
TEZA DE DOCTORAT

Complecși supramoleculari ai unor bioflavonoide de interes biologic

Doctorand **Róbert Szabó**
(REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT)

Conducător de doctorat **Prof. dr. Francisc Vasile Dulf**



REZUMAT

Flavonoidele reprezintă una dintre cele mai abundente clase de polifenoli naturali întâlniți în alimentația umană. Datorită gamei largi de proprietăți benefice pentru sănătate, precum efectele antioxidante, antiinflamatoare și protectoare, suplimentele alimentare pe bază de flavonoide au câștigat o popularitate tot mai mare în ultimii ani în rândul populației. Dintre acești compuși, icariina, icarisida II și icaritina au atras o atenție științifică considerabilă. Utilizată în mod tradițional în tratamentul bolilor cardiovasculare, osteoporozei și disfuncțiilor sexuale, în prezent icarisida II a demonstrat un profil farmacologic promițător și în gestionarea altor afecțiuni frecvent întâlnite. Cu toate acestea, în ciuda potențialului său terapeutic, biodisponibilitatea acestor compuși rămâne redusă. În ceea ce privește icarisida II (ICS), această limitare poate fi atribuită solubilității reduse în apă și permeabilității slabe prin membrană. Pentru a depăși aceste obstacole, studiul de față investighează formarea de complecși ca strategie de îmbunătățire a solubilității și, implicit, a biodisponibilității icarisidei II.

Dintre potențialii purtători adecvați pentru formarea de complecși, proteinele din zer au demonstrat un potențial ridicat din mai multe motive. Proteinele din zer prezintă numeroase beneficii pentru sănătatea umană, incluzând proprietăți anticancerigene, antimicrobiene, antihipertensive, de suprimare a apetitului, de reducere a colesterolului și de prevenire a cariilor dentare. Concentratul de proteine din zer (WPC) este alcătuit în principal din β -lactoglobulină (β -lg, 50% w/w), α -lactalbumină (20% w/w) și cantități mai mici de alte proteine, precum imunoglobuline și albumina serică bovină.

β -lactoglobulina califică concentratul de proteine din zer drept un candidat ideal pentru formarea de complecși cu icarisida II, datorită capacității sale de a lega molecule mici hidrofobe în cavitatea sa hidrofobă. În plus, proteinele din zer prezintă caracteristici funcționale precum solubilitate ridicată, capacitate de emulsificare, formare de gel și spumă, precum și capacitate de legare a apei. Forțele care mediază formarea complexelor includ legături de hidrogen, precum și interacțiuni hidrofobe și electrostatice. De asemenea, proteinele din zer sunt disponibile pe scară largă ca subprodus major al procesului de fabricare a brânzeturilor, ceea ce asigură un cost economic redus și un profil ridicat de sustenabilitate. În ansamblu, aceste proprietăți fac din WPC un candidat ideal pentru încapsularea moleculelor bioactive, inclusiv icarisida II.

Au fost utilizate analize spectroscopice, precum și DSC și XRD, pentru a investiga formarea și stabilitatea complexelor ICS-WPC. Măsurătorile spectrofluorimetrice au fost aplicate pentru a evalua comportamentul termodinamic al reacției, în timp ce spectroscopia în infraroșu cu transformata Fourier (FTIR), calorimetria diferențială de scanare (DSC) și difracția de raze X pe pulberi (XRD) au furnizat dovezi structurale privind formarea unor complecși amorfi noi. Aceste analize au demonstrat că

complexarea dintre icarisida II și WPC este favorabilă din punct de vedere termodinamic. A fost analizat impactul surfactanților, precum Tween 80 și lecitină, asupra solubilității în apă. Deși complexarea exclusiv cu WPC a condus la creșterea solubilității, adăugarea surfactanților a determinat îmbunătățiri suplimentare prin dispersie și reducerea agregării moleculare. Rezultatele indică faptul că surfactanții sunt necesari pentru maximizarea solubilității în mediu apos și a biodisponibilității ICS, completând efectele formării de complecși.

Pe lângă îmbunătățirea solubilității, a fost evaluată și activitatea antioxidantă a complecșilor. Măsurătorile prin testul de captare a radicalilor DPPH• și reacția oscilatorie Briggs–Rauscher au evidențiat faptul că complexarea amplifică activitatea antioxidantă a icarisidei II. Acest rezultat sugerează că modificarea bazată pe purtători nu numai că optimizează proprietățile fizico-chimice, dar poate îmbunătăți și activitatea biologică.

În ansamblu, această cercetare oferă o strategie inovatoare biotehnologică de îmbunătățire a solubilității icarisidei II prin complexarea cu proteine din zer completată de adăugarea Tween 80 și a lecitinei. Rezultatele contribuie la domeniul mai amplu al sistemelor de livrare a compușilor bioactivi, prin creșterea performanței compușilor naturali slab solubili. În plus, prin valorificarea proteinelor din zer, un subprodus al industriei lactatelor, studiul susține obiectivele de sustenabilitate. Rezultatele obținute pot fi extinse și la alte flavonoide hidrofobe, deschizând calea pentru dezvoltarea unor formulări de suplimente mai eficiente și cu funcționalitate superioară. Studiile realizate se înscriu în domeniul biotehnologiei, demonstrând potențialul dezvoltării unor sisteme inovatoare de livrare a compușilor bioactivi.

