

Universitatea “Politehnica” din Timișoara
Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului

Ing. Nicoleta G. HĂDĂRUGĂ

**CONTRIBUȚII PRIVIND
PROTEJAREA ȘI ELIBERAREA
CONTROLATĂ A PRINCIPILOR
BIOACTIVE**

- teză de doctorat -

Conducător științific:

Prof. Dr. Ing. Alfa Xenia LUPEA

Timișoara
2005

“Politehnica” University of Timișoara
*Faculty of Industrial Chemistry and
Environmental Engineering*

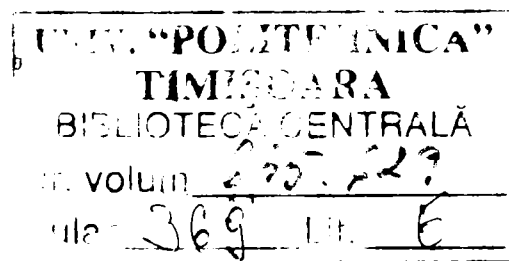
Dipl. Eng. Nicoleta G. HĂDĂRUGĂ

PROTECTION AND CONTROLLED RELEASE OF THE BIOACTIVE COMPOUNDS

- PhD Thesis -

Scientifical promoter:

Prof. Eng. Alfa Xenia LUPEA, PhD



***Timișoara
2005***

CUPRINS

1.	INTRODUCERE	5
2.	STADIUL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU	8
2.1.	MICRO- ȘI NANOÎNCAPSULARE. GENERALITĂȚI	8
2.2.	MATRICI UTILIZATE PENTRU PROTEJAREA ȘI ELIBERAREA CONTROLATĂ A BIOMOLECULELOR	8
2.2.1.	<i>Oligozaharide</i>	8
2.2.1.1.	Structura ciclodextrinelor	9
2.2.1.2.	Derivați ai ciclodextrinelor	10
2.2.1.3.	Proprietățile și caracterizarea ciclodextrinelor	11
2.2.1.4.	Metode de analiză a ciclodextrinelor	12
2.2.1.5.	Obținerea și degradarea enzimatică a ciclodextrinelor	13
2.2.1.6.	Obținerea, proprietățile, caracterizarea și analiza complexilor ciclodextrinelor	13
2.2.2.	<i>Polizaharide</i>	16
2.2.2.1.	Agar	16
2.2.2.2.	Alginați	17
2.2.2.3.	Carrageenani	17
2.2.2.4.	Gumă gellan	18
2.2.2.5.	Pectine	18
2.2.2.6.	Derivați de celuloză	19
2.2.2.7.	Exudate polizaharidice	19
2.2.2.8.	Gume din semințe	20
2.2.3.	<i>Lipide</i>	20
2.2.4.	<i>Polimeri sintetici</i>	21
2.2.4.1.	Rășini epoxidice	21
2.2.4.2.	Polimeri vinilici	22
2.2.4.3.	Poliuretani	24
2.2.4.4.	Polimeri siliconici	24
2.3.	APLICAȚII ALE MICRO- ȘI NANOÎNCAPSULĂRII	25
2.3.1.	<i>Aplicații în domeniul alimentară</i>	25
2.3.2.	<i>Aplicații în domeniul farmaceutic</i>	27
2.3.3.	<i>Aplicații în domeniile cosmetic, agricol, zootehnic și al tutunului</i>	28
3.	CONTRIBUȚII PROPRII	30
3.1.	INTRODUCERE	30
3.2.	NANOCAPSULE ACIZI GRAȘI/CICLODEXTRINE (REZULTATE ȘI DISCUȚII)	31
3.2.1.	<i>Nanocapsule acid oleic/α- și β-ciclodextrină</i>	31
3.2.2.	<i>Nanocapsule acid linoleic/α- și β-ciclodextrină</i>	38
3.2.3.	<i>Nanocapsule acid linolenic/α- și β-ciclodextrină</i>	45
3.2.4.	<i>Modelarea moleculară a interacțiunii acid gras/ciclodextrine</i>	49
3.2.5.	<i>Concluzii parțiale</i>	57
3.3.	NANOCAPSULE ULEIURI VOLATILE/β-CICLODEXTRINĂ (REZULTATE ȘI DISCUȚII)	58
3.3.1.	<i>Nanocapsule uleiuri volatile de plante din clasa Dicotyledonatae/β-ciclodextrină</i>	58
3.3.1.1.	Familia Apiaceae	58
3.3.1.2.	Familia Lamiaceae	67
3.3.1.3.	Familia Rutaceae	85
3.3.1.4.	Familia Myrtaceae	88
3.3.1.5.	Familia Lauraceae	93
3.3.1.6.	Familia Rosaceae	95
3.3.2.	<i>Nanocapsule uleiuri volatile de plante din clasa Monocotyledoneae/β-ciclodextrină</i>	99
3.3.3.	<i>Nanocapsule uleiuri volatile de plante din clasa Pinatae/β-ciclodextrină</i>	103
3.3.3.1.	Familia Pinaceae	103
3.3.3.2.	Familia Cupressaceae	110
3.3.4.	<i>Analiza multivariată (PCA) a datelor GC pentru complexii uleiuri volatile/β-ciclodextrină</i>	117
3.3.4.1.	PCA în clasa Dicotyledonatae	117
3.3.4.2.	PCA în clasa Pinatae	122
3.3.4.3.	PCA în clasele Dicotyledonatae-Pinatae	127
3.3.5.	<i>Concluzii parțiale</i>	131

3.4. APLICAȚII ALE COMPLECȘILOR ULEI VOLATIL/ β-CICLODEXTRINĂ (REZULTATE ȘI DISCUȚII)	132
3.4.1. <i>Concluzii parțiale</i>	134
3.5. PARTE EXPERIMENTALĂ	135
3.5.1. <i>Nanoîncapsularea acizilor grași</i>	135
3.5.1.1. Materiale utilizate	135
3.5.1.2. Metoda de complexare a acizilor grași	135
3.5.1.3. Derivatizarea acizilor grași	135
3.5.1.4. Recuperarea acizilor grași din complex	136
3.5.1.5. Derivatizarea probelor extrase din complex	136
3.5.1.6. Degradarea acizilor grași și a complecșilor acestora cu α - și β -ciclodextrină	136
3.5.1.7. Derivatizarea acizilor grași degradați și a probelor extrase din complecșii degradați	137
3.5.1.8. Analiza GC-MS	137
3.5.1.9. Determinarea indicilor de retenție Kovats (KI)	138
3.5.1.10. Calorimetria de scanare diferențială (DSC)	140
3.5.1.11. Modelarea moleculară	142
3.5.1.12. Analiza conformațională	143
3.5.2. <i>Nanoîncapsularea uleiurilor volatile</i>	144
3.5.2.1. Materiale utilizate	144
3.5.2.2. Metoda de complexare	145
3.5.2.3. Recuperarea uleiurilor volatile din complecși	145
3.5.2.4. Analiza GC-MS	146
3.5.2.5. Analiza TG-DTG	146
3.5.2.6. Analiza componentelor principale (PCA) pentru nanocapsulele uleiuri volatile/ β -ciclodextrină	146
3.5.3. <i>Aplicații ale complecșilor ulei volatil/β-ciclodextrină</i>	149
3.5.3.1. Materiale și metode	149
3.5.3.2. Analiza componentelor principale (PCA) pentru analiza senzorială a produselor de patiserie	149
CONCLUZII FINALE	150
BIBLIOGRAFIE	154
ANEXA 1	169
ANEXA 2	189
PH.D. THESIS ABSTARCT	205

PREFATĂ

Nanoîncapsularea compușilor bioactivi în scopul protejării și eliberării controlate a acestora constituie un domeniu extrem de actual, cu implicații în sferile chimiei supramoleculare, biochimiei, produselor medicamentoase, cosmetice și alimentare.

Investigațiile efectuate pe parcursul elaborării tezei de doctorat, abordând aspecte fundamentale și aplicative în domeniul chimiei supramoleculare, au avut ca scop principal evaluarea capacității de nanoîncapsulare și protejare a unor principii bioactive de către ciclodextrine.

Acum, la finalizarea cercetărilor care fac obiectul prezentei teze de doctorat, sentimentul deosebitei considerații și profunde recunoștințe se adresează doamnei Prof. Dr. Ing. Alfa Xenia Lupea, care mi-a făcut onoarea de a direcționa și conduce investigațiile întreprinse.

Pe întreg parcursul desfășurării cercetărilor un ajutor deosebit mi-a fost acordat de domnul Dr. Ing. Sorel Mureșan, AstraZeneca R&D Mölndal, Sweden, către care se îndreaptă mulțumirile mele și deosebita recunoștință.

În perioada de elaborare a diverselor părți din teză am beneficiat de sprijinul generos și competent al Conf. Dr. Ing. Geza Bandur de la Universitatea "Politehnica" din Timișoara, căruia îi exprim mulțumirile mele și o aleasă prețuire.

Mulțumiri pentru sprijin, colaborare și cooperare adresez domnului Prof. Dr. Ing. Ionel Jianu, Ș.l. Dr. Ing. Francisc Peter și Ing. Z. Stanoiev.

Doresc să exprim mulțumirile mele domnului Prof. Dr. Virgil Păunescu, Conf. Dr. Călin Tatu și Asist. Ing. Valentin Ordodi de la Laboratorul de Imunologie și Transplant din Timișoara cu ajutorul cărora am reușit să realizez o parte din analizele necesare.

Exprim tuturor persoanelor nenominalizate aici, care, într-o formă sau alta, au contribuit prin competență și spirit de cooperare la realizarea diferitelor proiecte de cercetare, sentimentul recunoștinței sincere.

În fine, dar nu în ultimul rând, sentimentul recunoștinței și profunde prețuiri se adresează părinților mei care au vegheat în cursul anilor tineri ai formării mele și soțului meu pentru sprijin și încurajare.

Nu este posibil de a încheia aceste rânduri fără a exprima sentimentul profundei gratitudini cadrelor didactice de la Facultatea de Tehnologie Produselor Agroalimentare a Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului, care au contribuit la formarea profesioanlă a subsemnatei.

Ing. Nicoleta Hădărugă

1. INTRODUCERE

Protejarea și eliberarea controlată a biomoleculelor reprezintă un domeniu vast și foarte actual, cu aplicații în special în industriile de medicamente, cosmetică și alimentară.

Cele mai utilizate sisteme de protejare și eliberare controlată a biomoleculelor sunt lipozomii, în special în industria farmaceutică și în practica medicală [1-5].

Lipozomii au fost studiați pentru prima dată în 1965 ca modele pentru membrane biologice [4]; mai târziu au fost folosite drept agenți de transport pentru diferiți compuși cu activitate terapeutică, iar mai recent au fost obiectul unor studii și în sectorul cosmetic.

Lipozomii sunt vezicule sferice ce prezintă central o cavitate hidrofilă, înconjurată de un număr variabil de lamele biomoleculare, compuse din fosfolipide, cu dimensiuni între 15 și 3500 nm [1-8].

De un interes deosebit se bucură materialele utilizate în transplantul celular (trasplant de celule imunoizolate) [9,10] sau încapsularea și eliberarea controlată a proteinelor, enzimelor sau antigenilor [11-17]. Acestea sunt de obicei microsferă pe bază de algiinați, agaroză și materiale compozite pe bază de agaroză/carboximetilceluloză, guma arabica, carragenani, chitozani, pectine, respectiv diverși polimeri sintetici de tipul poliacrilatilor.

Un domeniu relativ nou al chimiei organice, care a suscit o atenție deosebită, este cel care tratează complexarea unor molecule organice (molecule oaspete) în interiorul altor molecule (molecule gazdă) ce conțin cavități, canale sau buzunare. Astfel de complexări moleculare sunt baza proceselor specifice ce apar în biologie, cum ar fi legarea substratului la o enzimă sau recunoașterea dintre fragmentele de ADN. Aceste procese de recunoaștere moleculară au fost cunoscute sub genericul "chimia gazdă-oaspete"; mai târziu, Lehn [18] a introdus termenul mult mai general de chimie supramoleculară care este definit ca studiul structurilor și funcțiilor complexelor sau agregatelor ce rezultă din interacțiunile necovalente dintre molecule.

Ciclodextrinele au fost primii compuși studiați din punct de vedere al comportării la complexare și al proprietăților catalitice, obiectivul fiind acela de a mima enzimele. Prima publicație a apărut în 1891 [18-21], când Villiers a raportat izolarea a două tipuri diferite de compuși cristalini din degradarea amidonului tratat cu bacteria *Bacillus amylobacter*. Villiers a caracterizat acești compuși prin proprietățile lor fizice și i-a denumit "celulozine". Câțiva ani mai târziu Schardinger [20,21] a publicat mai multe date fizice relativ la acești compuși. El a continuat cu izolarea bacteriei responsabile pentru formarea ciclodextrinelor (*Bacillus macerans*) care este astăzi cea mai utilizată sursă din lume pentru producerea ciclodextrinelor. Datorită lucrărilor de pionierat ale acestuia, ciclodextrinele sunt adesea denumite dextrine Schardinger. Alte denumiri, cum ar fi cele din literatura veche, sunt cicloglucani, ciclomaltooligozaharide și cicloamiloze.

Lunga istorie a ciclodextrinelor cuprinde patru perioade [18]. În prima perioadă (din 1891 până la mijlocul anilor 1930) structura și potențialul industrial al ciclodextrinelor a fost neclar. După 24 de ani de la ultima publicație a lui Schardinger a fost rândul lui Pringsheim să joace un rol important în cercetarea ciclodextrinelor. Acesta a avut multe publicații, însă lucrările lui conțineau multe repetări, contradicții și erori. Totuși, lui îi este atribuită puterea de complexare a ciclodextrinelor.

În cea de-a doua perioadă, de la mijlocul anilor 1930 până în anii 1970, a fost elucidată structura ciclodextrinelor de către Freudenberg și colaboratorii [18]; au fost studiate proprietățile complexelor și s-au obținut numeroși derivați. De-a lungul acestei perioade sunt de remarcat numele de Cramer și French [18].

Cea de-a treia perioadă este caracterizată de o puternică explozie în domeniul articolelor științifice și al patentelor, privind studiile de toxicologie și începutul producției industriale a ciclodextrinelor.

A patra perioadă, care a început acum mai bine de un deceniu, este caracterizată prin cea de-a doua generație de ciclodextrine: producția industrială și utilizarea ciclodextrinelor modificate chimic.

Încapsularea a fost introdusă inițial în industriile de medicamente și alimentară pentru a obține materiale într-o formă uscată și pentru a realiza o protecție a acestor materiale [19]. Aplicarea

tehniciilor de încapsulare pentru alte principii medicamentoase sau alimentare prezintă la ora actuală o atenție mărită, deoarece aceste tehnici reprezintă un mijloc de protecție a compușilor bioactivi față de mediul înconjurător și față de ceilalți compuși din mediu [22]. În plus, s-au descoperit și dezvoltat metode de încapsulare pentru protejarea unor compuși specifici care permit și o eliberare controlată a acestora.

Cele mai importante avantaje ale aplicării încapsulării moleculare în industria alimentară și farmaceutică sunt [18]:

- Eliberarea controlată și protejarea compușilor aromatizanți și medicamentoși împotriva: oxidării, transformărilor induse de radiațiile luminoase, descompunerii termice, pierderilor prin volatilizare sau sublimare la stocare, obținerea unor specialități hidrosolubile.
- Eliminarea sau reducerea: gusturilor și mirosurilor neplăcute, fibrelor alimentare și a altor componente nearomatizante neplăcute, higroscopicității.
- Avantaje tehnologice: compoziții stabile, standardizabile, dozarea și mânuirea simplă a pulberilor, reducerea costurilor de ambalare și stocare, procese mult mai economice.

Obiectivele prezentei Teze de Doctorat sunt: realizarea un studiu privind capacitatea de încapsulare a acizilor grași nesaturați în ciclodextrine, în scopul protejării biocompușilor la degradarea (compuși de oxidare cu impact negativ puternic asupra sănătății omului, care pot fi responsabili de apariția diverselor forme de cancer [23]) datorată factorilor de mediu, respectiv obținerea și studiul unor biosisteme supramoleculare complexe între uleiuri volatile și ciclodextrine, în scopul stabilizării compușilor labili și evaluării competitivității la încapsulare a componentelor acestor uleiuri. Pentru aceasta se are în vedere:

- obținerea unei serii de bionanocapsule acizi grași/ciclodextrine prin metoda în soluție și caracterizarea lor prin calorimetrie de scanare diferențială (DSC-Differential Scanning Calorimetry); se vor utiliza drept componentă "oaspete" acizii oleic, linoleic și linolenic, iar drept componentă "gază" α - și β -ciclodextrina. În scopul evaluării concentrației componentelor încapsulate (acidul gras principal și componentele de impurificare) se va proceda la derivatizarea (esterificare cu $\text{MeOH}\cdot\text{BF}_3$) probelor inițiale și a celor recuperate din complexi prin extracție repetată în hexan și analiza GC-MS care permite atât identificarea componentelor (din datele MS și/sau din indicii de retenție Kovats), cât și stabilirea compoziției probelor;
- degradarea termică a probelor de acizi grași neîncapsulați (la temperaturi de 50-150°C, în prezența aerului la presiune normală) și determinarea componentelor de degradare, după derivatizare, respectiv a compoziției probelor degradate prin analiză GC-MS;
- degradarea termică a nanocapsulelor acid gras/ciclodextrină în aceleași condiții ca în cazul acizilor neîncapsulați, recuperarea probelor încapsulate degradate prin extracție repetată în hexan și analiza GC-MS a acestora pentru evaluarea tipului și concentrației componentelor de degradare, respectiv evaluarea capacității de protejare a acizilor grași de către ciclodextrine în condițiile degradării termice;
- modelarea moleculară a interacțiunii acestor biocompuși cu ciclodextrinele, utilizând programe de mecanică moleculară specifice și compararea rezultatelor obținute privind energiile de interacțiune cu cele rezultate din analiza DSC;
- obținerea, caracterizarea și analiza multivariată a datelor pentru biosistemele supramoleculare uleiuri volatile/ciclodextrine. Se are în vedere utilizarea de uleiuri volatile din plante din clasele botanice Dicotyledonatae, Monocotyledoneae și Pinatae;
- din prima clasă botanică (Dicotyledonatae) se vor studia uleiurile volatile provenite din plante din familiile Apiaceae (chimen, coriandru, fenicol, mărar), Lamiaceae (busuioc, cimbru, lavandă, măghiran, mentă, mentă creată, salvie), Rutaceae (bergamot, lămâie, portocală), Myrtaceae (cuișoare, eucalipt), Lauraceae (scorțișoară) și Rosaceae (trandafir). Uleiurile volatile vor fi încapsulate în β -ciclodextrină, iar nanocapsulele vor fi analizate prin

termogravimetrie în scopul evaluării formării complexului și a concentrației de ulei volatil încapsulat. Pentru evaluarea competitivității la încapsulare a componentelor uleiurilor volatile se va realiza analiza GC-MS a uleiurilor volatile proaspete și a celor recuperate din complex prin extracție repetată în hexan;

- din cea de-a doua clasă botanică (Monocotyledoneae) se va studia uleiul volatil de usturoi (familia Liliaceae). Acesta va fi încapsulat tot în β -ciclodextrină prin metoda în soluție, iar complexul și uleiul volatil neîncapsulat sau extras din complex în același mod vor fi analizate prin TG și, respectiv, GC-MS;
- din a treia clasă botanică (Pinatae) se vor studia uleiurile volatile provenite din plante aparținând familiilor Pinaceae (brad, molid, terebentină) și Cupressaceae (ienupăr-plantă, cetină și fruct). Se va proceda la nanoîncapsularea în β -ciclodextrină a uleiurilor volatile, analiza TG a complexilor și analiza GC-MS a uleiurilor volatile în modul amintit;
- datele analizelor GC-MS (concentrațiile procentuale ale componentelor) vor fi prelucrate într-o abordare originală, prin analiză statistică multivariată modernă (PCA-analiza componentelor principale) în scopul clasificării probelor atât în cazul claselor botanice Dicotyledonatae și Pinatae considerate separat, cât și în cazul acestor clase analizate împreună. Se va evalua modul de grupare a probelor în familii sau clase botanice, respectiv în probe proaspete sau încapsulate și se va identifica importanța componentelor uleiurilor în obținerea acestor clasificări;
- se va studia posibilitatea aplicării practice a unor nanocapsule în industria produselor de patiserie în scopul îmbunătățirii calității și stabilității acestora.

2. STADIUL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU

2.1. MICRO- ȘI NANOÎNCAPSULARE. GENERALITĂȚI

Protejarea și în special eliberarea controlată a diverselor molecule organice se realizează aproape exclusiv prin intermediul micro- sau nanocapsulelor (micro- sau nanoparticulelor) [1,4,9,11,24-28]. Micro- și nanocapsulele sunt particule de dimensiuni reduse ce conțin un agent activ sau un material intern înconjurat de un material de acoperire sau de un înveliș. Capsulele obținute prin încorporarea unuia sau a mai multor compuși în alte structuri omogene sau heterogene se pot clasifica astfel [4]: nanocapsule (particule cu dimensiuni mai mici de 1 μm); microcapsule (particule cu dimensiuni între 1-1000 μm ; produsele comerciale sunt cu dimensiuni între 3-800 μm , cu un procent de parte activă de 10-90%); macrocapsule (particule cu diametre mai mari de 1000 μm). Particulele pot fi sferice (cu miez ca fază continuă) sau miez multisferic în învelișul format dintr-o fază continuă (figura 2.1).

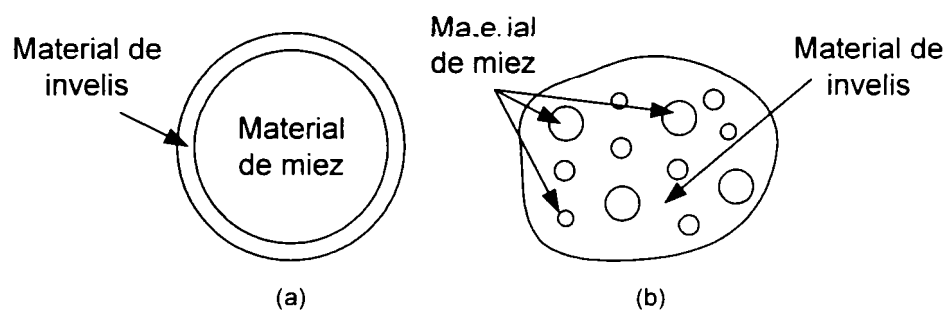


Figura 2.1. (a) Microcapsule continue miez/inveliș; (b) microcapsule multinucleare.

Conceptul de microparticule datează din anii 1930, obținerea acestora bazându-se pe procese fizice, chimice (polimerizare), sau combinate (fizice și chimice). O clasificare mult utilizată în cazul microcapsulelor este în procese chimice (de tip A: coacervare complexă, incompatibilitate polimer-polimer, polimerizare interfacială în mediu lichid, polimerizare *in situ*, gelifiere termică și ionică în mediu lichid) și procese mecanice (de tip B: pulverizare-uscare, pat fluidizat, depunere electrostatică, extrudare centrifugală, separare din suspensie pe sisteme rotative). Se încapsulează, de obicei, aditivi alimentari, aromatizanți, odoranți, celule, enzime, medicamente, cerneluri, adezivi etc, iar materialele de înveliș pot fi oligo- și/sau polimeri, grăsimi, ceruri, lipide etc.

Nanocapsulele sau compușii de incluziune sunt sisteme supramoleculare cu structuri de tipul aducțiilor, rezultate prin încapsularea moleculară a unui compus organic sau anorganic (de exemplu un compus bioactiv), ca "oaspete", într-o moleculă "gază" (cum este cazul ciclodextrinelor). Acest ultim tip de încapsulare (încapsulare moleculară) furnizează cel mai scăzut nivel de încapsulare (nanoîncapsulare), realizând o protecție aproape perfectă a compușilor bioactivi [4,19,29,30].

2.2. MATRICI UTILIZATE PENTRU PROTEJAREA ȘI ELIBERAREA CONTROLĂȚĂ A BIOMOLECULELOR

2.2.1. Oligozaharide

Deși există mai puține cazuri în care oligozaharidele sunt utilizate ca matrici de încapsulare, o subclasă din această grupă de carbohidrați s-a făcut remarcată datorită calităților excelente privind încapsularea moleculară a multor compuși organici și chiar anorganici. Este cazul ciclodextrinelor, oligozaharide ciclice care vor fi tratate mai amănunțit în cele ce urmează.

2.2.1.1. Structura ciclodextrinelor

Degradarea enzimatică a amidonului conduce, în general, la glucoză, maltoză, maltotrioză etc., și o serie de malto-oligomeri liniari sau ramificați, cunoscuți ca dextrine [20,31-34]. Dextrinele sunt compuși heterogeni, amorfii, higroscopici, produși în cantități mari pentru industriile alimentară, textilă, a hârtiei și sunt de multe ori consumați fără a fi izolați înainte (în produse cum ar fi berea și pâinea). Dacă, totuși, amidonul este degradat de enzima glucoziltransferază (CGT – Cyclodextrin Glucosil Transferase), produsul primar al lanțului splitat suferă o reacție intramoleculară fără participarea moleculelor de apă. Se formează compuși ciclici cu legături 1,4- α -glicozidice, cunoscuți sub denumirea de ciclodextrine [18,35-39] (figura 2.2).

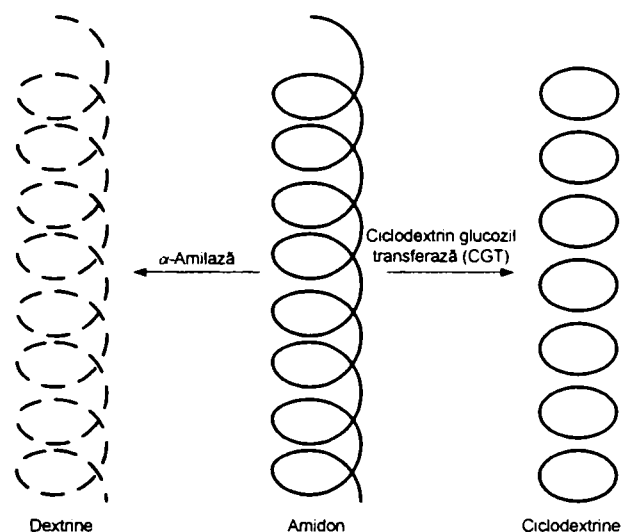


Figura 2.2. Formarea dextrinelor aciclice și ciclice din amidon.

Ciclodextrinele sunt o familie de trei oligozaharide ciclice produse industrial în cantități mari și câteva mai rare ce apar în cantități mici [18,20,39]. Cele trei ciclodextrine mai importante sunt substanțe cristaline, omogene și nehigroscopice, care au o formă de inel cu aspect toroidal, construite din unități glucopiranozice. α -Ciclodextrina, cunoscută și ca α -dextrină Schardinger, ciclomaltohexoză, ciclohexaglucan, ciclohexaamiloză, α -CD, ACD și C6A, este compusă din șase unități glucopiranozice. β -Ciclodextrina, cunoscută de asemenea ca β -dextrină Schardinger, ciclomaltoheptoză, cicloheptaglucan, cicloheptaamiloză, β -CD, BCD, C7A, conține șapte unități glucopiranozice, iar γ -ciclodextrina, γ -dextrină Schardinger, ciclomaltooctoză, ciclooctaglucan, ciclooctaamiloză, γ -CD, GCD și C8A, conține opt astfel de unități (figura 2.3).

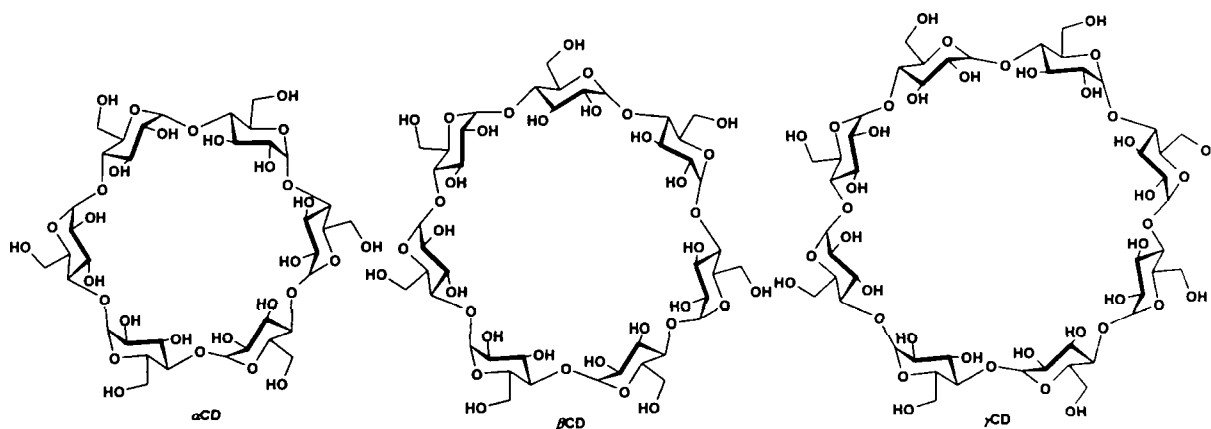


Figura 2.3. Structura α -, β - și γ -ciclodextrinei.

S-a demonstrat prin calcule de energie conformațională că nu se pot forma ciclodextrine cu mai puțin de șase membri în inel din motive sterice. Omologi superiori, cum ar fi δ -, ϵ -, ζ - și η -ciclodextrina, au fost obținuți de către Pulley și French [18].

Ca o consecință a conformației atomului de carbon C_1 a unității glucozilorpiranozice, toate grupele secundare hidroxil sunt situate pe una din cele două suprafețe marginale ale inelului, iar cele primare pe cealaltă. Cavitata este linearizată de către legăturile de hidrogen cu oxigenul glicozidic. Perechile de electroni neparticipanți ai punții de oxigen glicozidic sunt îndreptați spre interiorul cavității, producând o densitate mare de electroni și oferindu-i acesteia un caracter de bază Lewis. Grupul C_2 -OH al unei unități glucopiranozice poate forma legătură de hidrogen cu grupul C_3 -OH al unității glucozilorpiranozice vecine. În molecula de ciclodextrină se formează o centură secundară din legăturile de hidrogen, rezultând o structură rigidă [40-43]. Figura 2.4 ilustrează caracteristicile structurale ale ciclodextrinelor iar în figura 2.5 sunt prezentate dimensiunile moleculare ale celor trei ciclodextrine principale (α -, β - și γ CD). Când este implicată în formarea unor complecși de incluziune, ciclodextrina este mai degrabă un con trunchiat decât cilindru.

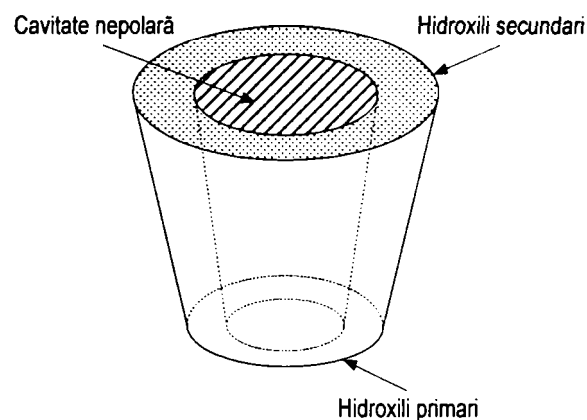


Figura 2.4. Schema structural-funcțională a ciclodextrinelor.

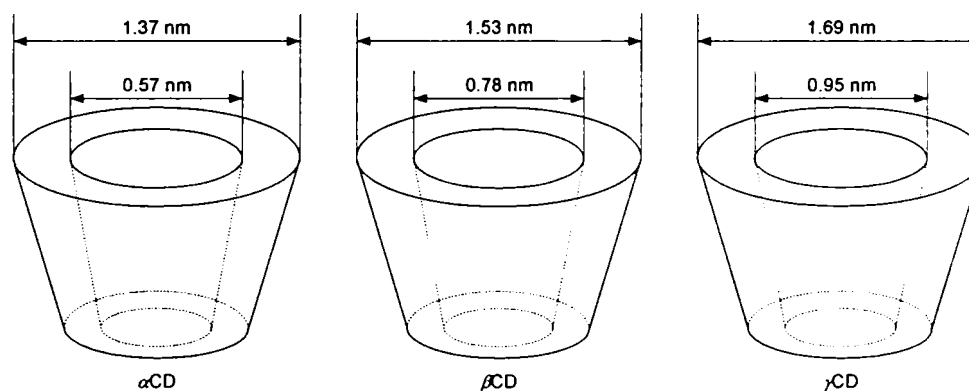


Figura 2.5. Dimensiunile moleculare ale ciclodextrinelor.

2.2.1.2. Derivați ai ciclodextrinelor

Ciclodextrinele pot fi modificate prin:

- substituția unuia sau a mai multor atomi de hidrogen ai hidroxililor primari și/sau secundari (esteri, eteri, glucozil-ciclodextrine);
- substituția unuia sau a mai multor hidroxili primari/secundari (deoxi, halogeno, amino etc.);
- splitarea uneia sau mai multor legături C_2 - C_5 prin oxidare periodată (dialdehid-ciclodextrina sau, după reducere, eteri coroană).

S-au obținut astfel derivați alchilați (cu radicali metil, etil, propil, alil, benzil, tritil, hidroxi-alchil etc.), derivați acilați (cu radicali acetil, benzoil, tosil, mesil, cinamoil, glutaril, lauril), esteri cu acizi anorganici (sulfati, azotați, fosfați), derivați cu azot (ce conțin grupări amino, alchilamino, azido, imidazolil, piperidil, adenil, histaminidil, piridil etc.), derivați halogenați (6-deoxi-6-cloro/bromo/iododerivați, mono(3-deoxi-3-iodo)derivați), 6-deoxiderivați, derivați cu sulf (eteri sulfopropilici, deoximercaptoderivați, deoxitioglicolaminoderivați, ciclodextrine conectate prin punți disulfidice), silil derivați (ce conțin grupări dimetilsilil, trimetilsilil, *t*-butildimetilsilil etc.), di- sau oligomeri ai ciclodextrinelor (oligomeri conținând punți azobenzenice, stilbenice, derivați de eteri coroaă etc.), derivați C₅-carboxilați sau carboximetilați, carbonați și carbamați, glucozil-ciclodextrine, derivați de ciclodextrine cu unități alterate de D-glucoză [18,20,30,44-79].

Oxidarea completă a grupelor hidroxil primare se poate realiza în prezența dioxidului de azot (N₂O₄) sau prin oxidare catalitică cu O₂/Pt, cu obținerea derivaților total carboxilați corespunzători. α -Ciclodextrin-6-carboxaldehida a fost obținută prin două metode [80]. Prima implică conversia 6-*O*-tosil derivatului intermediar în 6-azidă cu azidă de sodiu, apoi fotoliza la mono-(5-formil-5-demetil-6-deoxi)- α -ciclodextrină. A doua cale apelează la reducerea catalitică a 6-azidei de mai sus pentru a obține amina corespunzătoare, care a fost este dezaminată oxidativ la tratarea cu ninhidrină în soluție apoasă de bicarbonat de sodiu. Modificări selective ale funcțiunilor hidroxil primare pot fi realizate în vederea obținerii derivaților mono-, di-, tri-, tetra- și poli-C₆-substituiți, ca și amestecuri de produse C₆-substituite. Obținerea multor ciclodextrine monoalchilate a fost realizată utilizând un intermediar mono-6-trifenilmetilic (tritil), a cărui sinteză originală a fost descrisă de Melton și Slessor [80]. În mod asemănător a fost preparată 6-*O*-monotoluensulfonil- α -ciclodextrina prin esterificarea α -ciclodextrinei liofilizate în piridină. De asemenea, au fost raportate [80] și sintezele derivaților α - și β -ciclodextrinei în care funcțiunile hidroxil primare sunt substituite cu tosil, mesil sau alți esteri arilsulfonici. S-au obținut derivați de α - și β -ciclodextrină în care grupele hidroxil primare au fost modificate selectiv prin două metode, una care implică activarea selectivă a hidroxilului primar prin intermediul unei sări trifenilfosfoniu și apoi transformare în azidă iar a doua, indirectă, presupune perbenzoilarea funcției hidroxil și apoi deprotejarea funcției alcool primar. Derivații de ciclodextrine parțial substituiți, menționați mai sus, au fost utilizați pentru sinteza unei varietăți mari de amino-, azido- și halogenoderivați, precum și ai unor derivați de ciclodextrine cu derivați de imidazol, porfirină, piridină cu grupe funcționale prin reacții nucleofile cu reactanți potriviți [80]. Cu randamente bune s-au obținut și 6-bromo-6-deoxi-derivații și 6-deoxi-derivații α -, β - și γ -ciclodextrinei. Producții bromurați și formilați corespunzători au fost deformilați pentru a obține 6-bromo-6-deoxi-derivații ciclodextrinelor, care au fost utilizați drept precursori în obținerea produșilor 6-deoxi corespunzători [80]. S-a descoperit, de asemenea, o metodă pentru monoacilarea grupelor hidroxil secundare din ciclodextrine. Această metodă implică formarea unui complex de incluziune a ciclodextrinei cu molecule oaspete de tipul esterilor arilici care conțin la grupa esterică restul acil necesar, ceea ce permite obținerea derivatului monosubstituit în 2 sau 3 al ciclodextrinei [80].

Compușii ce conțin două sau mai multe unități de ciclodextrină legate prin legături covalente se numesc ciclodextrin-polimeri. Acești polimeri se obțin prin reticularea inelelor ciclodextrinelor sau prin legarea ciclodextrinelor de alți polimeri [18].

2.2.1.3. Proprietățile și caracterizarea ciclodextrinelor

Împachetarea moleculară a ciclodextrinei în cristalele tip rețea apare în unul din următoarele două moduri [18,21,75]: structura tip *colivie* sau structură tip *canal*. În structura tip canal, moleculele de ciclodextrină sunt aranjate una deasupra celeilalte, ca și monedele suprapuse. "Moleculele oaspete" sunt încapsulate în canalele formate de cavitățile aliniate liniar (figura 2.6). Aceste aranjamente mai pot fi de tipul „cap-coadă” sau „cap-cap”.

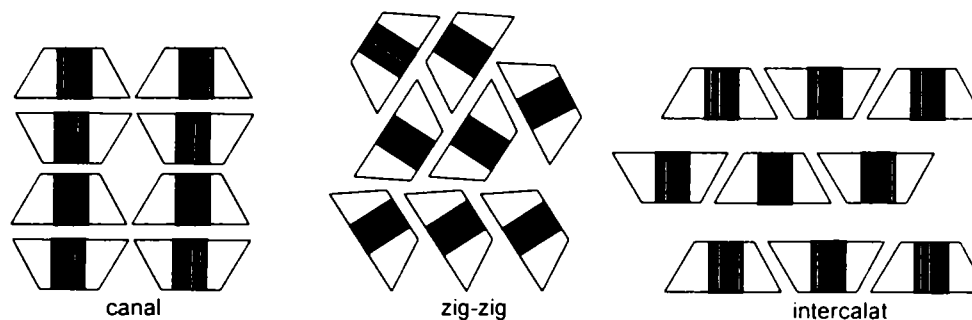


Figura 2.6. Reprezentarea schematică a aranjamentelor tip canal, zig-zag și intercalat.

În structurile cristaline aparținând tipului *colivie*, cavitatea unei singure molecule de ciclodextrină este blocată pe ambele părți de molecule de ciclodextrine adiacente, producând astfel cavități izolate. În acest tip de aranjament moleculele de ciclodextrină pot fi împachetate reticular de tipul zig-zag (cel mai des întâlnit la α -, β - și γ -ciclodextrine) sau de tip intercalat.

Ciclodextrinele pot prezenta mai multe forme cristaline [18,21]. Astfel, α -ciclodextrina poate avea trei forme cristaline diferite (α -ciclodextrina \cdot 6H₂O forma I, α -ciclodextrina \cdot 6H₂O forma II și α -ciclodextrina \cdot 7,5H₂O forma III). Toate structurile de β -ciclodextrină \cdot 12H₂O, β -ciclodextrină \cdot 11H₂O și γ -ciclodextrină \cdot 13,3H₂O sunt de tip zig-zag. În α -ciclodextrină \cdot 6H₂O doar două molecule de apă sunt izolate în interiorul cavității, iar celelalte 4 molecule sunt în afară. Hidratul de β -ciclodextrină are două forme cristaline: β -ciclodextrina \cdot 12H₂O și β -ciclodextrina \cdot 11H₂O. Diferența structurală dintre cele două forme este bazată în principal pe distribuția dezordonată a moleculelor de apă din cavitatea β -ciclodextrinei. În γ -ciclodextrina \cdot 13H₂O sunt incluse 5,5 molecule de apă. Inelul γ -ciclodextrinei este oarecum distorsionat de la structura ortogonală regulată.

Ciclodextrinele nu prezintă grupe reducătoare terminale. În general, ele prezintă reacțiile caracteristice zaharurilor nereducătoare. Hidroliza parțială acidă a ciclodextrinelor conduce la glucoză și la o serie de malto-zaharide aciclice. Această serie este completată de oligozaharide ce conțin tot atâtea unități de glucoză cât ciclodextrinele originale. Stabilitatea inelului la hidroliza acidă este de două până la de cinci ori mai mare, funcție de temperatură și aciditate, decât cea a dextrinelor aciclice. Deschiderea ciclului, prin splitarea primei legături glicozidice, este un proces mai lent decât hidroliza malto-oligozaharidelor astfel formate.

La iradierea cu raze γ a ciclodextrinelor β și γ apare în special splitarea legăturilor 1,4- α -glicozidice. Mecanismul este însă diferit de cel al hidrolizei acide. Nu s-a observat formarea glucozei, principalii produși fiind maltohexozele, malondialdehida și acidul gluconic.

2.2.1.4. Metode de analiză a ciclodextrinelor

Au fost propuse numeroase metode cromatografice pentru determinarea analitică a ciclodextrinelor [18,81-84]. Cea mai veche metodă cromatografică este cromatografia pe hârtie care necesită un timp îndelungat 2-25 ore, în timp ce metodele moderne cum este HPLC (High Performance/Pressure Liquid Chromatography) necesită doar 10-15 min [39,55,78,79,85]. De asemenea, cromatografia în strat subțire este o metodă convenabilă pentru determinarea ciclodextrinelor. Metoda recomandată, cea mai exactă și mai rapidă, pentru determinarea ciclodextrinelor este HPLC. Determinarea ciclodextrinelor prin gaz-cromatografie necesită o atenție deosebită la derivatizare [18].

Metodele fotometrice de analiză sunt rapide dar nu specifice. Deoarece ciclodextrinele nu prezintă absorbție decât în domeniul UV îndepărtat (190 nm), determinarea rapidă a conținutului de ciclodextrină prin fotometrie este posibilă doar în prezența unui indicator complexabil, determinarea fiind puternic dependentă de pH și de concentrația de ciclodextrină [18].

Ciclodextrinele mai pot fi separate și determinate semicantitativ prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă [86]. De asemenea, au fost propuse metode de dozare prin voltametrie ciclică și spectroscopie RMN [45,87-89].

2.2.1.5. Obținerea și degradarea enzimatică a ciclodextrinelor

Una dintre proprietățile importante ale ciclodextrinelor este rezistența lor recunoscută la enzimele hidrolizante pentru amidon [18,90-92]. Acestea sunt complet rezistente față de β -amilază, deoarece ele nu conțin grupări susceptibile terminale pe care să le atace această enzimă. Deoarece α -amilazele atacă în interiorul moleculei și nu necesită grupări libere terminale, acestea sunt capabile să hidrolizeze ciclodextrinele, de obicei într-o proporție mai mică.

Enzima implicată în obținerea ciclodextrinelor este ciclodextrin glucozil transferaza (CGT) sau α -1,4-glucozil-4-glucozil transferaza (ciclizată), prescurtată și ca CTG (enzima Ciclodextrin-Trans-Glucozidaza), care este produsă de o gamă variată de microorganisme [18,35-38]. Această enzimă poate cataliza degradarea amidonului la ciclodextrine; de asemenea poate cataliza reacțiile de cuplare și disproporționare. Ciclodextrinele pot fi obținute industrial doar prin conversia enzimatică a amidonului, utilizându-se enzima CGT. Villiers a fost primul care a descris prepararea ciclodextrinei în 1891, cultivând amilobacter (*Clostridium butyricum*) pe amidon. În 1903 Schardinger a descris microorganismul *Bacillus macerans* care în prezent este cea mai studiată sursă pentru enzima CGT. Există șase bacterii esențiale cunoscute drept producătoare de CGT extracelular. Pentru scopuri industriale se utilizează două tulpini: *Bacillus macerans* și *Alkalophilic bacillus No 38-2*.

2.2.1.6. Obținerea, proprietățile, caracterizarea și analiza complexilor ciclodextrinelor

Caracteristica cea mai importantă a ciclodextrinelor o reprezintă capacitatea acestora de a forma compuși de incluziune cu o mare varietate de compuși fără a forma legături covalente [39,49,54,55,82,85,88,93-110].

S-au elaborat diferite teorii cu privire la formarea compușilor de incluziune, plecând de la ideea că legătura dintre ciclodextrine și molecula oaspete este bazată pe: eliberarea unei "energii înalte" din cavitare, asocierea unui oaspete nepolar cu cavitarea nepolară (interacțiune hidrofobă), eliberarea tensiunii de conformație în inel, forțe van der Waals, legături de hidrogen, interacțiuni dipol-dipol, forțe de dispersie London [18]. În majoritatea cazurilor, la procesul de complexare participă colectiv o parte din forțele enumerate.

Din moment ce diametrul cavității unei ciclodextrine variază în funcție de numărul de unități de glucoză din inel, selectarea unei ciclodextrine de mărime apropiată de parametrii geometrici ai moleculei oaspete este de importanță majoră în formarea complexului de incluziune. Formarea complexilor nu necesită întotdeauna includerea în întregime a moleculei oaspete în cavitarea ciclodextrinei. Chiar și moleculele foarte mari pot fi complexate, atâta timp cât ramificațiile lor, indiferent de lungime, se potrivesc în cavitarea ciclodextrinei [18,111].

Un alt factor de care depinde formarea complexului este polaritatea. Moleculele organice insolubile în apă sau greu solubile în apă sunt candidate bune datorită interacțiunii hidrofobe favorabile. Datorită naturii nepolare a cavității, părțile organice ionice în general nu se leagă de ciclodextrine. Materialele amfotere pot fi excepții [18].

Reacțiile de complexare se desfășoară în mod obișnuit în prezența unui solvent: apa. Apa favorizează formarea complexilor pe baza interacțiunilor hidrofobe. Câteodată este necesară utilizarea acizilor organici pentru a dizolva moleculele oaspete, însă posibilitățile de alegere a solventilor sunt limitate datorită posibilității lor de a intra în competiție cu molecula oaspete în vederea ocupării cavității ciclodextrinei, sau în vederea formării unui compus ternar. Din acest motiv se preferă moleculele mici, polare și folosirea unei cantități minime de solvent [18] (de exemplu, metanol sau acetonă).

Mecanismul de formare al compușilor de incluziune poate fi explicat, în mediul apos, astfel (figura 2.7):

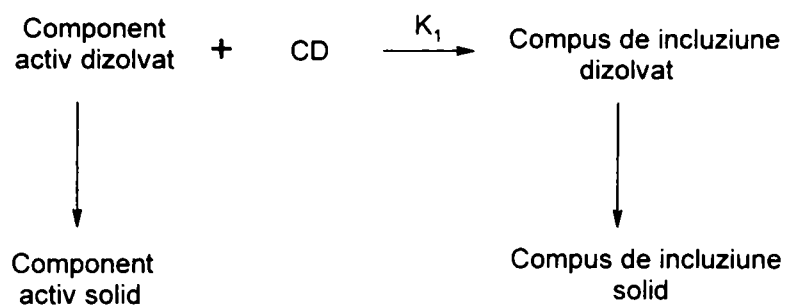


Figura 2.7. Mecanismul formării compusului de incluziune în mediul apos.

Reacția este o succesiune de echilibre care conduc la formarea supramoleculii compusului de incluziune mai mult sau mai puțin solubil în apă. Viteza de formare a supramoleculii este guvernată de o constantă K_1 , constanta de stabilitate, caracteristică tendinței compusului de incluziune de a disocia el însuși în prezența apei [18,44,100].

Termenul de *compus de incluziune* a fost introdus de Schlenk în 1950. Mai există însă și alți termeni utilizați în literatura de specialitate, cum ar fi *aduct*, *clatrat*, *compus molecular*, *criptat* și *complex de incluziune* [18,30]. Considerând faptul că între gazdă și oaspete nu se stabilesc legături covalente, echilibrul de asociere-disociere în soluție fiind cea mai importantă caracteristică a asocierii de tip gazdă-oaspete, termenul de *complex de incluziune* (sau *complex al ciclodextrinei*) pare să fie cel mai potrivit pentru astfel de compuși. În figura 2.8 este reprezentată schematic formarea complexului de incluziune al ciclodextrinei.

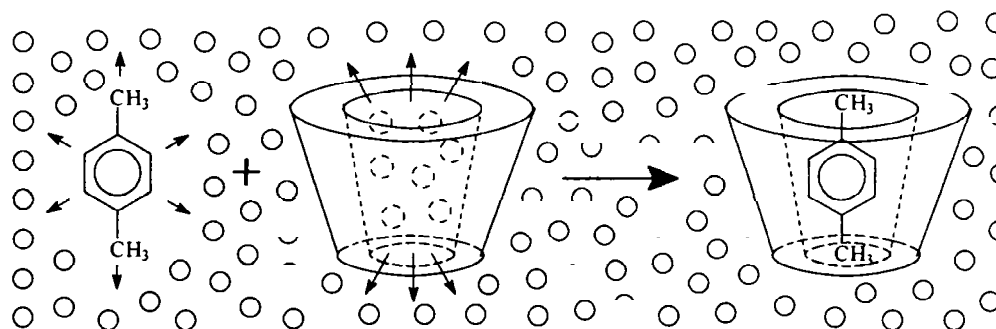


Figura 2.8. Reprezentarea schematică a formării complexului de incluziune al ciclodextrinei; *p*-xilenul este molecula oaspete, iar cercurile reprezintă moleculele de apă.

În principiu, nu este necesară prezența vreunui solvent pentru formarea complexului, însă complexarea se realizează de obicei în prezența apei, procesul fiind mult mai rapid atunci când formarea complexului apare în soluție. Prezența unui solvent deshidratant favorizează separarea produsului cristalin.

Prepararea complexelor de incluziune este simplă. Cele mai obișnuite proceduri sunt:

- agitarea unei soluții apoase de ciclodextrină (rece sau caldă, neutră, acidă sau alcalină în funcție de natura oaspetelui, pentru a preveni ionizarea acestuia), cu molecula oaspete sau cu soluția acestuia. Acest lucru se poate realiza și prin utilizarea unui solvent obișnuit, miscibil sau nemiscibil. Molecula oaspete este în general adăugată soluției calde de ciclodextrină. Echilibrul este atins printr-o agitare intensă și apoi răcire ușoară timp de câteva ore. Conținutul de moleculă oaspete nu poate fi mărit prin repetarea acestui proces, cum ar fi reîncălzirea și răcirea. Stabilitatea complexului ciclodextrinei depinde puternic de temperatură, disocierea putând fi considerată completă peste 80°C [18]. S-a stabilit că ciclodextrinele nu trebuie să fie complet dizolvate; agitarea compusului oaspete într-o suspensie de ciclodextrină conduce la complexare completă în 2-24 de ore la temperatura ambiantă. Procesul poate fi urmărit la microscop: cristalele de ciclodextrină tipice și cristalele sau picăturile compusului oaspete dispar și se formează cristale noi dispersate foarte fin, cu aspect amorf. Natura

cristalină a acestora poate fi evidențiată prin cristalografie de raze X , iar metodele general utilizate nu pot releva dacă produsul este un amestec mecanic sau un complex de incluziune real [18].

- metoda prin "mixare"; în acest caz se utilizează puțină apă, iar ciclodextrina nu este dizolvată, fiind amestecată ca pastă la care se adaugă o cantitate mică de apă în care a fost adăugat oaspetele fără alt solvent sau cu o cantitate mică de etanol în care a fost suspendat compusul oaspete [18]. În soluție apoasă de derivați de ciclodextrine foarte solubili complexarea poate fi realizată prin simplă agitare cu compusul oaspete sau prin agitare energetică până la atingerea solubilității maxime. Compusul oaspete nedizolvat este îndepărtat prin filtrare sau centrifugare și soluția apoasă limpede este evaporată la sec sub vid sau, preferabil, prin răcire-uscare (freeze-drying) [18].
- prin topirea compusului oaspete și amestecarea cu ciclodextrina fin mărunțită. În astfel de cazuri trebuie să existe un mare exces de compus oaspete și după răcire acest exces trebuie îndepărtat printr-o spălare foarte atentă cu un solvent care complexează foarte greu. Este preferabilă sublimarea la vid; această metodă este practic restrânsă la compușii oaspete ce sublimă, ca în cazul mentolului [18].

Pulberea microcristalină obținută prin amestecarea ciclodextrinei cu un compus potențial oaspete în soluție, în suspensie sau în pastă, nu prezintă garanția formării unui complex de incluziune omogen în adevăratul sens al cuvântului. Pentru determinarea formării complexelor de incluziune se realizează studii de dicroism circular UV, fluorescență, spectroscopie RMN (atât în soluție cât și în stare solidă), reactivitate sau fenomene catalitice, polarografie, permeație de gel, cromatografie de lichide de înaltă performanță, spectrometrie de masă, activitate superficială, concentrație critică micelară, difuziune, titrare potențiomtrică, determinare a coeficienților de partiție, vitezei de partiționare, permeabilitate prin membrane, titrare conductometrică etc.

Determinarea cantitativă a conținutului de compus oaspete poate fi realizată prin metode analitice curente cum ar fi spectrometria UV, cromatografia de gaze, HPLC sau, în cazul uleiurilor volatile, prin simpla măsurare a cantității de ulei din distilat.

Metodele termoanalitice [18,111,112], în special EGA (Evolved Gas Analysis – analiza dezvoltării de gaze) și TG/DTG (Termogravimetrie/Termogravimetrie diferențială), sunt potrivite pentru determinarea faptului dacă un produs este cu adevărat un complex. Aceste metode permit determinarea faptului dacă substanța oaspete suferă sau nu anumite modificări înaintea degradării termice a ciclodextrinei (250-300°C). Aceste modificări pot fi evaporare, descompunere, oxidare, topire sau tranziție polimorfă.

Termogravimetria (TG) și Termogravimetria Diferențială (DTG) [113-119] furnizează date cantitative privind pierderea de masă odată cu creșterea temperaturii. Ciclodextrinele încep să se descompună peste 250°C, astfel că se pot urmări complexările cu toate substanțele care se vaporizează sau se descompun cu eliberarea produselor volatile sub această temperatură.

Calorimetria de Scanare Diferențială (DSC) este o măsură a variației cantității de căldură eliberată sau absorbită de probă în timpul unui program de temperatură și a fost utilizată în principal pentru studiul complexării unor medicamente cum ar fi unii derivați de acid salicilic, diclofenac, sulfametizol sau bifonazol [113,117,118,120-125].

Analiza Eliberării de Gaz (EGA) [112] reprezintă măsurarea specifică a vitezei evoluției gazelor sau vaporilor ce părăsesc proba în timpul unui program de temperatură. Sunt detectate volatilele necomplexate și toate substanțele organice ce rezultă la descompunerea termică, cu excepția apei. Substanțele complexate în general nu sunt eliberate și nu se descompun până când nu este distrusă structura ciclodextrinei.

Substanțele ușor volatile cum sunt solvenții, uleiurile volatile aromatizante etc. pot fi îndepărtate cantitativ prin uscarea produsului în jur de 100°C (la presiune atmosferică sau sub vid). Sublimare în vid este potrivită doar în cazul substanțelor sublimabile, care pot fi studiate foarte eficient prin această

metodă. Compusul oaspete necomplexat poate fi recuperat cantitativ din sistemul de răcire în timp ce compusul oaspete este foarte puternic legat.

Cromatografia în strat subțire poate fi, folositoare pentru verificarea formării complexului, întrucât valorile R_f sunt alterate considerabil de complexare [39,110,126].

TAS–cromatografia ("Thermomikro-Abtrenn-Transfer" und "Auftragsver-fahren von Substanzen", aplicarea și transferul substanțelor prin separare termomicro) este o tehnică ce furnizează informații privind complexarea diferiților componenți în cazul unui sistem aromatizant multicomponent. Se pun câteva miligrame de complex într-un tub de probă împreună cu silicagel umed sau cu amidon capabil să elibereze vapori de apă. Capătul deschis al tubului este conectat la o capilară care are atașată la celălalt capăt o plăcuță de cromatografie în strat subțire. Tubul este încălzit ușor și odată cu încălzirea probei se deplasează și plăcuța cromatografică. Vaporii de apă eliberați vor antrena substanțele volatile care vor fi adsorbite pe placa cromatografică. În cazul compușilor de incluziune, componenții oaspete vor fi eliberați la temperaturi destul de ridicate [18].

Termofractografia este similară metodei TAS. În această tehnică ambele capete ale tubului sunt deschise și în loc de vapori de apă se utilizează un curent continuu de azot pentru transportul substanțelor volatile pe placa cromatografică înainte de dezvoltare. Automatizarea deplasării plăcii (ca funcție de temperatură) conduce la cromatograme semicantitative, în care compușii necomplexați sunt decelați la temperaturi între 40° și 120°C. Cei complexați apar în domeniul 120-260°C. Această metodă este utilă în special în cazurile în care complexabilitatea diferiților componenți din produsul multicomponent, cum este cazul extractelor aromatizante naturale, este diferită [18,126].

Cromatografia de gaz pirolitică este similară metodelor descrise mai sus. Se utilizează fie o conectare continuă, fie etapizată, la cromatograf, ce permite detectarea compușilor volatili și conduce la date cantitative ca funcție de temperatură [18].

Tehnicile de spectroscopie IR, mult utilizate în caracterizarea substanțelor organice solide, nu sunt în general potrivite pentru detectarea compușilor de incluziune. Benzile corespunzătoare ciclodextrinei se modifică doar în mică măsură în urma formării complexului și numai când fracțiunea de compus oaspete conținută în complex este mai mică de 25%. Benzile ce ar putea fi atribuite moleculei oaspete sunt ușor mascate de benzile datorate ciclodextrinei și de apa de cristalizare prezentă [18,124].

Analiza structurală prin cristalografie de raze X este cea mai bună metodă pentru detectarea formării complexului [18,20,109,127,128]. Se poate stabili o relație geometrică precisă între moleculele oaspete și gazdă și se pot identifica interacțiunile. Această tehnică este însă prea complicată pentru o utilizare de rutină.

În cazul compușilor nesaturați formarea complexului poate fi indicată de consumul de oxigen, măsurat prin metoda Warburg. Când molecula oaspete este complexată, consumul de oxigen este considerabil mai scăzut decât în cazul compusului liber [18].

2.2.2. Polizaharide

2.2.2.1. Agar

Agarul a fost descoperit în Japonia la mijlocul secolului al 17-lea, iar termenul japonez "kanten", ce desemnează acest produs, înseamnă "cer rece" și se referă la vemea rece existență în zonele montane de unde se obținea acest produs [129].

Agarul este un poligalactozid coloidal hidrofil uscat, extras din algele roșii din clasa *Rhodophyceae*. Acesta este format din unități de D-galactoză și 3,6-anhidro-L-galactoză, fiind un amestec de agaroză, componentul de gelifiere, un polizaharid neutru (figura 2.9a), și agaropectină, un polizaharid ionic negelifiant, în care unele resturi de D-galactoză sunt înlocuite cu resturi de 4,6-O-(1-carboxietiliden)-D-galactoză (cetal al acidului piruvic), iar unele resturi de 3,6-anhidro-L-galactoză sunt substituite de resturi de L-galactoză sulfat (figura 2.9b) [23,31].

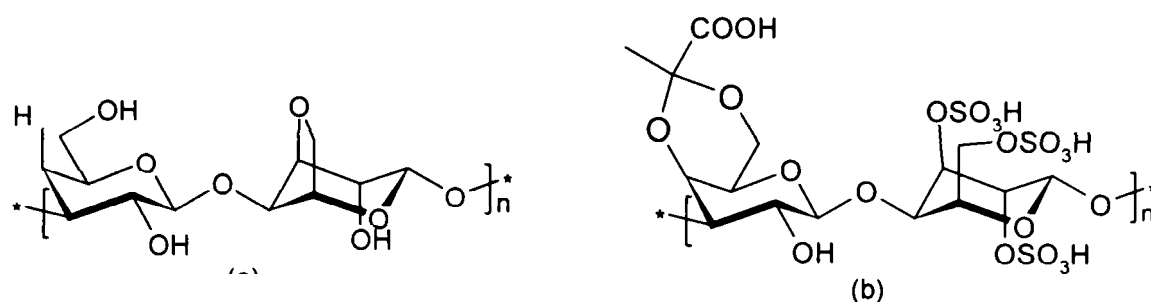


Figura 2.9. Unități din structura agarozei (a) și agaropectinei (b).

2.2.2.2. Algi nați

Algi nații au fost descoperiți pentru prima dată de către E.C.C. Stanford în 1881; acesta a descoperit procesul de extracție alcalină al unui material vâscos, denumit „algin”, din anumite alge, urmat apoi precipitarea acestora cu acizi minerali [129].

Algi nații reprezintă un grup de polizaharide naturale, extrase din algele brune, cele mai cunoscute fiind *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera* și *Ascophyllum nodosum*. Algi nații sunt săruri ale unui copolimer ce conține unități de acid anhidro-(1→4)- β -D-manuronic și acid L-guluronic (figura 2.10).

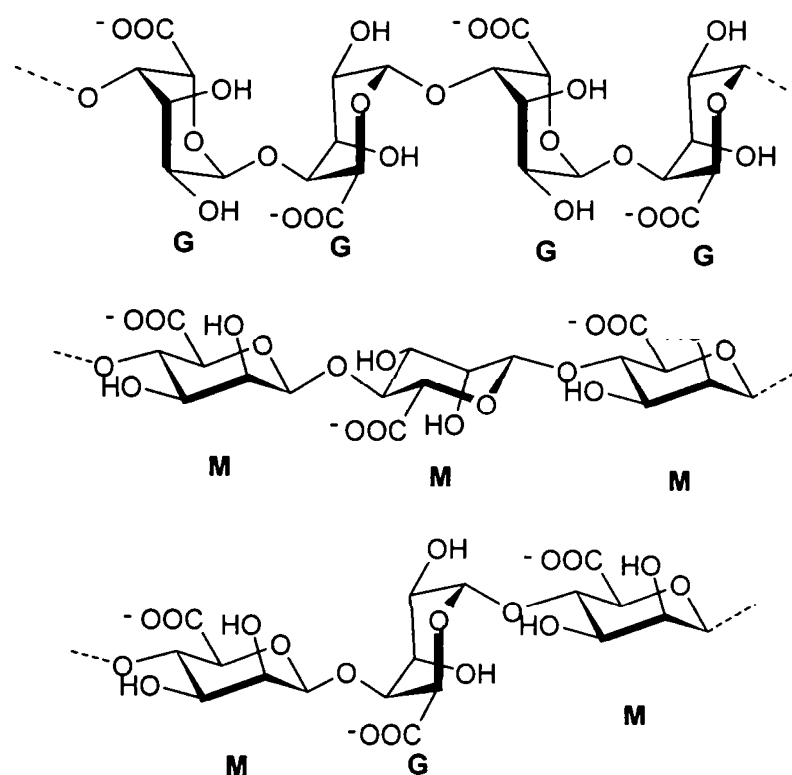


Figura 2.10. Structuri bloc în algi nați (G – rest guluronic, M – rest manuronic).

2.2.2.3. Carrageenani

Carrageenani reprezintă un component al matricii intracelulare din diverse specii de alge roșii (*Chondrus crispus*), acestea fiind utilizate în China încă din anul 600 î.Hr. Această clasă de compuși hidrocoloizi este formată din mai multe tipuri de carrageenani (de exemplu κ , ι și λ), care sunt polizaharide liniare compuse prin alternarea reziduurilor galactozidice legate $\beta(1\rightarrow3)$ și $\alpha(1\rightarrow4)$. Unitatea de bază care se repetă în acești compuși este carrabioza (o dizaharidă). Reziduurile sunt legate de obicei 1→4, însă apar și grupări 3,6-anhidro (figura 2.11). Structura de bază este substituită

la nivelul grupelor hidroxil, de obicei sulfatate în pozițiile 2 și 4 pentru resturile $\beta(1\rightarrow3)$ -D-galactozidice, în timp ce în resturile $\alpha(1\rightarrow4)$ -D-galactozidice apar grupări 2-sulfat, 6-sulfat, 2,6-disulfat, 3,6-anhidro și 3,6-anhidro-2-sulfat [129].

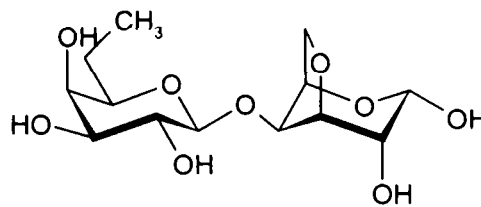


Figura 2.11. Unitatea de bază care se repetă în carrageenani.

2.2.2.4. Gumă gellan

Guma gellan este un produs de fermentație al bacteriei *Pseudomonas elodea*; este un polizaharid extracelular care se poate obține în două forme: substituit și nesubstituit. Masa moleculară a acestui heteropolizaharid anionic liniar este aproximativ 0.5 MDa, fiind compus din unități monozaharidice de glucoză, acid glucuronic și ramnoză în raport molar de 2:1:1. Unitatea de bază repetitivă în guma guar este un tetrazaharid conținând unitățile de mai sus (figura 2.12), care pot sau nu să fie substituite cu *O*-acetil de obicei în pozițiile 6 ale resturilor glucozidice, sau cu 3-*O*-L-gliceril în pozițiile 2 ale acestor resturi. Guma gellan se folosește cu preponderență în industria alimentară, cosmetică și în medicină, pentru obținerea mediilor biologice, a mediilor de cultură pentru țesuturi și a gelurilor deodorante, [129].

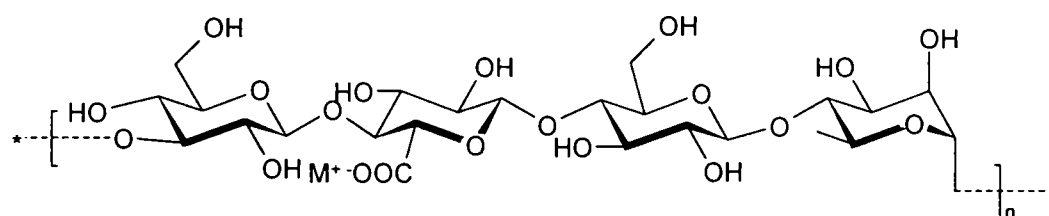


Figura 2.12. Unitatea tetrazaharidică repetitivă din guma gellan.

2.2.2.5. Pectine

Pectinele sunt polimeri naturali care se găsesc în foarte multe plante, cu o incidență apropiată cu cea a amidonului și celulozei. Acești carbohidrați au fost descoperiți în secolul al 18-lea de către Vauquelin (1790), iar Braconnot i-a caracterizat pentru prima dată drept componentele active din fructe responsabile pentru formarea gelului. În scopuri comerciale pectinele se extrag din coaja de citrice sau din pulpa de mere [39,129].

Generic, pectinele și substanțele pectice sunt heteropolizaharide constituite în principal din resturi de acid galacturonic și esteri metilici ai acestuia. O clasificare a acestor compuși este următoarea [129]:

- *Substanțe pectice*: derivați carbohidrați coloidal complexi din plante care conțin o proporție însemnată de unități de acid anhidrogalacturonic, grupările carboxil libere ale acestor unități putând fi esterificate parțial cu grupări metil, respectiv neutralizate cu una sau mai multe tipuri de baze;
- *Protopectine*: substanțe pro-pectice insolubile în apă, care la hidroliză controlată conduc la pectine și acid pectinic;
- *Acizi pectinici*: acizi poligalacturonici coloidal ce conțin o proporție neglijabilă de esteri metilici;

- *Pectină (sau pectine)*: sunt acei acizi pectinici solubili în apă, cu un conținut variabil de grupări ester metilice și un grad de neutralizare potrivit pentru formarea de geluri;
- *Acid pectic*: termen generic atribuit substanțelor pectice compuse în principal din acid poligalacturonic coloidal, liber de grupări esterice metilice;
- *Protopectinază*: enzima care convertește protopectina în produși solubili; se mai numește pectozinază sau propectinază;
- *Pectinesterază (PE) sau pectin polimetilesterază*: este o enzimă ce catalizează hidroliza legăturilor esterice ale substanțelor pectice cu obținerea acidului pectic și a metanolului;
- *Poligalacturonază (PG) sau pectin poligalacturonază*: este o enzimă ce catalizează hidroliza legăturilor glicozidice existente între resturile galacturonidice din substanțele pectice;
- *Pectinază*: termen utilizat frecvent pentru desemnarea amestecurilor de glucozidază și enzime pectice.

Pectinele comerciale sunt formate în principal din acid poli- $\alpha(1\rightarrow4)$ -D-galacturonic, parțial esterificat cu metanol, conținând între 200 și 1000 unități (figura 2.13).

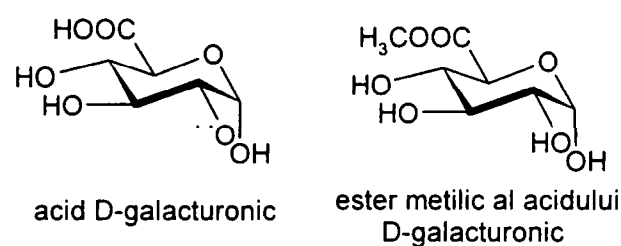


Figura 2.13. Principalele unități din moleculele pectinelor.

2.2.2.6. Derivați de celuloză

Celuloza este una dintre cele mai abundente substanțe organice din natură, reprezentând aproximativ o treime din lumea vegetală. Principalii constituenți cunoscuți sub denumirea generică de "celuloză" sunt celuloza, hemiceluloza (polizaharide de tipul xilanului și mananului) și ligninele (principalii constituenți din plante cu rol de schelet).

Celuloza este un polimer liniar format din resturi de D-glucoză conectate prin legături $\beta(1\rightarrow4)$ -D-glicozidice, care sunt aranjate în unități repetitive de celobioză (figura 2.14).

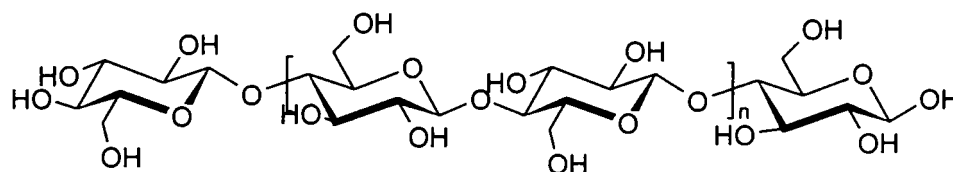


Figura 4.6. Molecula de celuloză.

2.2.2.7. Exudate polizaharidice

Dintre exudatele utilizate în special în industria alimentară sunt de amintit gumele arabică, tragacanth și karaya. Guma arabică este un exudat natural din copacul de acacia (*Acacia senegal* L.), care se găsește în diferite zone africane, Australia, India și America, fiind utilizat în special în industria alimentară ca stabilizant pentru diverse băuturi și emulsii. Tragacanth este un exudat din speciile *Astragalus*, care se găsesc în principal în sud-vestul Asiei, care se utilizează în stabilizarea diferitelor produse condimentare sau dresinguri pentru salate. Guma karaya este cunoscută și ca gumă streculia și este un exudat uscat din copacii *Sterculia urens*, care se găsesc în centrul și nordul Indiei, Senegal,

Mali și Pakistan; se utilizează în special în dresinguri și sosuri alimentare, produse lactate și de patiserie, pentru deserturi reci și unele produse din carne [129].

2.2.2.8. Gume din semințe

Gumele din semințe sunt în principal galactomanani, existând trei tipuri importante din punct de vedere comercial: guma din boabe de locust (*Ceratonia siliqua*), ce se găsește în regiunile mediteraneene, guma guar, care este un extract hidrocoloidal din două plante leguminoase (*Cyamopsis tetragonolobus* și *Cyamopsis psoraloides*) și se găsește în nord-vestul Indiei sau în Pakistan, și guma tara din planta *Caesalpinia spinosa*, originară din Ecuador, Peru și Kenya. Toate aceste gume sunt folosite cu preponderență în industria alimentară cu rol de îngroșanți pentru diverse sisteme alimentare apoase, produse instant, înghețate sau produse lactate fermentate [129].

2.2.3. Lipide

Cele mai utilizate lipide în protejarea și eliberarea controlată a diverșilor compuși organici sunt lipozomii [1-6,130-132]. Lipozomii sunt microsfele ce conțin cavități libere în interior, rezultate prin asamblarea fosfolipidelor cu apă. Membrana acestora este formată din două sau mai multe straturi duble lipidice, concave, care conțin o parte din faza apoasă în care sunt suspendate. Datorită caracterului amfifil al fosfolipidelor și al organizării de tip "închis" al acestora, lipozomii pot încapsula molecule hidrofobe în membrana dublu strat, sau compuși hidrofilii în cavitatea apoasă internă, ca de altfel și substanțe amfifile.

Aceste proprietăți speciale au generat numeroase aplicații ale lipozomilor lipidici ca:

- Modele pentru membrane biologice;
- Vehicule pentru transportul medicamentelor.

Medicamentele pot interacționa cu lipozomii în diverse moduri în funcție de solubilitatea și polaritatea acestora; ele pot fi inserate în regiunea bistrat lipidică, intercalate în regiunea grupelor polare exterioare, adsorbite pe suprafața membranei, ancorate printr-un lanț hidrofob sau încapsulat în compartimentul apos interior (figura 2.15).

Natura lipidelor și metodele de preparare a lipozomilor determină caracteristicile fizice și chimice ale acestora. Determinarea parametrilor structurali (organizarea dublului strat lipidic, numărul mediu de lamele per lipozom, diametrul mediu și distribuția diametrelor, volumul intern) este esențială pentru utilizarea lor ca transportatori de medicamente [4].

Primii lipozomi erau de tip multilamelar și se obțineau prin interacțiunea lipidelor cu apa în proporții și condiții bine stabilite. Lipozomii de ultimă generație sunt cei unilamelari, de caracteristici bine definite, a căror obținere industrială reprezintă secrete tehnologice. Metodele generale sunt de evaporare în fază inversă, pentru lipozomii unilamelari de dimensiuni mari, sau prin ultrasonare pentru lipozomii unilamelari de dimensiuni reduse [4].

Analiza lipozomilor se face prin difracție de raze X, microscopie electronică, ultracentrifugare analitică, sedimentare-fracționare, cromatografie de exclusiune (gel cromatografie), ultima având ca variantă și o metodă performantă, cromatografie de exclusiune de înaltă performanță (HPSEC – High Performance Size Exclusion Chromatography) [4,5].

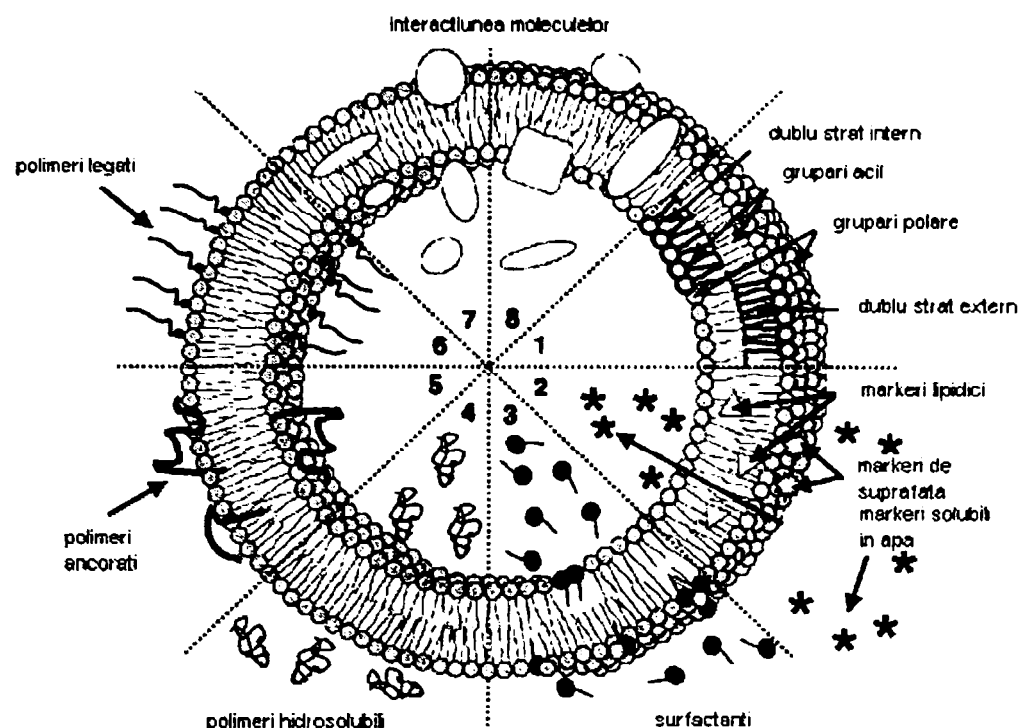


Figura 2.15. Reprezentarea schematică a lipozomilor unilamelari (1) și a pozițiilor compușilor încapsulați (2-8). Markerii hidrofobi sunt localizați în special în lanțurile acil ale stratului dublu; compușii amfifili sunt inserați între grupările polare de la capete, iar compușii solubili în apă se găsesc în mediul apos intern sau extern (2). Moleculele de surfactanți, care sunt amfifile, se partiționează între stratul dublu lipidic și mediul apos (3). Polimerii hidrosolubili de diverse mase moleculare pot fi încapsulați (4), ancorați (5) sau legați covalent (6). Siturile de interacțiune ale diferitelor medicamente, proteine sau alte macromolecule biologice (7,8) sunt: moleculele solubile în apă pot fi introduse în stratul apos interior al lipozomilor sau pot fi legate în stratul dublu; moleculele amfifile se orientează în stratul dublu; proteinele transmembranare străpung stratul dublu.

