



**ULBS**

Universitatea "Lucian Blaga" din Sibiu



Școala doctorală interdisciplinară

Domeniul de doctorat: Inginerie Industrială

## REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

### **VALORIFICAREA COMPONENTELOR BIOACTIVE DIN LEGUME CU POTENȚIAL PENTRU DEZVOLTAREA UNOR PRODUSE NATURALE INOVATIVE**

Doctorand:

**ANDREEA-CRISTINA, TECUCIANU (STROE)**

Conducător științific:

**Prof. univ. dr. *habil.* SIMONA, OANCEA**



Prezenta teză de doctorat reprezintă o abordare personală cu scopul valorificării componentelor bioactive din legume (dovleac plăcintar, rădăcina de păstârnac, varză roșie), cu potențial pentru dezvoltarea unor produse naturale inovative.

În urma analizei în literatura de specialitate s-au stabilit cele 3 categorii de compuși cu potențial imunostimulator (antociani, caroteni, fructani de tipul inulinei), și sursele bogate în acești compuși, selectate pe baza unor criterii de sustenabilitate, bazate pe următoarele aspecte: specii de plante autohtone, neexploatate sau puțin exploatate în scopurile stabilite în prezenta teză, materii prime accesibile economic, care să aibă un conținut ridicat de compuși bioactivi cu rol benefic în special la nivelul sistemului imunitar.

Pentru realizarea extracțiilor au fost testați diferiți parametri de proces, precum timpul, temperatura de extracție, raportul solvent/solid și diverși solvenți inclusiv cei prietenoși cu mediul (apă, etanol de diferite concentrații, ulei vegetal). De asemenea, au fost testate metode de extracție clasice (macerarea) și moderne (extracția asistată de ultrasunete și extracția asistată de enzime) și combinații ale celor două categorii de metode. Dintre metodele neconvenționale, în prezentul studiu s-a aplicat pentru prima dată tehnica de extracție utilizând o combinație enzimatică de pectinază și celulază, asupra materialelor vegetale selectate, pre-tratate prin uscare sau liofilizare. De asemenea, s-au testat diferite rapoarte solvent/solid ca parametri de proces ai tehnicilor de macerare și extracție cu ultrasunete, cu scopul utilizării unei cantități minime de solvent.

Pentru formularea unor produse inovative de tipul unui supliment alimentar cu potențial bioactiv, s-au utilizat extractele obținute prin aplicarea parametrilor optimi de extracție determinați în prima parte experimentală. În cea de-a doua parte experimentală au fost dezvoltate două noi produse de tip emulsie, cu aplicație practică ca suplimente alimentare antioxidante și anti-inflamatoare. Pentru stabilizarea lor, s-au utilizat aditivi naturali (guma de guar selectată în urma unor teste preliminare complexe), cu scopul principal de a încetini destabilizarea cinetică. Astfel s-au obținut produse de tip emulsie, cu o stabilitate de până la 8 zile, prin utilizarea exclusivă a ingredientelor naturale vegetale, agreeate și de consumatorii vegetarieni, a cărei acțiune antiinflamatoare a fost validată experimental, fiind comparabilă cu cea a acidului acetilsalicilic (aspirina).

Rezultatele obținute în cadrul acestei cercetări doctorale aduc contribuții originale cu caracter aplicativ, fiind diseminate prin publicarea unor articole științifice în reviste cotate ISI,

BDI, prin prezentarea de lucrări la conferințe naționale și internaționale din domeniu, prin înaintarea unei propuneri de brevet OSIM.

**CUVINTE CHEIE:** antioxidanți, antociani, caroteni, celulază, compuși bioactivi, dovleac plăcintar, DPPH, emulsie, enzime, FRAP, frunze de varză roșie, imunostimulator, inulină, macerare, pectinază, polifenoli, rădăcină de păstârnac, sustenabil, ultrasunete

# CUPRINS

SUMAR.....	I
LISTA DE ABREVIERI.....	4
LISTA DE TABELE.....	5
LISTA DE FIGURI.....	6
INTRODUCERE.....	9
1. STUDIUL DOCUMENTAR.....	13
1.1. ALIMENTAȚIA ȘI IMUNITATEA.....	13
1.2. IDENTIFICAREA COMPONENTELOR BIOACTIVE ESENȚIALE PENTRU DEZVOLTAREA UNUI PRODUS NATURAL IMUNOSTIMULATOR.....	16
1.3. CAROTENII.....	17
1.3.1 Aspecte generale.....	17
1.3.2. Localizare.....	19
1.3.3. Structura chimică.....	19
1.3.4. Sinteză și biodisponibilitate.....	20
1.3.5. Procese de degradare.....	23
1.3.6. Interacțiunea carotenoizilor cu alte molecule din organism.....	24
1.3.7. Beneficiile carotenilor asupra sănătății umane.....	25
1.3.8. Efectele imunomodulatoare ale carotenoizilor.....	27
1.4. ANTOCIANII.....	28
1.4.1. Aspecte generale.....	28
1.4.2. Localizare.....	29
1.4.3. Structura chimică.....	29
1.4.4. Biosinteză și biodisponibilitate.....	31
1.4.5. Stabilitatea chimică și procesele de degradare.....	32
1.4.6. Capacitatea antioxidantă și beneficiile antocianilor asupra sănătății umane.....	33
1.4.7. Efectele imunomodulatoare și antiinflamatoare ale antocianilor.....	35
1.5. FRUCTANII DE TIP INULINĂ.....	36
1.5.1. Aspecte generale.....	36
1.5.2. Structura chimică.....	37
1.5.3. Localizare.....	37
1.5.4. Biodisponibilitate.....	37
1.5.5. Beneficii asupra sănătății umane.....	38
1.5.6. Efecte imunomodulatoare.....	38
1.6. ALTE BIOMOLECULE CU EFECTE IMUNOMODULATOARE.....	39
1.7. BIBLIOGRAFIE.....	41
2. CONTRIBUȚII PRIVIND VALORIFICAREA UNOR RESURSE VEGETALE AUTOHTONE CU CONȚINUT RIDICAT DE COMPUȘI BIOACTIVI DE INTERES PENTRU DEZVOLTAREA DE NOI PRODUSE.....	47
INTRODUCERE.....	47
2.1. OBIECTIVE.....	48
2.2. DOVLEACUL PLĂCINTAR ( <i>CUCURBITA MAXIMA</i> ) – MATERIE PRIMĂ INVESTIGATĂ.....	48
2.2.1. Compoziție nutrițională.....	50
2.2.2. Beneficii aduse organismului.....	50
2.2.3. Elaborarea de metode de extracție a compușilor bioactivi de interes din pulpa de dovleac.....	50
2.3. PĂSTÂRNACUL ( <i>PASTINACA SATIVA</i> ) – MATERIE PRIMĂ INVESTIGATĂ.....	55

2.3.1. Compoziție nutrițională.....	56
2.3.2. Beneficii aduse organismului.....	56
2.3.3. Elaborarea de metode de extracție a compușilor bioactivi de interes din rădăcina de păstârnac.....	57
2.4. VARZA ROȘIE ( <i>BRASSICA OLERACEA</i> VAR. <i>CAPITATA</i> F. <i>RUBRA</i> ) – MATERIE PRIMĂ INVESTIGATĂ.....	59
2.4.1. Compoziție nutrițională.....	60
2.4.2. Beneficii aduse organismului.....	60
2.4.3. Elaborarea de metode de extracție a compușilor bioactivi de interes din varza roșie.....	60
2.5. CONCLUZII PARȚIALE.....	62
2.6. BIBLIOGRAFIE.....	64
3. CERCETĂRI EXPERIMENTALE PRIVIND OBTINEREA ȘI CARACTERIZAREA BIOEXTRACTELOR BOGATE ÎN PRINCIPII BIOLOGIC ACTIVE DIN MATERIILE PRIME SELECTATE.....	69
INTRODUCERE.....	69
3.1. OBIECTIVELE CERCETĂRII.....	70
3.2. MATERIALE ȘI ECHIPAMENTE.....	71
3.3. METODOLOGIA EXPERIMENTALĂ.....	72
3.3.1. Pre-tratamente ale materiilor prime.....	72
3.3.2. Tehnici extractive aplicate.....	77
3.3.3. Metodologia de analiză cantitativă a substanțelor bioactive din bioextractele preparate.....	89
3.3.4. Determinarea activității antioxidante prin metoda FRAP.....	91
3.3.5. Analiza stabilității termice a bioextractului antocianic.....	92
3.3.6. Analiza statistică a rezultatelor.....	93
3.4. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	94
3.4.1. Obținerea și caracterizarea bioextractului de dovleac ( <i>Cucurbita maxima</i> ) bogat în $\beta$ -caroteni.....	95
3.4.2. Obținerea și caracterizarea bioextractului de păstârnac ( <i>Pastinaca sativa</i> ) bogat în fructani de tipul inulinei.....	115
3.4.3. Obținerea și caracterizarea bioextractului de varză roșie ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> f. <i>rubra</i> ) bogat în antociani.....	126
3.5. CONCLUZII PARȚIALE.....	140
3.6. BIBLIOGRAFIE.....	144
4. CERCETĂRI EXPERIMENTALE DE VALIDARE A PROPRIETĂȚILOR IMUNOSTIMULATOARE ALE UNOR FORMULĂRI NOI DE PRODUSE BAZATE PE BIOEXTRACTELE PREPARATE.....	148
INTRODUCERE.....	148
4.1. Materiale și echipamente.....	150
4.2. METODOLOGIA EXPERIMENTALĂ.....	150
4.2.1. Determinarea indicelui de cremare (CI).....	155
4.2.2. Determinarea vâscozității emulsiei.....	155
4.2.3. Determinarea conținutului de acizi grași.....	155
4.2.4. Determinarea activității antioxidante.....	156
4.2.5. Determinarea activității antiinflamatoare.....	156
4.2.6. Determinarea activității antimicrobiene.....	157
4.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	157
4.3.1. Teste preliminare de formulare a emulsiilor bioactive.....	157
4.3.2. Caracterizarea fizico-chimică a emulsiilor finale.....	161
4.3.3. Activitatea biologică a emulsiilor nou dezvoltate.....	169
4.4. CONCLUZII PARȚIALE.....	172
4.5. BIBLIOGRAFIE.....	175

5. CONCLUZII FINALE, CONTRIBUȚII PROPRII ȘI DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE.....	178
Concluzii finale.....	178
Contribuții originale.....	183
<i>Recomandări și direcții viitoare de cercetare.....</i>	<i>184</i>
Lista publicațiilor rezultate în urma cercetării doctorale, publicate sau acceptate spre publicare.....	186

## LISTA DE TABELE

1. Tabel 1. Ionii derivați din beta-caroten în urma reacțiilor de oxido-reducere.
2. Tabel 2. Diferențe structurale ale principalilor agliconi ai antocianilor.
3. Tabel 3. Codificarea probelor analizate din punct de vedere al conținutului de molecule bioactive de interes.
4. Tabelul 4. Solvenți de extracție potriviți pentru clasele principale de compuși bioactivi din materii prime vegetale.
5. Tabel 5. Caracteristicile fizico-chimice ale probelor de dovleac investigate.
6. Tabel 6. Influența temperaturii de incubare a probelor DU cu enzima, la un timp de 120 minute, asupra conținutului de  $\beta$ -caroteni.
7. Tabel 7. Efectul tratamentului enzimatic și al tehnicii de extracție asupra conținutului de antociani din probele uscate de varză roșie (VU).
8. Tabel 8. Efectele tipului de pre-tratament și a timpului de incubare cu enzimă asupra conținutului de antociani din extractele macerate.
9. Tabel 9. Parametrii DSC ai probei martor și probei pre-tratată termic, sub acțiunea fluxului de oxigen/ azot.
10. Tabel 10. Rezultatele testelor preliminare realizate cu scopul obținerii unei emulsii cu stabilitate cât mai mare în timp.
11. Tabel 11. Detalii privind formularea a două emulsii bioactive prin combinarea a 3 extracte vegetale, în prezența unui aditiv natural.
12. Tabel 12. Conținutul de substanțe bioactive ale extractelor vegetale utilizate la realizarea emulsiilor.
13. Tabel 13. Conținutul de substanțe bioactive din compoziția emulsiilor nou dezvoltate.
14. Tabel 14. Conținutul total de acizi grași (% din aria GC).
15. Tabel 15. Activitatea antioxidantă a extractelor și emulsiilor nou dezvoltate, prin metodele FRAP și DPPH.
16. Tabel 16. Activitatea antiinflamatoare a extractelor și emulsiilor nou dezvoltate.

## LISTA DE FIGURI

1. Figura 1. Localizarea carotenoizilor în bistratul lipidic celular.
2. Figura 2. Structura chimică a principalilor carotenoizi.
3. Figura 3. Mecanismul de absorbție al carotenoizilor (adaptare după Fiedor și Burda, 2014).
4. Figura 4. Interacțiuni chimice responsabile pentru forma agregatelor de caroteni (adaptare după Kohn și al., 2008).
5. Figura 5. Principalele căi de degradare ale carotenoizilor (adaptare după Ursache și Botez, 2018).
6. Figura 6. Schema de interconversie structurală dependentă de pH între formele dominante de antociani monoglicozilați în fază apoasă (adaptare după Houbiers și al., 1998).
7. Figura 7. Reacția de degradare a antocianilor (adaptare după Castañeda-Ovando și al., 2009).
8. Figura 8. Efectul imunomodulator al fructanilor (adaptare după Pershev și Van den Ende, 2014).
9. Figura 9. Structura chimică a kaempferolului și quercetinei.
10. Figura 10. Proba de dovleac plăcintar (*Cucurbita maxima* var. Tudor) în stare proaspătă.
11. Figura 11. Schema cuprinzând tehnologiile extractive a  $\beta$ -carotenilor aplicate pulpei de dovleac.
12. Figura 12. Proba de rădăcină de păstârnac (*Pastinaca sativa*, soi Bielas), în stare proaspătă.
13. Figura 13. Schema cuprinzând tehnologiile extractive a inulinei aplicate rădăcinii de păstârnac.
14. Figura 14. Proba de varză roșie (*Brassica oleracea*. Var *capitata* f. *rubra*) în stare proaspătă.
15. Figura 15. Schema cuprinzând tehnologiile extractive a antocianilor aplicate frunzelor de varză roșie.
16. Figura 16. Schema tehnică experimentală de pre-tratamente aplicate pulpei de dovleac (*Cucurbita maxima*).
17. Figura 17. Schema tehnică experimentală de pre-tratamente aplicate rădăcinii de păstârnac (*Pastinaca sativa*).
18. Figura 18. Schema tehnică experimentală de pre-tratamente la varza roșie (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*).
19. Figura 19. Schema tehnică experimentală de extracție a compușilor bioactivi din pulpa de dovleac (*Cucurbita maxima*) prin metoda macerării.
20. Figura 20. Schema tehnică experimentală de extracție a compușilor bioactivi din rădăcina de păstârnac (*Pastinaca sativa*) prin metoda macerării.
21. Figura 21. Schema tehnică experimentală de extracție a compușilor bioactivi din frunzele de varză roșie (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) prin metoda macerării.
22. Figura 22. Schema tehnică experimentală de extracție a compușilor bioactivi din pulpa de dovleac (*Cucurbita maxima*) prin metoda extracției asistate de ultrasunete.
23. Figura 23. Schema tehnică experimentală de extracție a compușilor bioactivi din rădăcina de păstârnac (*Pastinaca sativa*) prin metoda extracției asistată de ultrasunete.
24. Figura 24. Schema tehnică experimentală de extracție a compușilor bioactivi din frunzele de varză roșie (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) prin metoda extracției asistate de ultrasunete.
25. Figura 25. Schema tehnică experimentală de extracție a compușilor bioactivi din pulpa de dovleac (*Cucurbita maxima*) prin metoda extracției asistate de enzime.
26. Figura 26. Schema tehnică experimentală de extracție a compușilor bioactivi din rădăcina de păstârnac (*Pastinaca sativa*) prin metoda extracției asistată de enzime.



27. Figura 27. Schema tehnică experimentală de extracție a compușilor bioactivi din frunzele de varză roșie (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) prin metoda extracției asistată de enzime.
28. Figura 28. Curba de calibrare pentru determinarea conținutului de  $\beta$ -caroten.
29. Figura 29. Curba de calibrare cu acid galic pentru determinarea conținutului de polifenoli totali.
30. Figura 30. Curba de calibrare cu catechină pentru determinarea conținutului de taninuri.
31. Figura 31. Curba de calibrare cu inulină.
32. Figura 32. Curba de calibrare cu acid ascorbic pentru determinarea activității antioxidante FRAP.
33. Figura 33. Conținutul de  $\beta$ -caroteni din extractele obținute prin macerarea DP, DU și DL în solventul acetonă/hexan (1/1) (2h, raport solvent/solid= 40/1).
34. Figura 34. Influența raportului solvent/solid asupra conținutului de  $\beta$ -caroten din extractele obținute din DU și DL în acetonă/hexan 1/1 prin metoda macerării.
35. Figura 35. Conținutul de  $\beta$ -caroteni din extractele obținute prin macerarea DP, DU și DL, în diverși solvenți (2h, raport solvent/solid= 10/1).
36. Figura 36. Conținutul de  $\beta$ -caroteni din extractele obținute prin macerarea DL în ulei de floarea-soarelui (raport solvent/solid= 10/1).
37. Figura 37. Influența tipului de pre-tratament asupra conținutului de polifenoli totali, din extractele etanolice, obținute prin metoda macerării, din DP, DU și DL (raport solvent/solid= 10/1).
38. Figura 38. Influența timpului de extracție asistată de ultrasunete, în etanol, asupra conținutului de  $\beta$ -caroteni din dovleacul uscat, la diferite rapoarte de solvent/solid.
39. Figura 39. Influența tipului de solvent asupra conținutului de  $\beta$ -caroteni din dovleacul liofilizat, în urma extracției asistate de ultrasunete (30 min, raport solvent/solid= 10/1).
40. Figura 40. Influența tipului de pre-tratament al dovleacului asupra conținutului de polifenoli totali, din extractele etanolice obținute prin metoda macerării din DU și DL (raport solvent/solid= 10/1).
41. Figura 41. Influența temperaturii de incubare a DU cu celulază și pectinază, timp de 120 minute, asupra conținutului de  $\beta$ -caroteni din extractele etanolice obținute prin macerare și extracție asistată de US.
42. Figura 42. Influența temperaturii de incubare cu celulază și pectinază asupra conținutului de polifenoli din extractele etanolice de dovleac uscat.
43. Figura 43. Activitatea antioxidantă a extractelor etanolice de DL, obținute prin tehnici convenționale (macerare) și neconvenționale (asistate de US, enzime) de extracție.
44. Figura 44. Conținutul de  $\beta$ -caroten din proba DL, în funcție de tehnica de extracție aplicată și de tipul de solvent utilizat (raport solvent/solid= 10/1).
45. Figura 45. Conținutul de fructani de tipul inulinei din probele proaspete și uscate de *Pastinaca sativa* în funcție de timpul de extracție asistată de US.
46. Figura 46. Conținutul de polifenoli totali din probele proaspete și uscate de *Pastinaca sativa* în funcție de timpul de extracție asistată de ultrasunete.
47. Figura 47. Influența temperaturii de incubare cu enzima și a tehnicii de extracție aplicată ulterior, asupra conținutului de fructani de tipul inulinei din PP și PU.
48. Figura 48. Influența temperaturii de incubare cu enzima și a tehnicii de extracție aplicată ulterior, asupra conținutului de polifenoli din PP și PU.
49. Figura 49. Influența tehnicii de extracție asupra activității antioxidante a extractelor de PP și PU.
50. Figura 50. Conținuturile de fructani de tipul inulinei obținute în urma extracției din rădăcina de păstârnac prin diferite tehnici de extracție, utilizând parametrii optimi.
51. Figura 51. Influența timpului de extracție prin macerare și a pre-tratamentului aplicat probelor de *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* asupra conținutului de antociani.

52. Figura 52. Influența timpului de extracție asistată de US, la amplitudinea de 50%, asupra conținutului de antociani din *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *Rubra*.
53. Figura 53. Influența timpului de extracție asistată de ultrasunete, la amplitudinea de 70%, asupra conținutului de antociani din *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *Rubra*.
54. Figura 54. Influența numărului de extracții prin macerare, asupra conținutului de antociani din materialul vegetal tratat enzimatic cu celuloză și pectinază.
55. Figura 55. Influența tehnicii de extracție asupra activității antioxidante a antocianilor din frunzele liofilizate de varză roșie.
56. Figura 56. Degradarea termică a antocianilor din varză roșie utilizând modelul cinetic de reacție de ordinul I.
57. Figura 57. Curbele DSC (A, B) și TG (C, D) a probelor control și pre-tratate termic, analizate sub flux de azot și respectiv de oxigen.
58. Figura 58. Conținuturile de antociani obținute în urma extracției din frunzele de varză roșie liofilizate (VL), prin diferite tehnici de extracție, utilizând parametrii optimi.
59. Figura 59. Reprezentarea schematică a tipurilor de emulsii O/W și W/O.
60. Figura 60. Formarea emulsiei pe bază de extracte uleioase și apoase bioactive, prin adaos de gumă guar.
61. Figura 61. Analiza microscopică a modificărilor apărute în structura emulsiilor după 10 zile (40X).
62. Figura 62. Evaluarea indicelui de cremare a emulsiilor E1 și E2, nou dezvoltate.
63. Figura 63. Influența temperaturii asupra vâscozității emulsiei (E1).
64. Figura 64. Spectrul GC-MS al uleiului din semințe de dovleac utilizat la extracția  $\beta$ -carotenilor din pulpa de dovleac .
65. Figura 65. Spectrul GC-MS al emulsiei nou dezvoltate, E1.
66. Figura 66. Spectrul GC-MS al emulsiei nou dezvoltate, E2.
67. Figura 67. Activitatea antimicrobiană a extractelor de caroteni, antociani și inulină și a celor două variante de emulsii.

## INTRODUCERE

Industria farmaceutică și a suplimentelor alimentare se află într-o continuă dezvoltare, în special ramura fitoterapeutică care se axează pe dezvoltarea produselor destinate îmbunătățirii stării de sănătate, pe bază de plante dar și îmbunătățirea proceselor industriale de producție și de control a calității acestor produse. În acest sens se fac numeroase cercetări naționale și internaționale pe diferite specii de plante, pentru identificarea componentelor bioactive din compoziția lor, dar și pentru îmbunătățirea proceselor extractive și de testare a proprietăților lor biochimice și a efectelor asupra organismului uman.

