



UNIUNEA EUROPEANĂ



**IOSUD – UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI**

**Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești**

**Proiect cofinanțat din Fondul Social European Operațional Capital Uman 2014-2020**

# TEZĂ DE DOCTORAT

## Compozite funcționale alimentare pe bază de coajă de ceapă galbenă, peptide și probiotice (Rezumatul tezei de doctorat)

Doctorand,

**Ștefania-Adelina MILEA**

Conducător științific,

**Prof. habil. dr. ing. Nicoleta STĂNCIUC**

Lucrare realizată în cadrul proiectului

„Program pentru creșterea performanței și inovării în cercetarea doctorală și postdoctorală de excelență - PROINVENT”

Contract nr: 62487/03.06.2022 POCU/993/6/13 - Cod SMIS: 153299

Seria I.7: Food Engineering Nr. 19

GALAȚI

2023



Parteneri:



Universitatea  
Ștefan cel Mare  
Suceava



USV 1842



Universitatea Națională de Arte  
George Enescu  
Iași



„Program pentru creșterea performanței și inovării în cercetarea doctorală și postdoctorală de excelență - PROINVENT”

IOSUD – UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI

Școala Doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești



# TEZĂ DE DOCTORAT (Rezumatul tezei de doctorat)

Compozite funcționale alimentare pe bază de coajă de ceapă galbenă,  
peptide și probiotice

Doctorand,

**Ștefania-Adelina MILEA**

**Președinte**

Prof. dr. ing. Gabriela-Elena BAHRIM

**Coordonator științific**

Prof. dr. ing. Nicoleta STĂNCIUC

**Referenți științifici**

Prof. dr. Natașa POKLAR  
Prof. dr. chim. Adela Mariana PINTEA  
Prof. dr.ing. Iuliana APRODU

**Seria I.7: Ingineria Produselor Alimentare Nr. 19**

**GALAȚI**

**2023**

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

**Domeniul fundamental ȘTIINȚE INGINERESTI**

- 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**
- Seria I 9: **Inginerie și management în agricultură și dezvoltare rurală**

**Domeniul fundamental ȘTIINȚE SOCIALE**

- Seria E 1: **Economie**
- Seria E 2: **Management**
- Seria E 3: **Marketing**
- Seria SSEF: **Știința sportului și educației fizice**
- Seria SJ: **Drept**

**Domeniul fundamental ȘTIINȚE UMANISTE**

- Seria U 1: **Filologie- Engleză**
- Seria U 2: **Filologie- Română**
- Seria U 3: **Istorie**
- Seria U 4: **Filologie - Franceză**

**Domeniul fundamental MATEMATICĂ ȘI ȘTIINȚE ALE NATURII**

- Seria C: **Chimie**

**Domeniul fundamental ȘTIINȚE BIOMEDICALE**

- Seria M: **Medicină**
- Seria F: **Farmacie**

## CUPRINS

	Teză	Rezumat
<b>Introducere</b>	1	1
<b>Obiective</b>	2	2
<b>STUDIUL DOCUMENTAR</b>		
<b>Capitolul 1. Compuși biologic activi din subproduse din fructe și legume: stadiul actual al cercetării</b>		
1.1. Introducere	6	-
1.2. Producția și consumul de ceapă	10	-
1.3. Descrierea morfologică, compozițională și structurală a cepei galbene	11	-
1.4. Compoziția în compuși biologic activi a cepei galbene	12	-
<b>Capitolul 2. Structura și funcția compușilor flavonoidici</b>		
2.1. Aspecte generale	14	-
2.2. Efectele polifenolilor și flavonoidelor asupra sănătății	17	-
2.3. Biodisponibilitatea polifenolilor	20	-
2.4. Stabilitatea la procesare a polifenolilor	22	-
<b>Capitolul 3. Metode de extracție, separare, purificare și identificare a flavonoidelor</b>		
3.1. Tehnici de extracție	25	-
3.2. Factori care influențează procesul de extracție	26	-
3.3. Tehnici convenționale de extracție	27	-
3.4. Tehnici avansate de extracție	27	-
3.5. Purificare și izolare	28	-
<b>Capitolul 4. Aspecte teoretice și practice despre încapsulare</b>		
4.1. Metode utilizate pentru investigarea mecanismelor de legare	29	-
4.1.1. Spectroscopie de fluorescență	29	-
4.1.2. Spectroscopie cu infraroșu	30	-
4.1.3. Spectroscopie de absorbție atomică	31	-
4.1.4. Spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară	31	-
4.1.5. Modelare și andocare moleculară	31	-
4.2. Aspecte teoretice și practice privind microîncapsularea compușilor bioactivi	32	-
4.2.1. Materiale de microîncapsulare cu accent pe relația structură-funcție a proteinelor din zer	33	-
4.2.2. Peptide bioactive derivate din proteinele din zer	35	-
4.2.3. Microîncapsulare prin coacervare	37	-
4.2.4. Microîncapsulare prin liofilizare	38	-
4.2.5. Co-microîncapsulare cu bacterii lactice	39	-
4.3. Aplicații ale microîncapsulării în diferite domenii	39	-
4.4. Bibliografie	40	-
<b>CONTRIBUȚII ORIGINALE</b>		
<b>Capitolul 5. Studiu comparativ al extracției compușilor bioactivi din cojii de ceapă galbenă din perspectivă fitochimică folosind diferite tehnici</b>		
5.1. Introducere	50	-
5.2. Obiectivele studiului	51	5
5.3. MATERIALE ȘI METODE	51	-
5.3.1. Pregătirea probelor	52	-

5.3.2. Metode convenționale și asistate de extracție solid-lichid pentru polifenoli	52	-
5.3.3. Caracterizarea fitochimică a extractelor	54	-
5.3.4. Digestibilitatea <i>in vitro</i> a flavonoidelor din extractul de coajă de ceapă galbenă	56	-
5.3.5. Identificarea compușilor biologic activi prin tehnici de cromatografie lichidă	56	-
5.3.6. Analiza GC-MS	57	-
5.3.7. Analiza statistică a datelor	57	-
5.4. REZULTATE ȘI DISCUȚII	57	
5.4.1. Analiza comparativă a profilului fitochimic al extractelor obținute prin metode convenționale și asistate	57	5
5.4.2. Identificarea și separarea cromatografică a compușilor antioxidanți din extractul de coajă de ceapă galbenă	60	7
5.4.3. Digestibilitatea <i>in vitro</i> a extractului de coajă de ceapă galbenă	65	10
5.4.4. Analiza GC-MS	66	11
5.5. Concluzii parțiale	68	12
5.6. References	69	-
<b>Capitolul 6. Condiții preliminare pentru o încapsulare eficientă a flavonoidelor din coaja de ceapă galbenă în peptidele proteinelor din zer</b>		
6.1. Introducer	72	-
6.2. Obiectivele studiului	73	14
6.3. MATERIALE ȘI METODE	73	-
6.3.1. Extracția compușilor biologic activi din coaja de ceapă folosind fluide supercritice	74	-
6.3.2. Caracterizarea compușilor biologic activi prin tehnici spectrofotometrice și cromatografice	74	-
6.3.3. Hidroliza enzimatică a principalelor proteine din zer	74	-
6.3.4. Tratamentul termic	75	-
6.3.5. Studiul mecanismelor de legare dintre compușii flavonoidici și principalele proteine din zer și peptide din zer prin spectroscopie de fluorescență	75	-
6.3.6. Studiul mecanismelor de legare dintre compușii flavonoidici și proteinele din zer și peptidele din zer prin modelare moleculară	75	-
6.4. REZULTATE ȘI DISCUȚII	76	
6.4.1. Caracterizarea în compuși biologic activi a extractului de coji de ceapă galbenă	76	14
6.4.2. Evaluarea gradului de hidroliză enzimatică a $\beta$ -lactoglobulinei	77	-
6.4.3. Evaluarea mecanismelor de legare dintre compușii biologic activi din extract și proteine/peptide prin spectroscopie de fluorescență	78	15
6.4.4. Evaluarea mecanismelor de legare între compușii biologic activi din extract și proteine/peptide prin modelare moleculară	80	16
6.5. Concluzii parțiale	84	18
6.6. Bibliografie	84	
<b>Capitolul 7. Microparticule multifuncționale pe bază de peptide/proteine din zer care conțin extract de coajă de ceapă galbenă</b>		
7.1. Introducere	87	-
7.2. Obiectivele studiului	88	19
7.3. MATERIALE ȘI METODE	88	-
7.3.1. Pregătirea probelor	89	-

7.3.2. Extracția compușilor biologic activi din cojile de ceapă galbenă și caracterizarea fitochimică a extractelor	89	-
7.3.3. Hidroliza enzimatică a $\beta$ -lactoglobulinei asistată de termolizină	89	-
7.3.4. Hidroliza enzimatică a izolatului proteic din zer cu proteinază K	89	-
7.3.5. Variante pentru microîncapsularea extractului din coji de ceapă galbenă în diferite matrice biopolimerice	90	19
7.3.6. Eficiența încapsulării flavonoidelor	91	-
7.3.7. Structura și morfologia pulberilor de microcapsule	91	-
7.3.8. Digestibilitatea <i>in vitro</i> a flavonoidelor	91	-
7.3.9. Potențialul antidiabetic	92	-
7.3.10. Efect prebiotic asupra <i>Lactobacillus bifementans</i> și <i>Lactobacillus casei</i>	92	-
7.3.11. Biscuiți aperitiv cu valoare adăugată formulați prin folosirea de flavonoide microîncapsulate din coaja de ceapă galbenă	93	-
7.3.12. Testarea acceptabilității produselor cu valoare adăugată	93	-
7.3.13. Analiza statistică a datelor	93	-
7.4. REZULTATE ȘI DISCUȚII	93	-
7.4.1. Compozite funcționale pe bază de coajă de ceapă galbenă în diferite stări moleculare ale $\beta$ -lactoglobulinei: detalii privind profilul fitochimic, structură și morfologie, bioaccesibilitate și efecte prebiotice	93	20
7.4.2. Compozite funcționale pe bază de coajă de ceapă galbenă în hidrolizat proteic din zer și poliglucide: detalii privind profilul fitochimic, structură și morfologie, bioaccesibilitate și efecte prebiotice	99	23
7.4.3. Compozite funcționale pe bază de coajă de ceapă galbenă în izolat proteic din zer și poliglucide: dovezi privind profilul fitochimic, structură și morfologie, bioaccesibilitate și efecte prebiotice	106	26
7.5. Concluzii parțiale	110	29
<b>Capitolul 8. Proiectarea unei metode ecologice de microîncapsulare a extractului flavonoidic din coaja de ceapă galbenă</b>		-
8.1. Introducere	112	31
8.2. Obiectivele studiului	112	-
8.3. MATERIALE ȘI METODE	112	-
8.3.1. Extracția cu apă fierbinte a compușilor biologic activi	113	-
8.3.2. Microîncapsularea extractului lichid din coajă de ceapă	113	-
8.3.3. Caracterizarea extractului și a pudrelor și digestibilitatea <i>in vitro</i>	114	-
8.3.4. Stabilitatea la variații de temperatură și pH a pudrelor	114	-
8.3.5. Citotoxicitatea <i>in vitro</i> a pulberilor de microcapsule	114	-
8.3.6. Microscopia confocală cu scanare laser	115	-
8.3.7. Analiza statistică	115	-
8.4. REZULTATE ȘI DISCUȚII	115	-
8.4.1. Caracterizarea extractelor și pudrelor	115	31
8.4.2. Analiza structurală și morfologică prin microscopia confocală cu scanare laser	117	32
8.4.3. Digestibilitatea <i>in vitro</i> a pudrelor	118	33
8.4.4. Citotoxicitatea <i>in vitro</i> a pudrelor	119	33
8.4.5. Stabilitatea pudrelor la variații de pH și temperatură	121	35
8.5. Concluzii parțiale	123	36
<b>Capitolul 9. Co-microîncapsularea flavonoidelor din coji de ceapă galbenă și diferite tulpini de bacterii lactice</b>		
9.1. Introducere	124	-
9.2. Obiectivele studiului	125	37

9.3. MATERIALE ȘI METODE	126	-
9.3.1. Co-microîncapsularea flavonoidelor din cojile de ceapă galbenă cu două tulpini diferite de bacterii lactice	126	37
9.3.2. Caracterizarea extractului și pulberii co-microîncapsulate cu <i>Lactobacillus casei</i> din perspectivă fitochimică	127	-
9.4. REZULTATE ȘI DISCUȚII	129	-
9.4.1. Caracterizarea fitochimică a extractului din coajă de ceapă galbenă	129	37
9.4.2. Caracterizarea fitochimică și probiotică a ingredientelor co-microîncapsulate	130	38
9.4.3. Citotoxicitatea <i>in vitro</i> a probelor microîncapsulate	131	38
9.4.4. Testarea ingredientelor co-microîncapsulate în sistem alimentar	133	39
9.4.5. Caracterizarea fitochimică a extractului și pulberii co-microîncapsulate cu <i>Lactobacillus casei</i>	134	40
9.4.6. Solubilitatea și higroscopicitatea pulberii co-microîncapsulate	135	40
9.4.7. Stabilitatea flavonoidelor în condiții gastrointestinale simulate	136	41
9.4.8. Potențialul antidiabetic și anti-inflamator	137	41
9.4.9. Citotoxicitatea <i>in vitro</i> a pulberilor microîncapsulate	138	41
9.4.10. Caracterizarea produsului alimentar nou formulat	139	43
9.4.11. Analiza CIELAB	140	43
9.5. Concluzii parțiale	140	43
<b>Capitolul 10. Creșterea eficienței de microîncapsulare și a funcționalității microparticulelor prin glicare</b>		
10.1. Introducere	142	-
10.2. Obiectivele studiului	142	45
10.3. MATERIALE ȘI METODE	143	-
10.3.1. Extracția flavonoidelor din coaja de ceapă	143	-
10.3.2. Prepararea conjugatelor izolat proteic din zer-xiloză-flavonoide	143	-
10.3.3. Profilul fitochimic al extractului și microcapsulelor	144	-
10.3.4. Măsurarea indicelui de îmbrunare și a gradului de glicare	144	-
10.3.5. Investigații <i>in silico</i>	144	-
10.3.6. Microscopia confocală cu scanare laser	144	-
10.3.7. Obținerea produselor cu valoare adăugată	144	-
10.3.8. Analiza statistică a datelor	145	-
10.4. REZULTATE ȘI DISCUȚII	145	-
10.4.1. Caracterizarea fitochimică a extractului din coajă de ceapă galbenă	145	45
10.4.2. Corelația între eficiența microîncapsulării, gradul de glicare și indicelui de îmbrunare	145	45
10.4.3. Modelare moleculară	147	46
10.4.4. Profilul fitochimic al pudrelor	149	47
10.4.5. Microscopia confocală cu scanare laser	150	47
10.4.6. Caracterizare produsului cu valoare adăugată	151	48
10.5. Concluzii parțiale	151	48
10.6. Bibliografie	152	-
<b>Capitolul 11. Concluzii finale</b>	163	50
<b>Capitolul 12. Contribuții personale și perspective pentru continuarea studiilor</b>	165	52
<b>Capitolul 13. Diseminarea rezultatelor</b>	167	54
<b>Anexe</b>		
Anexa 1: Lista de figuri	173	-



---

Anexa 2: Lista de tabele	176	-
Anexa 3: Fișă de analiză senzorială	179	-
<b>Listă de abrevieri</b>	180	-

## INTRODUCERE

În prezent, piața alimentară pe bază de produse vegetale se extinde, generând o cantitate semnificativă de produse secundare și deșeuri. Îmbunătățirea gestionării deșeurilor este un pas esențial în tranziția către o bioeconomie, deoarece ajută la reducerea consecințelor negative asupra mediului ale sectoarelor de prelucrare a fructelor și legumelor. Ca urmare, există un obiectiv larg răspândit de a dezvolta noi modalități de valorificare a acestor resurse, precum și strategii de valorificare ecologică (Sabater et al., 2020). Deșeurile agricole, produsele secundare și subprodusele sunt utilizate în producția de hrană pentru animale în întreaga lume, în timp ce deșeurile de biomasă sunt utilizate pe scară largă în producția de bioenergie. O bioeconomie responsabilă, pe de altă parte, trebuie să pună accent pe producția de alimente de înaltă calitate (Valenti et al., 2020). Conform Raportului privind amprenta risipei de alimente și schimbări climatice (FAO, 2019), în prima parte a lanțului de aprovizionare cu alimente, aproximativ 15% din toate fructele și 25% din toate legumele sunt aruncate (Basri et al., 2021). Se estimează că deșeurile alimentare vor fi de 89 de milioane de tone în fiecare an în Uniunea Europeană. În următorii patru ani, a fost sugerată o creștere a risipei alimentare cu 40% (Stenmarck et al., 2016). Conceptul zero deșeuri este o abordare eficientă pentru a îmbunătăți valorificarea deșeurilor agroindustriale generate în bunuri cu valoare adăugată, care pot fi utilizate în industria alimentară drept coloranți, antioxidanți, conservanți și multe altele (Saini et al., 2019). Deșeurile care nu sunt folosite (pielețe, coji, semințe și tescovină) includ adesea componente bioactive benefice, cum ar fi amilopectina, substanțe fitochimice, enzime, fibre alimentare și uleiuri. Deșeurile de fructe și legume conțin cantități semnificative de nutrienți și alte ingrediente nutritive care ajută la dezvoltarea hranei pentru animale, la formularea ingredientelor bioactive și la producția de etanol (Basri et al., 2021).

Strategiile de valorificare mai avansate încearcă să recupereze componente de mare valoare din subprodusele din fructe și legume, care sunt utilizate în mod obișnuit ca surse naturale de molecule bioactive în produse farmaceutice, medicamente și formulări alimentare funcționale (Lu et al., 2019). Compușii bioactivi asigură cerințe nutriționale de bază și au un efect pozitiv asupra sănătății organismului uman. Se știe că aceștia au caracteristici antioxidante, antimicrobiene sau anti-inflamatorii; totuși, aceste calități depind în mare măsură de bioactivitatea, structura chimică, doza lor, etc. Deoarece deșeurile sunt bogate în componente bioactive, acestea pot fi extrase și utilizate în producția de alimente, ingrediente sau nutraceutice, cu funcționalitate îmbunătățită. Cu toate acestea, atunci când se ia în considerare valoarea adăugată a acestor compuși bioactivi, trebuie luate în considerare mai multe procese de extracție. În plus, stabilitatea și biodisponibilitatea compușilor bioactivi sunt adesea compromise, ceea ce implică nevoia de a proiecta un sistem de livrare viabil și eficient pentru a le spori funcționalitatea specifică în organism (Saini și colab., 2019). Aceste produse secundare oferă o varietate de antioxidanți naturali, cum ar fi flavonoide (hesperetină, quercetină, genisteina și kaempferol), carotenoide (luteină și zeaxantina) și acizi fenolici.

Ceapa galbenă are niveluri ridicate de constituenți bioactivi în coji sau în stratul exterior, mai ales sub formă de glicozide, cum ar fi compușii fenolici și flavonoidici. Flavonoidele sunt pigmenți naturali care contribuie la culoarea galben-maronie a fructelor și legumelor. Proprietățile lor biologice, cum ar fi activitățile lor antioxidante, anticancerigene, antiinflamatorii și antimutagene, sunt recunoscute pe scară largă. Datorită capacității sale de a inhiba și/sau întârzia producția de radicali

liberi sau specii reactive provocate de stresul oxidativ, quercetina este poate unul dintre cei mai cercetați antioxidanți naturali. Cu toate acestea, acești compuși sunt extrem de sensibili la factorii externi de mediu, inclusiv lumina, tratamentul termic, modificările pH-ului, prezența oxigenului, ionilor, proteinelor etc., datorită caracteristicilor lor moleculare și structurale unice (Milea și colab., 2019).

Probioticele au fost recunoscute de mult timp ca stimulenți importanți ai sănătății. Probioticele sunt binecunoscute pentru potențialul lor de a ajuta la reglarea proceselor biologice. Probioticele pot activa, modifica și regla răspunsul imunologic al gazdei și pot modifica secreția de hormoni gastrointestinali și pot influența funcția creierului (Kerry et al., 2018).

Proteinele din zer sunt utilizate pe scară largă ca ingrediente alimentare funcționale în industria alimentară datorită proprietăților lor biologice *in vivo*, cum ar fi beneficiile asupra sistemelor cardiovascular, digestiv, endocrin, imunologic și neurologic. Datorită caracteristicilor lor structurale unice, proteinele din zer pot avea bioactivități care sunt codificate în secvențele lor originale de proteine, ceea ce face dificil procesul de hidroliză a enzimelor digestive (Pihlanto-Leppälä, 2000). Proteinele din zer pot fi hidrolizate de enzime pentru a produce peptide care au caracteristici benefice, inclusiv scăderea tensiunii arteriale, prevenirea cariilor dentare, coagularea sângelui, activitate antibacteriană și antivirală, promovarea relaxării și somnului, inhibarea enzimei DPP-IV și reducerea inflamației.

Au fost sugerate diferite tehnici de livrare prin microîncapsulate pentru a îndepărta instabilitatea la procesare și biodisponibilitatea polifenolilor și probioticelor, îmbunătățind astfel aroma, oferind protecție împotriva condițiilor de procesare și îmbunătățind absorbția prin tractul digestiv. Flavonoidele și bacteriile probiotice pot fi livrate direct în intestin prin încapsulare, proces care le acoperă și înglobează în materiale de încapsulare gastro-rezistente. Microîncapsularea poate fi folosită pentru a crea ingrediente alimentare noi cu aplicații funcționale îmbunătățite pentru flavonoide și probiotice. Există o varietate de materiale de încapsulare care pot fi utilizate, cum ar fi proteine cu interacțiuni hidrofobe, lipide stabilizate prin interacțiuni van der Waals și polimeri care formează rețiculare covalentă în membrane asemănătoare hidrogelului (Ye și colab., 2018).

Alegerea temei pentru teza de doctorat, intitulată „**Compozite funcționale alimentare pe bază de coajă de ceapă galbenă, peptide și probiotice**” a fost determinată de nevoia actuală de alternative științifice și tehnologice care să adauge valoare prin reintegrarea durabilă a subproduselor bioactive în alimente și ingredient inovatoare. Prin urmare, obiectivele principale ale tezei sunt concentrate pe dezvoltarea valorificării durabile a compușilor bioactivi din coaja de ceapă galbenă, proteinelor și peptidelor din zer și bacteriilor lactice în ingrediente și alimente cu o concentrație constantă de compuși țintă și caracteristici senzoriale stabile.

Principalele **obiective științifice** ale tezei de doctorat sunt:

- Profilarea diferitelor extracte obținute prin extracții convenționale și asistate solid-lichid (extracție convențională cu solvent, extracție asistată cu ultrasunete, extracție asistată cu enzime și extracție cu fluide supercritic) din perspectiva identificării celor mai potrivite condiții pentru a spori conținutul în flavonoide, polifenoli și activitate antioxidantă;
- Obținerea peptidelor bioactive din proteine din zer și testarea afinității de legare a peptidelor pentru flavonoidele din coaja de ceapă galbenă, ca o condiție prealabilă pentru o încapsulare eficientă;

- Abordări științifice și tehnologice pentru dezvoltarea ingredientelor biofuncționale, bazate pe peptide/hidrolizate și proteine din zer, extracte din coajă de ceapă galbenă, materiale de încapsulare biopolimerice și bacterii lactice, prin microîncapsulare și co-microîncapsulare;
- Diferite abordări pentru testarea proprietăților funcționale ale bioingredientului și a impactului asupra sănătății (profil fitochimic, bioaccesibilitate, activitate biologică *in vitro*, biocompatibilitate și stabilitate la depozitare);
- Dezvoltarea și caracterizarea produselor alimentare cu valoare adăugată pe bază de microparticule multifuncționale.

Teza de doctorat este structurată în **două părți**, după cum urmează:

**I. STUDIUL DOCUMENTAR** - este împărțit în 4 capitole, axate pe stadiul cercetării și pe cele mai noi tehnologii în ceea ce privește extracția compușilor biologic activi din subprodusele din fructe și legume, informații teoretice selectate despre structură și beneficii pentru sănătate, biodisponibilitate și stabilitatea procesării compușilor biologic activi. În plus, s-a considerat relevant să se adauge câteva aspecte teoretice și practice ale încapsulării.

**II. CONTRIBUȚII ORIGINALE** este formată din 7 capitole care prezintă rezultatele studiului experimental, astfel:

**Capitolul 5**, intitulat **STUDIUL COMPARATIV AL EXTRAȚIEI COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN COJILE DE CEAPĂ GALBENĂ, UTILIZÂND DIFERITE TEHNICI, DIN PERSPECTIVĂ FITOCHIMICĂ** - conține rezultate relevante obținute prin diferite metode de extracție, precum și caracterizarea fitochimică a extractelor prin metode spectrofotometrice și cromatografie în stare lichidă.

**Capitolul 6**, intitulat **CONDIȚII PRELABILE PENTRU O ÎNCAPSULARE EFICIENTĂ A FLAVONOIDELOR DIN COJILE DE CEAPĂ GALBENĂ ÎN PEPTIDELE PROTEINELOR DIN ZER** - s-a concentrat pe obținerea unor informații suficiente și relevante asupra hidrolizei proteinelor din zer și a mecanismelor de legare dintre flavonoide și peptidele  $\beta$ -lactoglobulinei prin metode cum ar fi spectroscopia de fluorescență, analiza termodinamică și modelare moleculară.

**Capitolul 7**, intitulat **MICROPARTICULE MULTIFUNCȚIONALE PE BAZĂ DE PEPTIDE/PROTEINE DE ZER CU EXTRACT DIN COJI DE CEAPĂ GALBENĂ** - prezintă rezultatele obținute prin testarea mai multor materiale de încapsulare, de la peptide la biopolimeri din punct de vedere fitochimic și biologic.

**Capitolul 8**, intitulat **PROIECTAREA UNEI METODE ECOLOGICE DE MICROÎNCAPSULARE A EXTRACTULUI DE FLAVONOIDIC DIN COJILE DE CEAPĂ GALBENĂ** - propune o strategie nouă, prietenoasă cu mediul, atât pentru tehnicile de extracție, cât și pentru cele de microîncapsulare discutate anterior, evidențind profilul fitochimic, activitatea biologică și stabilitatea la procesare a pulberilor obținute.

**Capitolul 9**, intitulat **CO-MICROÎNCAPSULAREA FLAVONOIDELOR DIN COJILE DE CEAPĂ GALBENĂ ȘI DIFERITE TULINI DE BACTERII ACIDICE LACTICE** - se concentrează pe rezultatele obținute prin utilizarea diferitelor strategii de îmbunătățire a proprietăților funcționale ale microparticulelor prin adăugarea de bacterii probiotice.

**Capitolul 10**, intitulat **CREȘTEREA EFICIENȚEI ȘI FUNCȚIONALĂȚII MICROINCAPSULĂRII MICROPARTICULELOR PRIN GLICARE** evidențiază posibilitatea utilizării conjugatelor izolat proteic din zer-xiloză ca materiale de acoperire pentru flavonoidele obținute din extracția din coji de ceapă galbenă. Microparticulele au fost adăugate într-un produs alimentar cu proprietăți funcționale îmbunătățite.

**Capitolul 11, CONCLUZII FINALE**, prezintă principalele concluzii rezultate din experimentele propuse.

Teza de doctorat conține 180 de pagini și include 43 de figuri și 42 de tabele. Studiul documentar reprezintă 25%, iar partea experimentală 75%.

În final, sunt prezentate contribuțiile personale și perspectivele pentru studiile viitoare. Diseminarea rezultatelor obținute în domeniul cercetat este evidențiată într-o listă de publicații care conține șapte articole publicate din teze de doctorat și 2 cereri de brevet. Rezultatele au fost prezentate și la peste 40 de conferințe internaționale și naționale.

Experimentele desfășurate în această teză de doctorat au fost posibile datorită infrastructurii Centrului de Cercetare Integrată, Expertiză și Transfer Tehnologic (BioAliment-TehnIA) ([www.bioaliment.ugal.ro](http://www.bioaliment.ugal.ro)), din cadrul Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor, "Dunărea de Jos", Galați.

În plus, majoritatea rezultatelor au fost obținute în cadrul proiectului PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0569-PRO-SPER (10PCCI), intitulat „Închiderea lanțurilor valorice bioeconomiei prin obținerea de bioproduse inovatoare solicitate de piață”.

De asemenea, Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Științe Biologice, București ([www.incdsb.ro](http://www.incdsb.ro)) este recunoscut pentru efectuarea testelor de citocompatibilitate.