2.2.4. Polimeri sintetici

Datorită faptului că biocapsulele sol-gel au demonstrat funcționalitatea biologică a acestora, s-au studiat diferite matrici polimerice, în special pentru încapsularea proteinelor, enzimelor etc. Cele mai importante clase de astfel de polimeri sunt: rășinile epoxi și epoxi-aminice, polimerii vinilici, spumele poliuretanică și elastomerii siliconici [133].

2.2.4.1. Rășini epoxidice

Rășinile epoxidice sunt polimeri funcționalizați utilizați pentru imobilizarea covalentă a proteazelor, esterazelor, lipazelor, glucozidazelor, liazelor, oxidoreductazelor și a altor enzime [19,133,134].

Rășinile epoxidice se formează prin deschiderea cu reticulare a ciclurilor epoxi ale macromoleculelor ce le conțin, cum ar fi polimeri ai epoclorhidrinei cu bisfenol A, polimeri glicidilacrilici sau metacrilici, polietilenglicoli conținând resturi glicidil terminale sau glicerol-propoxilați. Astfel, sistemele ce conțin un singur component, împreună cu un catalizator aminic, conduc la matrici având homopolimeri ca bază. Amestecurile de doi componenți cu amine multifuncționale ca și catalizatori conduc la matrici având copolimeri ca bază [133].

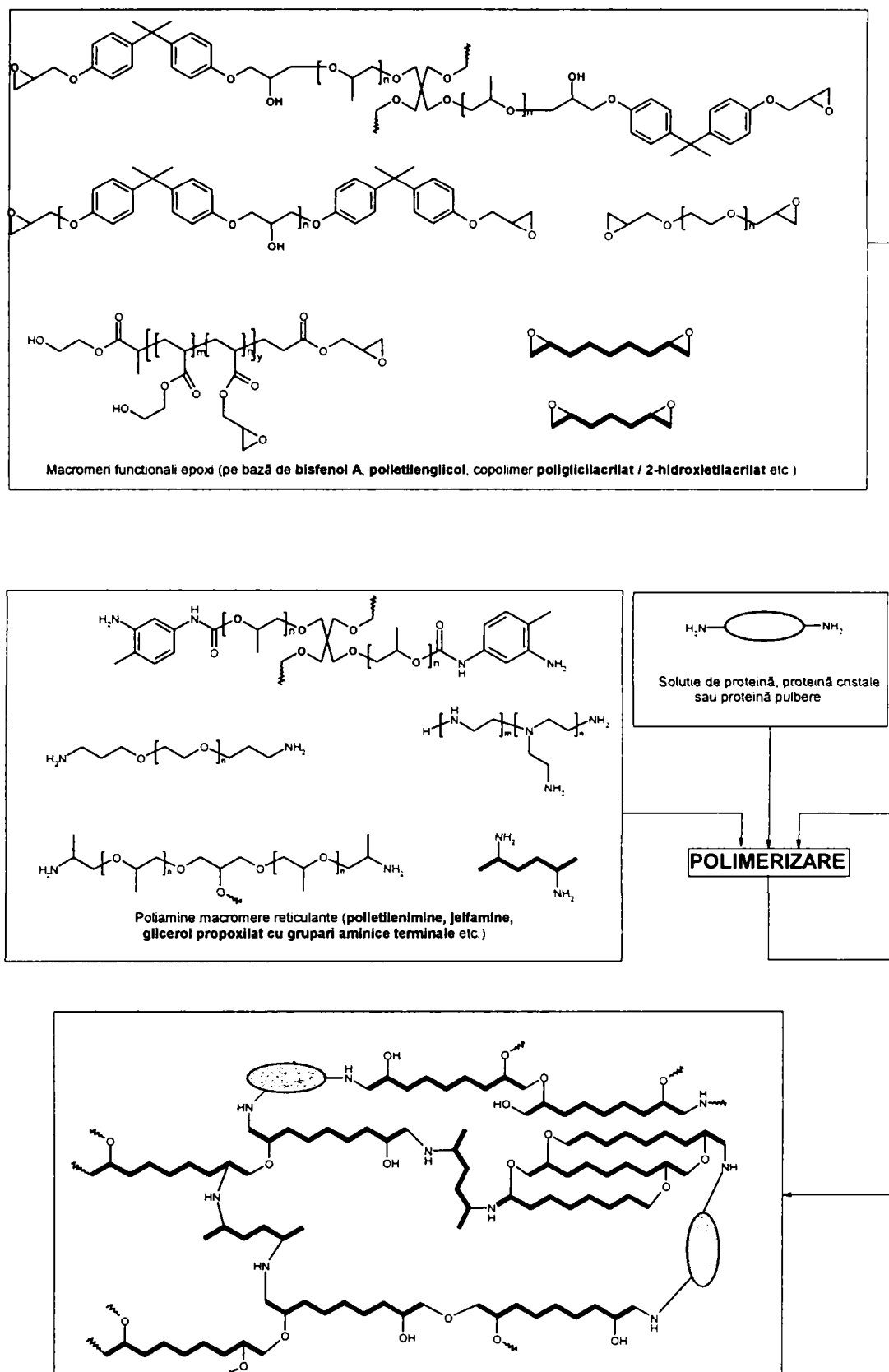


Figura 2.16. Formarea sistemelor compozite omogene și heterogene cu rășini epoxi.

2.2.4.2. Polimeri vinilici

Necesitatea de imobilizare a biocatalizatorilor fără afectarea funcției catalitice a determinat descoperirea diferiților polimeri care să îndeplinească aceste condiții. S-au obținut astfel polimeri stirenici, acrilici/metacrilici, copolimeri polimetilmetacrilat / butilacrilat în polietilenglicol (pentru

tirozinază), poliglicidil-metacrilat / hidroxietilmetacrilat / polietilenimină (pentru β -glucozidază), grafit / poliglicidilmetacrilat / 2-hidroxietilmetacrilat / polietilenimină (pentru glucozoxidază) etc (figura 2.17.) [133].

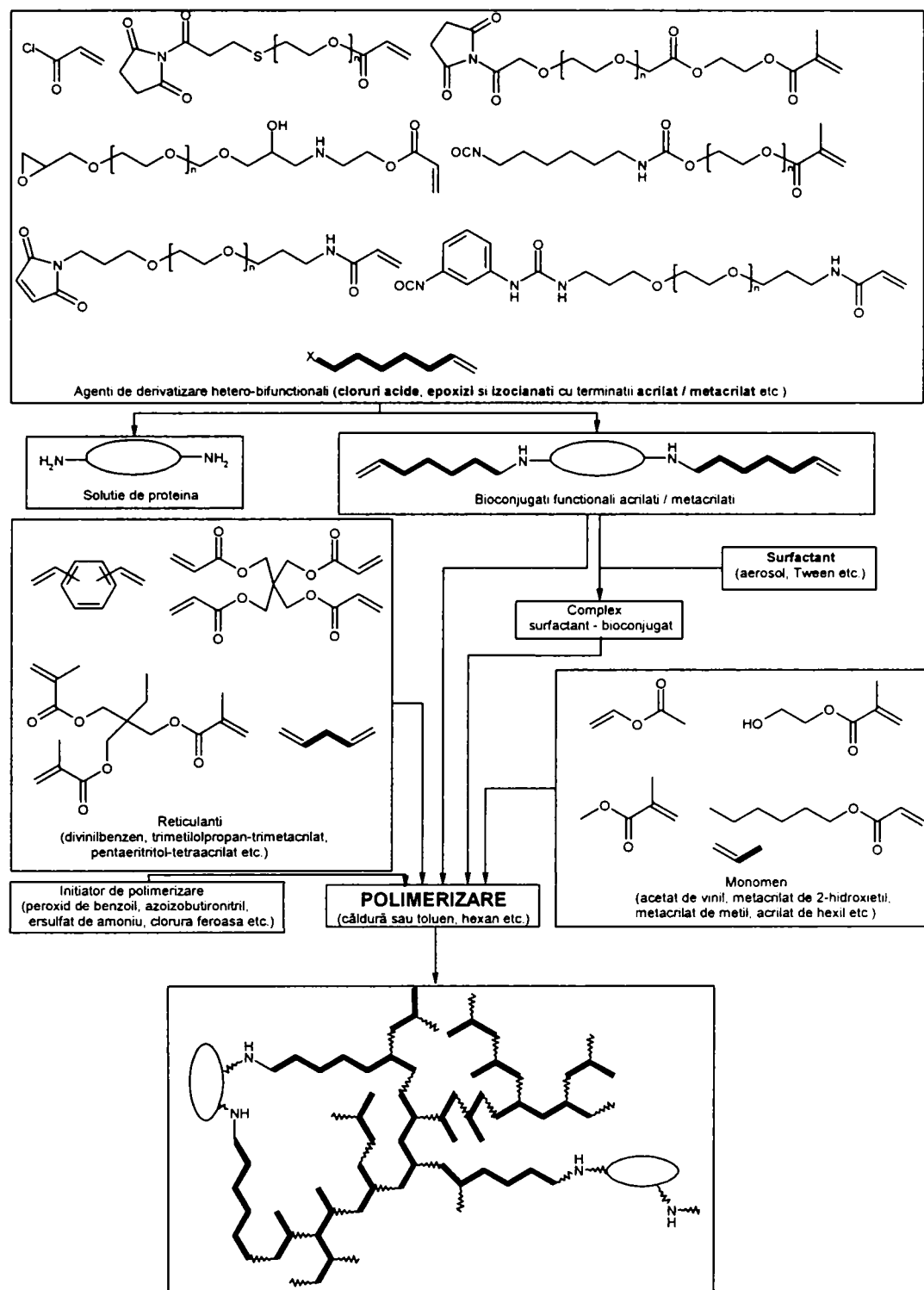


Figura 2.17. Formarea biocompozitelor proteine-polimeri vinilici.

Are loc mai întâi solubilizarea proteinei în solvenți organici (toluen, cloroform, hexan) în prezența polimerilor de tip polietilenglicol, polistiren, sau solubilizare prin formarea unor complexe proteină-agent de suprafață (surfactant), după care urmează reticularea.

2.2.4.3. Poliuretani

Poliuretanii sunt polimeri ce conțin gruparea uretanică rezultată în procesul de poliadiție a diizocianatilor.

Pentru obținerea matricilor de încapsulare se folosesc prepolimeri poliuretani (figura 2.18), care conduc la spume poliuretanică ce pot încorpora diferite proteine (amiloglucozidază, acetilcolinesterază, butilcolinesterază, organofosforhidrolază) [133].

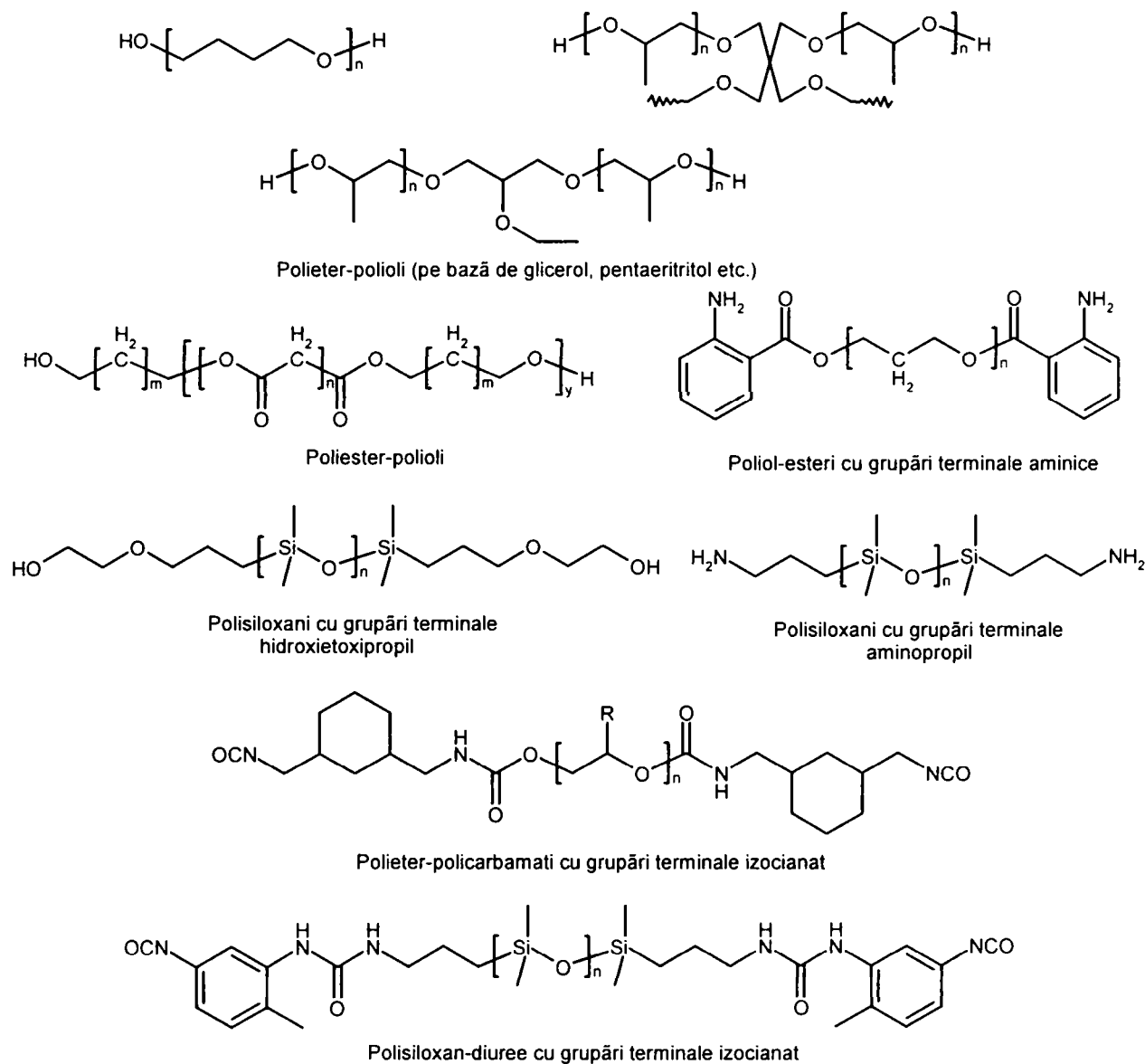


Figura 2.18. Exemple reprezentative de prepolimeri organici și silicon-organici utilizați în fabricarea copolimerilor poliuretani.

2.2.4.4. Polimeri siliconici

De departe, cei mai interesați și de actualitate polimeri utilizați ca matrici de încapsulare sunt polimerii siliconici biocompatibili, datorită toxicității lor foarte scăzute, a stabilității excelente *in vivo* și a rezistenței mari la degradare biologică și fizică [133].

Se pot distinge două tipuri de polimeri siliconici: polimeri siliconici în care prepolimerii liniari și/sau ramificați polialchilsilicați sunt condensați cu macromeri silanolică (elastomeri siliconici) și polimeri siliconici rezultați prin hidrosililarea vinilsiloxanilor cu polimeri dimetilsiloxanici cu capete vinilice (cauciucuri siliconice reticulate).

2.3. APLICAȚII ALE MICRO- ȘI NANOÎNCAPSULĂRII

2.3.1. Aplicații în domeniul alimentar

Din clasa **oligozaharidelor** s-au descoperit o serie de noi compuși funcționali alimentari, cu potențial de protejare a biomoleculelor din mediul alimentar, respectiv de eliberare progresivă a acestora, în special a aromelor alimentare. Multe dintre aceste zaharuri au proprietăți benefice sănătății umane, ele nefiind cancerigene și prezentând valori calorice reduse. De asemenea, joacă și rolul de "gazdă" în sensul stimulării selective a creșterii și/sau măririi activității uneia sau a unui număr limitat de specii bacteriene care se găsesc în colon, benefice sănătății umane, (efect prebiotic) [75]. Se utilizează în general în băuturi răcoritoare sau alcoolice, în lapte praf pentru copii, patiserie, produse de panificație, iaurturi și alte produse lactate. Subclasele de oligozaharide de acest tip sunt galacto-oligozaharidele, lactuloza și lactozaharoza, fructo-oligozaharidele, palatinozo(izomaltulozo)-oligozaharidele, glucozil-zaharoza, malto-oligozaharidele, gentio-oligozaharidele, oligozaharidele din soia, xilo-oligozaharidele și oligozaharidele ciclice (ciclodextrinele).

Dintre oligozaharide, doar cele ciclice au avut un impact deosebit atât în domeniul alimentar, cât și în celelate domenii adiacente, cum sunt cel farmaceutic și cosmetic. În domeniul alimentar principalele aplicații sunt în stabilizarea aromelor, modificarea gustului și atenuarea mirosurilor neplăcute, respectiv îmbunătățirea calității alimentelor.

Utilizarea directă în alimentație sau la procesare a materiilor prime vegetale și animale aromatizante prezintă o serie de inconveniențe: prepararea și prelucrarea lor este în mod obișnuit laborioasă; materiile prime nu au compoziție constantă, conținutul lor de aromă depinde de recoltare, prelucrare, sort și locul de creștere al produsului; produșii naturali pot adesea să conțină contaminanți microbiologici și, uneori, infectări parazite; conținutul lor în aromă scade în timpul stocării și poate, de asemenea, să implice o modificare nedorită a raportului dintre componenți; depozitarea este adesea limitată și poate conduce la probleme serioase datorate spațiului necesar, temperaturii, umidității etc.

Începând din a doua jumătate a secolului trecut aceste probleme au fost rezolvate în parte prin utilizarea oleorezinelor condimentare sau a uleiurilor esențiale. Oleorezinele sunt obținute prin extracția cu solvent a condimentelor iar uleiurile esențiale prin antrenare cu vapori de apă. Aceste produse au fost acceptate de industria alimentară încă din anii 1970, iar producția și consumul acestora în anii următori au crescut. Oleorezinele și uleiurile esențiale sunt în general transformate în produse sub formă de pulbere prin amestecarea cu săruri, zaharuri sau amidon, sau prin microîncapsulare în gumă arabică, derivați de celuloză sau amidon [4]. Astfel de *produse pulbere* oferă producătorilor alimentari o *formulare* standardizată, curată, ce poate fi dozată, comparativ cu produsul neîncapsulat, greu de dozat și de compoziție variabilă.

Cea mai utilizată bază pentru obținerea pulberilor aromatizante este dextrina [4]. Deși aceasta este ieftină și netoxică, este foarte higroscopică, ceea ce reprezintă un dezavantaj considerabil. Ciclodextrinele și complexii acestora nu sunt higroscopici, caracteristică foarte importantă, în special în condiții de umiditate ridicată, de exemplu la tropice. Al doilea mare dezavantaj al pudrelor aromatizante este acela că ingredientul activ este distribuit pe o suprafață destul de mare. Acest lucru conduce la o deteriorare rapidă prin volatilizare, oxidare, descompunee etc. Produsele microîncapsulate nu se deteriorează în acest mod, dar acestea sunt adesea scumpe și necompetitive. Principalele avantaje ale utilizării complexilor ciclodextrinelor în alimentație sunt [1,18,24,25,34,81,82,87,108-110,135-137]: protecția ingredientului (ingredientilor) activ împotriva oxidării, reacțiilor induse de lumină, distrugerii, descompunerii determinate de căldură, pierderii prin volatilizare, sublimare; eliminarea sau reducerea mirosurilor și gusturilor neplăcute, a contaminării microbiologice, a componentelor fibroase sau a altor componente nedorite, a higroscopicității; avantaje tehnologice privind stabilitatea, compoziția standardizată, dozarea simplă și mânăuirea ușoară a pulberilor uscate, reducerea costurilor de ambalare și stocare, procesare tehnologică mult mai economică, reducerea costurilor de laborator.

Gustul β -ciclodextrinei nu poate fi detectat în complex și el nu va afecta, deci, nici aroma, nici textura alimentului în care a fost utilizat. La scară mondială se utilizează un număr mare de complecși

aromatizanți. Alimentele sunt preparate conform unor rețete convenționale, astfel că în aceste produse, unul sau mai multe condimente pot fi înlocuite cu complexii corespunzători ai ciclodextrinelor. Utilizarea complexilor aromatizanți ai β -ciclodextrinei în formularea supelor deshidratate pare promițătoare, unele cercetări preliminare indicând un număr mare de aplicații posibile. Ceaiul de slabă calitate poate fi aromatizat prin amestecarea frunzelor de ceai cu cantități diferite de complexi ai β -ciclodextrinei cu bergamot, iasomie, lămâie sau mentă. Complexul granulat poate fi adăugat fie direct în săculeții cu ceai, fie poate fi preamestecat și procesat cu frunzele de ceai înainte de împachetare. Se poate realiza și adăugarea separată a β -ciclodextrinei și a principiilor aromatizante volatile, cum ar fi mentolul. Dacă se utilizează această metodă, de exemplu, la bomboane, poate fi prevenită pierderea de aromă în timpul procesării. De asemenea, chewing gum poate fi amestecată cu complexii aromatizanți pulbere, de exemplu cu complex mentă- β -ciclodextrină, mult mai ușor decât cu aromatizantul lichid original. Sub formă de complex, aroma se menține un timp mai îndelungat în chewing gum și menține gustul mult mai intens și un timp mai îndelungat. Biscuiții obținuți cu complex aromă de unt- β -ciclodextrină își mențin aroma chiar și după două luni de stocare. Biscuiții marțor, obținuți doar cu unt, își pierd aroma după doar două săptămâni. La adăugarea de complex aromă de unt- β -ciclodextrină la înghețată apare o îmbunătățire a gustului acesteia [18,21,22,29,82,138-140].

Domeniile posibile de aplicare a complexilor aromatizanți sunt [18,22]: utilizări casnice (acești complexi simplifică mult gătitul și furnizează posibilitatea alegerii gusturilor și aromelor; sub formă de produse dispersante, de exemplu tablete conținând diverse arome, acestea vor ocupa un loc restrâns și vor putea fi stocate pentru un timp mai îndelungat fără pierderea ingredientilor activi); în industria alimentară (prin eliminarea procesării manuale a unor materii prime, lucrul și suprafața de stocare vor fi diminuate; transportul va fi simplificat, pierderile la stocare pot fi înlăturate și se poate obține o mare varietate de gusturi pentru produsele alimentare; se pot obține gusturi și arome identice, indiferent de zonă, prin utilizarea produselor standard; în spitale pentru alimentele dietetice (prin reducerea consumului de produse fibroase și cu conținut de semințe, care irită tractul gastro-intestinal; diverse arome apetisante pot fi utilizate pentru obținerea unor alimente destinate unor pacienți cu dietă; majoritatea problemelor de digestie nu sunt cauzate de aroma ca atare, ci de materialele de transport, de obicei de natură vegetală); în alimente cu carne și în conserve (complexii cu ciclodextrine sunt produse aromatizante stabile de compoziție constantă).

Adăugarea de ciclodextrine sau a complexilor corespunzători ai acestora la produsele alimentare poate conduce adesea la modificarea favorabilă a unor proprietăți fizice importante cum ar fi higroscopicitatea, stabilitatea emulsiei, textura etc [1,18,24,25,34,81,82,87,108-110,135-137].

β -Ciclodextrina prezintă un gust dulce slab, valoarea pragului de detecție situându-se între 0.039% și 0.27%, iar cel de recunoaștere între 0.11% și 0.52% [18]. La utilizarea β -ciclodextrinei în procesarea alimentelor gustul dulce al acesteia nu poate fi ignorat, gradele de dulce ale zaharozei și β -ciclodextrinei fiind aditive. S-au efectuat studii privind reducerea gradului de amar, dulce sau acru al unor compuși naturali cum ar fi stevozidul, rubozidul, zaharina, chinina, cafeina, xiloza sau unii acizi organici, însă doar în primele două cazuri s-a observat o atenuare eficientă a intensității gustului respectiv [18].

Rezultate semnificative s-au obținut în cazul utilizării ciclodextrinelor pentru stabilizarea alimentelor. Stabilitatea emulsiilor, higroscopicitatea și stocabilitatea pot fi îmbunătățite în multe cazuri prin adăugarea de ciclodextrine componentului alimentar sau alimentului. O compoziție solidă, farmaceutică sau alimentară, conținând zaharuri și aminoacizi, primește în timp în culoare brună și se întărește [2,18,57,141-147]. Acest lucru poate fi prevenit prin încorporarea în aceste compoziții de oligo- sau polizaharide, cum ar fi dextrinele, amidonul sau ciclodextrinele, în cantități de peste 40% și conținut de apă de cel mult 3%. Încapsularea moleculară determină astfel izolarea celor două specii (zaharide și aminoacizi) și în consecință reduce posibilitatea apariției compușilor reacției Maillard (succesiune de reacții paralele și consecutive, ce au loc în special la temperaturi ridicate) [148-155].

Gelatinizarea este o caracteristică importantă a amidonurilor și a unor produse conținând amidon cum este cazul făinii. Temperatura de gelatinizare, puterea de gonflare a granulelor de amidon, viscozitatea pastei formate sunt proprietăți importante care pot fi modificate de prezența ciclodextrinelor.

Adăugarea de 1.5% β -ciclodextrină conduce la creșterea puterii de gonflare și a solubilității granulelor de amidon din grâu, în special după filtrarea fracțiunii amiloze. Viscositatea rezultată a pastelor de amidon crește în acest mod de aproximativ patru ori. După degresarea făinii efectul ciclodextrinei se reduce simțitor, acest lucru datorându-se, probabil, distrugerii complexilor lipidici ai amidonului [18].

Polizaharidele au fost utilizate de foarte mult timp în microîncapsularea unor componente alimentare [32,129,156].

Introducerea de agar în concentrații de 0.05-0.85% în diferite produse din brânză a condus la îmbunătățirea stabilității acestor produse. Agarul se mai folosește pentru obținerea unor produse solide prin gelifierea unor creme sau produse lactate, care pot fi dizolvate în ceai sau cafea fierbinte, respectiv în procesul de limpezire a vinului în concentrații de 0.05-0.15%, sau în obținerea unor produse de tip vegetarian, ca agent de coacere pentru cereale, în scopul obținerii deserturilor neamidonose, în obținerea saladelor aspic și a budincilor, jeleurilor din fructe și a gemurilor [129].

Cele mai multe aplicații ale algiનાților s-au raportat în industria alimentară, în texturizarea unor produse din fructe, prepararea unor geluri, extrudarea unor proteine, mărirea duratei de depozitare a cartofilor, în obținerea unor budinci pe bază de lapte, în stabilizarea înghețatelor și a altor produse lactate, în conservarea peștelui și a unor produse din carne, de tipul sosurilor. De asemenea, algiનાții au fost folosiți cu succes în obținerea chipsurilor de cartofi, în îmbunătățirea calității la extrudarea spaghetelor și macaroanelor, respectiv în conservarea vitaminei A în margarine [129].

Carrageenani se folosesc cu preponderență în industria alimentară sub formă de pudră sau produse instant ce se adăugă laptelui sau unor produse lactate pentru mărirea calității și stabilității acestor produse, ca gelifiant pentru soluții apoase, în stabilizarea grăsimilor, ca modificator reologic pentru diverse produse alimentare (cum ar fi unele produse din pește) [129].

Guma gellan are aplicații mai reduse în domeniul alimentar, una dintre acestea fiind în obținerea unor filme și materiale de acoperire pentru diverse produse alimentare [129].

Pricipalele utilizări ale pectinelor sunt pentru obținerea gemurilor și jeleurilor; de asemenea, se utilizează în obținerea diferitelor tipuri de glazuri alimentare sau în obținerea unor sorturi de iaurt cu fructe [129]. Pectinele au fost utilizate recent pentru microîncapsularea tanazei, enzimă responsabilă de hidroliza taninurilor [157].

S-au obținut o serie de derivați de celuloză, de tipul metil-celulozei, metil-hidroxipropil-celulozei, hidroxipropil-celulozei, carboximetilcelulozei cu diverse aplicații în special în domeniul alimentar [129]. S-au mai încercat încapsulări ale unor acizi fitici ca agenți de regularizare a concentrației lipidice [158].

Lipidele cele mai utilizate în domeniul încapsulării sunt lipozomii [1,4], însă în sfera alimentară aceștia și-au găsit mai puține aplicații. Totuși, lipozomii au fost utilizați pentru eliberarea controlată a proteinazelor cu scopul îmbunătățirii dezvoltării aromelor unor tipuri superioare de brânză, pentru încapsularea unor faze apoase alimentare în scopul reducerii presiunii de vapori. S-au propus noi aplicații ale acestora în microîncapsularea unor enzime alimentare, antioxidanți, aromatizanți nevolatili, coloranți alimentari și vitamine [1].

Polimerii sintetici sunt utilizați în special pentru microîncapsularea proteinelor, dar aplicațiile în domeniul alimentar sunt foarte limitate; există aplicații doar ca materiale de acoperire pentru protecția unor lipide, proteine sau zaharide împotriva factorilor din mediu [133].

2.3.2. Aplicații în domeniul farmaceutic

Dintre numeroasele substanțe din clasa **oligo- și polizaharidelor** ce pot forma micro- sau nanocapsule cu unele medicamente, ciclodextrinele satisfac cel mai bine condițiile impuse la obținerea unor specialități farmaceutice [3,18,49,51,53-55,57,85,92,94-98,141-146,159-169]. Dealtfel, sunt singurele substanțe cu proprietăți de "gazdă", obținute la scară industrială, ce se pot utiliza la prepararea medicamentelor ce se administrează oral, rectal sau dermic.

Formarea compusului de incluziune a unui medicament conduce la modificarea proprietăților fizice și chimice ale acestuia, modificări ce prezintă următoarele avantaje [18]: componentii lichizi pot fi transformați într-o formă cristalină, convenabilă, pentru producerea de tablete, cu miros și gust mascat; se pot amesteca componenți incompatibili dacă unul din ei este protejat prin incluziune; se îmbunătățește stabilitatea termică și chimică a medicamentelor; se mărește disponibilitatea biologică a medicamentelor greu solubile. Compușii de incluziune ai β -ciclodextrinei cu unele medicamente ușor volatile sau sublimabile constituie o metodă de protejare eficientă.

Incluziunea în ciclodextrină poate asigura protecție împotriva descompunerii induse de lumină [18]. Anumiți compuși sau sisteme naturale, cum ar fi, de exemplu, uleiurile din plante medicinale, nu pot fi păstrate timp îndelungat, chiar în fiole închise, datorită descompunerii și polimerizării componentilor de bază. În stare inclusă în ciclodextrină, acestea pot fi depozitate și folosite perioade îndelungate de timp.

Dintre polizaharide, agarul a fost utilizat pentru obținerea de filme peliculogene cu conținut de antibiotice solubile în apă, utilizate în avicultură [129], în obținerea culturilor de microorganisme, în special în vederea separării unor enzime specifice sau în procese de imunoizolare pentru diverse transplanturi de celule [35,170].

În domeniul medical, de un interes aparte se bucură utilizarea alginatilor, de obicei în sisteme compozite, în microîncapsularea celulelor utilizate pentru transplanturi imunoizolate, de exemplu în transplantul de celule Langerhans sau hepatocite la șobolani și chiar la om (alginat-poli-lisină, sau alginat-poli-L-lisină-poli(etilenimină)) [9,10].

De asemenea, alginatii pot fi utilizați în microîncapsularea proteinelor, enzimelor și chiar a AND-ului, în scopul protejării acestor biomacromolecule și eliberării controlate a lor, cu menținerea activității biologice a acestora [11,14]. S-a reușit astfel încapsularea albuminei și albuminei serice bovine (BSA), a genei CD40L, a factorului de creștere celular endotelial și a celui epidermal, a fibrinogenului, gamma-globulinei, peroxidazei din hrean, insulinei, mioglobinei, ovalbuminei, interleukinei-2 [11].

În domeniul farmaceutic **lipozomii** își găsesc cele mai multe aplicații [2-8,130-132,171,172], o problemă majoră fiind însă stabilitatea acestora în fluxul sanguin. S-au obținut lipozomi stabilizați, care sunt vezicule clasice cărora le-au fost atașate resturi polimerice, fie pe o singură parte, fie pe ambele părți ale acestora (lipozomi Stealth) [129]. Acești lipozomi stabilizați au aplicații în încapsularea unor medicamente anticancer (antraciline), antifungice, antivirale sau a unor antibiotice [2,3,5-7,130].

Dintre **polimerii sintetici**, copolimerii poliuretan-siliconici sunt la ora actuală utilizați cu succes în obținerea organelor umane artificiale sau implanturilor; de asemenea, există un interes deosebit în dezvoltarea de biomateriale rezistente, care să fie implementate pentru procese biologice *in vivo* și care să fie rezistente acțiunii agenților patogeni [173-177]. De exemplu, lumbrokinaza și hirudina recombinată au fost imobilizate în copolimeri poliuretani și utilizate pentru construcția valvelor artificiale pentru inimă, materialul prezentând un efect anti-trombotic. Tot în această direcție s-au obținut filme compozite bioactive sau tuburi biomedicale cu conținut de imunoglobulină [133].

2.3.3. Aplicații în domeniile cosmetic, agricol, zootehnic și al tutunului

Produsele cosmetice reprezintă un domeniu important de utilizare a oligo- și polizaharidelor [18,139,178,179] fără nici o limitare toxicologică. Acestea servesc la prepararea pulberilor și pastelor pentru dinți, a deodoranților și antisepticelor, a emulsiilor cosmetice, pentru stabilizarea lăptișorului de matcă, ca agent de despumare, la prepararea complexilor parfumați pentru pulberi de spălare, la pastele de amidon sub formă de spray, la parfumuri fumigene, parfumuri solide și preparate de baie precum și la lumânările parfumate.

Compușii de incluziune ai oligo- și polizaharidelor își găsesc largi aplicații în agricultură [18,180-182] sub forma pesticidelor condiționate și ca agenți de coacere a fructelor și legumelor.

Pesticidele (insecticidele, fungicidele, ierbicidele, regulatorii de creștere) sunt utilizate sub formă condiționată în solide umectabile, pudre, tămâi și produși granulați, sau sub formă de lichide ca soluții, emulsii, suspensii. Compușii de incluziune ai pesticidelor cu ciclodextrină, fiind substanțe microcristaline ușor solubile, pot fi utilizați atât la condiționarea solidelor, cât și a suspensiilor apoase concentrate.

Cum etena prezintă o importanță deosebită în regnul vegetal, similară cu a unor hormoni în regnul animal, s-au preparat compuși de incluziune ai acesteia cu ciclodextrină, cu utilizări eficiente în agricultură

Vitaminele solubile în grăsimi își pierd activitatea în timpul stocării prin izomerizare, oxidare sau alte procese chimice și fizice. Această problemă este valabilă și la medicamente, dar ea este mult mai importantă în preparatele vitaminice aplicate la creșterea animalelor în zootehnie. Metoda uzuală de stabilizare a vitaminelor este microîncapsularea cu gelatină sau cu alte materiale similare.

Aroma de tutun este utilizată în amestec direct cu tutunul. Bineînțeles, în timpul procesării și stocării, substanțele aromate volatile se pot pierde. Sub forma unui complex de incluziune cu ciclodextrină aceste substanțe rămân fixate și neschimbate din punct de vedere structural până când sunt eliberate în urma aprinderii (arderii).

Complexul format din nicotină cristalină cu β -ciclodextrina poate fi utilizat cu succes la țigarete cu filtru. Filtrul de celuloză impregnat cu β -ciclodextrină poate reține o cantitate destul de mare de nicotină și gudron din fumul filtrat [18].

3. CONTRIBUȚII PROPRII

3.1. INTRODUCERE

O problemă majoră la ora actuală este protejarea diversilor compuși bioactivi (și nu numai) împotriva acțiunii factorilor degradanți (aer/oxigen, lumină/radiații UV, umiditate etc.) din mediul înconjurător, din mediul alimentar (matricea alimentară), din mediile biologice etc. În unele medii există posibilitatea introducerii unor agenți antioxidanți (de obicei compuși de sinteză din clasa fenolilor împiedicați steric), tendința fiind aceea de a se apela la agenți antioxidanți naturali, cu toxicitate redusă, ce sunt adăugați mediilor amintite, sau preexistă în aceste matrici [8,39,183-206]. Unii compuși de oxidare ai moleculelor bioactive pot conduce, în momentul acumulării în organismul uman, la apariția diverselor boli, dintre care cele cu efecte negative majore sunt bolile neoplazice (diversele forme de cancer). Dintre compușii de oxidare rezultați, sau care generează radicalii liberi în organism (responsabili de reacțiile *in vivo* care conduc la diverse forme de mutagenză), hidroperoxizii și epoxizii ocupă un loc aparte din punct de vedere al toxicității, aceștia fiind extrem de activi atât în sintezele chimice, cât și în corpul uman, legându-se de AND, ARN sau de proteine [207,208]. Sunt activi în special epoxizii liniari (cum este cazul celor rezultați la epoxidarea acizilor grași nesaturați), care pot penetra ușor membranele celulare și pot ajunge mai ușor la țintele din interiorul acestor celule, alchilând în special AND-ul. În plus față de aceste efecte, epoxizii acizilor grași pot conduce la inflamații ale pielii sau la eczeme alergice [209]. Se cunoaște, de asemenea, că limonen-dioxidul, un compus ce poate apare ușor la oxidarea în aer a uleiurilor volatile de citrice sau a altor biosisteme de tipul uleiurilor volatile cu conținut de limonen, prezintă activitate neoplazică [209].

În prezentul studiu privind protejarea și eliberarea controlată a compușilor bioactivi, ne-am îndreptat atenția asupra stabilității termice a acizilor grași nesaturați și a posibilităților de protejare a acestora în matrici oligozaharidice. De asemenea, studiile au fost extinse și în sfera protejării prin nanoîncapsulare a uleiurilor volatile din plante aparținând claselor Dicotyledonatae, Monocotyledoneae și Pinatae. Ca matrici de încapsulare s-au utilizat ciclodextrinele, principalele aspecte studiate în acest sens fiind [39-43,178,210-218]:

- Nanoîncapsularea acizilor grași nesaturați (acizii oleic, linoleic, linolenic) în α - și β -ciclodextrină, respectiv studiul stabilității acestora împotriva factorilor degradanți din mediu (temperatură, aer, umiditate); complexii obținuți au fost analizați prin DSC (calorimetrie de scanare diferențială), iar identificarea componentilor și determinarea compoziției acestora în probele neîncapsulate și în cele recuperate prin extracție repetată din complex cu hexan, s-a realizat prin GC-MS, după derivatizare. Componenta și compoziția probelor degradate de acizi grași neîncapsulați sau recuperați din complexii degradați, s-au determinat în mod similar.
- Modelarea moleculară a interacțiunii acizilor grași studiați cu α - și β -ciclodextrina în scopul evaluării energiei de interacțiune și compararea rezultatelor teoretice cu cele experimentale (obținute prin DSC); în acest sens s-a realizat modelarea moleculară a ciclodextrinelor utilizând programe de mecanică moleculară, analiza conformațională și modelarea moleculară a acizilor grași utilizați pentru identificarea conformației de energie minimă, conformație utilizată în continuare la modelarea interacțiunii dintre cele două componente ale complexului; diferența dintre suma energiilor celor două componente ale complexului, considerate separat, și energia complexului a reprezentat energia de interacțiune teoretică, ce a fost corelată cu energia de interacțiune determinată experimental din analiza DSC (pe baza diferențelor dintre alura curbelor calorimetrice pentru complex și pentru componentele pure, analizate separat).
- Nanoîncapsularea uleiurilor volatile de plante din clasele Dicotyledonatae (18 uleiuri volatile), Monocotyledoneae (un ulei volatil) și Pinatae (6 uleiuri volatile) în β -ciclodextrină și analiza multivariată (analiza componentelor principale-PCA) a rezultatelor obținute; complexii obținuți au fost analizați prin termogravimetrie, iar uleiurile volatile proaspete (neîncapsulate) și cele recuperate din complexi prin extracție repetată în hexan au fost analizate prin GC-MS

pentru identificarea și determinarea concentrației componentelor. Datele de gaz cromatografie (concentrațiile procentuale ale componentelor din uleiurile proaspete și recuperate) au fost utilizate într-o abordare originală ca date de intrare în analiza statistică multivariată PCA, pentru determinarea similarităților dintre probele studiate (clasificare în funcție de familia sau clasa botanică, respectiv în funcție de proveniența uleiului volatil-proaspăt sau recuperat din complex) și a componentelor importante pentru aceste clasificări.

- Aplicarea industrială a unor nanocapsule obținute cu uleiuri volatile provenind din familia Rutaceae (ulei volatil de lămâie și de portocale) în produse de patiserie și aprecierea efectelor prin rezultatele analizei senzoriale ale acestora.

3.2. NANOCAPSULE ACIZI GRAȘI/CICLODEXTRINE (REZULTATE ȘI DISCUȚII)

3.2.1. Nanocapsule acid oleic/ α - și β -ciclodextrină

Principalele faze de lucru au fost: obținerea nanocapsulelor prin metoda în soluție, analiza DSC a acestora, analiza GC-MS a probelor neîncapsulate sau a celor recuperate din complex prin extracție repetată în hexan, după o prealabilă derivatizare la esterii metilici (pentru acizi) sau la acetali și cetali (pentru aldehide și cetone), degradarea probelor de acid neîncapsulate sau a capsulelor la 50-150°C în prezența aerului atmosferic, recuperarea prin extracție succesivă a componentelor degradate din complex, derivatizarea probelor și analiza GC-MS a acestora. Identificarea componentelor s-a realizat prin mai multe metode paralele: compararea automată a spectrelor de masă cu cele din baza de date NIST-National Institute of Standards and Technology (300 de mii de compuși) prin două metode (algoritmul PBM-Probability-Based Matching, dezvoltat la Cornell University de McLafferty și colaboratorii, respectiv algoritmul NIST MS Search), calcularea indicilor de retenție Kovats (indicii Kovats-KI s-au obținut prin interpolarea timpilor de retenție în graficul KI vs timp de retenție pentru alcanii liniari C₈-C₂₀ analizați în aceleași condiții) și compararea acestora cu cei obținuți pentru compușii etalon (în cazul compușilor pentru care s-au deținut etaloane) (vezi Partea experimentală).

În urma procesului de complexare s-au obținut randamente totale ridicate, cel mai bun fiind pentru complexul acid oleic/ β -ciclodextrină (86%). Complexul cu α -ciclodextrină a fost obținut cu un randament puțin mai scăzut (72.6%), probabil datorită unei solubilități mai mari a acestui complex în soluția etanol-apă utilizată pentru complexare.

Pentru stabilirea compoziției exacte a acidului oleic utilizat și evaluarea ulterioară a compușilor de degradare, s-a realizat analiza GC-MS a unei probe de acid gras. Concentrația de acid oleic în probă a fost de aproape 99% (exprimată ca ester metilic), pe lângă acesta mai apărând și unii compuși de impurificare cum ar fi acizii caproic, C₆ (0.01%), oenantic, C₇ (0.01%), caprilic, C₈ (0.02%), pelargonol, C₉ (0.024%), caprinic, C₁₀ (0.005%), miristic, C₁₄ (0.01%), palmitic, C₁₆ (0.14%), dar și unii acizi dicarboxilici, acizi ω -oxocarboxilici și câțiva compuși de degradare (în urme) a acidului oleic, rezultați probabil la stocare (la 4°C) și la manipulare (la 20-25°C). În figura 3.1 este prezentată gaz cromatograma acidului oleic derivatizat iar în tabelul 3.1 sunt trecute concentrațiile componentelor identificați pe baza spectrelor MS (figura 3.2 și Anexa 1, figurile A1.1-A1.8) și indicii de retenție corespunzători.

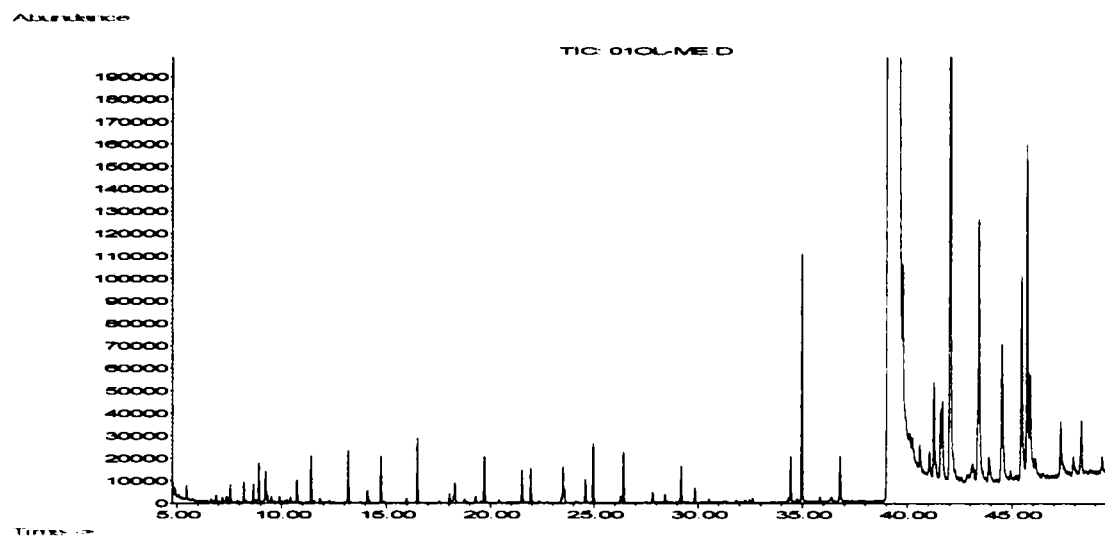


Figura 3.1. Gaz cromatograma din analiza GC-MS pentru acidul oleic derivatizat (mărire de 50 ori pentru observarea picurilor corespunzătoare impurităților).

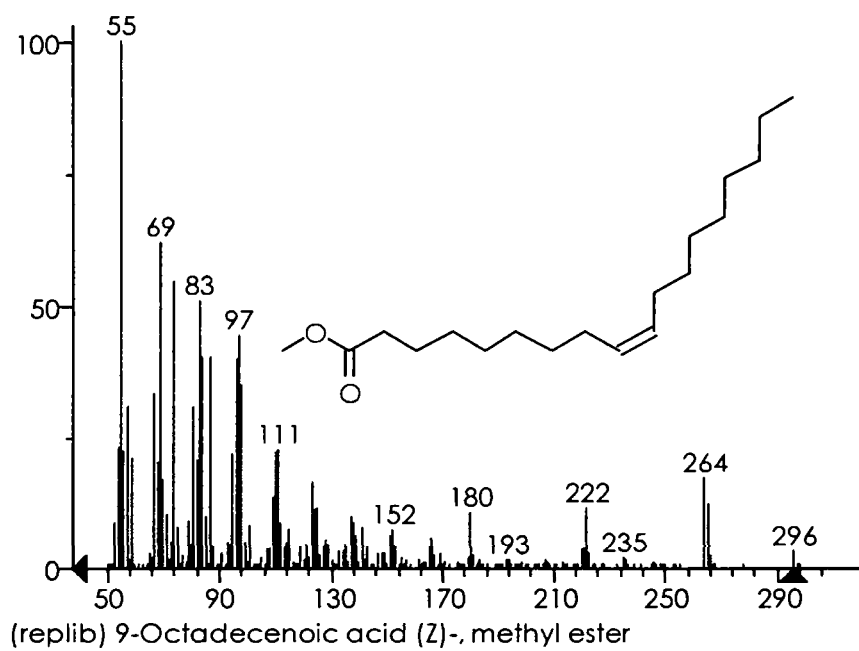
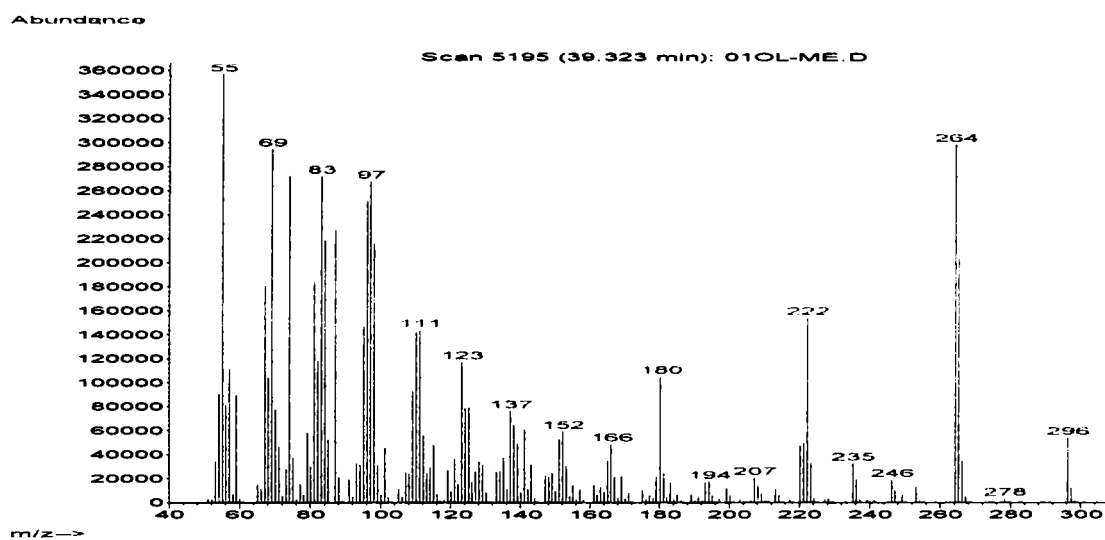


Figura 3.2. Spectrul MS experimental (sus) și din baza de date NIST (jos) pentru acid oleic, $C_{18:1}$, derivatizat.

După complexarea acidului oleic cu α - sau β -ciclodextrină și recuperarea acestuia prin extracții succesive în hexan s-a detectat o concentrație scăzută de oleat de etil (pe lângă oleatul de metil majoritar rezultat la derivatizare), care a fost format probabil în procesul de încapsulare în soluție etanol-apă. Concentrația acidului oleic (sub forma esterului metilic) după recuperarea din complexul cu α -ciclodextrină a fost de 98.7%, iar cel din complexul cu β -ciclodextrină de 99.5%. Oleatul de etil a avut o concentrație de 1.2% în primul caz și de 0.3% în cel de-al doilea. În figurile 3.3 și 3.4 sunt prezentate gaz cromatogramele pentru acidul oleic recuperat din complexii cu α - și, respectiv β -ciclodextrină, cu o mărire de câteva zeci de ori a imaginilor.

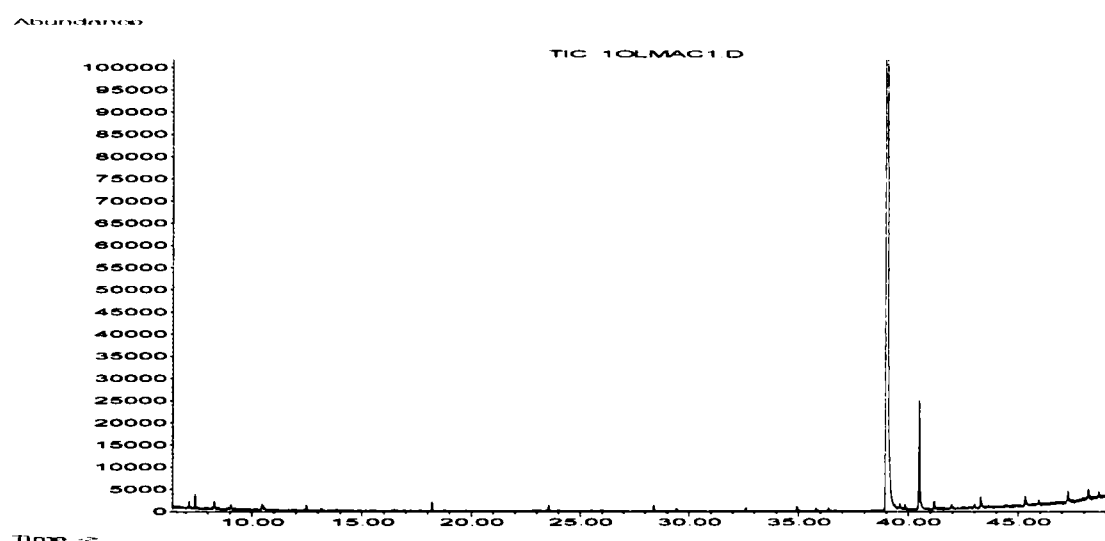


Figura 3.3. Gaz cromatograma din analiza GC-MS pentru acidul oleic derivatizat recuperat din complexul cu α -ciclodextrină (mărire de 20 ori pentru observarea picurilor corespunzătoare impurităților).

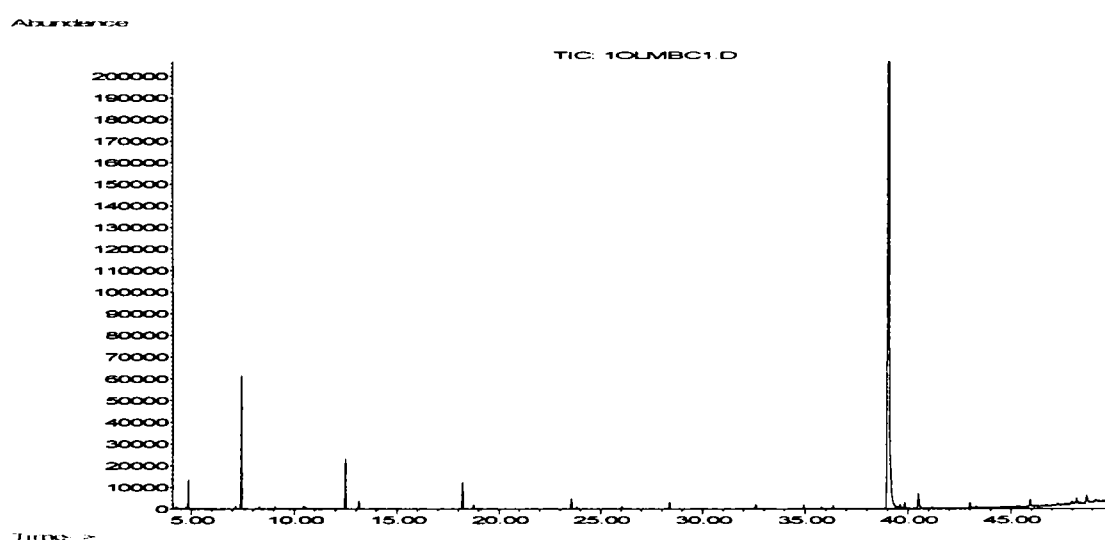


Figura 3.4. Gaz cromatograma din analiza GC-MS pentru acidul oleic derivatizat recuperat din complexul cu β -ciclodextrină (mărire de 10 ori pentru observarea picurilor corespunzătoare impurităților); picurii care apar la intervale regulate la începutul cromatogramei sunt datorate unor compuși separați din coloană (siloxani), probabil datorită unei uscări necorespunzătoare a probei.

Tabel 3.1. Identificarea componentelor din proba derivatizată de acid oleic, concentrația acestora și indicii Kovats

Nr.	Identificare MS	Concentrație (%)	Indice Kovats (KI)
1	Methyl caproate	0.01	926
2	Octanal	0.01	1004
3	Methyl enanthate	0.01	1026
4	Heptane, 1,1-dimethoxy-	0.004	1080
5	Nonanal	0.01	1105
6	Octanoic acid, methyl ester	0.02	1126
7	Octanal dimethyl acetal	0.03	1179
8	Decanal	0.01	1206
9	Nonanoic acid, methyl ester	0.02	1225
10	Nonanal dimethyl acetal	0.03	1278
11	Decanoic acid, methyl ester	0.01	1325
12	Decanal dimethyl acetal	0.03	1378
13	Octanedioic acid, dimethyl ester	0.02	1449
14	Octanoic acid, 6,6-dimethoxy-, methyl ester	0.02	1501
15	Nonanedioic acid, dimethyl ester	0.03	1550
16	Decanedioic acid, dimethyl ester	0.01	1651
17	Methyl tetradecanoate	0.01	1726
18	9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-	0.03	1905
19	Hexadecanoic acid, methyl ester	0.14	1927
20	Oleic acid/9-Octadecenoic acid, methyl ester, (Z)-	98.8	2121
21	11-Eicosenoic acid, methyl ester	0.24	2321
22	Octadecanoic acid, 9,10-dihydroxy-, methyl ester	0.03	2349
23	Oxiraneoctanoic acid, 3-octyl-, <i>cis</i> -	0.19	2449
24	Octadecanoic acid, 9,10-dihydroxy-, methyl ester (isomer)!	0.25	2468

* S-au menținut denumirile compușilor în engleză pentru posibilitatea regăsirii ușoare în baza de date NIST: s-a menținut, de asemenea, sistemul englez pentru numerele cu zecimale, acestea fiind utilizate ca atare pentru analizele statistice specifice.

În urma degradării probelor de acid oleic la temperaturi între 50-150°C, în aer la presiune atmosferică, s-au putut identifica o serie de produși de degradare, în special la temperaturi peste 100°C, care fac parte din următoarele clase: aldehide (oxidare), epoxizi și acizi dihidroxilați vicinali. Concentrația de acid oleic în proba degradată la 50°C a fost puțin peste 99%, probă ce a prezentat produși de degradare în concentrații foarte mici și puțini la număr, în timp ce în cazul probelor degradate la 100°C concentrația acidului oleic a fost de 95.1%, iar pentru proba degradată la 150°C de 81.7%. De remarcat este prezența unei concentrații mici de acid elaidic (diastereoizomerul *trans* al acidului oleic) de 8% în proba degradată la 150°C (tabel 3.2), rezultat probabil printr-o reacție de adiție-eliminare a unei molecule de apă.

Dintre aldehidele identificate ca produși de oxidare ai acidului oleic sau ai altor derivați prezenți în probă, care au fost derivatizate la acetali dimetilici corespunzători, sunt de amintit octanalul (Anexa 1, figura A.1.9), care a fost identificat în concentrații crescătoare în probele degradate (pornind de la 0.03%, la 0.16% și 0.18% în cele trei variante de degradare, la 50°C, la 100°C și, respectiv, la 150°C). Aceeași variație crescătoare a concentrațiilor se observă și la nonanal (0.03-0.4%; Anexa 1, figura A.1.10), decanal (0.02-0.21%; Anexa 1, figura A.1.11). În cazul probei degradate la 100°C s-a identificat și prezența compusului 9,10-epoxidat al acidului oleic, respectiv al derivatului 9,10-dihidroxilat (Anexa, figura A.1.12).

În figurile 3.5 și 3.6 sunt prezentate suprapunerile cromatogramelor GC pentru acidul oleic standard și pentru probele degradate la 50, 100 și 150°C, în zona apariției alchidelor inferioare (KI = 1000-1180) și, respectiv, a compușilor de epoxidare-hidroliză (KI = 2100-2600).

Tabel 3.2. Identificările MS, indicii de retenție Kovats și concentrațiile pentru compușii din probele de acid oleic degradate la temperaturi de 50-150°C.

Nr.	Identificare MS	KI	C ₁ ^a (%)	C ₂ ^b (%)	C ₃ ^c (%)
1	Malonaldehyde, bis(dimethyl acetal)	885			0.03
2	Hexanal dimethyl acetal	980		0.01	0.01
3	Octanal	1004		0.01	
4	Heptanoic acid, methyl ester	1026		0.003	0.01
5	Heptane, 1,1-dimethoxy-	1079		0.01	0.01
6	Nonanal	1105		0.02	0.02
7	Octanoic acid, methyl ester	1125		0.02	0.04
8	Octanal dimethyl acetal	1178	0.03	0.16	0.18
9	Decanal	1206		0.01	
10	Nonanoic acid, methyl ester	1225		0.02	0.05
11	Nonanal dimethyl acetal	1278	0.03	0.30	0.39
12	Decanoic acid, 2-methyl-	1325		0.002	
13	Methyl 8-oxooctanoate	1333			0.01
14	2-Undecenal	1364		0.01	
15	Decanal dimethyl acetal	1377	0.02	0.17	0.21
16	Undecanal dimethyl acetal	1400		0.004	
17	Nonanoic acid, 9-oxo-, methyl ester	1436		0.01	0.03
18	Octanedioic acid, dimethyl ester	1449		0.01	0.10
19	Octanoic acid, 6,6-dimethoxy-, methyl ester	1500		0.09	0.05
20	10-Oxodecanoic acid, methyl ester	1537		0.01	
21	Nonanedioic acid, dimethyl ester	1550		0.03	0.22
22	12,12-Dimethoxydodecanoic acid, methyl ester	1599			0.23
23	Decanedioic acid, dimethyl ester	1650		0.002	
24	Dodecane, 1,1-dimethoxy-	1700		0.17	0.10
25	Methyl tetradecanoate	1725		0.01	
26	Methyl palmitoleate	1903		0.01	
27	3-Hexanone, 1,5,6,6-tetramethoxy-	1916			0.01
28	Hexadecanoic acid, methyl ester	1926	0.04	0.10	0.03
29	Oleic acid / 9-Octadecenoic acid, methyl ester, (Z)-	2114	99.28	95.12	81.73
30	Elaidic acid, methyl ester	2130		0.09	8.04
31	Oleic acid, methyl ester (isomer)!	2170		0.03	0.11
32	Linoleic acid, methyl ester	2193		0.03	0.15
33	10-Nonadecenoic acid, methyl ester	2204	0.03	0.04	
34	Methyl (11R,12R,13S)-(Z)-12,13-epoxy-11-methoxy-9-octadecenoate	2224	0.01	0.10	0.32
35	10-Undecenoic acid, 2-methoxy-, methyl ester	2244	0.26	1.49	7.02
36	11-Eicosenoic acid, methyl ester	2318	0.09	0.16	0.31
37	Methyl dihydrosterculate	2383			0.63
38	8,11-Octadecadienoic acid, methyl ester	2336		0.10	
39	6-Hexadecenoic acid, 7-methyl,methyl ester (Z)	2384	0.12		
40	Cyclohexane, 1,1'-(2-methyl-1,3-propanediyl)bis-	2419			0.01
41	9-Octadecene, 1-methoxy-, (E)-	2431		0.03	
42	Octadecanoic acid, 9,10-dihydroxy-, methyl ester, (R*,R*)-	2464	0.09	0.89	
43	Methyl threo-9,10-dihydroxystearate	2475		0.70	
44	Octadecanoic acid, 9,10-epoxy-, isopropyl ester	2537		0.04	
45	Docosanoic acid, methyl ester/Behenic acid, methyl ester	2645		0.01	

^a concentrația componentilor din proba de acid oleic degradată la 50°C;^b concentrația componentilor din proba de acid oleic degradată la 100°C;^c concentrația componentilor din proba de acid oleic degradată la 150°C;

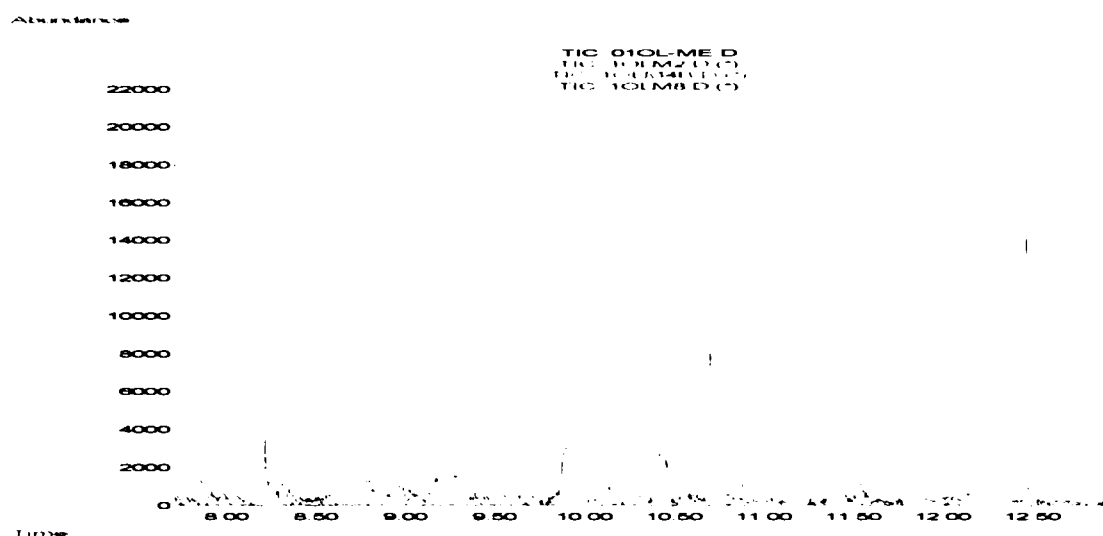


Figura 3.5. Suprapunerea cromatogramelor GC pentru acidul oleic standard (cu negru) și pentru probele neîncapsulate degradate la 50°C (verde), la 100°C (galben) și la 150°C (violet) pentru porțiunea corespunzătoare alchidelor inferioare (KI 1000-1180).

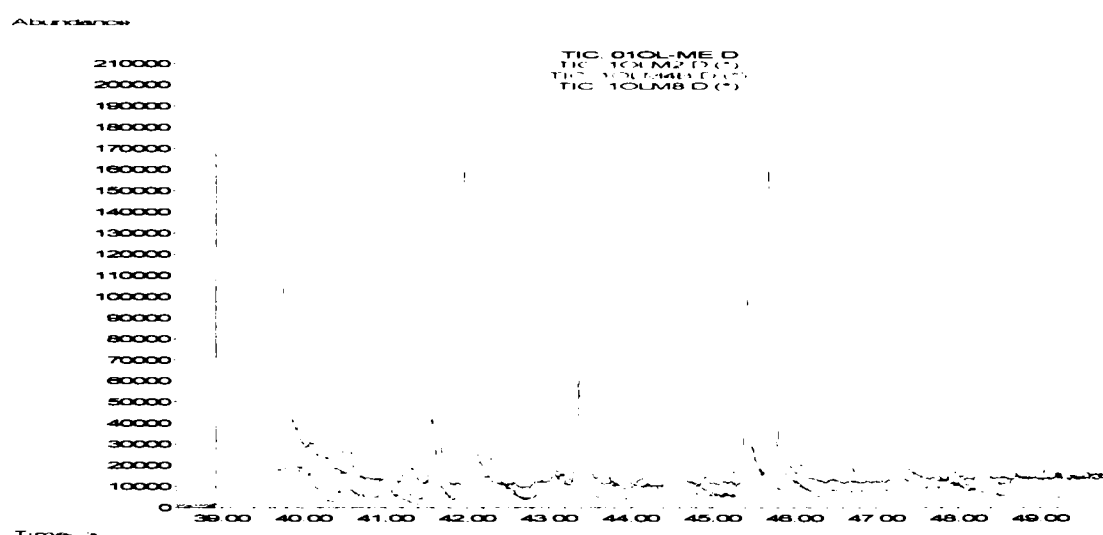


Figura 3.6. Suprapunerea cromatogramelor GC pentru acidul oleic standard (cu negru) și pentru probele neîncapsulate degradate la 50°C (verde), la 100°C (galben) și la 150°C (violet) pentru porțiunea corespunzătoare KI 2100-2600.

În urma **analizei probelor derivatizate recuperate din complexii acidului oleic cu α - și β -ciclodextrină**, degradați în aceleași condiții, se poate observa clar capacitatea de protejare a acestor oligozaharide ciclice la oxidare în special, dar și la alți factori de mediu (umiditate). În cazul probei de complex cu α -ciclodextrină degradate la 50°C nu s-a identificat nici un compus de degradare major, concentrația acidului oleic (exprimată ca ester metilic) fiind de 99.84%, în timp ce pentru proba similară degradată la 100°C concentrația acidului gras a fost de 97.44%. Compusul de degradare principal a fost malondialdehida (0.93%; figura 3.7), în concentrație semnificativă fiind și derivatul superior al esterului metilic al acidului oleic, oleatul de etil (1.32%, Anexa 1, figura A.1.13). În cazul complexului acidului oleic cu α -ciclodextrină, degradat la 150°C, nu s-a identificat acid elaidic. A fost identificat însă heptanalul, dar în concentrație scăzută (0.48%).

În cazul probelor derivatizate analizate prin GC-MS din complexii acidului oleic cu β -ciclodextrină, degradați în aceleași condiții, s-au identificat în concentrații mici unele aldehyde inferioare (C₆-C₉), însă concentrația acidului oleic a fost destul de mare (96.5%). Pentru proba degradată la 100°C acidul oleic (esterul metilic) a prezentat aproximativ aceeași concentrație (96.65%), în timp ce pentru proba degradată la 150°C esterul acidului oleic a fost în concentrație de doar 92.6%, 5.8% fiind identificat ca acid elaidic (figura 3.21).

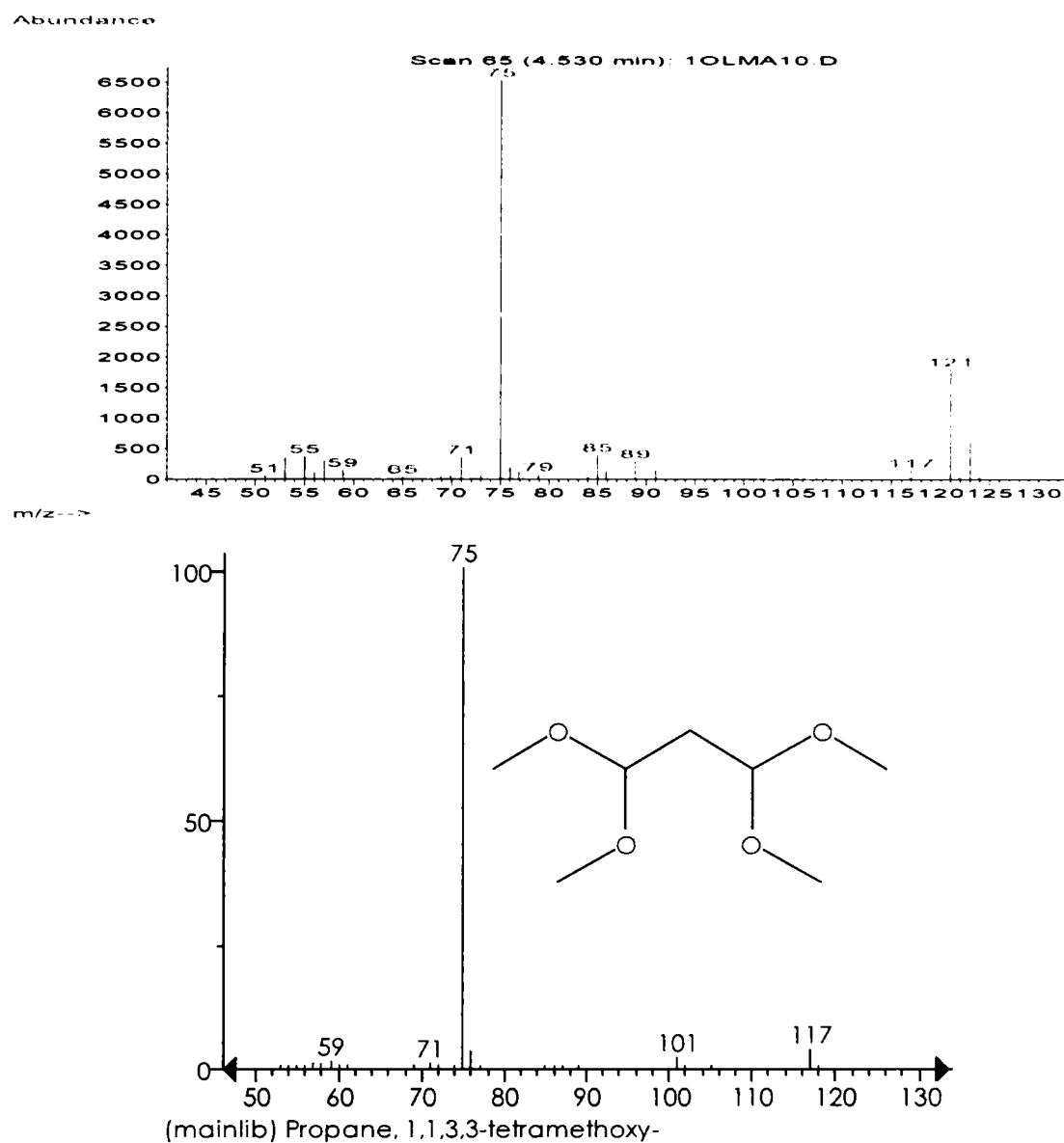


Figura 3.7. Spectrul MS experimental (sus) și din baza de date NIST (jos) pentru malondialdehida derivată (bis(dimetilacetal)).

Este foarte probabil ca **acidul oleic să sufere într-o primă fază o reacție de adiție a unei molecule de apă la temperatura de peste 100°C (în prezența aerului umed), iar apoi să se deshidrateze la izomerul geometric mai stabil, acidul elaidic**; sunt totuși destul de greu de cuantificat cei doi compuși izomeri datorită indicilor de retenție cromatografici foarte apropiați.

În figurile 3.8 și 3.9 sunt prezentate suprapunerile cromatogramelor GC pentru acidul oleic standard (negru) și pentru probele de complecși cu α -ciclodextrină, respectiv β -ciclodextrină, degradate la 50-150°C, comparativ cu proba de acid oleic necomplexată, degradată la 150°C, pentru zona apariției acidului oleic (ester metilic) și a omologilor superiori sau a derivaților similari. Se poate observa apariția picurilor semnificative pentru degradare, în special pentru proba neîncapsulată.

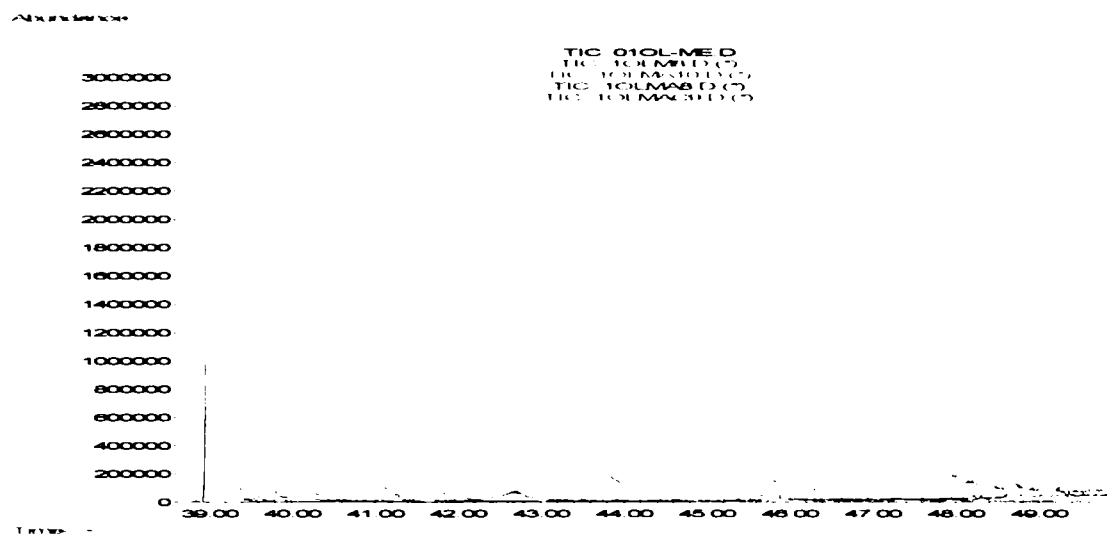


Figura 3.8. Suprapunerea cromatogramelor GC pentru acidul oleic standard (cu negru) și pentru probele de complecși cu α -ciclodextrină, degradate la 50°C (violet), la 100°C (galben) și la 150°C (cian), comparativ cu proba neîncapsulată, degradată la 150°C (verde), pentru porțiunea corespunzătoare KI 2100-2600.

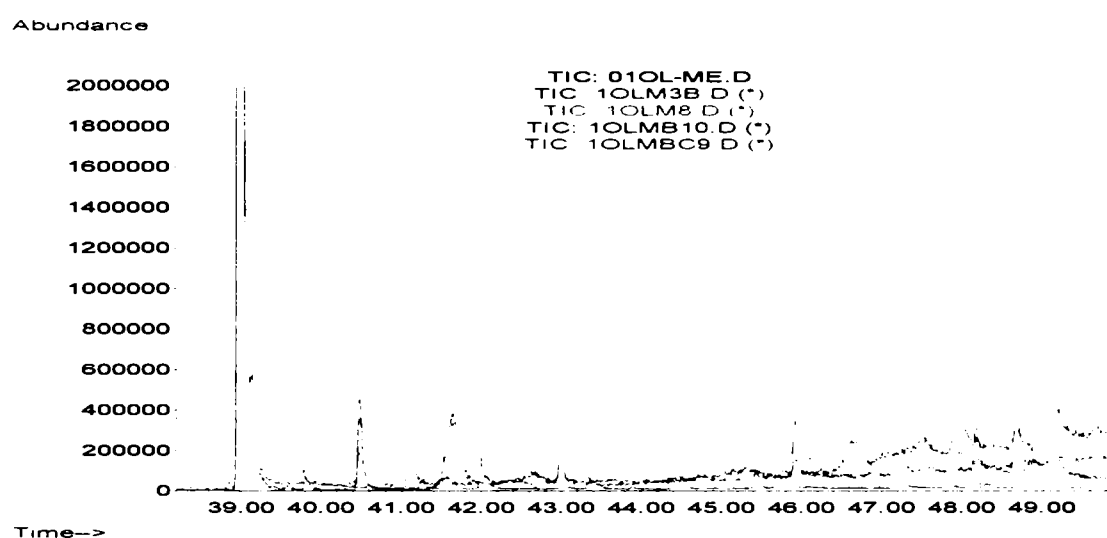


Figura 3.9. Suprapunerea cromatogramelor GC pentru acidul oleic standard (cu negru) și pentru probele de complecși cu β -ciclodextrină, degradate la 50°C (verde), la 100°C (violet) și la 150°C (cian), comparativ cu proba neîncapsulată, degradată la 150°C (galben), pentru porțiunea corespunzătoare KI 2100-2600.

3.2.2. Nanocapsule acid linoleic/ α - și β -ciclodextrină

Metodologia abordată pentru obținerea și analiza nanocapsulelor acid linoleic/ α - și β -ciclodextrină a fost similară cazului anterior. În urma procesului de nanoîncapsulare a acidului linoleic de puritate analitică în α - și β -ciclodextrină s-au obținut randamente ridicate, cel mai bun fiind pentru complexul acid linoleic/ α -ciclodextrină (88%). Complexul cu β -ciclodextrină a fost obținut cu un randament puțin mai scăzut (74%), probabil datorită aceleiași solubilități mai mari a acestui complex în soluția etanol-apă, față de cea a complecșilor acid oleic/ α -ciclodextrină.

