



REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Obținerea și caracterizarea unor microcapsule cu eliberare controlată pentru profilaxia bolilor de prostată

Doctorand: **Florina Lucia Csernatoni**

Conducător de doctorat: **Prof. dr. Carmen Socaciu**

CUPRINS

INTRODUCERE	Error! Bookmark not defined.
SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT	Error! Bookmark not defined.
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	Error! Bookmark not defined.
Capitolul 1. Tehnologii de microîncapsulare	Error! Bookmark not defined.
1.1. Definiție și istoric.....	Error! Bookmark not defined.
1.2. Clasificarea capsulelor. Tipuri de matrici și materiale încapsulante.....	Error!
Bookmark not defined.	
1.2.1. Clasificarea capsulelor	Error! Bookmark not defined.
1.2.2. Matrici utilizate pentru microîncapsulare	Error! Bookmark not defined.
1.3. Tehnici de obținere a microcapsulelor	Error! Bookmark not defined.
1.3.1. Tehnica uscării prin pulverizare (atomizare sau Spray –Drying)	Error!
Bookmark not defined.	
1.3.2. Microîncapsulare prin acoperire în pat fluidizat.....	Error! Bookmark not defined.
Bookmark not defined.	
1.3.3. Emulsii	Error! Bookmark not defined.
1.3.4. Microîncapsularea prin gelifiere ionotrop	Error! Bookmark not defined.
1.4. Metode de caracterizare a microcapsulelor	Error! Bookmark not defined.
1.4.1. Dimensionarea microcapsulelor	Error! Bookmark not defined.
1.4.2. Morfologia microcapsulelor	Error! Bookmark not defined.
1.4.3. Rezistența mecanică a microcapsulelor	Error! Bookmark not defined.
1.5. Mecanisme și metode de evaluare a eliberării principiilor active	Error!
Bookmark not defined.	
1.5.1. Mecanisme de eliberare a principiilor active.....	Error! Bookmark not defined.
1.5.2. Factorii care influențează activitatea de eliberare a principiilor active din microcapsule	Error! Bookmark not defined.
1.6. Aplicații ale microîncapsulării	Error! Bookmark not defined.
Capitolul 2. Bolile prostatei și efectele plantelor în prevenția acestora	Error! Bookmark not defined.
2.1. Funcțiile fiziologice și patologia prostatei	Error! Bookmark not defined.
2.1.1. Funcțiile prostatei.....	Error! Bookmark not defined.
2.1.2. Patologia prostatei	Error! Bookmark not defined.
2.2. Plante medicinale, fructe și semințe cu efect asupra dereglărilor metabolice la nivelul prostatei	Error! Bookmark not defined.
2.2.1. Substanțe bioactive cu rol de protecție a celulelor prostatei.....	Error! Bookmark not defined.
Bookmark not defined.	
2.3. Descrierea unor plante medicinale, semințe și fructe ce conțin compuși bioactivi implicați în protecția prostatei.....	Error! Bookmark not defined.
2.2.1. Cătină albă (Hippophae rhamnoides).....	Error! Bookmark not defined.
2.2.2. Urzică (Urtica dioica)	Error! Bookmark not defined.
2.2.3. Ceaiul verde (Camellia sinensis)	Error! Bookmark not defined.
2.2.4. Tomate (Solanum lycopersicum)	Error! Bookmark not defined.
2.2.5. Pufuțică cu flori mici (Epilobium parviflorum)	Error! Bookmark not defined.
2.2.6. Dovleacul (Cucurbita maxima)	Error! Bookmark not defined.
2.2.7. Floarea soarelui (Helianthus annuus).....	Error! Bookmark not defined.
2.2.8. Drojdia de bere (Saccharomyces cerevisiae)	Error! Bookmark not defined.
Capitolul 3. Metode de analiza a compușilor bioactive de origine vegetală	Error! Bookmark not defined.
3.1. Metode de analiza spectrometric	Error! Bookmark not defined.

