

IOSUD-Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești



TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

Compozite funcționale pe bază de oleoresine și proteine pentru utilizări în industria alimentară

Doctorand,
Ionica (GHEONEA) DIMA

Conducător științific,
Prof. univ. dr. ing. habil. Nicoleta STĂNCIUC

Seria I.7: Ingineria produselor alimentare Nr. 15

GALAȚI

2021

Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
Școala doctorală de Științe fundamentale și ingineresti



TEZĂ DE DOCTORAT

Compozite funcționale pe bază de oleoresine și proteine pentru utilizări în industria alimentară

(Rezumatul tezei de doctorat)

Doctorand

Ionica (Gheonea) Dima

Președinte

Prof. univ. dr. ing. Gabriela Elena BHRIM

Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați

Conducător științific

Prof. univ. dr. ing. Nicoleta STĂNCIUC

Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați

Referenți științifici

Prof. univ. dr. ing. Georgiana CODINĂ

Universitatea "Ștefan cel Mare" din Suceava

Prof. univ. dr. ing. Elena MUDURA

Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară
din Cluj-Napoca

Prof. univ. dr. ing. Gabriela Râpeanu

Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați

Seria I.7: Ingineria produselor alimentare Nr. 15

GALAȚI

2021

Seriile tezelor de doctorat susținute public în UDJG începând cu
1 octombrie 2013 sunt:

Domeniul **ȘTIINȚE INGINEREȘTI**

Seria I 1: **Biotehnologii**

Seria I 2: **Calculatoare și tehnologia informației**

Seria I 3: **Inginerie electrică**

Seria I 4: **Inginerie industrială**

Seria I 5: **Ingineria materialelor**

Seria I 6: **Inginerie mecanică**

Seria I 7: **Ingineria produselor alimentare**

Seria I 8: **Ingineria sistemelor**

Domeniul **ȘTIINȚE ECONOMICE**

Seria E 1: **Economie**

Seria E 2: **Management**

Domeniul **ȘTIINȚE UMANISTE**

Seria U 1: **Filologie- Engleză**

Seria U 2: **Filologie- Română**

Seria U 3: **Istorie**

Cuprins:

Nr.	Denumire	Pagină
	Introducere	1
	I. STUDIU DOCUMENTAR	3
	CAPITOLUL 1. ASPECTE BOTANICE, MORFOLOGICE ȘI COMPOZIȚIONALE ALE TOMATELOR	3
1.1.	Aspecte botanice și morfologice	3
1.2.	Principalele clase de compuși biologic activi din tomate	3
1.3.	Efecte pentru sănătate ale compușilor biologic activi din tomate	4
1.4.	Procesarea industrială a tomatelor	5
	CAPITOLUL 2. ASPECTE TEORETICE ȘI PRACTICE PRIVIND DEFINIREA CONCEPTULUI DE OLEORESINE ȘI METODE DE OBȚINERE	5
2.1.	Introducere	5
2.2.	Extracția oleorezinelor prin metode convenționale	5
2.3.	Extracția oleoresinelor din tomate prin extracție cu fluide supercritice	5
2.4.	Extracția oleorezinelor prin tehnica de extracție cu fluide supercritice asistată de enzime	5
2.5.	Extracția oleorezinelor prin tehnica de extracție cu fluide supercritice asistată de ultrasunete	6
2.6.	Extracția oleorezinelor prin tehnica de extracție cu fluide supercritice asistată de presiune hidrostatică ridicată	6
	CAPITOLUL 3. ASPECTE TEORETICE PRIVIND MICROÎNCAPSULAREA COMPUȘILOR BIOLOGIC ACTIVI	6
3.1.	Aspecte generale	6
3.2.	Criterii de clasificare a tehnicilor de microîncapsulare	6
3.3.	Principalele metode utilizate în industria alimentară. Avantaje	6
	CAPITOLUL 4. EVALUAREA COMPARATIVĂ A UNOR METODE DE EXTRACȚIE APLICATE PIELIȚELOR DE TOMATE DIN PERSPECTIVĂ CONȚINUTULUI ÎN COMPUȘI BIOLOGIC ACTIVI	7
4.1.	Aspecte generale	7
4.2.	Obiectivele studiului	7
4.3.	Materiale și metode	8
4.3.1.	Materiale	8
4.3.2.	Extracția compușilor biologic activi din pielița de tomate liofilizate prin extracție solid-lichid cu diferiți solvenți	9
4.3.3.	Extracția compușilor biologic activi din pielița de tomate liofilizate prin extracție combinată solid-lichid cu diferiți solvenți și ultrasunete	9
4.3.4.	Extracția compușilor biologic activi din pielița de tomate	9

	liefilizate prin extracție cu fluide supercritice		
4.3.5.	Determinarea conținutului de carotenoide totale, β -caroten și licopen	10
4.3.6.	Determinarea activității antioxidante	10
4.3.7.	Identificarea compușilor carotenoidici din extractele selectate prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) a carotenoidelor	11
4.3.8.	Determinarea acizilor grași din lipide totale din extracte selectate	11
4.3.9.	Evaluarea comportamentului carotenoidelor din extractele selectate la tratamentul termic	11
4.3.10.	Cinetica reacțiilor de denaturare a compușilor biologic activi	12
4.3.11.	Investigații de modelare moleculară asupra comportamentului la diferite temperaturi a licopenului	12
4.3.12.	Evaluarea stabilității la oxidare a unor uleiuri îmbogățite cu extract din pielită de tomate prin metoda Rancimat	13
4.3.13.	Culoarea extractelor în ulei de bumbac și ulei de arahide	13
4.3.14.	Analiza statistică	13
4.4.	REZULTATE ȘI DISCUȚII	14
4.4.1.	Evaluarea comparativă a profilului fitochimic global al extractelor din pielite de tomate obținute prin extracția cu solvenți, extracția asistată de ultrasunete și extracția cu fluide supercritice prin metode spectrofotometrice	14
4.4.2.	Evaluarea comparativă a profilului fitochimic individual al extractelor din pielite de tomate obținute prin extracția cu solvenți, extracția asistată de ultrasunete și extracția cu fluide supercritice prin metode cromatografice	15
4.4.3.	Evaluarea profilului în acizi grași al extractelor din pielite de tomate obținute prin extracția cu solvenți combinată cu extracția asistată de ultrasunete	16
4.4.4.	Evaluarea stabilității unor compuși biologic activi și a activității antioxidante la tratamentul termic	17
4.4.5.	Comportamentul la temperatură a moleculelor de licopen estimat prin tehnici de modelare moleculară	18
4.4.6.	Evaluarea potențialului de utilizare a extractelor ca antioxidanți în diferite uleiuri (Rancimat)	18
4.4.7.	Culoarea	19
4.5.	Concluzii parțiale	19
CAPITOLUL 5. STABILIREA MECANISMELOR DE LEGARE DINTRE COMPUȘII BIOLOGIC ACTIVI DIN EXTRACTELE DIN TESCOVINA DE TOMATE ȘI PROTEINE DIN ZER DIN PERSPECTIVA MICROÎNCAPSULĂRII EFICIENTE			22
5.1.	Aspecte generale	22
5.2.	Obiectivele studiului	22
5.3.	Materiale și metode	23

5.3.1.	Materiale	23
5.3.2.	Echipamente	23
5.3.3.	Extracția lycopenui	23
5.3.4.	Determinarea conținutului de carotenoide totale, β -caroten și lycopen	23
5.3.5.	Cuantificarea cromatografică a lycopenui din extractul de tomate	23
5.3.6.	Tratamentul termic a soluțiilor proteice	23
5.3.7.	Experimente de quencing utilizând extractul de tomate	24
5.3.8.	Studii de modelare moleculară	24
5.3.9.	Analiza statistică	24
5.4.	REZULTATE ȘI DISCUȚII	24
5.4.1.	Caracterizarea în compuși biologic activi a extractului din pielită de tomate	24
5.4.2.	Evaluarea mecanismelor de legare dintre lycopen și proteine din zer prin spectroscopie de fluorescență	25
5.4.3.	Calculul parametrilor de legare și termodinamici	26
5.4.4.	Evaluarea mecanismelor de legare dintre lycopen și proteine din zer prin experimente de docking molecular și modelare moleculară	26
5.5.	Concluzii parțiale	27
CAPITOLUL 6. DEZVOLTAREA UNOR INGREDIENTE CU FUNCȚIONALITATE RIDICATĂ PENTRU POTENȚIALE UTILIZĂRI ÎN PRODUSE ALIMENTARE			28
6.1.	Aspecte generale	28
6.2.	Obiectivele studiului	29
6.3.	Materiale	29
6.4.	Extracția convențională solid-lichid cu solvenți combinată cu extracția cu ultrasunete	29
6.5.	Extracția carotenoidelor cu fluide supercritice	29
6.6.	Variante experimentale de microîncapsulare a compușilor biologic activi din pielită de tomate	30
6.7.	Determinarea conținutului de carotenoide și lycopen din variantele experimentale	30
6.8.	Determinarea activității antioxidante utilizând metoda ABTS.	30
6.9.	Determinarea cromatografică a compușilor bioactivi din extractele și pudrele din pielite de tomate	30
6.10.	Eficiența microîncapsulării compușilor carotenoidici din extractele microîncapsulate	30
6.11.	Structura și morfologia pudrelor microîncapsulate utilizând microscopia confocală	30
6.12.	Structura și morfologia pudrelor microîncapsulate utilizând microscopia de scanare electronică	31
6.13.	Cinetica de degradare termică a compușilor bioactivi din	31

	pudrele microîncapsulate		
6.14.	Activitatea de inhibiție a α -amilazei și a α -glucozidazei	31
6.15.	Activitatea antimicrobiană	31
6.16.	Studiul citotoxicității compușilor microîncapsulați	31
6.17.	Studiu de stabilitate a conținutului fitochimic pe durata depozitării	32
6.18.	Analiza statistică	32
6.19.	REZULTATE ȘI DISCUȚII	32
6.19.1.	Analiza comparativă a eficienței încapsulării al variantelor experimentale microîncapsulate	32
6.19.2.	Caracterizarea fitochimică a pudrelor microîncapsulate și evaluarea stabilității compușilor la depozitarea controlată	33
6.19.3.	Activitatea inhibitorie asupra unor enzime importante din punct de vedere metabolic	35
6.19.4.	Activitatea antimicrobiană a variantelor microîncapsulate selectate	35
6.19.5.	Analiza citotoxicologică a variantelor microîncapsulate	35
6.19.6.	Analiza morfologică și structurală a variantelor încapsulate	37
6.19.7.	Stabilitatea la tratamentul termic a compușilor biologic activi din varianta de microîncapsulare 1	39
6.20.	Concluzii parțiale	39
CAPITOLUL 7. CERCETARE APLICATIVĂ PRIN DEZVOLTAREA DE VARIANTE TEHNOLOGICE DE OBTINERE A UNOR PRODUSE ALIMENTARE CU VALOARE ADĂUGATĂ		41
7.1.	Aspecte generale	41
7.2.	Obiectivele studiului	41
7.3.	Materiale și metode	41
7.3.1.	Materiale	41
7.3.2.	Tehnologie de obținerea unui produs de tip dressing (maioneză vegetală) cu ados de pudră microîncapsulată varianta 1	41
7.3.3.	Determinarea caracteristicilor reologice	42
7.3.4.	Determinarea conținutului de carotenoide	42
7.4.	REZULTATE ȘI DISCUȚII	42
7.4.1.	Caracterizarea fitochimică a produselor alimentare cu valoare adăugată	42
7.4.2.	Analiza reologică a produselor alimentare cu valoare adăugată	42
7.5.	Concluzii parțiale	43
CAPITOLUL 8. CONCLUZII FINALE		44
CAPITOLUL 9. CONTRIBUȚII PERSONALE ȘI PERSPECTIVE DE CONTINUARE A STUDIILOR		45
CAPITOLUL 10. LISTA PUBLICAȚIILOR		46

Introducere

Pelița de tomate este obținută ca subprodus în industria de procesare a tomatelor, cu un flux abundent de deșeuri solide în întreaga lume. O mare cantitate de reziduuri este direcționată către depozitele de deșeuri sau ca hrană pentru animale. Privite din punct de vedere cantitativ, dar mai ales în ceea ce privește profilul fitochimic, pelița de tomate prezintă o oportunitate de valorificare a unor compuși biologic activi, cu funcții bine definite pentru corpul uman și creează totodată un stimulent pentru industriile care facilitează tranziția către bioproduse regenerabile.

Teza de doctorat intitulată **”COMPOZITE FUNCȚIONALE PE BAZĂ DE OLEORESINE ȘI PROTEINE PENTRU UTILIZĂRI ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ”** a vizat studiul comportamentului biochimic și funcțional al compușilor biologic activi din pelița de tomate, în principal carotenoidele, în vederea obținerii unor compozite funcționale.

Principalele **obiective științifice** vizate pe durata studiilor doctorale sunt:

- Testarea diferitelor metode de extracție pentru obținerea unor oleoresine îmbogățite în compuși biologic activi, cu funcții determinate, cum ar fi activitatea antioxidantă;
- Profilarea fitochimică a oleoresinelor din pelițe de tomate autohtone (*Solanum lycopersicum*), cu identificarea compușilor biologic activi cu impact în activitatea antioxidantă și evaluarea comportamentului la tratamentul termic, cu scopul elucidării mecanismelor de degradare și optimizării condițiilor de obținere și păstrare a produselor bogate în compuși carotenoidici.
- Evaluarea mecanismelor de legare dintre compușii carotenoidici și proteine din zer prin experimente de docking molecular și modelare moleculară din perspectiva optimizării condițiilor experimentale pentru microîncapsularea compușilor biologic activi din extractele din peliță de tomate.
- Dezvoltarea unor strategii de valorificare a oleresinelor obținute prin extracția compușilor biologic activi din pelița de tomate prin tehnici de microîncapsulare combinate, cu obținerea unor ingrediente cu rol funcțional multiplu.
- Activități de cercetare aplicativă prin dezvoltarea unei tehnologii de obținere a unui produs funcțional cu valoare adăugată prin valorificarea ingredientelor microîncapsulate.
 - Teza de doctorat cuprinde:

I. STUDIUL DOCUMENTAR, cuprinde trei capitole și prezintă date recente din literatura de specialitate privind caracteristicile compușilor bioactivi (în principal carotenoide) și impactul pe care îl au aceștia în industria alimentară, punându-se accente pe efectele benefice asupra sănătății.

II. CONTRIBUȚII PROPRII cuprinde rezultatele investigațiilor desfășurate pe întreaga durată a stagiului doctoral, și cuprinde patru capitole:

CAPITOLUL 4, intitulat "**EVALUAREA COMPARATIVĂ A UNOR METODE DE EXTRAȚIE APLICATE PIELIȚELOR DE TOMATE DIN PERSPECTIVA CONȚINUTULUI ÎN COMPUȘI BIOLOGIC ACTIVI**", prezintă rezultatele obținute în cadrul experimentelor de extracție, separare, identificare, cuantificare și caracterizare fitochimică a oleoresinelor din extracțiile obținute din pielețele de tomate (*Solanum lycopersicum*), prin utilizarea metodelor spectrofotometrice, a tehnicilor de cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) și a tehnicilor de cromatografie gazoasă (GC-MS).

CAPITOLUL 5, intitulat "**STABILIREA MECANISMELOR DE LEGARE DINTRE COMPUȘII BIOLOGIC ACTIVI DIN EXTRACTELE DIN PIELIȚE DE TOMATE ȘI PROTEINE DIN ZER DIN PERSPECTIVA MICROÎNCAPSULĂRII EFICIENTE**" prezintă rezultatele obținute care permit descrierea detaliată a mecanismului de legare a principalului carotenoid din extractele obținute din pielită de tomate (licopenul) și proteinele din zer, din perspectiva micro- și nano-încapsulării. S-au utilizat experimente de quenching a fluorescenței, dar și metode andocare moleculară și de dinamică moleculară.

CAPITOLUL 6, intitulat "**DEZVOLTAREA UNOR INGREDIENTE CU FUNCȚIONALITATE RIDICĂ PENTRU POTENȚIALE UTILIZĂRI ÎN PRODUSE ALIMENTARE**" prezintă rezultatele obținute în etapele de microîncapsulare și dezvoltare a variantelor de ingrediente funcționale și caracterizarea pudrelor rezultate, din punct de vedere fitochimic, structural și morfologic, biologic și citotoxic.

CAPITOLUL 7, intitulat "**CERCETARE APLICATIVĂ PRIN DEZVOLTAREA DE VARIANTE TEHNOLOGICE DE OBȚINERE A UNOR PRODUSE ALIMENTARE CU VALOARE ADĂUGATĂ**" prezintă rezultatele obținute care au contribuit la elaborarea unei tehnologii pentru obținerea unui produs cu potențial funcțional și valoare adăugată prin valorificarea pudrelor microîncapsulate, respectiv o tehnologie pentru obținerea unui produs de tip dressing.

Fiecare capitol al studiului experimental este structurat astfel: *Aspecte generale, Obiectivele studiului, Materiale și metode, Rezultate și discuții, Concluzii parțiale și Referințe bibliografice.*

CAPITOLUL 8, CONCLUZII FINALE, prezintă principalele concluzii rezultate din investigațiile realizate.

CAPITOLUL 9, CONTRIBUȚII PERSONALE ȘI PERSPECTIVE DE CONTINUARE A STUDIILOR descrie principalele contribuții aduse la dezvoltarea cunoașterii în tematica abordată și deschide noi perspective de continuare a studiilor.

CAPITOLUL 10, LISTA PUBLICAȚIILOR trece în revistă principalele publicații și participări la manifestări științifice naționale și internaționale, care au avut ca scop valorificarea rezultatelor obținute în cadrul tezei de doctorat.

Teza de doctorat cuprinde **134** pagini, în care sunt incluse **30** figuri și **21** tabele. Studiul documentar reprezintă 21% iar partea experimentală 79%.

În final, sunt prezentate **contribuțiile originale** ale tezei de doctorat, precum și diseminarea rezultatelor obținute în domeniul de cercetare abordat. Astfel, rezultatele

cercetărilor au fost valorificate prin elaborarea a **4 articole științifice** publicate, în reviste cotate ISI (*Journal of Food Engineering, Journal of Food Processing and Preservation, Antioxidants, Journal of Luminescence*) precum și **10 comunicări** la manifestări științifice reprezentative pentru domeniul ingineriei produselor alimentare, din străinătate și din țară.

Activitățile de cercetare din cadrul tezei de doctorat au fost derulate cu ajutorul infrastructurii moderne de cercetare a *Centrului integrat de cercetare, expertiză și transfer tehnologic (BioAliment-TehnIA)* (www.bioaliment.ugal.ro), din cadrul Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați.

Teza s-a realizat sub coordonarea științifică a Prof.dr.ing. Nicoleta STĂNCIUC, în calitate de conducător de doctorat și a comisiei de îndrumare alcătuită din: Prof.dr.ing. Gabriela RÂPEANU - coordonator studii de extracție convențională și cinetica de degradare a compușilor biologic activi, Prof.dr.ing. Iuliana APRODU - coordonator studii de modelare și andocare moleculară, și Conf.dr.ing. Liliana MIHALCEA – coordonator extracție cu fluide supercritice.

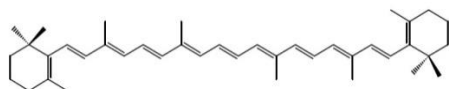
CAPITOLUL 1. ASPECTE BOTANICE, MORFOLOGICE ȘI COMPOZIȚIONALE ALE TOMATELOR

1.1. Aspecte botanice și morfologice

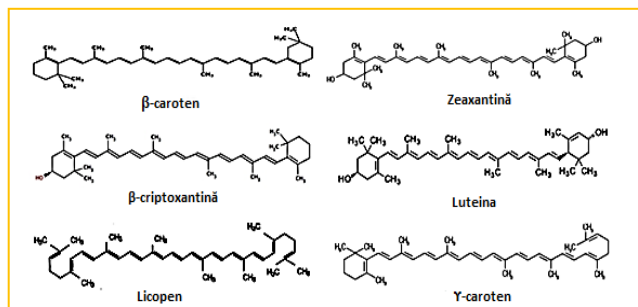
Tomata (*Solanum lycopersicum*) este un arbust important din familia Solanaceae. Soiurile de *S. lycopersicum* sunt de culoare roșie și prezintă o mare variabilitate în ceea ce privește calitatea, forma, intensitatea culorii fructelor, habitatul plantei și morfologia frunzelor. *S. lycopersicum* suferă procese de auto-polenizare și din acest motiv nu necesită ajutorul insectelor sau al păsărilor pentru realizarea polenizării.

1.2. Principalele clase de compuși biologic activi din tomate

Carotenoidele sunt pigmenți lipofili care conferă culoarea portocaliu, galben sau roșu multor fructe și legume, crustacee, unii pești sau gălbenușuri de ou. Sunt biosintezați de plante, alge, ciuperci și bacterii sau sunt pur și simplu acumulate prin diete neschimbate sau puțin modificate, la unele specii de animale.



Structura chimică generală a carotenoidelor



Structura principalelor carotenoide din tomate

Compușii carotenoidici sunt recunoscuți pentru efectul benefic asupra sănătății ochilor, însă au fost raportate și studii care indică faptul că reduc riscul de accident vascular cerebral, cancer de sân și îmbunătățesc sănătatea pielii.

1.3. Efecte pentru sănătate ale compușilor biologic activi din tomate

Prevenția stresului oxidativ și a inflamației

Carotenii și xantofilele reprezintă surse importante de oxigen singlet. Oxigenul singlet rezultă prin expunerea cromoforilor la lumina soarelui. Aceste molecule activate pot degrada ADN-ul, proteinele și lipidele.