Pentru stabilirea compoziției exacte a acidului linoleic utilizat și evaluarea ulterioară a compușilor de degradare, s-a procedat în același mod ca în cazul nanoîncapsulării acidului oleic. Astfel, din analiza GC-MS (figura 3.10) a rezultat o concentrație de acid linoleic în probă de aproape 98% (exprimată ca ester metilic; figura 3.11), pe lângă acesta mai apărând și unii compuși de impurificare cum ar fi unii izomeri de poziție ai acidului linoleic: acizii 7,10- și 8,11-octadecadienoici (0.03% și, respectiv 0.08%; tabelul 3.3 și Anexa 1, figurile A.1.14 și A.1.15), analogi cu trei duble legături (acid linolenic 0.15% și izomeri geometrici ai acestuia) și în concentrații mici unii derivați de degradare. În figura 3.10 este

prezentată gaz cromatograma acidului linoleic derivatizat iar în tabelul 3.3 sunt trecute concentrațiile componentilor identificați pe baza spectrelor MS și indicii de retenție corespunzători.

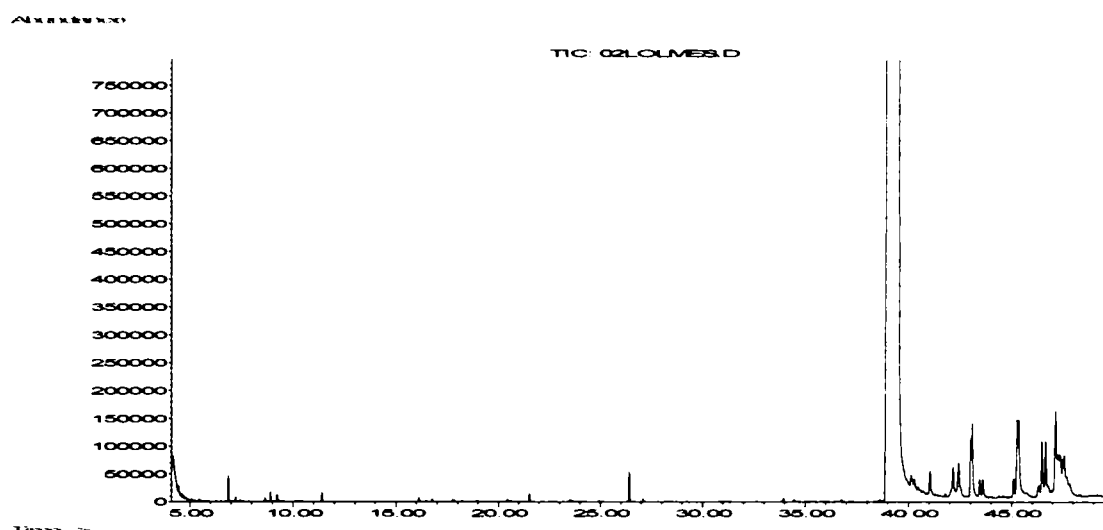


Figura 3.10. Gaz cromatograma din analiza GC-MS pentru acidul linoleic derivatizat (mărire de 10 ori pentru observarea picurilor corespunzătoare impurităților).

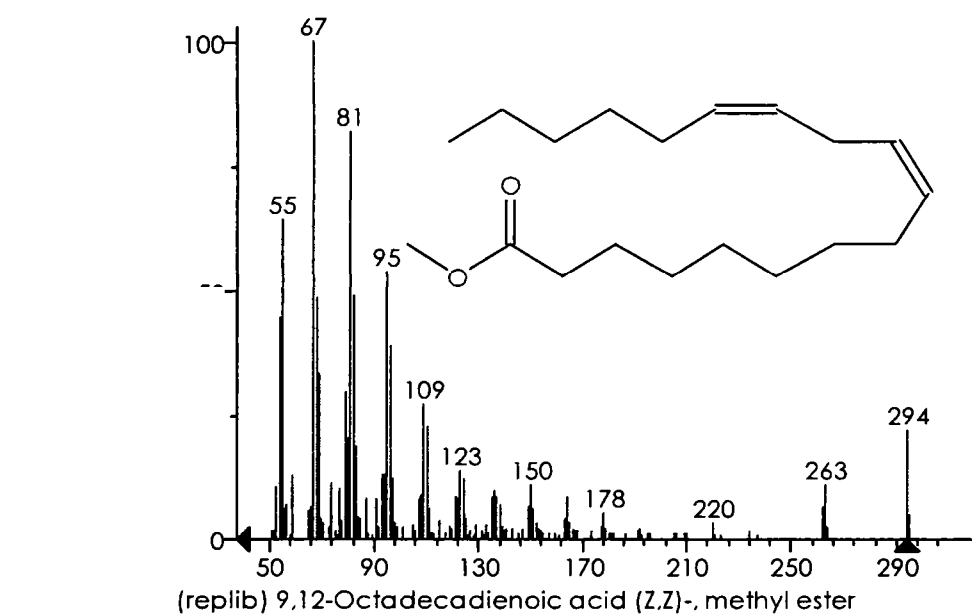
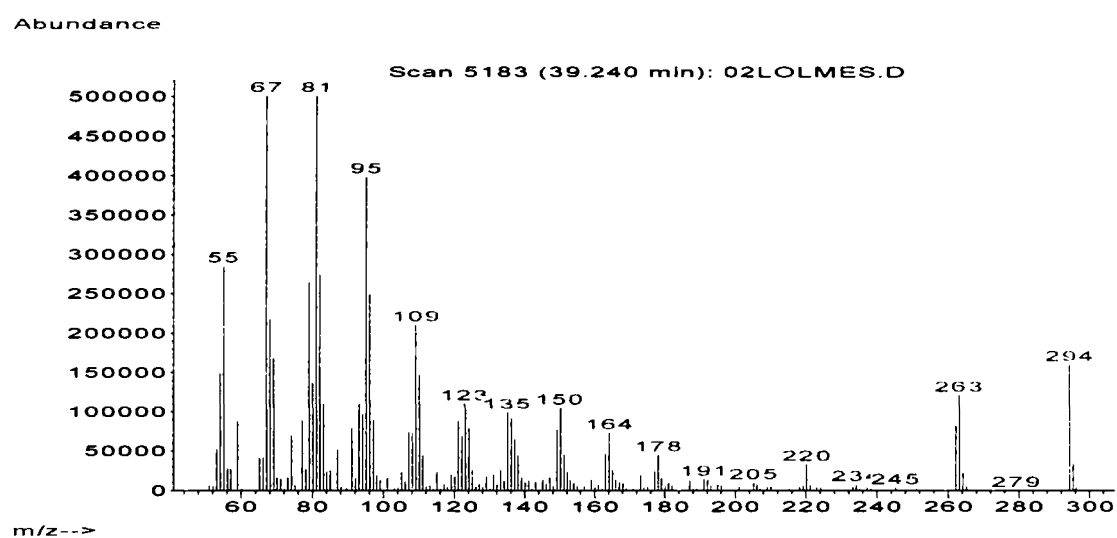


Figura 3.11. Spectrul MS experimental (sus) și din baza de date NIST (jos) pentru acid linoleic derivatizat.

După complexarea acidului linoleic cu α - sau β -ciclodextrină și recuperarea acestuia prin extracții succesive în hexan s-a detectat o concentrație scăzută de acid stearic și de hexanal (acetalul corespunzător), ultimul rezultat probabil prin procese de scindare oxidative. Concentrația acidului linoleic (sub forma esterului metilic) după recuperarea din complexul cu α -ciclodextrină a fost de 99.3%, iar cel din complexul cu β -ciclodextrină de 99.6%. În figurile 3.12 și 3.13 sunt prezentate gaz cromatogramele pentru acidul linoleic recuperat din complexii cu α - și, respectiv, β -ciclodextrină.

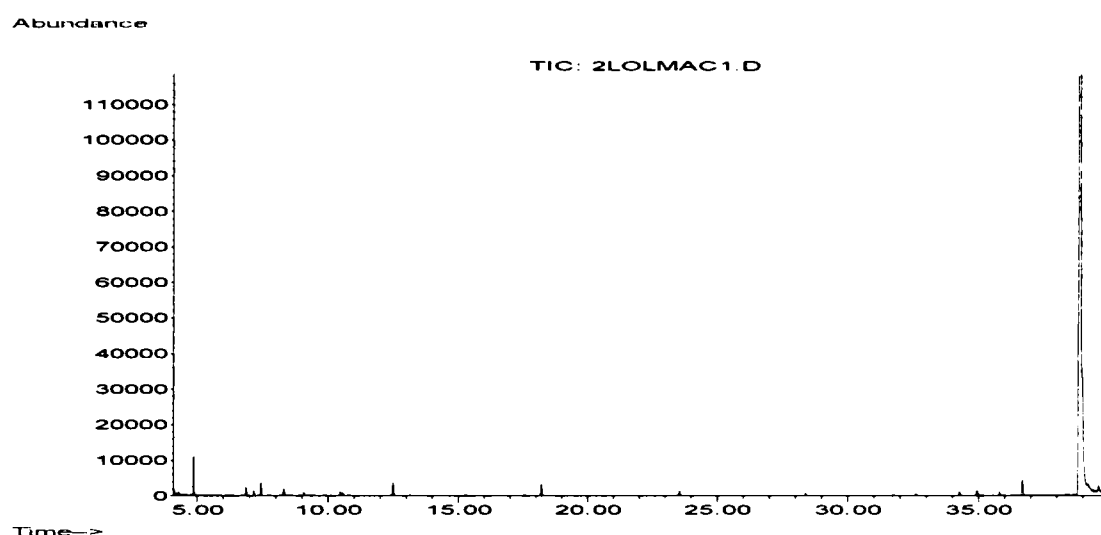


Figura 3.12. Gaz cromatograma din analiza GC-MS pentru acidul linoleic derivatizat recuperat din complexul cu α -ciclodextrină (mărire de 10 ori pentru observarea picurilor corespunzătoare impurităților).

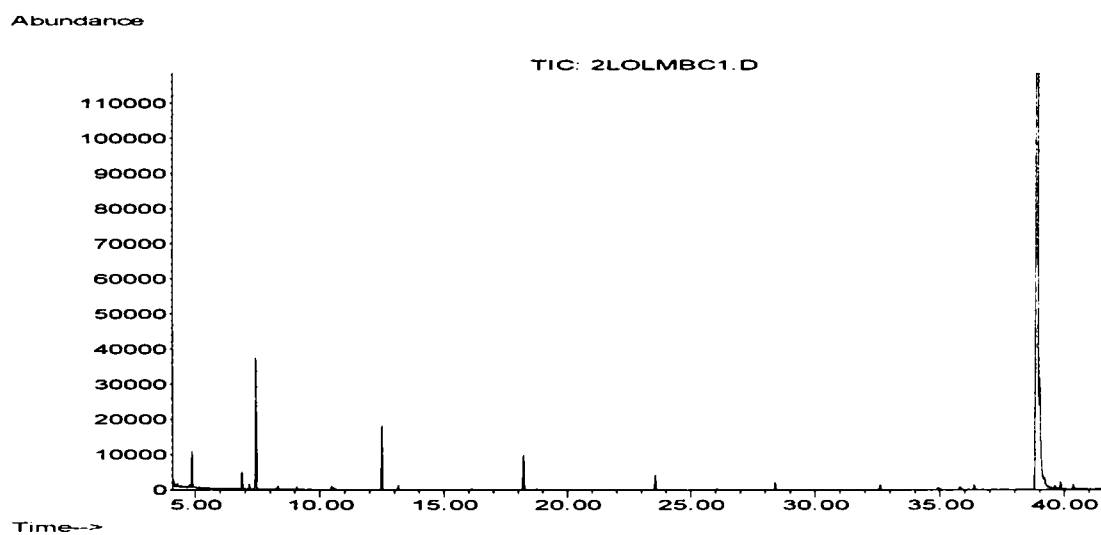


Figura 3.13. Gaz cromatograma din analiza GC-MS pentru acidul linoleic derivatizat recuperat din complexul cu β -ciclodextrină (mărire de 10 ori pentru observarea picurilor corespunzătoare impurităților); picurii care apar la intervale regulate la începutul cromatogramei sunt datorati unor compuși separați din coloană (siloxani), probabil datorită unei uscări necorespunzătoare a probei.

Tabel 3.3. Identificarea componentelor principali din proba derivatizată de acid linoleic, concentrația acestora și indicii de retenție Kovats.

Nr.	Identificare MS	Concentrație (%)	Indice Kovats (KI)
1	Nonanoic acid, 9-oxo-, methyl ester	0.02	1436
2	Octanoic acid, 6,6-dimethoxy-, methyl ester	0.06	1601
3	Linoleic acid, methyl ester	97.32	2121
4	7,10-Octadecadienoic acid, methyl ester	0.03	2152
5	8,11-Octadecadienoic acid, methyl ester	0.08	2196
6	9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester (izomer)	0.01	2233
7	6,9,12-Octadecatrienoic acid, methyl ester (izomer 1)	0.09	2253
8	6,9,12-Octadecatrienoic acid, methyl ester (izomer 2)	0.10	2267
9	Linolenic acid, methyl ester	0.15	2299
10	6,9,12-Octadecatrienoic acid, methyl ester (izomer 3)	0.24	2303
11	Oxiraneundecanoic acid, 3-pentyl-, methyl ester, cis-	0.21	2437
12	Methyl (Z)-12,13-epoxy-11-methoxy-9-octadecenoate	0.17	2525
13	9,12-Octadecadienal, dimethyl acetal	0.33	2579
14	(E)-8-Methyl-9-tetradecen-1-ol acetate	0.02	2609

În urma degradării probelor de acid linoleic la temperaturi între 50-150°C, în aer la presiune atmosferică, s-au putut identifica o serie de produși de degradare, în special la temperaturi peste 100°C, care fac parte din clasa alchidelor (oxidare) și epoxizilor. Concentrația de acid linoleic în proba degradată la 50°C a fost 97.5%, probă ce a prezentat produși de degradare în concentrații foarte mici, în timp ce în cazul probelor degradate la 100°C concentrația acidului linoleic a fost de 86.2%, iar pentru proba degradată la 150°C de 54.5% (tabelul 3.4).

Dintre alchidele identificate ca produși de oxidare ai acidului linoleic sau ai altor derivați prezenți în probă, care au fost derivatizate la acetali dimetilici corespunzători, sunt de amintit malondialdehida, care a fost identificată în concentrații crescătoare în probele degradate la 100 și 150°C (0.1%, respectiv 0.9%). Aceeași variație crescătoare a concentrațiilor se observă și la hexanal (de la 0.15% la 10.5% pentru probele degradate la temperaturi în intervalul 50-150°C), heptanal (0-0.3%), acid 9-oxononanoic (0.02-6%; Anexa 1, figura A.1.16), acid octandioic (0-0.9%; Anexa 1, figura A.1.17), acid 6-oxooctanoic (0.01-0.6%; Anexa 1, figura A.1.18), acid nonandioic (0-8.4%; Anexa 1, figura A.1.19) și pentru unii izomeri ai acidului linoleic și linolenic (acizi octadecadienoici și octadecatrienoici). În cazul probei degradate la 100°C s-a identificat (cu prin compararea spectrului MS cu cel din baza de date NIST) și prezența compusului 12,13-epoxidat al unui derivat al acidului linoleic (Anexa 1, figura A.1.20).

În figurile 3.14 și 3.15 sunt prezentate suprapunerile cromatogramelor GC pentru acidul linoleic standard și pentru probele degradate la 50, 100 și 150°C, în zona apariției alchidelor inferioare (KI = 880-1600) și a compuşilor superiori de oxidare, epoxidare, epoxidare-hidroliză (KI = 2100-2600).

Tabel 3.4. Identificările MS, indicii de retenție Kovats și concentrațiile pentru compușii din probele de acid linoleic degradate la temperaturi de 50-150°C.

Nr.	Identificare MS	KI	C ₁ ^a (%)	C ₂ ^b (%)	C ₃ ^c (%)
1	Malonaldehyde, bis(dimethyl acetal)	883		0.12	0.87
2	Methyl caproate	925	0.01	0.24	1.83
3	2-Heptenal, (Z)-	958		0.01	
4	Hexanal dimethyl acetal	980	0.15	1.58	10.56
5	Methyl enanthate	1026		0.04	0.25
6	2-Octenal, (E)-	1059		0.07	
7	Heptane, 1,1-dimethoxy-	1080	0.00	0.04	0.27
8	Caprylic acid methyl ester	1126	0.02	0.55	1.39
9	2-Nonenal, (E)-	1160		0.02	
10	2,4-Decadienal	1317		0.01	
11	Methyl 8-oxooctanoate	1334			0.53
12	2,4-Hexadiene, 1,6-dimethoxy-, (E,E)-	1354	0.01		
13	Methyl caproate	1394		0.02	0.27
14	Heptane, 1,1-dimethoxy- ! (aldehyde, dimethyl acetal)	1400	0.01		
15	Nonanoic acid, 9-oxo-, methyl ester	1436	0.02	1.09	6.07
16	Octanedioic acid, dimethyl ester	1449		0.02	0.85
17	Octanoic acid, 6,6-dimethoxy-, methyl ester	1500	0.01	0.15	0.56
18	3-Hexanone, 1,5,6,6-tetramethoxy-	1515			0.31
19	Nonanedioic acid, dimethyl ester	1550	0.00	0.55	8.41
20	2-Octanol, 8,8-dimethoxy-	1600	0.21	2.51	10.54
21	Methyl 8-(2-furyl)octanoate	1624			0.67
22	Decanedioic acid, dimethyl ester	1650			0.30
23	Methyl 11-oxo-9-undecenoate	1698		0.04	0.27
24	12,12-Dimethoxydodecanoic acid, methyl ester	1700		0.08	
25	Methyl 12-oxo-9-dodecenoate	1800		0.10	
26	Octanoic acid, 6,6-dimethoxy-, methyl ester	1817		0.04	
27	Heptanal, 7,7-dimethoxy-	1884	0.03	0.18	
28	6-Nonenal, 3,7-dimethyl-	1905		0.04	
29	Tetradecanoic acid, 10,13-dimethyl-, methyl ester	1926	0.00	0.02	0.12
30	Butanoic acid, 2-ethyl-, methyl ester	1954		0.02	
31	2-Hydroxyhexadecyl butanoate	1963		0.03	
32	9,12-Octadecadienal, dimethyl acetal	1970		0.12	
33	Methyl Z-11-tetradecenoate	2001		0.07	
34	3-Hexanone, 1,5,6,6-tetramethoxy-	2017	0.01		
35	Linoleic acid, methyl ester	2107	97.49	86.24	54.45
36	8,11-Octadecadienoic acid, methyl ester	2112	0.59	0.40	
37	9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester (isomer 1)	2147	0.01		
38	9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester (isomer 2)	2192	0.04		
39	6,9,12-Octadecatrienoic acid, methyl ester (isomer 1)	2294		0.22	0.50
40	6,9,12-Octadecatrienoic acid, methyl ester (isomer 2)	2299		0.38	
41	6,9,12-Octadecatrienoic acid, methyl ester (isomer 3)	2320	0.31		
42	Cyclopropaneoctanoic acid, 2-[[2-[(2-ethylcyclopropyl)methyl]cyclopropyl]methyl]-, methyl ester	2350	0.01		
43	Olealdehyde, dimethyl acetal	2374	0.02	0.35	0.98
44	9,12-Octadecadienal, dimethyl acetal (isomer 3)	2422	0.18		
45	Methyl (Z)-12,13-epoxy-11-methoxy-9-octadecenoate'	2521	0.53	4.65	
46	Octadecanoic acid, 9,10-dihydroxy-, methyl ester	2612	0.30		

^a concentrația componentilor din proba de acid linoleic degradată la 50°C;^b concentrația componentilor din proba de acid linoleic degradată la 100°C;^c concentrația componentilor din proba de acid linoleic degradată la 150°C;

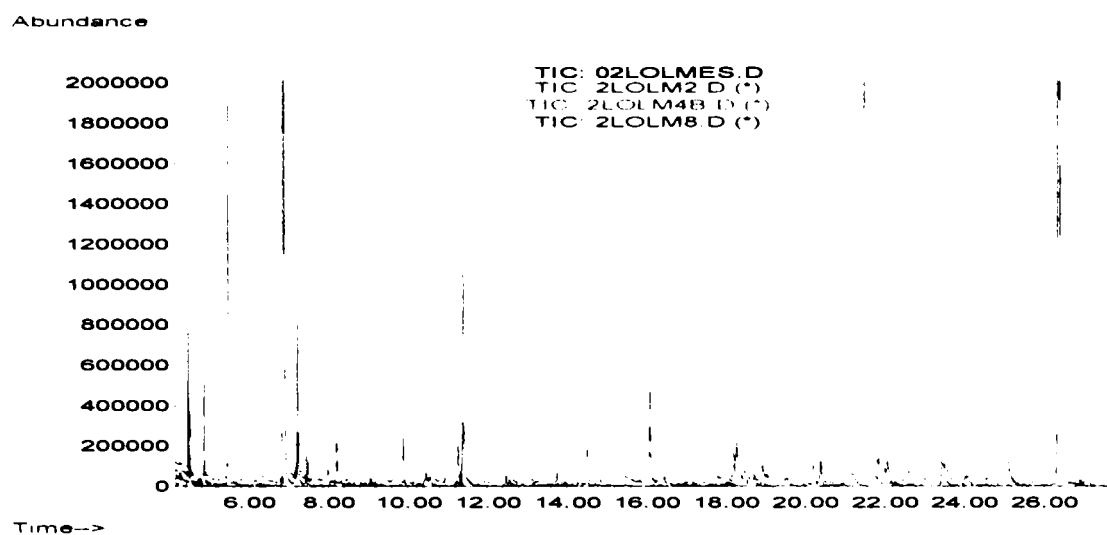


Figura 3.14. Suprapunerea cromatogramelor GC pentru acidul linoleic standard (cu negru) și pentru probele degradate la 50°C (verde), la 100°C (galben) și la 150°C (violet) pentru porțiunea corespunzătoare aldehydelor inferioare (KI 880-1600).

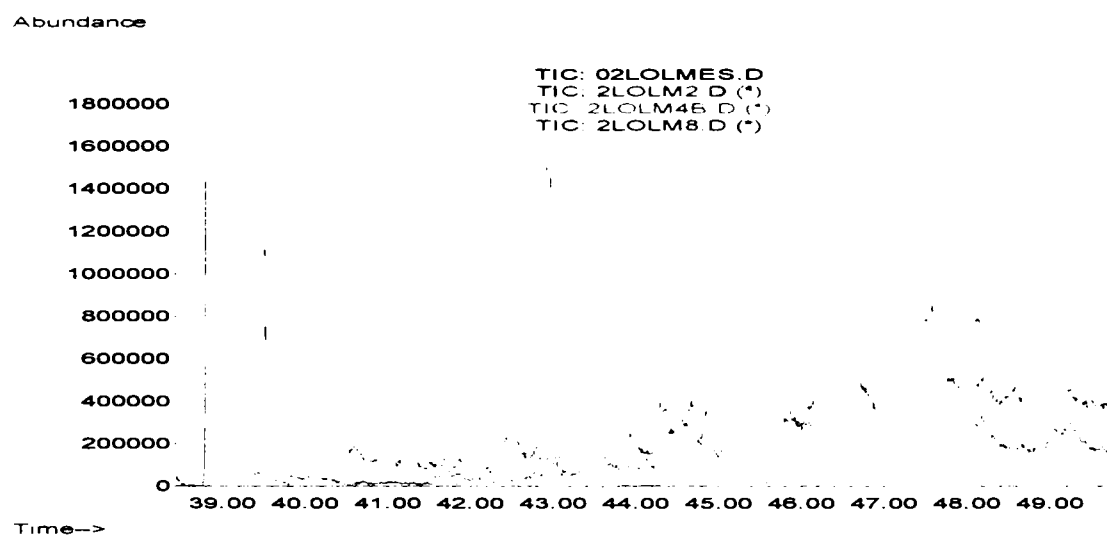


Figura 3.15. Suprapunerea cromatogramelor GC pentru acidul linoleic standard (cu negru) și pentru probele neîncapsulate, degradate la 50°C (verde), la 100°C (galben) și la 150°C (violet) pentru porțiunea corespunzătoare KI 2000-2600.

În urma analizei probelor derivatizate recuperate din complexii acidului linoleic cu α - și β -ciclodextrină, degradați în aceleași condiții, se poate observa clar capacitatea de protejare a acestor oligozaharide ciclice la oxidare în special, dar și la alți factori de mediu (umiditate). În cazul probei de complex cu α -ciclodextrină degradate la 50°C nu s-a identificat nici un compus de degradare major (malondialdehida fiind în concentrație de 0.59%), concentrația acidului linoleic (exprimată ca ester metilic) fiind de 99.4%, în timp ce pentru proba similară degradată la 100°C concentrația acidului gras a fost de doar 59.4%, o parte fiind izomerizată probabil la un derivat mai stabil termodinamic (39%). Compusul de degradare principal în acest ultim caz a fost malondialdehida (1.5%). În cazul complexului acidului linoleic cu α -ciclodextrină, degradat la 150°C, concentrația acidului linoleic a fost de 80%, o mare parte din acest acid fiind probabil polimerizat în condițiile de degradare la care a fost supus (figura 3.16).

În cazul analizei GC-MS a probelor derivatizate obținute prin extracție succesivă în hexan din complexii acidului linoleic cu β -ciclodextrină, degradați în aceleași condiții, s-au identificat în concentrații mici unele aldehyde inferioare (malondialdehidă, hexanal în cazul probelor degradate la 50-100°C), însă concentrația acidului linoleic a fost destul de mare (94% pentru proba degradată la 50°C și 92% pentru cea degradată la 100°C). Pentru proba degradată la 150°C acidul linoleic (esterul

metilic) a prezentat o concentrație de doar 74%, restul de 26% fiind probabil un omolog mai stabil termodinamic (vezi figura 3.17).

În figurile 3.16 și 3.17 sunt prezentate suprapunerile cromatogramelor GC pentru acidul linoleic standard (negru) și pentru probele de complecși cu α -ciclodextrină, respectiv β -ciclodextrină, degradate la 50-150°C, comparativ cu proba de acid linoleic necomplexată, degradată la 150°C, pentru zona apariției acidului linoleic (ester metilic) și a omologilor superiori sau a derivaților similari. Se poate observa apariția picurilor semnificative pentru degradare, în special pentru proba neîncapsulată.

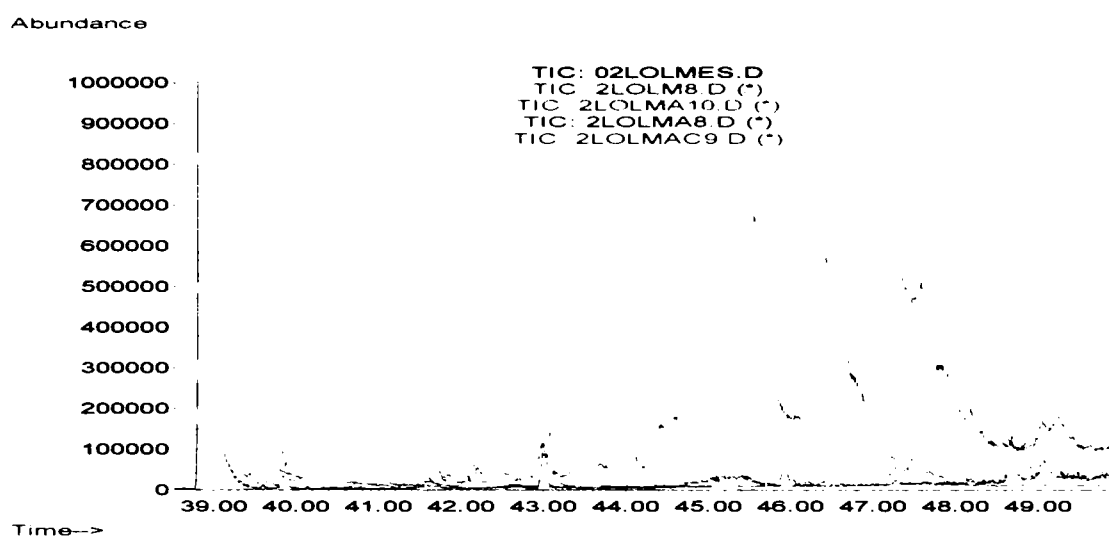


Figura 3.16. Suprapunerea cromatogramelor GC pentru acidul linoleic standard (cu negru) și pentru probele de complecși cu α -ciclodextrină, degradate la 50°C (violet), la 100°C (galben) și la 150°C (cian), comparativ cu proba neîncapsulată, degradată la 150°C (verde), pentru porțiunea corespunzătoare KI 2000-2600.

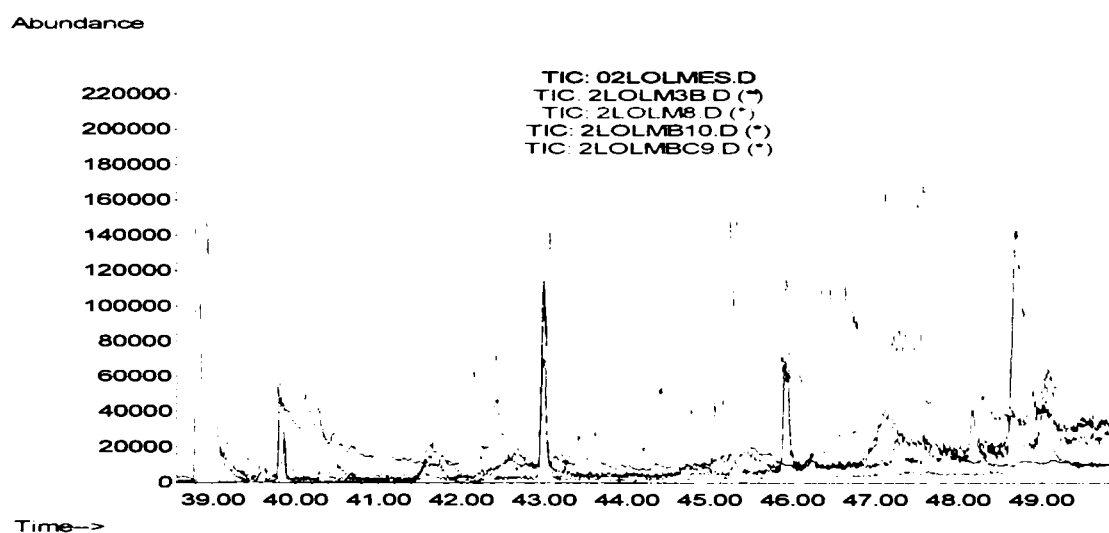


Figura 3.17. Suprapunerea cromatogramelor GC pentru acidul linoleic standard (cu negru) și pentru probele de complecși cu β -ciclodextrină, degradate la 50°C (verde), la 100°C (violet) și la 150°C (cian), comparativ cu proba neîncapsulată, degradată la 150°C (galben), pentru porțiunea corespunzătoare KI 2000-2600.

3.2.3. Nanocapsule acid linolenic/ α - și β -ciclodextrină

Complexul acid linolenic/ α -ciclodextrină a fost obținut cu randamente foarte bune (91%), în timp ce complexul cu β -ciclodextrina a fost obținut cu un randament de doar 59.2%, probabil datorită unei interacțiuni mai slabe a acidului linoleic cu matricea oligozaharidică și prin urmare o mai mare solubilitate în sistemul de solvenți utilizat pentru complexare.

Analiza GC-MS (figura 3.18) a probelor de acid linolenic natural (puritate >70%) a condus la identificarea unui număr de 55 de compuși principali (pe baza spectrelor MS experimentale, prin comparație cu cele din baza de date NIST 2002, respectiv pe baza indicilor de retenție Kovats obținuți pentru standardele disponibile; tabelul 3.5), concentrația acidului gras principal fiind de 88.7% (ca ester metilic; figura 3.19). În concentrație relativ însemnată (aproape 6% în proba derivatizată) s-a identificat și acidul linoleic, malondialdehida (ca bis(dimetildiacetal); 0.011%), acidul caprilic (0.05%), acidul 9-oxononanoic (0.05%), acidul nonandioic (0.02%), acidul palmitoleic (0.2%; Anexa 1, figura A.1.21) și unii izomeri de poziție ai acidului linolenic, în concentrații sub 1%, și ai acidului ricinoleic (sub 0.5%).

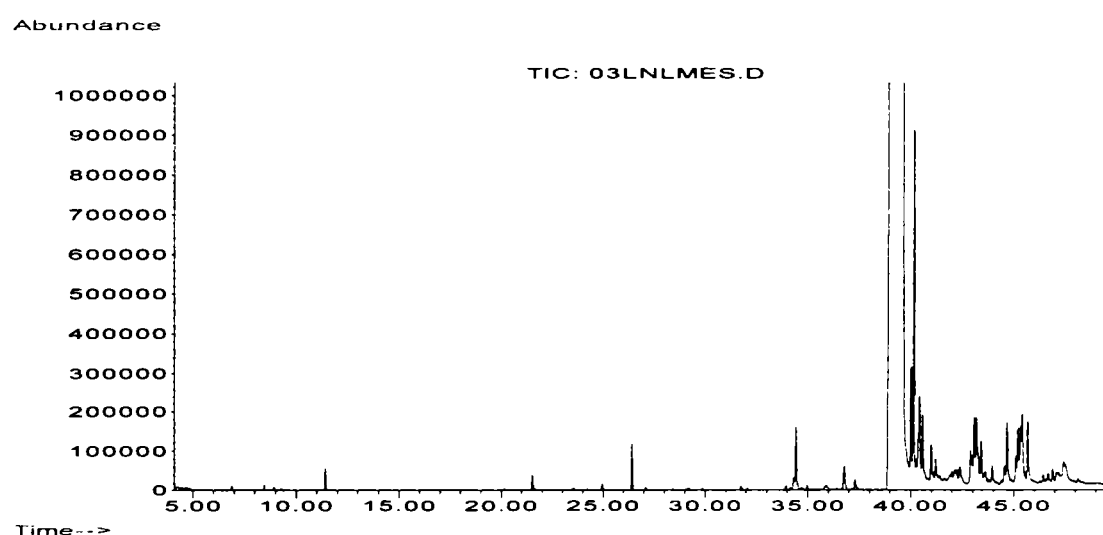


Figura 3.18. Gaz cromatograma din analiza GC-MS pentru acidul linolenic derivatizat (mărire de 10 ori a imaginii).

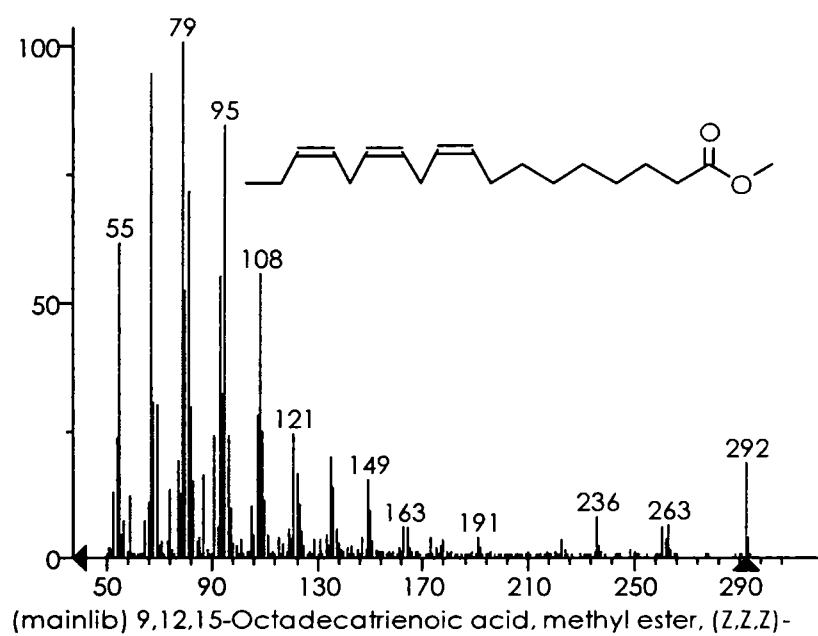
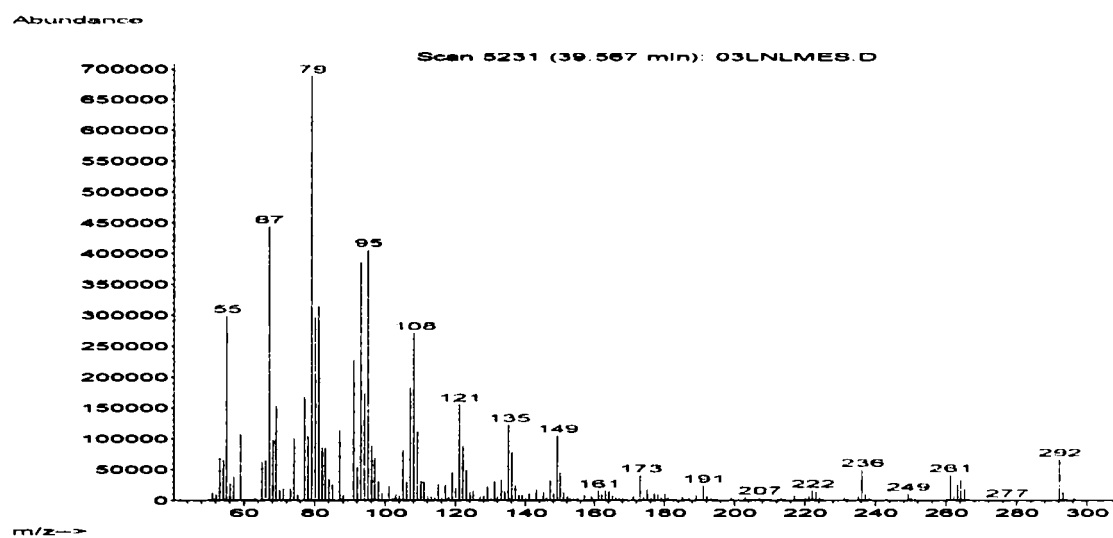


Figura 3.19. Spectrul MS experimental (sus) și din baza de date NIST (jos) pentru acidul linolenic derivatizat.

Tabel 3.5. Identificarea componentelor principali din proba derivatizată de acid linolenic, concentrația acestora și indicii de retenție Kovats.

Nr.	Identificare MS	Concentrație (%)	Indice Kovats (KI)
1	12,15-Octadecadiynoic acid, methyl ester	0.004	868
2	3-Heptanone	0.004	889
3	2-Heptanone	0.01	893
4	3-Hexanol, 5-methyl-	0.01	898
5	2-Heptanol	0.003	903
6	2-Pentenal, 2-ethyl-	0.001	939
7	Lauraldehyde, dimethyl acetal	0.002	979
8	Hexanal dimethyl acetal	0.01	980
9	2(3 <i>H</i>)-Furanone, 5-butylidihydro-4-methyl-, <i>cis</i> -	0.003	991
10	5-Hexen-3-ol, 3-methyl-	0.001	998
11	4-Heptenoic acid, methyl ester, (<i>E</i>)-	0.001	1022
12	Methyl enanthate	0.002	1026
13	<i>Malonaldehyde, bis(dimethyl acetal)</i>	<i>0.01</i>	<i>1034</i>
14	1-Hepten-4-ol	0.003	1041
15	3-Hexanol, 5-methyl-	0.01	1049
16	4-Methyl-2-hexanol	0.01	1060
17	Cyclohexanol, 1-ethyl-	0.001	1083
18	3-Hexanone, 1,5,6,6-tetramethoxy-	0.002	1115
19	<i>Caprylic acid methyl ester</i>	<i>0.05</i>	<i>1126</i>
20	Methyl 8-oxooctanoate	0.001	1140
21	Methyl pelargonate	0.001	1226
22	1,1,3-Trimethoxypropane	0.001	1242
23	Heptanal, 7,7-dimethoxy-	0.001	1269
24	Capric acid methyl ester	0.002	1326
25	Heptanal, dimethyl acetal	0.001	1401
26	Methyl-10-undecenoate	0.002	1430
27	<i>Nonanoic acid, 9-oxo-, methyl ester</i>	<i>0.05</i>	<i>1436</i>
28	Octanoic acid, 6,6-dimethoxy-, methyl ester	0.004	1501
29	Lauric acid, methyl ester	0.004	1526
30	<i>Nonanedioic acid, dimethyl ester</i>	<i>0.02</i>	<i>1550</i>
31	2-Octanol, 8,8-dimethoxy-	0.12	1601
32	7-Hexadecenoic acid, methyl ester, (<i>Z</i>)-	0.004	1699
33	Myristic acid, methyl ester	0.004	1726
34	6-Octadecenoic acid, methyl ester, (<i>Z</i>)-	0.01	1798
35	9-Dodecenoic acid, methyl ester, (<i>E</i>)-	0.01	1810
36	Octanoic acid, 6,6-dimethoxy-, methyl ester	0.001	1818
37	<i>Methyl palmitoleate</i>	<i>0.20</i>	<i>1905</i>
38	Palmitic acid, methyl ester	0.02	1927
39	Cyclopropanoic acid, 2-hexyl-, methyl ester/ 11-Hexadecenoic acid, 15-methyl-, methyl ester!	0.12	2003
40	Methyl (<i>Z</i>)-5,11,14,17-eicosatetraenoate!	0.04	2025
41	<i>Linoleic acid, methyl ester</i>	<i>5.90</i>	<i>2100</i>
42	Linolenic acid, methyl ester	88.8	2126
43	Linolenic acid, methyl ester (isomer 1)/ 6,9,12-Octadecatrienoic acid, methyl ester	0.27	2146
44	Linolenic acid, methyl ester (isomer 2)!	0.95	2153
45	7,10-Octadecadienoic acid, methyl ester	0.03	2160
46	Linolenic acid, methyl ester (isomer 3)!	0.09	2165
47	Linolenic acid, methyl ester (isomer 4)!	0.21	2168
48	6,9,12-Octadecatrienoic acid, methyl ester (isomer 1)!	0.11	2267
49	6,9,12-Octadecatrienoic acid, methyl ester (isomer 2)!	0.10	2294
50	6,9,12-Octadecatrienoic acid, methyl ester (isomer 3)!	0.07	2298
51	Ricinoleic acid methyl ester	0.24	2304
52	Ricinoleic acid methyl ester (isomer)!	0.32	2310
53	7,10,13-Eicosatrienoic acid, methyl ester	0.14	2324
54	9,12-Octadecadienal, dimethyl acetal	0.02	2579
55	Octadecanoic acid, 9,10-dihydroxy-, methyl ester	0.05	2608

Analiza GC-MS a probelor recuperate prin extracție repetată în hexan din nanocapsulele cu ciclodextrine a indicat o ușoară concentrare a acidului linolenic (în detrimentul celorlalți componente care probabil au fost încapsulați mai slab) în amestecul de acizi grași, concentrația relativă a acidului linolenic în complex fiind de 89.5% în cazul α -ciclodextrinei (figura 3.20) și de 91.2% în cazul β -ciclodextrinei (figura 3.21). Acidul linoleic din amestec a fost identificat în concentrație de 10.4% în primul caz și de 8.7% în cel de-al doilea caz.

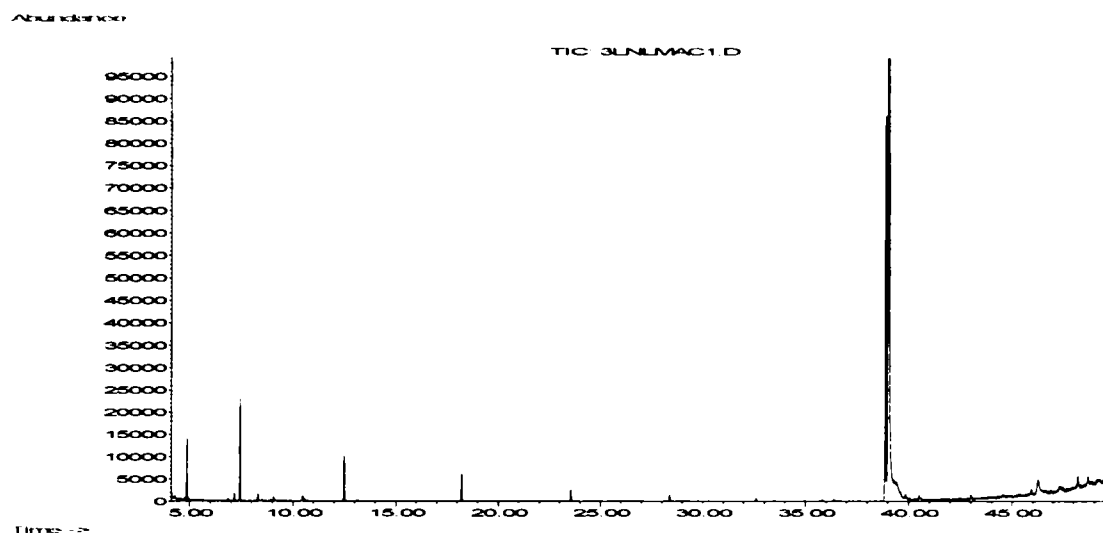


Figura 3.20. Gaz cromatograma din analiza GC-MS pentru acidul linolenic derivatizat recuperat din complexul cu α -ciclodextrină (mărire de 10 ori pentru observarea picurilor corespunzătoare impurităților); picurii care apar la intervale regulate la începutul cromatogramei sunt datorate unor compuși separați din coloană (siloxani).

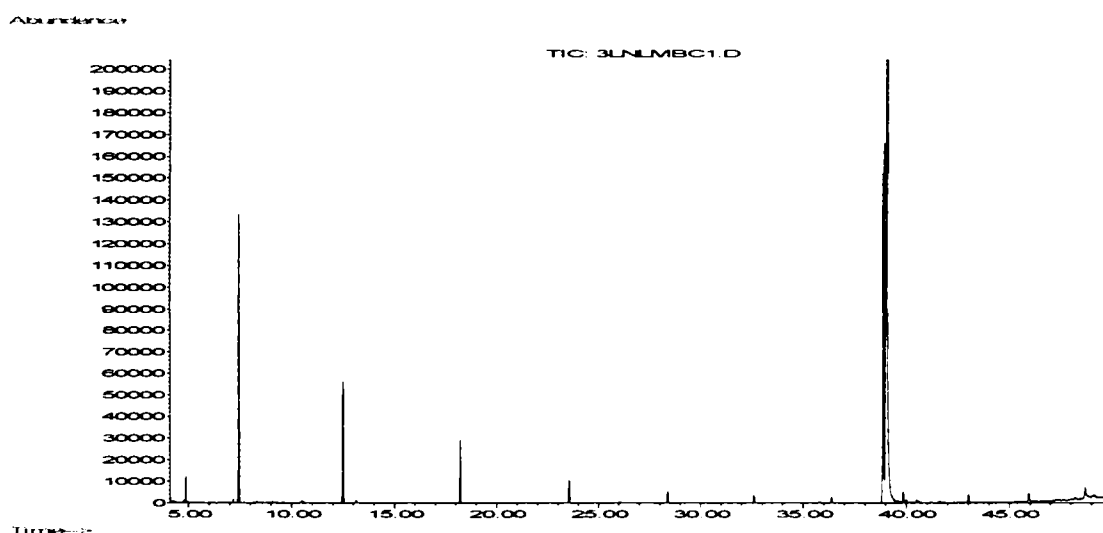


Figura 3.21. Gaz cromatograma din analiza GC-MS pentru acidul linolenic derivatizat recuperat din complexul cu β -ciclodextrină (mărire de 10 ori pentru observarea picurilor corespunzătoare impurităților); picurii care apar la intervale regulate la începutul cromatogramei sunt datorate unor compuși separați din coloană (siloxani).

La degradarea probelor neîncapsulate de acid linolenic la temperaturi de 100°C s-au decelat puțini compuși de degradare extractibili în hexan, în special hexanal (0.3% în proba derivatizată) și acizi grași saturați sau cu grad de nesaturare mai redus decât acidul linolenic (acizii caproic, caprilic, linoleic și oleic), o mare parte din acidul linolenic fiind polimerizat la această temperatură (s-a constatat prezența unei cantități însemnate de compuși neextractibili în hexan, care nu au putut fi caracterizați corespunzător). La temperatura de 150°C s-a decelat acidul linolenic în concentrație relativă de 91.7% în proba extrasă cu hexan, restul de 8.2% fiind acid linoleic. Și în acest caz o parte din acizii grași nesaturați au fost polimerizați.

Probele de acid linolenic încapsulate în ciclodextrine, degradate în condiții similare de temperatură, aer și umiditate, au prezentat o stabilitate mai mare doar în cazul complexelor cu α -ciclodextrină, unde concentrația relativă de acid linolenic a fost de 93.1% în cazul valorii de 100°C a temperaturii de degradare; acidul linoleic a fost în acest caz în concentrație de 5.1%, iar **principalul compus de degradare, malondialdehida** (ca bis(dimetilacetal)), a fost în concentrație de 1.2%. În cazul probei similare degradate la 150°C, concentrația relativă de acid linolenic în proba extractibilă în hexan a fost de doar 88%, restul fiind compuși de oxidare. **β -Ciclodextrina a prezentat o capacitate de protecție mult mai redusă în cazul acidului linolenic**, acesta fiind în concentrație de doar 52.2% în proba extrasă din complexul degradat la 100°C, o concentrație mare în cazul malondialdehidei (34%) s-ar datora foarte probabil faptului că o mare parte din acidul gras a polimerizat, în special în cazul degradării complexului la 150°C.

3.2.4. Modelarea moleculară a interacțiunii acid gras/ciclodextrine

S-a realizat un studiu privind interacțiunea acizilor grași (acizii oleic, linoleic și linolenic) cu matricile oligozaharidice (α - și β -ciclodextrină), atât din punct de vedere teoretic, prin modelare moleculară, cât și experimental, prin calorimetrie de scanare diferențială-DSC (vezi Partea experimentală).

Modelarea moleculară în cazul α - și β -ciclodextrinei s-a realizat prin **mecanică moleculară** [219], utilizând drept conformații de start conformații ciclice ale resturilor de amidon (legături α -(1→4)-glucozidice), în care unghiurile de legătură interglucozidice au fost tensionate la 127° în cazul α -ciclodextrinei și de 119° în cazul β -ciclodextrinei (figura 3.22). În figurile 3.23 și 3.24 sunt prezentate conformațiile stabile (optimizate prin mecanică moleculară MM+) ale ciclodextrinelor, în absența altor molecule. Energiile totale relative obținute prin această metodă de modelare moleculară au fost de 71.49 kcal/mol în cazul α -ciclodextrinei și 82.7 kcal/mol în cazul β -ciclodextrinei.

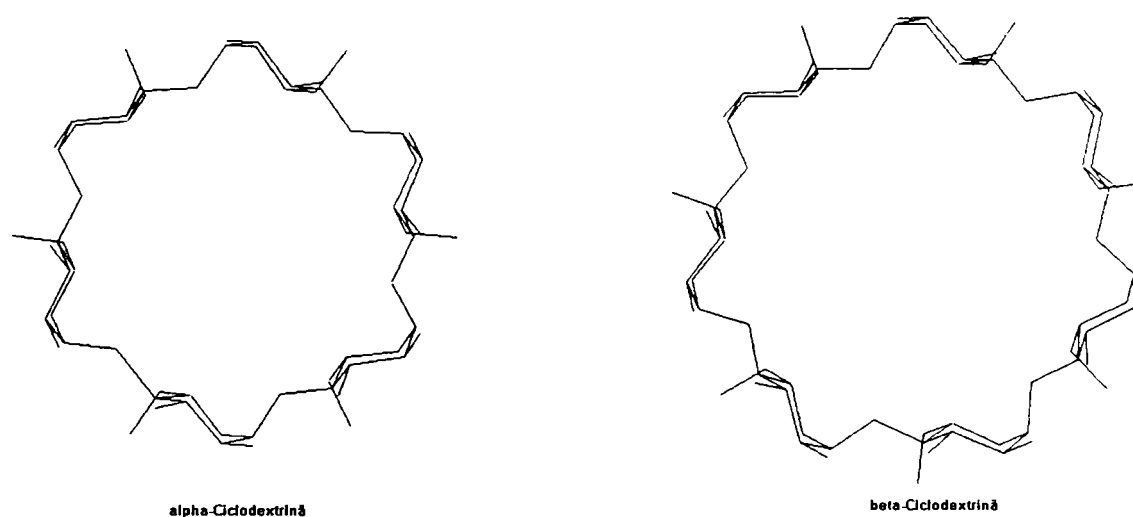


Figura 3.22. Conformații de start pentru modelarea moleculară a α - și β -ciclodextrinei.

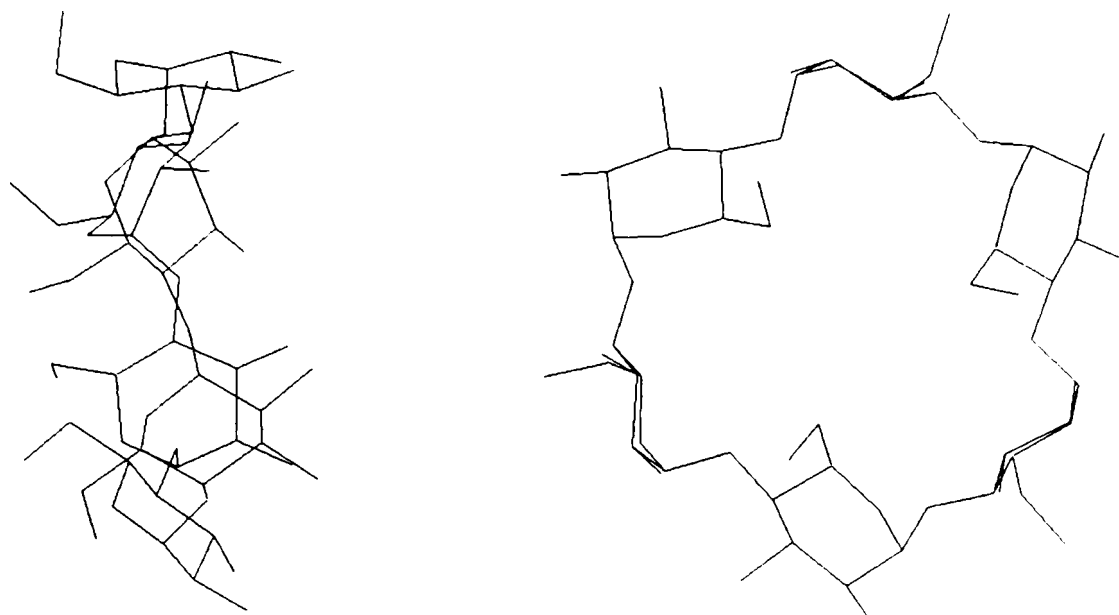


Figura 3.23. Conformația cea mai stabilă (după axa OX, respectiv OZ) a α -ciclodextrinei optimizate prin mecanică moleculară MM+.



Figura 3.24. Conformația cea mai stabilă (după axa OX, respectiv OZ) a β -ciclodextrinei optimizate prin mecanică moleculară MM+.

Cei trei acizi grași studiați (acizii oleic, linoleic și linolenic) au fost analizați din punct de vedere conformațional utilizând mecanica moleculară MM+, în scopul obținerii conformației celei mai stabile termodinamic (cu energia cea mai mică). Toți cei trei acizi au prezentat conformații stabile (de energie minimă) de formă spiralată (similare multor biomacromolecule cum ar fi proteinele și acizii nucleici) (figura 3.25), dar numărul conformațiilor cu valori ale energiilor potențiale sub 4 kcal/mol peste energia conformației celei mai stabile a fost relativ mare (peste 50 conformații cu stabilitate mai redusă). În modelarea moleculară a interacțiunii acid gras/ciclodextrină, procese desfășurate în absența altor molecule (cum ar fi cele de solvent), s-au utilizat doar conformațiile de minimă energie a moleculelor implicate în interacțiune. Energiile relative totale ale conformațiilor stabile termodinamic pentru cei trei acizi grași nesaturați au fost în ordine: 5.75 kcal/mol, 4.8 kcal/mol și, respectiv, 5.58 kcal/mol.

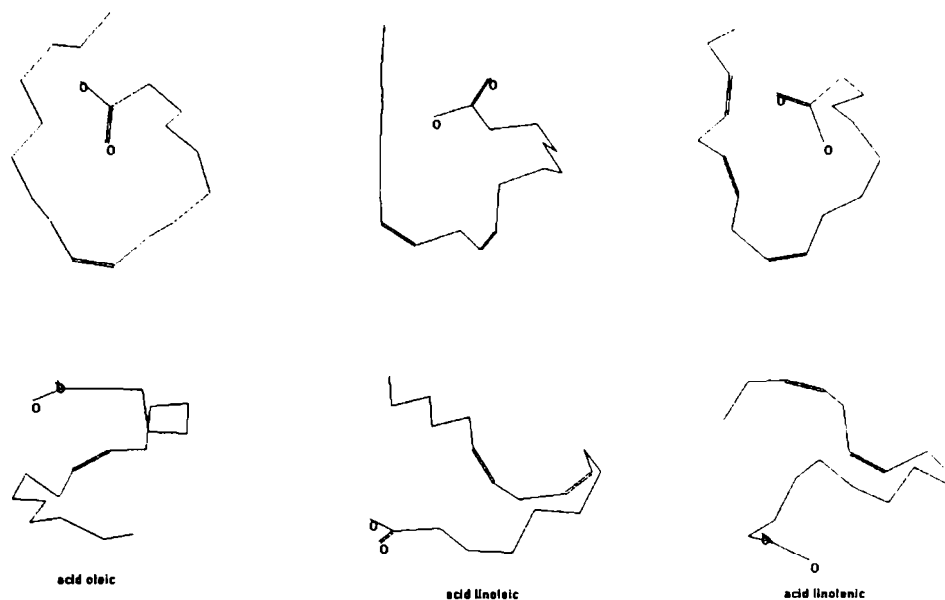


Figura 3.25. Conformațiile cele mai stabile obținute prin analiză conformațională (mecanică moleculară MM+) în cazul acizilor oleic, linoleic și linolenic (se poate observa aspectul spiralat al conformațiilor reprezentate după două axe principale perpendiculare).

Acizii grași par să se “acomodeze” (*docare*) mult mai bine în interiorul cavității β -ciclodextrinei, decât în cel al α -ciclodextrinei, ceea ce se poate observa din experimentele de docare ale acizilor grași nesaturați în ciclodextrine, prin utilizarea câmpului de forțe de mecanică moleculară MM+ la modelarea moleculară a acestor interacțiuni.

În cazul nanoîncapsulării acidului oleic în α -ciclodextrină, calculele teoretice indică o interacțiune hidrofobă (de tip van der Waals) între restul hidrofob al acidului oleic și interiorul ciclodextrinei (capătul exterior al acidului oleic fiind orientat doar până spre centrul matricei oligozaharidice, probabil datorită dimensiunilor mai reduse ale cavității α -ciclodextrinei), în timp ce gruparea carboxilică este orientată spre zona hidroxililor secundari, cu care formează legături de hidrogen (figura 3.26). O interacțiune hidrofobă mult mai bună apare la docarea acidului oleic în β -ciclodextrină, restul hidrofob al acidului penetrând aproape complet cavitatea oligozaharidei (figura 3.27). Pentru cele două cazuri de docare au fost calculate energiile de interacțiune în vid ca diferență între suma energiilor potențiale ale acidului oleic și α - sau β -ciclodextrina în conformațiile cele mai stabile și energia potențială totală a complexului format, valorile acestor energii fiind prezentate în tabelul 3.6.

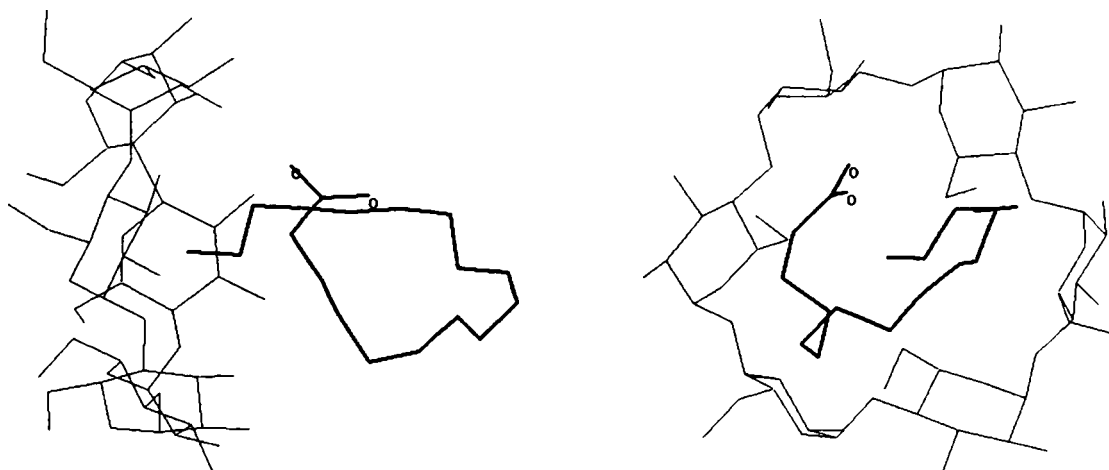


Figura 3.26. Modelarea moleculară MM+ a interacțiunii acid oleic (bold)/ α -ciclodextrină; reprezentarea complexului după axele OX și OZ (experimentele de docare au fost realizate în absența moleculelor de solvent, utilizând poziții de start ale centrelor de greutate ale moleculelor situate la distanța de 8.9Å, aliniată după axa OZ-axa ce trece prin centrul celor două baze ale “trunchiului de con” ce reprezintă forma generală a ciclodextrinei, interacțiunea având loc dinspre partea hidroxililor secundari)

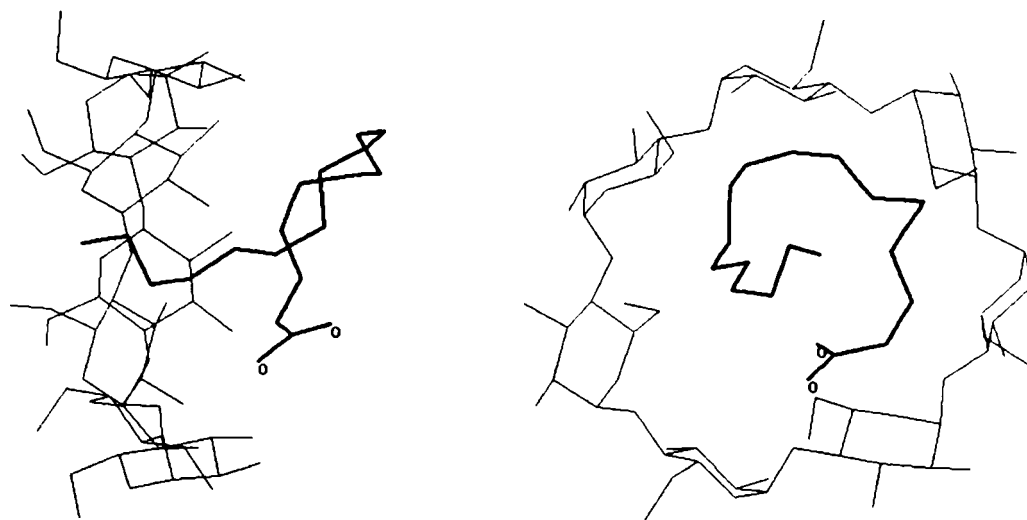


Figura 3.27. Modelarea moleculară MM+ a interacțiunii acid oleic (bold)/ β -ciclodextrină; reprezentarea complexului după axele OX și OZ (experimentele de docare au fost realizate în absența moleculelor de solvent, utilizând poziții de start ale centrelor de greutate ale moleculelor situate la distanța de 7.7Å, aliniat după axa OZ-axa ce trece prin centrul celor două baze ale "trunchiului de con" ce reprezintă forma generală a ciclodextrinei, interacțiunea având loc dinspre partea hidroxililor secundari)

Similar, s-au realizat experimente de docare și în cazul interacțiunii acidului linoleic cu α - și β -ciclodextrina (figurile 3.28 și 3.29), respectiv acidului linolenic cu α - și β -ciclodextrina (figurile 3.30 și 3.31). Și în aceste cazuri s-au determinat energiile de interacțiune acid gras/ciclodextrină, rezultatele fiind prezentate în tabelul 3.6.

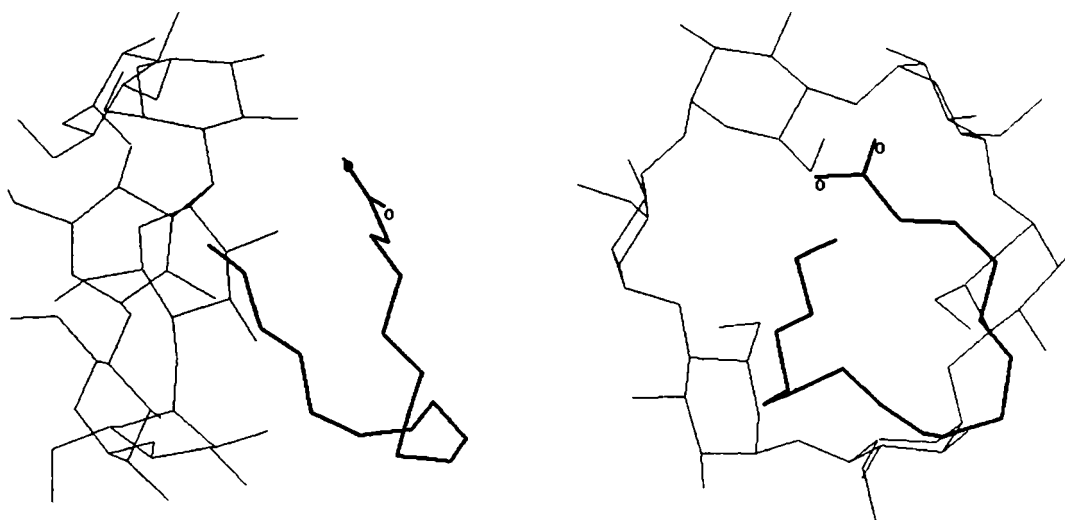


Figura 3.28. Modelarea moleculară MM+ a interacțiunii acid linoleic (bold)/ α -ciclodextrină; reprezentarea complexului după axele OX și OZ (experimentele de docare au fost realizate în absența moleculelor de solvent, utilizând poziții de start ale centrelor de greutate ale moleculelor situate la distanța de 9.1Å, aliniat după axa OZ-axa ce trece prin centrul celor două baze ale "trunchiului de con" ce reprezintă forma generală a ciclodextrinei, interacțiunea având loc dinspre partea hidroxililor secundari)



Figura 3.29. Modelarea moleculară MM+ a interacțiunii acid linoleic (bold)/ β -ciclodextrină; reprezentarea complexului după axele OX și OZ (experimentele de docare au fost realizate în absența moleculelor de solvent, utilizând poziții de start ale centrelor de greutate ale moleculelor situate la distanța de 9Å, aliniată după axa OZ-axa ce trece prin centrul celor două baze ale “trunchiului de con” ce reprezintă forma generală a ciclodextrinei, interacțiunea având loc dinspre partea hidroxililor secundari)

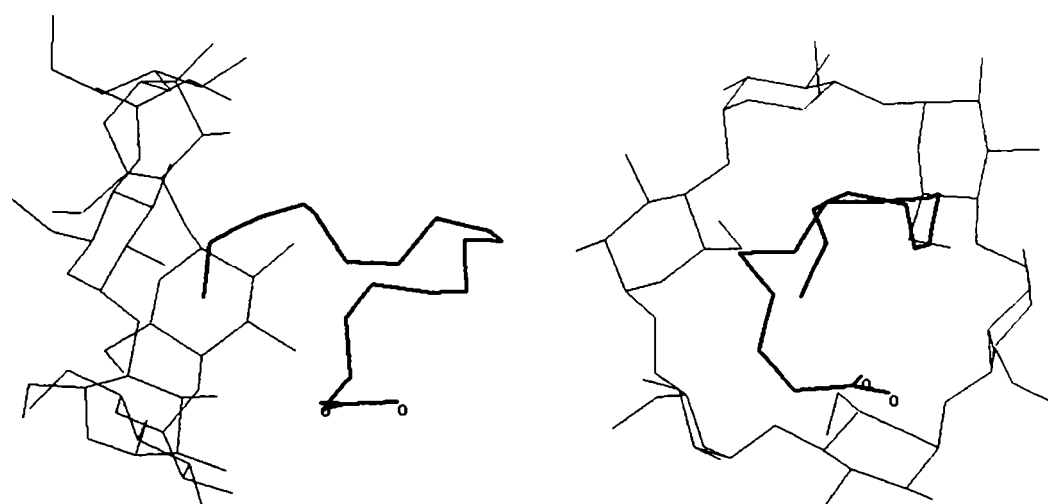


Figura 3.30. Modelarea moleculară MM+ a interacțiunii acid linolenic (bold)/ α -ciclodextrină; reprezentarea complexului după axele OX și OZ (experimentele de docare au fost realizate în absența moleculelor de solvent, utilizând poziții de start ale centrelor de greutate ale moleculelor situate la distanța de 8.4Å, aliniată după axa OZ-axa ce trece prin centrul celor două baze ale “trunchiului de con” ce reprezintă forma generală a ciclodextrinei, interacțiunea având loc dinspre partea hidroxililor secundari)

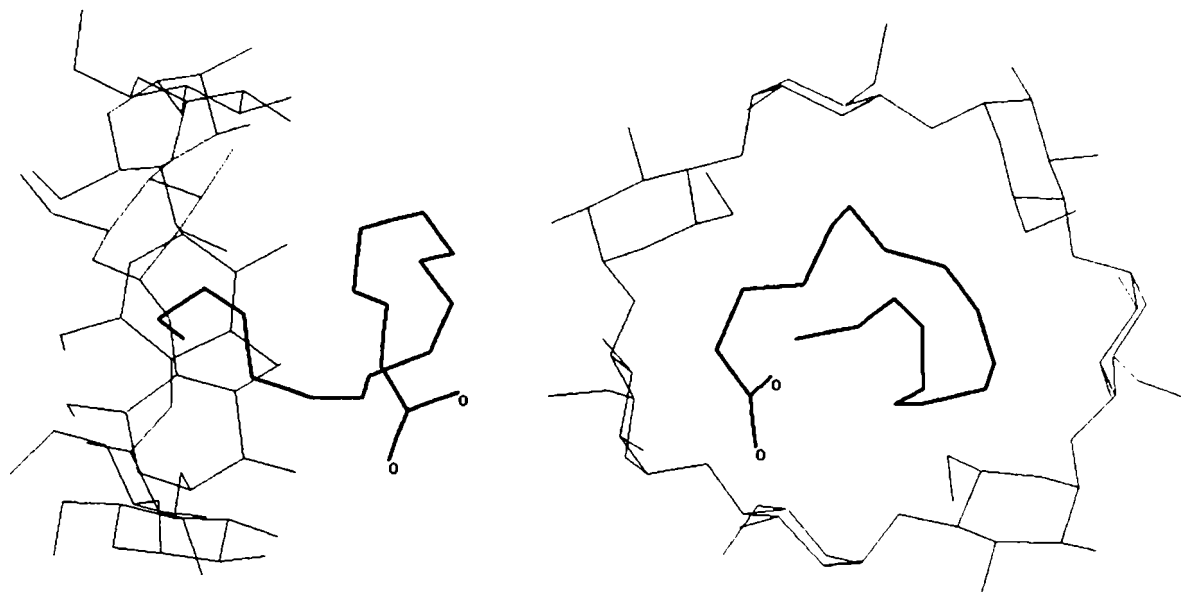


Figura 3.31. Modelarea moleculară MM+ a interacțiunii acid linolenic (bold)/ β -ciclodextrină, reprezentarea complexului după axele OX și OZ (experimentele de docare au fost realizate în absența moleculelor de solvent, utilizând poziții de start ale centrelor de greutate ale moleculelor situate la distanța de 8Å, aliniată după axa OZ-axa ce trece prin centrul celor două baze ale "trunchiului de con" ce reprezintă forma generală a ciclodextrinei, interacțiunea având loc dinspre partea hidroxililor secundari)

Tabel 3.6. Energii potențiale totale pentru acizii grași (acid oleic-OL, acid linoleic-LOL, acid linolenic-LNL), ciclodextrine (α -ciclodextrină- α CD și β -ciclodextrină- β CD), complecși acizi grași ciclodextrine și energii de interacțiune acid gras/ciclodextrină.

Nr.	Complex	E_{CD} (kcal/mol)	$E_{acid\ gras}$ (kcal/mol)	$E_{complex}$ (kcal/mol)	$E_{(acid\ gras+CD)}$ (kcal/mol)	$E_{interacțiune}$ (kcal/mol)
1	α CD-OL	71.49	5.75	59.29	77.24	17.95
2	β CD-OL	82.7	5.75	62.96	88.45	25.49
3	α CD-LOL	71.49	4.8	59.11	76.29	17.18
4	β CD-LOL	82.7	4.8	63.95	87.5	23.55
5	α CD-LNL	71.49	5.58	60.13	77.07	16.94
6	β CD-LNL	82.7	5.58	67.3	88.28	20.98

Datele prezentate în tabelul 3.6 indică faptul că energiile de interacțiune dintre acizii grași și β -ciclodextrină sunt superioare celor corespunzătoare interacțiunii acizilor grași cu α -ciclodextrina, fapt observat și din figurile 3.26-3.31, ce reprezintă *docarea* acizilor grași în aceste matrici oligozaharidice. De asemenea, energiile scad odată cu creșterea numărului de duble legături din moleculele acizilor grași, fapt ce poate fi explicat prin scăderea hidrofobicității moleculelor, exprimată prin logaritmul coeficientului de partiție 1-octanol/apă ($\log P$), care, pentru acizii oleic, linoleic și linolenic au respectiv următoarele valori (calculate cu ajutorul programului QSAR Properties din pachetul de programe HyperChem [219]): 6.14, 5.88, 5.62. Forțând corelările, dependența energiei de interacțiune acid gras/ciclodextrină de $\log P$ este liniară, deși numărul de date experimentale (numărul acizilor grași din setul analizat) este relativ redus pentru o astfel de corelare, dacă se ia în calcul fiecare matrice de încapsulare în parte.

Pentru calculul energiilor de interacțiune reale s-a realizat analiza nanocapsulelor acizi grași/ciclodextrine prin calorimetrie de scanare diferențială (DSC). Deși în ambele cazuri de matrici oligozaharidice se observă existența în complex a unei cantități mai mici de apă de cristalizare, formarea complexului este evidentă prin apariția unui pic endoterm mai aplatizat (dar mai puțin evident în cazul α -ciclodextrinei), situat după eliberarea apei din complex, corespunzător disocierii complexului acid gras/ciclodextrină (figurile 3.32 și 3.33). Calculul energiei de disociere (vezi 3.5.1.10) corespunzătoare acestui pic a condus la rezultatele prezentate în tabelul 3.7. Energiile de disociere molare (kcal/mol) s-au obținut din energiile de disociere specifice (J/g) prin utilizarea maselor moleculare ale ciclodextrinelor pure.

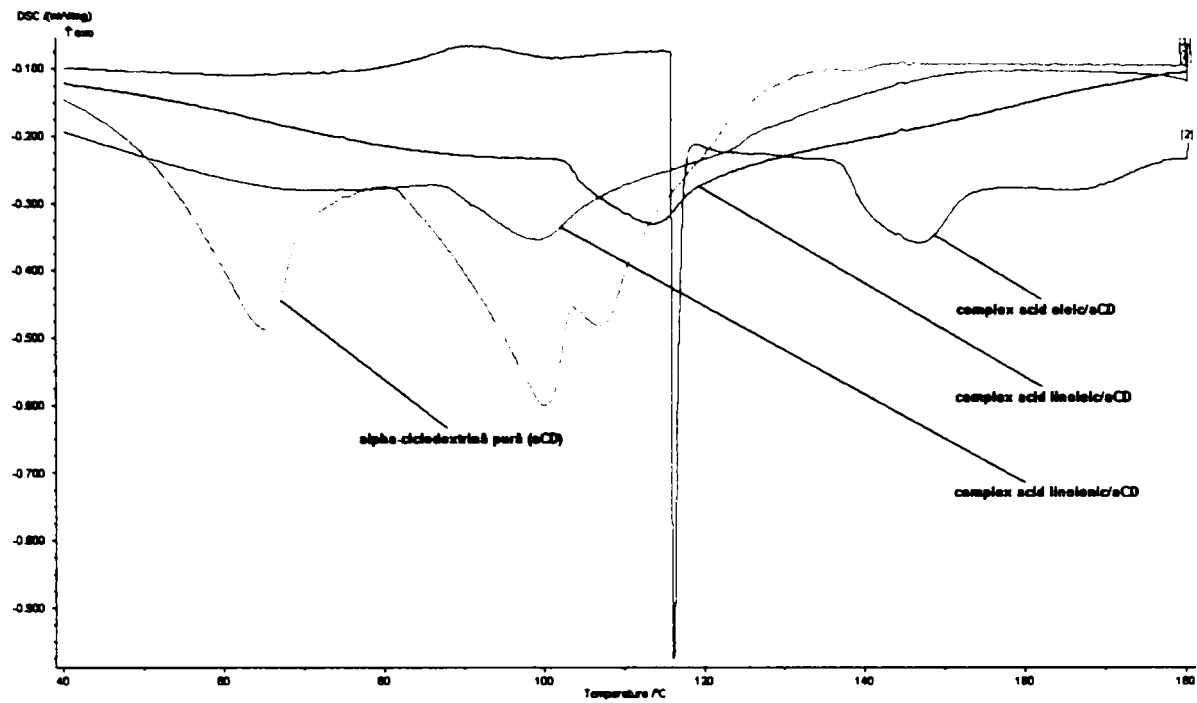


Figura 3.32. Analiza DSC a complexelor acid gras/ α -ciclodextrină.

