



**Cofinanțat de
Uniunea Europeană**



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

IM3.1 - Raport privind obținerea unui material de referință

Raport final



Proiect	Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+	309287
Descriere	Descrierea metodologiei de obținere a unui material de referință la nivelul METROFOOD-RO
Subactivitate 3.1	Sistem de calitate integrat pentru asigurarea calității și trasabilității măsurărilor din laborator (Dezvoltare experimentală)
Responsabil A3.1	IBA-București
Perioada raportată	Martie 2025- Noiembrie 2025
Rezultat asociat	R2 – Oferta finală de servicii
Termen finalizare	Noiembrie 2025
Criteriu de validare	Aprobarea Comitetului de conducere
Dovezi care probează îndeplinirea criteriilor	Document postat pe website-ul METROFOOD-RO –la interfața internă a proiectului





Cuprins

Structura parteneriatului pentru realizare IM3.1	4
1. Introducere	5
2. Metodologia de dezvoltare a materialelor de referință	6
2.1 Selecția materiei prime și procesare acesteia.....	8
2.2 Studiului de omogenitate pentru materialele de referință.....	9
2.2.1 Importanța omogenității unui material de referință	9
2.2.2 Planificarea studiului de omogenitate.....	12
2.3 Studiului de stabilitate pentru materialele de referință.....	16
2.3.1 Planificarea studiului de stabilitate.....	17
2.3.2 Stabilitatea pe termen lung.....	19
2.3.3 Stabilitatea pe termen scurt	21
2.3.4 Stabilitatea în utilizare.....	22
2.4 Caracterizarea materialului de referință	23
3. Fundamentarea condițiilor tehnice și metodologice pentru dezvoltarea materialului de referință	25
3.1 Considerații privind compoziția făinii din pielițe de roșii	26
3.2 Variația conținutului total de polifenoli în făina din pielițe de roșii	26
3.3 Factori de degradare a polifenolilor în pulberea din pielițe de roșii	28
3.4 Strategii de conservare a polifenolilor în făina din pielițe de roșii.	30
3.5 Strategia de testare a omogenității și stabilității materialului.....	31
4. Studiu pilot pentru făina rezultată din extracția sucului de roșii	32
4.1 Testarea inițială a matricei selectate pentru conținutul de polifenoli	32
4.2 Procedura de extracție pentru determinarea conținutului de polifenoli totali ..	35
4.3 Determinarea conținutului de polifenoli totali	36
4.4 Rezultate obținute.....	37
5. Etapele tehnologice în producția materialului de referință.....	37
5.1 Producția materialului de referință.....	37
5.1.1 Uscarea controlată a deșeurilor.....	39



5.1.2 Măcinarea probei obținute	40
5.1.3. Ambalarea materialului de referință.....	41
5.2 Metode alternative de procesare și ambalare a materialului de referință	42
5.2.1 Distilarea criogenică	43
5.2.2 Dezvoltarea și stabilirea protocolului de lucru pentru extracția apei din materialul de referință	44
5.2.3 Îndepărtarea completă a apei prin distilare criogenică	45
5.2.4 Inchiderea fiolelor care conțin cele două fracțiuni de probe: liofilizate și distilate criogenic	51
6. Analiza și interpretarea rezultatelor pentru materialul de referință produs.....	54
6.1 Procedura de extracție pentru determinarea conținutului de polifenoli totali 54	
6.2 Determinarea conținutului de polifenoli totali	55
6.3 Reactivi utilizați	56
6.4 Evaluarea omogenității probei de făină obținută din subprodusele reziduale (pielețe și seminte) rezultate în urma procesării roșiilor	57
6.4.1 Rezultate obținute în urma evaluării omogenității	58
6.5 Evaluarea stabilității probei de făină obținută din subprodusele reziduale (pielețe și seminte) rezultate în urma procesării roșiilor	60
6.5.1 Rezultate obținute în urma evaluării stabilității	60
Concluzii	64
Echipa de experți care a participat la elaborarea documentului	65



**Cofinanțat de
Uniunea Europeană**



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

Structura parteneriatului pentru realizare IM3.1

Partener	Conform Acord colaborare din Cererea de finantare		Raport
1	Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Bioresurse Alimentare	IBA	x
2	INCDO INOE 2000 Filiala Institutul de Cercetări pentru Instrumentație Analitică	ICIA	x
3	Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Tehnologii Izotopice și Mole-culare	INCDTIM	x
4	Universitatea de Științele Vieții "Regele Mihai I" - Facultatea de Inginerie Alimentară	USVT	x
5	Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Mașini și Instalații destinate Agriculturii și Industriei Alimentare	INMA	-
6	Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară din București	USAMVB	-
7	Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați	UDJG	-
8	Universitatea din București	UB	x





1. Introducere

Activitățile desfășurate în această fază contribuie la realizarea OS3- Consolidarea poziționării METROFOOD-RO în comunitatea științifică la nivel național, METROFOOD-RI și european, ca facilitate de cercetare orientată către actorii sistemului alimentar și este implementat prin intermediul activității de bază A3- Cercetare exploratorie.

Materialul de referință descris în IM3.1 - „Raport privind obținerea unui material de referință” a fost dezvoltat în cadrul activității A3.1 - „Sistem de calitate integrat pentru asigurarea calității și trasabilității măsurătorilor din laborator (Dezvoltare experimentală)”.

Dezvoltarea unui material de referință reprezintă un proces important pentru obținerea unor rezultate analitice de încredere și comparabile, mai ales în domeniul agroalimentar, unde complexitatea matricilor și variabilitatea naturală pot influența semnificativ determinările analitice. Pentru a obține un material de referință de adecvat, este necesară atât o bază teoretică, cât și o abordare experimentală bine planificată, în concordanță cu cerințele standardelor SR EN ISO 17034 și ISO Guide 35 privind omogenitatea, stabilitatea și trasabilitatea metrologică.

Prima etapă a constat în documentarea literaturii de specialitate privind dezvoltarea materialelor de referință, cu accent pe cerințele legate de stabilitate, omogenitate și condițiile de procesare specifice matricei alese. În etapa următoare, a fost realizat un studiu pilot pe pulberea obținută din subprodusul rezultat după extracția sucului de roșii, pentru a verifica dacă această matrice poate fi utilizată pentru determinarea polifenolilor totali și ca bază pentru un material de referință.

Pe baza rezultatelor obținute în etapa preliminară, materialul a fost produs printr-un proces controlat de prelucrare și ambalare, urmărind menținerea compușilor fenolici și limitarea variației între unitățile de material de referință. După finalizarea producției, materialul a fost evaluat pentru omogenitate și stabilitate în cadrul studiilor desfășurate pe durata a nouă săptămâni, perioadă în care conținutul de polifenoli totali a fost monitorizat periodic prin analiză spectrofotometrică, în condiții stabile de depozitare.

Raportul centralizează etapele prin care a fost realizat materialul de referință, de la documentare până la studiile de omogenitate și stabilitate, și reunește informațiile din rapoartele elaborate anterior, astfel încât să prezinte în mod structurat întregul parcurs al procesului.



2. Metodologia de dezvoltare a materialelor de referință

Orice proces de dezvoltare a unui material de referință începe cu o etapă de documentare și analiză preliminară. Această fază are rolul de a defini în mod clar scopul materialului, parametrii analitici de interes, matricea adecvată și cerințele tehnice sau reglementarile care trebuie respectate. Se analizează literatura de specialitate, standardele relevante, metodele analitice disponibile și eventualele provocări legate de stabilitate, omogenitate sau disponibilitatea materiei prime. Documentarea asigură o bază solidă pentru deciziile ulterioare și contribuie la construirea unei metodologii coerente.

Înainte de inițierea propriu-zisă a procesului de dezvoltare, este recomandată realizarea unor studii de fezabilitate/pilot. Acestea au rolul de a evalua posibilitatea tehnică și practică de a obține un material de referință cu caracteristicile dorite, luând în considerare factori precum disponibilitatea matricei, comportamentul parametrilor în timp, infrastructura analitică existentă și cerințele de calitate. Rezultatele studiului permit ajustarea timpurie a abordării și reduc riscurile asociate etapelor ulterioare.

Dezvoltarea unui material de referință implică o succesiune de etape planificate (Figura 1), fiecare având un rol esențial în asigurarea calității, trasabilității și reproductibilității materialului. Procesul pornește cu selecția atentă a materiei prime, urmată de procesare și obținerea unui lot omogen de material, ambalat în forma finală.

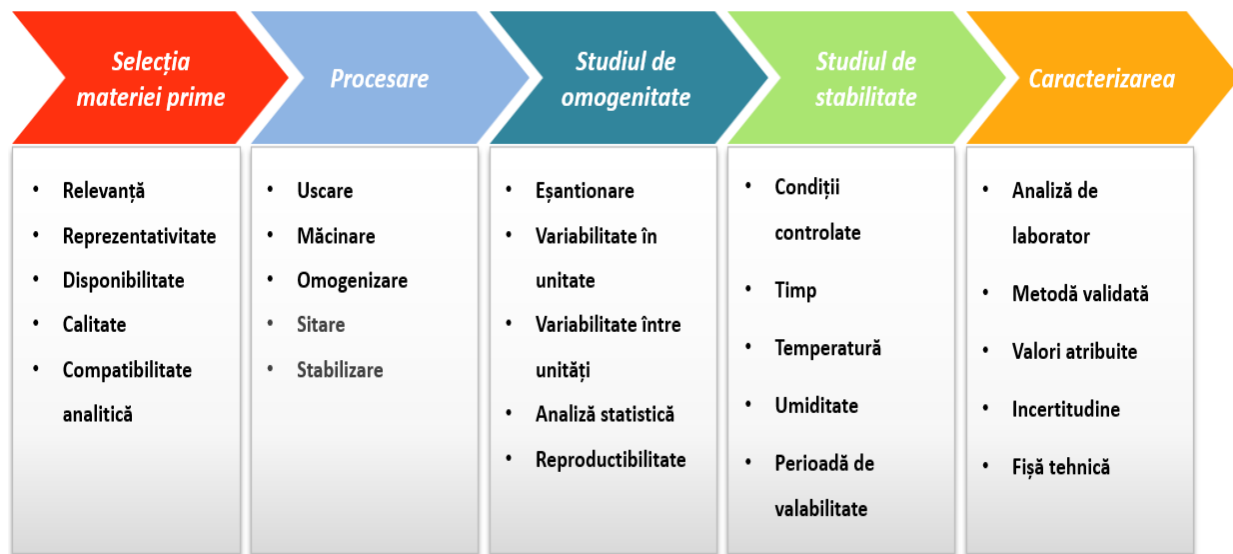


Figura 1. Principalele etape în dezvoltarea materialelor de referință



Ulterior, se realizează studiul de omogenitate, studiul de stabilitate și caracterizarea parametrilor vizați.

Pentru ca aceste etape să fie realizate într-un mod coerent și compatibil cu bunele practici internaționale, metodologia are la bază cerințele prevăzute în standardul **SR EN ISO 17034:2017 - „Cerințe generale pentru competența producătorilor de materiale de referință”**.

Pe lângă acest standard ISO 17034:2017, în dezvoltarea materialelor de referință sunt relevante și alte standarde internaționale, recent actualizate, care detaliază aspecte specifice precum terminologia, conținutul documentației, utilizarea, caracterizarea și evaluarea stabilității. Acestea sunt sintetizate în tabelul 1.

Tabel 1. Standardele ISO relevante pentru dezvoltarea materialelor de referință

Număr standard	Titlu	Descriere
ISO 17034:2016	Cerințe generale pentru competența producătorilor de materiale de referință	Stabilește cerințele pentru organizațiile care produc materiale de referință, inclusiv certificate.
ISO Guide 30:2015	Materiale de referință - Termeni și definiții selectate	Definește termenii esențiali utilizați în domeniul materialelor de referință.
ISO 33401:2024	Conținutul certificatelor, etichetelor și documentației însoțitoare	Detaliază informațiile obligatorii din documentația care însoțește materialele de referință.
ISO 33403:2024	Cerințe și recomandări pentru utilizarea materialelor de referință	Oferă recomandări privind utilizarea corectă și eficientă a materialelor de referință.
ISO 33405:2024	Abordări pentru caracterizarea și evaluarea omogenității și stabilității	Prezintă metode pentru caracterizarea materialelor de referință și evaluarea omogenității și stabilității.
ISO 33406:2024	Abordări pentru materiale de referință cu proprietăți calitative	Oferă orientări privind producerea și caracterizarea materialelor cu proprietăți calitative.



2.1 Selecția materiei prime și procesare acesteia

Selecția materiei prime reprezintă una dintre cele mai importante etape în dezvoltarea unui material de referință, întrucât caracteristicile acesteia vor influența direct omogenitatea, stabilitatea și relevanța materialului final. Alegerea trebuie realizată în funcție de scopul analitic urmărit, de parametrii care vor fi caracterizați și de compatibilitatea matricei cu metodele disponibile de analiză. Materia primă trebuie să fie reprezentativă pentru aplicația vizată și să permită prelucrarea ulterioară fără pierderi semnificative ale compușilor de interes.

Printre criteriile de selecție se numără disponibilitatea constantă a sursei, gradul de variabilitate naturală, susceptibilitatea la degradare, nivelul de contaminare și comportamentul termic sau chimic al componentei analitice. În cazul matricelor de origine biologică, cum sunt cele alimentare, este esențială și evaluarea prezenței unor factori interferenți, cum ar fi activitatea enzimatică sau umiditatea variabilă. În mod ideal, materia primă selectată trebuie să permită obținerea unui lot suficient de mare, pentru a susține atât validarea internă, cât și eventualele aplicații externe ale materialului.

În unele cazuri, selecția materiei prime presupune compararea mai multor surse sau variante ale aceleiași matrice, urmată de teste preliminare privind compoziția, omogenitatea și compatibilitatea cu procesul tehnologic. O selecție riguroasă în această fază reduce semnificativ riscurile în etapele ulterioare și contribuie la reproductibilitatea pe termen lung a materialului de referință.

După selecția materiei prime, procesarea are rolul de a aduce materialul într-o formă omogenă și stabilă, adecvată etapelor de omogenizare, ambalare și analiză. În funcție de tipul de matrice, pot fi aplicate operații precum uscarea, măcinarea, sitarea și omogenizarea mecanică preliminară, cu scopul de a reduce variabilitatea și de a preveni segregarea în lot.

Controlul atent al umidității, dimensiunii particulelor și condițiilor de prelucrare este esențial pentru a asigura stabilitatea compușilor de interes și pentru a limita pierderile sau contaminările. Procesarea parametrilor sensibili impune măsuri specifice pentru a limita degradările, precum cele de natură termică, oxidativă sau enzimatică.

La finalul acestei etape, materialul procesat este depozitat temporar în condiții controlate și poate fi supus unor verificări intermediare, pentru a evalua dacă proprietățile fizico-chimice sunt conforme cu cerințele. O procesare corectă reprezintă premisa necesară pentru obținerea unui material omogen și reproductibil.



2.2 Studiului de omogenitate pentru materialele de referință

Studiul de omogenitate constituie o etapă esențială în procesul de dezvoltare și caracterizare a unui material de referință. Un material de referință omogen asigură că fiecare unitate are practic aceeași compoziție sau valoare a proprietăților de interes. În acest fel, utilizatorii materialului pot obține rezultate analitice precise și reproductibile, indiferent de unitatea folosită. Conform cerințelor standardelor internaționale, precum ISO 17034 - „Cerințe generale pentru competența producătorilor de materiale de referință”, producătorii de materiale de referință trebuie să evalueze omogenitatea pentru fiecare proprietate de interes și să includă contribuția eventualei eterogenități în incertitudinea de măsurare a valorilor.

În continuare este prezentată metodologia generală recomandată pentru realizarea unui studiu de omogenitate, cu aplicabilitate în domeniul materialelor de referință.

2.2.1 Importanța omogenității unui material de referință

Omogenitatea unui material de referință se referă la gradul în care proprietățile sale sunt uniforme atât între unități, cât și în interiorul fiecărei unități (dacă se iau sub-eșantioane din același recipient. O omogenitate bună este caracterizată printr-o variabilitate inter- și intra-unitate redusă, astfel încât orice eșantion prelevat să fie reprezentativ pentru întregul lot.

Este relevant de subliniat că, în conformitate cu standardele internaționale, evaluarea omogenității între unități (Figura 2) este o cerință obligatorie, deoarece fiecare unitate a materialului de referință trebuie să fie echivalentă din punct de vedere al proprietăților măsurate, pentru a asigura comparabilitatea rezultatelor obținute în diferite condiții de utilizare.