Teza de doctorat a fost realizată sub coordonarea științifică a comitetului director:

**Profesor Nicoleta STĂNCIUC** – conducător doctorat

**Profesor Gabriela RÂPEANU** – coordonator analiza spectrofotometrică a compușilor polifenolici și metode de extracție

**Profesor Gabriela – Elena BAHIRM** – coordonator analize microbiologice și studii de microîncapsulare

**Profesor Iuliana APRODU** – coordonator modelare moleculară și mecanisme de legare.

## CAPITOLUL 5. STUDIU COMPARATIV AL EXTRAȚIEI COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN COJILE DE CEAPĂ GALBENĂ FOLOSIND DIFERITE TEHNICI, DIN PERSPECTIVA FITOCHIMICĂ

### 5.2. OBIECTIVELE STUDIULUI

Cojile de ceapă reprezintă o sursă de componente valoroase pentru sănătatea umană, datorită conținutului de substanțe fitochimice. Recuperarea substanțelor fitochimice din subproduse se referă la extracția compușilor fenolici și la validarea experimentală a activităților biologice ale acestora.

Scopul acestui studiu este de a compara profilul fitochimic și biologic al extractelor din coaja de ceapă galbenă obținute prin două metode diferite de extracție și anume: extracția convențională solid-lichid (folosind diferiți solvenți) și metode asistate de extracție solid-lichid (ultrasunete, enzimă, extracție cu fluide supercritice) din perspectiva obținerii de extracte de calitate superioară. Au fost obținute mai multe extracte, în timp ce profilarea a inclus separarea și cuantificarea compușilor polifenolici și activitate antioxidantă folosind 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) și compuși volatili. Prin urmare, au fost utilizate diferite tehnici pentru analiză, cum ar fi metode spectrofotometrice pentru cuantificarea polifenolilor și flavonoidelor, analiza cromatografică (HPLC) a flavonoidelor și identificarea compușilor prin intermediul analizei cromatografiei în stare gazoasă.

### 5.4. REZULTATE ȘI DISCUȚII

#### 5.4.1. Analiza comparativă a profilului fitochimic al extractelor obținute prin metode convenționale și asistate

Alegerea procesului de extracție precum și a parametrilor de extracție sunt esențiali pentru obținerea compușilor bioactivi. Tipul de solvent, concentrația de solvent, temperatura de extracție și metoda de extracție sunt parametrii responsabili pentru concentrația finală a compușilor bioactivi din extracte. Pentru a identifica cel mai neinvaziv și eficient protocol de extracție a compușilor biologic activi din coaja de ceapă galbenă, s-a realizat o comparație fitochimică a extractelor obținute prin diferite tehnici. Compușii polifenolici din extracte sunt prezentați în Tabelul 5.1.

**Tabelul 5.1.** Determinarea compușilor cu acțiune antioxidantă din extractele din coji de ceapă obținute prin extracție convențională și extracție asistată de ultrasunete

Compuși biologic activi	Extracție convențională	Extracție asistată de ultrasunete
TFC, mg EQ/g	334,97±19,41 <sup>a</sup>	230,63±8,36 <sup>b</sup>
TPC, mg EAG/g	150,05±5,65 <sup>a</sup>	139,67±3,82 <sup>b</sup>
AA, mM Trolox/g	312,28±2,36 <sup>a</sup>	285,90±3,86 <sup>b</sup>

Valorile medii care pe același rând nu au o literă în comun (a,b) sunt semnificativ diferite, pe baza metodei Tukey și a nivelului de încredere de 95%.

Extractul din coajă de ceapă care s-a realizat în primul studiu a fost caracterizat și a prezentat următoarele rezultate: 334,97±19,41 mg EQ/ g, 150,05±5,65mg EAG/ g și 312,28±2,36 mM Trolox/g. Extractul din coajă de ceapă galbenă din al doilea experiment a prezentat un conținut de flavonoide totale de 230,63±8,36 mg EQ/g SU, un conținut de polifenoli totali de 139,67±3,82 mg EAG/ g și valori de 285,90±3,86 mM Trolox/g, pentru activitatea antioxidantă. Activitatea antioxidantă este corelată cu o concentrație ridicată de flavonoide, ceea ce indică faptul că flavonoidele sunt responsabile în principal de activitatea antioxidantă a extractului din coji de ceapă.

În urma extracției asistată de enzime se poate observa din tabelul 5.2, că după 24 h de extracție a compușilor biologic activi din cojile de ceapă, concentrația cea mai ridicată de polifenoli și flavonoide totale a fost evidențiată prin extracția cu Zymorouge și Xilanază.

**Tabelul 5.2.** Compușii fitochimici din extractele din coji de ceapă obținute prin extracție asistată de enzime CBA

CBA	Extracție asistată de enzime		
	Celulază	Pectinază (Zymorouge)	Xilanază
TFC, mg EQ/g FW	63,36±4,51 <sup>b</sup>	108,36±3,62 <sup>a</sup>	106,85±12,49 <sup>a</sup>
TPC, mg EAG/g FW	16,22±2,01 <sup>b</sup>	25,19±3,56 <sup>a</sup>	25,17±2,44 <sup>a</sup>
AA, mM Trolox/g FW	58,7±2,19 <sup>a</sup>	51,0±1,78 <sup>b</sup>	31,9±0,83 <sup>c</sup>

Valorile medii care pe același rând nu au o literă în comun (a,b,c) sunt semnificativ diferite, pe baza metodei Tukey și a nivelului de încredere de 95%.

Contribuția enzimelor se referă la extracția compușilor bioactivi din coaja de ceapă galbenă prin ruperea integrității pereților celulari. Enzimele sunt responsabile de hidroliza componentelor din pereții celulari, crescând astfel permeabilitatea celulară și randamentul de extracție. După 24 de ore de extracție, compușii biologic activi au avut o concentrație mai mică comparativ cu celelalte tehnici de extracție. O posibilă explicație ar fi menținerea extractelor la o temperatură prea ridicată necesară inactivării enzimelor, iar scăderea concentrației de flavonoide poate indica o degradare a acestora, quercitina și kaempferolul fiind componente termolabile. În tabelul 5.3. sunt prezentate rezultatele obținute în urma extracției cu fluide supercritice.

**Tabelul 3.** Compușii fitochimici din extractele din coji de ceapă obținute prin extracție cu fluide supercritice

CBA	Extracție cu fluide supercritice			
	S40 I	S45 I	S40 II	S45 II
TFC, mg EQ/g SU	295,52±7,62 <sup>a</sup>	81,07±5,81 <sup>d</sup>	211,51±0,99 <sup>c</sup>	282,80±4,08 <sup>b</sup>
TPC, mg EAG/g SU	269,52±46,81 <sup>a</sup>	74,75±0,56 <sup>d</sup>	212,56±1,18 <sup>b</sup>	202,31±11,56 <sup>c</sup>
AA, mM Trolox/g SU	420,78±37,08 <sup>a</sup>	303,07±0,67 <sup>c</sup>	285,53±0,74 <sup>d</sup>	404,93±1,39 <sup>b</sup>

Valorile medii care pe același rând nu au o literă în comun (a,b,c) sunt semnificativ diferite, pe baza metodei Tukey și a nivelului de încredere de 95%.

Conform rezultatelor obținute în urma extracției compușilor biologic activi din cojile de ceapă, extracția cu fluide supercritice a înregistrat cea mai mare concentrație a conținutului de polifenoli și flavonoide, de 269,52±46,81 și respectiv de 295,52±7,62, precum și a activității antioxidante în fracțiunea S40 I comparativ cu celelalte fracțiuni. Totodată, valori destul de apropiate au fost obținute și pentru fracțiunea S45 II, după cum urmează: 282,80±4,08 mg EQ/g pentru TFC, 202,31±11,56 mg EAG/g pentru TPC și 404,93±1,39 mM Trolox/g pentru activitatea antioxidantă. Cele mai scăzute valori ale acestor parametri au fost înregistrate pentru fracțiunea S45I. Extracția cu fluide supercritice a înregistrat cea mai mare valoare a activității antioxidante, lucru confirmat și de concentrația cea mai ridicată de polifenoli totali.

**Tabelul 5.4.** Determinarea compușilor cu acțiune antioxidantă din extractele din coji de ceapă obținute prin extracție cu apă caldă

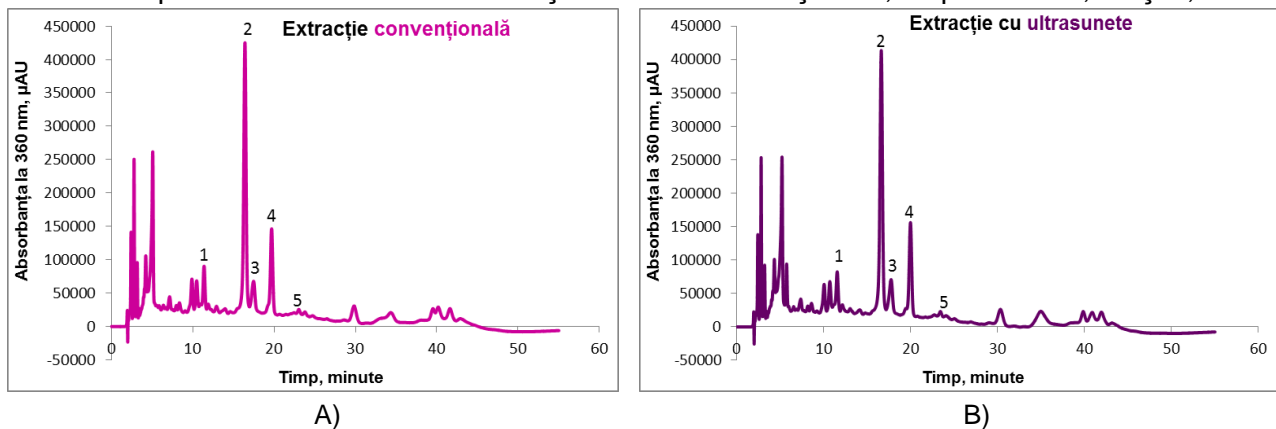
Extract flavonoidic lichid	Extract flavonoidic lichid
TFC, mg EQ/ g FW	50,21±0,09
TPC, mg EAG/ g FW	21,68±0,69
AA, mM Trolox/ g FW	250,81±6,76

În urma extracției în apă fierbinte a rezultat un lichid flavonoidic cu o activitate antioxidantă semnificativă ( $250,81 \pm 6,76$  mM Trolox/ g material vegetal), justificată de o concentrație ridicată de flavonoide ( $50,21 \pm 0,09$  mg EQ/ g material vegetal). Conținutul de polifenoli totali a fost de  $21,68 \pm 0,69$  mg EAG/ g material vegetal.

#### 5.4.2. Identificarea și separarea cromatografică a compușilor antioxidanți din extractul din coajă de ceapă galbenă

Profilul cromatografic al extractului obținut prin metoda convențională cu solvenți este prezentat în figura 4. Se pot observa câteva picuri care semnifică prezența a 5 compuși principali și anume Peak-ul (1) - quercitin 7,4-diglicozid; Peak-ul (2) - quercitin 3,4-diglicozid; Peak-ul (3) - quercitin 4-glucozid; Peak-ul (4) - quercitină; Peak-ul (5) – kaempferol. Astfel, din concentrația totală de flavonoide, compusul care a înregistrat cea mai mare valoare de 22,87% din totalul compușilor flavonoidici a fost quercitin 3,4-diglicozidul. Cea mai mica concentrație a derivaților de quercitină, de 2,98%, a fost determinată în cazul compusului quercitin 7,4-diglicozid. Quercitina și kaempferol, doi dintre compușii cei mai importanți, responsabili de activitatea antioxidantă a extractelor din coji de ceapă, au determinat valori de 7,51% și respectiv 1,12%.

În comparație cu rezultatele obținute pentru extractul obținut prin tehnică convențională, profilul cromatografic al extractului obținut prin utilizarea ultrasunetelor a evidențiat aceiași compuși (Peak-ul (1) - quercitin 7,4-diglicozid; Peak-ul (2) - quercitin 3,4-diglicozid; Peak-ul (3) - quercitin 4-glucozid; Peak-ul (4) - quercitină; Peak-ul (5) – kaempferol), însă cu o concentrație ușor mai scăzută, fapt confirmat și de caracterizarea fitochimică a extractelor. Astfel, în ceea ce privește quercitin 7,4-diglicozidul, acest compus a înregistrat o concentrație de 2,76% din totalul compușilor polifenolici în timp ce compusul majoritar din extractul studiat a fost quercitin 3,4-diglicozidul, cu o concentrație de 18,78%. În ceea ce privește quercitina și kaempferolul, s-au identificat de asemenea concentrații mai scăzute comparativ cu cea din extractul obținut tehnici convenționale, respectiv de 6,3% și 0,89%.

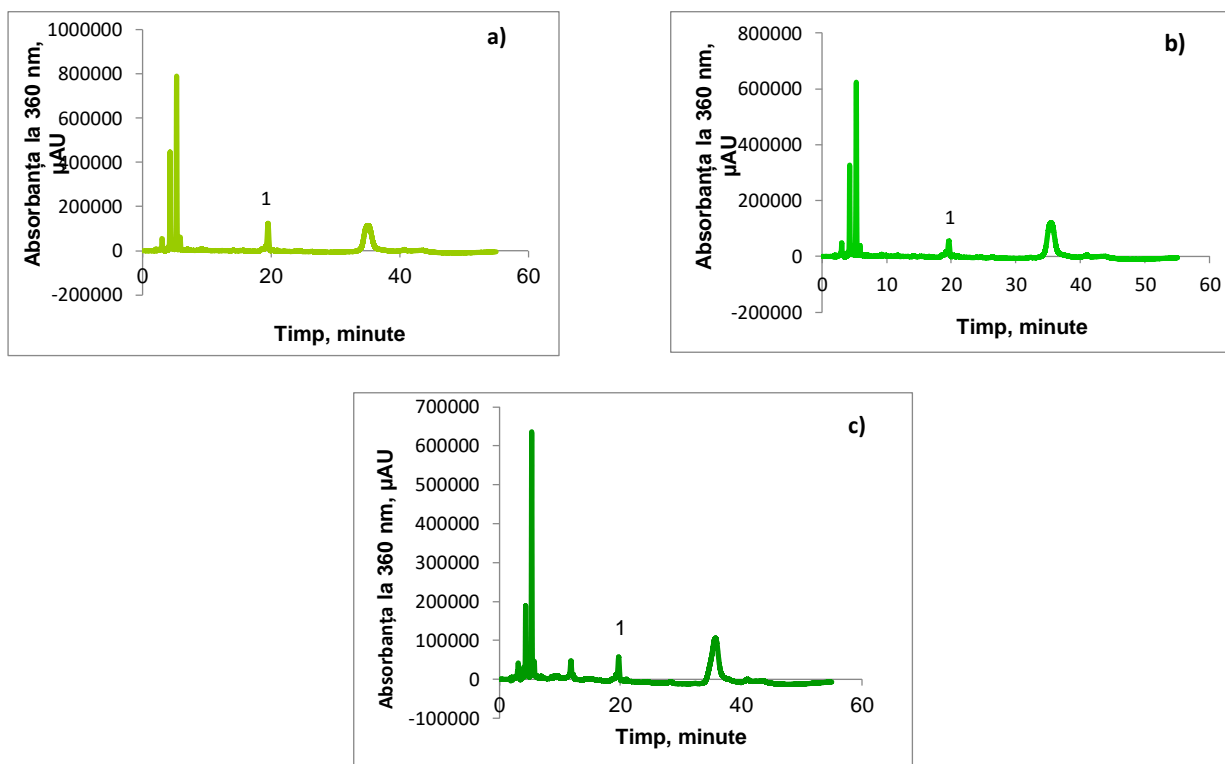


**Figura 5.6.** Profilul cromatografic al extractelor din coji de ceapă obținute în urma extracției convenționale și a extracției asistată de ultrasunete (A - extracție convențională; B - extracție asistată de ultrasunete) – Peak-ul (1) - quercitin 7,4-diglicozid; Peak-ul (2) - quercitin 3,4-diglicozid; Peak-ul (3) - quercitin 4-glucozid; Peak-ul (4) - quercitină; Peak-ul (5) – kaempferol;

O altă metodă de extracție a compușilor biologic activi studiată în literatură este extracția asistată de enzime, în acest caz pectinază, xilanază și celulază. Acest tip de extracție crește eficiența gradului de recuperare a compușilor polifenolici și este considerată a fi o metodă care nu are efecte negative asupra mediului înconjurător. Caracteristica distinctivă a enzimelor este aceea că ele pot funcționa eficient în condiții fiziologice normale, la presiune atmosferică și la un pH cuprins în



intervalul 3,0-10,0. Creșterea concentrației de enzimă utilizată conduce la o hidroliză avansată a polizaharidelor din pereții celulari, în special a rețelei de polizaharid-lignină, care în schimb poate duce la o rată de extracție mai mare a compușilor polifenolici. Profilul cromatografic rezultat în urma extracției asistată de enzime a evidențiat doar prezența quercitinei. Acest compus a prezentat cea mai mare concentrație în extractul obținut cu xilanază de 9,88%, urmat de extractul cu celuloză 4,63% și de cel cu pectinază de 4,42%.

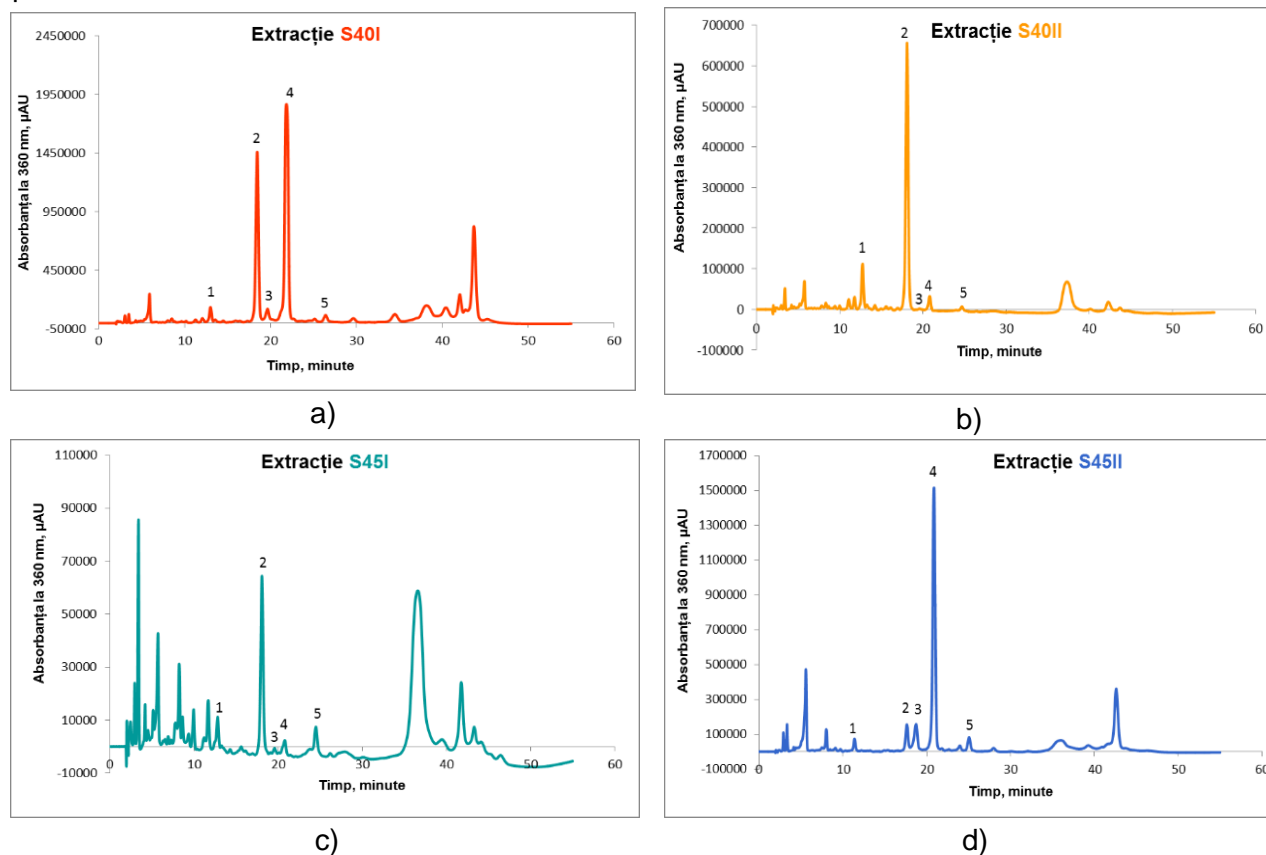


**Figura 5.7.** Profilul cromatografic al extractelor din coji de ceapă obținute în urma extracției asistată de enzime (A - xilanază; B - pectinază; C - celuloză) – Peak-ul (1) – quercitină;

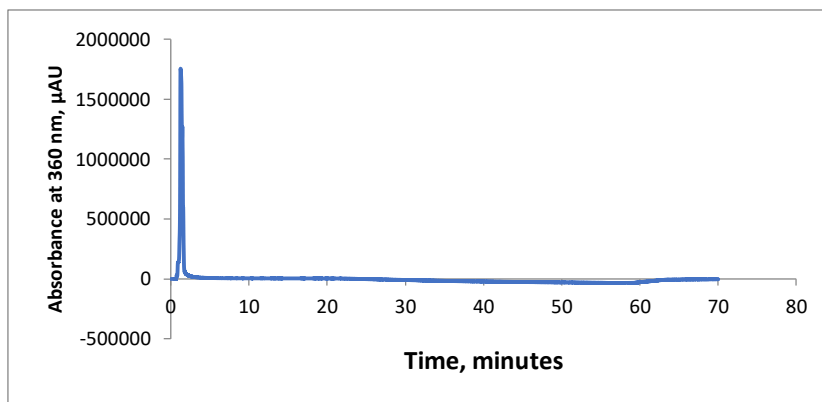
Extracția cu fluide supercritice este considerată o alternativă excelentă a metodei convenționale de extracție a compușilor bioactivi deoarece au ca rezultat extracte lipsite de solvenți organici. Profilul cromatografic al extractului obținut prin intermediul fluidelor supercritice a prezentat concentrații mai mari de compuși bioactivi în comparație cu cele ale extracțiilor anterioare, iar valorile au fost comparabile cu cele obținute la extracția convențională și cea asistată de ultrasunete. Cromatograma fracțiunii S40 arată prezența compușilor identificați și anterior, însă cea mai mare concentrație se remarcă în cazul quercitin 3,4-diglicozid cu un procent de 45,19%, în timp ce quercitina a înregistrat o concentrație de 2,41% și 1% kaempferol. Profilul cromatografic al extractului obținut din fracțiunea S45 a arătat o concentrație de 35% quercitină.

Astfel, extractul S40 I (temperatura de 40°C; presiunea de 400 atm, timp de extracție 2,5h) obținut din cojile de ceapă galbenă, a prezentat un profil cromatografic din care au fost identificați 5 compuși, respectiv quercitin 7,4-diglicozid, quercitin 3,4-diglicozid, quercitin 4-glucozid, quercitină, kaempferol. Cea mai mare concentrație a fost evidențiată pentru quercitină, de aproximativ 40%, urmată de quercitin 3,4-diglicozid cu o concentrație de 17,94% din totalul compușilor flavonoidici extrași. Cromatograma extractului S40 II (temperatura de 55°C; presiunea de 400 bari, timp de extracție 2,5h) a evidențiat prezența aceluși compuși însă cea mai mare concentrație a fost

identificată pentru quercitin 3,4-diglicozid de 45,19%, în timp ce quercitina a înregistrat o concentrație de 2.41%. Kaemperoful a prezentat concentrații în jurul valorii de 1%. Extractul obținut în celula de extracție S45 I (temperatura de 40°C; presiunea de 400 bari, timp de extracție 2,5h) a pus în evidență o concentrație mult mai scăzută a tuturor compușilor identificați comparativ cu celelalte extracte obținute prin extracție cu fluide supercritice. Astfel, cea mai mare concentrație a fost înregistrată pentru quercitin 3,4-diglicozid de 10,13% iar quercitina a prezentat o valoare de 2,02% din totalul compușilor flavonoidici. Profilul cromatografic al extractului obținut în celula S45 II (temperatura de 55°C; presiunea de 400 bari, timp de extracție 2,5h) a relevat ca și compus majoritar quercitina, de aproximativ 35%.



**Figura 5.8.** Profilul cromatografic al extractelor din coji de ceapă obținute în urma extracției cu fluide supercritice (A - S40 I; B - S40 II; C - S45 I; D - S45 II) – Peak-ul (1) - quercitin 7,4-diglicozid; Peak-ul (2) - quercitin 3,4-diglicozid; Peak-ul (3) - quercitin 4-glucozid; Peak-ul (4) - quercitină; Peak-ul (5) – kaemperol; Profilul cromatografic al extractului din cojile de ceapă obținut în urma extracției cu apă la 70°C din cojile de ceapă (Figura 5.9) a relevat prezența unui singur peak de o intensitate mare, cel mai probabil compuși din clasa acizilor polifenolici sau a chinonelor, compuși de culoare ce prezintă un coeficient de solubilitate în apă destul de ridicat. Cromatograma obținută în cazul acestui extract nu a reliefat la nici o lungime de undă prezența compușilor din clasa flavonoidelor. Acest fenomen poate fi explicat prin solubilitatea scăzută a acestor compuși în apă, astfel încât se poate concluziona că extracția cu apă nu reprezintă o metodă adecvată pentru extracția compușilor flavonoidici din cojile de ceapă.



**Figura 5.9.** Profilul cromatografic al extractului din coji de ceapă obținut în urma extracției cu apă la 70°C;

Identificarea și cuantificarea compușilor flavonoidici prin cromatografie poate fi corelată cu activitatea antioxidantă a extractului din coajă de ceapă. De obicei, valoarea crescută a activității antioxidante este datorată existenței compușilor flavonoidici (quercitină, kaempferol, miricitină, catehină), precum și derivaților secundari.

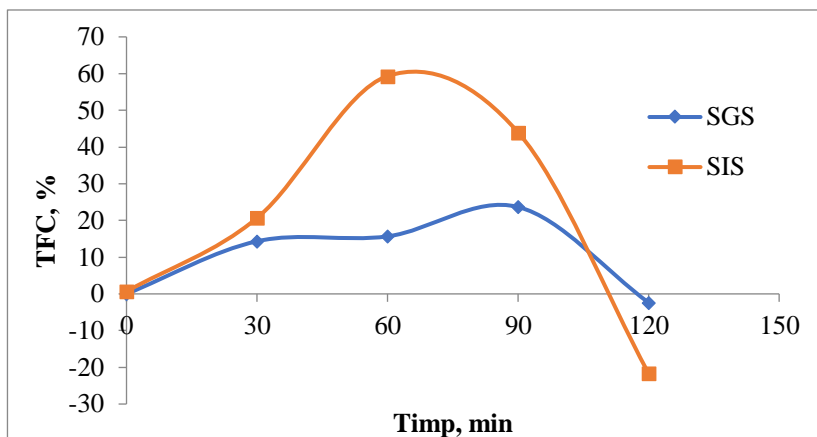
#### 5.4.3. Digestibilitatea *in vitro* a extractului din coajă de ceapă galbenă

În urma analizei componentelor fitochimice din extractele obținute, se poate concluziona faptul că o metodă optimă poate fi extracția convențională, aceasta prezentând o serie de avantaje, în raport cu celelalte tehnici, precum: durata scurtă a experimentului, dificultatea scăzută în vederea realizării acestuia, nu necesită echipamente suplimentare și nu în ultimul rând, eficiența foarte mare de extracție a compușilor de interes. Prin urmare, s-a selectat extractul obținut prin metoda convențională pentru determinarea digestibilității *in vitro* a flavonoidelor în tractul gastrointestinal.

**Tabelul 5.5.** Digestibilitatea *in vitro* a flavonoidelor din extractul convențional din coaja de ceapă  
Conținutul de flavonoide totale

Timpul de digestie	SGS	SIS
	V1	V1
0	0,1±0,001	0,1±0,001
30	0,114±0,004	0,12±0,004
60	0,115±0,006	0,159±0,021
90	0,123±0,001	0,144±0,001
120	0,095±0,002	0,078±0,001

SGS=suc gastric simulat; SIS=suc intestinal simulat



**Figura 5.10.** Digestibilitatea *in vitro* a flavonoidelor din extractul de coajă de ceapă galbenă

În primele 90 de minute de simulare a condițiilor de digestie gastrică, se poate observa o foarte ușoară creștere a concentrației de flavonoide de la  $0,1 \pm 0,001$  până la  $0,123 \pm 0,001$  EQ/ mL extract, urmată de aceeași tendință în primele 60 de minute de digestie în intestin. În următoarele 60 de minute, concentrația de flavonoide descrește, ceea ce semnifică faptul că ele suferă o degradare. Degradarea compușilor s-ar putea datora condițiilor din tractul intestinal, unde pH-ul crește brusc și devine nefavorabil pentru flavonoide. Rezultatele obținute în cadrul acestui experiment implică necesitatea căutării unor metode de îmbunătățire a stabilității compușilor fenolici sub diverse condiții, dar și de asigurare a eliberării controlate a acestora.

#### 5.4.4. Analiza GC-MS

Numărul de compuși determinați în extractul din coaja de ceapă depinde de metoda utilizată de extracție. Un număr mare de compuși a fost identificat în cazul extracției asistată de enzime. Compușii identificați aparțin următoarelor clase: alcooli, acizi, aldehide, cetone, alcani, esteri și compuși cu Sulf.

