

Stadiul si rezultatele obtinute in etapa 3

Raportul stiintific si tehnic in extenso este structurat in cinci capitole, in care se prezinta activitatile din Planul de realizare, corespunzatoare fiecarui partener.

Activitatea III.1 Optimizarea tehnologiei de extractie, fractionare si conservare a principiilor active din zer si din unele produse apicole (ROMVAC)

Interesul specialistilor din domeniul medical si farmaceutic este orientat din ce in ce mai mult spre metode noi de a extrage principiile bioactive din surse naturale, in special din produsele secundare si derivate nevalorificate rezultate in urma prelucrarii curente a laptelui, oualor si produselor apicole, cu scopul de a inlocui cat mai mult substantele de sinteza.

Zerul, un produs secundar lichid din industria branzeturilor, este cunoscut pentru continutul in multi constitienti valorosi. Acestea includ in special proteinele care poseda proprietati nutritionale si biologice importante - in special in ceea ce priveste promovarea sanatatii si prevenirea bolilor. Fractiunile principale sunt β -lactoglobulina, α -lactalbumina, albumina serica bovina (BSA), imunoglobuline (IgM, IgA, IgG) si proteinele minore sunt lactoferina, glicomacropptide, lactoperoxidaza.

Proteinele din zer sunt proteine pure, naturale si de inalta calitate. Sunt unele dintre cele mai bune proteine pentru uz alimentar uman, datorita profilului echilibrat de aminoacizi si digestibilitatea superioara. Proteinele din zer contin toti aminoacizii esentiali si, prin urmare, sunt „sursa completa” de proteine de inalta calitate

Propolisul este o materie rasinoasa, de culoare bruna, colectata de catre albine din mugurii de frunze ale unor specii de arbori precum mesteacan, plop, pin, arin, salcie si palmier si transportata in stupi unde este transformata cu ajutorul enzimelor din glandele albinelor. Propolisul poseda proprietati antibacteriene, antifungice, antivirale, antioxidante, antiinflamatorii, antitumorale si imunomodulatoare; datorita acestor efecte a fost folosit ca un remediu in medicina traditionala, in apiterapie, in cosmetica si farmacie inca din Antichitate.

Polenul se prezinta sub forma de grauncioare mici, in diferite nuante de galben si sunt colectate de catre albine din flori. Polenul poseda proprietati antioxidante puternice, antiinflamatoare, antihemoragice, cicatrizante, ajuta la detoxifierea ficatului si organismului, previne ateroscleroza si amelioreaza starile alergice.

Ceara naturala este un produs glandular al albinelor. Din punct de vedere chimic, ceara contine o multitudine de substante diferite: esterii, acizii grasi liberi, hidrocarburi, substante colorate, lactona, glucide cu molecula mare, saruri minerale, vitamine liposolubile, substante cu actiune bacteriostatica, si altele. Ceara de albine are proprietati antiinflamatorii,

emoliente si cicatrizante. In zilele noastre ceara este folosita in industria cosmetica si in industria farmaceutica, la realizarea de creme si unguente

In continuarea activitatii din anii trecuti, in cursul anului curent s-a dezvoltat preocuparea pentru fixarea si optimizarea metodelor de extragere fractionare si conservare a unora dintre principiile active din zer si unele produse apicole. In ceea ce priveste tehnologia prelucrarii zerului care anterior cuprindea o faza laborioasa de centrifugare pentru eliminarea corpurilor in suspensie (proteine precipitate-cazeina si globule lipidice) s-a experimentat un element de optimizare prin utilizarea unor filtre ceramice speciale, care a permis obtinerea unui produs cu calitati superioare in timpi tehnologici mai mici si implicit, costuri reduse. In continuare, zerul a fost fractionat prin filtrare tangentiala in doua faze.

Proteinele cu greutate moleculare cuprinse intre 5-100.000 Da au fost directionate catre obtinerea de produse specifice, suplimente nutritive si produse de uz topic. Cealalta fractie compusa din lactoza si saruri minerale – permeatul a fost directionata pentru obtinerea de medii de cultura in vederea realizarii de suplimente nutritive pe baza de microorganisme probiotice: *Kluyveromyces marxianus*, *Enterococcus faecium* si *Lactobacillus plantarum*.

