
TEZA DE DOCTORAT

Stabilitatea compușilor fenolici din tescovina de mere procesată și evaluarea potențialului prebiotic *in vitro*, a efectelor antioxidante și antiproliferative

Doctorand **Diana Plămadă**
(REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT)

Conducător de doctorat **Prof. univ. dr. Dan Cristian Vodnar**



Rezumat

Industria globală a merelor generează cantități semnificative de produse secundare, în special tescovina de mere (AP), care rămâne în mare parte subutilizată, în ciuda conținutului său ridicat de compuși bioactivi. Tescovina de mere, reziduul solid rămas după extragerea sucului, reprezintă o sursă bogată de fibre alimentare și polifenoli, inclusiv flavonoide, acizi fenolici și dihidrocalcone. Acești compuși sunt recunoscuți pentru beneficiile lor potențiale asupra sănătății, având proprietăți antioxidante, prebiotice și antiproliferative. Cu toate acestea, în ciuda caracteristicilor sale biofuncționale promițătoare, reziduul este utilizat în principal ca hrană pentru animale sau este eliminat, ceea ce evidențiază necesitatea unor strategii inovatoare de valorificare pentru a-i spori aplicabilitatea în nutriția umană și în dezvoltarea alimentelor funcționale.

Compușii fenolici, care constituie o fracțiune semnificativă din compoziția bioactivă a tescovinei, joacă un rol esențial în modularea microbiotei intestinale, acționând ca substraturi prebiotice ce stimulează selectiv creșterea bacteriilor benefice. Mai multe studii au demonstrat că tescovina bogată în polifenoli prezintă efecte prebiotice, favorizând proliferarea unor tulpini probiotice precum *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* și *Saccharomyces boulardii*. Aceste interacțiuni sugerează că tescovina poate contribui la sănătatea intestinală prin menținerea echilibrului microbiotic și prin exercitarea unor efecte antimicrobiene împotriva agenților patogeni enterici, cum ar fi *Escherichia coli*. În plus, polifenolii din tescovină au o activitate antioxidantă puternică, contracaraând stresul oxidativ și reducând inflamația, factori esențiali în dezvoltarea unor afecțiuni cronice.

Dincolo de rolul său prebiotic și antioxidant, cercetări recente au evidențiat potențialul antiproliferativ al tescovinei, în special împotriva celulelor canceroase colorectale. Testele *in vitro* au arătat că anumiți polifenoli din tescovină pot induce citotoxicitate selectivă, inhibând proliferarea celulelor tumorale fără a afecta în mod semnificativ fibroblastele sănătoase. Se presupune că acest efect are loc prin mai multe mecanisme, inclusiv modularea stresului oxidativ, inducerea apoptozei și interferența cu căile de semnalizare ale celulelor canceroase. Aceste descoperiri subliniază potențialul AP de a fi utilizată ca ingredient funcțional, combinând susținerea sănătății intestinale cu proprietăți chemopreventive.

Această cercetare evaluează sistematic stabilitatea procesării și activitatea biologică a tescovinei bogată în polifenoli, concentrându-se pe potențialul său prebiotic *in vitro*, proprietățile antioxidante și efectele antiproliferative. Prin caracterizarea impactului metodelor de procesare, cum ar fi liofilizarea, asupra retenției și bioactivității polifenolilor, acest studiu contribuie la optimizarea utilizării tescovinei în aplicațiile alimentare funcționale. Rezultatele subliniază importanța tescovinei ca ingredient sustenabil, cu beneficii multiple pentru sănătate, sprijinind integrarea sa în intervenții dietetice menite să îmbunătățească compoziția microbiotei intestinale și să reducă riscul de boli.

Prin urmare, studiul evidențiază necesitatea valorificării complete a tescovinei, aliniindu-se principiilor economiei circulare și producției alimentare durabile.