**Tabelul 5.6.** Compuși identificați în extractul de coajă de ceapă

Denumirea compusului	Timpul de retenție	Formula	Metoda de extracție/
			Suprafața peak-ului (%)
Catehol	26,59	$C_6H_6O_2$	CSE (5,44%)
			EAE (21,05%)
			SFE 40 (3,21%)
			SFE 45 (8,57%)
Acid vanilic	35,49	$C_8H_8O_4$	CSE (0,8%)
Acid tetradecanoic acid (acid miristic)	35,63	$C_{14}H_{28}O_2$	EAE (0,84%)
Acid hexadecanoic, metil ester (metil palmitat)	38,66	$C_{17}H_{34}O_2$	EAE (0,6%)

Denumirea compusului	Timpul de retenție	Formula	Metoda de extracție/
			Suprafața peak-ului (%)
Acid hexadecanoic, etil ester (etil palmitat)	40,78	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	EAE (4,7%)
Acid n-hexadecanoic (acid palmitic)	41,15	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	CSE (3,58%)
			EAE (18,03%)
Acid 9,12-octadecadienoic (Z, Z)- (acid linoleic)	43,68	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	CSE (25,87%)
			UAE (100%)
			EAE (25,81%)
			SFE 40 (20,46%)
I-(+)-Ascorbic acid 2,6-dihexadecanoate	42,59	C <sub>38</sub> H <sub>68</sub> O <sub>8</sub>	SFE 45 (58,61%)
			EAE (5,65%)
			SFE 45 (22,19%)

CSE – extracție convențională, UAE – extracție asistată de ultrasunete, EAE – extracție asistată de enzime, SFE – extracție cu fluide supercritice

Cateholul (1,2-dihidroxibenzen), un compus care se găsește în plante precum ceapa, eucaliptul, sfecla de zahăr s-a putut identifica și în extractele din coajă de ceapă, după cum urmează: 5,44% în CE, 21,05% în EAE, 3,21% în SFE 40 și 8, 57% în SFE 45. În plus, următorii fenoli au fost identificați în cantități mai mici: 2-metoxi-4-vinil fenol (p-vinil guaiacol); 2-metil-5-(1-metil etil)-fenol (carvacrol), acid vanilic. Acidul (Z Z)-9,12 octadecadienoic (acidul linoleic) a fost prezent în probele analizate. Acidul linoleic este un acid gras esențial care se găsește în fasole verde, cuișoare, kumuquat, nuci pecan. Astfel, cojile de ceapă pot fi exploatate în industria alimentară datorită proprietăților fizico-chimice și prezenței acizilor grași esențiali și a componentelor volatile.

### 5.5. Concluzii parțiale

Acest studiu și-a propus să compare profilul fitochimic și biologic al cojilor de ceapă galbenă obținute prin diferite tehnici de extracție. Rezultatele au permis să concluzioneze următoarele:

A. Extracția convențională cu solvent solid-lichid a înregistrat cea mai mare valoare pentru flavonoidele totale (334,97±19,41 mg EQ/g extract) în comparație cu tehnicile de extracție asistată.

B. Utilizarea extracției cu fluide supercritice a permis obținerea de extracte cu activitate antioxidantă mai mare, dată probabil de concentrația de polifenoli totali.

C. În ceea ce privește conținutul de polifenoli totali și flavonoide totale din extractele de coajă de ceapă obținute prin metoda extracției asistate enzimatic, s-a demonstrat că după 24 de ore, extracția cu pectinază și xilanază a dus la o concentrație mai mare în flavonoide, ducând la valori semnificative ale activității antioxidante.

D. Profilul cromatografic al extractelor obținute din cojile de ceapă galbenă prin diferite tehnici de extracție, precum extracția convențională, extracția asistată cu ultrasunete și extracția cu fluide

supercritice a relevat prezența a 5 compuși majoritari precum quercetina 7,4-diglicozidă, quercetină 3,4-diglicozidă, quercetină 4-glucozidă, quercetină și kaempferol.

E. Extractele obținute prin extracție asistată de enzime, în urma analizei HPLC-DAD, au evidențiat prezența unui singur compus, quercetina, în concentrații deficitare comparativ cu alte tipuri de extracție.

F. Extracția cu apă nu este o metodă potrivită pentru extracția compușilor flavonoide din cojile de ceapă din cauza solubilității scăzute a acestor compuși în apă.

G. Rezultatele obținute în urma experimentului de digestie *in vitro* au subliniat necesitatea îmbunătățirii stabilității compușilor fenolici expuși la diverse condiții, dar și asigurarea eliberării controlate a acestora.

H. Conținutul de acizi grași din cojile de ceapă, care a fost dezvăluit prin analiza GC-MS a fi bogat în acizi grași polinesaturați, făcându-l atractiv din punct de vedere nutrițional. Compoziția de acizi grași polinesaturați a cojilor de ceapă este un potențial de recuperare nutrițională, dar obținerea uleiurilor esențiale necesită testare prealabilă.

I. Pe baza rezultatelor obținute se poate afirma că toate metodele utilizate sunt adecvate pentru extracția polifenolilor din coaja de ceapă galbenă.

## CAPITOLUL 6. CONDIȚII PRELABILE PENTRU O ÎNCAPSULARE EFICIENTĂ A FLAVONOIDELOR DIN COJILE DE CEAPĂ GALBENĂ ÎN PEPTIDELE PROTEINELOR DIN ZER

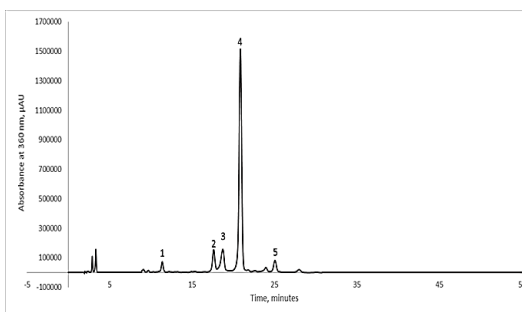
### 6.2. OBIECTIVELE STUDIULUI

Acest studiu și-a propus să investigheze posibilitatea utilizării proteinelor din zer, cum ar fi  $\beta$ -LG și a peptidelor bioactive rezultate din hidroliza enzimatică a  $\beta$ -LG pentru a lega flavonoidele extrase din coaja de ceapă galbenă. Interacțiunea dintre peptide și flavonoide a fost evaluată folosind două tehnici complementare: fluorescență și tehnici de modelare moleculară. Flavonoidele au fost extrase din cojile uscate de ceapă galbenă prin extracție cu fluide supercritice, iar extractul a fost caracterizat în ceea ce privește conținutul de flavonoide totale (TFC), conținutul de polifenoli totali (TPC) și activitatea antioxidantă. Hidroliza enzimatică asistată de termolizina a fost utilizată pentru a produce hidrolizate  $\beta$ -LG. Experimentele de stingere a fluorescenței au implicat utilizarea hidrolizatelor cu greutate moleculară mai mică de 3 kDa, denumite în continuare peptide  $\beta$ -LG ( $\beta$ -SP) mici. Rezultatele au permis calcularea parametrilor de legare precum Stern-Volmer și constantele de legare, precum și numărul de locuri de legare, în timp ce pe baza analizei termodinamice au fost identificate principalele forțe implicate în formarea complexului.

### 6.4. REZULTATE ȘI DISCUȚII

#### 6.4.1. Caracterizarea în compuși biologic activi a extractului din coji de ceapă galbenă

În acest studiu, pentru a mări solubilitatea compușilor polari și eficiența de extracție a flavonoidelor, coaja mărunțită de ceapă a fost amestecată cu o soluție hidroalcoolică și recirculată continuu cu  $\text{CO}_2$  supercritic. Extractul din coji de ceapă galbenă a prezentat o valoare a TFC de  $202,31 \pm 11,56$  mg EQ/g SU,  $282,80 \pm 4,08$  mg EAG/g SU pentru TPC și o activitate antioxidantă de  $404,93 \pm 1,39$  mM Trolox/g SU. Randamentul de extracție a fost de 0,65%, fapt ce demonstrează ideea că randamentul de extracție crește cu presiunea de extracție. Profilul cromatografic al extractului prezentat în acest studiu este reprezentat în Figura 6. Astfel, au fost identificați cinci compuși: quercitin 7,4- diglucozid, quercitin 3,4-diglucozid, quercitin 4-glucozid, quercitină și kaempferol. Cea mai mare concentrația s-a depistat în cazul quercitinei, de 39,94%, urmată de quercitin 4-glucozid cu o concentrație de 5,90%, quercitin 3,4-diglucozid cu 3,99%, quercitin 7,4-diglucozid cu 1,73%, iar kaempferolul cu o concentrație de doar 1,27% din extractul total.

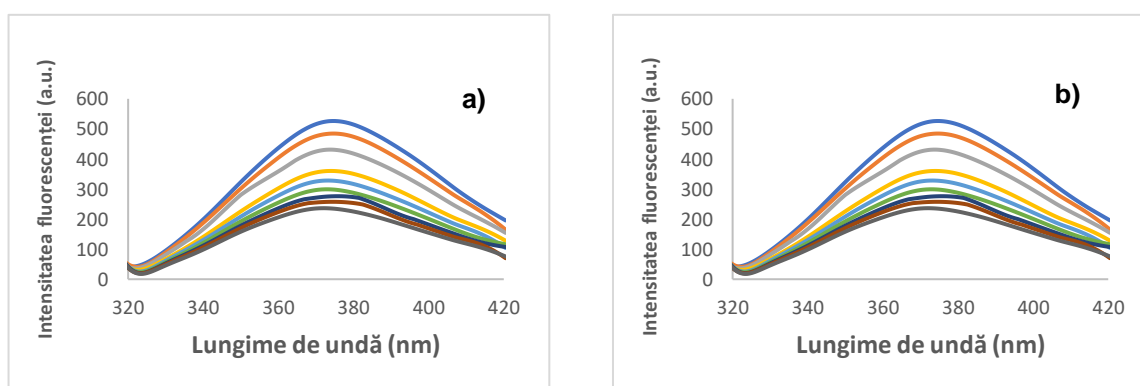


**Figura 6** Profilul cromatografic al extractului cu  $\text{CO}_2$  supercritic din coji de ceapă galbenă: Peak (1) – quercitin 7,4'-diglicozid; Peak (2) - quercitin 3,4-diglucozid; Peak (3) - quercitin 4-glucozid; Peak 253 (4) - quercitină; Peak (5) - kaempferol.

### 6.4.3. Evaluarea mecanismelor de legare dintre compușii biologic activi din extract și proteine și peptide prin spectroscopie de fluorescență

Utilizarea titrării cu liganzi în vederea stingerii fluorescenței triptofanului din proteine este o metodă rapidă și simplă pentru estimarea afinităților de legare a flavonoidelor la proteine și peptide. Interacțiunea dintre hidrolizatele de  $\beta$ -lactoglobulină și flavonoidele extrase din cojile de ceapă galbenă au fost studiate în sensul creșterii concentrației de flavonoide din amestec pe spectrele de intensitate a fluorescenței ale soluțiilor peptidice, tratate termic inițial la temperaturi cuprinse între 25°C și 100°C, timp de 15 minute. Efectul de stingere a fluorescenței s-a putut observa în cazul tuturor variantelor peptidice tratate la intervale diferite de temperatură. Creșterea concentrației de flavonoide de peste  $8,41 \times 10^{-8}$  M a dus la o stingere a fluorescenței peptidelor de aproximativ 46% (**Figura 6.1. a**), iar tratamentul termic de până la 100°C a determinat modificări conformaționale cu o rată de quenching de aproximativ 42% (**Figura 6.1. b**).

În ceea ce privește temperatura, creșterea concentrației de flavonoide nu a determinat deviații red sau blue shift, ceea ce indică faptul că adăugarea flavonoidelor nu a dus la pierderea structurii peptidice, ci doar la deteriorarea subdomeniului hidrofob de care aparține triptofanul.



**Figura 6.1.** Spectrele de fluorescență ale interacțiunii dintre hidrolizatele de  $\beta$ -LG și flavonoidele SFE la 25°C (a) și 100°C (b)

**Tabelul 6.1.** Parametrii de binding între hidrolizatele de  $\beta$ -LG și flavonoide la diferite temperaturi

T(°C)	<i>Extract SFE</i>			<i>Quercitină</i>		
	$K_{SV}(10^{-10} \text{ Mol/L})$	$K_b(10^{-8} \text{ Mol/L})$	$n$	$K_{SV}(10^{-10} \text{ Mol/L})$	$K_b(10^{-8} \text{ Mol/L})$	$n$
25	12,51±1,10	2,37±0,04	25	12,51±1,10	2,37±0,04	25
70	12,09±1,49	2,71±0,08	70	12,09±1,49	2,71±0,08	70
80	11,73±1,69	2,42±0,20	80	11,73±1,69	2,42±0,20	80
90	10,75±1,67	2,14±0,13	90	10,75±1,67	2,14±0,13	90
100	8,19±0,12	2,09±0,29	100	8,19±0,12	2,09±0,29	100

Datele prezentate în Tabelul 6.1 indică faptul că interacțiunile dintre flavonoide și peptide au urmat un mecanism static. Linearitatea ridicată a putut fi observată pe întregul interval de temperatură studiat, ceea ce indică faptul că hidrolizatele  $\beta$ -LG au moduri de legare unice. Creșterea temperaturii de la 25°C la 100°C a scăzut valorile  $K_{SV}$  de la  $12,51 \pm 1,10 \times 10^{10} \text{ L / Mol}$  la  $8,19 \pm$



0,12x10<sup>10</sup> L / Mol. În studiul de față, flavonoidele au format un complex nefluorescent cu hidrolizatul  $\beta$ -LG.

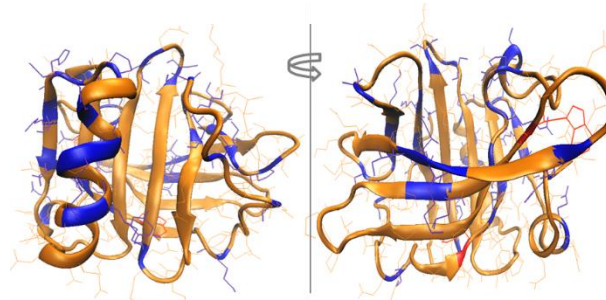
Din Tabelul 6.1 se poate observa că scăderea valorii  $K_b$  odată cu creșterea temperaturii, iar valorile  $n$  ale complexului flavonoid-peptidă sunt aproximativ egale cu 1, în cazul tuturor temperaturilor studiate. Aceste rezultate sugerează existența unui singur loc de legare pentru flavonoide. O ușoară scădere a valorilor lui  $n$  poate fi observată pe măsură ce temperatura crește. Cu toate acestea, în intervalul de temperatură de 80-100 ° C, nu există diferențe semnificative în numărul de locuri de legare. Parametrii de legare indică valori de mărime cu două ordine mai mici, iar valorile lui  $n$  indică prezența unui situs de legare pentru quercetină. Valorile mai mari ale constantelor de legare pentru extractul flavonoidic comparativ cu quercetina pot fi explicate prin existența unui spectru mai mare de compuși în extract, cu diverse afinități, care practic pot concura pentru legarea peptidei. Creșterea temperaturii nu a avut un efect semnificativ asupra conformației structurale a hidrolizatului de proteină  $\beta$ -LG, față de 100°C, când a putut fi observată o scădere a parametrilor de legare. Acest lucru ar putea fi justificat de plierea și/sau agregarea lanțurilor peptidice, care poate duce la un bloc de situsuri de legare a quercetinei. Relația liniară dintre  $\ln K_b$  și  $1/T$  sugerează că semnul entalpiei rămâne constant, în condiții de tratament termic. Se poate observa că pentru legarea dintre flavonoidele extrase din coaja de ceapă galbenă și peptide,  $\Delta H$  și  $\Delta S$  au fost  $-1149,6 \pm 18,11$  J/mol și, respectiv,  $-2,36 \pm 0,18$  J/mol. Aceste rezultate indică faptul că principalele forțe care stabilizează sistemul sunt legăturile de hidrogen și interacțiunile van der Waals.

**Tabelul 6.2.** Parametrii termodinamici pentru legarea dintre hidrolizatele de  $\beta$ -LG și flavonoidele extrase din coajile de ceapă galbenă, la diferite temperaturi

T(K)	$\Delta H$ (J/Mol)	$\Delta S$ (J/Mol·K)	$\Delta G$ (J/Mol)	R
298	-1149,6±11,20	-2,36±0,47	-446,32±11,20	0,95
343			-340,12±10,21	
353			-316,52±16,21	
363			-292,92±9,20	
373			-269,32±8,45	

#### 6.4.4. Evaluarea mecanismelor de legare dintre compușii biologic activi din extract și proteine și peptide prin modelare moleculară

Pentru completarea studiului legat de proprietățile de fluorescență din cadrul acestui experiment, s-a realizat o abordare in silico pentru a identifica detalii la nivel de atom privind comportamentul moleculelor. Având în vedere că, la nivel de laborator, pregătirea probelor a presupus obținerea peptidelor prin tratamentul termic al amestecului format din  $\beta$ -LG și termolizină, la o temperatură de 70°C, etapele de modelare moleculară s-au realizat respectând aceleași condiții de temperatură pentru modelul 3D optimizat de  $\beta$ -LG. Această abordare a permis simularea oricărui fenomen de pliere/depliere ce poate interveni asupra structurii  $\beta$ -LG și de asemenea la expunerea situsurilor susceptibile la hidroliza cu termolizină. Prin urmare, pentru a obține un grad de hidroliză de aproximativ 21%, identic cu cel calculat în cadrul experimentului de laborator, legăturile peptidice stabilite între reziduurile de aminoacizi cu o expunere de peste 3,2 Å<sup>2</sup> (Figura 6.2) au fost scindate, rezultând un amestec format din 30 de peptide diferite cu secvențe de la 2 la 19 resturi de aminoacizi și mase moleculare cu valori de la 206,24 Da la 2132.43 Da (Tabelul 6.3) și resturi libere de Leu, Ala, Ile.



**Figura 6.2.** Model 3D de  $\beta$ -lactoglobulină tratată termic la 70°C. Proteina este reprezentată în stil NewCartoon utilizând sftware-ul VMD. Situsurile de legare recunoscute de termolizină sunt marcate cu albastru, iar reziduurile de Trp sunt reprezentate cu roșu.

Așa cum au indicat și testele de stingerea a fluorescenței, adiția extractului flavonoidic a dus la scăderea fluorescenței hidrolizatului de  $\beta$ -LG. Luând în calcul condițiile experimentale utilizate în măsurătorile spectroscopiei de fluorescență (excitare la o lungime de undă de 295 nm), proprietățile fluorescente ale hidrolizatului de  $\beta$ -LG sunt atribuite celor două reziduuri de Trp localizate în pozițiile 19 și 61 din structura inițială a proteinei (Figura 6.2). Verificarea peptidelor rezultate prin hidroliza  $\beta$ -LG cu termolizină a indicat că reziduurile de Trp19 și Trp61 au devenit peptide cu o masă moleculară destul de mare de 782,85 Da și 1107,23 Da.

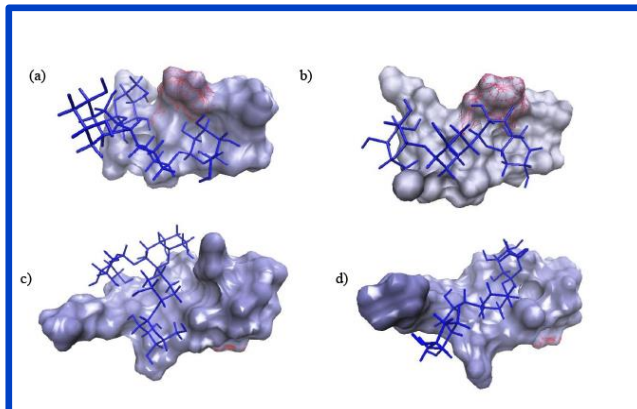
**Tabelul 6.3.** Detalii legate de peptidele rezultate în urma hidrolizei  $\beta$ -lactoglobulinei ( $\beta$ -LG) cu termolizină, obținerea unui grad de hidroliză de 21% și interacțiunea cu flavonoidele din extractul din coji de ceapă galbenă, QDG și QMG.

Numărul de reziduuri	Peptide rezultate în urma hidrolizei $\beta$ -LG cu termolizină		Energia de interacțiune, kcal/mol	
	Secvență	Masă moleculară, Da	QDG	QMG
19	Leu <sup>117</sup> -Lys <sup>135</sup>	2132,43	>0	>0
14	Val <sup>43</sup> -Ile <sup>56</sup>	1569,75	-18,56±0,59	-15,44±0,15
9	<b>Leu<sup>58</sup>-Cys<sup>66</sup></b>	1107,23	-128,22±8,92	-125,35±5,55
	Val <sup>94</sup> -Tyr <sup>102</sup>	1144,29	-17,50±4,67	-16,57±2,45
8	Leu <sup>103</sup> -Ser <sup>110</sup>	956,14	-15,30±2,66	-14,93±2,31
7	<b>Val<sup>15</sup>-Ser<sup>21</sup></b>	782,85	-15,21±0,98	-14,75±0,75
	Met <sup>24</sup> -Ser <sup>30</sup>	693,77	-16,52±0,34	-14,43±1,17
	Leu <sup>32</sup> -Pro <sup>38</sup>	701,75	-10,15±1,46	-10,28±1,02
	Ala <sup>73</sup> -Pro <sup>79</sup>	786,95	-13,38±1,06	-15,15±1,55

Peptidele cu triptofan sunt boldate. Situsurile de scindare au fost prezise cu PeptideCutter pe serverul ExPASy.

Ambele peptide au stabilit forțe de interacțiune mai mari cu QDG decât cu QMG (Tabelul 6.3). Chiar dacă peptida Leu<sup>58</sup>-Cys<sup>66</sup> include aminoacizi încărcăți negativ, contactul electrostatic cu QDG și QMG s-ar putea datora doar interacțiunilor  $\pi$ - $\pi$  și cation- $\pi$ , deoarece liganzii nu posedă sarcină electrică. Investigarea la nivel de atomi nu a indicat un contact direct între Trp din peptida Leu<sup>58</sup>-

Cys<sup>66</sup> și liganzi, inelul indol fiind localizat pe cealaltă parte a scheletului peptidei în ceea ce privește locul de interacțiune cu QDG și QMG (Figura 6.3). Considerând că nu au avut loc schimbări în mediul catenei laterale a rezidului de Trp la legarea cu flavonoide, cel mai probabil interacțiunea dintre Leu58-Cys66 și QDG sau QMG nu are ca rezultat modificarea fluorescenței.



**Figura 6.3.** Detalii legate de interacțiunea dintre peptidele cu Trp (Val<sup>15</sup>-Ser<sup>21</sup> (a și b) și Leu<sup>58</sup>-Cys<sup>66</sup> (c și d) rezultate în urma hidrolizei β-LG cu termolizină și flavonoidele extrase din cojile de ceapă galbenă (quercetin-3,4'-O-diglucozid (a și c) și quercetin-4'-O-monoglucozid (b și d))

### 6.5. Concluzii parțiale

Investigațiile despre interacțiunile dintre proteine și diferiți compuși biologic activi sunt esențiale pentru producția eficientă de noi componente de calitate alimentară, produse farmaceutice și cosmetice. Complexele flavonoide-proteine ar putea fi proiectate pentru a stimula utilizările funcționale ale flavonoidelor și pentru a depăși dezavantajele lor fundamentale, cum ar fi biodisponibilitatea. β-lactoglobulina joacă un rol important în legarea și transportul diverșilor liganzi, cum ar fi steroizi, acizi grași, retinoizi, vitamina D, colesterol, polifenoli etc. Acest studiu a analizat interacțiunea dintre peptidele rezultate din hidroliza β-lactoglobulinei cu termolizina și flavonoide extrase cu fluide supercritice dintr-un produs secundar rezultat din prelucrarea cepei. Metoda fluidelor supercritice cu CO<sub>2</sub> a dus la obținerea unui extract cu un conținut de flavonoide de 202,31±11,56 mg EQ/g SU, un conținut de polifenoli de 282,80±4,08 mg EAG/g SU și o activitate antioxidantă de 404,9±31,39 mM pentru Thelox/g SU extract de coajă de ceapă galbenă. Modificările intensității fluorescenței hidrolizatelor de proteine au permis estimarea constantei Stern-Volmer, a constantelor de legare și a numărului de situsuri de legare. Mecanismul de legare dintre flavonoide și peptide a fost static, iar principalele forțe implicate au fost legăturile de hidrogen și interacțiunile van der Waals. Numărul de situsuri de legare a fost 1 pentru toate temperaturile testate. Modelarea moleculară a arătat că legarea quercetin-3,4'-O-diglucozidei și quercetin-4'-O-monoglucozid și Val<sup>15</sup>-Ser<sup>21</sup> este în primul rând responsabilă pentru stingerea fluorescenței la adăugarea treptată a extractului de coajă de ceapă galbenă la hidrolizatului de β-lactoglobulină. Quercetin-3,4'-O-diglucozid și quercetin-4'-O-monoglucozid par să interacționeze cu toate peptidele cu 7-14 reziduuri de aminoacizi eliberate de termolizină.

## CAPITOLUL 7. MICROPARTICULE MULTIFUNCȚIONALE PE BAZĂ DE PEPTIDE/PROTEINE DE ZER CARE CONȚIN EXTRACT DIN COJI DE CEAPĂ GALBENĂ

### 1.1. OBIECTIVELE STUDIULUI

Scopul major al acestui studiu a fost testarea diferitelor variante tehnologice pentru dezvoltarea ingredientelor multifuncționale, pe bază de flavonoide, peptide bioactive și diferite combinații unice de matrice biopolimerice, pentru utilizări ulterioare în alimente cu înaltă funcționalitate sau nutraceutice, benefice pentru sănătatea umană. În plus, studiul nostru poate reprezenta o bază pentru exploatarea adecvată a subproduselor rezultate din prelucrarea industrială a legumelor, și anume coaja de ceapă galbenă.

Prin urmare, obiectivul studiului a fost valorificarea extractelor îmbogățite cu flavonoide din cojile de ceapă galbenă prin microîncapsulare în diferite combinații de biopolimeri și/sau peptide. Extractul de flavonoid îmbogățit din cojile de ceapă galbenă a fost obținut prin extracție repetată asistată cu ultrasunete și caracterizat pentru profil fitochimic și potențial antioxidant. Hidroliza enzimatică care implică două enzime (termolizina și Proteinaza K) a produs hidrolizate de proteine din zer. Combinațiile unice dintre flavonoide și matricele biopolimerice au fost microîncapsulate prin coacervare complexă și uscare prin congelare, în timp ce pulberile rezultate au fost testate pentru profilul fitochimic (conținutul total de flavonoide, conținutul total de polifenoli), activitatea antioxidantă și stabilitatea depozitării. În plus, pulberile selectate au fost testate pentru conținutul de bacterii lactice probiotice din perspectiva co-microîncapsulării.

Creșterea biodisponibilității flavonoidelor a fost testată prin experimente de digestie *in vitro*, în timp ce biocompatibilitatea *in vitro* a fost demonstrată prin testarea viabilității și compatibilității celulelor fibroblaste în prezența microcapsulelor obținute. Caracteristicile morfologice și structurale ale pulberilor au fost de asemenea evaluate prin microscopie confocală cu scanare laser. Funcționalitatea ingredientelor selectate a fost evidențiată prin încorporarea în alimente, care a fost testată din punct de vedere fitochimic și senzorial.

### 7.3. MATERIALE ȘI METODE

#### 7.3.5. Variante pentru microîncapsularea extractului de coji de ceapă galbenă în diferite matrici de biopolimer

**Experimentul 1:** Două pulberi liofilizate au fost obținute în urma realizării a două variante de microîncapsulare. Aproximativ 20 ml de hidrolizate  $\beta$ -LG au fost combinate cu 0,5 g de extract de coajă de ceapă înainte de a fi supuse la ultrasunete la  $40,0 \pm 1,0$  °C timp de 75 de minute. După aceea, amestecul a fost congelat la -70 °C și liofilizat (CHRIST Alpha 1–4 LD plus, Germania) la -42 °C sub o presiune de 0,10 mBar timp de 48 de ore. Pulberea corespunzătoare, care a inclus peptide cu mase moleculare sub 10 kDa ca material de încapsulare, a fost marcată P1. Proba P2 a fost creată prin repetarea tehnicii, însă utilizând  $\beta$ -LG nativ ca material de încapsulare. Ulterior, pulberile (P1 și P2) au fost colectate și ambalate în pungi metalice și păstrate la frigider până la analize ulterioare.

