

---

TEZA DE DOCTORAT

# Compoziția, autenticitatea și stabilitatea oxidativă a unor uleiuri esențiale în formă liberă și microîncapsulate

(REZUMAT)

---

Doctorand **Ramona Maria POPA**

---

Conducător de doctorat **Prof. emerit Dr. Carmen SOCACIU**

---



**Compoziția, autenticitatea și stabilitatea oxidativă a unor uleiuri esențiale în formă liberă și microîncapsulate**

---

## **INTRODUCERE**

Uleiurile esențiale, cunoscute și sub denumirea de uleiuri volatile, conțin în principal componente care se evaporă ușor, și anume hidrocarburi cum ar fi mono- și diterpenele, derivații terpenoidici (alcooli, aldehide și cetone, esteri și eteri derivați din terpene) reprezentând 90-98%, dar și componente mai puțin volatile (GYAWALI et al, 2014; RIVERA et al., 2015). Zeci de articole au fost raportate în ultimii ani despre compoziția chimică a substanțelor volatile din plante aromatice, fie din flora spontană fie cultivate în zone continentale, tropicale și subtropicale. Compoziția lor este mult influențată de genotip (specie, cultivar, ecotip), ecologic (zonă geografică, climă, compoziția solului) și factori tehnologici (cultivare, depozitare a materiei prime și tehnici de prelucrare) (JOHNSON, 2017). Uleiurile esențiale sunt utilizate pe scară largă ca arome naturale ale alimentelor, fiind responsabile pentru mirosul și gustul lor atractiv. Printre sursele indigene de uleiuri esențiale utilizate ca și condimente culinare sunt plantele aromatice din familia *Lamiaceae* (cimbru, salvie, oregano, mentă, măghiran și busuioc), din conifere (ienupăr, pin), precum și condimente precum cuișoarele și scorțișoara.

Încă din evul mediu, interesul pentru uleiurile esențiale s-a datorat efectelor lor antioxidante, bactericide, virucide, fungicide, antiparazitare, insecticide, iar acest interes este amplificat în zilele noastre, datorită aplicațiilor lor în farmacologie, medicină, industrie alimentară, sub diferite formule farmaceutice și cosmetice (BAKKALI, 2008; JOHNSON et al, 2017; KHANEGHAH, 2017; DERBASSIN et al, 2022; BAPTISTA-SILVA et al, 2020).

Pentru protecția alimentelor, îndeosebi ale celor grase, adăugarea de ierburi și condimente, dar și extractele lor sun formă de uleiuri esențiale sunt variante naturale preferate deoarece pot preveni și controla rănchezirea, pot întârzia formarea produșilor toxici de oxidare, pot menține calitatea nutrițională și pot prelungi durata de valabilitate a produselor alimentare (DERBASSIN et al, 2022). Concomitent, pe piață se pot găsi variante sintetice de compuși cu arome „identice naturale”, unele având coduri marcate E, altele fiind nedecarate, care falsifică OE. Autentificarea și trasabilitatea acestora reprezintă un domeniu important de investigație (TUREK et al, 2013).

Uleiurile esențiale din plante aromatice sunt extrem de apreciate de consumatori în zilele noastre, datorită efectelor lor antioxidante și de eliminare a radicalilor liberi (BAKKALI et al, 2008; DO et al, 2015). Mai mult, așa cum s-a demonstrat în ultimele decenii, prin diferite experimente *in vitro* sau *in vivo*, uleiurile esențiale acționează ca antimicrobiene, protejând împotriva bolilor respiratorii, infecțioase și cardiovasculare (RIVERA et al, 2015; BAPTISTA-SILVA et al, 2020).

## Compoziția, autenticitatea și stabilitatea oxidativă a unor uleiuri esențiale în formă liberă și microîncapsulate

Multe componente ale uleiurilor esențiale au fost identificate ca antibiotice eficiente, de ex. carvacrol, timol, eugenol, aldehydă cinamică și acid cinamic. Uleiurile esențiale sunt importante în industria alimentară, fiind dovedit efectul lor antimicrobian, pe durata procesării sau pentru conservarea diferitelor matrici alimentare, fiind utilizate inclusiv în ambalaje (KHANEGHAH, 2017; FIGUEROA et al, 2019; FERNANDEZ LOPEZ, 2018; JU, 2023). Recent, a fost publicată caracterizarea fracțiunilor volatile ale uleiuri esențiale din plante aromatice din familia *Lamiaceae* în raport cu activitățile lor antimicrobiene și antioxidante (FALEIRO, 2011; TUREK, 2013).

Aromele alimentare includ diferite tipuri de compuși clasificați în trei mari categorii: naturali, sintetici și eliberați în timpul procesării. O parte dintre aceștia sunt volatili și se cunosc sub denumirea de „flavours”, așa cum e cazul uleiurilor volatile, de origine naturală sau sintetică. Diferitele tipuri de compuși din arome sunt prezentați în Fig.1.