Ideea dezvoltării în prezenta teză de doctorat a unui supliment alimentar imunostimulator a pornit de la premisa că, indiferent de stilul de viață adoptat, în prezent ne confruntăm cu problema consumului de legume și fructe care sunt culese prematur, ceea ce înseamnă că valoarea lor nutritivă este diminuată, lucru care duce la un dezechilibru la nivelul organismului și, implicit, un dezechilibru al sistemului imunitar. Din această cauză apare nevoia suplimentării aportului de vitamine, minerale și alte biomolecule necesare organismului. Pentru atingerea acestui scop, au fost propuse metode extractive eficiente care au fost ulterior verificate experimental.

Conform Ministerului Sănătății, suplimentele alimentare sunt considerate produse alimentare comercializate sub formă de doze, care conțin concentrații mari de nutrienți, a căror consum are scopul de suplimentare a regimului alimentar cu diverși nutrienți ([Ministerul Sănătății Publice, 2007](#)).

S-a dovedit științific faptul că sistemul imunitar este sensibil la diverși factori, iar stresul este unul dintre elementele care afectează în mod direct imunitatea. Mecanismul prin care acesta acționează în mod negativ asupra imunității este acela că sub influența stresului, corpul produce o cantitate mare de specii reactive de oxigen în comparație cu antioxidanții enzimatici și non-enzimatici care ar trebui să lupte împotriva lor, ceea ce duce la un dezechilibru ([Krishnaiah și al., 2011](#)). Pornind de la această teorie, majoritatea studiilor pe produse cu proprietăți imunostimulatoare au dovedit un efect benefic asupra imunității prin acțiunea lor antioxidantă și prin efectul protector asupra celulelor imunitare împotriva speciilor reactive de oxigen.

Studiul prezent vizează dezvoltarea unui produs pe bază de plante (legume), având o compoziție specifică și unică, fiind eficient și diferit față de alte produse deja existente pe piață, printr-o combinație inovativă de biomolecule esențiale pentru sistemul imunitar. Mai mult, tema vizează valorificarea durabilă a unor plante cultivate în biodiversitatea țării noastre,

altele decât cele clasice (plante medicinale, condimente, fructe), produsul proiectat fiind sustenabil și potrivit inclusiv pentru vegetarieni.

Pe piață există o gama diversificată de suplimente alimentare cu proprietăți imunostimulatoare, care combină diferite plante medicinale cu origini geografice specifice, sau ingrediente de origine animală cu importanță asupra sistemului imunitar (miere, propolis, polen, acizi omega din pește, etc.).

Acestei lucrări i se pot asocia conceptele de sustenabilitate și dezvoltare durabilă datorită faptului că se bazează pe principiile acestora. Prin utilizarea materiilor prime regenerabile și a metodelor de lucru cu reactivi ”prietenosi” cu mediul, se asigură accesul la suplimente alimentare sigure, destinate consumului uman. De asemenea, selecționarea metodelor de lucru are la bază principiul consumului minim de reactivi, care este în conformitate cu obiectivul Strategiei Naționale pentru Dezvoltare Durabilă a României Orizonturi 2013-2020-2030, care are ca scop utilizarea unui volum redus de resurse energetice și materiale.

Sistemul imunitar reprezintă sistemul de apărare al organismului împotriva infecțiilor. În organism, protecția organismului este asigurată prin 3 linii principale de apărare: mucoasele și secrețiile cutanate, leucocitele, proteinele/peptidele antimicrobiene și răspunsul inflamator și sistemul imunitar, reprezentat de limfocite și anticorpi (Oancea, 2010). În cazul în care nu sunt suficiente aceste mecanisme de apărare, este necesară intervenția fie preventivă (cu suplimente alimentare) fie terapeutică (cu medicamente specifice).

Componentele bioactive din plante sunt bioelemente din compoziția resurselor vegetale, cu efecte specifice asupra organismului. Pot avea proprietăți catalizatoare ale unor reacții chimice din interiorul organismului, pot constitui elemente de legătură între diferite căi metabolice sau pot avea efect protector asupra celulelor. Cunoașterea proprietăților farmacologice ale compușilor biologici permite dezvoltarea unor tehnici de extracție adecvate, prin intermediul cărora se pot obține bioextracte ce constituie ingrediente importante în dezvoltarea industrială a unor produse de interes.

Dintre componentele bioactive, cele identificate ca fiind necesare sistemului imunitar sunt antioxidanții naturali de tipul antocianilor, carotenilor sau micronutrienților. Aceste biomolecule au proprietatea de a proteja sistemul imunitar împotriva activității oxidative a radicalilor liberi. Prebioticele de tipul polifructozaharidelor au dovedit, de asemenea, un efect imunostimulator indirect, prin stimularea creșterii speciilor de bacterii benefice din intestin și prin creșterea concentrației de imunoglobuline A (IgA) din țesuturi (Oancea, 2010).

În acest context, scopul principal al prezentei teze de doctorat constă în formularea unei rețete noi pentru dezvoltarea un supliment alimentar cu proprietăți imunostimulatoare, obținut din extracte bioactive din plante atent selecționate.

Pentru îndeplinirea scopului propus, obiectivele de cercetare stabilite sunt:

- Identificarea și selectarea atentă a unor materii prime, în principal autohtone, cu conținut ridicat de biomolecule cu rol imunostimulator (antociani, inulina, carotenoizi) pretabile atingerii scopului tezei
- Extracția, caracterizarea fizico-chimică precum și evaluarea stabilității compușilor biologic activi din plantele selecționate – utilizarea unor metode specifice clasice și moderne de extracție și selectarea acelei metode care să permită izolarea compușilor cu randament ridicat și păstrarea bioactivității.
- Obținerea unor formule de supliment alimentar bazate pe o combinație specifică a extractelor vegetale obținute (elaborarea rețetei tehnologice, a formei de prezentare, a caracteristicilor fizico-chimice a diferitelor compoziții dezvoltate).
- Evaluarea concentrației componentelor bioactive vizate, atât din extracte cât și din compozițiile finale dezvoltate.
- Validarea proprietăților compozițiilor dezvoltate prin testarea *in vitro* a efectelor biologice.

Pentru realizarea prezentei teze de doctorat și parcurgerea acestor obiective, teza a fost elaborată într-un număr de 187 de pagini, fiind structurată în 5 capitole principale, organizate în subcapitole corespunzătoare, conținând 67 de figuri și 16 tabele.

**Capitolul 1** ("Introducere") prezintă necesitatea și motivația alegerii temei prin expunerea obiectivelor principale ale tezei de doctorat.

**Capitolul 2** ("Contribuții privind valorificarea unor resurse vegetale autohtone cu un conținut ridicat de compuși bioactivi de interes pentru dezvoltarea de noi produse") descrie caracterizarea resurselor vegetale de interes selectate, precum și elaborarea metodelor adecvate de extracție a compușilor bioactivi vizați.

**Capitolul 3** ("Cercetări experimentale privind obținerea și caracterizarea bioextractelor bogate în principii biologic active din materiile prime selectate") prezintă rezultatele experimentale obținute în urma extracțiilor compușilor bioactivi prin diferite tehnici.

**Capitolul 4** ("Cercetări experimentale de validare a proprietăților imunostimulatoare ale unor noi produse bazate pe bioextractele preparate") conține date cu privire la elaborarea și dezvoltarea a două produse inovative de uz alimentar, de tip supliment alimentar, caracterizarea fizico-chimică a acestora, precum și validarea proprietăților bioactive.

**Capitolul 5** ("Concluzii finale, contribuții proprii și direcții viitoare de cercetare") conține principalele concluzii ale prezentei lucrări de doctorat, contribuțiile proprii aduse în domeniu, atât în sfera aplicativă cât și în cea teoretică, și expune noi direcții de cercetare derivate din tema propusă.



## 1. STUDIUL DOCUMENTAR - REZUMAT

### **IDENTIFICAREA COMPONENTELOR BIOACTIVE ESENȚIALE PENTRU DEZVOLTAREA UNUI PRODUS NATURAL IMUNOSTIMULATOR**

Sistemul imunitar are nevoie de numeroase resurse pentru a funcționa. Pe lângă vitaminele și mineralele esențiale sistemului imunitar, care sunt binecunoscute în prezent, există și alte biomoleculi care au dovedit un efect benefic, uneori chiar mai mare asupra imunității prin acțiunea lor directă sau indirectă asupra diverselor componente ale sistemului de apărare al organismului.

Nutriția sănătoasă reprezintă elementul cheie al răspunsurilor imune, malnutriția fiind cea mai frecventă cauză a imunodeficienței la nivel mondial. Prin intermediul alimentației organismul beneficiază de vitaminele și mineralele necesare dar și de compuși biologic activi care au diferite efecte benefice asupra proceselor biologice din organism.

Pentru funcționarea optimă, sistemul imunitar are nevoie în special de vitaminele A, B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub>, C, D, E, și microelementele fier, zinc, cupru și seleniu, însă există fitocompuși care au dovedit activități imunomodulatoare prin căi de acțiune directe sau indirecte. Între aceștia se numără antioxidanții naturali din categoria carotenilor și compușilor fenolici care includ clasa de antociani, cu acțiune directă, care au efect protector asupra celulelor sistemului imunitar și care stimulează sau inhibă sinteza unor compuși implicați în semnalizarea celulară din cadrul proceselor biologice de apărare a organismului.

Pe de altă parte, pe lângă efectele benefice asupra microflorei intestinale, prebioticele au proprietăți imunostimulatoare atât pe cale directă cât și indirectă, fiind implicate în creșterea randamentului de producere a unor componente esențiale sistemului imunitar.

Cunoașterea proprietăților farmacologice ale acestor compuși permite dezvoltarea unor metode adecvate de extracție a lor din matricile vegetale. Bioextractele obținute pot constitui ingrediente importante în dezvoltarea industrială a unor produse de interes.

În scopul dezvoltării unui produs natural 100%, sustenabil și eficient, cu efecte imunostimulatoare, în prezenta teză de doctorat am identificat și verificat experimental 3 tipuri de compuși bioactivi concentrați în legume, fiind vorba de antioxidanții naturali de tipul carotenilor, antocianilor și fructooligozaharidelor.

## CAROTENII

Carotenii sunt un grup de pigmenți naturali din categoria polienelor, care au structuri și funcții diverse (Landrum, 2010). Sunt substanțe cu proprietăți speciale pe care nicio altă grupă de substanțe nu le posedă. Proprietățile lor sunt determinate de structura moleculară, iar legătura dintre structura, proprietățile și funcțiile lor este necesară pentru înțelegerea importanței pe care o au în diferite contexte biologice (Britton și al., 2008).

Pe parcursul timpului, caracteristicile carotenilor au fost intens studiate de către cercetători, însă proprietățile acestora în soluțiile organice simple nu caracterizează în totalitate activitatea biologică pe care o au *in vivo*. În organismele vii, carotenii sunt parte a unor sisteme complexe și sunt adesea întâlniți în structuri sub-celulare organizate, în cadrul cărora proprietățile chimice le sunt influențate de prezența altor molecule aflate în vecinătate. Aceștia sunt mult mai stabili *in vivo* decât după izolare (Britton și al., 2008).

Carotenii sunt compuși hidrofobi, motiv pentru care au tendința să se asocieze cu lipidele, fiind adesea integrați în structura complexă a membranelor celulare. Această asociere depinde mult de particularitățile fizice, în special de mărime, formă și prezența grupelor funcționale (Britton și al., 2008).

Cu privire la semnificația biologică, este important de amintit rolul lor ca precursori ai metaboliților care au diferite funcții în organism (Britton și al., 2008).

Carotenoizii aduc numeroase beneficii asupra sănătății organismului uman, datorită proprietăților pe care le posedă, în special a capacității lor antioxidante care protejează împotriva acțiunii speciilor reactive de oxigen.

Stresul oxidativ este unul dintre principalele cauze ale bolilor cronice din zilele noastre. În conformitate cu statistica publicată în anul 2018 de Organizația Mondială a Sănătății (OMS), se estimează că 1 din 6 decese la nivel mondial au fost cauzate de cancer, iar numărul este într-o continuă creștere (World Health Organization, 2018).

Datorită activității antioxidante, carotenoizii au un efect benefic asupra celulelor sistemului imunitar, pe care le protejează împotriva stresului oxidativ. Odată cu înaintarea în vârstă apar unele modificări la nivelul sistemului imunitar care determină slăbirea acestuia. S-a observat că un aport adecvat de carotenoizi determină creșterea numărului de celule natural-killer, în special la oamenii cu vârsta trecută de 50 de ani (Farges și al., 2012).

Carotenoizii, în special  $\beta$ -carotenul, sunt cunoscuți pentru funcția de precursori ai vitaminei A. Datorită eficienței scăzute de conversie a  $\beta$ -carotenului în vitamina A, unele organisme, printre care și omul, au dezvoltat căi de absorbție și transport al acestuia la nivelul organismului (Chew, 1993). Această descoperire a condus spre cercetări ulterioare care au



demonstrat că la nivelul organismului uman, carotenoizii au numeroase alte funcții printre care se numără capacitatea de a influența în mod direct sistemul imunitar. Efectele imunomodulatoare ale carotenoizilor au fost observate în special asupra limfocitelor (Chew, 1993). De asemenea, numeroase studii au demonstrat legătura directă între alimentația bogată în carotenoizi și incidența scăzută a diverse forme de cancer (Etminan și al., 2004; Nishino și al., 2002; Tanaka și al., 2012).

Studiile efectuate pe subiecți tineri au demonstrat că suplimentarea dietei cu  $\beta$ -caroten are ca efect creșterea rezistenței la infecții și dezvoltarea timusului (Seifter și al., 2012). De asemenea s-a observat o creștere a numărului de limfocite la nivelul timusului șoarecilor a căror dietă a fost îmbogățită cu o cantitate de 4,3 mg  $\beta$ -caroten/ kg hrană. Pe de altă parte, acidul retinoic, care este un produs metabolic al vitaminei A, a avut ca efect scăderea populației de limfocite de la nivelul timusului (Seifter și al., 2012). Suplimentarea dietei vacilor Holstein cu o cantitate de 300-600 mg  $\beta$ -caroten/ zi timp de 4 săptămâni înainte și după nașterea fătului au avut ca efect creșterea populației de limfocite prin stimularea procesului de mitoză (Heirman și al., 1990). Stimularea proliferării limfocitelor datorată dietei bogate în  $\beta$ -caroten a fost observată și la specii de porci (Neacșu și al., 2003) și șoareci (Benedich și Shapiro, 1986).

Datorită efectului antioxidant,  $\beta$ -carotenul protejează ADN-ul celulelor limfocitare împotriva radiațiilor  $\gamma$  (Konopacka și Rzeszowska-Wolny, 2001). Studiile *in vitro* pe culturi de limfocite supuse stresului oxidativ cu peroxid de hidrogen ( $H_2O_2$ ) au demonstrat că o concentrație de 10000  $\mu g$  / ml  $\beta$ -caroten este suficientă pentru protecția ADN-ului împotriva degradării (Al-Shaban și al., 2016).

La oamenii în vârstă,  $\beta$ -carotenul împreună cu zincul contribuie la creșterea populației de limfocite T cu aproximativ 31% după 6 luni de administrare. După 3 luni de suplimentare a alimentației cu zinc și  $\beta$ -caroten, s-a observat o creștere a procentului de celule natural-killer de până la 121% (Steven și al., 2000). În urma suplimentării alimentației cu 180 mg  $\beta$ -caroten / zi timp de 7 zile s-a observat o creștere a numărului de limfocite T la persoane adulte cu stare bună de sănătate (Alexander și al., 1985).

## ANTOCIANII

Antocianii sunt un grup de metaboliți secundari sintetizați de plantele superioare ca și pigmenți responsabili pentru culorile roz, roșu violet, albastru și unele nuanțe de portocaliu, în principal ale fructelor și florilor (Castañeda-Ovando și al., 2009). Termenul antociani provine din limba greacă, fiind compus din anthos = floare și kyanos = albastru închis (Delgado-

Vargas și Paredes-Lopez, 2003). Până în prezent, au fost identificate peste 635 de tipuri de antociani. Rolul lor în regnul vegetal este de protecție a plantelor împotriva daunelor produse de radiațiile UV, dar și de atracție a animalelor care ajută în procesele de polenizare și dispersare a semințelor (Mazza și Miniati, 1993).

Antocianii sunt pigmenți vegetali care au demonstrat o puternică activitate antioxidantă, deoarece au capacitatea de a dona un electron liber sau atomi de hidrogen radicalilor liberi reactivi (Castañeda-Ovando și al., 2009; Oancea și al., 2013).

Radicalii liberi, peroxizii sau oxigenul singlet sunt specii reactive de oxigen care sunt produse în organism în urma reacțiilor biologice. Rolul acestora este important întrucât influențează sistemul imunitar și semnalizarea celulară, dar și alte procese care au loc în mod obișnuit în organism. Dacă sunt produse în cantități prea mari, speciile reactive de oxigen devin dăunătoare, conducând spre degradare celulară, îmbătrânire, inflamație, cancer și boli cardiovasculare (Allen și Tresini, 2000). În acest sens, antocianii au un potențial efect benefic întrucât au proprietăți antioxidante dovedite atât *in vitro* cât și *in vivo*. Ei au capacitatea de a captura radicalii liberi și de a opri reacția în lanț care conduce spre degradarea oxidativă.

Capacitatea antioxidantă a câtorva tipuri de antociani a fost măsurată *in vitro* prin metoda larg acceptată ORAC "oxygen radical absorbance capacity", în condiții similare de pH ca cele din organismul uman. Rezultatele au dus la concluzia că au o capacitate antioxidantă egală sau mai mare decât cea a vitaminei E (Tsuda și al., 1994; Wang și al., 1997). Antocianii pot prezenta activitate antioxidantă mai mare și față de vitamina C și  $\beta$ -carotenii (Kowalczyk și al., 2003).

Printr-un studiu *in vitro* realizat pe eritrocite umane tratate cu peroxid de hidrogen ca agent oxidant și vin roșu cu un conținut ridicat de antociani, s-a demonstrat că aceștia reduc semnificativ speciile reactive de oxigen din eritrocite (Tedesco și al., 2001).

Conform datelor obținute pe experimentele *in vitro*, antocianii au un efect protector împotriva stresului oxidativ, fapt demonstrat apoi de studiile *in vivo* realizate pe șoareci (Tsuda și al., 2000). Studiile efectuate pe animale au demonstrat o creștere a nivelului total de antioxidanți și o descreștere a conținutului de substanțe reactive ale acidului tiobarbituric (TBARS) indusă de antociani (Kowalczyk și al., 2001).

Consumul de antociani a fost asociat cu prevenirea bolilor cardiovasculare, acestea fiind cauzate în general de acumularea în cantități mari a lipoproteinelor oxidate, cu densitate mică (LDL), care se depun pe peretele arterelor. Antocianii au efectul de creștere a capacității antioxidante a serului, reducând astfel randamentul de oxidare al colesterolului (Aviram și al., 2005).

Având capacitatea de a capta radicalii liberi prin intermediul hidrogenului pe care îl donează, puterea lor antioxidantă este mai mare decât cea a vitaminelor C și E (Rice-Evans și al., 1996), fiind cunoscuți pentru efectele anticancerigene. Aceste efecte se bazează în mare măsură pe studiile realizate *in vitro*. În acest sens, antocianii extrași din petalele unor flori au dovedit un efect mult mai puternic asupra carcinomului intestinal malign, spre deosebire de alte tipuri de flavonoide (Kamei și al., 1995). Concluzii similare s-au desprins și în urma studiului efectelor antocianilor din vinul roșu asupra liniilor celulare ale cancerului gastric (Kamei și al., 1998). Studiile pe celule canceroase derivate din cancerul de colon, asupra cărora s-a aplicat un tratament cu antociani extrași din diferite tipuri de struguri, au demonstrat efectul antiproliferativ pe care îl posedă (Yi și al., 2005). Antocianii puri izolați din căpșuni au un efect inhibitor asupra celulelor canceroase derivate din cancerul de colon, de prostată și cancer osos (Zhang și al., 2008).

Efectul antiproliferativ al antocianilor depinde în mare măsură de structura lor chimică, care se referă la tipul de aglicon și la modelul de acilare și glicozilare (Jing și al., 2008).

Un studiu efectuat pe șoareci a demonstrat efectul antocianilor de protecție împotriva radiațiilor  $\gamma$  dar și potențialul imunostimulator al acestora împotriva imunosupresiei induse de radiații. Suplimentarea nutriției cu antociani, timp de 14 zile înainte de iradiere a redus semnificativ daunele la nivelul timusului și splinei comparativ cu grupul de control. În același timp a fost observată o reducere a numărului de micronuclei din eritrocitele măduvei osoase, care a indicat efectul protector al antocianilor împotriva degradării materialului genetic (Fan și al., 2012)

Inflamația reprezintă răspunsul dat de organism la leziunile tisulare, fiind un proces care favorizează apariția cancerului, datorită condițiilor de mediu favorabile dezvoltării tumorilor. Din acest motiv, moleculele biologice cu efect anti-inflamator au potențialul de a preveni progresia cancerului și conversia malignă (Coussens și Werb, 2002).

Conversia acidului arahidonic în prostaglandine, care au efect de stimulare a procesului inflamator, are loc sub acțiunea ciclooxygenazei (Seeram și al., 2001). Studiile au arătat că cianidina are efecte inhibitorii asupra ciclooxygenazei, fiind mai puternice decât cele ale unor medicamente antiinflamatoare, precum aspirina (Wang și al., 1999), ibuprofenul și naproxenul, în concentrație de 10  $\mu$ M (Seeram și al., 2001).

Studiul *in vitro* realizat pe culturi de celule epiteliale canceroase din colonul uman (Caco-2) a demonstrat că extractele de antociani din coacăze, cu o concentrație cuprinsă între 50 și 100  $\mu$ g/ml reduc procesul de activare al complexului proteic NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) cu până la 85,2%, având efect anti-inflamator,

reducând astfel procesul de diviziune necontrolată a celulelor canceroase (Taverniti și al., 2014).

Pe lângă activitatea antioxidantă, antocianii inhibă expresia proteinei de adeziune a celulelor vasculare (VCAM), reducând astfel procesul de reacție a leucocitelor cu celulele endoteliale. Pe de altă parte, scad nivelul de interleukina-2 (IL-2) și interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) (Lin și al., 2002), inhibă degranularea mastocitelor (Middelton și al., 2000) și producția factorului de necroză tumorală (TNF- $\alpha$ ) (Lin și al., 2002).

## FRUCTANII DE TIP INULINĂ

Fructanii fac parte din categoria carbohidraților, fiind formați din 1 până la 60 de unități de fructoză, legate sau nu de o moleculă terminală de zaharoză. Structura liniară caracterizată prin legături de tip  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 6) fructozil-fructoză este întâlnită la fructanii de tip levan, în timp ce legătura de tip  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) este caracteristică fructanilor de tip inulină (Carabin și al., 1999). Diferența constă în gradul de polimerizare, inulina caracterizându-se printr-o mare variație a numărului de unități monozaharidice (Carabin și al., 1999).