Fotoprotecția și sănătatea pielii

Lumina soarelui reprezintă un factor nociv pentru sănătatea pielii umane. Ultravioletele, lumina vizibilă și infraroșie sunt responsabile de oxigenul singlet și pentru formarea radicalilor, în special în prezența fotosensibilizatorilor naturali, precum porfine și riboflavină. Acest lucru poate duce la fotoîmbătrânire (piele aspră și riduri), eritem indus de UV (arsuri solare) și cancer de piele.

Îmbunătățirea vederii și prevenirea bolilor oculare

În afară de transformarea unor carotenoide în vitamina A, dovada că omul are nevoie în dietă de acești compuși reiese din studii asupra ochiului și din bolile asociate cu înaintarea în vârstă. La nivelul retinei, în centrul acesteia, poate apărea o pată galbenă cu diametrul de 5-6 mm, unde se acumulează luteina și zeaxantina cu o concentrație ridicată găsită în plasmă

Declin cognitiv și boala Alzheimer

Numeroase studii efectuate pe populația de vârstă medie au explorat relația dintre nivelul de β -caroten din plasmă și declinul cognitiv. Studii clinice realizate pentru a evalua suplimentele ce conțin vitaminele C și E și β -caroten în cazul bolilor de inimă și/sau a cancerului li s-au adăugat teste privind declinul cognitiv.

Prevenția și tratamentul cancerului

Compușii terpenoidici prezintă un potențial efect anticancerigen împotriva unei arii variate de cancere experimentale, dar efectele secundare toxice sunt inseparabile de modul lor de acțiune. Aceste studii au arătat un risc redus corelat cu consumul mare de β -caroten sau licopen sau nivelul ridicat al acestora în sânge și ocazional al xantofilelor.

Sindrom metabolic, obezitate, boli cardiovasculare și diabet

Sindromul metabolic este un cluster ce include obezitatea abdominală, tensiunea arterială ridicată, hiperglicemia, trigliceridele mărite și nivel scăzut al colesterolului HDL. Aceste anomalii metabolice cresc riscul de boli cardiovasculare și diabet. Același lucru se poate observa și în cazul obezității care este corelată cu mortalitatea cardiovasculară, fapt evidențiat prin factori investigați ipotetici precum creșterea inflamației cronice și a stresului oxidativ.

Carotenii prin proprietățile lor antioxidante pot ajuta la prevenirea progresiei bolilor cronice corelate cu obezitatea și sindromul metabolic, astfel scăzând rata mortalității și morbidității.

1.4. Procesarea industrială a tomatelor

Procesarea industrială a tomatelor conduce la obținerea unor cantități semnificative de subproduse, dintre care tescovina reprezintă 5-10%, fiind considerată o sursă importantă de compuși cu funcții nutriționale, cum ar fi proteinele, aminoacizii, acizi grași, fibre și compuși biologic activi cu proprietăți nutraceutice remarcabile. După ce tomatele sunt recoltate din cultură, acestea se spală și se sortează. Materialele de câmp sunt îndepărtate, iar fructele sunt sortate manual sau prin sisteme electronice, apoi spălate cu abur/sau apă fierbinte. După decojire, tomatele sunt din nou sortate și clasificate pentru procesarea finală, care constă în prepararea diverselor produse precum gemuri, piureuri, sucuri și sosuri. În timpul acestor procesări, semințele și cojile se obțin ca subproduse. Aceste subproduse pot fi valorificate prin diferite tratamente prin transformarea lor în pulberi fine și pot fi supuse ulterior extracțiilor pe bază de solvent sau asistate.

CAPITOLUL 2. ASPECTE TEORETICE ȘI PRACTICE PRIVIND DEFINIREA CONCEPTULUI DE OLEORESINĂ ȘI METODE DE OBȚINERE

2.1. Introducere

Fiind una dintre cele mai bogate surse de componente bioactive, oleorezinele își găsesc o aplicație largă în industria alimentară și farmaceutică.

2.2. Extracția oleorezinelor prin metode convenționale

Recuperarea oleorezinelor din sursele vegetale poate fi efectuată prin aplicarea unor tehnici convenționale de extracție, care constau în macerarea cu solvenți organici, extracție Soxhlet etc. Aceste metode pentru extracția convențională sunt procese care se desfășoară în două etape și presupun utilizarea solvenților organici precum acetatul de etil, alcoolii, acetonă și hexan pentru a extrage oleorezina, urmat de etape de îndepărtare a solvenților. Tehnicile convenționale prezintă mai multe dezavantaje care trebuie luate în considerare, cum ar fi timpul lung de extracție și, mai important, riscul prezenței urmelor de solvent în produsul final, cu efecte negative asupra mediului înconjurător și pentru sănătatea umană.

2.3. Extracția oleoresinelor din tomate prin extracție cu fluide supercritice

O tehnică utilizată frecvent pentru obținerea oleorezinelor din tomate este extracția cu fluide supercritice efectuată, de exemplu la presiuni de 20-55 MPa, la temperaturi de 40-80 ° C, la diferite debituri de CO₂ și timpi de extracție diferiți, care a permis obținerea unor randamente variabile de 5% –33%.

2.4. Extracția oleorezinelor prin tehnica de extracție cu fluide supercritice asistată de enzime

Extracția cu fluide supercritice asistată de enzime poate fi una dintre tehnicile de îmbunătățire a eficienței extracției compușilor biologic activi. Studii din literatură au arătat că pretratamentul materialului vegetal cu diferite enzime a îmbunătățit randamentul de extracție al polizaharidelor, uleiurilor comestibile și necomestibile, proteinelor și compușilor biologic activi.

Acest lucru se datorează faptului că o enzimă poate hidroliza structura compozită celulozică a peretelui celulei vegetale și, prin urmare, îmbunătățește recuperarea atât a compușilor legați, cât și a celor liberi.

2.5.Extracția oleorezinelor prin tehnica de extracție cu fluide supercritice asistată de ultrasunete

Această tehnologie integrează principiile extracției cu fluide supercritice cu cea asistată de ultrasunete. Principiul extracției asistate cu ultrasunete este sonochimic, fenomen asociat cu cavitația și formarea de microbule, când se aplică o presiune mare unui lichid. Aceste bule se sparg cu eliberarea de energie locală intensă datorită efectelor chimice și mecanice importante. Extracția asistată de ultrasunete a apărut ca o tehnică promițătoare pentru extracție cu diverse beneficii. Principalul avantaj al aplicației cu ultrasunete este că permite extragerea atât a compușilor polari, cât și a celor nepolari.

2.6.Extracția oleorezinelor prin tehnica de extracție cu fluide supercritice asistată de presiune hidrostatică ridicată

Combinarea dintre presiunea hidrostatică ridicată (HHP) și extracția cu fluide supercritice este promițătoare. Tratamentul HHP este utilizat, în principal pentru a asigura conservabilitatea produselor alimentare și păstrarea unor proprietăți funcționale și organoleptice ale alimentelor. Procedul a fost utilizat pentru extracția unor compuși bioactivi din mai multe fructe, deoarece poate crește permeabilitatea pereților celulari și permite difuzia metabolitelor în lichidul de extracție.

CAPITOLUL 3. ASPECTE TEORTICE PRIVIND MICROÎNCAPSULAREA COMPUȘILOR BIOLOGIC ACTIVI

3.1. Aspecte generale

Microîncapsularea și nanoîncapsularea sunt definite ca un set de tehnologii care permit înglobarea compușilor biologic activi cunoscuți sub numele de "material de bază" folosind un material încapsulant sau "înveliș".

Diferența majoră dintre micro- și nanoîncapsulare este dată de dimensiunea particulelor.

3.2. Criterii de clasificare a tehnicilor de microîncapsulare

Noile tehnici de încapsulare continuă să apară iar multe companii din industria alimentară comercializează produse înregistrate prin tehnologii brevetate. Încapsularea compușilor biologic activi se realizează printr-o varietate de metode. Cele 2 procese industriale cele mai utilizate sunt uscarea prin pulverizare și extrudarea.

3.3. Principalele metode utilizate în industria alimentară. Avantaje.

Încapsularea prin coacervare Termenul de **coacervare** este un procedeu prin care soluțiile coloidale apoase au fost separate în 2 faze lichide:

- una bogată în coloizi (coacervat),
- celălalt sărac în coloizi.

Parametrii care influențează forma coacervatelor

Interacțiunile dintre biopolimerii participanți, temperatura, tăria ionică, pH-ul mediului de reacție, raportul de amestecare al polimerilor, greutatea lor moleculară, concentrația totală, densitățile de sarcină, toate joacă un rol important în inițierea, continuarea dar și în stoparea procesului de coacervare. Presiunea, de asemenea joacă un rol important, în special atunci când se utilizează metoda extracției cu fluide supercritice în vederea obținerii coacervatelor. Viteza de agitare este importantă în controlul și dimensiunea formării coacervatelor. Gradul de ionizare al grupărilor amino din proteine și grupările carboxilice din polizaharide depinde de pH-ul mediului în care acestea există. Așadar, ajustarea pH-ului este esențială în procesul de coacervare. Cantitatea de sare prezentă în mediu afectează tăria ionică a soluției, care la rândul său influențează procesul de coacervare complexă.

CAPITOLUL 4. EVALUAREA COMPARATIVĂ A UNOR METODE DE EXTRACȚIE APLICATE PIELIȚELOR DE TOMATE DIN PERSPECTIVA CONȚINUTULUI ÎN COMPUȘI BIOLOGIC ACTIVI

4.1. Aspecte generale

O tehnică eficientă de extracție este extracția asistată de ultrasunete, ce poate fi aplicată la extracția compușilor biologic activi. Impactul major al ultrasunetelor într-un mediu lichid este atribuită cavității acustice, ceea ce duce la ruperea celulelor care îmbunătățește transferul în masă al extractanților. Puterea ultrasunetelor, intensitatea, temperatura și densitatea (raportul dintre probă și solvent) sunt factori decizivi pentru optimizarea extracției compușilor biologic activi.

Extracția cu fluide supercritice (*Supercritical Fluid Extraction* - SFE) este un proces de separare nedistructivă de tip *High Pressure Extraction*, desfășurată la presiuni înalte, bazată pe puterea de solvatare a fluidelor aflate la valori de temperatură și presiune superioare punctului critic. Metoda este inclusă la tehnologiile emergente ce permit obținerea de extracte libere de solvent. Cel mai utilizat fluid supercritic este dioxidul de carbon (CO₂), uneori în prezență de cosolvent (etanol sau metanol).

4.2. Obiectivele studiului

S-a urmărit testarea unor metode de extracție solid-lichid convenționale și asistate (extracție asistată de ultrasunete și extracție cu fluide supercritice - SC-CO₂) din perspectiva stabilirii unor profiluri fitochimice comparative și selectarea metodei de extracție care permite eficientizarea extracției compușilor carotenoidici, atât din punct de vedere al fezabilității cât și a profilului fitochimic. Prin urmare, au fost selectate trei metode de extracție:

- extracția solid-lichid cu diferiți solvenți;
- extracția combinată solid-lichid cu solvenți, asistată de ultrasunete;
- extracția cu fluide supercritice;

4.3. Materiale și metode

Tomatele (*Solanum lycopersicum* L.) au fost achiziționate de pe piața locală (Galați) în luna august 2018 (în perioada maximă de maturare), au fost spălate, îndepărtate părțile mucegăite sau alterate, au fost tăiate în bucăți mari și apoi procesare la nivel de laborator, utilizând o mașină de tocat roșii. Astfel, la obținerea sucului de roșii s-au colectat semințele și pieluța de roșii, s-au liofilizat și apoi s-au păstrat la o temperatură medie de 20°C, la întuneric.

4.3.1. Materiale

Reactivi

- ABTS•+ (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))
- Persulfat de potasiu, $K_2S_2O_8$
- Hexan
- Acetonă (grad HPLC)
- Etanol 70% (grad HPLC)
- Metanol (grad HPLC)
- Acetat de etil (grad HPLC)
- Apă ultrapură

Echipamente

- Balanță analitică de înaltă precizie, XS 403 SM, METTLER TOLEDO, Elveția
- Ultracentrifugă cu răcire, HETTICH Universal 320 R, Germania
- Spectrofotometru UV- VIS Biochrom Libra S22, 2017
- Concentrator sub vid AVC 2-18, CHRIST
- Liofilizator
- Sistem HPLC Thermo Finnigan Surveyor cuplat cu un detector DAD UV-vizibil (Finnigan Surveyor LC, Thermo Scientific, SUA)
- Baie de ultrasunete (MRC Scientific Instruments)
- Vortex
- Încălzitor bloc (Stuart SBH200D, Marea Britanie)
- Instalația de extracție cu CO_2 supercritic aflată în dotarea Universității Dunărea de Jos din Galați, Facultatea Știința și Ingineria Alimentelor, NATEX Prozesstechnologie GesmbH, Ternitz, Austria (<http://www.sia.ugal.ro/respia/imbunatatire.html>)

- Gaz comatograf (GC) cuplat cu spectrometru de masa (MS), PerkinElmer Clarus 600 T GC-MS (PerkinElmer, Inc., Shelton, CT, SUA)
- Rancimat mod 892 (Metrohm LTD, Herisau, Elveția)
- Colorimetru CHROMA Meter CR - 410 (Konica Minolta, SUA)
- Software HyperChem release 8.0 (Hypercube, Inc., Ontario, Canada)

4.3.2. Extracția compușilor biologic activi din pielea de tomate liofilizate prin extracție solid-lichid cu diferiți solvenți

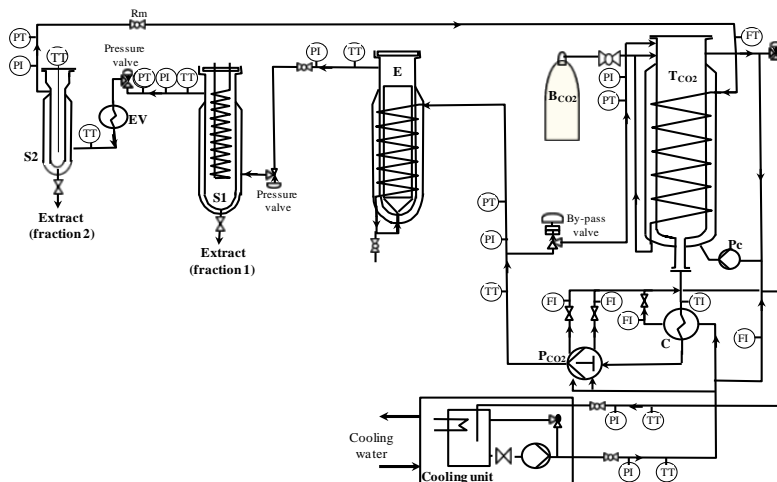
Proba de analizat (1 g) a fost omogenizată (pe rând, cu fiecare solvent) cu 10 mL, acetonă, hexan, metanol, etanol 70%, acetat de etil, amestec hexan/acetonă în raport de 1:1 (v/v) și hexan/acetonă, raport de 3:1 (v/v) și omogenizate cu ajutorul unui vortex la temperatura camerei timp de 5 min, în vederea extracției compușilor carotenoidici apoi repaos 40 min. Probele au fost centrifugate la 9000 rpm, la o temperatură de 10°C, timp de 10 minute, apoi supernatantul a fost colectat. Supernatantul rezultat s-a concentrat la temperatura de 40°C sub presiune redusă până la sec (AVC 2-18, CHRIST).

4.3.3. Extracția compușilor biologic activi din pielea de tomate liofilizate prin extracție combinată solid-lichid cu diferiți solvenți și ultrasunete

Proba de analizat (1 g) a fost omogenizată, pe rând cu 20 ml din fiecare solvent (hexan, acetonă, etanol 70%, acetat de etil, metanol, amestec hexan/acetonă, raport de 3:1 (v/v) și amestec hexan/acetonă, raport de 1:1 (v/v), apoi omogenizate cu ajutorul unui vortex la temperatura camerei timp de 2 min după care au stat în repaos 40 minute în vederea extracției compușilor carotenoidici. Probele au fost introduse în baia de ultrasonare, timp de 30 de min și menținute la o temperatură optimă de 40±3°C. Fiecare probă a fost apoi centrifugată la 9000 rpm, la o temperatură de 10°C, timp de 10 minute. Supernatantele rezultate s-au concentrat la temperatura de 40°C sub presiune redusă până la sec (AVC 2-18, CHRIST).

4.3.4. Extracția compușilor biologic activi din pielea de tomate liofilizate prin extracție cu fluide supercritice

Obținerea unor extracte selective din punctul de vedere al compușilor biologic activ țintă va presupune variații a parametrilor de extracție: presiune, temperatura, timp, debit de solvent și/sau cosolvent în vederea stabilirii condițiilor optime de obținere a extractelor cu concentrații mari în compuși biologic activi țintă (licopen, carotenoide totali, β-caroten etc.). Echipamentul utilizat în cadrul componentei de dezvoltare experimentală pentru extracția cu SC-CO₂ este redat schematic în figura de mai jos:



Schita de principiu a instalației aflată în dotarea Universității Dunărea de Jos din Galați,
Facultatea Știința și Ingineria Alimentelor

T_{CO2} – tanc pentru CO₂; B_{CO2} – butelie cu CO₂; E – extractor (C30); S1 – separator 1 (S40); S2 – separator 2 (S45); P_{CO2} – pompa de înaltă presiune pentru CO₂; P_c – pompa de circulație pentru CO₂; C – pre-răcitor; EV – evaporator; R_m – robinet cu acționare manuală; TT – transmițător a temperaturii; TI – indicator temperatură; PT – transmițător de presiune; PI – indicator de presiune; FI – indicator de debit; FT – transmițător de debit.

4.3.5. Determinarea conținutului de carotenoide totale, β-caroten și licopen

Toate extractele obținute au fost analizate pentru determinarea conținutului de carotenoide totale, β-caroten și licopen prin metode spectrofotometrice, care a presupus dizolvarea unei cantități din extract în solvenul de extracție și determinarea absorbanței la lungimi de undă de 470 nm pentru carotenoide totale, 450 nm pentru β-caroten și 503 nm pentru licopen. Pentru calculul concentrației de carotenoide s-a utilizat relația:

$$\text{Carotenoide } \left(\frac{mg}{g} \right) = A \times M_w \times V / (\epsilon \times M_a \times L)$$

unde: A = Absorbanța la lungimi de undă de 470 nm, 450 nm și respectiv, 503 nm, M_w: masa moleculară a licopenului, respectiv β-carotenului (536.873 g/mol, 536.8726 g/mol); V = volumul soluției; M_a = masa de extract luată în calcul (g), L = lungimea cuvei (1 cm), f_d = factor de diluție, ε = coeficientul de extincție (ε_{CT}=2590, ε_{β-caroten}=2500, ε_{lic}=3450 (L/mol*cm)).

4.3.6. Determinarea activității antioxidante

Activitatea antioxidantă a extractelor obținute a fost măsurată prin utilizarea testului de decolorare a radicalului radical ABTS [2,20 azinobis (acid 3-etilbenzotiazol-6-sulfonic)]. Determinarea activității antioxidante s-a realizat utilizând metoda radicalului cation ABTS•+.

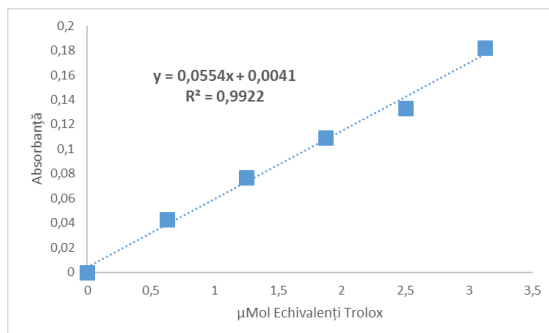
Materiale:

Se dizolva ABTS în apă deionizată până la concentrația de 7 mM. ABTS•+ este generat prin oxidarea ABTS (acid 2,2 azinobis 3-etilbenzotiazoline-6-sulfonic) cu 2.45 mM persulfat de potasiu. Reacția de formare a radicalului ABTS decurge la întuneric, la temperatura camerei timp de minimum 12-16 ore. Astfel se obține soluția stoc de ABTS radical. Soluția stoc de ABTS

se diluează cu etanol până la obținerea absorbantei de $0,700 \pm 0,020$ la 734 nm (de obicei 1/90).

Protocol de lucru:

Pentru determinarea activității antioxidante, 0,15 mL de extract dizolvat în solventul de extracție s-a adăugat peste 2,85 mL de reactiv ABTS•+. Reacție are loc la întuneric, pentru două ore. Pentru exprimarea activității antioxidante în $\mu\text{Mol Trolox/mL}$ s-a utilizat curba etalon prezentată în figura de mai jos:



Curba etalon utilizată pentru determinarea activității antioxidante în $\mu\text{Mol Trolox/mL}$

4.3.7. Identificarea compușilor carotenoidici din extractele selectate prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) a carotenoidelor

Analiza HPLC s-a realizat prin compararea timpilor de retenție a carotenoidelor din probele luate în studiu cu cele ale standardelor, precum și cu datele din literatură. Pentru profilul cromatografic al extractului obținut, s-a utilizat un sistem HPLC Thermo Finnigan Surveyor cuplat cu un detector DAD UV-vizibil (Finnigan Surveyor LC, Thermo Scientific, SUA), controlat de software-ul Xcalibur. Compușii carotenoidici din extractul de roșii au fost analizați la 450 nm utilizând o coloană Lichrosorb RP-18 (5 μm) Hibar RT 125-4. Faza mobilă de eluție a constat din doi solvenți, respectiv 90% acetonitril (A) și 100% acetat de etil (B). Volumul de injectare a fost de 10 μL , în timp ce viteza de curgere a fost menținută la 1000 ml / min. Gradientul de eluție a fost: 0-16 min, 15% B; 16-54 minute, 15-62% B, 54-56 min, 62% B; 56-60 min, 62-15% B; 60-70 min, 15% B. Cuantificarea licopenului și β -carotenului s-a făcut folosind curbele de calibrare pentru fiecare compus.