Obiectivele principale

Ipoteza centrală a acestei teze de doctorat a fost că icarisida II poate fi solubilizată eficient prin formarea de complecși supramoleculari cu concentrat de proteine din zer (WPC), iar efectul poate fi amplificat prin incorporarea surfactanților. S-a anticipat că această abordare va conduce la îmbunătățirea solubilității în apă și a capacității antioxidante, facilitând astfel incorporarea cu succes în suplimente alimentare. În plus, utilizarea proteinei din zer, subprodus al producției de brânzeturi, contribuie la sustenabilitate prin valorificarea resurselor.

Pentru validarea acestei ipoteze au fost definite mai multe obiective specifice, menite să ghideze direcțiile de investigație și să asigure o evaluare cuprinzătoare a strategiei propuse pentru creștere a solubilității. Aceste obiective sunt:

O1. Formularea și optimizarea complecșilor ICS–WPC, folosind concentratul de proteine din zer ca purtător natural, cu cost redus și sustenabil, cu accent pe eficiența complexării și stabilitatea fizico-chimică.

O2. Investigarea interacțiunilor dintre icarisida II și WPC în condiții variate (pH, temperatură), utilizând măsurători spectrofluorimetrice pentru evaluarea parametrilor termodinamici și a mecanismelor de legare.

O3. Caracterizarea transformărilor structurale și a stabilității complexelor ICS-WPC utilizând FTIR, XRD, DSC și simulări de andocare moleculară, cu scopul confirmării formării unor noi ansambluri supramoleculare amorfe.

O4. Investigarea efectului surfactanților (Tween 80 și lecitină) asupra complexelor ICS-WPC, pentru determinarea raportului optim care asigură cea mai mare creștere a solubilității.

O5. Evaluarea activității antioxidante a complexelor utilizând testele DPPH· și Briggs-Rauscher, pentru a determina dacă complexarea și încorporarea surfactanților pot îmbunătăți bioactivitatea funcțională a ICS.

Această teză de doctorat a explorat abordări inovatoare pentru îmbunătățirea solubilității în apă și a activității antioxidante a icarisidei II. Prin formarea de complecși cu concentrat de proteine din zer și încorporarea diferiților surfactanți, precum Tween 80 și lecitină, studiul a urmărit dezvoltarea unui supliment alimentar sustenabil și rentabil.

Concluziile generale

Principalele rezultate prezentate în această teză sunt rezumate după cum urmează:

În Capitolul 3 s-a investigat posibilitatea formării unor noi complecși supramoleculari între icarisida II și concentratul de proteine din zer. Difracția de raze X pe pulberi, calorimetria diferențială de scanare și spectroscopia FTIR au furnizat dovezi ale formării unor noi complecși amorfi ICS-WPC. Analiza termodinamică a arătat că cele mai favorabile condiții pentru formarea complexelor au fost pH 8 și 40°C. Rezultatele obținute prin spectroscopia de fluorescență au indicat valori pozitive ale modificărilor de entalpie și entropie, evidențiind faptul că interacțiunile hidrofobe reprezintă forța majoră responsabilă formarea complexelor.

Capitolul 4 s-a axat pe îmbunătățirea solubilității în apă a icarisidei II prin complexare cu concentrat de proteine din zer și prin adăugarea surfactanților Tween 80 și lecitină. Studiul a demonstrat că complexarea cu WPC a crescut semnificativ solubilitatea ICS, de aproximativ 258 de ori. În combinație cu surfactanții selectați, solubilitatea a crescut până la 554 de ori, evidențiind un efect sinergic între purtătorii proteici și surfactanți. Analizele spectroscopice și termice au confirmat formarea cu succes a noilor complecși, iar microscopia electronică de scanare a pus în evidență modificări morfologice relevante. În plus, această abordare a demonstrat atât eficiența ridicată, cât și potențialul de sustenabilitate prin valorificarea zerului, subprodus al industriei lactatelor.

În Capitolul 5 a fost investigată influența adăugării surfactanților asupra activității antioxidante a icarisidei II, utilizând metodele BR și DPPH·. Rezultatele au indicat că ICS prezintă o activitate minimă în medii apoase. Capacitatea antioxidantă a fost îmbunătățită prin complexare cu concentrat de proteine din zer și surfactanți (Tween 80 și lecitină), obținându-se o creștere de 4,16 ori. Aceste rezultate

demonstrează eficiența procedurii de complexare în creșterea funcționalității icarisidei II.

Pe baza rezultatelor acestei cercetări, au fost formulate următoarele concluzii și recomandări generale:

1. Formarea complexelor dintre icarisida II și concentratul de proteine din zer a prezentat cele mai favorabile rezultate la pH 8 și 40°C, conducând la formarea unor complexe amorfi ICS-WPC.

