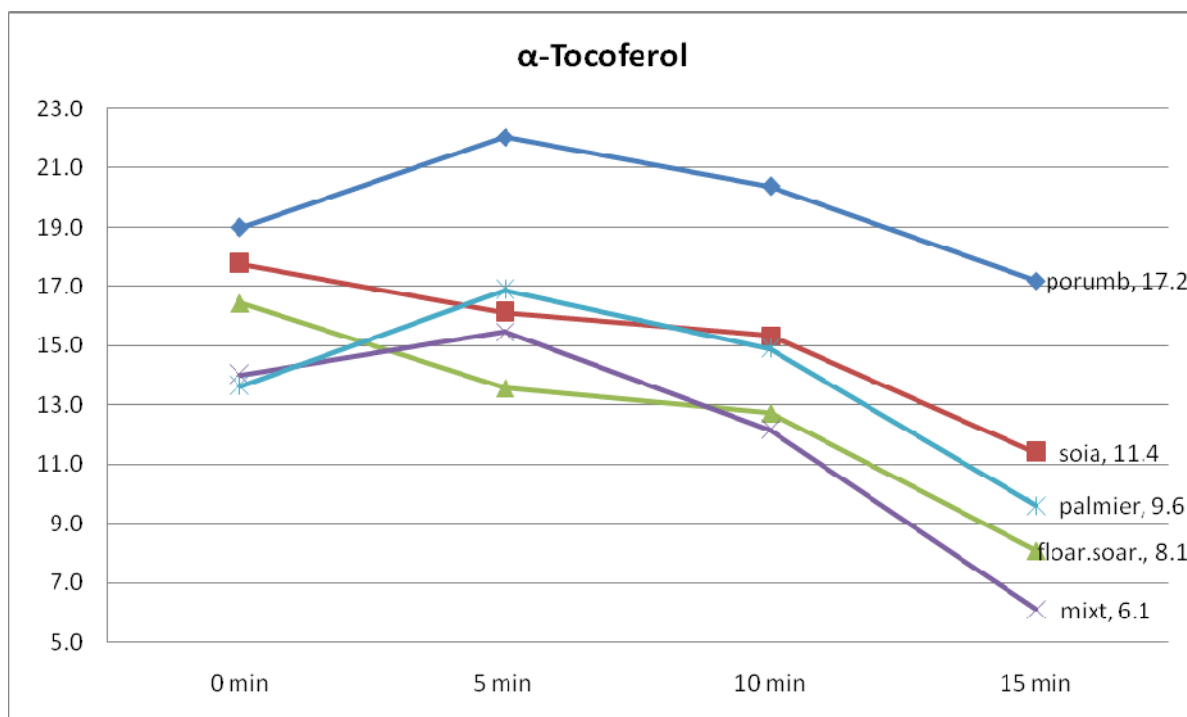


Figura 11. Variația α -tocoferolului în uleiuri tratate în cuptorul cu convecție

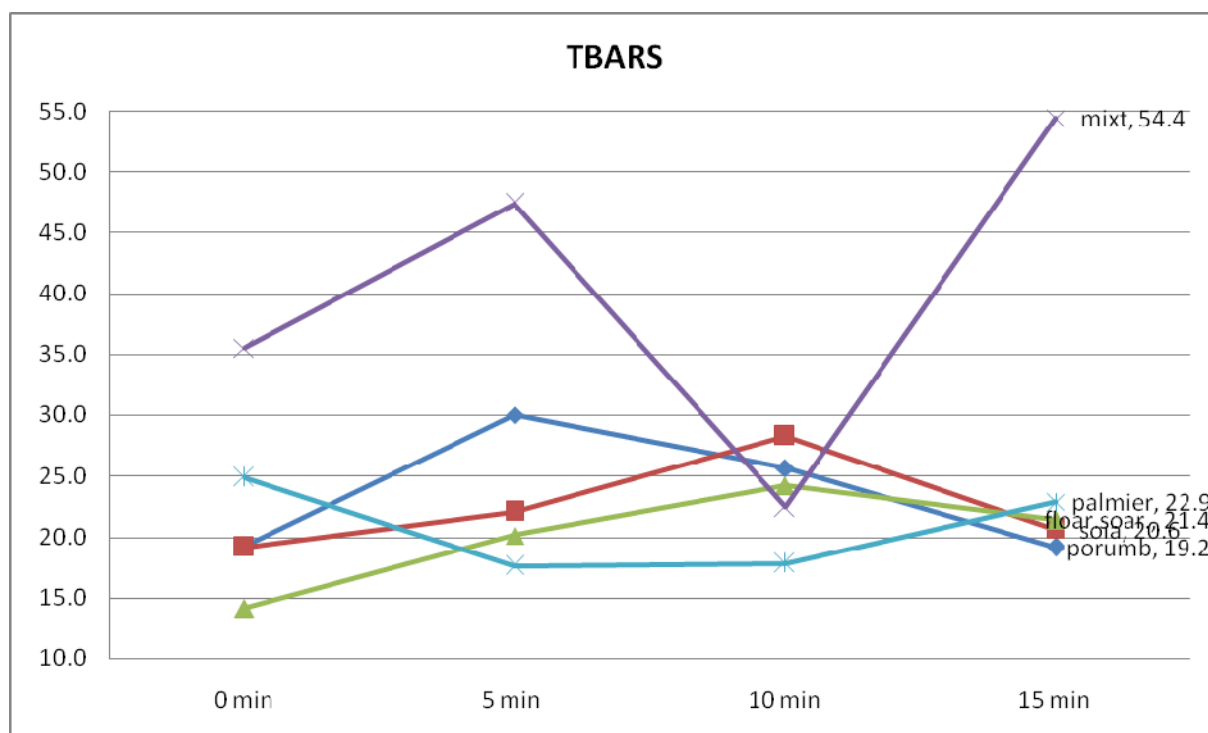


Figura 12. Variația TBARS în uleiuri tratate în cuptorul cu convecție

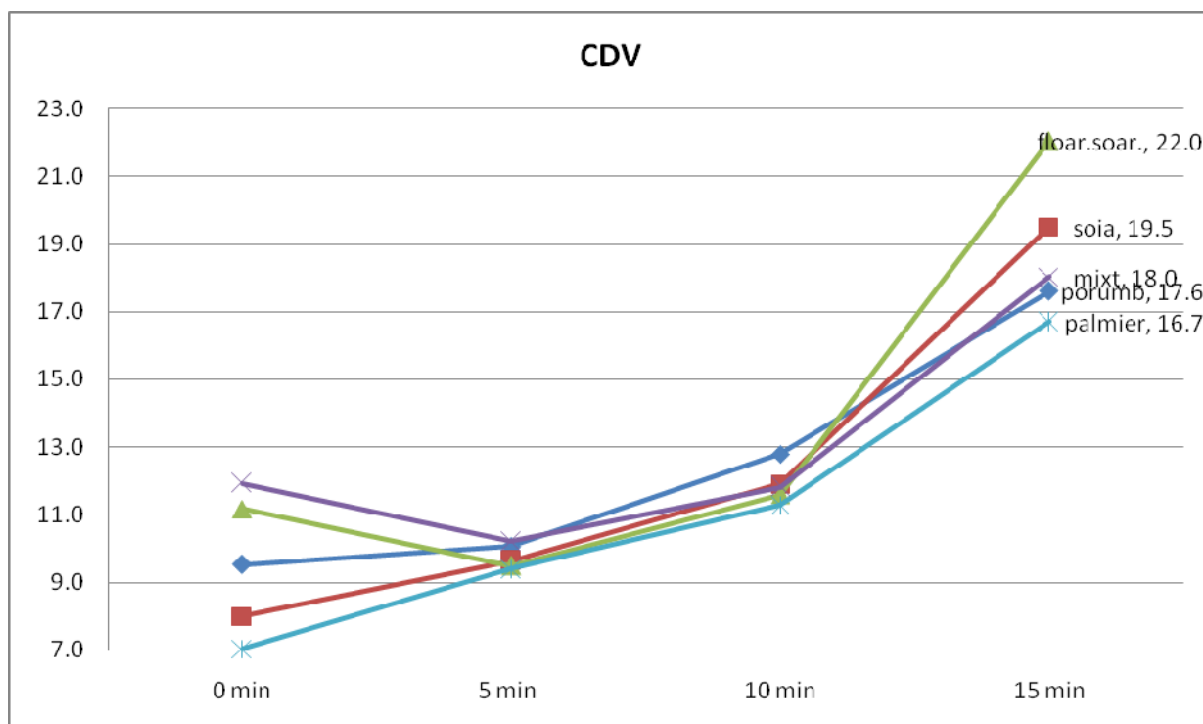


Figura 13. Variația dienelor conjugate în uleiuri tratate în cuptorul cu convecție

Discuții

Efectele proceselor de peroxidare sunt limitate de capacitatea antioxidantă nativă a uleiurilor. Creșterea valorilor determinate de diene conjugate și MDA se datorează proceselor oxidative care în mod obișnuit dau naștere la hidroperoxizi, acizi dienoici conjugați, epoxizi, hidroxizi și cetone. Acești compuși de oxidare primară pot fi oxidați la rândul lor și se pot rupe în fragmente mai mici sau să rămână în molecula trigliceridelor și să se lege unii cu alții, ducând la formarea de trigliceride dimerice și polimerice (Moreau, 2011).

Asocierea determinării malondialdehidei, un produs secundar al peroxidării lipidice, cu un produs inițial al peroxidării cum sunt dienele conjugate, obținute prin rearanjarea dublelor legături ale acizilor grași polinesaturați ce se petrece în timpul peroxidării, descrie procesele oxidative ce au loc în timpul încălzirii. Malondialdehida a fost generată prin descompunerea hidroperoxidilor acizilor grași cu trei sau mai multe duble legături, iar dienele conjugate pot apărea doar în timpul auto-oxidării acizilor grași polinesaturați și a esterilor acizilor grași

nesaturați cu doua duble legături (Moreau, 2011). Malondialdehida, un produs secundar al degradării acizilor grași polinesaturați oxidați este folosită în mod curent ca marker al peroxidării lipidice, deși nu este un marker specific. În timpul peroxidării lipidice, rearanjarea dublelor legături originale prezente în acizii grași polinesaturați duce la formarea dienele conjugate, care au proprietatea de a absorbi puternic la 233 nm în lumina ultravioletă.

Aceste doua metode sunt complementare; dienele conjugate pot fi considerate ca index al primelor deteriorări ale oxidării acizilor grași polinesaturați, în timp ce malondialdehida poate fi considerată ca produs secundar al degradării hidroperoxidilor.