3.1.1. Spectrometria UV-VIS.....	Error! Bookmark not defined.
3.1.2.Spectrometria FT-IR.....	Error! Bookmark not defined.
3.2. Metode de separare și identificare bazate pe cromatografia de lichide cu detecție prin spectrometrie de masă (analiza LC-MS)	Error! Bookmark not defined.
3.3. Metode de analiză aplicate specific pentru identificarea compușilor bioactivi de origine vegetală	Error! Bookmark not defined.
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ.....	Error! Bookmark not defined.
OBIECTIVELE CERCETĂRIILOR PROPRII	Error! Bookmark not defined.
Capitolul 4. Studiu comparativ al componentelor bioactive a suplimentului alimentar PROMEN și ingredientele sale utilizând metode spectroscopice și cromatografice (Studiul 1) ..	Error! Bookmark not defined.
Introducere.....	Error! Bookmark not defined.
4.1. Materiale și metod	Error! Bookmark not defined.
4.1.1. Plante-ingredientele utilizate la obținerea produsului PROMEN.....	Error! Bookmark not defined.
4.1.2.Extracția compușilor bioactivi din plante și PROMEN.....	Error! Bookmark not defined.
4.1.3.Analiza UV-VIS.....	Error! Bookmark not defined.
4.1.4.Dozarea conținutului de polifenoli totali (Metoda Folin-Ciocalteu).....	Error! Bookmark not defined.
4.1.5.Eficiența extracției	Error! Bookmark not defined.
4.1.6.Analiza FT-IR.....	Error! Bookmark not defined.
4.1.7.Analiza HPLC-DAD și LC-ESI(+)-QTOF-MS.....	Error! Bookmark not defined.
4.1.8. Analiza biostatistică a datelor	Error! Bookmark not defined.
4.2.Rezultate și discuții	Error! Bookmark not defined.
4.2.1.Amprenta spectroscopică UV-Vis a extractelor, și eficiența extracției.....	Error! Bookmark not defined.
4.2.2.Conținutul de polifenoli totali a plantelor-ingredientele și a produsului PROMEN	Error! Bookmark not defined.
4.2.3. Analiza FT-IR a ingredientelor și a produsului PROMEN.....	Error! Bookmark not defined.
4.2.4.Analiza HPLC-DAD a ingredientelor comparativ cu produsul PROMEN	Error! Bookmark not defined.
4.2.5.Analiza LC-(ESI+) QTOF MS a ingredientelor comparativ cu produsul PROMEN.....	Error! Bookmark not defined.
4.3.Concluzii	Error! Bookmark not defined.
Capitolul 5. Obținerea unor microcapsule/microsfere cu eliberare controlată, utilizând compuși bioactivi din tomate, fructe de cătină și ulei de dovleac (Studiul 2)	Error! Bookmark not defined.
Introducere.....	Error! Bookmark not defined.
5.1.Materiale și metod	Error! Bookmark not defined.
5.1.1. Extracția compușilor bioactivi din ingrediente.....	Error! Bookmark not defined.
5.1.2.Analiza UV-VIS.....	Error! Bookmark not defined.
5.1.3.Dozarea conținutului de polifenoli totali	Error! Bookmark not defined.
5.1.4.Calculul eficienței extracției și determinarea carotenoidelor totale.....	Error! Bookmark not defined.
5.1.5.Analiza FT-IR a ingredientelor	Error! Bookmark not defined.
5.1.6. Metoda de obținere a microsferelor și a microcapsulelor.....	Error! Bookmark not defined.
5.1.7.Determinarea vâscozității emulsiilor obținute	Error! Bookmark not defined.
5.1.8.Obținerea microsferelor și microcapsulelor.....	Error! Bookmark not defined.
5.2.Rezultate și discuții	Error! Bookmark not defined.
5.2.1. Analiza UV-VIS a extractelor cloroformice, eficiența extracției și calculul carotenoidelor totale.....	Error! Bookmark not defined.

5.2.2. Analiza UV-VIS a extractelor metanolice, eficiența extracției și calculul polifenolilor totali.....	Error! Bookmark not defined.
5.2.3. Analiza FT-IR a ingredientelor	Error! Bookmark not defined.
5.2.4. Determinarea vâscozității emulsiilor utilizate pentru obținerea de microcapsule	Error! Bookmark not defined.
5.2.5. Morfologia microsferelor și microcapsulelor	Error! Bookmark not defined.
5.3. Concluzii	Error! Bookmark not defined.
Capitolul 6. Caracterizarea și testarea stabilității microsferelor și microcapsulelor obținute din suc de cătină, suc de tomate și ulei de dovleac încorporate în alginat (Studiul 3)	Error! Bookmark not defined.
Introducere.....	Error! Bookmark not defined.
6.1. Materiale și metod	Error! Bookmark not defined.
6.1.1. Extracția compușilor bioactivi din microcapsule/microsfere.....	Error! Bookmark not defined.
6.1.2. Dozarea conținutului de polifenoli totali din extractele metanolice (METODA FOLIN-CIOCALTEU).....	Error! Bookmark not defined.
6.1.3. Eficiența extracției	Error! Bookmark not defined.
6.1.4. Calculul carotenoidelor totale	Error! Bookmark not defined.
6.1.5. Analiza FT-IR	Error! Bookmark not defined.
6.1.6. Testarea microcapsulelor în mediu gastric și intestinal simulat.....	Error! Bookmark not defined.
6.1.7. Analiza biostatistic	Error! Bookmark not defined.
6.2. Rezultate și discuții	Error! Bookmark not defined.
6.2.1. Eficiența extracției și concentrația de carotenoide totale din microcapsule și microsfere.....	Error! Bookmark not defined.
6.2.2. Eficiența extracției metanolice și calculul de polifenoli totali.....	Error! Bookmark not defined.
6.2.3. Analiza FT-IR.....	Error! Bookmark not defined.
6.2.4. Testarea stabilității microcapsulelor și a microsferelor în mediul gastric și intestinal simulat.....	Error! Bookmark not defined.
6.3. Concluzii	Error! Bookmark not defined.
Capitolul 7. Analiza UV-VIS a microcapsulelor / microsferelor cu sau fără coating de chitosan: rata de eliberare a compușilor bioactivi în timp și în diferiți solvenți – (Studiul 4)	Error! Bookmark not defined.
Introducere.....	Error! Bookmark not defined.
7.1. Materiale și metod	Error! Bookmark not defined.
7.1.1. Obținerea de microsferes și microcapsule cu coating de chitosan.....	Error! Bookmark not defined.
7.1.2. Extracția compușilor bioactivi din microcapsule/microsfere.....	Error! Bookmark not defined.
7.1.2. Analiza UV-Vis a extractelor metanolice și cloroformice ale microcapsulelor/microsferelor.....	Error! Bookmark not defined.
7.1.3. Rata de eliberare a compușilor bioactivi în timp și diferiți solvenți – comparații între microcapsule cu coating sau fără coating de chitosan	Error! Bookmark not defined.
7.2. Rezultate și discuții	Error! Bookmark not defined.
7.2.1. Amprenta spectroscopică a extractelor cloroformice	Error! Bookmark not defined.
7.2.2. Amprenta spectroscopică a extractelor metanolice	Error! Bookmark not defined.
7.3. Concluzii.....	Error! Bookmark not defined.
CONCLUZII GENERALE.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