In ceea ce priveste extractia si prelucrarea unor produse ale stupului, rezultatele cele mai bune s-au obtinut privind optimizarea izolarii unor principii active din corpul albinei. S-a gandit si aplicat o metoda mai buna privind recoltarea albinelor moarte prin aplicarea unui colector sub urdinis, ceea ce a dus la obtinerea albinelor moarte eliminate din stup fara ca acestea sa ia contact cu substratul din mediul exterior. In ceea ce priveste procedura propriu-zisa de extragere, optimizarea s-a referit la modificarea proportiei de amestec dintre corpii de albine si solutia de extractie precum si purificarea suspensiei obtinute dupa destructurarea corpurilor, prin filtrare, dupa centrifugare.

Referitor la obtinerea principiilor active din propolis si capaceala, s-a utilizat extractia optimizata hidroalcoolica, preparandu-se urmatoarele tincturi: tinctura de propolis (pentru 3 kg propolis s-au utilizat 13 litri alcool etilic de uz farmaceutic de 96⁰ si 2 litri apa deionizata) si tinctura de capaceala (pentru 1 kg capaceala s-au utilizat 5 litri alcool etilic de uz farmaceutic de 96⁰ si 5 litri apa deionizata).

Activitatea III.2 Optimizarea tehnologiei de extractie a Ca organic si de obtinere si a membranelor cochiliere hidrolizate (ICECHIM)

Optimizarea parametrilor tehnologici pentru obtinerea calciului organic

Cojile de oua, avand un continut foarte mare de carbonat de calciu (94%-97%), pot fi folosite ca materie prima alternativa pentru obtinerea citratului de calciu ale carui caracteristici sunt: concentratia de calciu elemental este de cca. 21%; solubil in mediu neutru

si alcalin; rata de absorbtie in tractul intestinal este cu 22%-27% mai buna decat a carbonatului de calciu; constanta de disociere a calciului din citrat este mare fiind absorbit sub forma ionizata; stabilitate ionica buna; nu afecteaza absorbtia altor minerale (ex Fe); nu produce calculi renali nici dupa o administrare indelungata.

In urma rezultatelor experimentarilor preliminare a fost selectata metoda de obtinere care are la baza reactia chimica dintre acidul citric ($C_6H_8O_7$) si carbonatul de calciu ($CaCO_3$), luandu-se in considerare randamentul citratului de calciu.

Cojile de oua cu membrane se amesteca cu o solutie de acid citric de diferite concentratii (10%, 20%, 30%), in diferite rapoarte (1:14, 1:16, 1:18), la temperaturi de 30⁰C, 35⁰C si 40⁰C, timp de 2,5,3, si respectiv 3,5 ore si cu agitare usoara (130 rpm). Solutia filtrata continand citratul de calciu se usuca la temperatura de 55⁰C - 60⁰C si apoi se macina. Citratul de calciu obtinut se purifica prin dizolvare in acid citric in concentratie de 0,0070 mol/L (volumul solutiei este de 500 mL) si se agita cateva minute la temperatura de 100⁰C.

Optimizarea prepararii citratului de calciu s-a realizat prin aplicarea testului ortogonal. Factorii variabili relevanti sunt concentratia de acid citric, raport solid:lichid, temperatura si timpul, iar nivelele selectate reprezinta numarul maxim de valori pentru fiecare factor determinate in studii preliminare, pe baza experimentelor cu un singur factor.

Aplicand metoda OAT se testeaza un numar de 9 combinatii perechi posibile ale valorilor parametrilor. Analiza statistica si analiza variantelor (ANOVA) s-a facut cu Minitab 19 software. Nivelul de semnificatie statistica luat in calcul este $p < 0,05$.

