

**Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați**  
**Școala Doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești**



# **TEZĂ DE DOCTORAT**

## **REZUMAT**

**CERCETĂRI BIOTEHNOLOGICE DE OBȚINERE A  
UNUI PRODUS CU VALOARE ADĂUGATĂ PE  
BAZĂ DE EXTRACTE VEGETALE ȘI PROTEINE**

**Doctorand,**  
**IULIANA-MARIA ENACHE**

**Conducător științific,**  
**Prof.univ.dr.ing. CAMELIA VIZIREANU**

**Seria I.1: BIOTEHNOLOGII, Nr. 14**  
**GALAȚI**  
**2021**

**Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați**  
**Școala Doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești**



**TEZĂ DE DOCTORAT**  
**REZUMAT**

**CERCETĂRI BIOTEHNOLOGICE DE OBȚINERE A**  
**UNUI PRODUS CU VALOARE ADĂUGATĂ PE**  
**BAZĂ DE EXTRACTE VEGETALE ȘI PROTEINE**

**Doctorand,**  
**IULIANA-MARIA ENACHE**

**Președinte comisie**

Prof. univ. dr.ing. GABRIELA ELENA BAHRIM  
Universitatea „Dunărea de Jos” Galați

**Conducător științific,**

Prof. univ. dr. ing. CAMELIA VIZIREANU  
Universitatea „Dunărea de Jos” Galați

**Referenți:**

1. Prof. univ. dr. ing. SEVASTIȚA MUSTE

Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca

2. Prof. univ. dr. ing. MONA ELENA POPA

Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară București

3. Prof.univ. dr. ing.habil. NICOLETA STĂNCIUC

Universitatea „Dunărea de Jos” Galați

**Seria I.1: BIOTEHNOLOGII, Nr. 14**  
**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

Denumire	Pag. teză	Pag. rezumat
Introducere	10	6
<b>OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT</b>	16	9
<b>STUDIUL DOCUMENTAR</b>	17	10
<b>CAPITOLUL 1. Aspecte botanice, etimologice, morfologice și compoziționale ale <i>Cornus mas</i></b>	18	10
1.1. Încadrarea taxonomică a <i>Cornus mas</i>	18	10
1.3. Factori favorabili pentru <i>Cornus mas</i> în România	18	10
1.4. Caracteristici generale, biologice, etimologice și morfologice ale <i>Cornus mas</i>	25	13
1.6. Pretabilitatea utilizării <i>Cornus mas</i> de către om	29	14
1.7. Bibliografie	29	14
<b>CONTRIBUȚII PROPRII</b>	47	17
<b>CAPITOLUL 4. Caracterizarea fitochimică a compușilor biologic activi din fructele de corn prin extracție, caracterizare și identificare în vederea profilării unor compuși cu funcție țintă</b>	48	17
4.1. Introducere	48	17
4.2. Obiectivele studiului	50	17
4.3. Materiale și metode	51	17
4.15. Rezultate și discuții	55	18
4.15.1. Extracția și caracterizarea compușilor biologic activi din fructele de <i>Cornus mas</i>	55	18
4.15.2. Identificarea și purificarea compușilor bioactivi din extractul de <i>Cornus mas</i>	57	18
4.15.3. Analiza colorimetrică a extractului de fructe de <i>Cornus mas</i>	58	19
4.15.4. Conținutul de acid ascorbic a extractului fructelor de corn	58	19
4.16. Concluzii parțiale	59	19
4.17. Bibliografie	59	20
<b>CAPITOLUL 5. Strategii de valorificare a compușilor biologic activi prin co-microîncapsulare în matrici biopolimerice complexe</b>	65	21
5.2. Obiectivele studiului	67	21
5.3. Materiale și metode	67	21
5.6. Co-microîncapsularea prin liofilizare a compușilor biologic activi din fructele de corn în diferite matrici	68	22
5.18. Rezultate și discuții	75	24
5.18.1. Profilul chimic al pudrelor co-microîncapsulate	75	24
5.18.2. Eficiența de încapsulare a antocianilor din pudrele co-	76	25

microîncapsulate		
5.18.3. Digestibilitatea <i>in vitro</i> a pudrelor co-microîncapsulate	76	25
5.18.4. Activitatea biologică a pudrelor co-microîncapsulate	77	26
5.18.5. Analiza colorimetrică a pudrelor co-microîncapsulate	78	27
5.18.6. Structura și morfologia pudrelor co-microîncapsulate	78	28
5.18.7. Testarea potențialului citotoxic al pudrelor co-microîncapsulate	80	29
5.18.8. Citocompatibilitatea <i>in vitro</i> a pudrelor co-microîncapsulate	81	31
5.18.9. Stabilitatea în timp a pudrelor co-microîncapsulate	82	32
5.18.10. Viabilitatea bacteriilor lactice	84	35
5.19. Concluzii parțiale	85	35
5.20. Bibliografie	86	36
<b>CAPITOLUL 6. Strategii de valorificare a bioingredientelor cu funcții multiple în dezvoltarea de produse alimentare cu valoare adăugată</b>	90	38
6.2. Obiectivele studiului	90	38
6.3. Materiale și metode	91	38
6.6. Scheme tehnologice de obținere a unor variante experimentale de produse cu valoare adăugată	91	38
6.9. Rezultate și discuții	93	40
6.9.1. Profilul chimic al produselor realizate	93	40
6.9.2. Stabilitatea la depozitare a produsului alimentar la 3 și la 7 de zile	94	40
6.9.3. Viabilitatea bacteriilor lactice	95	41
6.10. Concluzii parțiale	96	42
6.11. Bibliografie	96	43
<b>CAPITOLUL 7. Concluzii finale</b>	98	44
<b>CAPITOLUL 8. Contribuții personale și perspective de continuare a studiilor</b>	101	47
<b>CAPITOLUL 9. Lista publicațiilor</b>	102	48

**Cuvinte cheie:** fructe de corn, co-microîncapsulare, compuși biologic activi, bacterii lactice, bioingrediente, produse cu valoarea adăugată

## Introducere

Accesul la alimente optimizate nutrițional, sigure și sănătoase reprezintă un drept fundamental al omului promulgat prin diverse acte normative, atât în România, cât și în întreaga lume (**Food Safety, WHO**). Cu toate că alimentația din societatea contemporană are la bază principii și valori pe baza reglementărilor europene în domeniu, încă mai există numeroase curențe în alimentația omului. Industria alimentară are nevoie de cercetare, dezvoltare, inovare și mai ales transfer tehnologic pentru a dezvolta alimentele viitorului, bogate în fitonutrienți, optimizate nutrițional, sigure și sănătoase, care să asigure omului un nivel adecvat de protecție.

Pentru a veni în sprijinul specialiștilor din industria alimentară, în cadrul tezei de doctorat intitulată ***Cercetări biotehnologice de obținere a unui produs cu valoare adăugată pe bază de extracte vegetale și proteine*** sunt aduse contribuții importante la dezvoltarea conceptului de *sănătate prin alimente*, teza de doctorat evidențind valoarea biologic activă a fructului de corn pentru organismul uman și dezvoltă variante biotehnologice experimentale pentru obținerea de bioingrediente cu funcții multiple. În cadrul tezei de doctorat a fost studiat profilul fitochimic și proprietățile biologice active ale extractelor din fructe de corn de pădure și au fost dezvoltate bioingrediente microîncapsulate, cu funcții multiple, cum ar fi probiotice, antioxidante, antidiabetice, antiproliferative și de potențial înlocuitor al coloranților în industria alimentară, farmaceutică și cosmeceutică.

### Motivația tezei de doctorat

La baza realizării acestei teze de doctorat stă ipoteza conform căreia în România, consumul de fructe de pădure este foarte redus, supoziție demonstrată prin aplicarea pe un eșantion de 71 de indivizi a unui *Chestionar privind consumul de fructe de corn*, prezentat ca **Anexa 3** a tezei de doctorat. Potrivit acestuia, 79,7% dintre respondenți consideră ca fructele de corn pot fi consumate doar în stare proaspătă. Această ipoteză se aplică pentru majoritatea fructelor, considerate perisabile, dar și faptului că în general, fructul de corn nu este suficient promovat în România.

Cauzele apariției acestui fenomen sunt multiple, printre acestea numărându-se: perisabilitatea fructelor, insuficienta cunoaștere a efectelor pentru sănătate sau a perioadei optime de recoltare, imposibilitatea de a le procura pe tot parcursul anului, incapacitatea organismelor abilitate de a le promova corespunzător.

Aceste ipoteze au stat la baza alegerii tematicii tezei de doctorat intitulată ***„Cercetări biotehnologice de obținere a unui produs cu valoare adăugată pe bază de extracte vegetale și proteine”***, care își dorește să stabilească un profil compozițional și biologic activ avansat al fructului de corn și să valorifice potențialul pe care îl prezintă prin dezvoltarea unor biotehnologii de obținere a unor bioingrediente, cu funcții multiple. Teza are o abordare bottom-top, parcurgând etape de cercetare fundamentală, dezvoltare experimentală și cercetare aplicativă, care în final au condus la valorificarea potențialului bioactiv al fructului de corn prin dezvoltarea unui produs alimentar funcțional, pe bază de

fructe de corn și proteine din zer îmbogățit cu bacterii lactice cu efect antioxidant, probiotic și antiproliferativ.

În plus, un obiectiv secundar al tezei a constat în crearea unei baze de date științifice care să contribuie la promovarea fructului de corn în rândul populației din România.

Teza este structurată în două părți și 10 capitole, după cum urmează:

**I. Studiul documentar** este alcătuit din trei capitole, structurate astfel:

**Capitolul 1**, intitulat *Aspecte botanice, etimologice, morfologice și compoziționale ale Cornus mas* caracterizează fructul de corn din punct de vedere morfo-funcțional, evidențiind atât valoarea sa nutritivă, cât și importanța economică și asupra sănătății. De asemenea, sunt evidențiate informații referitoare la distribuția plantei la nivel național și internațional.

**Capitolul 2**, denumit *Stadiul actual al cunoașterii în corelație cu necesitatea dezvoltării de noi alimente cu valoare adăugată* aduce în prim-plan elemente definitorii ale cercetărilor efectuate în cadrul acestei lucrări, prin caracterizarea compușilor biologic activi (fenoli: flavonoide și antociani) ai fructului de corn, precizând totodată și efectele curative ale acestora. Mai mult decât atât, se evidențiază și aspecte teoretice privind activitatea antioxidantă a fructului, ca proprietate comună a compușilor bioactivi amintiți.

**Capitolul 3**, intitulat *Aspecte teoretice privind microîncapsularea compușilor biologic activi* vizează clasificarea tehnicilor de încapsulare cunoscute, caracteristicile fizico-chimice ale microcapsulelor, liofilizarea ca procedeu de încapsulare a compușilor biologic activi, precum și aplicații practice ale microîncapsulării în biotehnologie și în industria alimentară.

**II. Contribuții proprii** este structurată în 7 capitole după cum urmează:

**Capitolul 4**, intitulat *Caracterizarea fitochimică a compușilor biologic activi din fructele de corn prin extracție, caracterizare și identificare în vederea profilării unor compuși cu funcție țintă* evidențiază profilul fitochimic al extractelor hidroalcoolice din fructul de corn, precum și identificarea și cuantificarea compușilor țintă (antociani) cu ajutorul cromatografiei de înaltă performanță.

**Capitolul 5**, intitulat *Strategii de valorificare a compușilor biologic activi prin co-microîncapsulare în matrici biopolimerice complexe* stabilește o serie de strategii de valorificare a antocianilor din extractele de fructe de corn și a bacteriilor lactice cu potențial probiotic prin co-microîncapsulare în matrici biopolimerice, prin coacervare complexă și liofilizare, precum și testarea funcționalității multiple a bioproduselor obținute. Biopudrele obținute au fost testate ca bioingrediente funcționale, stabile în timp, cu efect probiotic, antioxidant și antiproliferativ.

**Capitolul 6**, denumit *Strategii de valorificare a bioingredientelor cu funcții multiple în dezvoltarea de produse alimentare cu valoare adăugată* propune strategii de dezvoltarea a unor alimente funcționale, care exploatează potențialul biologic activ al bioingredientelor co-microîncapsulate, cu efect probiotic, antioxidant și antiproliferativ, pretabile a fi consumate de diverse categorii de consumatori, datorită stabilității în timp și a aportului de compuși biologic activi din compoziția sa.

**Capitolul 7**, denumit *Concluzii finale* subliniază concluziile principale derivate din teza de doctorat, evidențiind gradul de îndeplinire a obiectivelor propuse și oferă o imagine globală asupra temei studiate, punând în valoare principalele rezultate ale tezei.

**Capitolul 8**, intitulat *Contribuții personale și perspective de continuare a studiilor* aduce în prim-plan cele mai relevante elemente de noutate elaborate în această lucrare. De asemenea, sunt precizate perspective de continuare a studiilor după finalizarea stagiului doctoral.

**Capitolul 9**, intitulat *Lista publicațiilor* prezintă diseminarea rezultatelor cercetării efectuate pe parcursul celor patru ani de stagiul doctoral: 3 articole științifice publicate în reviste cotate ISI, 1 articol științific publicat în revistă indexată BDI, 2 articole științifice aflate în elaborare/publicare, participarea la 1 conferință internațională în străinătate și 9 conferințe internaționale în țară, 1 proiect de mobilitate pentru cercetători cu deplasare în Burgos, Spania (*director de proiect*) și 1 lucrare premiată la o conferință internațională.

**Capitolul 10**, intitulat *Anexe* cuprinde *Lista figurilor* (Anexa 1), *Lista tabelor* (Anexa 2) utilizate în această lucrare, *Chestionarul privind consumul de fructe de corn* (Anexa 3) cu ajutorul căruia s-a stabilit ipoteza de cercetare pentru teza de doctorat și *Habitatele din România favorabile pentru Cornus mas* (Anexa 4) care evidențiază cele 38 de areale din flora spontană a țării noastre benefice pentru plantarea cornului de pădure, întrucât planta se dezvoltă armonios în aceste zone.

Teza de doctorat este alcătuită din 121 pagini, structurată astfel: studiul documentar reprezintă 25 %, iar partea experimentală 75 % și are 18 tabele și 19 figuri.

Efectuarea experimentelor realizate în această teză de doctorat a fost posibilă datorită infrastructurii moderne a *Centrului Integrat de Cercetare, Expertiză și Transfer Tehnologic* (BioAliment-TehnIA) <https://www.unicer.ugal.ro/index.php/en/about-tehnia> și a *Centrului Român pentru Modelarea Sistemelor de Recirculante de Acvacultură* (MoRas) (<https://www.unicer.ugal.ro/index.php/ro/prezentare-moras>) din cadrul Facultății Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați.

Teza s-a realizat sub coordonarea științifică a comisiei de îndrumare cu următoarea componență:

- ☐ Prof. univ. dr. ing. Camelia VIZIREANU - Conducător de doctorat
- ☐ Prof.univ.dr.ing.habil. Nicoleta STĂNCIUC – Coordonator studii de analiză spectrofotometrică și co-microîncapsulare
- ☐ Prof. univ. dr. chim. Rodica Mihaela DINICĂ – Coordonator studii de extracție
- ☐ Conf. univ. dr. biol. Vasilica BARBU – Coordonator studii de analiza morfologică.

## Bibliografie

1. Food Safety, WHO, <https://www.who.int/health-topics/food-safety/> (accesat la data de 26.05. 2020)



## OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT

Obiectivele științifice ale tezei de doctorat au fost stabilite ținând cont de ipotezele inițiale, precum și de versatilitatea și efectele curative ale acestui fruct. Așadar, la baza acestei teze de doctorat se află următoarele obiective științifice:

**O1.** Descrierea și caracterizarea cornului de pădure din punct de vedere etimologic, biologic, morfologic și al importanței economice.

**O2.** Profilarea fitochimică a compușilor biologic activi din fructele de corn prin extracție, caracterizare și identificare în vederea identificării unor compuși cu funcție țintă, cum ar fi antocianii cu activitate antioxidantă ridicată, antiinflamatorie, anti-diabetică etc.

**O3.** Dezvoltarea unor strategii de valorificare a compușilor biologic activi prin co-microîncapsulare în matrici biopolimerice complexe, formate din proteine, polimeri și bacterii lactice cu scopul obținerii unor biopudre stabile, cu rol de bioingrediente cu funcții multiple.

**O4.** Demonstrarea potențialului antioxidant, antiproliferativ, anti-diabetic și probiotic al biopudrelor co-microîncapsulate.

**O5.** Strategii de valorificare a bioingredientelor cu funcții multiple în dezvoltarea de produse alimentare cu valoare adăugată.

# STUDIU DOCUMENTAR

## CAPITOLUL 1. Aspecte botanice, etimologice, morfologice și compoziționale ale *Cornus mas*

### 1.1 Introducere

Fructele cornului de pădure reprezintă o sursă importantă de substanțe nutritive benefice pentru organism. Acestea fac parte din categoria fructelor de pădure existente în flora spontană a României. Dată fiind importanța acestora pentru om, dar și preabilitatea ei în diverse domenii, se impune necesitatea studierii lor aprofundate. În cele ce urmează sunt evidențiate elemente definitorii ale fructelor de corn, respectiv: încadrarea taxonomică, distribuția geografică în lume și în România, preabilitatea culturii de corn pe teritoriul țării noastre, caracteristici generale, biologice, etimologice și morfologice, importanța economică și domeniile de utilizare.

### 1.3. Distribuția geografică a *Cornus mas* în lume și în România

În România, *Cornus mas* se regăsește în 38 de areale. În țara noastră, cornul de pădure se pretează a fi cultivat în condițiile sintetizate în lucrarea ”Habitatele din Romania” (Doniță și colab., 2005). Aceasta prezintă habitatele din țara noastră, codificate, răspândirea, altitudinea, temperatura, precipitațiile medii anuale, relieful, tipurile de roci, tipul de sol, structura fitocenozelor și compoziția floristică a habitatului unde se poate întâni *Cornus mas*. Toate detaliile despre condițiile optime de creștere și dezvoltare ale cornului de pădure în România se regăsesc în Anexa 3: Habitatele din România favorabile pentru *Cornus mas* și sunt sintetizate în tabelul 1.1.

