



UNIVERSITATEA „POLITEHNICA” DIN BUCUREȘTI

Facultatea de Chimie Aplicata si Știința Materialelor

Departamentul de Chimie Organica „Costin Nenitescu”

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Bioproduse hibride pe bază de colagen din pește si extracte naturale

Autor: chim. Elena DĂNILĂ

Conducator științific: Prof.dr.Ing. Raluca Liane STAN

COMISIA DE DOCTORAT

Președinte	Prof. Dr. Ing. Oana Cristina PÂRVULESCU	de la	Universitatea POLITEHNICA București
Conducător de doctorat	Prof.dr.Ing. Raluca Liane STAN	de la	Universitatea POLITEHNICA București
Referent	CS1 Dr.chim- Mădălina ALBU-KAYA	de la	Institutul National de Cercetare-Dezvoltare pentru Textile si Pielarie Bucuresti, Departament Colagen
Referent	Prof. Dr.chim. Irinel Adriana BADEA	de la	Universitatea București
Referent	Prof. Dr.chim. Ioana LĂCĂTUȘU	de la	Universitatea POLITEHNICA București

Cuvinte cheie: colagen hidrolizat din pește, biocompatibilitate, uleiuri esențiale, activitate antimicrobiana, bioproduse hibride

București, 2022

CUPRINS

LISTA ABREVIERILOR	4
INTRODUCERE	6
CERCETARE BIBLIOGRAFICĂ	7
1. DATE GENERALE DESPRE COLAGEN	7
1.1. Compoziția biochimică, biosinteza colagenului, structura colagenului	7
1.2. Tipuri de colagen	11
1.3. Surse de extracție a colagenului, metode de extracție a colagenului	14
1.4. Funcțiile colagenului	17
2. COLAGENUL DIN PEȘTE	18
2.1. Surse de extracție a colagenului din pește	18
2.2. Extracția colagenului din pește sub forma de hidrolizat	19
2.3. Metode de caracterizare a colagenului din pește	20
2.4. Aplicații ale colagenului din pește în cosmetice	26
3. EXTRACTE NATURALE DIN PLANTE-ULEIURI ESENȚIALE	27
3.1. Metode de obținere a uleiurilor esențiale	28
3.2. Metode de caracterizare a uleiurilor esențiale	29
3.3. Aplicații ale uleiurilor esențiale în cosmetice	29
CONTRIBUȚII ORIGINALE	32
Scopul și obiectivele tezei de doctorat	32
4. MATERIALE ȘI METODE	33
4.1. EXTRAȚIA ȘI CARACTERIZAREA COLAGENULUI DIN PIELE DE PEȘTE	36
4.2. OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA ULEIURILOR ESENȚIALE	43
4.3. BIOPRODUSE PE BAZA DE COLAGEN DIN PEȘTE SI EXTRACTE NATURALE	46
REZULTATE ȘI DISCUȚII	55
5. OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA COLAGENULUI DIN PIELE DE PESTE ..55	
5.1. TEHNOLOGIA DE EXTRAȚIE A COLAGENULUI DIN PIELE DE PEȘTE	55
5.2. CARACTERIZAREA COLAGENULUI DIN PIELE DE PESTE	55

5.2.1. Caracterizarea fizico-chimica	58
5.2.2. Anliza de spectroscopie în infraroșu (FTIR)	60
5.2.3. Dicroism circular (CD)	62
5.2.4. Analiza prin difracție de raze X (XRD)	63
5.2.5. Determinarea punctului isoelectric (pI)	64
5.2.6 Analize de microscopie: Microscopie optică și SEM	65
5.2.7. Evaluarea biocompatibilității hidrolizatului de collagen din pește asupra keratinocitelor umane	67
6. OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA ULEIURILOR ESENTIALE	70
6.1 OBȚINEREA ULEIURILOR ESENTIALE	70
6.2. CARACTERIZAREA ULEIURILOR ESENTIALE	71
6.2.1. Densitate la 20°	71
6.2.2. Indicele de refracție	72
6.2.3. Caracterizarea prin GC-MS	73
6.2.4. Caracterizarea microbiologică	79
7. BIOPRODUSE PE BAZA DE COLAGEN DIN PEȘTE SI EXTRACTE NATURALE	83
7.1. Ser cu collagen si aha pentru tratarea petelor pigmentare – MELACOLL	84
7.2. Formularea și caracterizarea unor oleogeluri cu aplicații cosmetice pe bază de uleiuri vegetale cu SPF și ulei esențial de lavandă	85
7.3. Obținerea si caracterizarea unor emulsii pe baza de collagen hidrolizat si extracte naturale cu actiune potential anticelulitic	91
7.4. Obținerea si caracterizarea unor emulsii pe baza de collagen hidrolizat si extracte naturale cu actiune potential antiacneică	98
7.5 Obținerea si caracterizarea unor emulsii pe baza de collagen hidrolizat si extracte naturale folosite ca cc-cream sau fond de ten	106
CONCLUZII SI PERSPECTIVE	114
Lista de lucrări științifice	119
BIBLIOGRAFIE	122

II. CONTRIBUȚII ORIGINALE

Scopul și obiectivele tezei de doctorat

Obiectivul principal al tezei a fost obținerea colagenului din pește și a extractelor naturale (uleiuri esențiale), precum și caracterizarea acestora, în vederea obținerii unor bioproduse hibride. Pentru realizarea acestui obiectiv principal au fost îndeplinite următoarele obiective specifice:

- 1) Extracția și caracterizarea colagenului din piele de pește (crap).
- 2) Obținerea și caracterizarea extractelor din plante (uleiuri esențiale de lavandă, lămâie și piper roz).
- 3) Obținerea și caracterizarea unor bioproduse ce au la bază collagen din pește și extracte naturale: ser cu collagen și acid AHA pentru tratarea petelor pigmentare, ogeluri cu aplicații cosmetice pe bază de uleiuri vegetale cu SPF și ulei esențial de lavandă, emulsii pe baza de collagen hidrolizat și extracte naturale cu acțiune potențial anticelulitic, emulsii pe baza de collagen hidrolizat și extracte naturale cu acțiune potențial antiacneică, emulsii pe baza de collagen hidrolizat și extracte naturale folosite ca cc-cream sau fond de ten.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

5. OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA COLAGENULUI DIN PIELE DE PEȘTE

5.1. TEHNOLOGIA DE EXTRACȚIE A COLAGENULUI DIN PIELE DE PEȘTE

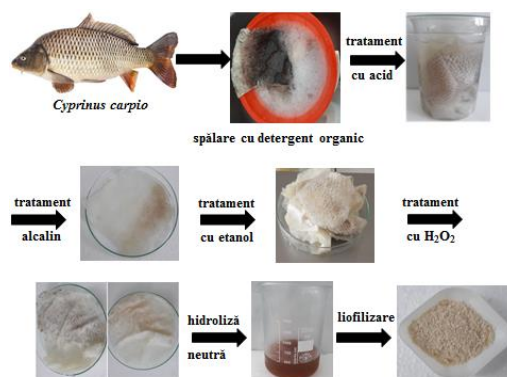


Figura 13. Etapele obținerii hidrolizatului de collagen din pește

Tabel 5. Tratamentul acid și alcalin al probelor de piele de crap, randamentul de extracție al hidrolizatorilor de collagen

Proba din piele de pește	Tratament acid Raport piele: soluție acida (m/V)	Tratament alcalin Raport piele: soluție alcalină (m/V)	Probă de hidrolizat de colagen	Randament de extracție
HO4P1s	3% amestec acid citric și lactic 1:1 1:3	NaOH 1 M 1:10	HO4P1	35.5
HO4P2s	3% soluție acid lactic 1:3	NaCl 1 M 1:5	HO4P2	28.1
HO4P3s	3% soluție acid lactic 1:3	NaHCO ₃ 1 M 1:10	HO4P3	24.6
HO4P4s	3% soluție acid citric 1:3	NaOH 1 M 1:10	HO4P4	29.3
HO4P5s	3% soluție acid lactic 1:3	NaOH 1 M 1:10	gelatină	-

Randamentele de extracție, prezentate în Tabelul 5, a hidrolizatorilor de collagen obținute în funcție de condițiile de procesare au fost: 35,5% pentru **HO4P1** (3% acid lactic și citric, NaOH 1M), 28,1% pentru **HO4P2** (3% acid lactic, NaCl 1M), 24,6% pentru **HO4P3** (3% acid lactic, NaHCO₃ 1M) și 29,3% pentru **HO4P4** (3% acid citric, NaOH 1M). Amestecul de acizi organici și tratamentul pre-hidroliză cu NaOH 1M (proba HO4P1) s-a dovedit a fi cel mai eficient procedeu. Randamentele obținute prin extracție sunt în concordanță cu collagenul solubil în acid obținut din pielea crapului, *Cyprinus carpio*- 41,3% și *Ctenopharyngodon idellus* -25,5% [1]. Datele din literatura de specialitate raportează randamente diferite de extracție pentru collagenul din piele de pește solubil în acid (roșu Snapper -5,71%, pește milk -4,00%, nautilus -55,2%, biban japonez -51,4%, macrou negru -49,8%, rechin -50,1%) explicată ca o diferență de solubilitate în soluțiile acide datorită gradului de reticulare a moleculelor de collagen.

5.2. CARACTERIZAREA COLAGENULUI DIN PIELE DE PEȘTE

5.2.1. Caracterizarea fizico-chimică

Rezultatele analizelor sunt prezentate în Tabelul 6:

Tabel 6. Caracteristicile fizico-chimice ale hidrolizatelor de colagen din piele de pește obținute prin diferite metode

Nr. crt.	Caracteristici	Valori determinate				Standardul de metodă
		HO ₄ P ₁	HO ₄ P ₂	HO ₄ P ₃	HO ₄ P ₄	
1	Substanță uscat , %	92,89 ± 0.39	91,18 ± 0.38	92,13± 0.38	91,06± 0.38	S EN ISO 4684:2006
2	Cenușă, %	nedetectabil	nedetectabil	nedetectabil	nedetectabil	SR EN ISO 4047:2002
3	Azot total, %	17,41± 0.11	17,38± 0.11	17,44± 0.11	17,55± 0.12	SR ISO 5397:1996
4	Substanță proteică, %	97,84± 2.61	97,68± 2.59	97,99± 2.61	98,62± 2.62	SR ISO 5397:1996
5	pH-ul soluției 10%, unit. de pH	6,94± 0.1	6,24± 0.1	6,15± 0.1	6,18± 0.1	STAS 8619/3:1990
6	Azot aminic, %	0,71	0,55	0,96	0,77	
7	DH, %	4.08	3.16	5.5	4.38	

Examinând datele din Tabelul 6 putem concluziona că toate probele de hidrolizat de colagen de pește obținute prezintă un grad ridicat de puritate datorită conținutului mare de substanță proteică (aproximativ 98%) și a valori nedetectate pentru conținutul de cenușă , fiind un important avantaj al metodei de extracție folosite. Prin comparație, datele din literatura de specialitate raportate pentru hidrolizatul de colagen din piele de *Cyprinus carpio* solubil în acid prezintă un procent de substanță proteică de 27-27,9% și un conținut de cenușă de 0,22-1,21% [2]. Procedura propusă pentru obținerea hidrolizatelor de colagen a condus la probe cu valori ale pH-ului în intervalul 6-7, ceea ce indică faptul că de hidrolizate obținute sunt adecvate pentru a fi utilizate în suplimente alimentare sau produse cosmetice. Informații suplimentare au rezultat prin examinarea valorilor azotului total, Nt și azotului aminic (NH₂) pentru a obține o estimare a gradului de hidroliză, DH [3]. Pe măsură ce gradul de hidroliză crește, masa moleculară a hidrolizatului scade, o estimare a acesteia din urmă pe baza conținutului de azot aminic

fiind posibilă conform rezultatelor raportate anterior [4]. Astfel, **HO4P2** este hidrolizatul cu cea mai mare greutate moleculară (valoarea DH 3,16%, masa moleculară medie estimată > 25.000 Da), în timp ce masa moleculară estimată pentru celelalte probe variază între 13.000–20.000 Da. Acest lucru poate fi explicat prin diferențele în tratamentul aplicat, valoarea pKa a acidului implicat în etapa de pretratare și natura de agentului de îndepărtare a proteinelor necolagenice: proba **HO4P2** a fost obținută după tratamentul cu acid lactic (pKa = 3,85, s-a dovedit a favoriza hidroliza până la gelatină) și un tratament ușor salin, cu NaCl 1 M pentru îndepărtarea proteinelor necolagene. În urma pretratamentelor acide și alcaline a probelor de piele (**HO4P1**, **HO4P3** și **HO4P4**, Tabelul 12) au rezultat hidrolizate de collagen cu un DH mai mare probabil datorită unei gonflari mai eficiente proces care permite clivarea unor legături non-covalente și legături intra-moleculare urmate de o hidroliză parțială [5].