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

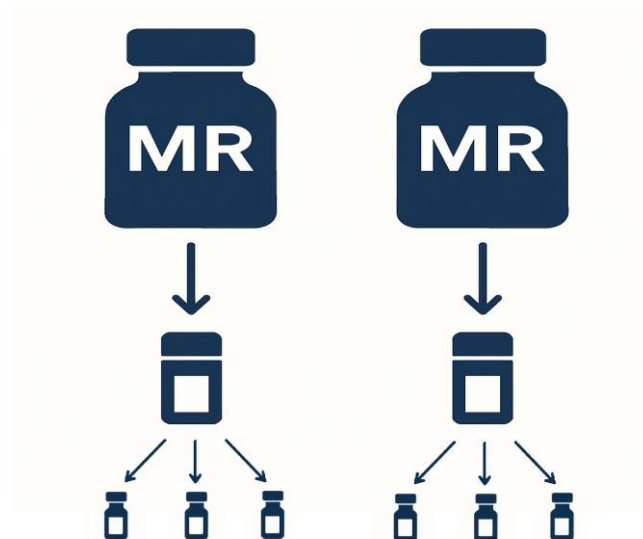


Figura 2. Schema de comparare a omogenității între unități de MR

Întrucât fiecare unitate a materialului de referință trebuie să prezinte caracteristici metrologice comparabile din perspectiva proprietăților măsurate, omogenitatea între unități este esențială pentru a asigura obținerea unor rezultate analitice consistente, indiferent de unitatea utilizată.

La rândul ei, omogenitatea în interiorul unei unități (Figura 3) devine relevantă în situațiile în care se prelevează doar o porțiune (sub-eșantion) din conținutul recipientului pentru analiză, în astfel de cazuri, este necesar ca orice sub-eșantion de dimensiune adecvată să reflecte compoziția întregii unități. În schimb, dacă materialul este utilizat integral la fiecare determinare (cum este cazul recipientelor mono-doză), omogenitatea internă are o importanță relativ scăzută, însă omogenitatea între unități rămâne o cerință fundamentală pentru obținerea unor rezultate analitice precise.

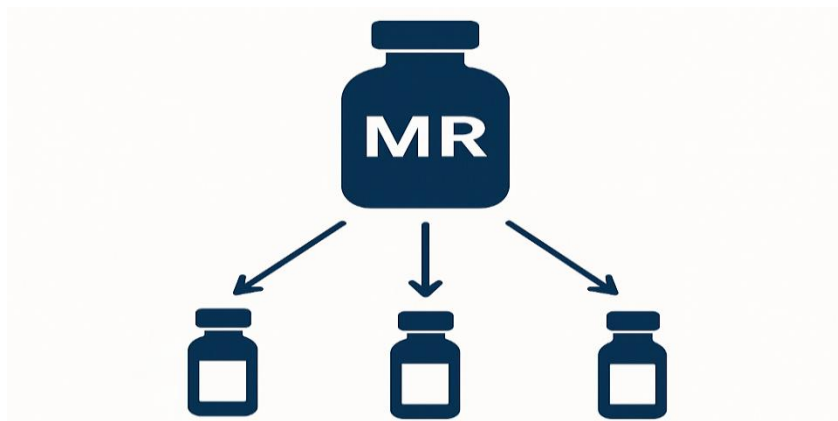


Figura 3. Schema de comparare a omogenității în cadrul unei unități de MR

Omogenitatea unui material de referință este esențială pentru obținerea unor rezultate analitice reproductibile și pentru menținerea trasabilității acestora. Prin urmare, evaluarea omogenității este o etapă obligatorie în cadrul dezvoltării materialelor de referință, furnizând informații esențiale privind eventuale variații de compoziție, prezența impurităților distribuite neuniform sau deficiențele apărute în procesul tehnologic (amestecare incompletă, măcinare neuniformă, etc.).

În cazul matricilor alimentare uscate precum făinurile, pulberile vegetale sau extractele solide, obținerea unei omogenități adecvate este adesea dificilă din cauza eterogenității naturale a acestor produse (dimensiuni variabile ale particulelor, distribuție inegală a componentelor, umiditate reziduală etc.). Totuși, prin aplicarea unor proceduri tehnologice bine controlate (uscare, măcinare fină, sitare, amestecare prelungită) și prin realizarea unui studiu metodic se poate verifica dacă materialul atinge nivelul de uniformitate necesar pentru utilizarea sa ca material de referință în aplicații analitice.

Scopul principal al studiului de omogenitate este demonstrarea faptului că materialul de referință candidat prezintă un grad suficient de uniformitate pentru proprietatea sau proprietățile de interes, astfel încât variația dintre două unități selectate aleatoriu din lot să nu fie semnificativă din punct de vedere statistic. Atunci când această condiție este îndeplinită, toate unitățile lotului pot fi considerate comparabile din perspectiva caracteristicilor măsurate. În schimb, dacă studiul evidențiază diferențe semnificative între unități, materialul nu poate fi acceptat pentru



caracterizare sau certificare fără aplicarea unor măsuri corective, precum reomogenizarea și reprocesarea lotului, excluderea unităților neconforme sau stabilirea unei mase minime de eșantion care să fie utilizată la analiză, pentru a reduce influența variabilității.

2.2.2 Planificarea studiului de omogenitate

Studiul de omogenitate trebuie planificat încă din etapa de proiectare a materialului de referință, fiind o componentă esențială a planului general de producție și caracterizare. Conform ISO 33405:2024, evaluarea omogenității este recomandat să se realizeze după ambalarea materialului în unități individuale (precum flacoane sau pungi) și înainte de etapa de caracterizare propriu-zisă. Această succesiune asigură că sunt luate în considerare eventualele variații introduse în timpul procesului de ambalare, cum ar fi distribuția neuniformă a particulelor în funcție de dimensiune sau densitate și oferă garanția că selecția unităților pentru caracterizare nu influențează valorile obținute.

Planificarea include următoarele aspecte principale:

Selecția proprietăților pentru studiul de omogenitate este un element fundamental în procesul de caracterizare a unui material de referință. Ideal, omogenitatea ar trebui evaluată pentru fiecare proprietate care urmează a fi certificată, astfel încât influența variației dintre unități să poată fi luată în considerare în estimarea incertitudinii asociate.

Totuși, în practică, atunci când materialul conține mai mulți analiți, producătorul poate selecta una sau mai multe proprietăți considerate reprezentative, de obicei cele cu un risc mai mare de variație între unități - cum ar fi oligoelemente, umiditate sau compuși prezenți în concentrații foarte mici sau eterogen distribuiți în matrice. Această abordare se bazează pe premisa că, dacă omogenitatea este demonstrată pentru proprietatea cea mai susceptibilă la neuniformitate, este probabil ca și celelalte proprietăți, cu comportament fizico-chimic similar, să fie omogene. O astfel de alegere trebuie însă justificată în mod explicit și nu este echivalentă cu o demonstrație formală a omogenității pentru celelalte proprietăți. În cazul în care se urmărește certificarea valorilor mai multor analiți, omogenitatea trebuie evaluată individual pentru fiecare, deoarece conform ISO 17034:2016, „contribuția eterogenității la incertitudine de măsurare trebuie evaluată pentru fiecare proprietate ce urmează a fi certificată”.



Astfel, selecția limitată a proprietăților pentru testare este acceptabilă doar în cazul valorilor informative sau atunci când nu se atribuie o valoare certificată.

Numărul de unități testate într-un studiu de omogenitate depinde de dimensiunea lotului și de recomandările din literatura de specialitate și standardele internaționale. Conform ISO 33405:2024, acest număr trebuie să fie suficient pentru a permite detectarea variațiilor între unități și formularea unor concluzii relevante. Pentru acest scop, ghidul propune o formulă simplificată care permite estimarea numărului minim de unități (N_{min}) ce ar trebui analizate, formulată astfel:

$$N_{min} = \max \left(10, \sqrt[3]{N_{prod}} \right)$$

unde:

- N_{min} = numărul minim de unități de testat
- N_{prod} = numărul total de unități din lot
- $\sqrt[3]{N_{prod}}$ = rădăcina cubică a numărului total de unități
 - Această formulă indică faptul că, pentru loturi mari (ex. peste 100 de unități), trebuie selectat **cel puțin 10 unități** sau rădăcina cubică a numărului total de unități - alegându-se valoarea mai mare dintre cele două.

Exemple aplicate:

- Pentru un lot de $N_{prod} = 3000$ unități:

$$\sqrt[3]{3000} \approx 14,4 \Rightarrow \text{se testează } 15 \text{ unități}$$

- Pentru un lot $N_{prod} = 500$ unități

$$\sqrt[3]{500} \approx 7,9 \Rightarrow \text{se testează } 10 \text{ unități}$$

- Pentru loturile mici, definite ca având mai puțin de 100 de unități, standardul ISO 33405:2024 recomandă testarea a cel puțin 3 unități sau a 10% din totalul lotului, alegându-se valoarea mai mare dintre cele două. Alegerea numărului de unități influențează direct sensibilitatea testului statistic: un eșantion prea mic



poate conduce la nedetectarea unor variații reale, în timp ce un număr excesiv de probe determină creșterea costurilor și a volumului de muncă. Prin urmare, se recomandă respectarea acestor orientări sau, în situații specifice, aplicarea unei analize de putere statistică (*power analysis*) pentru a verifica dacă studiul experimental permite identificarea unor diferențe de omogenitate relevante. Standardul ISO 33405:2024 menționează explicit această abordare ca metodă validă pentru optimizarea dimensiunii eșantionului.

În cadrul studiilor de omogenitate pentru materialele de referință, strategia de eșantionare joacă un rol central în asigurarea validității statistice a rezultatelor. Spre deosebire de studiile de stabilitate, unde accentul se pune pe modificările compoziționale ale unei unități în timp, studiile de omogenitate vizează variabilitatea între unitățile unui lot. Prin urmare, eșantionarea trebuie să surprindă potențialele variații între unități, generate fie de diferențe survenite în procesul tehnologic, fie de eterogenitatea naturală a matricei, specifică materialelor agroalimentare.

Obiectivul eșantionării este de a selecta un subset de unități pentru testare care să fie reprezentativ pentru întregul lot, permițând o estimare precisă a variabilității între recipiente. De regulă, se utilizează $N_{min} = 10$, însă pentru materiale cu risc crescut de eterogenitate sau atunci când cerințele de control sunt stricte, se recomandă extinderea eșantionului la 15-20 de unități.

Standardul ISO 33405:2024 descrie o serie de metode de eșantionare ce pot fi utilizate pentru a asigura selecția reprezentativă a unităților în cadrul studiilor de omogenitate.

În continuare, sunt prezentate cele mai frecvent utilizate tipuri de eșantionare:

- **Eșantionarea aleatorie simplă** constă în selectarea complet aleatorie a unui număr minim de unități (N_{min}) din întregul lot. Această metodă este relativ ușor de aplicat atunci când toate unitățile sunt ambalate și identificate individual, oferind o distribuție nedistorsionată a probabilităților. Totuși, dacă nu se cunoaște ordinea exactă de umplere a unităților sau posibilele variații apărute în timpul procesului, această abordare poate omite anumite diferențe sistematice între începutul și sfârșitul lotului.
- **Eșantionarea sistematică** presupune alegerea unui punct de pornire aleatoriu, urmată de selectarea fiecărei a n -a unitate, unde n este calculat prin raportarea totalului de unități produse la numărul dorit de eșantioane:



$$n = \left\lceil \frac{N_{total}}{N_{min}} \right\rceil$$

Această metodă este adecvată în procesele continue sau semiautomate, cum este umplerea în serie, asigurând o distribuție echilibrată a probelor pe întregul lot. De exemplu, pentru un lot de 300 de flacoane și un eșantion de 10 unități, se poate selecta câte un flacon la fiecare 30 de poziții (ex: 7, 37, 67 etc.), acoperind astfel cronologia întregului proces de umplere.

- **Eșantionarea stratificată** este recomandată atunci când există indicii că pot apărea diferențe între diferite etape ale procesului, cum ar fi începutul, mijlocul sau finalul umplerii. În acest caz, lotul este împărțit în segmente (straturi), iar din fiecare segment se selectează aleatoriu un număr proporțional de unități. Această metodă este utilă în special pentru materiale cu comportament fizic complex, în care distribuția componentelor poate varia ușor de-a lungul procesului, chiar dacă parametrii tehnologici rămân constanți.

Astfel, strategia de eșantionare are un rol fundamental în acuratețea rezultatelor obținute în orice studiu care urmărește caracterizarea unui material, în special atunci când se evaluează omogenitatea.

Alegerea metodei potrivite trebuie să țină cont atât de natura materialului, cât și de modul în care acesta a fost procesat și ambalat. O strategie de eșantionare adecvată permite obținerea unor rezultate reprezentative și sprijină evaluarea corectă a variabilității din lot.

Stabilirea metodei de analiză este o etapă importantă în realizarea studiului de omogenitate, deoarece performanțele metodei influențează direct capacitatea de a identifica eventualele diferențe dintre unitățile de material. Metoda trebuie să fie suficient de precisă și reproductibilă, astfel încât rezultatele să reflecte în mod reprezentativ variabilitatea materialului, fără a fi afectate semnificativ de fluctuațiile generate de procesul de măsurare.

Pentru ca studiul să ofere concluzii relevante, variabilitatea asociată metodei trebuie să fie mai mică decât variabilitatea între unități, permițând astfel delimitarea clară între fluctuațiile analitice și eventualele neomogenități ale materialului. În caz contrar, acuratețea studiului poate fi scădea semnificativ.

Se recomandă utilizarea aceleiași metode analitice care va fi aplicată și pentru caracterizarea materialului de referință, inclusiv în studiul de stabilitate, pentru a



asigura coerență metodologică și comparabilitate directă a rezultatelor în toate etapele de evaluare.

Pentru a evalua în mod corespunzător omogenitatea materialului de referință, este necesar ca fiecare unitate selectată să fie analizată de mai multe ori, prin prelevări repetate din aceeași unitate. Aceste măsurători, denumite replici analitice, permit determinarea variației intra-unitate, adică a variabilității asociate procesului de prelevare și analiză în cadrul unei singure unități.

Conform standardelor în vigoare, se recomandă ca fiecare unitate să fie analizată în triplicat, pentru a permite o estimare suficient de robustă a acestei variații. Alegerea analizei în triplicat oferă un echilibru optim între precizia estimării și eficiența resurselor (timp, material, efort analitic). Totuși, în funcție de contextul aplicației și de performanțele metodei analitice, pot fi utilizate și două replici, însă această alegere trebuie justificată corespunzător.

Replicile analitice sunt esențiale pentru a determina dacă diferențele între unități se datorează materialului sau metodei de măsurare. Fără aceste măsurători, omogenitatea nu poate fi evaluată în mod corect. Replicile permit estimarea variației intra-unitate și oferă baza necesară pentru aplicarea analizei statistice, prin care se decide dacă materialul poate fi considerat uniform.

2.3 Studiului de stabilitate pentru materialele de referință

După evaluarea omogenității, o altă etapă importantă în procesul de validare a unui material de referință o reprezintă analiza stabilității în timp a proprietăților sale. Dacă omogenitatea garantează uniformitatea valorilor între unitățile din același lot la un moment dat, stabilitatea urmărește ca aceste proprietăți să rămână constante, în limite acceptabile, pe durata depozitării și utilizării. În cazul materialelor de referință cu matrice alimentară, adesea sensibile la degradări chimice, fizice sau microbiologice, studiul de stabilitate este vital pentru a defini perioada de valabilitate și pentru a menține trasabilitatea valorilor atribuite în raport cu sistemul internațional de referință.

Conform cerințelor prevăzute în ISO 17034, stabilitatea reprezintă o condiție de bază în elaborarea oricărui material de referință, fie el certificat sau destinat utilizării în cercetare. Din perspectivă aplicativă, scopul studiului este de a demonstra că proprietățile de interes ale materialului se mențin neschimbate în condițiile recomandate de producător atât pe termen lung, în timpul depozitării, cât și pe termen



scurt, în situații de transport sau manipulare. În acest fel, analiza stabilității contribuie direct la asigurarea calității și la consolidarea încrederii în utilizarea materialului în activități analitice, de calibrare sau verificare.