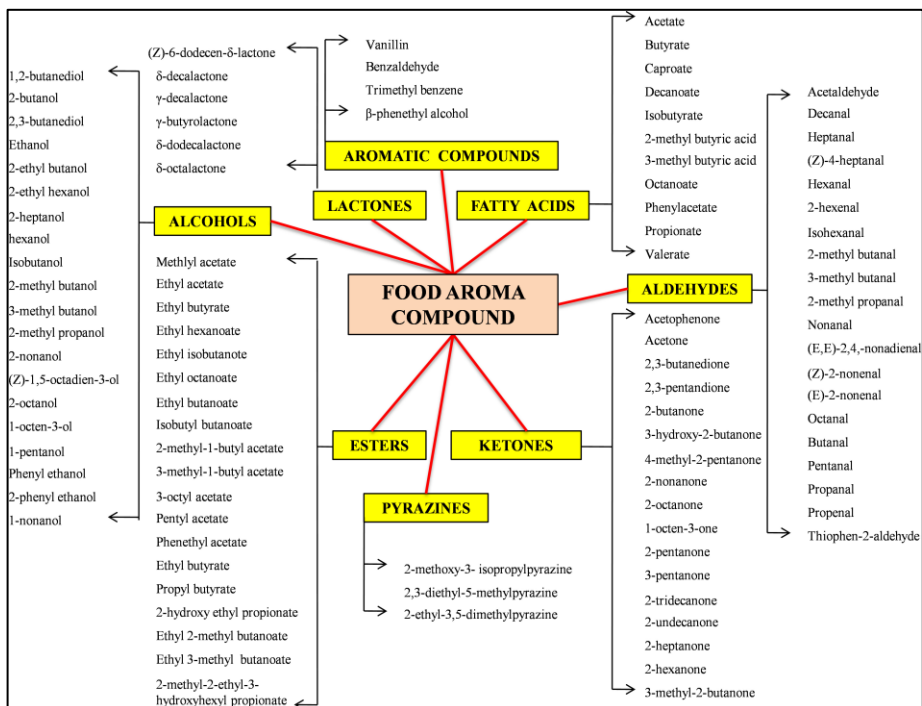
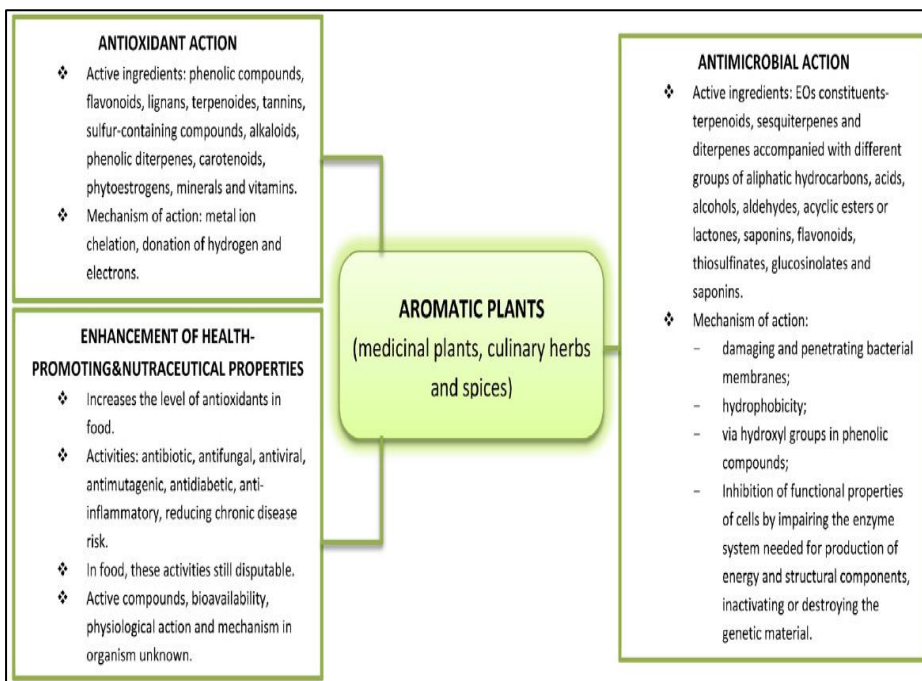


Fig.1. Clasificarea compușilor de aromă din plante și alimente ( SHARMA et al., 2020)

Rolul și beneficiile plantelor aromatice în sistemele alimentare, ingredientele active asociate și acțiunea lor antioxidantă, antimicrobiană și de protecție generală este prezentat succint în Fig.2.



**Fig. 2. Beneficiile plantelor aromatice (Sursa: FILIPCEV, 2020)**

Uleiurile esențiale utilizate ca arome naturale conțin o varietate de compuși dintre cei menționați mai sus, sunt extrase din plante aromatice și medicinale, sau semințe, condimente, legume sau fructe și se adaugă în alimente sub formă de pulberi (pudre), sau extracte apoase sau uleioase, acestea fiind descrise în monografiile EMA (<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/herbal>) și în FARMACOPEA EUROPEANĂ (2017, 2020).

Uleiurile esențiale includ de obicei amestecuri complexe din mai multe molecule volatile sau nevolatile, obținute prin hidrodistilare sau prin extracții cu fluide supercritice (dioxid de carbon). Un progres impresionant în cercetarea plantelor aromatice a fost observat în ultimele decenii, deoarece consumatorii sunt preocupați de calitatea alimentelor și preferă condimentele și aromele derivate din plante (ISTUDOR, 2001; FERNANDEZ LOPEZ, 2018; JU, 2023).

Recenzii sistematice recente au fost dedicate plantelor culinare și uleiurilor lor esențiale cu activități antibacteriene și potențiale aplicații în alimente (SVOBODA et al,

2004; BAKKALI, 2008; CHASSAGNE et al., 2021). De asemenea, verificarea autenticității uleiurilor esențiale, alături de alți metaboliți secundari ai plantelor, prezintă un interes științific ridicat și este importantă pentru câștigarea încrederii clienților. Calitatea, autenticitatea și siguranța uleiurilor esențiale prezintă un mare interes științific și aplicativ, implică proceduri analitice de înaltă rezoluție, îndeosebi gaz-cromatografia cuplată cu spectrometrie de masă, spectrometrie vibrațională (Infraroșu sau Raman), rezonanță magnetică nucleară (SOCACIU et al, 2009; DO et al, 2015; FRANCA et al, 2017; LI et al, 2019; TAYLAN et al, 2021; CEBI et al, 2021).

## **SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT**

Șase tipuri de uleiuri esențiale (cimbru, oregano, ienupăr, tea-tree, cuișoare și scorțișoară) precum și produsele Biomicin, Biomicin forte și Biomicin Urinar (formule uleioase), au fost utilizate pentru a obține formule microîncapsulate pe suport solid de fructoză sau maltodextrină.

Cercetările efectuate în cadrul prezentei teze de doctorat au avut ca scop general studiul compoziției, autenticității și a stabilității oxidative a acestor șase uleiuri în formă liberă și în formule uleioase și microîncapsulate pe suporturi solide.

Obiectivele punctuale au vizat patru direcții de cercetare:

1. Obținerea și caracterizarea unor formule originale ce includ cele șase tipuri de uleiuri esențiale: formule uleioase și formule solide obținute prin microîncapsulare pe suporturile solide de fructoză sau maltodextrină
2. Determinarea calității și autenticității uleiurilor esențiale prin gaz cromatografie cu detecție prin spectrometrie de masă (GC-MS) cuplată cu analiză statistică multivariată
3. Evaluarea calității și autenticității uleiurilor esențiale libereprin spectroscopie în Infraroșu (FTIR-ATR), înainte și după inducerea oxidării termice
4. Studiul comparativ al stabilității oxidative, a indicilor de peroxidare și a izomerizărilor cis-trans pentru uleiurile esențiale în formule uleioase și microîncapsulate

S-au aplicat metodologii moderne (GC-MS, FTIR-ATR) asociate cu analiză statistică specifică abordărilor metabolomice moderne, care stabilesc în mod netargetat și targetat biomarkerii metabolici de autenticitate, stabilitate și calitate a uleiurilor esențiale și a formulelor derivate. Aceste studii sunt originale și reprezintă un model modern de abordare în Știința și Tehnologia alimentelor, în farmacologie și cercetare biomedicală. Fig. 3. sumarizează obiectivele și metodele utilizate în aceste studii.

