



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 00894

(22) Data de depozit: 24.09.2010

(41) Data publicării cererii:
28.10.2011 BOPI nr. 10/2011

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE
ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
CLUJ-NAPOCA, STR. MĂNĂȘTUR NR.3-5,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• SOCACIU CARMEN, STR. MĂNĂȘTUR
NR.3-5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• RANGĂ FLORICUȚA, STR. MĂNĂȘTUR
NR.3-5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• FETEA FLORINELA, STR. MĂNĂȘTUR
NR.3-5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) PROCEDURI DE EVALUARE SPECTROSCOPICĂ UV-VIS ȘI
FTIR (FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY)
A CALITĂȚII ȘI AUTENTICITĂȚII ULEIURILOR VEGETALE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de evaluare a calității unor uleiuri vegetale. Procedeul conform invenției include tehnici complementare de spectrometrie UV-Vis și FT-IR a calității și autenticității uleiurilor vegetale, prin care se pun în evidență biomarkeri cum ar fi compușii fenolici, pigmentii carotenoidici și clorofilieni, cate-

chinele și acizii grași, precum și procesele de alterare oxidativă.

Revendicări: 4
Figuri: 10



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. 2010 00894
Data depozit ..24.09.2010....

24

PROCEDURI DE EVALUARE SPECTROSCOPICĂ UV-VIS ȘI FTIR (SPECTROSCOPIE ÎN INFRAROȘU CU TRANSFORMANTĂ FOURIER) A CALITĂȚII ȘI AUTENTICITĂȚII ULEIURILOR VEGETALE

DESCRIEREA INVENȚIEI

Prezenta invenție se referă la utilizarea tehnicilor spectroscopice moleculare, de tip spectrometrie de absorbție UV-Vis și spectrometrie vibrațională de tip Infraroșu (cu Transformantă Fourier) pentru a evidenția biomarkerii de autenticitate a uleiurilor vegetale.

Uleiurile vegetale sunt caracterizate de regulă prin indicatori generali de calitate (pecent de apă, indice de peroxid, indice de iod, indice de refracție) și fac obiectul unor standarde de calitate europene sau naționale, specifice uleiurilor și procedurile aferente.

În ultimii 15 ani, ținând cont de implicațiile nutriționale și biomedicale ale uleiurilor vegetale bogate în antioxidanți (acizi grași mono- și polinesaturați, pigmenți, steroli cu acțiune antagonista față de colesterol) interesul pentru evaluarea calității și a autenticității acestora a crescut semnificativ. S-au elaborat tehnici moderne de tip gaz-cromatografie (GC) cuplate cu detectie în flacără (FID) sau spectrometrie de masă (MS) pentru a identifica și separa acizii grași nesaturați și pentru a confirma autenticitatea sau a depista falsificarea uleiurilor virgine cu uleiuri rafinate de același tip sau a uleiurilor de valoare prin amestec cu uleiuri inferioare.

Din analiza standardelor ISO publicate de ISO/TC 34/SC11 " Animal and vegetable fats and oils ", cele care se referă, indirect la analiza unor biomarkeri de autenticitate sunt ISO 12228:1999 – Determinarea conținutului de steroli individuali și steroli totali prin metoda gaz cromatografică și respectiv, ISO 15788-1:1999 - Determinarea stigmastadienelor prin GC cu coloana capilară (Metoda de referință)

Standardele europene (CEN) care se referă la analiza uleiurilor vegetale sunt CEN/TC 307 - Standardizarea metodelor (fizice și chimice) de eșantionare și analiză a uleiurilor vegetale, animale și a reziduurilor, în scopul armonizării metodelor europene cu cele internaționale de tip ISO și CEN 14103 - Determinarea conținutului de esteri metilici ai acizilor grași (FAME)

Normele CODEX STAN 19-1981, Rev 2-1999 aplicate la uleiuri și grăsimi comestibile (gliceride, fosfatide, acizi grași liberi) includ modalități de discriminare între compoziția uleiurilor virgine și presate la rece (categoria A) și a celor rafinate (categoria B). Astfel, uleiurile virgine și presate la rece se obțin exclusiv prin metode fizice (mecanice) care nu alterează compoziția chimică originală a semințelor oleaginoase din care se obțin, se pot purifica prin spălare cu apă, decantare, filtrare și centrifugare, fără adausuri de aditivi (coloranți). Sunt permise adausuri de arome naturale sau identice naturale, antioxidanți naturali (acid ascorbic 500 ppm).

Până în prezent autentificarea produselor alimentare se face prin metode de tip GC cuplate cu FID sau MS, metode ce necesită aparatură și reactivi foarte scumpi, personal specializat și proceduri laborioase de izolare, pre-procesare și analiză. Prezentul brevet propune utilizarea a

două proceduri spectroscopice care sunt mai puțin costisitoare și oferă informații în timp util, rapid și nedistructiv al probelor de uleiuri de orice tip sau clasă de puritate.