2.3.1 Planificarea studiului de stabilitate

Planificarea studiului de stabilitate reprezintă o etapă importantă în dezvoltarea materialelor de referință, deoarece modul în care este conceput și aplicat testul influențează direct calitatea informațiilor obținute despre comportamentul materialului în timp. Această etapă implică stabilirea condițiilor de testare, a duratei de monitorizare, a frecvenței analizelor și a numărului de unități testate, astfel încât datele obținute să fie reprezentative pentru întregul lot și să permită evaluarea riscului de degradare în condiții controlate și bine documentate.

Un element important îl reprezintă alegerea condițiilor de testare. Pentru studiile de stabilitate pe termen lung, temperatura de păstrare este selectată astfel încât să reflecte condițiile normale de depozitare recomandate utilizatorilor, cum ar fi 20-25°C pentru materiale stabile la temperatura camerei sau 4°C pentru materiale sensibile la temperaturi ridicate.

În paralel, poate fi adăugată o condiție de testare accelerată, de exemplu 40°C, care permite evaluarea susceptibilității la degradare termică. Umiditatea relativă (RH) și expunerea la lumină trebuie de asemenea controlate, în funcție de caracteristicile materialului. În cazul materialelor higroscopice, RH se menține sub praguri critice, de regulă sub 30%, pentru a preveni absorbția de umiditate. Pentru materialele fotosensibile, este necesară protejarea completă față de lumină, prin ambalare adecvată și depozitare în condiții întunecate.

Durata studiului de stabilitate depinde de perioada de valabilitate anticipată și de comportamentul estimat al materialului în timp. Pentru materiale alimentare solide, cum ar fi pulberile uscate, se recomandă o perioadă minimă de monitorizare de 12 luni în studiile pe termen lung, cu puncte de măsurare la intervale regulate, cum ar fi la 3, 6, 9 și 12 luni. În cadrul studiilor pe termen scurt, aplicabile în special pentru simularea transportului sau condițiilor de stres temporar, intervalele pot fi de ordinul zilelor - de exemplu, 1, 3 sau 7 zile - adaptate în funcție de scenariul testat.

Un alt aspect important în planificare este determinarea numărului de unități testate. Conform standardelor în vigoare, la fiecare punct temporal este recomandată



Cofinanțat de
Uniunea Europeană



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

analiza mai multor unități replicate pentru a putea distinge variațiile reale ale materialului de variabilitatea metodei de analiză. În practică, se utilizează frecvent 3-5 unități, însă în cazul loturilor de dimensiuni reduse, această abordare poate consuma o proporție semnificativă din material.

Prin urmare, planificarea testării trebuie adaptată, iar numărul de unități analizate se stabilește în funcție de disponibilitatea materialului și de scopul studiului. Unitățile selectate trebuie să fie reprezentative pentru întregul lot și să acopere posibilele variații interne (de exemplu, începutul, mijlocul și sfârșitul producției), în conformitate cu ISO 17034.

Studiul experimental poate fi organizat după două modele. În studiul secvențial (clasic), probele sunt analizate imediat după fiecare interval de expunere, iar rezultatele se compară în funcție de timp. În studiul izocron, toate probele sunt păstrate în condiții controlate pentru perioadele definite, iar analiza se efectuează simultan, la finalul studiului, minimizând astfel variabilitatea de măsurare între puncte. Alegerea studiului depinde de stabilitatea estimată a materialului, de precizia metodei analitice și de capacitatea laboratorului de a păstra probele în condiții stabilizate, de exemplu prin congelare la -20°C imediat după expunere.

Conform standardului ISO 33405:2024, secțiunea 8.5, condițiile de testare trebuie definite și justificate în mod explicit, iar parametrii de mediu (temperatură, umiditate, lumină) trebuie monitorizați și documentați cu trasabilitate metrologică. În acest scop, se recomandă utilizarea unor sisteme de monitorizare continuă, cu senzorii calibrați periodic, în special în studiile pe termen lung. Pentru materialele alimentare uscate, se sugerează menținerea umidității relative sub 30% și, pentru simularea condițiilor de transport, expunerea la $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pentru minimum 7 zile este considerată adecvată pentru evaluarea stabilității în condiții de stres termic tranzitoriu.

Evaluarea stabilității materialelor de referință implică aplicarea unor strategii experimentale diferențiate, concepute pentru a acoperi întregul spectru de condiții de mediu la care materialul poate fi expus pe parcursul ciclului său de viață: producție, depozitare, transport și utilizare. În acest sens, studiile de stabilitate se clasifică în trei categorii principale: stabilitatea pe termen lung, stabilitatea pe termen scurt și, atunci când este cazul, stabilitatea în timpul utilizării. Fiecare tip de studiu răspunde unor cerințe specifice privind predictibilitatea comportamentului materialului și contribuie distinct la stabilirea duratei de valabilitate, precum și la validarea condițiilor optime de păstrare și manipulare.





2.3.2 Stabilitatea pe termen lung

Studiul de stabilitate pe termen lung este componenta principală a evaluării stabilității unui material de referință, având drept scop determinarea comportamentului în timp al proprietății de interes, în condițiile nominale de depozitare specificate de producător.

Obiectivul acestui studiu este definirea perioadei de valabilitate metrologică, adică intervalul în care valoarea atribuită materialului rămâne validă, fără a depăși pragurile acceptabile de incertitudine și fără a fi afectată de procese de degradare sau modificări fizico-chimice.

Metodologic, studiul de stabilitate pe termen lung se desfășoară în condiții de mediu controlat (temperatură, umiditate relativă, lumină), identice cu cele recomandate pentru stocarea materialului (Figura 4). Se selectează un număr reprezentativ de unități din lot, care sunt păstrate pentru o perioadă extinsă, de regulă minimum 12 luni, iar analizele se efectuează la intervale de timp prestabilite (ex: 0, 3, 6, 9, 12 luni).

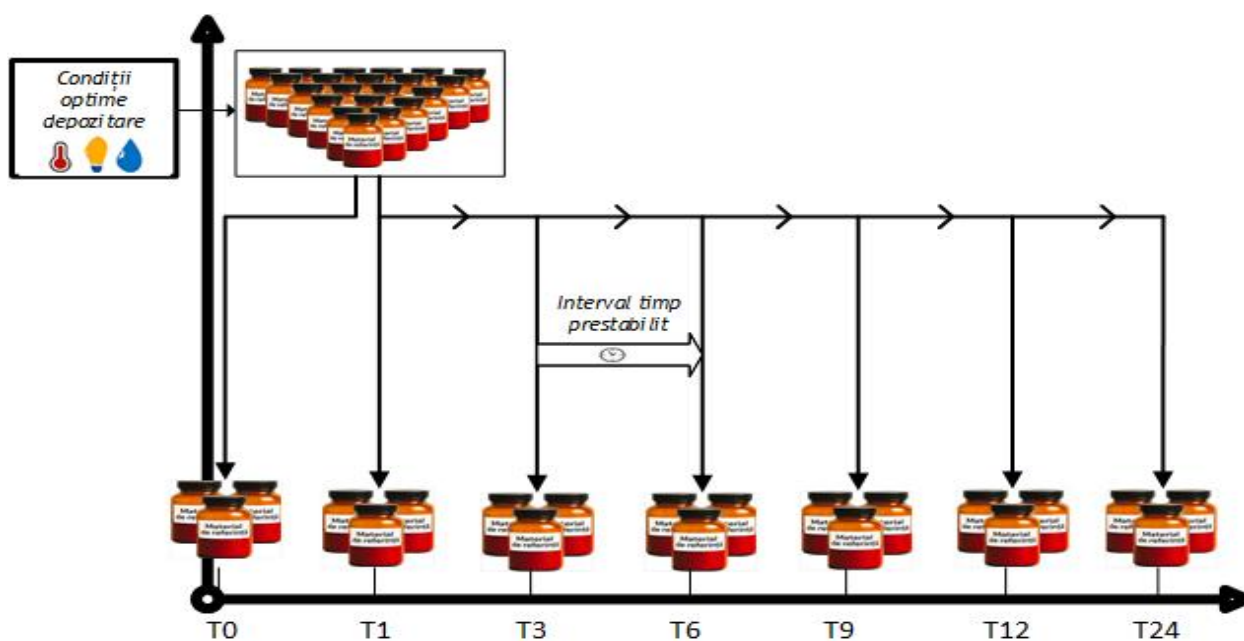


Figura 4. Schema unui studiu de stabilitate pe termen lung



În cazul materialelor cu stabilitate teoretic ridicată, studiul poate continua pe perioade multianuale, în paralel cu utilizarea comercială a lotului (studiu în timp real), în vederea extinderii ulterioare a valabilității declarate.

Pentru fiecare punct temporal, se evaluează tendința de variație a valorii analitice, prin comparare cu valoarea inițială ($t = 0$). Această analiză urmărește să identifice existența unei derivații semnificative în timp, fie în sensul unei degradări a analitului de interes, fie a unei modificări structurale a matricei.

În cadrul studiului experimental, se poate utiliza fie o abordare secvențială, în care probele sunt analizate imediat după fiecare interval de stocare, fie o abordare izocronă, în care toate probele sunt analizate simultan la finalul perioadei, după stabilizarea acestora prin congelare profundă sau alte metode de inhibare a proceselor de degradare. Alegerea studiului depinde de resursele disponibile, natura matricei și necesitatea minimizării variabilității analitice.

Datele obținute permit nu doar stabilirea unei perioade de valabilitate, ci și evaluarea contribuției stabilității la incertitudinea totală asociată valorii atribuite, în cazul materialelor certificate. În proiectele de cercetare, acest tip de studiu oferă fundamentul științific necesar pentru definirea unui interval de utilizare sigur al materialului și pentru caracterizarea comportamentului său metrologic în timp.

În conformitate cu cerințele actuale din domeniul standardizării materialelor de referință, studiul de stabilitate pe termen lung trebuie să fie suficient de extins pentru a permite nu doar detectarea unor variații semnificative ale proprietății monitorizate, ci și modelarea comportamentului materialului în timp, în vederea estimării robuste a perioadei de valabilitate. Ghidul recomandă ca această perioadă de monitorizare să fie, în mod ideal, cel puțin egală cu durata de valabilitate pe care producătorul intenționează să o declare. Alternativ, dacă se dorește o lansare anticipată, se pot utiliza date parțiale, completate ulterior de un studiu de monitorizare continuă, pentru extinderea duratei de utilizare.

Pentru materiale de referință cu matrice complexă, cum sunt cele alimentare, este recomandată utilizarea studiului izocron, în special în situațiile în care precizia metodei de măsurare este limitată sau unde sistemul analitic poate produce rezultate variabile în timp. Prin această abordare, toate probele sunt analizate simultan la final, iar variațiile observate pot fi atribuite exclusiv efectelor de timp și condițiilor de stocare, minimizând contribuțiile externe. Acest lucru este relevant pentru materiale în care degradarea chimică poate fi lentă și greu de detectat fără reducerea erorilor sistematice de măsurare.



2.3.3 Stabilitatea pe termen scurt

Studiul de stabilitate pe termen scurt (Figura 5) urmărește simularea condițiilor de stres ambiental la care materialul de referință poate fi supus în timpul etapelor de transport, manipulare sau depozitare temporară, în afara condițiilor optime. Scopul său este de a evalua rezistența materialului la variații tranzitorii de temperatură, umiditate sau expunere la lumină, caracteristice lanțului de distribuție și de a stabili limitele tolerabile de expunere fără afectarea valorii/valorilor atribuite.

Studiul experimental presupune expunerea materialului la condiții intenționat nefavorabile (ex: temperaturi de 30-40°C, umiditate ridicată, ciclicitate zi/noapte), pe intervale de timp scurte (e.g., 1, 3, 7, 14 zile), care reflectă duratele maxime de tranzit anticipate. Condițiile de testare trebuie să reflecte un scenariu realist de stres, raportat la ambalaj și modul de distribuție. În cazul materialelor sensibile la lumină sau oxigen, se poate include testarea în ambalaje transparente sau semipermeabile, pentru a analiza influența condițiilor externe asupra stabilității.

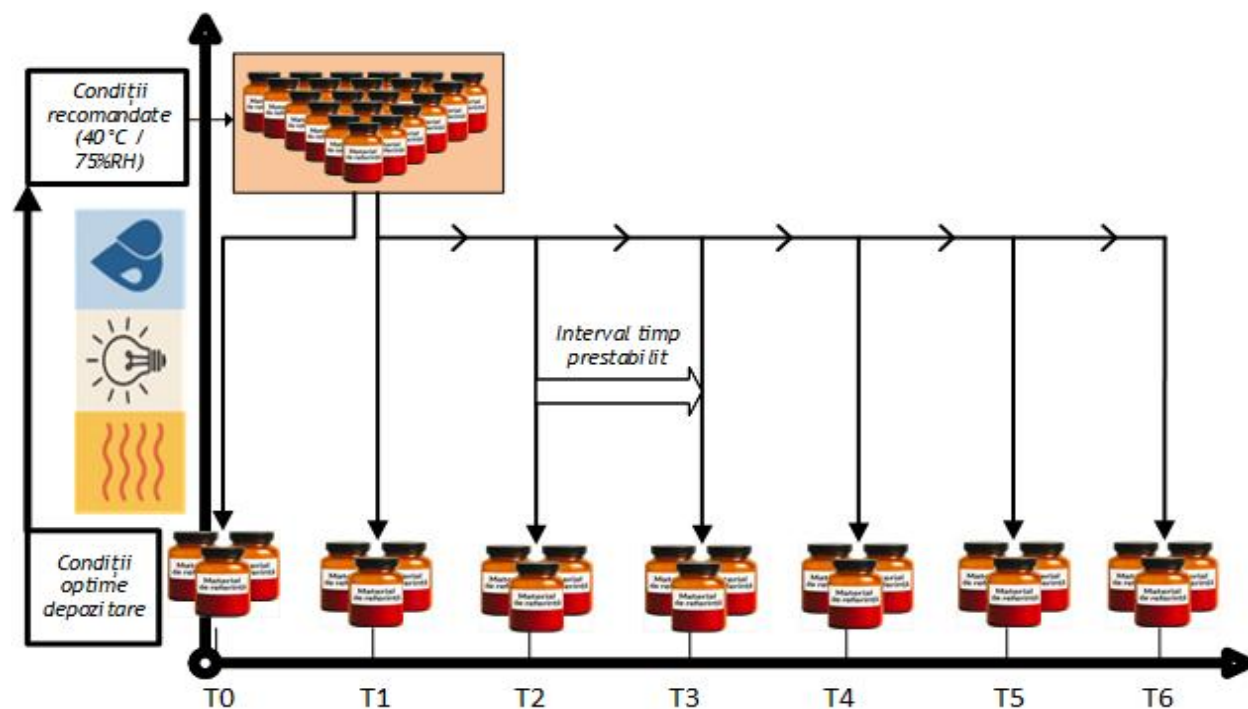


Figura 5. Schema unui studiu de stabilitate pe termen scurt



Analizele se efectuează imediat după încheierea perioadei de expunere, iar valorile obținute se compară cu cele ale materialului păstrat în condiții standard (martor). Evaluarea se axează pe detectarea unor variații rapide și semnificative ale proprietății monitorizate, care ar putea indica o instabilitate acută sau o sensibilitate ridicată a materialului la factori ambientali. În absența unor astfel de variații, materialul este considerat stabil la transport, iar producătorul poate include în documentație instrucțiuni privind condițiile acceptabile de manipulare și expediere, precum și eventuale precauții (e.g., ambalare termoizolantă, transport refrigerat).

Studiul de stabilitate pe termen scurt este critic în prevenirea pierderii valorii metrologice a materialului înainte de utilizare și pentru a garanta că logistica de distribuție nu afectează performanța analitică a lotului, în special în cazul materialelor cu stabilitate redusă sau ambalate în condiții atmosferice convenționale.

Pentru a maximiza relevanța rezultatelor, este recomandată analiza unui număr suficient de unități replicate (de exemplu, 3-5 replici pe punct temporal), iar rezultatele să fie comparate nu doar cu valoarea inițială, ci și cu valorile martor păstrate la temperatura nominală (ex: 20°C). Dacă în urma testării se constată o deviație semnificativă, ISO 17034 sugerează adoptarea unor măsuri preventive obligatorii, precum modificarea ambalajului, limitarea duratei de transport sau introducerea unor condiții stricte de expediere, inclusiv monitorizarea temperaturii pe durata livrării.