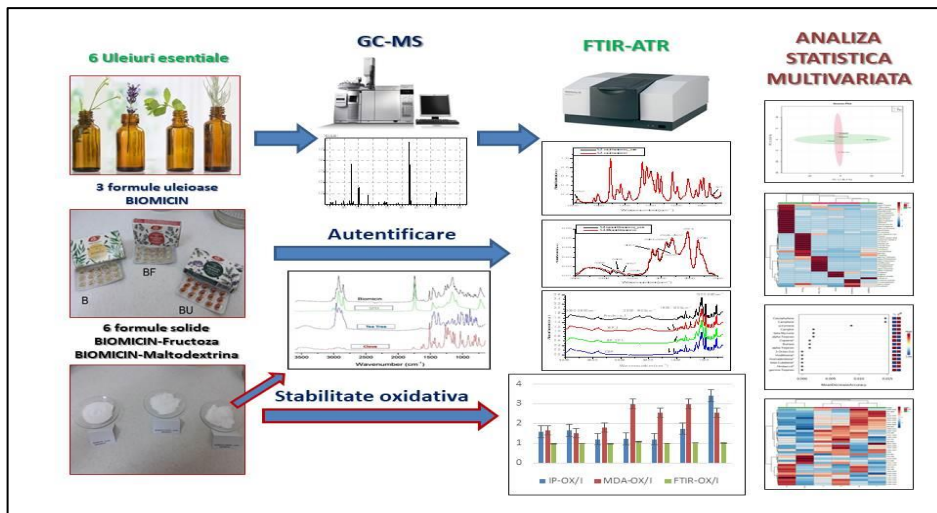


Fig.3. Prezentarea produselor și a metodelor aplicate în teza de doctorat.

## STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Prima parte, studiul de literatură, cuprinde capitolele 1-3 și tratează aspecte teoretice generale legate de uleiurile esențiale, tehnici, matrici de microîncapsulare și tehnici aplicate, precum și metode moderne de evaluare a calității și autenticității uleiurilor esențiale prin tehnici GC-MS și FTIR-ATR și analiză statistică. Contribuțiile personale sunt prezentate în capitolele 4-7 și includ rezultatele experimentale obținute în analiza uleiurilor esențiale, a formulelor uleioase și microîncapsulate, urmărindu-se compoziția și stabilitatea oxidativă.

## CONTRIBUȚIA ORIGINALĂ : REZULTATE

Cercetările întreprinse în cadrul tezei de doctorat au fost realizate în laboratoarele de Biochimie din campusul USAMV Cluj-Napoca și laboratorul LICSA, ambele aparținând Facultății de Știința și Tehnologia Alimentelor. Uleiurile esențiale și formulele uleioase din gama Biomicin au fost obținute de la compania SC Fares SA Orăștie, producător național de ceaiuri și suplimente alimentare pe bază de plante și uleiuri esențiale.

**Capitolul 4** a inclus materialele și metodele utilizate pentru obținerea și caracterizarea formulelor ce includ uleiuri esențiale, de la formulele uleioase (Biomicin, Biomicin forte, Biomicin urinar), la cele obținute prin microîncapsulare pe

suporturi solide de fructoză și maltodextrină. Pentru evaluarea calității formulelor uleioase s-au utilizat tehnici standardizate (densitate relativă, indice de refracție, indice de peroxid, putere rotatorie, determinarea peroxidării lipidelor prin testul malondialdehidei).

Au fost prezentate tehnici considerate în prezent ca cele mai avansate pentru separarea, identificarea și autentificarea moleculelor-marker din produse ce conțin uleiuri esențiale, și anume Cromatografia de Gaze cu detecție prin Spectrometrie de Masă (GC-MS) și Spectroscopia în Infraroșu cu transformata Fourier (FTIR-ATR).

Studiile analitice s-au completat prin urmărirea stabilității oxidative a acestor formule, fie prin oxidare indusă termic la formulele uleioase din gama Biomicin, fie prin oxidare solară indusă pe formulele solide microîncapsulate pe matrici de maltodextrină și fructoză.

**Capitolul 5** a inclus rezultatele analizelor GC-MS efectuate în vederea determinării calității și autenticității uleiurilor esențiale. Sunt prezentate spectrele obținute și o analiză statistică a rezultatelor, folosind o abordare bazată pe analiza metabolomică, o combinație între separarea și identificarea precisă a moleculelor din diferite uleiuri esențiale combinate cu un instrument statistic modern și actualizat oferit de softul Metaboanalyst 5.0.

S-au identificat moleculele specifice fiecăruia dintre cele șase uleiuri esențiale în formă liberă (Cimbru, Ienupăr, Oregano, Arbore de ceai, Cuișoare și Scorțișoară). Analiza multivariată a reflectat predictibilitatea a aproximativ 15 biomarkeri potențiali care discriminează uleiurile, cum ar fi Timol și p-Cimen pentru Cimbru,  $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Mircen și Sabinen pentru Ienupăr, Carvacrol pentru Oregano, derivați de Terpinen pentru Arbore de ceai, Eugenol, Acetat de Eugenol pentru Cuișoare, Cinamaldehydă pentru Scorțișoară. Tabelul 5.1 prezintă compoziția comparativă (%) a fracției volatile, calculate din spectrele GC-MS a celor șase uleiuri esențiale, cu identificarea componentelor.