Inulina nu este metabolizată în organismul uman, dar poate fi hidrolizată de microbiota din colon. Consumul zilnic de inulină în Europa este estimat la 3-11 g/zi (Bonnema și al., 2010), în timp ce în dieta americană valorile sunt cuprinse între 1,3-3,5 g/zi (Coussement, 1999).

Pe lângă funcția de prebiotic, fructanii de tip inulină au și alte funcții în organism, acționând atât pe cale indirectă cât și directă. Efectele benefice ale acestora sunt asociate deseori cu mecanismul indirect de acțiune care se referă la influența pozitivă pe care o au asupra microflorei intestinale (Gibson și al., 2004; Louis și al., 2016; Wopereis și al., 2018). S-a demonstrat că un aport regulat de fructani are efect pozitiv asupra bunăstării generale a organismului, scăzând incidența alergiilor și contribuind la creșterea rezistenței față de factorii patogeni din intestin și din afara lui, la scăderea nivelului de colesterol din sânge, facilitând totodată absorbția minerală la nivelul intestinului (Delgado și al., 2010; Scholoz-Ahrens și al., 2007).

Unele cercetări au sugerat potențialul efect benefic al consumului de fructani asociat cu reducerea riscului apariției cancerului de colon (Allsopp și al., 2013; Verma și Shukla, 2013).

Capacitatea antioxidantă sugerează un beneficiu în prevenirea bolilor cauzate de speciile reactive de oxigen și efectele pozitive în tratarea acestora. În acest sens a fost stabilită

o legătură între stresul oxidativ și dezvoltarea unor afecțiuni intestinale (Bhattacharyya și al., 2014; Van den Ende și al., 2011).

La nivelul intestinului, fructanii sunt supuși procesului de fermentare sub acțiunea microbiotei, în urma căruia rezultă acizi grași cu catenă scurtă. Fructanii, ca și alți carbohidrați, se pot lega de receptorii TLR2 (toll like receptor 2) și TLR4 (toll like receptor 4). Această legătură are ca efect stimularea unor factori de transcripție, printre care se numără și NF- $\kappa$ B, fapt care conduce la activarea unor căi imunologice diferite în funcție de tipul de celulă (Peshev și Van den Ende, 2014).

Pe de altă parte, fructanii îmbunătățesc viteza de absorbție a glucozei și stimulează activitatea protein-kinazei, care oprește procesul inflamator fie direct, fie prin intermediul inhibării semnalului transmis de NF- $\kappa$ B (Peshev și Van den Ende, 2014).

## **ALTE BIOMOLECULE CU EFECTE IMUNOMODULATOARE**

Compușii fenolici fac parte din categoria compușilor fitochimici cu proprietăți antioxidante, sintetizați în toate plantele ca rezultat al metabolismului secundar. Aceștia reacționează cu radicalii lipidici, transformându-i în compuși stabili din punct de vedere oxidativ (Hurrel, 2003).

Quercetina, pelargonidina sau kaempferolul sunt flavonoide – sub-clasă a compușilor polifenolici, cu dovedite proprietăți imunomodulatoare care inhibă activarea factorului nuclear responsabil pentru transcripția ADN-ului (NF- $\kappa$ B) prin scăderea producției factorului de necroză tumorală (TNF- $\alpha$ ) și a interleukinei- $\beta$  (IL- $\beta$ ), responsabilă în procesul de activare a limfocitelor (Cherng și al., 2008; Valles și al., 2010). Studiile *in vitro* realizate pe celulele mononucleare din sângele periferic uman au demonstrat că flavonoidele și cumarina din compoziția unor plante precum pătrunjelul sau țelina au ca efect activarea limfocitelor și creșterea randamentului de sinteză a IFN- $\gamma$  (Cherng și al., 2008).

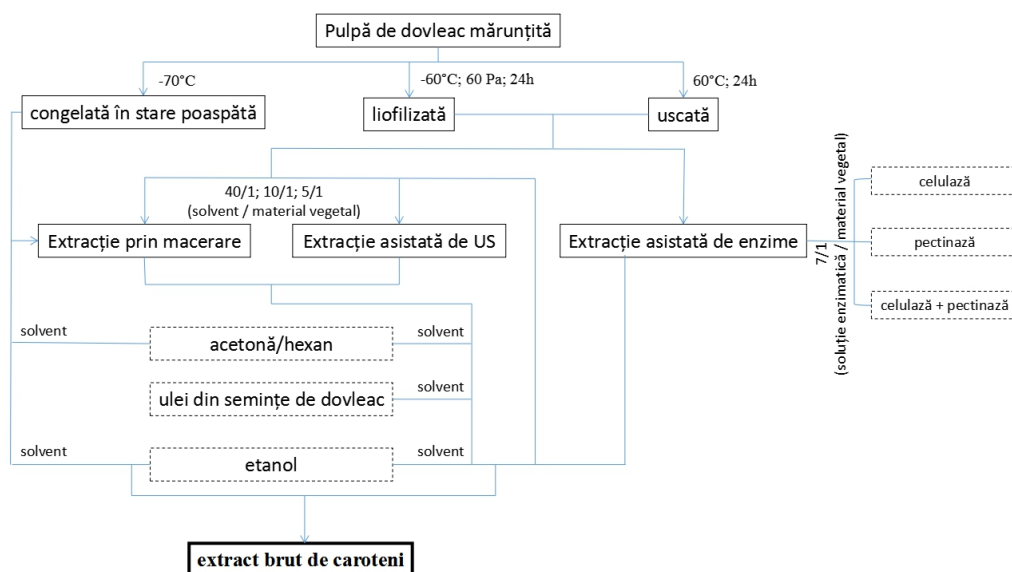
## 2. CONTRIBUȚII PRIVIND VALORIFICAREA UNOR RESURSE VEGETALE AUTOHTONE CU CONȚINUT RIDICAT DE COMPUȘI BIOACTIVI DE INTERES PENTRU DEZVOLTAREA DE NOI PRODUSE - REZUMAT

### OBIECTIVELE CERCETĂRII

Obiectivele acestei părți specifice a tezei de doctorat sunt:

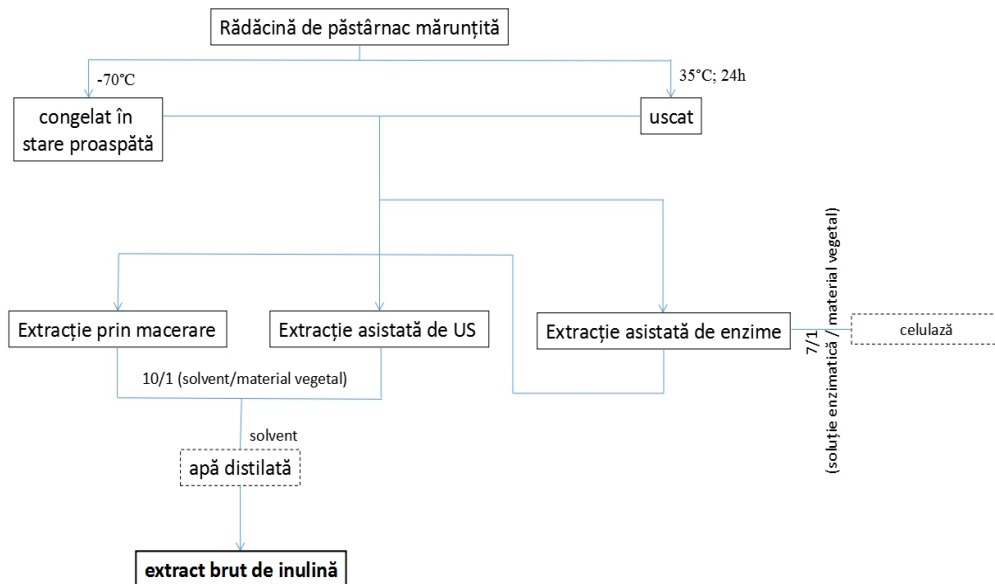
- identificarea și selectarea unor resurse vegetale autohtone sustenabile, altele decât plantele medicinale care sunt des utilizate în scopul dezvoltării de suplimente alimentare, cu un conținut ridicat de biomolecule din categoria carotenilor, antocianilor și fructanilor
- elaborarea unor metode adecvate de extracție eficientă a biomoleculelor vizate, pentru obținerea cu randament ridicat a extractelor bioactive.

### Elaborarea de metode de extracție a compușilor bioactivi de interes din pulpa de dovleac



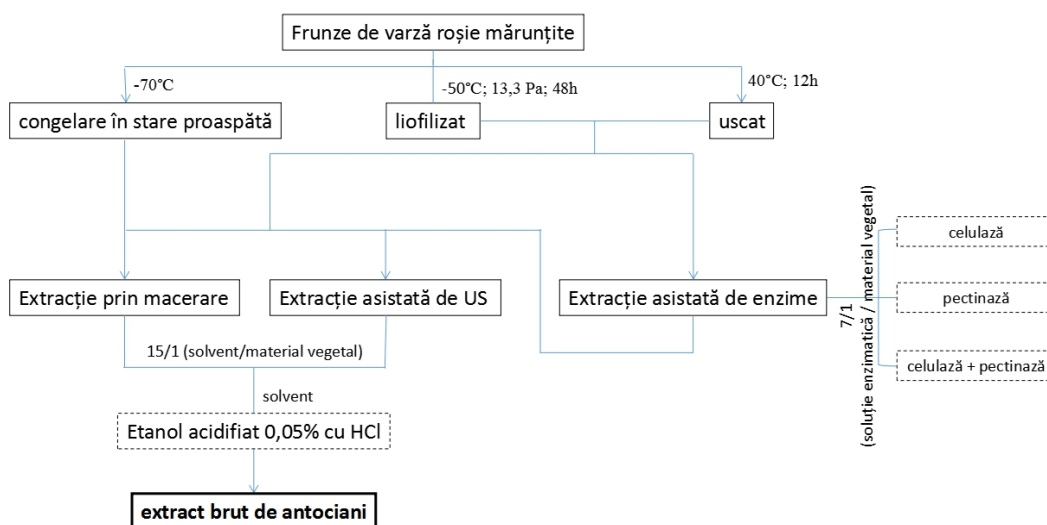
Schema cuprinzând tehnologiile extractive a  $\beta$ -carotenilor aplicate pulpei de dovleac.

## Elaborarea de metode de extracție a compușilor bioactivi de interes din rădăcina de păstârnac



Schema cuprinzând tehnologiile extractive a inulinei aplicate rădăcinii de păstârnac.

## Elaborarea de metode de extracție a compușilor bioactivi de interes din varza roșie



Schema cuprinzând tehnologiile extractive a antocianilor aplicate frunzelor de varză roșie.

Plantele identificate ca materii prime valoroase pentru potențialul lor bioactiv și studiate în prezenta teză de doctorat au fost atent selecționate, pe baza unor criterii de sustenabilitate.

În această parte specifică a tezei de doctorat au fost prezentate criteriile care au stat la baza selecționării materiilor prime și elaborarea metodelor de extracție eficientă a compușilor bioactivi vizați ( $\beta$ -caroteni, inulină, antociani). Astfel, materiile prime au fost ales pe baza următoarelor aspecte: specii de plante autohtone, neexploatate sau puțin exploatate în scopurile stabilite în prezenta teză, materii prime accesibile economic, care să aibă un conținut ridicat de compuși bioactivi cu rol benefic în special la nivelul sistemului imunitar. Antioxidanții naturali de tipul  $\beta$ -carotenilor și compușilor polifenolici (ex. antociani) au un efect protector asupra celulelor sistemului imunitar, iar prebioticele (inulina) contribuie la stimularea sistemului imunitar prin căi de acțiune directe sau indirecte.

Datorită conținutului mare de compuși carotenoidici, pulpa de dovleac plăcintar (*Cucurbita maxima* populație locală var. Tudor) constituie o sursă bogată în antioxidanți naturali, în special  $\beta$ -caroteni.

Rădăcina de păstârnac (*Pastinaca sativa*) este o sursă bogată în fructani de tipul inulinei, prebiotice cu efecte imunostimulatoare. De asemenea, compușii polifenolici prezenți în cantități mari în extractele apoase indică un efect puternic antioxidant.

Varza roșie (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) este bogată în antociani, pigmenți care au un efect protector asupra degradării oxidative și efect imunostimulator. În plus, datorită compoziției chimice, această materie primă contribuie la aportul corespunzător de vitamine și minerale esențiale, fiind o sursă bogată în vitamina C și alți antioxidanți.

Tehnicile extractive au fost selectate ținând cont atât de posibilitatea extracției unei cantități cât mai mari de compuși bioactivi, dar și de principiile sustenabilității referitoare la consumul minim de reactivi și de consumul acelor solvenți prietenoși cu mediul.

Macerarea a fost testată ca metodă clasică de extracție a moleculelor bioactive de interes din cele trei matrici vegetale, urmărind utilizarea unui raport solvent/solid cât mai mic, și a unor solvenți agreeți în industria alimentară (apă, etanol, ulei vegetal).

De asemenea, s-a testat extracția asistată de ultrasunete ca tehnică neconvențională, utilizată cu scopul reducerii timpului și a cantității de solvent folosită pentru cele trei resurse vegetale, metoda aplicată fiind controlată din punct de vedere al temperaturii procesului, o valoare ridicată putând influența negativ compușii termolabili ( $\beta$ -caroteni, antociani).



Pentru optimizarea extracției compușilor bioactivi de interes, s-a testat și o a treia variantă extractivă combinată (biotehnologică) prin care cele trei materii prime vegetale au fost supuse unui tratament enzimatic utilizând enzimele celulază și/sau pectinază, urmat de extracția compușilor bioactivi vizați prin metoda clasică a macerării și respectiv prin tehnica modernă de extracție asistată de ultrasunete.

### **3. CERCETĂRI EXPERIMENTALE PRIVIND OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA BIOEXTRACTELOR BOGATE ÎN PRINCIPII BIOLOGIC ACTIVE DIN MATERIILE PRIME SELECTATE - REZUMAT**

Acest capitol cuprinde rezultatele experimentale obținute în urma analizelor efectuate cu scopul obținerii unor extracte bogate în compuși bioactivi de interes, din resursele vegetale selectate (caroteni - din pulpa de *Cucurbita maxima*, fructani de tipul inulinei - din rădăcina de *Pastinaca sativa*, populație autohtonă Bielas, antociani - din frunzele de *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*). În acest sens au fost testați diferiți parametri de proces, precum timpul, temperatura de extracție, raportul solvent/solid și diverși solvenți inclusiv cei prietenoși cu mediul (apă, etanol de diferite concentrații, ulei vegetal). De asemenea, au fost testate metode de extracție clasice (macerarea) și moderne (extracția asistată de ultrasunete și extracția asistată de enzime) și combinații a celor două categorii de metode.

Dintre metodele neconvenționale, în prezentul studiu s-a aplicat pentru prima dată tehnica de extracție utilizând o combinație enzimatică de pectinază și celulază, asupra materialelor vegetale selectate, pre-tratate prin uscare sau liofilizare. De asemenea, s-au testat diferite rapoarte solvent/solid ca parametri de proces ai tehnicilor de macerare și extracție cu ultrasunete, cu scopul utilizării unei cantități minime de solvent.

Rezultatele experimentale obținute în urma analizei conținutului de molecule bioactive de interes din extractele realizate prin cele 3 tehnici extractive, au fost analizate comparativ, cu scopul identificării acelor care sunt cele mai eficiente, respectând în același timp principiile sustenabilității referitoare la consumul minim de energie și reactivi.

Comparând valorile obținute, s-a demonstrat faptul că fiecare din cele 3 resurse vegetale autohtone selectate prezintă particularitățile sale cu privire la eficiența tehnicii de extracție aplicate și a parametrilor de proces utilizați pentru obținerea probelor bogate în principii active. Astfel, extracția carotenilor din pulpa de dovleac s-a realizat cel mai eficient prin metoda clasică a macerării, inulina din rădăcina de păstârnac s-a extras eficient prin tehnica de extracție asistată de enzime combinată cu tehnica extracției asistată de ultrasunete, iar antocianii din frunzele de varză roșie s-au extras eficient prin tehnica asistată de enzime combinată cu metoda clasică a macerării.

În urma analizei comparative rezultatelor experimentale obținute, s-au determinat condițiile optime de extracție, utilizate în continuare pentru formularea optimă a suplimentului alimentar nou dezvoltat, alcătuit din două extracte apoase - extractul de antociani și extractul de fructani de tipul inulinei și un extract uleios, realizat în ulei obținut din semințe de floarea soarelui, îmbogățit cu  $\beta$ -caroten extras din pulpa de dovleac.

Studiile au urmărit determinarea condițiilor optime de extracție a compușilor bioactivi din legume de origine autohtonă, în principal  $\beta$ -carotenul din pulpa de dovleac plăcintar, inulina din rădăcina de păstârnac și antocianii din frunzele de varza roșie. Acești compuși bioactivi, alături de alți compuși cum ar fi polifenolii prezintă proprietăți de stimulare a sistemului imunitar, fiind utilizați în capitolele următoare pentru dezvoltarea unui produs inovativ, de uz alimentar.

Conținutul total de compuși bioactivi a fost determinat sub influența diferiților parametri de extracție, precum solventul, temperatura de extracție, raportul solvent/solid, timpul și amplitudinea undelor acustice, utilizând 3 tehnici extractive, macerarea, extracția asistată de ultrasunete și extracția asistată de enzime, precum și a pre-tratamentelor aplicate materiei prime (congelare, uscare, liofilizare).

În ceea ce privește extracția  $\beta$ -carotenului din pulpa de dovleac, în urma aplicării celor 3 tehnici de extracție, utilizând diferite combinații de parametri care ar putea influența cantitatea lor extractul final, cel mai mare conținut ( $62,6 \pm 1,1$  mg  $\beta$ -caroten/100 g s.u.) s-a obținut în materialul vegetal vegetal liofilizat, prin aplicarea metodei clasice a macerării, timp de 2 ore în solventul de referință, acetonă/hexan (1/1), la temperatura camerei, în raport solvent/solid de 40/1. Un conținut apreciabil de caroteni de 61,13 mg  $\beta$ -caroten/100 g s.u., s-a obținut în extractul realizat din același tip de material vegetal (liofilizat), folosind uleiul din semințe de dovleac obținut prin presare la rece, ca alternativă de solvent organic, prietenos cu mediul, în raport solvent solid de 10/1. Analizând comparativ rezultatele experimentale obținute s-a observat că, indiferent de tehnica de extracție aplicată și de solventul utilizat, în extractele din materialul vegetal liofilizat s-au identificat cele mai mari conținuturi de molecule bioactive de interes.

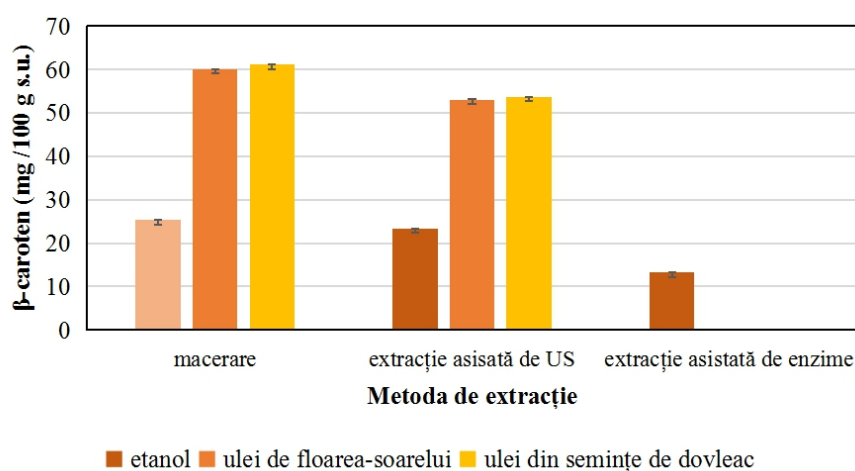
Prin aplicarea extracției asistate de ultrasunete, utilizând raportul solvent/solid de 10/1, timpul de extracție de 30 de minute, la amplitudinea undelor acustice de 70%, s-au obținut valori ale conținutului de  $\beta$ -caroten mai scăzute în probele de dovleac liofilizat, comparativ cu cele obținute prin metoda clasică, acestea fiind influențate în principal de temperatura de extracție.

Prin tehnica de extracție asistată de enzime, combinată cu macerarea, în urma incubării materialului vegetal liofilizat cu celulază (122,5 U/g) și pectinază (100 U/g), timp de 120 de

minute la temperatura de 40°C, urmat de extracția clasică prin macerare în etanol 70%, s-a obținut un conținut de  $\beta$ -caroten redus la jumătate față de valorile obținute prin utilizarea tehnicilor de macerare respectiv de extracție cu US, în același solvent, rezultatele fiind probabil influențate de expunerea îndelungată a moleculelor termolabile de caroten la acțiunea temperaturilor mai crescute din timpul incubării cu soluția enzimatică.

Pentru realizarea extractului utilizat la dezvoltarea noului suplimentului alimentar s-a aplicat extracția prin metoda clasică a macerării, în ulei din semințe de dovleac, utilizând materialul vegetal liofilizat în raport solvent/solid de 10/1, timp de 30 de minute în acest extract determinându-se un conținut de polifenoli de  $110.7 \pm 3,5$  mg GAE /100g.

În urma analizei activității antioxidante, determinată prin metoda FRAP, în extractele realizate în etanol 70%, din pulpa liofilizată de dovleac, prin aplicarea parametrilor optimi ai celor 3 tehnici extractive, cel mai mare conținut, de  $55,25 \pm 1,5$  mg acid ascorbic/ 100 g s.u., s-a identificat în proba macerată timp 30 de minute în raport solvent/solid de 10/1, aceasta fiind cu 9% mai mare față de activitatea antioxidantă a extractului obținut prin extracția asistată de enzime combinată cu macerarea, respectiv cu 12% mai mare față de cea identificată în extractul obținut prin tehnica modernă de extracție asistată de US.