Scopul și obiectivele tezei de doctorat

Scopul cercetărilor întreprinse este de a caracteriza și identifica componentele bioactive ale unor plante medicinale, fructe și a drojdiei de bere liofilizate pentru a obține o formulă originală a unui supliment alimentar (PROMEN) dar și o formulă microîncapsulată cu potențial benefic în prevenția bolilor de prostată.

Pentru acest studiu s-au utilizat diferite plante medicinale și fructe: urzica (*Urtica dioica*), ceai verde (*Camellia sinensis*), pufulița cu flori mici (*Epilobium parviflorum*), tomate (*Solanum lycopersicum*), cătina (*Hippophae rhamnoides*), semințe de dovleac (*Cucurbita maximă*), semințe de floarea soarelui (*Helianthus annuus*) și drojdie de bere liofilizată. Compușii bioactivi din aceste plante au fost analizați prin tehnici de spectrometrie UV-Vis, FTIR și cromatografie HPLC-DAD și LC-QTOF-MS, cu detectare prin fotodiode (DAD) și respectiv spectrometrie de masă (MS)

1. **Extracția și caracterizarea spectrometrică și cromatografică a compușilor bioactivi din plantele folosite ca ingredient în produsul PROMEN, și anume compușii polifenolici și carotenoidele.**
2. **Obținerea produsului PROMEN și caracterizarea compoziției acestuia comparativ cu plantele-ingredient.**
3. **Aplicarea tehnologiilor de microîncapsulare pe matrici de tip "alginate - cu sau fără coating de chitosan" pentru a obține microsferă și microcapsule ce încorporează compușii bioactivi din clasa carotenoidelor și a polifenolilor, cu eliberare controlată, ca produse generice de tip nutraceutice.**
4. **Caracterizarea morfologică, spectrometrică (UV-Vis și FTIR) a microcapsulelor și microsferelor obținute.**
5. **Testarea stabilității microsferelor și a microcapsulelor în mediu gastric și intestinal simulat.**
6. **Determinarea ratei de eliberare a compușilor bioactivi din microsferă și microcapsule, în timp și în diferiți solvenți, în funcție de tipul microcapsulelor și a coatingului cu chitosan.**

Structura tezei. Teza este structurată în două părți, prima parte conține date de literatură referitoare la tehnicile de microincapsulare, funcțiile fiziologice și patologice ale prostatei, dar și plante medicinale, fructe și semințe cu efect asupra dereglărilor metabolice la nivelul prostatei și metode de analiză a compușilor bioactivi de origine vegetală (3 capitole).

A doua parte se focusează pe contribuțiile personale aduse incluzând 4 studii experimentale ce includ materiale și metode folosite, rezultatele și concluziile aferente

Prima parte a tezei este structurată în 3 capitole:

Capitolul 1 include o scurtă descriere a tehnologiilor de microincapsulare, clasificarea capsulelor și tipurile de matrici incapsulante, tehnicile de obținere a microcapsulelor și descrierea succintă a celor mai utilizate tehnici în industria alimentară, metodele de caracterizare și evaluare a eliberării principiilor active a microcapsulelor, dar și aplicațiile microincapsulării.

Capitolul 2 include descrierea funcțiilor fiziologice și patologice ale prostatei, dar și plante medicinale, fructe și semințe cu efect asupra dereglărilor metabolice la nivelul prostatei. De asemenea, capitolul 2 include și o scurtă descriere a principalelor plante, fructe și semințe cu rol de protecție a prostatei. Plantele medicinale și aromatice ce conțin compuși bioactivi semnificativi pentru protecția prostatei sunt: catina, urzică, ceaiul verde, drojdia de bere, tomatele, pufulețul cu flori mici, semințele de dovleac și floarea soarelui.