**Tabel 5.1.**

**Compoziția comparativă (%) a fracției volatile, calculate din spectrele GC-MS, a celor șase uleiuri esențiale, cu identificarea componentelor.**

Molecule	Cimbru	Ienupăr	Oregano	Arbore ceai	Cuișoare	Scorțișoară
$\alpha$ -Terpinene	1.70	0.48	0.51	9.96	0	0
$\gamma$ -Terpinene	8.91	2.17	4.27	19.79	0	0
Himbaccol*	0.12	0	0	0	0	0
$\beta$ -Cubebene*	0	1.80	0	0	0	0
Aromadendrene	0	0.19	0	1.44	0	0



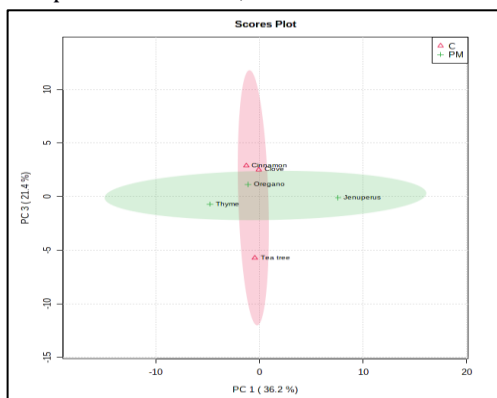
**Compoziția, autenticitatea și stabilitatea oxidativă a unor uleiuri esențiale în formă liberă și microincapsulate**

Viridiflorene*	0	0	0	1.30	0	0
1-Octen-3-ol	0.72	0	0	0	0	0
3-Carene *	0.12	0	0	0	0	0
1-Terpinen-4-ol	1.46	3.46	0.58	44.45	0	0
$\alpha$ -Terpineol	0.16	0.06	0.72	4.12	0	1.41
$\alpha$ -Caryophyllene	0	1.12	0.3	0.02	0.57	0
$\alpha$ -Cubebene	0.10	0.73	0	0	0	0
$\alpha$ -Phellandrene*	0.20	0	0	0.35	0	0
$\alpha$ -Pinene	1.16	36.41	0.21	2.63	0	0.89
Isothymol methyl ether	0.81	0	0	0	0	0
Thymol methyl ether	0.64	0	0	0	0	0
$\beta$ -Myrcene	1.76	15.38	0.23	0.41	0	0
$\beta$ -Pinene	0.24	3	0.44	0.56	0	0.18
$\beta$ -Linalool	5.03	0	2.53	0	0	4.63
$\alpha$ -Thujene	0.85	1.40	0.23	0.56	0	0
<i>trans</i> Sabinene hydrate*	0.35	0	0	0.17	0	0
Sabinene	0	10.31	0	0.22	0	0
Borneol	1.82	0	0.95	0	0	0
Camphene	1.67	0.3	0.14	0	0	0
Camphor	1.32	0	0.83	0	0	0
Carvacrol	2.34	0	75.82	0	0	0
Caryophyllene	7.50	5.41	2.33	0	0	0
Copaene*	0.14	0.53	0	0.18	7.59	3.3
$\beta$ -Elemene	0	0.67	0	0.07	0.16	0
Pseudolimonene*	0.06	0.37	0	0	0	0
$\alpha$ -Terpinolene	0.15	1.27	0	3.25	0	0
$\delta$ -Cadinene*	0.14	1.57	0	1.59	0	0

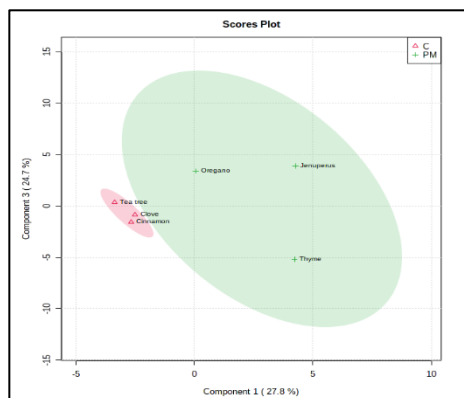
**Compoziția, autenticitatea și stabilitatea oxidativă a unor uleiuri esențiale în formă liberă și microincapsulate**

D-Limonene	0.80	8.17	0.67	1.38	0	1.81
Eucalyptol	1.76	0	1.52	1.69	0	3.74
Eugenol	0	0	0	0	79.67	2.03
Eugenol acetate	0	0	0	0	11.69	0
p-Cymene	19.94	2.90	5.98	2.67	0	2.05
Thymol	38.00	0	1.59	0	0	0
$\gamma$ -Muurolene	0	0.4	0	0	0	0
$\beta$ -cis-Ocimene	0		0	0.14	0	0
Germacrene B*	0	0.84	0	0	0	0
Cinnamyl acetate	0	0	0	0	0	2.76
Cinnamaldehyde	0	0	0	0	0	76.92

Analiza statistică multivariată prin algoritmi folosiți (PCA, PLSDA, Random Forest, Heatmap) au reflectat discriminarea dintre grupurile de probe (C și PM) și uleiurile esențiale individuale, reprezentate prin molecule-biomarker specifice. Figura 5.2a include graficul scorurilor PCA care evidențiază diferențierea probelor și asemănările grupului C (condimente) și PM (plante medicinale), pe baza variabilității compoziției lor. Co-varianța pentru primele 3 componente a atins valoarea 57,6%. Figura 5.2b reprezintă graficul scorului PLSDA, co-varianța pentru primele 3 componente fiind 52,5%.



**(a)**

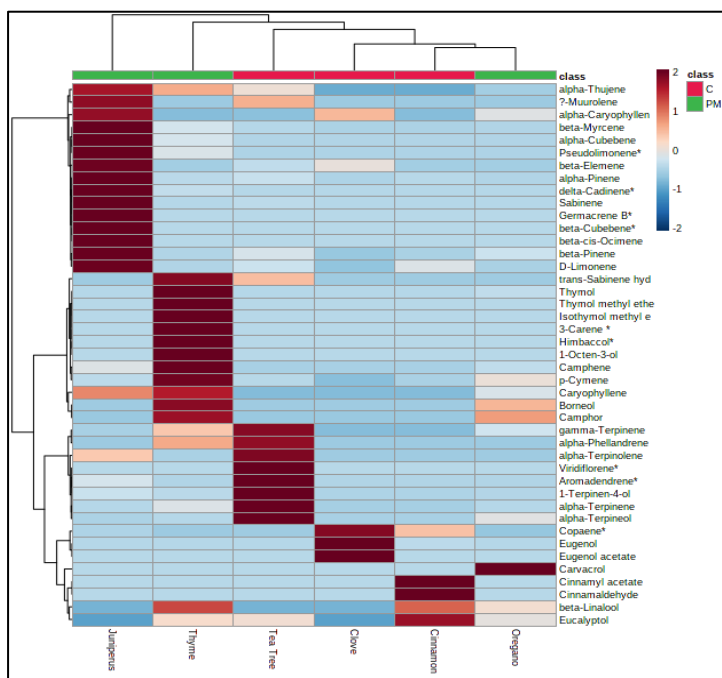


**(b)**

**Fig. 5.2 (a) Graficul scorurilor PCA (PC1 vs PC3) care prezintă diferențierea dintre grupurile PM și C (b) Graficul PLSDA (PC1 vs PC3) care arată discriminarea semnificativă între profilul grupurilor C și PM. Abrevieri: PM-plante medicinale (Cimbru, Oregano, Ienupăr); C-condimente (Scortșoară, Cuișoare, Arbore de ceai)**

Ambele grafice confirmă o diferențiere semnificativă între cele două grupuri. De remarcat că uleiul de Ienupăr este net diferit prin compoziția sa și de asemenea cel de Cimbru.