**Experimentul 2:** Două variante de pudră codificate H și I s-au obținut astfel: pentru proba H, o cantitate de 1,22 g extract de flavonoid din coajă de ceapă galbenă adusă la uscare a fost

amestecată cu 50 mL soluție 2% WPI hidrolizată cu transglutaminază și lăsată pe baia cu ultrasunete la solubilizare timp de 30 de minute. Proba a fost apoi omogenizată complet timp de 1 oră utilizând un agitator magnetic peste care s-au adăugat 0,5 g de *Lactobacillus casei* în condiții sterile. În final, omogenizarea a avut loc din nou timp de o oră urmată de liofilizare. Același protocol a fost urmat pentru obținerea probei I, singura modificare fiind înlocuirea soluției de proteine hidrolizate cu o soluție WPI 2% nehidrolizată. Probele au fost apoi liofilizate și păstrate la frigider până la utilizare.

**Experimentul 3:** Microîncapsularea a fost efectuată utilizând următoarele rapoarte maltodextrină:pectină: (M:P): 1:1 (varianta V1), 2:1 (varianta V2) și 1:2 (varianta V3). Fiecare variantă a fost omogenizată la 40°C și 450 rpm timp de 30 de minute, după care s-au adăugat 15 ml de soluție de extract și 20 ml de hidrolizat proteic (HP) și s-au amestecat din nou timp de 1 oră la 40°C și 450 rpm. Probele au fost apoi congelate la -70 °C, iar particulele de gheață au fost eliminate prin liofilizare la -42 °C timp de 48 de ore la o presiune de 0,10 mBar. Ulterior, ambele pulberi au fost colectate, ambalate în pungi metalice și păstrate în congelator la -20 °C până la analize ulterioare. Fiecare experiment a fost efectuat în dublu exemplar.

**Experimentul 4:** Pentru microîncapsularea extractului de coajă de ceapă galbenă s-a folosit ca tehnică principală liofilizarea; și amestecuri de maltodextrină, pectină și izolat de proteine din zer ca matrice de încapsulare. Au fost obținute trei variante experimentale. Astfel, varianta A folosește maltodextrină: pectină: izolat proteic din zer, în raport de 1: 1: 1, varianta B utilizează maltodextrină: pectină: izolat proteic din zer: hidrolizat proteic, în raport de 1: 1: 1: 0,5 și varianta C folosește maltodextrină: pectină: izolat proteic din zer: hidrolizat proteic din zer, în raport de 1: 0,5: 1: 0,5. Ulterior, fiecare variantă a implicat adăugarea a 1,6 g de extract etanolic dizolvat în 60 mL de apă acidulată la pH de 5,0, amestecul a fost agitat timp de o oră la 500 x g și o temperatură de 40°C. Coacervarea a implicat o scădere a pH-ului soluției la 5,0, urmată de liofilizare. Probele au fost liofilizate la o temperatură de -42°C, la o presiune de 0,10 mBar, timp de 48 de ore. Ulterior, pulberile au fost colectate, ambalate în recipiente de sticlă și depozitate la 25 °C până la caracterizare. Fiecare experiment a fost efectuat în dublu exemplar.

## 7.4. REZULTATE ȘI DISCUȚII

**7.4.1. Compozite funcționale pe bază de coajă de ceapă galbenă în diferite stări moleculare ale  $\beta$ -lactoglobulinei: detalii privind profilul fitochimic, structură și morfologie, bioaccesibilitate și efecte prebiotice**

### **Experimentul 1: Microîncapsularea flavonoidelor din cojile de ceapă galbenă în $\beta$ -lactoglobulină și hidrolizatele sale derivate din termolizină**

Gradul de hidroliză a înregistrat o valoare de  $31,94 \pm 0,49\%$ . Este cunoscut faptul că principala proteină din zer,  $\beta$ -LG, acționează ca un precursor pentru mai multe peptide funcționale. De exemplu, într-o digestie asistată de tripsină, a fost identificată prezența a cinci peptide bioactive în hidrolizatul total. De exemplu, secvențele SAPLRVY f(36–42) și LIVTQTMKG f(1–9) au fost împărțite în dipeptide și, respectiv, tripeptide. Pe de altă parte, secvența KPTPEG f(47–52) s-a dovedit a aparține celei mai lungi peptide (Val59-Ile72) obținute în condițiile experimentale luate în considerare. În studiul nostru,  $\beta$ -LG nu a prezentat activitate antioxidantă, în timp ce hidrolizatele obținute <10 kDa a avut o activitate antioxidantă de  $1,26 \pm 0,16$  mMol proteină Trolox / mg.

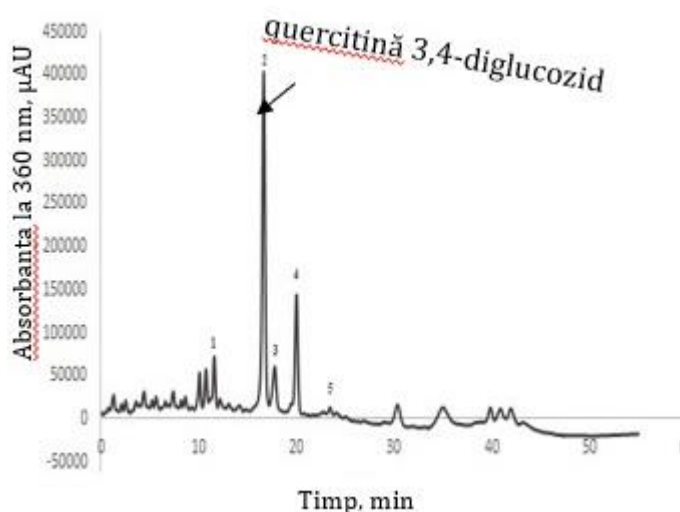
**Tabelul 7.1.** Peptides Peptidele eliberate prin hidroliza completă asistată de termolizină a  $\beta$ -lactoglobulinei

Numărul de reziduuri	Secvențe
14	Val <sup>59</sup> -Ile <sup>72</sup> *
10	Val <sup>139</sup> -Ala <sup>148</sup>
9	Leu <sup>74</sup> -Cys <sup>82</sup>
8	Leu <sup>111</sup> -Tyr <sup>118</sup>
7	Leu <sup>48</sup> -Pro <sup>54</sup> ; Ala <sup>89</sup> -Pro <sup>95</sup>
6	Ala <sup>32</sup> -Ser <sup>37</sup> ; Ala <sup>127</sup> -Ser <sup>132</sup> ; Leu <sup>172</sup> -His <sup>177</sup>
5	Leu <sup>26</sup> -Lys <sup>30</sup> ; Ala <sup>42</sup> -Ser <sup>46</sup> ; Leu <sup>103</sup> -Lys <sup>107</sup> ; Phe <sup>167</sup> -Gln <sup>171</sup>
4	Val <sup>19</sup> -Thr <sup>22</sup> ; Ala <sup>83</sup> -Lys <sup>86</sup> ; Met <sup>123</sup> -Ser <sup>126</sup> ; Ala <sup>134</sup> -Cys <sup>137</sup>
3	Met <sup>23</sup> -Gly <sup>25</sup> ; Ile <sup>100</sup> -Ala <sup>102</sup> ; Leu <sup>149</sup> -Lys <sup>151</sup> ; Phe <sup>152</sup> -Lys <sup>154</sup> ; Ala <sup>158</sup> -Pro <sup>160</sup>
2	Leu <sup>55</sup> -Arg <sup>56</sup> ; Val <sup>57</sup> -Tyr <sup>58</sup> ; Phe <sup>98</sup> -Lys <sup>99</sup> ; Phe <sup>121</sup> -Cys <sup>122</sup> ; Leu <sup>156</sup> -Lys <sup>157</sup> ; Met <sup>161</sup> -His <sup>162</sup> Ile <sup>163</sup> -Arg <sup>164</sup> ; Leu <sup>165</sup> -Ser <sup>166</sup>

\* Similiaritatea secvenței cu peptidele din BioDADPep

### Caracterizarea extractului, microîncapsularea și caracterizarea fitochimică a pudrelor

Extractul de coji de ceapă galbenă obținut de USAE a prezentat un conținut total de flavonoide de  $228,68 \pm 3,09$  mg EQ / g SU, un conținut total de compuși polifenolici de  $96,06,27 \pm 2,70$  mg echivalenți de acid galic (EAG) / g SU, și o activitate antioxidantă de  $495,89 \pm 2,42$  mM echivalenți Trolox/g SU. Mai departe, s-a realizat profilul cromatografic al extractului de coji de ceapă galbenă (Figura 7.2). Profilul a permis identificarea a 5 compuși, și anume quercitina 7,4-diglucozid, quercitina 3,4-diglucozid, quercitina 4-glucozid, quercitina și kaempferol. Compusul principal găsit a fost quercitina 3,4-diglucozid cu într-un procent de 19,29%, urmată de quercitina care a dezvăluit un conținut cu o concentrație de 7,30% din totalul flavonoidelor extrase. Primul compus identificat a fost quercitina 7,4-diglucozid, care a afișat un conținut de 2,79% din total compuși flavonoidici extrasăși în timp ce kaempferolul a afișat un conținut mai mic de 1%.



**Figura 7.2.** Analiza HPLC a extractului din coji de ceapă: Peak (1) - quercitina 7,4-diglucozid; Peak (2) - quercitină 3,4-diglucozid; Peak (3) - quercetină 4-glucozid; Peak (4) - quercitină; Peak (5) - kaempferol

Probele codificate P1 și P2 care conțin peptide cu o masă moleculară mai mică de 10 kDa și  $\beta$ -LG nativ ca material de încapsulare s-au distins prin rezultate diferite în ceea ce privește eficiența încapsulării și conținutul fitochimici. Pulberile obținute prin liofilizare au prezentat diferite rezultate pentru eficiența încapsulării, în funcție de masa moleculară. Prin urmare, valorile eficienței încapsulării au fost  $43,77 \pm 0,78\%$  pentru P1 și  $61,07 \pm 1,07\%$  pentru P2. Cea mai mare capacitate de a încapsula flavonoide din extractul de coji de ceapă a fost dat de  $\beta$ -LG și a scăzut cu dimensiunea lanțului polipeptidic. Eficiența încapsulării a depins de compoziția biopolimerilor a variat de la  $55,95 \pm 0,44\%$  la  $66,46 \pm 0,18\%$ , în funcție de raportul maltodextrină: pectină.

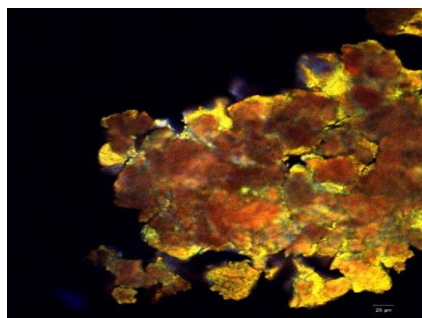
**Tabelul 7.2.** Profilul fitochimic al extractului și pulberilor obținute prin încapsularea flavonoidelor în diferite materiale: peptide obținute prin hidroliza  $\beta$ -lactoglobulinei prin termoliză și  $\beta$ -lactoglobulină

Compuși fitochimici	Extract	P1	P2
TFC, mg EQ/g SU	$228,68 \pm 3,05^c$	$339,64 \pm 2,70^a$	$329,57 \pm 4,10^b$
TPC, mg EAG/g SU	$96,06 \pm 2,70^c$	$188,26 \pm 7,13^a$	$174,66 \pm 1,29^b$
AA, mM Trolox/g SU	$495,89 \pm 2,42^b$	$503,54 \pm 2,89^a$	$495,32 \pm 0,99^b$

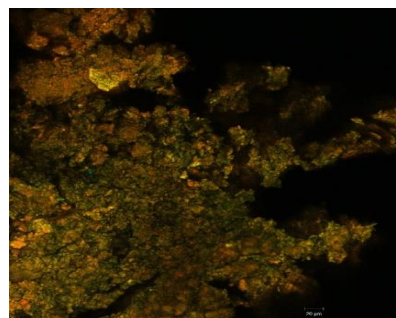
Valorile medii care pe același rând nu au o literă în comun (a,b,c) sunt semnificativ diferite, pe baza metodei Tukey și a nivelului de încredere de 95%.

### Structura și morfologia pulberilor

Analiza microscopică confocală a fost utilizată pentru a analiza design-ul microstructural al pulberilor obținute prin microîncapsularea valorilor compușilor bioactivi din cojile de ceapă galbenă folosind  $\beta$ -LG și hidrolizate ca materiale de acoperire. Imaginile confocale pentru pulbere sunt prezentate în Figura 7.3. Cea mai bună pulbere a fost P2, care a prezentat un aspect microscopic uniform, având microsferozomi mici cu diametre cuprinse între 1-2  $\mu$ m, cu emisie predominant în domeniul verde (550 nm). Tendința microsferozomilor de a se agrega în clustere poate fi observată în Figura 7.3. b. Acest fapt este bine corelat cu rezultatele obținute în ceea ce privește eficiența încapsulării. Cu toate acestea, utilizarea hidrolizatelor  $\beta$ -LG a schimbat evident structura microparticulelor. Peptidele cu masa moleculară mai mică de 10 kDa (prezentate cu galben) au determinat aglutinarea compușilor polifenolici și a flavonoidelor, ducând la coacervate mai mari de 20  $\mu$ m, având spectrul de emisie transportat în domeniul roșu (630-650 nm) (Figura 7.3. A).



a)



b)

**Figura 7.3.** Imagini confocale cu microscopie cu scanare laser pe probele obținute prin încapsularea flavonoidelor în diferite materiale de încapsulare: peptide obținute prin hidroliza  $\beta$ -lactoglobulinei prin termolizină (a) și  $\beta$ -lactoglobulină (b)

### Potențialul antidiabetic

În studiul nostru, eficiența inhibiției a scăzut în următoarea ordine P1 > P2, iar pulberile au fost în general mai active împotriva  $\alpha$ -glucozidazei decât a  $\alpha$ -amilazei, la concentrația testată (10 mg / ml). Cel mai mare efect împotriva  $\alpha$ -glucozidazei de  $44,79 \pm 0,58\%$  a fost observat în cazul P1, urmat de P2 cu  $32,76 \pm 2,08\%$  (Tabelul 8.3). P1 a fost, de asemenea, cea mai eficientă împotriva  $\alpha$ -amilazei, cu o activitate inhibitorie de  $5,28 \pm 0,31\%$ , comparativ cu efectul inhibitor al P2 de  $2,24 \pm 0,79\%$ .

**Tabelul 7.3.** Efectul pulberilor microîncapsulate asupra enzimelor asociate cu metabolismul glucidic. Rezultatele sunt raportate ca efect inhibitor (%)

Enzime	P1	P2
$\alpha$ -glucozidază	$44,79 \pm 0,58^a$	$32,76 \pm 2,08^b$
$\alpha$ -amilază	$5,28 \pm 0,31^a$	$2,24 \pm 0,79^b$

Valorile medii care pe același rând nu au o literă în comun (a,b) sunt semnificativ diferite, pe baza metodei Tukey și a nivelului de încredere de 95%.

### Experimentul 2: Microîncapsularea extractului de flavonoid în izolat de proteine din zer reticulat

Extractul flavonoidic din coji de ceapă galbenă a fost obținut prin metoda asistată de ultrasunete. Microîncapsularea a utilizat ca material de acoperire hidrolizatul proteic (Varianta H) și izolatul proteic din zer (Varianta I). Așa cum se poate observa din tabelul 7.1, o concentrație mai mare de compuși biologic activi, respectiv flavonoide ( $158,16 \pm 1,18$  mg EQ/ g SU față de  $128,95 \pm 1,42$  mg EQ/ g SU) și polifenoli ( $82,14 \pm 4,11$  mg AG/g SU față de  $70,51 \pm 5,21$  mg AG/g SU), s-a identificat în varianta H. Probabil, conținutul mai scăzut de compuși polifenolici din varianta I se datorează unei mai bune încapsulări a acestora în matricea dată de izolatul proteic din zer și de o o eliberare în condiții controlate. Această ipoteză se confirmă și de rezultatele obținute în cazul eficienței încapsulării mai mari pentru varianta I, respectiv  $25,01 \pm 2,11$  % față de  $16,20 \pm 1,82$  %. Activitatea antioxidantă a prezentat o valoare ușor mai mare în cazul variantei I ( $157,48 \pm 1,02$  mMol Trolox/g SU față de  $154,51 \pm 1,66$  mMol Trolox/g SU) datorită existenței hidrolizatului proteic în varianta H, care ar putea prezenta potențial antioxidant. Cu toate acestea, în urma obținerii rezultatelor din cadrul acestui experiment și prin comparare cu cele obținute anterior, pudra nu a fost utilizată ca ingredient funcțional.

**Tabelul 7.4.** Caracteristicile fitochimice ale probelor

CBA	H	I
TPC (mg EAG/g SU)	$82,14 \pm 4,11^A$	$70,51 \pm 5,21^B$
TFC (mg EQ/ g SU)	$158,16 \pm 1,18^A$	$128,95 \pm 1,42^B$
AA (mMol TROLOX/ g SU)	$154,51 \pm 1,66^A$	$157,48 \pm 1,02^A$
EE (%)	$16,20 \pm 1,82^B$	$25,01 \pm 2,11^A$

Valorile medii care pe același rând nu au o literă în comun (a,b) sunt semnificativ diferite, pe baza metodei Tukey și a nivelului de încredere de 95%.



### **7.4.2. Compozite funcționale pe bază de coajă de ceapă galbenă, hidrolizat de proteine din zer și poliglucide: detalii privind profilul fitochimic, structură și morfologie, bioaccesibilitate și efecte prebiotice - Experimentul 3**

#### **Hidroliza enzimatică a izolatului proteic din zer**

Hidroliza catalizată de proteinaza K a IPZ-ului a fost efectuată pe o durată de 6 ore. Extinderea duratei hidrolizei a dus la obținerea unui hidrolizat foarte amar, din cauza descompunerii peptidelor mici în timpul eliberării aminoacizilor. Prin urmare, este foarte important să se cunoască gradul de hidroliză (GH), timpul, enzimele etc. care permit obținerea unui număr mare de peptide mici mai puțin amare. În acest studiu, după 6 ore de hidroliză, hidrolizatul proteic obținut a avut un GH de  $31,20 \pm 1,23\%$ . Cu cât GH este mai mare, cu atât este mai mic numărul de peptide cu greutate moleculară mai mică. Acestea sunt cunoscute ca având efecte fiziologice în corpul uman, asupra sistemului nervos și asupra sistemului digestiv prin îmbunătățirea digestiei, activității antihipertensive și efectului hipocolesterolemiant.

#### **Eficiența încapsulării și caracterizarea pudrelor rezultate**

Eficiența încapsulării este unul dintre cei mai importanți parametri pentru a evalua includerea unui bioactiv în diferite materiale de bază. Eficiența încapsulării flavonoidelor din extractele de piele de ceapă a fost de  $55,95 \pm 0,44\%$  în **varianta 1**,  $66,46 \pm 0,18\%$  în **varianta 2** și  $57,99 \pm 1,73\%$  în **varianta 3**. Varianta 3 a înregistrat o valoare TFC de  $101,11 \pm 0,47$  mg EQ / g SU comparabilă cu celelalte variante experimentale, în timp ce conținutul total de polifenoli a fost semnificativ mai mare ( $69,26 \pm 1,03$  mg EAG / g SU). În consecință, activitatea antioxidantă a variantei 3 ( $337,57 \pm 0,89$  mM Trolox / g SU) a fost mai mare în ceea ce privește variantele 1 și 2. Trebuie remarcat faptul că variantele experimentale care conțin HP au prezentat o activitate antioxidantă satisfăcătoare, sugerând că peptidele bioactive din hidrolizatele de zer au contribuit la funcționalitatea crescută a pulberilor microincapsulate. Cu toate acestea, pe baza eficienței încapsulării și a profilului fitochimic al pulberilor, este corect să concluzionăm că o combinație dintre HP, maltodextrină și pectină, a dus probabil la formarea particulelor coloidale care au încapsulat cu succes flavonoidele din extractele de piele de ceapă.

#### **Structura și morfologia pulberilor microincapsulate**

Au fost observate plăci neregulate sau "fulgi" cu laturi variabile care măsurau  $36,32 - 42,49$   $\mu\text{m}$  și cu structură poroasă (microcavități sau fisuri pe perete) (Figura 7.5.a). În varianta 2, aspectul morfologic al microparticulelor este predominant filamentos cu lungimi variabile și cu diametrul cuprins între  $4,41$  și  $15,19$   $\mu\text{m}$ , care se termină în conformații globulare mari ( $12,44 - 36,31$   $\mu\text{m}$ ) (Figura 7.5.b). În varianta 3 (Figura 7.5.c) se observă o configurație mixtă, atât la scară ( $29,97 - 44,70$   $\mu\text{m}$ ), cât și sub forma filamentelor (expansiuni în formă de degete sau în formă de ace cu grosimea de  $5,62$   $\mu\text{m}$  și lungimea de  $73,71$   $\mu\text{m}$ ) având capete globulare (aproximativ  $6,81$   $\mu\text{m}$  diametru). Imaginile redată cu software-ul ZEN 2012 SP1 Black Edition ale pulberii colorate atât cu DAPI cât și cu Congo Red au arătat flavonoidele agregate în interiorul matricei formate între peptidele din zer și biopolimeri. Lungimile de undă de excitație pentru cei doi fluorofori, DAPI și Congo Red, au fost de  $358$  și  $497$  nm, în timp ce lungimile de undă de emisie au fost de  $463$  și respectiv  $614$  nm.

Compușii bioactivi din extractul de coji de ceapă galbenă au format grupuri mari și compacte, așa cum se poate observa în Figura 7.5 (micile particule roșii), distribuite în fracțiunile de biopolimeri (colorate în albastru). Quercitina, formează microparticule cu diametrul de  $1-2$   $\mu\text{m}$ , rareori:  $5-6$   $\mu\text{m}$ ,

care se aglomerează în clustere strânse împreună cu sferozomi (10-11  $\mu\text{m}$  diametru) formate din matricea polizaharidelor. Uneori acești sferozomi s-au agregat în vezicule mai mari (34,95  $\mu\text{m}$ ) (Figura 7.5. b și c).

Rata de supraviețuire a *Lactobacillus bifermentans* în bulion MRS suplimentat cu flavonoide microîncapsulate a fost analizată, pe parcursul a 21 de zile de depozitare la 4 ° C (Tabelul 3.2). În toate probele, viabilitatea *L. bifermentans* a înregistrat o scădere scăzută după 14 zile. Efectul stimulant ridicat asupra viabilității *L. bifermentans* a fost observat după 14 zile în **varianta 2**.

**Tabelul 7.6.** Numărul de celule *Lactobacillus bifermentans* (log UFC/g) pe parcursul a 21 de zile de depozitare

Varianta	Perioada de depozitare la 4°C			
	0	7	14	21
V1	8,47±0,03 <sup>aB</sup>	6,61±0,12 <sup>aB</sup>	3,01±0,04 <sup>bB</sup>	1,00±0,00 <sup>cC</sup>
V2	8,94±0,05 <sup>aA</sup>	8,80±0,009 <sup>aA</sup>	8,07±0,19 <sup>bA</sup>	5,17±0,01 <sup>cA</sup>
V3	8,91±0,18 <sup>aA</sup>	8,73±0,008 <sup>aA</sup>	5,75±0,01 <sup>bC</sup>	4,54±0,08 <sup>cB</sup>

Mediile care nu au în comun o literă (a, b, c) sunt semnificativ diferite  $p < 0,001$ , pe baza metodei Tukey și a gradului de încredere de 95%. Mediile care nu au în comun o literă (A, B, C) sunt semnificativ diferite  $p < 0,001$ , pe baza metodei Tukey și a gradului de încredere de 95%.

### Digestibilitatea *in vitro* a pulberilor microîncapsulate

Eliberarea *in vitro* a flavonoidelor totale din materialele de încapsulare a fost studiată în fluide gastrice simulate (SGF) și fluide intestinale simulate (SIF). Rezultatele evaluării *in vitro* a digestibilității în SGS arată că materialele de încapsulare selectate au arătat un efect protector asupra eliberării de flavonoide, în funcție de varianta experimentală (Tabelul 7.7), Variantele 1 și 2 au permis eliberarea treptată a flavonoidelor din capsule până la 15% (varianta 1) și 6% (varianta 2) după 120 de minute de digestie. Varianta 3 a prezentat un efect protector maxim, cu o ușoară scădere de maximum 2% după 120 de minute de digestie. Prin urmare, se poate aprecia că microparticulele acoperite cu maltodextrină, pectină și proteine din zer hidrolizate în raport de 2: 1: 0,5 sunt rezistente în mediul gastric, protejând astfel compușii flavonoide în timpul traversării prin stomac. În suc intestinal simulat, rezultatele au arătat că flavonoidele totale maxime sunt eliberate după 120 de minute de afecțiuni intestinale simulate în toate variantele, cu o valoare maximă înregistrată pentru varianta 2 la 27%, varianta 3 la 25% și varianta 1 la 21%%, respectiv.

**Tabelul 7.7.** Conținutul de flavonoide totale după digestia *in vitro* în sucuri gastrice și duodenale simulate

Timp (min)	SGF			SIF		
	V1	V2	V3	V1	V2	V3
0	79,96±0,63 <sup>c</sup>	89,15±0,57 <sup>b</sup>	93,99±0,40 <sup>a</sup>	82,06±1,89 <sup>A</sup>	67,42±1,77 <sup>C</sup>	67,50±1,37 <sup>B</sup>
30	85,35±2,21 <sup>b</sup>	91,67±1,72 <sup>a</sup>	92,26±0,10 <sup>a</sup>	92,38±1,95 <sup>A</sup>	80,56±0,54 <sup>B</sup>	81,23±1,61 <sup>B</sup>
60	87,81±0,31 <sup>b</sup>	92,48±0,75 <sup>a</sup>	92,58±0,66 <sup>a</sup>	94,63±1,10 <sup>A</sup>	82,79±2,74 <sup>B</sup>	83,66±1,15 <sup>B</sup>
90	89,61±1,90 <sup>b</sup>	93,59±0,36 <sup>a</sup>	92,65±0,35 <sup>a</sup>	97,54±1,78 <sup>A</sup>	87,28±1,63 <sup>B</sup>	84,08±1,81 <sup>B</sup>
120	91,52±1,96 <sup>a</sup>	94,52±1,20 <sup>a</sup>	92,40±0,20 <sup>a</sup>	103,50±2,20 <sup>A</sup>	92,04±0,85 <sup>B</sup>	90,59±1,47 <sup>B</sup>

Valorile medii care pe același rând nu au o literă (a,b,c - SGF și A,B,C - SIF) diferă semnificativ, pe baza metodei Tukey și a gradului de încredere de 95%

### Test de stabilitate la depozitare

Toate pulberile au fost păstrate la temperatura camerei timp de 28 de zile și au fost caracterizate pentru TFC și activitate antioxidantă. Pentru TFC, s-a observat un fenomen de eliberare în variantele 1 și 2, cu aproximativ 19%, respectiv 18%. În varianta 3 s-a constatat o scădere de aproximativ 18% după 28 de zile. Cu toate acestea, în variantele 1 și 2, s-a observat o creștere a TPC până la ~ 3% și, respectiv, ~ 15%, în timp ce în varianta 3, TPC crește cu 6% (Tabelul 7.8). Ca o consecință a creșterii conținutului de TFC, varianta 1 a prezentat o creștere a activității antioxidante (Tabelul 7.8) cu aproximativ 8%. Varianta 3 a prezentat o scădere a activității antioxidante, cu aproximativ 8%.

**Tabelul 7.8** Conținutul fitochimic al variantelor microîncapsulate pe parcursul a 28 de zile de depozitare

CBA	Perioada de depozitare (zile)					
	V1		V2		V3	
	0	28	0	28	0	28
<b>TFC (mg EQ/g)</b>	53,53±1,71 <sup>bc</sup>	63,52±0,08 <sup>ab</sup>	57,17±0,23 <sup>bb</sup>	67,30±1,02 <sup>aA</sup>	69,26±1,03 <sup>aA</sup>	57,12±0,72 <sup>bc</sup>
<b>TPC (mg EAG/g)</b>	98,12±0,55 <sup>aC</sup>	101,68±4,84 <sup>aC</sup>	103,75±0,57 <sup>bA</sup>	121,21±7,97 <sup>aA</sup>	101,11±0,47 <sup>bB</sup>	107,16±1,09 <sup>aB</sup>
<b>AA (mM Trolox/g)</b>	280,61±3,08 <sup>bc</sup>	304,92±1,58 <sup>aA</sup>	321,59±1,77 <sup>aB</sup>	316,95±8,51 <sup>aA</sup>	337,57±0,89 <sup>aA</sup>	311,74±2,30 <sup>bA</sup>

Valorile medii care nu au o singură literă în comun pe același rând – dependente de timp (a, b) diferă semnificativ,  $p < 0,05$ , pe baza metodei Tukey și a nivelului de încredere de 95%. Mediile care nu au o singură literă în comun pe același rând – eșantioanele dependente (A, B, C) sunt semnificativ diferite  $p < 0,05$ , pe baza metodei Tukey și a nivelului de încredere de 95%.