Cele două proceduri la care se referă brevetul sunt:

1. Analiza prin spectrometrie moleculară UV-Vis care permite identificarea tipurilor de molecule ce conțin legături simple sau duble (în sistem izolat sau conjugat) pe baza capacității unor grupări organice cu legături duble de a absorbi radiații din domeniul ultraviolet (UV) (180-360 nm) sau vizibil (360-800 nm). Moleculele cu legături simple sau legături duble izolate din uleiurile vegetale (acizii grași saturați sau acizii grași nesaturați în formă liberă sau esterificată, sterolii, aminoacizii, esterii compușilor fenolici) absorb în domeniul UV, în timp ce moleculele cu un număr mai mare de 9 legături duble conjugate absorb radiație din domeniul Vizibil (VIS) și sunt colorate. Este cazul pigmentilor clorofilieni, carotenoidici sau chinonici, care sunt liposolubili și se găsesc în uleiuri. Domeniile specifice de absorbție maximă a acestor tipuri moleculare sunt 270 -280 nm (derivați de acizi fenolici), 260 și 340 nm (flavonoide), 420 - 470 nm (carotenoide și apocarotenoide), 615, 670 nm (clorofile).

2. Spectroscopia în Infraroșu (FT-IR) este utilizată pentru identificarea grupărilor funcționale și a regiunilor specifice de recunoaștere a amprentei („fingerprint”) din uleiuri, direct, fără o prelucrare preliminară. amestecuri de molecule.

Aceste tehnici sunt frecvent utilizate în cuantificarea componentelor majore ale uleiurilor, utilizând ca variante de masurare analiza IR cu absorbție (microcelula cu diamant) sau cu transmise atenuată (ATR), o metodă recentă, cu sensibilitate înaltă.

Literatura de specialitate arată că spectroscopia vibrațională FTIR în combinație cu o analiză statistică multivariată, poate discrimina cu succes diferite tipuri de ulei și de asemenea, poate identifica uleiul de masline virgin sau rafinat, sau fraudat cu ulei de soia, floarea soarelui sau uleiuri inferioare. Spectrul generic de tip FTIR pentru uleiuri este prezentat în Fig.1.

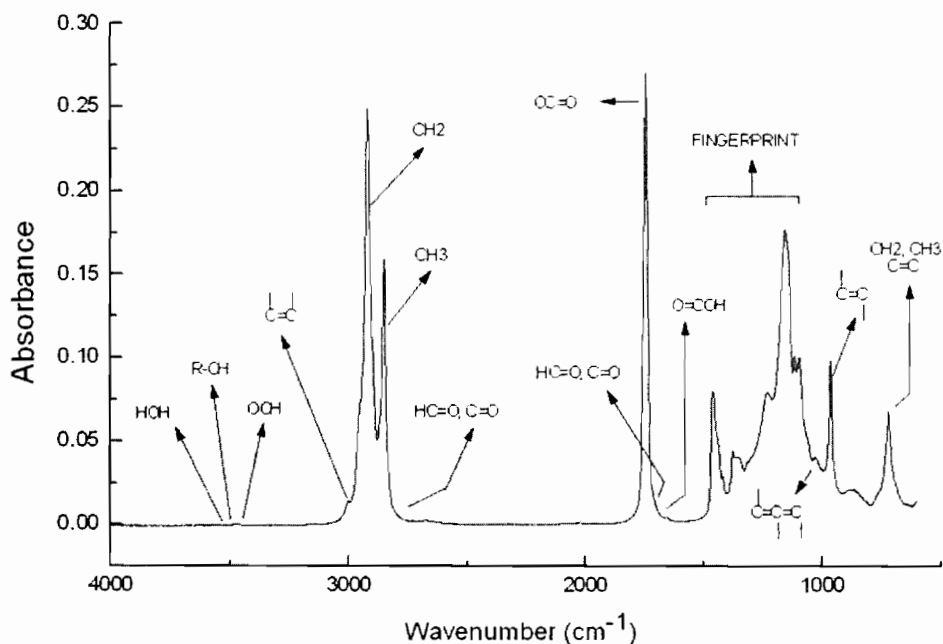


Fig. 1. Spectrul generic FTIR de evidențiere a amprentei uleiurilor, cu evidențierea grupărilor funcționale

Stampa circulară și semnătură manuală în colțul din dreapta jos al paginii.

Conform acestui spectru FT-IR generic, zona specifică de recunoaștere (fingerprint) a uleiurilor este domeniul $750-1250\text{ cm}^{-1}$, combinat cu alte zone care indică prezența dublelor legături de tip *cis* (ce indică uleiuri virgine, neprocesate termic) sau *trans* (uleiuri iferioare si procesate).