5.2.2. Analiza de spectroscopie în infraroșu (FTIR)

Spectrele IR obținute prin tehnica FT-IR ATR (spectrometrie IR cu reflexie totală atenuată) a permis identificarea grupărilor funcționale din compoziția collagenului pentru probele de hidrolizat de collagen (Figura 15):

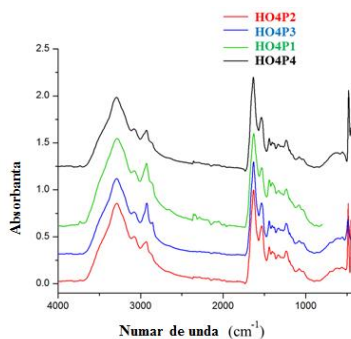


Figura 15. Spectrul FT-IR pentru hidrolizatele de collagen din pește

Probele de collagen prezintă benzile spectrale caracteristice grupărilor funcționale specifice collagenului: amidă A - amină secundară vibrații de întindere a grupării N-H, amidă B –vibrații de întindere asimetrică a grupării metilen, amidă I - vibrații de întindere a grupării carbonil, amida II și amida III vibrațiile de deformare ale grupării N – H cuplate cu vibrațiile de întindere ale grupărilor C-N și C-H, nu s-au observat diferențe semnificative între probele.

Deconvoluția benzii amidice I (Figura 16) au furnizat informații interesante despre modificările conformaționale ale proteinelor în hidrolizatele de piele de pește obținute.

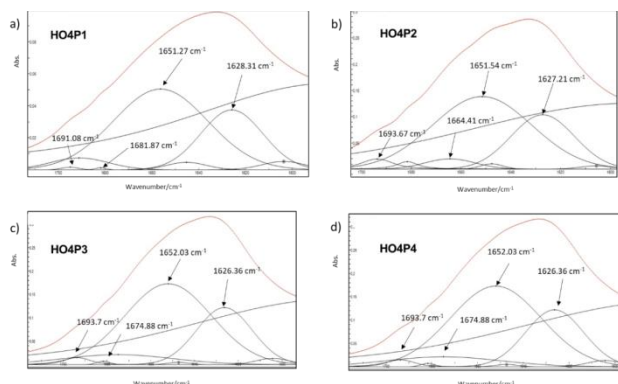


Figura 16. Deconvoluția benzii Amidă I pentru hidrolizate de collagen de pește cu componente fixe de bandă

Conform datelor din literatură [6, 7], picurile componente obținute după deconvoluția benzii amidice I pentru probele de hidrolizat de collagen examinate pot fi atribuite după cum urmează:

- Picul 1, 1625-1628 cm^{-1} - foi beta intramoleculare;
- Picul 2, 1651-1656 cm^{-1} - conformații aleatorii de tip bobina, resturi imide și conformații elicoidale α ;
- Picul 3, 1665-1681 cm^{-1} - β -spire ale telopeptidelor C și N în collagen;
- Picul 4, 1691-1694 cm^{-1} - gelatină și spirale ale peptidelor agregate.

O absorbție intensă la 1660 cm^{-1} este în general atribuită stării de triplu helix a collagenului, o scădere a intensității benzii însoțită de intensificarea benzilor în jurul valorii de 1630 cm^{-1} fiind în general asociată cu denaturarea termică a collagenului. Examinând picurile componente de deconvoluție a amidei I pentru probele de hidrolizate de collagen de pește, nu se observă o absorbție caracteristică a structurii de triplu helix, cea mai intensă componentă fiind cea datorată conformațiilor aleatorii ale bobinei, resturilor imide și conformațiilor elicoidale asemănătoare α (picul 2 la 1651 1656 cm^{-1}).

5.2.3. Dicroism circular (CD)

Spectrele CD ale probelor de collagen pește analizate sunt prezentate în Fig. 17:

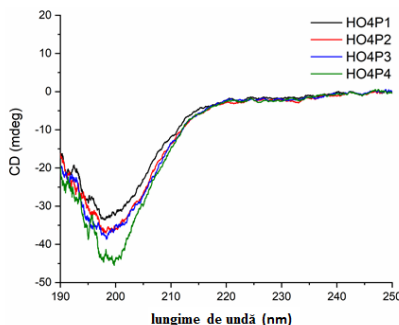


Figura 17. Spectru CD al hidrolizatorilor de collagen din pește analizate

Toate probele de hidrolizat de collagen pește analizate au arătat o bandă negativă pronunțată în jurul valorii de 196 până la 200 nm, tipică unei structuri aleatorii încolăcite (de „bobină”) și fără maxim pozitiv la lungimea de undă 220 nm, caracteristică pentru tripla helix. Astfel, o structură specifică caracteristică pentru collagenul denaturat (collagen hidrolizat) a fost atribuită tuturor extractelor de collagen de pește **HO4P1-HO4P4** [8].

5.2.4. Analiza prin difracție de raze X (XRD)

Spectrele cu raze X ale probelor de hidrolizat de collagen de pește liofilizate prezentate în Fig. 18 nu prezintă nici un vârf ascuțit asociat cu structura triplă elicoidală, datorită pierderii conformațiilor native ale collagenului în timpul procesului de hidroliză, confirmat și de spectrul FT-IR prin amida I și spectrele de dicroism circular.