Vitamina E sub forma de α -tocoferol este degradată odată cu oxidarea acizilor grași în timpul încălzirii, iar degradarea este direct proporțională cu temperatura și durata încălzirii. Valorile capacității antioxidante totale sunt inițial cele mai mari pentru uleiul de porumb (9.92 mM/l), urmat îndeaproape de cel de soia (9.56 mM/l) și scad după 5 minute de tratament termic urmând apoi aceeași tendință stabilă de scădere. Procesele de peroxidare ce au loc în uleiurile supuse tratamentului termic au un efect consistent asupra capacității antioxidante a acestora.

TBARS au avut o evoluție neconstantă pe durata experimentelor, dar putem aprecia că în general tendința este de creștere a valorilor MDA atât cu temperatura cât și cu durata de încălzire. Dienele conjugate au prezentat o creștere constantă pe parcursul experimentelor, cel mai probabil deoarece cantitatea de acizi grași polinesaturați ce sunt peroxidați crește în mod constant atât cu temperatura cât și cu perioada de încălzire pentru toate uleiurile folosite în experiment.

Putem spune că în timpul încălzirii uleiurilor vegetale comestibile utilizate în mod curent capacitatea antioxidantă totală, alături de cantitatea de vitamina E scade, în timp ce cantitatea de produși de peroxidare crește și aceste procese sunt mai intense în cazul utilizării microundelor decât la folosirea încălzirii dintr-o sursă convențională.

Cea mai bună retenție a α -tocoferolului în timpul încălzirii la microunde s-a manifestat la uleiul de palmier, pe când la încălzirea în cuptorul electric la uleiul de porumb.

Faptul că la încălzirea cu microunde cea mai bună capacitate antioxidantă totală nu aparține uleiului de palmier ci mai curând uleiurilor de soia și floarea-soarelui, iar la încălzirea

electrică uleiului de soia și palmier ne sugerează că mai există o serie de alți compuși în afara α -tocoferolului în compoziția uleiurilor care contribuie la protecția antioxidantă pe lângă tocoferoli și comportamentul acestora la încălzire poate avea un efect determinant.

De asemenea, rezultatele obținute pentru TBARS și diene conjugate arată că dintre uleiurile luate în studiu, efectele cele mai evidente ale oxidării primare au fost observabile la uleiul mixt și la cel de soia, indiferent de tipul de încălzire folosit. În ceea ce privește efectele secundare ale oxidării estimate prin conținutul de diene conjugate, valori semnificative s-au determinat pentru uleiul mixt, pentru cel de porumb și cel de floarea soarelui.