Figura 5.3. reprezintă harta tip Heatmap utilizând o distanța euclidiană și algoritmul Ward. Se văd (în partea superioară) dendrogramele de analiză Cluster, cu corelații și asemănări între probele din grupul C (roșu). Se observă o diferențiere semnificativă a probei de Oregano, care nu se clusterizează cu celelalte uleiuri din grupul PM (verde). Heatmap arată și care sunt moleculele care explică diferențierea, respectiv asemănarea dintre aceste probe de uleiuri.



**Fig. 5.3. Heatmap: corelații între probe (partea superioară) bazate pe dendrograma de analiză cluster și între probe și molecule (jos și dreapta), cu semnăturile specifice fiecărui tip de probă.**

Acest studiu oferă o evaluare și interpretare precisă a autenticității acestor uleiuri pe baza identificării biomarkerilor, fiind posibilă identificarea falsificărilor sau a degradărilor oxidative, inclusiv identificarea unor aditivi volatili denumiți uleiuri „identice naturale” care sunt de fapt specimene sintetice sau degradate.

**Capitolul 6** cuprinde rezultatele evaluării calității și autenticității a celor șase uleiuri esențiale prin spectrometrie de tip FTIR-ATR, înainte și după oxidare termică controlată. S-a făcut în paralel o evaluare a stabilității oxidative prin metode clasice

(indice de peroxid și testul malondialdehidei) și metoda FTIR-ATR. Rezultatele spectrelor FTIR au fost interpretate prin analiză statistică multivariată pentru a realiza „cărți de identitate” specifice fiecărui ulei, pe baza numerelor de undă specifice de absorbție IR și a intensităților semnalelor din anumite domenii spectrale, pentru a fi considerate markeri de autenticitate.

Prin oxidare termică indusă s-a demonstrat că aproape toate uleiurile esențiale testate au prezentat o bună stabilitate oxidativă. S-au găsit corelații pozitive și semnificative între valorile Indicelui de peroxid și a malodialdehidei, obținute prin metode chimice de rutină și intensitățile semnalelor FTIR la numere de undă specifice ( $966/925\text{ cm}^{-1}$ ), ca markeri ai stabilității oxidative a uleiurilor esențiale. Analiza spectrală FTIR a oferit informații suplimentare și complementare, evidențiind și absența izomerizărilor de tip *cis-trans*.

Analiza statistică multivariată de tip PLSDA și Random Forest și hărțile Heatmap intuitive au fost utile pentru a selecta și identifica biomarkerii de autenticitate, de calitate și de asemenea a evidenția diferențe de amprentă spectrală după oxidare termică indusă.

Pe baza amprentelor spectrale și a matricilor reprezentând numerele de undă vs intensitate, pentru fiecare probă de ulei esențial, înainte și după oxidarea termică indusă, analiza PLSDA și Random Forest au arătat diferențele dintre momentul inițial (G) și după oxidare (OX). Figura 6.4A și B reprezintă graficul scorului PLSDA și scorurile VIP care au identificat zonele IR (numerele de undă) care determină discriminarea dintre grupurile G și OX.

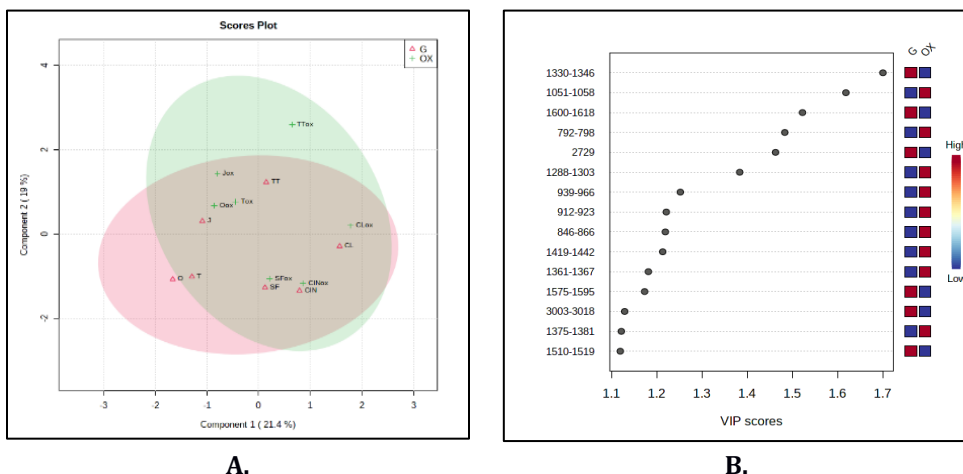
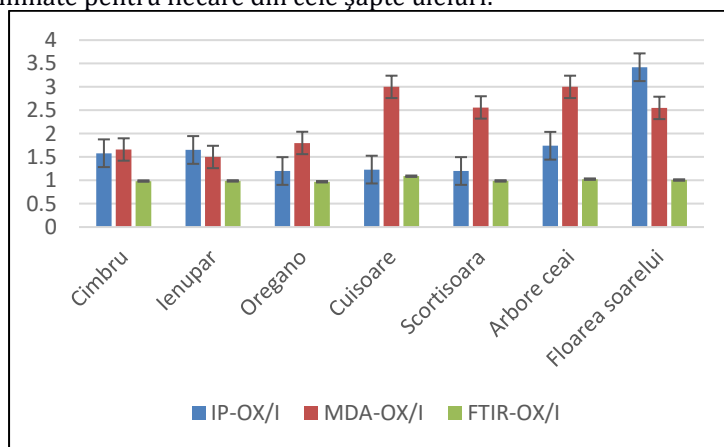


Fig. 6.4. A. Graficul PLSDA pentru discriminarea între probe, înainte(G) și după oxidare(Ox). B. Scoruri VIP corespunzătoare zonelor IR care pot diferenția grupurile G și Ox. Prescurtări: T-Cimbru; O-Oregano; TT-Arbore de ceai; J-Ienupăr; CIN-Scorțișoară; CL-Cuișoare

Spectroscopia FTIR-ATR-MIR s-a dovedit, încă o dată, a fi o metodă fiabilă, rapidă și nedistructivă, ușor de utilizat pentru controlul calității, autenticității și siguranței uleiurilor esențiale în formule uleioase.