2.3.4 Stabilitatea în utilizare

Stabilitatea în timpul utilizării se referă la comportamentul materialului după desigilarea recipientului și în timpul expunerii repetate la aer, umiditate sau lumină, în contextul manipulării de laborator. Relevanța acestui tip de stabilitate depinde de frecvența și durata utilizării fiecărei unități de material, precum și de caracteristicile fizico-chimice ale matricei, în special dacă aceasta este higroscopică, oxidabilă sau volatilă.

Evaluarea se efectuează prin simularea condițiilor reale de utilizare, în care materialul este expus la aer ambiental pentru intervale definite (ex: 1, 3, 7 zile), cu sau fără închiderea parțială a recipientului între utilizări. Se poate analiza efectul mai multor cicluri de deschidere/închidere, pentru a testa impactul manipulării repetate.



În paralel, se păstrează un set de flacoane martor, nedeschise, în condiții standard, pentru comparație.

Analizele efectuate urmăresc identificarea unor modificări semnificative ale valorii proprietății monitorizate, care pot apărea ca urmare a absorbției de umiditate, a oxidării analitului de interes sau a pierderii prin volatilizare. De asemenea, se pot evalua modificări vizibile (culoare, miros, agregare) care pot influența manipularea materialului.

Rezultatele obținute permit formularea unor instrucțiuni de utilizare după deschidere, precum: utilizarea imediată, limitarea duratei de expunere sau depozitarea în recipiente etanșe. Pentru materialele de referință alimentare sub formă de pulbere, acest tip de stabilitate este, de regulă, mai puțin critic, însă poate deveni relevant în cazul în care se observă activitate higroscopică sau sensibilitate la oxigen.

Pentru materiale sub formă de pulbere, se poate determina gradul de expunere acceptabil exprimat în unități de timp sau în număr de cicluri de deschidere. De asemenea, ghidurile internaționale recomandă ca, pentru materialele cu risc ridicat în utilizare, să fie evaluată inclusiv compatibilitatea recipientului cu reutilizarea (etanșeitate, transfer de umiditate). ISO 17034 precizează că, în absența unor date de stabilitate post-deschidere, producătorul trebuie să recomande utilizarea imediată, iar orice reutilizare trebuie să fie explicit condiționată de păstrarea materialului în mediu controlat.

2.4 Caracterizarea materialului de referință

Atribuirea valorii proprietății selectate reprezintă etapa centrală în procesul de caracterizare a unui material de referință, constând în estimarea unei valori orientative pentru o proprietate metrologică relevantă. Chiar și în absența unei acreditări ISO 17034, această etapă poate fi realizată cu rigoare, atâta timp cât sunt respectate principiile de trasabilitate, utilizarea metodelor validate și documentarea completă a procedurilor. Scopul atribuției este obținerea unei valori credibile și bine fundamentate, care să poată fi utilizată în aplicații interne de control al calității, validări metodologice sau studii comparative.

Există mai multe abordări utilizate în atribuirea valorii informative, în funcție de resursele disponibile, nivelul de complexitate al matricei și scopul utilizării materialului. În lipsa unor teste interlaboratoare, o strategie comună constă în caracterizarea internă cu ajutorul unuia sau mai multor laboratoare competente,



utilizând metode analitice validate și echipamente calibrate. Cu toate acestea, pentru consolidarea încrederii în valoarea atribuită, pot fi utilizate și teste interlaboratoriale, în care mai multe laboratoare independente analizează același lot de material, în condiții comparabile. Această abordare permite validarea externă a caracterizării și crește credibilitatea valorii informative, chiar în afara unui cadru acreditat.

Metodele analitice utilizate în cadrul acestor caracterizări, fie interne, fie interlaboratoriale, trebuie să fie trasabile la standarde internaționale sau naționale recunoscute. În mod ideal, se utilizează metode de referință (standardizate sau oficiale), dar pot fi acceptate și metode alternative, cu condiția ca acestea să fie complet validate și să demonstreze rezultate comparabile. Fiecare laborator participant trebuie să opereze în condiții controlate și să documenteze fiecare etapă analitică, incluzând controlul intern al calității. În cazul în care se obțin valori apropiate din surse independente, consistența acestora consolidează încrederea în valoarea informativă atribuită.

Atribuirea valorii trebuie efectuată exclusiv după confirmarea omogenității lotului și, preferabil, înainte de începerea studiului de stabilitate. Prelevarea unităților destinate caracterizării se realizează pe baza unui plan reprezentativ, care să acopere întregul lot.

În cazul utilizării unor studii interlaboratoare, unitățile distribuite către participanți trebuie să provină dintr-un lot verificat ca fiind omogen și stabil pe termen scurt. Datele colectate pot fi ulterior comparate și integrate pentru obținerea unei valori.

Documentarea procesului de atribuire a valorii informative trebuie să includă toate detaliile relevante: metodele analitice, echipamentele utilizate, trasabilitatea materialelor etalon, rezultatele individuale și justificarea valorii finale. În cazul în care caracterizarea implică mai multe laboratoare, trebuie menționate clar criteriile de selecție a acestora și condițiile de participare. Valoarea informativă rezultată poate fi inclusă în fișa tehnică sau în documentația de însoțire a MR-ului, cu mențiunea explicită privind caracterul necertificat al valorii și absența unei incertitudini formale. Chiar și în lipsa acreditării, o atribuire fundamentată pe bune practici analitice și colaborări interlaboratoriale asigură credibilitate științifică și relevanță practică pentru utilizatori.



3. Fundamentarea condițiilor tehnice și metodologice pentru dezvoltarea materialului de referință

Pelița roșiei este o matrice bogată în compuși fenolici, concentrând până la 98% din totalul polifenolilor prezenți în fruct. Flavonoidele, principala clasă de polifenoli, se localizează aproape exclusiv în coajă, în timp ce pulpa conține cantități neglijabile, iar semințele contribuie preponderent cu acizi fenolici, în concentrații mai reduse comparativ cu pelița.

Principalii compuși identificați în peliță includ naringenin chalconă (flavonoid predominant), rutina (quercetin-3-O-rutinozid), derivați ai quercetinei și kaempferolului, precum și acizi fenolici precum clorogenic, cafeic, p-cumaric și ferulic. Această compoziție determină o capacitate antioxidantă semnificativ superioară în coajă față de celelalte părți ale fructului.

În procesarea industrială a roșiilor, rezultă subproduse bogate în coji și semințe, care păstrează majoritatea compușilor bioactivi. Polifenolii din aceste reziduuri, în special flavonoidele și acizii fenolici, sunt relativ stabili la tratamentele termice uzuale, menținând un potențial antioxidant valoros.

Conținutul total de polifenoli din peliță variază semnificativ în funcție de genotip. Soiurile de tip cherry tind să aibă un conținut mai ridicat, în timp ce soiurile mari (Roma, San Marzano) prezintă valori moderate, iar unele varietăți sălbatice pot atinge concentrații excepționale.

Valorile determinate pentru conținutul de polifenoli pot varia în funcție de metoda analitică utilizată, precum și de o serie de factori experimentali. Metoda Folin-Ciocalteu, aplicată pe scară largă pentru estimarea conținutului total de polifenoli, oferă rezultate comparabile între studii atunci când este implementată în condiții standardizate. În unele cazuri, determinarea este completată de tehnici cromatografice, precum HPLC, care permit cuantificarea individuală a compușilor fenolici majori.

Aceste diferențe metodologice, alături de variațiile legate de parametrii de extracție și analiză, pot conduce la rezultate distincte. Totuși, standardizarea protocoalelor analitice contribuie la obținerea unor valori reproductibile și comparabile. Această uniformizare este esențială în contexte care necesită precizie analitică ridicată, precum selecția unei materii prime cu profil fenolic bine definit sau dezvoltarea unui material de referință. În astfel de aplicații, acuratețea și comparabilitatea datelor devin criterii fundamentale.



3.1 Considerații privind compoziția făinii din pielițe de roșii

Făina obținută din pielițe uscate de roșii constituie o sursă concentrată de compuși polifenolici, întrucât eliminarea apei prin uscare determină creșterea valorii raportate a conținutului total de polifenoli pe unitatea de masă a produsului uscat. Totuși, dacă uscarea nu este controlată corespunzător, unele metode termice pot cauza pierderi ale polifenolilor (prin degradare oxidativă), mai ales în prezența oxigenului și a enzimelor oxidante. Prin aplicarea unor metode de uscare controlată, care limitează degradarea termică și oxidativă, se poate conserva o proporție mult mai mare din polifenolii inițiali.

Din perspectiva omogenității, această compoziție neuniformă, atât ca origine, cât și ca structură fizică, poate genera variații între loturi sau chiar între recipiente din același lot. Granulometria diferită, densitatea componentelor și posibilitatea de segregare în timpul manipulării impun utilizarea unor metode riguroase de omogenizare și ambalare.

În ceea ce privește stabilitatea, prezența compușilor fenolici, cu reactivitate ridicată față de oxigen, lumină și temperatură, determină o sensibilitate ridicată la degradare în condiții de depozitare inadecvate. De asemenea, umiditatea reziduală și activitatea apei (aw) pot influența reactivitatea chimică, proliferarea microbiană sau reacțiile de oxidare.

3.2 Variația conținutului total de polifenoli în făina din pielițe de roșii

Conținutul total de polifenoli din pielițele de roșii, exprimat în mg miliechivalenți acid galic/100 g (mg GAE/100g) substanță uscată, variază considerabil în funcție de soiul utilizat. Această variabilitate reflectă diversitatea genetică a tomatelor și este bine documentată în literatura de specialitate. De exemplu, într-un studiu comparativ pe 10 soiuri cultivate în condiții identice, valorile conținutului total de polifenoli determinate în pielițe au variat între 35 și 157 mg GAE/100 g. Soiurile de tip cherry tind să aibă concentrații mai ridicate de polifenoli, datorită raportului mare suprafață/volum și caracteristicilor genetice specifice. Un studiu raportează pentru aceste soiuri un interval de 64,6 până la 440 mg GAE/100 g, în funcție de varietate și condițiile de creștere. În cazul tomatelor de dimensiuni mari, destinate procesării industriale, valorile conținutului total de polifenoli din pielițe sunt de obicei moderate, însă coaja rămâne cea mai concentrată parte a fructului în compuși antioxidanți.



Studiile arată că hibridii comerciali pot acumula concentrații mai mari de polifenoli în coajă comparativ cu soiurile tradiționale. De exemplu, Szabo et al. (2019) au raportat un conținut total de polifenoli de 155 mg GAE/100 g uscat în pielițele soiului Mirsini, semnificativ mai ridicat decât media celorlalte probe analizate (~76 mg/100 g). În contrast, un soi local românesc (Țărănești roz) a prezentat doar 58 mg GAE/100 g uscat.

În contrast, soiurile de procesare, precum Roma și San Marzano, prezintă concentrații moderate de polifenoli în pielițe, însă datele cantitative disponibile sunt mai limitate. Studiul a raportat pentru coaja soiului San Marzano un conținut de aproximativ 32 mg GAE/100 g, ceea ce ar corespunde, după conversie la substanță uscată, unei valori semnificativ mai mari, având în vedere conținutul ridicat de apă al pielițelor.

Diferențele între soiuri sunt atribuite variabilității genetice în biosinteza flavonoidelor și condițiilor de cultivare. De exemplu, s-a raportat că stresul hidric a crescut conținutul total de polifenoli în pielițele unui soi tradițional de la 152 la 361 mg GAE/100 g. Deși factorii de mediu pot amplifica conținutul total de polifenoli, pentru dezvoltarea unui material de referință este preferabilă utilizarea unui lot cultivat în condiții controlate, pentru a asigura consistența compozițională.

Această variabilitate a fost confirmată și printr-un studiu realizat de INCDO INOE 2000 - Filiala ICIA Cluj-Napoca, care a evaluat stabilitatea fracțiilor vegetale rezultate din procesarea tomatelor, respectiv, semințe și pielițe, cu scopul de a selecta o materie primă adecvată pentru dezvoltarea unui material de referință candidat, valoros din punct de vedere nutrițional și funcțional.

În cadrul acestui studiu au fost analizate pulberi din trei soiuri de roșii cultivate în condiții similare. Valorile conținutului total de polifenoli determinate prin metoda Folin-Ciocalteu evidențiază diferențe notabile între soiuri, iar, comparativ, făina obținută din pielițele roșiilor cherry analizată în cadrul Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Bioresurse Alimentare - IBA București prezintă o concentrație net superioară de polifenoli.

Valorile conținutului total de polifenoli determinate în cadrul studiului sunt prezentate Tabelul 2, precum și în probele proprii obținute din roșii cherry, se încadrează în intervalele raportate în literatura de specialitate, confirmând influența semnificativă a soiului și a fracțiunii analizate asupra compoziției fenolice. Pielilețele de roșii cherry au prezentat cea mai ridicată concentrație de polifenoli dintre toate



probele testate, confirmând potențialul ridicat al acestui tip de roșii pentru aplicații antioxidante.

Tabel 2. Conținut total de polifenoli în pielițe și semințe de roși		
Soiul de roșii	Tipul probei	mg GAE/100 g
Prekos	Pielițe uscate	158,1
Buzău 1600	Pielițe uscate	131,9
Floradade	Pielițe uscate	117,6
Prekos	Semințe uscate	142,6
Buzău 1600	Semințe uscate	114,3
Floradade	Semințe uscate	128,5
Roșii cherry	Pielițe + semințe uscate	590,47

Totuși, având în vedere disponibilitatea practică a materiei prime la nivel industrial, pentru dezvoltarea ulterioară se va utiliza un lot provenit din procesarea industrială a tomatelor, compus preponderent din pielițe provenite de la soiuri mari, selecționate pentru productivitate și procesabilitate.

3.3 Factori de degradare a polifenolilor în pulberea din pielițe de roșii

Stabilitatea acestor compuși este influențată de mai mulți factori fizico-chimici, ceea ce impune un control riguros al condițiilor de procesare, ambalare și depozitare a pulberii.

Unul dintre principalii factori de degradare este expunerea la lumină, în special în spectrul ultraviolet și vizibil. Radiațiile luminoase declanșează reacții de fotooxidare, care duc la alterarea structurală a polifenolilor și la scăderea capacității antioxidante. Studii efectuate pe produse pe bază de roșii depozitate în ambalaje transparente au raportat pierderi semnificative ale conținutului de polifenoli în condiții de iluminare directă. Utilizarea unor recipiente opace sau din sticlă brună reprezintă o metodă eficientă de protecție, prin reducerea transmiterii radiațiilor UV și vizibile și limitarea degradării fotochimice a compușilor fenolici.



Oxygenul este un alt factor major de degradare, favorizând reacțiile de oxidare atât în sisteme lichide, cât și în pulberile vegetale. Aceste reacții determină scăderea activității biologice a polifenolilor și pot modifica proprietățile vizuale și gustative ale produsului. Expunerea la oxigen, chiar la temperaturi moderate, a condus la pierderi semnificative ale flavonoidelor și acizilor fenolici în studiile de stabilitate realizate pe extracte și pulberi din tomate. Pentru reducerea expunerii la oxigen se recomandă utilizarea de recipiente ermetice, cu volum de aer rezidual minim. Opțional, se pot introduce absorbante de oxigen, frecvent utilizate în industrie și adaptabile și în laborator pentru conservare pe termen lung.

Temperatura de depozitare influențează direct rata reacțiilor chimice care duc la degradarea polifenolilor. Creșterea temperaturii accelerează reacțiile de oxidare și hidroliză, mai ales în absența protecției față de lumină și oxigen. Studiile efectuate pe extracte de tomate depozitate la 30-60°C au evidențiat degradări rapide ale polifenolilor și carotenoidelor. În schimb, depozitarea la 4°C reduce semnificativ rata acestor reacții. Studiile au evidențiat că pierderile de polifenoli și activitate antioxidantă sunt mai lente în condiții refrigerate decât la temperatura camerei sau în medii accelerate.

Umiditatea reprezintă un factor critic în stabilitatea pulberilor vegetale. Prin creșterea activității apei (a_w), umiditatea favorizează mobilitatea moleculară și accelerează reacțiile de degradare. În pulberile uscate, umiditatea excesivă duce la aglomerare, pierderea higroscopicității controlate și degradarea compușilor bioactivi. Studii pe diverse pulberi vegetale, inclusiv dragon fruit și tomate, au arătat că niveluri ridicate de umiditate relativă (peste 50%) sau $a_w > 0,3$ duc la pierderi semnificative ale polifenolilor. Se recomandă menținerea a_w sub 0,3, prin uscare eficientă și depozitare în recipiente etanșe, preferabil cu desicanti (ex. silica gel).