Reultatele obtinute au evidentiat conditiile optime ale procesului de obtinere pentru un randament maxim si anume: concentratia de acid citric 30%, raport solid:lichid 1:16, temperatura 30⁰C, timp 3 ore. Randamentul de obtinere a citratului de Ca preparat in conditiile optimizate este de 88,64%. Testul ANOVA a aratat ca ipoteza nula (egalitatea mediilor) trebuie respinsa (pentru $p < 0,05$).

Optimizarea parametrilor tehnologici pentru obtinerea membranelor cochiliere hidrolizate

Hidrolizatele proteice s-au obtinut prin tratarea suspensiilor de coji de oua cu membrane nedetasate cu solutie de NaOH 5%, la trei valori de pH si ultrasonare la frecventa 24 kHz, la diferite valori de amplitudine pentru diferite perioade de timp. Precipitarea proteinelor se face la punctul izoelectric. Pentru inlaturarea NaCl format in solutia de proteine solubile, supernatantul se repartizeaza in saci de dializa si se dializeaza fata de apa ultra pura timp de 24 ore, pana la o conductivitate a probei cuprinsa intre 1-2,5 mS/cm (sau a apei distilate sub 1 μ S). Precipitatul dializat obtinut prin centrifugare se preia cu apa pura si se liofilizeaza. Procentul de proteina solubilizata prin tratamentul alcalin se calculeaza prin

determinarea cantitatii de azot din probe prin metoda Kjeldahl folosind factorul de conversie 6,25.

Pentru optimizarea parametrilor tehnologici ai hidrolizei alcaline si efectul asupra cantitatii de proteina din hidrolizata din membranele cochiliere s-a folosit modelul ortogonal cu trei variante independente $L_9(3)^3$, si anume pH-ul solutiei, amplitudinea si timpul ultrasonarii (s-a urmarit efectul ultrasonarii asupra cantitatii de proteina recuperata), fiecare cu trei nivele. Varianta dependenta este randamentul de proteina extrasa. Datele obtinute au fost analizate cu Minitab 19 software si testate la un nivel de semnificatie $p < 0,05$. Pentru evaluarea factorilor cu cea mai mare influenta asupra extractiei se aplica analiza variantelor (ANOVA factoriala).

Analiza datelor experimentale indica faptul ca cel mai mare impact in extractia proteinelor il are pH-ul mediului, iar timpul de tratare ultrasonica a probelor are cea mai mica influenta. Randamentul maxim de proteine s-a obtinut cand pH-ul probei, amplitudinea si timpul ultrasonarii au fost de 12, 80% si respectiv 20 minute.

Activitatea III.3. Optimizarea si realizarea experimentala de variante de retete in care se vor incorpora pre/probiotice, vitamine, palatabile (arome naturale), uzuale. Realizarea unei linii demonstrative de microproductie pentru obtinerea de suplimente alimentare si a unui produs de uz extern. (ROMVAC).

Pe baza cunostintelor privind proprietatile derivatelor din zer, coaja oului si unele dintre produsele stupului si beneficiile pe care le au pentru sanatatea umana, le-am utilizat ca principii active in diverse preparate farmaceutice, de uz oral sau topic, cuactiune benefica asupra organismului persoanelor cu nevoi speciale.

S-au formulat diferite preparate pe baza de concentrat proteic de zer (CPZ), imunoglobulina Y (IgY) si extracte apoase de propolis (Pr) si polen (Po), sub forma de suplimente alimentare, de uz oral, precum solutii proteice buvabile, sirop proteic, pulberi si capsule si preparate pentru uz extern, cu aplicare la nivel cutanat, cum ar fi cremenuitritive, mastifaciale si geluriexfoliante. In formularea acestor produse s-au asociat si produse secundare provenite din prelucrarea oulor (coaja si membrana cochiliera a oului) si produse secundare apicole, precum mierea si ceara de albine, fiecare avand si efecte terapeutice proprii.

Concentratul proteic de zer este folosit ca amestec 1:1 (v/v) din cele doua probe de retentat (P1-5kDa si P2-10kDa), iar din extractele apoase de propolis si polen se face de asemenea un amestec 1:1 (v/v) pentru a fi utilizat in toate formularile.