Optimizând proprietățile sale bioactive, tescovina poate fi transformată dintr-un produs secundar subutilizat într-un ingredient funcțional valoros, reducând risipa alimentară și contribuind la soluții dietetice cu efecte benefice asupra sănătății. Metodologiile și perspectivele obținute din această cercetare pot fi extinse și către alte produse secundare din fructe, sporindu-le valoarea nutrițională și aplicabilitatea în domeniul sănătății și nutriției.

Obiectivele principale ale acestei teze:

Principală temă a acestei teze de doctorat este valorificarea tescovinei de mere, un subprodus agro-industrial abundent, transformând-o într-un ingredient funcțional de înaltă valoare, cu proprietăți prebiotice, antioxidante și antiproliferative. Prin investigarea compoziției sale fenolice, a activității sale biologice și a potențialelor aplicații, această cercetare își propune să contribuie la utilizarea sustenabilă a subproduselor rezultate din procesarea fructelor, în conformitate cu principiile economiei circulare. Pentru a explora și valida în mod sistematic potențialul funcțional al tescovinei, au fost stabilite mai multe obiective specifice:

01. Caracterizarea compoziției de compuși fenolici și a stabilității:

Analizarea profilului fenolic al tescovinei provenite din diferite soiuri de mere utilizând tehnici cromatografice avansate, evaluând impactul metodelor de procesare și conservare asupra stabilității și biodisponibilității compușilor fenolici.

02. Evaluarea proprietăților antioxidante și citotoxice:

Investigarea potențialului antioxidant al extractelor de tescovină înainte și după digestia *in vitro* și fermentație, precum și evaluarea efectelor citotoxice selective asupra celulelor canceroase colorectale umane, pentru a explora utilizarea tescovinei ca ingredient alimentar funcțional cu beneficii pentru sănătate.

03. Determinarea potențialului prebiotic în modele *in vitro*:

Examinarea capacității tescovinei liofilizate de a susține dezvoltarea unor microorganisme probiotice selectate, inclusiv *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* și *Saccharomyces boulardii*, prin evaluarea viabilității microbiene și a activității metabolice în timpul fermentației.

04. Optimizarea valorificării tescovinei pentru aplicații funcționale:

Identificarea strategiilor optime de procesare pentru conservarea sau îmbunătățirea proprietăților prebiotice, antioxidante și antiproliferative ale tescovinei, oferind perspective pentru integrarea acesteia în formulări alimentare funcționale și aplicații nutraceutice.

Prin atingerea acestor obiective, această teză de doctorat își propune să avanseze cunoștințele despre proprietățile biofuncționale ale tescovinei de mere și să sprijine tranziția acesteia de la un subprodus cu valoare redusă la un ingredient alimentar valoros, cu beneficii semnificative pentru sănătate. În plus, această cercetare se aliniază eforturilor mai ample de reducere a risipei alimentare și de promovare a utilizării sustenabile a reziduurilor agro-industriale.

Metodologie

Acest studiu a utilizat o combinație de metode analitice, microbiologice și *in vitro* pentru a evalua în mod cuprinzător proprietățile funcționale ale tescovinei de mere. Cercetarea a fost structurată în trei faze experimentale principale: (1) caracterizarea compușilor fenolici, stabilității și impactului procesării, (2) evaluarea potențialului prebiotic și a fermentației, și (3) analiza activității antioxidante și citotoxicității selective împotriva celulelor canceroase.

Profilul compușilor fenolici, stabilitatea și impactul procesării

Profilul fenolic al extractelor de tescovină de mere a fost caracterizat utilizând cromatografie în strat subțire de înaltă performanță (HPTLC) și cromatografie lichidă cu spectrometrie de masă (LC-MS/MS) pentru a cuantifica principalii compuși bioactivi, inclusiv flavonoidele, acizii fenolici și dihidrochalconele.