Interacțiunile cu materialul de ambalare pot de asemenea influența stabilitatea polifenolilor, în special în cazul ambalajelor polimerice. Materialele cu proprietăți ridicate de transfer al oxigenului sau cu capacitate de adsorbție a compușilor fenolici pot accelera degradarea acestora. Aceste efecte sunt neglijabile în sticlă, dar au fost documentate în ambalaje PET, în special în cazul sucurilor și pastelor de tomate.

În concluzie, degradarea polifenolilor în pulberea din pieițe de roșii este determinată de factori multipli: lumină, oxigen, temperatură, umiditate și tipul ambalajului. Pentru menținerea stabilității compoziționale este importantă utilizarea unor ambalaje protectoare și a unor condiții de depozitare controlate, adaptate caracteristicilor fizico-chimice ale produsului.



3.4 Strategii de conservare a polifenolilor în făina din piește de roșii.

Pentru a preveni degradarea compușilor fenolici din pulberile vegetale, inclusiv a făinii obținute din piește de roșii, este necesară aplicarea unor măsuri de conservare care să limiteze expunerea la lumină, oxigen, umiditate și temperaturi ridicate. Menținerea stabilității polifenolilor în timpul depozitării și utilizării impune un control strict asupra acestor factori.

O primă măsură constă în ambalarea individuală a probelor în recipiente etanșe, evitând astfel deschiderea repetată a unui singur recipient și expunerea succesivă la aer și umiditate. Această strategie este deosebit de utilă în cadrul studiilor de stabilitate, unde sunt necesare eșantionări la intervale diferite de timp.

Ambalajul joacă un rol determinant în protecția față de factorii externi. Dintre opțiunile disponibile, sticla brună oferă avantaje semnificative. Aceasta asigură o barieră eficientă împotriva radiațiilor UV și vizibile, reducând riscul de foto-oxidare, principală sursă de degradare a flavonoidelor și acizilor fenolici. În plus, sticla nu permite transferul de oxigen și vapori de apă, oferind o protecție superioară față de materialele plastice precum PET sau HDPE, care permit difuzia gazelor și pot favoriza interacțiuni chimice cu pereții recipientului.

Pe lângă protecția față de lumină și oxigen, menținerea unei activități a apei (a_w) sub 0,3 este critică pentru stabilitatea polifenolilor. Aceasta se realizează printr-un proces eficient de uscare, depozitare în recipiente etanșe și, opțional, utilizarea desicanților. De asemenea, depozitarea la temperaturi scăzute (aproximativ 4°C) reduce semnificativ rata reacțiilor oxidative și hidrolitice, contribuind la conservarea pe termen lung a proprietăților antioxidante.

Din punct de vedere practic, sticla brună este disponibilă în volume adecvate (30-100mL), permite etichetare și sigilare. Alegerea acestui tip de ambalaj oferă garanții suplimentare privind integritatea probei și constanța valorilor analitice atribuite pe durata depozitării.

Astfel, integrarea unor măsuri simple cum ar fi ambalare în sticlă brună, etanșare eficientă, controlul umidității și temperaturii, contribuie la conservarea polifenolilor în făina din piește de roșii și la păstrarea stabilității valorii proprietăților.



3.5 Strategia de testare a omogenității și stabilității materialului

Pe baza analizei prezentate anterior privind variabilitatea conținutului total de polifenoli în funcție de soi, condițiile de mediu și procesul de uscare, se conturează cerințele de bază pentru validarea materialului de referință candidat. Făina obținută din pielețe de roșii reprezintă o matrice alimentară concentrată în compuși bioactivi, însă aceștia sunt susceptibili la degradare oxidativă în timp, chiar și în condiții controlate. Astfel, testarea omogenității și stabilității contribuie direct la confirmarea calității materialului candidat.

Pentru testarea omogenității și stabilității, va fi aplicată eșantionarea aleatorie simplă, prin selectarea unui număr prestabilit de unități din întregul lot. Probele vor fi prelevate din poziții diferite ale lotului, astfel încât să reflecte potențialele variații generate în timpul procesului de ambalare.

Având în vedere dimensiunea redusă a lotului (aproximativ 50 unități), testarea omogenității va fi realizată inițial pe 5 flacoane selectate aleatoriu din diferite zone ale lotului. Pe fiecare unitate se va determina conținutul total de polifenoli prin metoda Folin-Ciocalteu. Rezultatele obținute vor fi analizate pentru a identifica posibile variații între flacoane. Dacă nu se constată diferențe semnificative, materialul va fi considerat omogen în raport cu dimensiunea lotului.

În cazul în care variațiile depășesc pragul acceptabil, materialul va fi reomogenizat și retestat. Această testare inițială este adecvată pentru loturi mici și va fi completată ulterior de testări extinse, dacă este necesar. Deși făina din pielețe de roșii are o stabilitate relativ bună în absența apei, literatura de specialitate arată că polifenolii pot suferi degradări semnificative în primele luni de depozitare, inclusiv la temperaturi scăzute.

Astfel, perioada inițială de testare va fi de 2,5-3 luni, timp în care materialul va fi depozitat în flacoane din sticlă brună, protejate de lumină, la temperatura de 4 °C. Opțional, o serie de probe va fi păstrată experimental și la 25 °C, pentru a evalua influența condițiilor uzuale de depozitare. Analizele se vor efectua săptămânal, cu accent pe monitorizarea evoluției conținutului total de polifenoli.

Această perioadă a fost aleasă deoarece degradarea compușilor fenolici se poate manifesta rapid, în special în primele luni de stocare, așa cum indică date din literatură. În funcție de rezultatele obținute, monitorizarea va continua ulterior, pe termen lung, pentru a determina perioada maximă de valabilitate și condițiile optime de păstrare a materialului.



Această strategie are rolul de a demonstra că făina din pielețe de roșii îndeplinește condițiile necesare pentru utilizarea ca material de referință în determinarea conținutului total de polifenoli, având omogenitatea și stabilitatea demonstrate, precum și o valoare analitică trasabilă și reproductibilă.

Strategia de analiză poate fi revizuită în funcție de evoluția proiectului și de eventuale situații neprevăzute care pot influența desfășurarea studiilor. Orice ajustare va urmări păstrarea coerenței metodologice și atingerea obiectivelor propuse.

4. Studiu pilot pentru făina rezultată din extracția sucului de roșii

În momentul actual, materialele de referință certificate destinate determinării polifenolilor totali sunt, în general, substanțe pure sau soluții standardizate de compuși fenolici specifici. Cele mai frecvent utilizate MRC-uri includ acidul galic, catechina, quercetina și acidul clorogenic, toate disponibile în formă purificată și certificate conform standardului ISO de la furnizori renumiți precum Sigma-Aldrich și NIST. Aceste materiale de referință sunt folosite în special pentru calibrarea echipamentelor cum ar fi spectrofotometrele UV-Vis sau sistemele HPLC, unde se urmărește construirea unei curbe de calibrare bazate pe concentrații cunoscute ale acestor compuși.

Deși materialele de referință pe bază de substanțe pure sunt esențiale pentru calibrarea instrumentelor și verificarea metodelor, ele nu reflectă întotdeauna complexitatea reală a probelor analizate. Atunci când sunt analizate probe alimentare sau vegetale, utilizarea unui material de referință obținut dintr-o matrice complexă, cu caracteristici similare, contribuie la o evaluare mai realistă a comportamentului compușilor și a performanței metodei analitice. Astfel de materiale de referință permit evaluarea performanței analitice în contexte mai apropiate de cele reale, metodele devenind mai robuste și conferind încredere în rezultatele analitice obținute.

Astfel, matricea aleasă pentru dezvoltarea materialului de referință în cadrul proiectului a fost pieleța de roșii, selecție făcută în cadrul workshopului datorită posibilității reale de valorificare în economia circulară și conținutului său bogat în compuși bioactivi.

4.1 Testarea inițială a matricei selectate pentru conținutul de polifenoli

Pentru a reproduce cât mai exact compoziția și structura resturilor vegetale provenite din procese industriale de prelucrare, a fost realizată o procesare



experimentală la nivelul stației pilot, utilizând ca materie primă 5,25 kg de roșii cherry proaspete, achiziționate din comerț.

Roșiile au fost procesate printr-o metodă de stoarcere cu presare la rece, utilizând un echipament de tip storcător cu ax melcat (Figura 6), cu scopul de a separa fracția lichidă de componenta solidă (pielețe și pulpa reziduală).



Figura 6. Storcător cu presare la rece

În urma procesului, a rezultat o cantitate de 0,88 kg de deșeu vegetal compact (Figura 7A), reprezentând partea solidă reținută după extracția sucului. Această fracțiune, considerată relevantă pentru dezvoltarea ulterioară a unui material de referință, a fost supusă unui proces de uscare controlată cu ajutorul unui uscător convectiv (Figura 7B), desfășurat la o temperatură constantă de 50°C, timp de 17 ore și 45 de minute.

Parametrii precum temperatura și perioada de uscare au fost selectați pentru a reduce semnificativ conținutul de umiditate până la un nivel rezidual scăzut, favorabil conservării și procesării ulterioare, fără a compromite stabilitatea compușilor fenolici prin supraîncălzire.



Cofinanțat de
Uniunea Europeană



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287



Figura 7. A) Deșeu vegetal compact B) Uscator convectiv

În urma procesului de uscare efectuat în condiții controlate a fost obținută o cantitate finală de 107,7 grame de masă solidă uscată (Figura 8), reprezentând fracțiunea reziduală provenită din piețile și resturile vegetale



Figura 8. Masă solidă uscată



După uscarea completă, proba a fost mărunțită inițial cu ajutorul unui blender (Figura 9A), pentru a facilita manipularea și prelucrarea ulterioară. În această etapă s-a obținut un amestec cu textură neuniformă, în care se regăseau atât particule fine, cât și fragmente vizibile de pielițe și semințe. Pentru a îmbunătăți gradul de omogenitate, materialul a fost ulterior procesat cu o moară de laborator (Figura 9B), obținându-se o pulbere fină, asemănătoare unei făini, în care au fost integrate inclusiv semințele, considerate parte din compoziția naturală a matricei. Acest proces a permis obținerea unei probe uniforme, potrivită pentru analiza conținutului de polifenoli și pentru evaluarea fezabilității ca potențial material de referință.



Figura 9. A) Mărunțirea inițială a masei uscate B) Măcinarea masei uscate cu moara de laborator

4.2 Procedura de extracție pentru determinarea conținutului de polifenoli totali

S-a cântărit o cantitate de 0.1 g probă peste care s-a adăugat un volum de 10 ml de solvent de extracție (metanol 80%). Extractele au fost obținute prin vortexare la temperatura camerei timp de 4 ore. După vortexare, acestea au fost centrifugate timp de 30 minute la 10.000 rotații pe minut (rpm) la o temperatură de 4°C pentru a îndepărta reziduurile.

Pentru a optimiza extracția compușilor polifenolici, peste reziduul rămas a fost adăugat un volum de 10 mL metanol și supus unui proces suplimentar de vortexare timp



de 1 oră. Ulterior, amestecul a fost centrifugat la 10.000 rpm, timp de 30 de minute, la o temperatură controlată de 4°C, pentru a asigura o separare eficientă a fracției lichide.

4.3 Determinarea conținutului de polifenoli totali

Principiul metodei Folin-Ciocalteu se bazează pe reducerea reactivului Folin-Ciocalteu de către compușii fenolici, proces în urma căruia se formează un complex albastru de molibden-tungsten. Intensitatea acestei culori, măsurată spectrofotometric la 752 nm, crește proporțional cu concentrația de compuși fenolici din probă.

Determinarea conținutului total de polifenoli a fost realizată prin metoda Folin-Ciocalteu, adaptată condițiilor specifice laboratorului. În practică, 500 μL de extract metanolic au fost amestecați cu 5 mL reactiv Folin-Ciocalteu (1:15), la care s-au adăugat 500 μL de carbonat de sodiu 20%. După o perioadă de incubare de 20 de minute, la temperatura camerei și în întuneric, absorbția compusului colorat a fost măsurată la 752 nm cu un spectrofotometru (Specord 210 UV-VIS, Analytic Jena, Germania).

Pentru cuantificare, a fost realizată o curbă de calibrare utilizând soluții de acid galic cu concentrații cuprinse între 0,005 și 0,175 mg/mL, preparate și analizate în aceleași condiții ca și probele ($R^2 = 0,9999$). Rezultatele au fost exprimate ca mg echivalenți acid galic la 100 g (mg GAE/100 g). (Figura 10).

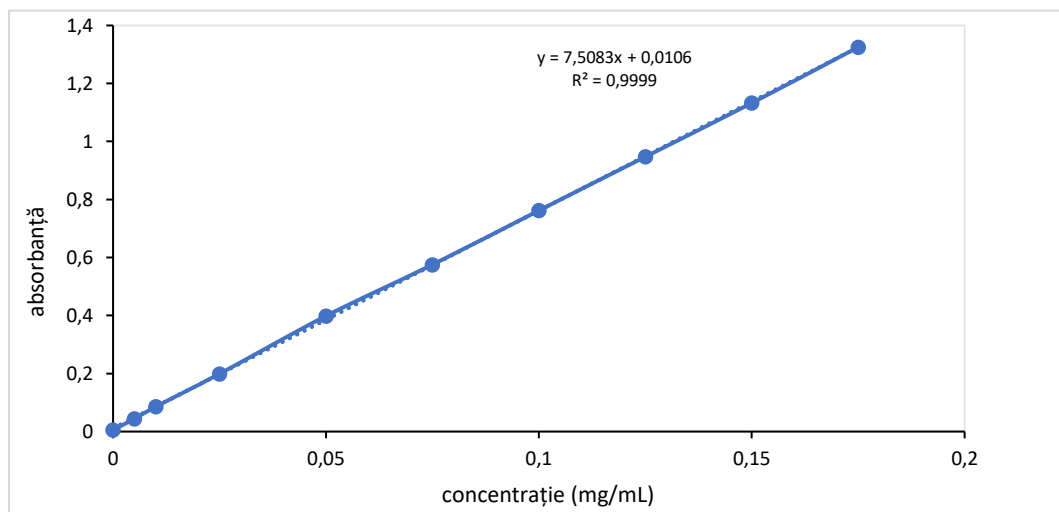


Figura 10. Curbă de calibrare utilizată pentru determinarea compușilor fenolici



4.4 Rezultate obținute

Conținutul de polifenoli totali în proba inițială a fost de 629,91 mg GAE/100 g substanță uscată (s.u). Pe parcursul depozitării s-a constatat o reducere treptată a concentrației compușilor fenolici. După o săptămână, valoarea TPC a înregistrat o scădere de 5,08%, iar după două săptămâni s-a observat o diminuare de 12,52% (Tabel 3).

Tabel 3. Conținutul de TPC în subprodusul analizat, pe parcursul depozitării

Proba	Timp de depozitare	Umiditate	TPC (mg GAE/100g) rap. la s.u
Subprodus	inițial	6,33	629,91
	1 săptămână de la t_0	6,41	597,91
	2 săptămâni de la t_0	7,05	551,03

Pentru a putea defini un material de referință certificat privind conținutul de polifenoli totali, studiile realizate au demonstrat că, pe o perioadă de valabilitate de două săptămâni, valoarea certificată este de $590,47 \pm 7\%$ mg GAE/100 g substanță uscată. Această valoare a fost stabilită pe baza determinărilor analitice repetate și a analizei statisticii rezultatelor.

Este important de subliniat că umiditatea reprezintă un factor determinant care influențează semnificativ conținutul de polifenoli totali raportat la substanța uscată. În cadrul acestei subactivități, proba analizată a prezentat o valoare medie a umidității de $6,60 \pm 7\%$, ceea ce poate influența atât stabilitatea compușilor fenolici, cât și precizia determinărilor analitice.

5. Etapele tehnologice în producția materialului de referință

5.1 Producția materialului de referință

Materialul de referință a fost produs pe baza materiei prime constituite din piețițe de roșii (Figura 11), provenite din fluxul tehnologic al procesării industriale a acestora. Matricea a fost utilizată în forma sa integrală, incluzând piețițele, semințele și fracțiile



solide, pentru a reflecta compoziția reală a subprodusului agroalimentar rezultat din procesare.

Prin această abordare s-a urmărit obținerea unui material omogen, stabil și reprezentativ, care să poată fi utilizat în determinări analitice privind compușii bioactivi specifici produselor vegetale. Procesul s-a desfășurat la scară de laborator, în condiții controlate, cu aplicarea unor etape succesive de prelucrare:

- recepția și conservarea materiei prime
- uscarea
- măcinarea în două etape
- ambalarea
- sigilarea

Aceste etape fiind concepute pentru a asigura păstrarea proprietăților fizico-chimice și stabilitatea materialului obținut.