4.3.8. Determinarea acizilor grași din lipide totale din extracte selectate

Pentru determinarea acizilor grași din lipidele totale a fost selectat extractul obținut prin extracție solid-lichid cu hexan și acetonă, raport 3:1 urmată de ultrasonare la 40°C, 30 de minute.

4.3.9. Evaluarea comportamentului carotenoidelor din extractele selectate la tratamentul termic

Pentru experimentele de tratament termic, extractul a fost cântărit și dizolvat în ulei de floarea-soarelui comercial la o concentrație de 25 mg/mL. Volumele de 0,20 ml ulei au fost distribuite în tuburi de sticlă (1 cm diametru) și supuse tratamentului termic în intervalul de temperatură între 100 și 145°C, pentru intervale variabile de timp (0-40 min), folosind un

încălzitor bloc (Stuart SBH200D, Marea Britanie). Pentru fiecare experiment a fost utilizat un timp de încălzire de 30 s. După tratamentul termic, tuburile au fost imediat răcite în apă cu gheață pentru a preveni degradarea ulterioară.

4.3.10. Cinetica reacțiilor de denaturare a compușilor biologic activi

Cinetica de degradare a carotenoidelor totale, β -carotenului și licopenului, precum și capacitatea antioxidantă, au fost descrise prin modelul cinetic de ordin I, descris de ecuația:

$$\frac{C}{C_0} = e^{-kt}$$

În care: C este parametrul care urmează a fi estimat, indicele 0 indică valoarea inițială a parametrului, t este timpul de încălzire și k este constanta vitezei de degradare la temperatura T (1 / min).

Timpul de înjumătățire ($t_{1/2}$) al reacției a fost calculat presupunând cinetica de ordinul I, conform ecuației.:

$$t_{1/2} = -\ln 0.5 / k$$

S-a fost folosit modelul Arrhenius pentru a descrie dependența de temperatură a ambelor constante de viteză de degradare așa cum este descris de ecuația:

$$k = k_{ref} \exp\left[-\frac{E_a}{R}\left(\frac{1}{T}\right)\right]$$

unde

E_a este energia de activare (kJ / mol),

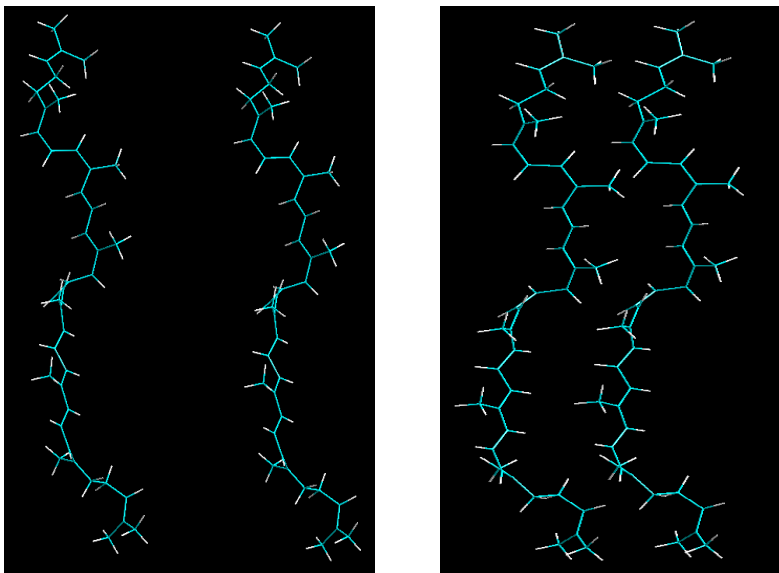
k_{ref} este constanta vitezei de degradare la temperatura de referință (1 / min),

T este temperatura absolută (K) și

R constanta universală a gazului (8.314 J / mol K) .

4.3.11. Investigații de modelare moleculară asupra comportamentului la diferite temperaturi a licopenului

Pentru simularea comportamentului termic al moleculei de licopen s-a utilizat software-ul dedicat HyperChem release 8.0. (Hypercube, Inc., Ontario, Canada).



Modelele optimizate ale complexului 1 (a) și complexului 2 (b) formate din câte două molecule de licopen

4.3.12. Evaluarea stabilității la oxidare a unor uleiuri îmbogățite cu extract din pieliță de tomate prin metoda Rancimat

Evaluarea stabilității la oxidare a unor uleiuri îmbogățite cu extract din pieliță de tomate prin metoda Rancimat a fost realizată după o metodă descrisă de [Nour și colab. \(2018\)](#), folosind echipamentul Rancimat mod 892 (Metrohm LTD, Herisau, Elveția).

4.3.13. Culoarea extractelor în ulei de bumbac și ulei de arahide

Parametrii Cielab (L^* , a^* , b^*) pentru uleiurile de arahide și bumbac îmbogățite cu extracte carotenoidice din pieliță de tomate au fost determinați cu un colorimetru CHROMA Meter CR - 410 (Konica Minolta, SUA). Măsurătorile au fost efectuate în triplicat.

Parametrul L^* reprezintă luminozitatea care variază de la 0 (negru) la 100 (alb), parametrul a^* oferă informații despre axa roșu / verde și variază de la -100 (verde) la +100 (roșu) și b^* parametrul evaluează axa galben / albastră și variază de la -100 (albastru) la +100 (galben). Experimentele au fost efectuate în triplicat.

4.3.14. Analiza statistică

Toate experimentele au fost efectuate în triplicat. Rezultatele au fost exprimate în termeni de valori medii. Analiza statistică a datelor a fost efectuată utilizând pachetul de instrumente de analiză a datelor din software-ul Microsoft Excel. Efectele temperaturii asupra parametrilor cinetici au fost evaluate printr-o analiză univariantă a varianței (ANOVA) cu un nivel de semnificație de 95% ($p = 0,05$) utilizând testul Tukey. Coeficientul de determinare (R^2) și eroarea medie au fost utilizate ca criteriu pentru adecvarea adaptării valorilor experimentale la modelul cinetic de ordin I.

4.4. REZULTATE ȘI DISCUȚII

4.4.1. Evaluarea comparativă a profilului fitochimic global al extractelor din pielțe de tomate obținute prin extracția cu solvenți, extracția asistată de ultrasunete și extracția cu fluide supercritice prin metode spectrofotometrice

Pentru extracția cu solvenți organici, s-au utilizat: acetonă, hexan, etanol 70%, metanol, acetat de etil, hexan:acetonă (1:1, v/v) și amestec hexan:acetonă (3:1,v,v). Rezultatele obținute prin extracție cu solvenți organici sunt prezentate în tabelul de mai jos:

Solvent utilizat	Carotenoide totale, g %	Licopen, g %	β -caroten, g%	Activitatea antioxidantă μ Mol Trolox/g su
Etanol 70%	50,47 \pm 0,77	30,81 \pm 1,43	52,65 \pm 0,55	20,80 \pm 0,28
Metanol	25,13 \pm 0,94	11,27 \pm 0,48	26,81 \pm 0,84	50,28 \pm 1,78
Hexan	89,91 \pm 3,23	53,04 \pm 1,86	62,32 \pm 2,05	90,90\pm0,38
Acetonă	115,32 \pm 0,43	67,05 \pm 2,38	87,41 \pm 0,24	73,03 \pm 1,85
Acetat de etil	117,53 \pm 0,55	74,08 \pm 2,18	90,86 \pm 0,32	75,25 \pm 0,79
Amestec hexan:acetonă (1:1, v/v)	125,62 \pm 2,80	77,41 \pm 2,93	94,38 \pm 2,24	69,30 \pm 2,84
Amestec hexan:acetonă (3:1, v/v)	131,21\pm1,09	81,80\pm0,15	98,18\pm0,43	66,71 \pm 0,55

Conținutul de compuși biologic activi și activitatea antioxidantă a extractelor obținute prin extracție solid-lichid cu solvenți organici

Extracția convențională solid-lichid a fost combinată cu extracția asistată de ultrasunete, la o frecvență și putere constante de 40 kHz, pentru 30 minute. Rezultatele obținute prin extracție cu solvenți organici în combinație cu extracția asistată de ultrasunete sunt prezentate în tabelul de mai jos:

Solvent utilizat	Carotenoide totale, g/100 g	Licopen, g/100 g	β -caroten, g/100 g	Activitatea antioxidantă μ Mol Trolox/g su
Etanol 70%	17,55 \pm 1,14	9,52 \pm 0,35	16,46 \pm 0,66	85,12 \pm 0,91
Metanol	25,01 \pm 0,84	11,12 \pm 0,46	23,55 \pm 0,89	49,38 \pm 1,15
Hexan	78,24 \pm 0,89	44,86 \pm 2,21	53,34 \pm 2,40	87,65\pm1,03
Acetonă	89,55 \pm 4,47	55,78 \pm 0,40	68,20 \pm 6,90	68,27 \pm 1,37
Acetat de etil	89,12 \pm 2,81	53,19 \pm 1,73	68,54 \pm 2,22	73,33 \pm 0,99
Amestec hexan:acetonă (1:1, v/v)	108,45 \pm 0,77	64,70 \pm 0,31	82,50 \pm 0,55	73,87 \pm 0,28
Amestec hexan:acetonă (3:1, v/v)	102,15\pm4,80	62,76\pm1,08	78,22\pm1,58	74,89 \pm 0,65

În tabelul de mai jos sunt prezentate rezultatele experimentale obținute la extracția cu fluide supercritice:

Extract	Compuși biologic activi					
	Licopen (mg/g su)		β-caroten (mg/g su)		Activitatea antioxidantă (mMol Trolox/g su)	
	S40	S45	S40	S45	S40	S45
Extract (70 °C)	6.06 ± 0.06 ^b	9.48 ± 0.41 ^c	10.88 ± 0.33 ^b	18.93 ± 0.73 ^c	48.52 ± 3.63 ^b	24.35 ± 0.71 ^c
Extract (74 °C)	5.28 ± 0.07 ^b	39.11 ± 0.59 ^a	12.57 ± 0.11 ^a	68.24 ± 0.71 ^a	77.61 ± 0.99 ^a	62.74 ± 1.74 ^a
Extract (80 °C)	8.11 ± 0.65 ^a	30.59 ± 0.63 ^b	11.85 ± 0.59 ^{ab}	47.08 ± 1.05 ^b	39.99 ± 1.02 ^c	38.34 ± 2.13 ^b

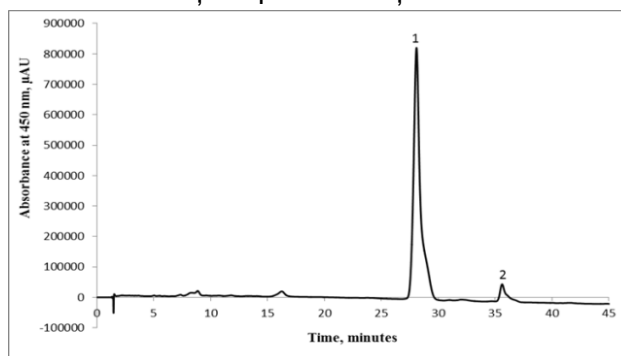
Conținutul de compuși biologic activi și activitatea antioxidantă a extractelor obținute prin extracție cu CO₂ supercritic

4.4.2. Evaluarea comparativă a profilului fitochimic individual al extractelor din pielețe de tomate obținute prin extracția cu solvenți, extracția asistată de ultrasunete și extracția cu fluide supercritice prin metode cromatografice

Din analiza rezultatelor prezentate la subcapitolul 4.4.1, au fost selectate următoarele extracte pentru analiza cromatografică:

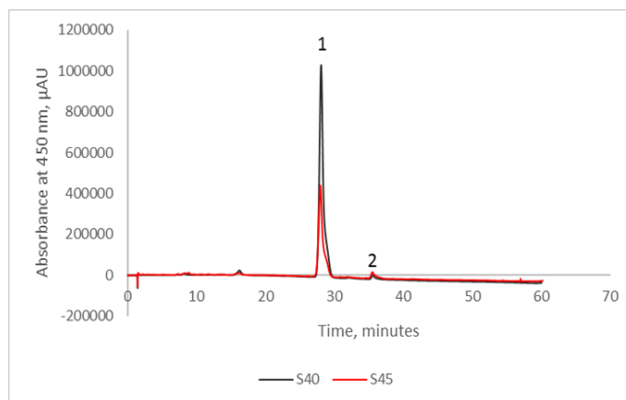
- Extractul obținut prin extracție combinată solid-lichid și ultrasonare, utilizând ca solvent amestecul de hexan:acetonă 3:1 și ultrasonare la o frecvență constantă de 40 kHz, putere de 100 W, timp de 30 de minute la 40°C.

Profilul cromatografic al extractului obținut prin extracție combinată solid-lichid și ultrasonare,



utilizând ca solvent amestecul de hexan:acetonă 3:1 și ultrasonare timp de 30 de minute la 40°C (peak 1 – licopen, peak 2 – β-caroten)

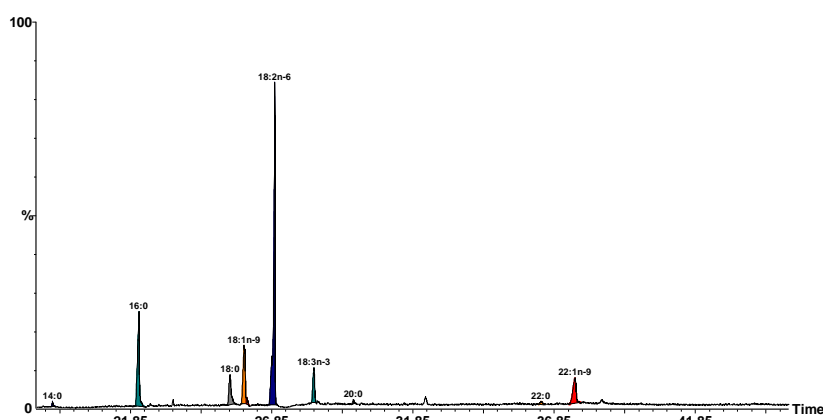
- Cele două fracțiuni (S40 și S45) obținute de la extracția cu fluide supercritice, obținute la temperatura de 74°C.



Profilul cromatografic al extractelor din pieiță de tomate obținute la extracția cu CO₂ supercritic la 450 nm (S40 - fracția de extract separată la 20MPa în primul separator, S45 - fracția de extract separată la 5MPa în al doilea separator).

4.4.3. Evaluarea profilului în acizi grași al extractelor din pieițe de tomate obținute prin extracția cu solvenți combinată cu extracția asistată de ultrasunete

Pentru identificarea conținutului de acizi grași din extractele obținute din tescovină de tomate, s-a selectat extractul obținut prin extracție combinată solid-lichid și ultrasunete, utilizând ca solvent amestecul de hexan : acetonă 3:1 și ultrasunete la o frecvență constantă de 40 kHz, putere de 100 W, timp de 30 de minute la 40°C, cu epuizare în compuși biologic active prin repetarea extracției de patru ori. În figura următoare este prezentată cromatograma de identificare și cuantificare a profilului acizilor grași:



Cromatograma GC-MS pentru identificarea și cuantificarea profilului acizilor grași totali din extractul din tescovină de tomate, obținut prin extracție solid-lichid în combinație cu ultrasunete

Compoziția în acizi grași (% din acizii grași totali) în extractul din tescovină de tomate, obținut prin extracție solid-lichid în combinație cu ultrasunete

Acid gras	% acid gras (procent de arie)
Acid miristic (14:0)	0,49±0,02
Acid palmitic (16:0)	17,26±0,89
Acid stearic (18:0)	6,56±0,23
Acid oleic (18:1n-9)	12,64±0,56
Acid vaccenic (18:1n-7)	0,75±0,05
Acid linoleic (18:2n-6)	47,42±1,02
Acid α-linolenic (18:3n-3)	5,73±0,11
Acid arahidic (20:0)	0,50±0,09
Acid behenic (22:0)	0,71±0,05
Acid erucic (22:1n-9)	7,94±0,34
AGSs	25,52
AGMSs	21,32
AGPNs	53,15
<i>n</i> -3 AGPN	5,73
<i>n</i> -6 AGPNs	47,42
<i>n</i> -6/ <i>n</i> -3	8,28

AGPN/AGM

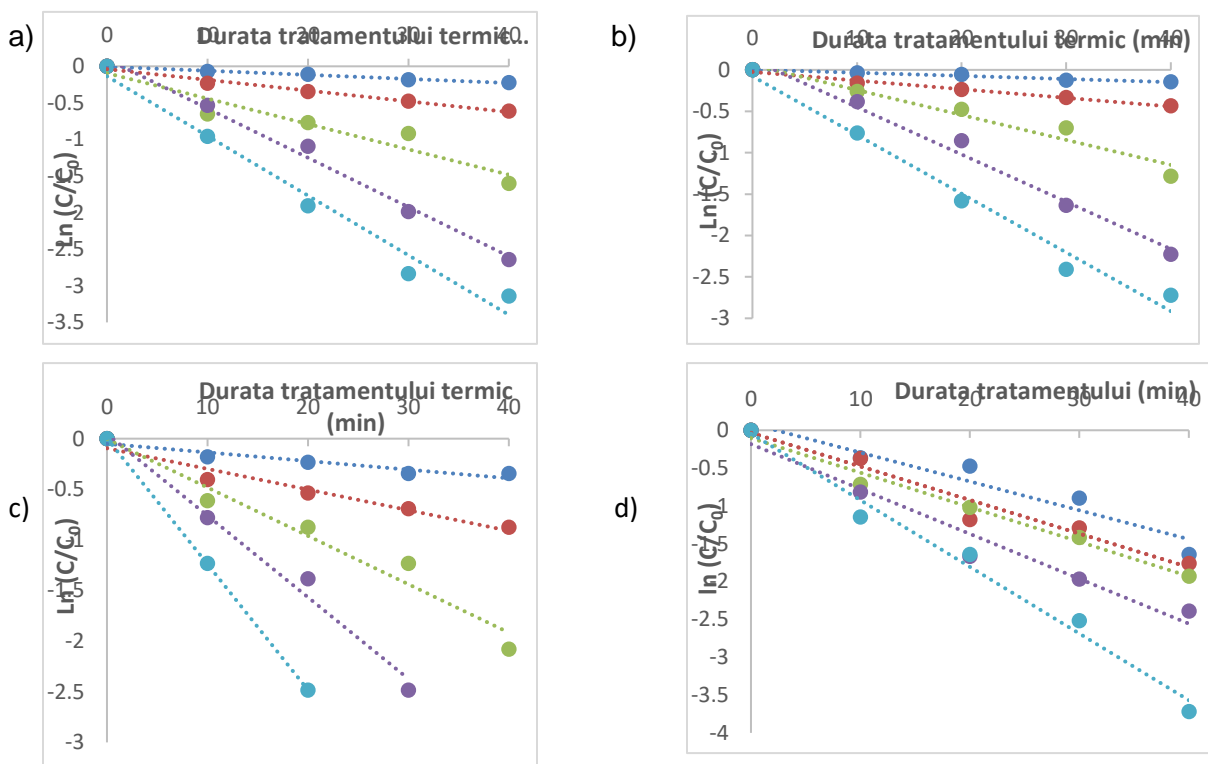
2,08

Abrevieri: AGS- acizi grași saturați, AGMN- acizi grași mononesaturați, AGPN-acizi grași polinesaturați.

4.4.4. Evaluarea stabilității unor compuși biologic activi și a activității antioxidante la tratamentul termic

Parametrii cinetici de estimare a comportamentului la diferite regimuri termice a compușilor biologic active, descriși prin constanta vitezei de degradare termică, timpul de înjumătățire și energia de activare sunt extrem de necesari pentru optimizarea tratamentelor de prelucrare termică la nivel industrial, care să permit reducerea impactului procesării termice asupra potențialului nutritional și functional al alimentelor.

În figura de mai jos sunt reprezentate dreptele de regresie liniară, care arată o scădere a concentrației de compuși biologic activi la temperatură constantă în funcție de timpul de încălzire.