Determinarea unor parametri suplimentari, cum sunt carotenii și cantitatea de polifenoli și flavonoizi, ar putea completa tabloul proceselor oxidative ce se produc în uleiuri în timpul încălzirii acestora.

Diferențe de compoziție, capacitate antioxidantă și procese oxidative între uleiurile rafinate și uleiurile presate la rece

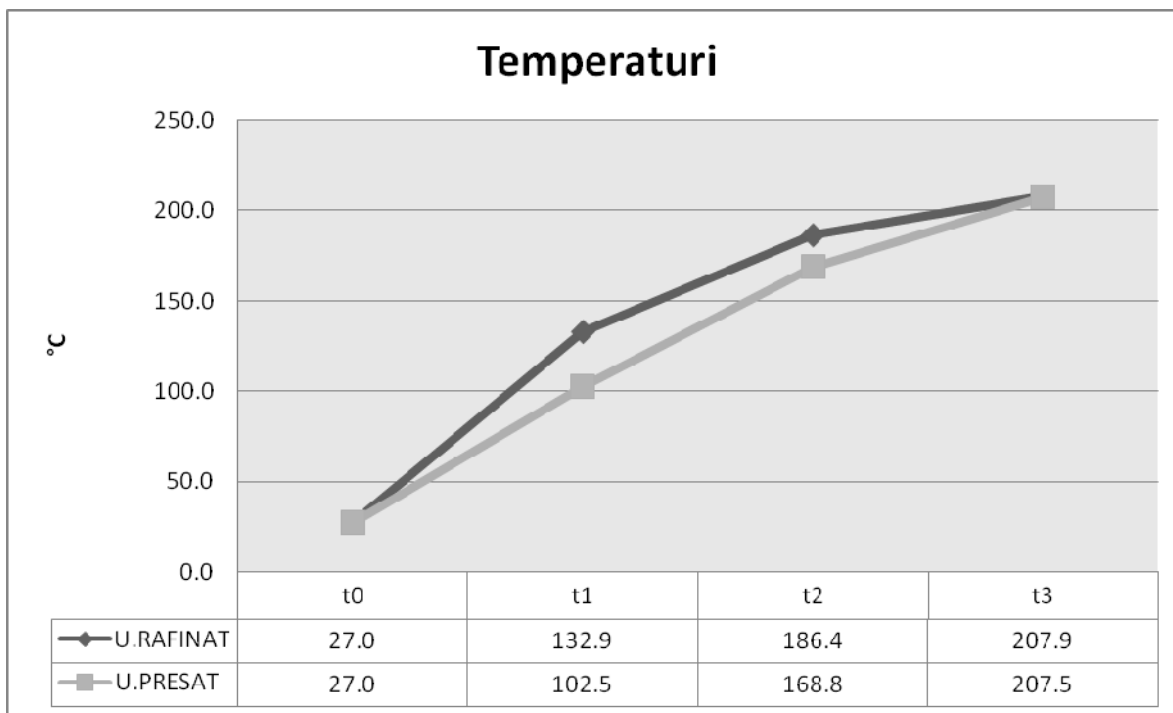


Figura 14. Variația temperaturii în uleiuri rafinate față de cele obținute prin presarea la rece în cuptorul cu microunde

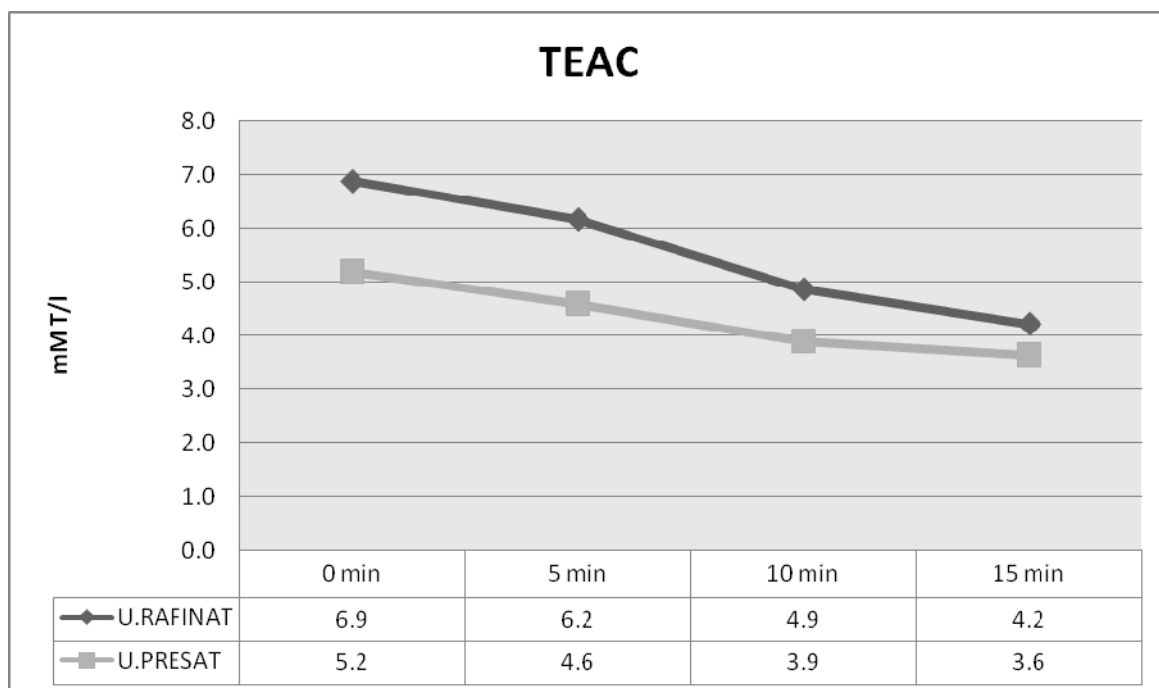


Figura 15. Variația TEAC în uleiuri rafinate față de cele virgine încălzite în cuptorul cu microunde

