
Ph.D. THESIS

Evaluarea bioaccesibilității *in vitro* a carotenoidelor din diverse matrici alimentare - efectul adității lipidelor și al încapsulării carotenoidelor

(REZUMATUL TEZEI DOCTORALE)

Ph.D. student **Elena-Cristina GHERASIM**

Scientific coordinator **Prof. Adela Mariana PINTEA, Ph.D.**



Introducere

Numeroase studii au arătat că unii compuși din plante, numiți și fitochimicale, sunt asociați cu numeroase beneficii pentru sănătate, fiind responsabile de prevenirea a numeroase boli. Carotenoidele sunt o clasă de compuși vegetali lipofili responsabili pentru culoarea frunzelor, fructelor și legumelor, sau a unor organisme animale. Carotenoidele sunt sintetizate de plante, alge, bacterii fotosintetizante și doar câteva organisme animale specifice, în timp ce oamenii nu le pot sintetiza, prezența lor în corpul uman fiind datorată exclusiv aportului alimentar (Rodriguez-Concepcion et al., 2018; Saini et al., 2015). Deși carotenoidele sunt abundente în alimente, efectul lor asupra sănătății umane este limitat de biodisponibilitatea lor scăzută.

Scopul acestui studiu a fost îndeplinit prin atingerea următoarelor obiective:

Obiectivul unu: Extracția carotenoidelor din matricile vegetale analizate, respectiv roșii, morcovi, spanac și cătină (fructe și reziduu), folosind extracția clasică solid-lichid (macerarea cu un amestec de solvenți organici) și extracția asistată de ultrasunete (reziduu de cătină). În cazul reziduuului de cătină, au fost folosiți o serie de solvenți ecologice (green) (lactat de etil, acetat de etil, ulei de floarea-soarelui, ciclopentil metil eter, metil tetrahidrofuran).

Obiectivul doi: Identificarea și cuantificarea carotenoidelor majore (α -carotină- α C, β -carotină- β C, γ -carotină- γ C, licopină-LYC, luteină-LUT, zeaxantină-ZEA, și esterii acesteia) prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC –PDA) și analiză spectrofotometrică. Caracterizarea compoziției în acizi grași a matricilor alimentare și a uleiurilor vegetale prin GC-MS.

Obiectivul trei: Determinarea capacității antioxidante a extractului de carotenoide saponificat, din fructe proaspete de cătină, prin metode antioxidante consacrate: ABTS, DPPH și FRAP.

Obiectivul patru: Determinarea bioaccesibilității *in vitro* a principalelor carotenoide din matrici alimentare prin utilizarea protocolului standardizat de digestie *in vitro* INFOGEST.

Obiectivul cinci: Evaluarea efectului adității de lipide (ulei de floarea-soarelui, ulei de măsline, ulei de semințe de in, pulpă de avocado, smântână) asupra bioaccesibilității carotenoidelor din morcovi, tomate cherry și spanac tânăr, folosind protocolul de digestie *in vitro* INFOGEST.

Obiectivul șase: Valorificarea unui subprodus rezultat la obținerea sucului de cătină (reziduu) pentru extracția carotenoidelor și încapsularea lor în vederea utilizării lor în industria alimentară.

Obiectivul șapte: Obținerea de microcapsulelor îmbogățite cu extract de carotenoide prin tehnica gelificării prin reticulare cu alginat de sodiu și carbonat de calciu; caracterizarea fizico-chimică a capsulelor obținute, prin tehnici spectroscopice și microscopice, determinarea eficienței de încapsulare și a stabilității microcapsulelor în diferite condiții experimentale.

Obiectivul opt: Determinarea bioaccesibilității *in vitro* a carotenoidelor încapsulate în microcapsule de alginat și evaluarea bioaccesibilității acestora în absența/prezența iaurtului.

Primul studiu- Efectul adiției uleiurilor vegetale asupra bioaccesibilității carotenoidelor din roșiile cherry, baby spanac și morcov

1.Introducere și scop

Scopul acestui studiu a fost de a găsi metode alternative de creștere a biodisponibilității carotenoidelor fără a utiliza procese care pot duce la distrugerea acestora, prin urmare matricile alimentare au fost analizate în stare proaspătă. Cunoscut fiind că adiția de lipide poate facilita micelizarea carotenoidelor crescând astfel bioaccesibilitatea acestora, în studiul actual a fost investigat efectul adiției diferitelor tipuri și cantități de uleiuri, utilizate în mod tradițional în alimentație. Uleiul de floarea-soarelui și cel de măsline au fost selectate datorită profilului bogat în acizi grași nesaturați și pentru că sunt uleiurile cele mai des folosite în alimentație. Uleiul din semințe de in este, de asemenea, un ulei foarte nesaturat, dar cu un profil specific de acizi grași, cu proporție mare de acizi grași n-3.

2. Materiale și metode

Roșiile cherry, frunzele de spanac și morcovii au fost spălate și zdrobite în bucăți mai mici cu ajutorul unui blender. Carotenoidele totale au fost extrase din 3 g probe folosind metanol: acetat de etil: eter de petrol (1:1:1, v/v/v), ca solvenți de extracție, până la decolorarea totală a reziduului. Reziduul a fost dizolvat în metil-tert-butil-eter (MTBE) și analizate prin HPLC-PDA pe o coloană C30. Lipidele totale au fost extrase din 3 g probe utilizând metoda Folch și colab. (1956). Esterii metilici ai acizilor grași (FAME) au fost identificați prin compararea timpilor lor de retenție cu cei ai standardelor cunoscute și a spectrelor de masă rezultate cu cele din baza de date. Digestia gastrointestinală simulată *in vitro* a fost efectuată folosind metoda descrisă de Minekus și colab. (2014).