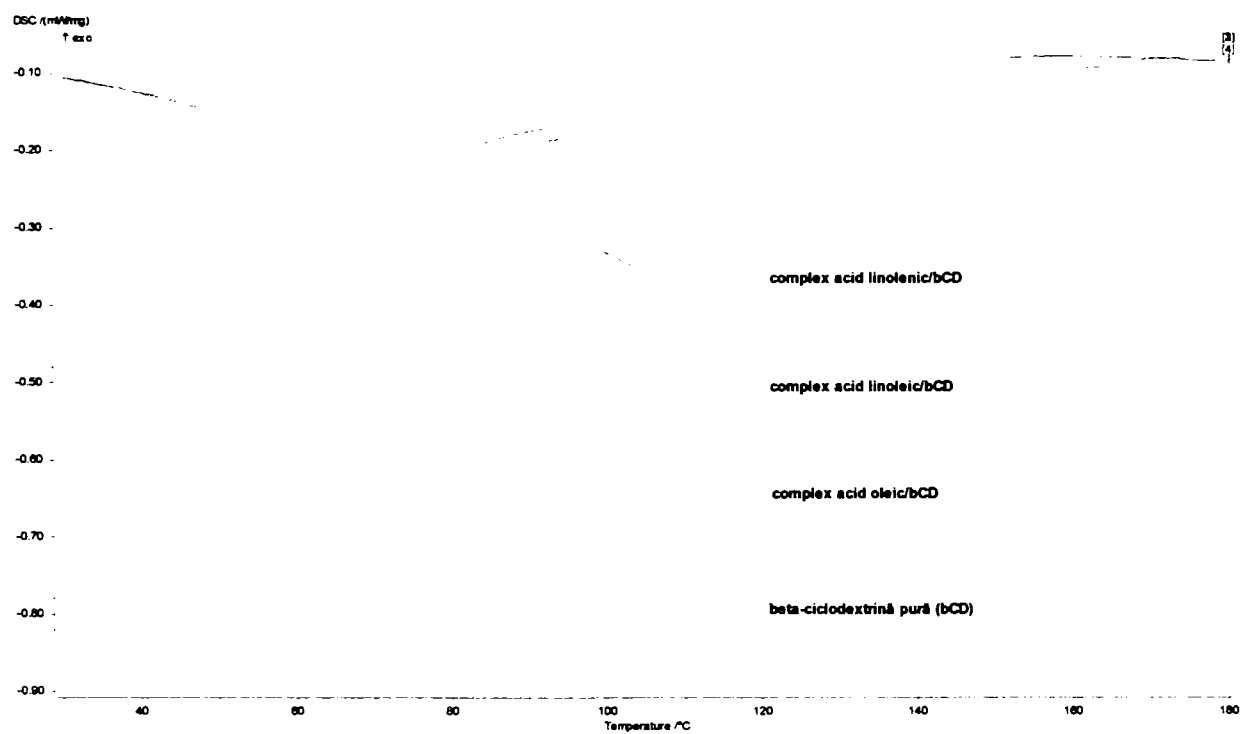


Figura 3.33. Analiza DSC a complexelor acid gras/ β -ciclodextrină.

Tabel 3.7. Energii de disociere ale complexelor acizi grași/ciclodextrine determinate din analizele DSC.

Nr.	Complex	$E_{\text{disociere}} = E_{\text{interacțiune}} \text{ (J/g)}$	$E_{\text{disociere}} = E_{\text{interacțiune}} \text{ (kcal/mol)}$
1	α CD-OL	3.72	0.86
2	β CD-OL	23.29	6.32
3	α CD-LOL	2.08	0.48
4	β CD-LOL	9.19	2.49
5	α CD-LNL	1.21	0.28
6	β CD-LNL	6.77	1.84

Dacă se neglijează energia de interacțiune a ciclodextrinelor cu apa de cristalizare (energia de interacțiune apă de cristalizare/ciclodextrine – energia degajată la formarea cristalelor pure de ciclodextrine – este egală cu energie de disociere apă de cristalizare/ciclodextrine – energia absorbită la ruperea legăturilor dipol-dipol dintre moleculele de apă de cristalizare și grupele hidroxilice ale ciclodextrinelor în momentul formării complexului acid gras/ciclodextrină), se poate considera că energia de disociere acid gras/ciclodextrină este egală cu energia de interacțiune dintre cele două specii moleculare, considerând că interacțiunea se realizează în raport echimolecular (cum de altfel s-a realizat și nanoîncapsularea).

Prin prisma acestei ipoteze se poate încerca o corelare a energiei de interacțiune experimentale (reale) cu energia de interacțiune obținută din experimentele de *docare* (care este o energie absolută ale cărei valori nu au semnificație fizică, ci doar permit efectuarea comparațiilor privind stabilitatea conformațională sau mărimea relativă – tăria – interacțiunilor). Corelarea datelor teoretice (tabelul 3.6) cu cele experimentale (tabel 3.7) a condus la o ecuație de corelare semnificativă din punct de vedere statistic, cu un coeficient de corelare de 0.915 (figura 3.34).

$$E_{\text{int}(\text{teoretic})} = 17.368(\pm 0.933) + 1.457(\pm 0.321) \cdot E_{\text{int}(\text{experimental})}$$

$$n = 6; r = 0.915; s = 1.62; F = 20.54$$

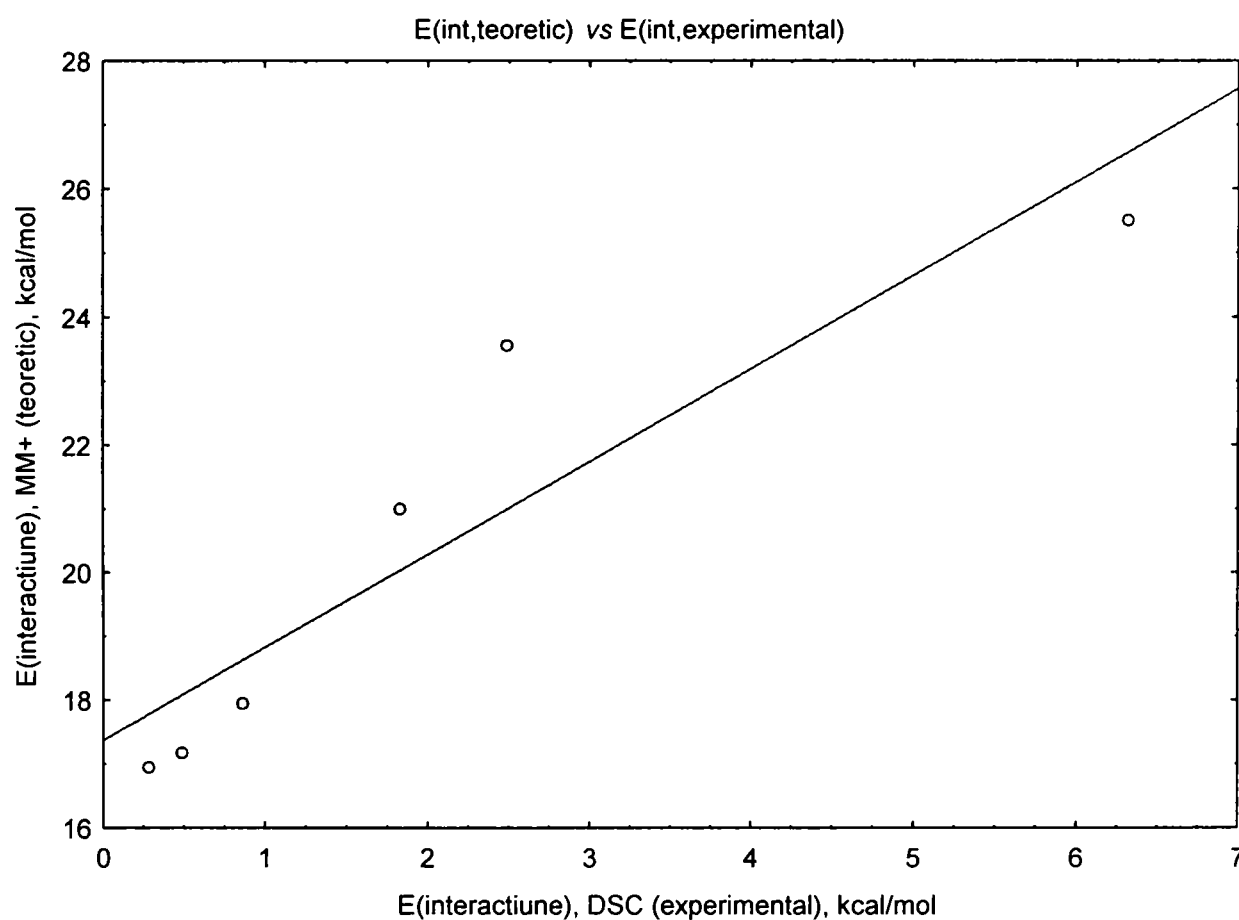


Figura 3.34. Corelarea energiei de interacțiune teoretice (obținută din calcule de *docare* MM+) cu energia de interacțiune experimentală (obținută din analiza DSC) pentru cazul nanocapsulelor acizi grași/ciclodextrine.

3.2.5. Concluzii parțiale

În urma studiilor efectuate privind nanoîncapsularea acizilor oleic, linoleic și linolenic în α - și β -ciclodextrină și degradarea termică a acestora se pot trasa următoarele concluzii parțiale:

1. S-au obținut **șase nanocapsule acizi grași/ciclodextrine**, neîntâlnite în literatura de specialitate, cu randamente cuprinse între 60% și 91%, cele mai mari fiind observate în cazul utilizării α -ciclodextrinei ca matrice de încapsulare. Ca regulă generală, randamentele de obținere a nanocapsulelor cu α CD au fost întotdeauna superioare față de cele de obținere a nanocapsulelor cu β CD, acestea crescând în primul caz (de la 72.6% pentru acid oleic la 91% pentru acid linolenic) și scăzând în cel de-al doilea odată (de la 72.1% pentru acid oleic la 59.2% pentru acidul linolenic) cu creșterea numărului de duble legături din moleculele acizilor grași.
2. S-au efectuat studii de **degradare termică** a acizilor grași nesaturați (oleic, linoleic și linolenic) neîncapsulați și încapsulați în α - sau β -ciclodextrină. Probele neîncapsulate degradate la 50, 100 și 150°C (în prezența aerului) au indicat o degradare relativ avansată, în special la temperaturi de peste 100°C, când concentrația de acid gras a scăzut de la 99% la 82% în cazul acidului oleic, de la 98% la 55% în cazul acidului linoleic și sub 70% în cazul acidului linolenic la peste 50°C.
3. **Principalii compuși de degradare** identificați au fost malondialdehida și aldehidele C₆-C₁₀, unii acizi mono- și dicarboxilici inferiori, acizi ω -oxocarboxilici, acizi epoxi- și dihidroxicarboxilici, izomeri geometrici ai acizilor grași studiați, iar în cazul acidului linolenic s-a observat formarea unei cantități apreciabile de polimeri.
4. **Analiza probelor de acizi grași rezultate la extracție repetată din complecși** (decomplexare) a indicat o concentrație de peste 99% în cazul acizilor oleic și linoleic și de peste 90% în cazul acidului linolenic. O foarte bună capacitate de protecție la degradare a fost observată în cazul nanocapsulelor acidului oleic/ α -ciclodextrină, în care concentrația de acid oleic a fost peste 97% la orice valoare a temperaturii de degradare, în timp ce complexul cu β -ciclodextrină a permis o degradare ușor mai avansată (92.5-96.5% acid oleic în extract).
5. **Acizii linoleic și linolenic au fost protejați mai slab** de matricile ciclodextrinice, fapt relevat de prezența în concentrații mai mari a compușilor de degradare, comparativ cu cazul acidului oleic. Concentrația acestor acizi în extractul din complecși a fost mai ridicată în comparație cu cazul acizilor neîncapsulați și degradați termic.
6. S-a realizat **modelarea moleculară** a interacțiunii acizilor grași studiați cu α - și β -ciclodextrina în absența moleculelor de solvent, determinându-se energia teoretică de interacțiune, care a fost corelată cu energie de interacțiune evaluată experimental din analizele calorimetrice ale complecșilor (DSC), considerându-se că energie consumată la disocierea moleculelor de apă interioare ciclodextrinei este compensată de energia degajată la formarea legăturilor dintre aceste molecule de apă cu moleculele de apă din masa solventului. S-a obținut o corelare foarte bună ($r = 0.915$) care confirmă faptul că picul endoterm observat în analiza DSC este corespunzător disocierii complexului.

3.3. NANOCAPSULE ULEIURI VOLATILE/ β -CICLODEXTRINĂ (REZULTATE ȘI DISCUȚII)

3.3.1. Nanocapsule uleiuri volatile de plante din clasa Dicotyledonatae/ β -ciclodextrină

Din clasa botanică Dicotyledonatae s-au utilizat drept biosisteme pentru nanoîncapsularea în β -ciclodextrină 18 uleiuri volatile: **patru** uleiuri volatile de plante din familia **Apiaceae** (chimen-*Carum carvi* L., coriandru-*Coriandrum sativum* L., fenicol-*Foeniculum vulgare* și mărar-*Anethum graveolens* L.), **șapte** uleiuri volatile de plante din familia **Lamiaceae** (busuioc-*Ocimum basilicum* L., cimbru-*Thymus vulgaris* L., lavandă-*Lavandula augustifolia*, măghiran-*Majorana hortensis*, mentă-*Mentha piperita* L., mentă creastă-*Mentha spicata* L. și salvie-*Salvia officinalis* L.), **trei** uleiuri volatile de plante din familia **Rutaceae** (bergamot-*Citrus aurantium sp. bergamia*, lămâie-*Citrus lemon* L. și portocale-*Citrus aurantium sp. sinensis* L), **două** uleiuri volatile de plante din familia **Myrtaceae** (cuișoare-*Eugenia caryophyllata* și eucalipt-*Eucalyptus globulus*) și **câte un ulei volatil** de plante din familiile **Lauraceae** și, respectiv, **Rosaceae** (scorțișoară-*Cinnamomum casia* L. și, respectiv, trandafir-*Rosa damascena* L.). Pentru încapsulare s-a utilizat metoda în soluție etanol-apă, complexii obținuți după cristalizare, filtrare, spălare și uscare fiind analizați prin termogravimetrie (TG). Compoziția uleiurilor volatile utilizate, atât în cazul celor proaspete cât și în cazul celor recuperate din complexi prin reextracții succesive în hexan, a fost determinată prin gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS), compușii separați prin GC fiind identificați pe baza spectrelor MS prin comparație cu spectrele compușilor etalon din baza de date NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library 2.0 (2002), respectiv pe baza indicilor Kovats determinați pentru compușii etalon disponibili.

3.3.1.1. Familia Apiaceae

Încapsularea uleiurilor volatile din plante din familia Apiaceae (chimen, coriandru, fenicol și mărar) s-a realizat cu randamente bune, în special în cazul uleiurilor volatile de chimen și de coriandru (76%), complexii cu ulei volatil de fenicol și de mărar fiind obținuți cu randamente de 56.8% și, respectiv, 63.4%. Procentul de ulei volatil încapsulat a fost determinat prin termogravimetrie, acesta situându-se între 7.6% (ulei volatil de coriandru) și 9% (ulei volatil de fenicol). În cazul β -ciclodextrinei pure acest procent a fost de 14.05%, corespunzător pentru cristalizarea oligozaharidei cu 10.5 molecule de apă (figura 3.35). Numărul de molecule de apă de cristalizare în cazul β -ciclodextrinei a fost calculat cu relația simplă:

$$n_{H_2O} = \frac{M_{CD} \cdot c}{M_{H_2O} \cdot (100 - c)} = 10.5$$

unde M_{CD} =1135 g/mol este masa molară a β -ciclodextrinei, c =14.06% reprezintă procentul de pierdere de masă din analiza termogravimetrică (până la 200°C), $(100-c)$ =85.94% reprezintă procentul de masă rămasă după pierderea apei (identificat ca β -ciclodextrina), iar M_{H_2O} =18 g/mol reprezintă masa molară a apei.

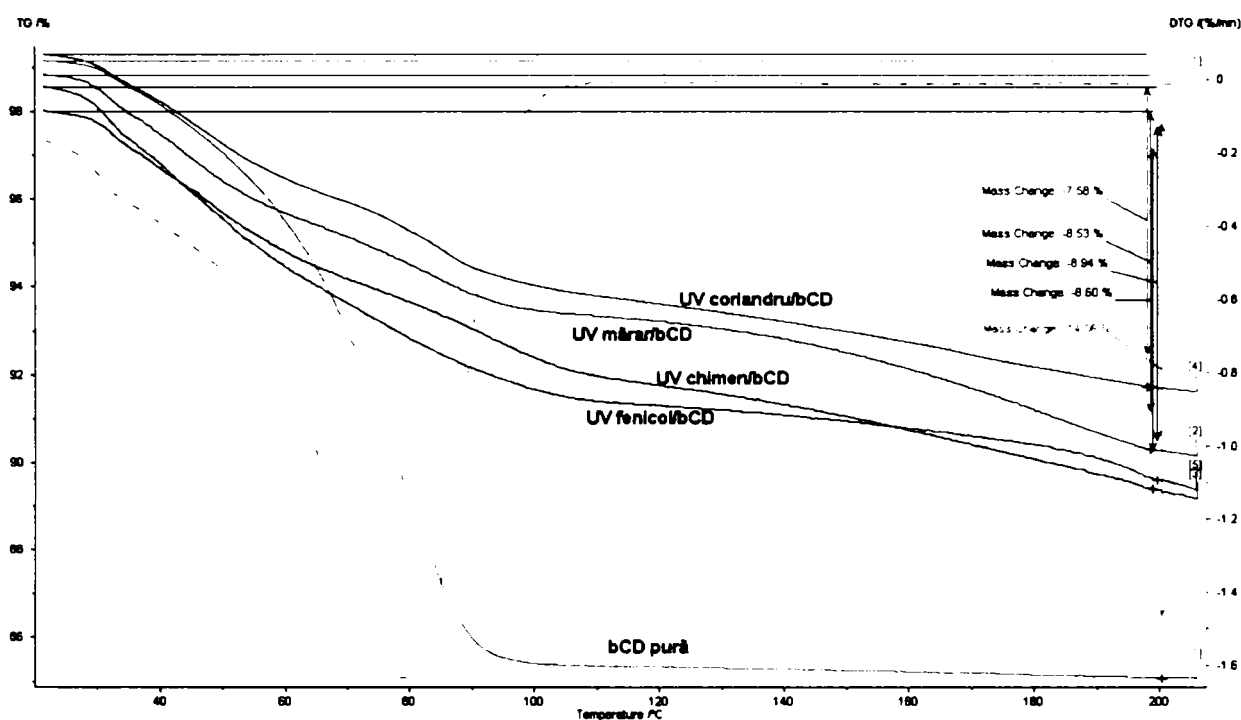


Figura 3.35. Analiza TG-DTG a complexilor β -ciclodextrinei cu uleiuri volatile din plante din familia Apiaceae.

Componentele principale din uleiurile volatile obținute din plantele familiei Apiaceae au fost **compuși oxigenați** și anume carvonă, linaloolul și anetolul.

Uleiul volatil de chimen a prezentat un număr de 173 de compuși (număr determinat din cromatograma GC prin contorizarea tuturor picurilor integrabile) cuantificați prin metoda ariilor din gaz cromatograma rezultată din analiza GC-MS (figura 3.36); acesta a prezentat o concentrație maximă în **carvonă** de 47.26% și în **limonen** de 28.39% (cei mai concentrați compuși sunt prezentați în tabelul 3.8), componentele fiind identificate pe baza spectrelor MS experimentale din analiza GC-MS, prin comparație cu spectrele componentelor etalon din baza de date NIST (figurile 3.37 și 3.38). Compușii minori importanți au fost pinenii, carveolul și câteva sesquiterpene (β -elemen, β -cubeben, β -bourbonen, γ -cadinen).

Analiza concentrațiilor relative ale componentelor recuperate din complexul cu β -ciclodextrină prin extracții repetate în hexan, au relevat faptul că limonenul, o monoterpenă (hidrocarbură hidrofobă) s-a încapsulat în concentrație relativă aproape dublă față de carvonă, la care raportul dintre concentrațiile după și înainte de încapsulare a fost subunitar (0.8). Diferențele pot fi observate calitativ și din suprapunerea cromatogramelor corespunzătoare (figura 3.39).

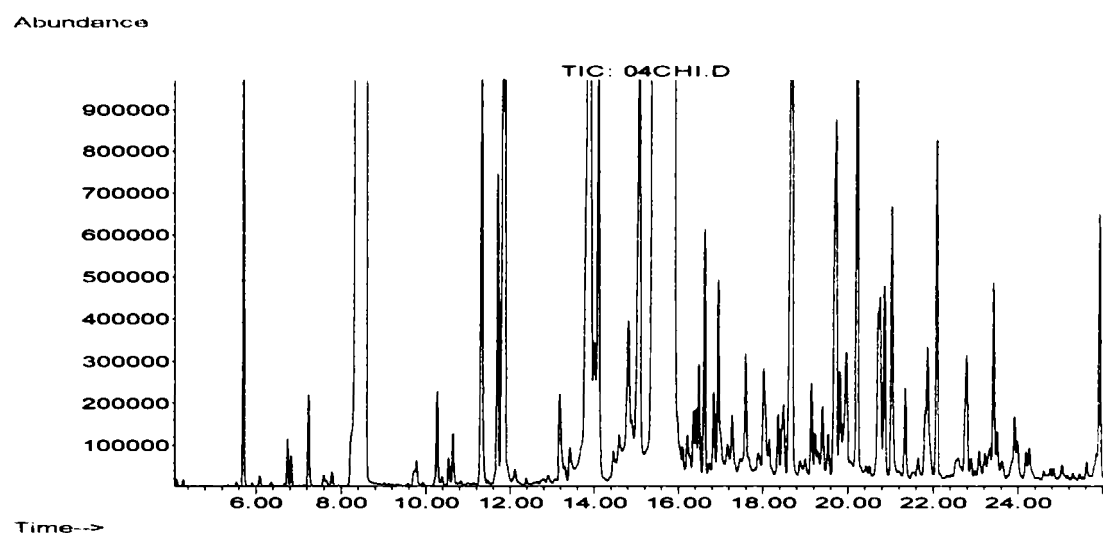


Figura 3.36. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de chimen.

Tabel 3.8. Compoziția uleiului volatil de chimen și compoziția relativă a principalilor componenți încapsulați.

Nr.	Identificare MS	Indice Kovats (KI)	Conc. UV proaspăt (%)	Conc. UV recuperat (%)	C _{UV proaspăt} / C _{UV recuperat}
1	alpha-Pinene	936	0.55	0.41	0.75
2	(-)-beta-Pinene	993	0.15	0.09	0.58
3	Limonene	1038	28.39	54.69	1.93
4	alpha,p-Dimethylstyrene	1091	0.17	0.09	0.50
5	trans-p-Mentha-2,8-dienol	1123	0.87	0.09	0.10
6	2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-, trans-	1138	0.80	0.32	0.40
7	Dihydrocarvone	1206	0.91	0.24	0.27
8	Diacetin	1215	0.004	0.09	
9	cis-Carveol	1221	0.07	0.19	2.88
10	Dihydrocarveol	1228	0.30	0.24	0.82
11	cis-Carveol	1236	1.28	0.11	0.09
12	Carvone	1261	47.26	37.84	0.80
13	Carvone oxide, cis-	1282	0.41	0.10	0.24
14	Epiglobulol	1286	0.02	0.08	3.32
15	Bicyclo[3.1.1]hept-2-en-4-ol, 2,6,6-trimethyl-, acetate	1289	0.15	0.12	0.84
16	Lavamenthe	1379	1.02	0.09	0.09
17	beta-Bourbonene	1386	0.27	0.10	0.36
18	beta-Elementen	1394	1.07	0.54	0.51
19	beta-Cubebene	1420	0.52	0.24	0.47
20	beta-Cubebene	1430	0.18	0.08	0.42
21	gamma-Cadinene	1454	0.61	0.35	0.57
22	gamma-Murolene	1478	0.31	0.09	0.30

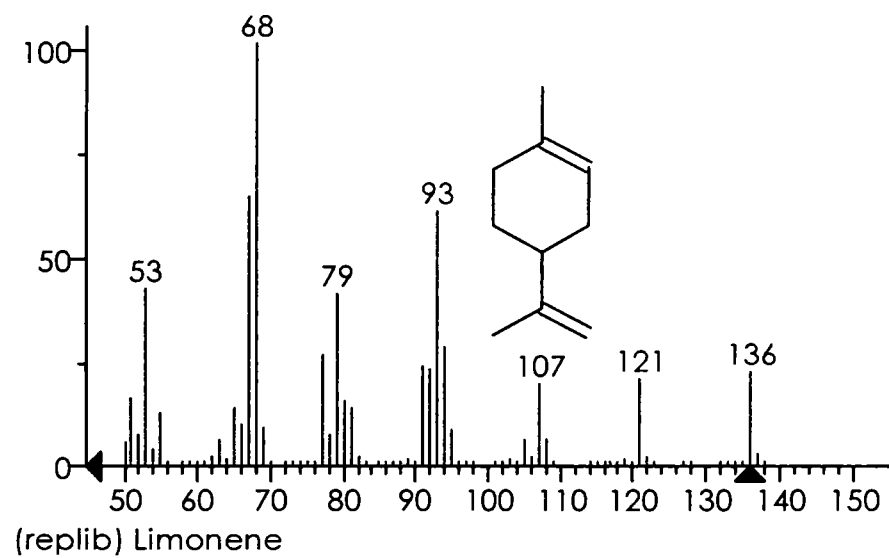
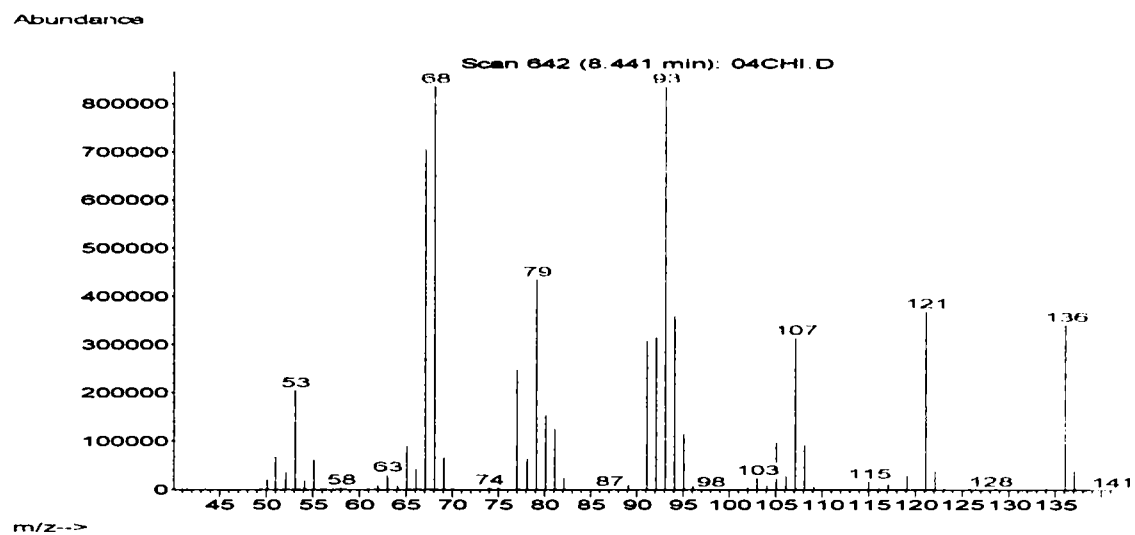


Figura 3.37. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru limonen.

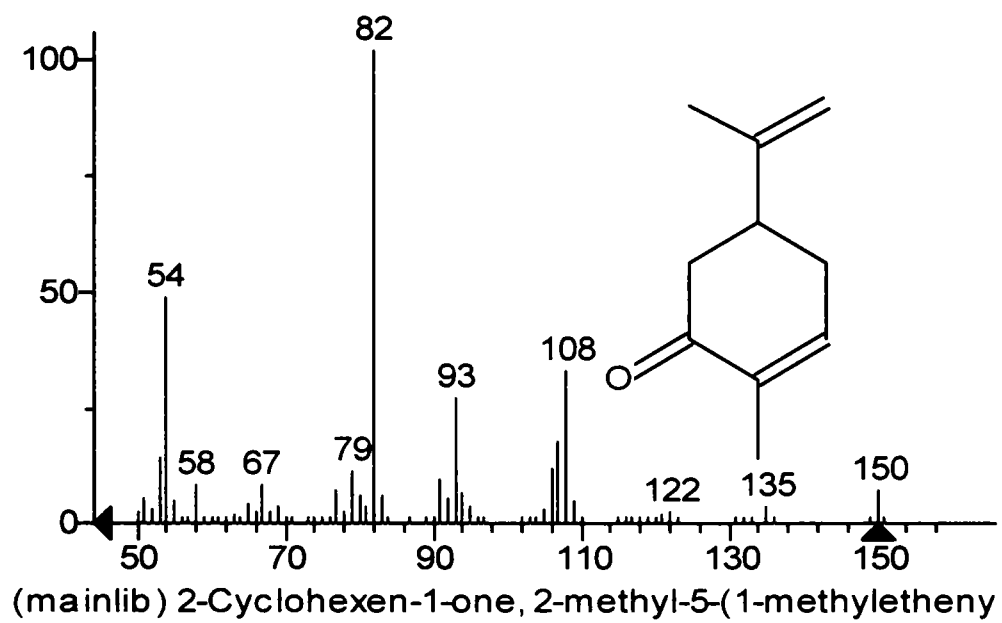
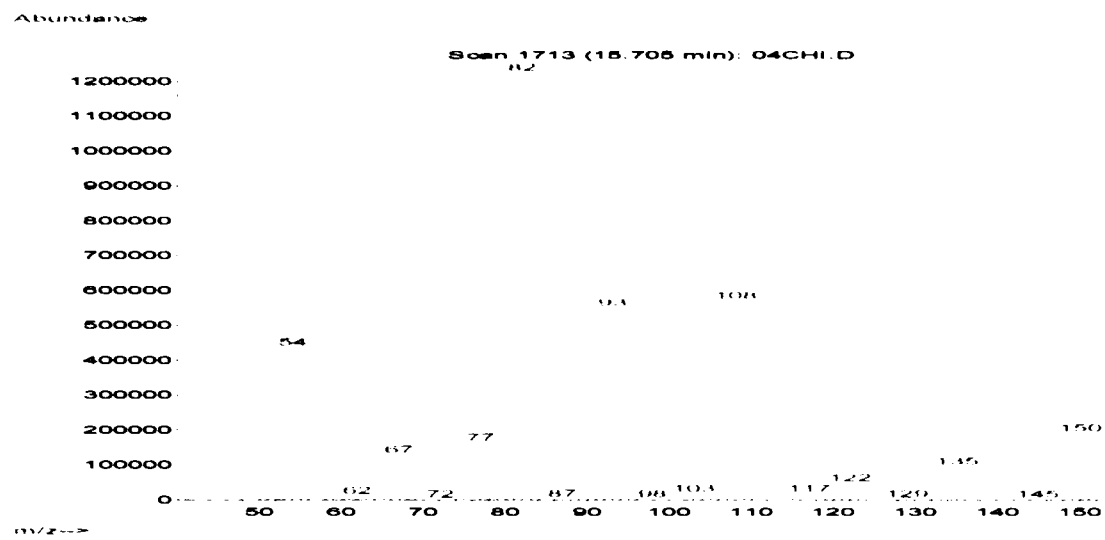


Figura 3.38. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru carvonă.

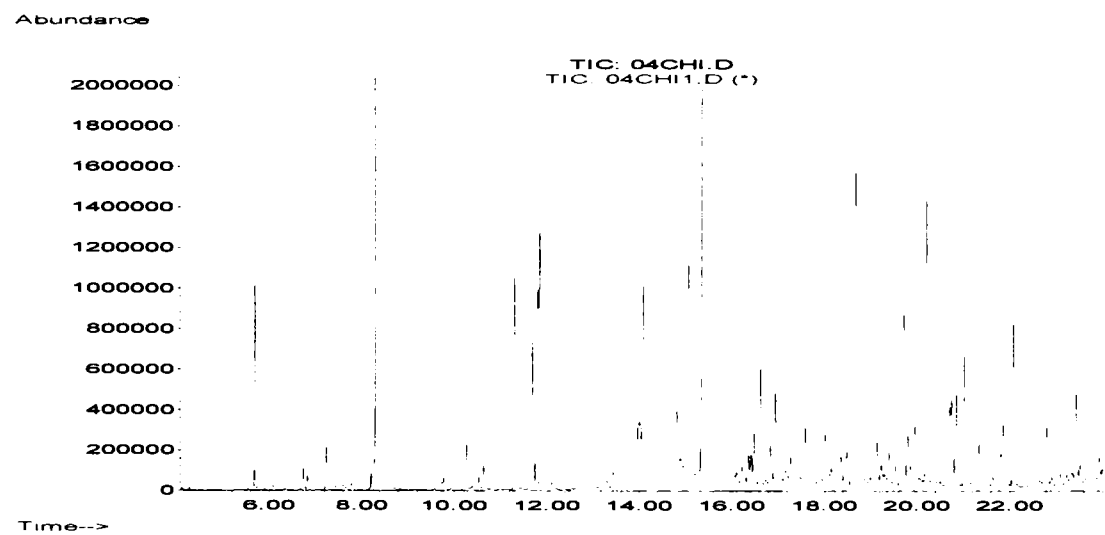


Figura 3.39. Suprapunerea cromatogramelor GC pentru uleiul volatil de chimen proaspăt (negru) și recuperat din complex (verde).

În cazul **uleiului volatil de coriandru**, componenții separați și identificați prin analiză GC-MS (figura 3.40) au fost în număr de 151, dintre care cei mai importanți sunt indicați în tabelul 3.9. Cel mai concentrat a fost **linaloolul** (40.73%; figura 3.41), urmat de cimen, camfor, limonen și α -pinen. Linaloolul a fost încapsulat în concentrație relativă superioară (raport de 1.6), în timp ce unele monoterpene (α -pinen, limonen) au prezentat rapoarte apropiate de unitate. Alcoolii (cu excepția linaloolului) au fost încapsulați în concentrații mult mai scăzute (tabel 3.9 și figura 3.42).

Tabel 3.9. Compoziția uleiului volatil de coriandru și compoziția relativă a principalilor componenți încapsulați.

Nr.	Identificare MS	Indice Kovats (KI)	Conc. UV proaspăt (%)	Conc. UV recuperat (%)	$C_{UV\text{ proaspăt}} / C_{UV\text{ recuperat}}$
1	alpha-Pinene	938	5.02	5.04	1.00
2	Camphene	951	0.90	0.54	0.59
3	beta-Pinene	994	2.19	1.08	0.49
4	Cymene	1030	9.25	7.22	0.78
5	Limonene	1034	6.42	5.60	0.87
6	trans-beta-Ocimene	1041	0.84	0.34	0.41
7	cis-beta-Ocimene	1052	1.76	0.79	0.45
8	gamma-Terpinen	1062	3.00	1.83	0.61
9	Linalool oxide	1076	2.80	0.19	0.07
10	Isopulegol	1088	0.02	0.88	
11	Linalool	1122	40.73	65.29	1.60
12	Camphor	1153	6.48	4.77	0.74
13	alpha-Terpineol	1196	1.17	0.38	0.32
14	Carvone	1248	2.14	0.76	0.35
15	Nerol	1260	1.87	0.41	0.22
16	Anisole, p-propenyl-	1290	2.30	0.27	0.12
17	Geranyl acetate	1388	2.46	0.77	0.31

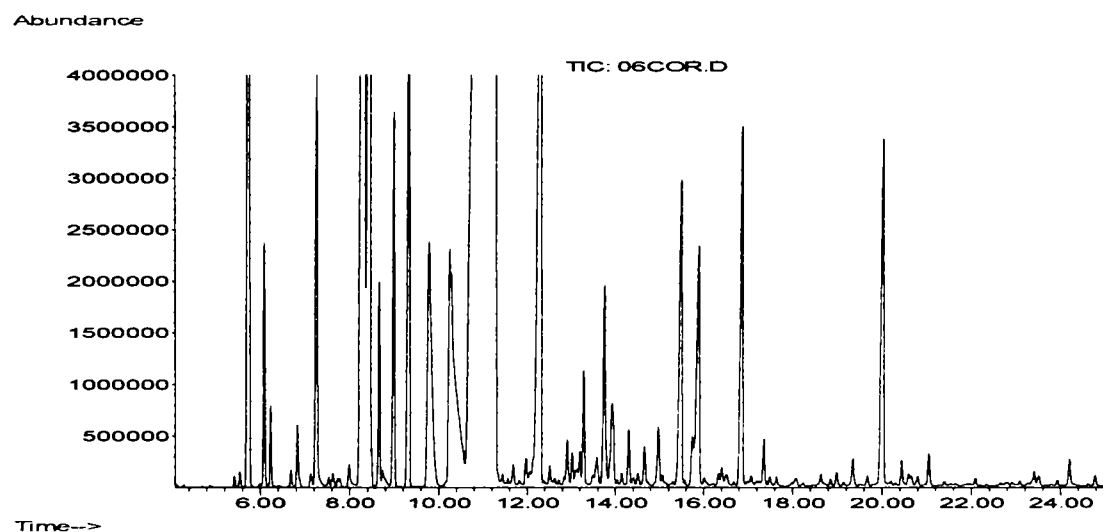


Figura 3.40. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de coriandru.

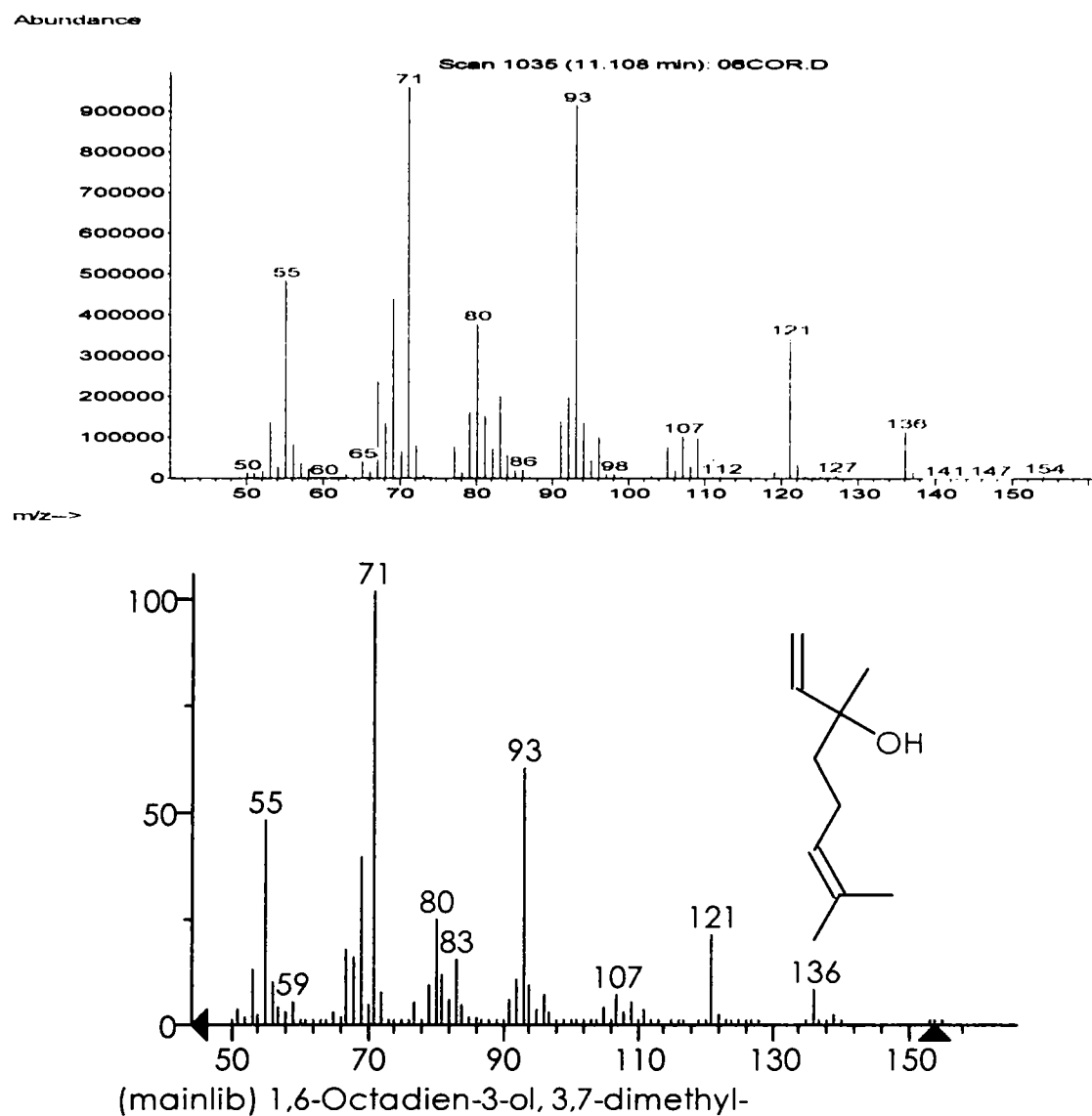


Figura 3.41. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru linalool.

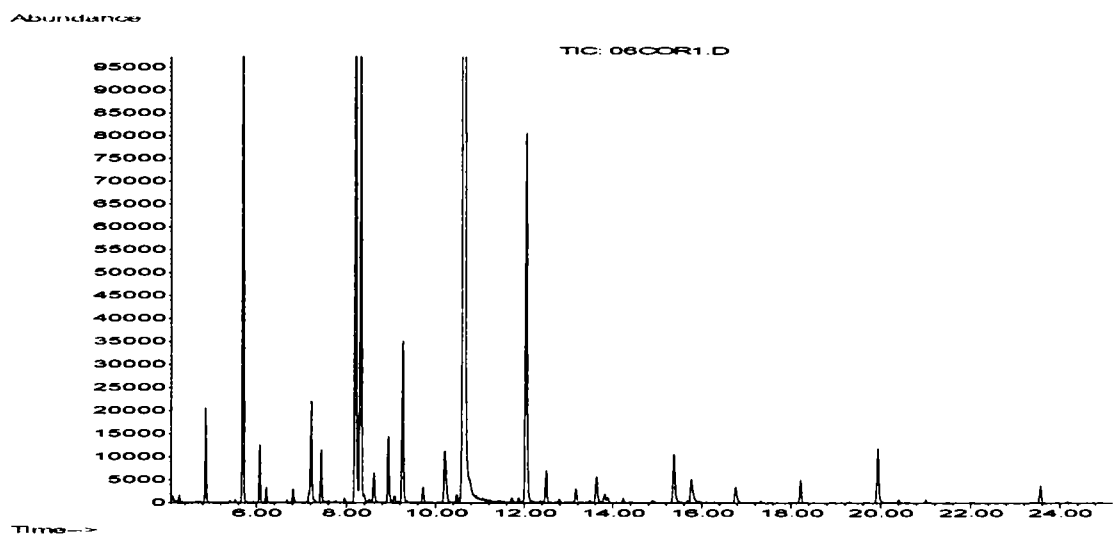


Figura 3.42. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de coriandru recuperat din complexul cu β -ciclodextrină.

Uleiul volatil de fenicol a prezentat trei compuși majoritari (**anetol**, **anisaldehydă** și o **anisaldehydă** substituită, tabel 3.10) din cei 116 separați (figura 3.43), iar **uleiul volatil de mărar** doi (**limonen** și **carvonă**, tabel 3.11) dintr-un total de 126 de compuși (figura 3.44).

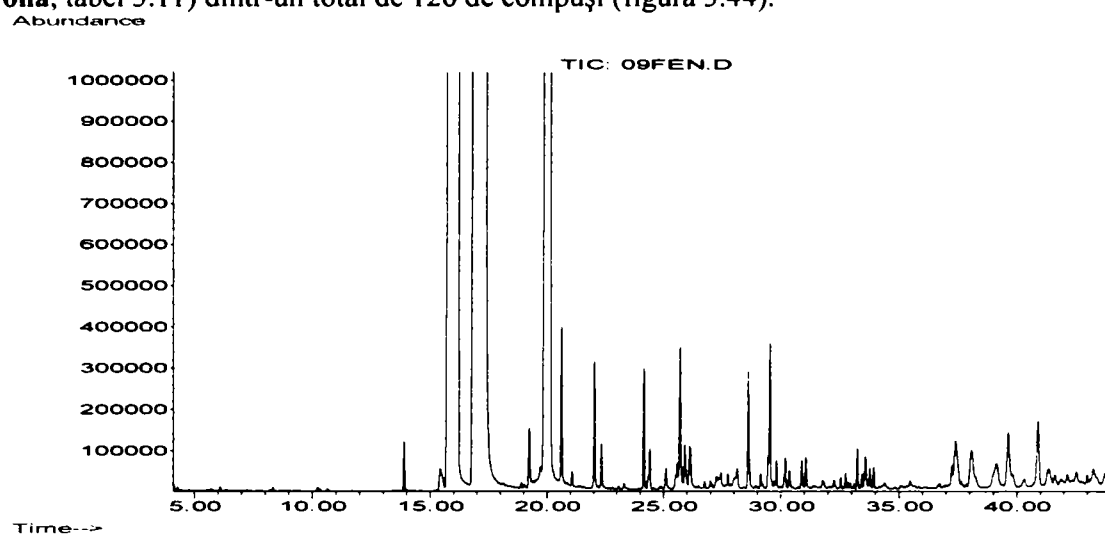


Figura 3.43. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de fenicol.

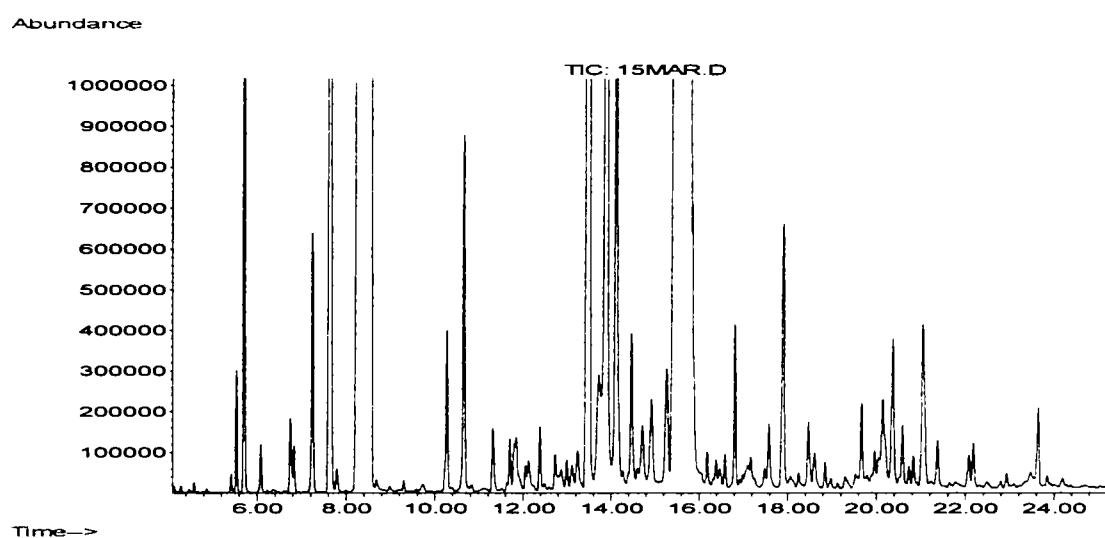


Figura 3.44. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de mărar.

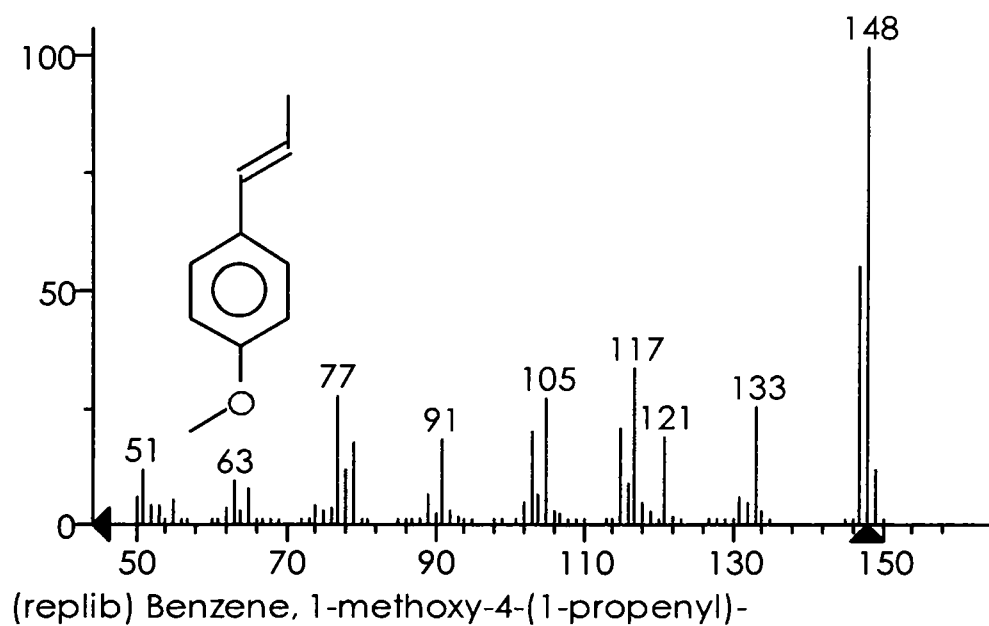
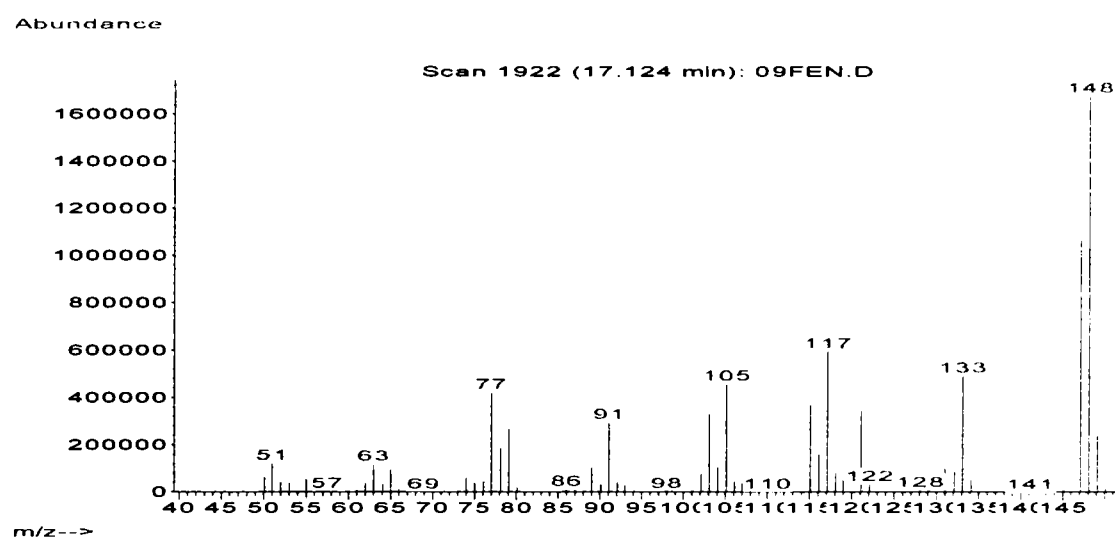
În toate cazurile componenții majoritari au fost încapsulați în concentrații relative superioare comparativ cu cele din uleiul proaspăt, rapoartele dintre aceste concentrații în uleiul recuperat și în cel proaspăt fiind de 1.37 pentru anetol și de 1.01 pentru carvonă. Pentru anetol sunt prezentate în figura 3.45 spectrele de masă experimental și din baza de date pentru compusul etalon, iar în figurile 3.46 și 3.47 sunt prezentate gaz cromatogramele din analiza GC-MS a uleiurilor volatile de fenicol și mărar recuperate din complexi.

Tabel 3.10. Compoziția uleiului volatil de fenicol și compoziția relativă a principalilor componenți încapsulați.

Nr.	Identificare MS	Indice Kovats (KI)	Conc. UV proaspăt (%)	Conc. UV recuperat (%)	$\frac{C_{UV\ proaspăt}}{C_{UV\ recuperat}}$
1	Limonene	1030	0.01	0.26	
2	Anisaldehyde	1269	8.82	9.77	1.11
3	Anethol	1305	60.36	82.83	1.37
4	2,3-Dimethyl- <i>p</i> -anisaldehyde	1390	14.03	0.57	0.04
5	Benzenemethanol, alpha-ethyl-4-methoxy-	1523	0.18	0.10	0.53

Tabel 3.11. Compoziția uleiului volatil de măr și compoziția relativă a principalilor componenți încapsulați.

Nr.	Identificare MS	Indice Kovats (KI)	Conc. UV proaspăt (%)	Conc. UV recuperat (%)	$\frac{C_{UV\text{ proaspăt}}}{C_{UV\text{ recuperat}}}$
1	alpha-Pinene	936	1.37	0.85	0.62
2	beta-Pinene	978	0.07	0.21	2.83
3	alpha-Phellandrene	1007	4.59	3.50	0.76
4	Limonene	1038	34.25	41.16	1.20
5	alpha,p-Dimethylstyrene	1091	0.31	0.11	0.36
6	Linalool	1103	0.71	0.33	0.47
7	3,6-Dimethyl-2,3,3a,4,5,7a-hexahydrobenzofuran	1188	6.32	2.87	0.45
8	alpha-Terpieol	1195	0.42	0.19	0.45
9	Dihydrocarvone	1201	3.92	2.52	0.64
10	Dihydrocarvone (isomer)	1207	1.84	0.65	0.36
11	4-Acetyl-m-xylene	1217	0.35	0.16	0.45
12	(+)-Carvone	1258	37.98	38.31	1.01
13	Acetic acid, 1,7,7-trimethyl-bicyclo[2.2.1]hept-2-yl ester	1288	0.29	0.17	0.58

**Figura 3.45.** Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru anetol.

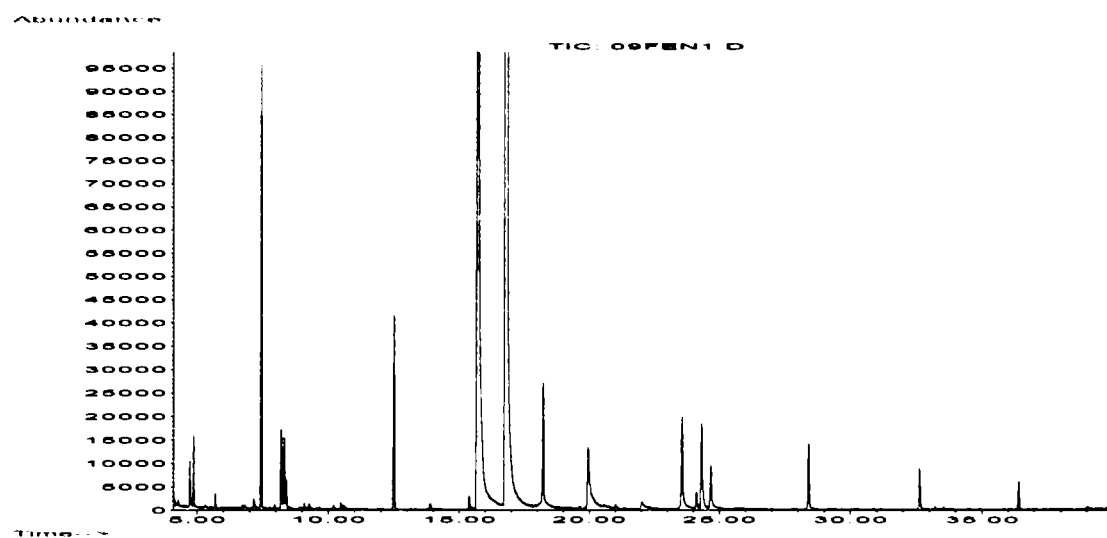


Figura 3.46. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de fenicol recuperat din complexul cu β -ciclodextrina.

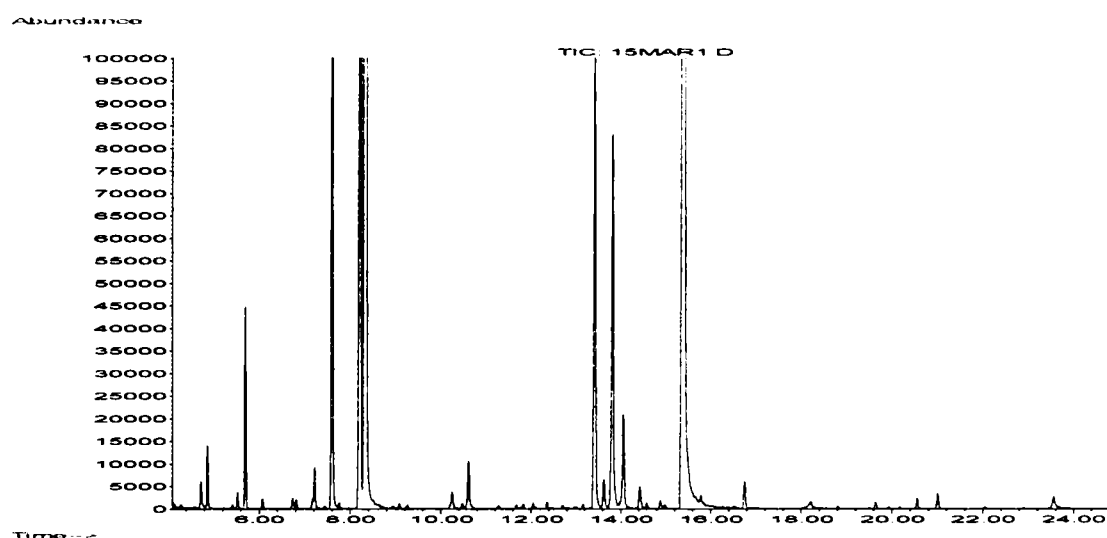


Figura 3.47. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de mărar recuperat din complexul cu β -ciclodextrina.

3.3.1.2. Familia Lamiaceae

Plantele din familia Lamiaceae (busuioc, cimbru, lavandă, măghiran, mentă, mentă creată și salvie) au avut drept **componenti majoritari compuși fenolici, alcooli, cetone sau esteri terpenici**. Cele mai bune randamente de obținere a complexelor ulei volatil/ β -ciclodextrină s-au obținut în cazul cimbrului și lavandei (80.7% și, respectiv, 80.4%). Cu randamente bune s-au obținut și complexul cu ulei volatil de salvie; complexii cu ulei volatil de măghiran, mentă și mentă creată s-au obținut cu randamente moderate, apropiate de 65% (65.96%, 64.69% și, respectiv, 63.95%). În urma analizei TG a complexelor ulei volatil/ β -ciclodextrină s-au putut determina procentele de ulei volatil încapsulat astfel: 9.12% ulei volatil de busuioc, 8.01% ulei volatil de cimbru, 7.89% ulei volatil de lavandă, 7.22% ulei volatil de măghiran, 6.57% ulei volatil de mentă, 8.07% ulei volatil de mentă creată și 8.74% ulei volatil de salvie (figura 3.48).

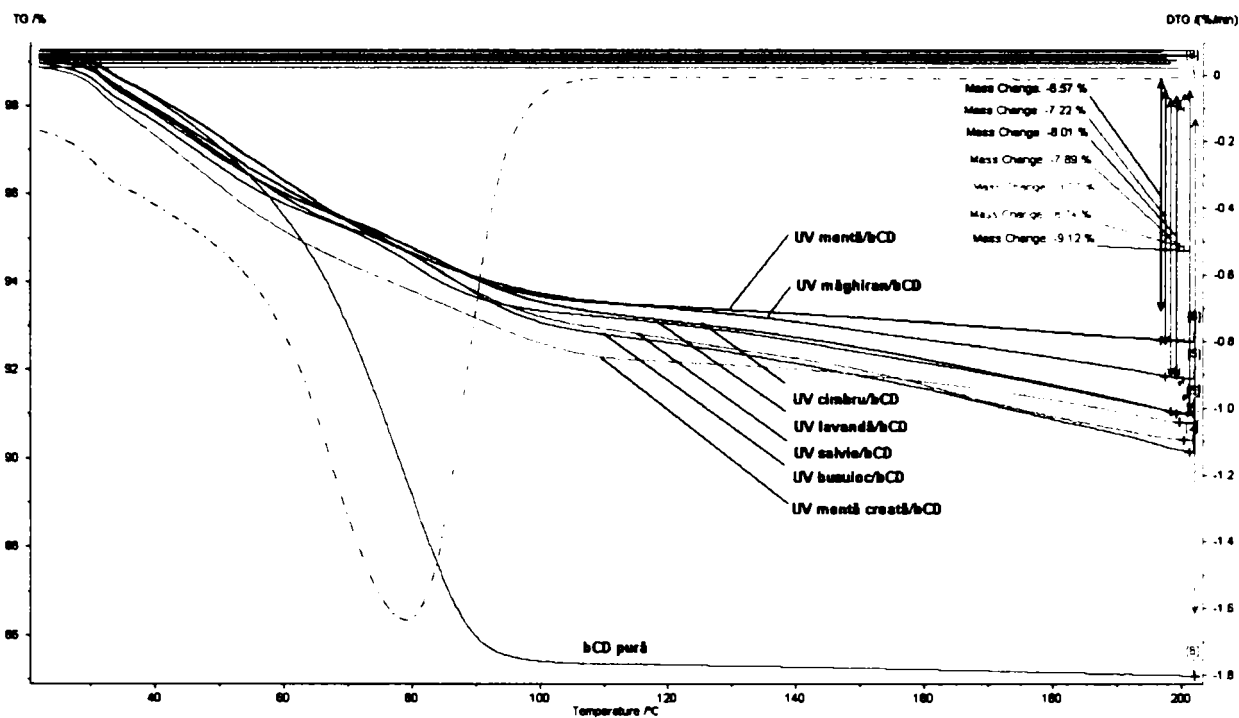


Figura 3.48. Analiza TG-DTG a complexelor β -ciclodextrinei cu uleiuri volatile din plante din familia Lamiaceae.

Analiza GC-MS a uleiului volatil de busuioc a permis integrarea a 140 de compuși (figura 3.49), dintre care majoritar a fost metil-cavicolul (66.05%) (figura 3.50), urmat de eucaliptol, metileugenol și linalool. Sesquiterpena cea mai concentrată a fost β -bergamotenul (5.7%), majoritatea celorlalți compuși găsindu-se la valori sub 1% (tabel 3.12). Compusul majoritar a fost încapsulat la o concentrație relativă puțin mai mare decât în uleiul inițial, în timp ce majoritatea sesquiterpenelor au prezentat un raport subunitar al raportului acestor concentrații. În figura 3.51 este prezentată gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de busuioc recuperat din complexul cu β -ciclodextrină.

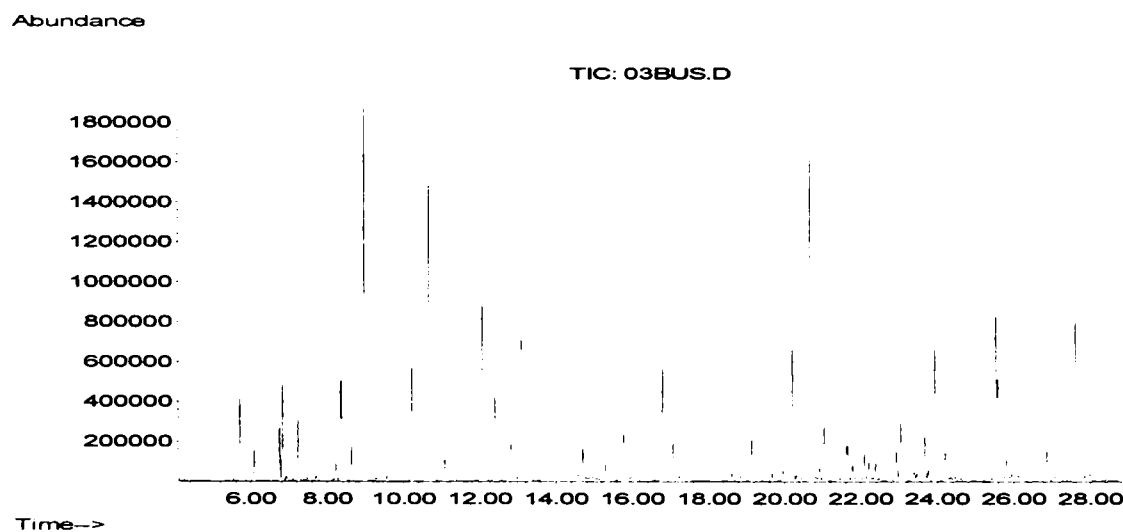


Figura 3.49. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de busuioc.

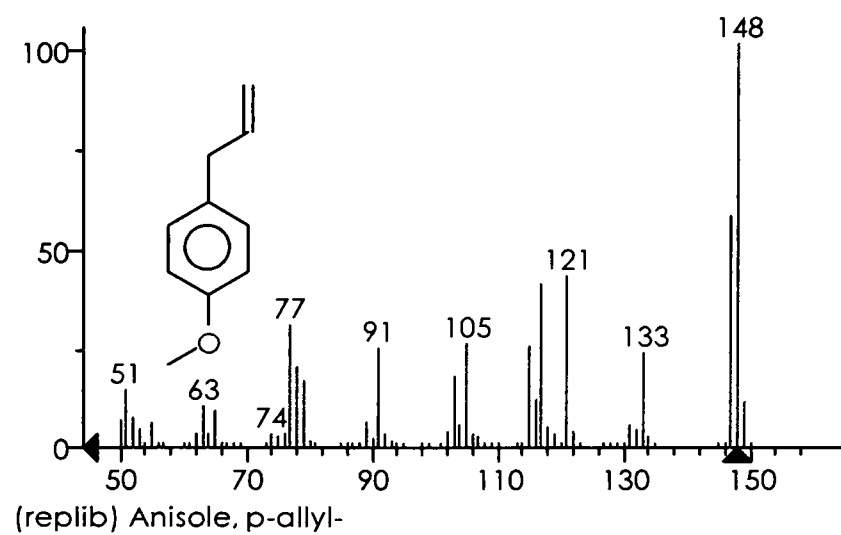
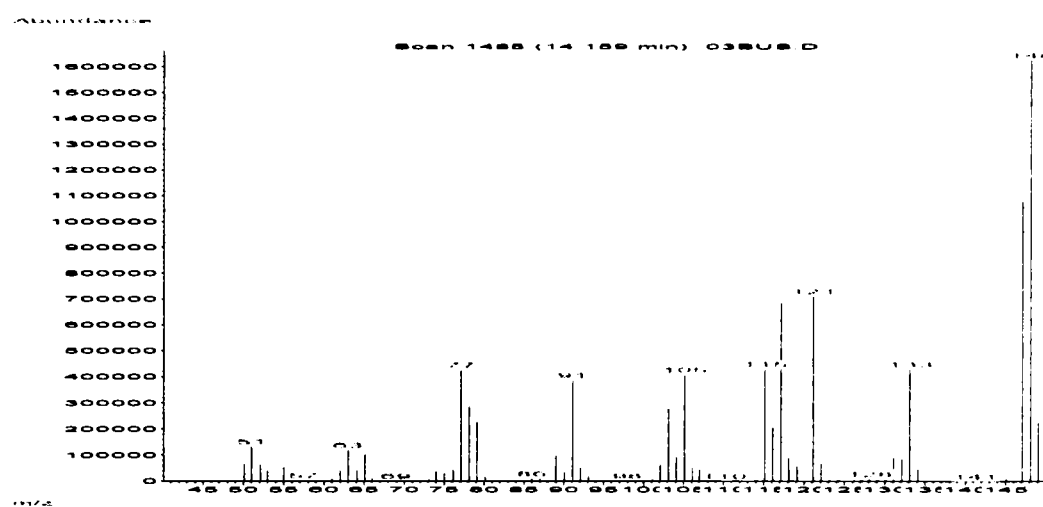
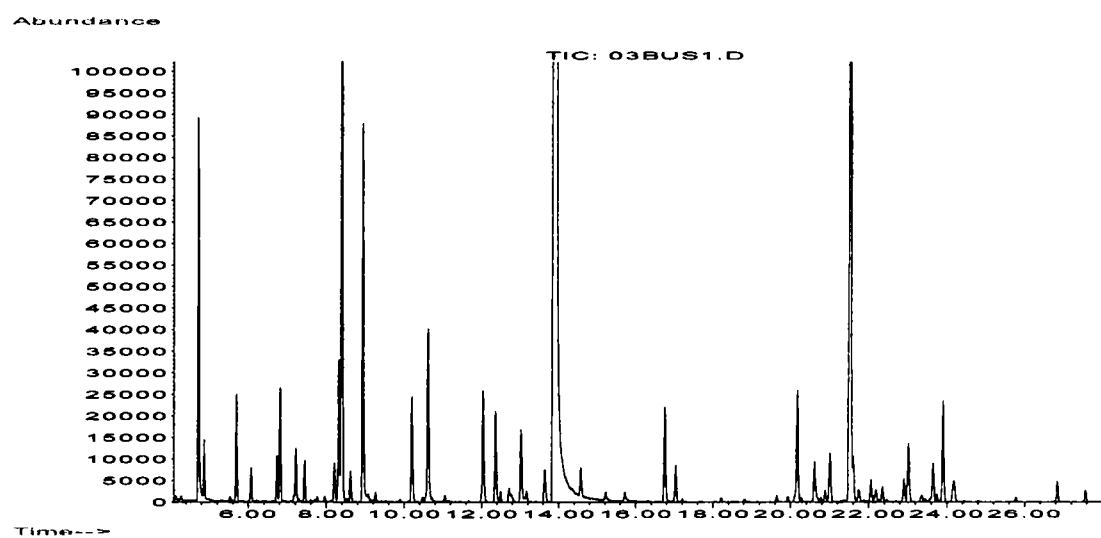


Figura 3.50. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru metil-cavicol.

Tabel 3.12. Compoziția uleiului volatil de busuioc și compoziția relativă a principalilor componenți încapsulați.

Nr.	Identificare MS	Indice Kovats (KI)	Conc. UV proaspăt (%)	Conc. UV recuperat (%)	$\frac{C_{UV\text{ proaspăt}}}{C_{UV\text{ recuperat}}}$
1	alpha-Pinene	936	0.36	0.25	0.69
2	Camphene	950	0.15	0.09	0.62
3	Sabinen	975	0.25	0.12	0.46
4	beta-Pinene	978	0.45	0.28	0.62
5	beta-Myrcene	993	0.29	0.15	0.54
6	beta-Cymene	1026	0.09	0.11	1.20
7	Limonene	1030	0.54	0.41	0.76
8	Eucalyptol	1033	4.21	1.77	0.42
9	<i>trans</i> -beta-Ocimene	1040	0.17	0.09	0.54
10	<i>cis</i> -beta-Ocimene	1050	1.86	1.08	0.58
11	Fenchone	1089	0.65	0.31	0.48
12	Linalool	1103	1.90	0.57	0.30
13	(+)-Camphor	1145	1.30	0.38	0.29
14	Isomenthone	1155	0.70	0.29	0.42
15	Borneol	1168	0.54	0.05	0.10
16	Cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	1176	2.03	0.26	0.13
17	Methyl-chavicol/ Anisole, <i>p</i>-allyl-	1209	66.51	84.77	1.28
18	Fenchyl acetate	1224	0.16	0.10	0.63
19	Fenchyl acetate!	1232	0.01	0.33	
20	Bornyl acetate	1287	0.64	0.12	0.18
21	Menthol, acetate	1296	0.21	0.39	1.82
22	beta-Elementen	1393	0.82	0.17	0.20
23	Methyleugenol	1408	1.98	0.17	0.09
24	Caryophyllene	1420	0.36	4.30	
25	alpha-Bergamotene	1438	5.69	0.13	0.02
26	alpha-Guaiene	1440	0.16	0.08	0.48
27	Humulene	1454	0.15	0.05	0.36
28	beta-Farnesene	1458	0.11	0.08	0.71
29	beta-Cubebene	1482	0.18	0.20	1.11
30	(<i>Z</i>)-beta-Farnesene	1486	0.40	0.15	0.37
31	delta-Guaiene	1507	0.31	0.34	1.11
32	gamma-Cadinene	1515	0.81	0.11	0.14
33	beta-Cedrene	1525	0.25	0.07	0.29

**Figura 3.51.** Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de busuioc recuperat din complexul cu β -ciclodextrină.

Carvacrolul (figura 3.52) a fost cel mai concentrat în **uleiul volatil de cimbru** (31.45%), urmat de limonen (12.51%), α - și β -pinen (11.08% și 5.88%). Dacă pinenii au fost încapsulați în concentrație relativă dublă față de cea din uleiul inițial, carvacrolul nu a prezentat nici măcar jumătate din concentrația relativă a uleiului proaspăt (raport de 0.35) (tabel 3.13), care a avut un număr de 109 componente separați prin gaz cromatografie (figura 3.53). În cazul uleiului volatil reextras din complex, numărul componentelor separați a fost de 55 (figura 3.54).

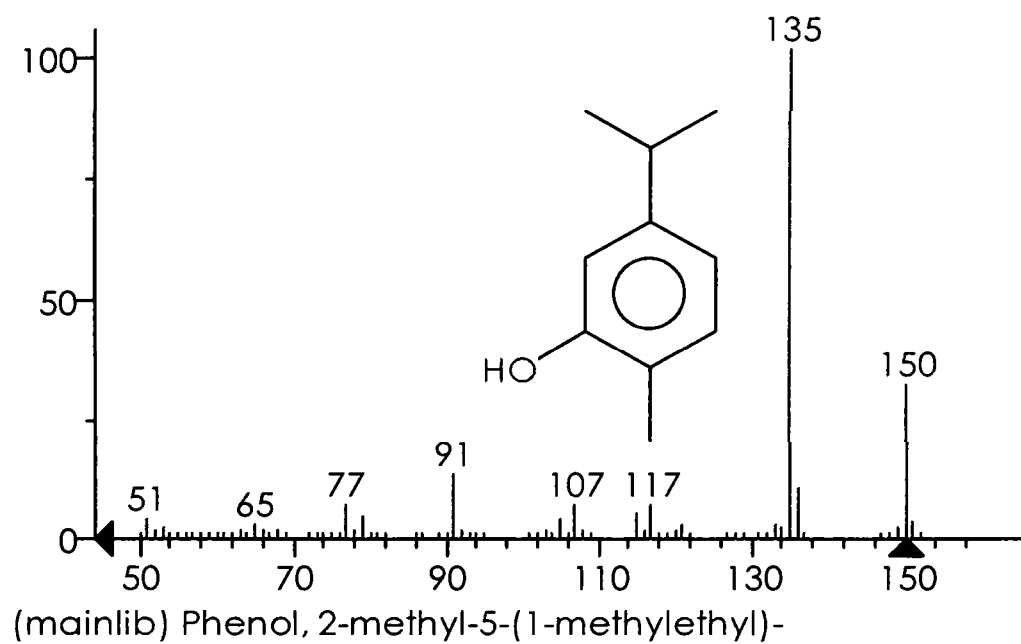
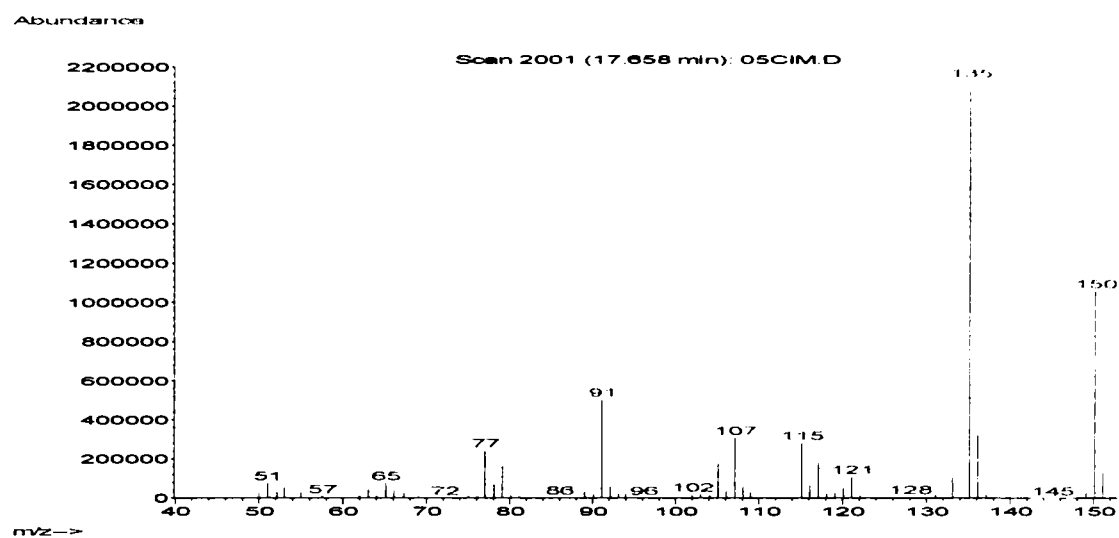


Figura 3.52. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru carvacrol.

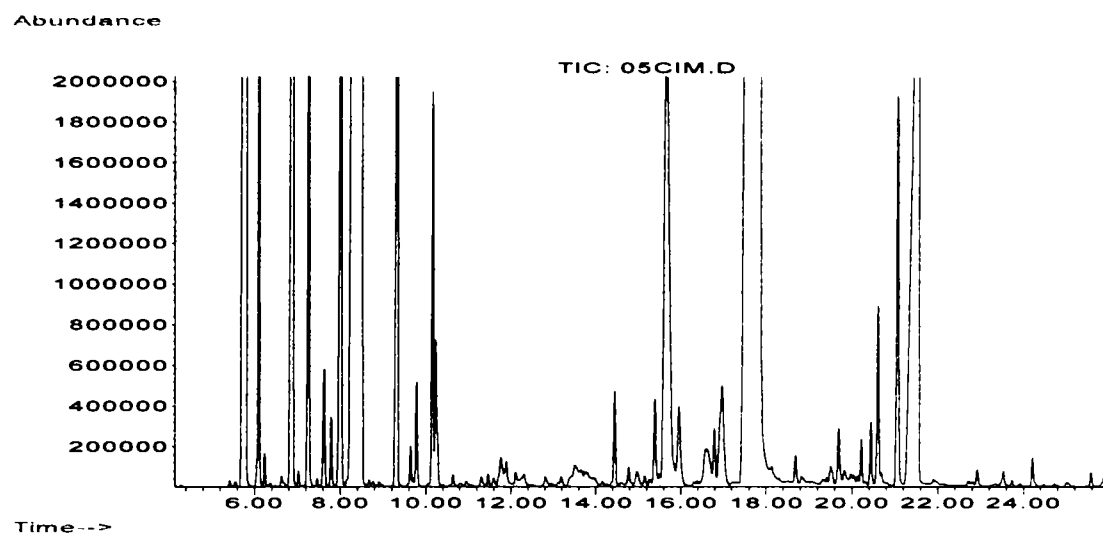


Figura 3.53. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de cimbru.