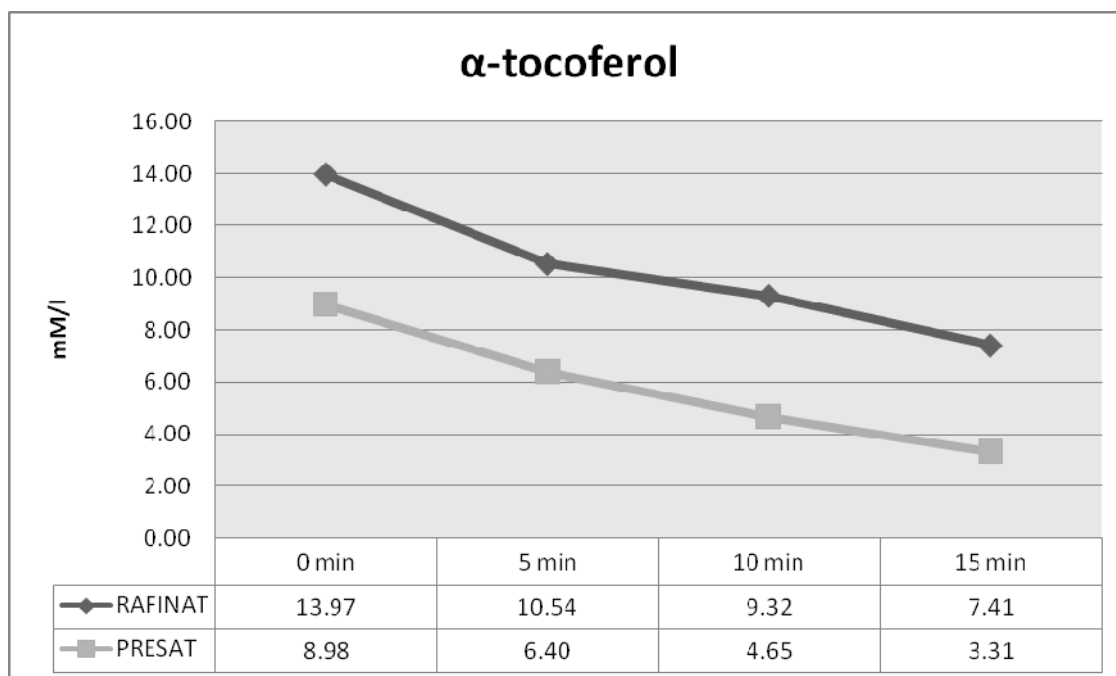


Figura 16 Comparația valorilor α -tocoferolului în uleiuri rafinate față de cele obținute prin presarea la rece

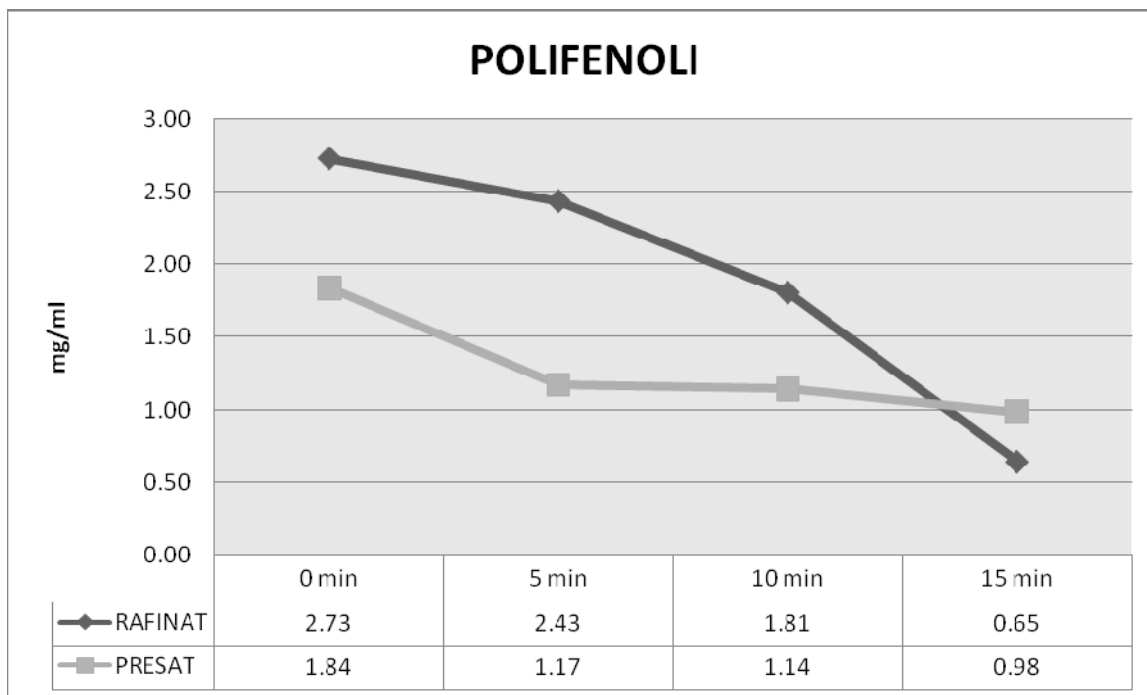


Figura 17. Variația cantității de polifenoli totali în uleiuri rafinate față de cele obținute prin presarea la rece

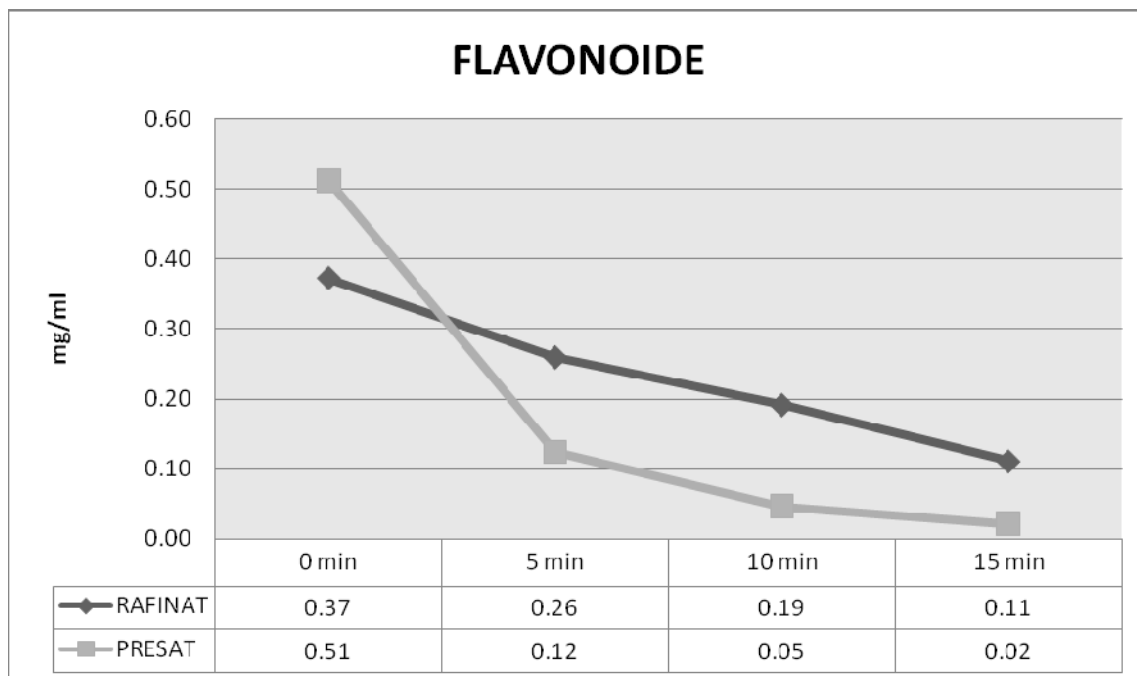


Figura 18 Variația cantității de flavonoide totale în uleiuri rafinate în timpul încălzirii cu microunde