Astfel:

- semnalul de la $720-722\text{ cm}^{-1}$ este datorat suprapunerii CH_2 vibrației “rocking” cu vibrația de deformare înafara planului a grupării olefinice *cis*-disubstituite.
- banda puțin intensă de la $962-968\text{ cm}^{-1}$ este asociată cu grupări CH conjugate olefinice, cu vibrații de deformare, ale grupărilor olefinice conjugate *trans,trans-* sau *cis,trans*.
- benzile de la 1119 și 1098 cm^{-1} st asociate cu alungiri ale grupării esterice C-O, prima fiind invers proporțională cu proporția de grupări acil saturate
- semnalul de la 1377 cm^{-1} datorat deformării grupărilor CH_2
- benzile de la 1238 și 1160 cm^{-1} sunt asociate cu alungiri ale grupării esterice C-O și cu vibrația de deformare a grupării CH_2 , ambele asociate cu proporția de grupări acil saturate
- banda $1416-1418\text{ cm}^{-1}$ datorată vibrațiilor “rocking” ale CH *cis*-disubstituit
- banda de la 1464 cm^{-1} datorată vibrațiilor de deformare ale CH_2 și CH_3 alifatici
- banda $1650-1656\text{ cm}^{-1}$ asociată cu întinderea C=C ale izomerilor *cis*-olefinici
- banda $1742-1744\text{ cm}^{-1}$ atribuită grupărilor esterice și carbonil din trigliceride
- Benzile de la 2923 și 2854 cm^{-1} corespunzătoare vibrațiilor de alungire asimetrice și simetrice ale CH_2 alifatic
- Banda de la $3007-3009\text{ cm}^{-1}$ datorată dublelor legături C=C *cis* (vibrație de alungire)

Concomitent, este posibil să fie evidențiate procese de peroxidare, prin benzi specifice acizilor grași oxidați, localizate între $3300-3500\text{ cm}^{-1}$.

Această metodă rapidă, directă și economică nu necesită reactivi sau extracții preliminare, dar nu este standardizată. Au fost corelate rezultatele obținute prin FTIR cu rezultatele obținute prin cromatografie GC sau HPLC și s-au stabilit corelații direct proporționale, semnificative statistic.

Scopul prezentei invenții este aplicarea celor două proceduri de măsurare spectroscopică (UV-Vis și FTIR) pentru a găsi, în timp minim, cu costuri minime, indicații privind autenticitatea diferitelor tipuri de uleiuri vegetale, pe baza profilului specific.

Procedurile utilizate s-au aplicat pe 6 tipuri de uleiuri comestibile cu caracter antioxidant: ulei de măsline (virgin sau rafinat), ulei de floarea soarelui (nerafinat și rafinat), ulei de in, cânepă, rapită și cătină.

Spectrele de absorbție moleculară UV-Vis s-au înregistrat cu un spectrometru cu dublu fascicul, de tip ABL Jasco 460 , utilizând domeniul $200-700\text{ nm}$.

Inregistrarea spectrelor de absorbție în Infraroșu (FTIR) s-a făcut direct prin utilizarea spectrofotometrului Shimadzu IR Prestige -21 cu accesoriu HATR (Horizontal Attenuated Total Reflectance) . Spectrele au fost înregistrate pe domeniul de lungimi de undă $600-4000\text{ cm}^{-1}$ și s-au identificat benzile de absorbție caracteristice tipului de legături și grupărilor funcționale (exprimate în cm^{-1}).

Exemplul 1. Procedura de autentificare a uleiurilor de masline pe baza spectrelor UV-Vis si FTIR

S-a utilizat ulei de masline extravirgin (P1), autentic și s-au realizat amestecuri controlate cu ulei de floarea soarelui rafinat (în procente de 10 și 25%), notate ca P2 și respectiv P3. Cele trei probe de ulei au fost introduse în cuve de cuarț, pentru analiza UV-Vis și s-a înregistrat spectrul pe domeniul 350-700 nm.

Fig.2 arată amprenta spectrală UV-Vis.

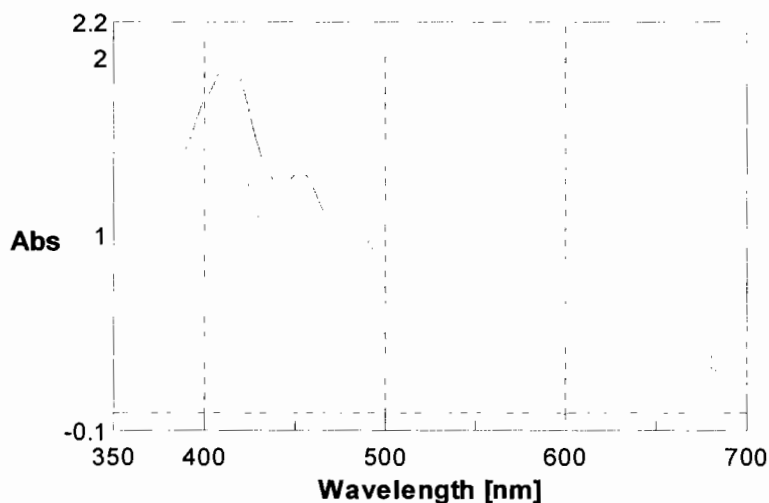


Fig. 2. Amprenta spectrală UV-Vis (350-700 nm) specifică pentru uleiul de măsline extravirgin autentic sau falsificat prin adaus de ulei de floarea soarelui rafinat.

Verde - P1- ulei masline extravirgin autentic. Albastru- P2- ulei masline extravirgin adulterat cu 10% ulei floarea soarelui rafinat. Rosu – P3- ulei masline extravirgin adulterat cu 25% ulei floarea soarelui rafinat

Fig.3. prezintă spectrul FTIR înregistrat direct pentru probele P1, P2 și P3, pe domeniul 600-4000 cm⁻¹.