Reprezentarea grafică a dreptelor de regresie liniară pentru degradarea termică de ordin I a carotenoidelor totale (a), β -carotenului (b), licopenului (c) și a activității antioxidante (d) din extractul obținut din tescovina de tomate în intervalul de temperatură de 100-145°C cu timp de menținere 0- 40 min (●100°C, ●115°C, ●125°C, ●135°C and ●145°C). Valorile reprezintă media aritmetică a trei determinări independente

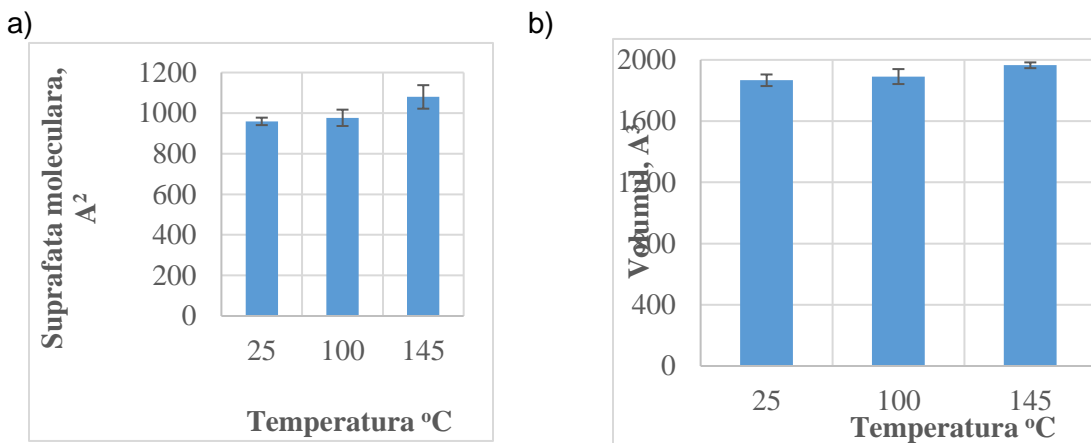
Parametrii cinetici estimați sunt prezentați în tabelul de mai jos:

Parametrii cinetici estimați (constantă vitezei de degradare - k , timpul de înjumătățire - $t_{1/2}$ și energia de activare - E_a) pentru degradarea compușilor biologic activi din extractul din pieliță de tomate în ulei vegetal

Temperatura °C	Carotenoide totale		β-caroten		Lycopen		Activitate antioxidantă	
	$k \cdot 10^{-2}$ (1/min)	$t_{1/2}$ (min)	$k \cdot 10^{-2}$ (1/min)	$t_{1/2}$ (min)	$k \cdot 10^{-2}$ (1/min)	$t_{1/2}$ (min)	$k \cdot 10^{-2}$ (1/min)	$t_{1/2}$ (min)
100	0.56±0.02	123.77±4.13	0.38±0.02	182.40±11.53	0.85±0.04	81.54±2.79	3.82±0.12	18.14±1.12
115	1.47±0.02	47.15±1.85	1.04±0.03	66.64±3.60	2.04±0.02	33.97±2.00	4.44±0.18	15.61±0.75
125	3.47±0.01	19.97±1.16	3.01±0.04	23.02±1.77	4.78±0.01	14.50±0.98	4.56±0.32	15.20±1.38
135	6.47±0.18	10.28±0.63	5.71±0.11	12.13±0.99	8.06±0.40	8.59±1.65	5.93±0.33	11.68±1.74
145	8.15±0.23	8.50±1.51	7.09±0.14	9.77±0.09	12.42±0.20	5.58±1.58	8.81±0.45	7.86±1.25
E_a (kJ·mol ⁻¹)	81.76±6.82		89.81±8.48		79.66±4.03		22.20±5.79	

4.4.5. Comportamentul la temperatură a moleculelor de licopen estimat prin tehnici de modelare moleculară

Abordarea *in silico* a fost adoptată pentru a colecta informații la nivel molecular cu privire la comportamentul licopenului la tratament termic. Analiza proprietăților QSAR după efectuarea etapelor de dinamică moleculară la diferite temperaturi cuprinse între 25°C și 145°C a indicat faptul că, independent de distanța dintre moleculele de același tip în modelele inițiale supuse optimizării, tratamentul termic determină tensionarea graduală a legăturilor covalente din structura licopenului. Astfel, la ridicarea temperaturii de la 25°C la 100°C a fost înregistrată o modificare ușoară a suprafeței moleculare de la 959,16±18,44 pâna la 976,77±40,29 Å².



Efectul tratamentului termic asupra suprafeței van der Waals (a) și a volumului moleculelor de licopen (b)

Conținutul total de carotenoide, activitatea antioxidantă și factorul de protecție Rancimat al uleiurilor de control și îmbogățite, precum și rezultatele de culoare.

4.4.6. Evaluarea potențialului de utilizare a extractelor ca antioxidanți în diferite uleiuri

	Umiditate %	Carotenoide totale (μg/g)	Activitate antioxidantă (%)	Factor de protecție Rancimat
Ulei de arahide				
Control	0.81±0.01	272.84±3.28	89.61±0.52	1.00±0.01

TPE:PO (1:2)	1.51±0.12	377.25±9.04	81.74±2.09	1.01±0.02
TPE:PO (2:1)	1.37±0.01	481.66±14.81	94.82±1.49	1.06±0.04
TPE:PO (3 g)	2.40±0.01	586.07±20.59	89.60±0.53	1.04±0.01
Ulei de bumbac				
Control	1.23±0.01	327.80±6.70	86.70±0.75	1.00±0.00
TPE:CO (1:2)	1.22±0.01	434.07±9.70	81.74±2.09	1.01±0.01
TPE:CO (2:1)	0.81±0.01	556.70±23.11	99.54±0.16	1.02±0.02
TPE:CO (3 g)	2.025±0.01	646.64±36.94	86.71±0.75	1.03±0.01

Abrevieri: CO, ulei de bumbac; PO, ulei de arahide; TPE, extract de pelliță de roșii.

Stabilitatea oxidativă a uleiului de bumbac a crescut odată cu creșterea concentrațiilor de extract adăugat, într-un răspuns dependent liniar de doză. Utilizarea extractului din tescovina de tomate ca antioxidant a fost mai puțin eficientă în uleiul de bumbac decât în uleiul de arahide, deși același raport a fost testat în ambele cazuri.

4.4.7. Culoarea

Valorile parametrilor de culoare pentru uleiurile îmbogățite cu extract din pelliță de tomate

Uleiurile îmbogățite cu diferite rapoarte de extract au prezentat valori ale luminozității (L^*) care au variat de la 65,86 la 83,36 pentru uleiurile de arahide îmbogățite și de la 66,27 la 83,95 pentru uleiurile de bumbac, fapt care arată tranziția de la uleiurile mai deschise la uleiuri mai închise la culoare, corespunzătoare celor cu adaos de extract.

	L^*	a^*	b^*
Ulei de arahide			
Control	94.23±0.01	-1.26±0.01	6.97±0.01
TPE:PO (1:2)	83.36±0.03	11.90±0.22	59.74±0.88
TPE:PO (2:1)	79.84±0.17	18.62±0.39	80.15±0.68
TPE:PO (3 g)	65.86±0.21	22.15±0.10	65.65±0.41
Ulei de bumbac			
Control	91.19±0.16	-6.55±0.16	34.03±1.71
TPE:CO (1:2)	83.95±0.57	8.00±0.82	56.68±2.95
TPE:CO (2:1)	80.60±0.22	15.26±0.32	75.05±0.57
TPE:CO (3 g)	66.27±0.13	21.92±0.19	65.89±0.29

(Abrevieri: CO, ulei de bumbac; PO, ulei de arahide; TPE, extract de pelliță de roșii).

4.5. Concluzii parțiale

Rezultatele experimentale obținute permit elaborarea unor concluzii parțiale, după cum urmează:

- 1) Pentru extracția solid-lichid a fost testată eficiența unor solvenți diferiți: etanol, metanol, acetonă, acetat de etil, amestec hexan:acetonă, în rapoarte diferite de 1:1 și respectiv, 3:1.
- 2) Rezultatele experimentale au relevat că utilizarea amestecului de hexan:acetonă, în raport de 3:1 permite extracția unui conținut ridicat de carotenoide totale (131,21±1,09

g/100 g), licopen ($81,80 \pm 0,15$ g/100 g), β -caroten ($98,18 \pm 0,43$ g/100 g), compuși care au contribuit la cuantificarea unei activități antioxidante a extractelor de $66,71 \pm 0,55$ μ Mol Trolox/g su.

- 3) În ceea ce privește activitatea antioxidantă, hexanul a determinat extracția unor compuși variați, pe lângă compușii carotenoidici, care au avut o contribuție mai mare la activitatea antioxidantă ($90,90 \pm 0,38$ μ Mol Trolox/g su).
- 4) Extracția solid-lichid în combinație cu extracția asistată de ultrasunete a testat aceeași solvenți, pentru facilitarea comparației. Și în acest caz, combinația de hexan:acetonă, în raport de 3:1 a determinat cea mai mare concentrație de compuși extrași (carotenoide totale - $102,15 \pm 4,80$ g/100g, licopen - $62,76 \pm 1,08$ g/100 g și respectiv, β -caroten - $78,22 \pm 1,58$ g/100g), hexanul în combinație unică conducând și de această dată la obținerea unui extract cu o activitate antioxidantă superioară ($87,65 \pm 1,03$ g/100 g).
- 5) Comparația între cele două metode testate a arătat o eficiență mai mare a extracției convenționale de a recupera compușii biologic activi testați.
- 6) Deoarece testarea inițială a metodelor nu a prevăzut o etapă de epuizare a tescovinei în compuși biologic activi prin extracții repetate, ci doar o analiză cantitativă care să permită selectarea unor parametri de lucru, în continuarea studiului, s-au selectat condițiile de extracție favorabile, respectiv extracția solid-lichid combinată utilizând ca solvent de extracție amestecul de hexan:acetonă în raport de 3:1 a fost aplicate repetat (de 4 ori), în vederea epuizării în compuși biologic activi.
- 7) În cazul extracției cu fluide supercritice s-au testat condiții de extracție pe baza literaturii de specialitate, cum ar fi: presiune 40 MPa, temperaturi 70°C, 74°C și 80°C și timp de extracție de 155 min.
- 8) Au fost obținute pentru fiecare temperatură 2 fracțiuni, corespunzătoare celor două separatoare, care au fost analizate din punct de vedere al profilului fitochimic global. În cazul separatorului S40, la o presiune de 20MPa și creșterea temperaturii de la 70°C la 80°C a avut loc o creștere a gradului de extractibilitate a licopenului, fiind obținute extracte cu un conținut de $6,06 \pm 0,06$ mg / g su și respectiv, $8,11 \pm 0,65$ mg / g su, cu o creștere de circa 34%. În cazul extracției β -carotenului, concentrația în extracte s-a corelat pozitiv în intervalul de temperatură 70°C - 74°C.
- 9) Creșterea temperaturii de la 70°C la 80°C nu a avut o influență semnificativă asupra randamentul gravimetric (3,39% pentru S40 și respectiv 6,18% pentru S45 la 70°C și respectiv, 3,81% și 5,99% la 80°C).
- 10) Rezultatele obținute au indicat că extracția cu CO₂ supercritic a fost mai favorabilă extracției compușilor bioactivi la temperatura de 74°C, iar o concentrație semnificativ superioară s-a obținut în al doilea separator (S45). Din analiza și corelarea rezultatelor au fost selectate pentru experimente ulterioare, două extracte:
- 11) Extract obținut prin extracție combinată solid-lichid și ultrasunete, utilizând ca solvent amestecul de hexan:acetonă 3:1 și ultrasunete la o frecvență constantă de 40 kHz, putere de 100 W, timp de 30 de minute la 40°C. Cele două fracțiuni (S40 și S45) obținute de la extracția cu fluide supercritice, obținute la temperatura de 74°C. Aceste extracte au fost utilizate pentru analiza cromatografică (carotenoide), dar și pentru experimentele de microîncapsulare.

- 12) Analiza cromatografică a evidențiat prezența licopenului ca majoritar, cu concentrații diferite în funcție de tipul de extracție. Cea mai mare concentrația a prezentat-o fracțiunea S40, cu o concentrație de licopen de 0,875 mg/mL, urmată de extractul obținut prin combinarea extracției convenționale și ultrasunete (0,449 mg/mL), iar cea mai mică concentrație de licopen s-a identificat și cuantificat în fracțiunea S45 (0,345 mg/mL).
- 13) Profilul acizilor grași a evidențiat o concentrație de circa 48% de acid linoleic (18:2n-6), urmat de acidul acid palmitic (16:0) cu 17% și acidul oleic, cu aproximativ 13%. Frațiunea lipidică a extractului supus analizei s-a evidențiat printr-o concentrație mai ridicată de acizi polinesaturați, de 53% și o valoare mai mică de acizi grași mononesaturați, de 21%. Acizii n-3 au avut o contribuție de circa 6% din conținutul total de acizi grași, în timp ce acizii n-6 au avut o contribuție semnificativ mai mare, de circa 48%.
- 14) Degradarea termică a compușilor bioactivi din extractul de tescovină de tomate a urmat un model cinetic de ordin I, evidențându-se o tendință de degradare mare mare a licopenului la temperaturi mai mici, de 100°C. Creșterea temperaturii până la 145°C a determinat o creștere semnificativă a valorilor constantelor vitezei de degradare pentru toți compușii studiați.
- 15) Valorile constantelor vitezei de degradare termică estimate, care au evaluat impactul tratamentul termic asupra activității antioxidante, au fost semnificativ mai mari în comparație cu valorile corespunzătoare ale degradării carotenoidelor în întreg interval de temperatură studiat, ceea ce denotă că activitatea antioxidantă este determinată cumulativ de compușii studiați.
- 16) Au fost estimați timpii de înjumătățire a concentrației compușilor, la fiecare temperatură, ceea ce a evidențiat următoare interrelație: β -caroten > carotenoide totale > licopen >> activitate antioxidantă.
- 17) Valorile energiei de activare pentru carotenoidele totale, β -caroten, licopen și activitatea antioxidantă au fost estimate la 81,76±6,82 kJ/M, 89,81±8,48 kJ/M, 79,66±4,03 kJ/M și, respective 22,20±5,79 kJ/M.
- 18) Abordarea *in silico* a permis analiza detaliată a conformației modelelor moleculare echilibrate la diferite temperaturi și a relevat că, creșterea temperaturii a determinat îndoirea treptată a lanțurilor tetraterpenice. În consecință, la temperaturi de peste 100°C, izomerizarea tuturor moleculelor *trans*-licopen tinde spre formarea conformației 9,9' *cis*.
- 19) Distanța inițială dintre lanțurile tetraterpenice a jucat un rol important în modularea comportamentului licopenului, influențând dinamica moleculelor la toate temperaturile investigate. La simularea comportamentului molecular la temperatura de 25°C, energia de interacțiune dintre cele două molecule de licopen a fost de trei ori mai mare pentru Complexul 1 comparativ cu Complexul 2, ceea ce a sugerat dezvoltarea unor forțe de atracție mai intense între molecule atunci când concentrația nu este foarte mare și spațiul disponibil permite rearanjarea liberă a poziției relative a celor două molecule.
- 20) Funcționalitatea extractelor a fost testată ca ingredient antioxidant pentru două uleiuri comerciale, de arahide și de bumbac, iar rezultatele au arătat că stabilitatea oxidativă a uleiului de bumbac a crescut odată cu creșterea concentrațiilor de extract adăugat, într-

un răspuns dependent liniar de doză. Utilizarea extractului din tescovina de tomate ca antioxidant a fost mai puțin eficientă în uleiul de bumbac.

- 21) Parametrii de culoare ai uleiurilor îmbogățite au arătat influența adăugării extractului culorii uleiurilor, rezultând nuanțe nuanțe mai închise, cu grade ridicate de roșu și galben.
- 22) Rezultatele obținute certifică potențialul biologic activ și valoarea funcțională a acestor produse secundare rezultate de la procesarea tomatelor, care pot fi exploatate ca resursă deosebit de valoroasă și alternativă de compuși valoroși activi biologic.

CAPITOLUL 5. STABILIREA MECANISMELOR DE LEGARE DINTRE COMPUȘII BIOLOGIC ACTIVI DIN EXTRACTELE DIN TESCOVINA DE TOMATE ȘI PROTEINE DIN ZER DIN PERSPECTIVA MICROÎNCAPSULĂRII EFICIENTE

5.1. Aspecte generale

Proteinele au un rol potențial în încapsularea, protecția și livrarea țintită a componentelor bioactive în alimentele funcționale, datorită capacității lor de a forma complexe proteină-ligand, protejând componentele legate de procese de oxidare și degradare și asigurând, de asemenea, mijloace de eliberare indusă de stimuli.

5.2. Obiectivele studiului

Studiul a avut ca obiectiv principal evaluarea mecanismelor de legare între licopen și proteinele din zer, din perspectiva stabilirii parametrilor de legare, parametrilor termodinamici și identificarea forțelor implicate în intercațiune, pentru eficientizarea încapsulării. Investigațiile au presupus utilizarea experimentelor de quenching (stingere) a intensității fluorescente a proteinelor la titrarea succesivă cu extracte îmbogățite în licopen din tescovină de tomate și a metodelor de simulare prin andocare moleculară și dinamică moleculară.

Etapile parcurse în desfășurarea studiului au fost:

- extracția și caracterizarea avansată a carotenoidelor din pielița de roșii, cu accent pe licopen, din perspectiva determinării conținutului de carotenoide totale, β -caroten și licopen, precum și a activității antioxidante a extractelor din pielița de tomate prin metode spectrofotometrice;
- studiul mecanismelor de legare prin spectroscopie de fluorescență (studii de quenching);
- calculul parametrilor de legare și a parametrilor termodinamici;
- studiul mecanismelor de legare prin docking molecular și metode de simulare a dinamicii moleculare;
- descrierea mecanismelor de legare din perspectiva optimizării condițiilor de microîncapsulare.

5.3. Materiale și metode

5.3.1. Materiale

β -LG (puritate > 90%, variante genetice A și B) din laptele bovin a fost achiziționat de la Sigma (Sigma – Aldrich Co., St. Louis, MO). Toți reactivii utilizați în analize au avut puritate analitică.

Tomatele coapte au fost achiziționate de pe o piață locală și depozitate la 4°C timp de maximum 2 zile înainte de utilizare. Pelița a fost uscată la temperatura camerei (20-22°C) în întuneric timp de 4-5 ore. Apoi au fost învelite în folie de aluminiu și păstrate la 4°C timp de cel mult 24 de ore înainte de utilizare.

5.3.2. Echipamente

Pentru evaluarea proprietăților fluorescente s-a utilizat spectrofluorimetrul de luminiscentă Perkin Elmer LS 55 (PerkinElmer Life Sciences, Shelton, CT) din dotarea centrului Integrat de Cercetare, Expertiză și Transfer Tehnologic (BioAliment-TehnIA, <https://www.unicer.ugal.ro/index.php/en/about-tehnia>)

5.3.3. Extracția licopenului

Cinci grame de material vegetal uscat au fost amestecate în vederea extracției licopenului cu 35 ml soluții etanol: hexan (4:3, v/v) conținând 0,05 g carbonat de magneziu pe un agitator orbital timp de 1 oră la temperatura camerei. După extracție, supernatantul a fost separat și reziduul a fost re-extras cu 70 ml soluții de etanol: hexan (4:3, v/v). Reziduul rezultat a fost spălat cu 25 ml etanol și apoi cu 12,5 ml hexan. Reziduul a fost spălat din nou cu 100 ml NaCl cu concentrație de 10% și 150 ml apă. Extractul de licopen a fost concentrat la 40°C până la uscare, dizolvat în 10 ml etanol (70%) și filtrat prin membrane de 0,45 μ m. Licopenul a fost cuantificat folosind o metodă colorimetrică. Pentru cuantificarea conținutului de licopen în extract, s-a determinat absorbanta la 503 nm. Concentrația licopenului în extract a fost calculată folosind coeficientul de extincție de 3150 1/M*cm.

5.3.4. Determinarea conținutului de carotenoide totale, β -caroten și licopen

Extractele rezultate s-au diluat în solventul de extracție în raport de 1 mg/ml și s-a citit absorbanta la 470 nm pentru carotenoide totale, 450 nm pentru β -caroten și 503 nm pentru licopen. Concentrația s-a exprimat în mg/g, cu ajutorul ecuației 4.1.

5.3.5. Cuantificarea cromatografică a licopenului din extractul de tomate

Pentru a identifica și cuantifica pigmentii carotenoizi din extractul de pieliță de tomate, a fost efectuată o analiză cromatografică. Sistemul utilizat a fost un HPLC de la Thermo Finnigan Surveyor (Finnigan Surveyor LC, Thermo Scientific, SUA), controlat de sistemul software Xcalibur. Carotenoidele au fost analizate la 450 nm pe o coloană Lichrosorb RP-18 (5 μ m) Hibar RT 125-44. Solvenții de eluare au fost 90% acetonitril (A) și 100% acetat de etil (B). Volumul de injecție a fost de 20 μ L, iar debitul a fost menținut la 0,800 ml / min.

5.3.6. Tratamentul termic a soluțiilor proteice

Tuburile de plastic (1 cm diametru) au fost umplute cu 0,150 ml soluție de β -LG de concentrație 1 mg/mL. Probele au fost încălzite la diferite temperaturi cuprinse între 25°C și

90°C timp de 15 minute, folosind o baie de apă termostatică (Digibath2 BAD 4, Raypa Trade, Barcelona, Spania). Probele au fost apoi răcite în apă cu gheață pentru a evita orice denaturare termică suplimentară a proteinei.

5.3.7. Experimente de quencing utilizând extractul de tomate

Probele de proteine netratate și tratate termic (0,100 mL de 1 mg/mL β -LG în 0,01 M soluție de Tris-HCl la pH=7,7) au fost diluate în 3 mL de buffer corespunzător și titrate prin adăugarea succesivă de extract de licopen diluat (1:10) în etanol. Lungimea de undă de excitație a fost setată la 292 nm, în timp ce spectrele de emisie au fost colectate de la 310 nm la 400 nm cu trepte de 0,5 nm.

5.3.8. Studii de modelare moleculară

Structura cristalină a β -LG de origine bovină a fost preluată de la Banca de date proteice RCSB. Modelul β -LG a fost definit prin eliminarea tuturor celorlalți compuși care însoțesc proteina, optimizat în vid, solvatat prin utilizarea moleculelor de apă și optimizat în mediul apos. Pentru a simula efectul tratamentului termic aplicat pe β -LG în experiment, modelul solvat a fost încălzit în continuare la 25°C, 60°C și 90°C folosind un termostat Berendsen și echilibrat definitiv prin procedura raportată de [Aprodu și colab. \(2017\)](#), astfel încât să se reducă oscilațiile de temperatură și energie ale sistemelor.