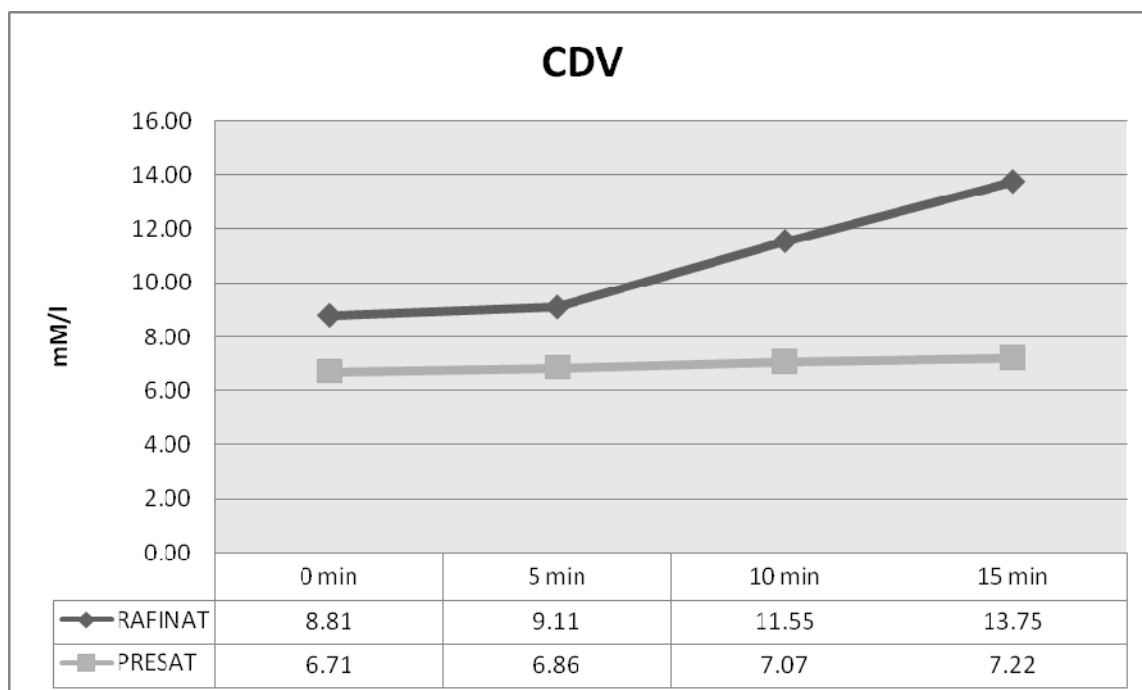


Figura 19. Variația dienelor conjugate în uleiuri rafinate față de cele obținute prin presarea la rece

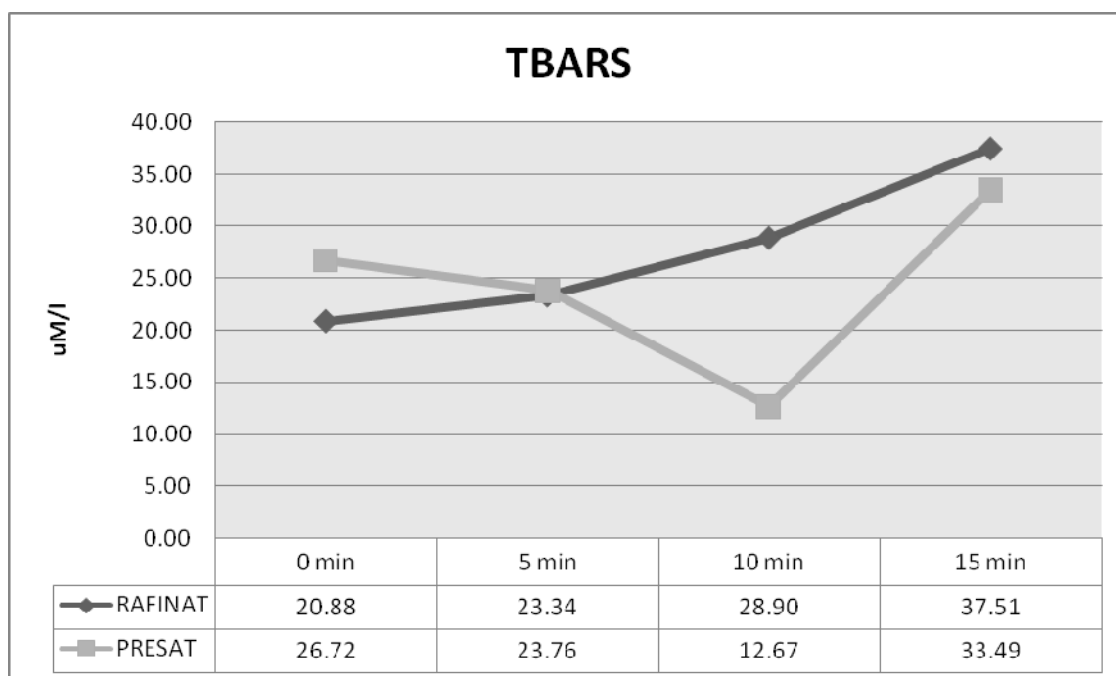


Figura 20 Variația TBARS în uleiuri rafinate față de cele obținute prin presarea la rece

Discuții

Comparând comportamentul capacității antioxidante, a substanțelor cu potențial antioxidant și a produșilor de oxidare măsurate în uleiuri rafinate față de cele măsurate în uleiuri obținute prin presarea la rece am putut observa următoarele:

- Temperatura crește mai rapid în uleiurile rafinate decât în cele presate la rece, dar după 15 minute în cuptorul cu microunde ajung la temperaturi similare;
- TEAC a prezentat valori mai mari în uleiurile rafinate decât în cele virgine, dar scăderea cu încălzirea a fost mai accentuată.
- După 15 minute de încălzire capacitatea antioxidantă scade cu 30% pentru uleiurile obținute prin presarea la rece și cu 40% pentru cele rafinate.
- Cantitatea de tocoferol scade brusc după 5 minute de tratament cu microunde în uleiurile rafinate și în mod liniar în cele virgine.
- După 15 minute de tratament în cuptorul cu microunde cantitatea de α -tocoferol scade cu 47% în uleiurile rafinate și cu 63% în cele nerafinate.
- În uleiurile rafinate polifenolii totali scad liniar până la 10 minute de încălzire pe când în cele virgine scad brusc după 5 minute la microunde și valorile medii finale au fost mai scăzute în uleiurile obținute prin presare decât în cele rafinate.
- Valorile polifenolilor totali au scăzut cu 76% în uleiurile rafinate, pe când în cele obținute prin presare cu doar 46%.
- Flavonoidele totale scad liniar în uleiurile rafinate și brusc după 5 minute de încălzire în uleiurile virgine.
- După 15 minute în cuptorul cu microunde scăderea totală a flavonoidelor pentru uleiurile rafinate a fost de 70% iar pentru cele nerafinate de 96%.
- Produșii de oxidare primară (CDV) au avut o creștere semnificativă pentru uleiurile rafinate și redusă pentru cele virgine.
- După 15 minute de încălzire dienele conjugate în uleiurile rafinate au crescut cu 56%, iar în cele virgine cu doar 7%.

- Uleiurile rafinate au o creștere constantă a nivelului TBARS în toate cele trei momente investigate pe când în cele virgine are loc o scădere inițială mai accentuată urmată de una liniară.
- După 15 minute de tratament termic creșterea TBARS față de valoarea inițială a fost de 79% în uleiurile rafinate și de doar 25% în cele virgine.

În concluzie, deși uleiurile rafinate au prezentat conform determinărilor efectuate valorile medii ale capacității antioxidante și compușilor antioxidanți sunt mai mari, și scăderea procentuală odată cu încălzirea este mai mare (cu excepția tocoferolului și flavonoidelor). De asemenea valorile markerilor de oxidare primară și secundară cresc în mod semnificativ mai accentuat în uleiurile rafinate decât în cele obținute prin presarea la rece.

Concluzii

Contribuții proprii

Există un interes crescut al consumatorilor asupra calității alimentelor și a efectelor acestora asupra sănătății umane. De asemenea au apărut numeroase studii asupra efectului microundelor atât asupra organismelor vii cât și asupra alimentelor. Rezultatele lor sunt contradictorii și există multe voci care afirmă că microundele denaturează calitatea alimentelor în diferite moduri, deși multe studii științifice au infirmat astfel de opinii.

Scopul principal studiilor de față a fost investigarea influenței încălzirii cu microunde asupra capacității antioxidante, compușilor antioxidanți și a celor de oxidare în uleiuri vegetale folosite în consumul uman în ideea de a identifica posibile riscuri de sănătate care ar putea apărea în consumul de zi cu zi.

În compoziția uleiurilor vegetale există o varietate surprinzătoare de compuși ce pot influența procesele oxidative, prooxidative și antioxidante. O primă estimare a acestora vine pe cale vizuală prin inspectarea culorii.

Din observațiile efectuate uleiurile mai închise la culoare în stare nativă au fost mai stabile oxidativ decât cele în culori mai deschise. Uleiurile cu retenție scăzută de antioxidanți au

avut culoarea în gama galben și au fost clare. Uleiurile cu retenție ridicată de antioxidanți au fost în paleta galben-vernă și portocalie în funcție de natura acestora. Uleiurile cu niveluri de polifenoli și flavonoide mai ridicate au avut o tentă verde (uleiul de măsline mai ales), iar cele cu un conținut mai accentuat de carotenoizi portocalii.

Teoretic, valorile capacității antioxidante totale sunt influențate de cantitatea de compuși antioxidanți și o influențează pe cea de compuși de oxidare din compoziția uleiurilor. Cu toate acestea, din punct de vedere statistic, valorile determinărilor efectuate în experimentul de față nu au prezentat o corelație pozitivă între capacitatea antioxidantă și compușii antioxidanți.

Am utilizat trei metode de determinare a capacității antioxidante calibrate cu același compus pentru a vedea în ce măsură vom obține rezultate similare între acestea, cum se corelează aceste valori ale capacității antioxidante cu compușii antioxidanți și dacă se pot face pe baza lor estimări asupra rezistenței uleiurilor la procese oxidative.

TEAC în uleiurile native a arătat o corelație negativă cu flavonoidele totale, FRAP corelații negative cu α -tocoferolul și polifenolii totali, iar CUPRAC nu a avut corelații. Deși era de așteptat ca determinările capacității antioxidante să aibă corelații pozitive cu antioxidanții, nu a fost așa. Corelațiile negative obținute surprind cel mai probabil existența, pe lângă efectul antioxidant, și a unor procese pro-oxidante, a unor interacțiuni complexe ce au loc în uleiurile vegetale. Dintre cele trei metode de determinare a capacității antioxidante folosite FRAP a fost singura care a arătat o corelație negativă cu produșii secundari de oxidare (TBARS).

Dintre antioxidanți, α -tocoferolul a arătat corelații pozitive cu polifenolii totali, ceea ce era de așteptat întrucât contribuția similară a tocoferolilor și polifenolilor la procese antioxidante este bine documentată, dar și cu dienele conjugate. Și polifenolii totali au prezentat o corelație pozitivă cu dienele conjugate. Apariția unei corelații pozitive între antioxidanți și compuși primari de oxidare este surprinzătoare.

Am studiat în continuare aceste aspecte sub influența încălzirii cu microunde și a încălzirii prin convecție.

S-a observat că sursa de încălzire determină un comportament termic diferit în timpul încălzirii. În cuptorul cu microunde temperatura uleiurilor crește rapid și are valori diferite pentru

diversele tipuri de uleiuri, pe când în cuptorul electric cu convecție creșterea a fost mai lentă și uniformă. Valorile finale după 15 minute sunt mai ridicate în cazul microundelor decât cele găsite la cuptorul electric cu convecție.

Capacitatea antioxidantă a uleiurilor este legată de cantități crescute de α -tocoferol, polifenoli și flavonoide. Datele actuale au arătat că, înainte de a pierde polifenoli și flavonoizi în timpul încălzirii, uleiurile vor pierde mai întâi conținutul de α -tocoferol.

Am putut identifica uleiuri rezistente la oxidare datorită retenției ridicate a α -tocoferolului - ulei de palmier, porumb și amestec care au prezentat o creștere mai mare a produselor de oxidare (TBARS și diene conjugate) după 15 minute de încălzire cu microunde.

Uleiul de măsline, având una dintre cele mai mici retenții în capacitatea antioxidantă și α -tocoferol, a arătat o retenție excelentă în polifenoli și flavonoide și una dintre cele mai mici creșteri ale produselor de oxidare.