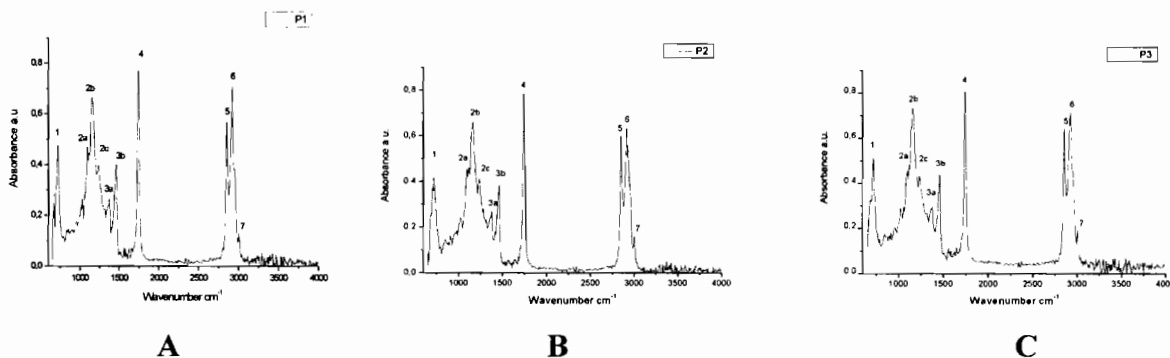


Fig.3. Spectrul FTIR-ATR specific probelor P1, P2, P3. P1- ulei masline autentic virgin. P2- ulei P1 falsificat cu 10% ulei de floarea soarelui rafinat. P3- ulei P1 falsificat cu 25% ulei de floarea soarelui rafinat. Benzile 1-7 din spectru sunt caracteristice numerelor de undă 722 (1), 1095 (2a), 1118 (2b), 1157 (2c), 1377 (3a), 1465 (3b), 1743 (4), 2850 (5), 2920 (6), 3008 cm⁻¹ (7).

Stampa circulară a Institutului Național de Cercetare Științifică și Dezbateri Publice din România și o semnătură manuscrită.

Exemplul 2. Identificarea uleiului de floarea soarelui rafinat și nerafinat

S-a utilizat ulei de floarea soarelui nerafinat (P4), autentic și s-a amestecat cu ulei rafinat (P7). Amestecul 1:1 între P4 : P7 este reprezentat de proba P6. cele trei probe de ulei au fost introduse în cuve de cuarț, pentru analiza UV-Vis și s-a înregistrat spectrul pe domeniul 350-700 nm.

Fig. 4 prezintă amprenta spectrală UV-Vis, specifică pentru uleiul de floarea soarelui autentic, nerafinat, comparativ cu uleiul de floarea soarelui rafinat.

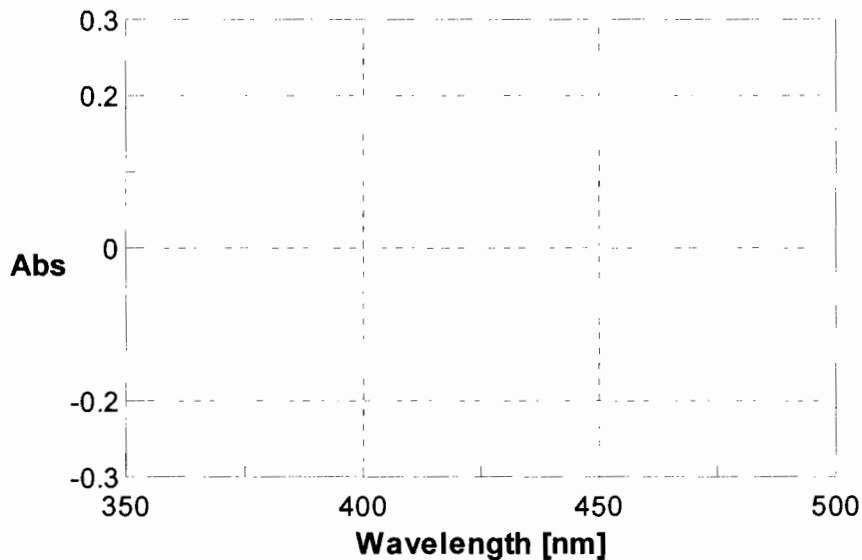


Fig.4. Amprenta spectrală UV-Vis (350-500 nm) specifică pentru uleiul de floarea soarelui autentic, nerafinat, comparativ cu uleiul de floarea soarelui rafinat. Albastru - ulei floarea soarelui autentic, nerafinat. Verde – ulei floarea soarelui rafinat.

Fig.5 prezintă spectrul FTIR înregistrat direct pentru probele P1, P2 și P3, pe domeniul 600-4000 cm^{-1} .