### **7.4.3. Compozite funcționale pe bază de coajă de ceapă galbenă în izolat proteic din zer și poliglucide: detalii privind profilul fitochimic, structură și morfologie, bioaccesibilitate și efecte prebiotice - Experimentul 4**

#### **Analiza fitochimică și fizico-chimică a ingredientelor funcționale formulate**

Analiza fitochimică a ingredientele funcționale formulate a presupus determinarea: eficienței încapsulării, conținutului de polifenoli totali, conținutului de flavonoide totale și activitatea antioxidantă. Varianta A a prezentat un conținut de polifenoli de 41,09±1,69 mg EAG/g pudră, varianta B 39,00±1,42 mg EAG/g pudră, iar varianta C 43,97±1,36 mg EAG/g pudră. În ceea ce privește conținutul de flavonoide totale, cea mai mare concentrație s-a evidențiat în amestecul din varianta B, 103,54±15,09 mg EQ/g pudră, urmată de varianta C, 99,15±8,39 mg EQ/g pudră și varianta A, 97,49±3,19 mg echivalenți quercitină /g pudră. Cea mai mare activitate antioxidantă a prezentat-o formularea aferentă variantei B (Tabel 7.9).

**Tabelul 7.9.** Caracteristicile extractului din coji de ceapă galbenă

CARACTERISTICĂ	EXTRACT FLAVONOIDIC
<b>Umiditate (%)</b>	1,74±0,21
<b>Substanță uscată (%)</b>	98,26±0,98
<b>TPC (mg acid galic/g SU)</b>	55,27±2,47
<b>TFC (mg echivalenți quercitină/g SU)</b>	97,28±3,01
<b>AA (mMol trolox/g SU)</b>	344,97±2,68

**Tabelul 7.10.** Caracteristicile fizico-chimice și fitochimice ale ingredientele funcționale formulate

Caracteristici fizico-chimice și fitochimice	A	B	C
Cenușa, %	9,79±0,08 <sup>C</sup>	10,09±0,19 <sup>B</sup>	10,51±0,01 <sup>A</sup>
Umiditate, %	4,53±0,03 <sup>A</sup>	4,54±0,09 <sup>A</sup>	4,55±0,06 <sup>A</sup>
Substanțe proteice, %	22,6±0,001 <sup>C</sup>	27,9±0,012 <sup>B</sup>	28,4±0,17 <sup>A</sup>
Glucide, %	63,08±0,12 <sup>A</sup>	54,47±0,9 <sup>C</sup>	56,54±0,24 <sup>B</sup>
Valoarea energetică, kcal la 100 g	351,28	337,71	348,25
Eficiența încapsulării, %	91,54±0,99 <sup>A</sup>	90,55±1,38 <sup>A</sup>	89,46±1,62 <sup>A</sup>
TPC (mg acid galic/g SU)	41,09±1,69 <sup>A</sup>	39,00±1,42 <sup>B</sup>	43,97±1,36 <sup>A</sup>
TFC (mg echivalenți quercitină/g SU)	97,49±3,19 <sup>A</sup>	103,54±15,09 <sup>A</sup>	99,15±8,39 <sup>A</sup>
AA (mmol trolox/g SU)	130,94±4,57 <sup>C</sup>	147,75±4,33 <sup>A</sup>	141,04±1,64 <sup>B</sup>

Valorile suprascriptelor din același rând cu litere distincte (A,B,C) sunt semnificativ diferite la  $p < 0,05$ , pe baza metodei Tukey.

Din Tabelul 7.10 se poate observa că adăugarea de peptide bioactive derivate din hidroliza izolatului proteic din zer cu un conținut ridicat de peptide bioactive a condus la o creștere a conținutului de proteine în formulările B și C, ceea ce a contribuit, de asemenea, la creșterea activității antioxidante generale a formulărilor funcționale aferente. Stabilitatea ingredientelor funcționale formulate a fost verificată prin păstrare la 25 °C timp de 35 de zile în ceea ce privește variația substanțelor fitochimice și a activității antioxidante și este prezentată în Tabelul 7.11.

**Tabelul 7.11.** Variația conținutului de componente fitochimice în ingredientele funcționale formulate în timpul depozitării la 25 °C

CBA	Perioada de depozitare (zile)					
	V1		V2		V3	
	0	35	0	35	0	35
TFC (mg EQ)/g	97,49±3,19 <sup>aB</sup>	94,52±2,46 <sup>aA</sup>	103,54±1,09 <sup>aA</sup>	87,14±0,68 <sup>bB</sup>	99,15±1,39 <sup>aB</sup>	87,65±2,98 <sup>bB</sup>
TPC (mg EAG/g)	41,09±1,69 <sup>aB</sup>	38,79±2,06 <sup>aA</sup>	39,00±1,42 <sup>aB</sup>	33,35±0,59 <sup>bB</sup>	43,97±1,36 <sup>aA</sup>	38,31±0,92 <sup>bA</sup>
AA (mM Trolox/g)	130,94±0,57 <sup>aA</sup>	127,75±1,75 <sup>aA</sup>	117,75±4,33 <sup>bB</sup>	114,79±0,70 <sup>bC</sup>	131,04±1,64 <sup>aA</sup>	120,94±1,79 <sup>bB</sup>

Valorile medii care nu au o singură literă în comun pe același rând – dependent de timp – 0 vs. 35 de zile (a, b) diferă semnificativ, pe baza metodei Tukey și a nivelului de încredere de 95%. Valorile medii care nu au o singură literă în comun pe același rând – probe V1 vs. V2 vs. V3, la același timp (A, B, C) sunt semnificativ diferite, pe baza metodei Tukey și a gradului de încredere de 95% nivel.

O scădere a conținutului de polifenoli totali în toate variantele experimentale, între 5 și 15%, se poate observa din Tabelul 7.11, care indică o stabilitate relativ mare la depozitare a compușilor polifenolici. În ceea ce privește conținutul total de flavonoide, o stabilitate mai mare a conținutului total de flavonoide în varianta V1, care nu conține hidrolizat proteic, se poate observa în Tabelul 7.11. Scăderea conținutului de flavonoide este de 11-15% pentru variantele V2 și V3. După cum era de așteptat, reducerea conținutului de compuși biologic activi a dus la o scădere a activității antioxidante la depozitarea ingredientelor funcționale formulate.

### Caracterizarea ingredientelor din punct de vedere al potențialului prebiotic

Variantele experimentale ale ingredientele funcționale formulate au fost utilizate pentru testarea efectului fiziologic asupra activității metabolice a celulelor de *Lactobacillus casei* ssp. *paracasei*, pudrele fiind adăugate în mediul de cultură specific, MRS lichid, în proporție de 0,5% și 2%. Cultivarea s-a realizat la temperatura de 37°C, timp de 48 de ore, în condiții de aerobioză. În mediul fermentat păstrat, timp de 14 de zile, la temperatura de 4°C s-a determinat viabilitatea

celulelor de *L. casei* prin numărare indirectă (ISO 8261 IDF122:2001), prin cultivare pe mediul MRS agar cu 1% CaCO<sub>3</sub>, timp de 48 ore, la temperatura de 37°C. Numărul de celule viabile s-a exprimat în log ufc/mL mediu fermentat.

**Tabelul 7.12.** Viabilitatea celulelor de *L. casei* 431<sup>®</sup> (log ufc/mL) la cultivarea pe mediul MRS suplimentat cu 0,5% ingredientele funcționale formulate

Perioada de depozitare (zile)	A	B	C
0	8,17±0,18 <sup>aA</sup>	8,22±0,07 <sup>aA</sup>	8,25±0,15 <sup>aA</sup>
7	7,12±0,11 <sup>bB</sup>	7,36±0,01 <sup>aB</sup>	7,06±0,07 <sup>bB</sup>
14	5,30±0,14 <sup>bC</sup>	5,30±0,11 <sup>bC</sup>	5,60±0,13 <sup>aC</sup>

Valorile medii care nu au o literă în comun pe același rând (a, b, c) și aceeași coloană (A, B, C) sunt semnificativ diferite p < 0,05, pe baza metodei Tukey și a nivelului de încredere de 95%.

**Tabelul 7.13.** Viabilitatea celulelor de *L. casei* 431<sup>®</sup> (log ufc/mL) la cultivarea pe mediu MRS suplimentat cu 2% ingredientele funcționale formulate

Perioada de depozitare (zile)	A	B	C
0	7,68±0,15 <sup>aA</sup>	7,35±0,11 <sup>bA</sup>	7,61±0,15 <sup>aA</sup>
7	7,04±0,11 <sup>aB</sup>	6,48±0,14 <sup>cB</sup>	6,70±0,11 <sup>bB</sup>
14	5,63±0,09 <sup>cC</sup>	6,00±0,17 <sup>bC</sup>	6,24±0,13 <sup>aC</sup>

Valorile medii care nu au o literă în comun pe același rând (a, b, c) și aceeași coloană (A, B, C) sunt semnificativ diferite p < 0,05, pe baza metodei Tukey și a nivelului de încredere de 95%.

Rezultatele demonstrează eficiența ingredientelor funcționale formulate asupra menținerii viabilității bacteriilor lactice. Concentrația mai mare de ingrediente funcționale formulate (2%) având un efect benefic, comparativ cu concentrația mai redusă (0,5%), cu grade de reducere a viabilității după 14 zile de păstrare în condiții de refrigerare, de 1,36 (V1) și respectiv 1,22 (V2 și V3).

#### Aplicații ale ingredientelor funcționale formulate pentru obținerea biscuiților aperitiv

Datorită creșterii gradului de conștientizare a consumatorilor și dezvoltării unui stil de viață și a unei diete sănătoase, piața componentelor și alimentelor bioactive s-a extins masiv. În timpul pregătirii și păstrării alimentelor, este încă dificil să se garanteze funcționalitatea și disponibilitatea componentelor bioactive. În acest studiu, a fost elaborată o rețetă de biscuiți cu valoare adăugată pentru a le crește caracteristicile funcționale și senzoriale. Au fost studiate componentele bioactive și caracteristicile organoleptice, după cum urmează.

**Tabelul 7.14.** Caracteristicile fitochimice ale biscuiților aperitiv cu adaos de ingredientele funcționale formulate

Caracteristici	M1	A1	B1	C1
TPC (mg EAG/g SU)	0,00±0,00 <sup>B</sup>	0,30±0,03 <sup>A</sup>	0,25±0,04 <sup>A</sup>	0,28±0,11 <sup>A</sup>
TFC (mg EQ/g SU)	0,69±0,10 <sup>C</sup>	2,61±0,78 <sup>A</sup>	2,41±0,56 <sup>A</sup>	1,23±0,32 <sup>B</sup>
AA (mMOL TROLOX/g SU)	7,67±1,57 <sup>C</sup>	16,04±0,12 <sup>A</sup>	15,50±0,21 <sup>B</sup>	15,58±0,17 <sup>B</sup>

Valorile suprascriptelor din același rând cu litere distincte (A, B, C) diferă semnificativ, pe baza metodei Tukey (p < 0,05).

Biscuiții pentru aperitiv cu adaos de ingrediente funcționale formulate au prezentat valoare adăugată în ceea ce privește conținutul de flavonoide totale, compuși polifenolici și activitate antioxidantă. Rezultatele analizei senzoriale sunt prezentate în Tabelul 7.15.

### Analiza senzorială a biscuiților

Analiza senzorială a fost realizată cu ajutorul a 9 paneliști, cu vârste între 25 și 44 ani, cercetători din cadrul facultății Știința și Ingineria Alimentelor (Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați). S-a utilizat scara hedonică de apreciere prin atribute senzoriale pe o scară de la 1 la 9 (1 – intensitatea minimă a atributului, 9 – intensitatea maximă a atributului). Rezultatele obținute pentru caracteristicile fitochimice sunt prezentate în Tabelul 7.15.

**Tabelul 7.15.** Rezultatele analizei senzoriale ale biscuiților aperitiv cu adaos de ingredientele funcționale formulate

Caracteristica analizată	M	A	B	C
Intensitatea culorii	3,00	7,89	6,66	7,22
Omogenitatea culorii	3,67	7,33	6,66	6,78
Aspect	5,44	6,67	5,89	6,89
Aroma de condiment	1,67	3,67	4,67	4,56
Gust dulce	2,33	2,55	2,67	3,78
Gust de unt	5,22	6,00	4,89	6,11
Gust sărat	4,44	5,78	6,33	5,67
Mouthfeel	5,11	6,44	5,44	6,56
Duritate	3,00	3,22	2,67	3,44
Crocantă	2,77	3,00	2,56	3,33
Acceptabilitate	5,22	7,22	6,68	7,67

Toate cele trei variante cu adaos de ingredientele funcționale formulate au obținut un scor general mai mare comparativ cu proba martor, varianta 3 fiind cel mai bine apreciată de paneliști.

### 7.5. Concluzii parțiale

A. În studiul asociat cu primul experiment, peptidele bioactive derivate din  $\beta$ -lactoglobulină sunt utilizate pentru încapsularea flavonoidelor obținute din cojile de ceapă galbenă. Posibilitatea de microîncapsulare a flavonoidelor din coji de ceapă galbenă a fost examinată între  $\beta$ -lactoglobulină și hidrolizatele acesteia obținute folosind termolizină. Influența peptidelor asupra controlului activităților antioxidante și antidiabetice a fost descoperită printr-o examinare comparativă a ambelor tipuri de microcapsule. Pulberea care conținea  $\beta$ -LG nativ ca material de acoperire a fost cea mai fină pulbere, având microsferozomi mici (1–2  $\mu\text{m}$ ), în timp ce peptidele au influențat flavonoidele să se aglutine, rezultând coacervate mai mari de 20  $\mu\text{m}$ . Rezultatele acestei cercetări pot fi în concordanță cu ideea că  $\beta$ -lactoglobulina împreună cu peptidele sale ar putea fi utilizate în abordări inovatoare pentru încapsularea flavonoidelor. Rezultatele acestei cercetări pot fi în concordanță cu ideea că  $\beta$ -lactoglobulina împreună cu peptidele sale ar putea fi utilizate în abordări inovatoare pentru încapsularea flavonoidelor. Aceste formulări ar putea fi utile pentru a dezvolta nutraceutice ca alternative la aditivii sintetici, dar sunt necesare studii suplimentare pentru a crea și caracteriza proprietățile funcționale ale acestora înainte de a putea fi utilizate în alimente.

B. Microparticulele pe bază de extract de coajă de ceapă galbenă încapsulat în proteină din zer și proteină din zer reticulat au prezentat un conținut ridicat de fitochimice, dar o valoare mai mică de flavonoide, în ceea ce privește eficiența încapsulării. Datorită biodisponibilității generale scăzute a compușilor polifenolici nativi, rezultatele nu au fost utilizate în continuare pentru alte teste.

C. Flavonoidele din coaja de ceapă au fost încapsulate eficient într-o matrice complexă bazată pe diferite proporții de hidrolizate de proteine din zer, maltodextrină și pectină (experimentul 3). Conform analizei *in silico*, unele tetrapeptide rezultate din hidroliza  $\alpha$ -lactalbuminei și  $\beta$ -

lactoglobulinei pot fi deosebit de importante datorită funcției lor antimicrobiene și activității inhibitoare a enzimei de conversie a angiotensinei. Toate variantele microîncapsulate au avut un conținut important de flavonoide și activitate antioxidantă. Rezultatele au indicat că raportul maltodextrină:pectină:hidrolizate de proteine din zer de 2:1:0,4 a arătat o eficiență mai mare de încapsulare a flavonoidelor de  $66,46 \pm 0,18\%$ . Digestibilitatea *in vitro* și stabilitatea la depozitare confirmă importanța tehnicii de microîncapsulare asupra compușilor biologic activi. Flavonoidele încapsulate din cojile de ceapă galbenă au potențialul de a fi utilizate ca ingredient alimentar funcțional cu efect benefic asupra sănătății consumatorului sau au un efect prebiotic asupra bacteriilor lactice.

D. Ingredientele obținute din maltodextrină, pectină și izolat proteic din zer ca materiale de încapsulare pentru extractele etanolice din cojile de ceapă galbenă sunt bogate în compuși biologic activi, cu o concentrație mare de flavonoide. În plus, ingredientele funcționale formulate, microîncapsulate prin liofilizare, conțin peptide obținute prin hidroliza enzimatică a proteinelor din zer, recunoscute pentru activitatea lor biologică și funcțională excepțională, tradusă în efecte benefice asupra sistemului imunitar, cardiovascular, nervos și gastrointestinal. Se poate aprecia că studiul propus este potrivit atât pentru menținerea viabilității unor bacterii probiotice, cât și pentru adăugarea ca ingredient în diverse formulări alimentare drept colorant natural, adăugând valoare funcțională prin conținutul de compuși biologic activi precum flavonoide și compuși polifenolici cu activitate antioxidantă ridicată.

## CAPITOLUL 8. PROIECTAREA UNEI METODE ECOLOGICE PENTRU MICROÎNCAPSULAREA EXTRACTULUI FLAVONOIDIC DIN COJI DE CEAPĂ GALBENĂ

### 8.2. OBIECTIVELE STUDIULUI

Obiectivele acestei lucrări au fost de a testa dacă un solvent prietenos cu mediu și ieftin ar putea fi folosit pentru extracția flavonoidelor din cojile de ceapă galbenă. Extractul va fi încapsulat într-o combinație de izolate de proteine din zer, hidrolizate de proteine din zer, maltodextrină și pectină pentru a evalua proprietățile funcționale ale pulberii rezultate. Experimentele implică studiul eficienței de încapsulare a flavonoidelor, conținutul de flavonoide, conținutul de polifenoli, activitatea antioxidantă, digestia *in vitro* și stabilitatea fitochimicelor în diferite intervale de temperatură și pH.

Citocompatibilitatea pulberilor a fost evaluată folosind fibroblaste de șoarece pentru a evalua eliberarea de compuși potențial toxici din probele microîncapsulate, precum și impactul proliferativ. Descoperirile acestui studiu pot avea implicații pentru maximizarea bioactivității flavonoidelor din pielea de ceapă galbenă în formularea de combinații benefice pentru sănătate cu calități funcționale superioare.

### 8.4. REZULTATE ȘI DISCUȚII

#### 8.4.1. Caracterizarea extractului din coajă de ceapă galbenă și a pudrelor

Prin utilizarea apei fierbinți ca solvent pentru extracția compușilor polifenolici din coji de ceapă galbenă, extractul a prezentat un conținut total de flavonoide de  $50,21 \pm 0,09$  mg EQ / g SU, un conținut total de polifenoli de  $21,68 \pm 0,69$  mg EAG / g SU și o activitate anti-oxidantă de  $250,81 \pm 6,76$  mM Trolox / g SU.

**Tabelul 8.1.** Profilul fitochimic al pulberilor microîncapsulate

Variante	Eficiența încapsulării, %	TFC, mg EQ/g SU	TPC, mg EAG/g SU	AA, mM Trolox/g SU
W1	76,55±2,62 <sup>ab</sup>	26,91±2,93 <sup>a</sup>	21,24±0,57 <sup>a</sup>	102,76±0,82 <sup>b</sup>
W2	83,51±1,81 <sup>a</sup>	20,75±0,78 <sup>b</sup>	18,57±0,32 <sup>b</sup>	109,28±0,12 <sup>a</sup>

Valorile sunt prezentate ca medie ± abatere standard. Conform tehnicii Tukey, valorile superscriptului pentru aceeași coloană care nu au aceeași literă (a și b) sunt diferite statistic la  $p < 0,05$ .

Din datele prezentate în Tabelul 8.1, se poate observa că microîncapsularea în IPZ, MD și P a extractelor de flavonoidice prin uscare prin congelare a permis o eficiență mai mare de încapsulare a flavonoidelor de aproximativ 84%, în comparație cu utilizarea IPZ, MD, WPH și P. Combinația biopolimerică a Variantei W1 a permis o mai bună retenție a polifenolilor, în timp ce Varianta W2 a arătat o concentrație mai mare de flavonoide. Ingredientele liofilizate au un profil fitochimic important, o activitate antioxidantă și un efect protector bun, în special în timpul digestiei simulate, facilitând adăugarea lor în diferite matrici alimentare.

Matricele au fost selectate în ceea ce privește dezvoltarea unei pulberi mai stabile, multifuncționale și mai sigure. O scurtă analiză a lucrărilor anterioare a evidențiat utilizarea preponderent a proteinei din gumă arabică, MD sau IPZ, într-o singură formă sau în combinație, pentru microîncapsularea polifenolilor. Selectarea proteinei din zer s-a bazat pe calitatea nutrițională ridicată și pe proprietățile funcționale semnificative ale acesteia. MD este adesea folosit ca material de acoperire datorită solubilității bune în apă, vâscozității reduse și conținutului redus de zahăr. HP



sunt considerate o sursă de peptide bioactive pentru alimentele funcționale, cu activitate antibacteriană și antivirală și proprietăți antiinflamatorii.

Rezultatele au arătat că varianta W2 afișează un conținut mai mic de flavonoide și polifenoli și o activitate antioxidantă mai mare. Acest lucru ar putea fi posibil datorită influenței peptidelor bioactive care ar putea prezenta o activitate antioxidantă mai mare și, de asemenea, încapsularea unor alte clase de polifenoli, care ar putea fi, de asemenea, responsabile pentru activitatea antioxidantă mai mare. Pulberile au fost testate pentru stabilitatea compușilor fitochimici după 30 de zile de depozitare la 4 ° C. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 8.2.

**Tabelul 8.2.** Stabilitatea fitochimică în pulberile microîncapsulate în timpul depozitării

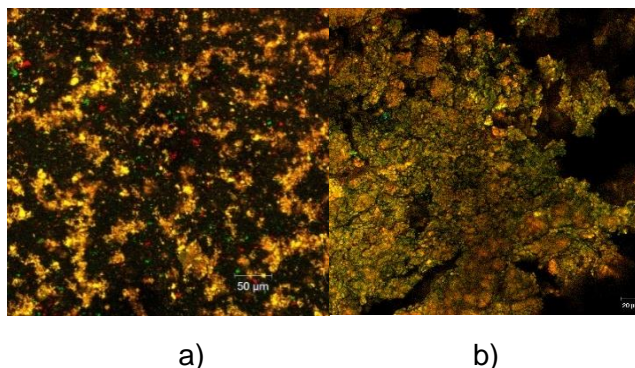
Variante	TFC, mg EQ/g SU	TPC, mg EAG/g SU	AA, mM Trolox/g SU
W1	22,35±0,60 <sup>a</sup>	19,56±0,05 <sup>a</sup>	82,23±0,92 <sup>b</sup>
W2	22,74±0,18 <sup>a</sup>	18,91±0,18 <sup>b</sup>	86,99±1,15 <sup>a</sup>

Valorile sunt prezentate ca medie ± abatere standard. Conform tehnicii Tukey, valorile superscriptului pentru aceeași coloană care nu au aceeași literă (a și b) sunt diferite statistic la  $p < 0,05$ .

Tabelul 8.2 arată că varianta W2 a avut o stabilitate fitochimică îmbunătățită, rezultând o creștere cu 10% a flavonoidelor, în timp ce varianta W1 a avut o pierdere de 17% în flavonoide. De asemenea, s-a observat că polifenolii sunt stabili în varianta W2, în timp ce au scăzut cu aproximativ 8% în varianta W1. Activitatea antioxidantă a scăzut cu 20% în ambele versiuni.

#### 8.4.2. Design-ul microstructural al pulberilor prin microscopie confocală

Analiza CLSM a celor două variante de pulberi a prezentat caracteristici importante în ceea ce privește morfologia și modelul structural. Imaginile au fost obținute prin scanare punct cu punct, la o rezoluție înaltă într-un câmp larg cu ajutorul focalizării digitale, fiind capturate după colorarea probelor (Figura 8.2a; b).



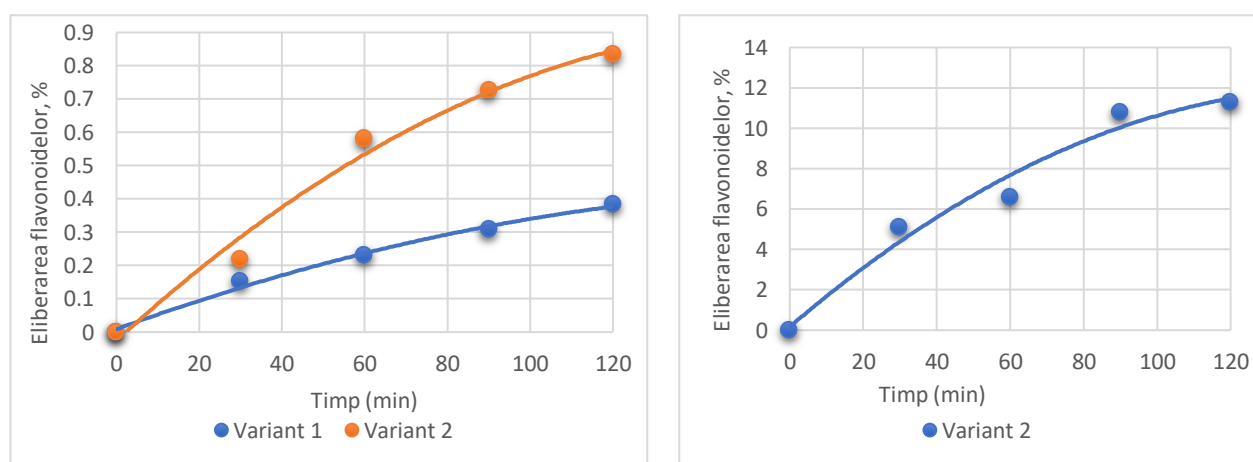
**Figura 8.2.** . Imagini microscopice confocale obținute cu software-ul ZEN 2012 SP1 (ediția neagră) a celor două probe de pulbere obținute prin încapsularea flavonoidelor extrase din cojile de ceapă galbenă din diferite materiale: Varianta W1 - IPZ: WHP: MD: P - 2: 0,5: 1: 0,5 (a), Varianta W2 - IPZ: MD: P - 2: 1: 0,5 (b)

Flavonoidele reprezintă un grup valoros mare de compuși polifenolici cu o capacitate antioxidantă ridicată, fiind de origine vegetală, cu peste 4500 de compuși diferiți, care furnizează un spectru variabil de absorbție-emisie care depinde de fiecare profil biochimic al sursei de extracție. Prin analiza microscopică confocală, s-a evaluat proiectarea micro-structurală a pulberilor obținute.

Prin marcarea fluorescentă a celor două pulberi colorate fluorescent, s-a putut observa o matrice bine individualizată formată din microsferozomi foarte mici, plini cu flavonoide și polifenoli, împreună cu matricea de microîncapsulare. Dintre cele două pulberi obținute, după cum se poate observa din Figura 5.1, din punct de vedere structural, cea mai fină pulbere a fost varianta 1 (Figura 5.1a), care a prezentat un aspect microscopic destul de uniform sub formă de microsferozomi foarte mici cu diametre mai mici de 2  $\mu\text{m}$ , emițând în jurul valorii de 550 nm, în timp ce pentru varianta 2, microsferozomii observați au prezentat tendința de a se aglomera în grupuri mai mari.

#### 8.4.3. Digestibilitatea *in vitro* a flavonoidelor

În acest studiu s-a observat comportamentul *in vitro* al flavonoidelor microîncapsulate în condiții gastrice simulate (SGS) și intestinale (SIF). O stabilitate semnificativă a flavonoidelor a fost remarcată în SGS (Figura 8.3 a) pentru ambele variante, cu o ușoară creștere a flavonoidelor, până la aproximativ 1% în varianta W2. Prin urmare, se poate afirma că flavonoidele au fost protejate cu succes prin intermediul materialelor de acoperire selectate.

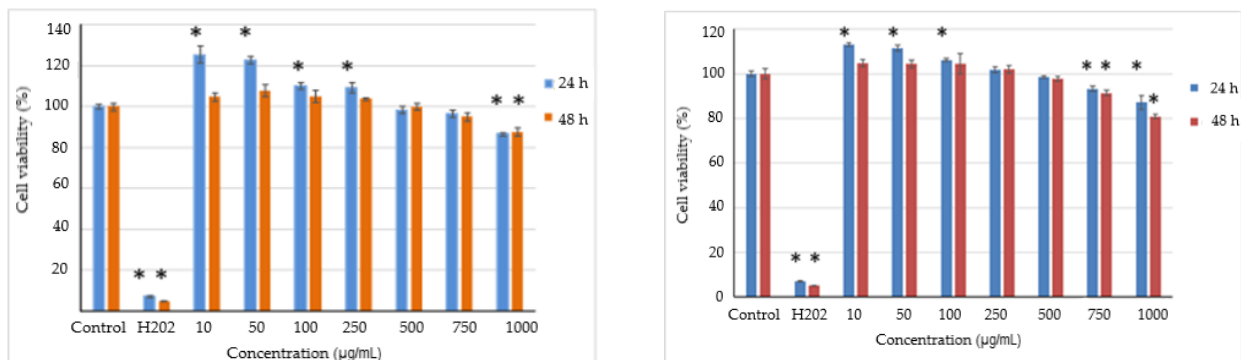


**Figura 8.3.** Eliberarea flavonoidelor (%) după digestia *in vitro* în sucurile gastrice (a) și intestinale (b) simulate.