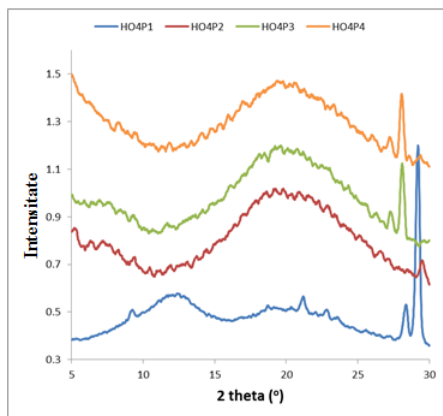


Figura 18. Spectru de difracție de raze X (XRD) pentru hidrolizatele de collagen din pește

Al doilea vârf este prezent la 21,19° (**HO4P1**), 19,18° (**HO4P2**), 19,28° (HO4P3), respectiv 19,84° (HO4P4). Ecuația lui Bragg $d (\text{Å}) = \lambda / 2\sin \theta$ (unde λ este lungimea de undă a razelor X (1,54 Å) și θ este unghiul de difracție Bragg), a fost utilizată pentru a

calcula valoarea minimă a distanțelor repetate. Distanța dintre schelete a fost de 4,18 Å (**HO4P1**), 4,62 Å (**HO4P2**), 4,59 Å (**HO4P3**) și respectiv 4,47 Å (**HO4P4**), în acord cu valorile raportate pentru colagenul extras din alte specii de pești [9].

5.2.5. Determinarea punctului isoelectric (pI)

S-au efectuat măsurători de potențial Zeta pentru fiecare probă de hidrolizat de colagen de pește la pH variabil (Fig. 19):

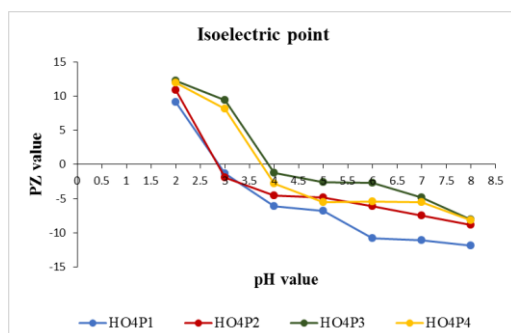


Figura 19. Punctul isoelectric (pI) pentru hidrolizatele de collagen din pește

Valorile calculate pentru pI variază între 2,9 și 3,9 după cum urmează: pI = 2,9 pentru proba **HO4P1**, pI = 2,9 pentru proba **HO4P2**; pI = 3,7 pentru proba **HO4P3** și respectiv pI = 3,9 pentru proba **HO4P4**. Valori similare ale pI pentru colagenul solubil în acid și pepsină au fost raportate în literatura de specialitate privind extracția colagenului din pielea și oasele peștilor

5.2.6 Determinarea morfologiei prin microscopie optică și Microscopie electronica de reflexie (SEM)

În figura 20 sunt prezentate imaginile de microscopie optica pentru hidrolizatele de collagen din pește:

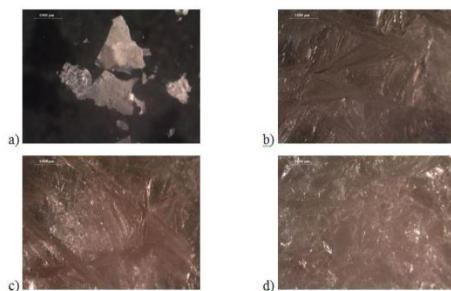


Figura 20. Microscopie optica pentru hidrolizatele de collagen din pește: (a: HO4P1, b: HO4P2, c: HO4P3, d: HO4P4)

Imaginile furnizate de microscopia optica arată o structură uniformă a hidrolizatorilor de collagen sub formă de fibre dispuse pe aceeași direcție.

Informații morfologice mai detaliate au fost obținute din microscopia SEM (Fig. 21), pentru toate probele de hidrolizat de collagen a fost identificată o structură caracteristică tridimensională, interconectată, formată preponderent din foi pliate și încrețite.

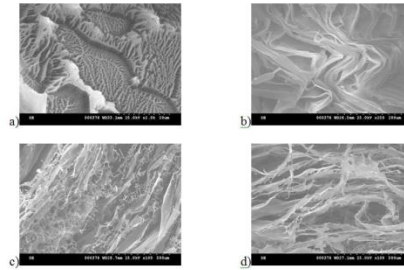


Figura 21. Imagini SEM pentru hidrolizatele de collagen din pește (a: HO4P1, b: HO4P2, c: HO4P3, d: HO4P4)

5.2.7. Evaluarea biocompatibilității hidrolizatului de collagen din pește asupra keratinocitelor umane

Experimentele de proliferare a liniei celulare HaCaT (keratinocite umane adulte) cultivate timp de 6 zile pe mediu suplimentat cu hidrolizate de collagen de pește 1% și investigate folosind microscopia cu contrast de fază (Fig. 22a) nu au evidențiat diferențe evidente în aspectul morfologic celular pentru hidrolizatele și controlul collagenului de pește.

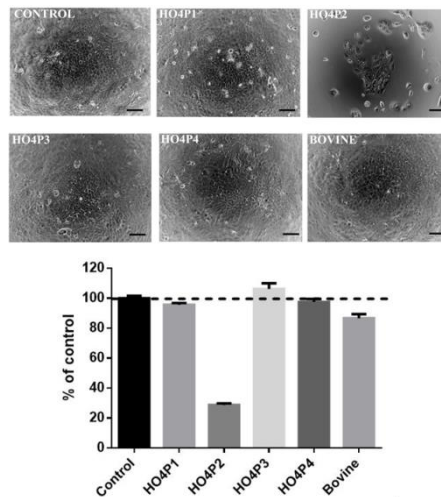


Figura 22. a) Imagini de microscopie optică pentru keratinocitele cultivate în prezența hidrolizatorilor de collagen de pește **HO4P1-HO4P4**. Scara goală reprezintă 100μm.

b) Viabilitatea keratinocitelor cultivate în prezența hidrolizatorilor de colagen din pielea de pește

N = 3 pe grup. * P < 0,05 în comparație cu grupul de control, NS- nesemnificativ

Procentul de celule viabile pentru hidrolizatele de colagen de pește a fost peste 80%, cu excepția probei **HO4P2**. Mai mult, toate cele 3 probe - **HO4P1**, **HO4P3** și **HO4P4**, au arătat o viabilitate mai mare în comparație cu hidrolizatul de control bovin, sugerând un efect superior pentru aplicațiile biomedicale. O explicație pentru biocompatibilitatea scăzută a hidrolizatului de probă de pește HO4P2 poate fi o masă moleculară mai mare a polipeptidelor sale componente în comparație cu alte probe (conform estimărilor din conținutul de azot aminic), susținută de alte rapoarte din literatură.

6. OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA ULEIURILOR ESENȚIALE

6.1. OBȚINEREA ULEIURILOR ESENȚIALE

Rezultatele experimentale în ceea ce privește randamentele de extracție pentru uleiurile esențiale obținute din sursele vegetale investigate obținute prin ambele metode sunt prezentate în tabelul 9 și 10 și corespund cu datele din literatură, ceea ce arată o puritate ridicată a uleiurilor esențiale obținute.

Tabel 9. Date experimentale obținute la extracția uleiurilor esențiale prin hidrolizările clasice

Material vegetal	Masa material vegetal, g	Volum apă distilată, L	Randament de extracție, %
Lămâie proaspătă	530	500 mL	0,67 [¹⁰]
Lavanda	403,18	2000 mL	0,124 [¹¹]
Piper roz	600 g	1000 mL	1,135 [¹²]

Tabel 10. Date experimentale obținute la extracția uleiurilor esențiale în câmp de microunde

Material vegetal	Masa material vegetal, g	Volum apă distilată, mL	Randament de extracție, %
Lămâie proaspătă	500	-	2,36 [¹³]
Lavanda	1344	1200	0,089 [¹⁴]

6.2. CARACTERIZAREA ULEIURILOR ESENȚIALE

6.2.1. Densitate la 20°C

Rezultatele obținute pentru densitatea uleiurilor esențiale sunt prezentate în tabelul 11:

Tabelul 11. Densitatea pentru uleiurile esențiale de lavanda, lamaie și piper roz

Ulei esențial	Codificare	Metoda de obținere	Volum ulei, mL	Masa ulei, g	Densitatea g/mL
Lamaie	ULem CL	hidrodistilare clasică	1,5	1,31	0,873
	ULem MW	microunde asistate	5,3	4,6	0,867
Lavanda	ULav CL	hidrodistilare clasică	0,5	0,44	0.88
	ULav MW	microunde asistate	1,2	1,104	0.92
Piper roz	UPr	hidrodistilare clasică	6,81	5.78	0.85

6.2.2. Indicele de refracție

Rezultatele pentru indicele de refracție sunt prezentate în tabelul 12 și sunt în concordanță cu standardele în vigoare, ceea ce demonstrează o puritate ridicată pentru toate uleiurile obținute.

Tabelul 12. Indicele de refracție pentru uleiurile esențiale

Ulei esențial	Codificare	Metoda de extracție a uleiului	Indice de refracție	Standard
Lamaie	ULem CL	hidrodistilare clasică	1,475	ISO no. 8899/2003 [Error! Bookmark not defined.]
	ULem MW	microunde asistate	1,474	
Lavanda	ULav CL	hidrodistilare clasică	1,468	ISO no. 3515/ 2002 [Error! Bookmark not defined.]
	ULav MW	microunde asistate	1,470	
Piper roz	UPr	hidrodistilare clasică	1,478	ISO no. 16385/2014

				[15]
--	--	--	--	------

6.2.3. Caracterizarea prin GC-MS

Analiza gaz cromatografică a uleiurilor esențiale **ULem CL**, **ULem MW**, **ULav CL**, **ULav MW**, **UPr** a relevat o compoziție asemănătoare cu cele prezentate în standardele în vigoare.

Compoziții majoritare ai uleiului de lămâie, sunt Limonen (70.95% CL, 71.57 % MW), β - Pinen (11.93 % CL, 13.46% MW), γ -Terpinen (10.82 % CL, 11% MW) și α -Pinen (1.98 % CL, 2.26 % MW), reușindu-se identificarea unui procent de peste 99% din compoziția chimică, în ambele cazuri. Conform literaturii de specialitate, tehnica de extracție cu microunde este mai puțin eficientă pentru compuși cu polaritate mai mare, așa cum sunt monoterpenele-alcooli (de ex., linalool) și mai eficientă în extracția de hidrocarburi [16]. În acest sens, se observă că terpinen-4-ol și linalool sunt extrași prin hidrodistilare clasică (fiind compuși cu polaritate ridicată) în timp ce α -Pinen, β -Pinen, Limonen, γ -Terpinen, cu polaritate mai mică, sunt extrași în procent mai mare prin metoda cu microunde.

Compoziții majoritare ai uleiului de lavandă, sunt aceiași pentru ambele uleiuri, diferind doar procentul: linalool (46.27% CL, 40.17 % MW), linalil acetat (10.77% CL, 12.31% MW), eucaliptol (8.12% CL, 7.09% MW), terpinen-4- ol (7.07% CL, 6.78% MW), neril-acetat (4.40% CL, 6.25% MW), endo-borneol (5.36% CL, 5.48% MW), α -terpineol (3.31% CL, 4.41% MW), reușindu-se identificarea unui procent de peste 99% din compoziția chimică, în ambele cazuri. Se observă că unele componente sunt extrase în procent mai mare prin hidrodistilare, iar altele prin tehnica cu microunde. Se observă că linalool este extras în procent mai mare prin hidrodistilare clasică (fiind un compus cu polaritate ridicată) în timp ce acetati (Linalil acetat și Neril acetat), cu polaritate mai mică, sunt extrași în procent mai mare prin metoda cu microunde.