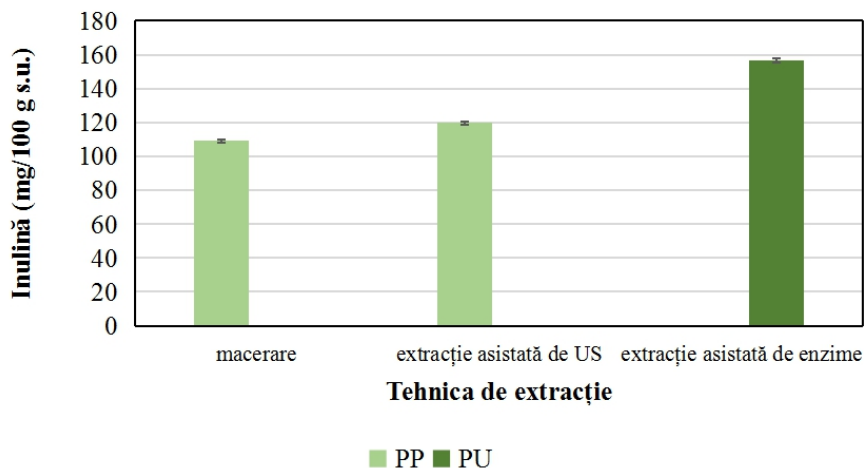


**Conținutul de  $\beta$ -caroten din proba DL, în funcție de tehnica de extracție aplicată și de tipul de solvent utilizat (raport solvent/solid= 10/1).**

În cea ce privește extracția fructanilor de tipul inulinei din probele de rădăcină de păstârnac în apă distilată, în raport solvent/solid de 10/1, utilizând metoda clasică de extracție prin macerare la temperatura de 80°C, timp de 2 ore, în două etape succesive, în proba proaspătă, s-a obținut un conținut de aproximativ 2 ori mai mare în comparație cu cel obținut în proba uscată.

În extractele realizate prin tehnica modernă de extracție cu US, timp de 5 minute, la amplitudinea undelor acustice de 70% s-a obținut un conținut cu aproximativ 9% mai mare comparativ cu cel obținut în extractul macerat timp de 2 ore, în două etape succesive, în proba de păstârnac proaspăt, rezultat ce indică faptul că utilizarea tehnicii neconvenționale de extracție este o metodă rapidă și eficientă de extracție a fructanilor de tipul inulinei din rădăcina de păstârnac, teorie susținută și de rezultatele obținute în probele de păstârnac uscat, în care s-a înregistrat, de asemenea, o creștere cu aproximativ 20%.

În urma aplicării celor două tehnici neconvenționale (de extracție asistată de enzime și extracție asistată cu ultrasunete) simultan, s-a înregistrat o creștere spectaculoasă a conținutului de fructani de tipul inulinei, în special în proba de păstârnac uscat, în care s-a obținut un conținut de  $156,67 \pm 3,1$  mg inulină/100g s.u., acesta fiind cu aproximativ 60% mai mare comparativ cu valorile obținute în celelalte probe.



**Conținutul de fructani de tipul inulinei obținut în urma extracției din rădăcina de păstârnac prin diferite tehnici de extracție, la parametri optimi identificați.**

Analizând rezultatele experimentale obținute, pentru realizarea extractului final, bogat în fructani de tipul inulinei, din compoziția suplimentului alimentar nou dezvoltat, s-a utilizat tehnica de extracție combinată (extracție asistată de enzime + extracție asistată de US), utilizând rădăcina de păstârnac uscată, incubată cu celuloză (122,5 U/g), în raport soluție enzimatică/probă de 7/1, timp de 180 de minute, la temperatura de 40°C, urmat de extracția în apă distilată prin tehnica asistată de US, timp de 5 minute, la un raport solvent/solid de 10/1.

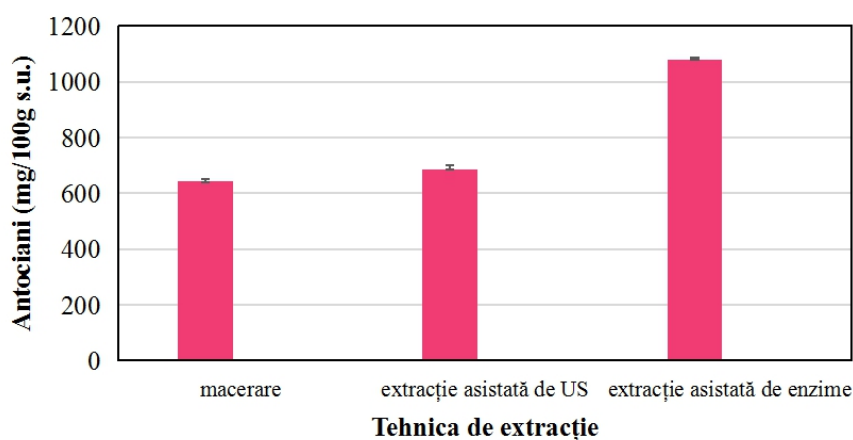
Cel mai mare conținut de compuși polifenolici din rădăcina de păstârnac (432,60 mg GAE/100 g s.u.), s-a obținut în materialul vegetal uscat, incubat cu celuloză la temperatura de 40°C, timp de 180 de minute, tratament urmat de o extracție asistată de US în apă distilată, în raport solvent solid de 10/1, timp de 5 minute, la amplitudinea de 70%, această valoare fiind

cu aproximativ 20% mai mare față de cea obținută în același tip de material vegetal, în urma extracției cu US timp de 5 minute, fără aplicarea în prealabil a tratamentului enzimatic.

Privitor la activitatea antioxidantă a extractelor de păstârnac, cele mai bune rezultate au fost obținute în probele realizate prin combinația celor două tehnici neconvenționale (extracției asistată de enzime și de extracția asistată de ultrasunete), obținându-se astfel un conținut de 25,44 mg acid ascorbic/ 100 g s.u. în proba de păstârnac uscat.

Prin aplicarea metodei clasice de extracție a antocianilor din frunzele de varză roșie, cel mai mare conținut, de  $642,655 \pm 8,2$  mg/ 100 g s.u., s-a obținut în materialul vegetal liofilizat, macerat timp de 20 de minute, la temperatura camerei, în etanol 50%, acidifiat 0,05% cu HCl, în raport solvent/solid de 15/1.

Prin aplicarea tehnicii moderne de extracție asistată de US, cel mai mare conținut de antociani ( $687,34 \pm 4,2$  mg/ 100g s.u.) s-a obținut în frunzele de varză roșie liofilizate la temperatura de  $-50^{\circ}\text{C}$ , în urma extracției timp de 20 de minute, la amplitudinea undelor acustice de 70%, în etanol 50% acidifiat 0,05% cu HCl, în raport solvent solid de 15/1, obținându-se astfel un conținut de antociani cu aproximativ 4,2% mai mare față de cel din proba macerată.



**Conținuturile de antociani obținute în urma extracției din frunzele de varză roșie liofilizate (VL), prin diferite tehnici de extracție, utilizând parametrii optimi.**

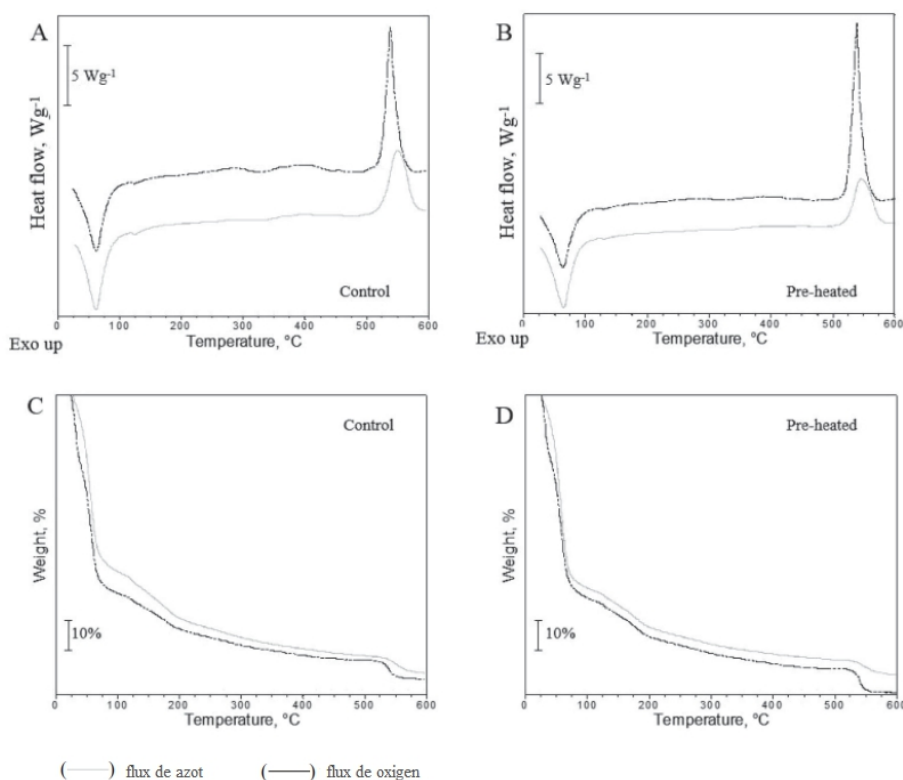
Acțiunea simultană a celulazei și pectinazei determină o creștere a conținutului de antociani în extract, deoarece atât celuloza cât și pectinaza contribuie la degradarea componentelor peretelui celular prin hidroliza legăturilor glicozidice ale polizaharidelor complexe din structura acestuia (celuloză, pectină, hemiceluloză), proces care facilitează eliberarea antocianilor din vacuole, dar și a compușilor fenolici legați de peretele celular. Astfel, cel mai mare conținut, de  $1078,834 \pm 8,2$  mg antociani/100g s.u., s-a obținut în

materialul vegetal liofilizat, în urma aplicării tratamentului enzimatic la temperatura de incubare de 47°C, utilizând o soluție formată din celulază și pectinază, metodă combinată cu extracția clasică a macerării, în etanol 50% acidifiat 0,05% cu HCl, timp de 20 de minute, în 3 etape succesive, la un raport solvent/solid de 15/1, obținându-se astfel un conținut cu aproximativ 40% mai mare față de celelalte probe.

Pentru obținerea extractului din compoziția suplimentului alimentar nou dezvoltat, s-au aplicat cele două metode combinate de extracție (extracția asistată de enzime + 3 x extracția prin macerare), utilizând parametrii descriși anterior. În proba astfel obținută s-a identificat cel mai mare conținut de compuși fenolici, de 1637,2±8,3 mg GAE/100g s.u. respectiv cea mai puternică activitate antioxidantă, de 135,91±3,3 mg AAE/100g s.u.)

Stabilitatea termică a antocianilor din extractul antocianic de varză roșie a fost studiată în condițiile de pH 3,5, la temperaturi de 50°C și respectiv 80°C. Degradarea termică a antocianilor a urmat un model cinetic de ordinul I, parametrii cinetici determinați fiind constanta de viteză,  $k$ , de  $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  și timpul de înjumătățire,  $t_{1/2}$ , de 405 minute (6,7 ore).

Degradarea termo-oxidativă a antocianilor, determinată prin analiza termică DSC și TGA evidențiază mai multe etape de degradare a antocianilor din frunzele de varză roșie, majoritatea evenimentelor surprinse în analiza DSC fiind corelate cu cele din analiza TG.



**Curbele DSC (A, B) și TG (C, D) a probelor control și pre-tratate termic, analizate sub flux de azot și respectiv de oxigen.**

#### 4. CERCETĂRI EXPERIMENTALE DE VALIDARE A PROPRIETĂȚILOR IMUNOSTIMULATOARE ALE UNOR FORMULĂRI NOI DE PRODUSE BAZATE PE BIOEXTRACTELE PREPARATE - REZUMAT

Acest capitol cuprinde date originale cu privire la formularea unui nou tip de supliment alimentar dezvoltat ca emulsie în 2 variante experimentale obținute prin combinarea celor trei categorii de extracte bogate în compuși biologic activi - caroteni, fructani de tipul inulinei și antociani - extrași prin tehnici eficiente din resursele vegetale autohtone selectate pentru această teză de doctorat, și anume dovleac plăcintar (*Cucurbita maxima* var. Tudor), rădăcina de păstârnac (*Pastinaca sativa*, soi Bielas) și frunze de varză roșie (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*).

Pentru realizarea extractelor s-au utilizat tehnicile de extracție care s-au dovedit a fi cele mai eficiente, determinate pe baza studiilor preliminare efectuate pentru fiecare material vegetal în parte, prezentate în capitolul anterior. În acest sens, s-au testat tehnici clasice de extracție (macerare) precum și tehnici moderne (extracția asistată de ultrasunete US și extracția asistată de enzime combinată cu macerarea sau US), prin combinarea unor parametrii experimentali diferiți din punct de vedere al timpului și temperaturii de extracție, al solventului și al raportului solvent/solid.

Întrucât compușii bioactivi vizați aparțin a două categorii diferite din punct de vedere al solubilității, caroteni fiind compuși lipofilici, antocianii și fructanii de tipul inulinei fiind compuși hidrofilici, în scopul obținerii unui amestec omogen, s-a decis ca produsul nou dezvoltat să fie prezentat sub forma unei emulsii.

În prezentul capitol au fost dezvoltate două noi produse de tip emulsie, cu aplicație practică ca suplimente alimentare antioxidante și anti-inflamatoare. Pentru stabilizarea emulsiilor dezvoltate, s-au utilizat aditivi sau stabilizatori naturali (guma de guar selectată în urma unor teste preliminare complexe), cu scopul principal de a încetini destabilizarea cinetică. Astfel, pentru a obține un amestec omogen din extractul uleios de  $\beta$ -caroteni, extractul hidroalcoolic de antociani și extractul apos de fructooligozaharide (inulina), au fost testate mai multe variante de concentrații și combinații între aditivi alimentari naturali cu rol de emulgatori (lecitina din soia, guma arabică și guma guar). Acești aditivi sunt agreați de



Uniunea Europeană spre a fi utilizați în alimentație, iar dintre ei, doar lecitina prezintă o doză maximă admisă, de până la 5000 mg/l.

În urma testelor preliminare, în care s-a urmărit stabilitatea în timp a emulsiilor în care au fost adăugate diferite procente de aditivi naturali, s-a stabilit ca varianta optimă emulsia cu adaos de 0,5% gumă guar, procent raportat la masa totală a soluției, care este stabilă timp de 7-8 zile.

Pentru dezvoltarea unui produs nou, inovativ de tip emulsie bioactivă pe baza celor 3 ingrediente vegetale investigate, au fost stabilite două rețete, diferite din punct de vedere al conținutului de molecule bioactive, pe baza studiilor cu privire la efectele interacțiunii între aceste biomolecule.

Emulsiile au fost analizate atât din punct de vedere al stabilității în timp, cât și din punct de vedere al conținutului și al activității biologice manifestate. Stabilitatea în timp determinată prin analiza la microscopul optic a emulsiilor nou dezvoltate a fost de 7-8 zile în cazul ambelor variante propuse. Analizând vâscozitatea emulsiei la temperaturi cuprinse între 4° și 40°C s-a observat o scădere a acesteia odată cu creșterea temperaturii, fapt ce indică o influență negativă a temperaturii crescute asupra stabilității în timp, întrucât o emulsie cu o vâscozitate mică este predispusă apariției fenomenelor de destabilizare. Pe baza acestei analize, se recomandă depozitarea la temperatura de 4°C (temperatura de refrigerare), temperatură la care tensiunea superficială a celor două lichide componente este mare, fapt ce contribuie la creșterea stabilității în timp.

În urma analizei conținutului de compuși bioactivi din compoziția celor două emulsii nou dezvoltate, s-au observat diferențe, acestea fiind datorate raportului diferit dintre cele 3 tipuri de extracte din formulele analizate. Astfel, cele mai mari conținuturi de antociani (523,3±4,3 mg/100 g) și β-caroteni (2933±6,2 mg/100 ml) au fost determinate în emulsia E1, în timp ce în emulsia E2 s-a determinat cel mai mare conținut de fructani de tipul inulinei (1589±6,6 mg/100 ml).

În scopul validării proprietăților bioactive ale noilor produse dezvoltate, s-a analizat activitatea antioxidantă, antiinflamatoare și antibacteriană. Astfel, rezultatele privind activitatea antioxidantă a extractelor și a emulsiilor nou dezvoltate, determinată prin metodele FRAP și DPPH, au arătat că extractul de antociani prezintă cea mai intensă acțiune antioxidantă (41,67±0,6 mg AAE/100 ml extract, 18,91±0,2% DPPH), fiind urmat de extractul de β-caroteni (40,41±0,1 mg AAE/100 ml extract, 16,83±0,1% DPPH). Acest lucru s-a reflectat și în activitatea antioxidantă mai intensă a primei variante de emulsii, E1, care conține 50% extract de β-caroteni și 25% extract de antociani.

Rezultatele obținute în urma testării proprietăților antiinflamatoare ale extractelor și a celor două emulsii nou dezvoltate au dus la concluzia că extractul de antociani are o puternică activitate antiinflamatoare (30,09%), apropiată de cea a acidului acetilsalicilic utilizat ca martor (30,67%), fiind urmat de extractul de  $\beta$ -caroteni (26,05). Dintre emulsii, prima variantă formulată, E1, având o compoziție de 25% antociani și 50%  $\beta$ -caroteni, prezintă o activitate antiinflamatoare mai accentuată cu 4,21% comparativ cu emulsia care are un conținut de 15% antociani și 25% caroteni. Cu toate acestea, ambele formulări de emulsii au demonstrat un efect antiinflamator mai puternic decât cel al acidului acetilsalicilic.

În cea ce privește activitatea antibacteriană testată pe tulpinile *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter* sp. ATCC 23355 și *Streptococcus haemolyticus*, rezultatele obținute au arătat o ușoară inhibiție dovedită de extractul de antociani, de inulină și respectiv de emulsia E1 asupra dezvoltării tulpinii de *Streptococcus haemolyticus*, indicând faptul că aceste extracte/ emulsii pot avea un potențial efect antibacterian, dar în concentrații mai mari.

Obținerea unui produs de tip emulsie, cu o stabilitate de până la 8 zile, prin utilizarea exclusivă a ingredientelor naturale vegetale, agreate și de vegetarieni, a cărei acțiune antiinflamatoare este comparabilă cu cea a acidului acetilsalicilic (aspirina), reprezintă un rezultat notabil, drept pentru care a fost depusă și înregistrată la OSIM o Cerere de Brevet de Invenție ([Oancea S., Tecucianu A.C., Dulf FV., 2020](#)).

## 5. CONCLUZII FINALE, CONTRIBUȚII PROPRII ȘI DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE

1. Pentru îndeplinirea scopului propus, de dezvoltare a unui produs de tip supliment alimentar inovativ, cu o compoziție unică, au fost selectate următoarele tipuri de compuși biologici: antioxidanții naturali de tipul  $\beta$ -carotenilor și compușilor polifenolici (antociani) care au un efect protector asupra celulelor sistemului imunitar, și prebioticele (inulina), care contribuie la stimularea sistemului imunitar prin căi de acțiune directe sau indirecte.
2. Materiile prime, valoroase pentru potențialul lor bioactiv și studiate în prezenta teză de doctorat au fost atent selecționate, pe baza unor criterii de sustenabilitate, bazate pe următoarele aspecte: specii de plante autohtone, neexploatate sau puțin exploatate în scopurile stabilite în prezenta teză, materii prime accesibile economic, care să aibă un conținut ridicat de compuși bioactivi cu rol benefic în special la nivelul sistemului imunitar.
3. Pentru îndeplinirea scopului propus, au fost selectate următoarele resurse vegetale: dovleacul plăcintar (*Cucurbita maxima* populație locală var. Tudor), care constituie o sursă bogată în antioxidanți naturali, în special  $\beta$ -caroteni, rădăcina de păstârnac (*Pastinaca sativa*), care este o sursă bogată în fructani de tipul inulinei, prebiotice cu efecte imunostimulatoare, și varza roșie (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) care este bogată în antociani, pigmenți care manifestă un efect protector asupra degradării oxidative și efect imunostimulator.
4. Tehnicile extractive au fost selectate ținând cont atât de necesitatea extracției unei cantități cât mai mari de compuși bioactivi, dar și de principiile sustenabilității referitoare la consumul minim de reactivi și de utilizare a acelor solvenți prietenoși cu mediul.
5. Macerarea a fost testată ca metodă clasică de extracție a moleculelor bioactive de interes din cele trei matrici vegetale, urmărind utilizarea unui raport solvent/solid cât mai mic, și a unor solvenți agreați în industria alimentară (apă, etanol, ulei vegetal). De asemenea, s-a testat extracția asistată de ultrasunete ca tehnică neconvențională, utilizată cu scopul reducerii timpului și a cantității de solvent folosită pentru cele trei resurse vegetale, metoda aplicată fiind controlată din punct de vedere al temperaturii procesului, o valoare ridicată putând influența negativ compușii termolabili ( $\beta$ -caroteni, antociani). Pentru optimizarea extracției compușilor bioactivi de interes, s-a testat și o a treia variantă extractivă combinată (biotehnologică) prin care cele trei materii prime vegetale au fost supuse unui tratament

enzimatic utilizând enzimele celuloză și/sau pectinază, urmat de extracția compușilor bioactivi vizați prin metoda clasică a macerării și respectiv prin tehnica modernă de extracție asistată de ultrasunete.

6. Conținutul total de compuși bioactivi a fost determinat sub influența diferiților parametrii de extracție, precum solventul, temperatura de extracție, raportul solvent/solid, timpul și amplitudinea undelor acustice, utilizând 3 tehnici extractive, macerarea, extracția asistată de ultrasunete și extracția asistată de enzime, precum și a pre-tratamentelor aplicate materiei prime (congelare, uscare, liofilizare).

7. În ceea ce privește extracția  $\beta$ -carotenului din pulpa de dovleac, în urma aplicării celor 3 tehnici de extracție, utilizând diferite combinații de parametrii care ar putea influența cantitatea lor în extractul final, cel mai mare conținut ( $62,6 \pm 1,1$  mg  $\beta$ -caroten/100 g s.u.) s-a obținut în materialul vegetal liofilizat, prin aplicarea metodei clasice a macerării, timp de 2 ore în acetonă/hexan (1/1), la temperatura camerei, în raport solvent/solid de 40/1. Un conținut apreciabil de  $\beta$ -caroteni de 61,13 mg  $\beta$ -caroten/100 g s.u., s-a obținut în extractul realizat din același tip de material vegetal (liofilizat), folosind uleiul din semințe de dovleac obținut prin presare la rece, ca alternativă la solvenții organici, fiind prietenos cu mediul, în raport solvent solid de 10/1. Analizând comparativ rezultatele experimentale obținute s-a observat că, indiferent de tehnica de extracție aplicată și de solventul utilizat, în extractele din materialul vegetal liofilizat s-au identificat cele mai mari conținuturi de molecule bioactive de interes.

8. Prin aplicarea extracției asistate de ultrasunete, utilizând raportul solvent/solid de 10/1, timp de 30 de minute, la amplitudinea undelor acustice de 70%, s-au obținut valori ale conținutului de  $\beta$ -caroten mai scăzute în probele de dovleac liofilizat, comparativ cu cele obținute prin metoda clasică, acestea fiind influențate în principal de temperatura de extracție.