**Tabel 1.1.** Sinteza habitatelor din România favorabile pentru *Cornus mas*  
(Doniță și colab., 2005) (Enache și colab., 2021)

R3115	R3129	R4114	R4126	R4133	R4137	R4147	R4158	R4159	R4164
R3122	R3130	R4120	R4127	R4134	R4140	R4149	R4153	R4160	R4218
R3126	R4111	R4121	R4129	R4135	R4141	R4150	R4154	R4162	
R3128	R4113	R4124	R4132	R4136	R4142	R4151	R4156	R4163	

Schimbările climatice actuale identificate atât la nivel global cât și la nivel zonal au ca impact major schimbări la nivelul vegetației. Din categoria posibilelor modificări apărute în urma acestor schimbări climatice amintim: migrarea la altitudini mai mari a unor specii, uscarea unor specii forestiere ca urmare a perioadelor tot mai îndelungate de secetă, creșterea sensibilităților speciilor forestiere după vătămări produse de zăpadă, doborâturi de vânt, secetă dar și o creștere a sensibilității stațiunilor forestiere uscate datorită uscăciunii, a eroziunii solurilor. Apare astfel, necesitatea cunoașterii acestor areale sensibile la nivelul cărora anumite specii vor reduce suprafața ocupată dar și arealele favorabile în care există posibilitatea extinderii acestora ca urmare a schimbărilor climatice cu implicații directe în managementul forestier.

Tehnologia GIS permite realizarea unei baze de date geospațiale aplicând tehnici moderne de interpolare și corelare spațială ce cuprinde cei mai relevanți indicatori ecologici ce influențează în mod pozitiv, dar și negativ favorabilitatea speciei la nivelul teritoriului României ([Șimonca și colab., 2019](#)), ([Roșca și colab., 2017](#)). Analizând factori climatici precum precipitațiile medii multianuale, temperatura medie anuală, caracteristici ale reliefului (altitudinea), caracteristici de sol (tipul de sol și geologia) se realizează hărți tematice și o bază de date raster ce permite, prin aplicarea tehnicilor geospațiale de modelare, încadrarea acestora într-un model cantitativ GIS pe clase de favorabilitate pentru *Cornus mas* prin realizarea unei colecții de hărți tematice pe clase de favorabilitate la nivel național pentru specia *Cornus mas*.

Implementarea tehnologiei GIS se bazează pe analiza spațială ținând cont de obiectivele urmărite având ca fundament bazele de date digitale manageriate prin intermediul funcțiilor de analiză spațială a programelor geoinformaționale ([Roșca și colab., 2017](#)), ([Șimonca și colab., 2019](#)).

În cazul de față o primă etapă în determinarea factorilor favorabili pentru *Cornus mas* a constat în achiziția bazelor de date în format digital (achiziție în mod direct pe baza submodelelor de analiză spațială pentru tipul de sol și altitudinea reliefului, clasele geologice și achiziție pe baza implementării funcțiilor de interpolare pentru factorii climatici).

Aplicarea analizei spațiale propriu-zise pe baza bonității calitative bazată pe expert knowledge presupune acordarea claselor specifice de favorabilitate respectiv restrictivitate pentru specia studiată la nivelul întregului teritoriu al României și presupune ca etapă finală, absolut obligatorie pentru modelele GIS, etapa de validare a modelului (prin compararea directă cu realitatea din teren) în vederea determinării gradului de predictibilitate a modelului realizat și eventuala calibrare a parametrilor acestuia ([Roșca și colab., 2019](#)).

Validarea rezultatelor a fost realizată prin compararea rezultatelor obținute din aplicarea modelului realizat în cadrul acestui studiu cu punctele de frecvență raportate în cadrul Atlasului european al speciilor forestiere din Europa, 2016 ([San-Miguel-Ayanz și colab., 2016](#)).

Ținând cont de preferințele speciei *Cornus mas* a fost realizată o bază de date cu valorile multianuale ale precipitațiilor de la stațiile meteorologice din România și utilizând ecuațiile de corelație ale precipitațiilor cu altitudinea, utilizând tehnici de analiză spațială GIS a fost obținut gridul precipitațiilor medii multianuale ce a fost convertit ținând cont de favorabilitate respectiv restrictivitatea pentru specia studiată.

Factori favorabili pentru *Cornus mas* dependent de: precipitațiile medii anuale, temperatura aerului, altitudinea reliefului, tipul de sol, geologie ([Enache și colab., 2021](#)).

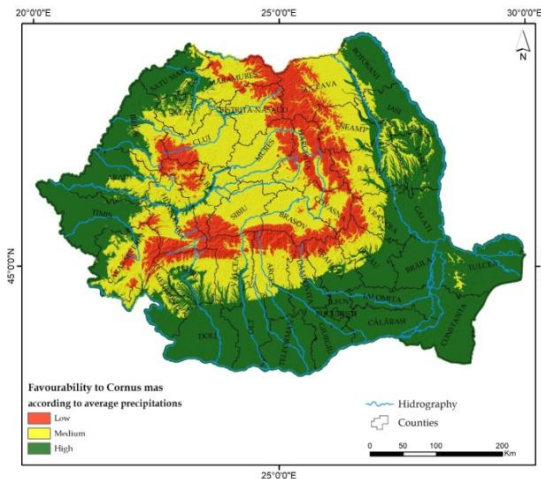


Figura 1.2. Precipitațiile medii anuale

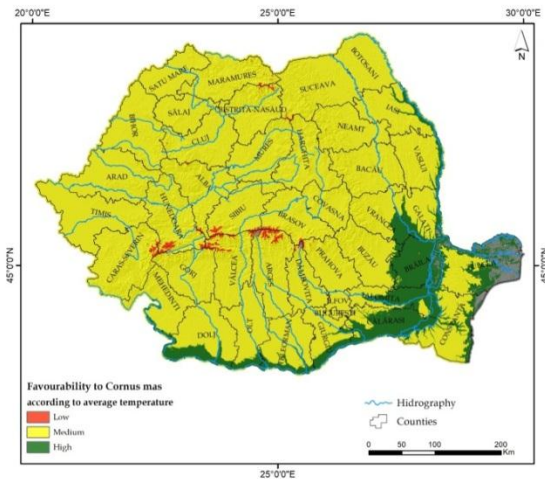


Figura 1.3. Temperatura aerului

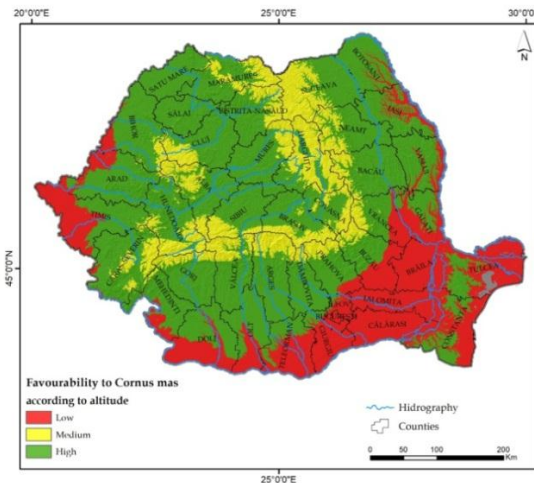


Figura 1.4. Altitudinea reliefului

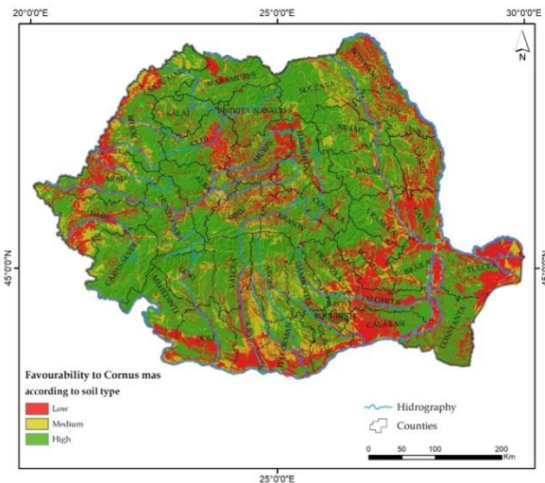


Figura 1.5. Tipul de sol

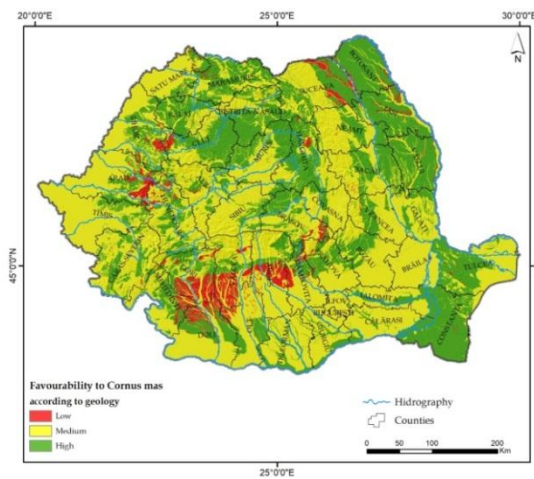
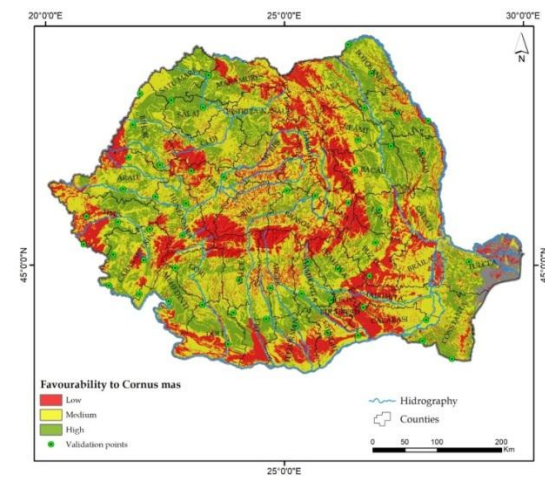


Figura 1.6. Geologie

Figura 1.7. Factori favorabili pentru *Cornus mas*

Validarea modelului a fost realizată utilizând rezultatul final reclasificat obținut ca urmare a implementării analizei spațiale (factori favorabili sau restrictivi la *Cornus mas*) și o bază de date vector de tip poligon obținută ca urmare a achiziției directe reprezentând locațiile geografice ale zonelor în care specia depășește valori de 25% din consistența

habitatelor în care se dezvoltă conform Atlasului speciilor din Europa ([San-Miguel-Ayanz și colab., 2016](#)). A fost astfel identificată o rată de validare de 83,5 % a rezultatelor finale ceea ce reflectă un grad ridicat de sensibilitate a modelului aplicat (28 de locații sigure în teren în care a fost identificată specia de *Cornus mas* sunt situate în zone încadrate în clasa de favorabile la nivel ridicat și 19 în clasa de favorabile la nivel mediu).

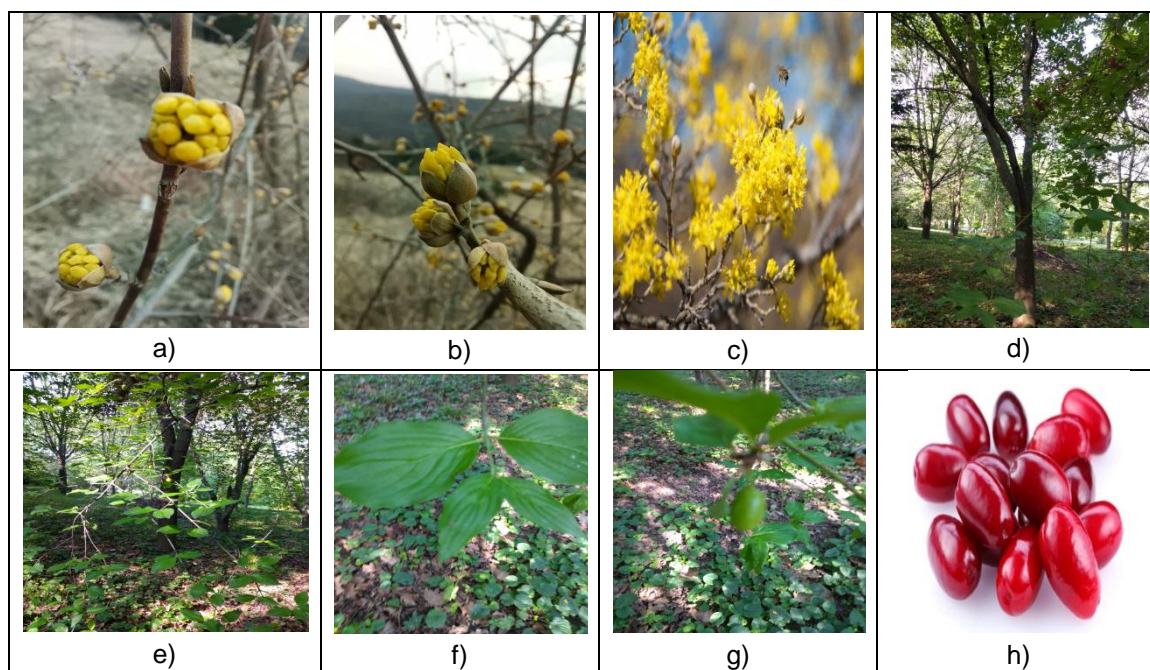
#### 1.4. Caracteristici generale, biologice, etimologice și morfologice ale *Cornus mas*

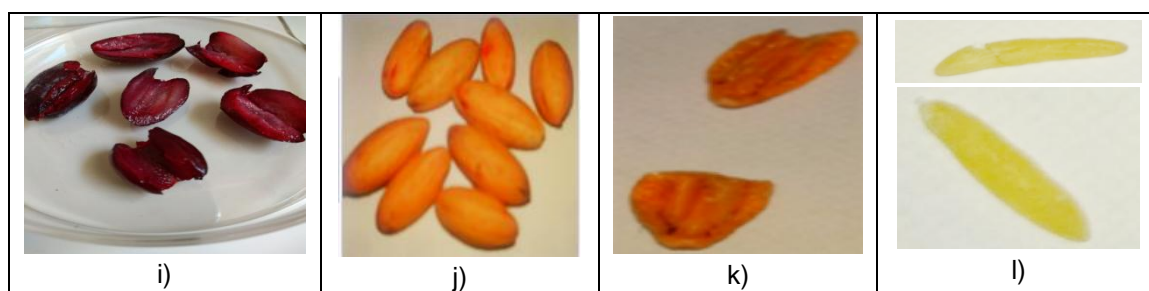
Genul *Cornus* cuprinde specii de arbuști distribuite pe scară largă în Europa de sud și Europa centrală, Asia de sud-vest, America (nord, est, sud, vest, și centru) și Africa de Est ([Eyde, 1988](#)). Două specii din acest gen sunt endemice în America de Sud și o specie în Africa tropicală ([Fan și Xiang, 2001](#)), ([Xiang și colab., 2006](#)).

*Cornus mas* se găsește în România sub denumirea de corn (sau corn european ([Stankovic și colab., 2014](#))), fiind un arbust sau arbore cu o înălțime de 2-60 metri. Se regăsește frecvent în zona pădurilor de stejar, etajul fagului, precum și în păduri și tufărișuri. Este o specie eutrofă, xeromez-mezotermă, subtemperată care preferă locurile calcaroase. Se utilizează cu precădere în industria alimentară sau ca element ornamental (parcuri și grădini), fiind o specie pontic-mediteraneană. Are o durată de viață mare, iar diametrul scoarței poate ajunge până la 40 cm.

Fructele sunt comestibile, de tip drupă elipsoidală, roșie, rar gălbuie, lucioasă, cu o lungime de 10-12 mm și grosă de cca 5 mm, la vârf cu discul nectarifer și stilul arcuit. Acestea sunt acrișoare și astringente; prezintă endocarp (sâmbure) cilindric-elipsoid și semințe ([Săvulescu, 1958](#)), ([Ciocârlan, 2009](#)). Greutatea medie a fructelor variază între 5 și 8 g, iar sâmburele reprezintă 7,5-11% din greutatea totală a fructelor.

În cele ce urmează sunt redată câteva imagini sugestive ale plantei *Cornus mas* (scoarță, frunze, fructe, sâmbure și semințe, întregi sau în secțiune).





**Figura 1.8.** Caracteristici morfologice ale *Cornus mas*: a) floarea (1); b) floarea (2); c) planta înflorită; d) scoarța; e) lăstari; f) frunze; g) fruct crud, întreg, h) fruct copt întreg, i) fruct copt în secțiune, j) sămbure întreg, k) sămbure în secțiune, l) semințe (sursa: arhiva personală)

### 1.6. Pretabilitatea utilizării *Cornus mas* de către om

Data fiind abundența de substanțe nutritive din *Cornus mas*, de-a lungul timpului această plantă a fost folosită cu succes atât în industria alimentară și a băuturilor, cât și în medicina alternativă sau a prelucrării lemnului. O sinteză a acestora este redată în tabelul 1.4.