3.Rezultate și discuții

3.1 Conținutul total de carotenoide pentru roșiile cherry, baby spanac și morcovi

Table 1. Total carotenoid content (mg/100g) from raw cherry tomatoes, carrots, and baby spinach

Proba	α -carotină	β -carotină	Luteină	Licopină	Conținut total
Baby spanac	0.10±0.003	4.32±0.80	9.58±2.03	-	15.21±1.82*
Morcovi	2.13±0.15	6.01 ±0.41	0.07±0.01		11.54±1.80
Roșiile cherry	-	1.01±0.36	0.09±0.03	3.67±1.25	5.90±0.74

*Total carotenoids obtained after saponification

**Each value represents the mean ±standard deviation of 3 replicates

3.2 Compoziția acizilor grași a probelor brute

Probele de roșiile cherry au avut un conținut total de lipide de 0,63 g/100 g lipide. În ceea ce privește profilul de acizi grași al roșiilor cherry, acizii grași polinesaturați au fost majoritari, cu un procent de 63.55%, urmați de acizii grași saturați, cca. 23%, și de acizi grași mononesaturați, cca. 13%. Acidul gras predominant a fost acidul linoleic, în concentrație de cca. 58%, urmat de acidul palmitic și oleic, cu 20% respectiv 12.4% și, în cantități mult mai mici, acizii α -linolenic (5.64%) și stearic (2.56%). În ceea ce privește probele de morcov, conținutul total de lipide a fost de 0,35 g/100 g lipide, iar principalul acid gras identificat a fost acidul linoleic (68.52%). Acizii grași polinesaturați au fost cei mai abundenți, cu un procent de 71%, acizii grași saturați au reprezentat aproximativ 28%, iar acizii grași mononesaturați s-au găsit în cantități foarte mici (cca. 1%). Acidul palmitic a fost găsit în cantități semnificative (26.35%),

iar în cantități mult mai mici au fost acizii α -linolenic (2.5%), oleic (0.86%) și stearic (0.7%). În probele de baby spanac, cantitatea totală de lipide a fost de 0,39 g/100 g., acizii grași polinesaturați au reprezentat fracția principală (88.30%), urmați de acizii grași saturați (11.14%) și cantități foarte mici de acizi grași mononesaturați. Acidul gras predominant a fost acidul α -linolenic, cu 84%, urmat de acidul palmitic.

3.3 Caracterizarea uleiurilor vegetale din punct de vedere al conținutului total de carotenoide și al compoziției în acizi grași

Conținutul total de carotenoide a uleiului de floarea-soarelui a fost de $0,06 \pm 0,002$, cel al uleiului de in de 0.2 ± 0.003 mg/100g, iar al uleiului de măsline de 0.4 ± 0.011 mg/100g. Principalele carotenoide identificate în toate uleiurile au fost luteina, zeaxantina și β -carotina, în proporții diferite. ($0,03 \pm 0,001$ mg/100g). Uleiul de floarea-soarelui a avut un conținut total de 8.22% acizi grași saturați, 21.32% acizi grași mononesaturați și 70.46% acizi grași polinesaturați. Acidul linoleic a fost cel mai important (70.46%), urmat de acidul oleic (20.53%) și palmitic (5.96%). Pentru uleiul de in, profilul acizilor grași a arătat ca acid principal acidul α -linolenic (53.72%), cantități importante de acid oleic (23.3%) și linoleic (14.08%). Uleiul de măsline este o sursă bogată de acid oleic (86.21%), urmat de acidul palmitic (8.82%).

3.4 Bioaccesibilitatea carotenoidelor

Dintre toate cele trei matrici, carotenoidele din morcovi au avut cea mai mare bioaccesibilitate. Procentul de bioaccesibilitate pentru luteină a fost de 45.2%, pentru α -carotină 13.1% și pentru β -carotină 12.1%. După digestia spanacului, bioaccesibilitatea a fost mai mare pentru luteină (6.3%) decât pentru β -carotină (3.2%). Aceeași ordine a fost găsită pentru aportul de carotenoide în extractul inițial, înainte de digestie (luteină-74.6%, β -carotină-25.4%). Pentru roșiile cherry, luteina a avut cel mai mare procent de bioaccesibilitate (40.1%), de aproximativ patru ori mai mare decât β -carotina (10.2%) și de peste zece ori mai mare decât lycopina (3.1%). După aditია uleiului, pentru roșiile cherry, se poate observa că bioaccesibilitatea β -carotinei a crescut de la 12.1 % la 16.2 % (ulei de măsline 10 %) și la 25.1 % (ulei de floarea-soarelui 10%). În cazul probelor de morcov, cele mai notabile modificări ale bioaccesibilității după aditია de ulei au fost observate pentru α -carotină. Pentru uleiul de măsline (10 %) și pentru uleiul de floarea-soarelui (10 %), bioaccesibilitatea α -carotinei a crescut de la 13.1 % la 31.4 % și, respectiv, 29.5 %. Pentru probele de baby spanac, cel mai important efect a fost observat pentru uleiul de măsline (4.6 %, pentru 10% ulei) și uleiul de floarea-soarelui (4.7 % pentru 10% ulei). Și după aditია uleiului de in a crescut bioaccesibilitatea, însă într-un procent mult mai mic.