Nu s-au detectat flavonoide în varianta W1 în SIS, sugerând o posibilă capacitate maximă de absorbție. În varianta W2, rezultatele au indicat că flavonoidele totale au fost eliberate pe o durată de 120 de minute în condițiile simulate intestinale, cu o valoare maximă înregistrată de 11%.

#### 8.4.4. Citotoxicitatea *in vitro* a pulberilor microîncapsulate

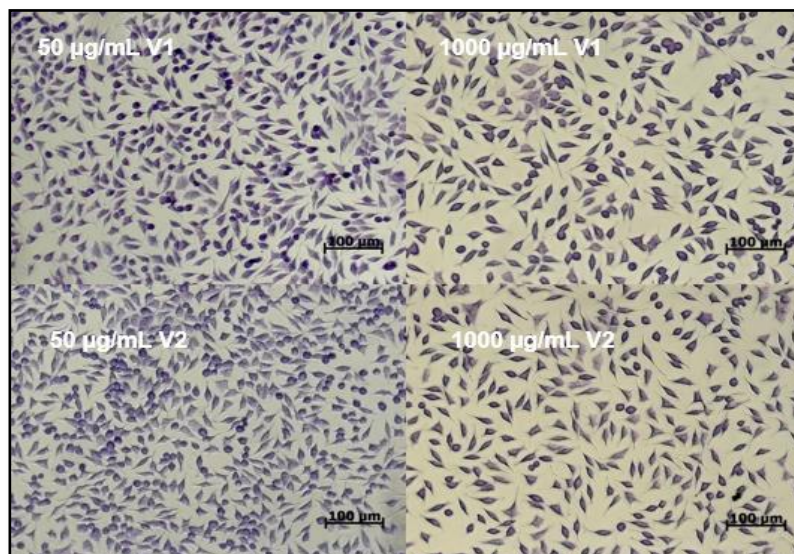
Posibila prezență și eliberare a oricărui compuși toxici din pudre și viabilitatea celulară au fost analizate în cultura de celule fibroblaste L929 prin testare NR. Rezultatele au arătat că extractele de ceapă microîncapsulate nu au prezentat un efect citotoxic în domeniul concentrațiilor testate, după 24 ore și 48 ore de cultivare (> 80% viabilitate celulară) (Figura 8.4).



**Figura 8.4.** Viabilitatea celulară a fibroblastelor L929 cultivate în prezența extractelor de coji de ceapă galbenă microîncapsulate (varianta W1 (A) și varianta W2 (B) timp de 24 h și respectiv 48 h, determinate prin testul NR. Rezultatele au fost exprimate în procent raportate la cultura martor (netratată), considerată ca având 100% viabilitate. Valorile reprezintă media  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \*  $p < 0,05$ , comparativ cu controlul.

Valorile viabilității celulare s-au situat între 81% -113% pentru varianta W1 și 87% -125% pentru varianta W2 și au scăzut prin creșterea concentrației de pudră. Aceste date indică faptul că citocompatibilitatea variantelor microîncapsulate este de până la 1 mg / ml. Mai mult, concentrațiile între 10-100  $\mu\text{g} / \text{mL}$  pentru varianta 1 și 10-250  $\mu\text{g} / \text{mL}$  pentru varianta W2 au stimulat proliferarea celulară după 24 de ore de cultivare, în contrast cu cultura martor, cu cele mai mari valori pentru varianta 2. O ușoară scădere a viabilității celulare a fost înregistrată pentru concentrații mai mari de 750-1000  $\mu\text{g} / \text{mL}$  pentru varianta 1 și 1000  $\mu\text{g} / \text{mL}$  pentru varianta W2, până la 80% și, respectiv, 87%.

Examinarea morfologiei celulare a fost corelată cu datele cantitative NR (Figura 3.7). Imaginile au arătat că celulele tratate cu pudre microîncapsulate și-au menținut fenotipul fusiform normal, caracteristic pentru celulele fibroblaste, similar culturii netratate.

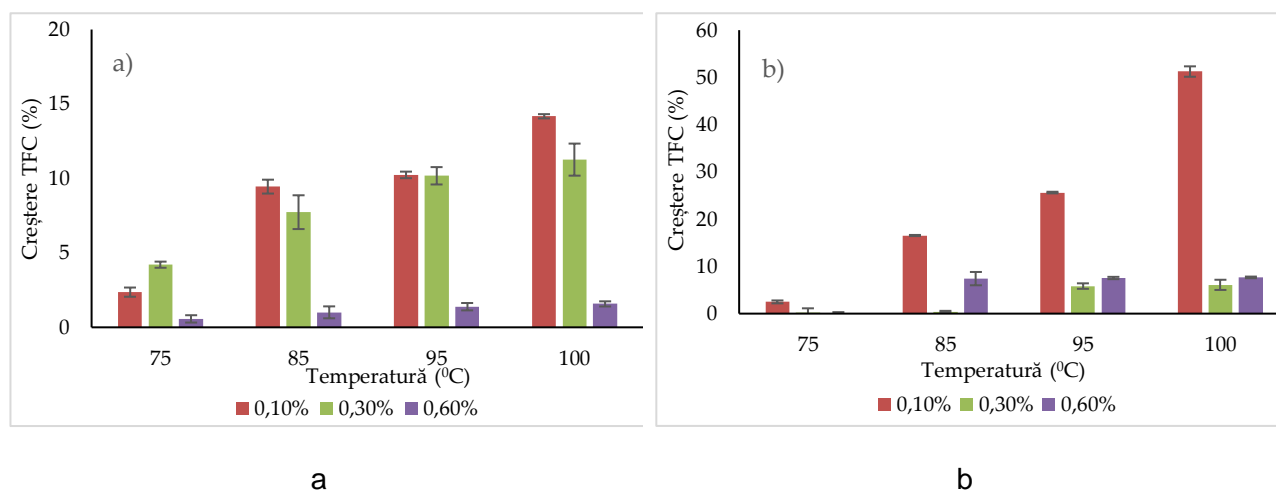


**Figura 8.5.** Micrograf0069ce ale celulelor L929 tratate cu variante microîncapsulate de extracte de coji de ceapă galbenă timp de 48 de ore

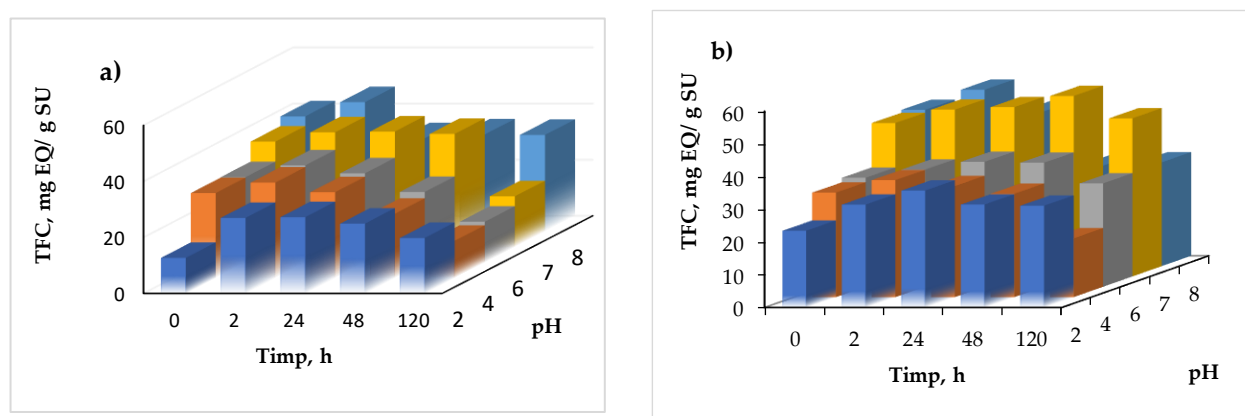
Distribuția celulară pe placa de cultură a fost uniformă, în timp ce densitatea a fost comparabilă cu cea a culturii netratate. La concentrații cuprinse între 10-100  $\mu\text{g/ml}$ , s-a observat o densitate celulară mai mare decât cea a matorului. Când s-au adăugat concentrații mai mari de pulberi, densitatea celulei a scăzut în plăcile de cultură.

#### 8.4.5. Stabilitatea pudrelor la variații de temperatură și pH

Pentru a utiliza pulberile ca ingrediente funcționale, este important să investigăm comportamentul termic și la pH al compușilor bioactivi într-un sistem simulat, datorită faptului că multe alimente funcționale care conțin compuși bioactivi susceptibili degradării sunt de obicei supuse tratamentelor termice și variațiilor de pH. Prin urmare, concentrația selectată de pulberi, variind de la 0,1 până la 0,6%, a fost dizolvată în apă dizolvată și supusă la diferite temperaturi (de la 25 °C la 100 °C) timp de 15 minute. Conținutul de flavonoide a fost măsurat după tratamentul termic (Figura 8.6). Încălzirea a provocat o creștere a conținutului de flavonoide, probabil din cauza degradării termice a matricelor de microîncapsulare și a eliberării compușilor.



**Figura 8.6.** Efectul tratamentului termic asupra flavonoidelor eliberate din pulberile microîncapsulate (a) varianta W1, b) varianta W2)



**Figura 8.7.** Efectul pH-ului asupra conținutului de flavonoide din pulberile microîncapsulate (a) varianta W1, b) varianta W2)

Eliberarea flavonoidelor din microcapsule s-a dovedit a fi dependentă de temperatură și concentrație. În varianta 1, cea mai mare eliberare de aproximativ 14% a fost găsită la 0,1% și 100 ° C, în timp ce în varianta 2, o eliberare semnificativă mai mare de 51% a fost găsită în condiții similare. Prin urmare, s-ar putea aprecia că varianta W2 a avut mai puțin efect protector atunci când s-a aplicat un tratament termic. În ceea ce privește stabilitatea la diferite valori ale pH-ului, rezultatele sunt prezentate în Figura 3.10. Stabilitatea pH-ului a fost verificată la o valoare constantă pentru perioade variabile de timp, variind de la 0 la 120 de ore. Din Figura 3.10 se poate observa că, în general, conținutul de flavonoide a crescut odată cu timpul, până la 24 de ore și a început să scadă încet la un timp mai lung cu fiecare test, indiferent de varianta microîncapsulată. Cea mai mare creștere a conținutului de flavonoide s-a găsit la pH 2,0, după 2 ore, când s-a constatat o creștere de două ori a conținutului de flavonoide în varianta W1.

### 8.5. Concluzii parțiale

Extracția compușilor flavonoidici din cojile de ceapă galbenă a fost finalizată cu succes folosind extracția cu apă fierbinte, permițând astfel obținerea unui extract sigur, îmbogățit în flavonoide. Rezultatele obținute au permis să se concluzioneze că extracția în apă fierbinte a flavonoidelor din coaja de ceapă galbenă poate fi utilizată ca solvent alternativ pentru extracția selectivă a compușilor flavonoidici. Extractul apos a fost microîncapsulat cu succes în matrici biopolimerice, pe bază de proteine, peptide și carbohidrați complecși, cu o eficiență de peste 76%. Pulberile liofilizate au prezentat un conținut fitochimic bun și activitate antioxidantă, în timp ce matricele de microîncapsulare selectate au oferit un efect protector în timpul digestiei simulate. Analiza CLSM a arătat că structura microscopică a pulberilor obținute prin cele două variante de microîncapsulare a fost distribuită uniform. S-a găsit un interval semnificativ de citocompatibilitate, până la 1 mg/mL, în timp ce la concentrații mai mici, pulberile au stimulat proliferarea celulară. Pulberile au prezentat o stabilitate termică și pH acceptabilă, ceea ce favorizează adăugarea lor în diferite matrici alimentare. Rezultatele obținute demonstrează că strategiile prietenoase pentru o valorificare eficientă a cojilor de ceapă pot fi aplicate în proiectarea ingrediente multifuncționale pentru aplicații alimentare, biofarmaceutice sau nutraceutice.

## CAPITOLUL 9. CO-MICROENCAPSULARE A FLAVONOIDELOR DIN PIEI DE CEAPĂ GALBENĂ ȘI DIFERITE TULINI DE BACTERII LACTICE

### 9.2. OBIECTIVELE STUDIULUI

În acest studiu, a fost determinat un profil de flavonoide co-microîncapsulate din extract de coajă de ceapă galbenă și bacterii lactice. Pulberile microîncapsulate au fost obținute prin liofilizare, folosind izolat proteic din zer, maltodextrină și inulină ca materiale de acoperire. De asemenea, a fost examinat potențialul compușilor polifenolici împotriva radicalilor liberi nocivi și a enzimelor implicate în hiperglicemie, dislipidemie, stres oxidativ și procesul inflamator asociat cu sindromul metabolic.

Concentrațiile totale de polifenoli (TPC) și flavonoide totale (TFC) au fost măsurate în pulbere pentru a evalua activitatea antioxidantă. Efectul inhibitor al pulberii asupra lipazei,  $\alpha$ -amilazei și lipoxigenazei a fost, de asemenea, testat pentru a testa activitatea biologică. Viabilitatea celulară, proliferarea și morfologia au fost testate în prezența pulberii co-microîncapsulate pentru a determina biocompatibilitatea *in vitro*. Au fost testate în prezența pulberii co-microîncapsulate în celulele fibroblaste pentru a determina biocompatibilitatea *in vitro*. Valoarea funcțională a pulberii a fost determinată prin încorporarea acesteia în matrici alimentare adecvate, care au fost apoi evaluate pentru stabilitatea componentelor fitochimice globale în raport cu activitatea antioxidantă și viabilitatea celulelor bacteriene în timpul depozitării. Aceste descoperiri sunt relevante pentru utilizarea beneficiilor flavonoidelor și probioticelor în dezvoltarea de noi componente utile cu calități funcționale îmbunătățite.

### 9.3. MATERIALE ȘI METODE

#### 9.3.1. Co-microîncapsularea flavonoidelor din coaja de ceapă galbenă cu două tulpini diferite de bacterii lactice

Tabelul 9.1. Codificarea probelor

Probe	Inocul/bacterie probiotică
B0	20 mL apă ultrapură sterilă
LB	20 mL suspensie <i>Lactobacillus bif fermentans</i>
LP	20 mL suspensie <i>Lactobacillus plantarum</i>
BP	20 mL suspensie <i>Lactobacillus bif fermentans</i> + <i>Lactobacillus plantarum</i> (1:1)

### 9.4. REZULTATE ȘI DISCUȚII

#### 9.4.1. Caracterizarea extractului și pulberilor de coji de ceapă galbenă

Tabelul 9.2 prezintă profilul fitochimic al extractului apos obținut din cojile de ceapă galbenă.

Tabelul 9.2. Caracteristicile fitochimice ale extractului din coji de ceapă galbenă

Caracteristici	Extract
TFC (mg EAG/g)	50,21±0,10
TFC (mg EQ/g)	21,68±0,69
AA (mMol Trolox/g)	250,81±6,76

Din Tabelul 9.2 se poate observa că extractul de flavonoid din cojile de ceapă galbenă a avut un conținut ridicat de polifenoli și flavonoide, ceea ce a condus la o activitate antioxidantă semnificativă.

### 9.4.2. Profilul fitochimic al pulberilor microîncapsulate

Tabelul 9.3. Profilul fitochimic al pulberilor microîncapsulate

Analyses	B0	LB	LP	BP
EE (%)	89,21±1,99 <sup>a</sup>	92,23±1,14 <sup>a</sup>	93,31±0,89 <sup>a</sup>	91,32±2,56 <sup>A</sup>
TPC (mg EAG/g SU)	16,42±0,06 <sup>c</sup>	17,40±0,83 <sup>b</sup>	17,73±1,59 <sup>b</sup>	18,40±0,68 <sup>A</sup>
TFC (mg EQ/ g SU)	17,35±1,97 <sup>a</sup>	15,06±0,68 <sup>b</sup>	16,66±1,42 <sup>a</sup>	16,43±1,18 <sup>A</sup>
AA (mMol Trolox/g SU)	84,74±2,90 <sup>b</sup>	81,03±2,31 <sup>c</sup>	84,29±0,55 <sup>b</sup>	91,92±3,73 <sup>A</sup>
EE LAB (%)	-	84,18±2,12 <sup>a</sup>	71,2±2,17 <sup>b</sup>	76,63±3,11 <sup>B</sup>
LAB Viability (UFC/g SU)	-	1,94X10 <sup>7C</sup>	3,6X10 <sup>7A</sup>	2,57X10 <sup>7B</sup>

Valorile suprascriptelor din același rând cu litere distincte (a, b, c) diferă semnificativ la  $p < 0,05$ , pe baza metodei Tukey.

Așa cum se poate observa din Tabelul 9.3, nu există diferențe semnificative în ceea ce privește profilul fitochimic și eficiența încapsulării flavonoidelor în cele 4 variante experimentale. Se poate aprecia că tehnica de co-microîncapsulare și materialele utilizate au permis obținerea unor variante de pudre cu un conținut ridicat de compuși biologic activi și bacterii lactice, cu o eficiență de încapsulare ridicată. Prin urmare, toate variantele au prezentat valori remarcabile ale activității antioxidante. Diferențe semnificative au fost remarcate la eficiența încapsulării bacteriilor lactice, cu o eficiență mai mare pentru specia *Lactobacillus bifementans*.

Tabelul 9.4. Caracteristicile funcționale ale ingredientelor formulate după 30 de zile de depozitare

CBA	B0	LB	LP	BP
TPC (mg EAG/g SU)	15,52±0,60 <sup>a</sup>	12,89±0,38 <sup>b</sup>	15,03±0,53 <sup>a</sup>	14,33±0,51 <sup>a</sup>
TFC (mg EQ/ g SU)	15,69±2,26 <sup>a</sup>	14,40±0,38 <sup>a</sup>	15,93±0,61 <sup>a</sup>	10,32±0,76 <sup>b</sup>
AA (mMol Trolox/g SU)	83,90±0,76 <sup>b</sup>	80,18±0,86 <sup>c</sup>	81,29±0,58 <sup>c</sup>	88,86±0,78 <sup>a</sup>
Viabilitate (UFC/g SU)	-	1,90x10 <sup>7b</sup>	1,87x10 <sup>6c</sup>	2,56x10 <sup>7a</sup>

Valorile suprascriptelor din același rând cu litere distincte (a,b,c) diferă semnificativ la  $p < 0,05$ , pe baza metodei Tukey.

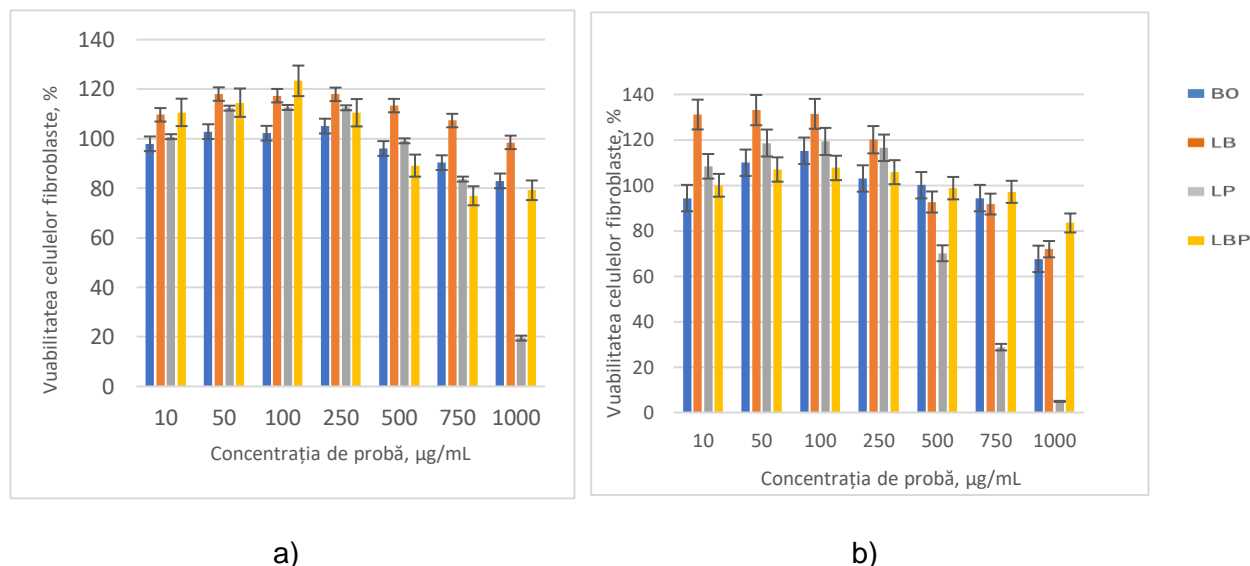
Depozitarea la 4-6°C timp de 30 de zile a dus la scăderea conținutului de compuși biologic activi, în special în proba B0, pentru conținutul total de polifenoli (cu aproximativ 26%) și în proba BP, pentru conținutul total de flavonoide (circa 37 %). Toate probele au păstrat activitate antioxidantă, peste 80 mM Trolox/g SU. Probă codificată LP a arătat o reducere cu 1 log a numărului de bacterii lactice la depozitare, în timp ce probele LB și BP au arătat o viabilitate de 100%. Rezultatele obținute în depozitarea controlată timp de 30 de zile sugerează că ingredientele multifuncționale rezultate în urma co-microîncapsulării au un potențial remarcabil de utilizare în sistemele alimentare, atât ca antioxidant, cât și probiotic, dar și pentru dezvoltarea nutraceuticelor.

### 9.4.3. Citotoxicitatea *in vitro* a probelor microîncapsulate

Rezultatele evaluării biocompatibilității *in vitro* (figura 9.1 ) au demonstrat că toate variantele realizate au fost biocompatibile deoarece, comparativ cu proba martor (celule în mediul de cultură, fără produse), celulele cultivate în prezența ingredientelor funcționalizate au prezentat valori ridicate ale viabilității și proliferații, iar morfologia lor în cultură a fost normală, caracteristică fenotipului celulelor fibroblaste.

Proba BP – a fost biocompatibilă pe domeniul 10-1000 μg/mL după 24 h de cultivare și pe domeniul 10-1000 ug/mL după 48 h de cultivare. Proba B+P a stimulat proliferația celulară la

concentrații de 10-250  $\mu\text{g/mL}$  chiar după 24 h de cultivare, dar și pe domeniul 10-250  $\mu\text{g/mL}$  după 48 h de cultivare. Valorile de viabilitate celulară au fost semnificativ mai mari comparativ cu martorul netratat, ajungând până la 123% la 24 h de cultivare și 107% după 48 h de cultivare.



**Figura 9.1.** Viabilitatea celulelor fibroblaste cultivate în prezența ingredientelor multifuncționale timp de 24 de ore, respectiv, 48 de ore

#### 9.4.4. Testarea ingredientelor co-microîncapsulate în sistem alimentar

Cele patru variante experimentale de ingrediente multifuncționale au fost adăugate, în proporție de 1% în sosuri pe bază de iaurt, pentru care s-au testat: profilul fitochimic și lactic inițial și stabilitatea la depozitare, luând în considerare o perioadă de valabilitate medie de 21 de zile. Sosurile au fost depozitate în sticle cu protecție UV și depozitate pentru perioada menționată la 4-6°C. Sosurile derivate au păstrat sistemul de codificare aferent ingredientelor, adăugându-se litera S pentru a se evita confuziile. Rezultatele obținute inițial și după 21 de zile de depozitare sunt prezentate în Tabelele 9.5 și 9.6.

**Tabelul 9.5.** Caracteristicile fitochimice și probiotice ale sosurilor cu valoare adăugată

Caracteristici	SB0	SB	SP	SBP
TPC (mg EAG/g SU)	4,89±0,08 <sup>c</sup>	5,72±0,54 <sup>b</sup>	5,86±0,36 <sup>b</sup>	7,22±0,67 <sup>a</sup>
TFC (mg EQ/ g SU)	1,52±0,32 <sup>b</sup>	2,14±0,22 <sup>ab</sup>	2,31±0,73 <sup>a</sup>	2,29±0,11 <sup>a</sup>
AA (mMol Trolox/g SU)	9,09±0,25 <sup>c</sup>	14,91±0,45 <sup>b</sup>	15,00±0,35 <sup>b</sup>	17,42±0,38 <sup>a</sup>
Viability of LAB (CFU/g SU)	-	1,87x10 <sup>7</sup>	1,67x10 <sup>6</sup>	2,30x10 <sup>7</sup>

Valorile suprascriptelor din același rând cu litere distincte (a,b,c) diferă semnificativ la  $p < 0,05$ , pe baza metodei Tukey.

Din Tabelul 9.5, se remarcă faptul că probele cu bacterii lactice au prezentat un conținut mai mare de compuși biologic activi și activitate antioxidantă mai mare.



**Tabelul 9.6.** Caracteristicile funcționale ale sosurilor cu valoare adăugată, după 21 de zile de depozitare

Caracteristici	SB0	SB	SP	SBP
TPC (mg EAG/g SU)	4.15±0.31 <sup>b</sup>	6.26±0.35 <sup>a</sup>	5.59±0.50 <sup>a</sup>	6.10±0.27 <sup>a</sup>
TFC (mg EQ/ g SU)	2.54±0.43 <sup>a</sup>	2.74±0.25 <sup>a</sup>	2.78±0.42 <sup>a</sup>	2.97±0.46 <sup>a</sup>
AA (mMol Trolox/g SU)	6.32±0.14 <sup>b</sup>	11.41±1.11 <sup>a</sup>	12.79±1.36 <sup>a</sup>	13.29±0.35 <sup>a</sup>
Viability of lab (CFU/g SU)	-	1.77x10 <sup>6</sup>	1.10x10 <sup>5</sup>	1.01x10 <sup>6</sup>

Valorile suprascriptelor din același rând cu litere distincte (a,b) diferă semnificativ la  $p < 0,05$ , pe baza metodei Tukey.

Din Tabelul 9.6, se poate observa că în timpul depozitării, ingredientele multifuncționale au prezentat un profil stabil, cu o cinetică de eliberare nesemnificativă a flavonoidelor din microcapsule și o scădere cu aproximativ 1 log a numărului de bacterii lactice.

#### **9.4.5. Caracterizarea fitochimică a extractului și pudrei co-microîncapsulate cu *Lactobacillus casei***

Extractul și caracterizarea fitochimică globală a pudrei sunt prezentate în tabelul 4.24. Extractul din coji de ceapă galbenă a prezentat un TFC de 229,14 ± 3,05 mg echivalenți de quercetină (EQ) / g greutate uscată (SU), un TPC de 96,06 ± 2,70 mg echivalenți de acid galic (EAG)/g SU și o activitate antioxidantă a 101,19 ± 0,53 mM Trolox / g SU.

**Tabelul 9.7.** Caracterizarea fitochimică a extractului și pudrei

Compuși fitochimici	Extract	Pudră
TFC, mg EQ/ SU	229,14 ± 3,05 <sup>a</sup>	89,49 ± 4,12 <sup>b</sup>
TPC, mg EAG/ g SU	96,06 ± 2,70 <sup>a</sup>	34,17 ± 1,79 <sup>b</sup>
AA, mM Trolox/g SU	101,19 ± 0,53 <sup>a</sup>	39,27 ± 0,45 <sup>b</sup>
EE, %	-	84,82 ± 0,72%
EE LAB, %	-	72,49 ± 0,11

Valorile medii care nu au aceeași literă superscript (a, b) diferă semnificativ.

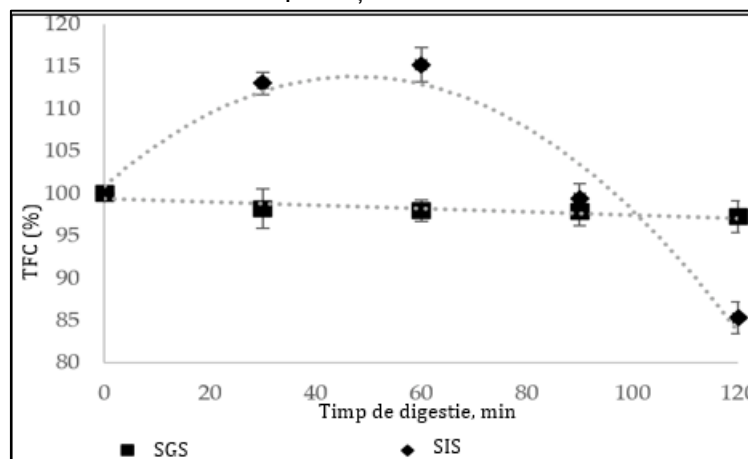
Eficiența de încapsulare a bacteriilor lactice în pulberea liofilizată a fost de 72,49 ± 0,11%. Profilul fitochimic global al pulberii a arătat un conținut de TFC de 89,49 ± 4,12 mg EQ / g SU și TPC de 34,17 ± 1,79 mg EAG / g SU, cu o capacitate de eliminare a radicalilor DPPH de 39,27 ± 0,45 mM Trolox / g SU, cu o inhibare de 87,40 ± 0,95% (Tabelul 9.7).