Figura 11. Deșeul umed obținut în urma stoarcerii sucului de roșii



5.1.1 Uscarea controlată a deșeului

Proba de deșeu vegetal a fost supusă unui proces de uscare controlată utilizând un uscător convectiv Memmert 100-800 (Figura 12).



Figura 12. Proba de deșeu vegetal supusă procesului de uscare

Procesul de tratare termică s-a realizat la o temperatură constantă de 50°C, pe o durată de aproximativ 17 ore. Parametrii de uscare (Figura 13) (temperatura și timpul de expunere) au fost selectați astfel încât să asigure reducerea semnificativă a conținutului de umiditate până la un nivel rezidual scăzut, favorabil conservării și procesării ulterioare.



Figura 13. Parametrii de uscare



5.1.2 Măcinarea probei obținute

După finalizarea procesului de uscare, proba a fost mărunțită preliminar cu ajutorul unei râșnițe de laborator MRC-300CC (Figura 14), pentru a facilita manipularea și procesarea ulterioară. În urma acestei etape s-a obținut un amestec cu textură neuniformă (Figura 15), conținând atât particule fine, cât și fragmente vizibile de pielițe, nervuri și semințe.



Figura 14. Râșniță de laborator



Figura 15. Amestecul obținut utilizând râșnița de laborator

Pentru îmbunătățirea gradului de omogenitate și obținerea unei dimensiuni uniforme a particulelor, materialul a fost ulterior supus unui proces de măcinare fină, utilizând o moară de laborator Retsch ZM 200 (Figura 16). În urma acestui proces s-a obținut o pulbere fină, cu aspect similar făinii (Figura 17), în care au fost integrate toate componentele structurale – semințele, pielițele și nervurile – considerate părți naturale ale matricei vegetale.



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287



Figura 16. Moară de laborator



Figura 17. Pulberea obținută utilizând o moară de laborator

5.1.3. Ambalarea materialului de referință

Materialul de referință candidat a fost ambalat în borcane din sticlă brună cu volum nominal de 50 g, alese pentru protecția conținutului față de lumină și variațiile de umiditate. În fiecare recipient (Figura 18) au fost introduse aproximativ 20 g de material (Figura 19), cantitate considerată adecvată pentru analizele prevăzute și pentru menținerea uniformității lotului.



Figura 18. Flacon din sticlă brun



Figura 19. Material cântărit pentru ambalare



Ambalarea s-a realizat cu respectarea condițiilor de igienă și manipulare atentă a pulberii, pentru a evita pierderile și contaminările accidentale.

După umplere, fiecare flacon a fost închis etanș și sigilat cu folie de aluminiu prin convecție, pentru a asigura protecția împotriva umidității și a contactului cu aerul. Ulterior, flacoanele au fost etichetate cu informațiile esențiale privind lotul, masa și data ambalării, permițând o identificare rapidă și o trasabilitate completă a fiecărei unități.



Figura 20. Materialul de referință

5.2 Metode alternative de procesare și ambalare a materialului de referință

În luna septembrie 2025, în cadrul laboratorului INCDTIM a fost recepționată o probă de 1 kg de material vegetal (Figura 21), destinată evaluării unei metode alternative de ambalare a materialului de referință. Pentru dezvoltarea fluxului tehnologic necesar obținerii materialului vegetal în fiole vidate, proba a fost împărțită în două fracțiuni și supusă unor proceduri experimentale de deshidratare, respectiv liofilizare și distilare criogenică.



Figura 21. Materialul vegetal (faină obținută din tomate)

Prima fracțiune, constituită din făină de tomate uscată prin liofilizare, a fost utilizată pentru umplerea a 100 de fiole, fiecare conținând câte 2 grame de material de referință. Pentru cea de-a doua fracțiune, s-a aplicat un proces experimental de distilare criogenică, cu scopul îndepărtării complete a apei.

Au fost definite etapele tehnice ale protocolului de distilare criogenică, parametrii de siguranță și condițiile necesare derulării procesului, precum și modul de organizare a activităților ulterioare. Pentru completarea cadrului conceptual, sunt prezentate principiile distilării criogenice și avantajele acestei tehnici în obținerea unui material vegetal complet deshidratat (făină de tomate), adecvat pentru catalogare și păstrare ca material de referință.

5.2.1 Distilarea criogenică

Distilarea criogenică este o tehnică avansată de separare care utilizează temperaturi extrem de scăzute pentru a condensa și îndepărta complet apa dintr-o matrice. Procesul presupune:

- răcirea probei sub punctul de îngheț al apei, până la temperaturi foarte joase (în laboratorul din INCDTIM se utilizează azot lichid, -196°C),
- urmată de sublimarea sau condensarea apei într-un sistem închis, controlat, în condiții de vid.

Deși această metodă este consacrată în special pentru separarea gazelor, distilarea criogenică prezintă aplicații valoroase și în domeniul alimentar, în special în cadrul laboratoarelor de cercetare, unde este necesară obținerea unor probe complet anhidre.



Obiectivul a constat în utilizarea distilării criogenice pentru obținerea unui material vegetal complet lipsit de apă, cu potențialul de a fi utilizat ca material de referință în analize ulterioare, asigurând astfel omogenitate și stabilitate optimă. Utilizarea în laborator a materialelor de referință este importantă pentru asigurarea calității rezultatelor experimentale, fiind intens folosite pentru calibrarea echipamentelor și asigurarea parametrilor de performanță ai metodelor.

Avantajul major al distilării criogenice constă în capacitatea sa de a îndepărtarea complet apa, fără a afecta semnificativ compoziția chimică a materialului analizat, ceea ce o face ideală pentru cercetari de stabilitate a matricei investigate sau inhibarea activității microbiene. Comparativ cu alte metode de deshidratare, precum liofilizarea sau uscarea la temperaturi ridicate, distilarea criogenică oferă numeroase beneficii:

- **eliminarea completă a apei (100%):** spre deosebire de liofilizare, care atinge o eficiență de aproximativ 96% (lăsând un reziduu de umiditate de circa 4%), distilarea criogenică permite extragerea integrală a apei din matrice;
- **inhibarea completă a activității bacteriene:** lipsa totală a apei înseamnă că dezvoltarea microbiană este complet stopată, ceea ce este esențial pentru studii privind conservarea, stabilitatea și siguranța alimentară;
- **păstrarea integrității chimice a matricei:** procesul are loc la temperaturi foarte scăzute, ceea ce minimizează degradarea compușilor sensibili la căldură (ex. vitamine, enzime, pigmenți naturali);

În cadrul laboratorului INCDTIM, se utilizează distilarea criogenică pentru extragerea completă a apei din diverse matrici alimentare, cum ar fi:

- legume și fructe - unde umiditatea naturală este ridicată (70-90%);
- produse de origine animală (carne, ouă);
- cereale - care în starea lor naturală, neprocesate, au un conținut de apă care variază între 10% și 15%;
- miere de albine - o matrice alimentară complexă, a carui procent de apă nu depășește 20%.

5.2.2 Dezvoltarea și stabilirea protocolului de lucru pentru extracția apei din materialul de referință



Astfel, întregul proces, de la sosirea probei de material vegetal în laborator, până la obținerea fiolelor vidate care conțin acest material complet uscat, a cuprins mai multe etape:

- I - eliminarea completă a apei printr-un proces de distilare crigenică;
- II - încărcarea fiolelor de păstrare a materialului de referință;
- III - vidarea acestor fiole;
- IV - închiderea fiolelor utilizând un pen alimentat cu un amestec gazos de propan (25%) și butan (75%);
- V - izolarea fiolelor pentru prevenirea deteriorării acestora în timpul transportului, prin utilizarea tuburilor termocontractabile.

5.2.3 Îndepărtarea completă a apei prin distilare criogenică

Utilizând instalația brevetată de distilare criogenică pentru extracția, fără fracționare izotopică, a apei din miere [brevet nr. RO138008 (A0)], s-a dezvoltat, testat și standardizat protocolul de lucru specific pentru extracția apei din materialul vegetal propus ca material de referință în cadrul proiectului - făina obținută din tomate. Procesul a presupus un efort susținut de adaptare tehnologică, fiind axat pe optimizarea parametrilor operaționali pentru a asigura un consum minim de resurse, un grad ridicat de eficiență energetică și costuri reduse de procesare. Rezultatul constă într-o metodă reproductibilă, robustă și scalabilă, aliniată cerințelor unui cadru de cercetare competitiv și în acord cu obiectivele de performanță asumate prin proiect. Acest protocol constă în următorii pași (Figura 22):



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

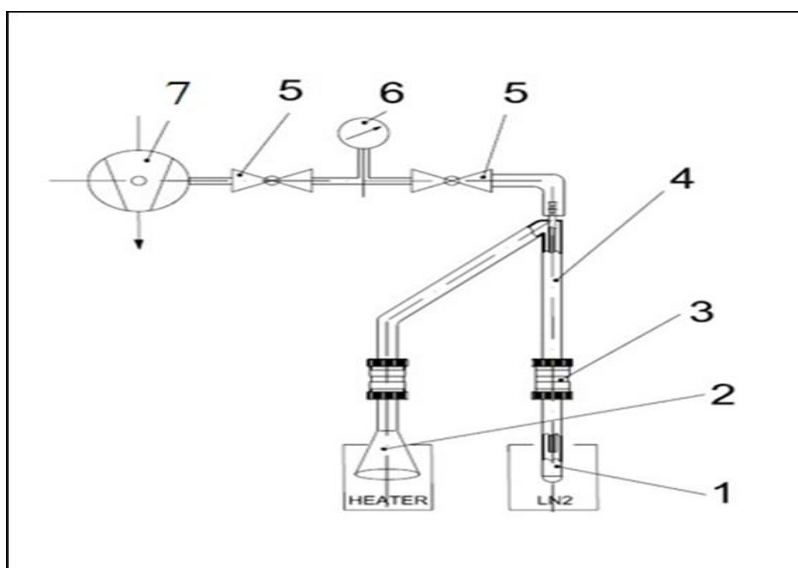


Figura 22. Schema instalației de distilare criogenică

În fiola port-probă 2 se pune o cantitate de făină obținută din tomate și se cântărește (pentru determinarea ulterioară, cu exactitate, a conținutului de apă din probă).

În vederea optimizării costurilor, s-au conceput fiole de volum variabil, pentru a permite procesarea unei cantități mai mari de material vegetal în procesul de distilare criogenică.

A fost inițiat un proces de optimizare a protocolului, cu accent pe obținerea unui randament maxim al procedurii și pe reducerea costurilor energetice asociate etapelor de extragere criogenică. În acest context, s-a decis fabricarea unui set extins de fiole (Figura 23), cu volume variabile, pentru a permite cântărirea unor cantități progresiv mai mari de probă.



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

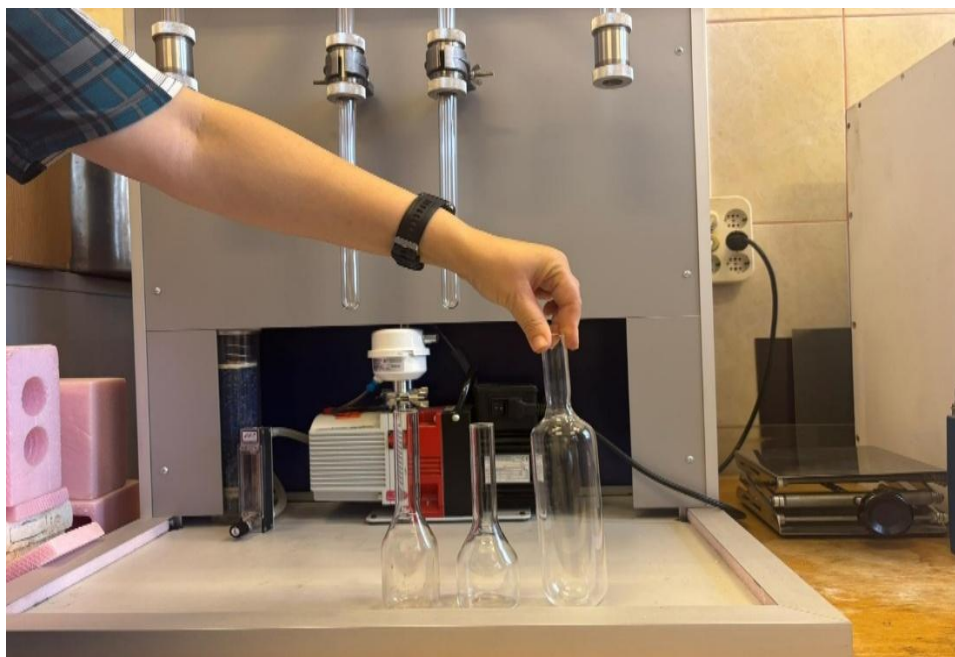


Figura 23. Fiole cu volume variabile

Astfel, procesul a debutat cu o fiolă încărcată cu 25,0 g de material vegetal, urmată de utilizarea unor mase de 37,48 g, 37,79 g, 68,5 g, respectiv 85,0 g - aceasta din urmă reprezentând cea mai mare cantitate procesată (Figura 24).



a)



b)



c)



d)

Figura 24. Încarcarea fioleu cu material vegetal



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287



a)



b)

Figura 25. Etape intermediare ale protocolului de lucru

1. Se atașează fiola colectoare 1 și fiola port-probă 2, care conține material vegetal, la puntea de distilare 4 (Figura 25 a,b).
2. Se videază instalația (vid preliminar 10^{-3} torr) până la valva 5.
3. Se imersează port-proba 2 în cuibul încălzitor (setat în intervalul de temperatură $50^{\circ} - 60^{\circ}\text{C}$), iar fiola colectoare 1 se imersează în azot lichid (Figura 266).



a)



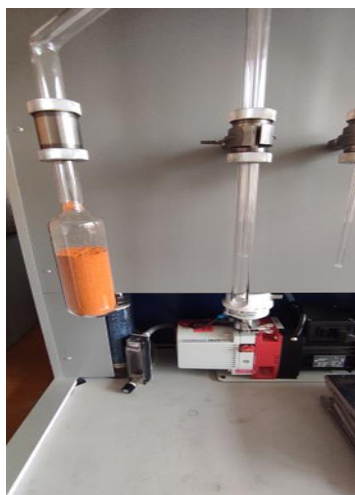
b)



c)



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287



d)



e)

Figura 26. Pași din timpul procesului de distilare criogenică

4. Se deschide valva (robinetul) 5 spre linia de vid.
5. Pe măsură ce aerul din instalație este evacuat, începe procesul de extracție propriu-zisă a apei din proba de tomate. Pentru o extracție totală a apei aferente probei de 25 g faină de tomate, acest proces durează aproximativ patru ore. Apa extrasă condensează pe pereții fiolei colectoare imersată în azot lichid.
6. Când toată apa a fost extrasă din probă, se oprește încălzirea cuibul și se închide valva 5 spre pompa de vid.
7. Se coboară treptat vasul ce conține azotul lichid, astfel încât apa colectată să se dezghețe treptat (Figura 16 c-e).
8. Când s-a dezghețat toată apa, se depresurizează instalația și se extrage apa cu ajutorul unei pipete. Toată proba de apă extrasă este depusă în flaconul destinat analizei izotopice ulterioare.



Consumul de energie și cel de azot lichid s-au înregistrat și monitorizat pe parcursul derulării procesului (Figura 27):



Figura 27. Monitorizare consum energie si azot

Din Tabel 4, se observă că probele liofilizate conțineau **4% umiditate reziduală**, iar prin aplicarea procesului de **distilare criogenică** s-a obținut **uscarea completă (100%)** a materialului vegetal.

S-a constatat că, exceptând fiola cu proba de 25 g, toate celelalte fiole cu probe, în ciuda diferențelor de masă, au necesitat aceleași condiții operaționale - respectiv același timp de procesare, același volum de azot lichid și același consum energetic - pentru realizarea etapei de extragere completă a apei prin distilare criogenică. In concluzie, s-a stabilit ca fiola incarcată cu 85 g probă este cea care indeplineste conditiile de a distila cea mai mare cantitate de material de referință, cu un consum optim de energie și azot lichid.