Tabel 3.13. Compoziția uleiului volatil de cimbru și compoziția relativă a principalilor componenți încapsulați.

Nr.	Identificare MS	Indice Kovats (KI)	Conc. UV proaspăt (%)	Conc. UV recuperat (%)	$C_{UV \text{ proaspăt}} / C_{UV \text{ recuperat}}$
1	alpha-Pinene	939	11.08	30.19	2.72
2	Camphene	951	1.36	1.56	1.14
3	(-)-beta-Pinene	980	5.88	10.13	1.72
4	beta-Myrcene	994	2.03	2.13	1.05
5	alpha-Thujene	1006	0.38	0.34	0.92
6	3-Carene	1012	0.20	0.17	0.84
7	alpha-Terpinen	1019	2.92	2.75	0.94
8	beta-Cymene	1029	7.28	6.67	0.92
9	Limonene	1035	12.51	22.10	1.77
10	gamma-Terpinen	1062	3.37	3.58	1.06
11	Bicyclo[2.2.2]octan-1-ol, 2-chloromethyl-	1076	0.30	0.24	0.78
12	Terpinolen	1088	1.12	1.08	0.96
13	Terpinolen!	1090	0.51	0.45	0.89
14	Verbenone	1189	0.08	1.67	
15	4-Acetyl- <i>m</i> -xylene	1216	0.31	0.15	0.48
16	(+)-Carvone	1245	0.30	1.35	4.46
17	<i>p</i> -Allylanisole	1287	0.16	0.34	2.10
18	Carvacrol	1320	31.45	11.03	0.35
19	alpha-Copaene	1377	0.21	0.15	0.71
20	(+)-Sativen	1391	0.02	0.11	4.70
21	Junipen	1406	0.60	0.54	0.89
22	Caryophyllene	1421	1.38	1.31	0.95

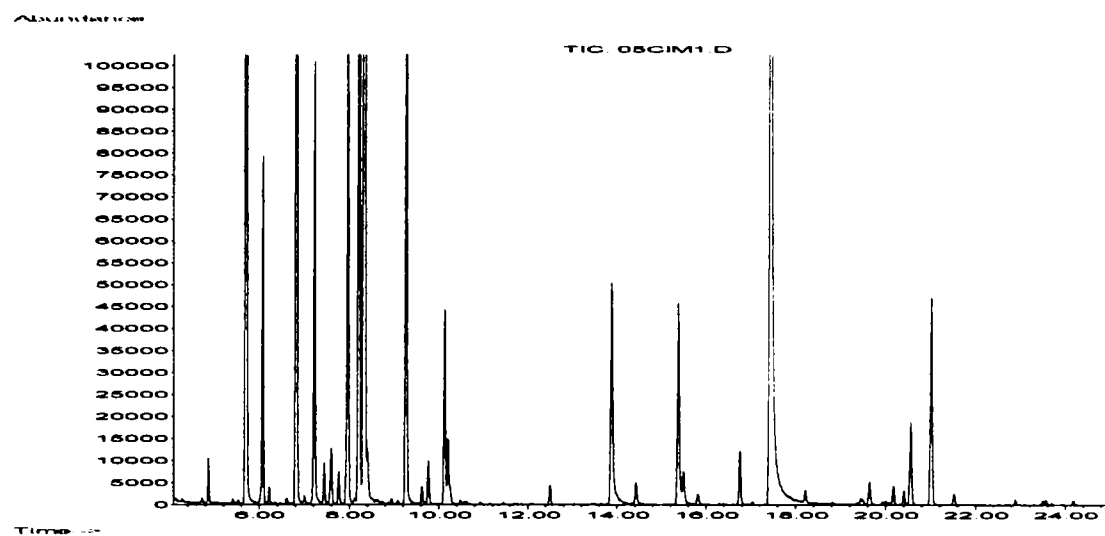


Figura 3.54. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de cimbru recuperat din complexul cu β -ciclodextrină.

Uleiurile volatile de lavandă și de măghiran au prezentat un număr însemnat de compuși, 133 în primul caz (figura 3.55) și 181 în cel de-al doilea (figura 3.56), având drept **componenți principali linalool și antranilat de linalil** în uleiul volatil de lavandă (figura 3.57) și **terpinen-4-ol și γ -terpinen** în uleiul volatil de măghiran (figura 3.58). Atât linaloolul, cât și antranilatul de linalil au fost încapsulate în concentrații relative puțin mai mari decât în uleiul de lavandă inițial, rapoartele dintre concentrațiile corespunzătoare fiind de 1.15 și, respectiv, 1.13 (tabel 3.14). În cazul uleiului volatil de măghiran cel mai bine a fost încapsulat γ -terpinenul (o monoterpenă hidrofobă), la o concentrație relativă aproape dublă, în timp ce alcoolul terpinen-4-ol a prezentat un raport de concentrații relative de doar 1.3 (tabel 3.15). Gaz cromatogramele uleiurilor volatile recuperate din complexii cu β -ciclodextrină sunt prezentate în figurile 3.59 și 3.60.

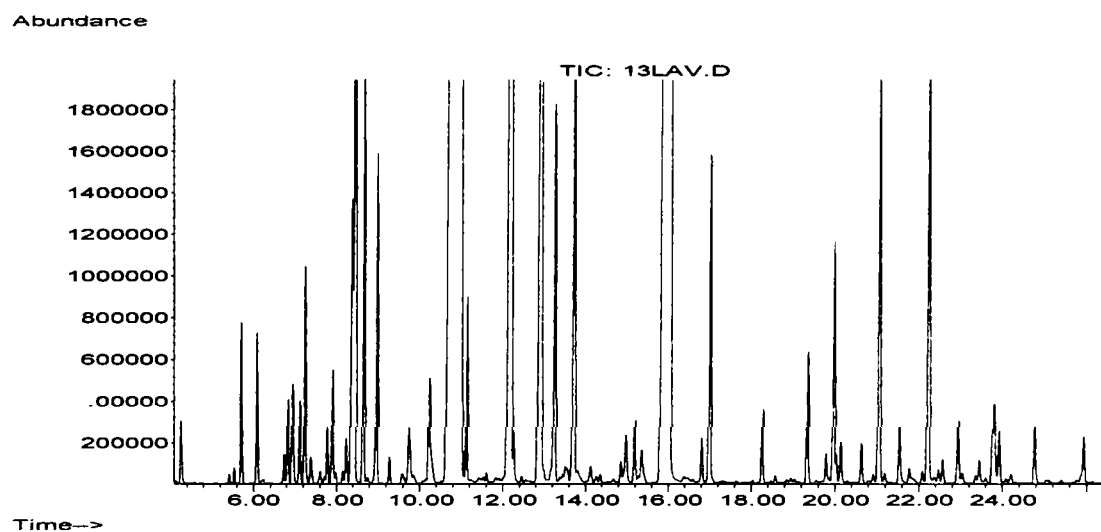


Figura 3.55. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de lavandă.

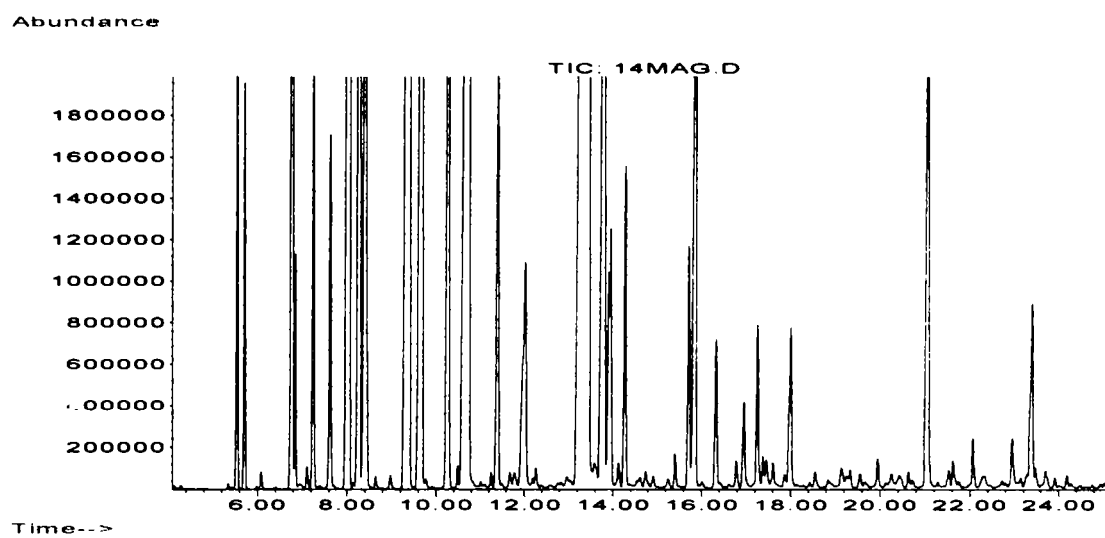


Figura 3.56. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de măghiran.

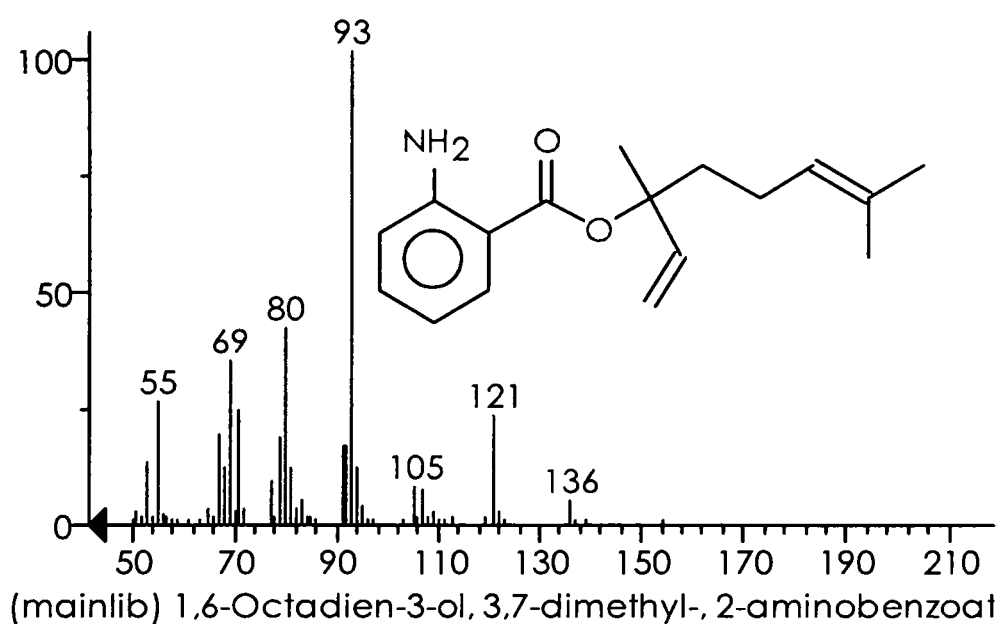
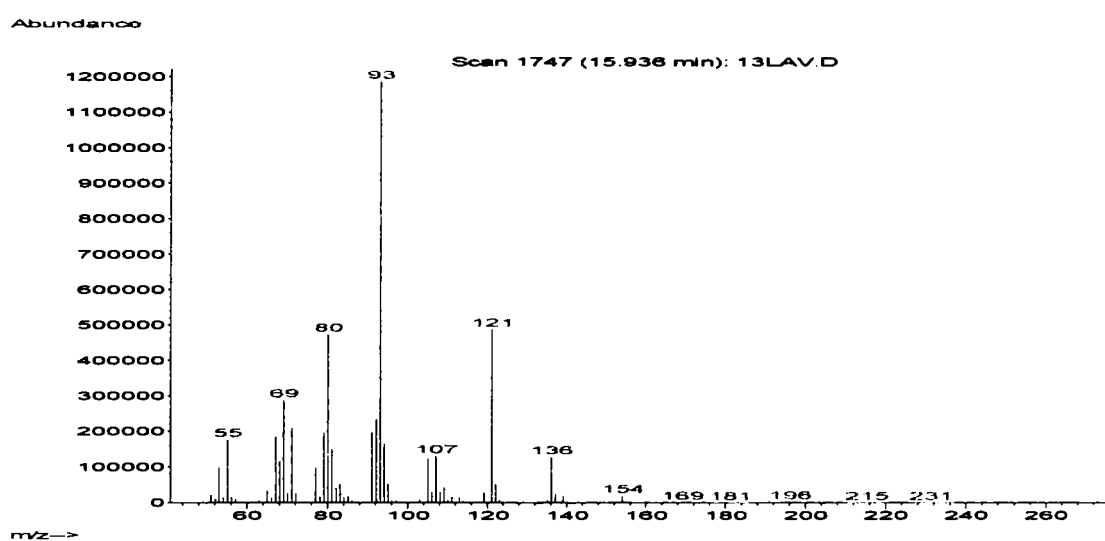


Figura 3.57. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru antranilat de linalil.

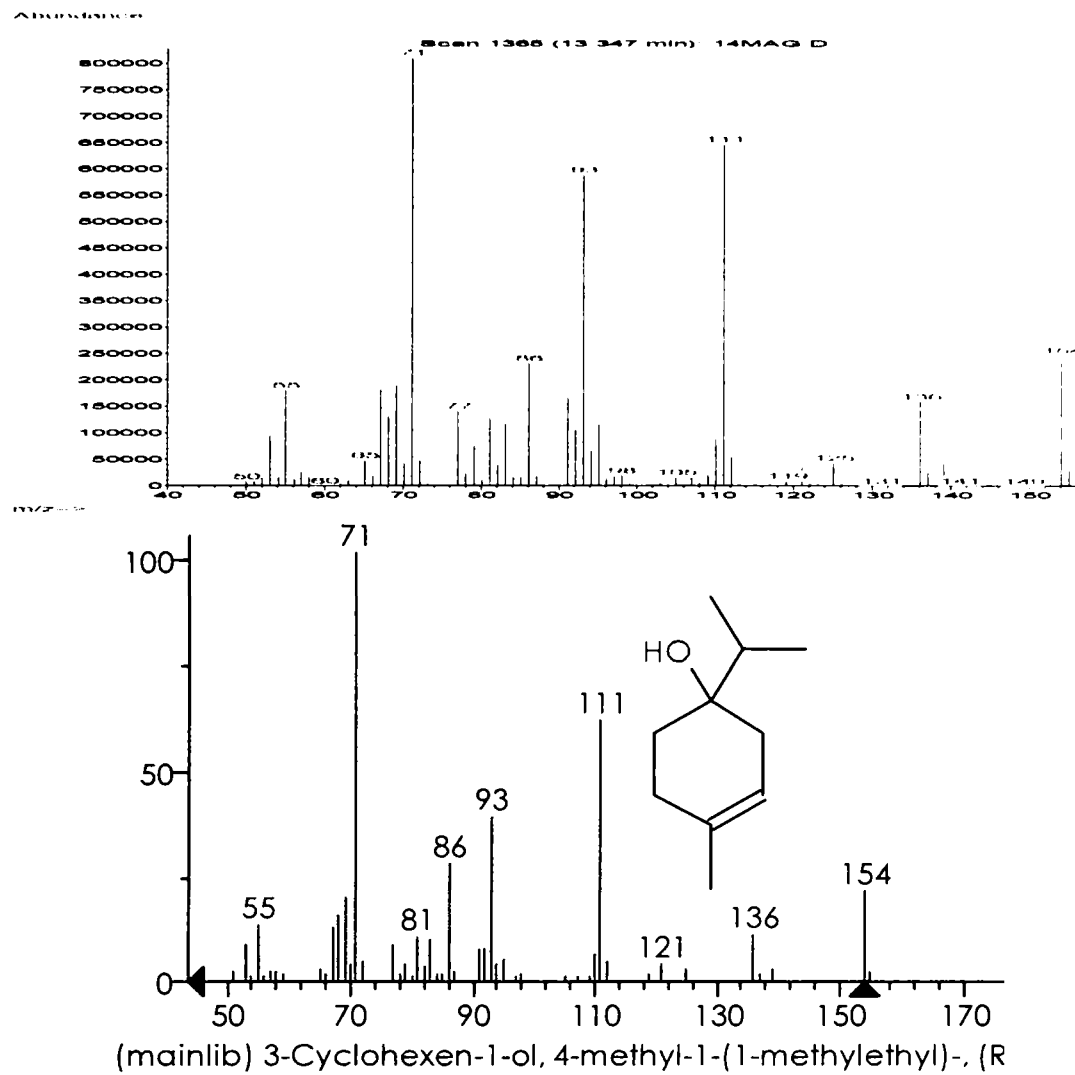


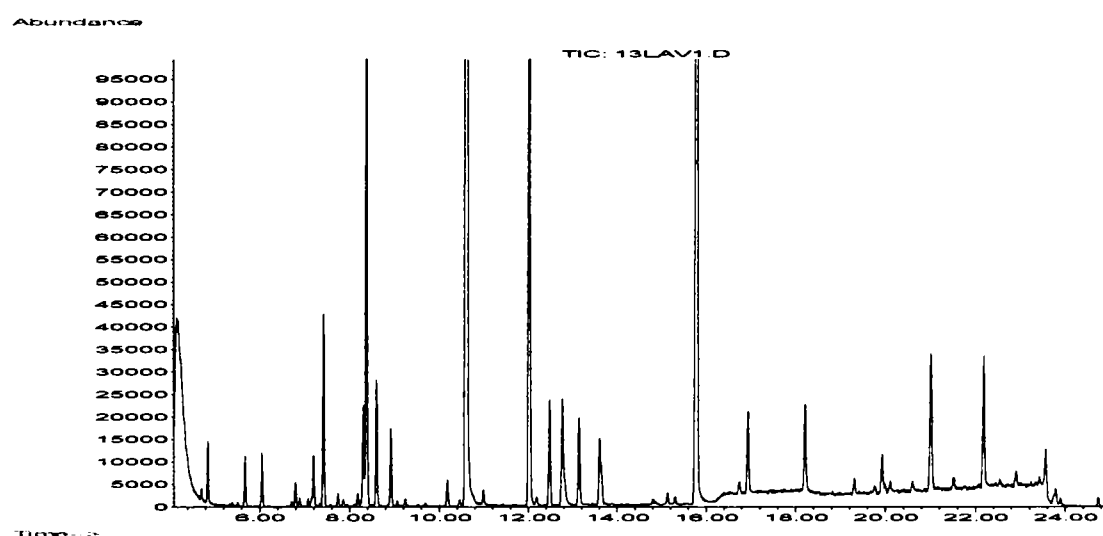
Figura 3.58. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru terpinen-4-ol.

Tabel 3.14. Compoziția uleiului volatil de lavandă și compoziția relativă a principalilor componenți încapsulați.

Nr.	Identificare MS	Indice Kovats (KI)	Conc. UV proaspăt (%)	Conc. UV recuperat (%)	$\frac{C_{UV\ proaspăt}}{C_{UV\ recuperat}}$
1	alpha-Pinene	936	0.50	0.35	0.70
2	Camphene	950	0.47	0.36	0.77
3	beta-Pinene	978	0.28	0.18	0.64
4	beta-Pinene!	993	0.73	0.39	0.54
5	Limonene	1031	1.40	0.82	0.59
6	Eucalyptol	1034	3.96	3.67	0.93
7	trans-beta-Ocimene	1040	1.65	0.99	0.60
8	cis-beta-Ocimene	1050	1.16	0.63	0.54
9	Bicyclo[3.1.0]hexane, 6-isopropylidene-1-methyl-	1087	0.01	0.23	
10	Linalool	1113	30.40	34.80	1.15
11	Camphor, (1R,4R)-(+)-	1149	8.84	6.06	0.69
12	Borneol, (1S,2R,4S)-(-)-	1171	5.49	1.34	0.24
13	(-)-Terpinen-4-ol	1181	1.65	0.80	0.49
14	alpha-Terpineol	1195	2.50	0.89	0.36
15	Linalyl anthranilate	1264	23.61	26.65	1.13
16	4-Hexen-1-ol, 5-methyl-2-(1-methylethenyl)-, acetate	1294	1.36	0.78	0.57
17	Caryophyllene	1421	1.86	1.53	0.82
18	(Z)-beta-Farnesene	1459	2.21	1.20	0.54
19	Linalyl iso-valerate	1511	0.33	0.24	0.71
20	alpha-Bisabolol	1686	0.60	0.21	0.35

Tabel 3.15. Compoziția uleiului volatil de măghiran și compoziția relativă a principalilor componenți încapsulați.

Nr.	Identificare MS	Indice Kovats (KI)	Conc. UV proaspăt (%)	Conc. UV recuperat (%)	C _{UV proaspăt} / C _{UV recuperat}
1	alpha-Pinene	936	0.90	0.91	1.01
2	beta-Phellandrene	976	3.73	4.11	1.10
3	beta-Pinene	979	0.47	0.50	1.07
4	beta-Myrcene	993	1.24	1.09	0.88
5	alpha-Phellandrene	1006	0.98	0.91	0.92
6	alpha-Terpinen	1021	7.84	11.23	1.43
7	beta-Cymene	1028	4.60	6.16	1.34
8	Limonene	1032	4.23	4.72	1.12
9	gamma-Terpinen	1064	11.03	19.05	1.73
10	Terpineol, <i>cis</i> -beta-	1073	5.34	2.12	0.40
11	Terpinolen	1091	3.70	4.57	1.24
12	Terpineol, <i>cis</i> -beta-!	1105	8.93	3.39	0.38
13	2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, <i>trans</i> -	1125	1.58	0.71	0.45
14	Terpinen-4-ol	1187	19.28	25.01	1.30
15	alpha-Terpineol	1197	4.81	3.17	0.66
16	<i>p</i> -Allylanisole	1202	0.65	0.28	0.44
17	<i>trans</i> -Piperitol	1212	1.01	0.33	0.33
18	<i>cis</i> -Carveol	1222	0.04	0.13	3.50
19	Linalyl anthranilate	1259	2.96	2.76	0.93
20	Terpinene 4-acetate	1302	0.53	0.36	0.68
21	Caryophyllene	1421	2.99	3.06	1.02
22	alpha-Humulene	1454	0.16	0.11	0.69

**Figura 3.59.** Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de lavandă recuperat din complexul cu β -ciclodextrină.

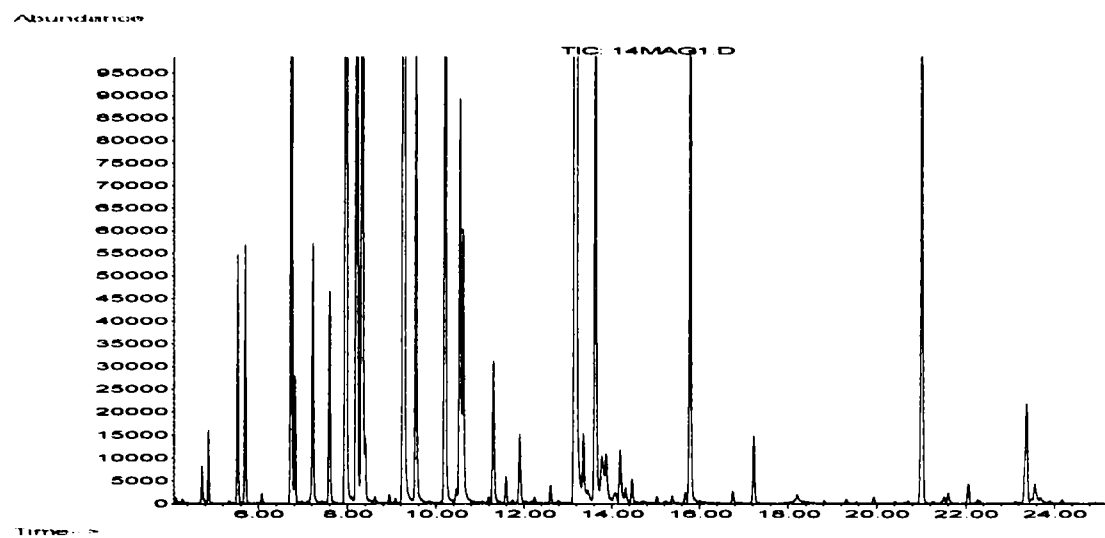


Figura 3.60. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de măghiran recuperat din complexul cu β -ciclodextrină.

În cazul **uleiului volatil de mentă** s-au separat prin gaz cromatografie 130 de compuși (figura 3.61), dintre care principalii 45 de compuși au fost regăsiți în uleiul volatil recuperat din complex (figura 3.62). Compușii prezenți în concentrațiile cele mai mari au fost ***l*-mentolul** (32.85%, figura 3.63), **mentona** (17.22%, figura 3.64), **acetatul de mentil/izomentil** (5%) și în concentrații mai scăzute limonenul (1.95%), izopulegolul (1.31%) și β -cariofilenul (1.16%). Mentona a fost încapsulată la o concentrație relativă superioară față de alcoolul corespunzător, mentolul, raportul dintre concentrația acestora în uleiul recuperat și în cel inițial fiind de 1.36 în primul caz și de 0.88 în cel de-al doilea. Ceilalți compuși mai importanți au prezentat valori ale acestor rapoarte apropiate de unitate (tabel 3.16)

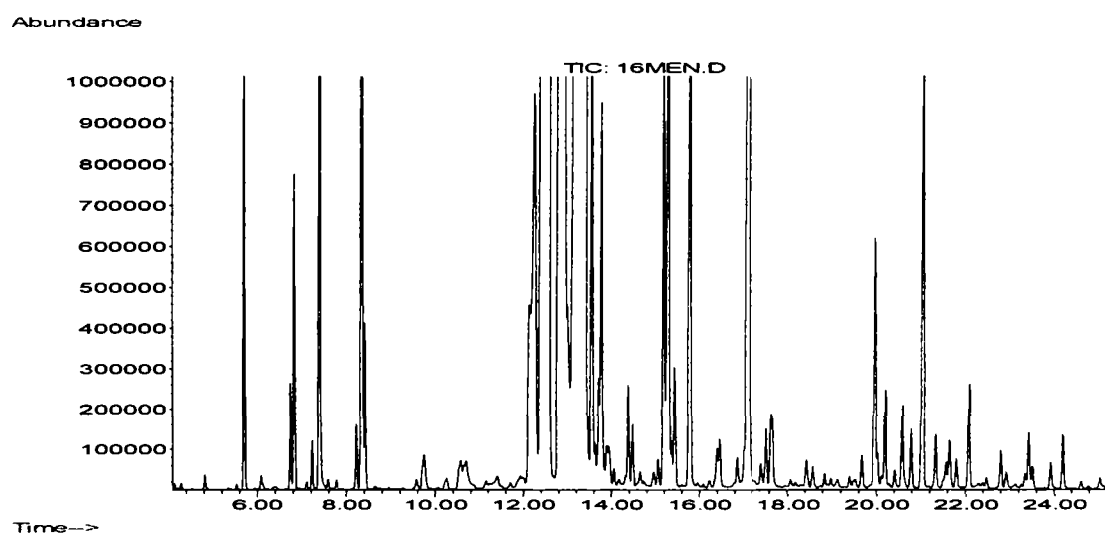


Figura 3.61. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de mentă.

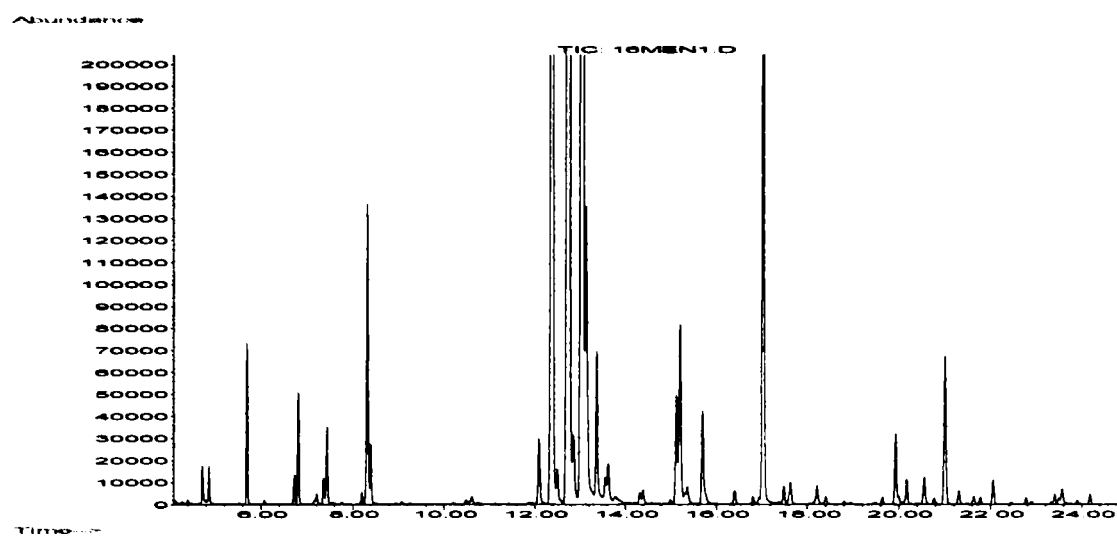


Figura 3.62. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de mentă recuperat din complexul cu β -ciclodextrină.

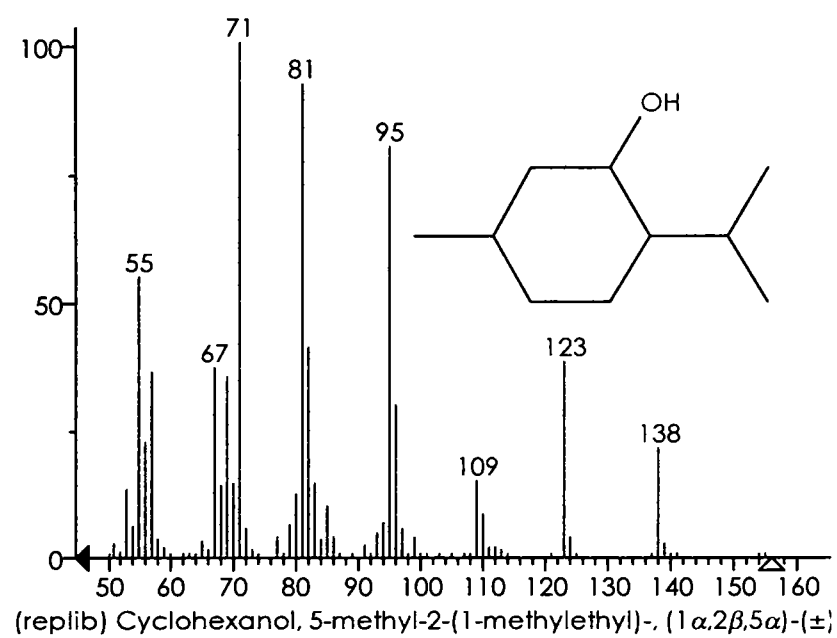
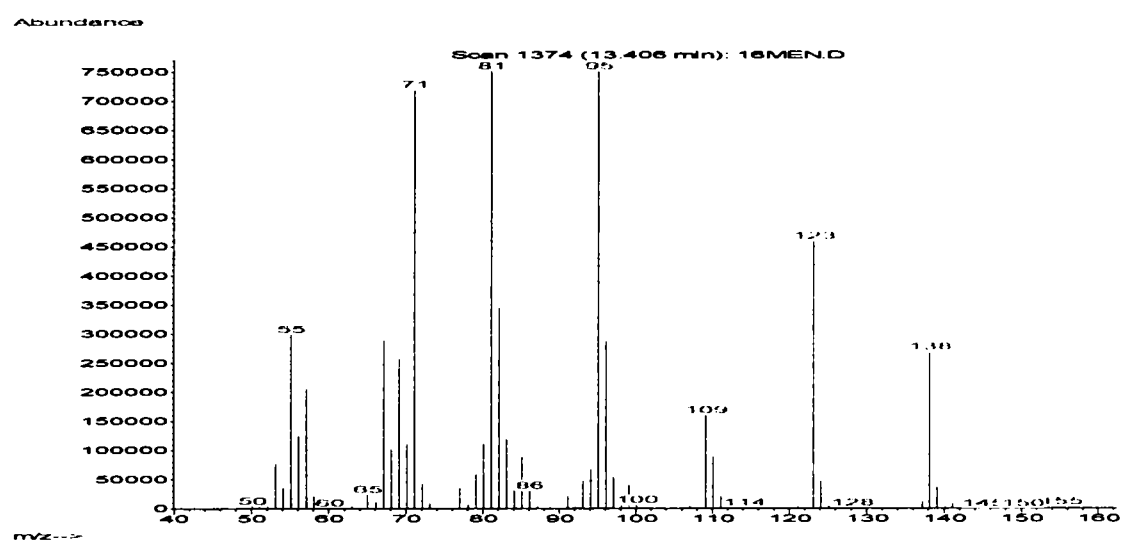


Figura 3.63. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru *l*-mentol.

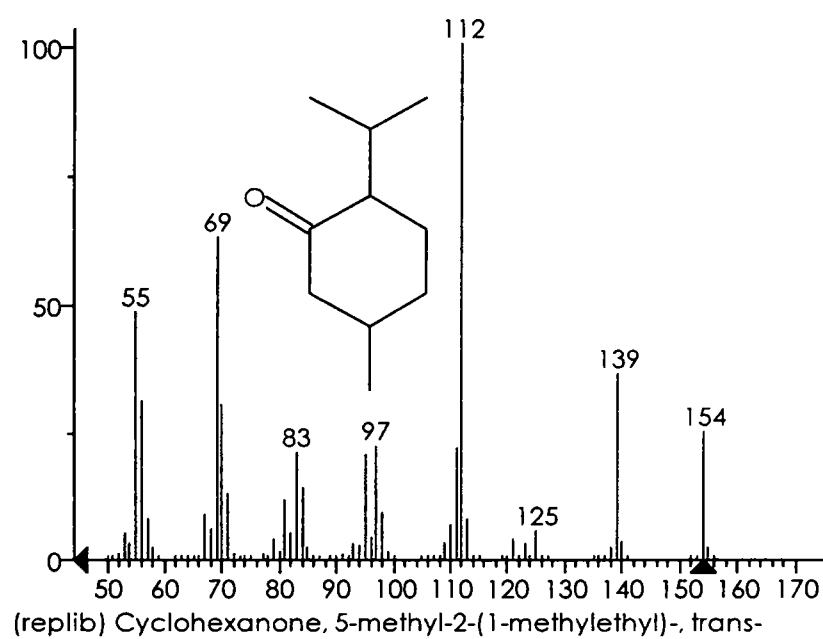
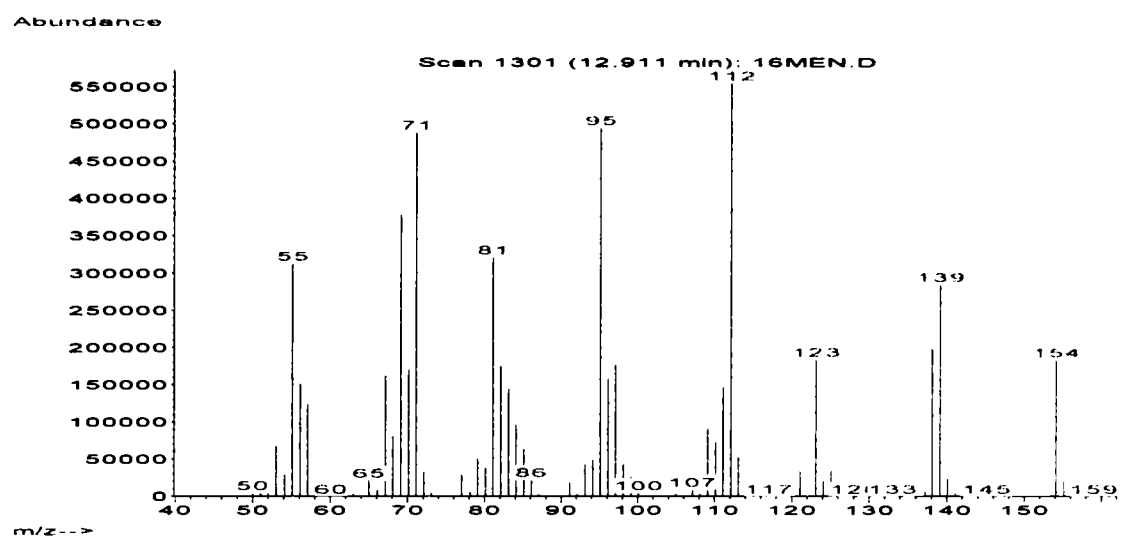


Figura 3.64. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru mentonă.

Tabel 3.16. Compoziția uleiului volatil de mentă și compoziția relativă a principalilor componenți încapsulați.

Nr.	Identificare MS	Indice Kovats (KI)	Conc. UV proaspăt (%)	Conc. UV recuperat (%)	$C_{UV\text{ proaspăt}} / C_{UV\text{ recuperat}}$
1	alpha-Pinene	936	0.73	0.78	1.08
2	beta-Phellandrene	975	0.19	0.16	0.84
3	beta-Pinene	978	0.58	0.61	1.06
4	beta-Pinene!	993	0.09	0.06	0.65
5	3-Octanol	998	1.27	0.15	0.12
6	<i>m</i> -Cymene	1026	0.13	0.07	0.55
7	Limonene	1030	1.95	1.78	0.91
8	Eucalyptol	1032	0.31	0.35	1.14
9	3-Nonanol	1101	0.13	0.07	0.55
10	(-)-Isopulegol	1147	0.63	0.51	0.81
11	Isopulegol	1151	1.31		
12	Menthone	1171	17.22	23.51	1.36
13	Menthol	1185	32.85	29.05	0.88
14	(-)-Isopulegol	1177		2.54	
15	Isomenthol	1184		1.04	
16	Cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	1190	1.05	0.16	0.16
17	Cyclohexene, 2-ethenyl-1,3,3-trimethyl-	1192	0.03	0.28	
18	Verbenone	1213	0.02	0.09	4.96
19	Caprylyl acetate	1215	0.21	0.11	0.52
20	1,6-Octadiene, 2,6-dimethyl-	1235	0.07	0.04	0.58
21	Isovaleric acid <i>cis</i> -3-hexenyl ester	1239	1.07	0.82	0.77
22	Pulegone	1242	1.78	1.33	0.75
23	Carvone	1246	0.29	0.15	0.50
24	3-Cyclohexen-1-one, 2-isopropyl-5-methyl-	1257	1.59	0.80	0.50
25	2H-1-Benzopyran, 3,4,4a,5,6,8a-hexahydro-2,5,5,8a-tetramethyl-	1289	0.06	0.06	0.90
26	Isomenthyl acetate	1297	5.00	5.66	1.13
27	Isomenthyl acetate! (isomer)	1310	0.13	0.13	1.02
28	<i>n</i> -Nonyl acetate	1313	0.17	0.21	1.23
29	Elixene	1338	0.08	0.06	0.72
30	alpha-Copaene	1376	0.09	0.05	0.64
31	(-)-beta-Bourbonene	1386	0.63	0.53	0.85
32	(-)-beta-Elemene	1393	0.23	0.18	0.80
33	(+)-Longifolene	1406	0.23	0.22	0.99
34	<i>n</i> -Decyl acetate	1412	0.13	0.05	0.38
35	beta-Caryophyllene	1420	1.16	1.16	1.00
36	beta-Cubebene	1430	0.14	0.11	0.79
37	Isovaleric acid, octyl ester	1440	0.13	0.07	0.51
38	gamma-Murolene	1445	0.07	0.05	0.72
39	1 <i>H</i> -Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-	1454	0.26	0.19	0.72
40	gamma-Murolene	1477	0.10	0.05	0.49
41	gamma-Murolene!	1498	0.15	0.07	0.44
42	alpha-Murolene	1501	0.05	0.03	0.62
43	gamma-Cadinene	1515	0.07	0.03	0.40
44	(+)-delta-Cadinene	1524	0.15	0.08	0.53
45	Caryophyllene oxide	1584	0.57	0.32	0.57

Principalul component din cei 110 separați prin gaz cromatografie (figura 3.65) în cazul **uleiului volatil de mentă creță** a fost (-)-**carvona** (50.3%, figura 3.66). Concentrații însemnate s-au decelat și pentru limonen (16%), dihidrocarveol (8.85%), neodihidrocarveol (3.52%), mentonă (3.24%) și β -cariofilen (2.3%). Carvona a fost încapsulată în β -ciclodextrină la o concentrație puțin mai mare decât în uleiul original (61.2%), ceea ce corespunde la un raport al concentrațiilor relative de 1.22. Și hidrocarburile terpenice mai importante au fost încapsulate la concentrații superioare, în timp ce alcoolii și cetonele terpenice au prezentat concentrații inferioare celor din uleiul proaspăt de mentă

creață (tabel 3.17). În figura 3.67 este prezentată gaz cromatograma din analiza GC-MS pentru uleiul volatil de mentă creață recuperat din complex.

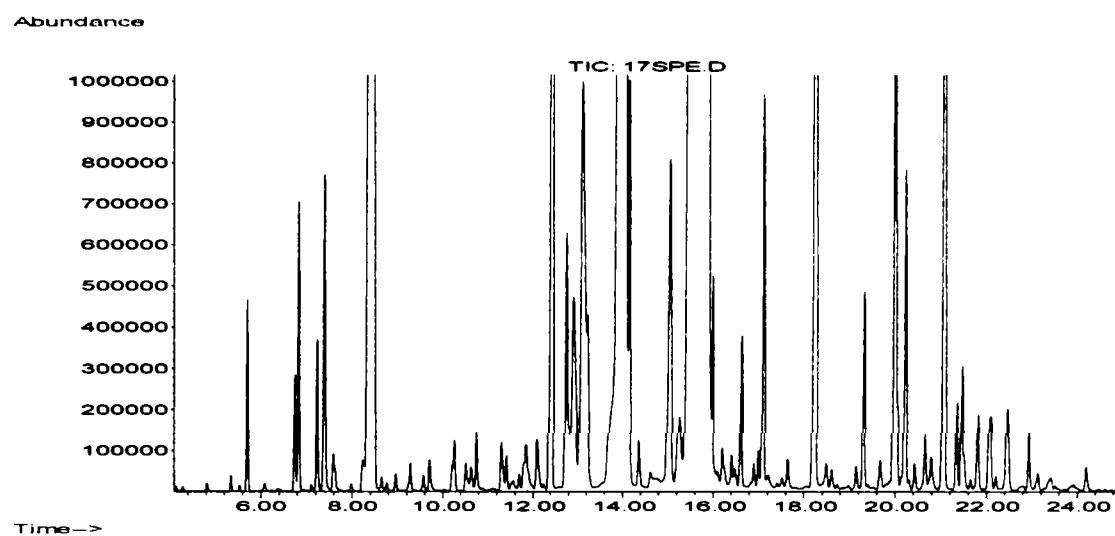


Figura 3.65. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de mentă creață.

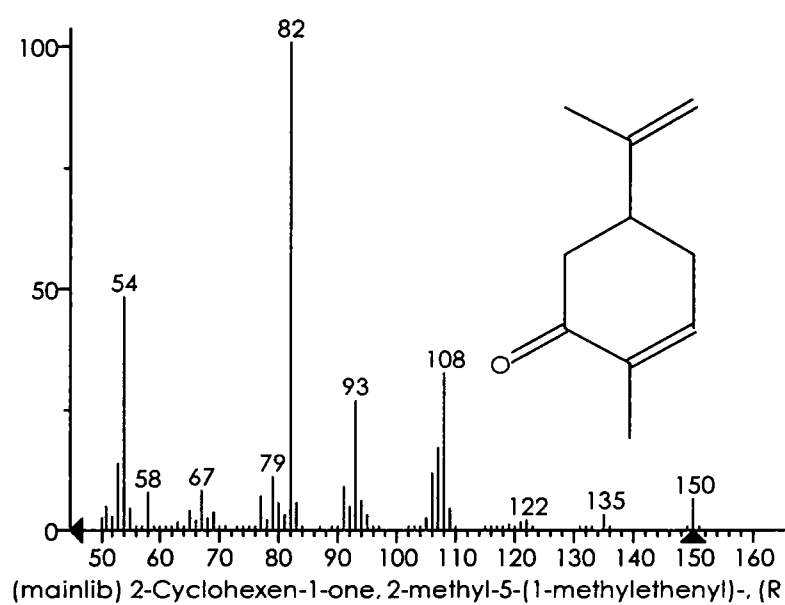
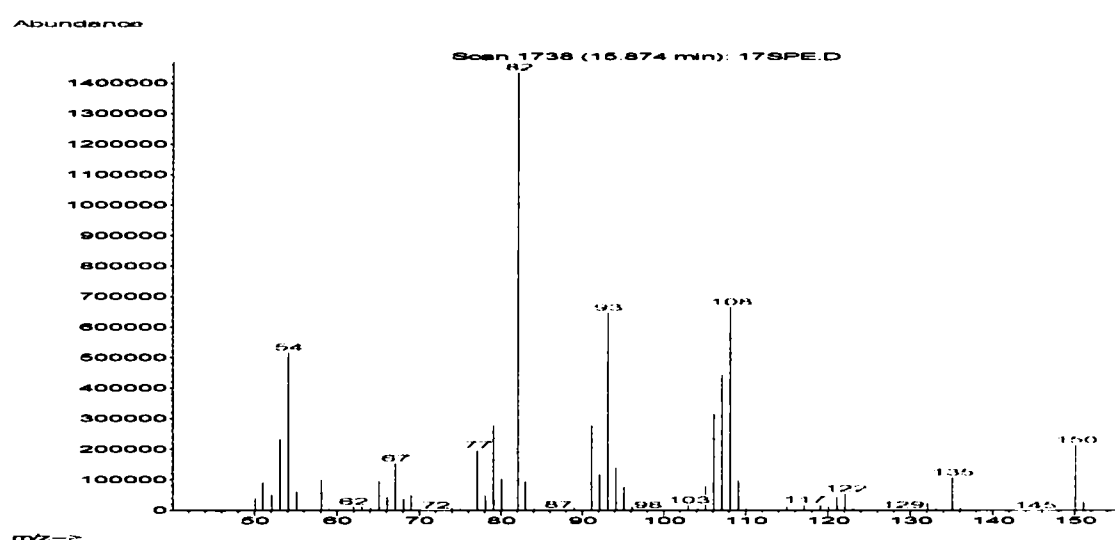
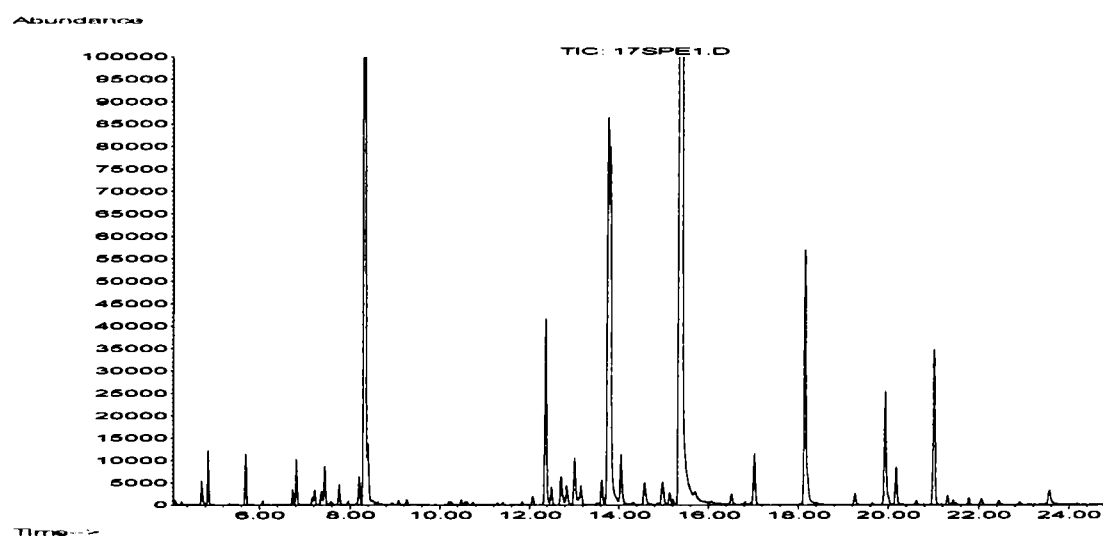


Figura 3.66. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru (-)-carvonă.

Tabel 3.17. Compoziția uleiului volatil de mentă creță și compoziția relativă a principalilor componenți încapsulați.

Nr.	Identificare MS	Indice Kovats (KI)	Conc. UV proaspăt (%)	Conc. UV recuperat (%)	$\frac{C_{UV\ proaspăt}}{C_{UV\ recuperat}}$
1	alpha-Pinene	936	0.28	0.31	1.09
2	beta-Phellandrene	975	0.19	0.10	0.55
3	beta-pinene	978	0.46	0.31	0.69
4	beta-Myrcene	993	0.25	0.11	0.42
5	3-Octanol	998	0.60	0.11	0.18
6	Nerol	1005	0.10	0.15	1.54
7	beta-Cymene	1027	0.10	0.21	2.20
8	Limonene	1034	16.00	19.53	1.22
9	Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6,6-trimethyl-	1040	0.02	0.40	
10	gamma-Terpinen	1060	0.06	0.05	0.78
11	Terpinolen	1090	0.05	0.03	0.67
12	(+)-Carvone	1146	0.14	0.08	0.57
13	Menthone	1156	3.24	1.67	0.52
14	Isomenthone	1165	0.63	0.32	0.51
15	Lavandulol	1170	0.65	0.19	0.29
16	Cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	1176	1.59	0.47	0.30
17	1,6-Dihydrocarveol	1200	8.85	3.43	0.39
18	Dihydrocarvone	1197		3.29	
19	trans-Dihydrocarvone	1207	0.85	0.51	0.60
20	cis-Carveol	1222	0.06	0.26	4.61
21	cis-Carveol!	1234	1.03	0.27	0.27
22	cis-3-Hexenyl isovalerate	1240	0.29	0.12	0.40
23	(-)-Carvone	1260	50.31	61.20	1.22
24	Carvone oxide, cis-	1282	0.29	0.11	0.38
25	Isomenthol acetate	1297	0.76	0.50	0.65
26	Neodihydrocarveol	1332	3.52	2.59	0.74
27	trans-Carveyl acetate	1365	0.39	0.10	0.27
28	beta-Bourbonene	1386	1.84	1.15	0.62
29	beta-Element	1394	0.65	0.34	0.52
30	Isocaryophyllene	1408	0.13	0.04	0.29
31	Caryophyllene	1421	2.30	1.51	0.66
32	beta-Cubebene	1430	0.18	0.08	0.47
33	Ascaridole epoxide	1434	0.25	0.04	0.17
34	gamma-Murolene	1445	0.17	0.06	0.36
35	Cis-alpha-Bisabolene	1454	0.26	0.07	0.26
36	Methane, [(1-ethynylcyclohexyl)oxy]methoxy-	1466	0.27	0.05	0.18
37	Caryophyllene oxide	1584	0.35	0.07	0.20

**Figura 3.67.** Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de mentă creță recuperat din complexul cu β -ciclodextrină.

În uleiul volatil de salvie s-au separat prin GC-MS 147 compuși (figura 3.68), dintre care cei cu concentrații peste 0.03% au fost regăsiți în uleiul volatil recuperat din complex în număr de 37 (figura 3.69). Componentii principali au fost **antranilatul de linalil** (46.44%, figura 3.70) și **linaloolul** (16.49%), primul regăsindu-se în concentrație mai însemnată în uleiul recuperat din complex (77.84%), iar al doilea în concentrație mai scăzută (raport de 0.7 între cele două concentrații). De asemenea, acetajii de neril și de geranil au fost încapsulați în concentrații mai scăzute decât în uleiul original (rapoarte apropiate de 0.5) (tabel 3.18).

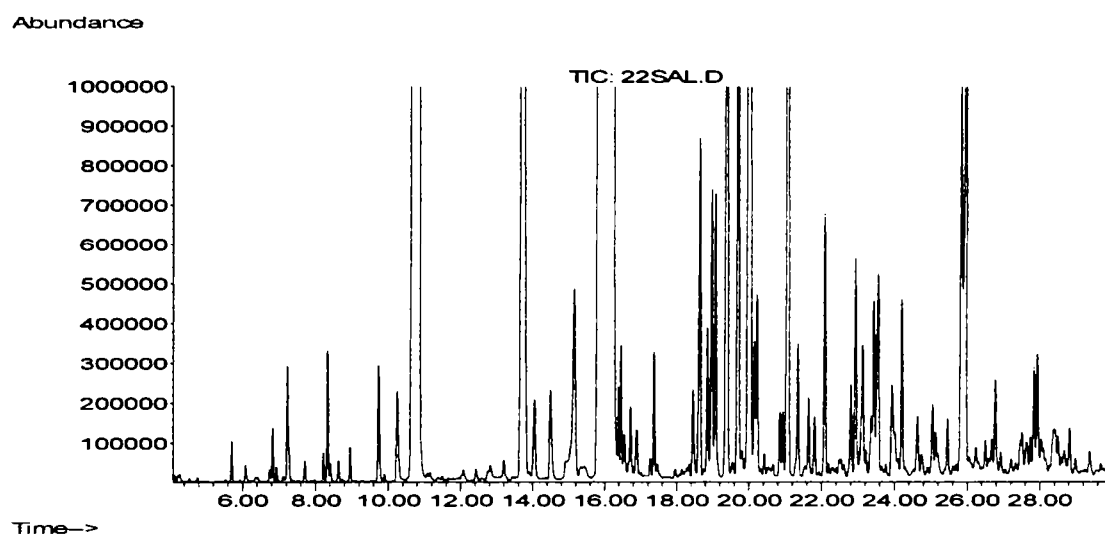


Figura 3.68. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de salvie.

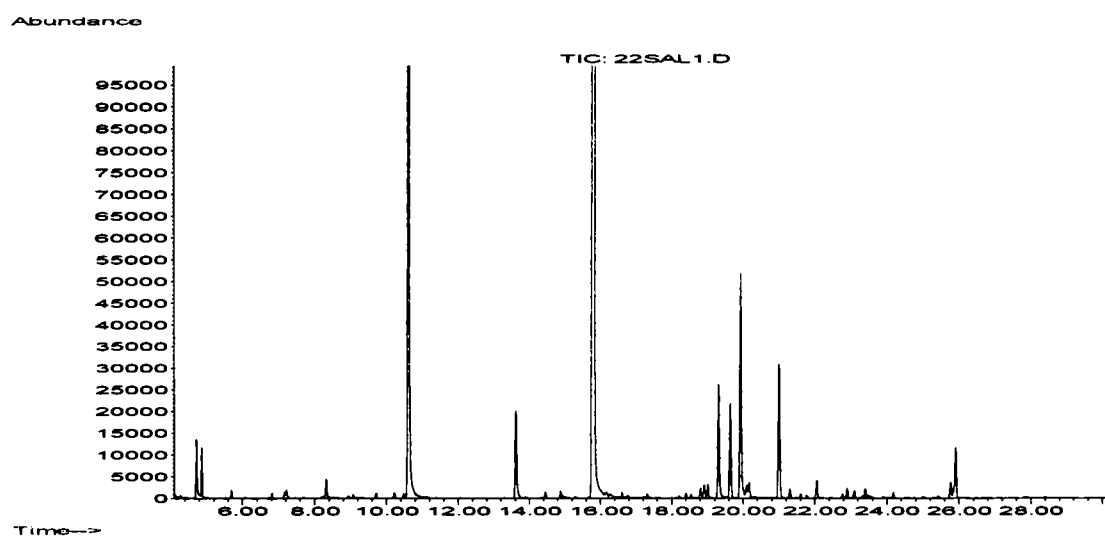


Figura 3.69. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de salvie recuperat din complexul cu β -ciclodextrină.

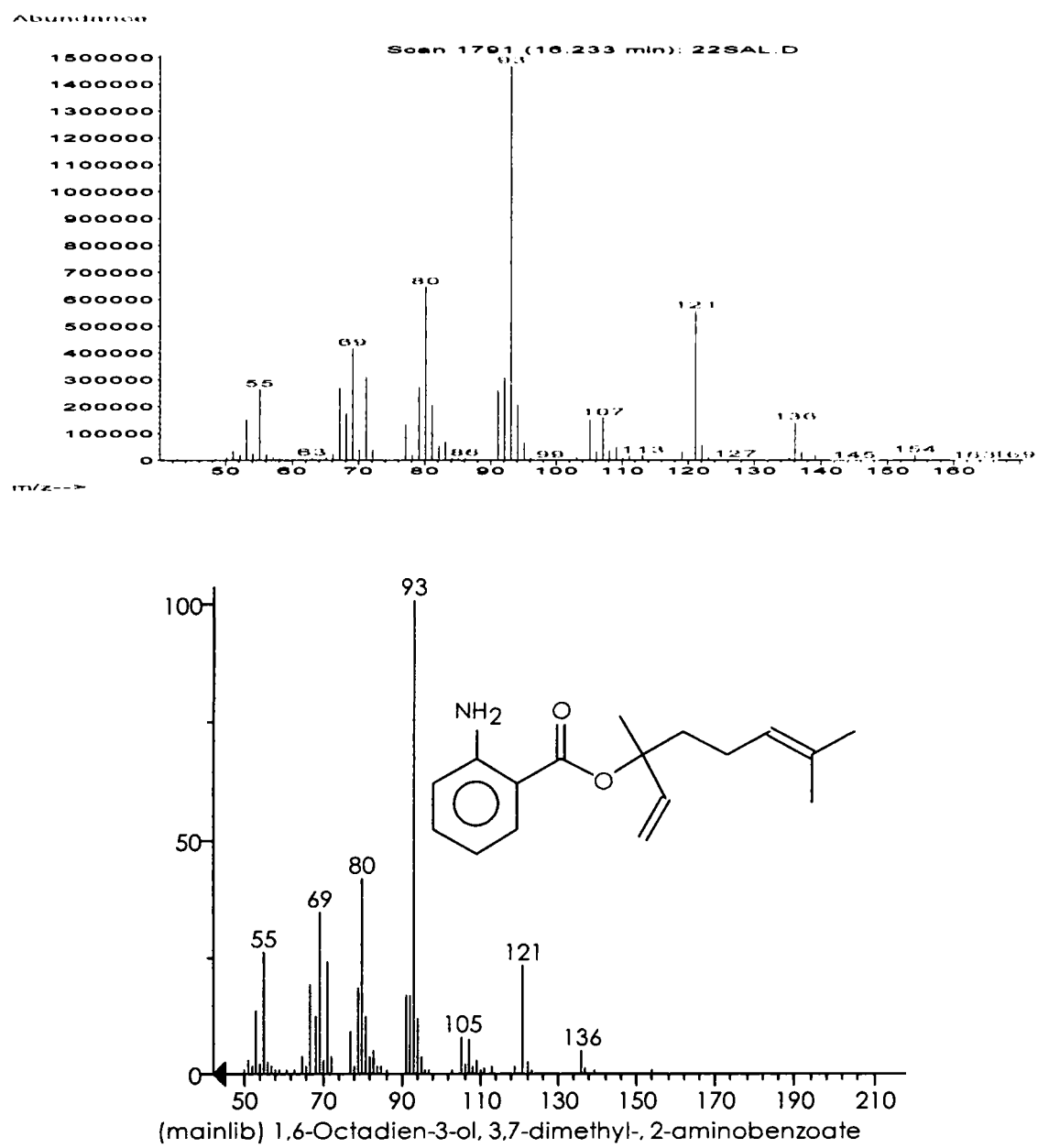


Figura 3.70. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru antranilat de linalil.

Tabel 3.18. Compoziția uleiului volatil de salvie și compoziția relativă a principalilor componenți încapsulați.

Nr.	Identificare MS	Indice Kovats (KI)	Conc. UV proaspăt (%)	Conc. UV recuperat (%)	$\frac{C_{UV\text{ proaspăt}}}{C_{UV\text{ recuperat}}}$
1	alpha-Pinene	936	0.06	0.07	1.10
2	beta-Pinene	978	0.08	0.05	0.58
3	(-)-beta-Pinene	993	0.22	0.09	0.41
4	Limonene	1030	0.20	0.16	0.77
5	Linalool oxide	1075	0.23	0.06	0.25
6	Linalool oxide (fr. I)! (isomer)	1091	0.23	0.06	0.26
7	Linalool	1110	16.49	11.49	0.70
8	alpha-Terpineol	1194	3.43	1.04	0.30
9	Linalyl formate	1218	0.26	0.06	0.24
10	Nerol	1231	0.04	0.09	2.10
11	Linalyl anthranilate	1270	46.44	77.84	1.68
12	cis-Linalool Oxide	1275	0.09	0.06	0.67
13	Neryl acetate	1285	0.13	0.06	0.42
14	Geranyl formate	1305	0.22	0.06	0.26
15	Elixene	1339	0.19	0.05	0.25
16	3,7-Octadiene-2,6-diol, 2,6-dimethyl-	1344	0.76	0.04	0.05
17	Copaene	1351	0.26	0.10	0.38
18	3-Nonanol, 1,2;6,7-diepoxy-3,7-dimethyl-, acetate	1355	0.58	0.15	0.26
19	3-Nonanol, 1,2;6,7-diepoxy-3,7-dimethyl-, acetate	1358	0.58	0.15	0.26
20	Neryl acetate	1368	2.90	1.24	0.43
21	alpha-Ylangene	1373	0.03	1.03	
22	Geranyl acetate	1389	4.89	2.47	0.51
23	beta-Cubebene	1392	0.26	0.17	0.67
24	(-)-beta-Elemene	1394	0.31	0.16	0.53
25	beta-Caryophyllene	1422	2.92	1.53	0.52
26	beta-Caryophyllene (isomer)!	1430	0.28	0.10	0.36
27	Cubenol	1437	0.03	0.04	1.15
28	gamma-Murolene	1454	0.52	0.19	0.36
29	gamma-Murolene!	1478	0.21	0.04	0.20
30	beta-Cubebene	1482	0.47	0.10	0.22
31	Eremophilene	1489	0.35	0.09	0.25
32	Eremophilene!	1496	0.12	0.09	0.77
33	(+)-delta-Cadinene	1525	0.32	0.05	0.16
34	(-)-Spathulenol	1581	1.03	0.18	0.17
35	Caryophyllene oxide	1585	1.68	0.60	0.36
36	Sclareoloxide(Cis-A/B)	1882	0.51	0.06	0.11
37	5-(7a-Isopropenyl-4,5-dimethyl-octahydroinden-4-yl)-3-methyl-pent-2-en-1-ol	2231	2.55	0.07	0.03

3.3.1.3. Familia Rutaceae

În procesul de nanoîncapsulare a uleiurilor volatile de plante din familia Rutaceae (bergamot, lămâie, portocale) s-au obținut randamente relativ scăzute, în cazul uleiurilor volatile din bergamot și portocale acestea fiind de 75-76%, în timp ce în cazul uleiului volatil de lămâie s-a obținut un randament de doar 55%. Procentul de ulei volatil eliberat în analiza termogravimetrică (și probabil și o cantitate de apă de cristalizare) a fost de 7.76% în cazul uleiului volatil de bergamot, 11.49% în cazul uleiului volatil de lămâie și de 10.53% în cazul celui de portocale (figura 3.71).

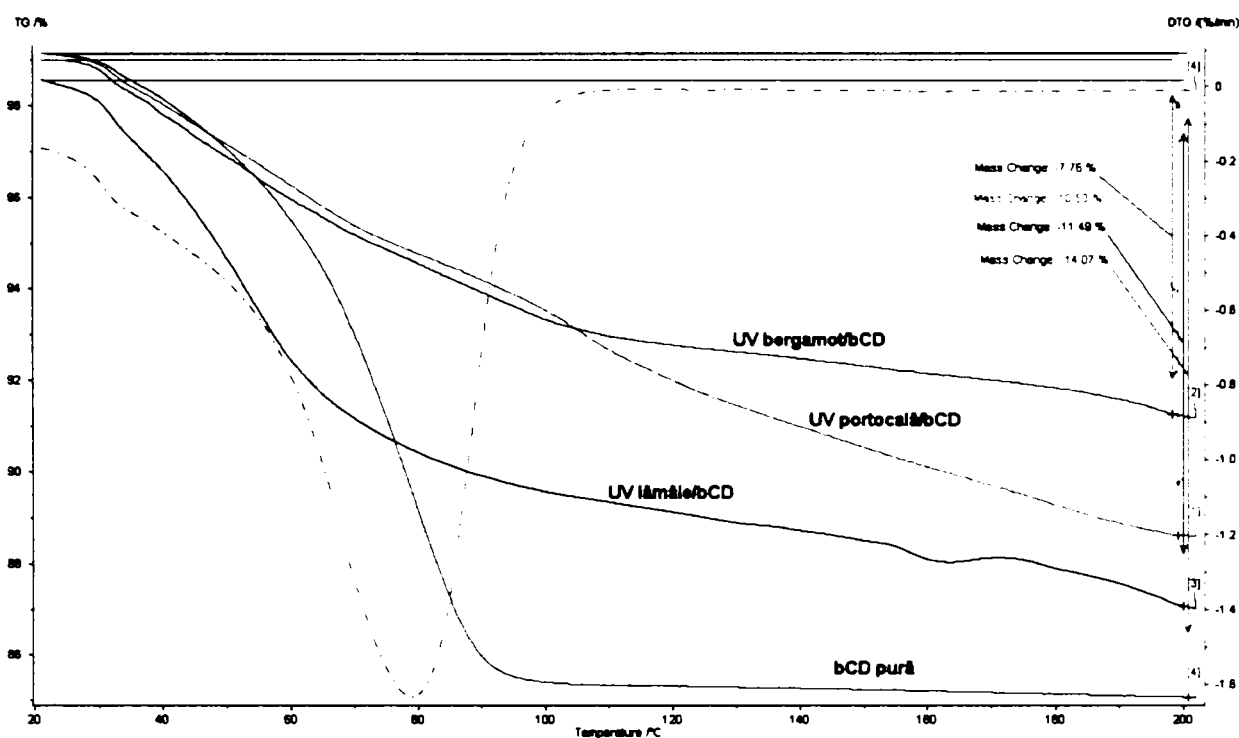


Figura 3.71. Analiza TG-DTG a complexelor β -ciclodextrinei cu uleiuri volatile de plante din familia Rutaceae.

Pentru toate uleiurile volatile din familia Rutaceae limonenul a fost printre componenții majoritari, doar în cazul **uleiului volatil de bergamot**, concentrația maximă a fost găsită pentru **linalool** (22.11%, figura 3.72). Numărul total de compuși separați prin gaz cromatografie a fost de 108 (figura 3.73), aproape toți identificați prin spectrometrie de masă. O selecție dintre cei mai importanți compuși este prezentată în tabelul 3.19.

Tabel 3.19. Compoziția uleiului volatil de măghiran și compoziția relativă a principalilor componenți încapsulați.

Nr.	Identificare MS	Indice Kovats (KI)	Conc. UV bergamot (%)	Conc. UV lămâie (%)	Conc. UV portocale (%)
1	alpha-Pinene	936	1.02	0.43	1.71
2	beta-Pinene	993	7.22		4.03
3	Limonene	1040	17.13	54.70	87.81
4	Linalool	1103	22.11		1.31
5	Neral	1244		4.20	
6	Geranial	1274		5.77	

În cazul **uleiurilor volatile de lămâie și de portocală**, **limonenul** a fost de departe componentul cel mai concentrat, în uleiul de lămâie fiind de 54.7% (figura 3.74), iar în cel de portocală de 87.81% (figura 3.75). În primul caz raportul dintre concentrațiile relative a fost de 1.56, iar în cel de-al doilea apropiat de unitate.

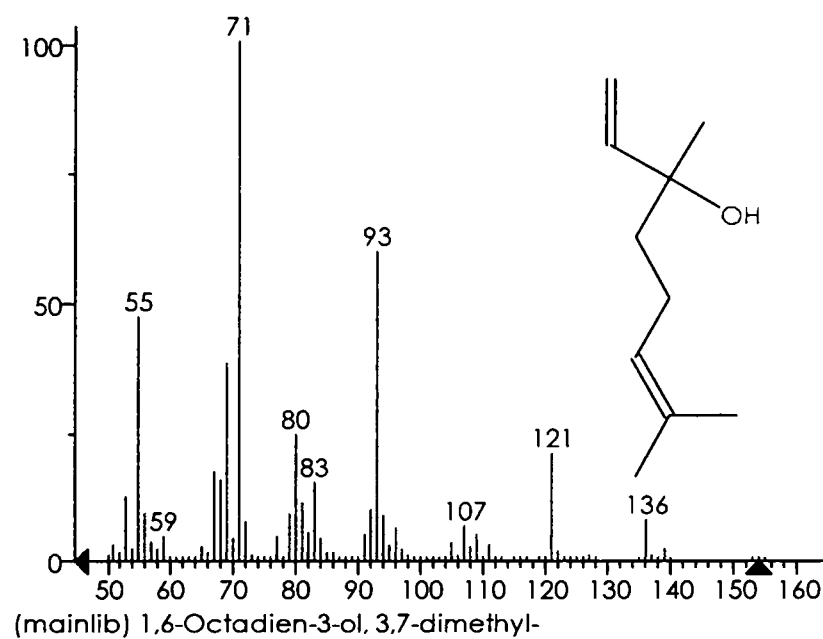
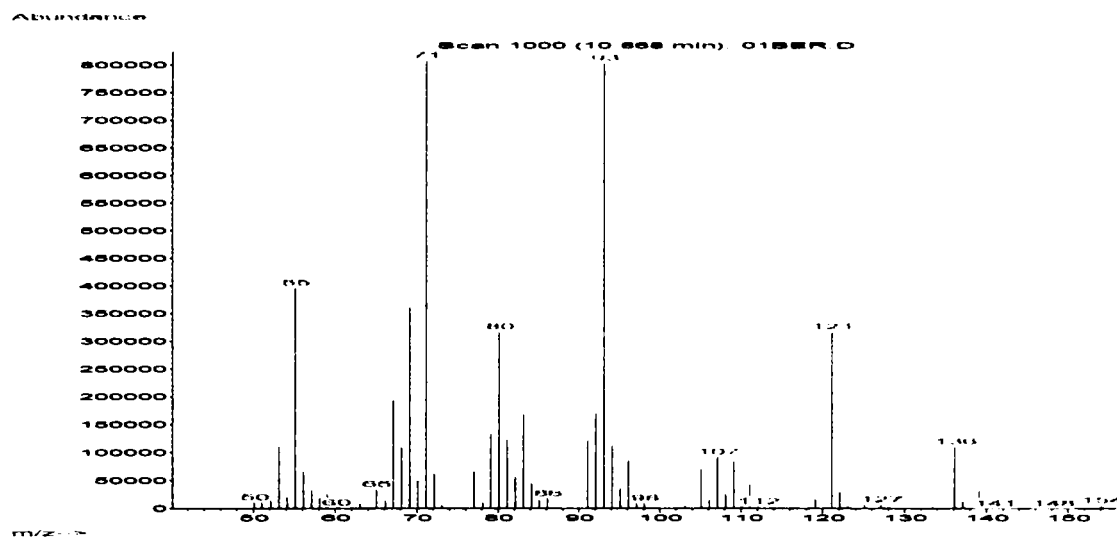


Figura 3.72. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru linalool.

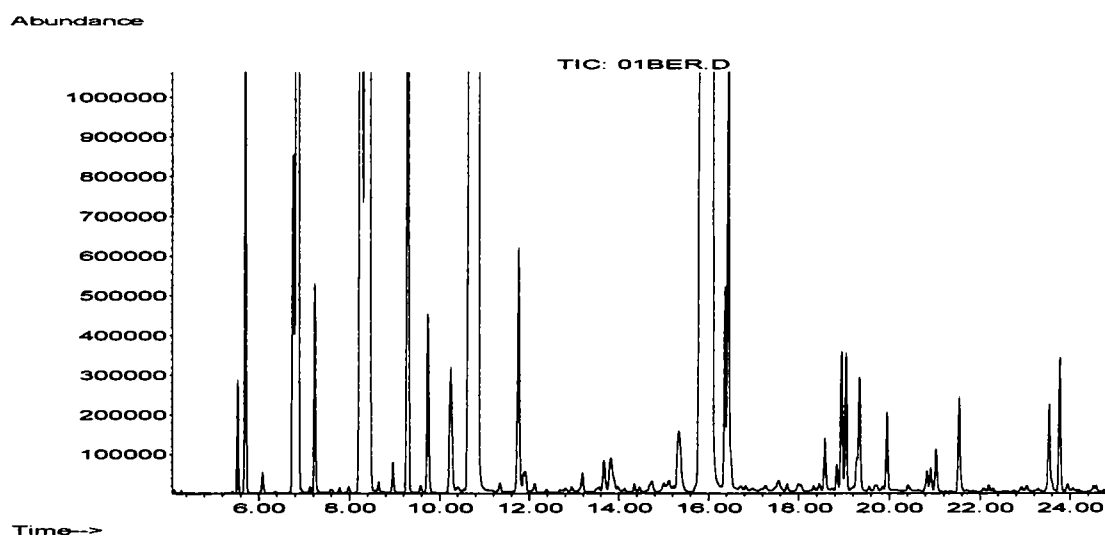


Figura 3.73. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de bergamot.

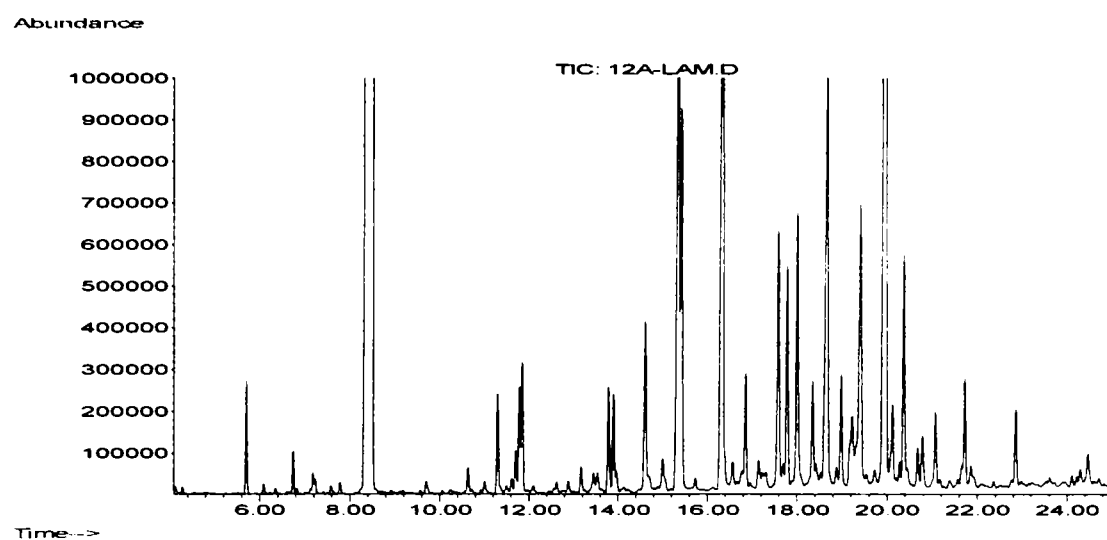


Figura 3.74. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de lămâie.

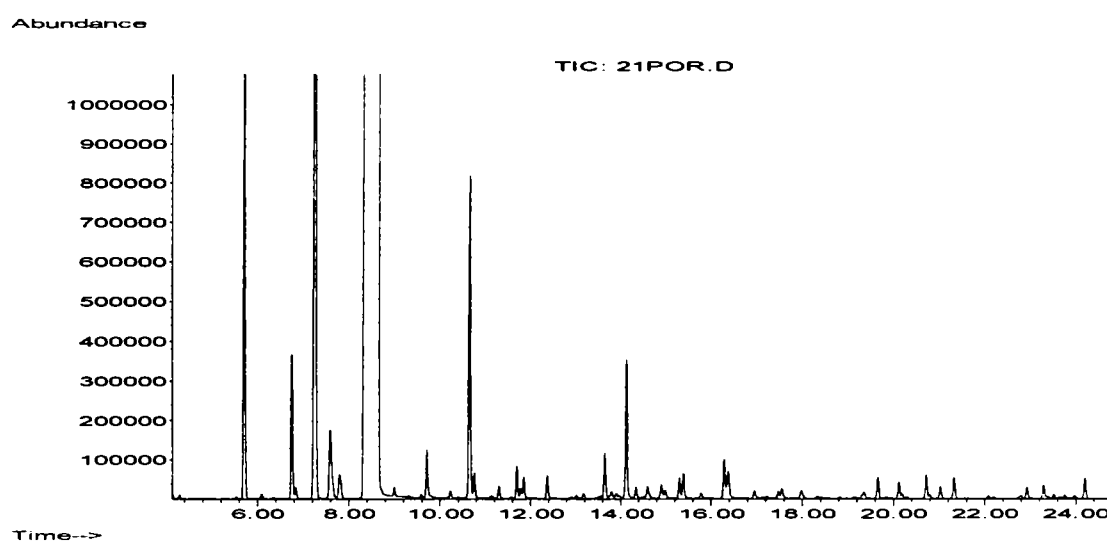


Figura 3.75. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de portocale.

3.3.1.4. Familia Myrtaceae

Din familia Myrtaceae s-au utilizat doar două uleiuri volatile pentru încapsularea în β -ciclodextrină: uleiul volatil de cuișoare și cel de eucalipt. Randamentul de încapsulare a fost relativ ridicat în cazul uleiului volatil de eucalipt (84.12%), în timp ce complexul cu ulei volatil de cuișoare s-a obținut doar cu randamente medii (62.17%). Procentul de ulei volatil încapsulat, rezultat din analiza TG-DTG a fost de 8.76% în cazul uleiului volatil de cuișoare și 7.52% în cazul celui de eucalipt (figura 3.76).