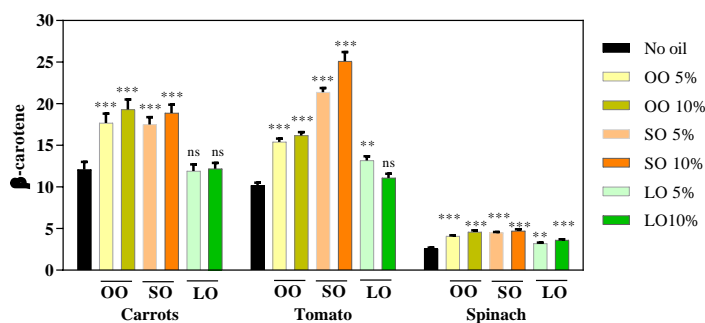


Figura 1. Bioaccesibilitatea β -carotinei din morcovi, roși cherry și baby spanac fără și cu aditία lipidelor

Al doilea studiu – Efectul aditiei unor surse bogate de lipide asupra bioaccesibilității luteinei și a β -carotinei din frunzele proaspete de baby spanac

1. Introducere și scop

În acest studiu ne-am propus să investigăm efectul aditiei lipidelor asupra bioaccesibilității carotenoidelor majore din baby spanac, atât din punct de vedere al cantității de lipide adăugate, cât și al tipului de lipide. În acest sens, s-au ales două tipuri de surse de lipide și anume avocado - o sursă de lipide vegetale bogată în acizi grași mononesaturați, și smântâna - o sursă de lipide animale, bogată în acizi grași saturați. Mai mult, înainte de digestia *in vitro*, toate probele au fost caracterizate din punct de vedere al compoziției în carotenoide și acizi grași.

2. Materiale și metode

Baby spanac proaspăt (*Spinacia oleracea*), avocado (*Persea americana*, Cv. Hass) și smântâna au supuse extracției de carotenoide și lipide. Extracția, analiza HPLC –PDA și GC-MS au fost realizate după metodele descrise în primul studiu. Digestia *in vitro* a fost efectuată pentru probe de baby spanac fără adaos de surse de lipide și cu adaos de lipide, respectiv avocado (5% și 10%) sau smântână (10% sau 20%).

3. Rezultate și discuții

3.1. Compoziția în carotenoide pentru baby spanac, avocado și smântână

Tabelul 1. Conținutul de carotenoide ($\mu\text{g}/100\text{g}$) * pentru probe proaspete

Proba	β -carotină	Luteină	Carotenoide totale
Baby spanac	2848.82 \pm 40.71	8407.43 \pm 143.10	16104.44 \pm 291.00
Avocado	33.73 \pm 0.80	102.34 \pm 2.71	182.04 \pm 12.00
Smântână	44.54 \pm 0.70	4.73 \pm 0.52	75.10 \pm 3.00

*Media \pm SD (n = 3)

3.2. Profilul acizilor grași și al lipidelor totale pentru baby spanac, avocado și smântână

Deși lipidele constituie o fracție minoră din frunzele de baby spanac, ele conțin, o proporție mare de acizi grași polinesaturați. În probele noastre de baby spanac, lipidele totale au reprezentat 0.25 g/100g F.W. Acizii grași majoritari au fost acidul α -linolenic (84.1%) și acidul palmitic (11%). Acizii grași polinesaturați (PUFA) au reprezentat clasa majoră, cu mai mult de 88% din totalul acizilor grași, în timp ce acizii grași saturați (SFA) au reprezentat 11%. Probele de avocado au avut un conținut total de lipide de 10.8 g/100 g lipide, iar cel mai important acid a fost acidul oleic (52.8%), urmat de acidul palmitic (23.7%) și linoleic (11.7%). Avocado este o sursă importantă de MUFA (63.3%), dar conține o proporție mai mică de acizi grași polinesaturați. Valorile acizilor grași saturați sunt mai mari decât ale baby spanacului, ajungând la 24%. Smântâna a avut cel mai ridicat conținut de lipide, 24.5 g lipide/100 g produs, în care acizii grași saturați reprezintă peste 77%, iar MUFA și PUFA, care reprezintă 22%, și respectiv, sub 1%. Acizii grași reprezentativi găsiți în probele de smântână au fost palmitic (36%), stearic (15%), miristic (13%), precum și cantități mici de acizi grași saturați cu catenă medie și scurtă (SMCFA), C4-C12. Singurul acid gras nesaturat prezent în cantitate semnificativă a fost acidul oleic (22%).

3.3. Bioaccesibilitatea luteinei și a β -carotinei din baby spanac pentru probele cu și fără aditie de lipide

Bioaccesibilitatea ambelor carotenoide fără adaos de lipide este scăzută (sub 10%). În cazul luteinei, adăugarea de lipide a avut un impact negativ pentru ambele surse de lipide, în timp ce pentru β -caroten a avut un efect pozitiv, mai ales când s-a folosit grăsimi saturate de origine animală, la concentrație mai mică. Putem concluziona că adaosul de lipide este mai benefic pentru carotenii nepolari decât pentru xantofilele din spanac, indiferent de tipul de lipide. În același timp, adăugarea unei cantități mari de lipide (10% avocado, 20% smântână) a avut în general un impact negativ asupra bioaccesibilității carotenoidelor investigate (Fig. 1).

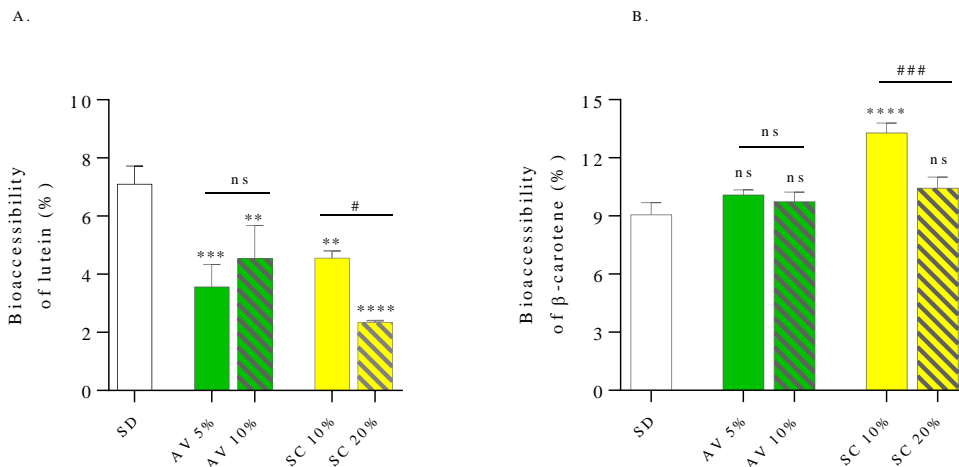


Figura 1. Bioaccesibilitatea luteinei (A) și β -carotinei (B).