Capitolul 3 include o scurtă descriere a principalelor metode de analiză a compușilor bioactivi de origine vegetală. Produsele vegetale includ un complex de compuși biochimici, de la metaboliti secundari și intermediari de metabolism, compuși cu mase moleculare mici, până la macromolecule polimerice (proteine, poliglucide, lipide complexe). Analiza acestora presupune utilizarea mai multor tehnici de extracție, separare, măsurare (UV-VIS, FT-IR și LC-MS).

A doua parte a tezei este reprezentată de contribuția personală însumează 4 studii concludente:

Capitolul 4 prezintă rezultatele obținute din analiza extractelor metanolice a șapte plante și a produsului PROMEN utilizând mai multe tehnici separare, măsurare (UV-VIS, FT-IR și LC-MS).

Capitolul 5 a fost dedicat obținerii de microcapsule/microsfere din suc de catina, tomate și ulei de dovleac și analiza UV-VIS, FT-IR a ingredientelor.

Capitolul 6 a avut ca obiective testarea microcapsulelor în mediul gastric și intestinal simulat și analiza UV-VIS a extractelor obținute.

Capitolul 7 a fost dedicat determinării ratei de eliberare a compușilor bioactivi din microsfere și microcapsule, în timp și în diferiți solvenți, în funcție de tipul microcapsulelor și a coatingului cu chitosan.

Programul de cercetare doctorală a fost realizat și cu sprijinul financiar oferit prin programul POSDRU/159/1.5/S/132765 (2007-2013)

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Capitolul 4. Studiu comparativ al componentelor bioactive a suplimentului alimentar PROMEN și ingredientele sale utilizând metode spectroscopice și cromatografice (Studiul 1)

Scopul acestui studiu a fost de a obține extracte metanolice din fiecare plantă ingredient și realizarea unei formule inovative din amestecul de plante cu funcții dirijate pentru protecția prostatei, denumit PROMEN.

Materiale și metodă

Ingredientele utilizate au fost: urzică, ceai verde, pufulița cu flori mici, tomate, cătina, semințe de dovleac, semințe de floarea soarelui, drojdie de bere liofilizată și PROMEN pudră. Extractia compusilor bioactivi s-a făcut în metanol acidulat, iar probele au fost analizate folosind spectrometria UV-VIS, FT-IR și LC-ESI(+)-Q-TOF-MS. Analiza statistică a fost realizată prin Analiza Principalelor Componente - PCA (Principal Component Analysis).

Rezultate și discuții

În urma analizei UV-VIS a tuturor probelor se poate observa că ceaiul verde, semințele de dovleac, semințele de floarea soarelui și drojdia prezintă 3 zone de absorbție în anume la 280, 330 și 400 nm în timp ce PROMEN, tomatele, pufulița și cătina doar câte 2 regiuni de absorbție la 280 și 400 nm. Pe baza amprentelor UV-VIS s-a calculat factorul de extracție putând observa că în general acizii fenolici s-au extras mult mai bine decât flavonoidele. Pufulița cu flori mici a avut cel mai bun grad de extracție fiind de 10 ori mai mare decât la urzică. Datorită concentrației mari în compuși nepolari ai semințelor de dovleac, floarea soarelui, cătina și tomate explică concentrația scăzută în acizii fenolici, flavonoide și quinone.

În urma calculului de polifenoli totali și pe baza raportului de compoziție a plantelor din produsul PROMEN, ar fi trebuit ca acesta să aibă teoretic 80,56 mg GAE/100 ml extract în loc de 76,611. Acest lucru arată că prin procesarea produsului s-au pierdut aproximativ 5% din totalul compușilor fenolici.

Analiza spectrelor IR pe domeniul specific de amprentă (1000 și 1500 cm⁻¹) evidențiază trei zone de absorbție, după cum urmează: zona 1: specifică compusilor mono-, oligo- glucidici; zona 2: corespunde toare vibrațiilor grupărilor CO carbonil de întindere a grupării OH și zona 3: specifică pentru vibrații de CO (amidă).

Prin analiza LC-ESI(+)-Q-TOF-MS în produsul PROMEN au fost identificați peste 21 de compuși dintre care: juglon, Resveratrol, Quercetin, epigallocatechin, Gallocatechin, Biochanin A, Isorhamnetin 3-O-glucozid 7-O-rhamnoside, Quercetin 3-O-galactozid 7-O-rhamnoside, Campferol 3,7-O-diglucozitol și acid p-Coumaroylquinic.

Concluzii

1. Pe baza amprentelor UV-Vis, s-au calculat factorii de extracție a acizilor fenolici, a flavonoidelor și a quinonelor și s-a constatat că acizii fenolici au avut un randament de extracție mai bun decât flavonoidele.
2. Pe baza amprentelor FTIR s-a putut face discriminarea dintre produsul PROMEN și ingredientele sale. Conform analizei PCA a spectrelor FTIR, probele au fost în principal legate de benzile în cm⁻¹ zona 1300-1489, care a avut contribuția principală la gruparea spectre. Trupe în zona 1000-1082 cm⁻¹ au fost, de asemenea, importante în clasificarea probelor. Datele prezentate în acest studiu arată că spectroscopia FTIR este o tehnică adecvată de amprentare comparativ și pentru a evalua randamentul de extracție de plante medicinale și suplimente alimentare.
3. Prin analiza cromatografică HPLC-DAD a extractelor, cu detecție la 280 nm și 330 nm s-au evidențiat un număr de 3-7 semnale majore ai acizilor fenolici și flavonoide comparând extractele de plante și produsul finit PROMEN cu standarde pure de acizii fenolici și flavonoide. Cei mai importanți compuși identificați sunt acizii ferulic, elagic, miricetina și acidul trans-cinamic.