Pentru a evalua impactul metodelor de procesare, extractele de tescovină au fost supuse tratamentului termic (TT), tratamentului termic la presiune înaltă (HPTT) și tratamentului cu câmp electric pulsatoriu (PEF). TT a implicat încălzirea la 80°C (T80) și 121°C (T121), în timp ce HPTT a combinat o presiune hidrostatică de 600 MPa cu temperaturi variabile (50°C, 80°C și 121°C). Tratamentul PEF a aplicat 10,9 kV, o frecvență de 30 Hz și 300 de impulsuri extractelor. După aceste tratamente, stabilitatea floridzinei, acidului clorogenic și epicatechinei a fost monitorizată pentru a determina efectele asupra stabilității compușilor și posibilele degradări oxidative.

Potențialul prebiotic și fermentația

Potențialul prebiotic al AP a fost evaluat prin fermentație *in vitro* utilizând trei tulpini probiotice bine caracterizate: *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Lactobacillus casei* ATCC 393 și *Saccharomyces boulardii* MYA-796. În plus, au fost incluse și tulpini enterice de *Escherichia coli* (ATCC 25922 și ATCC 8739) pentru a evalua selectivitatea prebiotică.

Pentru a simula digestia, tescovina a fost supus digestiei gastrointestinale *in vitro* utilizând protocolul INFOGEST, care include fazele orală, gastrică și intestinală. După digestie, tescovina a fost incorporată în medii MRS și YPD, înlocuind glucoza în proporții de 0,5% și 1% w/w. Fermentația a fost realizată pe o perioadă de 48 de ore, iar probele au fost colectate la 0, 4, 8, 24 și 48 de ore pentru a evalua creșterea și viabilitatea microbiană. Indicele prebiotic (PI) a fost calculat pentru a compara eficacitatea tescovinei cu fructooligozaharidele (FOS), un prebiotic standard.

Activitatea antioxidantă și citotoxicitatea

Pentru a evalua activitatea antioxidantă a extractelor de tescovină, au fost utilizate trei metode complementare: testul DPPH de captare a radicalilor liberi, testul de Capacitate Antioxidantă Echivalentă Trolox (TEAC) și spectroscopia de rezonanță paramagnetică electronică (EPR).

Potențialul citotoxic al extractelor de tescovină împotriva celulelor canceroase de colon a fost evaluat utilizând testele MTT și de excludere Trypan Blue pe linii celulare Caco-2, și Hs27. Celulele au fost expuse la concentrații crescătoare (0–100 μg/mL) de extracte de tescovină, iar valorile IC50 au fost calculate pentru a determina efectele

citotoxice selective. În plus, au fost realizate teste de apoptoză pentru a confirma dacă extractele de tescovină induc toxicitate specifică celulelor canceroase.

Rezultate

Profilul de compuși fenolici și impactul procesării

Analiza HPTLC și LC-MS/MS a identificat un total de 19 compuși fenolici din trei clase principale: flavonoide, acizi fenolici și dihidrochalcone. Conținutul de fenoli a variat în funcție de cultivarul de mere, cu tescovina Jonathan (JN) prezentând cel mai ridicat conținut de procyanidin B1 (0,69 mg/g DM), în timp ce tescovina Red Delicious (RD) a avut cel mai mare conținut total de fenoli (TPC) de 13,81 mg GAE/g DM.

Referitor la impactul procesării, TT la 121°C (T121) și HPTT la 121°C (H121) au condus la degradarea a 60–70% din acidul clorogenic și epicatechină, confirmând că temperaturile ridicate accelerează degradarea fenolică. Pe de altă parte, tratamentul PEF, deși a dus la o reducere de 50% a florizinei, a conservat majoritatea celorlalți fenoli mai eficient decât tratamentele termice. Dintre toate metodele testate, HPTT la temperatură scăzută (H50) și PEF au fost cele mai eficiente în menținerea stabilității fenolice.