Diferitele simboluri indică o diferență semnificativă între digesta simplă și digesta cu pulpă de avocado și smântână determinată prin testul de comparație ANOVA Multiple Tukey: extrem de semnificativ****; $p = 0,0001$ până la $0,001$, extrem de semnificativ***; $p = 0,001$ până la $0,01$, foarte semnificativ**, $p = 0,01$ până la $0,05$, nesemnificativ - ns; pentru a compara digesta cu pulpa de avocado 5% cu 10%, respectiv digesta cu smântână 5% cu 10% s-au folosit simboluri diferite pentru a indica diferența semnificativă prin testul de comparație ANOVA Multiple Tukey: extrem de semnificativ###; $p = 0,001$ până la $0,01$, # semnificativ; $p \geq 0,05$, nesemnificativ - ns. (SD- digesta simplă; AV 5% - digesta cu pulpă de avocado 5%; AV 10% - digesta cu pulpă de avocado 10%; SC 5% - digesta cu smântână 5%; SC 10% - digesta cu smântână 10%).

Al 3-lea studiu- Carotenoidele din fructele de cătină – compoziție, activitate antioxidantă și bioaccesibilitate *in vitro*

1.Introducere și scop

Toate carotenoidele pot acționa ca și antioxidanți prin proprietăți de neutralizarea a radicalilor liberi. Având în vedere multitudinea de proprietăți benefice ale fructelor de cătină, studiul actual și-a propus să determine compoziția în carotenoide a fructelor, activitatea lor antioxidantă și bioaccesibilitatea *in vitro* folosind protocolul standardizat INFOGEST (Minekus et al., 2014).

2. Materiale și metode

Carotenoidele au fost extrase și analizate prin HPLC-PDA din fructe de cătină din flora spontană, după metodele descrise în studiul 1. Activitatea antioxidantă a extractului lipofilic LSBE a fost determinată prin metodele: ABTS, DPPH și FRAP. Bioaccesibilitatea carotenoidelor a fost determinată folosind protocolul INFOGEST ușor modificat (Minekus et al., 2014). Pe scurt, 2,5 g de boabe de cătină au fost supuse fazei orale, gastrice și intestinale.

3. Rezultate și discuții

3.1. Conținutul în carotenoide pentru fructele de cătină

Tabelul 1. Conținutul de carotenoide totale (mg/100 FW) al extractelor saponificat și nesaponificat

ID	Carotenoide	UV-Vis maxima	Concentration (mg/100 g F.W)	
			Extract saponificat	Extract nesaponificat
1	Neoxantină	416,439,468	0.40 ± 0.07	nd
2	Neidentificat	400, 422, 448	0.39 ± 0.04	nd
3	cis-Luteină	330, 420, 441, 472	0.80 ± 0.16	0
4	all-trans-Luteină	422, 444, 473	1.80 ± 0.43	0.29 ± 0.04
5	Zeaxantină	427, 450, 477	8.61 ± 0.81	1.22 ± 0.31
6	β-Cryptoxantină	428, 451, 476	0.94 ± 0.22	0.15 ± 0.05
7	cis-β-Carotină	338, 420, 449,472	0.49 ± 0.19	0.18 ± 0.05
8	all trans β-Carotină	421, 451, 478	4.14 ± 0.23	3.92 ± 0.23
9	cis-β-Carotină	345, 421, 447, 473	0.39 ± 0.13	0.35 ± 0.04
10	Neidentificat	420, 441, 465	0.28 ± 0.11	nd
11	cis-γ-Carotină	361, 433, 460, 491	0.26 ± 0.09	nd
12	all trans γ-Carotină	434, 461, 492	1.65 ± 0.21	0.60 ± 0.08
13	cis-γ-Carotină	358, 431, 458, 489	0.04 ± 0.03	nd
14	Zeaxantină 14:0; 16:0	426, 450, 475	0	1.95 ± 0.24
15	Luteină 16:0;16:0	421, 446, 474	0	1.98 ± 0.31
16	Zeaxantină 16:0; 16:0	427, 450, 476	0	7.44 ± 0.55
	Alți esteri	-	0	6.04 ± 0.48
	Total		20.19 ± 2.72	24.12 ± 2.81

*Rezultatele reprezintă media a trei determinări ± SD a aceleiași probe (media ± SD, n =3)

3.2. Activitatea antioxidantă a LSBE

Tabelul 2. Procentul* inhibării DPPH și ABTS indus de acidul ascorbic (AA) comparat cu LSBE și zeaxantina (ZEA). *media ± SD, n =3