Principalele componente ale uleiului esențial de piper sunt: α -felandren (35.84 %), limonene (17.31 %), β -felandren (13.04 %), o-cimen (4.65 %), δ -cadinen (3.27%), trans-cariofilen (3.04 %), biciclogermacren (2.13 %), α -pinen (1.98 %). În literatura [12] principalele component sunt prezentate ca fiind: α -felandren (20.6%), β -felandren (10.8%), α -pinen (8.7%), β -pinen (5.1%), β -mircen (6.9%), β -elemen (5.0%), copaien (6.5%), germacren (5.8%), γ -cadinen (6.3%) și α -humulen (5.4%). Aceste diferențe pot fi

generate de o serie de factori, cum ar fi: condițiile pedo-climatice, perioada de recoltare, subspecii diferite, metoda de extracție aplicată

6.2.4. Caracterizarea microbiologică

În figurile 31 și 32 sunt prezentate rezultatele analizelor antimicrobiene: determinarea concentrației minime inhibitorii (CMI) și efectul antibiofilm pentru cele două uleiuri esențiale de lavandă (ULav CL și ULav MW) și lămâie (ULem CL și ULem MW) precum și pentru amestecul de uleiuri (ULav CL: ULem CL, ULav MW: ULem MW).

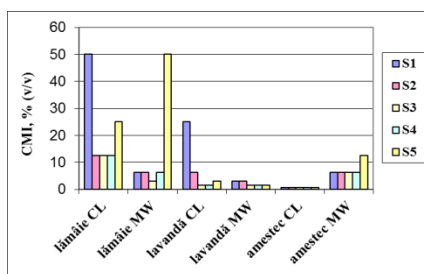


Figura 31. Concentrația minimă inhibitorie (CMI), față de 5 tulpini microbiene de *Staphylococcus epidermidis*, a uleiurilor de lavandă (ULav CL și ULav MW) , lămâie (ULem CL și ULem MW) și amestecul lor (ULav CL: ULem CL, ULav MW: ULem MW)

*S1, S2, S3, S4, S5 – tulpini de *Staphylococcus epidermidis* izolate clinic

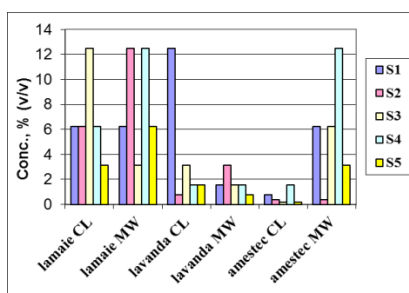


Figura 32. Efectul antibiofilm față de 5 tulpini microbiene de *Staphylococcus epidermidis*, al uleiului de lavandă (ULav CL și ULav MW) și lămâie (ULem CL și ULem MW) și amestecul lor (ULem CL și ULem MW)

*S1, S2, S3, S4, S5 – tulpini de *Staphylococcus epidermidis* izolate clinic

În ambele cazuri se observă ca uleiul de lavandă prezintă activitate antimicrobiană mai bună decât cel de lămâie față de tulpina bacteriană de *S. epidermidis*, dar amestecul de uleiuri prezintă activitate mai bună decât fiecare ulei esențial în parte atunci când pentru extracție se folosește procedeul de hidrodistilare, ceea ce demonstrează efectul sinergetic al celor două uleiuri esențiale

7. BIOPRODUSE PE BAZĂ DE COLAGEN DIN PEȘTE ȘI EXTRACTE NATURALE

7.1. Ser cu colagen și AHA pentru tratarea petelor pigmentare – MELACOLL

În figura 33 este prezentată varianta optimă selectată pentru serul cu colagen și AHA:



Figura 33. Varianta optimă selectată pentru serul cu colagen și AHA

Serul cu colagen și AHA se încadrează în normele impuse de legislația europeană privind produsele cosmetice, ingredientele din compoziție respectând concentrația impusă de aceste norme [17].

Concluziile studiului clinic și de evaluare a siguranței au fost următoarele: produsul poate fi comercializat liber pe piața românească, în condițiile respectării compoziției declarate, a instrucțiunilor de folosire și a domeniului de aplicabilitate, conform legii 178/2000 cu amendamentele ulterioare. Mai mult, recomandările sunt următoarele: produsul poate fi notificat și prin Portalul pentru Notificarea Produselor Cosmetice (CPNP).

7.2. Formularea și caracterizarea unor oleogeluri cu aplicații cosmetice pe bază de uleiuri vegetale cu SPF și ulei esențial de lavandă

Au fost obținute probe de oleogeluri stabile **OG 1-6** care au culoarea caracteristică conferită de caronozii prezenți în uleiurile de morcov, galbenele și catină cu o bună stabilitate așa cum se poate observa din figura 34

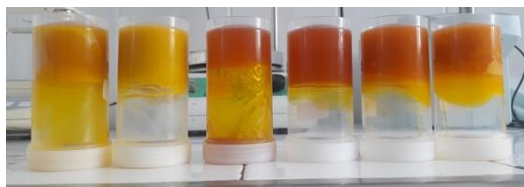


Figura 34. Oleogelurile pe bază de uleiuri vegetale cu SPF și ulei esențial de lavandă

Caracterizarea formulărilor **OG 1- 6** a urmărit influența organogelifiantului natural asupra stabilității , valoarea SPF, identificarea componentelor relevante prin spectroscopie IR morfologia și proprietățile reologice.

A fost evaluată capacitatea de legare a uleiului (OBC) a probelor de oleogel observându-se că cea mai bună capacitate de legare a uleiului o au probele preparate cu ceară de albine, urmate de probele preparate cu ceară de măsline, iar cele mai mici valori pentru OBC au fost obținute pentru probele preparate folosind gliceril stearate, ca și organogelifiant. Studiul structurii oleogelurilor a fost realizat prin spectroscopie în infraroșu și microscopie optică, putându-se observa o structură relativ uniformă și tridimensională, cu grupări funcționale de tip $-C-H$ și $-C=O$, grupări datorate uleiurilor vegetale din compoziție. Toate aceste teste fizice au demonstrat structura de gel a formulărilor. În cele din urmă, a fost efectuat un studiu reologic pentru a elucidă proprietățile lor specifice și stabilitatea lor în timpul depozitării. Testele reologice au confirmat comportamentul de subțiere la forfecare a compozițiilor de cremă analizate, ceea ce înseamnă că vâscozitatea nu este independentă de viteza de forfecare.

