

## Stadiul actual si rezultatele obtinute in etapa 2

### **Activitatea II.1 Elaborarea conceptului si formularilor de produs. Analiza fenomenelor fizico-chimice si microbiologice cu impact direct in stabilitatea produsului (EXPERGO)**

Pentru dezvoltarea noilor produse functionale de tip snack cu adaos de ingrediente bioactive cu rol in sustinerea sanatatii (extract de amarant incapsulat in lipozomi, extract de trifoi rosu incapsulat in lipozomi, faina din samburi de struguri si ulei din samburi de struguri incapsulat) au fost elaborate 27 variante experimentale de matrice alimentare, in care ingredientele au fost dozate in diferite proportii. Variantele obtinute au fost evaluate in cadrul laboratorului Expergo in functie de caracteristicile organoleptice preferate de consumatori. Dintre cele 27 de variante experimentale au fost selectate doua matrice V26 si V27, in care ulterior au fost incorporate ingredientele bioactive.

Matricea V26 a stat la baza realizarii a doua retete de produse functionale de tip snack, V28 si V29, in care au fost incorporate ingredientele bioactive. Varianta V28 a continut ulei din samburi de struguri microincapsulat, extractul din trifoi rosu incapsulat in lipozomi, orez expandat cu lapte si fructe de padure, fulgi de mei si orez, molda 13, pasta de curmale, lecitina lichida, cacao si apa. Varianta V29 a continut uleiul din samburi de struguri incapsulat si extractul din amarant incapsulat in lipozomi, orez expandat cu lapte si fructe de padure, fulgi de mei si orez, molda 13, pasta de curmale, lecitina lichida, cacao si apa.

Matricea V27 a stat la baza realizarii a doua retete de produse functionale de tip snack, V30 si V31, in care au fost incorporate ingredientele bioactive. Varianta V30 a continut faina din samburi de struguri, extractul de trifoi rosu incapsulat in lipozomi, orez expandat cu lapte si fructe de padure, fulgi de porumb si hrisca, molda 13, pasta de curmale, carob, lecitina lichida, ulei de cocos si apa. Varianta V31 a continut faina din samburi de struguri si extractul de amarant incapsulat in lipozomi, orez expandat cu lapte si fructe de padure, fulgi de porumb si hrisca, molda 13, pasta de curmale, carob, lecitina lichida, ulei de cocos si apa.

In vederea urmaririi stabilitatii celor 4 variante (V28, V29, V30 si V31) au fost realizate teste de analiza fizico-chimica si microbiologica utilizand metoda Accelerated Shelf Life Testing (ASLT).

Probele au fost pastrate in conditii de temperatura accelerata (ASLT) la 35 °C in camera de clima, timp de 60 zile, echivalentul a 12 luni de real life (RL). Parametrii urmariti au fost: substanta uscata, activitatea apei ( $a_w$ ), pH-ul si numarul total de germeni (NTG). Determinarea parametrilor s-a realizat pentru fiecare din cele 5 extrageri (determinari) realizate pe parcursul perioadei de pastrare in conditii accelerate de temperatura.

Probele analizate nu au prezentat modificari semnificative ale substantei uscate si ale pH-ului pe parcursul perioadei de testare. La sfarsitul perioadei de testare s-au inregistrat scaderi ale activitatii apei de aproximativ 35 % fata de inceputul perioadei de testare, insa aceste scaderi nu influenteaza negativ stabilitatea produselor. Cele 4 probe analizate au avut valori foarte scazute ale NTG (<10) pe durata de testare partiala T0 – T3, insa la finalul perioadei de testare (T4) s-au inregistrat valori semnificativ ridicate ale acestui parametru microbiologic.

Pentru a determina stabilitatea senzoriala, probele au fost analizate in cadrul laboratorului de analiza senzoriala Expergo Sensory Research, utilizand testul comparativ pereche, conform standardului SR ISO 5495. Probele au fost depozitate in conditii normale (RL), la temperatura de 25°C si in conditii accelerate (ASLT) la temperatura de 35 °C in camera de clima. Perioada de depozitare a fost de 60 zile. S-a urmarit determinarea unor diferente semnificative intre probele pastrate la 25 °C si probele pastrate la 35 °C. Testele senzoriale s-au efectuat la fiecare din cele 5 extrageri. Din analiza variatiei intensitatii atributelor pentru

fiecare din cele 4 variante realizate a rezultat ca atributul principal care a determinat modificari semnificative in calitatea senzoriala a fost textura (fermitatea).