Potențialul prebiotic și fermentația

Potențialul prebiotic al tescovinei de mere a fost utilizat, sprijinind selectiv creșterea unor tulpini probiotice, în special *L. casei* și *S. boulardii*, care au demonstrat o adaptare favorabilă în procesul de fermentație. Procesul de fermentație a dus la o creștere semnificativă a acizilor grași cu lanț scurt (SCFA), în special acetat și propionat, care susțin sănătatea intestinală.

Scorurile indicele prebiotic (PI) au arătat că tescovina la o concentrație de 1% în combinație cu *Saccharomyces boulardii* a prezentat cea mai ridicată activitate prebiotică ($1,15 \pm 0,20$), depășind alte tulpini probiotice. Totuși, tescovina a fost mai puțin eficientă decât FOS, sugerând că modificările suplimentare sau combinațiile cu alte tulpini prebiotice pot îmbunătăți beneficiile sale.

Activitatea antioxidantă și citotoxicitatea

După digestie, analiza a arătat o creștere cu 15% a inhibiției, indicând că compușii fenolici au devenit mai biodisponibili. Testul TEAC a evidențiat o creștere de 30–40% a activității antioxidante după procesarea termică moderată (T80, H50), în timp ce HPTT la temperaturi ridicate (H121) a redus semnificativ potențialul antioxidant.

În ceea ce privește citotoxicitatea, extractele de tescovină de mere au prezentat efecte inhibitoare selective asupra celulelor canceroase de colon. IC50 pentru celulele Caco-2 a fost de 41,36 μg/mL, în timp ce IC50 pentru fibroblastele normale Hs27 a fost de 74,67 μg/mL, indicând un coeficient de selectivitate de 1,81. Aceste rezultate sugerează un potențial terapeutic al tescovinei în nutraceutice.

Concluzii generale ale acestei teze:

1. Rezultatele evidențiază faptul că tescovina de mere, un subprodus major al industriei de procesare a merelor, deține proprietăți biofuncționale

semnificative, inclusiv efecte prebiotice, antioxidante și antiproliferative. Această cercetare subliniază potențialul său ca ingredient funcțional, contribuind la reducerea risipei alimentare și, în același timp, la promovarea sănătății umane.

2. Compușii fenolici din tescovină își mențin activitatea biochimică în diverse condiții de procesare și digestie, demonstrând o stabilitate care susține aplicarea lor în alimente funcționale. Studiul a confirmat că metodele de procesare influențează profilul fenolic, iar anumite soiuri de mere prezintă concentrații mai mari de compuși bioactivi.
3. Activitatea antioxidantă a tescovinei - a fost demonstrată o creștere în urma digestiei *in vitro*, sugerând că procesele digestive pot îmbunătăți biodisponibilitatea anumitor compuși fenolici. Acest aspect consolidează potențialul tescovinei de a combate stresul oxidativ, un factor major implicat în dezvoltarea bolilor cronice.
4. Citotoxicitatea selectivă a extractelor de tescovină asupra celulelor canceroase colorectale indică un posibil rol în strategiile de prevenție a cancerului. Toxicitatea preferențială față de celulele maligne, cu un impact redus asupra celulelor sănătoase, susține necesitatea unor investigații suplimentare privind utilizarea compușilor bioactive din tescovină în aplicații nutraceutice.
5. Potențialul prebiotic al tescovinei a fost demonstrat prin capacitatea sa de a susține selectiv creșterea microorganismelor benefice, precum *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* și *Saccharomyces boulardii*. Cu toate acestea, scorurile indicelui prebiotic sugerează că, deși tescovina favorizează dezvoltarea probioticelor, efectul său este moderat comparativ cu prebiotice cunoscute, precum fructooligozaharidele.
6. Studiul a evidențiat variații în conținutul fenolic și compoziția zaharurilor în funcție de soiul de măr utilizat, influențând astfel eficacitatea sa prebiotică. Aceste constatări subliniază importanța alegerii soiului de măr atunci când tescovina este luată în considerare ca ingredient funcțional.
7. Utilizarea sustenabilă a tescovinei se aliniază principiilor economiei circulare prin transformarea unui subprodus subutilizat într-un ingredient valoros. Optimizarea tehnicilor de procesare poate îmbunătăți proprietățile sale funcționale, facilitând integrarea sa în produse alimentare și aplicații pentru sănătate.