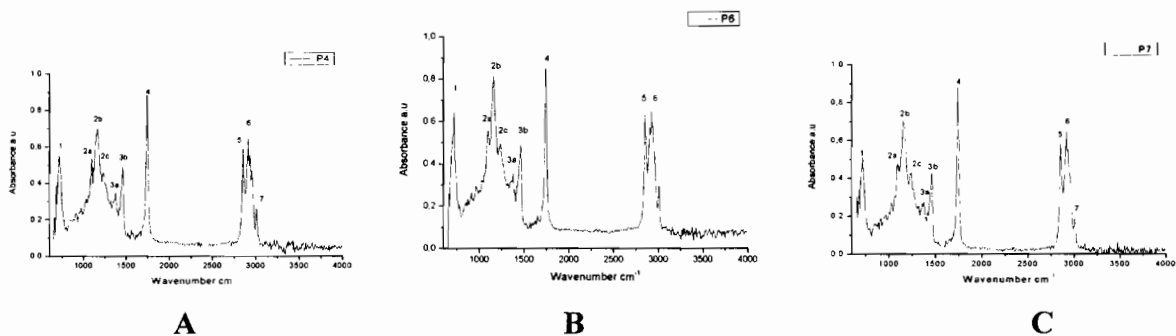


Fig. 5. Spectrul FTIR-ATR specific probelor P4 (A), P6 (B), P7(C). P4- ulei de floarea soarelui autentic, nerafinat. P6- P 4 falsificat cu ulei rafinat, P7, în raport 1:1. P7- ulei de floarea soarelui rafinat. Benzile 1-7 din spectru sunt caracteristice numerelor de undă 722 (1), 1095 (2a), 1118 (2b), 1157 (2c), 1377 (3a), 1465 (3b), 1743 (4), 2850 (5), 2920 (6), 3008 cm^{-1} (7).

INSTITUTUL NAȚIONAL DE RECHIZIȚII ȘI
TESTARE ȘI CALITATE
București

Exemplul 3. Identificarea amprentelor spectroscopice UV-Vis și FTIR specifice uleiurilor autentice de in, cânepă, rapiță și cătină

Fig.6 prezintă amprenta spectrală UV-Vis specifică uleiurilor autentice de in (A) și cânepă (B)

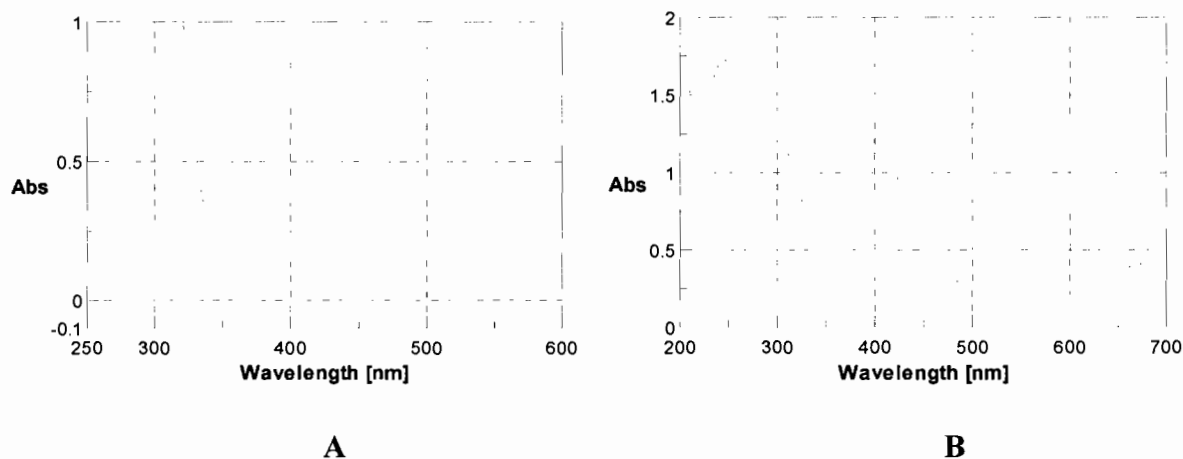


Fig.6. Amprenta spectrală UV-Vis (200- 700 nm) specifică pentru uleiul de in autentic (A) și uleiul de cânepă autentic (B)

Fig.7 prezintă amprenta spectrală UV-Vis specifică uleiurilor autentice de cătină (A) și rapiță (B)