**Tabel 1.4.** Domeniile de utilizare ale *Cornus mas*

Domeniul de utilizare	Scop/ Produs obținut	Referințe
Industria alimentară și a băuturilor	murate ca măslinile, gem, suc, sirop, vin,	(Sochor și colab., 2014) (Dinda și colab., 2016)
Medicina homeopată	cancer, diabet, afecțiuni gastro-intestinale, afecțiuni ale rinichilor și tractului urinar etc.	(Mikaili și colab., 2013), (Dinda și colab., 2016), (Ahmadipour și colab., 2017),
Protecția mediului	bio-combustibil	(Akalin și colab., 2012), (Norhuda I, 2009)
Industria cosmetică	produse cosmetice (emulsii)	(Nizioł-Łukaszewska și colab., 2018)
Industria farmaceutică	produse farmaceutice (cremă)	(Brindza și colab., 2009),
Industria prelucrării lemnului	mobilă, Instrumente muzicale - scoarța	(Brindza și colab., 2009)
Alte întrebuințări	bijuterii – sămburi	(Brindza și colab., 2009)

### 1.7. Bibliografie

- Ahmadipour S.H., Vakili M., Ahmadipour S. *Phytotherapy for children's nocturnal enuresis*. Journal of Medical and Biomedical Sciences, 6 (3), (2017), 23–29. <https://doi.org/10.4314/jmbs.v6i3.4>
- Akalin M.K., Tekin K., Karagöz S. (2012). *Hydrothermal liquefaction of cornelian cherry stones for bio-oil production*. Bioresource Technology, 110, 682–687. [doi:10.1016/j.biortech.2012.01.1](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.1)
- Brindza P., Klimentko S.V., Grigorieva O., Brindza J., Tóth D. *Biological and commercial characteristics of cornelian cherry (Cornus mas L.) population in the gemer region of Slovakia*. Acta Horticulturae, 818, (2009), 85–94, <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.818.11>
- Ciocârlan V., *Flora Ilustrată a României, Pteridophyta et Spermatophyta*. Editura Ceres, Ed. III, (2009), 1141 pagini

5. Dinda B., Kyriakopoulos A.M., Dinda S., Zoumpourlis V., Thomaidis N.S., Velegraki A., Markopoulos C., Dinda M. *Cornus mas L. (cornelian cherry), an important European and Asian traditional food and medicine: Ethnomedicine, phytochemistry and pharmacology for its commercial utilization in drug industry*. Journal of Ethnopharmacology, 193, (2016), 670–690. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.09.042>
6. Doniță N., Popescu A., Păucă-Comănescu M., Mihăilescu S., Iovu A.B. (ed.), *Habitatele din România* Editura Tehnică Silvică, (2005), ISBN: 973-96001-4-X.
7. Enache I.M., Coman G., Roșca S., Vizireanu C., Mihalcea L., *Optimization conventional extraction of bioactive compounds from Cornus mas by RSM and determination of favourability factors by GIS technique*, Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 49 (2), Article 12307, 2021, 1-20 [DOI: 10.15832/nbha\[12307\]](https://doi.org/10.15832/nbha[12307])
8. Fan C., Xiang Q.Y. *Phylogenetic relationships within Cornus (Cornaceae) based on 26S rDNA sequences*. American Journal of Botany, 88, (2001), 1131–1138. <https://doi.org/10.2307/2657096>
9. Mikaili P., Koohirostamkolaei M., Babaeimarzangou S.S., Aghajanshakeri S., Moloudizargari M., Gamchi N.S., Toloomoghaddam S. *Therapeutic uses and pharmacological effects of Cornus mas: A review*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 35 (35), (2013), 1732–1738.
10. Nizioł-Łukaszewska Z., Wasilewski T., Bujak T., Gawel-Beben K., Osika P., Czerwonka D. *Cornus mas L. extract as a multifunctional material for manufacturing cosmetic emulsions*. Chinese Journal of Natural Medicines, 16 (4), (2018), 284–292. [https://doi.org/doi:10.1016/s1875-5364\(18\)30058-x](https://doi.org/doi:10.1016/s1875-5364(18)30058-x)
11. Norhuda I, Kamaruzaman J. *Supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) as a clean technology for palm kernel oil extraction*. Journal of Biochemical Technology, 1 (3), (2009), 75–78, ISSN: 0974-2328
12. Roșca S., Bilașco Ș., Păcurar I., Colniță D., Fodorean I., Vescan I., Petrea D., Păcurar H. *Quantitative evaluation of forest favourability using GIS database in a hill area in the Transylvania Depression, Romania*. Geomatics, Natural Hazards and Risk, 8 (2), (2017), 1914–1934. <https://doi.org/10.1080/19475705.2017.1401012>
13. Roșca S., Șimonca V., Bilasco S., Vescan I., Fodorean I., Petrea D. *Assessment of favourability and spatio-temporal dynamics of pinusmugo in the romanian carpathians using GIS technology and landsat images*. Sustainability, 11 (13), (2019), 30. <https://doi.org/DOI: 10.3390/su11133678>
14. San-Miguel-Ayanz J., de Rigo D., Caudullo G., Houston Durrant T., Mauri A. (Eds.), *European Atlas of Forest Tree Species*. Publication Office of the European Union, Luxembourg. (2016), ISBN: 978-92-79-52833-0. [DOI: 10.2788/038466](https://doi.org/10.2788/038466)
15. Săvulescu T. *Flora Republicii Socialiste Române*. VI. 1958, Editura Academiei Republicii Populare Române
16. Sochor J., Jurikova T., Ercisli S., Mlcek J., Baron M., Balla S., Yilmaz S. O., Necas T. *Characterization of cornelian cherry (Cornus mas L.) genotypes - genetic resources for food production in Czech Republic*. Genetika, 46 (3), (2014). 915–924. <https://doi.org/10.2298/GENSR1403915S>

17. Stankovic M.S., Zia-Ul-Haq M., Bojovic B.M., Topuzovic M.D. *Total phenolics, flavonoid content and antioxidant power of leaf, flower and fruits from cornelian cherry (Cornus mas L.)*. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 20, (2014),358–363.

18. Șimonca V., Roșca S., Colișar A., Rebreaan F., Bilașco S. *Favourable and restrictive factors for quercus pubescens in the transylvanian basin, evaluated by GIS techniques*. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 47 (4), (2019), 1299–1307. <https://doi.org/10.15835/nbha47411624>

19. Xiang Q.Y., Thomas, D.T., Zhang W., Manchester S.R., Murrell Z. *Species level phylogeny of the genus Cornus (Cornaceae) based on molecular and morphological evidence - Implications for taxonomy and Tertiary intercontinental migration*. Taxon, 55 (1), (2006). 9–30. <https://doi.org/10.2307/25065525>



# CONTRIBUȚII PROPRII

## CAPITOLUL 4. Caracterizarea fitochimică a compușilor biologic activi din fructele de corn prin extracție, caracterizare și identificare în vederea profilării unor compuși cu funcție țintă

### 4.1. Aspecte introductive

Un studiu realizat în 2016 și condus de [Dinda \(2016\)](#) oferă o prezentare generală a celor 101 compuși fitochimici din diferite segmente vegetale ale plantei de *Cornus mas* L., clasificați în: antociani (10), catechine (4), flavonoide (20), acizi fenolici și taninuri (11), monoterpenoide (9), triterpenoide (1), iridoide (5), carotenoide (10), vitamine (4), carbohidrați (3), acizi organici (8), acizi grași (6), și hidrocarburi (10).

### 4.2. Obiectivele studiului

Obiectivele științifice ale **Capitolului 4**: intitulat *Caracterizarea fitochimică a compușilor biologic activi din fructele de corn prin extracție, caracterizare și identificare în vederea profilării unor compuși cu funcție țintă* sunt:

- O1. Extracția și cuantificarea compușilor biologic activi din fructul de corn (polifenoli totali, flavonoide totale și antociani monomerici totali) și a activității antioxidante.
- O2. Identificarea antocianilor din fructele de corn cu ajutorul cromatografiei lichide de înaltă performanță.
- O3. Realizarea analizei colorimetrice a extractului de fructe de corn.
- O4. Determinarea conținutului de acid ascorbic în extractul de fructe de corn.

### 4.3. Materiale și metode

În vederea caracterizării acestora s-a realizat profilul fitochimic al extractului concentrat în termeni de: conținut de polifenoli totali (TPC) cu metoda și reactivul Folin-Ciocalteu, conținut de flavonoide totale (TFC) cu ajutorul metodei colorimetrice pe bază de  $\text{AlCl}_3$ , conținut de antociani totali (TAC) prin metoda pH-ului diferențial și capacitatea antioxidantă a acestuia (TAA) utilizând metoda și reactivul DPPD. De asemenea, în acest capitol s-au identificat antocianii din fructele de corn cu ajutorul cromatografiei lichide de înaltă performanță (HPLC). Pentru estimarea conținutului de acid ascorbic a fost utilizat un test bazat pe permanganat de potasiu ( $\text{KMnO}_4$ ), ca agent oxidant. Analiza colorimetrică s-a realizat cu ajutorul metodei  $\text{CIEL}^*a^*b^*$ . Reactivii utilizați au fost achiziționați de la Sigma Aldrich (Steinheim, Germania).

## 4.15. REZULTATE ȘI DISCUȚII

### 4.15.1. Extracția și caracterizarea compușilor biologic activi din fructele de *Cornus mas*

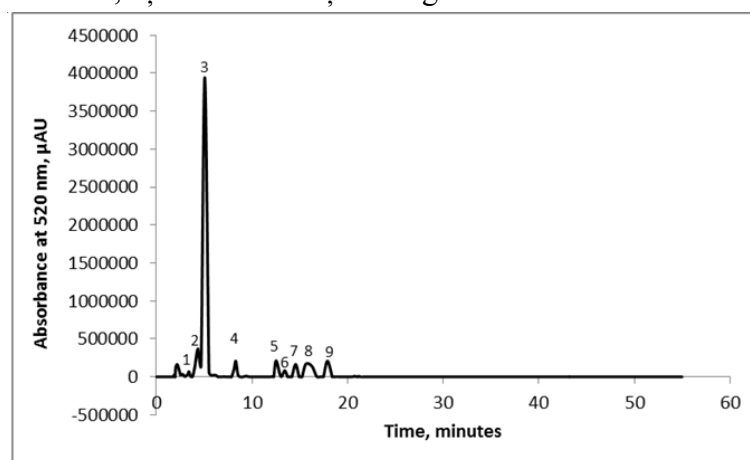
Din punct de vedere fitochimic, extractul etanolic obținut prin extracție asistată cu ultrasunete (40°C, 100 kHz, 100W, 30 min) se poate caracteriza astfel: activitate antioxidantă (TAA) 178,43±4,34 mMol Trolox/g s.u.; conținut total de polifenoli (TPC) 27,00±0,46 mg acid galic /g s.u.; conținut total de flavonoide (TFC) 14,31±1,69 mg catehină/g s.u.; conținut total de antociani (TAC) 45,09±0,53 mg C3R/g s.u.

Conform informațiilor prezentate anterior, se evidențiază un conținut ridicat de polifenoli, antociani și flavonoide, care conduc la obținerea unei activități antioxidante crescute. De-a lungul timpului au fost efectuate diverse studii privind extracția compușilor bioactivi și a activității antioxidante asupra fructelor de corn, variind solventul sau metoda de extracție, precum și raportul dintre solvenți.

Compararea datelor cu literatura de specialitate este dificilă, datorită tehnicilor diferite de extracție utilizate, precum și modalității de exprimare a rezultatelor.

### 4.15.2. Identificarea și purificarea compușilor bioactivi din extractul de *Cornus mas*

Profilul cromatografic al extractului de fructe de corn evidențiază prezența a nouă compuși, dar doar cinci dintre aceștia au putut fi comparați cu standardele existente și cu literatura de specialitate, așa cum reiese și din figura 4.2.



**Figura 4.2.** Profilul cromatografic al extractului de fructe de corn

Peak 1 - delphinidin-3-galactozid; Peak 2 - cianidin-3-glucozid; Peak 3 - cianinidin-3-rutinozid; Peak 4 - pelargonidin-3-glucozid; Peak 5 - pelargonidin-3-rutinozid; și Peaksurile 6-9 - compuși neidentificați

Cei cinci compuși identificați au fost: delphinidin-3-galactozid (1,03%), cianidin-3-glucozid (5,42%), cianidin-3-rutinozid (72,77%), pelargonidin-3-glucozid (3,05%) și pelargonidin-3-rutinozid (2,42%). Cei doi antociani din extractul de fructe de corn au fost cianidin-3-rutinoside cu un conținut de 241,21 mg/100 g s.u. și cianidin-3-glucozid (5,42%) cu un conținut de 22,62 mg/100 g s.u. Conținutul de delphinidin-3-galactozid, pelargonidin-3-glucozid și pelargonidin-3-rutinozid a fost de 4,31 mg/100 g s.u., 12,73 mg/100 g s.u. și, respectiv, 9,12 mg/100 g s.u. Dumitrașcu și colab., (2019) a analizat conținutul antocianilor de fructele de corn și a evidențiat prezența a șase compuși, din care

cel mai mare conținut a fost înregistrat pentru cianidin-3-rutinozid. [Kucharska și colab., \(2015\)](#) a evaluat antocianii din 26 de soiuri diferite de corn de pădure și a raportat existența a cinci antociani majori, respectiv: delphinidin, cianidin, glicozid și pelargonidin. ([Enache și colab., 2020b](#)).

#### 4.15.3. Analiza colorimetrică a extractului de fructe de *Cornus mas*

Valorile pentru extract au fost  $L^*$  de  $81,87 \pm 2,63$ ,  $a^*$  de  $18,08 \pm 3,89$  și  $b^*$  de  $4,25 \pm 0,15$ , acestea fiind corelate valorile pentru  $c=18,59 \pm 3,81$ ,  $h=0,24 \pm 0,05$ ,  $\Delta E=84,02 \pm 1,78$ . După cum se poate observa, valoarea ridicată a\* indică o culoare roșiatică predominantă a probei, în timp ce valoarea b\* sugerează o nuanță de galben. Se poate aprecia că nuanța pronunțată de roșu a extractului de fructe de corn este corelată cu conținutul de antociani prezenți, în special de antocianul majoritar, respectiv cianidin-3-rutinozid, care este recunoscut pentru intensitatea de roșu pe care o imprimă surselor în care se regăsește.

#### 4.15.4. Conținutul de acid ascorbic a fructelor de corn

Cantitatea de acid ascorbic din fructul de corn pentru extractul din fructe de corn (30,82 mg/100 g s.u.). Conform [Regulamentului CE 1169/2011](#), Valoarea Nutrițională de Referință, cantitatea de vitamina C pentru o persoană adultă este de 80 mg/ 100 g.

#### 4.16. Concluzii parțiale

În cadrul acestui capitolul, s-au stabilit o serie de obiective referitoare în principal la profilarea fitochimică a fructului de corn, în special în ceea ce privește conținutul total de polifenoli, flavonoide și antociani monomerici totali, identificarea antocianilor din fructele de corn cu ajutorul cromatografiei lichide de înaltă performanță, corelarea conținutului de antociani cu analiza colorimetrică a extractului, precum și determinarea conținutului de acid ascorbic din diferite variante de fructe, în stare proaspătă, liofilizată sau uscată.

Rezultatele obținute au permis elaborarea următoarelor concluzii parțiale:

- A. Metoda de extracție aplicată, care a constat într-o combinație de extracție hidroalcoolică solid-lichid și extracție asistată cu ultrasunete, în condiții nenedurante au permis obținerea unui extract concentrat cu un conținut ridicat de polifenoli de  $27,00 \pm 0,46$  mg acid galic /g s.u., flavonoide de  $14,31 \pm 1,69$  mg catehină/g s.u., antociani monomerici de  $45,09 \pm 0,53$  mg C3R/g s.u.;
- B. Concentrația ridicată de compuși biologic activi a condus la determinarea unei activități antioxidante (DDPH) remarcabile de circa 179 mMol Trolox/g s.u.;
- C. Cromatografia lichidă de înaltă performanță a permis evidențierea principalilor compuși biologic activi țintă din studiu, respectiv predominanța cianidin-3-rutinozidului ( $241,21$  mg/100 g s.u.) și cianidin-3-glucozidului ( $22,62$  mg/100 g s.u.), în timp ce conținutul de delphinidin-3-galactozid, pelargonidin-3-glucozid și pelargonidin-3-rutinozid a fost de  $4,31$  mg/100 g s.u.,  $12,73$  mg/100 g s.u. și, respectiv,  $9,12$  mg/100 g s.u.

- D. Analiza colorimetrică a confirmat conținutul ridicat de antociani, în special cianidin-3-rutinozid, responsabili de culoarea roșie (valoarea  $a^*$  de  $18,08 \pm 3,89$ ).
- E. Toate cele trei variante de fructe de corn (proaspătă, uscate și liofilizate) au prezentat un conținut ridicat de vitamina C, comparabil cu datele prezentate în literatura de specialitate;
- F. Așa cum era de așteptat, conținutul de vitamina C a variat astfel: fruct proaspăt < fructul liofilizat < extractul din fructe de corn;
- G. Se remarcă conținutul de vitamina C cel mai mare din extractul obținut, de circa 31 mg/100 g.

#### 4.17. Bibliografie

1. Dinda B., Kyriakopoulos A.M., Dinda S., Zoumpourlis V., Thomaidis N.S., Velegraki A., Markopoulos C., Dinda M. *Cornus mas L. (cornelian cherry), an important European and Asian traditional food and medicine: Ethnomedicine, phytochemistry and pharmacology for its commercial utilization in drug industry*. Journal of Ethnopharmacology, 193, (2016), 670–690. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.09.042>
2. Dumitrașcu, L., Enachi E., Stănciuc N., Aprodu I. *Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from cornelian cherry fruits using response surface methodology*. CYTA - Journal of Food, 17 (1), (2019), 814–823. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1659418>
3. Enache I.M., Vasile A.M., Enachi E., Barbu V., Stănciuc N., Vizireanu C. *Co-microencapsulation of anthocyanins from cornelian cherry fruits and lactic acid bacteria in biopolymeric matrices by freeze-drying: evidences on functional properties and applications in food*. Polymers, 12 (906), (2020), 1–12. <https://doi.org/10.3390/polym12040906> (b)
4. Kucharska A.Z., Szumny A., Sokól-Letowska A., Piórecki N., Klymenko S.V. *Iridoids and anthocyanins in cornelian cherry (Cornus mas L.) cultivars*. Journal of Food Composition and Analysis, 40, (2015), 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.12.016>
5. Ghidul privind informarea consumatorilor cu privire la produsele alimentare, Regulamentul CE 1169/2011, EuroCommerce & FoodDrinkEurope, Septembrie 2013 (Versiunea a treia), Avenue des Arts 43-1040 Brussels – Belgia – Tel. +32 2 514 11 11 – Fax. +32 2 511 29 05 info@fooddrinkeurope.eu – [www.fooddrinkeurope.eu](http://www.fooddrinkeurope.eu) (pagina 27)

## CAPITOLUL 5. Strategii de valorificare a compușilor biologic activi prin co-microîncapsulare în matrici biopolimerice complexe

### 5.2. Obiectivele studiului

În cadrul Capitolului 5 denumit *Strategii de valorificare a compușilor biologic activi prin co-microîncapsulare în matrici biopolimerice complexe*, s-au stabilit următoarele obiective științifice:

O1. Co-microîncapsularea compușilor bioactivi din extractul din fructele de corn în două matrici biopolimerice complexe utilizând liofilizarea ca biotehnologie inovatoare.

O2. Testarea pudrelor co-microîncapsulate din punct de vedere al concentrației de compuși biologic activi, eficiența de încapsulare a antocianilor, activitatea biologică, digestibilitatea *in vitro* a antocianilor, analiza colorimetrică, analiza structurală și morfologică a biopudrelor, testarea citocompatibilității și a potențialului antiproliferativ, stabilitatea în timp a compușilor bioactivi și viabilitatea bacteriilor lactice.

O3. Demonstrarea potențialului antioxidant, antiproliferativ, antidiabetic și probiotic al pudrelor co-microîncapsulate.