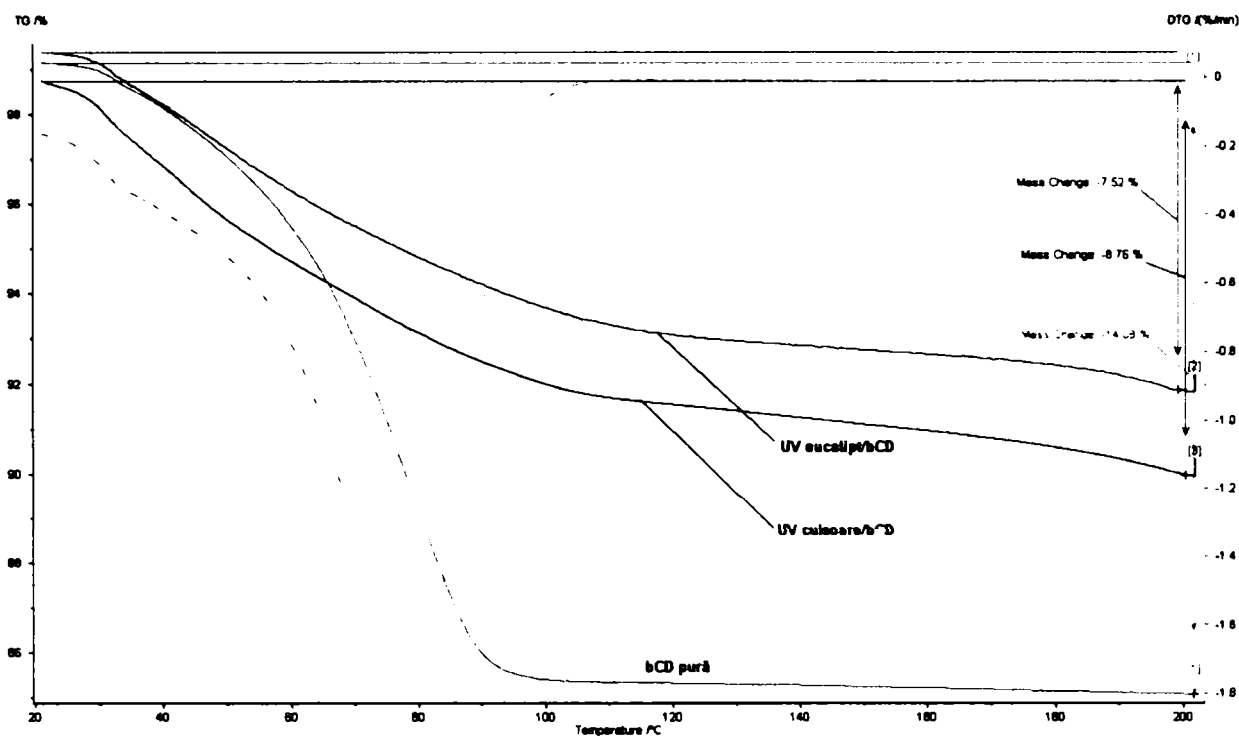


Figura 3.76. Analiza TG-DTG a complexilor β -ciclodextrinei cu uleiuri volatile de plante din familia Myrtaceae.

Analiza GC-MS a uleiului volatil de cuișoare a condus la separarea unui număr de 81 de compuși volatili (figura 3.77), **principalul component fiind eugenolul** (77.97%, figura 3.78); s-a mai identificat β -cariofilenul (13.54%), humulenul (3.68%) și compusul de epoxidare al cariofilenului (1.37%). În urma analizei GC-MS a uleiului volatil recuperat din complexul cu β -ciclodextrină (figura 3.79) s-a putut determina concentrația relativă a principalilor componenți încapsulați, interesant fiind faptul că eugenolul (compus fenolic) a fost încapsulat la o concentrație relativă interioară celei din uleiul inițial, o concentrație însemnată determinându-se pentru β -cariofilen (tabel 3.20).

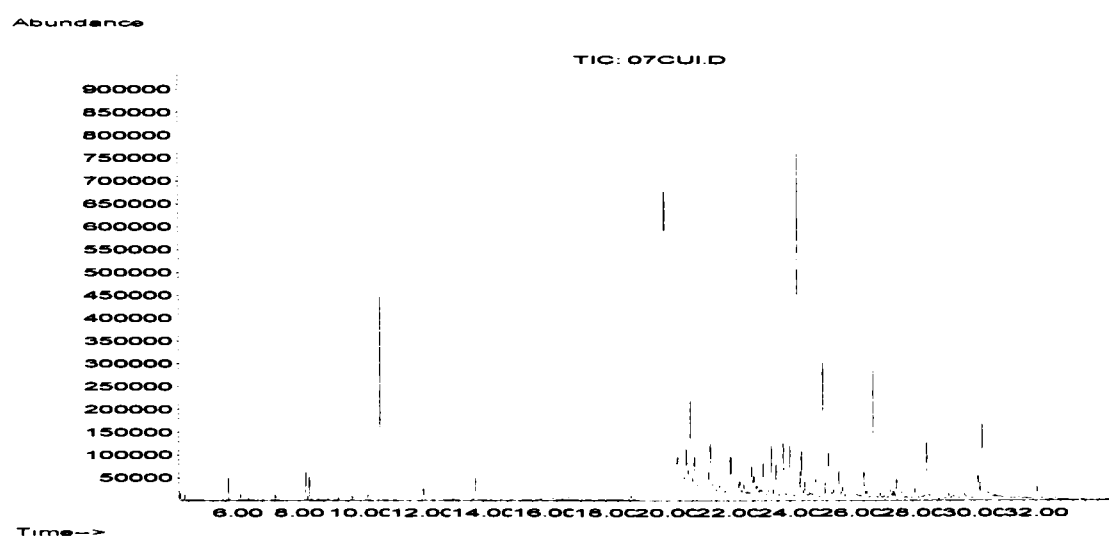


Figura 3.77. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de cuișoare.

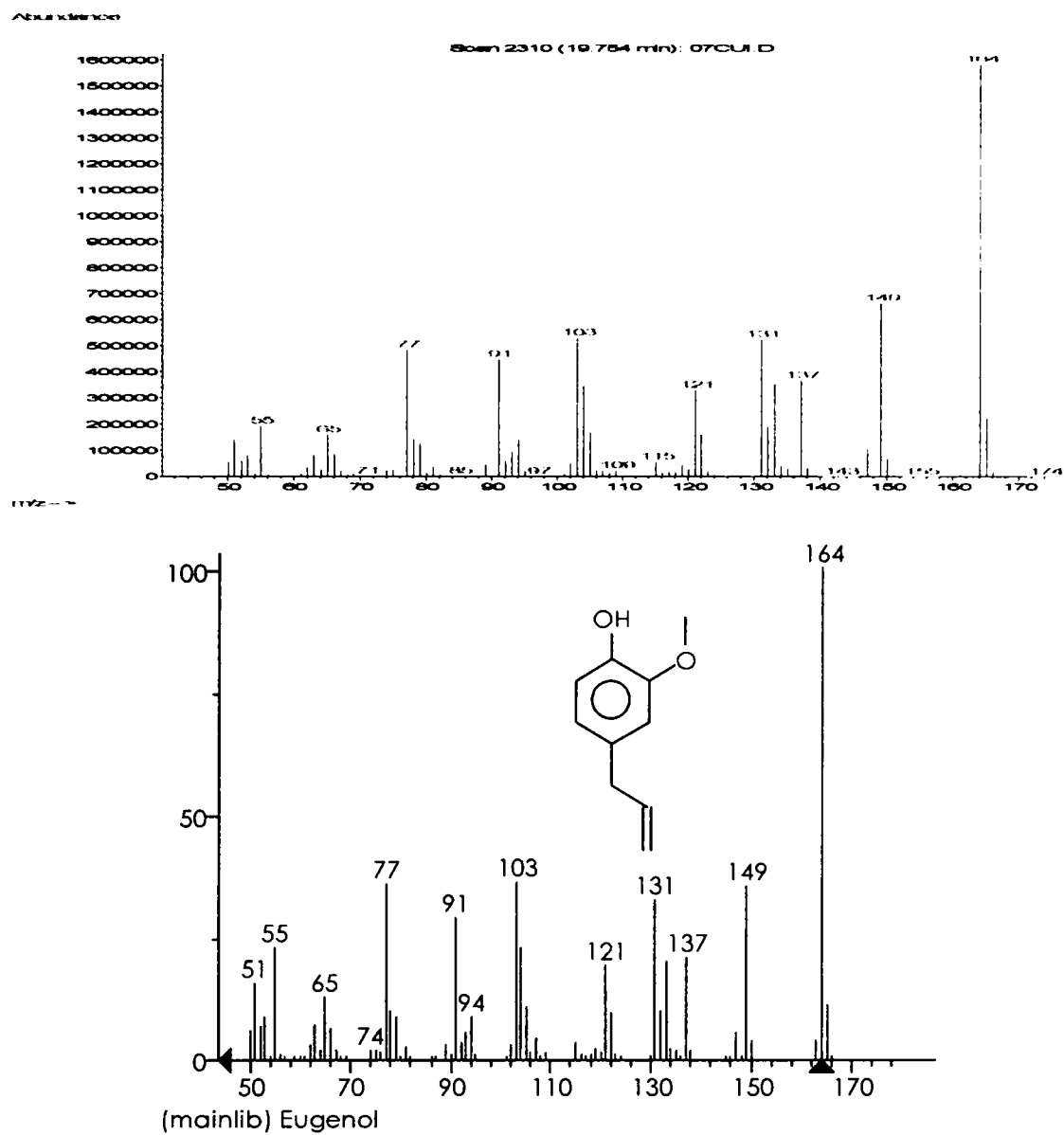


Figura 3.78. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru eugenol.

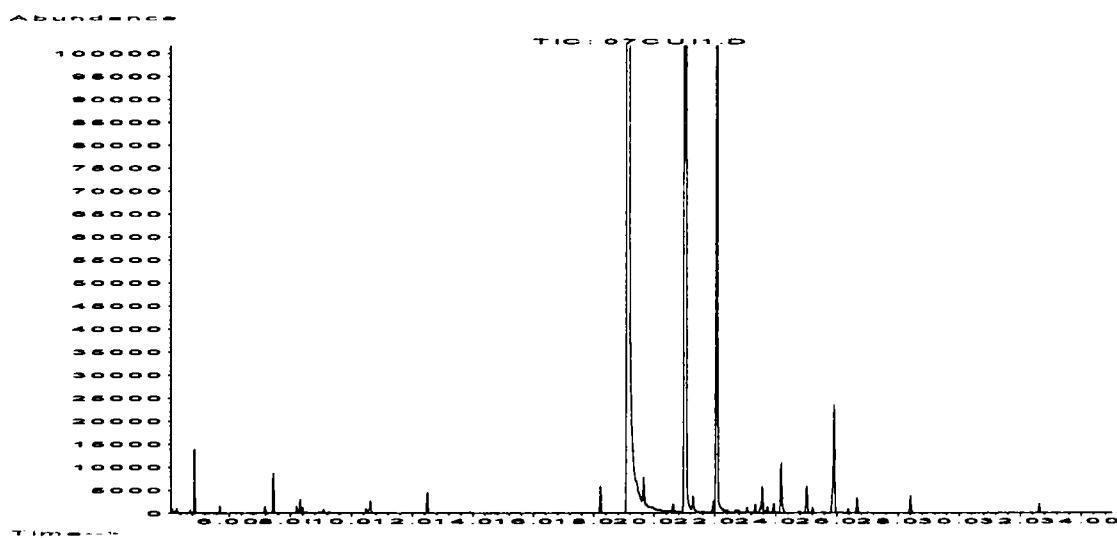
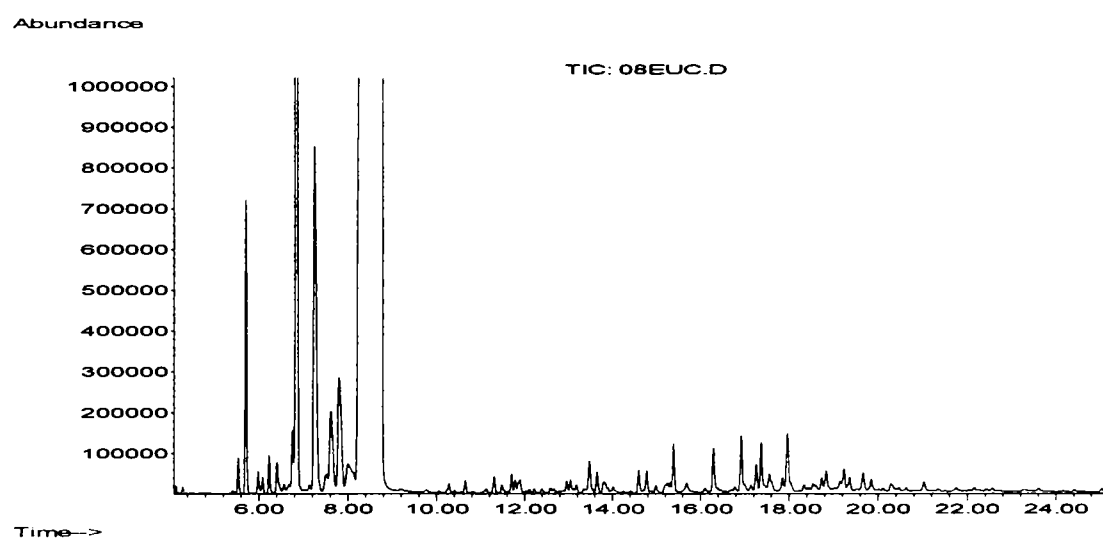


Figura 3.79. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de cuișoare recuperat din complexul cu β -ciclodextrină.

Tabel 3.20. Compoziția uleiului volatil de cuișoare și compoziția relativă a principalilor componenți încapsulați.

Nr.	Identificare MS	Indice Kovats (KI)	Conc. UV proaspăt (%)	Conc. UV recuperat (%)	$\frac{C_{UV \text{ proaspăt}}}{C_{UV \text{ recuperat}}}$
1	<i>o</i> -Cymene	1026	0.04	0.03	0.84
2	<i>trans</i> -beta-Ocimene	1040	0.003	0.07	
3	beta-Linalool	1103	0.26	0.09	0.33
4	Eugenol	1381	77.97	63.84	0.82
5	Phenol, 2-methoxy-5-(1-propenyl)-, (<i>E</i> -)	1415	0.05	0.01	0.24
6	beta-Caryophyllen	1427	13.54	28.30	2.09
7	Bicyclo[7.2.0]undecane, 10,10-dimethyl-2,6-bis(methylene)-	1432	0.06	0.12	1.86
8	1,4,7,-Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl-, <i>Z,Z,Z</i> -	1458	3.68	5.51	1.50
9	Alloaromadendren	1463	0.02	0.02	0.98
10	beta-Cadinene, (-)-	1476	0.05	0.02	0.33
11	Eudesma-4(14),11-diene	1488	0.05	0.04	0.65
12	alpha-Selinene	1497	0.09	0.05	0.60
13	alpha-Farnesene	1510	0.10	0.04	0.37
14	Caryophyllene oxide	1517	0.10	0.04	0.41
15	delta-Cadinene, (+)-	1526	0.54	0.34	0.62
16	Caryophyllene oxide	1586	1.37	0.79	0.58
17	<i>trans</i> -Z-alpha-Bisabolene epoxide	1601	0.04	0.02	0.47
18	12-Oxabicyclo[9.1.0]dodeca-3,7-diene, 1,5,5,8-tetramethyl-	1611	0.19	0.09	0.46

Uleiul volatil de eucalipt a prezentat un număr de 105 componenți volatili (figura 3.80), cel mai concentrat component fiind **eucaliptolul** (85.64%, figura 3.81); componenții identificați în concentrații mai scăzute au fost pinenul (4.22%) și cimenul (1.78%). Analiza GC-MS a uleiului volatil de eucalipt recuperat din complex (figura 3.82) a indicat o concentrație de eugenol de 73.68%, ceea ce reprezintă un raport subunitar (0.86) între concentrațiile din uleiul recuperat și cel proaspăt. Principalii componenți identificați în acest ulei volatil sunt prezentați în tabelul 3.21.

**Figura 3.80.** Gaz chromatogramă din analiza GC-MS a uleiului volatil de eucalipt.

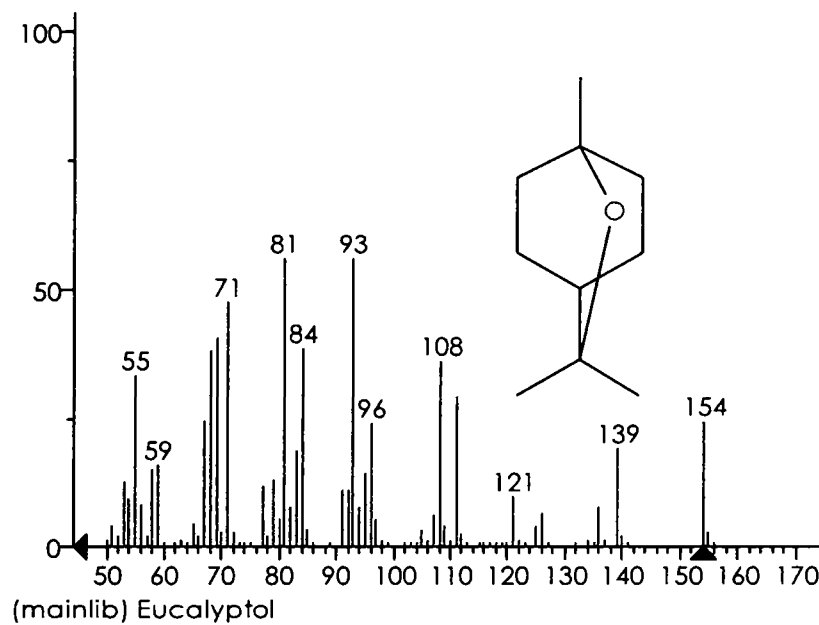
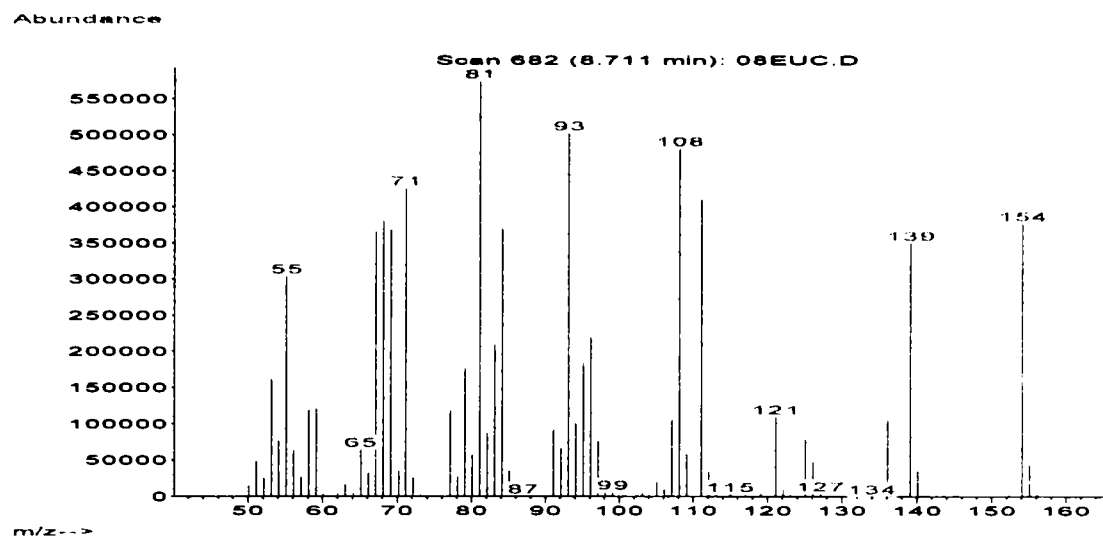


Figura 3.81. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru eucaliptol.

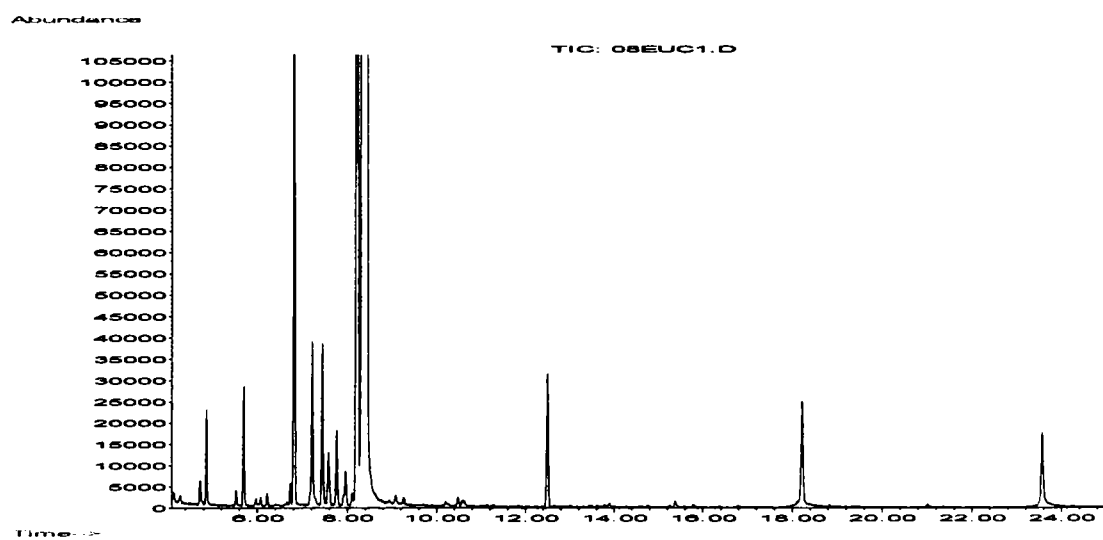


Figura 3.82. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de eucalipt recuperat din complexul cu β -ciclodextrină.

Tabel 3.21. Compoziția uleiului volatil de eucalipt și compoziția relativă a principalilor componenți încapsulați.

Nr.	Identificare MS	Indice Kovats (KI)	Conc. UV proaspăt (%)	Conc. UV recuperat (%)	$\frac{C_{UV \text{ proaspăt}}}{C_{UV \text{ recuperat}}}$
1	alpha-Pinene	936	0.73	0.39	0.53
2	Camphene	951	0.05	0.03	0.69
3	trans-Verbenol	956	0.11	0.05	0.48
4	beta-Phellandrene	976	0.20	0.06	0.32
5	beta-Pinene	979	4.23	1.79	0.42
6	3-Carene	1012	0.65	0.29	0.45
7	gamma-Terpineol	1019	0.24	0.17	0.70
8	Cymene	1028	1.77	9.81	5.53
9	Limonene	1030		12.57	
10	Eucalyptol	1038	85.64	73.68	0.86
11	(-)-Isopulegol	1057	0.01	0.03	4.84
12	Benzene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-	1091	0.04	0.02	0.63
13	Linalool	1103	0.04	0.03	0.77
14	(+)-Carvone	1245	0.16	0.03	0.18
15	Caryophyllene	1420	0.04	0.02	0.41
16	Thunbergol	2106	0.01	0.04	3.94

3.3.1.5. Familia Lauraceae

Din familia Lauraceae s-a utilizat un singur ulei volatil, cel de scorțișoară. Complexul acestuia cu β -ciclodextrina s-a obținut cu un randament moderat (67.37%), procentul de ulei volatil încapsulat fiind de 9.73% (figura 3.83).

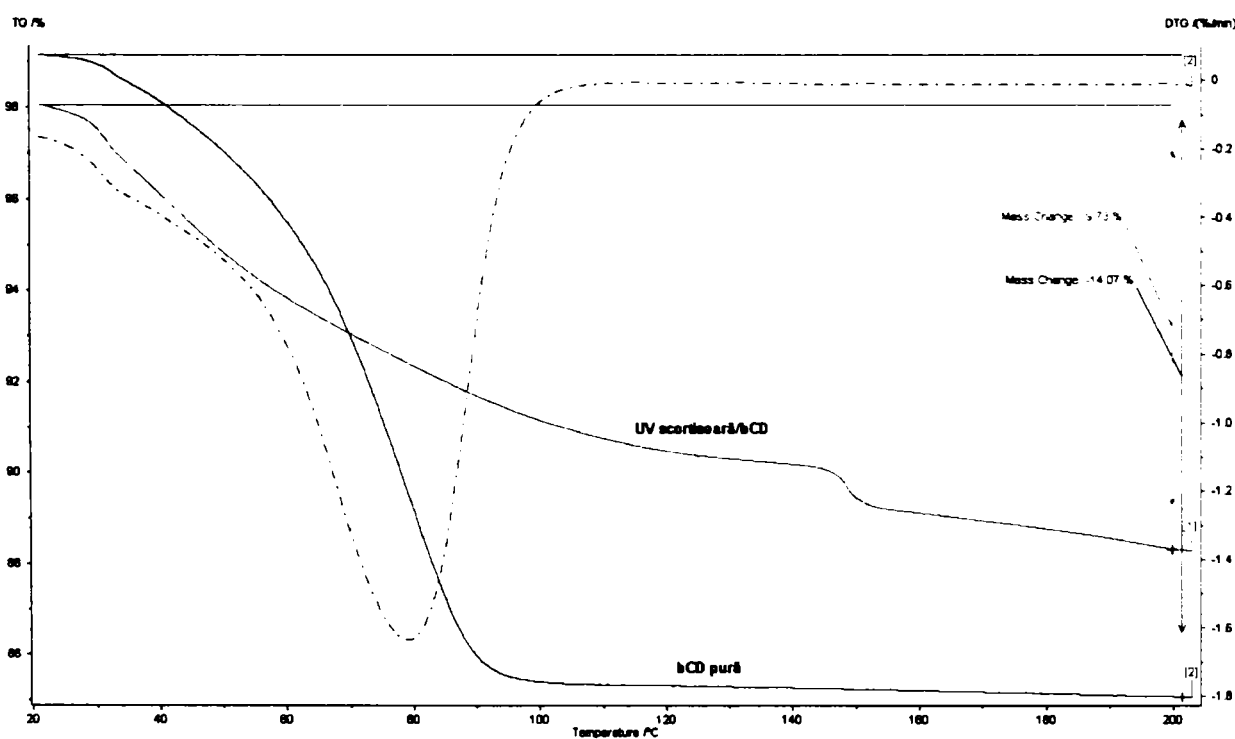


Figura 3.83. Analiza TG-DTG a complexului β -ciclodextrinei cu uleiul volatil de scorțișoară (familia Lauraceae).

Numărul total de compuși volatili separați prin gaz cromatografie (figura 3.84) a fost de 104, cel mai concentrat fiind **cinamaldehyda** (62.31%, figura 3.85), acetatul de cinamil (9.96%, Anexa 2, figura A.2.1), *o*-metoxicinamaldehyda (12.08%, Anexa 2, figura A.2.2) și benzaldehyda (2.4%, Anexa 2, figura A.2.3). Încapsularea a condus la o ușoară concentrare a cinamaldehydei în uleiul recuperat

(raport de 1.12 dintre concentrațiile în uleiul recuperat și cel proaspăt, figura 3.86) și o scădere a concentrației celorlalți compuși minoritari menționați mai sus (tabel 3.22).

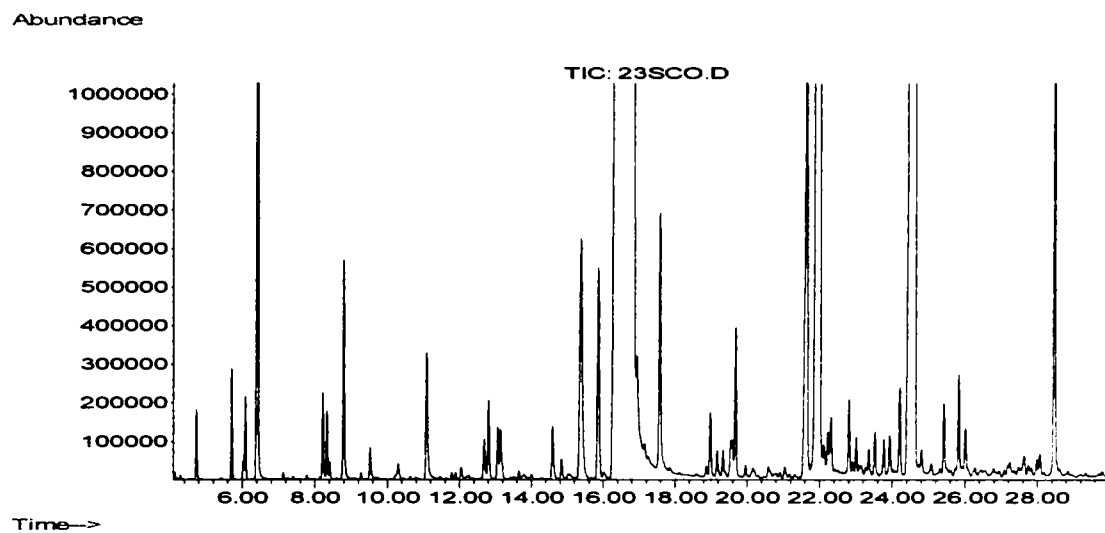


Figura 3.84. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de scorțișoară.

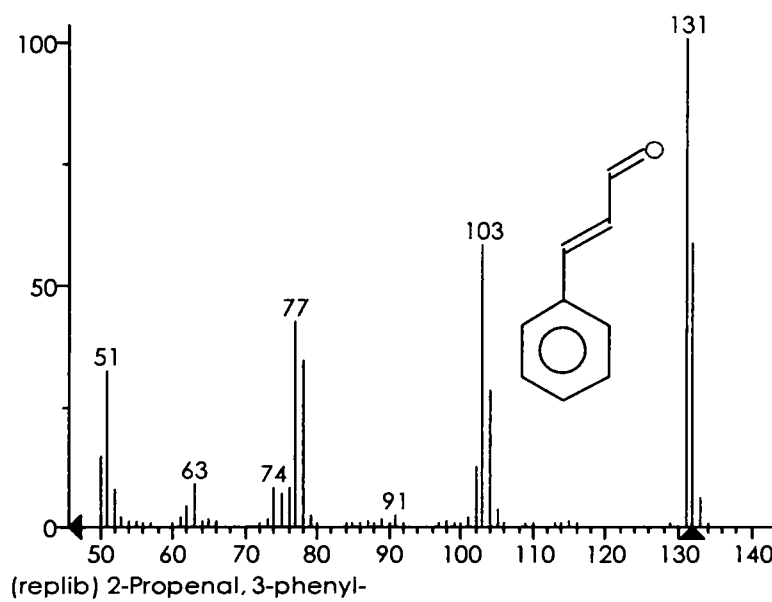
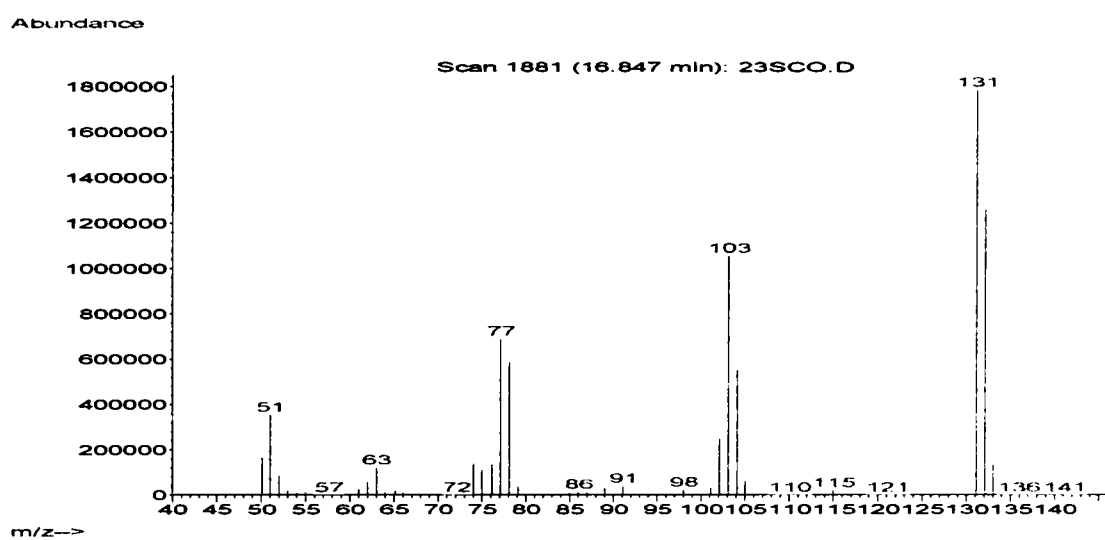


Figura 3.85. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru cinamaldehydă.

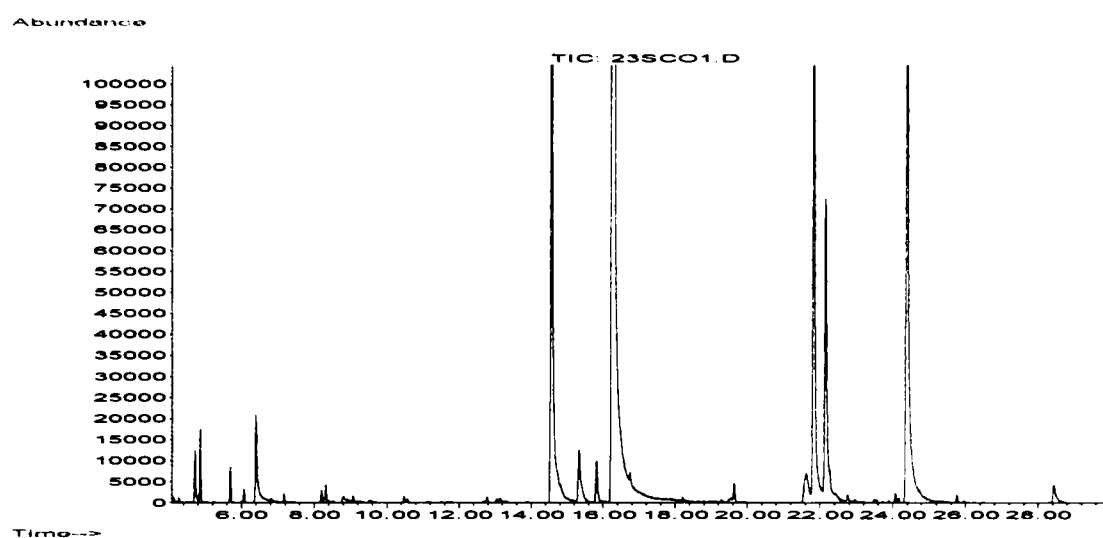


Figura 3.86. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de scorțișoară recuperat din complexul cu β -ciclodextrină.

Tabel 3.22. Compoziția uleiului volatil de scorțișoară și compoziția relativă a principalilor componenți încapsulați.

Nr.	Identificare MS	Indice Kovats (KI)	Conc. UV proaspăt (%)	Conc. UV recuperat (%)	$C_{UV\text{ proaspăt}} / C_{UV\text{ recuperat}}$
1	alpha-Pinene	936	0.17	0.18	1.06
2	Camphene	951	0.14	0.07	0.51
3	Benzaldehide	963	2.41	0.84	0.35
4	5-Hepten-2-one, 6-methyl-	989	0.02	0.02	1.47
5	p-Cymene	1026	0.15	0.07	0.45
6	Limonene	1030	0.12	0.13	1.10
7	Salicylaldehyde	1045	0.45	0.04	0.09
8	Acetophenone	1068	0.08	0.02	0.29
9	o-Guaiacol	1092	0.04	0.04	1.02
10	Borneol	1168	0.17	0.04	0.22
11	2-Methylcumarone	1175	0.11	0.03	0.29
12	o-Anisaldehyde	1244	0.92	0.72	0.79
13	beta-Phenethyl acetate	1259	0.59	0.40	0.67
14	Cinnamaldehyde	1289	62.31	69.67	1.12
15	(-)-alpha-Copaene	1377	0.32	0.14	0.44
16	Coumarin	1440	1.75	0.65	0.37
17	Cinnamyl alcohol, acetate	1452	9.96	6.54	0.66
18	gamma-Cadinene	1478	0.16	0.06	0.40
19	alpha-Curcumene	1485	0.07	0.02	0.35
20	alpha-Muurolene	1502	0.11	0.03	0.24
21	gamma-Cadinene!	1516	0.08	0.07	0.84
22	(+)-delta-Cadinene	1525	0.21	0.04	0.18
23	Cinnamaldehyde, o-methoxy-	1539	12.09	10.19	0.84
24	(-)-Spathulenol	1581	0.21	0.05	0.23
25	6,7-Dimethoxy-2-tetralone	1675	1.16	0.28	0.24

3.3.1.6. Familia Rosaceae

În urma încapsulării uleiului volatil de trandafir în β -ciclodextrină s-a obținut un randament total al procesului de 72.3%, procentul de ulei volatil încapsulat, determinat din analiza TG-DTG a complexului, fiind de 7.68% (figura 3.87). Principalii compuși identificați în uleiul volatil de trandafir sunt prezentați în tabelul 3.23.

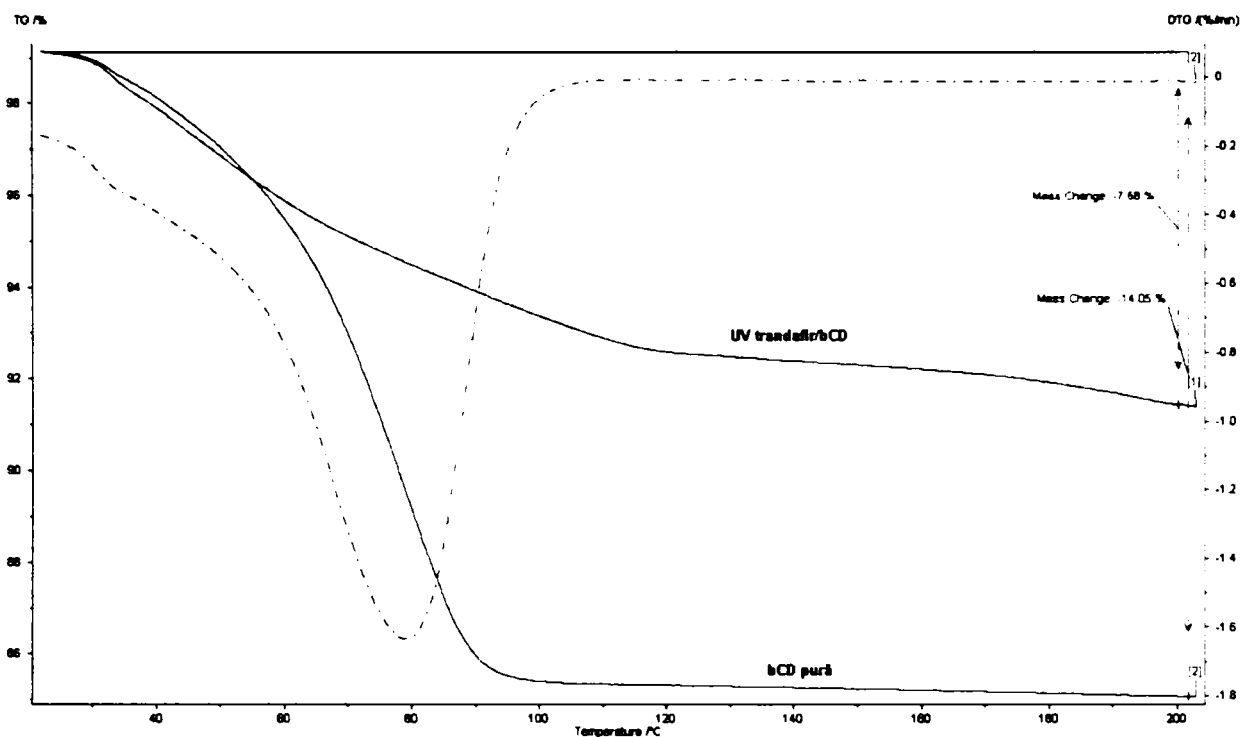


Figura 3.87. Analiza TG-DTG a complexului β -ciclodextrinei cu uleiul volatil de trandafir (familia Rosaceae).

Uleiul volatil de trandafir, singurul achiziționat de pe piața autohtonă, a prezentat un număr foarte mare de compuși la analiza GC-MS, atât în cazul uleiului volatil proaspăt: 153 compuși (figura 3.88), cât și în cazul uleiului volatil recuperat din complex: 66 (figura 3.89). Concentrațiile maxime au fost determinate pentru **alcoolul feniletic** (27.82%, figura 3.90) și **ftalatul de dimetil**, a cărui concentrație a fost de 29.94%. Alcoolul feniletic și ftalatul de dimetil (compuși hidrofilii) a fost încapsulat la concentrații mai reduse decât în uleiul inițial (raport de 0.61 și respectiv 0.38 între cele două concentrații).

Tabel 3.23. Compoziția uleiului volatil de trandafir și compoziția relativă a principalilor componenți încapsulați.

Nr.	Identificare MS	Indice Kovats (KI)	Conc. UV proaspăt (%)	Conc. UV recuperat (%)	C _{UV proaspăt} / C _{UV recuperat}
1	Pinene	936	0.02	0.84	
2	Benzenecarbonal	963	1.51	1.07	0.71
3	Nopinen	978	0.01	0.11	
4	1-Decene	992	0.01	0.12	
5	p-Cimene	1026	0.04	0.42	
6	p-Menth-8-en-1-ol, acetate	1030	0.12	0.44	3.73
7	Benzenecetaldehyde	1047	0.45	0.44	0.98
8	Benzenemethanol, alpha-methyl-	1065	0.02	0.05	2.23
9	Linalool	1103	0.20	0.47	2.34
10	Nonanal	1106	0.05	0.07	1.44
11	Phenylethyl Alcohol	1128	27.82	17.00	0.61
12	3,7-Dimethyl-7-octenal	1156	0.07	0.10	1.42
13	Benzyl acetate	1170	5.17	7.81	1.51
14	Phenethyl alcohol, formate	1179	1.18	2.50	2.12
15	Benzeneformic acid	1189	0.12	0.03	0.26
16	Cyclopropanecarboxamide, N-benzoyloxy-	1194	0.15	0.08	0.52
17	Perhydrogeraniol	1199	0.04	0.04	0.92
18	trans-5-Methyl-2-isopropyl-2-hexen-1-al	1215	0.04	0.10	2.22
19	3-Hexen-2-one, 3,4-dimethyl-, (Z)-	1217	0.42	1.16	2.76
20	1,3-Cyclopentanedione, 2,4-dimethyl-	1227	0.08	0.17	2.29
21	3,7-Dimethyl-6-octen-1-ol (Citronelol)	1234	3.89	8.28	2.13
22	Guaniol	1259	1.89	3.32	1.76
23	(E)-Citral	1273	0.30	0.56	1.84
24	p-Menth-8-en-1-ol, acetate	1283	0.70	2.08	2.95
25	Terpinyl acetate	1288	0.35	1.04	2.97
26	Hexa-hydro-farnesol	1294	0.07	0.06	0.83
27	4,8-Dimethyl-1-nonanol	1298	0.03	0.03	1.17
28	10-Undecenal	1302	0.26	0.41	1.59
29	Geranyl formate	1304	0.11	0.22	2.11
30	alpha,alpha-Dimethylphenethyl acetate	1322	1.32	4.23	3.20
31	Citronellol epoxide (R or S)	1343	0.53	0.30	0.57
32	2-Decanol	1347	0.22	0.49	2.28
33	alpha-Terpinyl acetate	1353	3.72	11.34	3.05
34	Isotridecanol-	1364	0.15	0.71	4.64
35	Geranyl acetate	1386	0.63	1.39	2.22
36	Isotridecanol	1413	0.16	0.24	1.50
37	beta-Citronellal	1419	0.31	0.53	1.72
38	Dimethyl phthalate	1472	29.94	11.31	0.38
39	(+)-Cuparene	1509	1.09	3.74	3.44
40	alpha-n-Methyl ionone	1523	1.11	2.79	2.50
41	Elemol	1553	0.20	0.14	0.66
42	(S)-(+)-Carvone acetate	1570	0.08	0.06	0.69
43	Terpin diacetate, trans-	1586	0.10	0.16	1.62
44	beta-Phenylethyl benzoate	1855	0.14	0.11	0.78

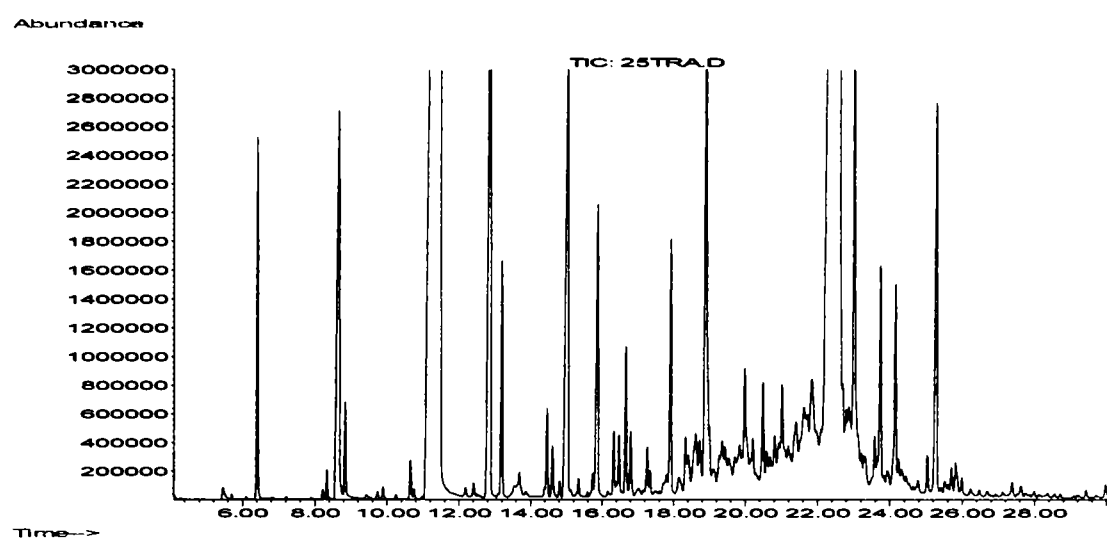


Figura 3.88. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de trandafir.

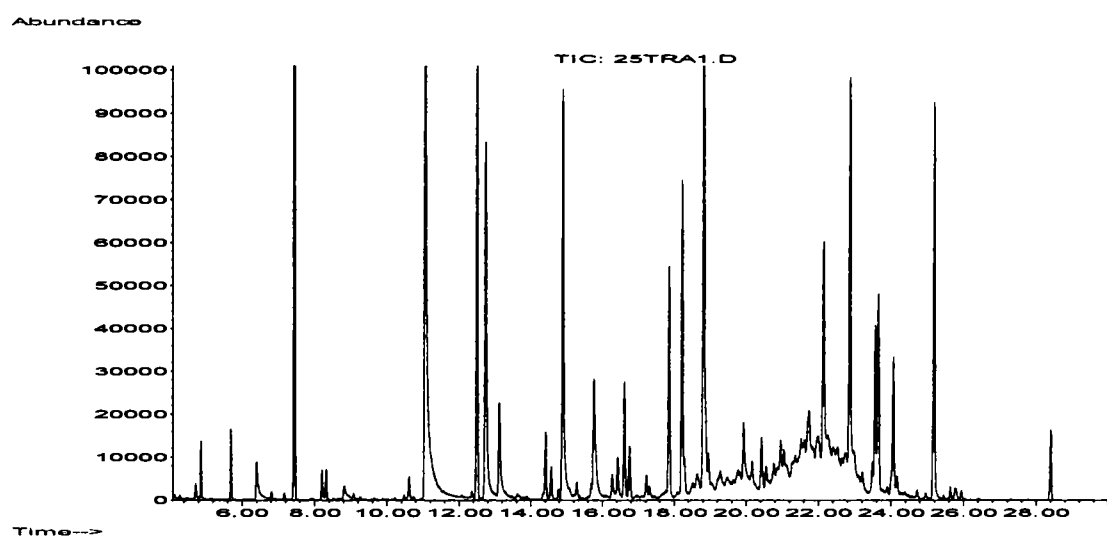


Figura 3.89. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de trandafir recuperat din complexul cu β -ciclodextrină.

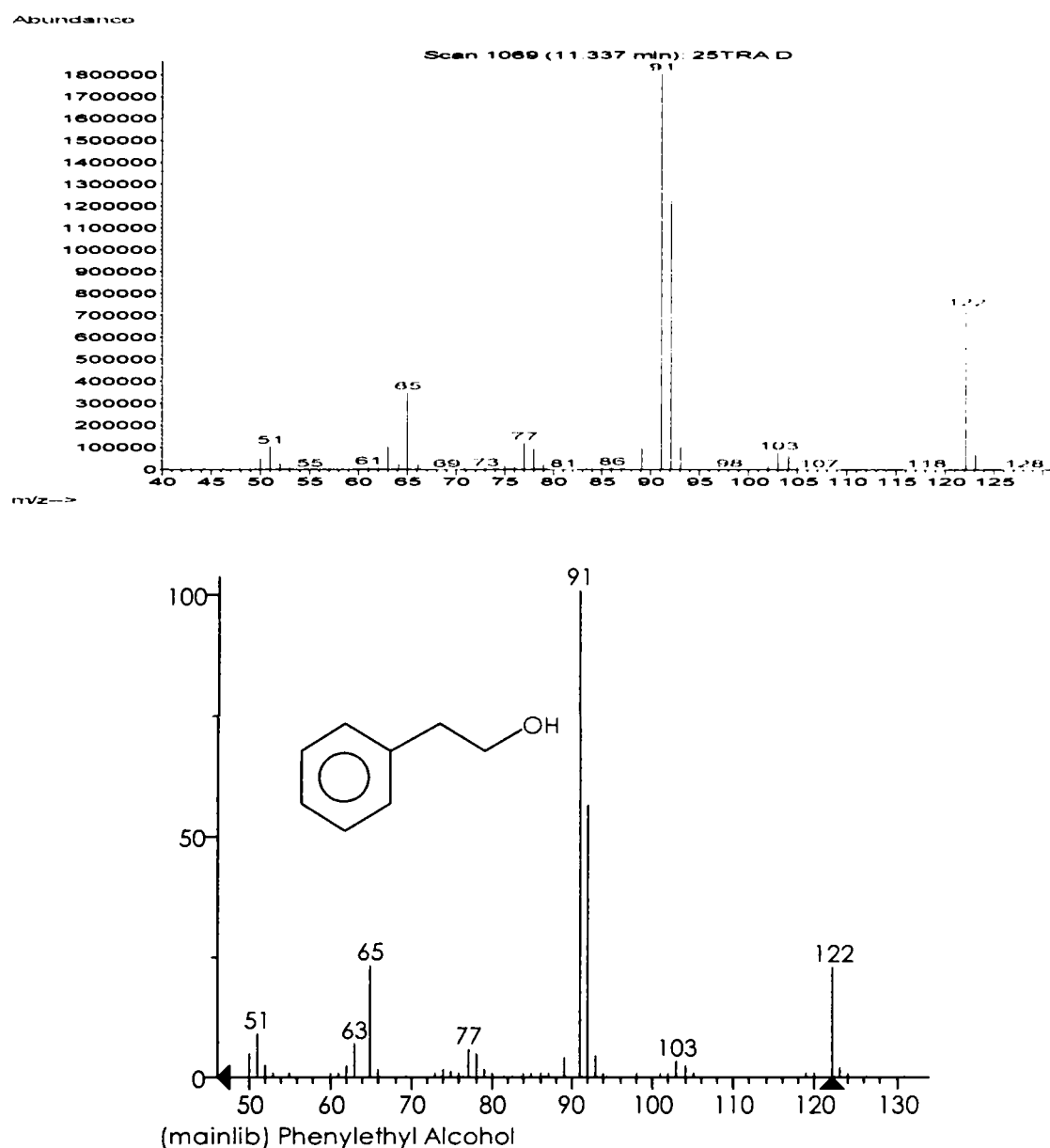


Figura 3.90. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru alcoolul feniletic.

3.3.2. Nanocapsule uleiuri volatile de plante din clasa Monocotyledoneae/ β -ciclodextrină

Din clasa Monocotyledoneae s-a studiat doar o singură specie din familia Liliaceae (usturoiul-*Allium sativum* L.). Complexul acestuia cu β -ciclodextrina s-a obținut cu un randament de 72.62%. Analiza TG-DTG a complexului ulei volatil de usturoi/ β -ciclodextrină a indicat o concentrație a uleiului volatil încapsulat de 7.7% (determinare efectuată pe intervalul de temperatură 20-210°C), în timp ce β -ciclodextrina eliberează aproape întreaga cantitate de apă de cristalizare până la 95-100°C. Majoritatea uleiului volatil eliberat s-a realizat până la 140°C (5.3%; probabil dialil mono-, di-trisulfuri), și până la 210°C a fost eliberată încă o cantitate corespunzătoare unui procent de 1.8%, datorată probabil oligosulfurilor mai hidrofobe (figura 3.91).

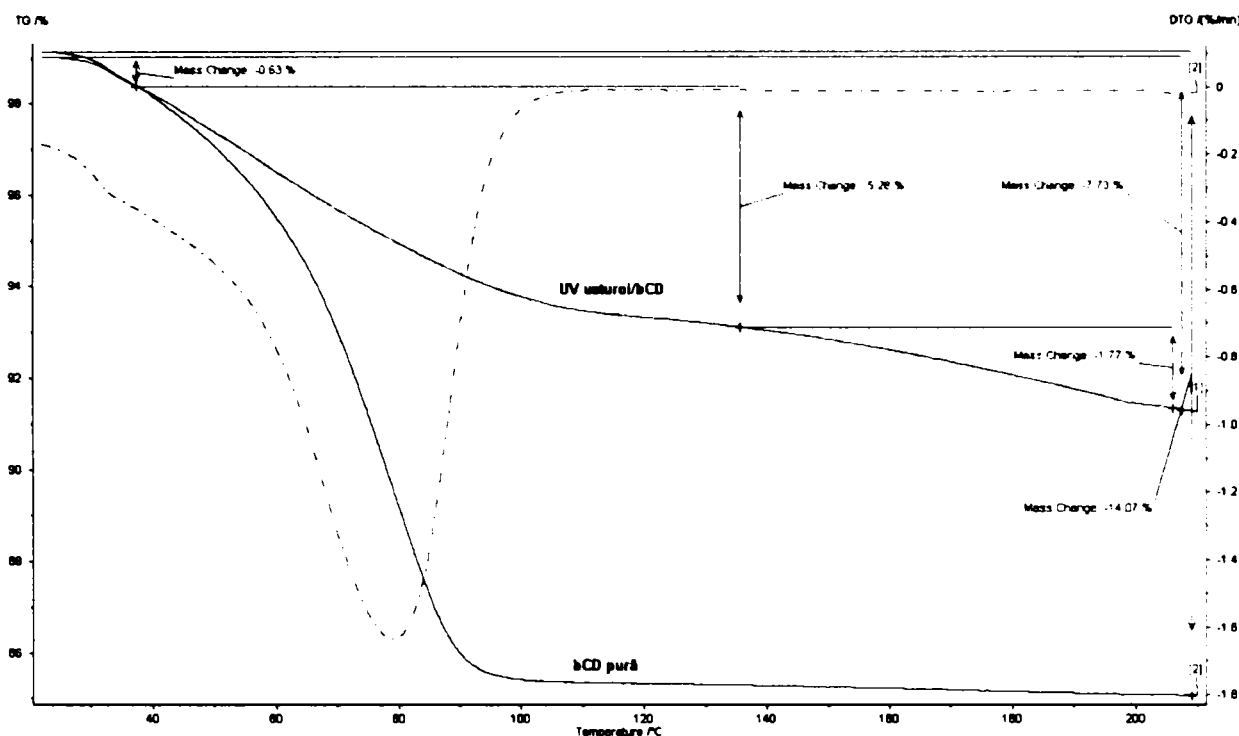


Figura 3.91. Analiza TG-DTG a complexului β -ciclodextrinei cu uleiul volatil de usturoi (familia Liliaceae).

Principalii compuși identificați sunt prezentați în tabelul 3.24. Analiza GC-MS a uleiului volatil de usturoi proaspăt a indicat un număr de 97 de compuși volatili (figura 3.92), majoritatea acestora fiind identificați prin spectrometrie de masă. Compușii identificați în concentrația relativă cea mai mare au fost dialil-disulfura (18.26%, figura 3.93) și dialil-trisulfura (21.18%, figura 3.94). Dialil-tetrasulfura a fost determinată în concentrație de 13.02% (Anexa 2, figura A.2.4), iar compusul asimetric alil-metil-trisulfura a fost identificată în concentrație de 9.35% (Anexa 2, figura A.2.5). În concentrații mai reduse (sub 2.3%) au fost identificate și sulfurile saturate metil-propil-sulfura, dimetil-trisulfura, dipropil-disulfura, dimetiltetrasulfura și 2,2-bis(metiltio)propan. Ceva mai concentrată a fost sulfura ciclică 1,3-ditian (3.94%, Anexa 2, figura A.2.6), în timp ce trisulfura ciclică 1,3,5-tritian a fost în concentrație de doar 1.15%.

Tabel 3.24. Compoziția uleiului volatil de usturoi și compoziția relativă a principalilor compuși încapsulați.

Nr.	Identificare MS	Indice Kovats (KI)	Conc. UV proaspăt (%)	Conc. UV recuperat (%)	$C_{UV\text{ proaspăt}} / C_{UV\text{ recuperat}}$
1	1-(1-Propenylthio)propane	877	0.13		
2	1,3-Dithiane	920	3.94	2.76	0.70
3	Disulfide, methyl propyl	933	0.17		
4	Thiourea, ethyl-	958	0.18		
5	Dimethyl trisulfide	972	2.32	1.30	0.56
6	Diallyl disulphide	1087	18.26	25.82	1.41
7	Disulfide, dipropyl	1108	0.13		
8	Trisulfide, methyl 2-propenyl	1142	9.35	9.34	1.00
9	1,3,5-Trithiane	1153	1.15	0.68	0.59
10	3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-4-ene	1186	0.13		
11	Tetrasulfide/ Pentasulfide, dimethyl	1215	1.38	1.67	1.21
12	Trisulfide, di-2-propenyl	1306	21.18	29.68	1.40
13	Pentasulfide, di-2-propenyl	1382	4.66	3.37	0.72
14	Propane, 2,2-bis(methylthio)-	1444	1.01	0.73	0.72
15	1,5-Dithiaspiro[5.6]dodecan-7-ol	1514	0.78	0.59	0.76
16	Tetrasulfide, di-2-propenyl	1545	13.02	13.55	1.04
17	Trisulfide, di-2-propenyl	1589	0.12	0.30	2.46
18	Propane, 1,1'-thiobis[3-(methylthio)-	1673	0.80	0.46	0.57
19	1-(2-Ethyl-[1,3]dithian-2-yl)-3-methyl-butan-1-ol	1816	3.70	3.16	0.85

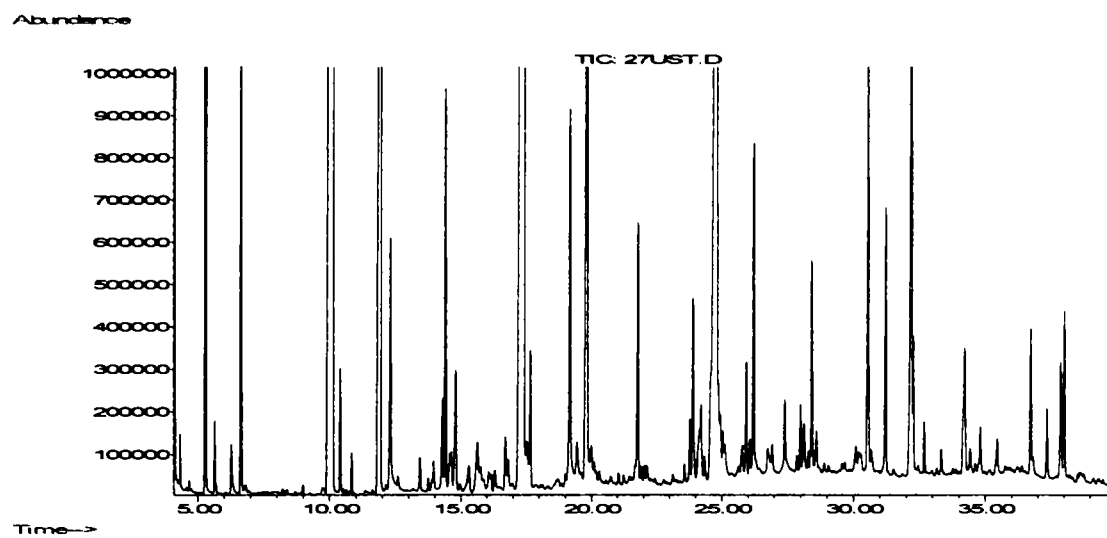


Figura 3.92. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de usturoi.

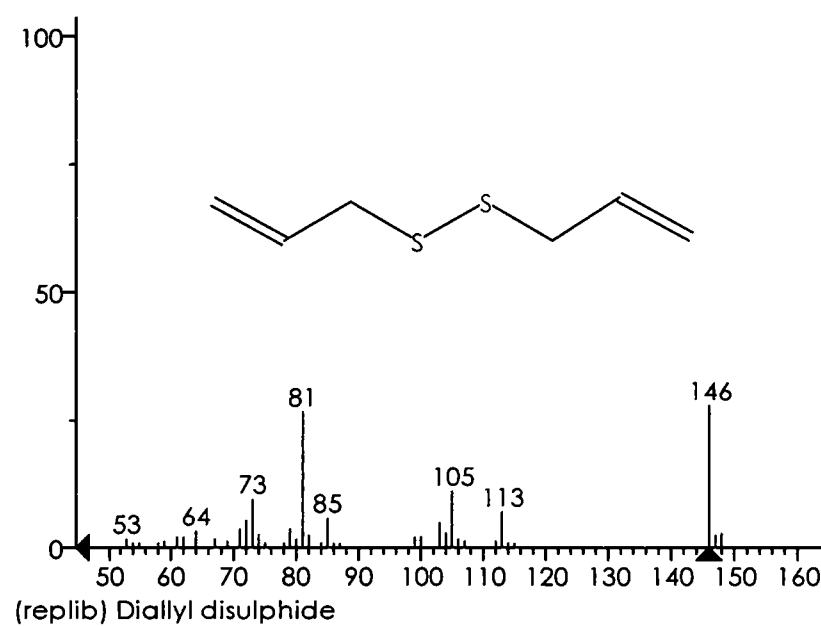
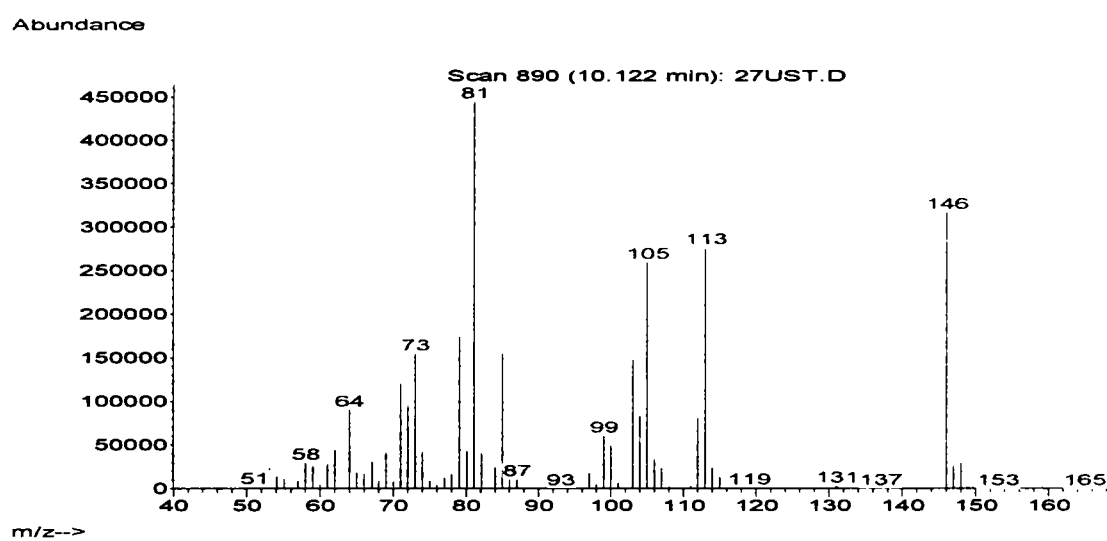


Figura 3.93. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru dialil-disulfură.

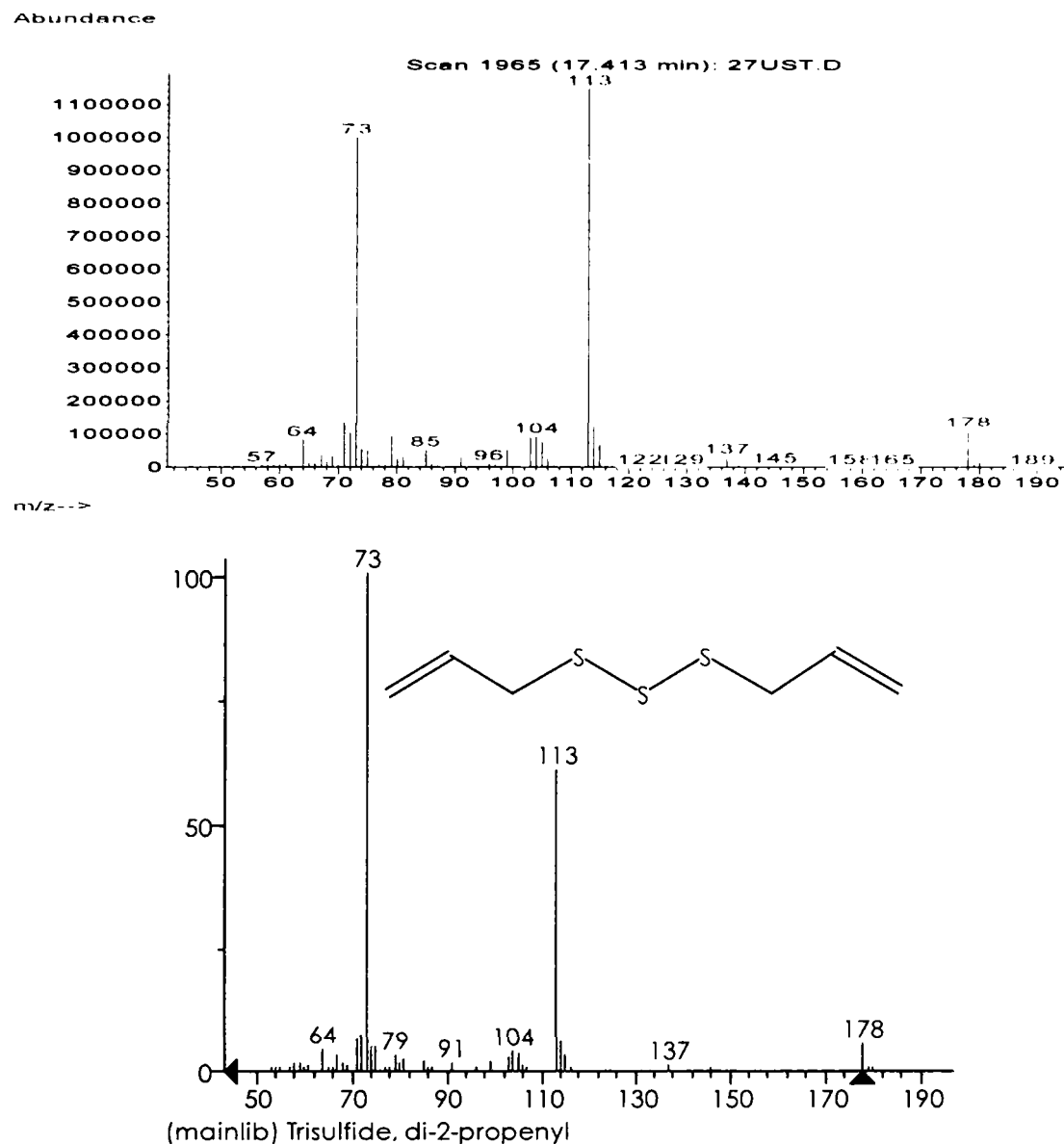


Figura 3.94. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru dialil-trisulfură.

Tot prin analiză GC-MS (a uleiului volatil recuperat din complex prin extracții repetate în hexan, figura 3.95), s-a reușit obținerea concentrațiilor relative a compușilor încapsulați în β -ciclodextrină (tabel 3.24). Sulfurile aciclice au fost încapsulate în concentrații relative superioare în comparație cu cele ciclice. Raportul dintre concentrațiile compușilor volatili în uleiul recuperat și în cel proaspăt a fost supraunitar în cazul dialil-disulfurii (1.41), dialil-trisulfurii (1.40), dialil-tetrasulfurii (1.04) și alil-metil-trisulfurii (1.00), toți acești compuși aparținând clasei polisulfurilor aciclice nesaturate, în timp ce compușii saturați corespunzători (sulfuri aciclice și ciclice) au prezentat astfel de rapoarte subunitare: 0.56 pentru dimetil-disulfură, 0.72 pentru 2,2-bis(metiltio)propan, 0.70 pentru 1,3-ditian și 0.59 pentru 1,3,5-tritian.

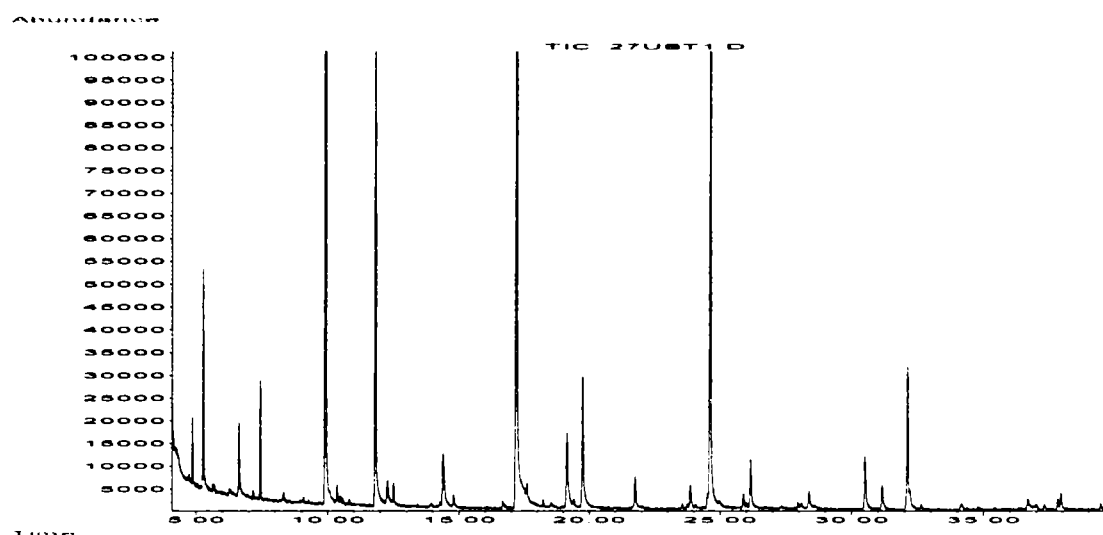


Figura 3.95. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de usturoi recuperat din complexul cu β -ciclodextrina.

3.3.3. Nanocapsule uleiuri volatile de plante din clasa Pinatae/ β -ciclodextrină

Din clasa Pinatae s-au luat în studiu un număr de șase uleiuri volatile din familiile Pinaceae (brad-*Abies alba*, molid-*Picea excelsa* L. și terebentină-*Pistacia terebinthus*) și Cupressaceae (ienupăr-*Juniperus communis* L., ulei volatil din întreaga plantă, din cetină și din fruct). Complecșii cu β -ciclodextrina s-au obținut în modul prezentat în Partea experimentală, analiza complecșilor realizându-se prin termogravimetrie (TG-DTG), iar cea a uleiurilor volatile proaspete sau recuperate (prin extracție repetată cu hexan din complex) prin cromatografie de gaze cuplată cu spectrometrie de masă.

3.3.3.1. Familia Pinaceae

Uleiurile volatile provenite din frunzele arborilor din clasa Pinaceae (brad, molid și terebentină) au fost încapsulate în β -ciclodextrină cu randamente totale ale procesului de peste 70% (72.8% în cazul bradului, 78.06% pentru molid și 81.28% în cazul terebentinei). Analiza TG-DTG (figura 3.96) a indicat o alură asemănătoare a curbelor termogravimetrice, procentele de ulei volatil încapsulat fiind de 8.92% în cazul uleiului volatil de brad, 7.19% pentru cazul uleiului volatil de molid și 7.59% pentru uleiul volatil de terebentină.

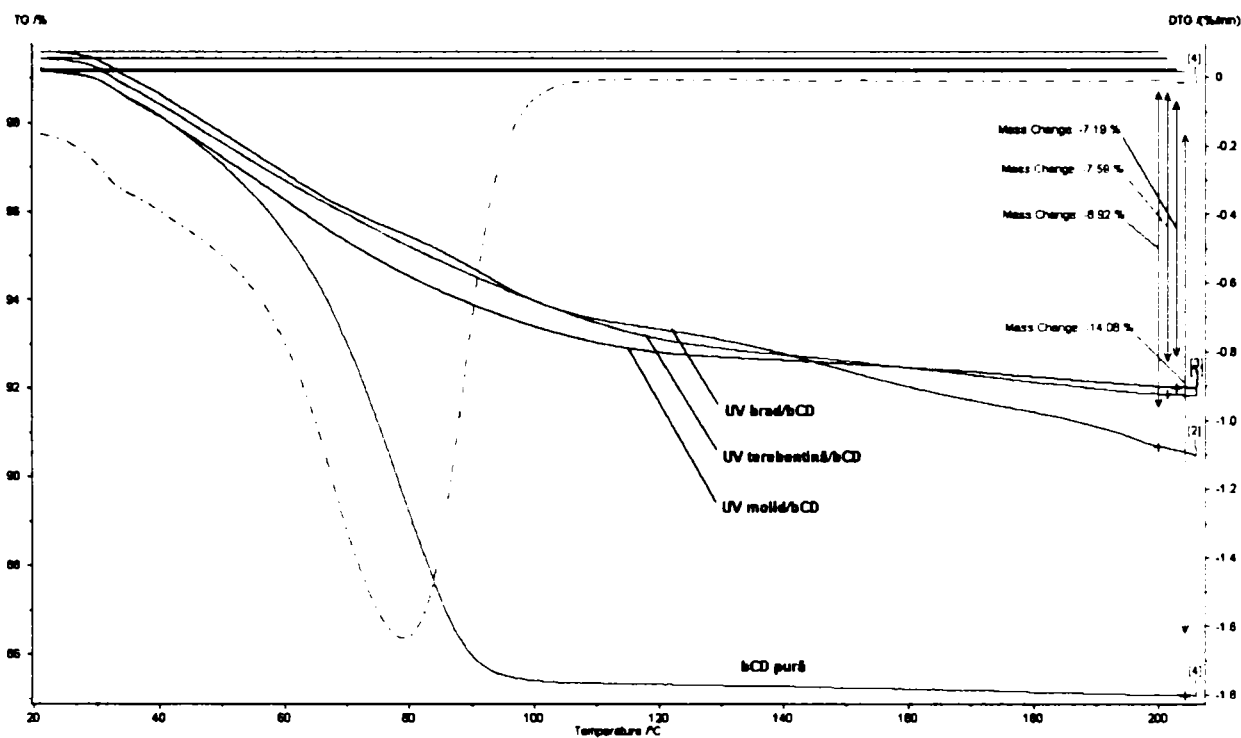


Figura 3.96. Analiza TG-DTG a complexilor β -ciclodextrinei cu uleiurile volatile din frunzele ale arborilor din familia Pinaceae.

Majoritatea componentelor identificați prin GC-MS în uleiurile volatile din familia Pinaceae fac parte din clasa hidrocarburilor monoterpenice. Astfel, din analiza GC-MS a uleiului volatil de brad (figura 3.97), cel mai concentrat a fost limonenul (13.84%, figura 3.98), 3-carenul (13.42%, Anexa 2, figura A.2.7), α - și β -pinenul (9.98% și, respectiv, 3.96%, Anexa 2, figurile A.2.8 și A.2.9), β -felandrenul (5.7%), camfenul (4.05%) și terpinen-4-olul (4.01%); mai apare α - și γ -terpinenul, α -tuienul, mircenul și acetatul de bornil la concentrații între 1 și 4% (tabel 3.25). Din analiza GC-MS a uleiului volatil de brad recuperat din complex (figura 3.99) a rezultat faptul că limonenul, pinenii și esterii terpenici au fost încapsulați la concentrații superioare comparativ cu uleiul inițial, în timp ce alcoolii terpenici au fost încapsulați la concentrații mai reduse (tabel 3.25).

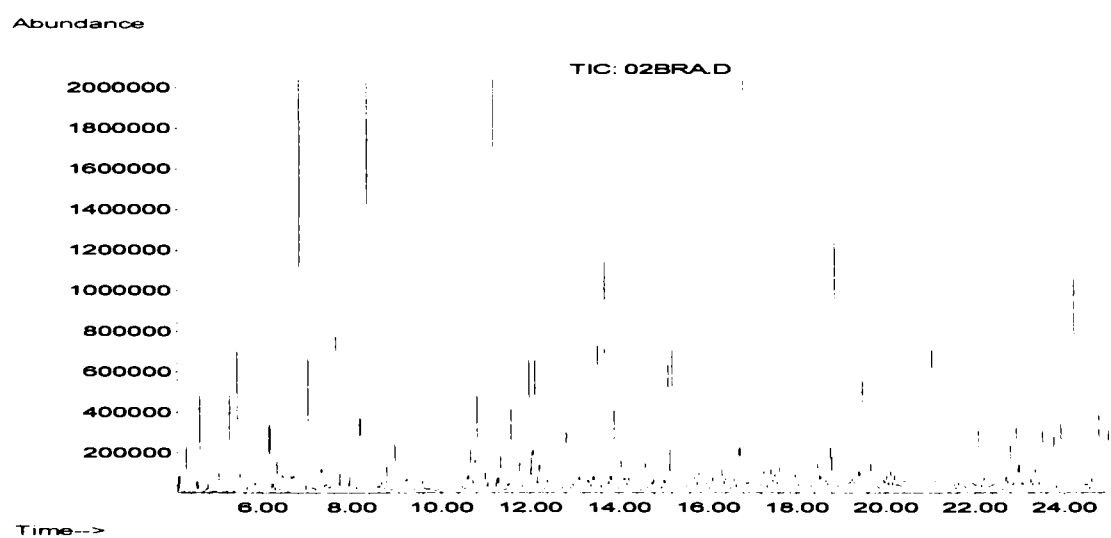


Figura 3.97. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de brad.