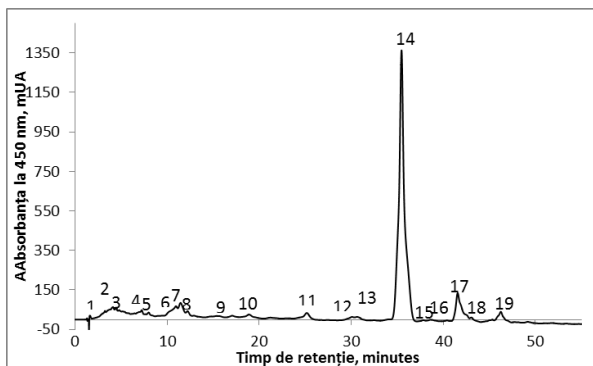
5.3.9. Analiza statistică

Toate experimentele au fost efectuate în triplicat cu probe în duplicat. Datele obținute au fost analizate utilizând Microsoft Office versiunea Excel 2007. Valorile sunt reprezentate ca mijloace \pm deviație standard. Pentru comparații multiple, s-a utilizat testul ANOVA unidirecțional, iar valoarea p a fost mai mică de 0,05.

5.4. REZULTATE ȘI DISCUȚII

5.4.1. Caracterizarea în compuși biologic activi a extractului din pieițe de tomate

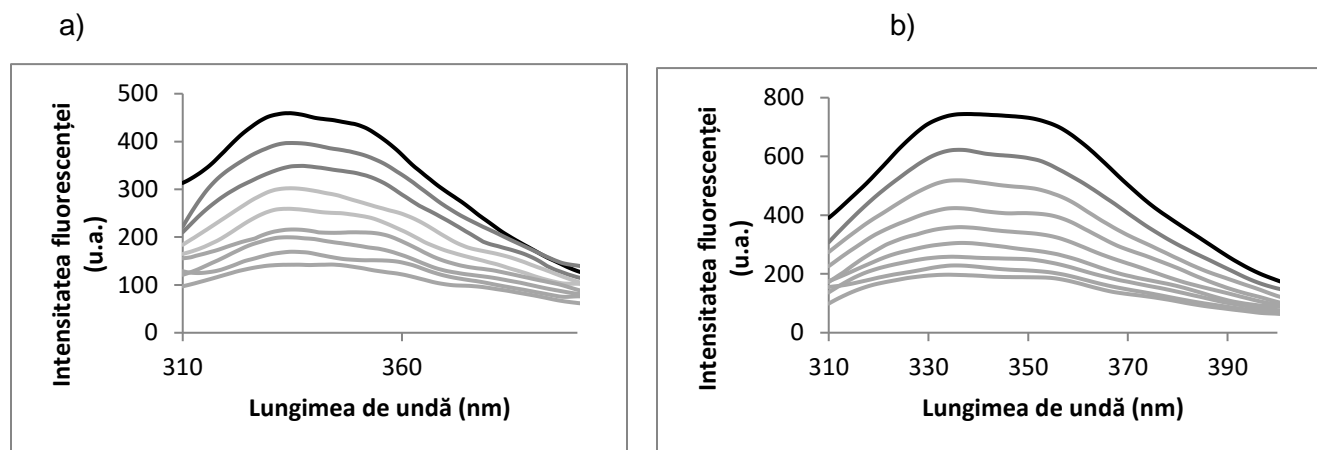
Înainte de experimentele de quenching, s-a efectuat o caracterizare detaliată a extractului de licopen prin tehnici cromatografice. Cromatograma HPLC tipică pentru carotenoide este redată în figura de mai jos:



Profilul cromatografic al carotenoidelor din extractul din pieițe de tomate

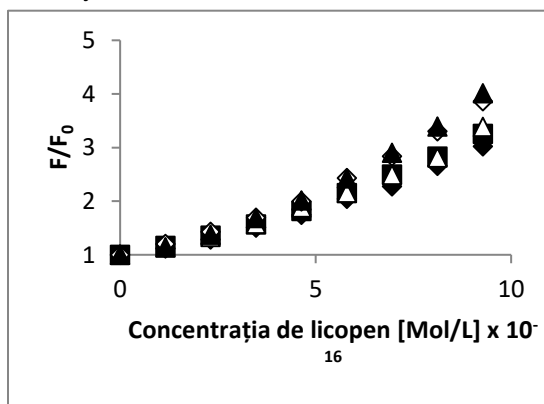
5.4.2. Evaluarea mecanismelor de legare dintre licopen și proteine din zer prin spectroscopie de fluorescență

Spectre de emisie la două temperaturi diferite (25°C și 90°C) sunt redată în figura de mai jos. Fluorescența moleculelor de β-LG a fost stinsă în mod succesiv odată cu creșterea concentrației de extract, ca o consecință a interacțiunii dintre proteine și carotenoidele din extract.



Spectrele de emisie care redau interacțiunea dintre moleculele de β-lactoglobulină și extractul de licopen la 25°C și 90°C. Concentrația de licopen (de la a-f) a variat de la 0 la $2,91 \cdot 10^{-5}$ M/L.

Pentru a stabili dacă mecanismul de legare dintre β-LG și extractul de licopen este static sau fie dinamic, datele au fost analizate folosind ecuația Stern-Volmer, reprezentările Stern-Volmer sunt date în figura de mai jos:



Reprezentarea Stern-Volmer pentru experimentele de quenching ale β-LG bovină și extract de licopen la 25°C (◆), 60°C (■), 70°C (Δ), 80°C (◇) 90°C (▲)

Parametrii de legare pentru interacțiunea dintre β-LG și extractul de licopen la temperaturi diferite sunt redați în tabelul de mai jos:

T (°C)	$K_{sv}(10^{-7}/\text{mol})$	K_q (10^{-15}L/mol/s)	K_b (10^{-7}L/mol)	n	K_a (10^{-7}L/mol)	f_a
25	0.22 ± 0.03^a	0.22 ± 0.03	1.04 ± 0.01	1.09 ± 0.05	8.75 ± 0.91	0.59 ± 0.12
60	0.24 ± 0.04	0.24 ± 0.04	0.88 ± 0.08	0.76 ± 0.09	7.19 ± 0.60	0.60 ± 0.13
70	0.25 ± 0.07	0.25 ± 0.07	0.83 ± 0.04	0.74 ± 0.08	5.75 ± 0.33	0.83 ± 0.11

80	0.30±0.07	0.30±0.07	0.79±0.03	0.71±0.06	5.69±0.17	0.89±0.09
90	0.32±0.07	0.32±0.07	0.72±0.09	0.67±0.06	3.26±0.17	1.03±0.34

^a –deviația standard

K_{SV} – constanta Stern-Volmer estimate

K_q – rata constantă de stingere;

K_b și n – constanta de legare și numărul de situri de legare estimate

K_a – constanta de afinitate și f_a fracția accesibilă calculate

5.4.3. Calculul parametrilor de legare și termodinamici

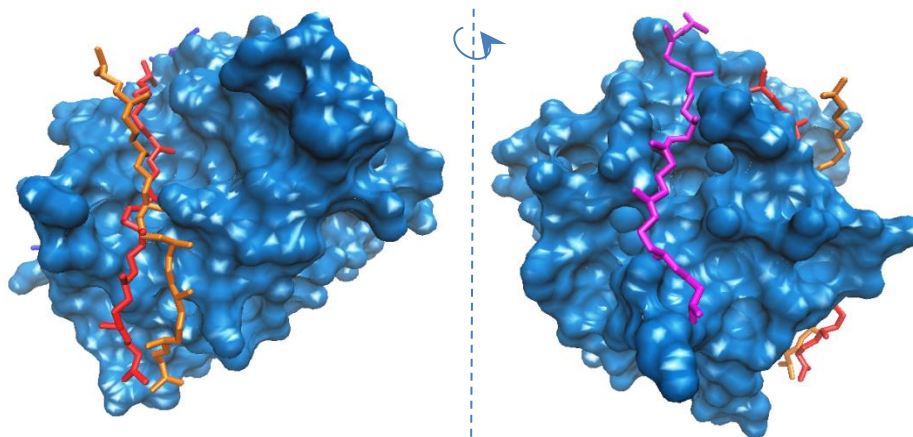
În interacțiunea dintre un ligand și biomolecule pot intervi diferite forțe, cum ar fi: van der Waals, legăturile de hidrogen, forțele electrostatice și interacțiunile hidrofobe. Studiul termodinamic permite obținerea unor informații utile cu privire la forțele implicate în aceste interacțiuni, pe baza valorilor și semnului parametrilor termodinamici.

Parametrii termodinamici pentru interacțiunea dintre β -LG și licopen sunt prezentați în tabelul de mai jos:

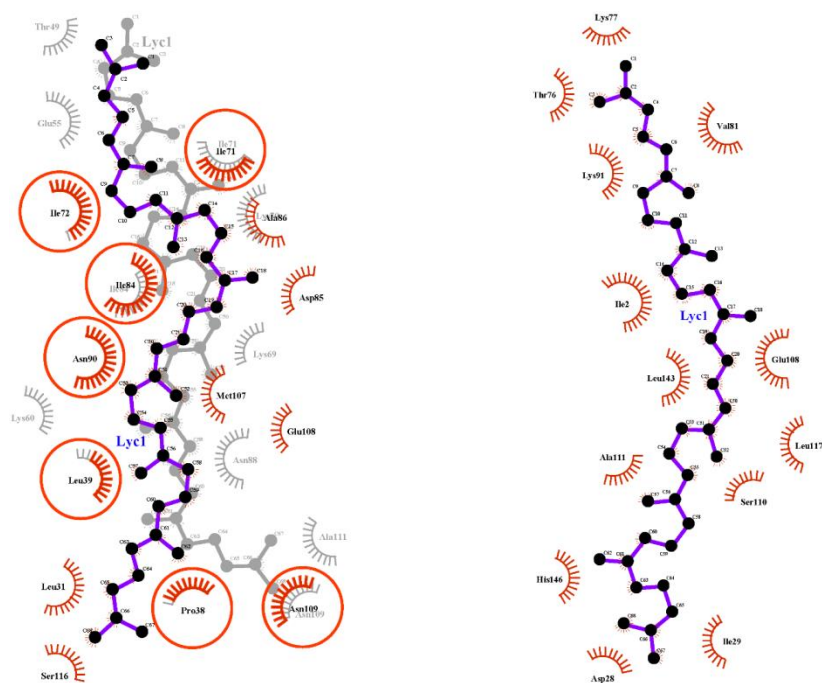
T(K)	ΔH (J/mol)	ΔS (J/mol/K)	ΔG (J/mol)
298	-68.19±1.50	-2.16±0.54	575.68±11.25
333			651.30±10.69
343			672.91±10.47
353			694.51±10.12
363			716.12±11.17

5.4.4. Evaluarea mecanismelor de legare dintre licopen și proteine din zer prin experimente de docking molecular și modelare moleculară

Modelarea moleculară a fost folosită în continuare pentru detalierea mecanismului de legare dintre cei doi compuși, la nivel molecular. Dinamica moleculară a fost utilizată mai întâi pentru încălzirea și echilibrarea proteinei la 25°C, 60°C și 90°C.



Detalii despre modelele de legare între licopen de β -LG echilibrate la temperaturi diferite. β -LG este reprezentată în stil Surf în albastru, în timp ce ligandul este reprezentat în stil Licorice în roșu, portocaliu și magenta la 25°C, 60°C și respectiv 90°C. Suprapunerea complexelor a fost pregătită folosind software-ul Visual Molecular Dynamics (VMD)



Contactele hidrofobe stabilite între aminoacizii β -lactoglobulină (reprezentate prin arcuri care radiază spre atomii de ligand cu care sunt în contact) și molecula de licopen. (a) Suprapunerea modelelor moleculare echilibrate la 25°C (colorate) și la 60°C (gri) (b)

5.5. Concluzii parțiale.

Rezultatele obținute au permis elaborarea următoarelor concluzii parțiale:

- 1) Aplicarea tehnicii de extracție cu solvenți a permis obținerea unui extract cu un conținut ridicat de compuși biologic activi, iar tehnica cromatografică a permis identificarea a 19 compuși, cu următoarea distribuție cantitativă: licopen > β -caroten > di-palmitat de zeaxantină > astaxantină > zeaxantină > luteină > γ -caroten > cis licopen > α -caroten > cis β -caroten > cis γ -caroten > 15 - δ -caroten.
- 2) Aplicarea unor tratamente termice soluțiilor de β -lactoglobulină au determinat apariția unor modificări conformaționale parțiale în întregul interval de temperatură studiat, monitorizate prin red-shift-uri succesive în lungimea de undă maximă la emisie (λ_{max}), sugerând o creștere a caracterului hidrofob în vecinătatea fluoroforilor. Astfel, tratamentul termic a determinat un red-shift de 2 nm în λ_{max} la temperaturi de până la 80°C și de 4 nm prin încălzire la 90°C, ceea ce sugerează relocarea reziduurile de Trp într-un mediu mai polar, ceea ce, în cele mai multe cazuri, implică expunerea la solvent.
- 3) Extractul de licopen a stins în mod semnificativ fluorescența fluoroforilor din structura proteinei, monitorizate prin red-shift-uri de 7 nm și 10 nm la 80°C și respectiv 90°C în lungimea de undă maximă la emisie (λ_{max}), indicând faptul că adăugarea de extract de licopen a cauzat pierderea parțială a conformației proteice compacte, expunând subdomeniu hidrofob unde este plasat Trp¹⁹.

- 4) Mecanismul de quenching a fluorescenței este dinamic, cu o creștere a valorilor K_{SV} la creșterea temperaturii de la 25°C la 90°C.
- 5) Valorile constantelor de legare au fost mai mici odată cu creșterea temperaturii, sugerând unele modificări ale situsurilor de legare împreună cu modificări ale capacității de legare a extractului de licopen de către β -lactoglobulină. Astfel, valorile K_b au scăzut odată cu creșterea temperaturii de la $1,58 \pm 0,27 \times 10^{-5}$ mol/L la 25°C la $1,06 \pm 0,012 \times 10^{-5}$ mol/L la 90°C, sugerând schimbarea sau modificarea situsurilor de legare împreună cu modificări ale capacității de legare a licopenului din extract de către β -LG.
- 6) Numărul situsurilor de legare a fost aproximativ egal cu 1 la 25°C și a scăzut odată cu creșterea temperaturii, ceea ce indică faptul că încălzirea a dus la formarea unei clase de site-uri de legare independente.
- 7) Parametrii termodinamici au permis evaluarea forțelor implicate în interacțiune. Astfel, valorile negative ale entalpiei și entropiei au condus la concluzia că interacțiunea dintre β -lactoglobulină și licopen sunt cordonate de forțe van der Waals și legături de hidrogen.
- 8) Analiza computațională a permis identificarea aminoacizilor implicați în legarea licopenului la molecula de β -lactoglobulină. Datorită micilor rearanjări ale lanțurilor laterale la încălzirea proteinelor de la 25°C la 60°C, au fost observate unele diferențe în legarea ligandului deasupra calixului proteic, precum și reorientări locale ale regiunii buclei EF, unde este localizat principalul situs de legare pentru liganzi în molecula proteinei.
- 9) Tratamentul termic la temperaturi mai mari a condus la o perturbare semnificativă a conformației β -lactoglobulinei, care afectează afinitatea de legare a licopenului. Studiile de andocare efectuate cu β -lactoglobulină echilibrată la 90°C au evidențiat că licopenul se leagă de preferință de situsul situat la interfața dintre monomeri.
- 10) Rezultatele obținute în acest studiu au descris în detaliu mecanismul de legare dintre proteina principală din zer și carotenoidul principal din pielea de tomate, facilitând înțelegerea modalităților de interacțiune și aprecierea stabilității complexelor în diferite condiții.

CAPITOLUL 6. DEZVOLTAREA UNOR INGREDIENTE CU FUNCȚIONALITATE RIDICATĂ PENTRU POTENȚIALE UTILIZĂRI ÎN PRODUSE ALIMENTARE

6.1. Aspecte generale

Eforturile de a produce alimente funcționale la nivel industrial au succes datorită capacității unor compuși de a aduce beneficii sănătății umane. Alimentele funcționale sunt produse îmbogățite cu compuși cu activitate biologică sporită, cu beneficii suplimentare pentru sănătate, cum ar fi vitaminele, mineralele și compușii bioactivi.

6.2. Obiectivele studiului

În cadrul acestui capitol, s-a studiat posibilitatea de a dezvolta ingrediente cu funcționalitate multiplă, care valorifică potențialul de valoare adăugată a pielii de tomate ca sursă valoroasă de compuși biologic activi. Au fost testate două tehnici combinate de microîncapsulare a extractelor selectate în capitolele anterioare, și anume emulsionarea, coacervarea complexă și liofilizarea. Pulberile astfel rezultate au fost analizate pentru eficiența microîncapsulării compușilor biologic activi, conținutul de compuși fitochimici și activitatea antioxidantă, activitatea antimicrobiană, aspectul structural și morfologic precum și proprietățile antiproliferative și citotoxice.

6.3. Materiale

Izolatul proteic din zer (conținut de proteine de 95%) au fost achiziționate de la Fonterra (Auckland, Noua Zeelandă). Hexanul, acetona, acetonitrilul, acetatul de etil și metanolul au fost de puritate HPLC; [2,2-azinobis-(acid 3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic) sare de diamoniu] (ABTS), acidul 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilic (Trolox), guma acacia, și standardele de licopen și β -caroten au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich (Steinheim, Germania).

Echipamente

- Spectrofotometru biochrom Libra S 22 din dotarea platformei BioAliment,
- Balanță analitică de înaltă precizie, XS 403 SM, METTLER TOLEDO, Elveția
- Ultracentrifugă cu răcire, HETTICH Universal 320 R, Germania
- Concentrator sub vid AVC 2-18, CHRIST
- pH-metru S 20 K, Mettler Toledo, Elveția,
- Shaker orbital cu control analogic al frecvenței de agitare și termostatare, Lab Companion Comecta SA,
- Agitator orbital IKA T18 Ultra Turrax,
- Liofilizator Martin Christ Alpha 1-4

6.4. Extracția convențională solid-lichid cu solvenți combinată cu extracția cu ultrasunete

O cantitate de 100 g pielită de tomate a fost omogenizată cu 100 mL carbonat de magneziu, 20% cu menținere pe agitator orbital la temperatura de 25°C timp de 2 ore. Apoi, în vederea extracției au fost adăugați 120 mL amestec hexan:acetona (3/1; v/v), urmată de introducerea în baia de ultrasunete pentru 30 min la temperatura de maximum 50°C. Proba a fost ulterior centrifugată la 9000 rpm, timp de 10 min, la o temperatură de 10°C. Extracția a fost repetată de 10 ori, iar supernatantul total obținut a fost colectat și concentrat la temperatura de 40°C sub presiune redusă până la sec (AVC 2-18, CHRIST).

6.5. Extracția carotenoidelor cu fluide supercritice

O cantitate de 165 g pielită de tomate proaspete și mărunțite a fost introdusă în instalația de extracție cu fluide supercritice în compartimentul de alimentare C30. Debitul de CO₂ a fost menținut pe perioada extracției între 2,5~4,5 mL/min., presiunea menținută între 20~50 Mpa iar

temperatura de 70°, 74° și 80°C. Au fost colectate fracțiunile S40 și S45 în vederea caracterizării acestora în compuși biologic activi și microîncapsulării acestora în diferite matrici proteice.

6.6. Variante experimentale de microîncapsulare a compușilor biologic activi din pieliță de tomate

Pentru microîncapsularea compușilor carotenoidici din extractul din pieliță de tomate s-au utilizat diferite metode și matrici de încapsulare.

S-au realizat 12 variante de microîncapsulare, în care s-au utilizat extract carotenoidic dizolvat în ulei (de floarea soarelui și ulei din sămburi de struguri), izolat proteic din zer în diferite concentrații, proteine vegetale din soia (lecitină), carboximetilceluloză, transglutaminază, gumă acacia. Metodele de obținere a pudrelor încapsulate sunt coacervarea și liofilizarea.

6.7. Determinarea conținutului de carotenoide și licopen din variantele experimentale

Licopenul și cantitatea totală de caroteni au fost determinate prin metoda spectrofotometrică descrisă la capitolul 4.3.5. O cantitate de 0.2 g extract concentrat a fost dizolvată în 11 mL amestec hexan/acetona (3/1; v/v), urmată de determinarea absorbanței la diferite lungimi de undă, respectiv 470 nm, 450 nm, 503 nm.

6.8. Determinarea activității antioxidante utilizând metoda ABTS.

Metoda de determinare a activității antioxidante a fost descrisă în subcapitolul 4.3.6.

6.9. Determinarea cromatografică a compușilor bioactivi din extractele și pudrele din pielițe de tomate

Metoda de determinare a profilului cromatografic din probele analizate a fost descrisă în subcapitolul 4.3.7.

6.10. Eficiența microîncapsulării compușilor carotenoidici din extractele microîncapsulate

Pentru **variantele 2-11 de microîncapsulare** s-a determinat conținutul total și de suprafață al carotenoidelor din pudra microîncapsulată prin extracție cu solvenți.