Pentru determinarea termenului de valabilitate al produselor functionale, au fost corelate rezultatele obtinute in studiul stabilitatii fizico-chimice, microbiologice si senzoriale. Din punct de vedere fizico-chimic termenul de valabilitate poate fi cel preconizat de 12 luni, din punct de vedere microbiologic termenul de valabilitate poate fi de 10 luni, iar din punct de vedere al calitatii senzoriale termenul de valabilitate poate fi de 7 luni. Parametrul care a stabilit termenul de valabilitate al produselor a fost cel senzorial.

Selectia retetelor finale s-a realizat in functie de valoarea maxima a termenului de valabilitate, de 7 luni, calculata pentru atributul textura (fermitate). Valorile maxime ale termenului de valabilitate au fost obtinute pentru retetele V28 (baton de tip snack cu ulei din samburi de struguri si extract de trifoi rosu incapsulat in lipozomi) corespunzator probelor 547/237 si V31 (baton de tip snack cu faina din samburi de struguri si extract de amarant incapsulat in lipozomi) corespunzator probelor 468/146.

## **Activitatea II.2. Obtinerea si optimizarea lipozomilor ca sistem de livrare si protectie a ingredientelor bioactive (ICECHIM)**

Lipozomii pot fi definiti ca nanostructuri sferice, cu una sau mai multe membrane fosfolipidice, utilizati ca sisteme de incapsulare pentru diferiti compusi activi (vitamine, enzime, polipeptide antimicrobiene, uleiuri esentiale, compusi fenolici, minerale, antioxidanti, aditivi alimentari, arome, acizi grasi sau proteine) cu aplicatii in industria farmaceutica, cosmetica si alimentara. In industria alimentara, lipozomii sunt utilizati in diverse aplicatii, cum ar fi: cresterea biodisponibilitatii compusilor activi, asigurarea activitatii antimicrobiene a ingredientelor incapsulate, cresterea absorbtiei intestinale, imbunatatirea aromelor si prelungirea termenului de valabilitate.

Metodele utilizate pentru obtinerea lipozomilor pot fi grupate in metode conventionale (omogenizare/agitare, hidratare in pelicula subtire, injectarea cu etanol/eter, evaporarea in faza inversa, metoda prolipozomilor) si moderne (centrifugarea asimetrica dubla si metoda fluidelor supercritice). Dintre acestea cele mai utilizate la nivel industrial pentru obtinerea lipozomilor sunt metoda agitarii, injectarea cu etanol si metoda de evaporare in faza inversa. In functie de metoda utilizata lipozomii sunt protejati de conditiile de prelucrare a alimentelor, de actiunea sucurilor gastrointestinale, astfel incat sa se asigure eliberarea tintita – controlata, influentand semnificativ dimensiunea, forma si lamelariitatea acestora, dar si eficienta de incapsulare a compusilor activi.

La nivel de laborator s-au testat doua metode (metoda agitarii si injectarea cu etanol) de incapsulare in lipozomi a extractului de amarant si a extractului de trifoi rosu. In urma caracterizarii probelor obtinute prin cele doua metode s-a selectat metoda de obtinere prin agitare a solutiilor lipozomale. In vederea optimizarii procesului de reducere a marimii lipozomilor prin ultrasonicare si studierea relevantei variabilelor s-a realizat proiectarea statistica a experimentelor Box-Behnken Design (BBD), din clasa proiectelor cu blocuri incomplete echilibrate (nu toate punctele planului experimental sunt incluse in acelasi bloc).