### 5.3. Materiale și metode

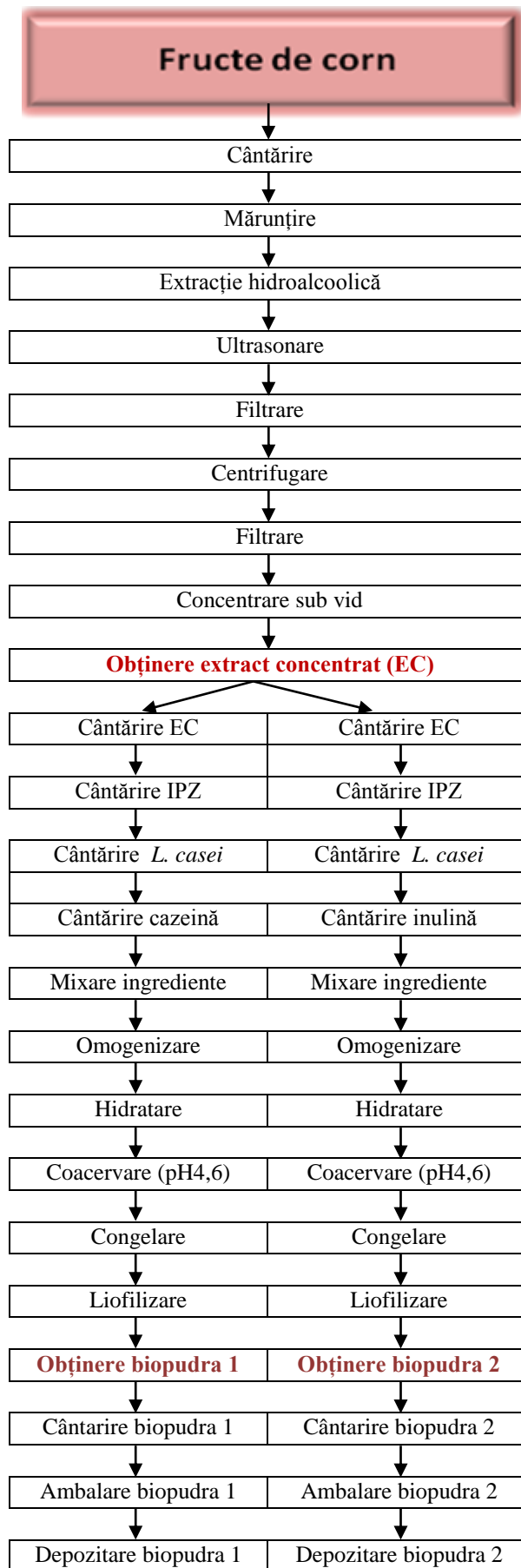
Metodele de lucru din acest studiu, acestea sunt:

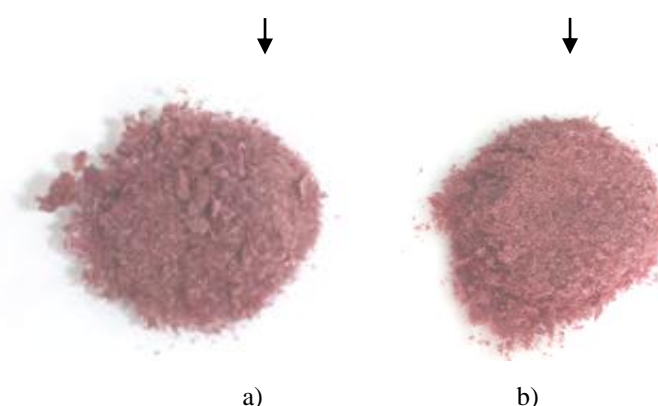
- ✓ co-microîncapsularea compușilor bioactivi din extractul de fructe de corn prin liofilizare,
- ✓ profilul chimic al biopudrelor prin determinarea conținutului de polifenoli, antociani, flavonoide și a activității antioxidante,
- ✓ eficiența de încapsulare a antocianilor din cele două biopudre prin diferența dintre conținutul de antociani totali și antociani de suprafață,
- ✓ activitatea biologică a biopudrelor prin stabilirea activității inhibitorie a  $\alpha$ -glucosidazei și a  $\alpha$ -amilazei,
- ✓ digestibilitatea *in vitro* a antocianilor din cele două biopudre utilizând condiții simulate de digestie gastrică și intestinală,
- ✓ analiza colorimetrică a biopudrelor utilizând sistemul CIEL\*a\*b\*,
- ✓ structura și morfologia microparticulelor utilizând microscopia de scanare cu laser confocal,
- ✓ testarea potențialului citotoxic a biopudrelor co-microîncapsulate utilizând linia celulară HT-29 (ATCC),
- ✓ testarea efectului anti-proliferativ a biopudrelor co-microîncapsulate utilizând linia celulară L929 clonată NCTC (ECACC)
- ✓ stabilitatea în timp a compușilor bioactivi prin determinarea conținutului de polifenoli, antociani, flavonoide și a activității antioxidante la 21 și 90 de zile de depozitare în condiții controlate
- ✓ viabilitatea bacteriilor lactice din cele două biopudre prin cultivarea pe plăcile cu MRS-agar.

## 5.6. Co-microîncapsularea prin liofilizare a compușilor biologic activi din fructele de corn în diferite matrici

Pentru co-microîncapsularea extractului din fructe de corn și bacterii lactice cu potențial probiotic (*Lactobacillus casei*) s-au utilizat două combinații de materiale biopolimerice, și anume izolat proteic din zer (IPZ) și cazeină și IPZ și inulină.

Au fost aplicate următoarele scheme de co-microîncapsulare: IPZ:Cazeină:extract concentrat de fructe de corn și 1g *L. casei* =1:1:2,5 (m/m); respectiv IPZ:Inulină:extract concentrat de fructe de corn și 1 g *L. casei* =1:1:2,5 (m/m). Schema tehnologică de obținere a celor două variante de pudre co-microîncapsulate este redată în figura 5.1





**Figura 5.1.** Schema tehnologică de obținere a biopudrelor co-microîncapsulate  
(a - biopudra 1, b - biopudra 2)

## 5.18. REZULTATE ȘI DISCUȚII

### 5.18.1. Profilul chimic al pudrelor co-microîncapsulate

O caracteristică importantă a fructelor de corn este abundența compușilor biologic activi, precum și capacitatea antioxidantă ridicată a acestor fructe. Profilul chimic al biopudrelor co-microîncapsulate înglobează trei dintre compușii bioactivi existenți în pulpa fructului, respectiv polifenoli, flavonoide și antociani. Dată fiind proprietatea comună a acestora, respectiv activitatea antioxidantă, s-a decis cuantificarea acestora conform tabelului 5.1.

**Tabel 5.1.** Profilul chimic al pudrelor co-microîncapsulate

Compus analizat	Biopudra 1	Biopudra 2
Activitatea antioxidantă (mMol TE/g s.u.)	50,05±0,94 <sup>a</sup>	47,62±1,43 <sup>b</sup>
Conținut de polifenoli (mg GAE/g s.u.)	9,67±0,12 <sup>a</sup>	9,79±0,15 <sup>a</sup>
Conținut de flavonoide (mg CE/g s.u.)	5,59±0,51 <sup>a</sup>	5,94±0,24 <sup>a</sup>
Conținut de antociani (mg C3R/g s.u.)	32,14±0,97 <sup>a</sup>	32,29±0,26 <sup>a</sup>

Pentru fiecare compus fitochimic testat și fiecare tip de biopudră studiată, valorile care se află pe același rând care nu au aceleași litere mici sunt diferite statistic la  $p < 0,05$  pe baza metodei Tukey și a intervalului de încredere de 95%.

Din Tabelul 5.1. se poate observa că nu există diferențe semnificative între profilul fitochimic global al celor două biopudre, cu excepția activității antioxidante. [Vasile și colab., \(2020\)](#) a co-microencapsulat antociani din fasole neagră și *Lactobacillus casei* în proteine din izolate proteice din zer, inulină și chitosan prin liofilizare, sugerând un conținut de compuși bioactivi de  $1,65 \pm 0,13$  mg C3G/g s.u. pentru TAC,  $21,64 \pm 0,98$  mg GAE/g s.u. pentru polifenoli și  $157,22 \pm 4,13$  mMol/g s.u. pentru activitate antioxidantă.



### 5.18.2. Eficiența de încapsulare a antocianilor din pudrele co-microîncapsulate

Ulterior finalizării procesului de liofilizare, eficiența de încapsulare a antocianilor (%) a variat între  $77,97 \pm 0,57\%$  (IPZ:Cazeină:*L. casei*) și  $79,03 \pm 0,72\%$  (IPZ:Inulină:*L. casei*). Oancea și colab., (2018) a microîncapsulat antocianii din coaja de cireșe în izolat proteic din zer și a raportat o eficiență de încapsulare de  $70,30 \pm 2,20\%$ , în timp ce Tao și colab., (2017) a sugerat că eficiența încapsulării a antocianilor din afine în diferite raporturi de IPZ, guma de salcâm, maltodextrină și  $\beta$ -ciclodextrină a fost de 82%.

După 90 de zile de stocare la 4 °C, la întuneric, eficiența încapsulării antocianilor a fost de  $58,05 \pm 0,61\%$  pentru IPZ:Cazeină:*L. casei* și  $66,00 \pm 0,89\%$  pentru IPZ:Inulină:*L. casei*.

### 5.18.3. Digestibilitatea *in vitro* a pudrelor co-microîncapsulate

Testarea digestibilității *in vitro* a pudrelor a antocianilor din pudrele co-microîncapsulate este redată în tabelul 5.2.

**Tabel 5.2.** Digestibilitatea *in vitro* a antocianilor din pudrele co-microîncapsulate

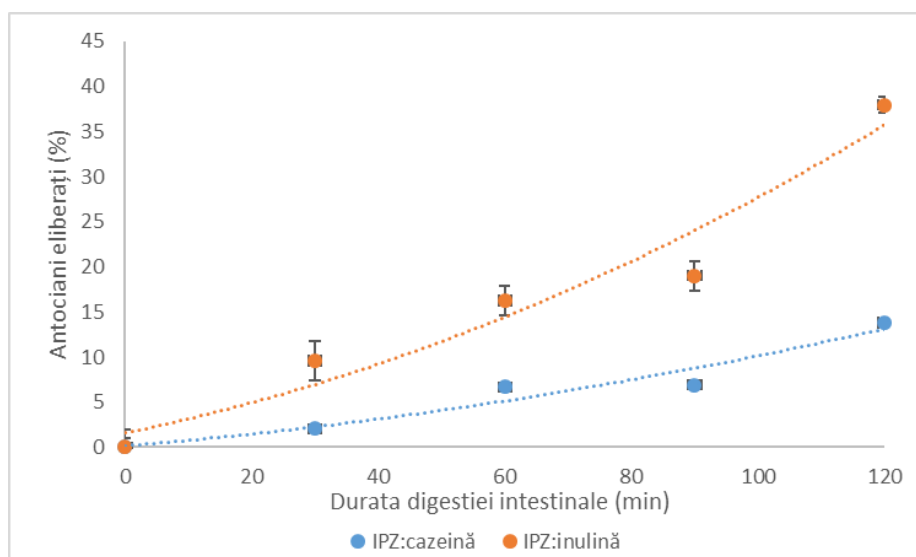
Timp	Biopudra 1	Biopudra 2
SGS (mg C3R/g s.u.) – T0	$8,00 \pm 0,51^a$	$8,44 \pm 0,51^b$
SGS (mg C3R/g s.u.) – T30	$8,30 \pm 0,66^a$	$8,49 \pm 0,58^b$
SGS (mg C3R/g s.u.) – T60	$8,49 \pm 0,57^a$	$9,00 \pm 0,58^b$
SGS (mg C3R/g s.u.) – T90	$8,54 \pm 0,54^a$	$9,04 \pm 0,66^b$
SGS (mg C3R/g s.u.) – T120	$8,70 \pm 0,43^a$	$9,04 \pm 0,81^b$
SIS (mg C3R/g s.u.) – T0	$15,49 \pm 0,65^a$	$11,50 \pm 0,51^b$
SIS (mg C3R/g s.u.) – T30	$15,80 \pm 0,81^a$	$12,59 \pm 0,87^b$
SIS (mg C3R/g s.u.) – T60	$16,51 \pm 0,93^a$	$13,37 \pm 0,42^b$
SIS (mg C3R/g s.u.) – T90	$16,83 \pm 0,87^a$	$13,68 \pm 0,45^b$
SIS (mg C3R/g s.u.) – T120	$17,61 \pm 0,87^a$	$15,85 \pm 0,48^b$

Pentru fiecare compus fitochimic testat și fiecare timp de stocare (T0, T30, T60, T90, T120 de minute), valorile care se află pe același rând care nu au aceleași litere mici sunt diferite statistic la  $p < 0,05$  pe baza metodei Tukey și a intervalului de încredere de 95%.

Din datele prezentate în Tabelul 5.2., se poate observa că există diferențe semnificate ( $p < 0,05$ ) în ceea ce privește conținutul de antociani eliberați în timpul digestiei gastrice între cele două biopudre, însă nu există diferențe semnificative ( $p > 0,05$ ) în ceea ce privește influența timpului de digestie gastrică, ceea ce denotă că ambele matrici de co-microîncapsulare au prezentat eficiență ridicată în protecția compușilor antocianici în SGS.

În SIS are loc eliberarea controlată a compușilor antocianici, pentru ambele biopudre co-microîncapsulate. Amestecul de IPZ:cazeină a fost mai puțin eficient în eliberarea antocianilor, astfel încât la sfârșitul etapei de digestie intestinală, aproximativ 14% din antocianii prezenți în microcapsule au fost eliberați. Comparativ, matricea

IPZ:inulină a permis eliberarea a aproximativ 38% din conținutul de antociani monomerici, aspect care poate fi corelat cu o capacitate mai mare de absorbția a acestora (Figura 5.2).



**Figura 5.2.** Eliberarea antocianilor din cele două biopudre co-microîncapsulate în sucul intestinal simulat

Prin urmare, se poate afirma că ambele variante de materialele încapsulante utilizate au avut un rol protector față de acțiunea sucului gastric, însă matricea IPZ:inulină este mai eficientă în absorbția antocianilor în intestinul subțire. [González și colab. \(2020\)](#) a raportat că antocianii dintr-o pudră încapsulată pe bază de extract de frunze de măsline în maltodextrină și inulină au fost parțial degradate în condiții gastrice și intestinale. Aceste constatări indică faptul că instabilitatea antocianilor în timpul digestiei gastrointestinale trebuie luată în considerare la estimarea bioaccesibilității și biodisponibilității antocianilor din pulberile co-microîncapsulate. Studii suplimentare despre digestia *in vivo* a antocianilor în diferite matrici alimentare sunt necesare pentru a determina efectele reale asupra sănătății ale antocianilor atunci când sunt consumate.

#### 5.18.4. Activitatea biologică a pudrelor co-microîncapsulate

Gestionarea eficientă a diabetului zaharat, în special a tipului II non-insulino-dependent, vine într-un context în care acesta devine epidemie la adulți și copii, ducând la afecțiuni grave, cum ar fi insuficiența renală, atacul de cord, orbirea și amputarea membrelor inferioare ([OMS, 2020](#)). În al doilea rând, administrarea inhibitorilor enzimelor sintetice, cum ar fi acarboze, sulfoniluree, biguanide, glinide, metformină și orlistat implică mai multe efecte secundare ([Kunyanga și colab., 2012](#)). Prin urmare, este necesar să se dezvolte noi formule pentru inhibitorii naturali ai enzimelor digestive ai amidonului, cum ar fi  $\alpha$ -amilază și  $\alpha$ -glucozidază, prevenind astfel creșterea excesivă a nivelului de glucoză din sânge.

**Tabel 5.3.** Activitatea biologică a pudrelor co-microîncapsulate

Variante	$\alpha$ -amilază	$\alpha$ -glucozidază	TPC (mg GAE/g s.u.)
<b>Biopudra 1</b>	61,61±0,06	89,91±0,01	9,67±0,12
<b>Biopudra 2</b>	79,27±0,07	88,87±0,01	9,79±0,15

În acest studiu, biopudrele co-microencapsulate au fost testate ca o posibilă formulă inhibitoră pentru un efect antidiabetic la o concentrație de 1 mg/ml. Pulberea a prezentat un efect inhibitor mai ridicat împotriva  $\alpha$ -glucosidazei de 89,91±0,01% comparativ cu  $\alpha$ -amilază, cu un efect inhibitor de 61,61±0,06%. Prin urmare, pulberea co-microencapsulată a fost mai eficientă împotriva  $\alpha$ -amilazei și mai puțin eficientă la  $\alpha$ -glucozidază. [Costamagna și colab., \(2016\)](#) a raportat că inhibarea simultană a ambelor enzime ar duce la fermentarea bacteriană anormală în colon datorită prezenței carbohidraților nedigerabili. S-a raportat că alte plante, multe dintre ele utilizate în mod tradițional pentru controlul diabetului zaharat sau hiperglicemiei, exercită o inhibare puternică a  $\alpha$ -glucozidazei și un efect moderat sau neglijabil asupra activității  $\alpha$ -amilază ([Ranilla și colab., 2010](#)).

#### 5.18.5. Analiza colorimetrică a pudrelor co-microîncapsulate

Culoarea reprezintă una dintre cele mai importante proprietăți organoleptice care stau la baza cuantificării prospețimii alimentelor. Tabelul 5.4 prezintă o analiză completă a pudrelor co-microîncapsulate din punct de vedere colorimetric.

**Tabel 5.4.** Analiza colorimetrică a pudrelor co-microîncapsulate

Variante	L	a*	b*	c*	h*	$\Delta E$
<b>Biopudra 1</b>	37.17 ±0.24 <sup>a</sup>	21.45 ±0.18 <sup>a</sup>	6.67 ±0.01 <sup>a</sup>	22,47 ±0,17 <sup>a</sup>	0,30 ±0,00 <sup>a</sup>	43,43±0,29 <sup>a</sup>
<b>Biopudra 2</b>	35.35 ±0.06 <sup>b</sup>	21.30 ±0.12 <sup>a</sup>	6.00 ± 0.02 <sup>b</sup>	22,13 ±0,12 <sup>a</sup>	0,27±0,00 <sup>b</sup>	41,71 ±0,11 <sup>b</sup>

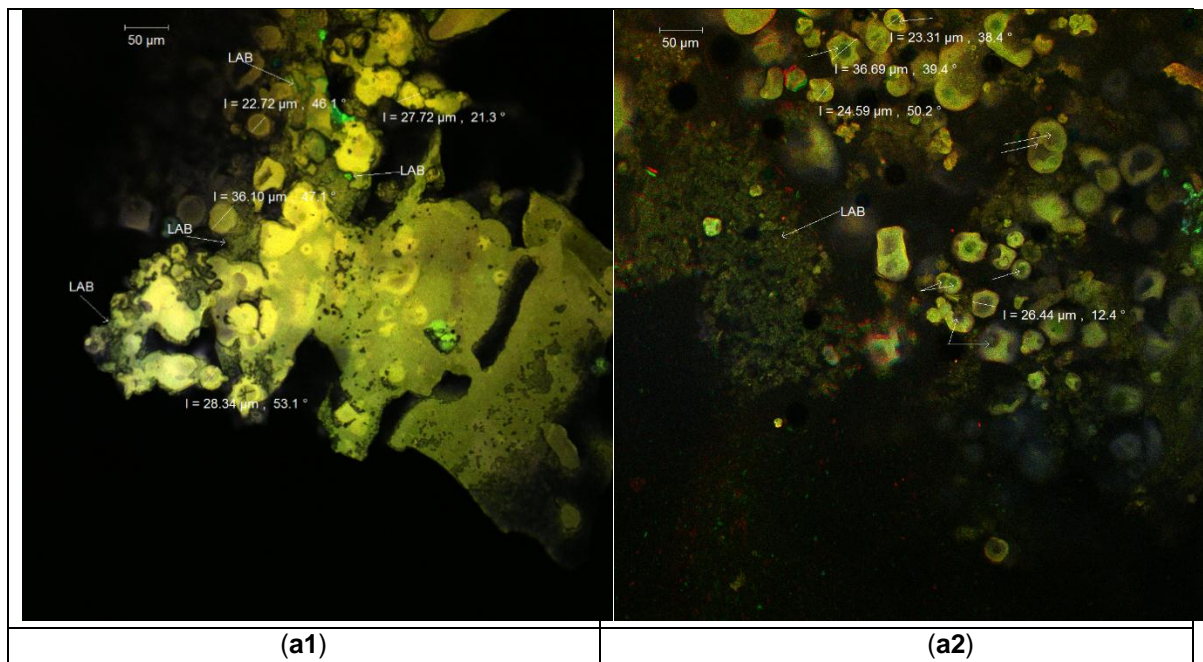
Pentru fiecare parametru testat (L\*, a\*, b\*, c\*, h\*,  $\Delta E$  \*), valorile care se află pe aceeași coloană care nu au aceleași litere mici sunt diferite statistic la  $p < 0,05$  pe baza metodei Tukey și a intervalului de încredere de 95%.