În majoritatea cazurilor după 5 minute de încălzire nu există creșteri semnificative ale produșilor de oxidare. După 10 minute de tratament cu microunde, atât TBARS, cât și dienele conjugate încep să crească. După 15 minute de încălzire cu microunde am găsit creșteri de peste 100% în TBARS și diene conjugate. Putem concluziona că o scurtă încălzire de maxim 10 minute nu va afecta dramatic calitatea uleiurilor.

La 15 minute și după am descoperit că o serie de uleiuri au creșteri uriașe în produsele de oxidare atât din uleiuri cu retenție antioxidantă mai scăzută - ulei de nucă, soia și floarea-soarelui cât și uleiurile cu cea mai mare retenție în TEAC și α -tocoferol - palmier, porumb și ulei mixt.

Apariția unor efecte pro-oxidative în timpul încălzirii cu microunde a fost evidențiată în cazul α -tocoferolului și flavonoidelor

Ar fi de interes aprofundarea studiului acestor procese prin determinarea contribuției individuale a diverselor flavonoide și a tipurilor de tocoferoli implicate în echilibrul proceselor antioxidante/prooxidante ce apar în timpul încălzirii cu microunde a uleiurilor alimentare.

Cunoașterea acestor interacțiuni ar putea duce la îmbunătățirea uleiurilor alimentare astfel încât acestea să aibă o rezistență crescută la procesele oxidative și implicit o utilizabilitate mai îndelungată la gătit și posibile efecte nedorite asupra sănătății consumatorilor cât mai reduse.

Vitamina E sub forma de α -tocoferol este degradată odată cu oxidarea acizilor grași în timpul încălzirii, iar degradarea este direct proporțională cu temperatura și durata încălzirii. Valorile capacității antioxidante totale sunt inițial cele mai mari pentru uleiul de porumb (9.92 mM/l), urmat îndeaproape de cel de soia (9.56 mM/l) și scad după 5 minute de tratament termic urmând apoi aceeași tendință stabilă de scădere.

TBARS au avut o evoluție neconstantă pe durata experimentelor, dar putem aprecia că în general tendința este de creștere a valorilor MDA atât cu temperatura cât și cu durata de încălzire.

Dienele conjugate au prezentat o creștere constantă pe parcursul experimentelor, cel mai probabil deoarece cantitatea de acizi grași polinesaturați ce sunt peroxidati crește în mod constant atât cu temperatura cât și cu perioada de încălzire pentru toate uleiurile folosite în experiment.

Putem spune că în timpul încălzirii uleiurilor vegetale comestibile utilizate în mod curent capacitatea antioxidantă totală, alături de cantitatea de vitamina E scade, în timp ce cantitatea de produși de peroxidare crește și aceste procese sunt mai intense în cazul utilizării microundelor decât la folosirea încălzirii dintr-o sursă convențională.

Cea mai bună retenție a α -tocoferolului în timpul încălzirii la microunde s-a manifestat la uleiul de palmier, pe când la încălzirea în cuptorul electric la uleiul de porumb.

Faptul că la încălzirea cu microunde cea mai bună capacitate antioxidantă totală nu aparține uleiului de palmier ci mai curând uleiurilor de soia și floarea-soarelui, iar la încălzirea electrică uleiului de soia și palmier ne sugerează că mai există o serie de alți compuși în afara α -tocoferolului în compoziția uleiurilor care contribuie la protecția antioxidantă pe lângă tocoferoli și comportamentul acestora la încălzire poate avea un efect determinant.

De asemenea rezultatele obținute pentru TBARS și diene conjugate arată că dintre uleiurile luate în studiu, efectele cele mai evidente ale oxidării primare au fost observabile la uleiul mixt și la cel de soia, indiferent de tipul de încălzire folosit. În ceea ce privește efectele secundare ale oxidării estimate prin conținutul de diene conjugate, valori semnificative s-au determinat pentru uleiul mixt, pentru cel de porumb și cel de floarea soarelui.

Comparând comportamentul capacității antioxidante, a substanțelor cu potențial antioxidant și a produșilor de oxidare măsurate în uleiuri rafinate față de cele măsurate în uleiuri obținute prin presarea la rece am putut observa următoarele:

- deși uleiurile rafinate au prezentat conform determinărilor efectuate valorile medii ale capacității antioxidante și compușilor antioxidanți sunt mai mari, și scăderea procentuala odată cu încălzirea este mai mare (cu excepția tocoferolului și flavonoidelor)
- valorile markerilor de oxidare primară și secundară cresc în mod semnificativ mai accentuat în uleiurile rafinate decât în cele obținute prin presarea la rece.

Concluzii generale

Obiectivele studiului au fost atinse, rezultatele obținute susținând ipotezele propuse. S-a demonstrat influența determinanta a compușilor antioxidanți determinați asupra rezistenței la oxidare a uleiurilor, mai ales a tocoferolului și flavonoidelor. A fost verificată o ipoteză asupra comportamentului antioxidanților în timpul încălzirii, și anume flavonoidele se consumă primele în timpul oxidării ducând la protejarea tocoferolului, astfel efectul antioxidant este prelungit. Corelațiile rezultatelor sugerează pe lângă efectul antioxidant și apariția unor procese prooxidante pentru tocoferol și flavonoide. S-a arătat că o scurtă încălzire cu microunde de maxim 10 minute nu va afecta dramatic calitatea uleiurilor.

S-au identificat uleiuri cu creșteri foarte mari în produsele de oxidare:

- uleiuri cu retenție antioxidantă mai scăzută - ulei de nucă, rapiță, soia și floarea-soarelui
- uleiuri cu cea mai mare retenție în TEAC și α -tocopherol - palmier, porumb și ulei mixt.
- efectele cele mai evidente ale oxidării primare au fost observabile la uleiul mixt și la cel de soia, indiferent de tipul de încălzire folosit.
- efectele secundare ale oxidării semnificative s-au determinat pentru uleiul mixt, pentru cel de porumb și cel de floarea soarelui.

Comparând uleiurile rafinate cu cele virgine s-a constatat ca:

- uleiurile rafinate au prezentat valorile capacității antioxidante și compușilor antioxidanți mai mari, dar și scăderea procentuală odată cu încălzirea mai mare
- valorile markerilor de oxidare primară și secundară cresc în mod semnificativ mai accentuat în uleiurile rafinate decât în cele obținute prin presarea la rece.

Având în vedere rezultatele studiului consideram ca ar fi utilă introducerea unui screening mai amănunțit al compușilor antioxidanți și capacității antioxidante a uleiurilor în practica industrială.