- (identificați la 280 nm) și rutina, quercetina, acid ferulic și miricetina (identificați la 330 nm).
4. Prin analiza LC - QTOF MS- au fost separați și identificați 21 de compuși specifici în produsul final PROMEN.

Rezultatele acestui studiu au fost publicate în:

1.CSERNATONI FLORINA, CARMEN SOCACIU, RALUCA MARIA POP, FLORICUTA RANGA, FLORINA BUNGHEZ, FLORINA ROMANCIUC, 2013, Comparative Fingerprint of Aromatic Herbs and Yeast Alcoholic Extracts used as Ingredients for Promen, a Prostate Preventive Nutraceutical, Bulletin USAMV Food Science and Technology 70(1), 45-52.

2.CSERNATONI FLORINA, CARMEN SOCACIU, RALUCA MARIA POP, FLORINELA FETEA, FLORINA BUNGHEZ, 2013, Application of FTIR Spectroscopy for Fingerprinting Bioactive Molecules in a Nutraceutical PROMEN, comparatively with Plant ingredients, Bulletin USAMV Food Science and Technology 70(1), 68-69.

3.CSERNATONI FLORINA, ANCA BACIU, RALUCA POP, FLORINA ROMANCIUC, CARMEN SOCACIU, 2014, Characterization of seven medicinal plants included in an original formula Promen, to prevent prostate diseases, Hop and Medicinal Plant, No. 1-2, 70-79.

4.CSERNATONI FLORINA, CARMEN SOCACIU, RALUCA MARIA POP, FLORINA ROMANCIUC, FLORINA BUNGHEZ, 2014, HPLC-PDA and HPLC-ESI(+)QTOF-MS fingerprints of polyphenols in a nutraceutical product (Promen) comparatively with plant ingredients, Romanian Journal of Biochemistry 51, 60-61.

Capitolul 5. Obținerea unor microcapsule/microsfere cu eliberare controlată, utilizând compuși bioactivi din tomate, fructe de cătină și ulei de dovleac (Studiul 2)

Scopul acestui studiu a fost de a caracteriza sucul de tomate și sucul de cătină combinate cu ulei de dovleac (prin metode spectrometrice) și de a obține microsfere și microcapsule, cu sau fără coating prin tehnica gelificării ionotrope.

Materiale și metodă

Pentru determinarea compușilor bioactivi s-au făcut 2 tipuri de extracții (una metanolică și una cloroformică) după care extractele obținute au fost analizate prin tehnicile de spectrometrie UV-VIS și FT-IR.

Pe baza amprentelor UV-VIS s-au calculat factorii de extracție, polifenoli totali (extracte metanolice) și conținutul total de carotenoide (extracte cloroformice).

Pentru obținerea emulsiilor s-au cântărit probele de suc apoi s-au pus într-un pahar Berzelius pe un agitator magnetic și s-au încălzit la 30°C, apoi s-a adăugat alginatul și au fost luate la agitat o oră și jumătate până s-a dizolvat complet alginatul de sodiu. Pentru matricile de microsfere s-a adăugat ulterior uleiul de dovleac, s-a ultraturaxat proba 5 minute până s-a obținut o emulsie, iar pentru microcapsule uleiul reprezintă nucleul microcapsulei. Apoi s-a preparat baia de întărire din apă distilată la care s-a adăugat 2%CaCl₂, iar pentru o parte din microcapsulele obținute din probele 1C și 2C s-a făcut un coating de chitosan 0.1% adăugat în baia de întărire, probele fiind notate 1C* și 2C*.

Determinarea vascozității s-a făcut cu un viscosimetru Fungibal utilizând o geometrie R2 și este exprimată în cP, iar pentru obținerea de microcapsule și microsfere s-a utilizat un microîncapsulator Buchi B 395 PRO.

Rezultate și discuții

Analiza UV-VIS a extractelor cloroformice a permis identificarea a 4 clase de compuși: lipide, acizi fenolici, flavonoide și carotenoide, iar pe baza factorului de extracție s-a observat că adaosul de 5% ulei de dovleac crește semnificativ cantitatea de lipide a probelor. Evaluarea **conținutului total de carotenoide prin spectrometrie UV-Vis** subliniază faptul că sucul de roșii și suc de cătină sunt surse bogate de carotenoide.

Analiza UV-VIS a extractelor metanolice permis identificarea a 4 clase de compuși: lipide, acizi fenolici, flavonoide și quinone, iar din calculul de polifenoli totali se poate observa faptul că sucul de cătină este o sursă extrem de bogată în compuși fenolici, având o concentrație mai mare de 6 ori față de sucul de tomate.