2. Analizele termodinamice au confirmat că interacțiunile hidrofobe reprezintă forța principală care conduce la formarea complexelor supramoleculare.

3. Complexarea icarisidei II cu concentrat de proteine din zer, în special la un raport molar de 2:1, a îmbunătățit semnificativ solubilitatea în apă, rezultând o creștere de 258 de ori. În plus, încorporarea combinată a Tween 80 și lecitinei a crescut solubilitatea până la 554 de ori. Această îmbunătățire poate fi atribuită schimbărilor morfologice și reducerii tensiunii interfațiale.

4. Investigațiile structurale și morfologice (DSC, XRD, FTIR, SEM) au confirmat tranziția de la starea cristalină la cea amorfă și formarea de noi legături de hidrogen. Aceste transformări contribuie la îmbunătățirea solubilității și stabilității icarisidei II. Încorporarea concentratului de proteine din zer, subprodus al producției de brânzeturi, împreună cu utilizarea uscării prin pulverizare, subliniază sustenabilitatea și scalabilitatea metodei, cu implicații relevante pentru biotehnologie.

5. Complexarea icarisidei II cu WPC a îmbunătățit semnificativ activitatea antioxidantă. Adăugarea surfactanților precum Tween 80 și lecitină a condus la o creștere de 4,16 ori, confirmată prin testul DPPH-.

6. Metoda BR a demonstrat că ICS pur prezintă bioactivitate limitată în condiții apoase, subliniind importanța strategiilor biotehnologice de formulare pentru îmbunătățirea solubilității în apă și performanței funcționale, în vederea unor aplicații potențiale în suplimente alimentare.

7. Formularea dezvoltată S-ICS-WPC oferă o metodă nouă, sustenabilă și scalabilă pentru îmbunătățirea biodisponibilității icarisidei II, compus natural slab solubil în apă. Totuși, sunt necesare studii suplimentare, precum simulări gastrointestinale in vitro și evaluări in vivo ale biodisponibilității, pentru a valida eficiența sa ca supliment alimentar funcțional.

Originalitatea și contribuțiile personale

Prezenta teză de doctorat evidențiază contribuțiile originale ale autorului în domeniul biotehnologiilor și tehnologiilor verzi aplicate dezvoltării alimentelor funcționale cu accent pe îmbunătățirea solubilității în apă și a activității antioxidante a compușilor naturali cu biodisponibilitate redusă având ca studiu reprezentativ icarisida II. Noutatea acestei cercetări constă în formarea unor complexe anterior neinvestigați, introducând o strategie inovatoare pentru îmbunătățirea proprietăților funcționale ale compușilor naturali slab solubili.

Una dintre contribuțiile principale ale acestei teze este dezvoltarea unui sistem biotehnologic de livrare bazat pe complexarea icarisidei II cu concentrat de proteine din zer. În limita cunoștințelor actuale, acesta este primul studiu care investighează formarea de complecși între icarisida II și concentratul de proteine din zer. Caracterizarea fizico-chimică cuprinzătoare utilizând DSC, XRD și FTIR a confirmat formarea cu succes a complecșilor, oferind o bază solidă pentru dezvoltarea viitoare a unor produse provenite din biotehnologii alimentare avansate.

Originalitatea contribuțiilor este amplificată de integrarea surfactanților, precum Tween 80 și lecitina, în sistemul ICS-WPC, ceea ce a permis formarea unui complex mixt pe bază de surfactanți (S-ICS-WPC). Adăugarea surfactanților a generat un efect sinergic, amplificând semnificativ solubilitatea în apă a icarisidei II. Studiul a demonstrat că această abordare biotehnologică a crescut solubilitatea în mediu apos a de 554 de ori, oferind o soluție promițătoare pentru creșterea biodisponibilității și eficienței sale ca supliment alimentar.

Această cercetare se numără printre primele care au evaluat proprietățile antioxidante ale complecșilor icarisida II-WPC utilizând metoda sistemului oscilator Briggs-Rauscher și testul de captare a radicalilor DPPH. Aceste metode, relevante pentru biotehnologiile aplicate, au furnizat atât informații cantitative, cât și informații calitative în condiții care mimează mediul gastric uman.

Un aspect esențial al cercetării îl constituie orientarea către biotehnologii sustenabile, reflectată prin utilizarea concentratului de proteine din zer, subprodus valorificat al industriei lactatelor, și prin alegerea uscării prin pulverizare. Această tehnică, specifică biotehnologiilor moderne, a fost aleasă datorită accesibilității, costurilor reduse și scalabilității industriale, contribuind la reducerea deșeurilor și promovând practici de producție ecologică.

În perspectiva dezvoltărilor viitoare, această teză de doctorat oferă un fundament solid pentru investigații suplimentare privind biodisponibilitatea *in vitro* și *in vivo*, eficiența încapsulării și stabilitatea gastrointestinală a sistemelor dezvoltate. Totodată, deschide perspectiva aplicării unor strategii similare și în cazul altor compuși hidrofobi din domeniul alimentar sau farmaceutic.