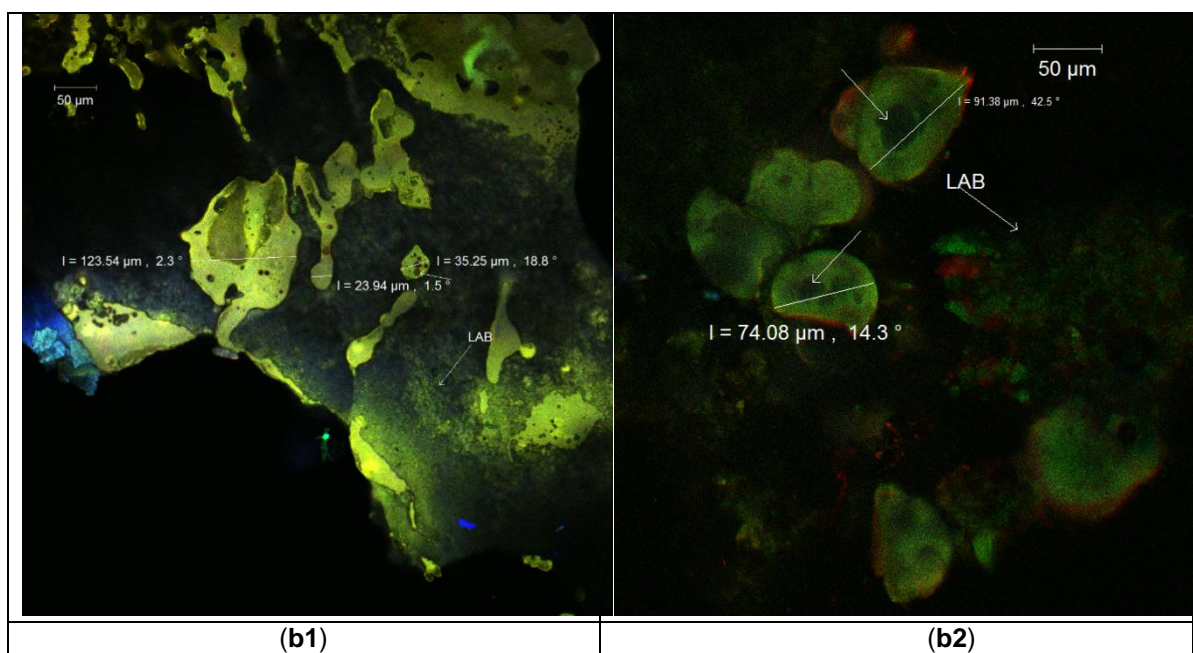
Parametrul a\* poate fi corelat cu conținutul de antociani din pulbere, descriind astfel tendința pulberilor spre roșu, care poate fi asociată cu antocianii eliberați din proantocianidine ([Kaderides și colab., 2020](#)) și formarea pigmentilor derivați din antociani care stabilizează flaviliul de culoare roșie ([Moser și colab., 2017](#)). Parametrul L\* arată că cele două variante de pudre co-microîncapsulate au tendința de a lumina, deoarece materialele de încapsulare sunt materiale albe, și este firesc ca și culoarea pulberilor să fie deschisă la culoare. Rezultatele obținute sunt în concordanță cu cele obținute de [Barbu și colab., \(2020\)](#) care a studiat culoarea pudrei de sfeclă roșie îmbogățită cu *Lactobacillus plantarum*. Valoarea nuanței a fost calculată ca unghiul care a avut tangenta b/a (0°-90° corespunde nuanței care variază de la roșu pur la galben pur, 90°-180° nuanța variază de la galben pur la verde pur).

### 5.18.6. Structura și morfologia pudrelor co-microîncapsulate

Microscopia confocală cu scanare laser (CLSM) se utilizează ca metodă de imagistică de rutină a unui produs biologic marcat fluorescent încă din 1980. Aceasta prezintă numeroase avantaje, dintre care obținerea unei imagini digitale a unei secțiuni optice a probei analizate, în doar câteva secunde, poate fi considerat cel mai important (Paddock, 1999).

Pentru a determina structura și particularitățile morfologice ale antocianinelor co-microencapsulate și ale bacteriilor lactice din matricea biopolimerică, pulberea obținută a fost analizată prin microscopie confocală. Abundența pigmentilor vegetali cu proprietăți antioxidante în fructele de corn a fost, împreună cu autofluorescența lor, detaliată anterior de mai multe alte studii (Dumitrașcu și colab., 2019), (Adamenko și colab., 2019). Este bine cunoscut faptul că compușii fenolici au o absorbție maximă la 280 nm, carotenoidele între 439 și 451 nm și flavonoidele și antocianinele din intervalul 520–580 nm (Boulet și colab., 2017).





**Figura 5.3.** Imagini de microscopie confocală cu scanare laser a probei P1 (a1 – proba necolorată și a2 - proba colorată cu fluorofori) și probă P2 (a1 – proba necolorată și a2 - proba colorată cu fluorofori)

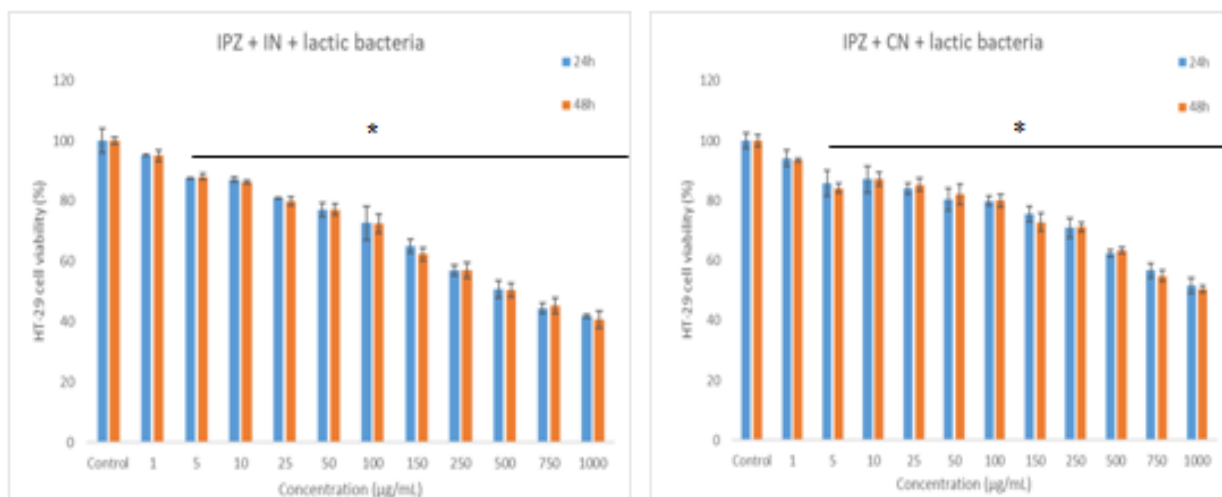
Imaginile probelor scanate laser au fost captate cu ajutorul microscopului confocal Carl Zeiss LSM710 și interpretate cu ajutorul ZEN 2012 SP1 software (Black edition). Probele native ale extractului de fructe de corn încapsulat matrici biopolimerice (Figura 5.3.a1 și 5.3.b1) au pus în evidență formațiuni neregulate, poligonale, mari și subțiri cu autofluorescență în domeniul 500-540 nm, în care antocianii și bacteriile lactice sunt prinse în rețeaua matriceală. Dacă în cazul probei P2 sferozomii sunt rari, predominând formațiunile scalariforme (Figura 5.3.b1), când se folosește cazeina ca matrice bioincapsulantă (P1) sferozomii sunt numeroși, mai mici (cu diametre cuprinse între 17.42 – 34.03 μm) și cu tendința de aglutinare (Figura 5.3.a1). Bacteriile lactice (LAB) *Lb. casei* 431® formează biofilme compacte în structura formațiunilor solzifome în ambele variante (Figura 5.3.a1 și b1). Marcarea fluorescentă a probelor cu Congo Red (Figura 5.3.a2 și b2) a confirmat rezultatele obținute anterior, evidențiind dubla încapsulare a compușilor biologic activi în sferozomii obținuți în ambele variante experimentale, probabil datorită condițiilor de liofilizare. Deosebirea microstructurală între cele două pudre constă în faptul că biopudra 1 este mai fină, prezintă sferozomi uniformi, cu diametre mai mici comparativ cu încapsularea în inulină (P2) unde sferozomii ating dimensiuni de 74.08-91.38μm.

### 5.18.7. Testarea potențialului citotoxic al pudrelor co-microîncapsulate

#### *Activitatea anti-proliferativă in vitro a pulberilor co-microencapsulate*

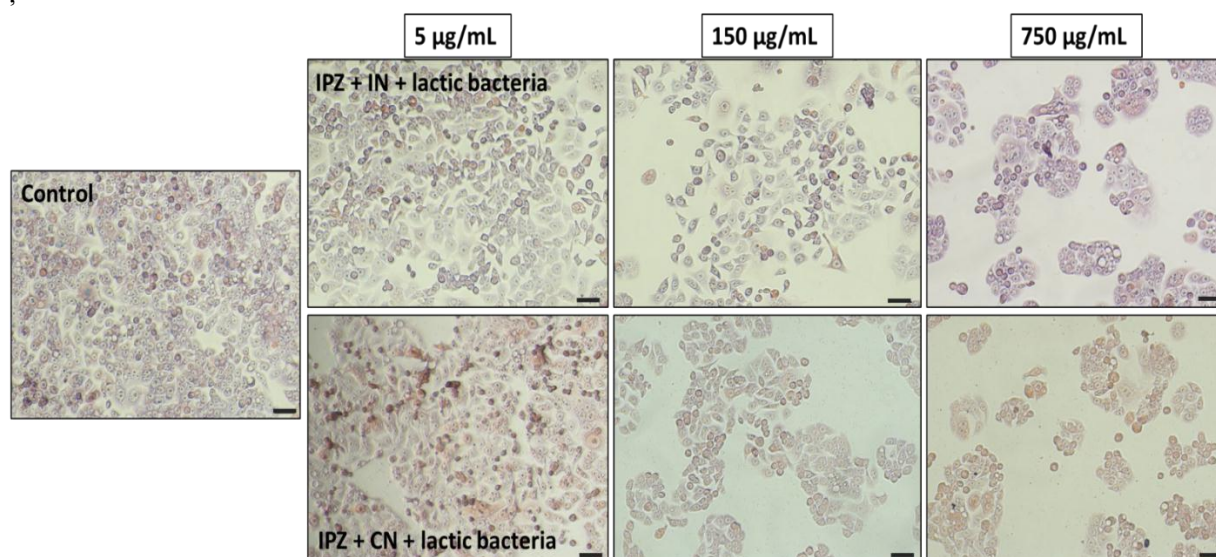
Efectul anti-proliferativ al bioprobelor co-microencapsulate care conțin extracte de fructe de corn a fost evaluat pe celule intestinale umane HT-29 prin testul Roșu Neutru (NR). Datele obținute au indicat un efect anti-proliferativ al ambelor tipuri de probe, într-

o manieră dependentă de concentrație (figura 5.4). Un efect al scăderii viabilității celulare sub 80% a fost detectat pentru concentrații de extracte mai mari de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Valorile  $\text{EC}_{50}$  au fost calculate în intervalul de 750-1000  $\mu\text{g/mL}$ , cu IPZ, inulină și bacterii lactice și extract concentrat de fructe de corn ca având cea mai puternică activitate anti-proliferativă.



**Figura 5.4** Efectul antiproliferativ al biopudrelor P1 și P2 pentru celulele intestinale umane HT-29 evaluate prin metoda Roșu Neutru la 24 și 48h. Rezultatele au fost exprimate ca procent în raport cu cultura de control (netratată), considerată 100% viabilă. Valorile reprezintă media  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

Investigarea microscopiei morfologiei celulelor tumorale a confirmat datele cantitative (figura 5.5). Micrografele au arătat o scădere dependentă de concentrație a densității celulare pentru ambele tipuri de extract. Chiar dacă celulele tratate și-au menținut fenotipul agregativ normal, viabilitatea și proliferarea celulară au fost grav afectate începând cu 250 și, respectiv, 750  $\mu\text{g/mL}$  IPZ, inulină și *L. casei* și IPZ, cazeină și bacterii lactice.



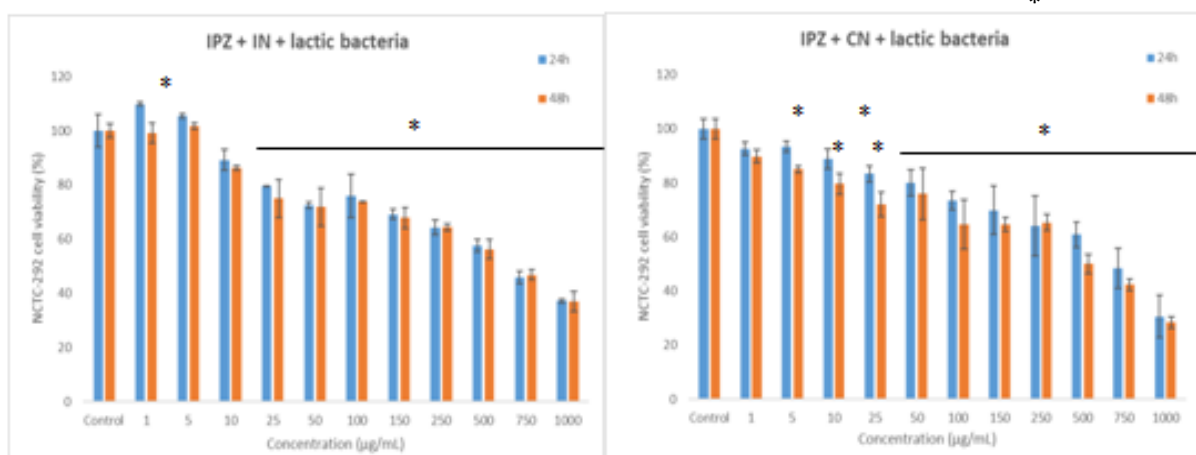
**Figura 5.5.** Morfologia celulară a celulelor tumorale HT-29 cultivate în prezența diferitelor concentrații de pudră co-microîncapsulată (P1 și P2), timp de 48 de ore. Bară de scală = 50  $\mu\text{m}$ .

Studiile anterioare au arătat efectul antitumoral dependent de doză al sucului de corn de pădure asupra diferitelor tipuri de celule canceroase umane prin efectul inhibitor asupra viabilității diferitelor linii celulare canceroase (Hep-G2, Caco-2, HT-29, CT-26, MCF-7), inclusiv celulele canceroase de colon umane HT-29 (Tiptiri-Kourpeti și colab., 2019). Recent, efectul antiproliferativ s-a găsit în corelație cu conținutul de polifenoli și prezența iridoidă, ca un constituent monoterpeneid major al cornului de pădure (Blagojević și colab., 2020). Spre deosebire de aceste studii care au propus concentrații inhibitorii în intervalul de 1-10 mg/ml extract de corn, constatările noastre au sugerat concentrații mult mai mici de extracte încapsulate care au redus viabilitatea celulelor HT-29 cu 50%, în intervalul de 500-1000 μg/mL. Aceste observații comparative au evidențiat faptul că tehnica inovatoare de microîncapsulare aplicată extractelor de fructe a fost eficientă, în comparație cu alte studii.

### 5.18.8. Citocompatibilitatea *in vitro* a pudrelor co-microîncapsulate

Viabilitatea celulară a fost evaluată în cultura celulară fibroblastică L929 prin testul NR. Rezultatele au arătat că ambele biopudre erau citocompatibile într-o manieră dependentă de concentrație (Figura 5.6). Fără citotoxicitate (valori ale viabilității celulare > 80%) a fost observat pentru concentrații testate între 1-25 μg/ml din biopudra care conține inulină, după 48 de ore de cultivare. În plus, s-a observat că biopudrele au stimulat proliferarea celulară la concentrații de 1 și 5 μg/ml, după 24 de ore de tratament. La concentrații cuprinse între 50-250 μg/ml a indus o scădere moderată a viabilității celulare (valori de 60-80%). Concentrații mai mari ale biopudrelor au scăzut viabilitatea celulară până la 35%. În ceea ce privește biopudra 1 datele au ilustrat citocompatibilitatea acestuia (viabilitatea celulară >80%) pe o gamă mai largă de concentrații între 1-50 μg/ml și citocompatibilitate moderată (60-80% viabilitate celulară) pe o gamă de concentrații de 100-250 μg/ml, după 48 de ore de cultivare și chiar 500 μg/ml la 24 h de cultivare. La concentrații mai mari de extract microencapsulat în IPZ, cazeină și bacterii lactice, viabilitatea celulară a scăzut până la 30%.