Figura 6.8. integrează datele obținute prin cele trei metode, considerând valorile medii (determinate din triplicat) ale rapoartelor IP-OX/I, MDA-OX/I și FTIR-OX/I determinate pentru fiecare din cele șapte uleiuri.



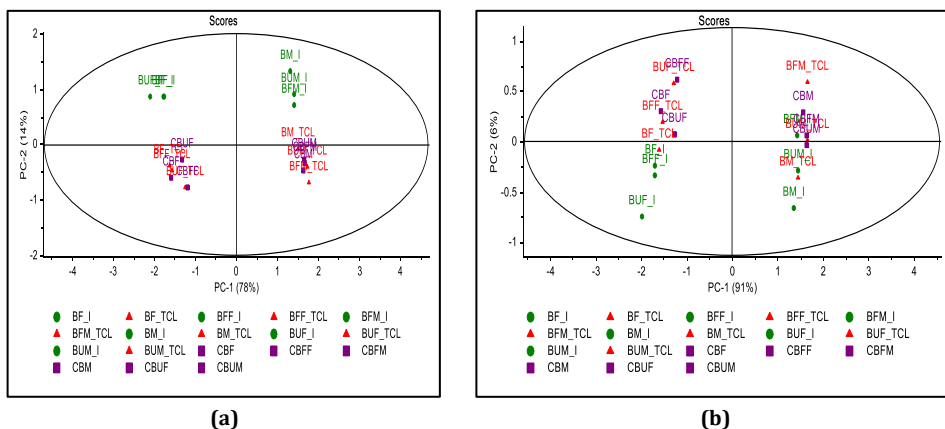
**Fig. 6.8. Valorile medii ( $x \pm SD$ ) pentru rapoartele IP-OX/I, MDA-OX/I și FTIR-OX/I pentru cele șapte uleiuri menționate în legendă.**

**În capitolul 7** rezultatele reflectă stabilitatea oxidativă comparativă a formulilor uleioase și microîncapsulate pe suporturi solide. A fost utilizată spectrometria FTIR-ATR pentru a determina amprenta specifică a acestor produse și a evalua stabilitatea lor în urma iradierii solare. Investigațiile și rezultatele prezentate au demonstrat că tehnica FTIR-ATR-MIR poate fi aplicată succesiv, cu succes în formulele derivate, uleioase sau microîncapsulate pe suport solid.

Spectrele de absorbție FTIR-ATR-MIR ale uleiurilor esențiale prezintă vibrații caracteristice, de întindere C-H ( $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$ ), întindere C=O ( $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ ), întindere O-H ( $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ ) și C-O ( $\sim 1100\text{ cm}^{-1}$ ) specifice componentelor terpenoidice, și sunt dominate de moduri de vibrație ale monoterpenelor la 886, 1436 și  $1644\text{ cm}^{-1}$ .

Forma spectrelor și intensitățile semnalelor au reflectat o bună discriminare între cele trei formule uleioase dar și a celor microîncapsulate. Analiza statistică a fost deosebit de utilă și în acest caz, pentru identificarea și discriminarea diferențelor dintre profilurile celor trei formule pe suporturi de fructoză sau maltodextrină. Graficele PLSDA au arătat că formulele solide pe maltodextrină au fost capabile să discrimineze mai bine diferitele ingrediente ale uleiurilor esențiale.

Folosind softul și algoritmi Unscrambler 10.x, s-au obținut graficele scorului componentelor principale (PCA) corespunzătoare regiunii IR 3600-650  $\text{cm}^{-1}$  (Fig.7.5.a) și 1800-650  $\text{cm}^{-1}$  (Fig.7.5.b), cu evidențierea diferențelor între amprentele produselor microîncapsulate Biomicin (B), Biomicin Forte (BF) și Biomicin urinar (BU) pe suporturi de fructoză (F) sau maltodextrină (M), în stadiul inițial (I), după iradiere solară (TCL) și după păstrare în capsule (C).



**Fig. 7.5. Scorurile componentelor principale (PCA) corespunzătoare regiunii IR 3600-650  $\text{cm}^{-1}$  (a) și 1800-650  $\text{cm}^{-1}$  (b), cu evidențierea diferențelor între amprentele produselor microîncapsulate Biomicin (B), Biomicin Forte (BF) și Biomicin urinar (BU) folosind fructoză (F) vs maltodextrină (M) ca suport, în stadiul inițial (I), după iradiere solară (TCL) și după păstrare în capsule (C).**

O imagine generală a comparațiilor dintre probe și numerele de undă semnificative a fost obținută prin graficele Heatmap iar Analiza de tip Random Forest a arătat care sunt cele mai relevante numere de undă capabile să discrimineze diferitele uleiuri esențiale adsorbite pe aceste matrici.

Numerele de undă specifice de absorbție și intensitățile semnalelor înainte și după expunerea la lumină au indicat, de asemenea, o bună stabilitate a acestor formulări solide, precum și diferențele dintre fructoză și maltodextrină. Maltodextrina este recomandată pentru încapsulare având avantajul unei higroscopicități (retenții de umiditate) mai scăzute, o stabilitate mai bună și o mai bună disponibilitate pentru a fi inclusă și în matrici alimentare (de exemplu bomboane, gume) sau în suplimente alimentare. Față de formulările uleioase, mai expuse la oxidare și mai greu de introdus în matrici alimentare, se recomandă formulările solide microîncapsulate, în special pe maltodextrină.

Contribuția fiecărui ingredient din categoria uleiurilor esențiale de Cimbru, Oregano, Ienupăr, Arbore de ceai, Cuișoare, Scorțișoară în formule uleioase și în

formule solide microîncapsulate au fost ușor de identificat și de evaluat semcantitativ prin numere de undă specifice de absorbție FTIR și prin intensitățile semnalelor.