Prin determinarea vâscozității s-a putut observa că emulsiile ce conțin suc de tomate (1A, 2A) au o vâscozitate redusă față de cele care conțin suc de cătină (1B, 2B), iar adaosul de 5% ulei de dovleac mărește semnificativ vâscozitatea probelor.

În urma evaluării morfologice ale microcapsulelor s-a putut observa că toate tipurile de microsferă 1A, 1B, 1C au formă sferică și dimensiuni între 850 și 900 μm, în timp ce microcapsulele 2A, 2B, 2C au dimensiune între 750 și 800 μm a învelișului și dimensiuni de 150-180 μm a nucleului reprezentat de uleiul de dovleac. În cazul probei 2A nucleul este foarte bine reprezentat și delimitat, iar în cazul probei 2B acesta nu se poate observa datorită cantităților mari de pigmenți din înveliș.

Concluzii

1. Pe baza amprentelor UV-VIS a extractelor cloroformice s-au identificat patru clase de compuși (lipide, acizi fenolici, flavonoide și carotenoide) și s-a calculat eficiența extracției a acestora și conținutul total de carotenoide care a dovedit faptul că cea mai bună extracție au avut-o probele individuale (suc de roșii sau suc de cătină) față de probele mixte.
2. Analiza spectrometrică UV-VIS a extractelor metanolice a permis identificarea a 4 clase de compuși: lipide, acizi fenolici, flavonoide și quinone, iar în urma calculului eficienței extracției se poate observa că lipidele și polifenolii au avut cel mai bun randament de extracție.
3. Analiza FT-IR a extractelor cloroformice s-au identificat 4 zone de absorbție pe intervalul 1000-3500 cm⁻¹, iar în cazul extractelor metanolice s-au identificat 3 zone de absorbție pe intervalul 1000-4000 cm⁻¹.
4. Determinarea vâscozității emulsiilor care conțin suc de tomate (1A, 2A) a avut o vâscozitate redusă față de cele care conțin suc de cătină (1B, 2B).
5. De asemenea a fost caracterizată forma și morfologia microsferelor și microcapsulelor (prin microscopie optică). Toate tipurile de microsferă/microcapsule au formă sferică și dimensiuni normale.

Rezultatele acestui studiu au fost publicate în:

CSERNATONI FLORINA, RALUCA POP, FLORINA ROMANCIUC, OANA POP, FLORINELA FETEA, FLORICU A RANGA, RAMONA BIANCA MO, CARMEN SOCACIU, 2015, Preparation and Comparative Characterization of Alginate-Made Microcapsules and Microspheres Containing Tomato, Seabuckthorn Juices and Pumpkin Oil, Bulletin USAMV Food Science and Technology 72(1), 56-64.

Capitolul 6. Caracterizarea și testarea stabilității microsferelor și microcapsulelor obținute din suc de cătină, suc de tomate și ulei de dovleac încorporate în alginat (Studiul 3)

Scopul acestui studiu a fost de a evalua componentele bioactive încorporate în microsfere și microcapsule și de a testa stabilitatea acestora în mediul gastric și intestinal simulat.

Materiale și metodă

Pentru determinarea compusilor bioactivi din fiecare tip de microcapsule/microsfere s-au făcut 2 tipuri de extracții (una metanolică și una cloroformică) după care extractele obținute au fost analizate prin tehnicile de spectrometrie UV-VIS și FT-IR. Pe baza amprentelor UV-VIS s-au calculat factorii de extracție, polifenoli totali (extracte metanolice) și conținutul total de carotenoide (extracte cloroformice).

Sucul gastric simulat a fost preparat prin adaosul de pepsină 3g/L (P7000, 1:10,000) în clorura de sodiu steril de concentrație (0.5%, w/v) și ajustarea pH-ului la 2.0 cu HCl concentrat sau NaOH. Sucul intestinal simulat s-a realizat prin adaosul de pancreatină 1g/L USP (P-1500) și săruri biliare 4,5% în clorura de sodiu steril de concentrație (0.5%, w/v) și ajustarea pH-ului la 8.0 cu HCl concentrat sau NaOH.

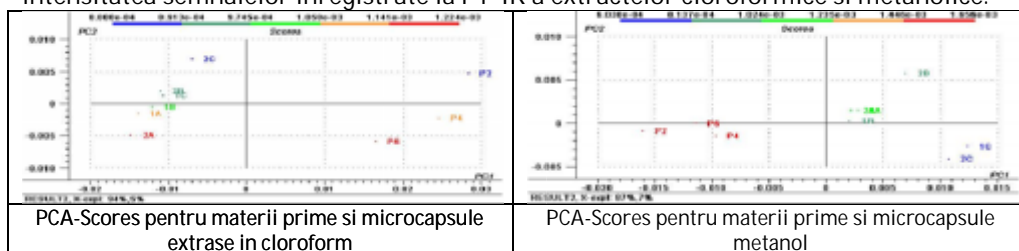
Probe de câte 2 g microcapsule (1A, 2A, 1B, 2B, 1C, 2C, 1C*, 2C*) au fost puse în câte 20 ml mediu gastric simulat și incubate la 37°C și ulterior agitate timp de 30 de minute după care microcapsulele au fost transferate în câte 20 ml de mediu intestinal simulat și incubat la 37°C și ulterior agitate timp de 2 ore.