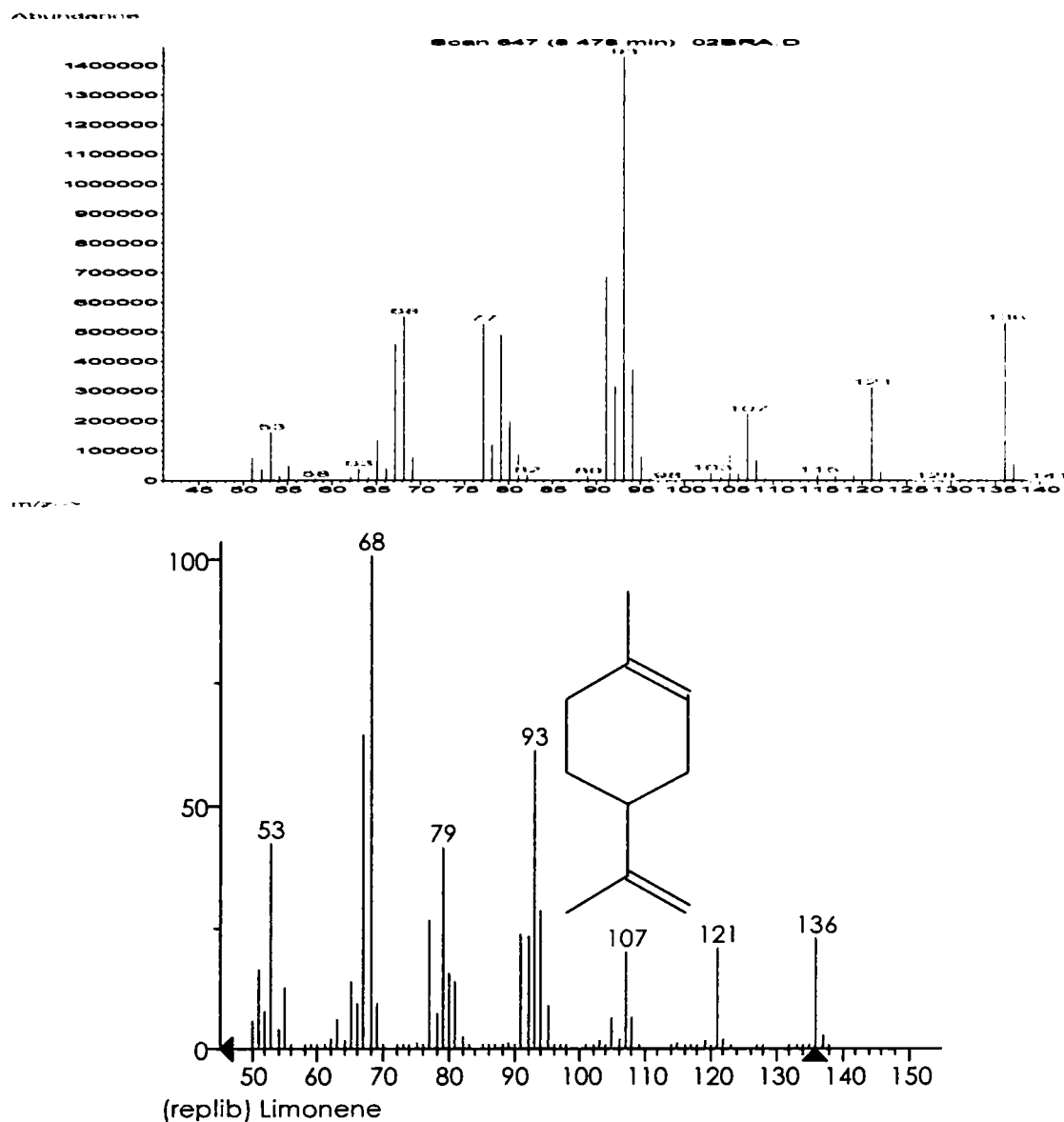


Figura 3.98. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru limonen.

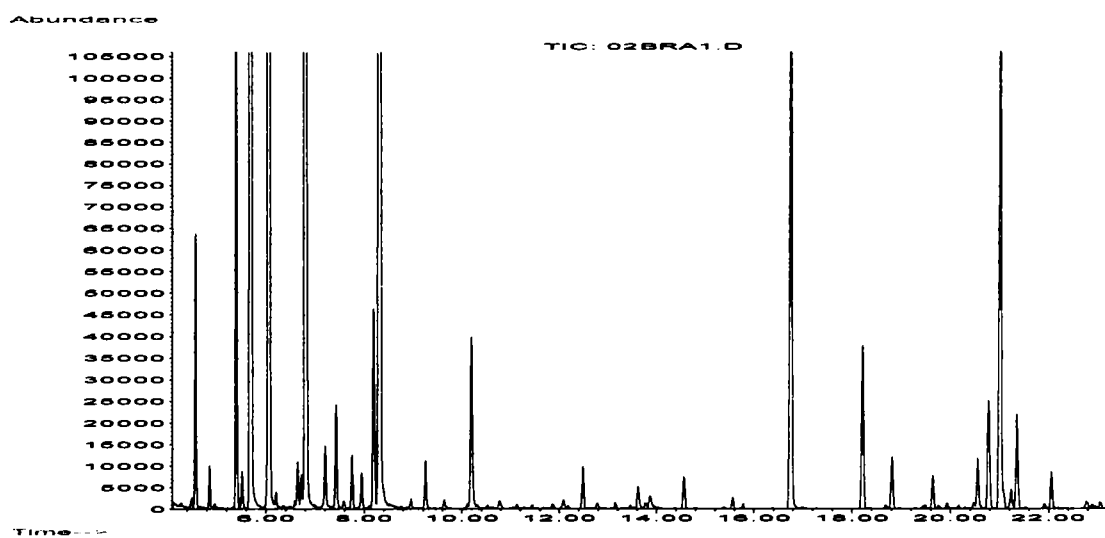


Figura 3.99. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de brad recuperat din complexul cu β -ciclodextrina.

Tabel 3.25. Compoziția uleiului volatil de brad și compoziția relativă a principalilor componenți încapsulați.

Nr.	Identificare MS	Indice Kovats (KI)	Conc. UV proaspăt (%)	Conc. UV recuperat (%)	$\frac{C_{UV\ proaspăt}}{C_{UV\ recuperat}}$
1	Cyclofenchene	885	0.03	0.04	1.22
2	Santene	888	0.25	0.76	3.04
3	Tricyclene	924	0.49	1.77	3.59
4	alpha-Pinene	939	9.98	33.52	3.36
5	Camphene	952	4.05	17.66	4.36
6	<i>trans</i> -Verbenol/1,3-Cyclopentadiene, 5,5-dimethyl-2-propyl-	954	0.13	0.06	0.47
7	Terpinolen	971	0.07	0.15	2.31
8	beta-Phellandrene	977	5.70		
9	beta-Pinene	980	3.96	18.23	4.61
10	Myrcene	994	2.35		
11	alpha-Phellandrene	1007	0.90	0.04	0.05
12	3-Carene	1016	13.42		
13	alpha-Terpinen	1020	3.48		
14	<i>p</i> -Cymene	1025	0.32	0.78	2.47
15	Limonene	1035	13.84	16.53	1.19
16	<i>beta</i> -cis-Ocimene	1051	0.18	0.04	0.23
17	gamma-Terpinen	1062	3.89		
18	3-Thujanone	1108	0.43	0.05	0.11
19	Thujone	1119	1.94		
20	alpha-Campholenal/ <i>trans</i> -bicyclo[4.4.0]decan-1-ol-3-one	1129	0.02	0.02	0.96
21	Carveol (fr.1)	1137	0.11	0.03	0.23
22	3,7,7-Trimethyl-8-(2-methyl-propenyl)-bicyclo[4.2.0]oct-2-ene	1147	0.42	0.05	0.12
23	(-)-Borneol	1168	0.25	0.02	0.10
24	(-)-Terpinen-4-ol	1181	4.01		
25	<i>p</i> -Cymen-8-ol	1189	0.71	0.02	0.02
26	alpha-Terpineol	1194	0.87	0.12	0.13
27	<i>cis</i> -Piperitol/Myrtenal	1197	0.03	0.02	0.86
28	<i>p</i> -Allylanisole (Anethole)	1200	0.30	0.07	0.23
29	Fenchyl acetate	1224	0.06	0.15	2.58
30	Linalyl anthranilate	1257	0.09	0.02	0.20
31	(-)-Bornyl acetate	1287	1.92	3.15	1.64
32	Verbenone	1345	0.01	0.02	1.38
33	alpha-Terpinyll acetate	1351	0.95	0.24	0.25
34	alpha-Copaene	1376	0.11	0.15	1.44
35	Nerolidol, acetate	1385	0.04	0.03	0.78
36	beta-Caryophyllen	1420	0.56	2.61	4.66
37	Dihydrocurcumene	1448	0.03	0.03	0.98
38	alpha-Humulene	1454	0.22	0.18	0.81
39	gamma-Muurolene	1478	0.17	0.05	0.27
40	beta-Cubebene	1482	0.25	0.02	0.07
41	alpha-Himachalene	1484	0.06	0.04	0.60
42	Cadina-1,4-diene	1493	0.04	0.02	0.45
43	(+)-Ledene	1496	0.12	0.03	0.24
44	(+)-alpha-Longipinene/alpha-Muurolene	1501	0.25	0.08	0.32
45	gamma-Cadinene	1515	0.27	0.02	0.07
46	delta-Cadinene	1525	0.86	0.04	0.04
47	Caryophyllene oxide	1584	0.06	0.03	0.53
48	Cembrene	1953	0.06	0.02	0.39

În cazul **uleiului volatil de molid**, principalii compuși identificați prin GC-MS (figura 3.100) au fost în general aceeași și anume: **limonen** (16.48%), **3-careen** (11.07%), **α -pinen** (14.26%), **β -pinen** (10.35%), **camfen** (9.33%), **acetat de bornil** (7.81%) și între 1% și 3% triciclen, mircen, cimen, terpinolen, α -cedren, cariofilen și analogul epoxidat al acestuia. Din analiza GC-MS a uleiului volatil de molid recuperat din complex (figura 3.101) au reieșit aceleași rapoarte supraunitare între concentrațiile componentelor din uleiul recuperat și cele din uleiul proaspăt pentru toate hidrocarburile monoterpene majoritare (1.2 pentru limonen, aproape 1 pentru 3-careen, 1.69 pentru α -pinen, 1.29 pentru β -pinen și 1.27 pentru camfen, toți ceilalți compuși prezentând valori subunitare ale acestor rapoarte, inclusiv acetatul de bornil-0.80; tabel 3.26).

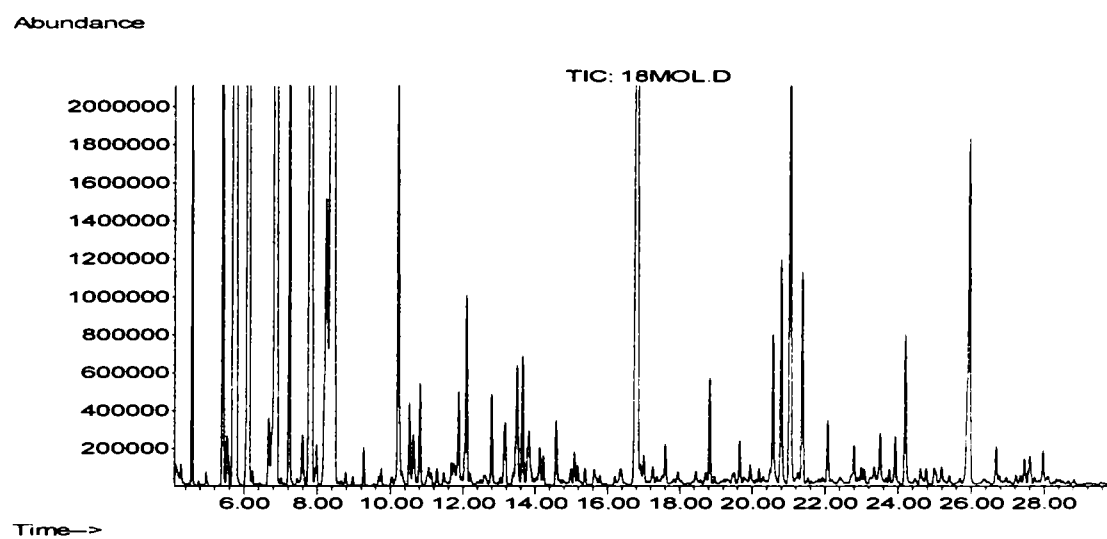


Figura 3.100. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de molid.

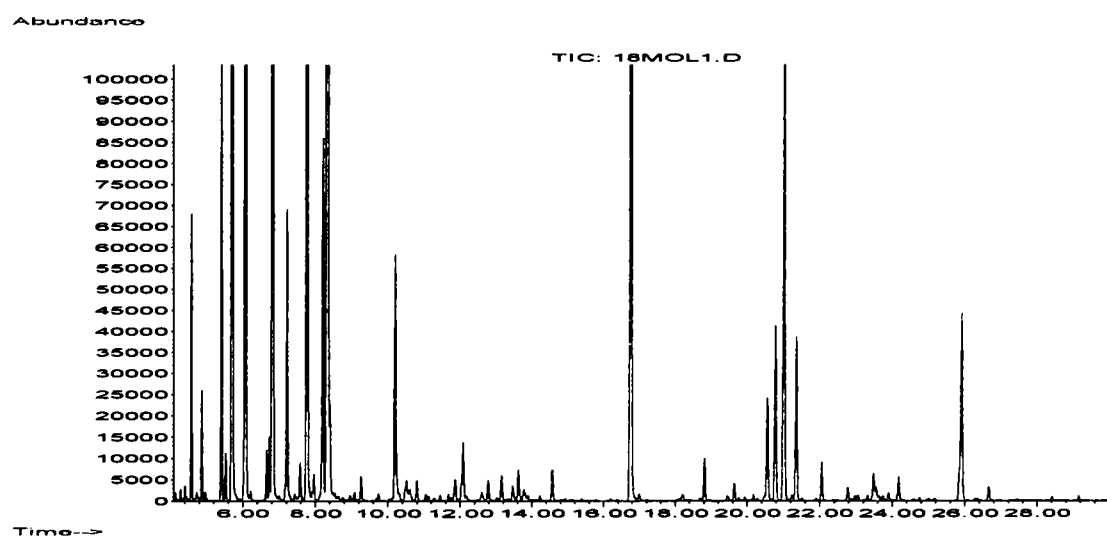


Figura 3.101. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de molid recuperat din complexul cu β -ciclodextrina.

Tabel 3.26. Compoziția uleiului volatil de molid și compoziția relativă a principalilor componenți încapsulați.

Nr.	Identificare MS	Indice Kovats (KI)	Conc. UV proaspăt (%)	Conc. UV recuperat (%)	$C_{UV\text{ proaspăt}} / C_{UV\text{ recuperat}}$
1	Santen	888	1.21	0.70	0.57
2	Tricyclene	924	2.01	1.45	0.72
3	Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, didehydro deriv.	929	0.26	0.13	0.52
4	alpha-Pinene	939	14.26	24.08	1.69
5	Camphene	953	9.33	11.87	1.27
6	trans-Verbenol	956	0.05	0.03	0.73
7	<i>m</i> -Cymene	972	0.31	0.15	0.49
8	beta-Pinene	981	10.35	13.30	1.29
9	beta-Myrcene	993	1.74	0.98	0.56
10	beta-Pinene!	1005	0.27	0.15	
11	3-Carene/Cyclofenchene	1014	11.07	10.79	0.97
12	alpha-Terpinene	1018	0.16	0.11	0.69
13	<i>p</i>-<i>m</i>-Cymene	1027	2.25	1.36	0.60
14	Limonene	1035	16.48	19.76	1.20
15	gamma-Terpinene	1060	0.13	0.09	0.69
16	Terpinolene	1090	1.69	0.96	0.57
17	alpha-Pinene epoxide	1099	0.32	0.12	0.38
18	beta-Linalool	1102	0.28	0.05	0.18
19	<i>cis</i> -Verbenol	1108	0.42	0.09	0.21
20	<i>trans</i> -(-)-Pinocarveol	1140	0.38	0.10	0.28
21	(<i>S</i>)- <i>cis</i> -Verbenol	1146	0.82	0.29	0.36
22	Isopinocampone	1161	0.03	0.06	1.70
23	Borneol	1167	0.36	0.08	0.22
24	1-Terpinen-4-ol	1178	0.37	0.11	0.29
25	<i>p</i> -Cymen-8-ol	1188	0.63	0.08	0.12
26	alpha-Terpineol	1193	0.52	0.13	0.26
27	Myrtenol	1198	0.24	0.07	0.28
28	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,3,3-trimethyl-, acetate, (1 <i>S</i> - <i>exo</i>)-	1221	0.29	0.13	0.46
29	(-)-Bornyl acetate	1289	7.81	6.21	0.80
30	(-)-Myrtenyl acetate	1294	0.13	0.04	0.27
31	delta-Elemene	1350	0.45	0.18	0.40
32	alpha-Copaene	1376	0.18	0.08	0.41
33	(+)-Longifolene	1405	0.69	0.48	0.70
34	alpha-Cedrene	1413	1.05	0.78	0.74
35	beta-Caryophyllen/Isocaryophyllene	1421	2.92	2.26	0.77
36	Thujopsene	1431	0.93	0.72	0.77
37	alpha-Humulene	1454	0.28	0.16	0.55
38	gamma-/alpha-Muurolene	1481	0.03	0.06	2.19
39	alpha-Muurolene!	1501	0.25	0.15	0.57
40	gamma-Cadinene	1515	0.20	0.04	0.21
41	(+)-delta-Cadinene	1524	0.66	0.11	0.17
42	Caryophyllene oxide	1585	2.09	0.98	0.47

În cazul uleiului volatil de terebentină, cel mai concentrat component rezultat la analiza GC-MS (figura 3.102) a fost α -pinenul (44.63%), urmat de β -pinen (18.19%) și limonen (9.64%); în concentrații mai mici dar semnificative au fost identificate și unele sesquiterpene (cariofilen și epoxidul acestuia, 5.19% și 2.21%, longifolen, 4.25% și α -cubeben, 1.17%). În uleiul recuperat din complex analiza GC-MS (figura 3.103) a relevat faptul că toate sesquiterpenele au fost încapsulate la rapoarte de concentrații relative subunitare, în timp ce hidrocarburile monoterpenice au prezentat valori ale acestor rapoarte apropiate de unitate sau supraunitare (1.54 în cazul celui mai concentrat compus, α -pinenul) (tabel 3.27).

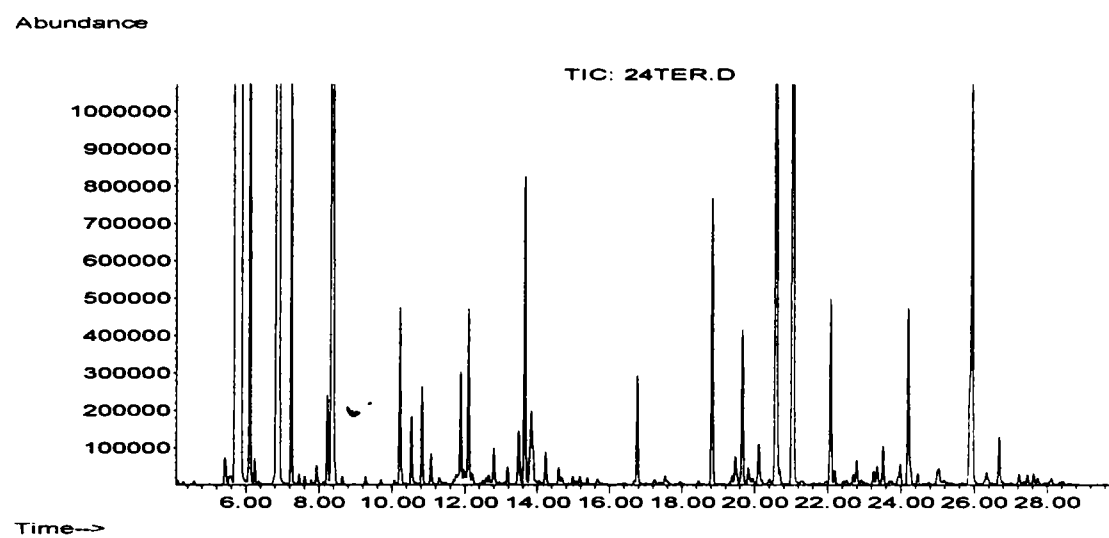


Figura 3.102. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de terebentină.

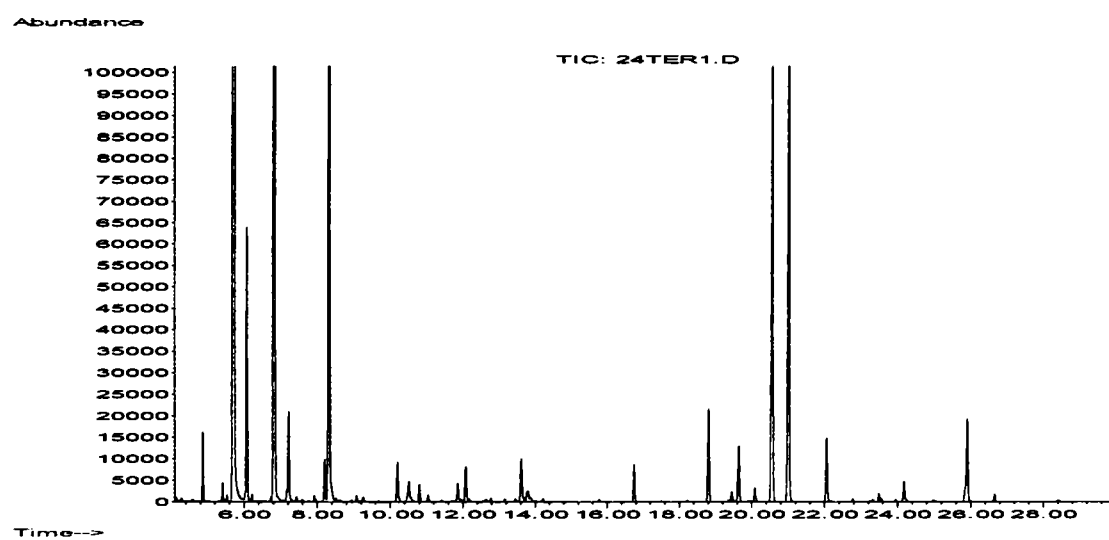


Figura 3.103. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de terebentină recuperat din complexul cu β -ciclodextrina.

Tabel 3.27. Compoziția uleiului volatil de terebentină și compoziția relativă a principalilor componenți încapsulați

Nr.	Identificare MS	Indice Kovats (KI)	Conc. UV proaspăt (%)	Conc. UV recuperat (%)	$C_{UV\text{ proaspăt}} / C_{UV\text{ recuperat}}$
1	Santen	889	0.01	0.01	0.67
2	Tricyclene	925	0.13	0.06	0.47
3	Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, didehydro deriv.	930	0.07	0.02	0.34
4	alpha-Pinene	942	44.63	68.54	1.54
5	Camphene	952	1.96	1.03	0.52
6	<i>trans</i> -Verbenol	957	0.07	0.03	0.37
7	(-)-beta-Pinene	982	18.19	16.52	0.91
8	Myrcene	993	1.31	0.40	0.30
9	<i>trans-p</i> -Menth-2-ene	1001	0.04	0.02	0.50
10	alpha-Thujene	1006	0.04	0.01	0.37
11	1,4-Cineol	1017	0.08	0.04	0.47
12	<i>p</i> -Cymene	1027	0.34	0.18	0.52
13	Limonene	1032	9.64	4.36	0.45
14	4-Carene, (1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-(-)-	1040	0.03	0.01	0.28
15	gamma-Terpinene	1060	0.03	0.02	0.95
16	Terpinolen	1090	0.65	0.19	0.29
17	alpha-Pinene epoxide	1099	0.26	0.16	0.60
18	(<i>S</i>)- <i>cis</i> -Verbenol	1108	0.36	0.08	0.23
19	(+)-Fenchol	1116	0.12	0.03	0.24
20	<i>trans</i> -(-)-Pinocarveol	1140	0.47	0.10	0.21
21	(<i>S</i>)- <i>cis</i> -Verbenol	1147	0.68	0.19	0.27
22	Pinocarvone	1163	0.03	0.01	0.41
23	Borneol	1168	0.15	0.02	0.10
24	4-Terpineol	1179	0.07	0.01	0.18
25	<i>p</i> -Cymen-8-ol	1188	0.27	0.02	0.06
26	alpha-Terpineol	1193	1.19	0.25	0.21
27	Myrtenol	1198	0.50	0.03	0.06
28	1,3,4-Trimethyl-3-cyclohexenyl-1-carboxaldehyde	1205	0.01	0.02	1.65
29	Berbenone	1210	0.14	0.02	0.11
30	(-)-Myrtenyl acetate	1253	0.03	0.01	0.41
31	(-)-Bornyl acetate	1286	0.43	0.18	0.43
32	(-)-alpha-Cubebene	1350	1.17	0.47	0.40
33	(+)-Cycloisositivene	1367	0.03	0.01	0.29
34	Longicyclene	1370	0.15	0.05	0.36
35	(-)-alpha-Copaene	1376	0.65	0.30	0.46
36	(+)-Sativen	1391	0.20	0.07	0.35
37	(+)-Longifolene	1406	4.25	2.42	0.57
38	beta-Caryophyllen	1421	5.19	3.02	0.58
39	alpha-Humulene	1454	0.74	0.33	0.45
40	Cadina-1(10),4-diene	1477	0.11	0.01	0.12
41	Germacrene D-4-ol	1496	0.08	0.01	0.11
42	1-Isopropyl-4,7-dimethyl-1,2,4a,5,6,	1501	0.17	0.04	0.23
43	Cadina-1(10),4-diene	1524	0.81	0.11	0.13
44	Caryophyllene oxide	1585	2.21	0.52	0.23
45	1,5,5,8-Tetramethyl-12-oxabicyclo[9.1.0]dodeca-3,7-diene	1611	0.21	0.04	0.17

3.3.3.2. Familia Cupressaceae

Din această familie s-a luat în studiu doar **uleiul volatil de ienupăr** (*Juniperus communis* L.), însă aceasta a fost analizat în funcție de părțile de arbust de unde a fost separat: întreaga plantă, cetină și fructe. Randamentele de obținere a complexilor ulei volatil de ienupăr/ β -ciclodextrină au fost relativ apropiate (79.43% pentru uleiul volatil din întreaga arbust, 72.55% în cazul uleiului volatil din cetină și 77.97% în cazul celui din fructe). Procentele de ulei volatil determinate prin analiză TG-DTG încapsulat au fost apropiate: 7.1% pentru uleiul volatil din întreaga arbust, 7.8% în cazul celui din cetină și 8.1% pentru cel din fructe de ienupăr (figura 3.104).

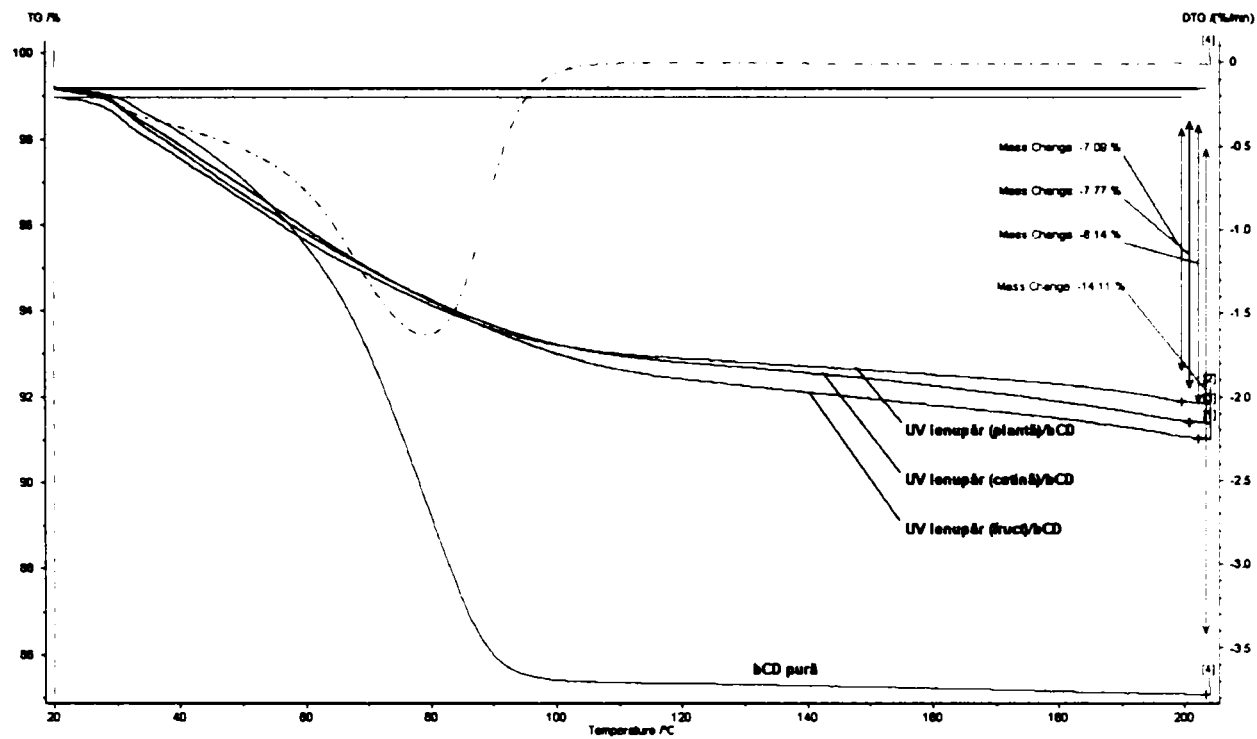


Figura 3.104. Analiza TG-DTG a complexșilor β -ciclodextrinei cu uleiurile volatile din diverse părți ale ienupărului (familia Cupressaceae).

În toate cazurile, prin analiza GC-MS a uleiurilor volatile de ienupăr s-au separat un număr foarte mare de componente volatile (peste 130). Uleiul volatil de ienupăr din tot arbustul a prezentat 152 de picuri cromatografice relevanți (figura 3.105), cel din cetină de ienupăr 134 componente (figura 3.106), iar cel din fructe de ienupăr 164 de picuri cromatografice (figura 3.107).

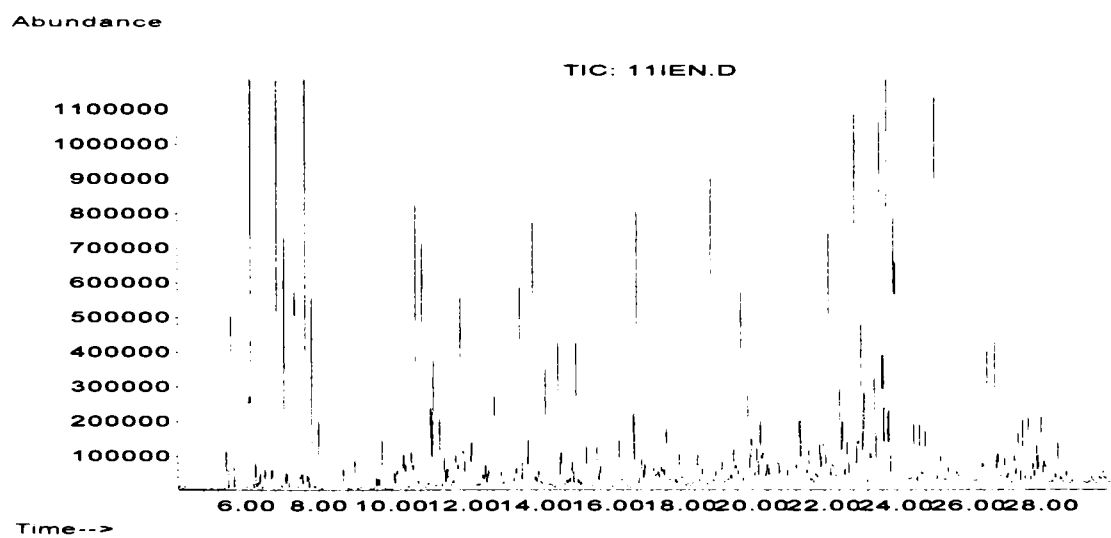


Figura 3.105. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de ienupăr din întreaga plantă.

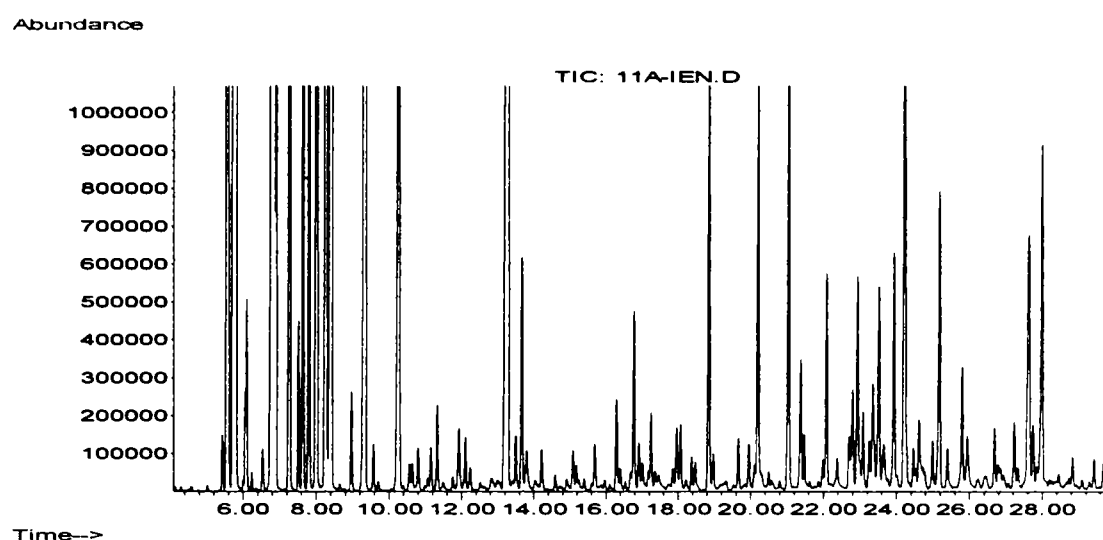


Figura 3.106. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de ienupăr din cetină.

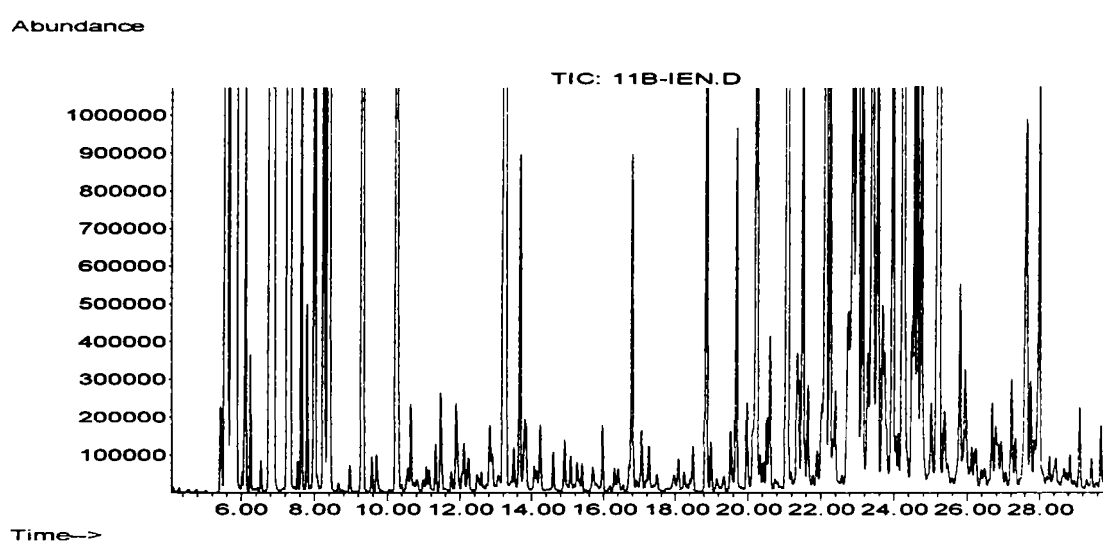


Figura 3.107. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de ienupăr din fructe.

Cele trei probe de ulei volatil au prezentat aceeași componenți majoritari, la concentrații care au variat în limite relativ mici. Astfel, cel mai concentrat a fost α -pinenul (în concentrații de 15.69%, 14.38% și 15.34% în uleiurile din întregul arbust, din cetină și, respectiv, din fructe, Anexa 2, figura A.2.10), apoi limonenul (9.9%, 7.33% și 4.82%, Anexa 2, figura A.2.11), terpinen-4-olul (7.5%, 7.27% și 4.06%, Anexa 2, figura A.2.12), *p*-cimenul (7.43%, 4.34% și 1.85%, Anexa 2, figura A.2.13), cariofilenul (4.74%, 1.25% și 3.31%, Anexa 2, figura A.2.14), mircenul (4.04%, 3.49% și 6.39%, Anexa 2, figura A.2.15) și β -felandrenul (3.6%, 14.82% și 6.84%, Anexa 2, figura A.2.16). Toți ceilalți componenți au fost identificați în concentrații apropiate de 3% sau sub această valoare (tabelele 3.28, 3.29 și 3.30).

Tabel 3.28. Compoziția uleiului volatil de ienupăr (întreaga plantă) și compoziția relativă a principalilor componenți încapsulați.

Nr.	Identificare MS	Indice Kovats (KI)	Conc. UV proaspăt (%)	Conc. UV recuperat (%)	$\frac{C_{UV\text{ proaspăt}}}{C_{UV\text{ recuperat}}}$
1	alpha-Thujene (Sabinene)	930	0.53	0.58	1.11
2	alpha-Pinene	941	15.69	37.31	2.38
3	Camphene	951	0.81	0.77	0.95
4	<i>trans</i> -Verbenol	957	0.04	0.15	3.88
5	beta-Phellandrene	977	3.60	2.77	0.77
6	beta-Pinene	980	2.81	2.99	1.06
7	Camphene	986	0.39	0.33	0.85
8	beta-Myrcene	995	4.04	3.71	0.92
9	(-)-beta-Pinene	1006	0.81	0.64	0.79
10	3-Carene	1012	0.31	0.26	0.83
11	alpha-Terpinen	1019	0.16	0.16	1.01
12	Cymene	1029	7.43	7.29	0.98
13	Limonene	1034	9.90	13.32	1.35
14	gamma-Terpinen	1061	2.15	1.82	0.85
15	Terpinolen	1091	2.96	2.22	0.75
16	Linalool	1103	0.52	0.32	0.61
17	(<i>S</i>)- <i>cis</i> -Verbenol	1109	0.54	0.11	0.20
18	Fenchol, <i>exo</i> -	1116	0.16	0.09	0.56
19	Thujone	1118	0.23	0.13	0.59
20	<i>trans</i> -Pinocarveol	1141	0.38	0.17	0.46
21	(<i>S</i>)- <i>cis</i> -Verbenol!	1148	1.49	0.61	0.41
22	(-)-Terpinen-4-ol	1183	7.50	6.23	0.83
23	<i>p</i> -Cymen-8-ol	1190	0.55	0.14	0.25
24	alpha-Terpineol	1195	1.63	0.64	0.39
25	<i>p</i> -Allylanisole	1200	0.83	0.15	0.18
26	Verbenone	1211	0.25	0.09	0.38
27	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,3,3-trimethyl-, acetate, (1 <i>S</i> - <i>exo</i>)-	1221	0.32	0.13	0.41
28	Bornyl acetate	1287	0.58	0.37	0.63
29	Ylangene	1350	0.64	0.38	0.60
30	alpha-Copaene	1376	0.40	0.24	0.61
31	(+)-Longifolene	1406	2.44	1.68	0.69
32	alpha-Cedrene	1414	2.47	1.94	0.78
33	Caryophyllene	1422	4.74	3.74	0.79
34	Himachala-2,4-diene	1428	0.16	2.55	15.87
35	Humulene	1454	0.58	0.35	0.61
36	di- <i>epi</i> -alpha-Cedrene	1465	0.25	0.12	0.50
37	beta-Chamigrene	1478	0.96	0.53	0.55
38	Eudesma-4(14),11-diene	1487	0.21	0.11	0.53
39	Thujopsene-(12)	1497	0.19	0.13	0.67
40	Thujopsene-(12)!	1501	1.16	0.78	0.67
41	(+)-Cuparene	1508	0.97	0.95	0.97
42	delta-Elemene	1514	0.61	0.55	0.91
43	(+)-delta-Cadinene	1525	1.60	0.59	0.37
44	Tricyclo[7.2.0.0(2,6)]undecan-5-ol, 2,6,10,10-tetramethyl- (isomer 2)	1553	0.97	0.25	0.26
45	Caryophyllene oxide	1586	3.19	1.13	0.36
46	Cedrol	1603	0.37	0.12	0.31
47	12-Oxabicyclo[9.1.0]dodeca-3,7-diene, 1,5,5,8-tetramethyl-, [1 <i>R</i> -(1 <i>R</i> *,3 <i>E</i> ,7 <i>E</i> ,11 <i>R</i> *)]-	1611	0.30	0.11	0.38
48	Cembrene	1954	0.66	0.13	0.20

Tabel 3.29. Compoziția uleiului volatil de ienupăr (cetină) și compoziția relativă a principalilor componenți încapsulați.

Nr.	Identificare MS	Indice Kovats (KI)	Conc. UV proaspăt (%)	Conc. UV recuperat (%)	$C_{UV\text{ proaspăt}} / C_{UV\text{ recuperat}}$
1	Tricyclene	924	0.12	0.10	0.84
2	Sabinene/Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, didehydr.	930	5.29	4.49	0.85
3	alpha-Pinene	940	14.38	28.07	1.95
4	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-	947	0.02	0.13	
5	(+)-Camphene	949	0.16	0.24	1.50
6	trans-Verbenol	956	0.03	0.03	1.06
7	2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene	967	0.10	0.07	0.72
8	beta-Phellandrene	979	14.83	22.79	1.54
9	beta-Pinene!	981	1.47	1.59	1.08
10	beta-Pinene	994	3.49	3.06	0.88
11	(+)-4-Carene	1002	0.30	0.30	1.00
12	alpha-Phellandrene	1007	1.64	1.21	0.74
13	3-Carene	1012	2.05	1.52	0.74
14	alpha-Terpinen	1019	4.67	3.81	0.81
15	m-Cymene!	1028	4.34	3.84	0.88
16	Limonene	1033	7.33	7.11	0.97
17	cis-beta-Ocimene	1050	0.21	0.14	0.66
18	gamma-Terpinen	1063	7.29	6.82	0.94
19	Terpineol, cis-beta-	1070	0.10	0.07	0.67
20	Terpinolen	1091	4.36	3.52	0.81
21	iso-Amyl isovalerate	1107	0.11	0.06	0.51
22	Thujone	1118	0.11	0.07	0.61
23	2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, trans-	1123	0.19	0.05	0.27
24	2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, cis-	1141	0.19	0.04	0.19
25	3,7,7-Trimethyl-8-(2-methylpropenyl)-bicyclo[4.2.0]oct-2-ene	1147	0.13	0.06	0.45
26	(-)-Terpinen-4-ol	1182	7.27	3.76	0.52
27	alpha-Terpineol	1193	0.55	0.14	0.26
28	cis-Piperitol	1197	0.15	0.04	0.25
29	Benzene, 2-methoxy-4-methyl-1-(1-methylethyl)-	1236	0.11	0.06	0.52
30	(-)-Bornyl acetate	1287	0.42	0.24	0.58
31	Terpinene 4-acetate	1301	0.18	0.09	0.48
32	(-)-Myrtenyl acetate	1326	0.16	0.08	0.50
33	2-Bornene	1336	0.08	0.04	0.57
34	alpha-Terpineol acetate	1351	1.16	0.66	0.57
35	Citronellol acetate	1355	0.10	0.04	0.45
36	Copaene	1376	0.13	0.06	0.48
37	Nerolidyl acetate	1385	0.11	0.05	0.43
38	(-)-beta-Elemene	1393	0.96	0.54	0.56
39	Caryophyllene	1420	1.25	0.72	0.58
40	Thujopsene	1431	0.35	0.22	0.62
41	Elixene	1434	0.14	0.07	0.47
42	alpha-Caryophyllene	1454	0.53	0.32	0.60
43	beta-Cubebene	1464	0.08	0.03	0.39
44	(-)-beta-Cadinene	1475	0.15	0.05	0.31
45	gamma-Muurolene	1478	0.27	0.14	0.54
46	beta-Cubebene	1482	0.61	0.31	0.50
47	beta-Eudesmene	1487	0.21	0.12	0.59
48	beta-Cubebene	1493	0.13	0.05	0.41
49	alpha-Selinene	1496	0.33	0.18	0.54
50	alpha-Muurolene	1502	0.54	0.39	0.72
51	gamma-Cadinene	1515	0.61	0.34	0.56
52	(-)-beta-Cadinene	1525	2.12	1.32	0.62
53	gamma-Elemene	1558	0.84	0.19	0.23
54	(-)-Spathulenol	1579	0.35	0.13	0.36
55	gamma-Muurolol	1644	1.03	0.06	0.06
56	delta-Cadinol, (-)-	1648	0.17	0.05	0.32
57	alpha-Cadinol	1657	1.01	0.33	0.32

Tabel 3.30. Compoziția uleiului volatil de ienupăr (fructe) și compoziția relativă a principalilor componenți încapsulați.

Nr.	Identificare MS	Indice Kovats (KI)	Conc. UV proaspăt (%)	Conc. UV recuperat (%)	$\frac{C_{UV\ proaspăt}}{C_{UV\ recuperat}}$
1	Tricyclene	925	0.15	0.12	0.83
2	Sabinene/Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, didehydro deriv.	930	2.68	1.69	0.63
3	alpha-Pinene	942	15.34	39.77	2.59
4	Camphene	952	0.51	0.42	0.83
5	<i>trans</i> -Verbenol	957	0.14	0.10	0.73
6	beta-Phellandrene	979	6.84	7.64	1.12
7	(-)-beta-Pinene	981	2.15	2.37	1.10
8	Myrcene	997	6.39	7.43	1.16
9	alpha-Phellandrene	1007	0.54	0.31	0.57
10	3-Carene	1012	0.21	0.13	0.62
11	alpha-Terpinen	1020	2.38	1.41	0.59
12	Cymene	1027	1.85	1.53	0.83
13	Limonene	1033	4.82	4.48	0.93
14	gamma-Terpinen	1062	3.47	2.64	0.76
15	gamma-Terpinen!	1070	0.05	0.04	0.80
16	Terpinolen	1091	2.70	1.76	0.65
17	Linalool	1103	0.11	0.04	0.41
18	alpha-Campholenal	1127	0.16	0.08	0.49
19	(-)-Terpinen-4-ol	1181	4.06	1.99	0.49
20	alpha-Terpineol	1193	0.50	0.11	0.23
21	(-)-Myrtenal	1197	0.10	0.05	0.57
22	Methyl citronellate	1262	0.11	0.03	0.32
23	(-)-Bornyl acetate	1287	0.53	0.34	0.65
24	<i>Neo-iso</i> -thujyl alcohol	1301	0.07	0.03	0.41
25	gamma-Elemene	1338	0.08	0.03	0.40
26	Copaene	1350	1.21	0.76	0.63
27	Citronellol acetate	1355	0.08	0.03	0.42
28	alpha-Ylangene	1372	0.12	0.06	0.53
29	Copaene	1376	0.54	0.38	0.71
30	gamma-Elemene	1386	0.15	0.07	0.48
31	(-)-beta-Elemene	1394	2.25	1.61	0.71
32	Copaene!	1397	0.05	0.03	0.54
33	alpha-Himachalene	1400	0.04	0.07	1.86
34	(+)-Longifolene	1406	0.25	0.19	0.74
35	Caryophyllene	1422	3.31	2.76	0.83
36	beta-Cubebene	1430	0.25	0.14	0.56
37	gamma-Elemene	1435	0.94	0.59	0.63
38	alpha-Cubebene	1448	0.06	0.06	0.99
39	Humulene	1456	2.71	2.26	0.83
40	beta-Farnesene	1459	0.77	0.37	0.48
41	(-)-beta-Cadinene	1462	0.06	0.07	1.33
42	(-)-beta-Cadinene!	1475	0.43	0.11	0.25
43	gamma-Muurolene	1480	1.26	0.89	0.71
44	beta-Cubebene	1485	4.48	3.85	0.86
45	beta-Eudesmene	1489	0.85	0.71	0.83
46	beta-Cubebene	1493	0.21	0.12	0.55
47	1 <i>H</i> -Cyclopropa[<i>a</i>]naphthalene, decahydro-1,1,3 <i>a</i> -trimethyl-7-methylene-	1497	1.46	1.29	0.89
48	alpha-Muurolene	1503	1.22	0.98	0.80
49	(-)-beta-Elemene	1507	0.29	0.24	0.84
50	gamma-Cadinene	1516	1.52	0.80	0.53
51	Eremophila-1(10),11-diene	1522	0.06	0.03	0.60
52	(-)-beta-Cadinene	1527	4.41	2.23	0.51
53	gamma-Elemene	1560	4.15	2.44	0.59
54	(-)-Spathulenol	1580	0.39	0.11	0.28
55	Caryophyllene oxide	1585	0.23	0.10	0.44
56	Calarene epoxide	1611	0.13	0.05	0.40
57	(-)-delta-Cadinol	1649	0.17	0.05	0.31
58	alpha-Cadinol	1657	0.90	0.16	0.18
59	Eudesm-7(11)-en-4-ol	1698	0.14	0.04	0.31
60	Cembrene	1953	0.28	0.05	0.19
61	Verticilol	1988	0.28	0.07	0.26

În urma analizelor GC-MS a uleiurilor volatile recuperate din complexii cu β -ciclodextrina (figurile 3.108, 3.109 și 3.110) doar α -pinenul a fost încapsulat la un raport al concentrațiilor peste 1.9, limonenul prezentând un astfel de raport în jur de 1.0, ceilalți componenți importanți din uleiurile volatile de ienupăr fiind încapsulate la rapoarte ale concentrațiilor puțin sub 1.0 (tabel 3.28, 3.29 și 3.30).

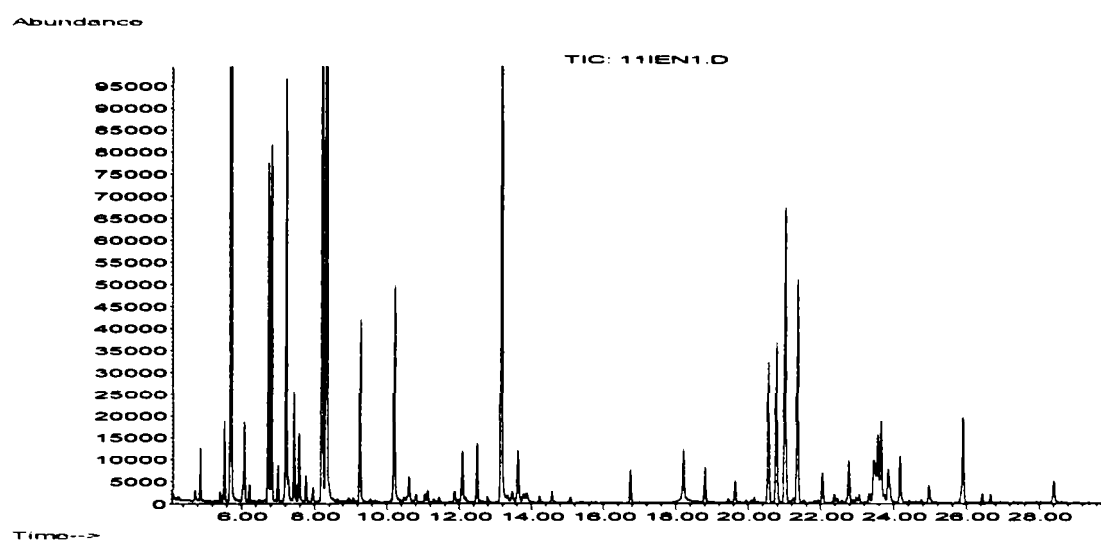


Figura 3.108. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de ienupăr (din întreaga plantă) recuperat din complexul cu β -ciclodextrina.

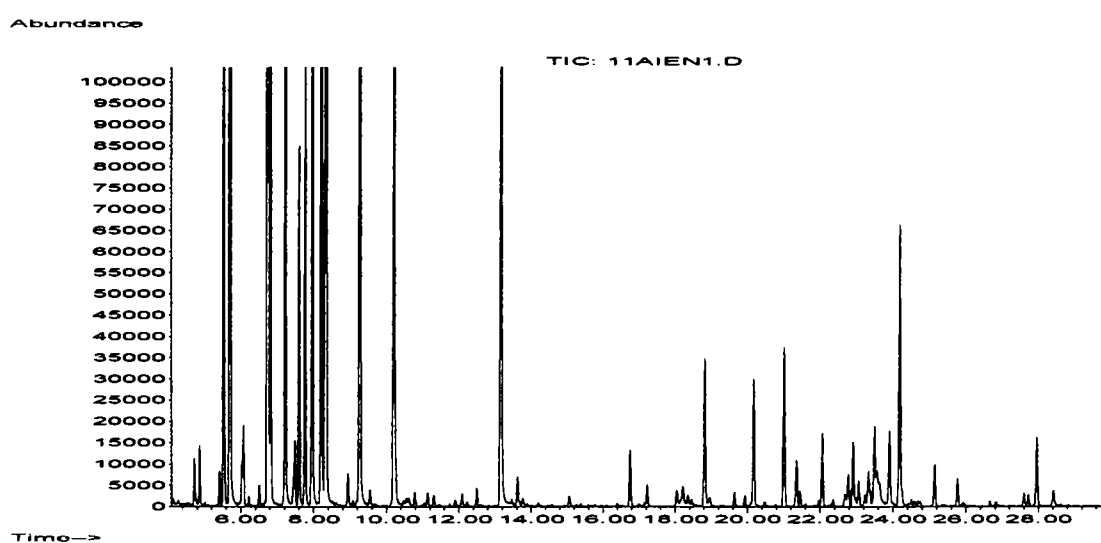


Figura 3.109. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de ienupăr (cetină) recuperat din complexul cu β -ciclodextrina.

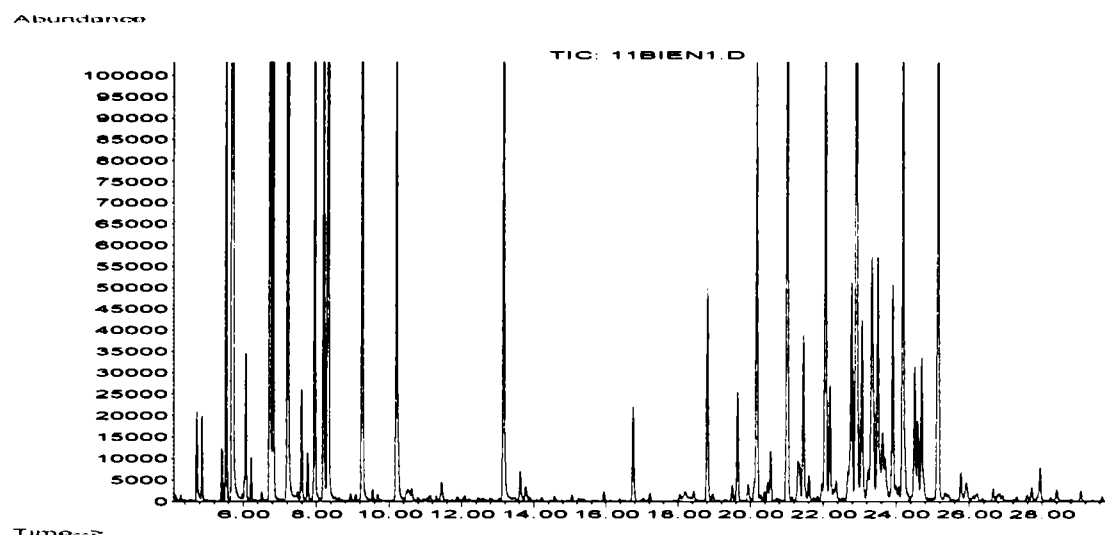


Figura 3.110. Gaz cromatograma din analiza GC-MS a uleiului volatil de ienupăr (fructe) recuperat din complexul cu β -ciclodextrina.

3.3.4. Analiza multivariată (PCA) a datelor GC pentru complexii uleiuri volatile/ β -ciclodextrină

Cantitatea foarte mare de date de gaz cromatografie obținută în urma analizei GC-MS a uleiurilor volatile proaspete sau recuperate din complexii cu β -ciclodextrina, nu permite o prelucrare pertinentă și face chiar imposibilă evaluarea corectă a datelor achiziționate. Un instrument statistic foarte puternic în astfel de cazuri, aplicabil în special în cazul în care se lucrează cu matrici (bidimensionale sau chiar multidimensionale) de date cu un număr mare de variabile, dar nu neapărat de cazuri, este analiza componentelor principale (PCA-Principal Component Analysis) [220-232]. PCA s-a realizat cu ajutorul programului The Unscrambler 6.1, utilizând pentru analiză datele GC centrate iar pentru validare metoda de validare încrucișată (cross-validation).

3.3.4.1. PCA în clasa Dicotyledonatae

Prelucrarea multivariată a datelor de gaz cromatografie (concentrațiile masice ale componentelor) a condus la o clasificare bună a probelor de uleiuri volatile în funcție de familiile din care fac parte (în special în cazul în care s-a folosit un număr redus de cazuri-componentele ce s-au identificat în concentrație însemnată în majoritatea uleiurilor volatile din plante din clasa Dicotyledonatae). Primele trei componente principale explică 96% din varianța datelor (prima componentă principală PC1 83%, a doua componentă principală PC2 10%, iar a treia componentă principală 3%), putându-se observa din graficul înregistrărilor PC2 vs PC1 o grupare bine-definită a uleiurilor volatile din clasa Lamiaceae și o parte din clasa Apiaceae (figura 3.111); mult mai bine se observă gruparea acestora din graficul înregistrărilor PC3 vs PC1, în care uleiurile din familia Lauraceae se situează în partea superioară a graficului, cele din familiile Lamiaceae și Apiaceae în zona central-stângă, uleiurile din clasa Myrtaceae sunt grupate în partea dreaptă a graficului, iar cele din familiile Rutaceae și Rosaceae în zona central-dreapta (figura 3.112).

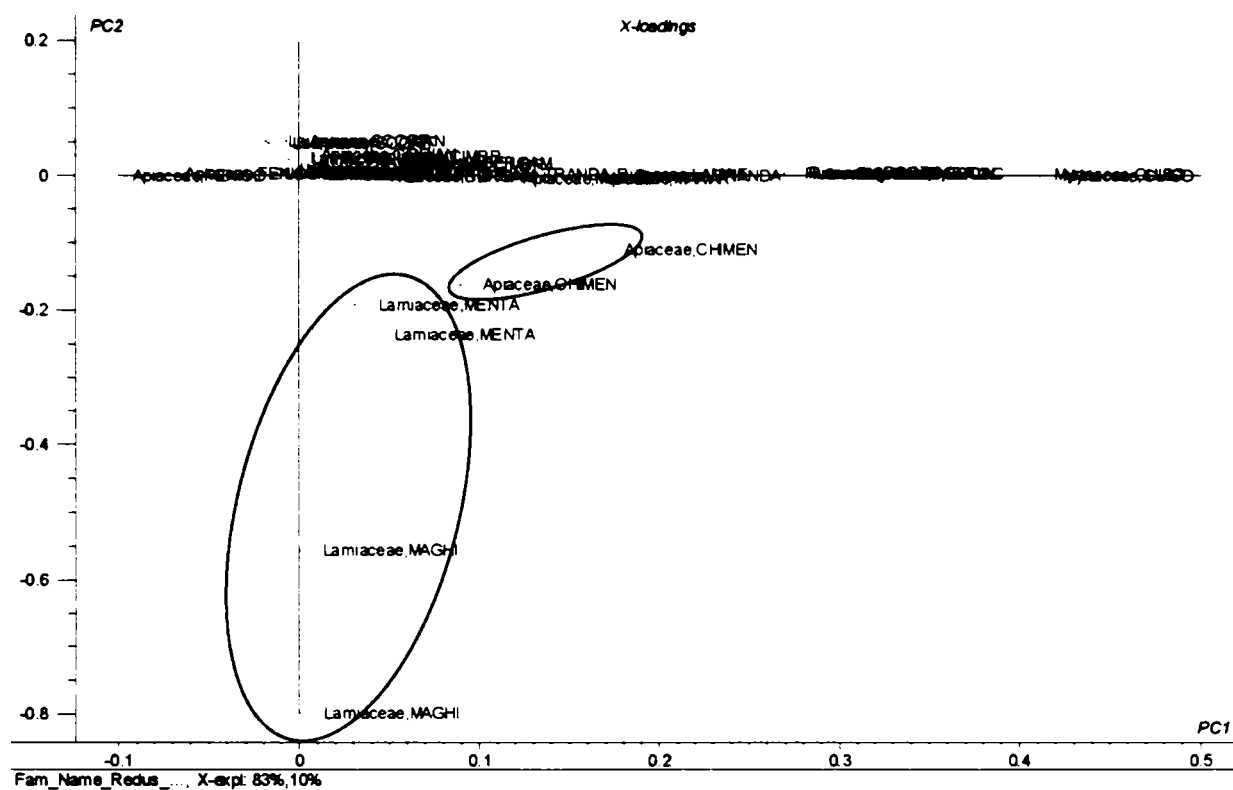


Figura 3.111. Graficul înregistrărilor PC2 vs PC1 în cazul uleiurilor volatile din clasa Dicotyledonatae (componenți principali).

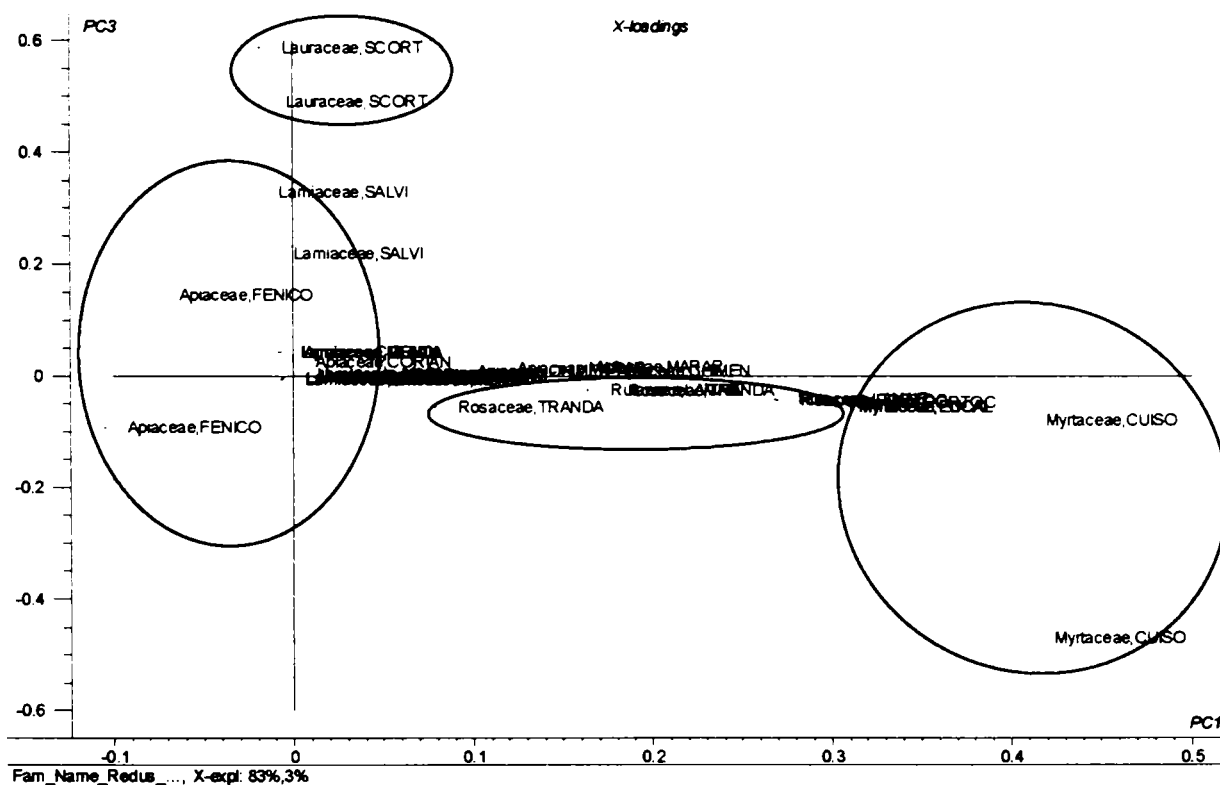


Figura 3.112. Graficul înregistrărilor PC3 vs PC1 în cazul uleiurilor volatile din clasa Dicotyledonatae (componenți principali).

Din graficul scorurilor se poate observa că cei mai importanți compuși pentru această clasificare au fost cinamaldehida și antranilatul de linalil pentru prima componentă principală, alcooli, fenoli, aldehide sau esteri (fenilacetaldhida, eugenolul, linaloolul, *p*-anisaldehida, ftalat de dimetil) pentru

cea de-a doua și compuși hidroxilați sau carbonilați (carvacrol, mentol, mentonă, carvonă) pentru a treia componentă principală (figurile 3.113 și 3.114).

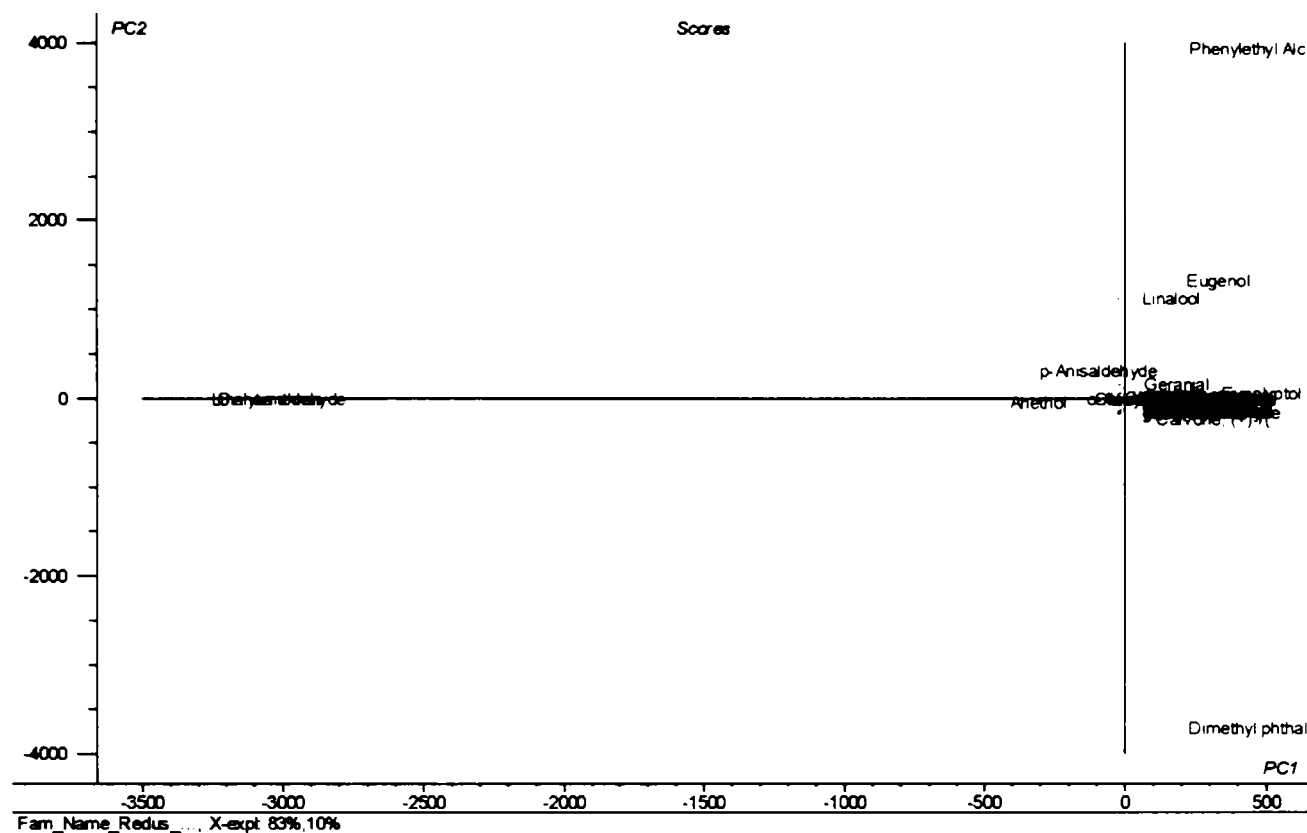


Figura 3.113. Graficul scorurilor PC2 vs PC1 în cazul uleiurilor volatile din clasa Dicotyledonatae (componenți principali).

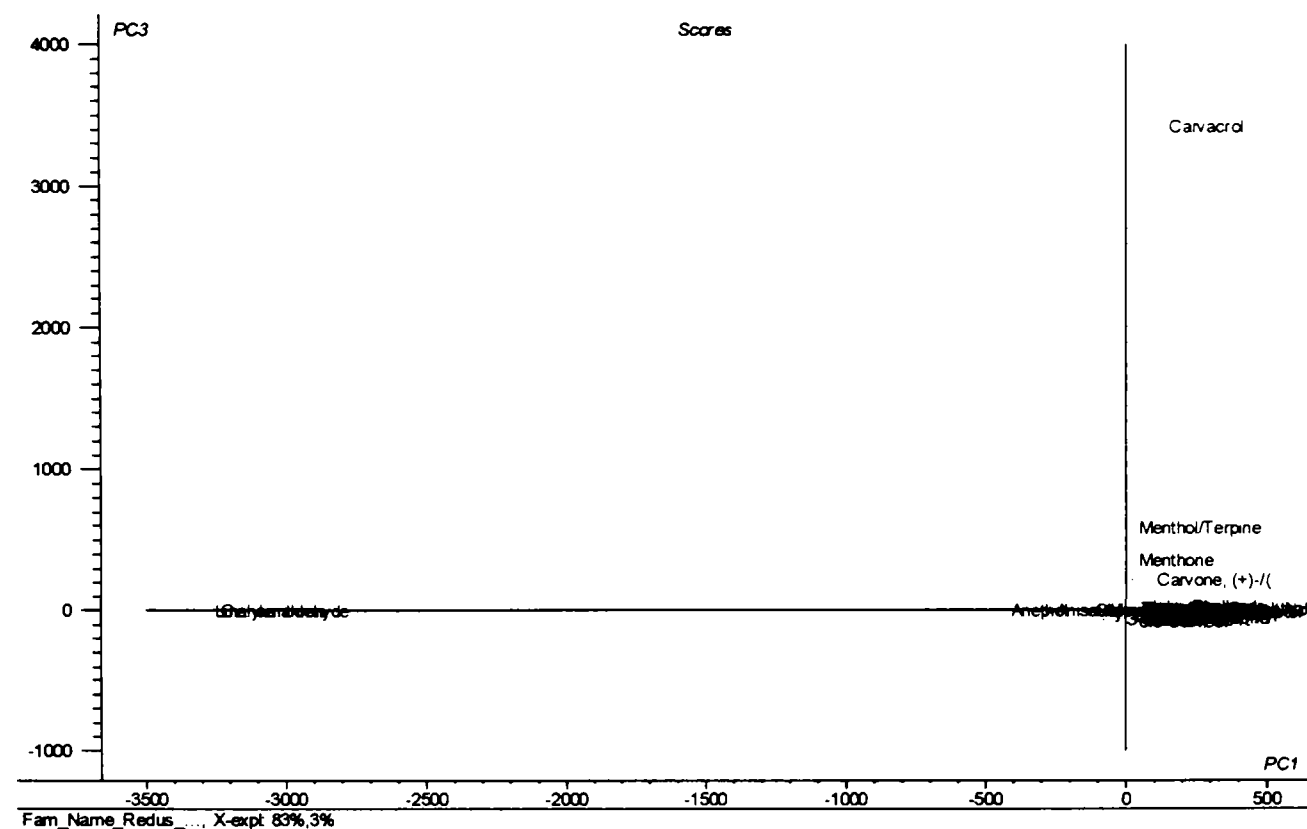


Figura 3.114. Graficul scorurilor PC3 vs PC1 în cazul uleiurilor volatile din clasa Dicotyledonatae (componenți principali).

Dacă se investighează zona centrală a graficelor înregistrărilor, se poate observa o grupare a uleiurilor volatile din familiile Lamiaceae și Lauraceae în zona central-superioară a graficului PC2 vs PC1 (figura 3.115), respectiv a celor din familia Apiaceae în zona superioară a graficului PC3 vs PC1,

Rutaceae și Rosaceae în partea dreaptă-inferioară și Lamiaceae în partea centrală a aceluiași grafic (figura 3.116).

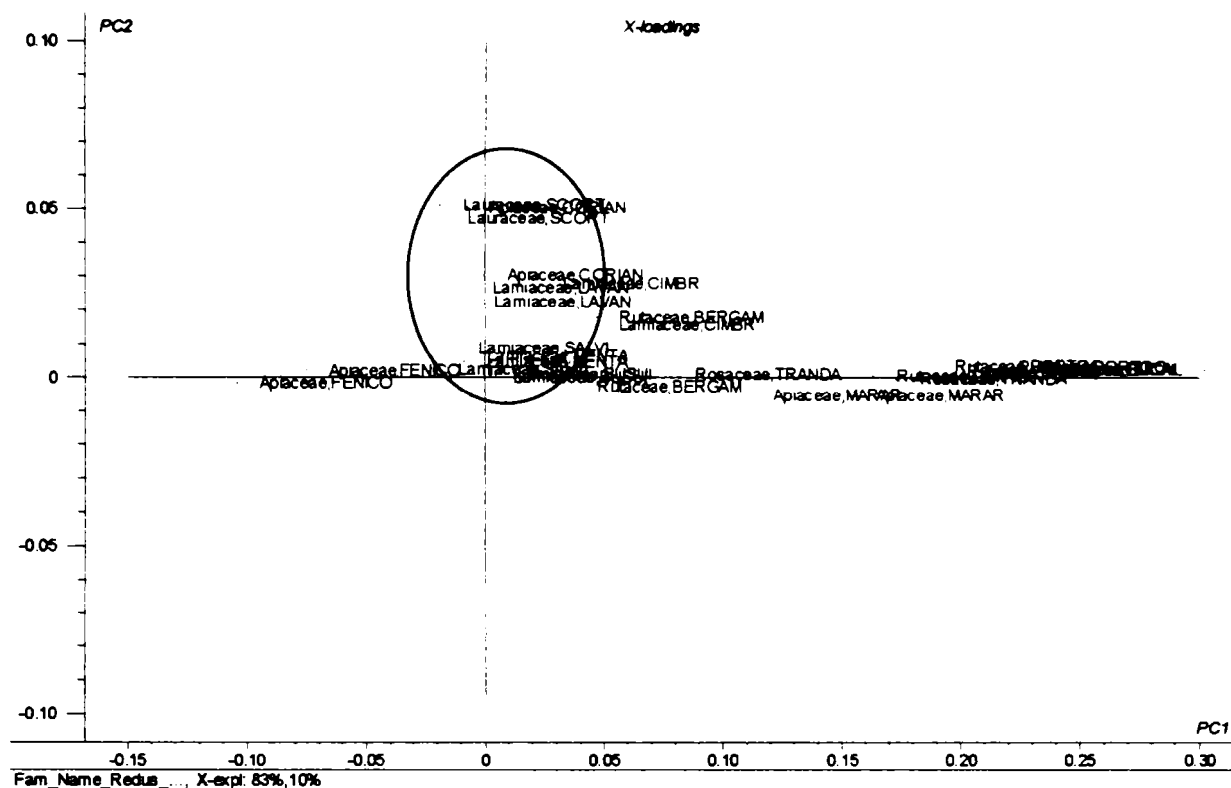


Figura 3.115. Graficul înregistrărilor PC2 vs PC1 (în zona centrală) în cazul uleiurilor volatile din clasa Dicotyledonatae (compenți principali).