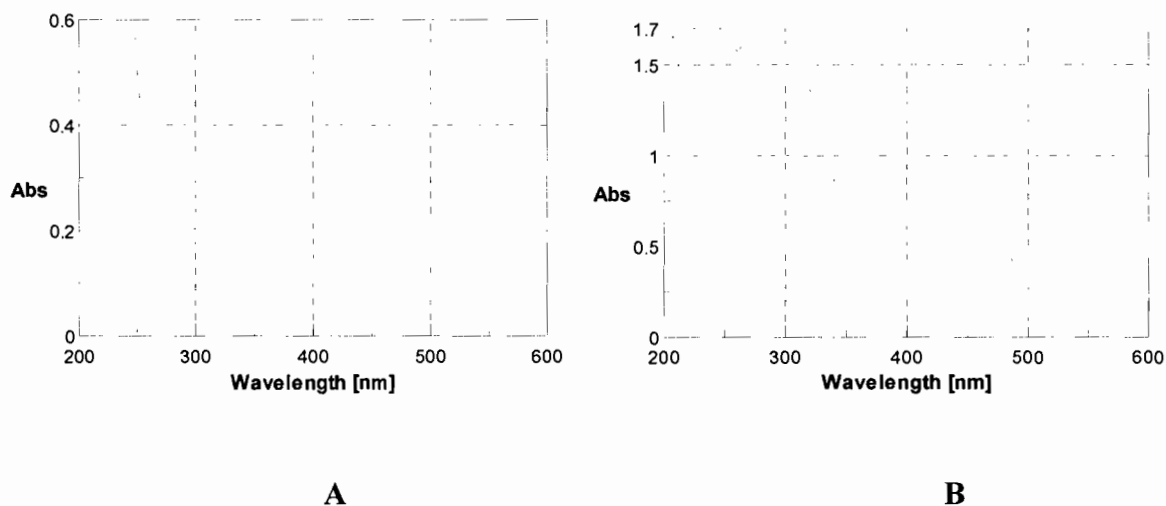


Fig.7. Amprenta spectrală UV-Vis (200- 700 nm) specifică pentru Uleiul de cătină autentic (A) și uleiul de rapiță autentic (B)

Fig.8. prezintă spectrul FTIR înregistrat direct pentru probele de uleiuri de rapiță, cătină, in și cânepă, pe domeniul $600- 3500 \text{ cm}^{-1}$.

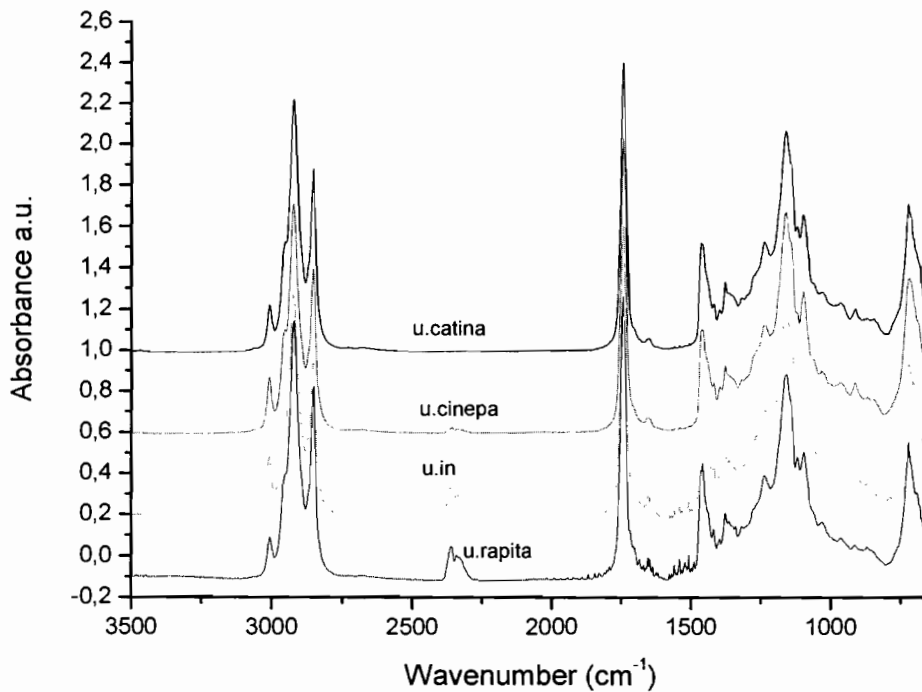


Fig. 8. Spectrul FTIR specific probelor de uleiuri de rapiță, cătină, in și cânepă, pe domeniul 600- 3500 cm^{-1} .

Exemplul 4. Analiza de ansamblu a uleiurilor vegetale , prin spectrometrie UV-Vis și FTIR cu evidențierea markerilor de recunoaștere

Prin înregistrarea unui număr mare de spectre UV-Vis și suprapunerea spectrelor se pot evidenția deosebirile calitative și domeniile de absorbție specifice diferitelor grupări . Astfel fig. 9 A și B arată amprenta spectrală UV-Vis specifică pentru 7 tipuri de uleiuri autentice pe intervale de lungimi de undă (250-700 nm)(A) și respectiv (350-700 nm)(B).