#### **9.4.6. Solubilitatea și higroscopicitatea pulberii co-microîncapsulate**

În studiul de față, pulberea co-microîncapsulată a prezentat un indice de solubilitate în apă de 65,07 ± 1,24%. Acest rezultat poate fi atribuit tehnicii de microîncapsulare care constă într-o amestecare timp de 20 de ore și, de asemenea, complexității materialului de încapsulare. Rezultatul observat poate fi, de asemenea, corelat cu distribuția mărimii particulelor. Din fericire, solubilitatea finală depinde în mare parte de compoziția produsului alimentar final, care ar oferi în cele din urmă o mai bună disponibilitate a suprafeței pentru procesul de hidratare.

#### 9.4.7. Stabilitatea flavonoidelor în condiții gastrointestinale simulate

Rezultatele obținute pentru digestibilitatea *in vitro* sub fluide gastrice simulate (SGF) și intestinale (SIF) arată că materialele de acoperire au prezentat un efect protector asupra eliberării flavonoidelor. Proba a prezentat o scădere nesemnificativă (Figura 9.3) a flavonoidelor din lichidele gastrice cu aproximativ 3% după 120 de minute de interacțiune gastrică, ceea ce înseamnă că aproape toți compușii bioactivi rămân încapsulați.



**Figura 9.3.** Eliberarea totală a flavonoidelor din pulberea co-microîncapsulată în timpul digestiei *in vitro* în sucurile gastrice și intestinale simulate. Datele afișate reprezintă mediile probelor în trei exemplare. Barele de eroare de pe diagramă reprezintă abaterile standard.

Pe de altă parte, concentrația de flavonoide a crescut cu 15% în tractul intestinal, evidențiind o eliberare din matricea încapsulată, urmată de o scădere cu aproximativ 15% la sfârșitul reacției, sugerând că 85% din flavonoide sunt disponibile după întregul proces de digestie.

#### 9.4.8 Potențialul antidiabetic și antiinflamator

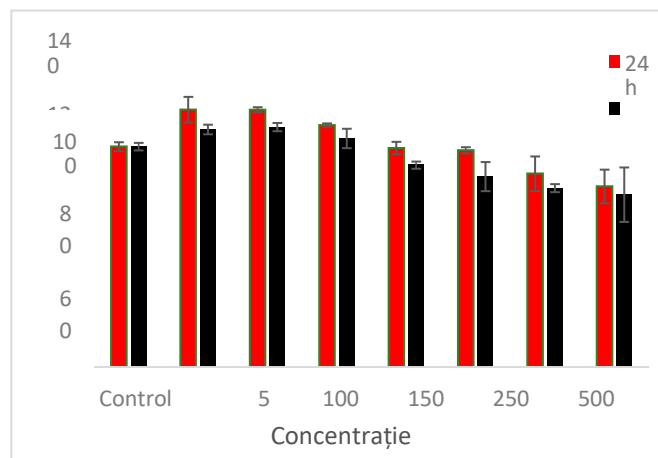
##### Potențialul de inhibiție asupra $\alpha$ -amilazei, lipazei și lipoxigenazei

Un rezultat al raportului de inhibiție de  $76,40 \pm 2,30\%$  obținut în acest studiu demonstrează că proba poate fi luată în considerare pentru potențialul antidiabetic. Sursele de antioxidanți naturali pot fi studiate pentru inhibiția lipazei pentru a înlocui medicamentele. În acest context, pulberea co-microîncapsulată a prezentat o activitate inhibitorie de  $82,58 \pm 3,36$ . Efectul pulberii microîncapsulate a fost testat împotriva unei enzime proinflamatorii, și anume lipoxigenaza. Pulberea a prezentat o rată de inhibiție de  $49,01 \pm 0,62\%$ .

#### 9.4.9. Citotoxicitatea *in vitro* a pulberilor microîncapsulate

Eliberarea unor posibili compuși toxici din extracte naturale și viabilitatea celulară au fost evaluate în cultura de celule fibroblaste L929 prin test NR. Rezultatele au arătat că extractul de ceapă galbenă nu a prezentat efect citotoxic până la concentrațiile testate de  $500 \mu\text{g/mL}$ , după 24 de ore și până la  $250 \mu\text{g/mL}$  după 48 de ore de cultivare ( $>80\%$  viabilitate celulară) (Fig. 2). Valorile viabilității celulare au variat între  $70,9\%$  -  $116,7\%$  pentru extractul de ceapă și au scăzut odată cu creșterea concentrației. O scădere moderată a viabilității celulare a fost înregistrată pentru concentrații mai mari de  $750\text{-}1000 \mu\text{g/mL}$  după 24 de ore și pentru  $500\text{-}1000 \mu\text{g/mL}$  după 48 de ore de tratament. Aceste date ilustrează citocompatibilitatea pulberii de ceapă până la  $50 \mu\text{g/mL}$ . În plus, concentrațiile

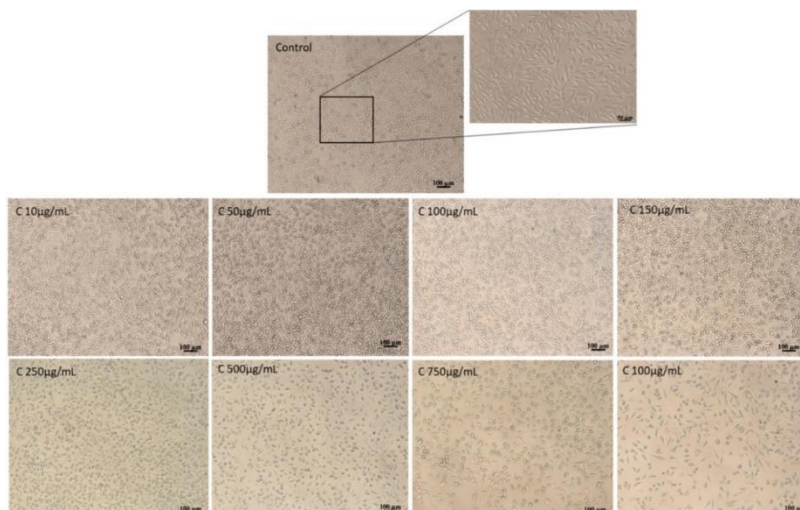
de extract de ceapă în intervalul 10-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  au stimulat proliferarea celulară după 24 și 48 de ore de cultivare, comparativ cu cultura martor.



**Figura 9.4.** Viabilitatea celulară a fibroblastelor L929 cultivate în prezența extractelor vegetale de ceapă timp de 24 ore și respectiv 48 ore, determinată prin testul NR

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

Observațiile legate de morfologia celulară au fost în conformitate cu datele cantitative NR(Figura 3.18).



**Figura 9.5.** Micrografiile ale celulelor L929 tratate cu extracte de ceapă timp de 48 de ore

Din imagini, se poate observa că celulele tratate cu pulberea co-microîncapsulată sunt similare cu celulele de cultură martor, păstrându-și fenotipul fusiform normal, caracteristic celulelor fibroblastice. În plus, se observă o distribuție omogenă a celulelor pe placa de cultură, cu o densitate similară culturii de control. La concentrații de 10-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pentru pulbere, densitatea celulară a fost mai mare în comparație cu cultura martor. Concentrații mai mari  $>750$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  ale extractelor vegetale au scăzut moderat densitatea celulară în culturile tratate.

#### 9.4.10. Caracterizarea produsului alimentar nou formulat

Pentru a-i testa funcționalitatea, pulberea a fost adăugată într-o matrice selectată, în diferite rapoarte. Au fost realizate 2 variante de cremă de brânză: varianta C1 (1%) și varianta C2 (2%) și un blank fără pulbere. Produsele alimentare obținute au fost analizate din punct de vedere al stabilității compușilor bioactivi și al viabilității celulelor bacteriilor lactice timp de 21 de zile, în timpul depozitării la 4-6°C. Viabilitatea celulară a LAB co-microîncapsulate în timpul depozitării la 4 °C, a variat de la 6,66 la 7,51 log CFU/g SU după 21 de zile pentru probele C1 și C2. Prin urmare, pentru proba C, după 21 de zile, viabilitatea bacteriilor lactice a scăzut cu 0,5 log CFU/g SU în comparație cu probele C1 și C2 în care s-a observat o creștere a 1 log CFU/g SU.

**Tabelul 9.8.** Caracteristicile fitochimice ale probelor

Probe	TFC, mg EQ/g SU		TPC, mg EAG/g SU		AA, mM Trolox/g SU	
	0	21 days	0	21 days	0	21 days
C1	4,81±0,32 <sup>aB</sup>	2,75±0,23 <sup>bA</sup>	4,68±0,24 <sup>aA</sup>	3,06±0,24 <sup>bB</sup>	1,95±0,01 <sup>aB</sup>	1,81±0,01 <sup>bA</sup>
C2	5,87±0,22 <sup>aA</sup>	3,16±0,11 <sup>bA</sup>	5,15±0,29 <sup>aA</sup>	3,60±0,14 <sup>bA</sup>	2,01±0,01 <sup>aA</sup>	1,83±0,01 <sup>bA</sup>

Valorile suprascriptelor din același rând cu litere distincte (a,b) sunt semnificativ diferite la  $p < 0,05$ , pe baza metodei Tukey. Valorile suprascriptelor din aceeași coloană cu litere distincte (A,B) sunt semnificativ diferite la  $p < 0,05$ , pe baza metodei Tukey.

#### 9.4.11. Analiza CIELAB

**Tabelul 9.9.** Parametrii de culoare ai pulberii microîncapsulate și a brânzei moi

Probe	Parametri de culoare		
	L*	a*	b*
Pudră	20,33±0,89 <sup>d</sup>	15,85±0,13 <sup>b</sup>	10,27±0,13 <sup>c</sup>
Martor	102,39±0,32 <sup>a</sup>	-2,24±0,14 <sup>c</sup>	3,93±0,45 <sup>d</sup>
C1	82,84±5,02 <sup>b</sup>	15,70±0,77 <sup>b</sup>	21,16±1,74 <sup>b</sup>
C2	73,61±0,09 <sup>c</sup>	20,02±0,12 <sup>a</sup>	25,84±0,05 <sup>a</sup>

Valorile suprascriptelor din aceeași coloană cu litere distincte (a,b,c,d) diferă semnificativ la  $p < 0,05$ , pe baza metodei Tukey.

#### 9.5. Concluzii parțiale

A. Se poate aprecia că procesul de co-microîncapsulare a fost eficient în protecția compușilor biologic activi și a bacteriilor lactice, ceea ce a condus la valori remarcabile pentru activitatea antioxidantă și menținerea viabilității bacteriilor lactice, atât în ingredientele formulate, cât și în sosul pe bază de iaurt, după o perioadă lungă de păstrare (21 de zile).

B. Rezultatele prezentate în acest studiu susțin multifuncționalitatea ingredientelor co-microîncapsulate, obținute prin liofilizarea extractului etanolic de coajă de ceapă galbenă, bogat în compuși flavonoidici selectați și bacterii lactice, într-o combinație de matrice de co-microîncapsulare, care exploatează potențialul tehnologic. În concluzie, se poate afirma că ingredientele au prezentat valori ridicate ale eficienței de încapsulare, atât pentru compușii flavonoidici, cât și pentru bacteriile lactice, demonstrând dubla funcționalitate prin activitatea antioxidantă și metabolică a bacteriilor lactice.

C. Pentru încapsulare a fost utilizat un complex de biopolimer, inclusiv utilizarea izolatului proteic din zer liofilizat, maltodextrină și inulină cu adăugarea de *Lactobacillus casei*. Pulberea rezultată a prezentat proprietăți remarcabile în ceea ce privește profilul fitochimic, potențialul antioxidant, antidiabetic, antiinflamator și citocompatibilitate importantă. Atât flavonoidele, cât și bacteriile lactice au atins o eficiență ridicată de încapsulare. Rezultatele obținute de digestibilitate *in vitro* au indicat că materialul de acoperire a avut un efect protector asupra eliberării flavonoidelor. Au fost investigate proprietățile fizice ale pulberii microîncapsulate, iar rezultatul poate fi corelat cu stabilitatea lor la

depozitare. Pentru a testa potențialul funcțional al alimentelor, pulberea a fost adăugată într-un sistem alimentar (brânză proaspătă). Un efect stimulator asupra viabilității bacteriilor lactice a fost observat după 21 de zile în variantele care conțin ingredient microîncapsulat. În acest studiu a fost observat un efect sinergic între bacteriile lactice și polifenoli.

D. Aceste rezultate au confirmat că pulberile obținute prin încapsularea flavonoidelor de ceapă și a bacteriilor lactice au potențialul de a fi folosite pentru a obține alimente funcționale sau nutraceutice.

## CAPITOLUL 10. CREȘTEREA EFICIENȚEI MICROÎNCAPSULĂRII ȘI FUNCȚIONALITĂȚII MICROPARTICULELOR PRIN GLICARE

### 10.2. OBIECTIVELE STUDIULUI

Mulți cercetători au folosit proteina din zer ca material de încapsulare, dar nimeni nu a folosit izolatul proteic din zer în forma sa glicată cu xilo-oligozaharide ca material de încapsulare pentru flavonoide. Obiectivul cercetării actuale a fost de a determina posibilitatea conjugatelor izolatului proteic din zer de a putea fi utilizate ca materiale de încapsulare pentru flavonoidele extrase din cojile de ceapă galbenă. Flavonoidele au fost extrase folosind o combinație de tehnici de extracție etanolică lichid-solid și asistată de ultrasunete. Liofilizarea a fost folosită pentru a crea microcapsulele pe bază de flavonoide. Pulberile liofilizate au fost evaluate în termeni de eficiență de încapsulare, compoziție fitochimică, activitate antioxidantă și alți factori folosind izolat proteic din zer și xiloză cu și fără încălzire. Microscopia confocală de scanare cu laser a fost utilizată pentru a examina caracteristicile structurale și morfologice ale materialelor. Pentru a determina valoarea adăugată, pulberile au fost amestecate într-o rețetă pentru un produs alimentar (nachos), apoi caracterizate fitochimic și fizico-chimic. Concluziile acestui studiu ar putea avea implicații atât pentru maximizarea potențialului bioactiv al substanțelor fitochimice, cât și pentru proiectarea de formule cu calități funcționale îmbunătățite.

### 10.4. REZULTATE ȘI DISCUȚII

#### 10.4.1. Caracterizarea fitochimică a extractului de coajă de ceapă galbenă

Metoda asistată de ultrasunete aplicată în acest studiu a permis obținerea unui extract îmbogățit cu compuși bioactivi, care conține flavonoide totale de  $228,68 \pm 3,00$  mg EQ/g SU, un conținut de polifenoli totali de  $96,06 \pm 2,70$  mg EAG/g SU, producând o activitate antioxidantă de  $495,89 \pm 2,42$  mM Trolox / g SU.

#### 10.4.2. Corelația între indicele de îmbrunare, gradul glicare și eficiența microîncapsulării

Formarea pigmentului maro în pulberile microîncapsulate a fost evaluată prin măsurători de absorbantă la 420 nm și respectiv 600 nm. Așa cum era de așteptat, indicele de îmbrunare a fost mai mare ( $0,12 \pm 0,01$ ) pentru varianta tratată termic (Varianta M2) decât pentru varianta netratată ( $0,09 \pm 0,01$ ) (Varianta M1).

-a observat o creștere proporțională între intensitatea îmbrunării și activitatea antioxidantă a pulberilor, indicând potențialul antioxidant puternic al variantei glicate datorită procesului de încălzire. Pulberile au prezentat diferențe semnificative în ceea ce privește activitatea antioxidantă ( $p < 0,05$ ), cu o valoare de  $179,7 \pm 4,5$  mMol TE/g SU pentru M1 și  $184,4 \pm 0,7$  mMol TE/g SU pentru M2. În studiul de față, se poate observa o corelație între gradul glicare și eficiența încapsulării în ambele variante. Astfel, s-a observat un grad glicare de  $22,6 \pm 2,5\%$  și o eficiență de încapsulare de  $86,7 \pm 1,4\%$  pentru M1. Au fost estimate valori semnificative mai mari ( $p < 0,05$ ) pentru varianta 2, cu un grad de glicare de  $30,4 \pm 1,6\%$  și o eficiență de încapsulare de  $90,5 \pm 0,3\%$ . Prin urmare, se poate aprecia că acești conjugăți obținuți pe bază reacției Maillard au arătat o capacitate mai mare de a captura și încapsula flavonoidele din extractul de coajă de ceapă galbenă.

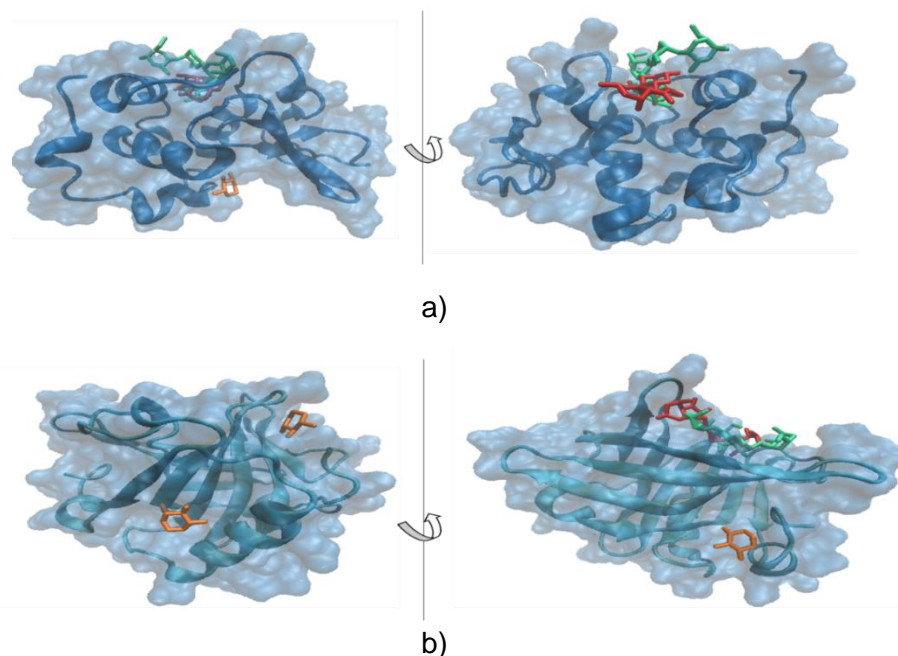
### 10.4.3. Modelare moleculară

Detaliile despre modul în care glicarea proteinelor cu X afectează legarea suplimentară a flavonoidelor au fost colectate prin intermediul abordării *in silico*. Siturile potențiale de legare pentru X au fost prezise atât pentru moleculele  $\alpha$ -LA, cât și pentru moleculele  $\beta$ -LG prin efectuarea de simulări de docking molecular. Cele mai bune trei potriviri care implică  $\alpha$ -LA și  $\beta$ -LG ca receptori, selectate pe baza valorilor energiei de legare și a zonei de interfață au fost analizate în detaliu (Tabelul 10.1).

**Tabelul 10.1.** Detalii moleculare privind interacțiunea dintre principalele proteine din zer ( $\alpha$ -lactalbumină ( $\alpha$ -LA) și monomerul  $\beta$ -lactoglobulinei ( $\beta$ -LG)) echilibrate la 25°C, xiloza (X) și flavonoidele majore din coaja de ceapă (quercitin-4'-O-monoglucozid (QMG) și quercitin-3,4'-O-diglucozid (QDG))

	$\alpha$ -lactalbumin - xylose			$\alpha$ -lactalbumin - QMG	$\alpha$ -LA - QDG
	Complex 1	Complex 2	Complex 3	Horincar et al. (2019)	
<b>Interaction descriptors</b>					
Amino acids interacting with ligands	Thr <sup>33</sup> , Glu <sup>49</sup> , Phe <sup>53</sup> , Gln <sup>54</sup> , Tyr <sup>103</sup> , Trp <sup>104</sup> , Leu <sup>105</sup> , Ala <sup>106</sup>	Thr <sup>33</sup> , Val <sup>42</sup> , Asn <sup>44</sup> , Glu <sup>49</sup> , Phe <sup>53</sup> , Gln <sup>54</sup> , Tyr <sup>103</sup> , Trp <sup>104</sup> , Leu <sup>105</sup> , Ala <sup>106</sup>	Glu <sup>11</sup> , Leu <sup>12</sup> , Asp <sup>14</sup> , Leu <sup>15</sup> , Thr <sup>38</sup> , Leu <sup>85</sup> , Thr <sup>86</sup> , Ile <sup>89</sup> , Met <sup>90</sup> , Lys <sup>93</sup>	Leu <sup>3</sup> , Glu <sup>11</sup> , Leu <sup>12</sup> , Lys <sup>13</sup> , Asp <sup>14</sup> , Thr <sup>38</sup> , Leu <sup>52</sup> , Leu <sup>85</sup> , Thr <sup>86</sup> , Asp <sup>88</sup> , Ile <sup>89</sup> , Met <sup>90</sup> , Lys <sup>93</sup>	Glu <sup>1</sup> , Leu <sup>3</sup> , Arg <sup>10</sup> , Glu <sup>11</sup> , Leu <sup>12</sup> , Lys <sup>13</sup> , Thr <sup>38</sup> , Leu <sup>52</sup> , Asp <sup>83</sup> , Leu <sup>85</sup> , Thr <sup>86</sup> , Asp <sup>88</sup> , Ile <sup>89</sup>
Binding energy, kcal/mol	-13.00	-10.52	-7.48	-24.41	-32.01
Interface area, Å <sup>2</sup>	153.5	147.5	159.8	625.20	541.20
<b>Pocket descriptors</b>					
Volume, Å <sup>3</sup>	339.58	339.58	381.50	435.84	
Depth, Å	15.72	15.72	13.18	13.94	
Enclosure	0.16	0.16	0.20	0.30	
	$\beta$ -LG - Xyl			$\beta$ -LG - QMG	$\beta$ -LG - QDG
	Complex 1	Complex 2	Complex 3	Horincar et al. (2019)	
<b>Interaction descriptors</b>					
Amino acids interacting with ligands	Tyr <sup>20</sup> , Tyr <sup>42</sup> , Val <sup>43</sup> , Glu <sup>44</sup> , Gln <sup>59</sup> , Cys <sup>66</sup> , Pro <sup>126</sup> , Leu <sup>156</sup> , Glu <sup>157</sup> , Glu <sup>158</sup> , Gln <sup>159</sup> , Cys <sup>160</sup> , His <sup>161</sup>	Ala <sup>23</sup> , Met <sup>24</sup> , Ala <sup>25</sup> , Leu <sup>133</sup> , Phe <sup>136</sup> , Asp <sup>137</sup> , Leu <sup>140</sup> , Arg <sup>148</sup> , Leu <sup>149</sup> , Ser <sup>150</sup>	Ile <sup>2</sup> , Leu <sup>93</sup> , Glu <sup>108</sup> , Ala <sup>111</sup> , Gln <sup>115</sup> , Leu <sup>117</sup>	Ala <sup>37</sup> , Pro <sup>38</sup> , Leu <sup>39</sup> , Val <sup>41</sup> , Leu <sup>58</sup> , Lys <sup>60</sup> , Ile <sup>71</sup> , Ile <sup>84</sup> , Asp <sup>85</sup> , Ala <sup>86</sup> , Leu <sup>87</sup> , Asn <sup>88</sup> , Asn <sup>90</sup> , Met <sup>107</sup> , Glu <sup>108</sup> , Asn <sup>109</sup>	Pro <sup>38</sup> , Leu <sup>39</sup> , Val <sup>41</sup> , Leu <sup>58</sup> , Lys <sup>60</sup> , Glu <sup>62</sup> , Ala <sup>67</sup> , Lys <sup>69</sup> , Ile <sup>71</sup> , Asn <sup>90</sup> , Met <sup>107</sup> , Glu <sup>108</sup> , Asn <sup>109</sup>
Binding energy, kcal/mol	-13.37	-16.41	-13.00	-35.05	-34.37
Interface area, Å <sup>2</sup>	169.1	152.8	157.6	502.10	585.90
<b>Pocket descriptors</b>					
Volume, Å <sup>3</sup>	217.15	141.31	137.86	229.70	
Depth, Å	9.42	7.68	10.16	13.08	
Enclosure	0.12	0.19	0.19	0.33	

În plus, acest buzunar amplu cu un volum de 435,8 Å<sup>3</sup> pare să fie capabil să găzduiască o moleculă X, care se suprapune QMG fără a interfera cu legarea QDG. Oricum, trebuie remarcat faptul că  $\alpha$ -LA exercită o afinitate mai bună față de QMG și QDG (energie de legare de -24,21 kcal/mol și respectiv -32,01 kcal/mol) față de X (energie de legare de -7,48 kcal/mol). Pe de altă parte, molecula  $\beta$ -LG este capabilă să găzduiască molecula X în trei buzunare diferite cu volume cuprinse între 137,86 și 217,15 Å (Tabelul 10.1), fără a interfera cu legarea QMG sau QDG (Figura 10.3).



**Figura 10.3.** Suprapunerea modelelor care prezintă cele mai probabile complexe formate între (a)  $\alpha$ -lactalbumină și (b)  $\beta$ -lactoglobulină (reprezentată în albastru în stil surf) și xiloză (reprezentată în portocaliu în stil lemn dulce – modelele 1 și 2), quercitin-4'-O-monoglucozid (reprezentată cu roșu în stilul lemn dulce) și quercitin-3,4'-O-diglucozid

$\beta$ -LG se leagă mai strâns de moleculele X în comparație cu  $\alpha$ -LA; energia de legare la X de către monomerul  $\beta$ -LG variază între -16,41 și -13,00 kcal/mol. În plus, legarea a două molecule X la buzunarele  $\beta$ -LG implică legături de hidrogen stabilite cu Glu<sup>158</sup> în cazul complexului 1 și Met<sup>24</sup>, Asp<sup>137</sup> și Leu<sup>149</sup> în cazul complexului 2, așa cum este prezentat în Tabelul 10.1.

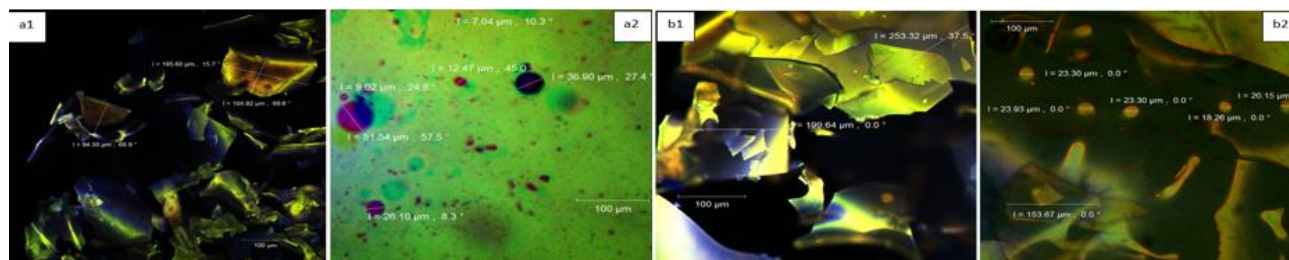
#### 10.4.4. Profilul fitochimic al pudrelor

Cele două pudre au prezentat un conținut fitochimic diferit, constând în conținut total de flavonoide de 97,65±3,74 mg EQ/g SU în M1 și 119,99±1,57 mg EQ/g SU în M2. Conținutul total de polifenolici nu a prezentat diferențe semnificative de 45,11 ± 0,65 mg EAG/g SU și 46,98 ± 1,57 mg EAG/g SU în M1 și M2, producând o activitate antioxidantă corespunzătoare de 179,74 ± 4,51 mMol Trolox/g SU și 184,38 mMol/g SU și 184,38 mMol Trolox/g SU, respectiv.

#### 10.4.5. Structura și morfologia pudrelor

Folosind un microscop Carl Zeiss 710 de scanare cu software-ul ZEN 2012 SP1 (Black Edition), imaginile pulberilor M1 și M2 (Figura 10.4) au fost captate, ambele în stare nativă fără nici un alt colorant suplimentar adăugat (Figura 10.4 a și c) și colorate cu roșu Congo (Figura 10.4 b și, respectiv d)





**Figura 10.4.** Imagini ale probei M1 (a - stare nativă și b - colorate cu fluorofori) și ale probei M2 (c - stare nativă și d - colorate cu fluorofori) capturate de CLSM

Compușii biologic activi au fost capturați în matricea IPZ-X (cu o autofluorescență afișată în albastru). Au putut fi observate mai multe formațiuni solzoase neregulate cu dimensiuni mai mari pentru V2 (199,6 - 253,3 μm), comparativ cu V1 (94,5-104,8 μm), probabil datorită conjugatelor IPZ-X.