9. Prin tehnica de extracție asistată de enzime, combinată cu macerarea, în urma incubării materialului vegetal liofilizat cu celuloză (122,5 U/g) și pectinază (100 U/g), timp de 120 de minute la temperatura de 40°C, urmat de extracția clasică prin macerare în etanol 70%, s-a obținut un conținut de  $\beta$ -caroten redus la jumătate față de valorile obținute prin utilizarea tehnicilor de macerare respectiv de extracție cu US, în același solvent, rezultatele fiind probabil influențate de expunerea îndelungată a moleculelor termolabile de  $\beta$ -caroten la acțiunea temperaturilor crescute din timpul incubării cu soluția enzimatică.

10. Pentru realizarea extractului utilizat la dezvoltarea noului suplimentului alimentar s-a aplicat extracția prin metoda clasică a macerării, în ulei din semințe de dovleac, utilizând materialul vegetal liofilizat în raport solvent/solid de 10/1, timp de 30 de minute în acest extract determinându-se un conținut de polifenoli de  $110,7 \pm 3,5$  mg GAE /100g.

11. În urma analizei activității antioxidante, determinată prin metoda FRAP, în extractele realizate în etanol 70%, din pulpa liofilizată de dovleac, prin aplicarea parametrilor optimi ai celor 3 tehnici extractive, cel mai mare conținut, de  $55,25 \pm 1,5$  mg acid ascorbic/ 100 g s.u., s-a identificat în proba macerată timp 30 de minute în raport solvent/solid de 10/1, aceasta fiind cu 9% mai mare față de activitatea antioxidantă a extractului obținut prin extracția asistată de enzime combinată cu macerarea, respectiv cu 12% mai mare față de cea identificată în extractul obținut prin tehnica modernă de extracție asistată de US.
12. În ceea ce privește extracția fructanilor de tipul inulinei din probele de rădăcină de păstârnac prin metoda macerării, timp de 2 ore, în două etape succesive, în proba proaspătă s-a obținut un conținut de aproximativ 2 ori mai mare în comparație cu cel obținut în proba uscată.
13. În extractele realizate prin tehnica modernă de extracție cu US, timp de 5 minute, la amplitudinea undelor acustice de 70% s-a obținut un conținut cu aproximativ 9% mai mare comparativ cu cel obținut în extractul macerat timp de 2 ore în două etape succesive, în proba de păstârnac proaspăt, rezultat ce indică faptul că utilizarea tehnicii neconvenționale de extracție este o metodă rapidă și eficientă de extracție a fructanilor de tipul inulinei din rădăcina de păstârnac, teorie susținută și de rezultatele obținute în probele de păstârnac uscat, în care s-a înregistrat, de asemenea, o creștere cu aproximativ 20%.
14. În urma aplicării celor două tehnici neconvenționale (de extracție asistată de enzime și extracție asistată cu ultrasunete) simultan, s-a înregistrat o creștere spectaculoasă a conținutului de fructani de tipul inulinei, în special în proba de păstârnac uscat, în care s-a obținut un conținut de  $156,67 \pm 3,1$  mg inulină/100g s.u., acesta fiind cu aproximativ 60% mai mare comparativ cu valorile obținute în celelalte probe.
15. Analizând rezultatele experimentale obținute, pentru realizarea extractului final, bogat în fructani de tipul inulinei, din compoziția suplimentului alimentar nou dezvoltat, s-a utilizat tehnica de extracție combinată (extracție asistată de enzime + extracție asistată de US), utilizând rădăcină de păstârnac uscată, incubată cu celuloză (122,5 U/g), în raport soluție enzimatică/probă de 7/1, timp de 180 de minute, la temperatura de 40°C, urmat de extracția în apă distilată prin tehnica asistată de US, timp de 5 minute, la un raport solvent/solid de 10/1.
16. Cel mai mare conținut de compuși polifenolici din rădăcina de păstârnac (432,60 mg GAE/100 g s.u.), s-a obținut în materialul vegetal uscat, incubat cu celuloză la temperatura de 40°C, timp de 180 de minute, tratament urmat de o extracție asistată de US în apă distilată, în raport solvent solid de 10/1, timp de 5 minute, la amplitudinea de 70%, această valoare fiind cu aproximativ 20% mai mare față de cea obținută în același tip de material vegetal, în urma extracției cu US timp de 5 minute, fără aplicarea în prealabil a tratamentului enzimatic.

17. Privitor la activitatea antioxidantă a extractelor de păstârnac, determinată prin metoda FRAP, cele mai bune rezultate au fost obținute în probele realizate prin combinația celor două tehnici neconvenționale (extracția asistată de enzime și de extracția asistată de ultrasunete), obținându-se astfel un conținut de 25,44 mg acid ascorbic/ 100 g s.u. în proba de păstârnac uscat.

18. Prin aplicarea metodei clasice de extracție a antocianilor din frunzele de varză roșie, cel mai mare conținut, de  $642,655 \pm 8,2$  mg/ 100 g s.u., s-a obținut în materialul vegetal liofilizat, macerat timp de 20 de minute, la temperatura camerei, în etanol 50%, acidifiat 0,05% cu HCl, în raport solvent/solid de 15/1.

19. Prin aplicarea tehnicii moderne de extracție asistată de US, cel mai mare conținut de antociani ( $687,34 \pm 4,2$  mg/ 100g s.u.) s-a obținut în frunzele de varză roșie liofilizate la temperatura de  $-50^{\circ}\text{C}$ , în urma extracției timp de 20 de minute, la amplitudinea undelor acustice de 70%, în etanol 50% acidifiat 0,05% cu HCl, în raport solvent solid de 15/1, obținându-se astfel un conținut de antociani cu aproximativ 4,2% mai mare față de cel din proba macerată.

20. Acțiunea simultană a celulazei și pectinazei determină o creștere a conținutului de antociani în extract, deoarece atât celuloza cât și pectinaza contribuie la degradarea componentelor peretelui celular prin hidroliza legăturilor glicozidice ale polizaharidelor complexe din structura acestuia (celuloză, pectină, hemiceluloză), proces care facilitează eliberarea antocianilor din vacuole, dar și a compușilor fenolici legați de peretele celular. Astfel, cel mai mare conținut, de  $1078,834 \pm 8,2$  mg antociani/100g s.u., s-a obținut în materialul vegetal liofilizat, în urma aplicării tratamentului enzimatic la temperatura de incubare de  $47^{\circ}\text{C}$ , utilizând o soluție formată din celuloză și pectinază, metodă combinată cu extracția clasică a macerării, în etanol 50% acidifiat 0,05% cu HCl, timp de 20 de minute, în 3 etape succesive, la un raport solvent/solid de 15/1, obținându-se astfel un conținut cu aproximativ 40% mai mare față de celelalte probe.

21. Pentru obținerea extractului din compoziția suplimentului alimentar nou dezvoltat, s-au aplicat cele două metode combinate de extracție (extracția asistată de enzime + 3 extracții succesive prin macerare), utilizând parametrii descriși anterior. În proba astfel obținută s-a identificat cel mai mare conținut de compuși fenolici, de  $1637,2 \pm 8,3$  mg GAE/100g s.u. respectiv cea mai puternică activitate antioxidantă, de  $135,91 \pm 3,3$  mg AAE/100g s.u.

22. Stabilitatea termică a antocianilor din extractul antocianic de varză roșie a fost studiată în condițiile de pH 3,5, la temperaturi de  $50^{\circ}\text{C}$  și respectiv  $80^{\circ}\text{C}$ . Degradarea termică a antocianilor a urmat un model cinetic de ordinul I, parametrii cinetici determinați fiind constanta de viteză,  $k$ , de  $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  și timpul de înjumătățire,  $t_{1/2}$ , de 405 minute (6,7 ore).

23. Degradarea termo-oxidativă a antocianilor, determinată prin analiza termică DSC și TGA a evidențiat mai multe etape de degradare a antocianilor din frunzele de varză roșie, majoritatea evenimentelor surprinse în analiza DSC fiind corelate cu cele din analiza TG.
24. Pentru valorificarea extractelor obținute au fost dezvoltate două noi produse de tip emulsie, cu aplicație practică ca suplimente alimentare antioxidante și anti-inflamatoare, emulsia E1 fiind compusă din 50% extract de  $\beta$ -caroten, 25% extract bogat în antociani și 25% extract bogat în fructani de tipul inulinei, iar emulsia E2 fiind alcătuită din 25% extract de  $\beta$ -caroten, 15% extract de antociani și 60% extract de fructani de tipul inulinei.
25. Pentru obținerea unui amestec omogen din extractul uleios de  $\beta$ -caroteni, extractul hidroalcoolic de antociani și extractul apos de fructooligozaharide (inulina), au fost testate mai multe variante de concentrații și combinații între aditivi alimentari naturali cu rol de emulgatori (lecitina din soia, guma arabică și guma guar).
26. Testarea încetirii destabilizării cinetice a emulsiilor nou dezvoltate a condus la concluzia că guma de guar în concentrație de 0,5% are efect stabilizant, fiind selectată în urma unor teste preliminare complexe.
27. Stabilitatea în timp a emulsiilor nou dezvoltate, determinată prin analiza la microscopul optic, a fost de 7-8 zile în cazul ambelor variante propuse.
28. Analiza vâscozității emulsiei la temperaturi cuprinse între 4° și 40°C a arătat o scădere a acesteia odată cu creșterea temperaturii, fapt ce indică o influență negativă a temperaturii crescute asupra stabilității în timp, întrucât o emulsie cu o vâscozitate mică este predispusă apariției fenomenelor de destabilizare. Pe baza acestei analize, se recomandă depozitarea la temperatura de 4°C (temperatura de refrigerare), temperatură la care tensiunea superficială a celor două lichide componente este mare, fapt ce contribuie la creșterea stabilității în timp.
29. În urma analizei conținutului de compuși bioactivi din compoziția celor două emulsii nou dezvoltate, s-au observat diferențe, acestea fiind datorate raportului diferit dintre cele 3 tipuri de extracte din formulele analizate. Astfel, cele mai mari conținuturi de antociani ( $523,3 \pm 4,3$  mg/100 g) și  $\beta$ -caroteni ( $2933 \pm 6,2$  mg/100 ml) au fost determinate în E1, în timp ce în E2 s-a determinat cel mai mare conținut de fructani de tipul inulinei ( $1589 \pm 6,6$  mg/100 ml).
30. În scopul validării proprietăților bioactive ale noilor produse dezvoltate, s-a analizat activitatea antioxidantă, antiinflamatoare și antibacteriană, rezultatele obținute fiind următoarele:
- Rezultatele privind activitatea antioxidantă a extractelor și a emulsiilor nou dezvoltate, determinată prin metodele FRAP și DPPH, au arătat că extractul de antociani prezintă cea mai intensă acțiune antioxidantă ( $41,67 \pm 0,6$  mg AAE/100 ml extract,  $18,91 \pm 0,2\%$

DPPH), fiind urmat de extractul de  $\beta$ -caroteni ( $40,41 \pm 0,1$  mg AAE/100 ml,  $16,83 \pm 0,1\%$  DPPH). Acest lucru s-a reflectat și în activitatea antioxidantă mai intensă a primei variante de emulsii, E1, care conține 50% extract de  $\beta$ -caroteni, 25% extract de antociani și 25% fructani.

- Rezultatele obținute în urma testării proprietăților antiinflamatoare ale extractelor și a celor două emulsii nou dezvoltate au dus la concluzia că extractul de antociani are o puternică activitate antiinflamatoare (30,09%), apropiată de cea a acidului acetilsalicilic utilizat ca martor (30,67%), fiind urmat de extractul de  $\beta$ -caroteni (26,05%). Dintre emulsii, prima variantă, E1, având o compoziție de 25% antociani, 50%  $\beta$ -caroteni și 25% fructani, prezintă o activitate antiinflamatoare mai ridicată cu 4,21% comparativ cu emulsia care are un conținut de 15% antociani și 25% caroteni 60% fructani. Cu toate acestea, ambele formulări de emulsii au demonstrat un efect antiinflamator mai puternic decât cel al acidului acetilsalicilic.
- Rezultatele obținute privind activitatea antibacteriană testată pe tulpinile standard de bacterii gram-pozitive și gram-negative, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter* sp. ATCC 23355 și *Streptococcus haemolyticus*, au arătat o ușoară inhibiție a creșterii acestora dovedită de extractul de antociani, de inulină și respectiv de emulsia E1 asupra dezvoltării tulpinii de *Streptococcus haemolyticus*, indicând faptul că aceste extracte/ emulsii pot avea un potențial efect antibacterian, dar în concentrații mai mari.

## Contribuții originale

Prin prezenta lucrare de cercetare s-au adus contribuții importante la nivel teoretic, experimental și aplicativ în domeniul extractelor de compuși bioactivi de interes selectați - antociani,  $\beta$ -caroteni, fructani de tipul inulinei, dar și a altor compuși de interes, precum compușii polifenolici, cu potențial de a conduce la obținerea unor produse valoroase, inovative, dezvoltate cu scopul beneficiilor aduse prin prisma activităților biologice, și aplicații în sectorul alimentar:

- Contribuții la îmbogățirea bazei teoretice prin sinteza realizată privind potențialele beneficii, în special asupra sistemului imunitar, ale compușilor bioactivi de interes selectați, studiu concretizat prin publicarea a două articole științifice având ca temă potențialul imunostimulator al unor categorii de compuși extrași din plante, respectiv o abordare din punct de vedere istoric a utilizării antioxidantilor în medicină și alimentație.



- Studii asupra aplicării unor tehnici extractive clasice (macerarea) și moderne (extractione asistată de ultrasunete, extractione asistată de enzime), prin utilizarea a diferiților parametrii experimentali.
- Cercetări experimentale de stabilire a condițiilor optime de extractione a compușilor bioactivi vizați din extractele preparate și propuse ca ingrediente naturale ale unor produse inovative bioactive
- Caracterizarea fizico-chimică și biologică a bioextractelor obținute
- Conceperea și dezvoltarea a două produse inovative de uz alimentar cu o stabilitate acceptabilă, prin utilizarea exclusivă a ingredientelor naturale vegetale (cele 3 bioextracte preparate), agreate și de vegetarieni, potențialul bioactiv fiind validat prin testarea proprietăților antioxidante, antiinflamatoare și antimicrobiene.

### ***Recomandări și direcții viitoare de cercetare***

Rezultatele experimentale notabile obținute în prezenta teză de doctorat se doresc a fi continuate sub aspectul standardizării extractelor obținute, întrucât, așa cum au demonstrat și alte studii realizate în acest sens, conținutul de molecule bioactive de interes variază, în cadrul aceleiași specii, de la o varietate la alta și chiar de la o plantă la alta, fiind puternic influențat de factorii de mediu și de zona geografică în care aceasta s-a dezvoltat (luminozitate, temperatură, altitudine, etc.).

O altă recomandare constă în cercetarea din punct de vedere al activității manifestate *in vitro* și *in vivo* a acțiunii sinergice a categoriilor de molecule bioactive din compoziția noilor produse dezvoltate, de tip supliment alimentar.

De asemenea, cercetările viitoare se pot îndrepta și spre abordări interdisciplinare, prin realizarea unor studii clinice, pe categorii de pacienți, pentru identificarea beneficiilor aduse asupra organismului uman, pe lângă testarea de laborator finalizată în această teză de doctorat.

## BIBLIOGRAFIE

1. Ahmadiani, N., Robbins, R. J., Collins, T. M., & Giusti, M. M. (2014). Anthocyanins contents, profiles, and color characteristics of red cabbage extracts from different cultivars and maturity stages. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(30), 7524-7531.
2. Alarifi, S., Bell, A., & Walton, G. (2018). In vitro fermentation of gum acacia–impact on the faecal microbiota. *International journal of food sciences and nutrition*, 69(6), 696-704.
3. Allen, R.G.; Tresini, M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, pp. 463-499.
4. Allsopp, P., Possemiers, S., Campbell, D., Oyarzábal, I. S., Gill, C., & Rowland, I. (2013). An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from *Agave angustifolia* and the associated anticancer activity. *Anaerobe*, 22, 38-44.
5. Al-Shaban, S. A. W., Al-Wasiti, E., & Al-Salihi, A. (2016). Evaluation of the level of DNA damage and repair in human lymphocytes cultured in the presence of Beta-Carotene using comet assay (single cell gel electrophoresis). *Iraqi Journal of Community Medicine*, 29(1), 11-15.
6. Ananga, A.; Georgiev, V.; Ochieng, J.; Tslova, V. (2013). Production of Anthocyanins in Grape Cell Cultures: A Potential Source of Raw Material for Pharmaceutical, Food, and Cosmetic Industries. In D. Poljuha, & B. Sladonja (Eds.), *The Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive*.
7. Aparicio-Ruiz, R., Mínguez-Mosquera, M. I., & Gandul-Rojas, B. (2011). Thermal degradation kinetics of lutein,  $\beta$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin in virgin olive oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(6), 811-820.
8. Apolinário, A. C., de Carvalho, E. M., de Lima Damasceno, B. P. G., da Silva, P. C. D., Converti, A., Pessoa Jr, A., & da Silva, J. A. (2017). Extraction, isolation and characterization of inulin from *Agave sisalana* boles. *Industrial Crops and Products*, 108, 355-362.
9. Assegehegn, G., Brito-de la Fuente, E., Franco, J. M., & Gallegos, C. (2018). The Importance of Understanding the Freezing Step and its Impact on Freeze Drying Process Performance. *Journal of pharmaceutical sciences*.
10. Association of Official Analytical (A.O.A.C.). (2005). *Official methods of analysis, association of official analytical chemists*, 18 ed., Maryland, USA.
11. Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.), & Association of Official Agricultural Chemists (US). (1925). *Official methods of analysis* (Vol. 2). Association of Official Agricultural Chemists.
12. Aviram, M.; Kaplan, M.; Fuhrman, B. (2005). Dietary antioxidants and paraoxonases against LDL oxidation and atherosclerosis development. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 170, pp. 263-300.
13. Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436.
14. Baby, K.C., Ranganathan, T.V. (2013). Enzyme -Assisted extraction of Bioingredients. *Chemical Weekly*, 213-224
15. Bagchi, D., Sen, C. K., Bagchi, M., & Atalay, M. (2004). Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochemistry (Moscow)*, 69(1), 75-80.
16. Bai, L., Huan, S., Li, Z., & McClements, D. J. (2017). Comparison of emulsifying properties of food-grade polysaccharides in oil-in-water emulsions: Gum arabic, beet pectin, and corn fiber gum. *Food Hydrocolloids*, 66, 144-153.
17. Baker, D.L.; Krol, E.S.; Jacobsen, N.; Liebler, D.C. (1999). Reactions of beta-carotene with cigarette smoke oxidants. Identification of carotenoid oxidation products and evaluation of the prooxidant/antioxidant effect. *Chemical Research in Toxicology*, 12(6), pp. 535-543.
18. Baker, M. T., & Naguib, M. (2005). Propofol: the challenges of formulation. *Anesthesiology*, 103(4), 860-876.
19. Barclay, T.G.; Ginic-Markovic, M.; Cooper, P.D.; Petrovsky, N.; (2010). Inulin - A versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses. *Journal of Excipients and Food Chemicals*, 1(3).
20. Benedich, A., Shapiro, S.S. (1986). Effect of  $\beta$ -carotene and canthaxanthin on the immune responses of the rat. *The Journal of Nutrition*, 116, pp 2254.
21. Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
22. Berggren, A., Ahrén, I. L., Larsson, N., & Önning, G. (2011). Randomised, double-blind and placebo-controlled study using new probiotic lactobacilli for strengthening the body immune defence against viral infections. *European journal of nutrition*, 50(3), 203-210.

23. Bernhardt, S.; Schlich, E. (2006). Impact of different cooking methods on quality: Retention of lipophilic vitamins in fresh and frozen vegetables. *Journal of Food Engineering*, 77, pp. 327-333.
24. Beukema, M., Faas, M. M., & de Vos, P. (2020). The effects of different dietary fiber pectin structures on the gastrointestinal immune barrier: impact via gut microbiota and direct effects on immune cells. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(9), 1364-1376.
25. Bhaskaram, M.D. Padbidri. (2002). Micronutrient Malnutrition, Infection, and Immunity: An Overview. *Nutrition Reviews*, 60, pp. S40–S45.
26. Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., & Crowe, S. E. (2014). Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological reviews*, 94(2), 329-354.
27. Bhosale, P.; Larson, A.J.; Frederick, J.M.; Southwick, K.; Thulin, C.D.; Bernstein, P.S. (2004). Identification and Characterization of a Pi Isoform of Glutathione S-Transferase (GSTP1) as a Zeaxanthin-binding Protein in the Macula of the Human Eye. *The Journal of Biological Chemistry*, 279.
28. Bikle, D. D. (2011). Vitamin D regulation of immune function. In *Vitamins & hormones* (Vol. 86, pp. 1-21). Academic Press.
29. Bochnak, J., & Świeca, M. (2020). Potentially bioaccessible phenolics, antioxidant capacities and the colour of carrot, pumpkin and apple powders—effect of drying temperature and sample structure. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(1), 136-145.
30. Böhm, A., Kaiser, I., Trebstein, A., & Henle, T. (2005). Heat-induced degradation of inulin. *European Food Research and Technology*, 220(5), 466-471.
31. Bonnema, A.L.; Kolberg, L.W.; Thomas, W.; Slavin, J.L.; (2010). Gastrointestinal tolerance of chicory inulin products. *Journal of the American Dietetic Association*, 110(6), pp. 865-868.
32. Bowen-Forbes, C. S., Zhang, Y., & Nair, M. G. (2010). Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of food composition and analysis*, 23(6), 554-560.
33. Brambilla, D. (2008). The role of antioxidant supplement in immune system, neoplastic and neurodegenerative disorders: a point of view for an assesment of the risk/benefit profile. *Nutrition Journal*, pp. 7-29.
34. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
35. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (2008). Carotenoids. Volume 4: Natural Functions. Special Molecules, Special Properties.
36. Burri, L., Hoem, N., Banni, S., & Berge, K. (2012). Marine omega-3 phospholipids: metabolism and biological activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 15401-15419.
37. Carabin, I., & Flamm, W. (1999). Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. *Regulatory Toxicology Pharmacology*, 30, pp. 268-282.
38. Carrillo, C., Buvé, C., Panozzo, A., Grauwet, T., & Hendrickx, M. (2017). Role of structural barriers in the in vitro bioaccessibility of anthocyanins in comparison with carotenoids. *Food chemistry*, 227, 271-279.
39. Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, L.; Páez-Hernández, E.; Rodríguez, J.A.; Galán-Vidal, C.A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, pp. 859-871.
40. Castenmiller, J.J.M.; West, C.E. (1997). Bioavailability of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 89, pp. 2145-2150.
41. Castro, A., Bergenstahl, B., & Tornberg, E. (2012). Parsnip (*Pastinaca sativa* L.): Dietary fibre composition and physicochemical characterization of its homogenized suspensions. *Food research international*, 48(2), 598-608.
42. Chan, J.M.; Gann, P.H.; Giovannucci, E.L. (2005). Role of diet in prostate cancer development and progression. *Journal of Clinical Oncology*, 23, pp. 8152-8160.
43. Chandra R.K. (1997). Nutrition and the immune system: an introduction. *The American Society for Clinical Nutrition*, 66(2), pp. 460-463.
44. Chandrasekhar, J., Madhusudhan, M. C., & Raghavarao, K. S. M. S. (2012). Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. *Food and bioproducts processing*, 90(4), 615-623.
45. Chantrell, S.J.; McAuliffe, C.A.; Munn, R.W. (1977). Excited states of protoporphyrin IX dimethyl ester: Reaction of the triplet with carotenoids. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 73, pp. 858-865.
46. Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics sonochemistry*, 34, 540-560.
47. Chen, G., & Tao, D. (2005). An experimental study of stability of oil–water emulsion. *Fuel processing technology*, 86(5), 499-508.
48. Chen, Q., & Ross, A. C. (2007). Retinoic acid promotes mouse splenic B cell surface IgG expression and maturation stimulated by CD40 and IL-4. *Cellular immunology*, 249(1), 37-45.