Cercetările viitoare ar trebui să exploreze intervențiile dietetice pe termen lung pentru a valida beneficiile tescovinei asupra sănătății în modele umane. De asemenea, optimizarea strategiilor de procesare pentru a îmbunătăți efectele prebiotice și stabilitatea compușilor bioactivi va fi esențială pentru dezvoltarea de alimente funcționale și nutraceutice pe bază de tescovină de mere.

Originalitatea și contribuțiile personale:

Această teză de doctorat aduce contribuții originale în domeniul valorificării durabile a produselor alimentare, concentrându-se pe exploatarea funcțională a tescovinei de mere, un subprodus agro-industrial cu un potențial bioactiv semnificativ.

Cercetarea oferă perspective noi asupra proprietăților fizico-chimice ale tescovinei, a potențialului său prebiotic, a stabilității activității antioxidante și a efectelor antiproliferative, contribuind la o mai bună înțelegere a aplicațiilor sale în alimente funcționale și nutraceutice.

O contribuție majoră a acestui studiu constă în caracterizarea detaliată a compușilor fenolici din tescovină provenită din diferite soiuri de mere. Prin utilizarea tehnicilor analitice avansate, cercetarea a evidențiat variații dependente de soi în compoziția fenolică, conținutul de zaharuri și impactul acestora asupra activității biologice. Rezultatele obținute creează o bază solidă pentru optimizarea ingredientelor derivate din tescovină în funcție de potențialul lor biofuncțional.

Această cercetare se numără printre puținele studii care au evaluat sistematic stabilitatea și bioactivitatea polifenolilor din tescovină în urma digestiei *in vitro* și a fermentației microbiene. Studiul a demonstrat că procesele digestive îmbunătățesc biodisponibilitatea anumitor compuși fenolici, sporindu-le activitatea antioxidantă, ceea ce este esențial pentru efectele lor fiziologice post-consum. De asemenea, experimentele fermentative au oferit informații valoroase despre efectele prebiotice ale tescovinei, evidențiind capacitatea acestuia de a susține selectiv creșterea microorganismelor benefice, precum *Lactobacillus casei* și *Saccharomyces boulardii*, deși indicele prebiotic a fost mai scăzut în comparație cu prebioticele comerciale.

Un aspect inovator al acestei teze este investigarea efectelor antiproliferative ale tescovinei asupra celulelor canceroase colorectale, demonstrând citotoxicitatea sa selectivă, cu un impact minim asupra fibroblastelor normale. Explicațiile mecanistice, incluzând inducerea stresului oxidativ și modularea apoptozei, evidențiază potențialul compușilor fenolici derivați din tescovină ca elemente funcționale în strategiile de prevenție a cancerului.

Prin evidențierea proprietăților multifuncționale ale tescovinei, această cercetare consolidează rolul său ca ingredient sustenabil în formulările alimentare funcționale, aliniindu-se principiilor economiei circulare. Metodologiile dezvoltate pentru evaluarea bioactivității compușilor fenolici din tescovină pot fi adaptate și pentru alte subproduse derivate din fructe, extinzând aplicabilitatea acestora în strategiile de valorificare a deșeurilor agro-industriale.

Direcțiile viitoare de cercetare care derivă din această lucrare includ rafinarea tehnicilor de procesare pentru a îmbunătăți biodisponibilitatea polifenolilor din tescovină, optimizarea integrării tescovinei în matrice alimentare și efectuarea de studii *in vivo* pentru validarea suplimentară a beneficiilor sale asupra sănătății. Integrarea tescovinei în sistemele alimentare durabile reprezintă o oportunitate promițătoare pentru reducerea risipei alimentare, contribuind în același timp la sănătatea publică și la sustenabilitatea mediului.