Concentrația				%inhibare ABTS			%inhibare DPPH		
(μM)	(μg/mL)			AA	LSBE	ZEA	AA	LSBE	ZEA
	AA	LSBE	ZEA	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD
1000	176	557.75	568.90	92.80±0.57	56.80±0.28	58.60±0.85	87.13±1.24	68.65±0.07	41.75±1.06
750	132	418.31	426.70	65.70±0.99	46.88±0.45	42.55±0.78	60.73±0.39	52.90±0.28	32.13±1.59
500	88	278.87	284.49	43.30±0.42	37.21±0.30	30.60±0.85	42.50±0.71	37.05±0.07	23.75±0.35
250	44	139.42	142.22	27.20±0.28	13.80±0.64	14.65±0.49	23.85±0.21	23.57±0.62	14.25±0.49
100	17.60	55.77	56.89	12.20±0.28	7.48±0.25	7.58± 0.11	10.90±0.57	10.87±0.47	5.55± 0.35
50	8.80	27.88	28.45	5.30±0.14	3.38±0.11	3.63± 0.11	6.13±0.18	5.68±0.11	3.00±0.28

3.3. Bioaccesibilitatea carotenoidelor din fructele de cătină

În acest studiu am caracterizat compoziția carotenoidală a fructelor de cătină și am demonstrat că extractul lipofil saponificat bogat în zeaxantină (LSBE) exercită activitate antioxidantă in vitro, în mod dependent de doză. Mai mult, am demonstrat că fracția de carotenoid din cătină

este foarte bioaccesibil, oferind o cantitate semnificativă de compuși care promovează sănătatea, cum ar fi zeaxantina (42% bioaccesibilitate), luteina (39,8%) și β -carotina. Rezultatele noastre oferă dovezi experimentale care susțin utilizarea potențială a fructelor de cătină ca ingredient bioactiv funcțional pentru aplicații alimentare sau farmaceutice.

Al 4-lea studiu- Valorificarea carotenoidelor din reziduul de cătină prin extracție green și încapsulare

1. Introducere și scop

Urmând conceptul economiei circulare în știința alimentelor, scopul nostru a fost valorificarea reziduului de cătină prin extracția green și încapsularea fracției sale bogate în carotenoide. Obiectivele acestui studiu au fost: (1) testarea eficacității a cinci solvenți green și a două metode de extracție pentru extracția carotenoidelor din reziduul de cătină rezultat în urma producției de suc; (2) obținerea și caracterizarea microcapsulelor de alginat ca și agenți de încapsulare pentru carotenoidele din reziduul de cătină; (3) determinarea stabilității și a bioaccesibilității carotenoidelor din microcapsulele de alginat adăugate unui produs alimentar.

2. Materiale și metode

Reziduul de cătină a fost obținut după separarea sucului din fructe proapsete, a fost cântărit, uscat și măcinat. Extracția carotenoidelor din pudră a fost realizată comparativ, folosind un amestec de solvenți organici și, respectiv, solvenți green, utilizați individual (acetat de etil-ETA, lactat de etil-ETL, ciclopentil-metil-ether-CPME, metil-tetrahidrofuran-METHF și ulei de floarea-soarelui presat la rece), utilizând două metode de extracție, macerarea și extracția asistată de ultrasunete. Extractul de carotenoide a fost utilizat pentru încapsularea ulterioară, rezultând microsferă pe bază de alginat. Imaginile de microscopie în câmp luminos și fluorescență ale microcapsulelor au fost colectate folosind un microscop cu inversie. Microcapsulele au fost supuse testelor de stabilitate timp de 30 de zile, în trei condiții diferite: hidratate-refrigerate (WRF), hidratate-păstrate la temperatura camerei (WRT) și deshidratate-păstrate la temperatura camerei (DRT). Protocolul standardizat INFOGEST a fost utilizat pentru digestia gastrointestinală *in vitro*.

3. Rezultate și discuții

3.1. Extracția carotenoidelor din reziduul de cătină

Carotenoidele au fost extrase prin metoda convențională (macerare) și prin extracție asistată de ultrasunete (EAU) (Tabelul 1).

Tabelul 1. Randamentul de extracție al carotenoidelor majoritare (mg/100 pudră) obținut utilizând extracția asistată de ultrasunete cu diferiți solvenți

Carotenoid	OS	MeTHF	CPME	ETL	ETA	SFL oil
Zeaxantină	3.76±0.43 ^a	2.55±0.21 ^a	4.69±0.35 ^{ac}	7.23 ±0.75 ^b	6.29±0.85 ^b	4.62±0.51 ^{abc}
ZMP	8.13±0.62 ^a	9.84±1.63 ^a	9.20±2.11 ^a	8.10±1.14 ^a	7.02±1.23 ^a	7.23±0.63 ^a
ZDP	20.97±1.90 ^a	26.76±3.52 ^a	24.49±3.81 ^a	18.24±2.70 ^{ab}	18.63±2.14 ^{ab}	16.17±1.42 ^{ab}
β -carotină	14.83±1.40 ^a	16.65±3.24 ^a	15.45±1.83 ^a	13.69±2.45 ^a	11.10±1.72 ^a	14.42±1.00 ^a
γ -carotină	3.52±0.50 ^a	5.82±0.91 ^a	8.41±2.34 ^b	3.24±0.40 ^a	2.78±0.32 ^{ac}	3.20±0.24 ^a
Licopină	3.94±0.43 ^a	3.54±0.61 ^a	2.58±0.25 ^{ab}	1.54±0.30 ^b	1.63±0.40 ^b	2.77±0.33 ^{ab}

Datele reprezintă media aritmetică și deviația standard (SD) a 3 repetiții. Diferențele semnificative statistic au fost determinate utilizând testul ANOVA (Tukey's Multiple Comparison Test; GraphPad Prism Versiunea 9.3). Literele superscripte diferite (a-d) pe același rând indică o diferență semnificativă între solvenții utilizați pentru extracția asistată cu ultrasunete (UAE).