#### 10.4.6. Caracterizarea unui produs alimentar nou formulat

Pentru a testa funcționalitatea selectată, pulberile au fost adăugate într-o rețetă de nachos în proporție de 3%. Prin urmare, s-au obținut 3 variante de nachos conform celor două variante, codificate ca N1 (3% din varianta M1 și N2 cu adaos de 3% din varianta M2 și un martor fără pulbere (C). Produsele alimentare obținute au fost analizate din punct de vedere al stabilității compușilor timp de 28 de zile, la 25°C. Așa cum era de așteptat, diferențele de compuși polifenolici și activitatea antioxidantă dintre probe se corelează cu cantitatea adăugată de pulbere (Tabelul 4.28). În timpul testului de depozitare, nu s-a găsit nicio scădere semnificativă ( $p > 0,05$ ) în flavonoidele conținute în N1, spre deosebire de N2, unde s-a observat o semnificativă ( $p < 0,05$ ), până la 9%. Din tabelul 4.28, se poate observa o creștere semnificativă a valorilor activității antioxidante pentru ambele variante, în timpul depozitării, probabil datorită eliberării altor compuși, în afară de flavonoide, precum acizii fenolici, din microcapsule. Prin urmare, s-a constatat o creștere a activității antioxidante în ambele variante, cu aproximativ 26%.

**Tabelul 10.2.** Profilul fitochimic al nachos-ului cu valoare adăugată și stabilitatea pe parcursul a 28 de zile de depozitare

Compuși identificați	Martor		N1		N2	
	0	28	0	28	0	28
TFC, mg EQ/g SU	0,66±0,02 <sup>a</sup>	0,63±0,02 <sup>a</sup>	1,04±0,05 <sup>a</sup>	0,99±0,01 <sup>a</sup>	1,08±0,05 <sup>a</sup>	0,98±0,04 <sup>b</sup>
TPC, mg EAG/g SU	0,73±0,04 <sup>a</sup>	0,75±0,02 <sup>2</sup>	1,24±0,03 <sup>a</sup>	1,22±0,05 <sup>a</sup>	1,37±0,19 <sup>a</sup>	1,08±0,019 <sup>a</sup>
AA, mMol Trolox/g SU	156,07±2,57 <sup>b</sup>	197,97±1,74 <sup>a</sup>	157,89±1,41 <sup>b</sup>	199,49±0,81 <sup>a</sup>	158,19 ±0,48 <sup>b</sup>	198,57±0,35 <sup>a</sup>

Valorile sunt reprezentate ca medie ± erori standard. Valorile suprascriptelor din același rând cu litere distincte (a, b) sunt semnificativ diferite la  $p < 0,05$ , pe baza metodei Tukey.

#### 10.5. Concluzii parțiale

În acest studiu, au fost obținute cu succes microcapsule încărcate cu flavonoide folosind izolate proteice din zer glicate cu xiloză prin reacția Maillard. Extractul a prezentat un conținut semnificativ de flavonoide și o activitate antioxidantă satisfăcătoare. S-au folosit izolate proteice din zer și xiloză, în formă neglicată și glicată, ca posibili candidați pentru microîncapsularea extractului de coajă de ceapă îmbogățit cu flavonoide, prin liofilizare. S-a găsit o corelație pozitivă între indicele de rumenire și activitatea antioxidantă și, consecutiv, între gradul de glicare și eficiența microîncapsulării. Microscopia confocală de scanare cu laser a confirmat capacitatea mai mare a izolatelor de proteine din zer-conjugate de xiloză de a capta flavonoidele. Studiile de andocare moleculară au permis identificarea zonelor potențiale de pe suprafețele de  $\alpha$ -lactalbumină și  $\beta$ -lactoglobulină implicate în interacțiunea cu molecula de xiloză. Pulberea a fost adăugată în nachos și s-a constatat o ușoară scădere a substanțelor fitochimice în timpul depozitării. Cu toate acestea, activitatea antioxidantă a produselor cu valoare adăugată a crescut, probabil datorită eliberării altor substanțe bioactive din microcapsule. Pe baza rezultatelor, conjugajii de tip proteină-monozaharidă Maillard sunt o alternativă bună pentru purtători de ingrediente alimentare și metode atractive promițătoare de livrare.

## CAPITOLUL 11. CONCLUZII FINALE

În ultimii ani, conceptul de a dezvolta un stil de viață sănătos, bazat pe consumul de produse cu valoare adăugată, cum ar fi alimente și băuturi, care pot reduce riscul de a dezvolta o anumită boală, a devenit din ce în ce mai cunoscut. Acest studiu se bazează pe exploatarea subproduselor din prelucrarea industrială a legumelor, și anume coji de ceapă galbenă, surse bogate în antioxidanți naturali.

Prezentul studiu a urmărit diversificarea și compararea diferitelor tehnici de extracție privind conținutul de compuși biologic activi din coaja de ceapă. Rezultatele obținute au relevat că toate procedeele (metode convenționale și asistate) reprezintă tehnici adecvate pentru extracția compușilor biologic activi. Profilul cromatografic al extractelor de coajă de ceapă galbenă obținute prin diferite tehnici de extracție a relevat prezența a cinci compuși esențiali, cum ar fi quercetin 7,4-diglicozid, quercetin 3,4-diglicozid, quercetin 4-glucozid, quercetin și kaempferol. Digestibilitatea *in vitro* a extractului a subliniat faptul că există o scădere a concentrației de flavonoide după digestia gastrică, sugerând necesitatea îmbunătățirii acestui aspect. Cojile de ceapă pot fi exploatare și datorită proprietăților lor fizico-chimice și prezenței acizilor grași esențiali și a componentelor volatile.

În această lucrare a fost examinată interacțiunea peptidelor rezultate din hidroliza  $\beta$ -lactoglobulinei cu termolizina și flavonoidele izolate din cojile de ceapă galbenă. Constantele Stern-Volmer, constantele de legare și numărul situsurilor de legare ar putea fi toate estimate prin stingerea fluorescenței hidrolizatelor de proteine. Procesul de legare dintre peptide și flavonoide a fost determinat a fi static, cu legături de hidrogen și interacțiunile van der Waals acționând ca forțe majore în interacțiune. Testele de andocare moleculară au sugerat că toate peptidele formate din 7 până la 14 aminoacizi generate de termolizina par să interacționeze cu flavonoidele primare găsite în cojile de ceapă. Rezultatele acestor studii ar putea contribui la identificarea de noi molecule bioactive de legare a ligandului derivate din  $\beta$ -lactoglobulină, care ar avea implicații biotehnologice și farmaceutice semnificative.

Încapsularea prin liofilizare a fost metoda utilizată pentru obținerea ingredientelor funcționale. Încapsularea este o tehnică bine stabilită pentru îmbunătățirea stabilității celulelor și pentru protejarea compușilor biologic activi. Flavonoidele extrase din coaja de ceapă au fost încapsulate cu succes în matrici complexe pe bază de hidrolizat de proteine din zer, izolat de proteine din zer, maltodextrină, pectină, inulină și hidrolizate de proteine din zer în proporții variate, cu sau fără adaos de bacterii lactice. Peptidele bioactive provenite din  $\beta$ -lactoglobulină au fost apoi utilizate pentru a microîncapsula flavonoidele extrase din cojile de ceapă galbenă. Descoperirile validează potențialul  $\beta$ -lactoglobulinei și al peptidelor sale de a fi utilizate ca metodă nouă de încapsulare a flavonoidelor.

Maltodextrina, pectina, hidrolizatele de proteine din zer și proteina din zer au fost folosite într-o matrice complexă pentru a încapsula cu succes flavonoidele extrase din coaja de ceapă. Digestibilitatea *in vitro* a demonstrat un efect protector al flavonoidelor în fluidele gastrice simulate, cu eliberare controlată în partea intestinală. Rezultatele au demonstrat, de asemenea, eficacitatea ingredientelor funcționale asupra menținerii viabilității bacteriilor lactice *Lactobacillus bifermens* și *Lactobacillus casei*.

O altă cercetare a testat extragerea flavonoidelor din cojile de ceapă galbenă folosind un solvent ecologic și ieftin. Pentru a crea o pulbere mai stabilă, funcțională și mai sigură, cu o gamă largă de aplicații, un amestec special de matrici biopolimerice - inclusiv izolat de proteine din zer,

hidrolizate de proteine din zer, maltodextrină și pectină - a fost dizolvat în extractul apos îmbogățit cu flavonoide. Rezultatele obținute au concluzionat că o soluție alternativă pentru extracția precisă a compușilor vizați este extracția cu apă fierbinte a flavonoidelor din coji de ceapă.

Flavonoidele și probioticele au fost, de asemenea, co-încapsulate prin liofilizare folosind izolat de proteine din zer, maltodextrină și inulină, cu scopul de a determina un profil de flavonoide co-microîncapsulate din extractul de coajă de ceapă galbenă și bacteriile lactice. Pulberile rezultate au prezentat proprietăți remarcabile în ceea ce privește profilul fitochimic, antioxidant, antidiabetic, anti-inflamator și, de asemenea, biocompatibilitate semnificativă. S-au obținut rezultate importante în ceea ce privește eficiența încapsulării atât pentru flavonoide, cât și pentru bacteriile lactice.

Izolatul proteic din zer și xiloza au fost testate, sub formă neglicată și glicată, ca posibili candidați pentru microîncapsularea extractului de coajă de ceapă bogat în flavonoide, prin liofilizare. Conjugatele Maillard sunt o alternativă bună pentru încapsularea ingredientelor alimentare și promit metode de livrare atractive. Constatările privind digestibilitatea *in vitro* au arătat că materialele de acoperire au avut un impact protector asupra eliberării de flavonoide. Analiza confocală a arătat că structura pulberilor a fost uniform dispersată și a afișat un model structural. Proprietățile fizice au fost investigate, iar rezultatul poate fi corelat cu stabilitatea lor la depozitare. Pentru a testa funcționalitatea ingredientelor, pulberile au fost adăugate în sistemele alimentare, care au fost apoi analizate pentru fitochimie și viabilitatea bacteriilor lactice. Aceste rezultate au confirmat că flavonoidele extrase din cojile de ceapă galbenă, încapsulate au potențialul de a fi utilizate ca ingredient alimentar funcțional cu efect benefic asupra sănătății consumatorului sau ca având un efect prebiotic asupra bacteriilor lactice.

Ingredientele obținute reprezintă o alternativă viabilă la variantele de antioxidanți și coloranți sintetici și pot avea multiple destinații în mai multe industrii.

## CAPITOLUL 12. CONTRIBUȚII PERSONALE ȘI PERSPECTIVE PENTRU CONTINUAREA STUDIILOR

Alegerea temei de doctorat „**Compozite funcționale alimentare pe bază de coajă de ceapă galbenă, peptide și probiotice**” s-a bazat pe necesitatea închiderii lanțurilor valorice în bioeconomie prin obținerea de bioproduse inovatoare solicitate de piață. Principalele obiective ale studiului au fost utilizarea sustenabilă a cojilor de ceapă galbenă și dezvoltarea ingredientelor funcționale în vederea obținerii de produse alimentare cu valoare adăugată (biscuiți, sosuri de salată, brânză proaspătă și nachos) cu o concentrație stabilă de compuși țintă și caracteristicile senzoriale.

Contribuțiile originale ale acestei lucrări includ următoarele:

- Extracția, identificarea și caracterizarea compușilor biologic activi și a activității antioxidante și identificarea compușilor volatili din coaja de ceapă galbenă, o sursă valoroasă și neutilizată de polifenoli;
- Studiul mecanismului de legare dintre flavonoidele extrase din coji de ceapă galbenă și peptidele derivate din hidroliza proteinelor din zer prin spectroscopie de fluorescență și modelare moleculară;
- Studiul comportamentului compușilor fenolici din cojile de ceapă galbenă în timpul digestibilității simulate *in vitro* pentru a crește bioaccesibilitatea;
- Utilizarea ca material de încapsulare și sursă de peptide cu funcții biologice a izolatului proteic din zer și a  $\beta$ -lactoglobulinei;
- Microîncapsularea flavonoidelor din extractul de coajă de ceapă galbenă în matrici complexe biopolimerice pe bază de proteine și poliglucide pentru a crește stabilitatea compușilor țintă;
- Co-microîncapsularea flavonoidelor extrase din coji de ceapă galbenă și bacterii lactice pentru obținerea de ingrediente multifuncționale caracterizate din punct de vedere al conținutului fitochimic, activități biologice, digestibilitate *in vitro*, biocompatibilitate *in vitro* și potențial prebiotic;
- Dezvoltarea unei metode ecologice pentru extracția și încapsularea unui extract lichid de flavonoide din cojile de ceapă galbenă;
- Creșterea eficienței de încapsulare a flavonoidelor din cojile de ceapă galbenă prin reacția Maillard între izolatul proteic din zer și xiloză;
- Dezvoltarea de ingrediente multifuncționale pe bază de compuși biologic activi din coajă de ceapă galbenă, îmbogății cu peptide și bacterii lactice testate în diferite matrici alimentare pentru funcționalizarea acestora;
- Dezvoltarea de produse alimentare cu valoare adăugată care conțin o concentrație ridicată și stabilă de compuși biologic activi extrași din coaja de ceapă galbenă, probiotice, proteine și poliglucide.

**Perspectivile pentru studii ulterioare** derivă din necesitatea valorificării numeroaselor subproduse insuficient cunoscute și neutilizate care reprezintă surse bogate de compuși cu efecte benefice asupra sănătății. Prin urmare, pot fi luate în considerare următoarele:

- Analiza profilului hidrofob al extractului de coajă de ceapă galbenă;
- Analiza cojilor de ceapă galbenă din perspectiva existenței potențialilor contaminanți fizici și chimici, metale grele, pesticide, microplastice;

- Extinderea duratei de valabilitate a pulberilor pentru a obține cea mai bună stabilitate a compușilor biologic activi;
- Determinarea profilului fitochimic, a viabilității celulare și a profilului colorimetric a ingredientelor funcționale și produselor alimentare cu valoare adăugată, la depozitare îndelungată;
- Testarea potențialului de inhibiție asupra altor enzime;
- Dezvoltarea de noi tehnologii de produse alimentare cu valoare adăugată în vederea extinderii industriei;
- Valorificarea altor deșeuri noi provenite din prelucrarea industrială;

## CAPITOLUL 13. DISEMINAREA REZULTATELOR

### 13.1. Lista publicațiilor

1. **Milea, S. A.**, Aprodu, I., Enachi, E., Barbu, V., Râpeanu, G., Bahrim, G. E., Stănciuc, N. (2021). Whey protein isolate-xylose Maillard-based conjugates with tailored microencapsulation capacity of flavonoids from yellow onion skins. *Antioxidants*, 10(11), 1708. <https://doi.org/10.3390/antiox10111708>.
2. **Milea, S. A.**, Vasile, M. A., Crăciunescu, O., Prelipcean, A. M., Bahrim, G. E., Râpeanu, G., Oancea, A., Stănciuc, N. (2020). Co-microencapsulation of flavonoids from yellow onion skins and lactic acid bacteria lead to a multifunctional ingredient for foods and pharmaceuticals applications. *Pharmaceutics*, 12(11), 1053 DOI: [10.3390/pharmaceutics12111053](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111053).
3. **Milea, S. A.**, Aprodu, I., Mihalcea, L., Enachi, E., Bolea, C. A., Râpeanu, G., Bahrim, G. E., Stănciuc, N. (2020). Bovine  $\beta$ -lactoglobulin peptides as novel carriers for flavonoids extracted with supercritical fluids from yellow onion skins. *Journal of Food Science*, 85(12), 4290–4299. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15513>.
4. **Milea, S. A.**, Aprodu, I., Enachi, E., Barbu, V., Râpeanu, G., Bahrim, G. E., Stănciuc, N. (2021). B-lactoglobulin and its thermolysin derived hydrolysates on regulating selected biological functions of onion skin flavonoids through microencapsulation. *CyTA - Journal of Food*, 19(1), 127–136. <https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1864020>
5. **Milea, S. A.**, Aprodu, I., Vasile, A. M., Barbu, V., Râpeanu, G., Bahrim, G. E., Stănciuc, N. (2019). Widen the functionality of flavonoids from yellow onion skins through extraction and microencapsulation in whey proteins hydrolysates and different polymers. *Journal of Food Engineering*, 251, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.02.003>.
6. Constantin, O. E., **Milea, A. Ș.**, Bolea, C., Mihalcea, L., Enachi, E., Copolovici, D. M., Copolovici, L., Munteanu, F., Bahrim, G. E., Râpeanu, G. (2021). Onion (*Allium cepa* L.) peel extracts characterization by conventional and modern methods. *International Journal of Food Engineering*, 17(6), 485–493. <https://doi.org/10.1515/ijfe-2020-0310>.
7. **Milea, S. A.**, Crăciunescu, O., Râpeanu, G., Oancea, A., Enachi, E., Bahrim, G. E., Stănciuc, N. (2021). Multifunctional ingredient from aqueous flavonoidic extract of yellow onion skins with cytocompatibility and cell proliferation properties. *Applied Sciences*, 11(16), 7243. <https://doi.org/10.3390/app11167243>.

### 13.2. Cereri de brevete

1. **Milea Ștefania-Adelina**, Mihalcea Liliana, Bahrim Gabriela Elena, Vasile Aida Mihaela, Râpeanu Gabriela, Stănciuc Nicoleta, "Dunărea de Jos" University of Galati, Ingrediente funcționale formulate pe bază de extracte flavonoidice din coji de ceapă galbenă și peptide bioactive din zer pentru utilizări în industria alimentară; 30564/27.11.2018
2. **Milea Ștefania-Adelina**, Bahrim Gabriela Elena, Râpeanu Gabriela, Stănciuc Nicoleta. Ingrediente multifuncționale pe bază de extracte flavonoidice din coji de ceapă galbenă și bacterii lactice co-microîncapsulate și aplicații ale acestora ; A/00471 din 01.08.2019

### 13.3. Participări și premii la conferințe naționale și internaționale

1. Student Scientific Session XVIIIth Edition, November 25-2, 2022, Arad, Romania, SUSTAINABLE USE OF ONION SKINS FOR THE DEVELOPMENT OF INNOVATIVE FUNCTIONAL INGREDIENTS, **Stefania-Adelina Milea**, Nicoleta Stănciuc, Faculty of Food Science and Engineering, Dunărea de Jos University, Galați, Romania – premiul al III-lea;
2. SCDS-UDJG 2022 - The Tenth Edition, GALAȚI, Yellow onion skins: from food waste to valuable resource, **Stefania-Adelina Milea**, Iuliana Aprodu, Gabriela Râpeanu, Gabriela Elena Bahrim, Nicoleta Stănciuc, poster.
3. SCDS-UDJG 2022 - The Tenth Edition, GALAȚI, Exploring the health benefits of multifunctional ingredients based on flavonoids from yellow onion skins and lactic acid bacteria through comicroencapsulation, **Stefania-Adelina Milea**, Iuliana Aprodu Gabriela Râpeanu, Gabriela Elena Bahrim, Nicoleta Stănciuc, poster – mențiune.
4. CEREX UDJG 2021 Award for outstanding results in research, development, innovation, technology transfer, artistic creation, and sports performance - Research Gala at the University "Dunărea de Jos" in Galați - Research Assistant **PhD. eng. MILEA Ștefania-Adelina**.
5. The competition for the award of the research results of the doctoral students from IOSUD-UDJG for the year 2021, "Whey Protein Isolate-Xylose Maillard-Based Conjugates with Tailored Microencapsulation Capacity of Flavonoids from Yellow Onions Skins", published in Antioxidants - **first prize**.
6. Inovaliment 2021- Sustainable valorification of onion peels for the development of innovative functional ingredients - authors: Dermengiu Nicoleta, **Milea Ștefania Adelina**, Nicoleta Stănciuc, Mihalcea Liliana - Biotechnologies category – **first prize**.
7. Inovaliment 2021- Sustainable valorification of onion peels for the development of innovative functional ingredients - authors: **Milea Ștefania Adelina**, Nicoleta Stănciuc - Innovation category - **3rd prize**.
8. EuroAliment, Galați, 7-8 October, 2021, *Functional potential of natural co-microencapsulated ingredients based on flavonoids from yellow onion skins, whey bioactive peptides and lactic acid bacteria*, **Stefania-Adelina Milea**, Gabriela Elena Bahrim, Gabriela Râpeanu, Iuliana Aprodu, Nicoleta Stănciuc, "Dunărea de Jos" University of Galați.
9. 9<sup>th</sup> edition of Scientific Conference of Doctoral Schools SCDS-UDJG, "Dunarea de Jos" University of Galați, 10-11 of June 2021, *Effect of glycosylation with xylose on the ability of whey proteins to encapsulate the flavonoids from yellow onions skins*, **Stefania Adelina Milea**, Iuliana Aprodu, Elena Enachi, Gabriela Râpeanu, Gabriela Elena Bahrim, Nicoleta Stănciuc. – **2<sup>nd</sup> prize**.
10. 9<sup>th</sup> edition of Scientific Conference of Doctoral Schools SCDS-UDJG, "Dunarea de Jos" University of Galați, 10-11 of June 2021, *Effect of glycosylation with xylose on the ability of whey proteins to encapsulate the flavonoids from yellow onions skins*, **Stefania Adelina Milea**, Iuliana Aprodu, Elena Enachi, Gabriela Râpeanu, Gabriela Elena Bahrim, Nicoleta Stănciuc. – **special prize "Profesor G.M. Costin"**.
11. 9<sup>th</sup> edition of Scientific Conference of Doctoral Schools SCDS-UDJG, "Dunarea de Jos" University of Galați, 10-11 of June 2021, *Functional ingredients based on yellow onion skins extract and whey bioactive peptides for use in the food industry*, **Stefania-Adelina Milea**, Liliana Mihalcea, Aida Mihaela Vasile, Nicoleta Stănciuc, Gabriela Râpeanu, Gabriela Elena Bahrim.
12. Ingredients Show by Ro.aliment, On-line, May 2021, *Ingrediente naturale inovatoare cu funcționalitate multiplă și aplicații în domeniile alimentar și farmaceutic*, Nina-Nicoleta Condurache



(Lazăr), **Ștefania-Adelina Milea**, Gabriela Râpeanu, Gabriela Bahrim, Nicoleta Stănciuc. Universitatea Dunărea de Jos din Galați, Facultatea Știința și Ingineria Alimentelor.

13. Scientific Communications Session, Galati, 28 Mai 2021, A simplified, green extraction method of flavonoids from yellow onion from microencapsulation perspective – A preliminary study Valache Alondra, Professor Nicoleta Stănciuc, PhD student **Ștefania Adelina Milea** – **3<sup>rd</sup> prize**.

14. Student Scientific Session XVIII<sup>th</sup> Edition, November 26-27, 2020, Arad, Romania, *β-lactoglobulin peptides enhanced the health-benefits of flavonoids from yellow onion skins extract through microencapsulation*, **Ștefania-Adelina Milea**, Iuliana Aprodu, Gabriela Elena Bahrim, Gabriela Râpeanu, Nicoleta Stănciuc, Faculty of Food Science and Engineering, Dunărea de Jos University, Galati, Romania – **1<sup>st</sup> prize**;

15. The IOSUD-UDJG PhD research award competition for 2020, "Widen the functionality of flavonoids from yellow onion skins through extraction and microencapsulation in whey proteins hydrolysates and different polymers", published in the Journal of Food Engineering -**3<sup>rd</sup> prize**;

16. Inovaliment - 23-27 November 2020, *Ingrediente naturale multifuncționale pe bază de flavonoide din coajă de ceapă și bacterii lactice co-microîncapsulate*, **Ștefania-Adelina Milea**, Gabriela Elena Bahrim, Gabriela Râpeanu, Nicoleta Stănciuc, Faculty of Food Science and Engineering, Dunărea de Jos University, Galati, Romania.

17. 8<sup>th</sup> edition of Scientific Conference of Doctoral Schools SCDS-UDJG, "Dunarea de Jos" University of Galati, 18-19 of June 2020. *Boosting the health-benefits of flavonoids from yellow onion skins and β-lactoglobulin peptides microencapsulation*, **Adelina Ștefania-Milea**, Iuliana Aprodu, Gabriela Râpeanu, Gabriela Elena Bahrim, Nicoleta Stănciuc, Faculty of Food Science and Engineering, Dunărea de Jos University, Galati, Romania – **1<sup>st</sup> prize**;

18. 8<sup>th</sup> edition of Scientific Conference of Doctoral Schools SCDS-UDJG, "Dunarea de Jos" University of Galati, 18-19 of June 2020, *Evidences of binding mechanism between flavonoids supercritical fluids extracted from yellow onion skins and bovine β-lactoglobulin peptides*, **Adelina Ștefania-Milea**, Iuliana Aprodu, Gabriela Râpeanu, Gabriela Elena Bahrim, Nicoleta Stănciuc, Faculty of Food Science and Engineering, Dunărea de Jos University, Galati, Romania;

19. Inoivent, Chișinău, 20-23 November 2019, *Ingrediente multifuncționale pe bază de extracte flavonoidice din coji de ceapă galbenă și bacterii lactice co-microîncapsulate și aplicații ale acestora*, **Ștefania-Adelina Milea**, Gabriela Elena Bahrim, Gabriela Râpeanu, Nicoleta Stănciuc, Faculty of Food Science and Engineering, Dunărea de Jos University, Galati, Romania – **Gold**;

20. Inoivent, Chișinău, 20-23 November 2019, *Ingrediente naturale pe bază de antociani din struguri microîncapsulate în hidrogeluri din proteine din zer pentru utilizări în industria alimentară*, Carmen BOLEA, Elena ENACHI, **Ștefania-Adelina MILEA**, Gabriela RÂPEANU, Gabriela BAHIRM, Nicoleta STĂNCIUC, Faculty of Food Science and Engineering, Dunărea de Jos University, Galati, Romania – **Gold**;

21. UGAL INVENT Innovation and Research Show, 16-18 October 2019, *Ingrediente multifuncționale pe bază de extracte flavonoidice din coji de ceapă galbenă și bacterii lactice co-microîncapsulate și aplicații ale acestora*, **Ștefania-Adelina Milea**, Gabriela Elena Bahrim, Gabriela Râpeanu, Nicoleta Stănciuc, Faculty of Food Science and Engineering, Dunărea de Jos University, Galati, Romania – **Silver**;

22. International Expo-Conference Ingredients Show, 3<sup>rd</sup> Edition, 17-18 octombrie 2019, Sinaia, *Ingrediente co-încapsulate cu bacterii lactice și compuși bioactivi*, **Ștefania Adelina Milea**, Nina

Nicoleta Condurache, Gabriela Râpeanu, Gabriela Elena Bahrim, Nicoleta Stănciuc, Faculty of Food Science and Engineering, Dunărea de Jos University, Galați, Romania – **2<sup>nd</sup> prize;**

23. EuroAliment, Galați, 5-6 September, 2019, *Development of highly functional ingredient based on yellow onion skin flavonoids microencapsulation*, **Stefania-Adelina Milea**, Gabriela Elena Bahrim, Gabriela Râpeanu, Nicoleta Stănciuc, Faculty of Food Science and Engineering, Dunărea de Jos University, Galați, Romania.

**24.** 2nd European One Health Conference, Bucharest, 21-22 June 2019, **Stefania-Adelina Milea**, Gabriela Râpeanu, Gabriela Elena Bahrim, Nicoleta Stănciuc, *Yellow onion skins: a possible source for positive health effects;*

25. The 23rd International Exhibition of Inventics “INVENTICA 2019” Iași, Romania, *Functional ingredients based on flavonoid extract from yellow onion skins and whey bioactive peptides for use in the food industry*, **Stefania-Adelina Milea**, Liliana Mihalcea, Aida Mihaela Vasile, Nicoleta Stănciuc, Gabriela Râpeanu, Gabriela Elena Bahrim;

26. Seventh Edition of the Scientific Conference of the Doctoral Schools of Dunărea de Jos University, Galați, 13-14 June 2019, **Milea Stefania-Adelina**, Bahrim Gabriela Elena, Râpeanu Gabriela, Stănciuc Nicoleta, *Onion (*Allium cepa* L.) skin extracts characterization by conventional and modern methods –**mention;***

#### 13.4. Research projects:

1. **Research assistant in the project** “Complex system for the utilization of fruit by-products to obtain bioactive powders” - BIOPOWDER. PNDR financing contract C161A0000011884200010/18.03.2021.

2. **Research assistant in the project** „*Innovative strategies for capitalizing agri-food by-products into products with economic value promoting the principles of the circular economy*”, financing contract no. 14888/11.05.2022.

3. **Research assistant in the project** "New emerging concepts for food functionalization, through the transition from probiotics to metabiotics, as a health promotion strategy (BIOTICS +)", financing contract no. PCE 159/2021.

4. **Research assistant in the project** „*Innovative and emerging solutions for the design of natural co-microcomposites to improve food functionality*”, financing contract no. RF 3637/30.09.2021.

5. **Research assistant in the project** PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-056, 10PCCDI/2018 PRO-SPER „Closing value chains in the bioeconomy by obtaining innovative bioproducts required by the market” Project 3 - Tribiotic products - probiotics, prebiotics, postbiotics - with multiple uses, obtained from by-products from the industrialization of vegetables – 3-4Life.

Axa prioritară 6- Educație și competențe

Titlul proiectului: „Program pentru creșterea performanței și inovării în cercetarea doctorală și postdoctorală de excelență - PROINVENT”

Contract nr: 62487/03.06.2022 POCU/993/6/13 - Cod SMIS: 153299

Punctele de vedere exprimate în lucrare aparțin autorului și nu angajează Comisia Europeană și Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați, beneficiara proiectului.