Eficiența încapsulării a fost calculată după ecuația :

$$EE, \% = \frac{\text{Licopen total} - \text{Licopen suprafață}}{\text{Licopen total}} * 100$$

6.11. Structura și morfologia pudrelor microîncapsulate utilizând microscopia confocală

Structura și morfologia pulberilor obținute au fost determinate folosind un sistem microscopic cu scanare laser confocal Zeiss LSM 710 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Köln, Germania). Specificițiile tehnice ale microscopului LSM 710 sunt: diode laser (405 nm), laser Ar (458, 488 și 514 nm), laser DPSS (pompa cu diode pentru solide 561 nm) și laser HeNe (633 nm). Distribuția compușilor bioactivi în matricea complexă de biopolimeri a fost observată folosind obiectivul 20 apocromatic și mărire 0,6. Pulberile obținute au fost observate atât în starea lor nativă, cât și marcate fluorescent cu Roșu de Congo (40 μM), într-un raport de 3:1.

Imaginile confocale ale pulberilor au fost capturate și analizate cu software-ul ZEN 2012 SP1 (Black Edition, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germania).

6.12. Structura și morfologia pudrelor microîncapsulate utilizând microscopia de scanare electronică

Examinarea structurii unor probe selectate s-a realizat utilizând microscopia cu scanare de electroni (FEI Quanta 200) utilizând un voltaj de 15 kV în vacuum scăzut. Pudrele au fost fixate pe un tub de aluminiu utilizând bandă dublu adezivă din carbon. Pentru creșterea conductivității, probele au fost acoperite cu un strat subțire de aur de 5 nm, cu ajutorul unui modul SPI-Module Sputter Coater (SPI Supplies, USA), utilizând un curent de 18 mA. Imaginile SEM au fost colectate la diferite magnitudini între 5000 și 100.000X.

6.13. Cinetica de degradare termică a compușilor bioactivi din pudrele microîncapsulate

Un volum de 1 mL soluție cu pudră microîncapsulată (8,5 mg/mL în 0,1 M buffer fosfat de sodiu la pH 6,9) a fost introdus în tuburi din sticlă și sigilate. Tuburile au fost apoi supuse tratamentului termic în interval 110-140°C, timpul menținut la tratament termic variind între 0 și 40 minute. După tratarea termică a probelor tuburile din sticlă au fost imersate în apă cu gheață pentru aproximativ 2 minute pentru a putea preveni o posibilă degradare termică ulterioară. Probele astfel obținute au fost diluate cu 1 mL buffer fosfat de sodiu 0,1 M la pH 6,9 la care s-au măsurat absorbanțele la lungimile de undă corespunzătoare carotenilor totali și licopenului, respectiv 470 nm și 503 nm. Rezultatele obținute au fost adaptate unui model cinetic de ordin întâi.

6.14. Activitatea de inhibiție a α-amilazei și a α-glucozidazei

Variante experimentale selectate de pudre microîncapsulate au fost dizolvate în soluție tampon fosfat de sodiu (0,1 M și pH 6,9) având o concentrație de 8,5 mg/mL.

6.15. Activitatea antimicrobiană

Testarea activității antimicrobiene, față de microorganismele indicator (*Aspergillus niger* MIUG M5 și *Bacillus subtilis* MIUG B1) a fost realizată utilizând 0,5 g pudră microîncapsulată, au fost omogenizate cu 45 mL de mediu de cultură steril PDA (Potato Dextrose Agar), pH = 5,4 (pentru mucegaiuri), PCA (Plate Count Agar) pentru *B. subtilis* și TSA (Tryptic Soy Agar) (pentru *S. agona*), temperat la temperatura de 42°C, iar apoi s-au repartizat în placi Petri. Mediul solidificat a fost inoculat, în centrul plăcii, cu 5 μL suspensie de microorganism indicator, având o concentrație finală de 1×10^7 spori/mL. Plăcile au fost termostatate la 25°C, timp de 5 zile, pentru mucegaiuri și 37°C, 24 h (pentru bacterii). În paralel, au fost realizate și probe martor, în condiții similare cu probele de analizat. După termostatare, au fost măsurate diametrele coloniei microorganismului indicator din proba martor (D_M) și proba de analizat (D_P), și exprimate în mm. Raportul de inhibiție a creșterii a fost calculat utilizând următoarea ecuația:

$$RI = \frac{D_M - D_P}{D_M} \times 100, \%$$

6.16. Studiul citotoxicității compușilor microîncapsulați

Testele de culturi de celule au fost efectuate în conformitate cu SR EN ISO 10993-5 pentru citotoxicitatea dispozitivelor medicale utilizând metoda de cultivare prin contact direct și Roșu Neutru (RN) pentru evaluarea cantitativă a viabilității celulare.

Linia celulară de fibroblaste de șoarece NCTC clona L929 au fost cultivate pe mediul MEM suplimentat cu 10% (v/v) FCS, 2 mM L-glutamină și 1% (v/v) amestec PSN în atmosferă umidificată cu 5% CO₂, la temperatura de 37°C, până la subconfluență.

6.17. Studiu de stabilitate a conținutului fitochimic pe durata depozitării

Pentru studiul stabilității la depozitare, pulberile au fost păstrate în recipiente de sticlă rezistente la lumină, la temperatura de 25°C, timp de 21 de zile, și au fost observate modificările apărute la nivelul conținutului fitochimic.

6.18. Analiza statistică

Toate experimentele au fost efectuate în triplicat, cu probe în duplicat. Rezultatele au fost exprimate în termeni de valori medii. Analiza statistică a datelor a fost efectuată prin analiza univariantă a varianței (ANOVA) cu un nivel semnificativ de 95% ($p < 0,05$) folosind testul Tukey.

6.19. REZULTATE ȘI DISCUȚII

6.19.1. Analiza comparativă a eficienței încapsulării al variantelor experimentale microîncapsulate

Microîncapsularea a fost utilizată în scopul obținerii unor pudre de calitate superioară, reducând la minimum degradarea oxidativă a compușilor biologic activi din extracte. Producerea de microcapsule s-a realizat printr-o metodă combinată, care a utilizat emulsionarea, coacervarea complexă și liofilizarea ca tehnică de uscare, obținându-se pulberi fine, de culoare portocalie.

În tabelul de mai jos sunt prezentate valorile înregistrate pentru eficiența încapsulării principalilor compuși biologic activi din variantele experimentale obținute.

Eficiența încapsulării (EE) pentru variantele de pudre microîncapsulate

Variante	Caroteni totali, %	β -caroten, %	Licopen, %
V1	89.78±0.41	89.61±0.31	83.6±0.20
V2	6.49±0.69	0.41±1.44	5.06±0.001
V3	19.93±0.001	17.94±1.8	22.31±0.61
V4	21.64±7.51	13.13±3.71	12.85±4.39
V5	21.22±1.37	17.67±1.63	20.27±1.83
V6	-	-	-
V7	19.74±2.69	16.37±3.12	19.50±3.42
V8	-	-	-
V9	38.25±2.96	38.11±3.29	36.14±3.5
V10	46.87±9.73	46.31±8.49	46.08±8.46
V11	49.43±3.54	44.59±4.75	49.22±4.00
V12 (S40)	51.94±1.94	51.63±1.61	37.08±4.3

V12 (S45)	51.16±1.31	50.07±1.55	40.52±2.14
-----------	------------	------------	------------

6.19.2. Caracterizarea fitochimică a pudrelor microîncapsulate și evaluarea stabilității compușilor la depozitarea controlată

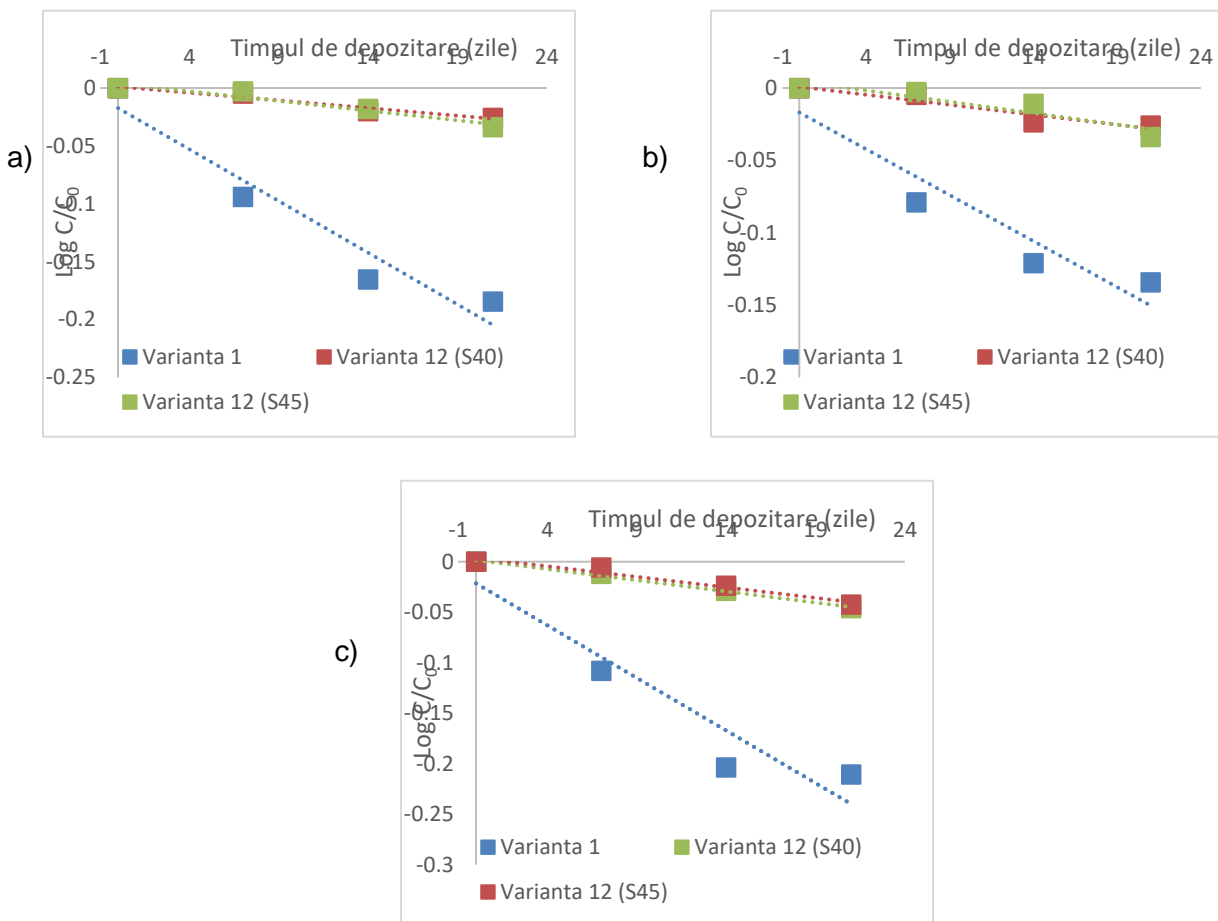
În tabelul de mai jos sunt prezentate profilurile fitochimice ale variantelor experimentale în ceea ce privește conținutul de carotenoide totale, licopen și β-caroten, precum și variația concentrației acestor compuși la depozitare pentru anumite variante selectate.

Stabilitatea compușilor biologici activi la depozitare la 4°C, 21-28 de zile

Varianta de încapsulare	Caroteni totali, mg/g s.u.	β-caroten, mg/g s.u.	Licopen, mg/g s.u.	ABTS μg Trolox/g s.u.
V1				
Inițial	46.75±0.30	34.97±0.13	29.09±0.20	1.77±0.05
7 zile	37.64±0.11	29.15±0.08	22.68±0.07	2.29±0.02
14 zile	31.94±0.51	26.46±0.50	18.19±0.37	2.39±0.02
21 zile	30,56±0,45	25,67±0,55	17,90±0,34	
V2				
Inițial	13.81±0.001	13.64±0.001	9.52±0.001	nd
7 zile	5.36±0.45	5.09±0.47	3.35±0.34	nd
14 zile	4.85±0.18	4.61±0.31	2.97±0.14	nd
21 zile	5.60±0.25	5.49±0.42	3.38±0.31	nd
V3				
Inițial	16.38±0.001	16.22±0.12	11.57±0.001	nd
7 zile	4.62±0.09	4.31±0.07	2.84±0.07	nd
14 zile	4.64±0.11	4.42±0.05	2.87±0.07	nd
21 zile	5.04±0.41	4.92±0.38	3.04±0.27	nd
V4	9.19±0.07	8.61±0.05	5.2±0.05	nd
V5	23.60±0.59	21.55±0.66	13.85±0.4	nd
V6	7.88±0.11	7.15±0.11	5.07±0.08	nd
V7	14.89±0.44	13.81±0.46	8.84±0.33	nd
V8	4.50±0.59	4.10±0.65	2.95±0.43	nd
V9	3.70±0.31	3.47±0.31	2.04±0.22	nd
V10				
Inițial	3.38±0.18	3.37±0.15	2.34±0.12	2.11±0.07
7 zile	2.44±0.20	2.34±0.20	1.69±0.14	2.34±0.01
14 zile	1.99±0.06	1.90±0.05	1.40±0.05	2.57±0.02
21 zile	2.26±0.06	2.15±0.05	1.57±0.03	4.52±0.28
V11				
Inițial	7.14±0.62	5.68±0.60	4.86±0.48	2.82±0.06
7 zile	8.63±0.51	7.07±0.53	5.73±0.33	2.96±0.03
14 zile	3.35±0.02	2.95±0.03	2.24±0.01	2.67±0.11
21 zile	4.16±0.10	3.59±0.11	2.76±0.08	3.92±0.27
V12 (S40)				
Inițial	26.28±1.28	25.57±1.14	12.03±0.81	10.10±0.87
7 zile	25.99±0.49	25.32±0.44	11.70±0.28	11.12±0.33
14 zile	24,88±1,03	29,39±0,80	15,39±0,67	12,15±0,60
21 zile	24.76±0.48	23.73±0.48	10.82±0.32	9.71±0.08
V12 (S45)				
Inițial	21.95±0.47	21.60±0.69	11.97±0.27	10.42±0.21
7 zile	21.81±0.46	21.37±0.5	11.81±0.16	10.78±0.20
14 zile	21.41±1.41	31.35±1.15	18.82±0.90	11.40±1.20
21 zile	20.30±0.15	20.05±0.12	10.85±0.08	8.86±0.38

Pentru analiza cinetică a datelor, au fost selectate trei variante experimentale respectiv variantele 1, 12(S40) și 12 (S45).

În figura de mai jos sunt prezentate dreptele de regresie liniară care descriu variația concentrației de compuși biologic activi în timpul depozitării, descrise de modelul cinetic de ordin I.



Dreptele de regresie liniară care descriu variația concentrației de compuși biologic activi în timpul depozitării (a – carotenoide totale, b – β -caroten, c – licopen)

Valorile parametrilor cinetici care descriu variația conținutului de carotenoide totale, β -caroten și licopen în timpul depozitării unor variante experimentale de pudre microîncapsulate

Varianta	k (zile ⁻¹)x 10 ⁻³			$t_{1/2}$ (zile)		
	Carotenoide totale	β -caroten	Licopen	Carotenoide totale	β -caroten	Licopen
11 (S40)	2,99±0,78	3,22±0,88	5,06±0,36	231,51±1,23	214,98±4,56	136,80±2,35
12 (S45)	3,91±0,67	3,68±0,97	4,83±0,78	177,04±1,89	188,10±3,21	143,32±2,78
1	20,49±0,99	14,73±1,02	23,95±1,45	33,81±0,86	47,02±1,23	28,93±1,09

Ținând cont de rezultatele obținute pentru eficiența microîncapsulării, **variantele 1 și 12 au fost selectate pentru experimente ulterioare.**

6.19.3. Activitatea inhibitorie asupra unor enzime importante din punct de vedere metabolic.

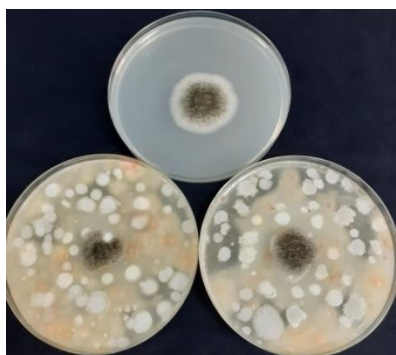
Variantele microîncapsulate V12 (S40 și S45) au prezentat un efect inhibitor asupra α -amilazei de 79,89-1,74%, în timp ce efectul de inhibiție asupra α -glucozidazei a fost mai mic pentru, cu inhibare de numai 5,80 0,62%. Prin urmare, varianta V12 a fost mai eficientă pentru inhibarea activității enzimatică a α -amilazei în comparație cu α -glucozidaza. Aceasta este o problemă importantă, deoarece s-a raportat că inhibarea simultană a ambelor enzime ar duce la fermentarea bacteriană anormală în colon datorită prezenței glucidelor nedigerate.

6.19.4. Activitatea antimicrobiană a variantelor microîncapsulate selectate

Variantele **microîncapsulate V12 (S40 și S45)** au fost testate pentru activitatea antifungică și antimicrobiană, utilizând ca microorganisme indicator *Aspergillus niger* MIUG M5 și *Bacillus subtilis* MIUG B1.

Activitatea antifungică a variantelor experimentale de pudre microîncapsulate

Microorganism indicator	Raport de inhibiție, %	
	V12 (S40)	V12 (S45)
<i>Aspergillus niger</i> MIUG M5	38,23	35,29
<i>Bacillus subtilis</i> MIUG B1	0	0

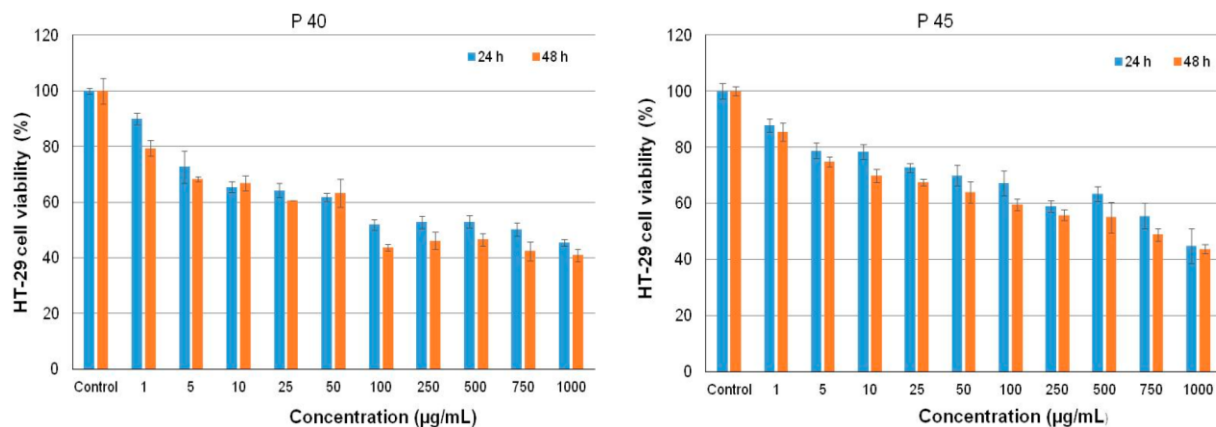


Efectul inhibitor al probelor testate față de *Aspergillus niger* MIUG M5

Activitatea antimicrobiană mai mare în cazul probelor S40 și S45 poate fi asociată cu conținutul mai ridicat de carotenoide și, probabil, cu cel al acizilor grași liberi.

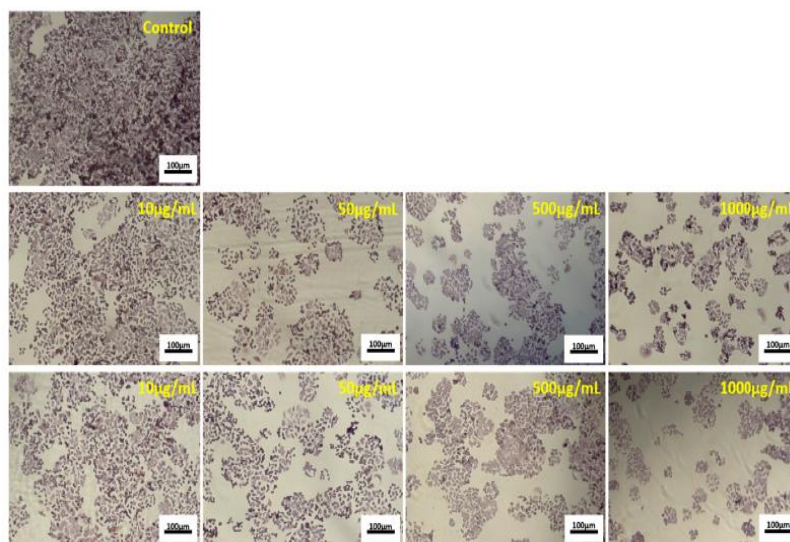
6.19.5. Analiza citotoxicologică a variantelor microîncapsulate

Citotoxicitatea *in vitro* a pudrelor microîncapsulate, varianta V12 (S40 și S45) a fost evaluată pe liniile celulare HT-29 și L929, după 24 de ore și 48 de ore de cultivare prin testul Roșu Neutru. Rezultatele au arătat o scădere a viabilității celulare HT-29, care este dependentă de cantitate, în cazul ambelor variante.