7.3. Obținerea și caracterizarea unor emulsii pe bază de collagen hidrolizat și extracte naturale cu acțiune potențial anticelulitică

Formulările anticelulitice de tip emulsie U/A, **Eac1-6**, obținute sunt stabile (Figura 40) și au fost caracterizate prin determinarea proprietăților organoleptice, pH, determinarea stabilității în timp, morfologie și analiză reologică.



Figura 40. Emulsiile de tip ulei în apă (U/A) cu rol anticelulitic **Eac1-6**

Cele 6 emulsii obținute sunt stabile la diferite temperaturi și valoarea obținută pentru pH-ul emulsiilor corespunde pH-ului natural al pielii, indicând faptul că emulsiile pot fi aplicate în siguranță pe piele. Rezultatele analizei prin microscopie optică arată că emulsiile S1-S3 (obținute cu emulgatorul stearat de gliceril) au un aspect mai cremos și

emulsiile S4-S6 (obținut cu emulgatorul cetearil olivat și sorbitan olivat) au un aspect ușor aerat „ca de spumă”. Testele reologice au confirmat comportamentul de subțiere la forfecare a compozițiilor de cremă studiate, ceea ce înseamnă că vâscozitatea nu este independentă de viteza de forfecare, dar cremele au devenit mai puțin vâscoase atunci când se aplică viteze de forfecare mai mari. Se poate concluziona că toate emulsiile preparate sunt stabile, sigure pentru piele și prezintă proprietăți reologice adecvate, deci pot fi folosite ca alternativă naturală pentru tratamentul celulei.

7.4. Obținerea și caracterizarea unor emulsii pe bază de collagen hidrolizat și extracte naturale cu acțiune potențial antiacneică

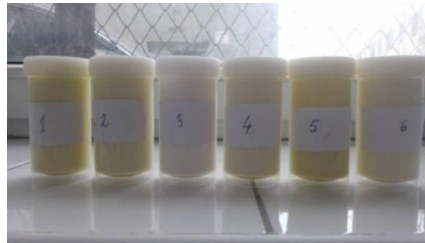


Figura 45. Emulsii dermatocosmetice **Eaa1-Eaa6** obținute

Valorile pH-ului formulărilor obținute s-au dovedit a fi în concordanță cu pH-ul pielii umane. De asemenea, acestea prezintă cei doi parametri de calitate estimate de obicei pentru emulsiile cosmetice topice, și anume comportament pseudoplastic (cuantificat prin aplicarea modelului reologic al legii puterii - vâscozitatea în funcție de pe rata de forfecare) și comportamentul tixotrop (cuantificat după aria tixotropă și indicele tixotropiei). Formulările cosmetice testate au arătat un caracter pseudoplastic non-newtonian cu subțierea la forfecare la ambele temperaturi selectate (24 ° C și 33 ° C). S-au determinat parametrii de curgere și caracteristicile tixotropiei au fost semnificativ influențate atât de compoziția formulărilor cosmetice (în special de concentrație emulgatorului pe bază de stearat de gliceril și stearat de potasiu) și al agentului de modificare a vâscozității, și anume guma xantan) cât și de temperatura de lucru. Formulările cosmetice au dovedit caracteristicile inițiale (aspect, consistență, culoare, miros și pH) timp de 6 luni (la temperatura camerei). Nu s-a observat nicio separare de fază, formulările fiind stabile în perioada de timp menționată.

7.5 Obținerea și caracterizarea unor emulsii pe bază de collagen hidrolizat și extracte naturale folosite ca cc-cream sau fond de ten



Figura 54. CC-cream (CC1,CC2) și fond de ten (FF1, FF2)

Ambele tipuri de emulsii obținute (CC-cream și fond de ten) sunt stabile la diferite temperature și valoarea obținută pentru pH-ul emulsiilor corespunde cu pH-ului natural al pielii, indicând astfel că emulsiile pot fi aplicate în siguranță pe piele. Rezultatele determinărilor de microscopie optică arată că toate emulsiile au aspect de spumă și fondul de ten este ușor aerat.

Emulsiile testate prezintă un comportament pseudoplastic non- newtonian cu subțiere la forfecare la ambele temperature de lucru. Analiza de tixotropie a fost efectuată folosind descriptori specifici precum aria tixotropă și indicele de tixotropie. Atât parametrii de curgere, cât și caracteristicile de tixotropie determinate sunt puternic influențate de compoziția formulărilor cosmetice și temperatura de lucru. Se poate concluziona că toate emulsiile preparate sunt stabile, sigur pentru piele și prezintă proprietăți reologice adecvate, deci poate fi folosit ca o alternativă naturală pentru un CC-cream sau un fond de ten.

Rezultatele originale obținute în cadrul acestei teze de doctorat au fost valorificate prin publicare și comunicare după cum urmează:

Lista de lucrări științifice

Articole

1. E. Dănilă , D. A. Kaya, M. V. Ghica, M. G. Albu Kaya, Cristina Negrea, Lăcrămioara Popa, Cornelia Nitipir, Rheological properties and stability of dermatocosmetic emulsions with collagen and natural ingredients used as color correcting cream and cream foundation, Revista de chimie, vol. 70, nr. 6/2019. IF= 1.755