Aceste date au completat studiile bazate pe analiza GC-MS care a putut evidenția și identifica moleculele individuale din cele șase uleiuri esențiale, găsindu-le biomarkerii majori de autenticitate, de ex. timol și p-cimen pentru Cimbru,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -mircen și sabinen pentru Ienupăr, carvacrol pentru Oregano, derivați de terpinen pentru Arbore de ceai, eugenol, acetat de eugenol pentru Cuișoare, cinamaldehydă pentru Scorțișoară. Studii similare au fost efectuate pentru uleiurile esențiale libere din Cimbru (SATYAL et al., 2016), Oregano (GONG et al., 2016; KULA et al., 2007), Ienupăr (FALCĂOA et al., 2018), Arbore de ceai [RAYMOND et al., 2017; GALLART-MATEUA et al., 2018], Cuișoare (HAMEED et al., 2021) și Scorțișoară (BRODOWSKA et al., 2016). Unele studii au fost validate prin GC-MS, fiind axate pe taxonomia și puritatea uleiurilor esențiale, și interpretate statistic (SU et al., 2019). Acestea au demonstrat că spectrometria FTIR este o metodă fiabilă de evaluare a biomarkerilor specifici acestor uleiuri și specii de plante.

Niciunul dintre aceste studii nu a efectuat analize pe uleiurile esențiale microîncapsulate pe matrici solide. De aceea cercetările prezentate în această teză de doctorat completează datele existente, au demonstrat avantajele spectroscopiei FTIR pentru calitatea, autentificarea și siguranța uleiurilor esențiale în orice formulă.

## **CONCLUZII GENERALE**

Obiectivele vizate de acest studiu au fost realizate experimental, astfel încât :

1. S-au obținut și caracterizat șase tipuri de uleiuri esențiale (Cimbru, Ienupăr, Oregano, Arbore de ceai, Cuișoare și Scorțișoară), libere sau incluse în diferite formule (uleioase sau solide pe diferite suporturi biodisponibile) utilizând tehnici de microîncapsulare prin adsorbție pe fructoză sau maltodextrină.
2. S-au evaluat calitatea și autenticitatea celor șase uleiuri esențiale în formă liberă prin gaz cromatografie cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS), evidențiindu-se moleculele-marker de autentificare a fiecărui tip de ulei esențial.
3. S-au realizat amprente spectrale ale uleiurilor esențiale libere și ale formulelor uleioase din gama Biomicin (Biomicin, Biomicin Forte și Biomicin Urinar) prin spectroscopie în Infraroșu (FTIR-ATR), înainte și după inducerea oxidării termice.
4. S-a realizat un studiu comparativ al stabilității oxidative, a indicilor de peroxidare și a izomerizărilor *cis-trans* prin metode complementare (chimice

și spectroscopice FTIR-ATR) pentru uleiurile esențiale incluse în formule uleioase și microîncapsulate pe suporturi solide de fructoză și maltodextrină.

5. Toate datele experimentale au fost procesate statistic prin analiză multivariată și univariată (One way ANOVA) utilizând software-uri specializate, cum sunt Unscrambler 10.x și Metaboanalyst 5.0, soft specializat în analiza metabolomică.

Datele obținute au evidențiat aspecte semnificative privind utilitatea tehnicilor de separare și identificare a biomarkerilor de autenticitate și calitate ale uleiurilor esențiale în diferite formule.

## **ORIGINALITATE ȘI CONTRIBUȚII INOVATIVE**

Rezultatele obținute în studiile prezentate au inclus diferite aspecte de originalitate și contribuții inovative, din punct de vedere tehnic și de procesare statistică. Astfel, menționăm:

- Utilizarea unor protocoale originale de obținere a formulelor uleioase ce conțin amestecuri de uleiuri esențiale cu funcționalitate dirijată (Biomicin, Biomicin forte și Biomicin Urinar) ce conțin amestecuri de molecule bioactive din uleiuri esențiale cu acțiune antibacteriană din diferite plante.
- Aplicarea unor protocoale originale de obținere a formulelor solide microîncapsulate pe suporturi biodisponibile de fructoză și maltodextrină, utilizând rapoarte optime între concentrațiile de ulei esențial și matricile solide. Fructoza nu a fost raportată până acum ca fiind utilizată ca matrice de încapsulare, în ciuda originii sale naturale și a calității nutriționale ridicate.
- Aplicarea unor metode și tehnici complementare (GC-MS, FTIR-ATR) asociate cu analiză statistică specifică abordărilor metabolomice moderne, care stabilesc în mod netargetat și targetat biomarkerii metabolici de autenticitate, stabilitate și calitate a uleiurilor esențiale și a formulelor derivate.
- Aplicarea unui protocol simplificat pentru analiza FTIR-ATR-MIR în timp scurt a unui număr mare de probe, identificând fenotipul specific fiecărui tip de ingredient (ulei esențial) în amestecuri complexe, din formule uleioase sau solide. O astfel de procedură permite o evaluare rapidă și precisă a autenticității uleiurilor esențiale, a calității, stabilității și trasabilității în diferite matrici, în timpul depozitării sau pe lanțul productiv.

Aceste studii originale ce includ componente inovative reprezintă un model actualizat de abordare în Știința și Tehnologia alimentelor, în farmacologie și cercetare biomedicală. În acest context, rezultatele prezentate în aceste studii oferă perspective



aplicative benefice în domeniul Științei și Tehnologiilor alimentare. Studiile efectuate au fost publicate în reviste internaționale cu impact:

- ✓ POPA R.M., SOCACI S., FARCAS A., SOCACIU C., 2021, Comparative Authenticity Signatures of Six Essential Oils Used as Food Flavors: a Gas chromatography - Mass Spectrometry Approach, *Bull USAMV Food Sci Technol*, 78, 88-100.
- ✓ POPA R.M., FETEA F., SOCACIU C., 2021, ATR-FTIR-MIR Spectrometry and pattern recognition of bioactive volatiles in oily vs microencapsulated food supplements: authenticity, quality and stability, *Molecules*, 26, 4837.
- ✓ POPA R.M., FETEA F., SOCACIU C., 2021, Attenuated total reflectance - fourier transform infrared spectroscopy applied for the evaluation of essential oils' pattern recognition and thermos oxidative stability: a comparative study, *Studia UBB Chemia*, LXVI, 4, 33-50.

### **PERSPECTIVE DE CERCETARE**

Acest studiu poate oferi un exemplu de abordare sistematică, prin metode și tehnici complementare (GC-MS și FTIR-ATR) combinate cu analiza statistică, care pot fi aplicate în viitor diferitelor formule ce conțin uleiuri esențiale din plante, și care vor face posibilă evaluarea calității, a autenticității și trasabilității acestora în diferite produse agroalimentare sau cosmetice. Deoarece uleiurile esențiale sunt utilizate frecvent, libere sau în diferite formule, ca ingrediente în alimente și suplimente alimentare, sau fitocosmetice este posibilă identificarea falsurilor (specimene volatile sintetice sau uleiuri esențiale degradate prin oxidare).