49. Cherbut, C., Michel, C., Raison, V., Kravtchenko, T., & Severine, M. (2003). Acacia gum is a bifidogenic dietary fibre with high digestive tolerance in healthy humans. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 15(1), 43-50.
50. Cherng, J. M., Chiang, W., & Chiang, L. C. (2008). Immunomodulatory activities of common vegetables and spices of Umbelliferae and its related coumarins and flavonoids. *Food chemistry*, 106(3), 944-950.
51. Chew, B.P. (1993). Role of carotenoids in the immune response. *Journal of Dairy Science*, 76(9), 2804-2811
52. Chigurupati, N., Saiki, L., Gayser Jr, C., & Dash, A. K. (2002). Evaluation of red cabbage dye as a potential natural color for pharmaceutical use. *International journal of pharmaceutics*, 241(2), 293-299.
53. Choque Delgado, G., Tamashiro Wirla, M., & Pastore, G. (2010). Immunomodulatory effects of fructans. *Food Research International*, 43, pp. 1231-1236.
54. Choudhari, S. M., & Ananthanarayan, L. (2007). Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues. *Food chemistry*, 102(1), 77-81.
55. Christie, W. W. (1989). Preparation of methyl ester and other derivatives. *Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide*, 1, 36-44.
56. Chutia, H., & Mahanta, C. L. (2021). Green ultrasound and microwave extraction of carotenoids from passion fruit peel using vegetable oils as a solvent: Optimization, comparison, kinetics, and thermodynamic studies. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 67, 102547.
57. Clevidence, B.A.; Bieri, J.G.; (1993). Association of carotenoids with human plasma lipoproteins. *Methods in Enzymology*, 214(3), pp. 33-46.
58. Clinton, S.K.; Emenhiser, C.; Schwarts, S.J.; Bostwick, D.G.; Williams, A.W.; Moore, B.J.; Erdman, J.W. (1996). cis-trans lycopene isomers, carotenoids, and retinol in the human prostate. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 5(10), pp. 823-833.
59. Conn, S.; Franco, C.; Zhang, W. (2010). Characterization of anthocyanic vacuolar inclusions in *Vitis vinifera* L. cell suspension cultures. *Planta*, 231(6), pp. 1343-1360.
60. Costa, A. M., Nunes, J. C., Lima, B. N. B., Pedrosa, C., Calado, V., Torres, A. G., & Pierucci, A. P. T. R. (2015). Effective stabilization of CLA by microencapsulation in pea protein. *Food chemistry*, 168, 157-166.
61. Council of Europe. (2005). *European Pharmacopoeia*.
62. Coussement, P.A.; (1999). Inulin and oligofructose: safe intakes and legal status. *The Journal of Nutrition*, 129, pp. 1412S-1417S.
63. Coussens, L.M.; Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420, pp. 860-867.
64. Crowe, J.H.; Carpenter, J.F.; Crowe, L.M.; (1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 60, pp. 73-103.
65. Cruickshank, R., Duguid, J. P., Marmion, B. P., & Swain, R. H. A. (1975). Medical Microbiology 12th Edition Volume Two: The practice of Medical Microbiology 200p. *Churchill Livingstone Edinburgh London and New York*, 202-203.
66. Cunningham-Rundles, S. (2005). Mechanism of nutrient modulation of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(6), pp. 1119-1128.
67. Cvetkovic, D.; Fiedor, L.; Wisniewska-Becker, A.; Markovic, D. (2013). Molecular Base for Carotenoids Antioxidant Activity in Model and Biological Systems: The Health-Related Effects. In M. Yamaguchi, *Carotenoids: Food Sources, Production and Health Benefits* (pp. 93-126). Hauppauge, New York, USA: Nova Science Publishers.
68. Dai, D., Nanthkumar, N. N., Newburg, D. S., & Walker, W. A. (2000). Role of oligosaccharides and glycoconjugates in intestinal host defense. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 30, S23-S33.
69. Damergi, E., Schwitzguébel, J. P., Refardt, D., Sharma, S., Holliger, C., & Ludwig, C. (2017). Extraction of carotenoids from *Chlorella vulgaris* using green solvents and syngas production from residual biomass. *Algal research*, 25, 488-495.
70. Danişman, G., Arslan, E., & Toklucu, A. K. (2015). Kinetic analysis of anthocyanin degradation and polymeric colour formation in grape juice during heating. *Czech Journal of Food Sciences*, 33(2), 103-108.
71. Daud, M. A., Sanjana, R., Shahnaz, R., Ishtiaq, A., & Mohammed, R. (2015). How Good is Red Cabbage Extract for Lowering High Blood Glucose and Alleviating Pain? A Preliminary Evaluation of Brassica oleracea L. var capitata f. rubra. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(9), 1642-1651.
72. de Almeida Paula, D., Ramos, A. M., de Oliveira, E. B., Martins, E. M. F., de Barros, F. A. R., Vidigal, M. C. T. R., ... & da Rocha, C. T. (2018). Increased thermal stability of anthocyanins at pH 4.0 by guar gum in aqueous dispersions and in double emulsions W/O/W. *International journal of biological macromolecules*, 117, 665-672.
73. de Carvalho, L. M. J., Gomes, P. B., de Oliveira Godoy, R. L., Pacheco, S., do Monte, P. H. F., de Carvalho, J. L. V., ... & Ramos, S. R. R. (2012). Total carotenoid content,  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): A preliminary study. *Food Research International*, 47(2), 337-340.
74. De Castro, M. L., & Garcia-Ayuso, L. E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica chimica acta*, 369(1-2), 1-10.

75. DeCicco, K. L., Zolfaghari, R., Li, N. Q., & Ross, A. C. (2000). Retinoic acid and polyriboinosinic acid act synergistically to enhance the antibody response to tetanus toxoid during vitamin A deficiency: possible involvement of interleukin-2 receptor- $\beta$ , signal transducer and activator of transcription-1, and interferon regulatory factor-1. *The Journal of infectious diseases*, 182(Supplement\_1), S29-S36.
76. Delgado, G. T. C., Tamashiro, W. M., & Pastore, G. M. (2010). Immunomodulatory effects of fructans. *Food Research International*, 43(5), 1231-1236.
77. Delgado-Vargas, F.; Paredes-Lopez, O. (2003). Anthocyanins and betalains. In F. Delgado-Vargas, & O. Paredes-Lopez (Eds.), *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses* (pp. 167-219). Florida: Boca Raton, FL: CRC Press.
78. Dey, S., & Rathod, V. K. (2013). Ultrasound assisted extraction of  $\beta$ -carotene from *Spirulina platensis*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 271-276.
79. Dhanani, T., Shah, S., Gajbhiye, N. A., & Kumar, S. (2017). Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1193-S1199.
80. Di Bartolomeo, F., Startek, J. B., & Van den Ende, W. (2013). Prebiotics to fight diseases: reality or fiction?. *Phytotherapy Research*, 27(10), 1457-1473.
81. Diaconeasa, Z., Leopold, L., Rugină, D., Ayvaz, H., & Socaciu, C. (2015). Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin rich extracts from blueberry and blackcurrant juice. *International journal of molecular sciences*, 16(2), 2352-2365
82. Dickinson, E. (2015). Colloids in food: ingredients, structure, and stability. Annual review of food science and technology, 6, 211-233.
83. Dini, I., Tenore, G. C., & Dini, A. (2013). Effect of industrial and domestic processing on antioxidant properties of pumpkin pulp. *LWT-Food Science and Technology*, 53(1), 382-385.
84. Doymaz, I. (2007). The kinetics of forced convective air-drying of pumpkin slices. *Journal of food engineering*, 79(1), 243-248.
85. Drăghici, M.-L. Păcală, Oancea S., Kinetic studies on the oxidative stabilization effect of red onion skins anthocyanins extract on parsley (*Petroselinum crispum*) seed oil, *Food Chemistry*, 265, 337-343, 2018.
86. Eder, R. (2000). Pigments. In *Food Analysis by HPLC*. New York: Monticello, NY: Marcel Dekker.
87. Edge, R.; McGarvey, D.J.; Truscott, T.G. (1977). The carotenoids as anti-oxidants - a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 41, pp. 189-200.
88. Edge, R.; Truscott, T.G. (2010). Properties of carotenoid radicals and excited states and their potential role in biological systems. In J. Landrum, *Carotenoids: Physical, Chemical, and Biological Functions and properties* (pp. 283-308). Florida, SUA: CRC Press: Boca Raton.
89. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Mortensen, A., Aguilar, F., Crebelli, R., Di Domenico, A., Frutos, M. J., ... & Leblanc, J. C. (2017). Re-evaluation of lecithins (E 322) as a food additive. *EFSA Journal*, 15(4), e04742.
90. Elik, A., Yanik, D. K., & Göğüş, F. (2020). Microwave-assisted extraction of carotenoids from carrot juice processing waste using flaxseed oil as a solvent. *LWT*, 123, 109100.
91. Enneb, S., Drine, S., Bagues, M., Triki, T., Boussora, F., Guasmi, F., ... & Ferchichi, A. (2020). Phytochemical profiles and nutritional composition of squash (*Cucurbita moschata* D.) from Tunisia. *South African Journal of Botany*, 130, 165-171.
92. Entezari, M. H., & Kruus, P. (1996). Effect of frequency on sonochemical reactions II. Temperature and intensity effects. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3(1), 19-24.
93. Etminan, M., Takkouche, B., & Caamano-Isorna, F. (2004). The role of tomato products and lycopene in the prevention of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 13(3), 340-345.
94. European Parliament and Council Directive No 95/2/EC of 20 February 1995 on food additives other than colours and sweeteners, OJ L 61, 18.3.1995, p. 1-63
95. Fan, Z. L., Wang, Z. Y., Zuo, L. L., & Tian, S. Q. (2012). Protective effect of anthocyanins from lingonberry on radiation-induced damages. *International journal of environmental research and public health*, 9(12), 4732-4743.
96. Farges, M. C., Minet-Quinard, R., Walrand, S., Thivat, E., Ribalta, J., Winklhofer-Roob, B., ... & Vasson, M. P. (2012). Immune status is more affected by age than by carotenoid depletion–repletion in healthy human subjects. *British Journal of Nutrition*, 108(11), 2054-2065
97. Faria, A.; Pestana, D.; Azevedo, J.; Martel, F.; Freitas, V.; Azevedo, D. (2009). Absorption of anthocyanins through intestinal epithelial cells - Putative involvement of GLUT2. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, pp. 1430-1437.
98. Fernandes, I.; Faria, A.; Calhau, C.; Freitas, V.; Mateus, N. (2014). Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of Functional Foods*, 7, pp. 54-66.
99. Fernandez-Garcia, E.; Carvanjal-Lerida, I.; Jaren-Galan, M.; Garrido-Fernandez, J.; Perez-Galvez, A.; Hornero-Mendez, D. (2012). Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International*, 46, pp. 438-450.

100. Fiedor, J.; Burda, K. (2014). Potential Role of Carotenoids as Antioxidant in Human Health and Disease. *Nutrients*, 6, pp. 466-488.
101. Fiedor, J.; Fiedor, L.; Haessner, R.; Scheer, H. (2005). Cyclic ednoperoxides of  $\beta$ -carotene, potential pro-oxidants, as products of chemical quenching of singlet oxygen. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1709, pp. 1-4.
102. Fine, F., Vian, M. A., Tixier, A. S. F., Carre, P., Pages, X., & Chemat, F. (2013). Les agro-solvants pour l'extraction des huiles végétales issues de graines oléagineuses. *OCL*, 20(5), A502.
103. Flamm, G.; Glinsmann, W.; Kritchevsky, D.; Prosky, L.; Roberfroid, M.; (2001). Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 41(5), pp. 353-362.
104. Francis, F.J. (1989). Food Colorants: Anthocyanins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28, pp. 273-314.
105. Franck, A.; (2002). Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87, pp. 287-291.
106. Franco, D., Sineiro, J., Rubilar, M., Sánchez, M., Jerez, M., Pinelo, M., ... & Núñez, M. J. (2008). Polyphenols from plant materials: extraction and antioxidant power. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem*, 7(8), 3210-3216.
107. Franco, Z., & Nguyen, Q. D. (2011). Flow properties of vegetable oil–diesel fuel blends. *Fuel*, 90(2), 838-843.
108. Fredrick, E., Walstra, P., & Dewettinck, K. (2010). Factors governing partial coalescence in oil-in-water emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 153(1-2), 30-42.
109. Gershwin, M. (2012). *Nutrition and immunity*. Elsevier.
110. Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J., Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition research reviews*, 17(2), 259-275.
111. Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J., Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition research reviews*, 17(2), 259-275.
112. Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*, (1), F1-2.
113. Golubkina, N., Zayachkovsky, V., Stepanov, V., Deryagina, V., Rizhova, N., Kirsanov, K., & Caruso, G. (2020). High Temperature and Humidity Effect on Biochemical Characteristics of Organically-Grown Parsnip Roots Compared to Garlic Bulbs. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75(2), 292-297.
114. González-Gallego, J., García-Mediavilla, M. V., Sánchez-Campos, S., & Tuñón, M. J. (2014). Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of dietary flavonoids. In *Polyphenols in Human Health and Disease* (pp. 435-452). Academic Press.
115. Goula, A. M., Ververi, M., Adamopoulou, A., & Kaderides, K. (2017). Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils. *Ultrasonics sonochemistry*, 34, 821-830.
116. Grodstein, F., Kang, J. H., Glynn, R. J., Cook, N. R., & Gaziano, J. M. (2007). A randomized trial of beta carotene supplementation and cognitive function in men: the Physicians' Health Study II. *Archives of internal medicine*, 167(20), 2184-2190.
117. Guiné, R. P., Pinho, S., & Barroca, M. J. (2011). Study of the convective drying of pumpkin (*Cucurbita maxima*). *Food and bioproducts processing*, 89(4), 422-428.
118. Guo, Y., Zhang, P., Liu, Y., Zha, L., Ling, W., & Guo, H. (2020). A dose-response evaluation of purified anthocyanins on inflammatory and oxidative biomarkers and metabolic risk factors in healthy young adults: A randomized controlled trial. *Nutrition*, 110745.
119. Hafidh, R. R., Abdulmir, A. S., Bakar, F. A., Jalilian, F. A., Jahanshiri, F., Abas, F., & Sekawi, Z. (2013). Novel anticancer activity and anticancer mechanisms of *Brassica oleracea* L. var. capitata f. rubra. *European Journal of Integrative Medicine*, 5(5), 450-464.
120. Hager, A. (1970). Formation of maxima in the absorption spectrum of carotenoids in the region around 370 nm; consequences for the interpretation of certain action spectra. *Planta*, 91(1), pp. 38-53.
121. Halvorsen, B. L., Holte, K., Myhrstad, M. C., Barikmo, I., Hvattum, E., Remberg, S. F., ... & Blomhoff, R. (2002). A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *The Journal of nutrition*, 132(3), 461-471.
122. Hamid, A. A., Aiyelaagbe, O. O., Usman, L. A., Ameen, O. M., & Lawal, A. (2010). Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *African Journal of pure and applied chemistry*, 4(8), 142-151.
123. Handa, S.S., Khanuja, S. S., Longo, G., & Rakesh, D. D. (2008). Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. *United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology*. Trieste, Italy, 29.
124. He, J.; Giusti, M. (2010). Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Review of Food Science and Tehnology*, April.

125. Heinrich, U., Gärtner, C., Wiebusch, M., Eichler, O., Sies, H., Tronnier, H., & Stahl, W. (2003). Supplementation with  $\beta$ -carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV-induced erythema. *The Journal of nutrition*, 133(1), 98-101.
126. Heirman, L.R.; Chew, B.P., Wong, T.S.; Michal J.J.;Standert F.E. (1990). Effects of dietary  $\beta$ -carotene on lymphocyte function in peripartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 73, pp 166.
127. Hennekens, C.H.; Buring, J.E.; Manson, J.E.; Stampfer, M.J.; Rosner, B.; Cook, N.R.; Belanger, C.; LaMotte, F.; Gaziano, J.M.; Ridker, P.M. (1996). Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *The New England Journal of Medicine*, 334, pp. 1145-1149.
128. Hernández, Y., Lobo, M. G., & González, M. (2009). Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple. *Food Chemistry*, 114(2), 734-741.
129. Hester, S. N., Mastaloudis, A., Gray, R., Antony, J. M., Evans, M., & Wood, S. M. (2018). Efficacy of an anthocyanin and prebiotic blend on intestinal environment in obese male and female subjects. *Journal of nutrition and metabolism*, 2018.
130. Hidaka, H.; Eida, T.; Takizawa, T.; Tokunaga, T.;. (1986). Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacterium Microflora*, 5, pp. 37-50.
131. Hoag, K. A., Nashold, F. E., Goverman, J., & Hayes, C. E. (2002). Retinoic acid enhances the T helper 2 cell development that is essential for robust antibody responses through its action on antigen-presenting cells. *The Journal of nutrition*, 132(12), 3736-3739.
132. Hou, Z., Qin, P., Zhang, Y., Cui, S., & Ren, G. (2013). Identification of anthocyanins isolated from black rice (*Oryza sativa* L.) and their degradation kinetics. *Food research international*, 50(2), 691-697.
133. Houbiers, C.; Lima, J.C.; Macanita, A.L.; Santos, H. (1998). Color stabilization of malvidin 3-glucoside: Self-aggregation of the flavylum cation and copigmentation with the z-chalcone form. *The Journal of Physical Chemistry*, 102, pp. 3578-3585.
134. Huang, Y., & Zhou, W. (2019). Microencapsulation of anthocyanins through two-step emulsification and release characteristics during in vitro digestion. *Food chemistry*, 278, 357-363.
135. Hughes, D. A. (2001). Dietary carotenoids and human immune function. *Nutrition*, 17(10), 823-827.
136. Hughes, D. A., Wright, A. J., Finglas, P. M., Peerless, A. C., Bailey, A. L., Astley, S. B., ... & Southon, S. (1997). The effect of  $\beta$ -carotene supplementation on the immune function of blood monocytes from healthy male nonsmokers. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 129(3), 309-317.
137. Hui, Y. H., & Evranuz, E. Ö. (Eds.). (2015). *Handbook of vegetable preservation and processing*. CRC press.
138. Hung, S. W., Tu, C. Y., & Wang, W. S. (2007). In vivo effects of adding singular or combined anti-oxidative vitamins and/or minerals to diets on the immune system of tilapia (*Oreochromis hybrids*) peripheral blood monocyte-derived, anterior kidney-derived, and spleen-derived macrophages. *Veterinary immunology and immunopathology*, 115(1-2), 87-99.
139. Hurrell, R. F. (2003). Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability. *The Journal of nutrition*, 133(9), 2973S-2977S.
140. Hurst, S. M., Hurst, R. D., Lyall, K. A., Roberts, J. M., Perthaner, A., Wells, R. W., ... & Burr, N. S. (2019). Consumption of an anthocyanin-rich extract made from New Zealand blackcurrants prior to exercise may assist recovery from oxidative stress and maintains circulating neutrophil Function: a pilot study. *Frontiers in Nutrition*, 6, 73.
141. Igarashi, K., Kimura, Y., & Takenaka, A. (2000). Preventive effects of dietary cabbage acylated anthocyanins on paraquat-induced oxidative stress in rats. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64(8), 1600-1607
142. Inoue, R., Sakaue, Y., Kawada, Y., Tamaki, R., Yasukawa, Z., Ozeki, M., ... & Naito, Y. (2019). Dietary supplementation with partially hydrolyzed guar gum helps improve constipation and gut dysbiosis symptoms and behavioral irritability in children with autism spectrum disorder. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 64(3), 217-223.
143. Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C., & Song, S. Y. (2004). Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity*, 21(4), 527-538.
144. Janković, B., Marinović-Cincović, M., & Janković, M. (2017). Distribution of apparent activation energy counterparts during thermo-And thermo-oxidative degradation of *Aronia melanocarpa* (black chokeberry). *Food chemistry*, 230, 30-39.
145. Jing, P.; Bomser, J.A.; Schwartz, S.J.; He, J.; Magnuson, B.A.; Giusti, M.M. (2008). Structure-function relationships of anthocyanins from various anthocyanin-rich extracts on the inhibition of colon cancer cell growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp. 9391-9398.
146. Johnson, E. J., McDonald, K., Caldarella, S. M., Chung, H. Y., Troen, A. M., & Snodderly, D. M. (2008). Cognitive findings of an exploratory trial of docosahexaenoic acid and lutein supplementation in older women. *Nutritional neuroscience*, 11(2), 75-83.
147. Jonasson, L., Wikby, A., & Olsson, A. G. (2003). Low serum  $\beta$ -carotene reflects immune activation in patients with coronary artery disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 13(3), 120-125.