2. **E. Danila**, D. A. Kaya, M. Patrascu, M. Albu Kaya , S. Kumbakisaka, Comparative Study of *Lavandula angustifolia* Essential Oils Obtained by Microwave and Classical Hydrodistillation, *Revista de chimie*, vol. 69, nr. 8/2018 , IF- 1.755
3. **E. Dănilă**, Z. Moldovanu, M. Popa, M. C. Chifiriuc, A. Durmuş Kayaf, M. Albu Kaya, Chemical composition, antimicrobial and antibiofilm efficacy of *C. limon* and *L. angustifolia* EOs and of their mixtures against *Staphylococcus epidermidis* clinical strains, *Industrial Crops & Products*, 2018, 122, pp. 483–492., IF=5.645
4. **E. Danila**, Z. Moldovan, M.G. Albu Kaya, M.V. Ghica, Formulation and characterization of some oil in water cosmetic emulsions based on collagen hydrolysate and vegetable oils mixtures, *Pure and Applied Chemistry*, July 2019, Conference Paper, DOI: 10.1515/pac-2018-0911., IF= 2.453
5. **E. Dănilă**, R. Stan, A. E. Enache, M. Türkmen, D. A. Kaya, M. Albu Kaya, A. Serafim, Obtaining and characterization of some emulsions based on collagen hydrolysate and natural extracts with a potential anticellulitic action, *U.P.B. Sci. Bull., Series B*, Vol. 81, Iss. 4, 2019.
6. **E. Dănilă**, R. Stan, M. Albu Kaya, G. Voicu, M. M. Marin, A. Moroșan, I. Titorencu, R. Țuțuianu, Valorization of *Cyprinus Carpio* skin for biocompatible collagen hydrolysates with potential application in foods, cosmetics and pharmaceuticals, *Waste and Biomass Valorization*, 2022, 13, p.917–928, <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01569-w>, IF 3.703.

Conferinte

1. **E. Danila** , Z. Moldovan, M. C. Chifiriuc, M. Bucur, A. Kaya Durmus, M. Pătrașcu, M. Albu Kaya, prezentare orală - Dermatocosmetic emulsions based on collagen and essential oils used as a potential treatment for acne, 1st International Conference “Chemistry for beauty and health”, 13-16 iunie 2018, Torun, Polonia, p.45 volum de rezumate.
2. **E. Danila**, R. Stan, A. Serafim, Z. Moldovan, C. Chelaru, Formulation and characterization of oleogels for cosmetic applications based on sun protection vegetable oils and lavender essential oil, 21st Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering Constanta- Mamaia, ROMANIA - September 4 – 7, 2019.

Cerere de brevet

1. E. Danila, M. G. Albu Kaya, S. Marin, M. M. Marin, G. Bumbeneci, A. Corina, G. Coara, F. L. Albu, Procedeu de obținere a hidrolizatului de colagen din piele pește pentru aplicații medicale și cosmetic, Cerere de brevet nr. OSIM nr. A00841/26.10.2018.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. W. Haibo, L. Yanping, W. Haiyin, Z. Hanjun, W. Min, Liangzhong, L.: Physical-chemical properties of collagens from skin, scale, and bone of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 23, (2014) 264–277.
2. S. Mahboob, S. Haider, S. Sultana, K.A. Al-Ghanim, F. Al-Misned, H.F. Al-Kahem Al-Balawi, Z. Ahmad, Isolation and characterization of collagen from the waste material of two important freshwater fish species. *J. Anim. Plant Sci.* 24(6), (2014) 1802–1810.
3. H.A. Morais, M.P.C. Silvestre, V.D.M. Silva, M.R. Silva, A.C. Simoes e Silva, J.N. Silveira, Correlation between the degree of hydrolysis and the peptide profile of whey protein concentrate hydrolysates: effect of the enzyme type and reaction time. *Am. J. Food Technol.* 8, (2013) 1–16.
4. M. Niculescu, S. Bajenaru, C. Gaidau, D. Simion, L. Filipescu, Extraction of the protein components as amino-acids hydrolysates from chrome leather wastes through hydrolytic processes, *Rev. Chim.* 60, (2009) 1070–1078.
5. T. Riaz, R. Zeeshan, F. Zarif, K. Ilyas, N. Muhammad, S. Zaman Safi, A. Rahim, S.A.A. Rizvi, I. Ur Rehman, FTIR analysis of natural and synthetic collagen. *Appl. Spectrosc. Rev.* 53(9), (2018) 703–746.
6. J.H. Muyonga, C.G.B. Cole, K.G. Duodu, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*), *Food Chemistry* 86 (2004) 325–332.
7. O. S. Rabotyagova, P. Cebe, L. David, Collagen structural hierarchy and susceptibility to degradation by ultraviolet radiation, *Materials Science and Engineering C* 28 (2008) 1420–1429.
8. L. Yang, L. Yanwen, D. Zongliang, L. Guoying, Comparison of dynamic denaturation temperature of collagen with its static denaturation temperature and the configuration characteristics in collagen denaturation processes, *Thermochimica Acta* 469 (2008) 71–76.
9. L. Sun, H. Hou, B. Li, Y. Zhang, Characterization of acid- and pepsin- soluble collagen extracted from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *International Journal of Biological Macromolecules* 99 (2017) 8–14.
10. D. Djenane, Antibacterial and Antioxidant Activity of Algerian Citrus Essential Oils and Their Application in *Sardina pilchardus*, *Foods* 4 (2015) 208–228
11. M. Belhadj Mostefa, A. Kabouche, I. Abaza, T. Aburjai, R. Touzani, Z. Kabouche,

Chemotypes investigation of *Lavandula* essential oils growing at different North African soils, J. Mater. Environ. Sci. 5 (6) (2014) 1896-1901

12. K. Belhamel, A. Abderrahim, R. Ludwig, Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Schinus molle* L. grown in Algeria, International Journal of Essential Oil Therapeutics (2008) 2, 175-177

13. M.-T. Golmakani, M. Moayyedi, Comparison of heat and mass transfer of different microwave-assisted extraction methods of essential oil from *Citrus limon* (Lisbon variety) peel, Crit Rev Food Sci Nutr 3(6) (2015) 506–518

14. I. Calinescu, A. I. Gavrilă, M. Ivopol, G. C. Ivopol, M. Popescu, N. Mircioaga, Microwave assisted extraction of essential oils from enzymatically pretreated lavender (*Lavandula angustifolia* Miller), Esent Eur J Chem 12 (8) (2014) 829-839

15. ISO 16385:2014(en) Essential oil of molle (*Schinus areira* L.), Argentinean type

16. M. Mohamadim, T. Shamspur, A. Mostafavi Comparison of microwave-assisted distillation and conventional hydrodistillation in the essential oil extraction of flowers *Rosa damascena* Mill., J. Essent. Oil Res. 25 (1) (2013) 55-61.

17. Regulation (EC) no 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on Cosmetic Products, p. 59 (2009).