Avantaje:

- identificarea produselor/loturilor care vor fi susceptibile la procese oxidative, ducând la câștiguri economice prin identificarea produselor care ar putea avea o durată de viață la raft mai redusă datorită rezistenței scăzute la oxidare sau ar putea avea efecte nedorite asupra sănătății consumatorilor;
- îmbunătățirea proceselor de producție prin identificarea compușilor-cheie ce cresc rezistența la oxidare, care ar putea fi protejați în timpul operațiunilor asociate producției de uleiuri comestibile sau prin adăugarea de antioxidanți.

Dezavantaje:

- metodele folosite pentru determinarea capacității antioxidante sunt încă insuficient de bine interesate pentru a putea fi folosite cu încredere absolută;
- metoda de identificare a compușilor de oxidare secundari (TBARS) este nespecifică;
- introducerea unui pas suplimentar în procesul de producție ar duce la creșterea costurilor indirecte.

Studiul nu a putut face o corelație clară între cele trei metode de determinare a capacității antioxidante utilizate și nici între acestea și valorile compușilor antioxidanți investigați. Din această cauză încă nu putem spune cu certitudine că un screening ca cel sugerat ar duce la o identificare corectă a celor mai bune uleiuri din punct de vedere al rezistenței la oxidare.

Direcții de cercetare

O prima direcție de cercetare este verificarea aceleiași baterii de teste pe un număr mai mare de uleiuri de diferite tipuri pentru a obține date statistice care să ofere concluzii robuste.

O a doua necesitate este identificarea mai precisă a compoziției în acizi grași ca și a polifenolilor/flavonoidelor din uleiurile vegetale comestibile prin metode mai sensibile decât cele spectrofotometrice (electroforeza capilară, HPLC etc.). Aceasta ar permite identificarea exactă a compușilor care contribuie la efectele anti și prooxidante.

O altă direcție de cercetare este studiul uleiurilor pregătite conform protocolului într-un sistem digestiv *in vitro* și/sau în modele celulare din epiteliul intestinal, care ar permite observarea nemijlocită a efectului ingerării uleiurilor alimentare încălzite asupra digestiei umane și estimarea mai exactă a riscurilor de sănătate implicate.

BIBLIOGRAFIE

1. Aladedunye, F., Przybylski, R., Matthaus, B., 2015. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 0.
2. Alam, M.N., Bristi, N.J., Rafiquzzaman, M., 2013. *Saudi Pharm. J.* 21, 143–152.
3. Albi, T., Lanzón, A., Guinda, A., León, M., Pérez-Camino, M.C., 1997. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3795–3798.
4. Apak et al, 2007. *Molecules* 12, 1496–1547.
5. Belitz, H.-D. (Hans-D., Grosch, W. (Werner), Schieberle, P., 2009. *Food Chemistry*. Springer-Verlag.
6. Chiou, A., Kalogeropoulos, N., Boskou, G., Salta, F.N., 2012. *Food Chem.* 133, 1255–1263.
7. Emken, E.A., 1984. *Annu. Rev. Nutr.* 4, 339–76.
8. Emken, E.A., Adlof, R.O., Rohwedder, W.K., Gulley, R.M., 1989. *Lipids* 24, 61–9.
9. Gómez-Alonso, S., Fregapane, G., Desamparados Salvador, M., Gordon, M.H., 2003. *J. Agric. Food Chem.* 51, 667–672.
10. Guichardant, M., Chen, P., Liu, M., Calzada, C., Colas, R., Véricel, E., Lagarde, M., 2011. *Chem. Phys. Lipids* 164, 544–548.
11. Gunstone, F.D., 2011. Edited by.
12. Gutteridge, J.M., Halliwell, B., 2000. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899, 136–147.
13. Hassanein, M.M., El-Shami, S.M., Hassan El-Mallah, M., 2003. *Grasas y Aceites* 54, 343–349.
14. Hunter, J.E., 2001. *Lipids* 36, 655–68.
15. Jr, D.R.J., Gross, M.D., Tapsell, L.C., 2009. 89, 1543–1548.
16. Juárez, M.D., Osawa, C.C., Acuña, M.E., Sammán, N., Gonçalves, L.A.G., 2011. *Food Control* 22, 1920–1927.
17. Judd, J.T., Clevidence, B.A., Muesing, R.A., Wittes, J., Sunkin, M.E., Podczasy, J.J., 1994. *Am. J. Clin. Nutr.* 59, 861–8.
18. Kalantzakis, G., Blekas, G., Pegklidou, K., Boskou, D., 2006. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108, 329–335.
19. Kortenska, V.D., Yanishlieva, N. V., Kasaikina, O.T., Totzeva, I.R., Boneva, M.I., Russina, I.F., 2002. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104, 513–519.
20. Lassen, A., Ovesen, L., 1995. *Nutr. Food Sci.* 95, 8–10.

21. Mageed, M.A.A.E., Mansour, A.F., Massry, K.F.E., Ramadan, M.M., Shaheen, M.S., 2011. *J. Essent. Oil-Bearing Plants* 14, 214–223.
22. Marinova, E.M., Seizova, K.A., Totseva, I.R., Panayotova, S.S., Marekov, I.N., Momchilova, S.M., 2012. *Bulg. Chem. Commun.* 44, 57–63.
23. Moreau, R.A., 2011. Corn Oil, in: *Vegetable Oils in Food Technology*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp. 273–289.
24. Paciulli, M., Ganino, T., Carini, E., Pellegrini, N., Pugliese, A., Chiavaro, E., 2016. *J. Food Sci. Technol.* 53, 2443–2451.
25. Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Díaz- Rubio, M.E., Serrano, J., Goñi, I., Saura-Calixto, F., 2008. *Food Res. Int.* 41, 274–285.
26. Ramadan, M.F., Kroh, L.W., Mersel, J., 2003. *Society* 51, 6961–6969.
27. Rodrigues, N., Malheiro, R., Casal, S., Asensio-S.-Manzanera, M.C., Bento, A., Pereira, J.A., 2012. *Food Chem. Toxicol.* 50, 2894–2901.
28. Schirmer, M.A., Phinney, S.D., 2007. *J. Nutr.* 137, 1430–5.
29. Tan, C.P., Man, Y.B.C., Jinap, S., Yusoff, M.S.A., 2001. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78, 1227–1232.
30. Yoshida, H., Hirakawa, Y., Tomiyama, Y., Mizushina, Y., Technology, H., 2003. *Eur. J. Sci. Technol.* 105, 351–358.
31. YOSHIDA, H., HIROOKA, N., KAJIMOTO, G., 1991. *J. Food Sci.* 56, 1042–1046.
32. Zurier, R.B., Rossetti, R.G., Jacobson, E.W., DeMarco, D.M., Liu, N.Y., Temming, J.E., White, B.M., Laposata, M., 1996. *Arthritis Rheum.* 39, 1808–17.