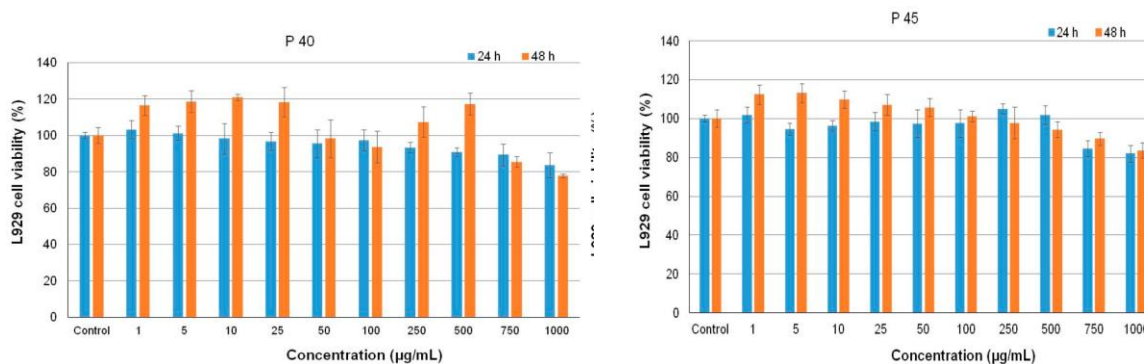
Viabilitatea celulară pe celule HT-29 cultivate în prezența diferitelor concentrații ale pudrelor microîncapsulate după 24 ore (varianta 1 albastru) și 48 ore (varianta 2 roșu), prin metoda Roșu Nețru. Rezultatele au fost exprimate ca valori medii ± SD (n = 3). *p<0,05 comparativ cu proba control

Valorile concentrației (IC₅₀) au fost 100 µg/mL în cazul probei V12(S40) și 750 µg/mL în cazul probei V12(S45), indicând un efect proliferativ superior al probei V12 (S40) față de V12 (S45) în linia celulară HT-29. Observații asupra morfologiei celulare urmând datele cantitative Roșu Nețru.



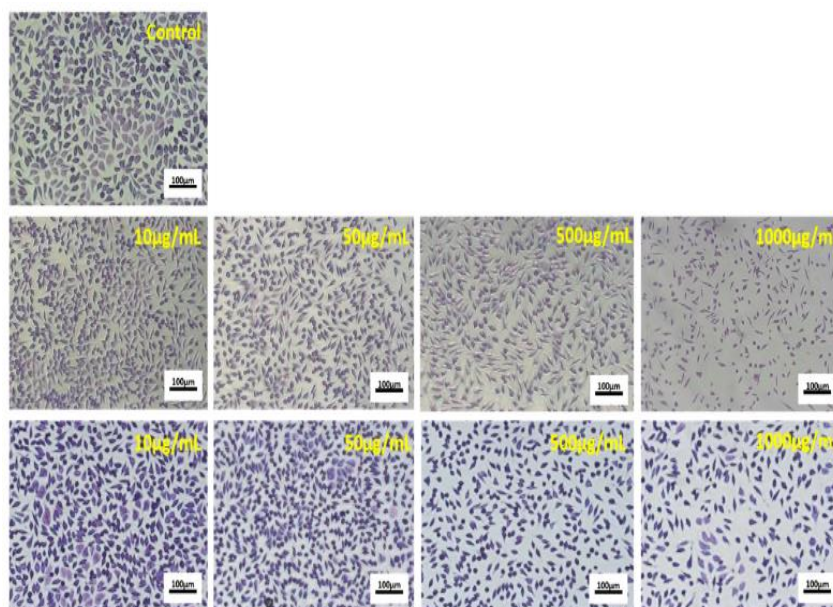
Imagini de microscopie optică ale culturii de celule HT-29 cultivate în prezența diferitelor concentrații din varianta experimentală V12 cu probe S40 (linia 2) și S45 (linia 3), timp de 48 h. Cultura netratată a servit drept probă de control (prima linie). (Colorație Giemsa). Scală de mărime=100µm.

Microscopia optică a arătat că morfologia celulară și densitatea culturilor celulare L929 tratate cu diferite concentrații de pulberi microîncapsulate au fost în conformitate cu datele cantitative obținute prin testul cu Roșu Nețru:



Viabilitatea celulară pe celule L929 cultivate în prezența diferitelor concentrații ale pudrelor microîncapsulate S40 și respectiv S45 după 24 ore (varianta 1 albastru) și 48 ore (varianta 2 roșu), prin metoda Roșu Netru. Rezultatele au fost exprimate ca valori medii ± SD (n = 3).

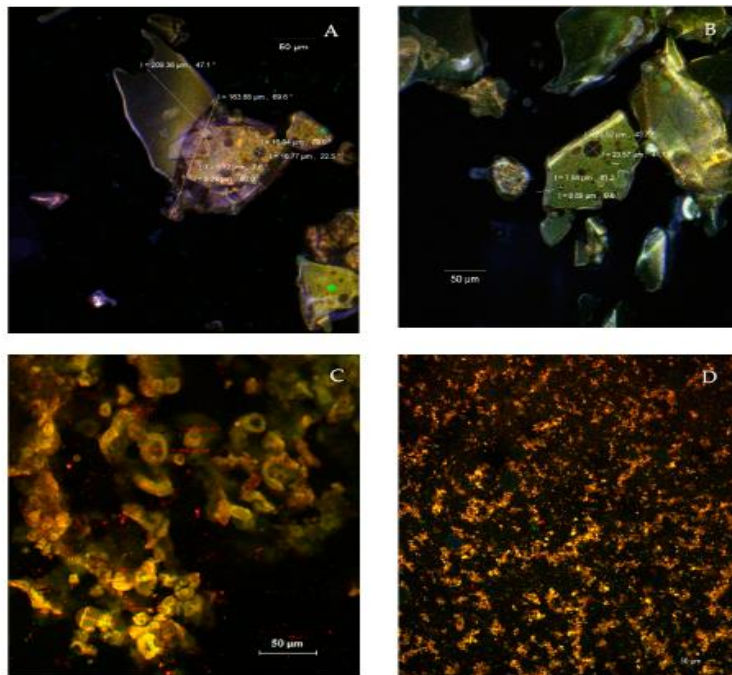
*p<0,05 comparativ cu proba control



Imagini de microscopie optică ale culturii de celule L929 cultivate în prezența diferitelor concentrații a probelor S40 (linia 2) și S45 (linia 3), timp de 48 h. Cultura netratată a servit drept probă de control (prima linie). (Colorație Giemsa). Scală de mărime=100µm.

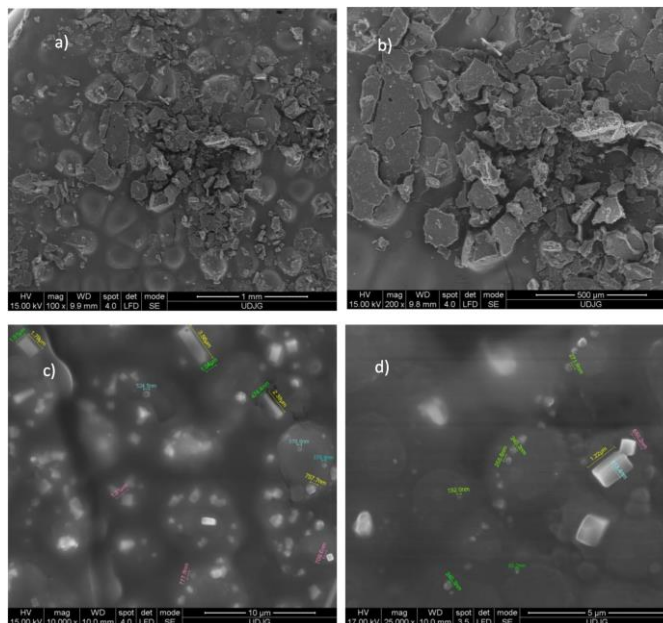
6.19.6. Analiza morfologică și structurală a variantelor microîncapsulate

Imaginile obținute din pulberile native indică microîncapsularea compușilor fitochimici din pielile de tomate sub formă de solzi mari, poligonali, cu dimensiuni cuprinse între 163,68–209,36 µm în interiorul cărora pot fi observate veziculele sferice (sferozomi) cu diametre de 5,29–16,77 µm (în P40) sau 7,94–23,5 µm (în P45). Ca principal compus din extract, licopenul, cu o auto-fluorescență în intervalul 500–580 nm, a fost capturat în matricea microîncapsulă formată din izolat proteic din zer (în verde) și gumă arabică (în albastru).



Imagini CLSM cu preparate microscopice (obiectiv apocromat 20x, zoom 1) din pudra microîncapsulată în stare nativă a) proba S40; b) proba S45; și preparate la care s-au adăugat coloranți c) proba S40; d) proba S45

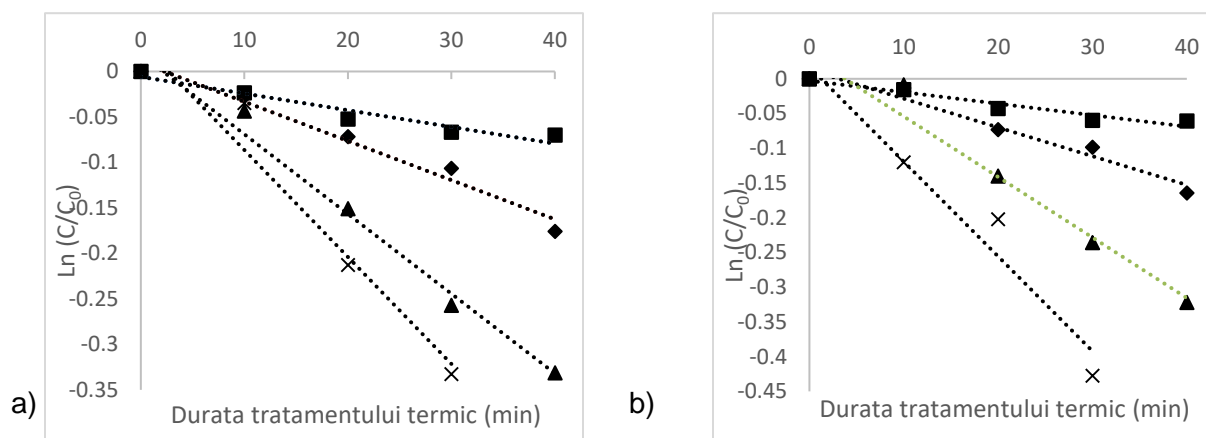
Imaginile SEM al microparticulelor sunt prezentate în figura de mai jos:



Imaginile SEM ale variantei microîncapsulate 1 la magnitudine de 100 (a), 200x (b), 10000x (c) și 25000x (d).

6.19.7. Stabilitatea la tratamentul termic a compușilor biologic activi din varianta de microîncapsulare 1

Pentru a testa comportamentul termic al lycopenui și al carotenoidelor totale, s-a efectuat un studiu cinetic al compușilor biologic activi din microcapsule în tratamentul termic. Modelul cinetic de ordinul I a fost utilizat pentru a determina constanta vitezei de degradare (figura a) și b).



Modelul cinetic de ordin 1 care descrie degradarea termică a carotenoidelor totale (a) și a lycopenui (b) în varianta microîncapsulată 1. Rezultatele sunt prezentate ca medie aritmetică a trei determinări. Temperatura: ■ 110°C, ◆ 120°C, ▲ 130°C și x140°C.

Parametrii cinetici estimați (k) și energia de activare pentru degradarea termică a compușilor fitochimici din extractul din pieliță de tomate microîncapsulate în izolat proteic din zer și gumă acacia

Temperatura, °C	Carotenoide total	Licopen
	$k \cdot 10^{-3} (min^{-1})$	$k \cdot 10^{-3} (min^{-1})$
110	4.14±0.24 ^d	3.91±0.17 ^d
120	9.90±0.98 ^c	9.44±0.27 ^c
130	20.26±0.99 ^b	20.03±0.87 ^b
140	27.17±1.02 ^a	31.32±1.45 ^a
$E_a (kJ \cdot mol^{-1})$	83.95±1.96	92.19±7.73

6.20. Concluzii parțiale

Rezultatele obținute au permis elaborarea următoarelor concluzii parțiale:

A. Utilizând tehnici combinate de microîncapsulare, bazate pe emulsionare, coacervare complexă și liofilizare au fost testate 12 variante de matrici biopolimerice și două extracte obținute din pieliță de tomate, respectiv extractul obținut prin extracția solid-lichid cu solvenți, asistată de ultrasunete și repetată pentru epuizarea matricii vegetale în compuși funcționali și extracție cu CO₂ supercritic.

B. În general, indiferent de materialul de încapsulare și tipul de extract au rezultat pudre fină, de culoare portocalie cu microparticule de diferite dimensiuni.

C. Din variantele testate, 3 variante au prezentat valori superioare ale parametrilor fitochimici, activitate antioxidantă și eficiența microîncapsulării. Prin urmare, variantele 1, 12 (S40) și 12 (S45) au fost selectate pentru experimente ulterioare.

D. Eficiența microîncapsulării pentru variantele selectate a variat în funcție de matricea biopolimerică, între 37% și 89%, ceea ce a permis emiterea ipotezei că selectarea matricei formate din izolat proteic din zer și gumă acacia (2:1) a permis o mai eficientă încapsulare comparativ cu aceeași matrice, în combinație de 5:1.

E. Varianta 1 a prezentat cel mai mare conținut de compuși biologic activi, de de 46.75 ± 0.30 mg/g su carotenoide totale, 34.97 ± 0.13 mg/g su β -caroten și licopen de 29.09 ± 0.20 mg/g su. Astfel, licopenul în pudra încapsulată a reprezentat aproximativ 62% din conținutul total de carotenoide. Activitatea antioxidantă pudrei a fost de 1.77 ± 0.05 mMol Trolox/g su.

F. Depozitarea pudrelor selectate a indus modificări în conținutul de compuși biologic activi, cu o tendință de scădere în timp a concentrației de compuși studiați, care a fost descrisă cu ajutorul modelului cinetic de ordinul 1.

G. Variantele experimentale 12 au prezentat valori mai mari pentru timpul de înjumătățire a concentrației de compuși biologic activi comparativ cu varianta 1, care a prezentat o sensibilitate mai mică la depozitare. Se pare că licopenul este compusul care prezintă sensibilitatea cea mai mare la depozitarea pudrelor, având atât constantele vitezelor de reducere a concentrației cele mai mari, respectiv valori mai mici ale timpilor de înjumătățire comparativ cu carotenoidele totale și β -carotenul.

H. Variantele microîncapsulate V12 au prezentat un efect inhibitor asupra α -amilazei de 80%, în timp ce efectul de inhibiție asupra α -glucozidazei a fost mai mic pentru, cu inhibare de numai 6%.

I. Variantele 12 au fost testate pentru activitatea antifungică și antimicrobiană, utilizând ca microorganisme indicator *Aspergillus niger* MIUG M5 și *Bacillus subtilis* MIUG B1. Cea mai mare activitate antimicrobiană (cu un raport de inhibiție de 38,23%) a fost identificată în cazul V12 (S40) împotriva *Aspergillus niger* MIUG M5, în timp ce nici una din variante nu a avut efect asupra culturii de *Bacillus subtilis* MIUG B1.

J. A fost evidențiat un efect proliferativ al variantelor 12, valorile concentrației IC50 fiind estimate la 100 μ g/mL în cazul probei V12(S40) și 750 μ g/mL în cazul probei V12(S45), pentru linia celulară HT-29.

K. Rezultatele au indicat că pulberile microîncapsulate cu extracte S40 și S45 au exercitat un efect antiproliferativ la concentrații minime de 5 μ g/ml și respectiv 25 μ g /ml în celulele HT-29, după 24 de ore de cultivare.

L. Analiza structurală și morfologică a subliniat microîncapsularea compușilor fitochimici din pielile de tomate sub formă de solzi mari, poligonali, cu dimensiuni cuprinse între 163,68–209,36 μ m în interiorul cărora pot fi observate veziculele sferice (sferozomi) cu diametre de 5,29–16,77 μ m (în P40) sau 7,94–23,5 μ m (în P45).

M. Stabilitatea la tratamentul termic a compușilor biologic activi din pudre s-a testat în intervalul 110-140°C, fiind descrise de modelul cinetic de ordin I.

N. Aceste date susțin ipoteza ca microîncapsularea permite obținerea de pudre/pulberi stabile, la fel de funcționale ca și ingrediente și cu valoare adăugată dată de proprietățile funcționale benefice asupra sănătății umane.

CAPITOLUL 7. CERCETARE APLICATIVĂ PRIN DEZVOLTAREA DE VARIANTE TEHNOLOGICE DE OBȚINERE A UNOR PRODUSE ALIMENTARE CU VALOARE ADĂUGATĂ

7.1. Aspecte generale

Utilizarea dressingurilor în prepararea saladelor este un obicei încă neexploatat pe piața de consum din România. În România, dressingul pentru salată este în continuare o categorie de nișă dat fiind faptul că obiceiul de consum este format pe clasicul amestec ulei – oțet și sare.

7.2. Obiectivele studiului

Pentru testare s-a selectat varianta tehnologică 1.

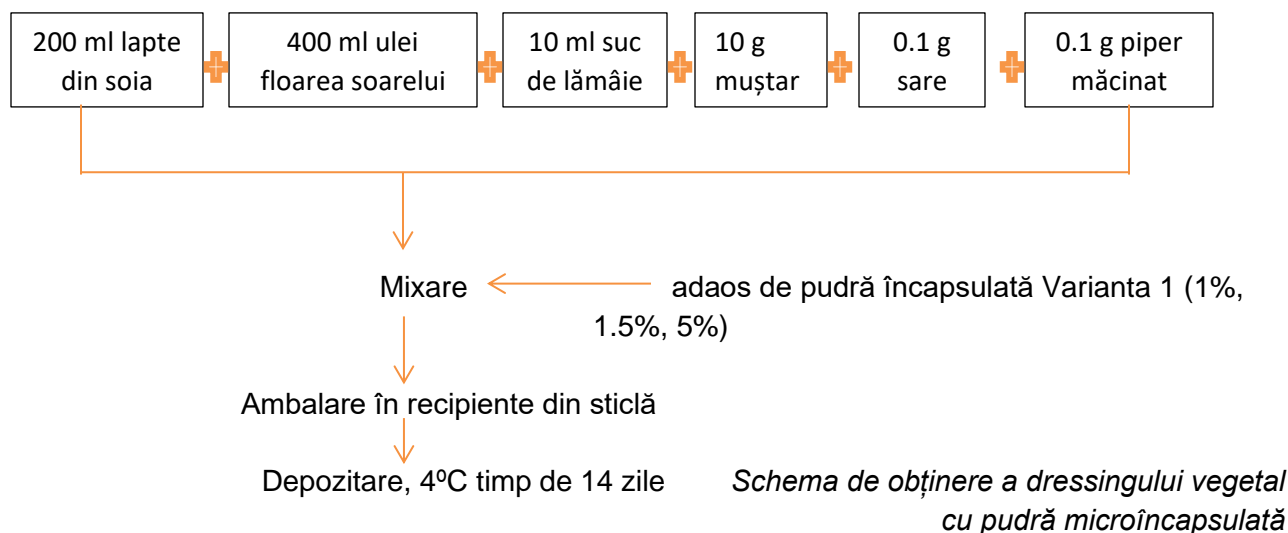
Acest studiu are ca obiective principale: stabilirea rețetei tehnologice de obținere a produsului cu valoare adăugată, analiza comparativă a caracteristicilor fizico-chimice și reologice precum și analiza caracteristicilor senzoriale ale acestora.

7.3. Materiale și metode

7.3.1. Materiale

Produsele comerciale (lapte de soia, ulei de floarea soarelui, muștar, lămâie, sare, piper) au fost achiziționate de la un supermarket din Galați.

7.3.2. Tehnologie de obținerea unui produs de tip dressing (maioneză vegetală) cu ados de pudră microîncapsulată varianta 1



7.3.3. Determinarea caracteristicilor reologice

S-a determinat comportamentul reologic al dressingului în termen de 3 ore de la preparare folosindu-se un reometru de stres-control Rheometer AR2000ex, TA care permite controlul temperaturii printr-un cilindru Peltier.

7.3.4. Determinarea conținutului de carotenoide

Conținutul de carotenoide a fost determinat spectrofotometric, respectiv peste 2 g produs vegetal (martor, 1%, 1.5% și 5%) au fost adăugați 10 ml amestec hexan/acetona (3/1; v/v) în vederea extracției compușilor biologic activi, apoi probele au fost introduse în baia de ultrasunte pentru 40 minute la o temperatură maximă de 40°C. Probele au fost ulterior centrifugate la 9000 rpm timp de 10 minute la o temperatură de 4°C după care s-a determinat absorbanta spectrofotometric la diferite lungimi de undă, respectiv 470 nm, 450 nm, 503 nm. Cantitatea de caroteni a fost exprimată în mg/g su.

7.4. REZULTATE ȘI DISCUȚII

7.4.1. Caracterizarea fitochimică a produselor alimentare cu valoare adăugată

În vederea dezvoltării unor tehnologii de obținere a produselor cu valoare adăugată, a fost selectată o schema de obținere a unor produse de tip dressing, în care s-a adăugat pudra microîncapsulată varianta 1. În tabelul de mai jos sunt prezentate rezultatele obținute pentru profilul fitochimic.