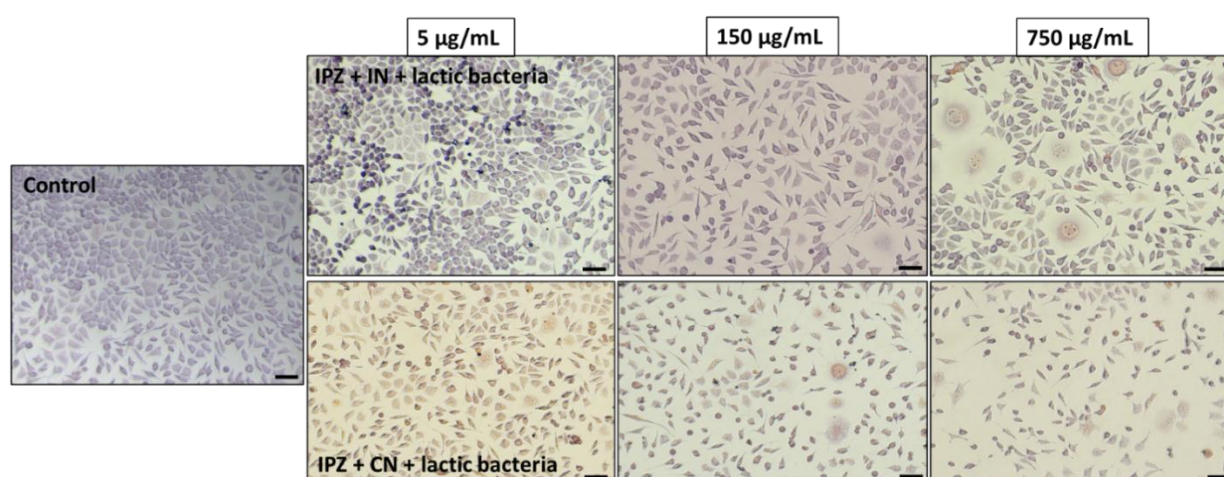
**Figura 5.6.** Viabilitatea celulară a fibroblastelor L929 cultivate în prezența pudrelor co-microîncapsulate de corn de pădure, IPZ, inulină și bacterii lactice (a) și IPZ



, cazeină și bacterii lactice (b) timp de 24 h și, respectiv, 48 h, determinate prin testul NR.

Rezultatele au fost exprimate ca procent în raport cu cultura netratată (control), considerată 100% viabilă. Valorile reprezintă media  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \* $p < 0,05$ , comparativ cu proba martor.

Imaginile microscopice au arătat că celulele L929 cultivate în prezența biopudrelor și-au menținut fenotipul fusiform normal, specific celulelor fibroblastice, similar culturii martor, la concentrații scăzute cuprinse între 1-50  $\mu\text{g/mL}$  (figura 5.7). Celulele au fost distribuite omogen pe suprafață, iar densitatea lor a fost comparabilă cu cultura de control. La concentrații cuprinse între 50-250  $\mu\text{g/mL}$ , densitatea celulară a fost ușor scăzută, în timp ce la concentrații mai mari, unele modificări structurale ale celulelor, cum ar fi formarea veziculelor, au fost observate în culturile tratate cu ambele biopudre. Astfel, aceste observații calitative ale microscopiei ușoare au confirmat datele cantitative Roșu Neutru.



**Figura 5.7.** Morfologia celulară a celulelor L929 cultivate în prezența diferitelor concentrații de pudre co-microencapsulate, timp de 48 de ore. Bară scală = 50  $\mu\text{m}$ .

### 5.18.9. Stabilitatea în timp a pudrelor co-microîncapsulate

Stabilitatea compușilor bioactivi au fost verificate după trei luni de depozitare la 4°C în întuneric (tabelul 5.5).

**Tabel 5.5.** Stabilitatea în timp a pudrelor co-microîncapsulate

Compus analizat	Timp (zile)	Pudră co-microîncapsulată	
		Biopudra 1	Biopudra 2
Activitatea antioxidantă (mMol TE/g s.u.)	0	50,05 $\pm$ 0,94 <sup>a</sup>	47,62 $\pm$ 1,43 <sup>b</sup>
	21	49,73 $\pm$ 2,35 <sup>b</sup>	46,03 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>
	90	46,33 $\pm$ 1,01 <sup>a</sup>	45,87 $\pm$ 1,11 <sup>a</sup>
Conținut de polifenoli (mg GAE/g s.u.)	0	9,67 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	9,79 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>
	21	9,65 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	9,75 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
	90	9,57 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	9,54 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
Conținut de flavonoide (mg CE/g s.u.)	0	5,59 $\pm$ 0,51 <sup>a</sup>	5,94 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>
	21	5,65 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	5,81 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>
	90	5,85 $\pm$ 0,65 <sup>a</sup>	5,67 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>
Conținut de antociani mg C3R/g s.u.)	0	32,14 $\pm$ 0,97 <sup>a</sup>	32,29 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>
	21	14,62 $\pm$ 1,12 <sup>b</sup>	17,26 $\pm$ 0,81 <sup>a</sup>
	90	10,64 $\pm$ 0,66 <sup>b</sup>	13,35 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup>

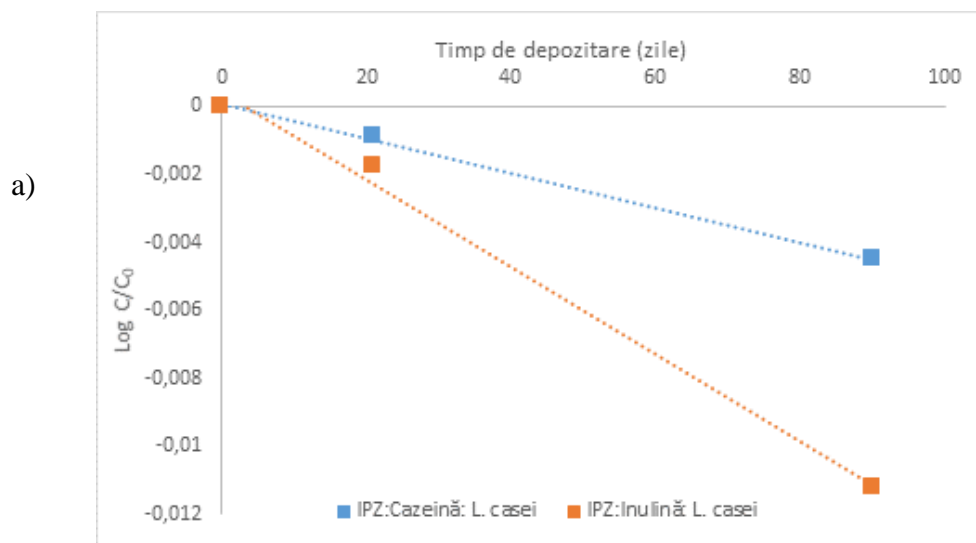


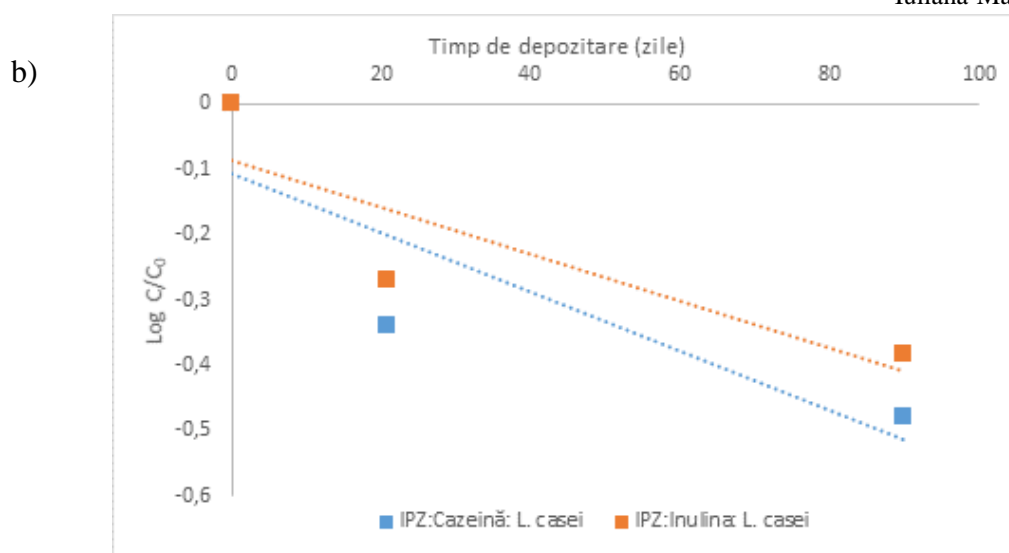
Pentru fiecare compus fitochimic testat și fiecare timp de stocare (21, 90 de zile), valorile care se află pe același rând care nu au aceleași litere mici sunt diferite statistic la  $p < 0,05$  pe baza metodei Tukey și a intervalului de încredere de 95%.

Conform tabelului 5.5 și în corelație cu rezultatele obținute inițial ( $T_0$ ), imediat după finalizarea procesului de liofilizare, se poate observa o eliberare constantă a compușilor biologic activi pe parcursul depozitării biopudrelor. După 21 de zile de depozitare în condiții de întuneric la  $4^{\circ}\text{C}$  există un conținut mai mare de compuși bioactivi (TPC, TPC, TAC) pentru pudra IPZ: Inulină *L. casei* comparativ cu pudra IPZ: Cazeină:*L. casei*. În schimb valoarea activității antioxidante este mai crescută pentru IPZ:Cazeină: *L. casei*. După 90 de zile de depozitare în condiții de întuneric la  $4^{\circ}\text{C}$ , pudra IPZ: Inulină *L. casei* manifestă o capacitate antioxidantă mai mare, alături de TPC și TPC, în timp ce conținutul de antociani este vizibil mai redus.

Rezultatele obținute au fost analizate cu ajutorul modelului cinetic de ordin I, care a permis estimarea constantelor vitezelor de degradare a compușilor biologic activi și timpul de înjumătățire a concentrație lor pentru cele două biopudre.

În figura 5.8. sunt prezentate dreptele de regresie liniară, care descriu evoluția conținutului de polifenoli (a), antociani (b) pe parcursul celor 90 de zile de depozitare.





**Figura 5.8.** Dreptele de regresie liniară, care descriu evoluția conținutului de polifenoli (a), antociani (b) pe parcursul celor 90 de zile de depozitare.

Parametrii cinetici sunt prezentați în Tabelul 5.7.

**Tabel 5.7.** Parametrii cinetici ( $k$  și  $t_{1/2}$ ) estimați conform modelului cinetic de ordin I la depozitarea biopudrelor

Parametri cinetici	IPZ:cazeină:L.casei			IPZ:inulină:L.casei		
	Polifenoli	Antociani	Activitate antioxidantă	Polifenoli	Antociani	Activitate antioxidantă
$k \times 10^{-3}$ (zile <sup>-1</sup> )	0,11±0,01	10,36±1,24	0,92±0,09	0,23±0,07	8,29±0,98	0,23±0,07
$t_{1/2}$ (zile)	6019,51±2,35	66,88±1,67	752,43±2,56	3009,75±5,67	83,60±2,46	3009,75±4,57

Din rezultatele prezentate în Tabelul 5.7. se poate observa o viteză mai mare de degradare a antocianilor în varianta de biopudră IPZ:cazeină:L.casei, în timp ce conținutul de polifenoli se degradează cu o viteză mai mare în varianta cu inulină. Degradarea antocianilor din biopudra IPZ:cazeină:L.casei are un impact mai mare asupra vitezei de degradare a activității antioxidante în timp. Timpul de înjumătățire a concentrațiilor de compuși biologic activi este semnificativ, cu circa 67 de zile pentru conținutul de antociani în biopudra IPZ:cazeină:L.casei și semnificativ mai mare în biopudra IPZ:inulină:L.casei, de circa 84 de zile. Se remarcă de asemenea, timpul de înjumătățire de ordinul 6000 și respectiv 3000 zile pentru polifenoli și activitatea antioxidantă. Aceste rezultate susțin stabilitatea excelentă a compușilor biologic activi în cele două variante experimentale.

Rezultatele obținute sunt în acord cu (Moser și colab., 2017) care a concluzionat faptul că sucul de struguri încapsulat cu maltodextrină și proteină din soia sau zer prin uscare prin pulverizare a avut o stabilitate ridicată pe parcursul celor 150 de zile de depozitare.

### 5.18.10. Viabilitatea bacteriilor lactice

Viabilitatea bacteriilor lactice a fost testată imediat după liofilizare, cât și după 21 și 90 de zile de pătrare la 4°C, la întuneric (Tabel 5.7.)

**Tabel 5.7.** Viabilitatea *L. casei* din pudrele co-microîncapsulate

Varianta	0	21 zile	90 zile
Biopudra 1 (UFC/g s.u.)	8,02 x 10 <sup>9</sup>	7,51 x 10 <sup>9</sup>	1,52 x 10 <sup>9</sup>
Biopudra 2 (UFC/g s.u.)	8,10 x 10 <sup>9</sup>	7,67 x 10 <sup>9</sup>	3,86 x 10 <sup>9</sup>

Sultana și colab., (2000) și Vidhyalakshmi și colab., (2009) au studiat efectele încapsulării în alginat–amidon asupra supraviețuirii *Lactobacillus acidophilus* și *Bifidobacterium spp.* în iaurt pe o perioadă de 60 de zile. Acești autori au demonstrat că supraviețuirea culturilor încapsulate de *L. acidophilus* și *Bifidobacterium spp.* a arătat o scădere a numărului viabil de aproximativ 0,5 log UFC/g s.u., pe o perioadă de 60 de zile, în comparație cu o scădere de 1 log UFC/g s.u. pentru celulele libere. Pudrele co-microencapsulate au arătat o scădere a celulelor viabile de *L. casei* 431® după 90 de zile, cu doar 0,5 log UFC/g s.u. (Enache și colab., 2020b).

### 5.19. Concluzii parțiale

În acest capitol a fost exploatată oportunitatea de a folosi fructul de corn de pădure ca sursă naturală de compuși biologic activi. Astfel, scopul acestui studiu a fost extragerea polifenolilor, antocianilor și a flavonoidelor din fructele de corn și co-microîncapsularea acestora cu bacterii lactice, în vederea obținerii de ingrediente cu funcționalități multiple, produse nutraceutice și/sau pentru aplicații alimentare.

În urma experimentelor realizate în cadrul acestui capitol se desprind următoarele concluzii:

- A. Extractul și bacteriile lactice au fost co-microîncapsulate în două variante, care au utilizat izolatul proteic din zer și cazeină sau inulină, cu o eficiență de încapsulare de 77,97 - 79,03% pentru antociani și 100% pentru bacterii lactice.
- B. Tehnica de uscare prin înghețare a permis obținerea a două biopudre de culoare roz-roșie, cu un conținut semnificativ de compuși bioactivi și celule viabile de 10<sup>9</sup> UFC/g s.u.
- C. Analiza morfologiei și structurii biopudrelor au arătat prezența compușilor bioactivi din fructele de corn în cadrul unor formațiuni mari cu dimensiuni diferite, sugerând o dublă încapsulare a compușilor biologic activi.
- D. În mod semnificativ, biopudra care utilizează inulină a arătat activitate antioxidantă și antidiabetică remarcabile, cu un efect inhibitor mare împotriva  $\alpha$ -amilazei și una mai mică pentru  $\alpha$ -glucozidază.
- E. Testul de stabilitate în timp de 90 de zile la 4° C a permis modelarea variației conținutului de compuși biologic activi cu ajutorul modelului cinetic de ordin I, care a permis estimarea constantelor vitezelor de degradare și a timpului de înjumătățire a concentrației lor în pudre.
- F. S-a evidențiat o stabilitate ridicată a polifenolilor și mai mică a antocianilor, păstrând activitatea antioxidantă.

G. Modelul de digestibilitate *in vitro* a evidențiat o eliberare semnificativă de antociani în condiții gastrice simulate și o creștere în prezența sucului intestinal simulat de aproximativ 14% (biopudra 1) și 38 % (biopudra 2) după 120 min de digestie.

Așadar, studiul realizat demonstrează potențialul de dezvoltare a ingredientelor multifuncționale, furnizate atât de compușii bioactivi din surse vegetale, cât și de bacteriile lactice, pentru aplicații ca nutraceutice sau în produsele alimentare. Sunt necesare studii suplimentare pentru a demonstra eficiența acestor pulberi pentru efectele conexe asupra sănătății, cum ar fi hipocolesterolemice, anti-cancer, efect antiinflamatorii etc.

## 5.20. Bibliografie

1. Adamenko K., Kawa-Rygielska J., Kucharska A.Z., Piórecki N. *Fruit low-alcoholic beverages with high contents of iridoids and phenolics from apple and cornelian cherry (Cornus mas L.) fermented with Saccharomyces bayanus*. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 69, (2019), 307–317. <https://doi.org/10.31883/pjfn/111405>
2. Barbu V., Cotârleț M., Bolea C.A., Cantaragiu A., Andronoiu D.G., Bahrim G.E., Enachi E. *Three Types of beetroot products enriched with lactic acid bacteria*. Foods, 9(6), (2020), 786. [doi:10.3390/foods9060786](https://doi.org/10.3390/foods9060786)
3. Blagojević B., Agić D., Serra A.T., Matić S., Matovina M., Bijelić S., Popović B.M. *An in vitro and in silico evaluation of bioactive potential of cornelian cherry (Cornus mas L.) extracts rich in polyphenols and iridoids*. Food Chemistry, 335, 127619, (2020), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127619>
4. Boulet J.C., Ducasse M.A., Cheyrier V. *Ultraviolet spectroscopy study of phenolic substances and other major compounds in red wines: relationship between astringency and the concentration of phenolic substances*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 23, (2017), 193–199. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12265>
5. Costamagna M.S., Zampini I.C., Alberto M.R., Cuello S., Torres S., Pérez J., Quispe C., Schmeda-Hirschmann G., Isla M.I. *Polyphenols rich fraction from Geoffroea decorticans fruits flour affects key enzymes involved in metabolic syndrome, oxidative stress and inflammatory process*. Food Chemistry, 190, (2016), 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.068>
6. Dumitrașcu L., Enachi E., Stănciuc N., Aprodu I. *Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from cornelian cherry fruits using response surface methodology*. CYTA - Journal of Food, 17 (1), (2019), 814–823. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1659418>
7. Enache I.M., Vasile A.M., Enachi E., Barbu V., Stănciuc N., Vizireanu C. *Co-microencapsulation of anthocyanins from cornelian cherry fruits and lactic acid bacteria in biopolymeric matrices by freeze-drying: evidences on functional properties and applications in food*. Polymers, 12 (906), (2020), 1–12. <https://doi.org/10.3390/polym12040906> (b)
8. González E., Gómez-Caravaca A.M., Giménez B., Cebrián R., Maqueda M., Parada J., Martínez-Férez A., Segura-Carretero A., Robert P. *Role of maltodextrin and inulin as encapsulating agents on the protection of oleuropein during in vitro gastrointestinal*