Rezultate și discuții

În urma calculării factorului de extracție în cloroform a compusilor s-a observat faptul că acizii fenolici și carotenoidele au avut cel mai bun factor de extracție, iar flavonoidele cel mai scăzut. În urma determinării carotenoidelor totale s-a putut observa faptul că tomatele sunt surse foarte bogate în carotenoide și au avut un randament de extracție de 90% comparativ cu materiile prime.

Calculul de polifenoli totali din microcapsule a arătat că când extracția în mod similar materiilor prime s-au putut evalua peste 50% din totalul de polifenoli, iar restul rămânându-se în peletul rămas în urma centrifugării probelor.

Pentru a compara și evidenția deosebirile de amprentă spectroscopică FTIR a extractelor, s-a utilizat metoda "Principal component analysis" (PCA) fig.1. bazată pe intensitatea semnalelor înregistrate la FT-IR a extractelor cloroformice și metanolice.



În urma analizei PCA a extractelor cloroformice s-au identificat trei zone de separare, grupurile formate din: 1B, 1A, 2A și 1C, 2B, 2C situate în partea inferioară respectiv superioară a axei PC2. Cel de-al treilea grup reprezentat de P2, P4 și P6 este situat în extremitatea dreaptă a axei PC1 și diametral opus față de celelalte două grupe. Lungimile de undă care au influențat gruparea probelor sunt: 2700-2800cm⁻¹ precum și 2920 cm⁻¹ care corespunde benzilor de vibrație C-H, specifice CH₃ și CH₂ din lipide, caracteristic primelor 2 grupuri și din intervalul între 1600-1750 cm⁻¹ cu semnale majore la: 1743cm⁻¹ și 1745cm⁻¹, care corespunde benzilor de vibrație N-H (aminoacizi), aldehide, cetone și esteri dar și a acizilor grași și gliceride, caracteristic celui de-al treilea grup.

Lungimile de unda ale extractelor metanolice care influențează gruparea probelor (P2, P6, P4) situate de-a lungul axei PC1, în partea stânga sunt lungimile de undă cuprinse între 1020-1080 cm⁻¹ cu semnale majore la: 1055, 1072, 1074 și 1076 cm⁻¹, care corespund benzilor de vibrație C-O ale mono-, oligo- și carbohidraților. În continuare se pot identifica formarea a încă trei grupe, situate opus față de primul grup identificat, după cum urmează: grupul reprezentat de proba 2B aflat în partea superioară a axei PC2 și a axei PC1, la mijlocul cadranelui drept; grupul reprezentat de probele 1B, 1A și 2A situat aproape de centrul plotului și grupul reprezentat de probele 1C-2C plasat aproape diametral opus de primul grup identificat (P2P6P4) de-a lungul axei PC1, în partea dreaptă. Distribuția celor trei grupe de-a lungul celor 2 axe PC1 și PC2 a fost influențată în mare parte de lungimile de undă cuprinse între 1700-1732 cm⁻¹ caracteristice grupului 2B, care corespunde benzilor de vibrație N-H (aminoacizi), aldehide, cetone și esteri dar și a acizilor grași și gliceride și 3300-3460 cm⁻¹ cu semnale majore la: 3311, 3332, 3356, 3358, 3383, 3385 cm⁻¹, care corespunde benzilor de vibrație a grupării O-H (din apă, alcool sau compuși fenolici) caracteristic grupului 1C, 2C.

În urma evaluării stabilității microcapsulelor în mediul gastric și intestinal simulat se observă faptul că microcapsulele/microsferele nu se dezintegrează în mediul gastric simulat, doar se eliberează o parte din compuși, în schimb în mediul intestinal acestea se dezintegrează.

Analiza spectrometrică UV-VIS a extractelor în mediul gastric simulat a permis identificarea a două clase de compuși: lipide și acizi fenolici, iar în cazul mediului intestinal s-au identificat 3 clase de compuși, acizi fenolici, flavonoide și carotenoide.

Concluzii

1. Calculul de carotenoide toale a arătat faptul că atât catina cât și tomatele sunt surse bogate de carotenoide.
2. În urma calculului de polifenoli totali s-a observat că sucul de catina este o sursă extrem de bogată în compuși fenolici, având o concentrație mai mare de 6 ori față de sucul de tomate.
3. Amprenta FTIR a extractelor cloroformice a permis evidențierea a 4 zone de absorbție pe intervalul 1000-3500 cm⁻¹, iar în cazul extractelor metanolice 3 zone de absorbție pe intervalul 1000-4000 cm⁻¹.
4. Testarea stabilității microcapsulelor în mediul gastric și intestinal simulat a demonstrat că microcapsulele/microsferele nu se dezintegrează în mediul gastric simulat la pH acid dar eliberează o parte din compuși bioactivi, în schimb în mediul intestinal, la pH neutru, după 2 ore microcapsulele se dezintegrează complet cu excepția microcapsulelor de tomate.