Formulele propuse optimizate fata de cele de anul trecut, se pot utiliza pentru intarirea sistemului imunitar, marirea rezistentei la efort fizic si stres, tratarea eczemelor, ingrijirea si curatarea pielii sensibile si sunt destinate persoanelor cu nevoi speciale de nutritie, dieta si ingrijire, care necesita un aport proteic suplimentar, ca de exemplu: solutie proteica buvabila, sirop proteic, pulberi proteice liofilizate, pulberi cu probiotice, liofilizate pe support de zeolit, geluri precum si alte trei produse PROPOLFRESH, DERMA MPE si ORALTRAT - cu actiuni demonstrate experimental asupra igienei mainilor, cavitatii bucale si a cailor respiratorii superioare, rezultate foarte bune obtinandu-se in ceea ce priveste activitatea antivirala a acestora, in special fata de coronavirusul aviar, virus inrudit cu coronavirusurile umane.

Abordarea formularii acestor produse a fost generata de echipa de cercetatori in incercarea lor de a aduce o mica contributie in lupta cu pandemia Covid 19.

Activitatea III.4. Testarea prin mijloace preclinice si clinice a noilor produse, pe animale de laborator (ROMVAC).

Principiile active si unele produse realizate in cadrul programului de anul acesta, au fost testate prin mijloace preclinice pentru a determina si fixa compozitia acestora. S-au efectuat teste de cromatografie de inalta precizie - HPLC, imunodifuziune verticala in gel de poliacrilamida, teste imunoenzimatic, precum si teste privind sterilitatea, contaminarea bacto-fungica precum si concentratia in microorganisme. Avand in vedere evolutia pandemiei cu Coronavirus, o atentie deosebita s-a acordat demonstrarii ipotezelor privind activitatea fata de unele virusuri animale inrudite cu virusuri similare, izolate de la om. Este vorba de Coronavirusul aviar, inrudit cu coronavirusurile umane si doua paramixovirusuri - Canine Distemper virus si New Castle Diseases virus inrudite cu virusurile gripale umane. Rezultatele obtinute cu produsele PROPOLFRESH, DERMA MPE sau ORALTRAT puse in contact cu virusurile mai sus amintite, au demonstrat eficienta acestora in proportie de peste 95% - DERMA MPE, 99,95% - produsul ORALTRAT si 99,95- PROPOLFRESH.

S-au efectuat teste clinice pe animale de laborator - pui SPF (Specific Pathogen Free) privind influenta unor produse (ROMBIOTIC 3 si POLIBIOTIC) asupra starii de sanatate, cresterii in greutate, precum si influenta asupra raspunsului imun, dupa vaccinarea puilor hraniti cu aceste produse, fata de vaccinuri contra New Castle Diseases si coronavirusul aviar - virusul bronsitei infectioase aviare. Pe scurt, produsul probiotic a determinat o crestere semnificativa a raspunsului imun fata de cele doua vaccinuri, comparativ cu celelalte.

Activitatea III.5 Optimizarea retetelor de suplimente alimentare si de produse de uz extern in functie de analiza senzoriala a acestora (ICECHIM)

Partenerul ROMVAC a furnizat probe de suplimente alimentare si produse de uz extern, care au fost analizate din punct de vedere senzorial. Produsele au fost evaluate de un panel format din 10 evaluatori instruiti toti o data asupra derularii testului, categoriilor de produse analizate, modalitatii de degustare, modalitatii de aplicare si de completare a chestionarelor. Fiecare evaluator a evaluat acelasi numar de produse fara replicari. Dupa fiecare proba de supliment alimentar/produs de uz extern testata evaluatorul a trebuit sa isi clateasca gura cu apa/sa se spele pe maini si pe urma sa treaca la urmatoarea proba.