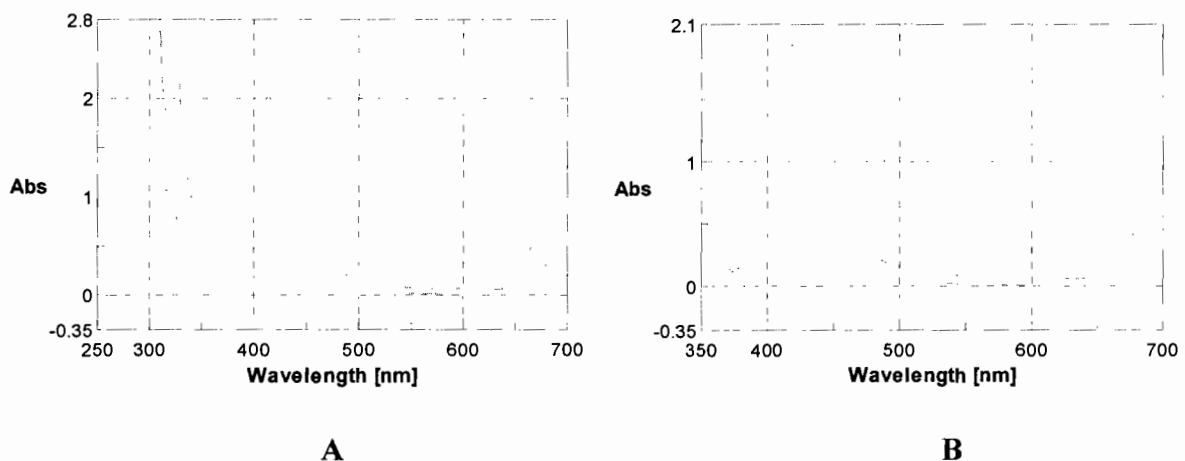


Fig. 9. Amprenta spectrală UV-Vis pentru uleiuri autentice pe intervale de lungimi de undă (250-700 nm)(A) și respectiv (350-700 nm)(B). Albastru – ulei masline extravirgin. Rosu inchis - ulei floarea soarelui nerafinat. Verde deschis – ulei floarea soarelui rafinat. Verde turquoise - ulei canepa. Kaki - ulei cătină. Violet – ulei de in. Rosu - ulei rapiță

[Handwritten signature]

Datele spectrale au evidențiat specificul fiecărui tip de ulei prin grupările funcționale care absorb în domeniul UV și/sau Vis. Datele sunt prezentate în tabelul 2.

Tabel 2. Domeniul specific UV și/sau Vis, markerii de autenticitate pentru 7 uleiuri analizate

Tip de ulei	Markeri UV	Markeri Vis
Floarea soarelui nerafinat	250-310 nm Compusi fenolici	440-470 nm Carotenoide
Floarea soarelui rafinat	250-320 nm Compusi fenolici	-
Masline	305, 340 nm Compusi fenolici (derivati de acizi fenolici și flavonoide)	418 nm- chinone 450-470 nm Carotenoide 615, 670 nm Clorofile
Rapita	243-310 nm Compusi fenolici	440-450 nm Carotenoide
In	250-310 nm Compusi fenolici	-
Canepa	260-300 nm Compusi fenolici	408 nm Chinone 470 nm Carotenoide 615, 670 nm Clorofile
Cătină	260-280 nm Compusi fenolici	415-470 nm Carotenoide

Se constată că nu se suprapun nici domeniile, nici markerii specifici. Este astfel posibilă evidențierea deosebitrilor dintre cele 7 uleiuri pe baza compoziției specifice în compuși fenolici, cu sau fără pigmenți carotenoidici, cu sau fără pigmenți clorofilieni sau chinone.

Prin analiza spectroscopică FTIR s-au evidențiat nu numai amprentele specifice fiecărui ulei (prezentate în Fig. 3, 5 și 8, dar mai ales benzile caracteristice legăturilor duble de tip cis sau trans care evidențiază prezența acizilor grași nesaturați, în formă nativă sau izomerizată prin rafinare. Tabelul 3 include absorbțiile caracteristice la numerele de undă 720-722, 967, 1657, 3007-3008 cm^{-1} .

Tabel 3. Absorbții caracteristice înregistrate în spectrul FTIR, la numerele de undă 720-722, 967, 1657, 3007-3008 cm^{-1} .

Denumire ulei	Nr. de undă (cm^{-1})			
	720-722 (deformare cis)	967 (deformare cis,trans; trans,trans)	1657 Intindere C=C cis	3007-3008 (intindere, cis)
Ulei de masline extravirgin (P1)	0,454	0,156	0,071	0,119
Ulei de masline extravirgin falsificat cu 10% ulei fl.soarelui (P2)	0,416	0,175	0,048	0,146
Ulei de masline extravirgin falsificat cu 25% ulei fl.soarelui (P3)	0,503	0,195	0,089	0,180

Ulei de fl. Soarelui nerafinat (P4)	0,518	0,254	0,138	0,266
Ulei de fl. Soarelui nerafinat falsificat cu 10% ulei fl.soarelui rafinat (P6)	0,617	0,293	0,140	0,296
Ulei de fl. Soarelui rafinat (P7)	0,494	0,208	0,078	0,180
Ulei de rapiță	0,654	0,188	0,058	0,188
Ulei de in	0,752	0,212	0,071	0,280
Ulei de cinepa	0,749	0,246	0,068	0,270
Ulei de catina	0,701	0,233	0,056	0,219

Se identifică astfel:

- ❖ Creșteri ale absorbțiilor la 720-722, 967, 1657, 3007-3008 cm^{-1} prin falsificarea uleiului de măsline cu ulei de floarea soarelui (P3 si P2 față de P1)
- ❖ Uleiul rafinat de floarea soarelui are valori mai mici de absorbție la 720-722, 967, 1657, 3007-3008 cm^{-1} , comparativ cu uleiul nerafinat
- ❖ Uleiurile funcționale, virgine, bogate în acizi grași nesaturați, au valori mari de absorbții, maxime pentru uleiul de cânepă, urmat de uleiul de in, cătină, rapiță. Uleiul de măsline și uleiul de floarea soarelui au valori mai mici, de aprox. 1,2 ori. O imagine comparativă (Fig. 10) face posibilă corelarea concentrației de acizi grași saturați (AGS), acizi grași nesaturați (AGN) cu absorbțiile înregistrate la 720-722 cm^{-1} (3) , 967 cm^{-1} (4), 1657 cm^{-1} (5) , 3007-3008 cm^{-1} (6)

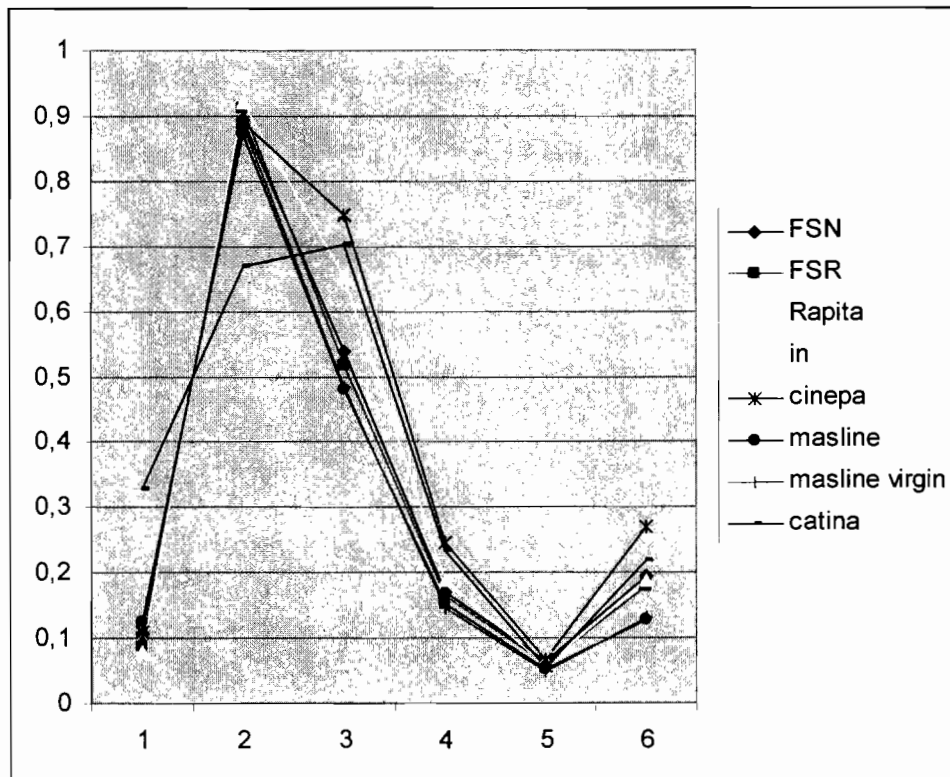


Fig.10. Corelații între concentrațiile de acizi grași saturați (1), acizi grași nesaturați (2) cu absorbțiile înregistrate la 720-722 cm^{-1} (3) , 967 cm^{-1} (4), 1657 cm^{-1} (5) , 3007-3008 cm^{-1} (6) pentru uleiurile analizate. FSN- floarea soarelui nerafinat, FSR- floarea soarelui rafinat.

REVENDICARI

1. Procedură de evaluare prin spectrometrie UV-Vis a calității și autenticității uleiurilor vegetale, prin înregistrarea profilului metabolic specific, pe baza absorbției specifice în domeniul 200-700 nm, cu identificarea markerilor de recunoaștere: compuși fenolici, pigmenți carotenoidici, clorofilieni și chinone.
2. Procedură de evaluare prin spectrometrie în Infraroșu cu Transformantă Fourier (FTIR-ATR) a calității și autenticității uleiurilor vegetale pe baza absorbției specifice în domeniul 600-4000 cm^{-1} . Sunt identificate benzile specifice de absorbție (fingerprint), cu identificarea legăturilor duble de tip cis sau trans, specifice acizilor grași nesaturați.
3. Proceduri complementare (UV-Vis și FTIR) de evaluare comparativă a uleiurilor autentice, virgine, față de uleiurilor de același tip, rafinate sau a uleiurilor falsificate prin amestecare de uleiuri nerafinate cu uleiuri rafinate, de uleiuri superioare cu uleiuri inferioare.
4. Proceduri de complementare (UV-Vis și FTIR) de evaluare comparativă și autentificare a șase tipuri de uleiuri vegetale, funcționale, de floarea soarelui, măsline, în, cânepă, cătină, rapiță.

Procedurile testate sunt utile în evaluarea calității și a autenticității acestor uleiuri, de proveniențe diferite, în condiții de obținere tehnologică diferită, sau depozitare la temperaturi și umiditate diferită. Este posibilă și evidențierea proceselor de alterare oxidativă și falsificare.



A circular stamp is located in the bottom right corner of the page. The text within the stamp is partially legible and appears to include 'ANIA' and 'ROMANIA'. To the right of the stamp is a handwritten signature.