148. Kalala, G., Kambashi, B., Everaert, N., Beckers, Y., Richel, A., Pachikian, B., ... & Bindelle, J. (2018). Characterization of fructans and dietary fibre profiles in raw and steamed vegetables. *International journal of food sciences and nutrition*, 69(6), 682-689.
149. Kamei, H.; Hashimoto, Y.; Koide, T.; Kojima, T.; Hasegawa, M. (1998). Anti-tumor effect of methanol extracts from red and white wines. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 13, pp. 447-452.
150. Kandlakunta, B., Rajendran, A., & Thingnganing, L. (2008). Carotene content of some common (cereals, pulses, vegetables, spices and condiments) and unconventional sources of plant origin. *Food Chemistry*, 106(1), 85-89.
151. Kassie, F., Uhl, M., Rabot, S., Grasl-Kraupp, B., Verkerk, R., Kundi, M., ... & Knasmüller, S. (2003). Chemoprevention of 2-amino-3-methylimidazo [4, 5-f] quinoline (IQ)-induced colonic and hepatic preneoplastic lesions in the F344 rat by cruciferous vegetables administered simultaneously with the carcinogen. *Carcinogenesis*, 24(2), 255-261.
152. Kataya, H. A., & Hamza, A. A. (2008). Red cabbage (*Brassica oleracea*) ameliorates diabetic nephropathy in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5(3), 281-287.
153. Kaufmann, B., & Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 13(2), 105-113.
154. Kaur, N.; Gupta, A.K.; (2002). Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences*, 27(7), pp. 703-714.
155. Kaw, A.L.; Ahern, P.P.; Griffin, N.W.; Goodman, A.L.; Gordon, J.I. (2011, Jun 15). Human nutrition, the gut microbiome, and immune system: envisioning the future. *Nature*, 474, pp. 327-336.
156. Kelly, G.; (2008). Inulin-type prebiotics--a review: part 1. *Alternative Medicine Review*, 13(4), pp. 315-229.
157. Kendall, C. W., Esfahani, A., & Jenkins, D. J. (2010). The link between dietary fibre and human health. *Food Hydrocolloids*, 24(1), 42-48.
158. Khadem, B., Khellaf, M., & Sheibat-Othman, N. (2020). Investigating swelling-breakdown in double emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 585, 124181.
159. Khanal, R. C., Howard, L. R., & Prior, R. L. (2010). Effect of heating on the stability of grape and blueberry pomace procyanidins and total anthocyanins. *Food Research International*, 43(5), 1464-1469.
160. Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & nutrition research*, 61(1), 1361779.
161. Kim, C. H. (2011). Retinoic acid, immunity, and inflammation. In *Vitamins & Hormones* (Vol. 86, pp. 83-101). Academic Press.
162. Kohn, S.; Kolbe, H.; Korger, M.; Kopsel, C.; Mayer, B.; Auweter, H.; Luddecke, E.; Bettermann, H.; Martin, H.D. (2008). Carotenoids. Volume 4: Natural Functions. Aggregation and Interface Behaviour of Carotenoids.
163. Konopacka, M., & Rzeszowska-Wolny, J. (2001). Antioxidant vitamins C, E and  $\beta$ -carotene reduce DNA damage before as well as after  $\gamma$ -ray irradiation of human lymphocytes in vitro. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 491(1-2), 1-7.
164. Köpcke, W., & Krutmann, J. (2008). Protection from Sunburn with  $\beta$ -Carotene—A Meta-analysis. *Photochemistry and photobiology*, 84(2), 284-288.
165. Korson, L., Drost-Hansen, W., & Millero, F. J. (1969). Viscosity of water at various temperatures. *The Journal of Physical Chemistry*, 73(1), 34-39.
166. Koshland Jr, D. E. (1953). Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biological reviews*, 28(4), 416-436.
167. Kowalczyk, E., Niedworok, J., Andryskowski, G., & Jankowski, A. (2001). Effect of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* Elliot on oxidative stress biomarkers in animals chronically exposed to lead acetate or cadmium chloride. *Monograph-Circulation of Elements in Nature. Instytut Ochrony Ęrodowiska, Warszawa*, 262-267.
168. Krafft, M. P., Rolland, J. P., & Riess, J. G. (1991). Detrimental effect of excess lecithin on the stability of fluorocarbon/lecithin emulsions. *The Journal of Physical Chemistry*, 95(14), 5673-5676.
169. Krishnaiah D., Sarbatly R., Nithyanandam R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, 89(3), pp. 217-233.
170. Küllenberg, D., Taylor, L. A., Schneider, M., & Massing, U. (2012). Health effects of dietary phospholipids. *Lipids in health and disease*, 11(1), 3.
171. Laar, Y.J.; Stahl, W.; Bolsen, K.; Goerz, G.; Sies, H. (1996).  $\beta$ -Carotene serum levels in patients with erythropoietic protoporphyria on treatment with the synthetic all-trans isomer or a natural isomer mixture of  $\beta$ -carotene. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 33, pp. 157-162.
172. Lacatusu, I., Badea, N., Ovidiu, O., Bojin, D., & Meghea, A. (2012). Highly antioxidant carotene-lipid nanocarriers: synthesis and antibacterial activity. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(6), 1-16.
173. Landrum, J.T. (2010). Carotenoids: Physical, Chemical, and Biological Functions and Properties.



174. Lavecchia, R., & Zuorro, A. (2008). Improved lycopene extraction from tomato peels using cell-wall degrading enzymes. *European Food Research and Technology*, 228(1), 153-158.
175. Le Marchand, L.; Hankin, J.H.; Kolonel, L.N.; Beecher, C.R.; Wilkens, L.R.; Zhao, L.P. (1993). Intake of specific carotenoids and lung cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2(3), pp. 183-187.
176. Lee, K. J., Sok, D. E., Kim, Y. B., & Kim, M. R. (2002). Protective effect of vegetable extracts on oxidative stress in brain of mice administered with NMDA. *Food research international*, 35(1), 55-63.
177. Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X., & Deng, Y. (2015). A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 10(2), 81-98.
178. Li, X., Feng, Y., Ting, S., Jiang, J., & Liu, Y. (2019). Correlating emulsion properties to microencapsulation efficacy and nutrients retention in mixed proteins system. *Food Research International*, 115, 44-53.
179. Liaaen-Jensen, S.; Lutnaes, B.F. (2008). Carotenoids. Volume 4: Natural Functions. Isomers and Isomerization.
180. Lin, J. Y., Li, C. Y., & Hwang, I. F. (2008). Characterisation of the pigment components in red cabbage (*Brassica oleracea* L. var.) juice and their anti-inflammatory effects on LPS-stimulated murine splenocytes. *Food Chemistry*, 109(4), 771-781.
181. Lin, L. C., Kuo, Y. C., & Chou, C. J. (2002). Immunomodulatory Proanthocyanidins from *Ecdysanthera u* *tilis*. *Journal of Natural Products*, 65(4), 505-508.
182. Lingyun, W., Jianhua, W., Xiaodong, Z., Da, T., Yalin, Y., Chenggang, C., ... & Fan, Z. (2007). Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers. *Journal of Food engineering*, 79(3), 1087-1093.
183. Liu, X., Mei, Z., Qian, J., Zeng, Y., & Wang, M. (2013). Puerarin partly counteracts the inflammatory response after cerebral ischemia/reperfusion via activating the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Neural regeneration research*, 8(34), 3203.
184. Lomax, A. R., & Calder, P. C. (2008). Prebiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence. *British Journal of nutrition*, 101(5), 633-658.
185. Lombardelli, C., Liburdi, K., Benucci, I., & Esti, M. (2020). Tailored and synergistic enzyme-assisted extraction of carotenoid-containing chromoplasts from tomatoes. *Food and Bioproducts Processing*, 121, 43-53.
186. Louis, P., Flint, H. J., & Michel, C. (2016). How to manipulate the microbiota: prebiotics. In *Microbiota of the human body* (pp. 119-142). Springer, Cham.
187. Łozicki, A., Koziarzewska, A., Halik, G., Dymnicka, M., Arkuszewska, E., Niemiec, T., & Bogdan, J. (2015). Effect of ensiling pumpkin (*Cucurbita maxima* D.) with dried sugar beet pulp on the content of bioactive compounds in silage and its antioxidant potential. *Animal Feed Science and Technology*, 206, 108-113.
188. Luque-Garcia, J. L., & De Castro, M. L. (2003). Ultrasound: a powerful tool for leaching. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(1), 41-47.
189. Ma, Y., Chen, Q., & Ross, A. C. (2005). Retinoic acid and polyriboinosinic: polyribocytidylic acid stimulate robust anti-tetanus antibody production while differentially regulating type 1/type 2 cytokines and lymphocyte populations. *The Journal of Immunology*, 174(12), 7961-7969.
190. Maggini, S., Wintergerst, E. S., Beveridge, S., & Hornig, D. H. (2007). Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. *British Journal of Nutrition*, 98(S1), S29-S35.
191. Majkowska-Gadomska, J., & Wierzbicka, B. (2008). Content of basic nutrients and minerals in heads of selected varieties of red cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata f. rubra). *Polish Journal of Environmental Studies*, 17(2), 295.
192. Mallery, S.R.; Budendorf, D.E.; Lasern, M.P.; Pei, P.; Tong, M.; Holpuch, A.S. (2011). Effects of human oral mucosal tissue, saliva and oral microflora on intraoral metabolism and bioactivation of black raspberry anthocyanins. *Cancer Prevention Research*, 4(8), pp. 1209-1221.
193. Maltry, W., Pötke, E., Schneider, B. (1975). *Landwirtschaftliche Trocknungstechnik*. 2nd edn. VEB Verlag Technik, Berlin
194. Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Remesy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, pp. 230-242.
195. Mansfield, S. D., Mooney, C., & Saddler, J. N. (1999). Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnology progress*, 15(5), 804-816.
196. Markham, K.R.; Gould, K.S.; Winefield, C.S.; Mitchell, K.A.; Bloor, S.J.; Boase, M.R. (2000). Anthocyanic vacuolar inclusions — their nature and significance in flower colouration. *Phytochemistry*, 55(4), pp. 327-366.

197. Markowiak, P., & Ślizewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9), 1021.
198. Martí, R., Roselló, S., & Cebolla-Cornejo, J. (2016). Tomato as a source of carotenoids and polyphenols targeted to cancer prevention. *Cancers*, 8(6), 58.
199. Martínez-Valdivieso, D., Gómez, P., Font, R., Alonso-Moraga, Á., & Del Río-Celestino, M. (2015). Physical and chemical characterization in fruit from 22 summer squash (*Cucurbita pepo* L.) cultivars. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1225-1233.
200. Mayne, S.T.; Goodwin, W.J. (1993). Chemoprevention of head and neck cancer. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 1, pp. 126-132.
201. Mazza, G.; Miniati, E. (1993). Grapes. In G. Mazza, & E. Miniati (Eds.), *Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains* (pp. 149-199). Florida: Boca Raton, FL: CRC Press.
202. McClements, D. J. (2015). Food emulsions: principles, practices, and techniques. CRC press.
203. McGarr, S.E.; Ridlon, J.M.; Hylemon, P.B. (2005). Diet, anaerobic bacterial metabolism, and colon cancer: A review of the literature. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 39, pp. 98-109.
204. Mensink, M.A.; Frijlink, H.W.; van der Voort Maarschalk, K.; Hinrichs, W.L.J.; (2015). Inulin, a flexible oligosaccharide. II: Review of its pharmaceutical applications. *Carbohydrate Polymers*, 134, pp. 418-428.
205. Michalska, A., Wojdyło, A., Brzezowska, J., Majerska, J., & Ciska, E. (2019). The Influence of Inulin on the Retention of Polyphenolic Compounds during the Drying of Blackcurrant Juice. *Molecules*, 24(22), 4167.
206. Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 673-751.
207. Miguel, M. G. (2011). Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(6), 7-15.
208. Mínguez-Alarcón, L., Mendiola, J., López-Espín, J. J., Sarabia-Cos, L., Vivero-Salmerón, G., Vioque, J., Torres-Cantero, A. M. (2012). Dietary intake of antioxidant nutrients is associated with semen quality in young university students. *Human reproduction*, 27(9), 2807-2814.
209. Ministerul Sănătății Publice. (2007, 07 05). Ordinul nr. 1069/2007 pentru aprobarea Normelor privind suplimentele alimentare.
210. Mirhosseini, H., Rashid, N. F. A., Amid, B. T., Cheong, K. W., Kazemi, M., & Zulkurnain, M. (2015). Effect of partial replacement of corn flour with durian seed flour and pumpkin flour on cooking yield, texture properties, and sensory attributes of gluten free pasta. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), 184-190.
211. Mitchell, B. L., Ulrich, C. M., & McTiernan, A. (2003). Supplementation with vitamins or minerals and immune function: can the elderly benefit?. *Nutrition research*, 23(8), 1117-1139.
212. Müller, J. și Heindl, A. (2006). Drying of medicinal plants. *Frontis*, 237-252.
213. Murador, D. C., Braga, A. R. C., Martins, P. L., Mercadante, A. Z., & de Rosso, V. V. (2019). Ionic liquid associated with ultrasonic-assisted extraction: A new approach to obtain carotenoids from orange peel. *Food research international*, 126, 108653.
214. Murkovic, M., Mülleder, U., & Neunteufl, H. (2002). Carotenoid content in different varieties of pumpkins. *Journal of food composition and analysis*, 15(6), 633-638.
215. Nagao, A. (2009). Absorbtion and function of dietary carotenoids. *Forum of nutrition*, 61, pp. 55-63.
216. Nagao, A. (2014). Bioavailability of dietary carotenoids: intestinal absorption and metabolism. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 48(4), pp. 385-391.
217. Nakamura, K., Kariyazono, H., Komokata, T., Hamada, N., Sakata, R., & Yamada, K. (2005). Influence of preoperative administration of ω-3 fatty acid-enriched supplement on inflammatory and immune responses in patients undergoing major surgery for cancer. *Nutrition*, 21(6), 639-649.
218. Nawirska, A., Figiel, A., Kucharska, A. Z., Sokół-Łętowska, A., & Biesiada, A. (2009). Drying kinetics and quality parameters of pumpkin slices dehydrated using different methods. *Journal of Food Engineering*, 94(1), 14-20.
219. Nawirska-Olszańska, A., Stępień, B., & Biesiada, A. (2017). Effectiveness of the fountain-microwave drying method in some selected pumpkin cultivars. *LWT*, 77, 276-281.
220. Neacșu, A., Oprean, C., Curea, M., Tuchilă, G., & Trifu, M. (2003). Neuroprotection with carotenoids in glaucoma. *Oftalmologia (Bucharest, Romania: 1990)*, 59(4), 70-75.
221. Neveu, V.; Perez-Jimenez, J.; Vos, F.; Crespy, V.; du Chaffaut, L.; Mennen, L. (2010). Phenol-explorer: An online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database (Oxford)*
222. Nishino, H., Murakoshi, M., Ii, T., Takemura, M., Kuchide, M., Kanazawa, M., ... & Yogosawa, S. (2002). Carotenoids in cancer chemoprevention. *Cancer and Metastasis Reviews*, 21(3-4), 257-264.
223. Nishino, H., Murakoshi, M., Tokuda, H., & Satomi, Y. (2009). Cancer prevention by carotenoids. *Archives of biochemistry and biophysics*, 483(2), 165-168.
224. Norma igienico-sanitară pentru alimente din 16.12.2020.

225. Norshazila, S., Koy, C. N., Rashidi, O., Ho, L. H., Azrina, I., Zaizuliana, N. R., & Zarinah, Z. (2017). The effect of time, temperature and solid to solvent ratio on pumpkin carotenoids extracted using food grade solvents. *Sains Malaysiana*, 46(2), 231-237.
226. Oancea S., Drăghici O., Assessment of primary and secondary oxidation products during storage and heating of linseed oil enriched with natural extract, *Oxid. Commun.* Vol. 40, No. 1-I, 138-148, 2017.
227. Oancea S., Drăghici O., Grosu C., Evaluation of the antioxidant efficiency of berry extracts in sunflower oil, *Oxid. Commun.* Vol. 39, No. 1, 132-144, 2016
228. Oancea S., Drăghici O., Perju M., Dulf F.V., Effects of roselle extract on the oxidative stability of hempseed oil, *J. Food Nutr. Res.*, 59(2), 98-107, 2020.
229. Oancea S., Tecucianu A.C., Dulf F.V., Compoziție stabilă sinergică cu proprietăți antioxidante și antiinflamatoare pe bază de fitoextracte bioactive, Cerere de brevet de invenție OSIM, A/00393, 09.07.2020. Publicat în revista BOPI (*Buletinul Oficial de Proprietate Industrială*), nr. 2, pp. 17, 2021.
230. Oancea, S. (2010). Imunologie pentru studenții în profil alimentar.
231. Oancea, S., & Calin, F. (2016). Changes in total phenolics and anthocyanins during blackberry, raspberry and cherry jam processing and storage. *Romanian Biotechnological Letters*, 21(1), 11232-11237.
232. Oancea, S., & Oprean, L. (2011). Anthocyanins, from biosynthesis in plants to human health benefits . *Acta Universitatis Cibinensis, Series E: Food Technology*, 15(1).
233. Oancea, S., Grosu, C., Ketney, O., & Stoia, M. (2013). Conventional and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from blackberry and sweet cherry cultivars. *Acta Chimica Slovenica*, 60(2), 383-389.
234. Oancea, S., Mila, L., & Ketney, O. (2018). Content of Phenolics, in vitro Antioxidant Activity and Cytoprotective Effects against Induced Haemolysis of Red Cabbage Extracts. *Romanian Biotechnological Letters*. 2019; 24(1), 1-9.
235. Oancea, S., Mila, L., & Ketney, O. (2019). Content of Phenolics, in vitro Antioxidant Activity and Cytoprotective Effects against Induced Haemolysis of Red Cabbage Extracts. *Biotech. Lett*, 24, 1-9.
236. Oancea, S., Moiseenco, F., Ketney, O., & Traldi, P. (2014). Effects of freezing and oven drying of Romanian wild and cultivated red raspberries on total anthocyanins and total antioxidant capacity. *Romanian Biotechnological Letters*, 19(2), 9241.
237. Oancea, S., Moiseenco, Florina, & Traldi, P. (2013). Total phenolics and anthocyanin profiles of Romanian wild and cultivated blueberries by direct infusion ESI-IT-MS/MS. *Romanian Biotechnological Letters*, 18(3), 8351.
238. O'flaherty, S., Saulnier, D., Pot, B., & Versalovic, J. (2010). How can probiotics and prebiotics impact mucosal immunity?. *Gut microbes*, 1(5), 293-300.
239. Okuro, P. K., Gomes, A., Costa, A. L. R., Adame, M. A., & Cunha, R. L. (2019). Formation and stability of W/O-high internal phase emulsions (HIPEs) and derived O/W emulsions stabilized by PGPR and lecithin. *Food Research International*, 122, 252-262.
240. Onda, A., Ochi, T., & Yanagisawa, K. (2008). Selective hydrolysis of cellulose into glucose over solid acid catalysts. *Green Chemistry*, 10(10), 1033-1037.
241. Ordóñez-Santos, L. E., Esparza-Estrada, J., & Vanegas-Mahecha, P. (2021). Ultrasound-assisted extraction of total carotenoids from mandarin epicarp and application as natural colorant in bakery products. *LWT*, 139, 110598.
242. Ordóñez-Santos, L. E., Pinzón-Zarate, L. X., & González-Salcedo, L. O. (2015). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total carotenoids from peach palm fruit (*Bactris gasipaes*) by-products with sunflower oil using response surface methodology. *Ultrasonics sonochemistry*, 27, 560-566.
243. Ostertag, E., Becker, T., Ammon, J., Bauer-Aymanns, H., Schrenk, D.. (2002). Effects of storage conditions on furocoumarin levels in intact, chopped, or homogenized parsnips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2565–2570.
244. Padmanabhan, P., & Jangle, S. N. (2012). Evaluation of in-vitro anti-inflammatory activity of herbal preparation, a combination of four medicinal plants. *International journal of basic and applied medical sciences*, 2(1), 109-116.
245. Palmer, A. C., West, K. P., Dalmiya, N., & Schultink, W. (2012). The use and interpretation of serum retinol distributions in evaluating the public health impact of vitamin A programmes. *Public health nutrition*, 15(7), 1201-1215.
246. Palozza, P.; Luberto, C.; Calviello, G.; Ricci, P.; Bartoli, G.M. (1997). Antioxidant and prooxidant role of beta-carotene in murine normal and tumor thymocytes: effects of oxygen partial pressure. *Free Radical Biology & Medicine*, 22(6), pp. 1065-1073.
247. Park, Y. J., Jeon, K. H., Kim, S. H., & Bae, S. J. (2004). The effect on antimicrobial and cytotoxicity of *Brassica oleracea* L. fractions. *Journal of Life Science*, 14(4), 567-572.
248. Parker, R.S. (1989). Carotenoids in human blood and tissues. *Journal of Nutrition*, 119(1), pp. 101-104.
249. Pegg, A. M. (2012). The application of natural hydrocolloids to foods and beverages. In *Natural food additives, ingredients and flavourings* (pp. 175-196). Woodhead Publishing.
250. Pencheva, D., Petkova, N., & Denev, P. (2012). Determination of inulin in dough products. *Scientific works of UFT*, 59, 339-344.