Tabel 4. Parametrii înregistrați pe parcursul optimizării protocolului de lucru

Cantitatea de probă (grame)	Timp extracție (ore)	Cantitatea apă extrasă (ml)	Procent apă (%)	Consum energie (KWh)	Consum azot lichid (litru)
25.00	4	1.00	4.00	0.55	1.0
37.48	6	1.50	4.00	1.16	1.5
37.79	6	1.51	4.00	1.16	1.5
68.50	6	2.74	4.00	1.16	1.5
85.00	6	3.40	4.00	1.16	1.5



5.2.4 Inchiderea fiolelor care conțin cele două fracțiuni de probe: liofilizate și distilate criogenic

În etapa următoare, în luna octombrie, atât din materialul vegetal liofilizat, cât și din materialul vegetal complet uscat, s-au cântărit câte 2 g în fiole din Pyrex, cu diametrul de 10 mm. În prealabil, fiolele au fost spălate cu apă bidistilată (operațiune repetată de 10 ori) și clătite ulterior cu apă ultrapură (procedură repetată de 5 ori) (Figura 30). Etapa finală de uscare s-a realizat timp de 24 de ore la o temperatură de 130°C. (Figurile 28, 29).

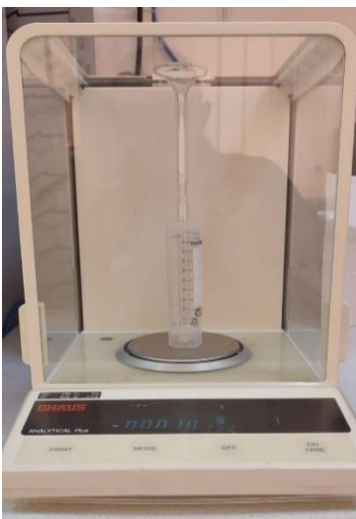


Figura 28. Fiolele au fost spălate cu apă bidistilată

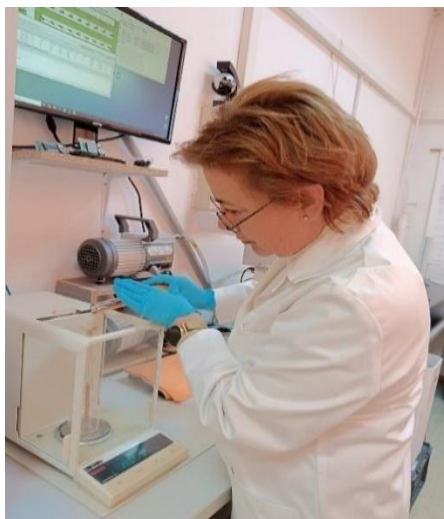


Figura 29. Cântărire probelor

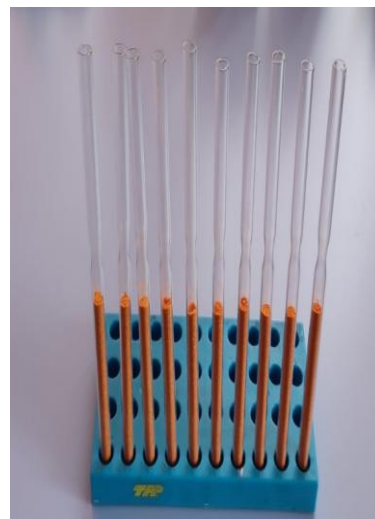


Figura 30. Etapa finală de uscare

A urmat etapa de modelare a fiolei, utilizând flacăra cu oxigen, în vederea obținerii unei geometrii a fiolei potrivită pentru procedura de vidare și închidere a fiolelor. (Figura 31)



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

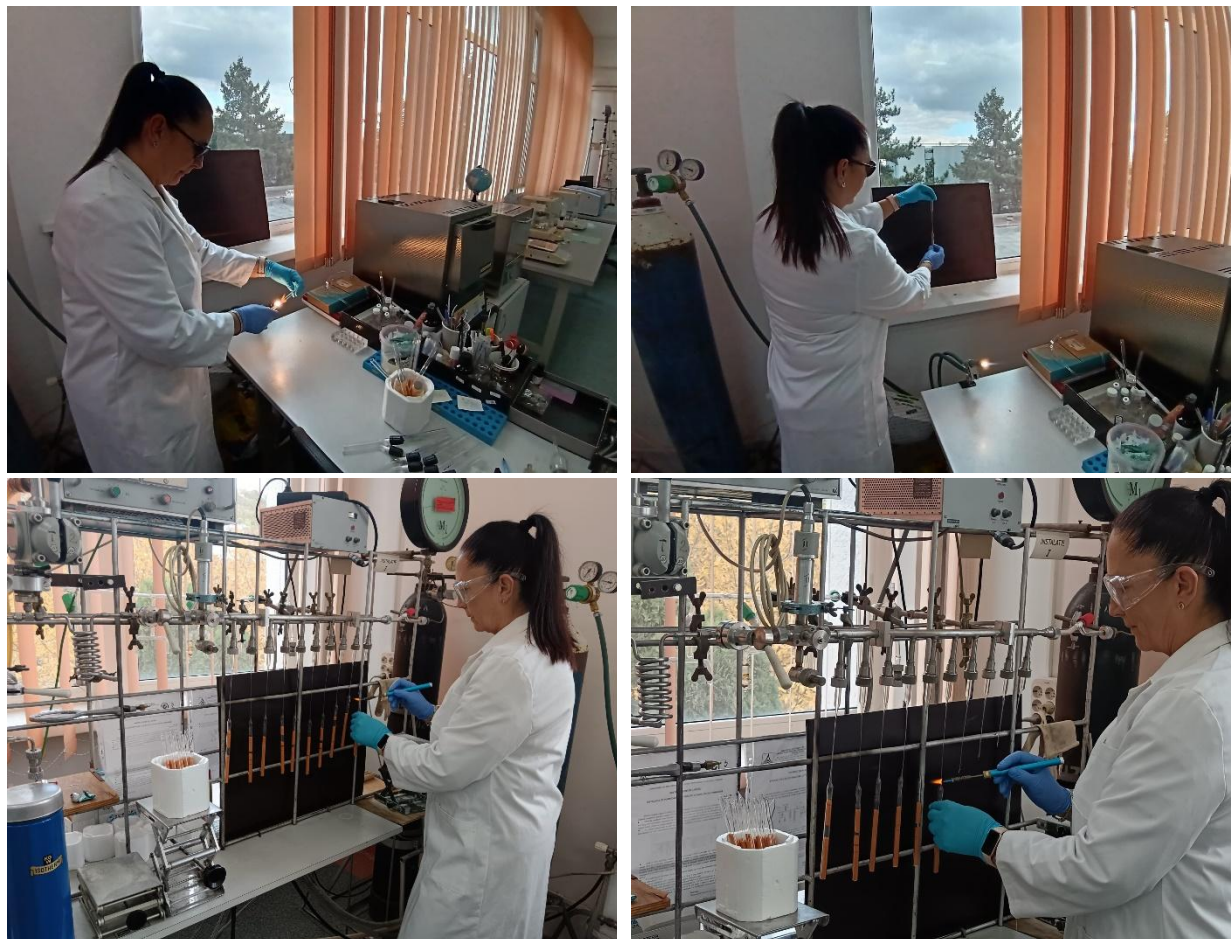


Figura 31. Modelarea fiolei cu flacăra de oxigen

Tot acest proces s-a realizat pe materialul vegetal grupat în două categorii: i) materialul vegetal uscat prin liofilizare și ii) materialul vegetal din care s-a extras apa prin distilare criogenică (Figura 32). Pentru vidarea și închiderea fiolelor care conțineau făină obținută din tomate, dar uscată prin liofilizare, timpul de eliminare a aerului a fost mai îndelungat din cauza procentului de apă rămas după liofilizare (4 %) și probele s-au vidat mai greu comparativ cu probele obținute prin distilare criogenică.



Cofinanțat de
Uniunea Europeană



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287



Figura 32. Fiole cu material vegetal uscat prin cele două metode

Pasul următor a constat în izolarea fiolelor pentru prevenirea deteriorării acestora în timpul transportului, prin utilizarea tuburilor termocontractabile (Figura 24) și a unui pistol cu aer cald (200°C) (Figura 33):



Figura 33. Izolarea probelor





Pentru a diferenția materialul de referință provenit din probele liofilizate față de cele uscate prin distilare criogenică, s-au utilizat tuburi termocontractabile de două culori diferite: roșu, pentru probele liofilizate, și albastru, pentru cele obținute prin distilare criogenică (Figura 34). La final, s-au obținut în total 200 de fiole, fiecare set cuprinzând câte 100 de fiole, izolate cu tub termocontractabil roșu și respectiv albastru. Temperatura de păstrare a fiolelor este temperatura camerei (19-25 °C).



Figura 34. Fiole sigilate cu tuburi termocontractabile roșii și albastre

6. Analiza și interpretarea rezultatelor pentru materialul de referință produs

6.1 Procedura de extracție pentru determinarea conținutului de polifenoli totali

Pentru extracția compușilor polifenolici, s-au cântărit 0,1 g probă peste care s-a adăugat un volum de 10 mL de solvent de extracție (metanol 80%). Extractele au fost obținute prin vortexare (Vortex Multi reax, Heidolph Instruments, Schwabach, Germania)(Figura 35) la temperatura camerei, timp de 4 ore și 30 minute. După vortexare, acestea au fost centrifugate timp de 30 minute la 10.000 rotații pe minut (rpm) la o temperatură de 4 °C pentru a îndepărta reziduurile.



Pentru a recupera complet compușii polifenolici, peste reziduul rămas (ce rămâne după ce se colecează extractul) a fost adăugat un volum de 10 mL metanol și supus unui proces suplimentar de vortexare timp de 1 oră. Ulterior, amestecul a fost centrifugat la 10.000 rpm, timp de 30 de minute, la o temperatură controlată de 4°C, pentru a asigura o separare eficientă a fracției lichide.

Au fost analizate atât extractele inițiale, cât și cele obținute după vortexarea și centrifugarea reziduului. Concentrațiile celor două au reprezentat concentrația finală pentru o probă.

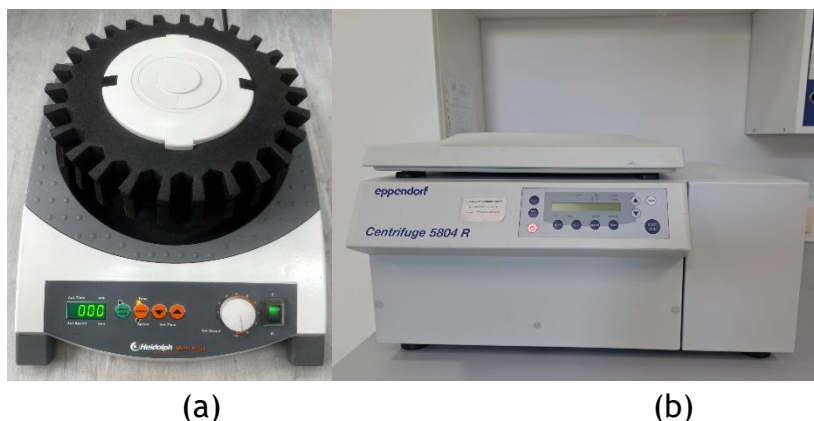


Figura 35. Echipamentele utilizate pentru obținerea extractelor (a) vortex, (b) centrifugă

6.2 Determinarea conținutului de polifenoli totali

Principiul testului F-C constă în reducerea reactivului Folin-Ciocalteu în prezența substanțelor fenolice, rezultând producerea de albastru de molibden-tungsten care este măsurat spectrofotometric la 752 nm, iar intensitatea crește linear odată cu concentrația de fenolici în mediul de reacție.

Conținutul total de compuși polifenolici a fost determinat prin metoda Folin-Ciocalteu, adaptată la condițiile de lucru din laborator. Pe scurt, 500 μ L extract metanolic a fost amestecat cu 5 mL reactiv Folin-Ciocalteu (dilat cu apă în proporție de 1:15) și incubat la întuneric timp de 10 minute. După expirarea celor 10 minute se adaugă 500 μ L carbonat de sodiu 20% și se lasă la incubat timp de 20 minute. După 20 minute de incubare la temperatura camerei, la întuneric, compusul albastru colorat



dezvoltat a fost măsurat spectrofotometric la 752 nm utilizând un spectrofotometru (Specord 210 UV-VIS, Analytic Jena, Germania). S-a realizat o curbă standard folosind diferite concentrații (0,005-0,175 mg/mL) de acid galic în aceleași condiții cu proba ($R^2=0,9999$). Rezultatele au fost exprimate ca medie a 6 rezultate, în mg miliechivalenți acid galic/100 g (mg GAE/100g) (Figura 36).

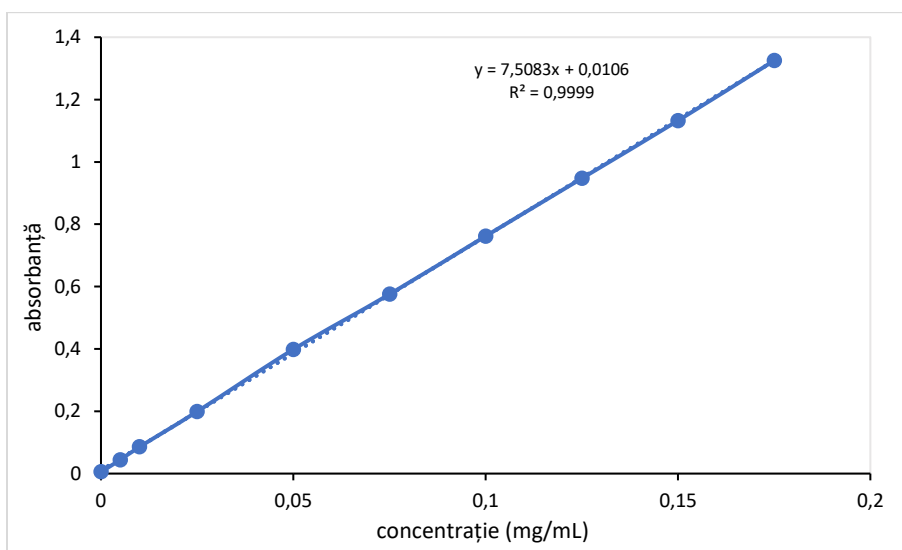


Figura 36. Curba de calibrare pentru acid galic utilizată pentru determinarea compușilor polifenolici

6.3 Reactivi utilizați

- Reactiv Folin Ciocalteu - Sigma Aldrich
- Acid galic - Sigma Aldrich
- Carbonat de sodiu - Carl Roth
- Metanol - Carlo Erba

După obținerea materialului de făină de roșii, s-au realizat studii pentru evaluarea **omogenității** și **stabilității** acestuia, conform cerințelor ghidurilor ISO 17034 și ISO Guide 35. Aceste studii au avut ca scop verificarea uniformității distribuției analitului în întreg lotul de material și asigurarea faptului că proprietățile certificate rămân neschimbate pe parcursul perioadei de valabilitate. Evaluarea omogenității s-a efectuat pe un set reprezentativ de unități selectate aleator, iar stabilitatea a fost monitorizată în timp (9 săptămâni), în condiții controlate de temperatură și umiditate,



pentru a confirma stabilitatea și reproductibilitatea materialului în utilizări analitice repetate.

6.4 Evaluarea omogenității probei de făină obținută din subprodusele reziduale (pielițe și seminte) rezultate în urma procesării roșiilor

Testele de omogenitate sunt esențiale pentru a asigura consistența proprietăților materialelor de referință în toate unitățile și în cadrul unităților individuale. Ghidul ISO 35:2017 oferă îndrumări detaliate privind efectuarea testelor de omogenitate ca parte a procesului de producție a MR (Figura 37).

Testele de omogenitate asigură:

- omogenitatea între unități: toate unitățile MR au valori ale proprietăților consistente în limita incertitudinii declarate;
- omogenitatea în cadrul unității: materialul din cadrul fiecărei unități este uniform, în special atunci când se prelevează subeșantioane pentru măsurare.

Evaluarea omogenității

- variabilitatea între unități: abaterea standard între unități este calculată pentru a determina dacă variabilitatea este acceptabilă pentru utilizarea preconizată a MR;
- variabilitatea în cadrul unității: dacă este permisă subeșantionarea, variabilitatea în cadrul unității este evaluată pentru a se asigura că dimensiunea minimă a eșantionului este suficientă pentru măsurători precise.