- digestion*. Food Chemistry, 310, 125976 (2020), 1-25. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125976>
9. Kaderides K., Mourtzinou I., Goula A.M. *Stability of pomegranate peel polyphenols encapsulated in orange juice industry by-product and their incorporation in cookies*. Food Chemistry, 310, 125849, (2020), 1-28 . <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125849>
10. Kunyanga C., Imungi J., Okoth M., Vadivel V., Biesalski H.K. *Development, acceptability, and nutritional characteristics of a low-cost, shelf-stable supplementary food product for vulnerable groups in Kenya*. Food and Nutrition Bulletin, 33, (2012), 43–52. <https://doi.org/10.1177/156482651203300104>
11. Moser P., Telis V.R.N., de Andrade Neves N., García-Romero E., Gómez-Alonso S., Hermosín-Gutiérrez I. *Storage stability of phenolic compounds in powdered BRS Violeta grape juice microencapsulated with protein and maltodextrin blends*. Food Chemistry, 214, (2017), 308–318. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.081>
12. Oancea A.M., Hasan M., Vasile A.M., Barbu V., Enachi E., Bahrim G., Râpeanu G., Silvi S., Stănciuc N. *Functional evaluation of microencapsulated anthocyanins from sour cherries skins extract in whey proteins isolate*. LWT, 95, (2018), 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.083>
13. Paddock S.W. *Overview Confocal Laser Scanning Microscopy*, BioTechniques, 27 (5), (1999), 992-1004
14. Ranilla L.G., Kwon Y.I., Apostolidis E., Shetty K. *Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America*. Bioresource Technology, 214, (2010), 308–318. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.093>
15. Tao Y., Wang P., Wang J., Wu Y., Han Y., Zhou J. *Combining various wall materials for encapsulation of blueberry anthocyanin extracts: Optimization by artificial neural network and genetic algorithm and a comprehensive analysis of anthocyanin powder properties*. Powder Technology, 311, (2017), 77–87. [doi:10.1016/j.powtec.2017.01.078](https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.01.078)
16. Sultana K., Godward G., Reynolds N., Arumugaswamy R., Peiris P., Kailasapathy K. *Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt*. International Journal of Food Microbiology, 62, (2000), 47–55. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00380-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00380-9)
17. Tiptiri-Kourpeti A., Fitsiou E., Spyridopoulou K., Vasileiadis S., Iliopoulou C., Galanis A., Vekiari S., Pappa A., Chlichlia K. *Evaluation of antioxidant and antiproliferative properties of Cornus mas L. fruit juice*. Antioxidants, 8(9), 377. <https://doi.org/10.3390/antiox8090377>
18. Vasile M.A., Milea Ș.A., Enachi E., Barbu V., Cîrciumaru A., Bahrim G.E., Râpeanu G., Stănciuc N. *Functional enhancement of bioactives from black beans and lactic acid bacteria into an innovative food ingredient by comicroencapsulation*. Food and Bioprocess Technology, 13, (2020), 978–987. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02451-8>

19. Vidhyalakshmi R., Bhakayaraj R., Subhasree, R.S. *Encapsulation the future of probiotics - a review*. *Advances in Biological Research*, 3, (2009), 96–103.
20. Organizația Mondială a Sănătății (OMS). Disponibil online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabet> (accesat la 25 martie 2020).

## **CAPITOLUL 6. Strategii de valorificare a bioingredientelor cu funcții multiple în dezvoltarea de produse alimentare cu valoare adăugată**

### **6.2. Obiectivele studiului**

Capitolul 6 intitulat *Strategii de valorificare a bioingredientelor cu funcții multiple în dezvoltarea de produse alimentare cu valoare adăugată* se urmăresc următoarele obiective științifice:

- O1. Formularea de produse alimentare îmbogățite cu pudră co-microîncapsulată pe bază de fructe de corn.
- O2. Cuantificarea conținutului de compuși biologic activi din produsele alimentare rezultate.
- O3. Testarea potențialului antioxidant al produselor alimentare realizate.
- O4. Determinarea viabilității bacteriilor probiotice din produsele alimentare alese.
- O5. Testarea stabilității în timp a conținutului de compuși biologic activi din produsele alimentare obținute.

### **6.3. Materiale și metode**

Testarea profilului chimic al produselor alimentare se realizează prin caracterizarea acestora privind viabilitatea bacteriilor probiotice (cu ajutorul mediului de cultură MRS Agar), a activității antioxidante (folosind radicalul liber DPPH) și conținutul de: polifenoli totali (prin metoda Folin-Ciocalteu), flavonoide totale (utilizând metoda colorimetrică  $AlCl_3$ ) și antociani totali (prin metoda pH-ului diferențial).

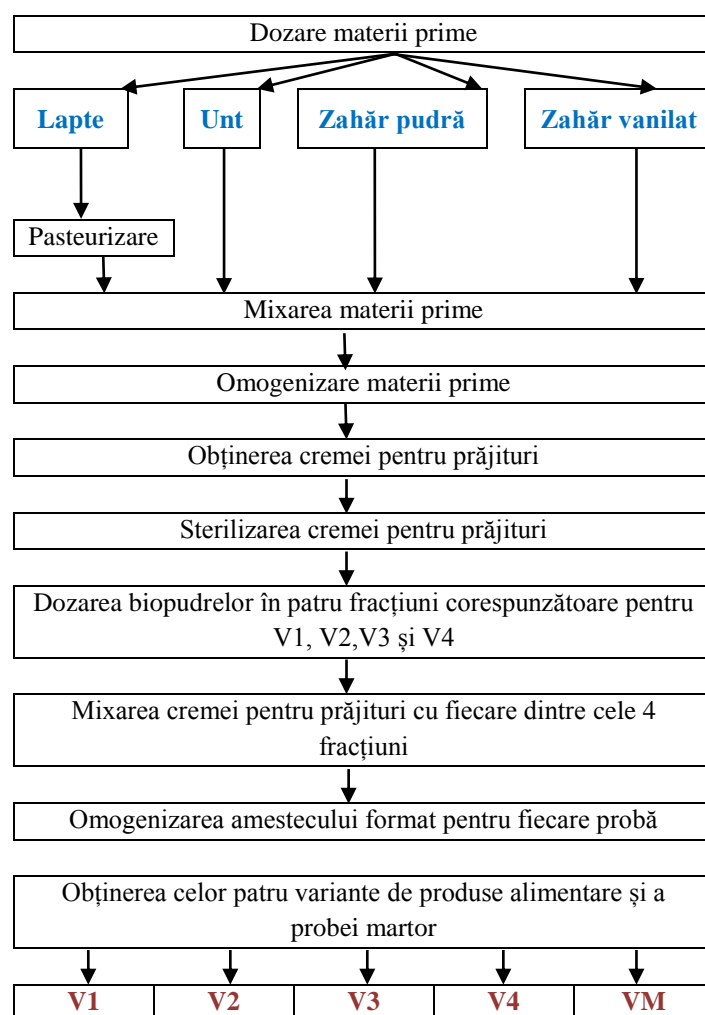
### **6.6. Scheme tehnologice de obținere a unor variante experimentale de produse cu valoare adăugată**

Crema pentru prăjituri s-a obținut utilizând următoarele ingrediente: 100 g unt, 87,5 g zahăr pudră, 37,5 lapte și 4 g zahăr vanilat. Raportul procentual al ingredientelor utilizate pentru realizarea cremei pentru prăjituri este 43,67 : 38,21 : 16,37 : 1,75.

**Tabel 6.1.** Produse alimentare realizate

Varietă biopudră	Raport procentual	Codificare	Cantitate de pudră	Substanța
	pudră	probă	adăugată	uscată
<b>Biopudra 1</b>	2%	V1	0,50 g	82,65%
<b>Biopudra 2</b>	5%	V2	1,25 g	83,95%
<b>Biopudra 1</b>	2%	V3	0,50 g	83,92%
<b>Biopudra 2</b>	5%	V4	1,25 g	83,93%
<b>Proba martor</b>	N.A.	VM	N.A.	82,59%

Probele au fost realizate în condiții sterile și cu respectarea normelor de protecție aplicabile în laboratoarele de cercetare. Fiecare rețetă de cremă pentru prăjituri cu adaos de pudră co-microîncapsulată pe bază de fructe de corn a fost realizată conform schemei tehnologice de obținere a produselor alimentare din figura 6.1.

**Figura 6.1.** Schema tehnologică de obținere a produselor alimentare

## 6.9. REZULTATE ȘI DISCUȚII

### 6.9.1. Profilul chimic al produselor realizate

Pentru a testa eficiența pudrelor co-microîncapsulate în ceea ce privește funcționalitatea, fiecare pudră a fost adăugată într-o cremă pentru prăjituri în diferite raporturi aleatorii de 2% și 5%. Probele de cremă pentru prăjituri cu valoare adăugată au fost testate din punct de vedere fitochimic și al activității antioxidante, precum și al viabilității *Lactobacillus casei* pe parcursul a 7 zile de depozitare la 4-6°C. În paralel, s-a obținut un test de control, fără adăugarea de pudră, conform tabelului 6.2.

**Tabel 6.2.** Profilul chimic al produselor alimentare realizate

Compus analizat	Produse alimentare îmbogățite cu adaos de pudre co-microîncapsulate				
	V1	V2	V3	V4	VM
Activitatea antioxidantă (mMol TE/g s.u.)	32,46±1,36 <sup>a</sup>	34,53±2,32 <sup>a</sup>	29,69±2,38 <sup>b</sup>	31,21±1,97 <sup>b</sup>	0,84±0,03 <sup>c</sup>
Conținut de polifenoli (mg GAE/g s.u.)	3,93±0,46 <sup>b</sup>	4,76±0,36 <sup>a</sup>	3,92±0,09 <sup>b</sup>	4,78±0,27 <sup>a</sup>	0,78±0,08 <sup>c</sup>
Conținut de flavonoide (mg CE/g s.u.)	1,15±0,01 <sup>b</sup>	1,13±0,04 <sup>a</sup>	1,11±0,04 <sup>b</sup>	1,11±0,03 <sup>b</sup>	0,55±0,08 <sup>c</sup>
Conținut de antociani mg C3R/g s.u.)	14,17±2,29 <sup>a</sup>	14,44±1,16 <sup>a</sup>	14,86±1,88 <sup>a</sup>	16,23±2,29 <sup>b</sup>	0,13±0,02 <sup>c</sup>

Pentru fiecare compus fitochimic testat, valorile care se află pe același rând care nu au aceleași litere mici sunt diferite statistic la  $p < 0,05$  pe baza metodei Tukey și a intervalului de încredere de 95%.

Tabelul 6.2. evidențiază tendința de creștere a concentrației de compuși bioactivi (antociani, polifenoli și flavonoide) pentru ambele variante de cremă pentru prăjituri cu adaos de 5% pudră co-microîncapsulată (V2 și V4), comparativ cu variantele V1 și V3.

Comparativ cu proba martor (VM), se poate observa faptul că adăugarea de biopudre în crema pentru prăjituri influențează semnificativ conținutul de compuși biologic activi (antociani, polifenoli și flavonoide) și activitatea antioxidantă a produselor alimentare realizate. Variantele experimentale au prezentat un conținut semnificativ mai mare pentru toate categoriile (Tabel 6.2.) cu impact asupra activității antioxidante.

### 6.9.2. Stabilitatea la depozitare a produsului alimentar la 3 și la 7 de zile

Realizarea profilului de stabilitate a compușilor biologic activi al produselor alimentare s-a efectuat prin determinarea conținutului de antociani, polifenoli și flavonoide și a activității antioxidante după 3, respectiv 7 zile de depozitare la 4 °C, la întuneric. Rezultatele obținute sunt redate în tabelul 6.3.



**Tabel 6.3.** Stabilitatea la depozitare a produselor alimentare realizate

Compus analizat	Timp (zile)	Produse alimentare îmbogățite cu adaos de pudre co-microîncapsulate				
		V1	V2	V3	V4	VM
<b>Activitatea antioxidantă</b> (mMol TE/g s.u.)	3	24,92±0,57 <sup>a</sup>	26,99±1,60 <sup>a</sup>	10,25±1,62 <sup>b</sup>	17,61±0,96 <sup>c</sup>	0,82±0,03 <sup>c</sup>
	7	13,06±0,43 <sup>a</sup>	18,05±0,19 <sup>b</sup>	9,91±0,19 <sup>c</sup>	14,85±0,27 <sup>a</sup>	0,81±0,15 <sup>c</sup>
<b>Conținut de polifenoli</b> (mg GAE/g s.u.)	3	4,55±0,28 <sup>b</sup>	5,25±0,38 <sup>a</sup>	3,95±0,18 <sup>b</sup>	5,27±0,07 <sup>a</sup>	0,75±0,08 <sup>d</sup>
	7	3,59±0,19 <sup>a</sup>	4,35±0,12 <sup>b</sup>	4,34±0,15 <sup>b</sup>	5,18±0,26 <sup>c</sup>	0,70±0,07 <sup>d</sup>
<b>Conținut de flavonoide</b> (mg CE/g s.u.)	3	1,33±0,010 <sup>a</sup>	1,38±0,02 <sup>a</sup>	1,15±0,10 <sup>b</sup>	1,48±0,06 <sup>c</sup>	0,64±0,02 <sup>c</sup>
	7	1,29±0,08 <sup>a</sup>	1,29±0,03 <sup>a</sup>	1,25±0,07 <sup>a</sup>	1,40±0,05 <sup>b</sup>	0,56±0,07 <sup>d</sup>
<b>Conținut de antociani</b> mg C3R/g s.u.)	3	13,83±1,53 <sup>a</sup>	14,17±1,35 <sup>b</sup>	14,19±2,81 <sup>b</sup>	14,57±1,07 <sup>b</sup>	0,12±0,01 <sup>c</sup>
	7	12,66±1,11 <sup>a</sup>	13,97±1,73 <sup>b</sup>	13,24±0,80 <sup>b</sup>	14,06±2,06 <sup>c</sup>	0,10±0,01 <sup>d</sup>

Pentru fiecare compus fitochimic testat și fiecare timp de stocare (3 și 7 zile), valorile care se află pe același rând care nu au aceleași litere mici sunt diferite statistic la  $p < 0,05$  pe baza metodei Tukey și a intervalului de încredere de 95%.

Conform tabelului 6.3., toate variantele de produse prezintă o scădere a capacității antioxidante și a compușilor bioactivi la 3, respectiv 7 zile de depozitare. Toate cele patru variante de cremă pentru prăjituri îmbogățite cu adaos de pudre co-microîncapsulate variante au arătat o activitate antioxidantă crescută în comparație cu proba martor.

### 6.9.3. Viabilitatea bacteriilor lactice

Testarea potențialului probiotic al celor patru variante de cremă pentru prăjituri cu adaos de pudră co-microîncapsulată pe bază de fructe de corn se realizează imediat după realizare, dar și ulterior, după 7 zile de depozitare la 4°C în condiții de întuneric. Rezultatele obținute sunt evidențiate în tabelul 6.4.

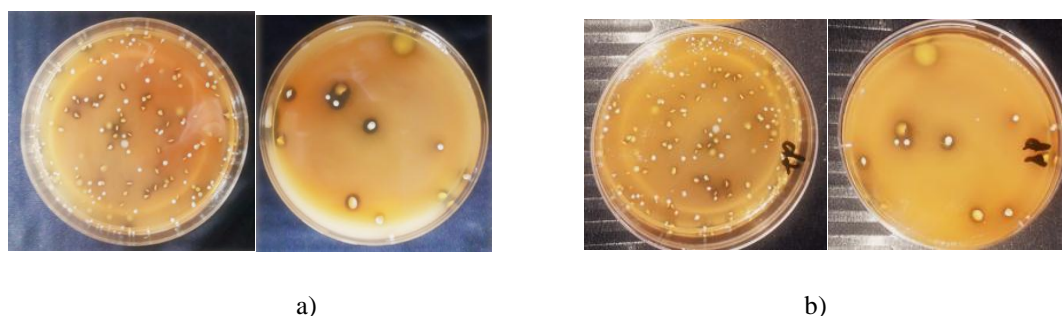
**Tabel 6.4.** Viabilitatea bacteriilor lactice în produsele alimentare realizate

Produs alimentar	0 (UFC/ g s.u.)	7 zile (UFC/ g s.u.)
<b>V1</b>	2,63 x 10 <sup>7</sup>	1,58 x 10 <sup>7</sup>
<b>V2</b>	7,57 x 10 <sup>7</sup>	5,73 x 10 <sup>7</sup>
<b>V3</b>	1,16 x 10 <sup>8</sup>	3,15 x 10 <sup>7</sup>
<b>V4</b>	1,59 x 10 <sup>8</sup>	7,76 x 10 <sup>7</sup>
<b>V.M.</b>	N.A.	N.A.

\*N.A. – neaplicabil

Viabilitatea bacteriilor lactice în produsele alimentare realizate variază între 2,63 x 10<sup>7</sup> (V1) și 1,59 x 10<sup>8</sup> (V4) UFC/g s.u., la momentul T0. Viabilitatea *L. casei* din crema pentru prăjituri cu adaos de biopudră co-microîncapsulate prezintă o ușoară scădere la 7 zile de depozitare, respectiv: 0,60 log pentru V1, 0,75 log pentru V2, 0,27 log pentru V3 și 0,48 log pentru V4, dar toate probele analizate pot fi considerate produse probiotice funcționale datorită prezenței bacteriilor lactice în produsele alimentare studiate în cuantum de 10<sup>7</sup> UFC/g s.u.

Figura 6.2 prezintă imagini reprezentative pentru testarea viabilității bacteriilor lactice din crema pentru prăjituri cu adaos de pudră co-microîncapsulată.



**Figura 6.2.** Viabilitatea bacteriilor lactice din produsele alimentare realizate: a – V2, b –V4

Cui și colab., (2018) a studiat efectele diferitelor metode de uscare asupra calității, viabilității bacteriene și a stabilității de depozitare a gustărilor cu mere îmbogățite cu probiotice. S-a demonstrat faptul că bacteriile probiotice din probele uscate prin congelare urmată de uscarea în vid cu microunde au rămas peste  $1 \times 10^6$  UFC/g timp de 120 de zile la  $25^\circ\text{C}$ .

### 6.10. Concluzii parțiale

Înlocuirea aditivilor alimentari sintetici de către omologii lor naturali reprezintă o provocare pentru specialiștii din industria alimentară, iar antocianii au câștigat un interes din ce în ce mai mare ca pigmenții alimentari naturali roșii, purpurii și albaștri.

Dat fiind faptul că fructul de corn reprezintă o sursă importantă de antociani cu efect antioxidant, se propune dezvoltarea a patru variante de cremă pentru prăjituri cu adaos de pudră co-microîncapsulată pe baza de fructe de corn, respectiv V1, V2, V3 și V4.

În urmă experimentelor efectuate în cadrul acestui capitol, se pot extrage următoarele concluzii:

A. Comparativ cu proba martor (VM), probele experimentale au un conținut crescut de compuși bioactivi (3,92-4,78 mg GAE/g s.u. pentru conținutul de polifenoli, 1,11-1,15 mg CE/g s.u. conținutul de flavonoide, 14,17-16,23 mg C3R/g s.u. conținutul de antociani) corelat cu o capacitate antioxidantă semnificativă de 29,69 -34,53 mMol TE/g s.u.