Articol acceptat - în curs de publicare:

CSERNATONI FLORINA, RALUCA MARIA POP, FLORINA ROMACIUC, FLORINELA FETEA, OANA POP, CARMEN SOCACIU, 2015, Sea buckthorn juice, tomato juice and pumpkin oil microcapsules/ microspheres with health benefit on prostate disease – obtaining process, characterization and testing properties, Romanian Biotechnological Letters

Capitolul 7. Analiza comparativă UV-VIS a microcapsulelor / microsferelor cu sau fără coating de chitosan: rata de eliberare a compușilor bioactivi în timp și în diferiți solvenți – (Studiul 4)

Scopul acestui studiu a fost de a determina rata de eliberare a compușilor bioactivi din microsfere și microcapsule, în timp și în diferiți solvenți, în funcție de tipul microcapsulelor și a coatingului cu chitosan.

Materiale și metodă

Pentru obținerea emulsiilor s-au cântărit probele de suc apoi s-au pus într-un pahar Berzelius pe un agitator magnetic și s-au încălzit la 30°C, apoi s-a adăugat alginatul și au fost luate la agitator o dată pe jumătate până s-a dizolvat complet alginatul de sodiu. Pentru metodele de microsferă s-a adăugat ulterior uleiul de dovleac, s-a ultraturaxat proba 5 minute până s-a obținut o emulsie, iar pentru microcapsule uleiul reprezintă nucleul microcapsulei. Apoi s-a preparat baia de întărire din apă distilată la care s-a adăugat 2%CaCl₂, iar pentru o parte din microcapsulele obținute din probele 1C și 2C s-a făcut un coating de chitosan 0.1% adăugat în baia de întărire, probele fiind notate 1C* și 2C*.

Rata de eliberare a compusilor s-a făcut în 3 tipuri de solvenți: metanol acidulat, metanol cu pH de 7,5 și cloroform. Acestea au fost incubate la 37°C și au avut o agitare timp de 1h, 2h, 4h și 6h. Pentru incubare și agitare s-a utilizat un incubator Heidolph Unimax Incubator 1000. După incubare probele au fost filtrate și analizate cu un fotospectrometru UV-Vis JASCO V530.

Rezultate și discuții

În urma evaluării ratei de eliberare a compusilor în timp și diferiți solvenți se poate observa că în cazul extracției în metanol acidulat și cloroform există diferențe semnificative a ratei de eliberare a compusilor în timp, dar și între probele cu și fără coating de chitosan. În cazul extracției în metanol cu pH=7,5 nu există diferențe semnificative a extracției în timp doar în ceea ce privește rata de eliberare a compusilor din probele cu și fără chitosan.

Deasemenea se poate observa faptul că rata de extracție din probele fără coating de chitosan este mai mare decât în cazul probelor cu coating de chitosan, ceea ce demonstrează că coating-ul de chitosan poate fi folosit pentru obținerea de produse cu eliberare controlată.

Concluzii

1. S-au obținut microcapsule și microsferă prin tehnica microincapsulării în alginat urmat de coating cu chitosan
2. Pentru evaluarea compusilor bioactivi din cele două tipuri de microcapsule/microsferă, s-au efectuat două tipuri de extracții (în metanol și cloroform).
3. Analiza spectrometrică UV-VIS a extractelor metanolice a permis identificarea a 4 clase de compuși: lipide, acizi fenolici, flavonoide și quinone, iar în urma calculului eficienței extracției se poate observa că lipidele și polifenolii au avut cel mai bun randament de extracție comparativ cu flavonoidele și quinonele.
4. Rata de extracție din probele fără coating de chitosan este mai mare decât în cazul probelor cu coating de chitosan, ceea ce demonstrează că coating-ul de chitosan poate fi folosit pentru obținerea de produse cu eliberare controlată.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

Contribuțiile originale și inovative ale prezentei teze de doctorat pot fi sintetizate prin următoarele rezultate semnificative:

1. Aplicarea tehnologiilor inovative de obținere de microsferă și microcapsule cu și fără coating, utilizând metode naturale (alginat și chitosan) care încorporează și stabilizează compuși bioactivi benefice pentru sănătate
2. Realizarea unei formule originale PROMEN ce include plante ingredient cu funcționalitate dirijată spre prevenirea cancerului de prostată.

3. Utilizarea de tehnici analitice performante de tipul cromatografiei lichide, cuplate cu spectrometria de masă, a spectrometriei UV-Vis și FTIR pentru a determina calitativ, amprentă și cantitativ, ponderea compușilor bioactivi din extractele de plante și microcapsule/microsfere.
4. Valorificarea plantelor indigene (catina, tomate, ulei de dovleac) prin soluții tehnologice inovative de obținere de microcapsule și microsfele cu eliberare controlată, cu aplicații importante în alimentație și prevenirea bolilor metabolice.