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

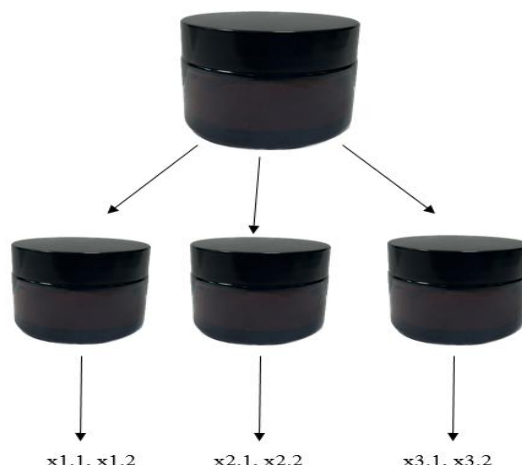


Figura 37. Schema pentru evaluarea omogenității făinii obținute din suprodusul rămas după stoarcerea roșiilor

Testele de omogenitate asigură că materialul de măsurare este potrivit pentru utilizarea prevăzută, iar rezultatele sunt utilizate pentru a calcula componenta de incertitudine asociată cu omogenitatea. Dacă se constată că materialul este insuficient de omogen, pot fi necesare procesări sau ajustări suplimentare.

Testarea omogenității este o etapă esențială în producția de materiale de referință pentru a asigura fiabilitatea și consecvența măsurărilor în toate unitățile și subeșantioanele.

6.4.1 Rezultate obținute în urma evaluării omogenității

În vederea caracterizării și certificării materialului de referință, s-au realizat studii privind omogenitatea acestuia, conform recomandărilor ISO Guide 35. Lotul de făină obținut a fost subdivizat în trei flacoane brune, etanș închise, care au fost păstrate în condiții controlate, la întuneric și la o temperatură de 4 °C. Ulterior, din fiecare flacon au fost prelevate probe care au fost analizate în dublu, în vederea evaluării omogenității materialului.



Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 5.

Tabel 5. Determinarea conținutului de polifenoli totali în materialul analizat pentru evaluarea omogenității

Probă		Umiditate (%)	TPC (mg GAE/100g) rap. la s.u	Medie pe lot	Medie	Deviația standard
1	1.1	5,00	730,24	720,77	740,38	17,45
	1.2	5,02	711,29			
2	2.1	4,98	774,23	754,19		
	2.2	4,95	734,14			
3	3.1	5,01	748,83	746,20		
	3.2	4,99	743,57			

În continuare, s-au analizat următorii parametri: varianța între loturi, varianța între replicare și incertitudinea măsurărilor, pentru a evalua omogenitatea probelor. Această analiză a permis evidențierea variațiilor atât între loturi cât și în cadrul replicatelor, oferind o imagine clară asupra consistenței și repetabilității măsurărilor realizate.

Astfel în analiza omogenității s-au analizat 3 loturi, fiecare lot în dublu. Aplicând analiza statistică cu programul MiniTab, se obțin următoarele:

- **Varianța între loturi (SB) - 609,24 (mg/100g)²**
- **Varianța între replici (SW) - 332,32 (mg/100g)²**
- **Incertitudinea standard pentru o unitate - 12,89 mg/100g**
- **Incertitudinea standard a mediei globale - 7,44 mg/100g**
- **Incertitudinea totală (include variabilitatea între loturi și între replici) - 16,08 mg/100g**

Mai departe, a fost calculat p-value pentru a testa dacă există diferențe semnificative între loturi. Astfel valoarea obținută a fost de 0,29 ($p > 0,05$), ceea ce înseamnă că nu există diferențe semnificative între loturi, proba este omogenă.



6.5 Evaluarea stabilității probei de făină obținută din subprodusele reziduale (pielețe și seminte) rezultate în urma procesării roșiilor

Pentru evaluarea stabilității făinii de roșii în vederea elaborării unui material de referință certificat, au fost pregătite inițial 27 de probe ambalate în flacoane etanșe. Pe parcursul a nouă săptămâni de depozitare, s-au analizat câte trei flacoane în fiecare săptămână, fiecare probă fiind determinată în dublu. Determinările au vizat conținutul total de compuși polifenolici, în scopul urmăririi variațiilor acestora în timp și al evaluării stabilității matricei (Figura 38).

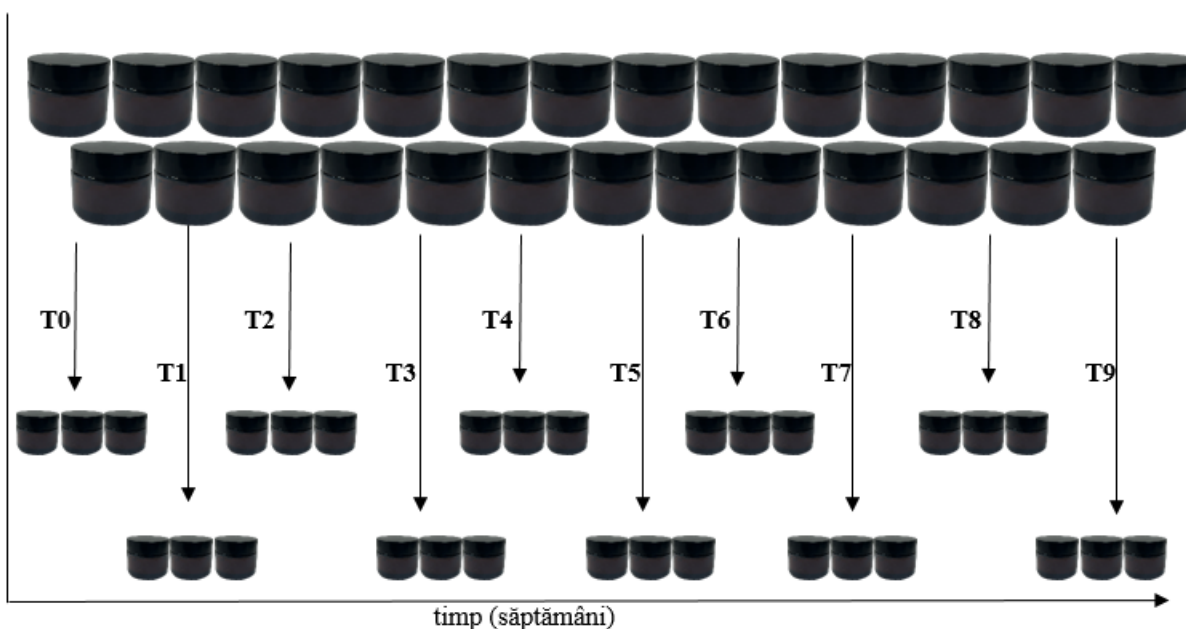


Figura 38. Schema pentru evaluarea stabilității făinii obținute din suprodusul rămas după stoarcerea roșiilor

6.5.1 Rezultate obținute în urma evaluării stabilității

Rezultatele obținute în urma determinărilor efectuate asupra făinii din subprodusul rămas după stoarcerea roșiilor sunt prezentate în Tabelul 6. Pe baza acestor date, s-a inițiat procesul de elaborare a unui material de referință certificat,



destinat utilizării în calibrarea și verificarea metodelor analitice pentru determinarea compușilor polifenolici din produse vegetale.

Tabel 6. Conținutul de TPC în făina obținută din subprodusul rămas după stoarcerea roșiilor

Timp de depozitare	Codificare	Probă în dublu	Umiditate (%)	TPC (mg GAE/100g) rap. la s.u	Medie lot	Medie
T0	0.1	1	5,05	779,01	764,31	762,24
		2	5,08	749,61		
	0.2	1	5,00	762,38	761,51	
		2	5,05	760,65		
	0.3	1	5,01	776,60	760,88	
		2	5,02	745,17		
T1	1.1	1	5,08	752,82	744,68	757,34
		2	5,00	736,54		
	1.2	1	4,93	742,40	753,05	
		2	4,94	763,70		
	1.3	1	4,91	784,39	774,30	
		2	5,01	764,20		
T2	2.1	1	5,20	730,47	750,12	752,95
		2	5,24	769,77		
	2.2	1	5,18	717,56	733,26	
		2	5,24	748,96		
	2.3	1	5,37	769,44	775,37	
		2	5,35	781,34		
T3	3.1	1	5,09	714,28	725,85	741,24
		2	4,94	737,43		
	3.2	1	5,23	777,68	770,80	
		2	5,16	763,92		
	3.3	1	4,98	711,55	727,08	
		2	5,31	742,61		
T4	4.1	1	4,98	729,06	729,56	737,87
		2	5,0	730,05		
	4.2	1	5,07	711,57	725,68	
		2	5,09	739,79		
	4.3	1	5,06	785,74	758,38	
		2	5,10	731,01		
T5	5.1	1	4,77	737,66	731,86	734,85
		2	5,33	725,70		
	5.2	1	5,46	738,98	722,03	



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

		2	5,32	705,07	750,84	
	5.3	1	5,28	773,98		
		2	5,27	727,86		
T6	6.1	1	5,06	719,53	724,36	725,34
		2	5,06	729,19		
	6.2	1	4,93	743,40	741,75	
		2	5,07	740,10		
	6.3	1	5,02	712,17	709,90	
		2	5,22	707,62		
T7	7.1	1	4,89	715,44	723,31	722,24
		2	4,95	731,17		
	7.2	1	4,79	720,14	716,24	
		2	4,93	712,34		
	7.3	1	4,99	707,46	727,18	
		2	4,99	746,89		
T8	8.1	1	5,02	723,37	736,11	716,77
		2	5,00	748,86		
	8.2	1	4,98	672,50	693,35	
		2	5,06	714,90		
	8.3	1	4,99	700,78	720,84	
		2	5,05	740,91		
T9	9.1	1	5,15	707,12	721,93	712,41
		2	5,21	736,73		
	9.2	1	5,01	712,11	709,80	
		2	5,16	707,49		
	9.3	1	5,08	724,54	705,49	
		2	5,08	686,44		

Stabilitatea făinii obținute din subprodusul rămas după stoarcerea roșiilor, utilizată pentru analiza compușilor polifenolici, a fost evaluată pe durata a 9 săptămâni. Pentru fiecare săptămână, au fost analizate câte trei flacoane, fiecare determinată în dublu. Analiza statistică ANOVA a permis calcularea varianței între flacoane (SB), a varianței între replici (SW), precum și a statisticii F și a p-value corespunzătoare pentru fiecare săptămână. Rezultatele obținute în urma analizei statistice sunt prezentate în tabelul 7.



Tabel 7. Analiza statistică ANOVA cu privire la stabilitatea făinii obținute din subprodusul rămas după stoarcerea roșiilor

Săptămâna	SB (variația între flacoane) (mg/100g) ²	SW (variația între replicate) (mg/100g) ²	F	p-value
0	6,65	309,20	0,021	0,9789
1	466,15	187,73	2,483	0,2311
2	899,26	445,34	2,019	0,2783
3	1311,00	281,66	4,654	0,1203
4	638,19	632,12	1,010	0,4621
5	432,77	570,00	0,759	0,5410
6	104,71	26,48	3,954	0,1442
7	61,93	311,68	0,199	0,8298
8	932,82	441,15	2,115	0,2673
9	145,23	391,62	0,371	0,7179

Interpretarea datelor indică faptul că, în toate săptămânile, diferențele dintre flacoane nu sunt semnificative statistic ($p\text{-value} > 0,05$), iar variabilitatea internă între replicate este mai mare decât diferențele între unități, confirmând **stabilitatea materialului**. Această constatare susține utilizarea făinii obținute din subprodusul rămas după stoarcerea roșiilor ca **material de referință stabil și omogen** pentru determinarea compușilor polifenolici pe parcursul a 9 săptămâni de depozitare.

Pe baza analizei tuturor rezultatelor din cele 9 săptămâni (3 flacoane $\times$ 2 replici pe săptămână), valoarea medie a conținutului de polifenoli, în făina obținută din subprodusul rămas după stoarcerea roșiilor, a fost determinată ca fiind **736,5 $\pm$ 25,5 mg TPC/100g s.u.**, interval [711,00-762,00]. Această valoare reflectă întreaga variabilitate observată între replici și între flacoane pe parcursul perioadei de 9 săptămâni, fiind astfel recomandată ca **valoare informativă pentru materialul de referință**. Intervalul media $\pm$ deviația standard oferă o estimare a incertitudinii asociate și poate fi utilizat pentru compararea și calibrarea metodelor analitice utilizate în determinarea compușilor polifenolici.

Este important de subliniat că umiditatea reprezintă un factor determinant care influențează semnificativ conținutul de polifenoli totali raportat la substanța uscată. Analiza de determinare a umidității a fost efectuată prin metoda clasică, la etuvă, la temperatura de 105°C, timp de 4 ore.



În cadrul acestei subactivități, proba analizată a prezentat o valoare medie a umidității de $5,08 \pm 0,14$, interval $[4,94-5,22]$ ceea ce poate influența atât stabilitatea compușilor fenolici, cât și precizia determinărilor analitice.

Concluzii

Metodologia utilizată a permis dezvoltarea și evaluarea unui material de referință pe bază de făină din piețițe de roșii, în conformitate cu principiile prevăzute în SR EN ISO 17034 și ISO Guide 35. Etapele parcurse au inclus documentarea, studiul pilot, producerea lotului și evaluarea comportamentului materialului în ceea ce privește omogenitatea și stabilitatea pe termen scurt.

Analiza literaturii a evidențiat factori importanți care influențează calitatea unui material vegetal de tip pulbere, precum variabilitatea naturală a compoziției, susceptibilitatea la oxidare și rolul condițiilor de depozitare în menținerea compușilor bioactivi. Pe baza acestor informații a fost formulat un plan de testare care a inclus criterii de eșantionare, ambalare și monitorizare în condiții controlate.

Evaluarea omogenității a arătat că diferențele dintre flacoane sunt reduse și nu indică variații relevante din punct de vedere analitic. Testarea stabilității pe durata celor nouă săptămâni a confirmat că materialul de referință își menține proprietățile în condițiile definite de depozitare, fără modificări semnificative ale nivelului de polifenoli.

În acest stadiu, materialul poate fi caracterizat printr-o valoare informativă a conținutului de polifenoli, utilă pentru validarea metodelor analitice și pentru activități de control al calității. Monitorizarea pe termen lung rămâne necesară pentru confirmarea stabilității extinse și pentru completarea caracterizării metrologice.

Rezultatele obținute susțin potențialul utilizării piețițelor de roșii ca sursă pentru dezvoltarea unui material de referință vegetal destinat determinării polifenolilor totali și deschid posibilitatea extinderii cercetărilor către loturi mai mari și perioade de depozitare mai lungi.



**Cofinanțat de
Uniunea Europeană**



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

Echipa de experți care a participat la elaborarea documentului

Nume, prenume	Funcția în proiect	Contribuția la activitate
INCDB IBA Bucuresti		
Mărculescu Ovidiu	Expert	Dezvoltarea material de referință/Elaborare raport
Șerbancea Floarea	Coordonator activitate A3.1	Contribuții la dezvoltarea materialului de referință/Elaborare raport
Anghel Mihaela	Expert	Dezvoltarea material de referință/Elaborare raport
ICIA		
Simedru Dorina	Expert	Contribuții la dezvoltarea materialului de referință
INCDTIM		
Magdas Dana Alina	Expert	Contribuții la dezvoltarea materialului de referință/Elaborare raport
Magdas Ariana	Expert	Contribuții la dezvoltarea materialului de referință/Elaborare raport
David Maria	Expert	Contribuții la dezvoltarea materialului de referință/Elaborare raport
Cristea Gabriela	Expert	Contribuții la dezvoltarea materialului de referință/Elaborare raport
Petrica Nicoleta	Expert	Contribuții la dezvoltarea materialului de referință/Elaborare raport
Puscas Romulus	Expert	Contribuții la dezvoltarea materialului de referință/Elaborare raport
Curean Ioana	Expert	Contribuții la dezvoltarea materialului de referință/Elaborare raport
UB		
Moza Iasmina	Expert	Contribuții la dezvoltarea materialului de referință





Cofinanțat de
Uniunea Europeană



Consolidarea integrării nodului românesc METROFOOD-RO în infrastructura europeană de cercetare METROFOOD-RI, acronim METROFOOD-RO Evolve
Cod SMIS 2021+ 309287

USVT		
Radulov Isidora	Expert	Contribuții la dezvoltarea materialului de referință
Tulcan Camelia	Expert	Contribuții la dezvoltarea materialului de referință
Poiană Maria-Atena	Expert	Contribuții la dezvoltarea materialului de referință

Document realizat de,
Mărculescu Ovidiu