3.2. Încapsularea extractului carotenoidic

Morfologia și dimensiunea microcapsulelor au fost analizate prin imagistică cu câmp luminos (Fig.1.A) și fluorescență convențională (Fig.1.B), beneficiind de capacitățile sale de fluorescență intrinsecă fără adăugarea de fluorofor. Microcapsulele depuse pe o lamă de microscop din sticlă prezintă o formă sferică, care măsoară un diametru mediu de $700 \pm 50 \mu\text{m}$. Microscopia de scanare laser confocală a confirmat dimensiunea și forma particulelor (Fig. 2).

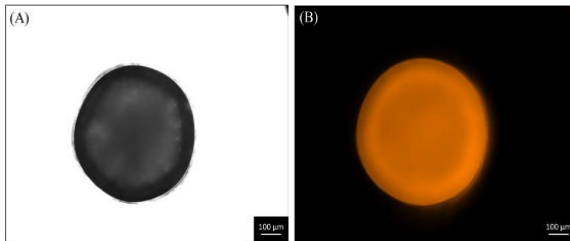


Figura 1. Imagini reprezentative cu câmp luminos (A) și fluorescență convențională (B) ale microcapsulelor obținute

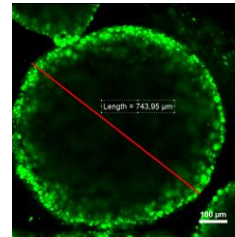


Figura 2. Imaginile microscopiei confocale cu scanare cu laser (CLSM) ale microcapsulelor de alginat

Reziduul de cătină rezultat din producția de suc este o sursă valoroasă de carotenoide, în principal zeaxantina și esterii săi, și β -carotina. Carotenoidele din reziduul de cătină pot fi recuperate eficient folosind o varietate de solvenți ecologici, CPME și MeTHF (în special cu EAU) fiind cei mai eficienți. Deși uleiul de floarea-soarelui a avut un randament de extracție mai mic, acesta poate fi folosit pentru extracția carotenoidelor datorită costurilor mai mici și a posibilității de a utiliza în continuare extractele fără a fi nevoie de evaporare și de costurile asociate acestui proces.

3.3. Stabilitatea capsulelor îmbogățite cu extract carotenoidic

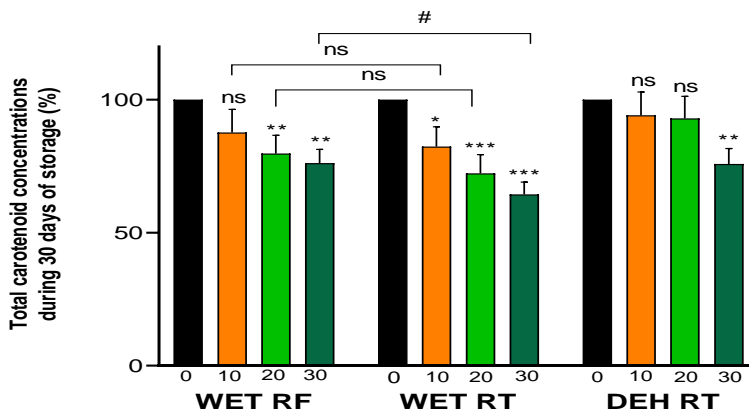


Figura 3. Conținutul carotenoidelor totale din microcapsulele de alginat timp de 30 de zile de depozitare în trei condiții diferite: WRF - microcapsule hidratate păstrate la frigider, WRT - microcapsule hidratate păstrate la temperatura camerei și DRT - microcapsule deshidratate păstrate la temperatura camerei. Diferențele semnificative statistice între același tip de microcapsule, în zile diferite de depozitare, au fost determinate utilizând testul de comparații multiple Dunnett ANOVA unidirecțional: extrem de semnificativ ***, $p = 0,001$ până la $0,01$, foarte semnificativ **; $p = 0,01$ până la $0,05$, nesemnificativ - ns, $p \geq 0,05$. Diferențele dintre același tip de microcapsule (hidratate) păstrate la temperaturi diferite au fost determinate folosind testul t Unpaired iar simbolurile reprezintă ### extrem de semnificativ; $p = 0,0001$ până la $0,001$, foarte semnificativ ##, $p = 0,001$ până la $0,01$, semnificativ #; $p \geq 0,05$, nesemnificativ - ns.

3.4. Bioaccesibilitatea carotenoidelor din microcapsulele de alginat

Tabelul 3. Bioaccesibilitatea carotenoidelor din microcapsulele hidratate și deshidratate (%)

Carotenoid	Capsule hidratate		Capsule deshidratate	
	Control	Cu iaurt	Control	Cu iaurt
Zeaxantină	6.31±2.42	4.73±2.12	28.67±3.24	41.64±3.90
ZMP	64.26± 4.32	50.87± 3.91	42.10±4.13	49.13±3.70
ZDP	66.05±4.11	46.85±2.32	39.58±3.81	45.93±5.30
β-carotină	51.42±3.60	36.24±2.24	41.48±3.90	43.66±2.71
γ-carotină	51.38± 3.90	36.47±2.32	40.85±2.53	38.83±1.22
Licopină	11.08±1.90	6.98±0.71	29.58±3.70	24.12±1.32
Bioaccesibilitate totală	42.11±4.60	29.50±3.91	40.80±4.00	40.70±3.82

Extractul de carotenoide din reziduu de cătină poate fi încapsulat eficient în microcapsule de alginat, prezentând o bună stabilitate în timpul depozitării, mai ales în condiții de hidratare și refrigerare. Bioaccesibilitatea carotenoidelor totale și individuale a fost bună, dar depinde de tipul de carotenoid și de forma de depozitare a microcapsulelor. Adăusul de iaurt a avut un efect pozitiv asupra bioaccesibilității carotenoidelor doar în microcapsulele deshidratate, iar impactul a fost mai mare pentru zeaxantina liberă și esterii săi.