B. Pentru toate cele patru variante de produse alimentare realizate se menține un conținut semnificativ de compuși bioactivi pe toată perioada de depozitare, corelat cu activitatea antioxidantă a acestora.

C. Produsele obținute prin adaos de biopudre co-microîncapsulate pot fi încadrate în categoria produselor probiotice funcționale, deoarece numărul de bacterii lactice viabile se mențin la valori peste  $10^6$  UFC/g s.u., chiar și după 7 zile de depozitare, în condiții controlate de temperatură.

În concluzie, toate cele patru variante de cremă pentru prăjituri cu adaos de biopudre co-microîncapsulate de fructe de corn reprezintă o alternativă de utilizare în

realizarea produselor de cofetărie cu valoare adăugată și funcționalitate multiplă, dată de potențialul probiotic și antioxidant.

### **6.11. Bibliografie**

1. Cui L., Niu L., Li D., Liu C., Liu Y., Liu C., Song J. *Effects of different drying methods on quality, bacterial viability and storage stability of probiotic enriched apple snacks*. Journal of Integrative Agriculture, 17 (1), (2018), 247–255. [doi:10.1016/s2095-3119\(17\)61742-8](https://doi.org/10.1016/s2095-3119(17)61742-8)

## CAPITOLUL 7. Concluzii finale

- ✓ Provocările actuale ale omenirii în ceea ce privește alimentația la nivel mondial reprezintă un subiect controversat care face obiectul a numeroase studii și care înglobează o serie de necesități și dorințe din ce în ce mai greu de realizat.
- ✓ În societatea contemporană, dieta zilnică este săracă din punct de vedere nutritiv, dar bogată în compuși de sinteză fără valoare nutritivă pentru organismul uman.
- ✓ Înlocuirea acestora cu compuși din surse naturale reprezintă tranziția spre o viață echilibrată din punct de vedere nutrițional, dar și pentru dezvoltarea armonioasă a întregului organism.
- ✓ Versatilitatea utilizării fructelor de corn în industria alimentară (în stare proaspătă sau procesată) și în medicină homeopată (pentru a ameliora sau trata diverse afecțiuni) a condus la studierea acestor fructe din punct de vedere fitochimic, morfologic sau medicinal.
- ✓ Fiind o sursă importantă de compuși bioactivi, fructul de corn este unul dintre fructele de pădure insuficient valorificate la nivel național, așa cum reiese și din *Chestionarul privind consumul de fructe de corn*, aplicat pe un eșantion de 71 de indivizi de origine română.
- ✓ Conform acestui studiu, un procent 79,7% consideră faptul că fructele de corn pot fi consumate doar în stare proaspătă, ceea ce reduce considerabil posibilitatea de a le introduce în alimentație pe parcursul întregului an.
- ✓ Fructul de corn reprezintă o resursă naturală de origine vegetală insuficient exploatată și valorificată pe teritoriul României, cu un aport nutritiv considerabil și multiple beneficii pentru sănătatea individului.
- ✓ Cornul a fost caracterizat din punct de vedere al încadrării taxonomice, distribuției geografice la nivel mondial și național, precum și a factorilor de favorabilitate sau restrictivitate de pe teritoriul României utilizând tehnologia GIS și încadrarea pe clase de favorabilitate la nivelul fiecărui județ al țării.
- ✓ În lucrare au fost descrise principalele caracteristici generale, biologice, etimologice și de morfologie ale plantei, precum și importanța economică a acesteia și preabilitatea utilizării ei de către om.
- ✓ Ca urmare a realizării validării modelului prin metoda GIS s-a obținut o rată de validare de 83,5% fapt care evidențiază corectitudinea întocmirii bazelor de date primare, corectitudinea metodologiei propuse ca fundament a analizei spațiale și propune implementarea modelului în cadrul teritoriului analizat.
- ✓ Metoda de extracție aplicată, care a constat într-o combinație de extracție hidroalcoolică solid-lichid și extracție asistată cu ultrasunete, în condiții nenednaturante au permis obținerea unui extract concentrat cu un conținut ridicat de polifenoli, flavonoide, antociani monomeric
- ✓ Profilul cromatografic al extractului de fructe de corn indică prezența cianidin-3-rutinozidului și a cianidin-3-glucozidului ca antociani majoritari, reprezentând mai mult de 78% din conținutul total de antocianine.

- ✓ Analiza colorimetrică a confirmat conținutul ridicat de antociani, în special cianidin-3-rutinozid, responsabili de culoarea roșie extractului.
- ✓ Așa cum era de așteptat, conținutul de vitamina C a variat astfel: fruct proaspăt < fructul liofilizat < extractul din fructe de corn;
- ✓ Unul dintre obiectivele acestui studiu a fost extragerea polifenolilor, antocianilor și a flavonoidelor din fructele de corn și co-microîncapsularea acestora cu bacterii lactice și proteine din zer, în vederea obținerii de ingrediente cu funcționalități multiple pentru aplicații alimentare.
- ✓ Extractul și bacteriile lactice au fost co-microîncapsulate în izolat proteic din zer alături de cazeină sau inulină, cu o eficiență de încapsulare de circa 78-79% pentru antociani și 100% pentru bacteriile lactice.
- ✓ Tehnica de liofilizare a permis obținerea a două biopudre de culoare roz-roșie, cu un conținut semnificativ de compuși bioactivi și celule viabile, de ordinul  $10^9$  UFC/g s.u.
- ✓ Analiza morfologiei și structurii pulberii încapsulate a arătat prezența compușilor bioactivi din fructele de corn în cadrul unor formațiuni mari cu dimensiuni diferite.
- ✓ În mod semnificativ, biopudrele au prezentat activitate antioxidantă și antidiabetică remarcabile, cu un efect inhibitor mare împotriva  $\alpha$ -amilazei și una mai redusă pentru  $\alpha$ -glucozidază.
- ✓ Studiile realizate asupra profilului citotoxic și antiproliferativ al biopudrelor relevă importanța utilizării procesul inovator de co-microîncapsulare aplicat extractelor de fructe de corn.
- ✓ Astfel, concentrații mult mai mici de biopudre au redus viabilitatea celulelor HT-29 cu 50%, în intervalul de 500-1000  $\mu$ g/mL, comparativ cu alte studii.
- ✓ Testul de stabilitate în timp de 90 de zile la 4° C a permis modelarea variației conținutului de compuși biologic activi cu ajutorul modelului cinetic de ordin I, care a permis estimarea constantelor vitezelor de degradare și a timpului de înjumătățire a concentrației lor în pudre
- ✓ Modelul de digestibilitate *in vitro* a evidențiat o eliberare semnificativă de antocianine în condiții gastrice simulate și o creștere în prezența sucului intestinal simulat de aproximativ 14% (biopudra 1) și 38% (biopudra 2) după 120 min de digestie.
- ✓ Comparativ cu proba martor (VM), toate probele experimentale au un conținut crescut de compuși bioactivi corelat cu o capacitate antioxidantă semnificativă.
- ✓ Produsele obținute prin adaos de biopudre co-microîncapsulate pot fi încadrate în categoria produselor probiotice funcționale, deoarece numărul de bacterii lactice viabile se mențin la valori peste  $10^6$  UFC/g s.u., chiar și după 7 zile de depozitare, în condiții controlate de temperatură.
- ✓ Valoarea adăugată a fost demonstrată prin dezvoltarea unor variante experimentale de creme pentru prăjituri, care au arătat că atât culoarea, cât și conținutul de compuși biologic activi, pe lângă activitatea antioxidantă, au fost semnificativ mai mari în comparație cu proba de control.
- ✓ Așadar, studiul realizat demonstrează potențialul de dezvoltare al ingredientelor multifuncționale, furnizate atât de compușii bioactivi din surse vegetale, cât și de bacteriile lactice, pentru aplicații ca nutraceutice sau în produsele alimentare.

- ✓ Sunt necesare studii suplimentare pentru a demonstra eficiența acestor pulberi pentru efectele conexe asupra sănătății, cum ar fi hipocolesterolemice, efecte antiinflamatorii

## CAPITOLUL 8. Contribuții personale și perspective de continuare a studiilor

### 1. Contribuții originale

În cadrul prezentei lucrări, contribuțiile originale sunt:

1. Descrierea și caracterizarea cornului de pădure din punct de vedere etimologic, biologic, morfologic și al importanței economice.
2. Întocmirea profilului fitochimic al fructelor de corn.
3. Realizarea de hărți geografice care evidențiază factorii de favorabilitate/restrictivitate ai plantei pe teritoriul României.
4. Extracția și caracterizarea compușilor biologic activi ai fructului de corn.
5. Co-microîncapsularea compușilor bioactivi ai fructului de corn cu proteine, polimeri și bacterii lactice cu scopul obținerii unor pudre stabile cu efect simbiotic.
6. Realizarea profilului chimic al pudrelor co-microîncapsulate, precum și determinarea eficienței de încapsulare a antocianilor, testarea culorii, a digestibilității antocianilor în condiții simulate (*in vitro*), a activității biologice, a morfologiei microparticulelor prin microscopie confocală, a stabilității compușilor bioactivi și a viabilității bacteriilor lactice.
7. Testarea potențialului antioxidant, probiotic, citotoxic și antiproliferativ al pudrelor co-microîncapsulate pe bază de extract de fructe de corn.
8. Testarea pudrelor obținute în matrici alimentare pentru evidențierea calității acestora ca produse nutraceutice cu valoare adăugată.

### 2. Perspective de continuare a studiilor:

În ceea ce privește perspectivele de cercetare a fructelor de corn, se prevăd următoarele:

1. Întocmirea forumulei ecologice și a fișei ecologice pentru *Cornus mas.*
2. Obținerea drepturilor de proprietate intelectuală pentru pudrele co-microîncapsulate și pentru produselor alimentare realizate.
3. Analiza texturală a produselor alimentare realizate.
4. Analiza reologică a produselor alimentare realizate.
5. Testarea pudrelor co-microîncapsulate din punct de vedere al digestibilității *in vitro* a bacteriei probiotice *Lactobacillus casei*.
6. Determinarea stabilității la depozitare a pudrelor co-microîncapsulate la 365 de zile .
7. Realizarea profilului colorimetric al pudrelor co-microîncapsulate la 365 de zile.
8. Determinarea vitaminei C din pudrele co-microîncapsulate și din produsele alimentare realizate.
9. Cuantificarea informațiilor nutriționale pentru produsele alimentare realizate.
10. Valorificarea compușilor biologic activi prin co-microîncapsulare a altor fructe (afine, agrișe, căpșuni, coacăze, corcodușe, dude, mure, pepene, porumbele, zmeură etc) și legume (bob, fasole verde, morcov, păstârnac, țelină etc).

## CAPITOLUL 9. Lista publicațiilor

Diseminarea rezultatelor cercetării derulată pe parcursul celor 4 ani de stagiul doctoral se concretizează prin publicarea a 3 articole cotate ISI (1 în zona roșie –Q1, 1 în zona galbenă –Q2 și 1 în zona gri –Q3), 1 articol indexat BDI, 2 articole aflate în curs de elaborare/ publicare, 1 conferință internațională în străinătate, 9 conferințe internaționale în România, 1 proiect de mobilitate pentru cercetători și 1 premiu câștigat la o conferință internațională, după cum urmează:

### A. ARTICOLE PUBLICATE

#### A.1. Articole cotate ISI

1. **Iuliana-Maria Enache**; Aida Mihaela Vasile; Elena Enachi; Viorica Barbu; Nicoleta Stănciuc; Camelia Vizireanu; *Co-microencapsulation of anthocyanins from black currant extract and lactic acid bacteria in biopolymeric matrices*, **Molecules** **2020**, 25, 1700, p. 1-12. [doi: 10.3390/molecules25071700](https://doi.org/10.3390/molecules25071700), Q2, Impact Factor = 3,060
2. **Iuliana-Maria Enache**; Aida Mihaela Vasile; Elena Enachi; Viorica Barbu; Nicoleta Stănciuc; Camelia Vizireanu; *Co-microencapsulation of anthocyanins from cornelian cherry fruits and lactic acid bacteria in biopolymeric matrices by freeze-drying: evidences on functional properties and applications in food*, **Polymers**, **2020**, 12 (4), 906, p. 1-12, [doi: 10.3390/polym12040906](https://doi.org/10.3390/polym12040906), Q1, Impact Factor = 3,164
3. **Iuliana-Maria Enache**; Coman Gigi; Sanda Roșca; Camelia Vizireanu; Liliana Mihalcea; *Optimization conventional extraction of bioactive compounds from *Cornus mas* by RSM and determination of favourability factors by GIS technique*, **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, **2021**, Volume 49, Issue 2, Article 12307, [DOI: 10.15832/nbha\[12307\]](https://doi.org/10.15832/nbha[12307]) Q3, Impact Factor =1,168 (2020)

#### A.2. Articole indexate în baze de date internaționale (BDI)

1. **Iuliana Maria Enache**; Nicoleta Stănciuc; Camelia Vizireanu; *Microencapsulation of biologically active compounds from cornelian cherry fruits with whey protein isolate and accacia gum*, Multidisciplinary Conference on Sustainable Development, **Filodiritto International Proceedings**, **2019**, p. 435-439, ISBN 978-88-85813-60-1

#### A.3. Articole aflate în curs de publicare

1. **Iuliana Maria Enache**; Óscar Benito-Román; Gigi Coman; Camelia Vizireanu; Nicoleta Stănciuc; Doina Georgeta Andronoiu; Liliana Mihalcea; ;Maria Teresa Sanz; *Extraction optimization and valorization of the cornelian cherry fruits extracts: evidences on phytochemical profile and food applications*, submis la **Applied Sciences**
2. **Iuliana Maria Enache**, Oana Crăciunescu, Ana-Maria Prelipceanu, Aida Mihaela Vasile, Anca Oancea, Elena Enachi, Vasilica Barbu, Nicoleta Stănciuc and Camelia



Vizireanu, *Co-microencapsulation of anthocyanins from cornelian cherry (Cornus mas) fruits with lactic acid bacteria in high antioxidant, anti-proliferative and cytotoxic derivative freeze dried powders, in elaborare.*

## B. CONFERINȚE

### B.1. CONFERINȚE INTERNAȚIONALE ÎN STRĂINĂTATE

1. **Iuliana-Maria Enache**, Gigi Coman, Óscar Benito Román, Sagrario Beltrán Calvo, Camelia Vizireanu, Liliana Mihalcea, *Biocompounds evaluation for Cornus mas fruits by ultrasound-assisted extraction*, European Biotechnology Congress, Praga, Cehia, 24-26.09. 2020, Book of abstract p 588, <https://www.tandfonline.com/toc/tbeq20/35/sup1>

### B.2. CONFERINȚE INTERNAȚIONALE ÎN ROMÂNIA

1. **Iuliana Enache**, Nicoleta Stănciuc, Camelia Vizireanu, *Extraction and characterization of phytochemical compounds from cornelian cherry*, Scientific "Dunărea de Jos" University of Galați, Conference of Doctoral Schools, The 6th Edition, 7 - 8.06.2018, Book of Abstract p.181

2. **Iuliana-Maria Enache**, Nicoleta Stănciuc, Camelia Vizireanu, *Microencapsulation of biologically active compounds from cornelian cherry fruits with whey proteins isolate and accacia gum*, Banat's University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine "King Michael I of Romania" Timișoara, The 2nd International Conference on Life Sciences, 23 - 24.05.2019, Book of Abstract p. 29

3. **Iuliana Enache**, Nicoleta Stănciuc, Camelia Vizireanu, *Cornelian cherry, an important source of biologically active compounds*, University of Agronomic Sciences and Veterinary Medicine of Bucharest, The 8th edition of the International Conference Agriculture for Life, Life for Agriculture, 6 – 8.06.2019, Book of Abstract p. 51

4. **Iuliana-Maria Enache**, Nicoleta Stănciuc, Camelia Vizireanu, *The biologically active compounds from cornelian cherry - a good source of natural pigments*, "Dunărea de Jos" University of Galați, Scientific Conference of Doctoral Schools, The 7th Edition, 13 - 14.06.2019, Book of Abstract p. 225

5. **Iuliana Maria Enache**, Nicoleta Stănciuc, Camelia Vizireanu, *The cornelian cherry - a versatile source of vitamins and biologically active compounds used in food industry*, Dunărea de Jos" University of Galați, The 9th International Symposium EuroAliment, Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor Galați, 5 - 6.09.2019, Book of Abstract p. 62

6. **Iuliana-Maria Enache**, Nicoleta Stănciuc, Livia Pătrașcu Camelia Vizireanu, *Photocolorimetric analysis of Cornus mas fruit using the CIELAB color system*, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca, 18th International Conference "Life Sciences for Sustainable Development", 26 – 28.09.2019, Book of Abstract p.401

7. **Iuliana-Maria Enache**, Liliana Mihalcea, Camelia Vizireanu, *Conventional extraction optimization and HPLC identification of bioactive compounds from cornelian cherry fruits*, Dunărea de Jos" University of Galați, Scientific Conference of Doctoral Schools, The 8th Edition, 18 - 19.06.2020, Book of Abstract 231

8. **Iuliana-Maria Enache**, Gigi Coman, Liliana Mihalcea, Camelia Vizireanu, *Ultrasound-assisted extraction optimization of cornelian cherry fruits and quantitative evaluation of bioactive compounds by HPLC*, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine from Cluj-Napoca, The 19th International Conference "Life Sciences for Sustainable Development", 24 - 26.09.2020, Book of abstract, p. 275
9. **Iuliana-Maria Enache**, Anna Busuioc (Cazanevscaia), Rodica Mihaela Dinică, Camelia Vizireanu, *Ascorbic acid and total antioxidant capacity of the cornelian cherry fruits*, "Dunărea de Jos" University of Galati, Scientific Conference of Doctoral Schools, 9th Edition, 10 – 11.06.2021, Book of abstract, p. 246

### C. PROIECTE

1. 01-15.11.2019, **Director de proiect**, Proiect de mobilitate pentru cercetători, PN-III-P1-1.1-MC-2019-1908, Universidad de Burgos, Spania, Domeniul Științele vieții aplicate și Biotehnologii, Contract de finanțare pentru execuție proiecte nr. 411 din 26/11/2019.

### D. PREMII ȘI DISTINCȚII

1. **Honorable Mention** pentru lucrarea *Conventional extraction optimization and HPLC identification of bioactive compounds from cornelian cherry fruits*, "Dunărea de Jos" University of Galati, Scientific Conference of Doctoral Schools, The 8th Edition, 18 - 19.06.2020