251. Perez-Jimenez, J.; Fezeu, L.; Touvier, M.; Amault, N.; Manach, C.; Hercberg, S. (2011). Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93, pp. 1220-1228.
252. Perez-Jimenez, J.; Neveu, V.; Vos, F.; Scalbert, A. (2010). Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: An application of the phenol-explorer database. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, pp. 4959-4969.
253. Peshev, D., & Van den Ende, W. (2014). Fructans: prebiotics and immunomodulators. *Journal of Functional Foods*, 8, 348-357.
254. Phan, M. A. T., Bucknall, M., & Arcot, J. (2018). Interactive effects of  $\beta$ -carotene and anthocyanins on cellular uptake, antioxidant activity and anti-inflammatory activity in vitro and ex vivo. *Journal of Functional Foods*, 45, 129-137.
255. Phillips, A. O., & Phillips, G. O. (2011). Biofunctional behaviour and health benefits of a specific gum arabic. *Food Hydrocolloids*, 25(2), 165-169.
256. Phillips, G. O., & Williams, P. A. (Eds.). (2000). Handbook of hydrocolloids (pp. 53-64). Boca Raton, FL: CRC press.
257. Plat J., Mensink R.P. (2005). Food components and immune function. *Current Opinion in Lipidology*, 16(1), pp. 31-37.
258. Prince, M.R.; Frisoli, J.K. (1993). Beta-carotene accumulation in serum and skin. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57, pp. 175-181.
259. Provesi, J. G., & Amante, E. R. (2015). Carotenoids in pumpkin and impact of processing treatments and storage. In *Processing and impact on active components in food* (pp. 71-80). Academic Press.
260. Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in biotechnology*, 30(1), 37-44.
261. Queipo-Ortuno, M.I.; Bot-Ordonez, M.; Murri, M.; Gomez-Zumaquero, J.M.; Clemente-Postigo, M.; Estruch, R. (2012). Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 95, pp. 1323-1334.
262. Rabelo, C. A., Taarji, N., Khalid, N., Kobayashi, I., Nakajima, M., & Neves, M. A. (2018). Formulation and characterization of water-in-oil nanoemulsions loaded with acai berry anthocyanins: Insights of degradation kinetics and stability evaluation of anthocyanins and nanoemulsions. *Food research international*, 106, 542-548.
263. Radziejewska-Kubzdela, E., & Biegańska-Marecik, R. (2015). A comparison of the composition and antioxidant capacity of novel beverages with an addition of red cabbage in the frozen, purée and freeze-dried forms. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 821-829.
264. Rammuni, M. N., Ariyadasa, T. U., Nimarshana, P. H. V., & Attalage, R. A. (2019). Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and  $\beta$ -carotene from *D. salina*. *Food chemistry*, 277, 128-134.
265. Ramos, S. R., de Carvalho, H. W. L., de Oliveira, I. R., dos Anjos, J. L., de QUEIROZ, M. A., de LIMA, M. A. C., ... & Borges, R. M. E. (2009). Identificação de acessos locais de abóbora com elevados teores de carotenóides totais e características agrônômicas e comerciais. In *Embrapa Semiárido-Resumo em anais de congresso (ALICE)*. In: REUNIÃO ANUAL DE BIOFORTIFICAÇÃO NO BRASIL, 3., 2009, Aracaju. Anais... Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009.
266. Rao, T. P., & Quartarone, G. (2019). Role of guar fiber in improving digestive health and function. *Nutrition*, 59, 158-169.
267. Rashmi, H. B., & Negi, P. S. (2020). Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. *Food Research International*, 109298.
268. Reed, J. (2002). Cranberry flavonoids, atherosclerosis and cardiovascular health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(S3), 301-316.
269. Reese, E. T., Siu, R. G., & Levinson, H. S. (1950). The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *Journal of bacteriology*, 59(4), 485.
270. Rein, M. (2005). Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. pp. 10-14.
271. Ribeiro, D.; Freitas, M.; Silbav, M.S. Artur; Carvalhoc, F.; Fernandes, E. (2018). Review: Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products. *Food and Chemical Toxicology*, 120, pp. 681-699.
272. Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), pp. 933-956.
273. Robert, C., Couëdelo, L., Vaysse, C., & Michalski, M. C. (2019). Vegetable lecithins: a review of their compositional diversity, impact on lipid metabolism and potential in cardiometabolic disease prevention. *Biochimie*.
274. Rodriguez G.A. (2001) *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* F2.1.1-F2.1.8 Copyright © 2001 by John Wiley & Sons, Inc.
275. Rodriguez, G. A. (2001). Extraction, isolation, and purification of carotenoids. *Current protocols in food analytical chemistry*, (1), F2-1.

276. Romdhane, M., Gourdon, C., & Casamatta, G. (1995). Local investigation of some ultrasonic devices by means of a thermal sensor. *Ultrasonics*, 33(3), 221-227.
277. Ross, A. C. (2012). Vitamin A and retinoic acid in T cell-related immunity. *The American journal of clinical nutrition*, 96(5), 1166S-1172S.
278. Ruiz-Garcia, Y., Smith, P. A., & Bindon, K. A. (2014). Selective extraction of polysaccharide affects the adsorption of proanthocyanidin by grape cell walls. *Carbohydrate polymers*, 114, 102-114.
279. Sadilova, E., Carle, R., & Stintzing, F. C. (2007). Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Molecular nutrition & food research*, 51(12), 1461-1471.
280. Saengthongpinit, W.; Sajjaanantakul, T.; (2005). Influence of harvest time and storage temperature on characteristics of inulin from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *Postharvest Biology and Technology*, 37(1), pp. 93-100.
281. Saha, S., Walia, S., Kundu, A., Sharma, K., & Paul, R. K. (2015). Optimal extraction and fingerprinting of carotenoids by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food chemistry*, 177, 369-375.
282. Saharay, M., Guo, H., & Smith, J. C. (2010). Catalytic mechanism of cellulose degradation by a cellobiohydrolase, *CelS*. *PLoS One*, 5(10), e12947.
283. Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Latha, L. Y. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1).
284. Scalbert, A.; Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The journal of Nutrition*, 130, pp. 2073S-2085S.
285. Scholz-Ahrens, K. E., Ade, P., Marten, B., Weber, P., Timm, W., Açil, Y., ... & Schrezenmeir, J. (2007). Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. *The Journal of nutrition*, 137(3), 838S-846S.
286. Schwartz, S.J. (2006). Pigments in Food - A Challenge to Life Science. p. 114.
287. Seeram, N. P., & Nair, M. G. (2002). Inhibition of lipid peroxidation and structure- activity-related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins, and catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(19), 5308-5312.
288. Seeram, N.P.; Momin, R.A.; Nair, M.G.; Bourquin, L.D. (2001). Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. *Phytomedicine*, 8, pp. 362-369.
289. Seifert, S., & Watzl, B. (2007). Inulin and oligofructose: review of experimental data on immune modulation. *The Journal of nutrition*, 137(11), 2563S-2567S
290. Seifert, E., Rettura, G., & Levenson, S. M. (2012). Carotenoids and cell-mediated immune responses. *The Quality of Foods and Beverages*, 2, 335-347.
291. Selma, M.V.; Espin, J.C.; Tomas-Barberan, F.A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, pp. 6485-6501.
292. Senser, F., Scherz, H. (1999). *Tablas de composición de alimentos*, 2nd ed. Editorial Acribia, Zaragoza.
293. Shahidi, F.; Naczk, M. (2004). Contribution of phenolic compounds to flavor and color characteristics of food. In F. Shahidi, & M. Naczk (Eds.), *Food and Nutraceuticals* (pp. 443-461). Florida: Boca Raton, FL: CRC Press.
294. Sharoni, Y., Linnewiel-Hermoni, K., Zango, G., Khanin, M., Salman, H., Veprik, A., ... & Levy, J. (2012). The role of lycopene and its derivatives in the regulation of transcription systems: implications for cancer prevention. *The American journal of clinical nutrition*, 96(5), 1173S-1178S.
295. Shchipunov, Y. A. (1997). Self-organising structures of lecithin. *Russian chemical reviews*, 66(4), 301.
296. Shokryazdan, P., Jahromi, M. F., Navidshad, B., & Liang, J. B. (2017). Effects of prebiotics on immune system and cytokine expression. *Medical microbiology and immunology*, 206(1), 1-9.
297. Sicaire, A. G., Vian, M., Fine, F., Joffre, F., Carré, P., Tostain, S., & Chemat, F. (2015). Alternative bio-based solvents for extraction of fat and oils: solubility prediction, global yield, extraction kinetics, chemical composition and cost of manufacturing. *International journal of molecular sciences*, 16(4), 8430-8453.
298. Simopoulos, Artemis S. (2002). Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *Journal of the American College of Nutrition*, 21(6), pp. 495-505.
299. Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
300. Smith, R. M. (2003). Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of chromatography A*, 1000(1-2), 3-27.
301. Sokhal, K. S., Dasaroju, G., & Bulasara, V. K. (2019). Formation, stability and comparison of water/oil emulsion using gum arabic and guar gum and effect of aging of polymers on drag reduction percentage in water/oil flow. *Vacuum*, 159, 247-253.
302. Sokhal, K. S., Dasaroju, G., & Bulasara, V. K. (2019). Formation, stability and comparison of water/oil emulsion using gum arabic and guar gum and effect of aging of polymers on drag reduction percentage in water/oil flow. *Vacuum*, 159, 247-253.

303. Song, J., Wang, X., Li, D., & Liu, C. (2017). Degradation kinetics of carotenoids and visual colour in pumpkin (*Cucurbita maxima* L.) slices during microwave-vacuum drying. *International journal of food properties*, 20(sup1), S632-S643.
304. Song, J., Wei, Q., Wang, X., Li, D., Liu, C., Zhang, M., & Meng, L. (2018). Degradation of carotenoids in dehydrated pumpkins as affected by different storage conditions. *Food research international*, 107, 130-136.
305. Song, J., Yang, Q., Huang, W., Xiao, Y., Li, D., & Liu, C. (2018). Optimization of trans lutein from pumpkin (*Cucurbita moschata*) peel by ultrasound-assisted extraction. *Food and Bioprocess Processing*, 107, 104-112.
306. Sordillo, M.; Aitken, S.L. (2009). Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128(1-3), pp. 104-109.
307. Southgate, D., (2001). Appendix — Table a.3. In G. A. Spiller (Ed.), *CRC handbook of dietary fiber in human nutrition* (pp. 659–662). (3rd edition). California: CRC Press.
308. Speroni, C. S., Stiebe, J., Guerra, D. R., Bender, A. B. B., Ballus, C. A., dos Santos, D. R., ... & Emanuelli, T. (2019). Micronization and granulometric fractionation improve polyphenol content and antioxidant capacity of olive pomace. *Industrial Crops and Products*, 137, 347-355.
309. Stahl, W., & Sies, H. (2012).  $\beta$ -Carotene and other carotenoids in protection from sunlight. *The American journal of clinical nutrition*, 96(5), 1179S-1184S.
310. Stahl, W., Heinrich, U., Jungmann, H., Sies, H., & Tronnier, H. (2000). Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 71(3), 795-798.
311. Steed, H., & Macfarlane, S. (2009). Mechanisms of prebiotic impact on health. *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*, 135-161.
312. Steinkellner, H., Rabot, S., Freywald, C., Nobis, E., Scharf, G., Chabicovsky, M., ... & Kassie, F. (2001). Effects of cruciferous vegetables and their constituents on drug metabolizing enzymes involved in the bioactivation of DNA-reactive dietary carcinogens. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 480, 285-297.
313. Stevenson, D. G., Eller, F. J., Wang, L., Jane, J. L., Wang, T., & Inglett, G. E. (2007). Oil and tocopherol content and composition of pumpkin seed oil in 12 cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(10), 4005-4013.
314. Strati, I. F., Gogou, E., & Oreopoulou, V. (2015). Enzyme and high pressure assisted extraction of carotenoids from tomato waste. *Food and Bioprocess Processing*, 94, 668-674.
315. Strati, I. F., Gogou, E., & Oreopoulou, V. (2015). Enzyme and high pressure assisted extraction of carotenoids from tomato waste. *Food and Bioprocess Processing*, 94, 668-674.
- Lingyun, W., Jianhua, W., Xiaodong, Z., Da, T., Yalin, Y., Chenggang, C., ... & Fan, Z. (2007). Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers. *Journal of Food engineering*, 79(3), 1087-1093.
316. Strauch, R. C., Mengist, M. F., Pan, K., Yousef, G. G., Iorizzo, M., Brown, A. F., & Lila, M. A. (2019). Variation in anthocyanin profiles of 27 genotypes of red cabbage over two growing seasons. *Food chemistry*, 301, 125289.
317. Stroe, A. C., & Oancea, S. (2020). Immunostimulatory Potential of Natural Compounds and Extracts: A Review. *Current Nutrition & Food Science*, 16(4), 444-454.
318. Stroe, A. C., Draghici, O., Oancea, S. (2018). Influence of pretreatment conditions on the content of antioxidant compounds extracted from *Cucurbita maxima*. *International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM: Surveying Geology & mining Ecology Management*, 18, 261-267.
319. Stroe, P. A. C., Draghici, L. O., & Oancea, S. (2018). Influence of pretreatment conditions on the content of antioxidant compounds extracted from *Cucurbita Maxima*. *International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM*, 18(6.2), 261-267.
320. Sun, X. H., Zhou, T. T., Wei, C. H., Lan, W. Q., Zhao, Y., Pan, Y. J., & Wu, V. C. (2018). Antibacterial effect and mechanism of anthocyanin rich Chinese wild blueberry extract on various foodborne pathogens. *Food Control*, 94, 155-161.
321. Swer, T. L., & Chauhan, K. (2019). Stability studies of enzyme aided anthocyanin extracts from *Prunus nepalensis* L. *LWT*, 102, 181-189.
322. Talavera, S.; Felgines, C.; Texier, O.; Besson, C.; Manach, C.; Lamaison, J.L.; Remesy, C. (2004). Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. *The journal of Nutrition*, 134, pp. 2275-2279.
323. Tam, M.; Gomez, S.; Gross-Gonzalez, M.; A., Marcos. (2003). Possible roles of magnesium on the immune system. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(10), pp. 1193–1197.
324. Tanaka, T., Shnimizu, M., & Moriwaki, H. (2012). Cancer chemoprevention by carotenoids. *Molecules*, 17(3), 3202-3242.
325. Tang, X. C., & Pikal, M. J. (2004). Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharmaceutical research*, 21(2), 191-200.

326. Tao, Y., Zhang, Z., & Sun, D. W. (2014). Kinetic modeling of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grape marc: Influence of acoustic energy density and temperature. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(4), 1461-1469.
327. Tarini, J., Wolever, T. M. (2010). The fermentable fibre inulin increases postprandial serum short-chain fatty acids and reduces free-fatty acids and ghrelin in healthy subjects. *Applied physiology, nutrition, and metabolism*, 35(1), 9-16.
328. Tavakoli, J., Javad Rashidi, M., & Mohammad Bagher Hashemi, S. (2017). Evaluating Antioxidative Activity of the Peel of Cucurbita Pepo Cultivated In Two Areas of Mazandaran, Iran. *Current Nutrition & Food Science*, 13(4), 319-322.
329. Taverniti, V., Fracassetti, D., Del Bo', C., Lanti, C., Minuzzo, M., Klimis-Zacas, D., ... & Guglielmetti, S. (2014). Immunomodulatory effect of a wild blueberry anthocyanin-rich extract in human Caco-2 intestinal cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(33), 8346-8351.
330. Tecucianu, A. C., & Oancea, S. (2019). Ultrasound-assisted and enzyme-assisted extraction of fructans and phenolics from parsnip (*Pastinaca sativa* L.). *Current Trends in Natural Sciences Vol*, 8(15), 29-34.
331. Tecucianu, A. C., Drăghici, O., & Oancea, S. (2020). An enzyme-enhanced extraction of anthocyanins from red cabbage and their thermal degradation kinetics. *Acta Alimentaria*, 49(2), 204-213.
332. Tecucianu, A.C. and Oancea S. (2020). A historical perspective of food and medicinal uses of antioxidants from natural sources. *Acta Musei Brukenthal*, 15(3).
333. Tedesco, I.; Luigi Russo, G.; Nazzaro, F.; Russo, M.; Palumbo, R. (2001). Antioxidant effect of red wine anthocyanins in normal and catalase-inactive human erythrocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 12, pp. 505-511.
334. Tomwall, M.E.; Virtamo, J.; Korhonen, P.A. (2004). Effect of  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene supplementation on coronary heart disease during the 6-year post-trial follow-up in the ATBC study. *European Heart Journal*, 25, pp. 1171-1178.
335. Tonnis, W.F.; Mensink, M.A.; de Jager, A.; van der Voort Maarschalk, K.; Frijlink, H.W.; Hinrichs, W.L.; (2015). Size and molecular flexibility of sugars determine the storage stability of freeze-dried proteins. *Molecular Pharmaceutics*, 12(3), pp. 684-694.
336. Trevor, A.; Mori, L.J. (2004). Omega-3 fatty acids and inflammation. *Current Atherosclerosis Reports*, 6(6), pp. 461-467.
337. Trumbo, P., Yates, A. A., Schlicker, S., & Poos, M. (2001). Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 101(3), 294.
338. Tsuda, T.; Horio, F.; Osawa, T. (2000). The role of anthocyanins as an antioxidant under oxidative stress in rats. *Biofactors*, 13, pp. 133-139.
339. Tsuda, T.; Watanabe, M.; Ohshima, K.; Norinobu, S.; Choi, S.W. (1994). Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-beta-D-glucoside and cyanidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, pp. 2407-2410.
340. Uchiyama, S., & Yamaguchi, M. (2005).  $\beta$ -Cryptoxanthin stimulates cell proliferation and transcriptional activity in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *International journal of molecular medicine*, 15(4), 675-681.
341. Ursache, F.M.; Botez, E. (2018). Teză de doctorat. Compozite funcționale pe bază de extracte de cătină (*Hippophae rhamnoides*) cu obținerea unor produse alimentare cu valoare adăugată.
342. Ushikubo, F. Y., & Cunha, R. L. (2014). Stability mechanisms of liquid water-in-oil emulsions. *Food Hydrocolloids*, 34, 145-153.
343. Valles, S. L., Dolz-Gaiton, P., Gambini, J., Borrás, C., LLoret, A., Pallardo, F. V., & Viña, J. (2010). Estradiol or genistein prevent Alzheimer's disease-associated inflammation correlating with an increase PPAR $\gamma$  expression in cultured astrocytes. *Brain research*, 1312, 138-144.
344. Van den Ende, W., Peshev, D., & De Gara, L. (2011). Disease prevention by natural antioxidants and prebiotics acting as ROS scavengers in the gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology*, 22(12), 689-697.
345. Varela-Lopez, S. (2002). Functional foods and immune system: a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, pp. 29-33.
346. Vereyken, I.J.; Chupin, V.; Hoekstra, F.A.; Smeekens, S.C.M.; Kruijff, B.; (2003). The Effect of Fructan on Membrane Lipid Organization and Dynamics in the Dry State. *Biophysical Journal*, 84(6), pp. 3759-3766.
347. Vereyken, I.J.; Chupin, V.; Islamov, A.; Kuklin, A.; Hinch, D.K.; de Kruijff, B.; (2003). The effect of fructan on the phospholipid organization in the dry state. *Biophysical Journal*, 85(5), pp. 3058-3065.
348. Verma, A., & Shukla, G. (2013). Administration of prebiotic inulin suppresses 1, 2 dimethylhydrazine dihydrochloride induced procarcinogenic biomarkers fecal enzymes and preneoplastic lesions in early colon carcinogenesis in Sprague Dawley rats. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 991-996.
349. Vinatoru, M., Toma, M., Radu, O., Filip, P. I., Lazurca, D., & Mason, T. J. (1997). The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrasonics sonochemistry*, 4(2), 135-139.

350. Vinatoru, M., Toma, M., Radu, O., Filip, P. I., Lazurca, D., & Mason, T. J. (1997). The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrasonics sonochemistry*, 4(2), 135-139.
351. Vogiatzi, G.; Tousoulis, D.; Stefanadis, C. (2009). The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hellenic Journal of Cardiology*, 50, pp. 402-409.
352. Vogt, L., Ramasamy, U., Meyer, D., Pullens, G., Venema, K., Faas, M. M., ... & de Vos, P. (2013). Immune modulation by different types of  $\beta$ 2 $\rightarrow$ 1-fructans is toll-like receptor dependent. *PloS one*, 8(7), e68367.
353. Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant*, 3(1), pp. 2-20.
354. Vuoltilainen, S.; Nurmi, T.; Mursu, J.; Rissanen, T.H. (2006). Carotenoids and cardiovascular health. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83, pp. 1265-1271.
355. Walk, A. M., Khan, N. A., Barnett, S. M., Raine, L. B., Kramer, A. F., Cohen, N. J., ... & Hillman, C. H. (2017). From neuro-pigments to neural efficiency: The relationship between retinal carotenoids and behavioral and neuroelectric indices of cognitive control in childhood. *International Journal of Psychophysiology*, 118, 1-8.
356. Walstra, P. (2002). Physical chemistry of foods. CRC Press.
357. Wan, L., Tan, H. L., Thomas-Ahner, J. M., Pearl, D. K., Erdman, J. W., Moran, N. E., & Clinton, S. K. (2014). Dietary tomato and lycopene impact androgen signaling-and carcinogenesis-related gene expression during early TRAMP prostate carcinogenesis. *Cancer Prevention Research*, 7(12), 1228-1239.
- Alexander, M., Newmark, H., & Miller, R. G. (1985). Oral beta-carotene can increase the number of OKT4+ cells in human blood. *Immunology letters*, 9(4), 221-224.
358. Wang, H.; Cao, G.; Prior, R.L. (1997). Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, pp. 304-309.
359. Wang, H.; Nair, M.G.; Strasburg, G.M.; Chang, Y.C.; Booren, A.M. (1999). Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *Journal of Natural Products*, 62, pp. 294-296.
360. Wiczowski, W., Szawara-Nowak, D., & Topolska, J. (2015). Changes in the content and composition of anthocyanins in red cabbage and its antioxidant capacity during fermentation, storage and stewing. *Food chemistry*, 167, 115-123.
361. Wintergerst, E.S.; Maggini, S.; Horning, D.H. (2007). Contribution of Selected Vitamins and Trace Elements to Immune Function. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 51(4), pp. 301-323.
362. Wisniewska, A.; Subczynski, W.K. (1998). Effects of polar carotenoids on the shape of the hydrophobic barrier of phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1368, pp. 235-246.
363. Wisniewska, A.; Subczynski, W.K. (2006). Accumulation of macular xanthophylls in unsaturated membrane domains. *Free Radical Biology and Medicine*, 40, pp. 1820-1826.
364. Wloch, E.; Wieckowski, S.; Turek, A.M. (1987). Spectroscopic characteristics of the long wavelength absorbing form of beta carotene. *Photosynthetica*, 21(1), pp. 2-8.
365. Wood, S. M., Beckham, C., Yosioka, A., Darban, H., & Watson, R. R. (2000).  $\beta$ -Carotene and selenium supplementation enhances immune response in aged humans. *Integrative Medicine*, 2(2-3), 85-92.
366. Wopereis, H., Sim, K., Shaw, A., Warner, J. O., Knol, J., & Kroll, J. S. (2018). Intestinal microbiota in infants at high risk for allergy: effects of prebiotics and role in eczema development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(4), 1334-1342.
367. Workneh, T. S., Zinash, A., & Woldetsadik, K. (2014). Blanching, salting and sun drying of different pumpkin fruit slices. *Journal of food science and technology*, 51(11), 3114-3123.
368. World Health Organization. (2018, 09 12). *Cancer*. Retrieved 12 28, 2018, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
369. Xiao, Y. D., Huang, W. Y., Li, D. J., Song, J. F., Liu, C. Q., Wei, Q. Y., ... & Yang, Q. M. (2018). Thermal degradation kinetics of all-trans and cis-carotenoids in a light-induced model system. *Food chemistry*, 239, 360-368.
370. Xiong, X., Cao, X., Zeng, Q., Yang, X., Wang, Y., Zhang, R., & Su, D. (2021). Effects of heat pump drying and superfine grinding on the composition of bound phenolics, morphology and microstructure of lychee juice by-products. *LWT*, 111206.
371. Yi, W.; Ficher, J.; Akoh, C.C. (2005). Study of anticancer activities of muscadine grape phenolics in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp. 8804-8812.
372. Yoshida, K.; Kitahara, S.; Ito, D.; Kondo, T. (2006). Ferric ions involved in the flower color development of the Himalayan blue poppy, *Meconopsis grandis*. *Phytochemistry*, 67(10), pp. 992-998.
373. Zhang, Y.; Seeram, N.P.; Lee, R.; Feng, L.; Heber, D. (2008). Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp. 670-675.