8. Concluzii și recomandări

Scopul acestei teze a fost de a investiga bioaccesibilitatea *in vitro* a principalelor carotenoide găsite în sângele și țesuturile umane, din unele matrici vegetale comune, fără prepararea termică a matricii, pentru a studia efectul adăugării diferitelor surse de lipide asupra bioaccesibilității carotenoidelor, De asemenea, ne-am propus valorificarea unui produs secundar al prelucrării fructelor de cătină, bogat în compuși bioactivi, prin extracția verde a carotenoidelor și încapsularea acestora pentru utilizare ulterioară în industria alimentară.

Concluzii finale:

În capitolul patru (Studiul 1), a fost investigată bioaccesibilitatea carotenoidelor majore din morcovi, roșii cherry și baby spanac, în prezența sau în absența uleiurilor vegetale (5 și 10 %), folosind protocolul standardizat de digestie *in vitro* INFOGEST. Rezultatele au arătat că bioaccesibilitatea carotenoidelor este puternic afectată atât de tipul de carotenoid, cât și de matrice. Astfel, indiferent de probele analizate, luteina (o xantofilă) a prezentat o bioaccesibilitate mai bună decât toți carotenii investigați. Dintre caroteni, α-carotina a avut cea mai mare bioaccesibilitate, urmat îndeaproape de β-carotină, în timp ce licopina a avut cea mai scăzută bioaccesibilitate. Mai mult, pentru același compus, bioaccesibilitatea este puternic influențată de tipul de matrice (de exemplu, β-carotenul și luteina sunt mai bioaccesibile din morcovi și roșii crude, în comparație cu baby spanac). Adăugarea de lipide a avut un impact pozitiv asupra bioaccesibilității tuturor carotenoidelor din morcovi și roșii cherry (cu un efect mai semnificativ pentru caroteni), dar aproape niciun efect asupra bioaccesibilității acestora din spanac. În ceea ce privește tipul de ulei, rezultate mai bune s-au obținut după adăugarea de ulei de măsline (mononesaturat, acid gras major n-9) și ulei de floarea-soarelui (polinesaturat, acid gras major n-6), în timp ce adăugarea de ulei din semințe de in (polinesaturat, acid gras major n-3), adăusul nu a avut un efect pozitiv constant sau uniform.

În capitolul cinci (Studiul 2), bioaccesibilitatea luteinei și β-carotenului a fost determinată din frunzele proaspete de spanac tânăr, în prezența sau în absența a două surse de

lipide, pulpă de avocado și smântână, în concentrații de 5 %, 10 % (avocado) sau 10% și 20 %, pentru smântână. S-a observat o bioaccesibilitate scăzută a luteinei și β -carotinei din probele neprocesate, fără lipide adăugate. În prezența lipidelor, pentru luteină, atât adăugarea de pulpă de avocado, cât și adaosul de smântână au avut un impact negativ asupra bioaccesibilității, ducând la un procent mai mic de micelizare comparativ cu probele martor, indiferent de cantitatea de lipide adăugate. Cu toate acestea, pentru β -carotină prezența lipidelor a avut un efect pozitiv asupra bioaccesibilității, mai ales în prezența smântânii, o sursă importantă de acizi grași saturați. În același timp, o creștere a cantității de lipide adăugate, a dus la un impact negativ asupra micelizării compușilor investigați. Pe baza rezultatelor noastre, am putea afirma că adaosul de lipide este mai benefic pentru caroteni (compuși nepolari) decât pentru xantofilele din spanac, indiferent de tipul de lipide, iar o cantitate mare de lipide nu duce la o micelizare mai mare pentru luteină și β -carotină.

În capitolul șase (Studiul 3), a fost determinată compoziția în carotenoide a fructelor de cătină, în extracte saponificate și nesaponificate, precum și activitatea antioxidantă și bioaccesibilitatea carotenoidelor majore. Am demonstrat că zeaxantina și esterii săi, împreună cu β -carotina, au fost constituenții majori ai extractului nesaponificat. Extractul lipofil saponificat (LSBE), având zeaxantina liberă cași compus principal, exercită activitate antioxidantă in vitro, într-o manieră dependentă de doză, așa cum a rezultat din toate cele trei test antioxidante efectuate, ABTS, DPPH și FRAP. Mai mult, am constatat bioaccesibilități bune ale carotenoidelor din fructele de cătină, cele mai mari valori fiind înregistrate pentru xantofile (zeaxantina, luteina și β -criptoxantina). Conținutul ridicat, bioaccesibilitatea ridicată și activitatea antioxidantă a carotenoidelor din boabele de cătină pledează pentru necesitatea unor studii mai ample asupra beneficiilor acestor fructe.