Metoda de analiza utilizata pentru evaluarea proprietatilor organoleptice ale suplimentelor alimentare si ale produselor de uz extern a fost **metoda cu scari de punctaj**, cu numar mic de puncte (0 – 5), care sa aprecieze criteriile de calitate in functie de importanta lor in aprecierea senzoriala a calitatii produselor respective. Atributele senzoriale pentru suplimentele alimentare sunt evaluate in urmatoarea ordine: aspect, miros, gust, aroma, textura (consistenta). Analiza si aprecierea calitatii produselor de uz extern se refera la aspect si consistenta, culoare, miros, actiunea asupra pielii, prezenta defectelor. Pentru fiecare caracteristica organoleptica analizata senzorial s-a intocmit cate un tabel cu scari de punctaj.

Punctajele individuale acordate de evaluatori la fiecare caracteristica se inregistreaza intr-o fisa centralizatoare si se calculeaza un punctaj mediu (P_m).

Gradul de acceptare de catre consumatori se determina prin **metoda cu scara de referinta (hedonica)**. Metoda cu scara de referinta (hedonica) evalueaza acceptabilitatea produsului de catre degustatori, permitand stabilirea atat a celei mai bune probe, cat si a gradului de preferinta pentru o anumita caracteristica. Sensatiile pozitive se incadreaza in treptele 6 – 9, cele negative in treptele 1 – 4, iar pentru calificativul „indiferent” este prevazuta treapta a 5-a. Pentru fiecare caracteristica se calculeaza valoarea punctajului mediu ponderat (P_{mp}) cu ajutorul caruia se trece de la scara de 5 puncte la scara de 20 de puncte, pentru stabilirea calitatii organoleptice a fiecarui produs. Calculul punctajului mediu total (P_{mt}) se obtine prin mediasumei valorilor punctajelor medii ponderate de la toate caracteristicile organoleptice si se exprima cu o zecimala. Pe baza acestor valori se stabileste calitatea organoleptica cu o scara de la 0-20 puncte.

In urma analizei senzoriale prin metoda cu scari de punctaj, calificativele acordate pentru calitatea organoleptica a **suplimentelor alimentare** a fost “**BUN**” pentru toate probele. In ceea ce priveste produsele de uz extern, calificativele au fost “**Foarte bun**” pentru cremele nutritive si crema de protectie a mainilor Derma PE si „**Bun**” pentru mastile faciale, gelul exfoliant si crema de protectie a mainilor Derma MPE.

In ceea ce priveste metoda cu scara de referinta (hedonica), in vederea acordarii unui

punctaj pentru fiecare proba analizata s-a avut in vedere urmatorul barem de notare: 1 – imi displace extrem; 2 – imi displace foarte mult; 3 – imi displace moderat; 4 – imi displace usor; 5 – indiferent; 6 – imi place usor; 7 – imi place moderat; 8 – imi place foarte mult; 9 – imi place extrem. Probele de suplimente alimentare au primit aprecieri incadrate in „indiferent” si „imi displace usor”. Probele de produse de uz extern au primit aprecieri de „imi place usor”, „indiferent”, si „imi displace usor”.

In urma analizei senzoriale a probelor primite si pentru optimizarea retetelor se recomanda reformularea produselor, astfel incat acestea sa corespunda asteptarilor consumatorilor. Recomandarile privind optimizarea suplimentelor alimentare sunt: ajustarea aromei si a post gustului puternic amar si iritativ al siropurilor de tuse imprimate de tinctura de cuisoare; adaugarea unui strat lucios la suprafata tabletelor pentru imbunatatirea aspectului exterior; diminuarea texturii cretoase a tabletelor prin ajustarea excipientilor; adaugarea de arome pentru mascarea gustului si mirosului de zer. Recomandarile privind optimizarea produselor de uz extern sunt: adaugarea unor substante parfumate pentru modificarea mirosului nesatisfacator al tuturor probelor; modificarea consistentei prea mucilaginoasa, prea lichida a gelului exfoliant si marirea dimensiunii particulelor de gomaj; diminuarea vascozitatii cremelor de protectie a mainilor pentru cresterea gradului de penetrabilitate in piele; ajustarea consistentei prea compacte a cremelor nutritive pentru usurarea aplicarii; obtinerea unei consistente mai cremoasa a mastilor de fata.