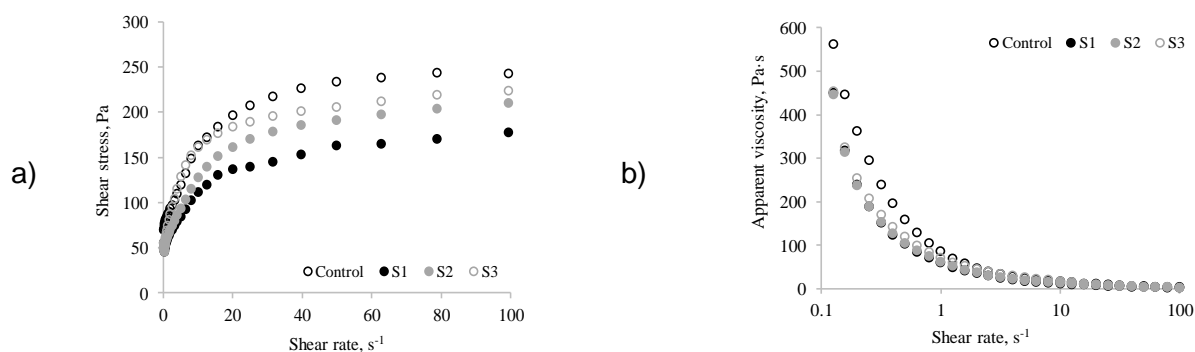
Cantitatea de carotenoide totale, β -caroten, licopen și activitatea antioxidantă din variantele tehnologice de dressing cu valoare adăugată

Adaos	Caroteni totali, mg/g s.u.	β -caroten, mg/g s.u.	Licopen, mg/g s.u.	mMol E Trolox/g s.u.
0%	0.43±0.009	0.37±0.005	0.19±0.003	20.24±1.60
1%	1.19±0.070	1.08±0.063	0.69±0.042	28.03±0.64
1,5%	1.70±0.016	1.52±0.013	1.00±0.012	29.70±0.82
5%	4.55±0.080	3.84±0.085	2.73±0.056	33.52±0.32

7.4.2. Analiza reologică a produselor alimentare cu valoare adăugată

Condițiile de debit forțat au fost aplicate pe probele de dressing pentru a estima impactul adăugării de microcapsule asupra comportamentului de curgere a acestora.

Toate probele au prezentat un comportament de subțiere a forfecării. Rezultatele sunt prezentate ca medii a trei măsurători repetate, iar abaterea standard a fost mai mică de 6,5%.



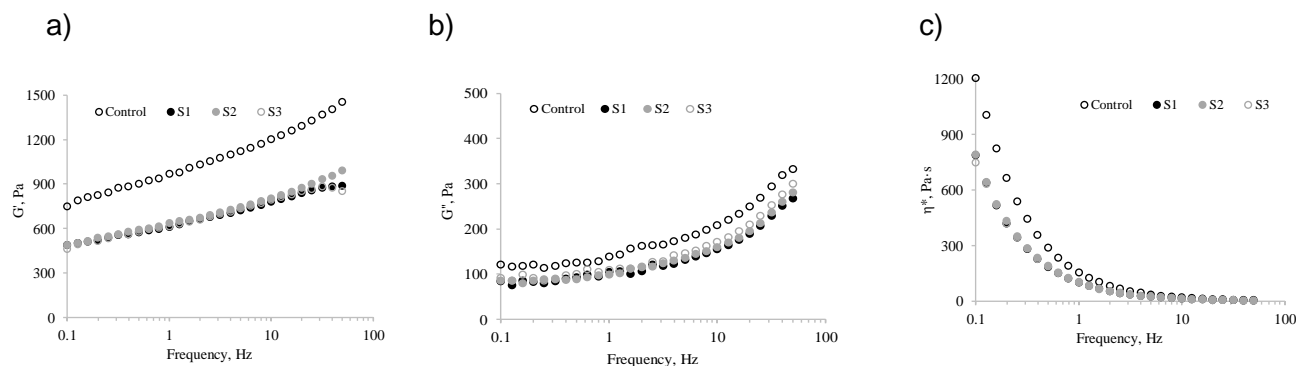
Reogramele (a) și curbele de curgere (b) ale dressing-urilor cu adaos de cantități diferite de pulbere microîncapsulată (0% - Control, 1% - S1, 1,5% - S2, 5% - S3) la 10°C.

Proprietățile reologice la 10°C ale produselor cu valoare adăugată (0% - Control, 1% - S1, 1.5% - S2, 5% - S3).

Probe	Flux continuu		Teste oscilatorii dinamice de amplitudine mică			
	K, Pa·s ⁿ	<i>n</i>	η_{50} , Pa·s	γ_c , %	γ_y , %	G^* , Pa
Control	92.728	0.221	4.709	2.0	35.34	977.9
S1	63.236	0.229	3.364	1.2	35.01	619.3
S2	66.477	0.263	3.969	1.0	34.77	642.3
S3	76.859	0.267	4.261	1.0	34.36	643.2

Parametrii de curgere: index de consistență - *K*, index de curgere - *n* și vâscozitatea aparentă la viteza de forfecare de 50 s⁻¹ - η_{50} ; teste oscilatorii dinamice de amplitudine mică: încordare critică - γ_c , randament de încordare- γ_y și coeficient complex G^* la frecvență de 1 Hz

Caracteristicile vîscoelastice ale emulsiilor au fost apoi monitorizate prin efectuarea de teste de frecvență în LVR. Probele cu pudră microîncapsulată au prezentat valorile G' și G'' semnificativ mai mici comparativ cu proba martor:



Evoluția modului de depozitare (a), modului de pierdere (b) și a vâscozității complexe (c) a probelor de dressing cu adaos de pudră microîncapsulată (0% - Control, 1% - S1, 1.5% - S2, 5% - S3) în timpul testelor de frecvență.

Toate probele au prezentat un comportament asemănător solidului, caracterizat prin „valorile G' predominante peste G'' ” pe întregul interval de frecvență testat.

7.5. Concluzii parțiale

În cadrul acestui capitol, varianta tehnologică 1 a fost utilizată pentru dezvoltarea de produse cu valoare adăugată, și anume produse de tip dressing. Au fost obținute 3 variante tehnologice de produse cu valoare adăugată, exprimată prin conținutul de compuși biologic active și activitatea antioxidantă.

A. S-a observat că prin adăugarea de pudră microîncapsulată, conținutul de compuși biologic activi crește semnificativ, de aproape 2.8 ori în proba cu adaos de 1%, 3.95 în proba cu adaos de 1.5% și de circa 10 ori în proba cu 5% pentru carotenoide totale.

B. Conținutul de β -caroten crește cu circa 2.9 în proba cu adaos de 1%, 4 ori în proba cu 1.5% și 10,3 ori în proba cu adaos de 5%. Concentrația de licopen este mai mare cu 3,6%, 5,26% și 14,4% în probele cu valoare adăugată. În ceea ce privește activitatea antioxidantă, aceasta a crescut cu cca. 39% în proba cu 1%, 47% în proba cu 1,5% adaos și 66% în proba cu adaos de 5%.

C. Măsurătorile de reologie au indicat că, indiferent de proporția adăugată, probele de dressing au prezentat un comportament solid.

D. Aceste rezultate susțin ipoteza că ingredientele bioactive obținute permit obținerea unor produse alimentare funcționale și alimente cu valoare adăugată, în special în ceea ce privește activitatea antioxidantă.

CAPITOLUL 8. CONCLUZII FINALE

Teza de doctorat intitulată **"COMPOZITE FUNCȚIONALE PE BAZĂ DE OLEORESINE ȘI PROTEINE PENTRU UTILIZĂRI ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ"** a avut ca scop principal identificarea și stabilirea pe baze științifice a unor strategii de valorificare a potențialului nutrițional și funcțional al unor produse secundare rezultate de la procesarea industrială a tomatelor.

Pelița de tomate este obținută ca subprodus în industria de procesare a tomatelor, cu un flux abundent de deșeuri solide în întreaga lume. O mare cantitate de reziduuri este direcționată către depozitele de deșeuri sau ca hrană pentru animale. Privite din punct de vedere cantitativ, dar mai ales în ceea ce privește profilul fitochimic, pelița de tomate prezintă o oportunitate de valorificare a unor compuși biologic activi, cu funcții bine definite pentru corpul uman și creează totodată un stimulent pentru industriile care facilitează tranziția către bioproduse regenerabile.

Teza de doctorat a vizat studiul comparativ al eficienței diferitelor tehnici de extracție asupra profilului cantitativ și calitativ al extractelor, studiul mecanismelor și de interacțiune dintre principalii compuși biologic activi din extracte și matrici de legare, cum ar fi proteinele din zer, din perspectiva microîncapsulării, dezvoltarea unor variante de obținere a unor compozite funcționale, cu rol de ingrediente naturale, stabile pentru potențiale utilizări în industria alimentară.

Au fost testate diferite tehnici de extracție și metode moderne de investigație (extracție cu fluide supercritice, cromatografie gazoasă, cromatografie lichidă de înaltă performanță, modelare moleculară) pentru profilarea fitochimică avansată a extractelor, iar prin analiza statistică a rezultatelor au fost stabilite condiții optime de extracție, pentru obținerea unor extracte funcționale, îmbogățite în compuși valoroși. O altă tehnică modernă, avansată de analiză a vizat fundamentarea științifică a modificărilor structurale și conformaționale ale carotenoidelor din extractele din pelița de tomate autohtone (*Solanum lycopersicum*), care au presupun elucidarea modificărilor structurale ale compușilor carotenoidici din pelița de tomate,

din perspectiva optimizării proceselor industriale, cu scopul de a asigura o funcționalitate optimă/optimizată a produselor alimentare.

Teza aduce contribuții semnificative la elucidarea mecanismelor de legare dintre β -lactoglobulina bovină și licopenul extras din pielea de tomate, utilizând tehnicile de quenching a intensității de fluorescență, calculul parametrilor de legare și a parametrilor termodinamici și modelarea moleculară. În cadrul abordărilor, au fost fundamentate științific mecanismele de legare și elucidate principalele forțe de interacțiune. Această bază de date cu parametrii de legare poate servi ca bază pentru optimizarea condițiilor de microîncapsulare.

Au fost dezvoltate o serie de variante de microîncapsulare, care au utilizat ca tehnici emulsionarea, coacervarea complexă și liofilizarea, variindu-se tipul de extract și matricile de microîncapsulare. Pudrele au fost caracterizate din punct de vedere al profilului fitochimic și activității antioxidante și antimicrobiene. Pudrele microîncapsulate selectate au prezentat activitate biologică, de inhibare a unor enzime implicate în sindromul metabolic, au avut activitate antioxidantă și antimicrobiană semnificativă și nu au prezentat citotoxicitate.

În etapa de cercetare aplicativă, au fost obținute 3 variante tehnologice de produse cu valoare adăugată, prin adăugarea de pudre microîncapsulate, funcționalitatea acestora fiind exprimată prin conținutul de compuși biologic activi și activitatea antioxidantă. S-a observat că prin adăugarea de pudră microîncapsulată, conținutul de compuși biologic activi crește semnificativ, în timp ce proprietățile reologice au indicat că, indiferent de proporția adăugată, probele de dressing au prezentat un comportament solid.

CAPITOLUL 9. CONTRIBUȚII PERSONALE ȘI PERSPECTIVE DE CONTINUARE A STUDIILOR

Teza de doctorat intitulată **”COMPOZITE FUNCȚIONALE PE BAZĂ DE OLEORESINE ȘI PROTEINE PENTRU UTILIZĂRI ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ”** se constituie într-un studiu original, cu o *abordare bottom-top*, care a permis parcurgerea unor etape de cercetare fundamentală și cercetare aplicativă, cu scopul de a stabili strategii de valorificare și reintegrare în lanțul alimentar a unor compuși funcționali, cu efecte benefice demonstrate asupra sănătății.

Studiile întreprinse au avut o abordare integrată, care a constat în:

- A. Testarea diferitelor tehnici de extracție din perspectiva optimizării condițiilor de recuperare a compușilor biologic activi din pielea de tomate;
- B. Caracterizarea avansată a extractelor complexe obținute și profilarea fitochimică și funcțională;
- C. Studiul avansat de cunoaștere a modalităților de interacțiune dintre liganzii selectați (licopenul) și matrici proteice, respectiv proteine din zer.
- D. Dezvoltarea unor variante microîncapsulate cu rol de ingrediente, cu avantajul principal al stabilizării funcționalității biologice și tehnologice ale compușilor lipofili din extracte și potențiala maximizare a biodisponibilității lor;

- E. Reintegrarea compușilor biologic activi din pielea de tomate în produse alimentare, care au căpătat astfel valoare adăugată și funcționalitate specifică, în special antioxidantă.
- F. Fundamentarea științifică a abordărilor standard, integrate de valorificare și reintegrare a compușilor biologic activi din produse secundare rezultate de la procesarea industrială a tomatelor în alimente funcționale, contribuind astfel la aplicarea principiilor de bioeconomie emergentă în România.

Din perspectiva de continuare a studiilor, abordarea din teza de doctorat intitulată **”COMPOZITE FUNCȚIONALE PE BAZĂ DE OLEORESINE ȘI PROTEINE PENTRU UTILIZĂRI ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ”** poate fi extrapolată și la alte produse secundare rezultate de la procesarea industrială a legumelor și fructelor (vinete, ceapă, dovleac, fructe de pădure, vișine, cireșe, prune etc) pentru reintegrarea compușilor biologic activi în alimente cu impact pozitiv asupra potențialului de creștere a calității vieții prin alimente și alimentație.

CAPITOLUL 10. LISTA PUBLICAȚIILOR

A. Articole publicate în reviste cotate ISI

1. **Ionica Dima (Gheonea)**, Aprodu, I., Râpeanu, G., **Stănciuc., N. 2018**. Binding mechanisms between lycopene extracted from tomato peels and bovine β -lactoglobulin. *Journal of Luminescence*, 203, 582-589, <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2018.07.017>.
2. **Ionica Dima (Gheonea)**, Aprodu, I., Enachi, E., Horincar, G., Bolea, C.A., Bahrim, G.E., Râpeanu, G., Stănciuc, N. **2020**. Investigations on thermostability of carotenoids from tomato peels in oils using a kinetic approach. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44, e14303. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14303>.
3. **Ionica Dima (Gheonea)**, Aprodu, I., Cîrciumaru, A., Râpeanu, G., Bahrim, G.E., Stănciuc, N. **2021**. Microencapsulation of lycopene from tomatoes peels by complex coacervation and freeze-drying: Evidences on phytochemical profile, stability and food applications, *Journal of Food Engineering*, 288, 110166, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110166>.
4. Mihalcea, L., Crăciunescu, O., **Ionica Dima (Gheonea)**, Prelipcean, A.-M., Enachi, E., Barbu, V., Bahrim, G.E., Râpeanu, G., Oancea, A., Stănciuc, N. **2021**. Supercritical CO₂ extraction and microencapsulation of lycopene-enriched oleoresins from tomato peels: Evidence on antiproliferative and cytocompatibility activities. *Antioxidants*, 10(2), 222. [doi: 10.3390/antiox10020222](https://doi.org/10.3390/antiox10020222).

B. Lucrări comunicate la manifestări științifice internaționale

1. Elena Enachi, **Ionica Dima (Gheonea)**, Carmen Alina Bolea, Georgiana Horincar, Iuliana Aprodu, Gabriela Râpeanu, Nicoleta Stănciuc, *Tomatoes's skins as a rich source of natural pigments*, European Biotechnology Congress 2019, Valencia-Spain, 11-13 September 2019, poster presentation

2. **Ionica Dima (Gheonea)**, Râpeanu Gabriela, Iuliana Aprodu, Liliana Mihalcea, Nicoleta Stănciuc, *Carotenoids thermal degradation in tomato waste extract-a kinetic study*, The 9th International Symposium EuroAliment, Dunărea de Jos University of Galati, 5-6 September 2019, Galați, România, poster presentation
3. Gabriela Iordăchescu, Gabriela Ploscuțanu, Liliana Mihalcea, **Ionica Dima (Gheonea)**, Augustin Octavian Mihalache, Octavian Baston, Octavian Barna, Eugenia Mihaela Pricop, Vanessa Guemkam Boudjeka, *Exploiter les déchets de tomates pour obtenir des produits sains et à haute valeur nutritionnelle*, Conference finale SaIN déroulée à l'Université de Médecine et Pharmacie Grigore T. Popa, 6 December 2019, Iași, România, oral presentation
4. **Ionica Dima (Gheonea)**, Liliana Mihalcea, Gabriela Râpeanu, Nicoleta Stănciuc, *Extraction of lycopene from tomato peels with Supercritical Carbon Dioxide and the effect of antioxidant activity*, European Biotechnology Congress 2020, Vienna-Praga, 24-26 September 2020, poster presentation

C. Lucrări comunicate la manifestări științifice naționale

1. **Ionica Dima (Gheonea)**, Iuliana Aprodu, Gabriela Râpeanu, Liliana Mihalcea, Nicoleta Stănciuc, *Lycopene extraction from tomato peels-characterisation and thermal degradation kinetics*, PhD student conference CSSD-UDJG, Dunărea de Jos University of Galați, Romania, 7nd-8th of June 2018, oral presentation
2. **Ionica Dima (Gheonea)**, Iuliana Aprodu, Liliana Mihalcea, Nicoleta Stănciuc, *Microencapsulation of lycopene from tomato peels extract*, PhD student conference CSSD-UDJG, Dunărea de Jos University of Galați, Romania, 13nd-14th of June 2019, poster presentation
3. **Ionica Dima (Gheonea)**, Gabriela Râpeanu, Nicoleta Stănciuc, *Microencapsulation of lycopene from tomato peels by complex coacervation and freeze-drying: evidences of stability*, PhD student conference CSSD-UDJG, Dunărea de Jos University of Galați, Romania, 18nd-19th of June 2020, poster presentation
4. **Ionica Dima (Gheonea)**, Liliana Mihalcea, Gabriela Râpeanu, Nicoleta Stănciuc, *Comparative study on Supercritical CO₂ extraction of lycopene and β -carotene from fresh tomato peels and ultrasound extraction and the effect of antioxidant activity*, PhD student conference CSSD-UDJG, Dunărea de Jos University of Galați, Romania, 18nd-19th of June 2020, poster presentation
5. **Ionica Dima (Gheonea)**, Râpeanu Gabriela, Aprodu Iuliana, Stănciuc Nicoleta, *Interactions of β -lactoglobulin and tomato lycopene: studies on binding mechanism*, PhD student conference CSSD-UDJG, Dunărea de Jos University of Galați, Romania, 10nd-11th of June
6. **Ionica Dima (Gheonea)**, (Gheonea) Ionica, Râpeanu Gabriela, Aprodu Iuliana, Stănciuc Nicoleta, *The functional potential of lycopene from tomato by-products: A review*, PhD student conference CSSD-UDJG, Dunărea de Jos University of Galați, Romania, 10nd-11th of June 2021, poster presentation

D. Alte publicații în reviste cotate ISI:

1. Gabriel-Dănuț Mocanu, Oana-Viorela Nistor, Doina Georgeta Andronoiu, Liliana Ceclu, **Ionica Dima Gheonea**, Liliana Mihalcea, Viorica Vasilica Barbu, Oana Emilia Constantin, Livia Pătrașcu, *Effects of drying methods on quality parameters of potato and red beetroot purée with Lactobacillus delbrueckii*, Journal of Food and Nutrition Research.

2. Alte conferințe internaționale

1. Dănuț G. Mocanu, **Ionica (Gheonea) Dima**, Liliana Mihalcea, Vasilica V. Barbu, Oana V. Nistor, Doina G. Andronoiu, Oana E. Constantin, Livia Pătrașcu, Elisabeta Botez, *The effects of drying methods on the quality parameters of potatoes and red beetroot purée*, International Conference on Agronomy and Food Science and Technology-2019, 20-21 June, Istanbul, Turcia, poster presentation
2. Liliana Mihalcea, Monica Ioan, Livia Pătrașcu, Dănuț G. Mocanu, **Ionica (Gheonea) Dima**, *New Sugar-Free Product on the Basis of Almond Flour and Pumpkin Pulp*, International Conference on Agronomy and Food Science and Technology-2019, 20-21 June, Istanbul, Turcia, poster presentation

3. Alte conferințe naționale

1. Dănuț G. Mocanu, L.A. (Butnariu) Tănase, Oana V. Nistor, **Ionica (Gheonea) Dima**, A. C. Chirilă, Doina G. Andronoiu, Oana E. Constantin, Vasilica V. Barbu, Livia Pătrașcu, Elisabeta Botez, 5th International Conference on Chemical Engineering-Innovative Materials and Processes for a Sustainable Development, Health promoters from potato and pumpkin instant purée, ICCE 2020, 28-30 Oct, Iași, România, poster presentation
2. Monica Ioan, Dănuț G. Mocanu, Doina G. Andronoiu, **Ionica (Gheonea) Dima**, Livia Pătrașcu, Liliana Mihalcea, *Rheological and Nutritional Properties of Sugar-Free Roulade with Pumpkin Pulp*, Week of Banat's University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, King Michael I of Roumania, Timoșoara, 20-22 May 2019, poster presentation
3. Dănuț G. Mocanu, Oana V. Nistor, Doina G. Andronoiu, Oana E. Constantin, Vasilica V. Barbu, **Ionica (Gheonea) Dima**, Livia Pătrașcu, Liliana Ceclu, Liliana Mihalcea, Elisabeta Botez, *Quality Characteristics of Fresh and Reconstituted Probiotic Potatoes Purée with Sea Buckthorn Supercritical CO₂ Extract*, Week of Banat's University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, King Michael I of Roumania, Timoșoara, 20-22 May 2019, poster presentation
4. Liliana Mihalcea, Livia Pătrașcu, **Ionica (Gheonea) Dima**, *Ruladă aglutenică cu conținut redus de zahăr*, Salonul Inovării și Cercetării Ugal Invent, 16-18 Oct 2019, Galați, România, poster presentation, Lucrare premiata de către Romanian Inventors Forum cu Premiul Euroinvent Medal.
5. Dănuț G. Mocanu, Oana V. Nistor, Doina G. Andronoiu, Oana E. Constantin, Vasilica V. Barbu, **Ionica (Gheonea) Dima**, Livia Pătrașcu, Liliana Ceclu, Liliana Mihalcea, Elisabeta Botez, *Caracteristicile de calitate ale Piureului de cartofi Probiotic cu ulei de*

Cătină, Salonul Inovării și Cercetării Ugal Invent, 16-18 Oct 2019, Galați, România,
poster presentation.