Optimizarea folosind metodologia suprafetei de raspuns, a fost utilizata atat pentru solutiile lipozomale cu extract din amarant (SLA), cat si pentru solutiile lipozomale cu extract din trifoi rosu (SLT). Ambele planuri experimentale au avut la baza obtinerea solutiilor lipozomale prin metoda agitarii. In cadrul proiectarii statistice a experimentelor BBD, variantele dependente au fost concentratia extractului din plante, puterea baii de ultrasonare si raportul masic dintre extract si lecitina, fiecare cu trei niveluri. Analiza de regresie a fost realizata separat pentru cele doua planuri experimentale SLA si SLT, luand in calcul cei trei parametri. In cazul variantei experimentale SLA, valorile optime de operare au fost concentratia extract 0,99 %, intensitatea puterii de ultrasonare 100 % si raport masic 1:8 g/g, astfel incat dimensiunea optima estimata a veziculelor sa fie 129,5 nm. Pentru SLT, valorile

optime de operare au fost concentratie extract 1 %, intensitatea puterii de ultrasonare 90,3 % si raport masic 1:11,87 g/g, astfel incat dimensiune optima estimata a veziculelor sa fie 130,48 nm.

In vederea incapsularii extractelor de germeni de amarant si trifoi rosu au fost obtinute cantitati mai mari de extracte liofilizate si depozitate in pungi vidate, la temperatura de – 20 °C, pana la realizarea etapei de incapsulare. Acestea au fost caracterizate fizico-chimic. Din punct de vedere al compozitiei chimice, la extractul de germeni de amarant concentratiile cele mai mari au fost la proteina totala (9,28 %), polifenoli totali (3,74 % GAE), fosfor (0,735 %) urmat de potasiu (0,716%) si vitamina C (170,56 mg/100 g), iar la extractul din germeni de trifoi rosu, concentratiile cele mai mari au fost la proteina totala (23,9 %), polifenoli totali (7,41 % GAE) potasiu (1,31 %) urmat de fosfor (1,31 %) si vitamina C (204 mg/100 g). Extractele obtinute au fost incapsulate in lipozomi in conditii optime. Solutiile lipozomale au fost caracterizate prin determinarea marimii veziculelor, a numarului de straturi din structura lor, a permeabilitatii si a capacitatii de incapsulare.

Determinarea marimii si distributiei veziculelor lipozomale optimizate (SLA-O si SLT-O) a fost realizata folosind sistemul de masurare DLS. Analiza DLS a aratat o distributie majoritara a veziculelor cu diametru de 185 nm pentru proba SLA-O, si 158 nm pentru SLT-O.

Caracterizarea probelor la Cryo- TEM a evidentiat vezicule sferice unilamelare, cu dimensiuni cuprinse intre 20-1000 nm pentru SLA-O, respectiv 20-500 nm pentru SLT-O. Proba SLA-O a prezentat cateva agregate, respectiv micelii goale de dimensiuni mai mici.

Permeabilitatea probelor lipozomale s-a determinat in prezenta unor solutii saline (hipotonicitate osmotica) sau a unor solutii izotonice de glicerol la temperatura de 42 °C (difuzie moleculara). S-a observat o crestere in volum a veziculelor lipozomale in solutiile saline de 91 % pentru proba SLA-O comparativ cu SLT-O unde cresterea a fost de 59,68 %. Pentru proba SLA-O viteza de difuzie moleculara in glicerol a crescut cu 4,58 % comparativ cu proba SLT-O unde a scazut cu 3,11 %. S-a constatat faptul ca acesta proba opune o rezistenta mai ridicata fata de difuzia moleculelor de glicerol prin membrana lipidica.

Pentru proba SLT-O s-a observat o capacitate de incapsulare a extractului total cat si a compusilor bioactivi (proteina totala si vitamina C) mai mare decat valorile obtinute pentru proba SLA-O. In ceea ce priveste capacitatea de incapsulare a continutului total de polifenoli s-a observat ca valoarea acesteia este mai mare pentru proba SLA-O.

### **Activitatea II.3. Diseminarea pe scara larga prin comunicarea si publicarea nationala sau internationala a rezultatelor (ICECHIM)**

S-a reactualizat pagina web prin adaugarea unui fisier in format PDF continand stadiul si rezultatele obtinute in etapa a 2 a de derulare a proiectului, precum si a unor imagini semnificative. Au fost prezentate 2 comunicari stiintifice, una de catre EXPERGO si una de catre ICECHIM. De asemenea, ICECHIM a trimis spre publicare un articol stiintific intr-o revista cotata ISI.