### **REFERINTE SELECTATE**

1. BAKKALI F.; S. AVERBECK; D. AVERBECK; M. IDAOMAR; 2008, Biological effects of essential oils – A review, *Food and Chem Toxicol.*, 46, 446–475.
2. BAPTISTA-SILVA S., BORGES S., RAMOS O.L., PINTADO M., SARMENTO B., 2020, The progress of essential oils as potential therapeutic agents: a review, *J. of Essential Oil Res.*, 32, 279-295.
3. CEBI N., TAYLAN O., ABUSURRAH M., SAGDIC O., 2021, Detection of Orange Essential Oil, Isopropyl Myristate, and Benzyl Alcohol in Lemon Essential Oil by FTIR Spectroscopy Combined with Chemometrics, *Foods* 10, 27-32.
4. CHASSAGNE F, SAMARAKOON T, PORRAS G, LYLES JT, DETTWEILER M, MARQUEZ L, et al., 2021, A Systematic Review of Plants with Antibacterial Activities: A Taxonomic and Phylogenetic Perspective. *Frontiers in Pharmacology* 11,135.
5. DERBASSIN B., PEDROSA M. C., HELENO S., CAROCHO M., FERREIRA I.C.F.R., BARROS L., 2022, Plant volatiles: Using Scented molecules as food additives, *Trends in Food Science & Technology*, 122, 97-103.
6. DO T.K.T., HADJI-MINAGLOU F., ANTONIOTTI S., FERNANDEZ X., 2015, Authenticity of essential oils. *Trends Anal Chem.* 66, 146-157.
7. FALCÃO S., BACÉMB I., IGREJASB G., RODRIGUES P.J., VILAS-BOASA M., AMARALA J.S., 2018, Chemical composition and antimicrobial activity of hydrodistilled oil from juniper berries, *Ind Crops & Prod.* 124, 878–884.

8. FERNANDEZ LOPEZ J. , VIUDA MARTOS M., Application of Essential Oils in Food Systems, 2018, MDPI AG , ISBN 9783038970477
9. FIGUEROA L., KELLY J., VICENTE A., REIS V., MARIA A. M., et al., 2019, Antimicrobial and Antioxidant Performance of Various Essential Oils and Natural Extracts and Their Incorporation into Biowaste Derived Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Layers Made from Electrospun Ultrathin Fibers, *Nanomaterials* 9 (2), 144
10. FILIPCEV B., 2020, The effects of aromatic plants and their extracts in food products, *Feed Additives Aromatic Plants and Herbs in Animal Nutrition and Health*, 279-294.
11. FRANCA A.S., L.M.L. NOLLET, Spectroscopic Methods in Food Analysis, *CRC Press, NY, 2017*, 664 pg
12. GALLART-MATEUA D., LARGO-ARANGO C.D., LARKMANB T., GARRIGUESA S., DE LA GUARDIA M., 2018, Fast authentication of tea tree oil through spectroscopy. *Talanta* 189, 404-410.
13. GYAWALI R., IBRAHIM S.A., 2014, Natural products as antimicrobial agents, *Food Control*, 46, 412-429.
14. HAMEED M., RASUL A., WAQAS M.K., SAADULLAH N., ASLAM G., ABBAS S., LATIF H., AFZAL S., INAM, SHAH P. A., 2021, Formulation and Evaluation of a Clove Oil-Encapsulated Nanofiber Formulation for Effective Wound-Healing, *Molecules* 26, 2491.
15. JOHNSON S.A., 2017, Medicinal Essential Oils: The Science and Practice of Evidence-Based Essential Oil Therapy, *Lightning Source Inc. Publ., ISBN 9780997548709*
16. JU J., 2023, Essential Oils as Antimicrobial Agents in Food Preservation, *Taylor & Francis Ltd*,
17. KHANEGHAH A., 2017, Essential Oils in Food Processing – Chemistry, Safety and Applications, Chichester, United Kingdom, 392 pp.
18. KULA J., MAJDA T., STOYANOVA A. , GEORGIEV E., 2007, Chemical composition of Origanum vulgare L. essential oil from Bulgaria. *J. Essent. Oil Bear Plant*, 10, 215-220.
19. LI Q., CHEN J., HUYAN Z., KOU Y., XU L., YU X., GAO J.-M., 2019, Application of Fourier transform infrared spectroscopy for the quality and safety analysis of fats and oils: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 59, 3597–3611.
20. RAYMOND C.A., DAVIES N.W., LARKMAN T., 2017, GC-MS method validation and levels of methyl eugenol in a diverse range of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oils. *Anal Bioanal Chem.* 409, 1779–1787.
21. RIVERA CALO J., CRANDALL P.G., O'BRYAN C.A., RICKE S.C., 2015, Essential oils as antimicrobials in food systems, A review. *Food Control*, 54, 111-119.
22. SATYAL P., MURRAY B.L., MCFEETERS R.L., SETZER W.N., 2016, Essential Oil Characterization of *Thymus vulgaris* from Various Geographical Locations, *Foods*, 5, 70-75.
23. SHARMA A., SHARMA P., SINGH J., SINGH S., NAIN L., 2020, Prospecting the Potential of Agroresidues as Substrate for Microbial Flavor Production. *Front. Sustain. Food Syst.* 4, 18.
24. SOCACIU C., RANGA F., FETEA F., LEOPOLD D., DULF F., PARLOG R., 2009, Complementary advanced techniques applied for plant and food Authentication, *Czech J. Food Sci.* 27, S70–S75,
25. SU W.-H., SUN D.-W., 2019, Mid-infrared (MIR) Spectroscopy for Quality Analysis of Liquid Foods. *Food Eng. Rev.* 11, 142–158.
26. SVOBODA K., BROOKER J.D., ZRUSTOVA J., 2004, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods, *Int J Food Microbiol.* 94, 223-253.
27. TAYLAN O., CEBI N., SAGDIC O., 2021, Rapid Screening of *Mentha spicata* Essential Oil and L-Menthol in *Mentha piperita* Essential Oil by ATR-FTIR Spectroscopy Coupled with Multivariate Analyses, *Foods* 10, 202.