În capitolul șapte (Studiul 4), am comparat eficiența a cinci solvenți verzi (lactat de etil, acetat de etil, ulei de floarea-soarelui, ciclopentil metil eter, metil tetrahidrofuran) și două metode de extracție (macerare-CE și extracție asistată cu ultrasunete-UAE) pentru recuperarea carotenoidelor din fructele de cătină, în comparație cu un amestec de solvenți organici. La utilizarea UAE, randamentul de extracție pentru toți solvenții testați a fost mai bun, cu excepția uleiului de floarea-soarelui. În ceea ce privește solvenții utilizați, pentru extracția clasică, CPME a avut cele mai bune rezultate, în timp ce pentru UAE, cele mai bune rezultate au fost obținute cu CPME și MeTHF. Chiar dacă uleiul de floarea-soarelui a avut un randament de extracție mai mic, utilizarea lui pentru extracția carotenoidelor prezintă numeroase avantaje. În ceea ce privește tipul de carotenoide analizate, CPME a fost cel mai eficient în extracția esterilor zeaxantinei și a carotenilor, în timp ce lactatul de etil a fost cel mai eficient solvent pentru zeaxantina liberă. Mai mult, extractul de carotenoide obținut a fost încapsulat cu succes (99 %) în microcapsule de alginat (700 nm diametru). Retenția carotenoidelor în timpul depozitării a fost mai mare pentru microcapsulele depozitate sub formă hidratată, la temperatură scăzută, iar microbibilele au fost stabile în pH acid, eliberând carotenoidele la pH neutru. Cea mai mare bioaccesibilitate a carotenoidelor totale a fost obținută din capsulele hidratate, în timp ce pentru carotenoidele individuale, cele mai mari procente de micelizare au fost obținute pentru esterii zeaxantinei, β -carotină și γ -carotină. Adaosul de iaurt a avut un efect pozitiv asupra bioaccesibilității carotenoidelor doar în microcapsulele deshidratate, iar impactul a fost mai mare pentru zeaxantina liberă și esterii săi.

Deoarece bioaccesibilitatea carotenoidelor este influențată de atât de mulți factori, trebuie aplicate metode statistice avansate pentru a înțelege pe deplin interacțiunile complexe dintre structura carotenoidului, matricea în care se găsesc și forma de stocare, și tipul de lipide adăugate. În plus, ar fi important să se determine gradul de hidroliză a lipidelor în timpul digestiei *in vitro*, deoarece acesta ar putea oferi informații utile pentru înțelegerea mecanismelor micelizării carotenoidelor. Cu toate acestea, o constatare majoră a studiului nostru a fost că, în general, adăugarea unei surse de lipide nesaturate în timpul digestiei *in vitro* facilitează transferul carotenoidelor (în principal al carotenilor) în micle mixte, sporind astfel bioaccesibilitatea acestora.

Ca recomandări viitoare, o atenție deosebită trebuie acordată extracției de compuși fitochimici (în special carotenoide) folosind solvenți verzi, deoarece aceștia pot fi o metodă eficientă de recuperare a compușilor bioactivi din plante, cu impact redus asupra mediului și asupra sănătății umane.

Subprodusele rezultate din industria alimentară merită o atenție sporită, datorită conținutului lor ridicat în molecule importante din punct de vedere nutrițional care pot fi extrase și reutilizate în continuare ca ingredient/suplimente alimentare sau în industria cosmetică și farmaceutică.

9. Originalitate și contribuții personale

În cadrul prezentei teze de doctorat, a fost investigată bioaccesibilitatea carotenoidelor din diverse matrici alimentare, folosind diferite abordări. În plus, utilizarea unui protocol standardizat de digestie *in vitro* ne permite compararea rezultatelor cu literatura existentă în domeniu.

Au fost obținute noi informații relevante cu privire la compoziția în carotenoide și acizi grași a unor alimente comune în alimentația umană, în stare neprocesată. După cunoștințele noastre, acesta este primul studiu care investighează, în același studiu și în condiții experimentale identice, efectul uleiului de măsline, de floarea-soarelui, și semințele de in, a pulpei de avocado și a smântânii asupra bioaccesibilității carotenoidelor majore din morcovi, roșii cherry. și baby spanac. Datorită complexității designului experimental, am putut sublinia interacțiunile dintre natura chimică a carotenoidelor (polaritate), matricea alimentară și tipul de lipide, precum și influența acestora asupra bioaccesibilității carotenoidelor. Astfel, am constata că indiferent de matrice, xantofilele sunt mai bioaccesibile decât carotenii, dar adăugarea de lipide, mai ales în concentrație mai mare, are un efect pozitiv mai puternic asupra carotenilor decât asupra xantofilelor. De asemenea, am demonstrat că uleiul de măsline și uleiul de floarea-soarelui sporesc bioaccesibilitatea tuturor carotenoidelor, la concentrație de 5%.

În ceea ce privește fructele de cătină, am caracterizat un extract lipofil din punctul de vedere al compoziției în carotenoide și am demonstrat o activitate antioxidantă mai bună a acestuia în comparație cu compușii puri, folosind o baterie de teste antioxidante. La fel ca și în cazul legumelor, am constatat o mai bună bioaccesibilitate a xantofilelor, în special a zeaxantinei din fructele de cătină, demonstrând astfel valoarea nutritivă ridicată a acestora.

Din câte știm, acesta este primul studiu care combină mai multe elemente noi în ceea ce privește analiza compușilor carotenoidici, respectiv utilizarea solvenților verzi pentru

extracție, utilizarea extracției asistate cu ultrasunete ca metodă de extracție, dar și valorificarea unui produs secundar (tescovină de cătină) prin încapsulare. Constatările prezentate în această teză aduc informații noi și relevante despre noi metode de extracție a carotenoidelor, mult mai puțin costisitoare și la fel de eficiente sau chiar mai eficiente decât cele utilizate în mod tradițional. În ceea ce privește extracția asistată cu ultrasunete, putem spune că este o metodă care oferă un randament de extracție la fel de bun sau chiar mai bun decât extracția clasică, dar într-un timp mult mai scurt. De asemenea, s-au evidențiat avantajele utilizării solvenților verzi pentru extracția carotenoidelor, prin obținerea unor rezultate la fel de bune sau mai bune decât cele obținute prin utilizarea solvenților organici tradiționali.

Din punct de vedere economic, originalitatea acestui studiu constă în valorificarea unui subprodus, prin utilizarea acestuia ca matrice pentru extracția eficientă și verde a carotenoidelor, care ulterior pot fi utilizate pentru obținerea de microcapsule, în vederea îmbunătățirii valorii nutritive a unor produse alimentare sau suplimente.