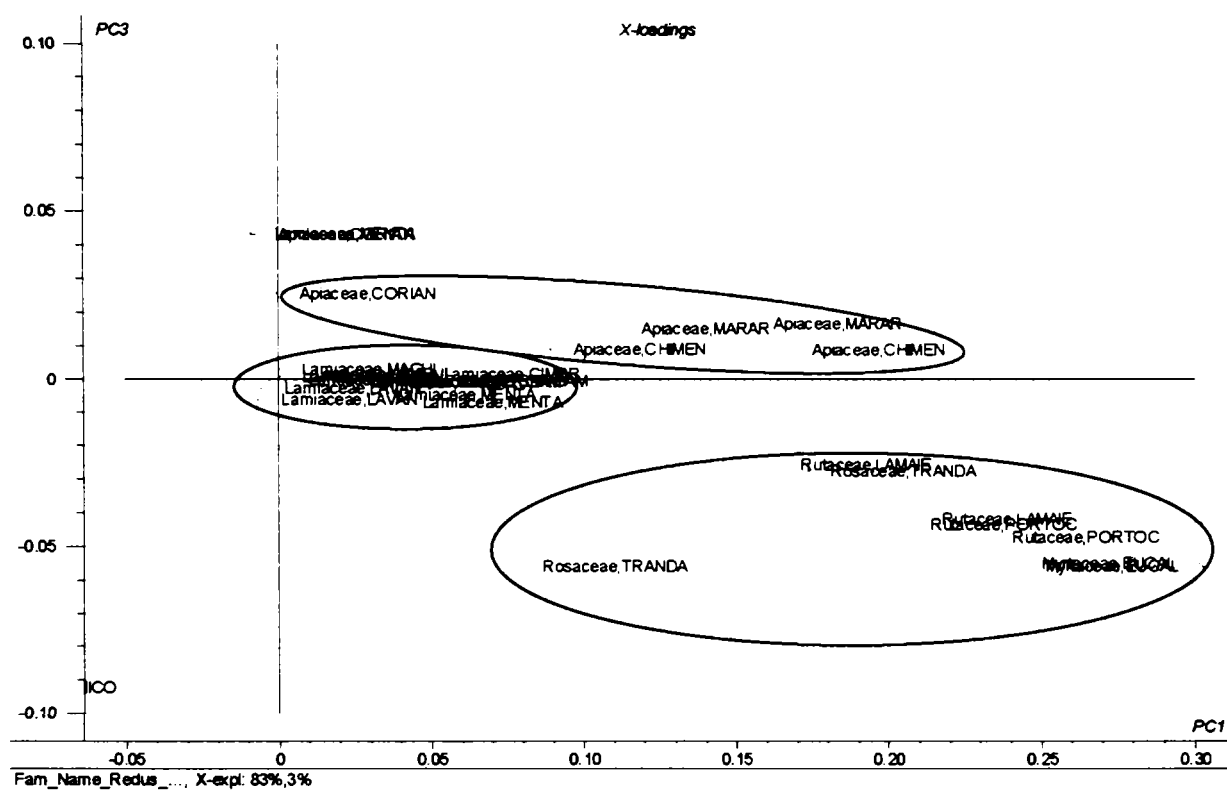
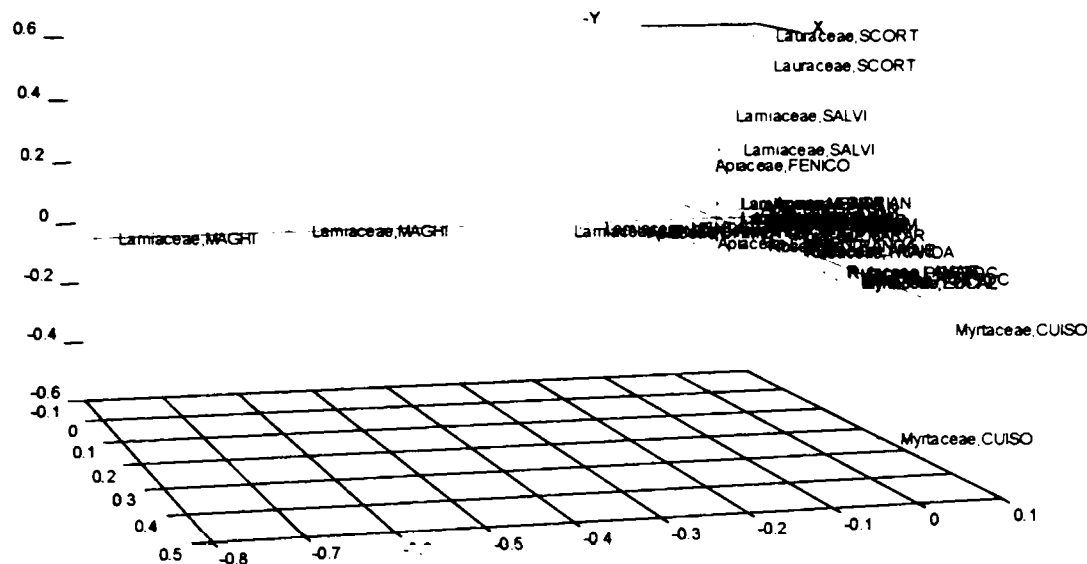


Figura 3.116. Graficul înregistrărilor PC3 vs PC1 (în zona centrală) în cazul uleiurilor volatile din clasa Dicotyledonatae (compenți principali).

O reprezentare tridimensională a graficului înregistrărilor PC3 vs PC1 și PC2 este prezentată în figura 3.117. Se poate observa gruparea familiilor de plante luate în studiu, în special pentru Lauraceae, Lamiaceae și Myrtaceae.

X-loadings

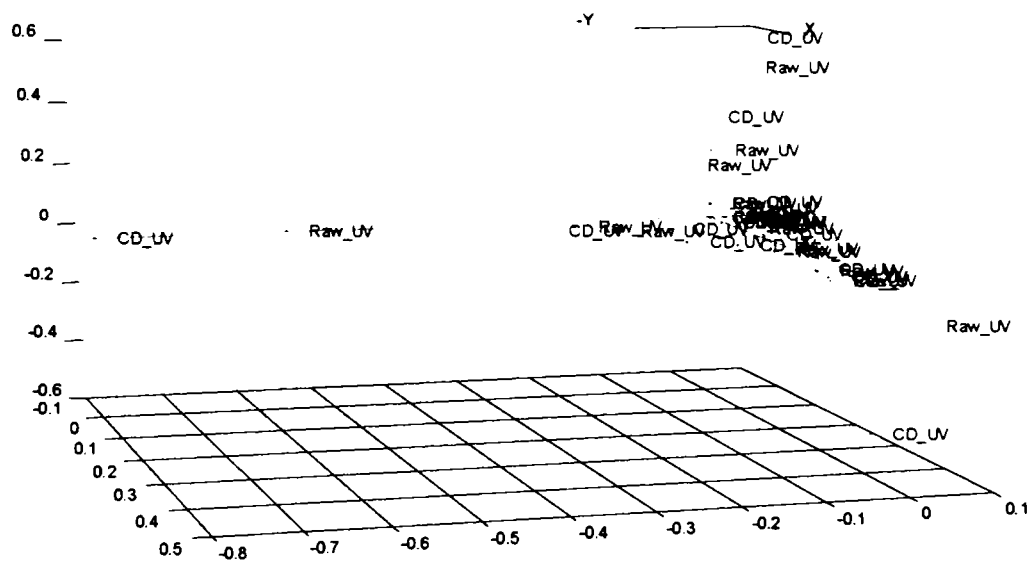


Fam_Name_Reduc..., X-expt: 83%,10%,3%

Figura 3.117. Graficul înregistrărilor 3D PC3 vs PC1 și PC2 în cazul uleiurilor volatile din clasa Dicotyledonatae (componenți principali).

Încercarea de clasificare a probelor de uleiuri volatile proaspete (codificate prin Raw_UV) și recuperate din complecși (codificate prin CD_UV), pe baza concentrațiilor determinate din analiza GC-MS, nu a condus la rezultate semnificative; în figura 3.118 este prezentată dependența PC3 vs PC1 și PC2 în cazul prezentat mai sus. Se observă totuși clasificări pereche corespunzătoare uleiurilor volatile proaspete și recuperate pentru fiecare probă de ulei volatil luat în studiu.

X-loadings



Compl_Type_Reduc..., X-expt: 83%,10%,3%

Figura 3.118. Graficul înregistrărilor 3D PC3 vs PC1 și PC2 în cazul uleiurilor volatile proaspete (Raw_UV) și recuperate din complex (CD_UV) din clasa Dicotyledonatae (componenți principali).

1.1.1.1. PCA în clasa Pinatae

Analiza multivariată PCA pe baza datelor GC pentru uleiurile volatile proaspete și recuperate provenite din plante din clasa Pinatae a condus la rezultate semnificative din punct de vedere al clasificării probelor în funcție de familie sau de tipul uleiului: proaspăt (Raw_UV) sau recuperat din complex (CD_UV).

În cazul utilizării datelor GC ca date de intrare în analiza multivariată funcție de familia de proveniență a uleiurilor volatile, reprezentarea înregistrărilor PC2 vs PC1 conduce la o clasificare clară a uleiurilor volatile în special a celor din familia Cupresaceae în zona central-dreapta a graficului, cele provenite din familia Pinatae fiind poziționate în principal în zona superioară a aceluiași grafic (figura 3.119). Responsabili pentru această clasificare sunt în principal α - și β -pinenul, limonenul și β -felandrenul pentru prima componentă principală (care explică 81% din varianța datelor), respectiv β -felandrenul, limonenul, camfenul, β -pinenul și acetatul de bornil pentru cea de-a doua componentă principală (care explică 9% din varianța datelor) (figura 3.120).

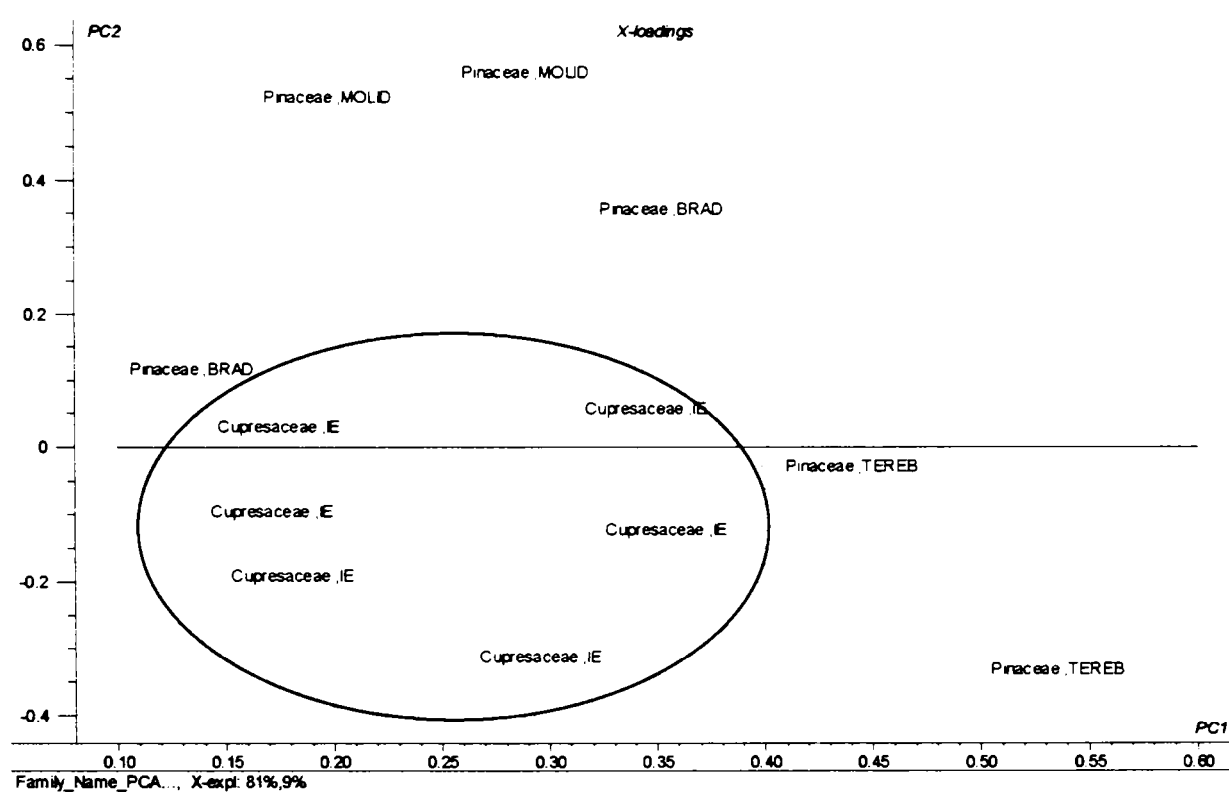


Figura 3.119. Graficul înregistrărilor PC2 vs PC1 în cazul uleiurilor volatile din clasa Pinatae.

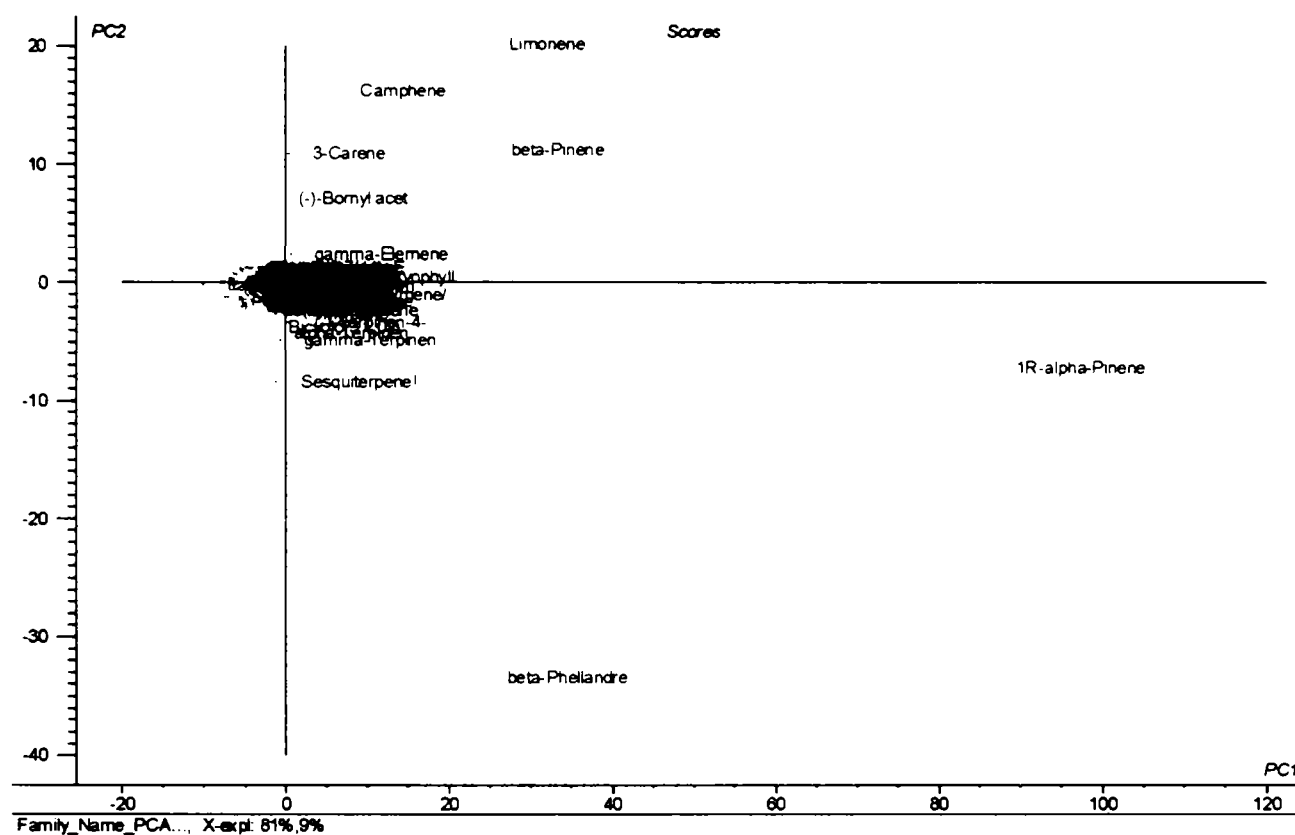


Figura 3.120. Graficul scorurilor (denumirile compușilor) PC2 vs PC1 în cazul uleiurilor volatile din clasa Pinatae.

S-a încercat evaluarea claselor de compuși odoranți-aromatizanți responsabile pentru astfel de clasificări ale uleiurilor volatile, aceste clase fiind codificate conform tabelului 3.33. Conform acestei abordări, clasificarea în funcție de prima și a doua componentă principală s-a realizat pe baza datelor GC ale hidrocarburilor monoterpenice mono- și diciclice (figura 3.121), deși la o investigație mai atentă, la această grupare participă și hidrocarburile sesquiterpenice di- și triciclice, în special pentru cea de-a doua componentă principală (figura 3.122). Clasificarea în cele două grupe corespunzătoare familiilor de proveniență ale uleiurilor volatile se observă mult mai clar la reprezentarea 3D a înregistrărilor (figura 3.123).

Tabel 3.33. Codificarea claselor și subclaselor organice de compuși odoranți-aromatizanți din uleiurile volatile analizate.

Nr.	Clasă	Subclasă	Cod	Nr.	Clasă	Subclasă	Cod
<i>Compuși alifatici</i>				<i>Compuși aromatici</i>			
1	Compuși alifatici neterpenici	alcooli aldehide cetone acizi esteri	CAN-Alc CAN-Ald CAN-Cet CAN-Ac CAN-Est	1	Compuși aromatici nefenolici	hidrocarburi alcooli aldehide cetone esteri	CNF-H CNF-Alc CNF-Ald CNF-Cet CNF-Est
2	Compuși alifatici ciclici	ciclopentanici ciclohexanici policiclici macrociclici	CAC-Cp CAC-Ch CAC-Pc CAC-Mc	2	Compuși aromatici fenolici	fenoli eteri esteri alcooli&esteri aldehide acizi esteri	CF-F CF-Et CF-Est CF-Alc&Est CF-Ald CF-Ac CF-Est
3	Monoterpenoide aciclice	hidrocarburi alcooli aldehide cetone esteri	MTA-H MTA-Alc MTA-Ald MTA-Cet MTA-Est				
4	Sesquiterpenoide aciclice	hidrocarburi alcooli aldehide cetone esteri	STA-H STA-Alc STA-Ald STA-Cet STA-Est	3	Compuși heterociclici cu oxigen	eteri ciclici lactone glicidati	CHO-Et CHO-Lac CHO-Gli
5	Monoterpenoide monociclice	hidrocarburi alcooli aldehide cetone esteri	MTC1-H MTC1-Alc MTC1-Ald MTC1-Cet MTC1-Est	4	Compuși cu azot	nitrili antranilați nitroderivați heterocicli	CN-Nitril CN-Antr CN-Nitro CN-Het
6	Sesquiterpenoide monociclice	hidrocarburi alcooli aldehide cetone esteri	STC1-H STC1-Alc STC1-Ald STC1-Cet STC1-Est				
8	Monoterpenoide biciclice	hidrocarburi alcooli aldehide cetone esteri	MTC2-H MTC2-Alc MTC2-Ald MTC2-Cet MTC2-Est				
9	Sesquiterpenoide biciclice	hidrocarburi alcooli aldehide cetone esteri	STC2-H STC2-Alc STC2-Ald STC2-Cet STC2-Est				
10	Monoterpenoide triciclice	hidrocarburi alcooli aldehide cetone esteri	MTC3-H MTC3-Alc MTC3-Ald MTC3-Cet MTC3-Est				
11	Sesquiterpenoide triciclice	hidrocarburi alcooli aldehide cetone esteri	STC3-H STC3-Alc STC3-Ald STC3-Cet STC3-Est				

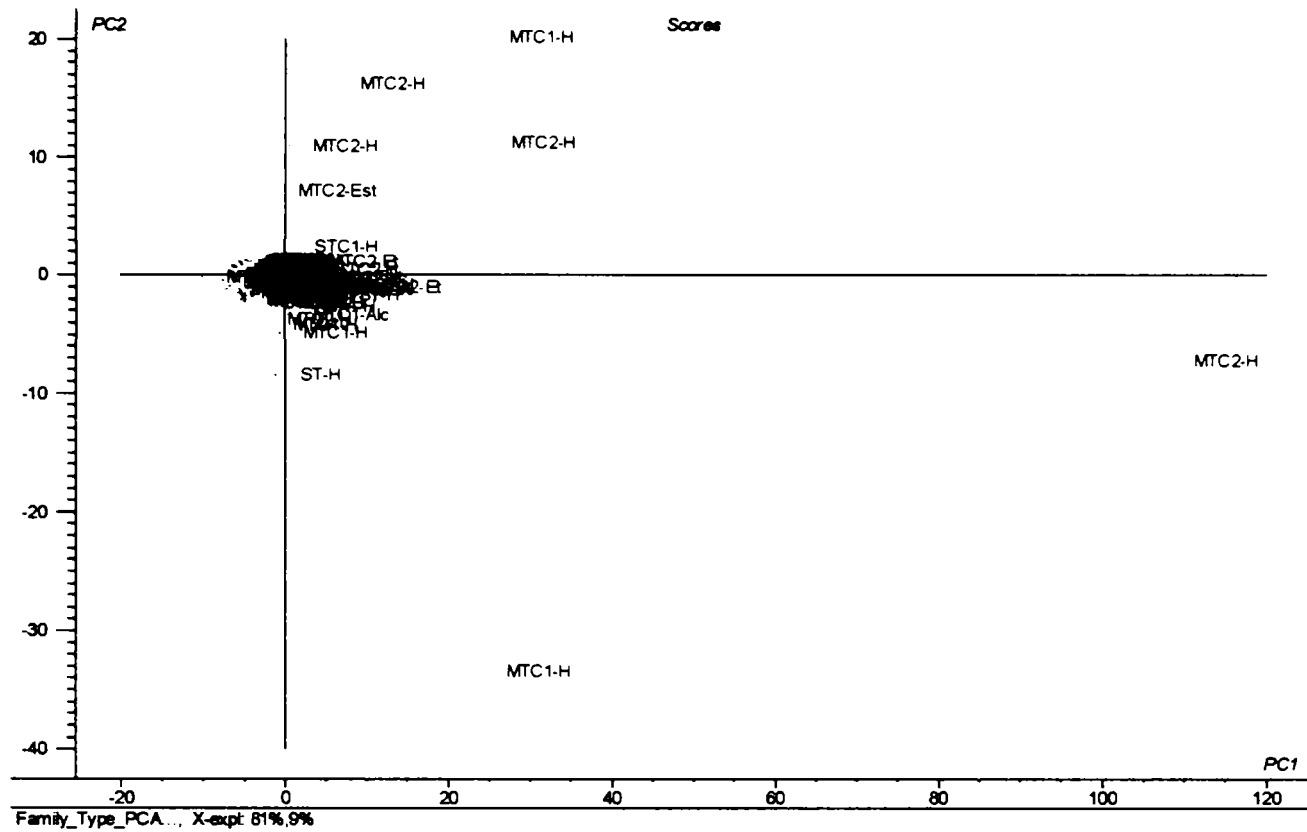


Figura 3.121. Graficul scorurilor (clasa chimică a compușilor) PC2 vs PC1 în cazul uleiurilor volatile din clasa Pinatae.

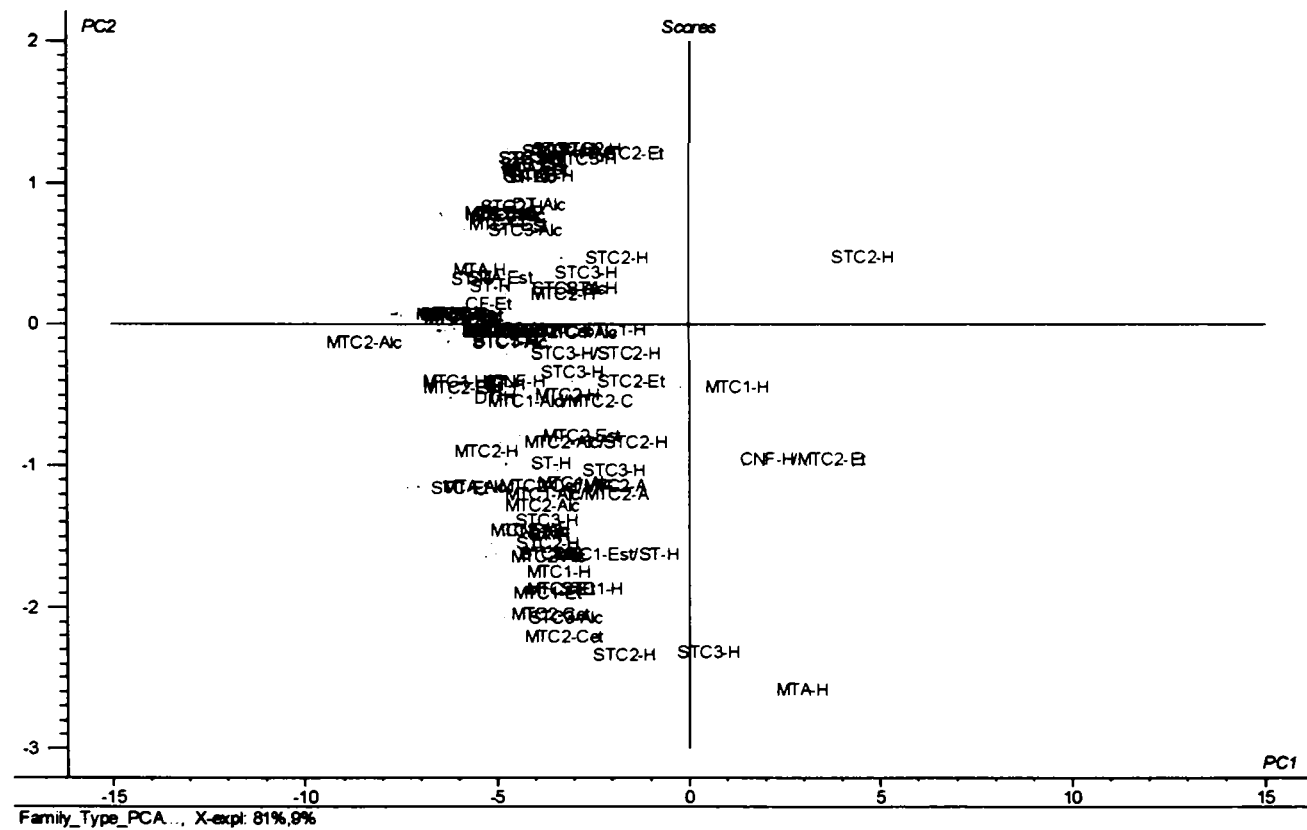
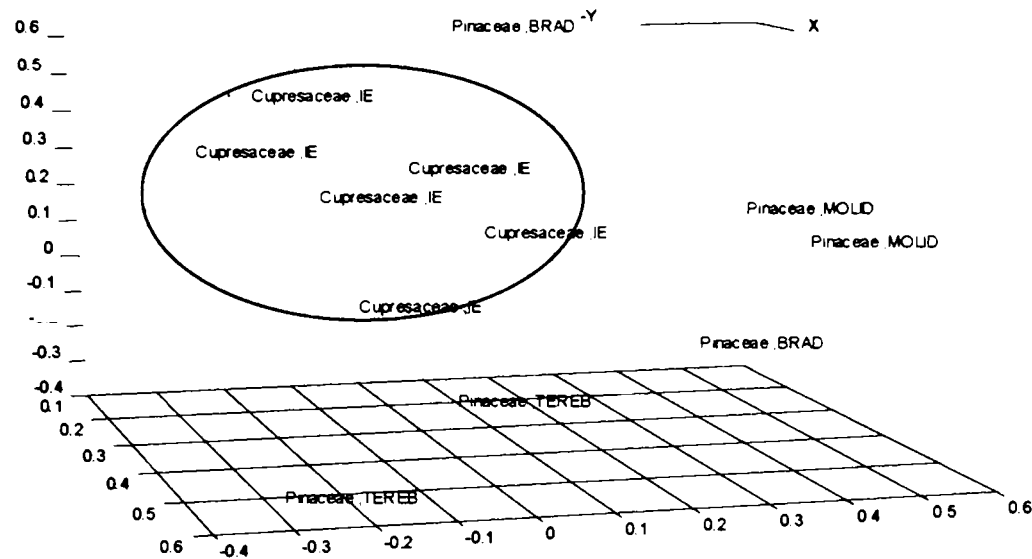


Figura 3.122. Graficul scorurilor (clasa chimică a compușilor) PC2 vs PC1 în cazul uleiurilor volatile din clasa Pinatae (mărire a zonei centrale).

X-loadings



Family_Type_PCA... X-expl: 81%,9%,4%

Figura 3.123. Graficul înregistrărilor 3D PC3 vs PC1 și PC2 în cazul uleiurilor volatile din clasa Pinatae.

S-a încercat, de asemenea, gruparea probelor analizate prin GC-MS funcție de tipul de ulei volatil: proaspăt (codificat prin Raw_UV) și recuperat din complexul cu β -ciclodextrină (codificat prin CD_UV). Reprezentarea înregistrărilor PC2 vs PC1 a indicat o foarte bună clasificare a acestor tipuri de ulei (cu excepția uleiului proaspăt de ienupăr din fruct) în partea stângă a graficului pentru uleiurile proaspete și în dreapta reprezentării în cazul celor recuperate (figura 3.124). Clasificarea poate fi extinsă și în cazul reprezentării PC3 vs PC1 pe aceleași considerente (figura 3.125). Și în cazul acestor grupări tot hidrocarburile monoterpene au fost cele care au avut impactul cel mai mare.

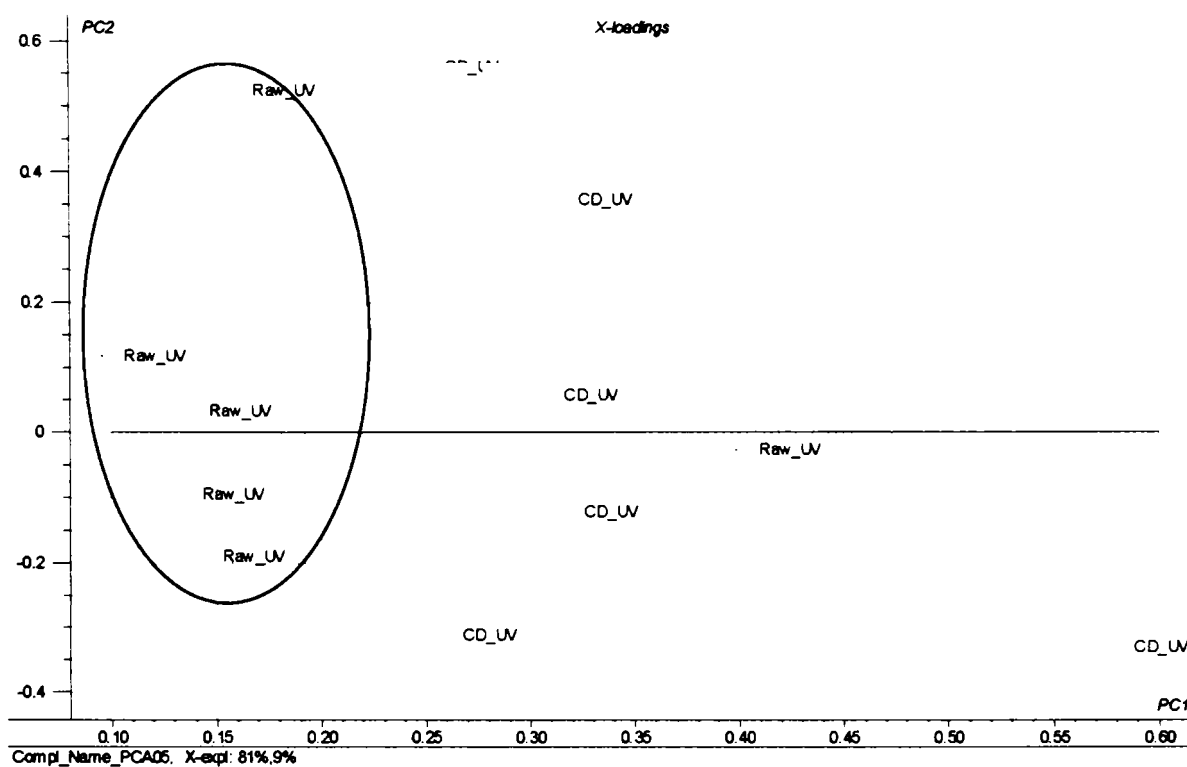


Figura 3.124. Graficul înregistrărilor PC2 vs PC1 în cazul uleiurilor volatile proaspete (Raw_UV) și recuperate din complex (CD_UV) din clasa Pinatae.

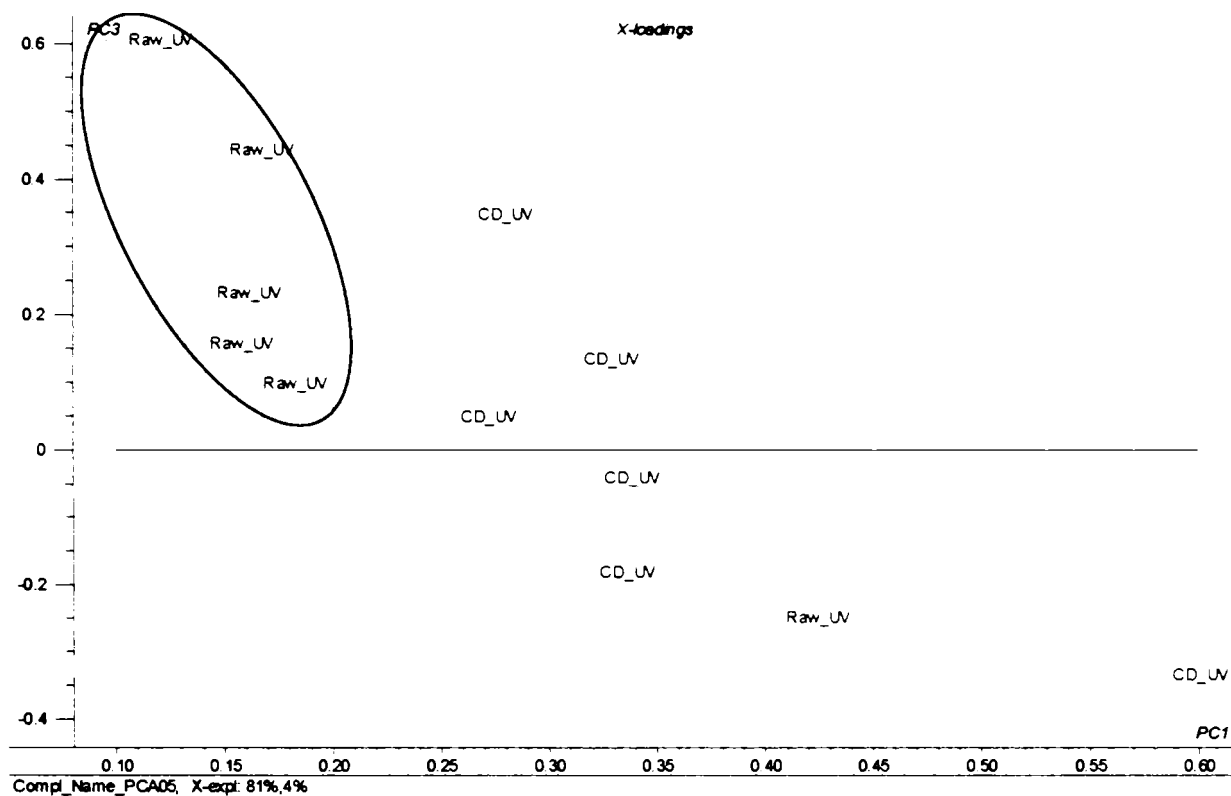


Figura 3.125. Graficul înregistrărilor PC3 vs PC1 în cazul uleiurilor volatile proaspete (Raw_UV) și recuperate din complex (CD_UV) din clasa Pinatae.

1.1.1.2. PCA în clasele Dicotyledonatae-Pinatae

Rezultatele bune obținute în cazul analizei multivariate PCA în clasele botanice de proveniență a uleiurilor volatile folosite la încapsularea în β -ciclodextrină au determinat extinderea acestui tip de analiză statistică și pentru totalitatea probelor de uleiuri volatile utilizate (din clasele Dicotyledonatae și Pinatae) la nanoîncapsulare în scopul protejării componentelor labili împotriva factorilor degradanți din mediu (aer/oxigen, temperatură, umiditate, lumină etc.).

Analiza PCA a datelor GC pentru toate uleiurile volatile utilizate (cu excepția uleiului volatil de usturoi, care face parte din clasa Monocotyledoneae, fiind o probă unică), a condus la o foarte bună clasificare a acestora în funcție de clasa botanică din care fac parte. Primele trei componente principale au explicat 95% din variația datelor (PC1 73%, PC2 14% și PC3 8%), existând o clasă foarte bine grupată în zona central-superioară a graficului înregistrărilor PC2 vs PC1 (figura 3.126), respectiv clasa Pinatae, în timp ce a doua clasă de uleiuri volatile a fost localizată în două zone semnificative: zona superioară, respectiv zona central-dreapta a aceluiași grafic, gruparea acestei ultime clase botanice fiind mult mai evidentă în reprezentarea PC3 vs PC1 (figura 3.127).

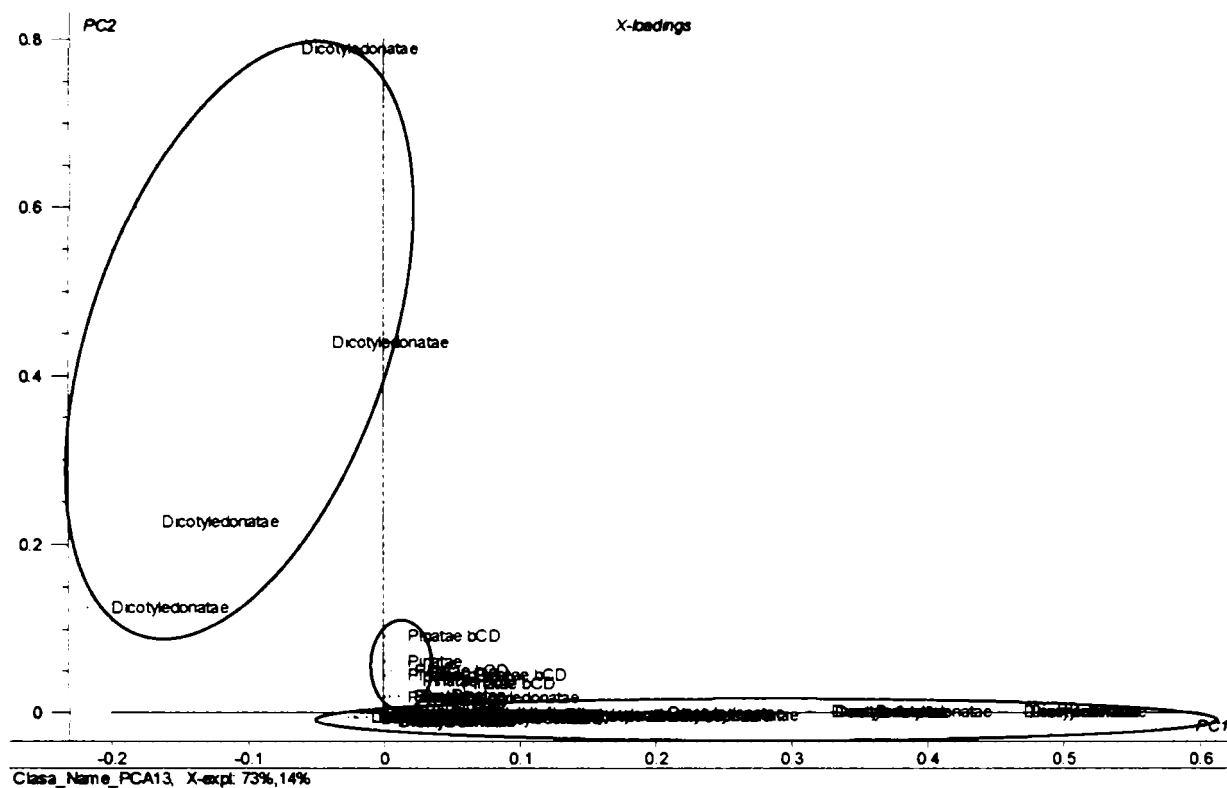


Figura 3.126. Graficul înregistrărilor PC2 vs PC1 în cazul uleiurilor volatile din clasele Dicotyledonatae și Pinatae.

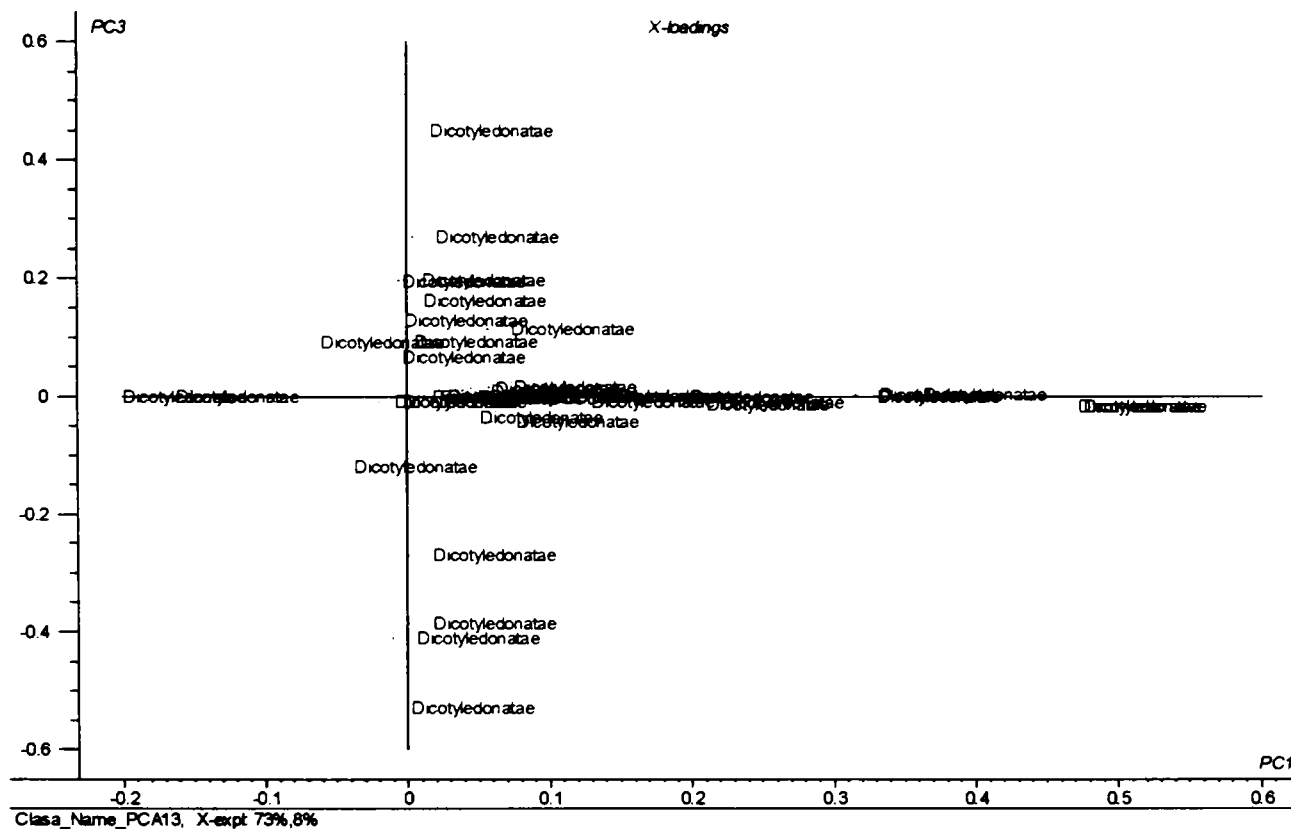


Figura 3.127. Graficul înregistrărilor PC3 vs PC1 în cazul uleiurilor volatile din clasele Dicotyledonatae și Pinatae.

O imagine mult mai clară se obține în cazul reprezentării zonei centrale a dependenței PC2 vs PC1 (figura 3.128), în care clasa Pinatae este situată în zona superioară a graficului, iar clasa Dicotyledonatae este în zona mediană PC1 (în planul PC1-PC3), respectiv la reprezentarea tridimensională PC3 vs PC1 și PC2 (figura 3.129). Principalii compuși responsabili pentru aceste clasificări sunt cinamaldehida, antranilatul de linalil, camfenul și anetolul pentru PC1, respectiv

carvacrolul și carvona pentru PC2 (figura 3.130), sau dacă se apelează la clasa organică de compuși implicați în analiza multivariată, cei mai importanți pentru această clasificare sunt în primul rând compușii aromatici fenolici și nefenolici (codificați prin CF și CNF), respectiv compușii monoterpenici aciclici și monociclici (codificați prin MT, figura 3.131).

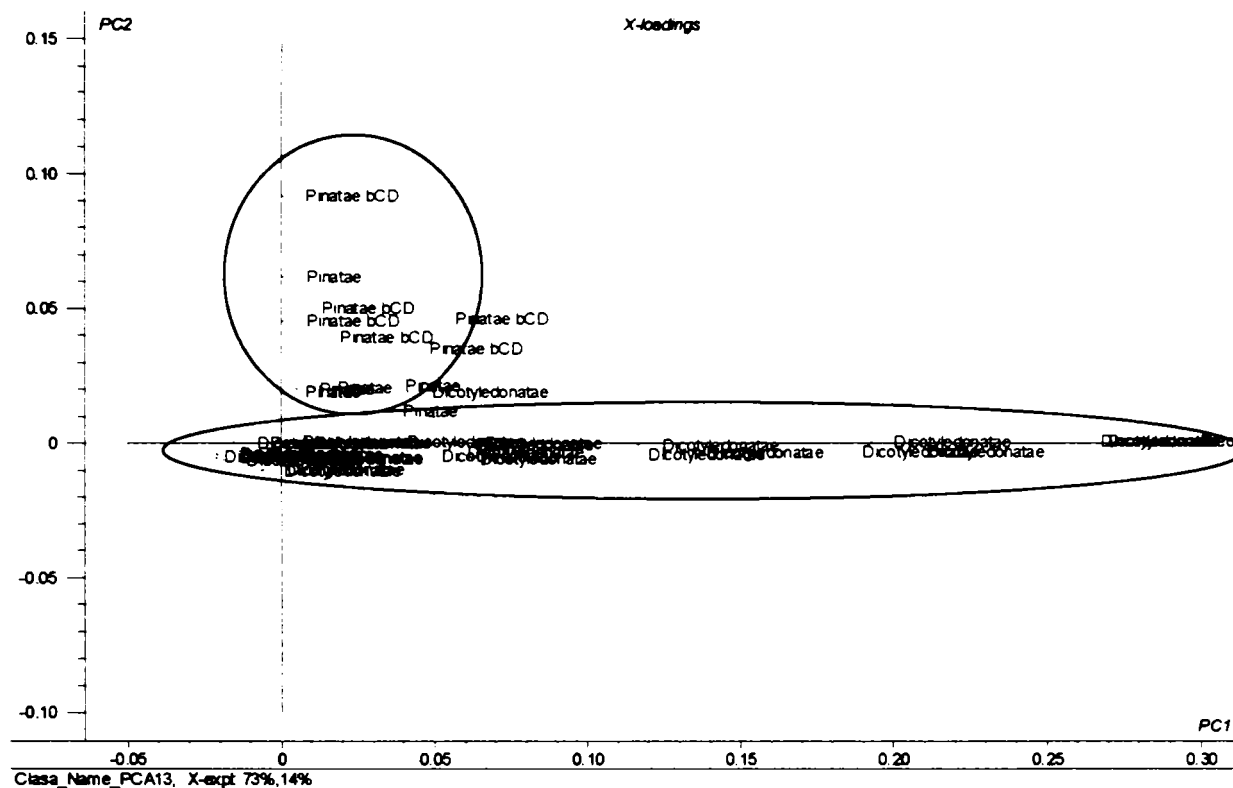
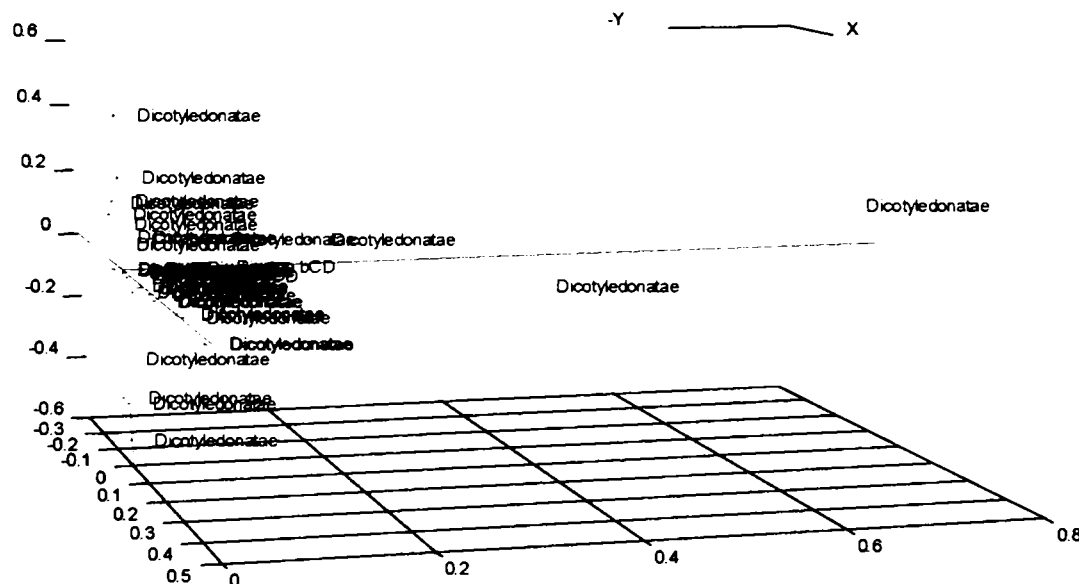


Figura 3.128. Graficul înregistrărilor PC2 vs PC1 (zona centrală) în cazul uleiurilor volatile din clasele Dicotyledonatae și Pinatae.

X-loadings



Clasa_Name_PCA13, X-expt 73%,14%,8%

Figura 3.129. Graficul înregistrărilor PC3 vs PC1 și PC2 în cazul uleiurilor volatile din clasele Dicotyledonatae și Pinatae.

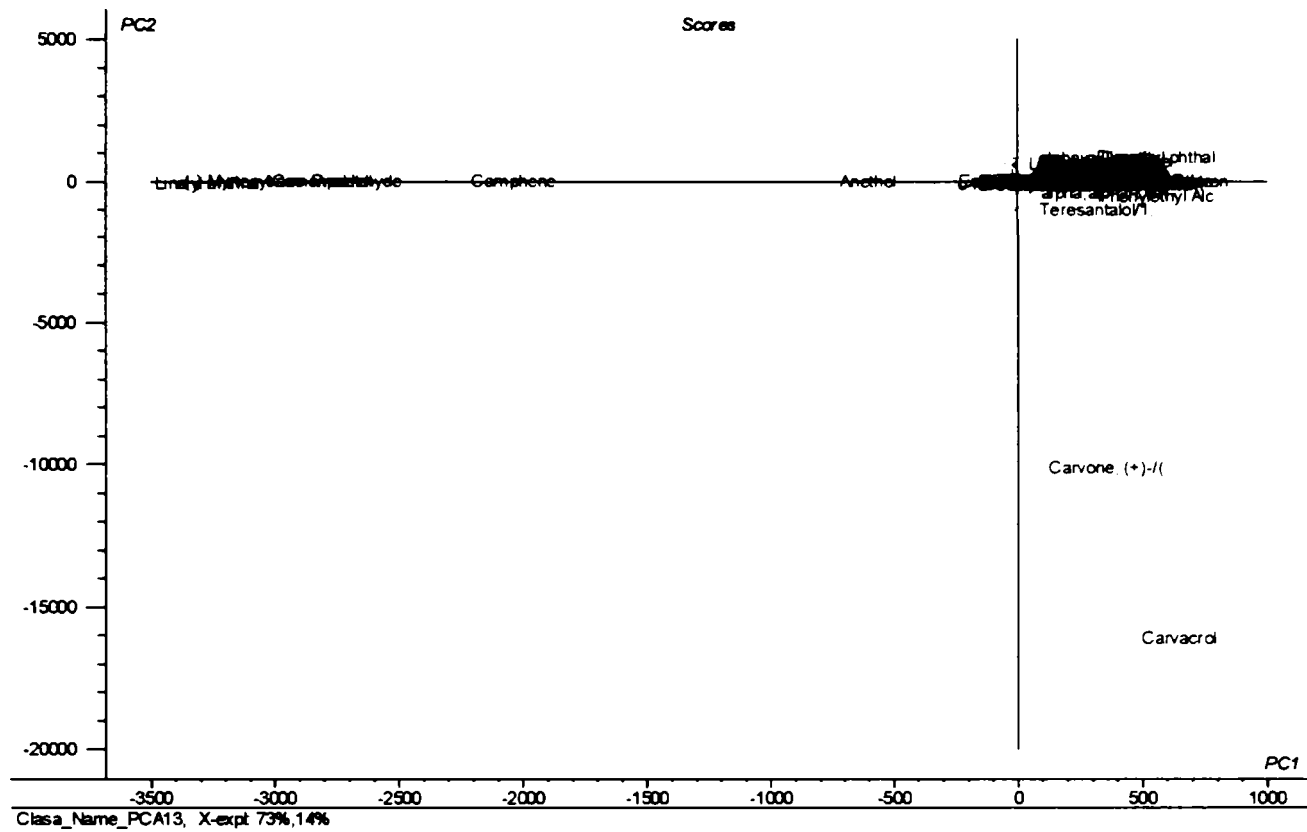


Figura 3.130. Graficul scorurilor (denumirile compușilor) PC2 vs PC1 în cazul uleiurilor volatile din clasele Dicotyledonatae și Pinatae.

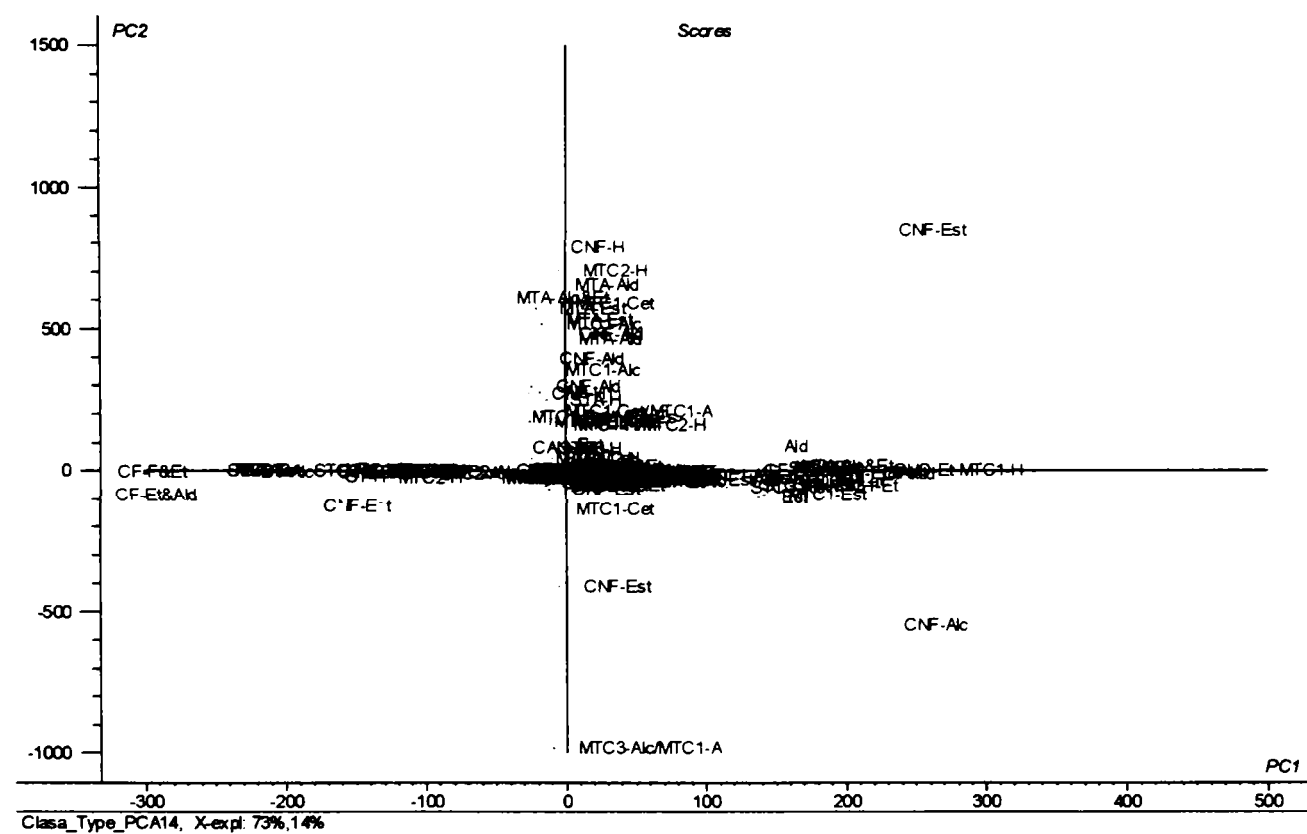


Figura 3.131. Graficul scorurilor (clasa chimică a compușilor) PC2 vs PC1 în cazul uleiurilor volatile din clasele Dicotyledonatae și Pinatae.

3.3.5. Concluzii parțiale

În urma studiilor efectuate privind nanoîncapsularea uleiurilor volatile provenind din plante din clasele botanice Dicotyledonatae, Monocotyledoneae și Pinatae se poate conchide:

1. S-au obținut **25** de complecși **uleiuri volatile/ β -ciclodextrină** care au fost analizați unitar din punct de vedere al compoziției nanocapsulelor și similarității-disimilarității acestora, utilizând o metodă modernă de analiză multivariată a datelor.
2. Complecșii β -ciclodextrinei cu **uleiuri volatile** din plante din **familia Apiaceae/Dicotyledonatae** (uleiuri volatile de chimen, coriandru, fenicol și mărar) au fost obținute cu randamente între 57% și 76%. Principalii componenți identificați au fost carvona în cazul chimenului și mărarului, linaloolul și anetolul în celelalte două cazuri. Capacitatea de încapsulare a fost evaluată și prin determinarea raportului dintre concentrațiile compușilor în uleiul extras din complex și în cel proaspăt. Cu excepția carvonei, pentru care acest raport a fost între 0.8 și 1, celelalte două componente principale au fost încapsulate la rapoarte peste 1.3.
3. Complecșii β -ciclodextrinei cu **uleiuri volatile** de plante din **familia Lamiaceae/Dicotyledonatae** (uleiuri volatile de busuioc, cimbru, lavandă, măghiran, mentă, mentă creată și salvie) s-au obținut cu randamente mai bune (între 62 și 81%). Principalii compuși identificați au fost metilcavicolul, linaloolul și carvacrolul în cazul uleiurilor de busuioc, cimbru și lavandă, terpinen-4-ol, mentol și carvonă în cazul uleiurilor de măghiran, mentă și, respectiv, mentă creată și antranilat de linalil în cazul uleiului volatil de salvie. Acești compuși au fost prezentat rapoarte ale concentrațiilor relative subunitare doar în cazul compușilor alcoolici (mentol) și fenolici (carvacrol), în timp ce alcoolii terțiari (linalool și terpinen-4-ol) sau derivații cu grupări hidroxilice substituie (eteri) au fost încapsulați la rapoarte supraunitare ale concentrațiilor.
4. Complecșii β -ciclodextrinei cu **uleiuri volatile** de plante din **famiile Rutaceae, Myrtaceae, Lauraceae și Rosaceae/Dicotyledonatae** au fost obținuți cu randamente între 55 și 84%. Și în acest caz alcoolii și fenolii au fost încapsulați relativ slab (rapoarte subunitare ale concentrațiilor) în timp ce hidrocarburile terpenice (limonen) au fost încapsulate cel mai bine (rapoarte supraunitare ale concentrațiilor).
5. Din familia **Liliaceae/Monocotyledoneae** s-a utilizat doar **uleiul volatil de usturoi**, randamentul de încapsulare fiind de aproape 73%. Principalii compuși identificați au fost compușii cu sulf (dialil- di-/tri-/tetrasulfură, alte sulfuri aciclice și ciclice). Compușii aciclici au fost încapsulați la rapoarte supraunitare ale concentrațiilor, în timp ce sulfurile ciclice au prezentat rapoarte subunitare.
6. Din clasa botanică Pinatae s-au folosit pentru încapsulare în β -ciclodextrină **uleiuri volatile** de brad, molid și terebentină (**familia Pinatae**) și trei uleiuri volatile de ienupăr (**familia Cupressaceae**), randamentele de obținere fiind de peste 72% în toate cazurile. Principalii componenți identificați au fost hidrocarburile terpenice mono- și biciclice (limonen și pineni), toate fiind încapsulate la concentrații superioare comparativ cu concentrațiile din uleiurile proaspete (rapoarte supraunitare ale acestor concentrații).
7. Ca regulă generală, toți compușii principali identificați au fost încapsulați la concentrații relative superioare celor din uleiurile proaspete, valoarea logaritmului coeficientului de partiție octanol/apă, logP, fiind în majoritatea cazurilor peste 2.5. Foarte puține excepții s-au întâlnit în cazul unor alcoolii sau derivați (feniletanol, eugenol, eucaliptol), cu valori ale logP sub 2 (încapsulați mai slab), sau cu valori mai mari ale hidrofobiei (logP>3) și cu structuri foarte rigide, care au fost încapsulați la concentrații scăzute (carvacrol).

8. În clasa Dicotyledonatae s-a reușit gruparea clară a familiilor botanice prin **analiză multivariată (PCA)** a datelor GC pe baza componentelor volatile identificate la concentrații semnificative, compușii volatili responsabili pentru această clasificare fiind cinamaldehida, antranilatul de linalil și unii alcooli, fenoli și esteri. În clasa Pinatae s-a obținut o clasificare excelentă din punct de vedere al tipului de ulei volatil: proaspăt sau recuperat din complex, respectiv în funcție de familiile botanice de proveniență, unde hidrocarburile mono- și sesquiterpenice ciclice au fost cele mai importante pentru grupare. Analiza multivariată a întregii cantități de date GC, atât pentru Dicotyledonatae, cât și pentru Pinatae, a condus la o grupare foarte bună a celor două clase.
9. Rezultatele bune obținute pentru complexii biosistemelor utilizate cu matrici ciclodextrinice (acceptate GRAS din 1998) recomandă utilizarea acestora la nivel industrial și implementarea metodelor de analiză pentru sistemele HACCP.

3.4. APLICAȚII ALE COMPLECȘILOR ULEI VOLATIL/ β -CICLODEXTRINĂ (REZULTATE ȘI DISCUȚII)

Complecșii β -ciclodextrinei cu uleiurile volatile de plante din familia Rutaceae (lămâie și portocală) au fost utilizați la obținerea pe o linie industrială a unor produse de patiserie ("madalenas") în scopul verificării posibilității de îmbunătățire a calității produselor, de stabilizare și eliberare controlată a aromelor utilizate. Produsele au fost realizate în duplicat.

S-a lucrat în două variante:

- prin adăugarea în compoziția standard a complecșilor obținuți anterior;
- prin adăugarea separată a β -ciclodextrinei și uleiului volatil (cu posibilitatea formării parțiale a complecșilor în timpul amestecării).

Produsele cu complecși ai ciclodextrinei au fost comparate cu probe similare obținute cu ulei volatil sau aromă standard utilizată în procesul normal de fabricație.

În general, produsele conținând complecși ulei volatil/ β -ciclodextrină au prezentat un aspect exterior mai uniform și o uniformitate mai mare a coacerii (în secțiune longitudinală și transversală). Analiza standardizată [233] a unor astfel de produse se realizează eficient prin analiză senzorială [226,227,229,234,235], utilizând ca subiecți consumatori obișnuiți. Principalele variabile evaluate senzorial (caracteristici organoleptice) au fost aspectul, consistența, culoarea, aroma și gustul (vezi 3.5.3). Prelucrarea statistică multivariată a permis evaluarea caracteristicilor importante din punct de vedere senzorial, deși gruparea probelor nu a fost excelentă.

Analiza PCA a rezultatelor analizei senzoriale a indicat o acceptabilitate mai mare pentru produsele ce conțin ulei volatil de portocale (complexat sau necomplexat), codificate cu **P** în figura 3.132, în comparație cu cele cu ulei sau aromă de lămâie (**L**), primele fiind în general localizate în zona pozitivă a graficului scorurilor PC2 vs PC1. Primele trei componente principale din analiza PCA explică 76% din varianța datelor (PC1 45%, PC2 23% și PC3 8%). Dacă se încearcă o analiză a datelor în funcție de aditivul aromatizant utilizat (codificate cu **C**-complex al β -ciclodextrinei, **bCD**- β -ciclodextrină necomplexată, **UV**-ulei volatil neîncapsulat, **A**-aromă standard) se poate observa o oarecare grupare în zona pozitivă a graficului scorurilor (figura 3.133) a probelor ce conțin complecși cu β -ciclodextrină, deși există și unele excepții; acest lucru demonstrează o acceptabilitate mai mare a acestor produse. În general, probele cu aromă standard sunt situate la valori negative ale componentelor principale, în special pentru PC2 (**A** în partea inferioară a graficului). Aceste rezultate ale acceptabilității sunt datorate în special variabilelor gust și aromă pentru prima componentă principală și aspectului pentru cea de-a doua componentă principală (figura 3.134).

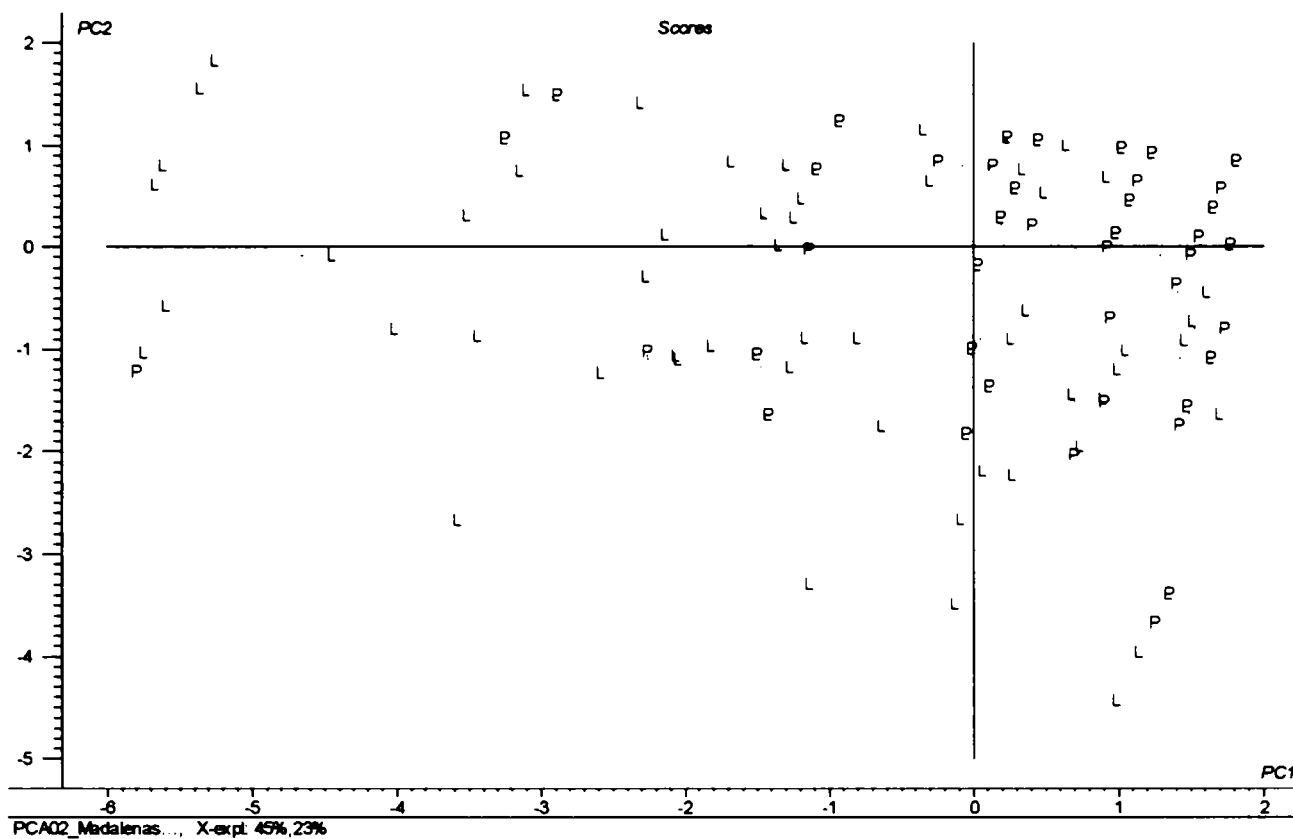


Figura 3.132. Graficul scorurilor PC2 vs PC1 în cazul analizei PCA a datelor de analiză senzorială pentru "madalenas"; codificare: P-aromă de portocale, L-aromă de lămâie.

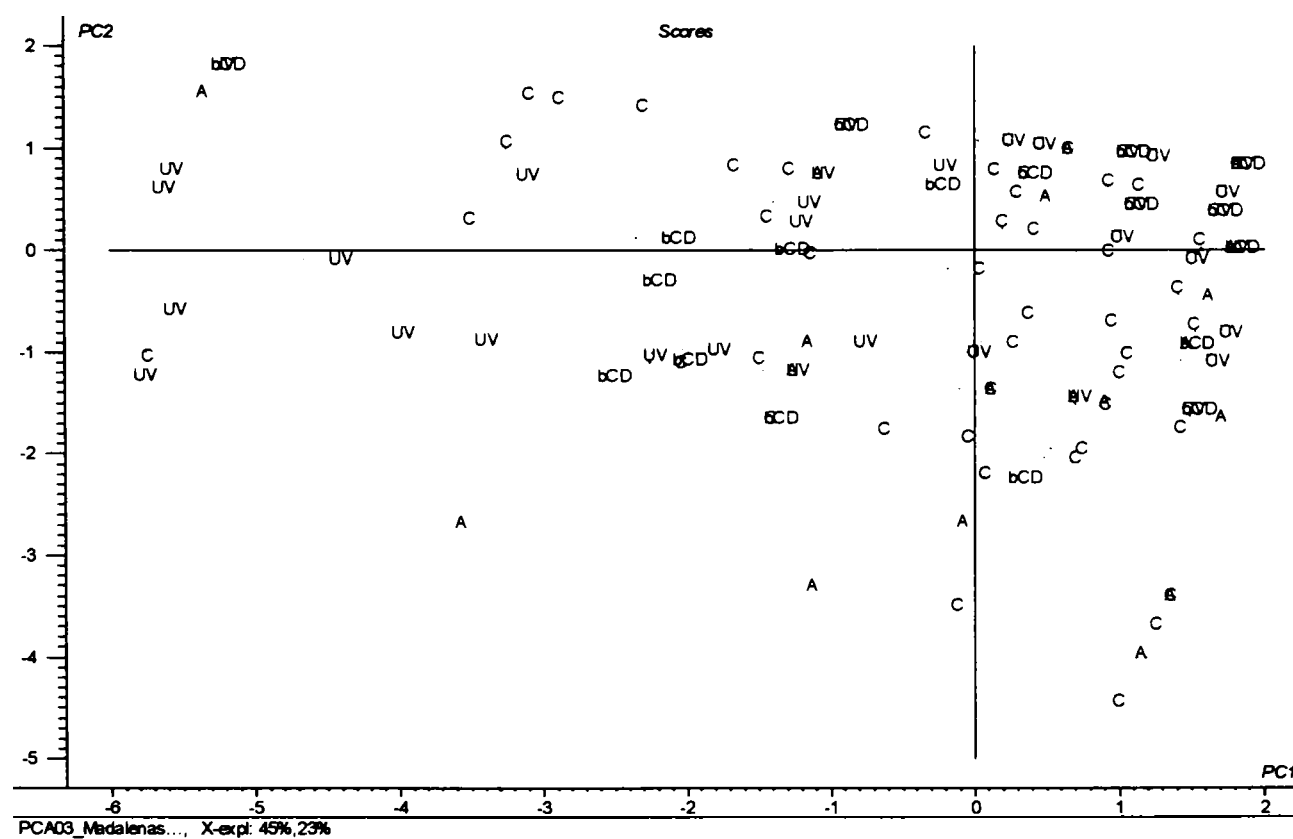


Figura 3.133. Graficul scorurilor PC2 vs PC1 în cazul analizei PCA a datelor de analiză senzorială pentru "madalenas"; codificare: C-complex al β -ciclodextrinei, bCD- β -ciclodextrină necomplexată, UV-ulei volatil neîncapsulat, A-aromă standard.

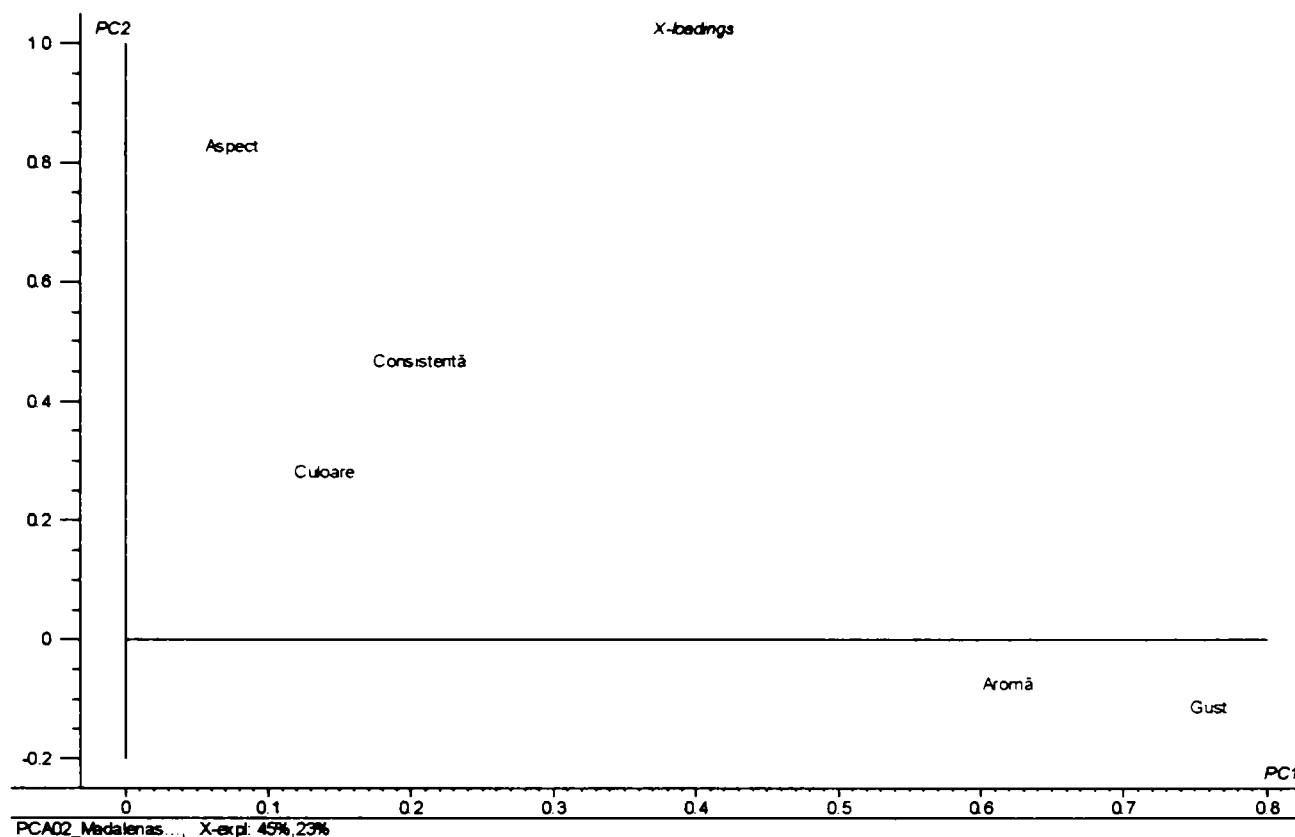


Figura 3.134. Graficul înregistrărilor PC2 vs PC1 în cazul analizei PCA a datelor de analiză senzorială pentru "madalenas".

1.1.1. Concluzii parțiale

În urma analizelor senzorială și statistică multivariată (PCA) a produselor de patiserie obținute pe linie industrială, utilizând complecși ulei volatil de lămâie și portocale (familia Rutaceae) se pot trasa următoarele concluzii parțiale:

1. S-au obținut pe linie industrială 9 produse de patiserie de tip "madalenas" (în duplicat) conținând complecși ai β -ciclodextrinei cu ulei volatil de lămâie sau de portocale, amestecuri mecanice de β -ciclodextrină și ulei volatil sau aromă, respectiv ulei volatil sau aromă fără ciclodextrină.
2. Produsele obținute cu complecși ai ciclodextrinei sau cu amestecuri mecanice ale acestora au prezentat uniformitate și consistență superioare probelor martor, iar analiza senzorială a produselor, pentru un panel de 14 consumatori, a indicat o acceptabilitate mai mare a probelor cu complex (în special cu ulei volatil de portocale), fapt demonstrat prin analiză statistică multivariată PCA, cele mai importante caracteristici în acest sens fiind gustul, mirosul și aspectul.

3.5. PARTE EXPERIMENTALĂ

3.5.1. Nanoîncapsularea acizilor grași

3.5.1.1. Materiale utilizate

Materialele utilizate pentru încapsularea moleculară a acizilor grași au fost *acidul oleic*, *acidul linoleic* (99% puritate, Fluka Chemie AG), *acid linolenic* (natural, puritate >70%, Fluka Chemie AG), α - și β -ciclodextrină (purtate >99%, Merck&Co, Inc.), *soluția standard de alcani liniari C_x-C₂₀* (necesară determinării indicilor Kovats pentru compușii analizați prin GC-MS, Fluka Chemie AG), *alcool etilic* (p.a., 96%, Chimopar București), *metanol·BF₃* (necesar derivatizării acizilor carboxilici, pentru sinteză, 20% BF₃, Merck Chemical&Co, Inc.), *hexan* (p.a., 99%, Merck Chemical&Co, Inc.) și *dodecan* (standard extern, 99%, Riedel-de-Haën).

3.5.1.2. Metoda de complexare a acizilor grași

Mod de lucru general:

Pentru nanoîncapsularea acizilor grași nesaturați s-a utilizat metoda în soluție etanol-apă. S-au cântărit la balanța analitică 540 mg (0.5 mmoli) α -ciclodextrină·6H₂O sau 671 mg (0.5 mmoli) β -ciclodextrină·11.5H₂O și s-au dizolvat în 8 ml apă distilată la temperatura de 50±1°C. Peste această soluție s-au introdus, în picături, sub agitare, 5 ml soluție etanolică de acid gras nesaturat (0.5 mmoli acid gras, respectiv 28.24 mg acid oleic/ml, 28.04 mg acid linoleic/ml și 27.84 mg acid linolenic/ml), corespunzătoare unui raport molar acid gras : ciclodextrină de 1 : 1. Pe măsura adăugării soluției de acid gras, complexul format a început să cristalizeze, iar după finalizarea adăugării soluției de acid suspensia s-a agitat la temperatura de mai sus încă 15 minute, după care s-a răcit lent (pe o baie de apă) în timp de 4 ore. S-a lăsat apoi la temperatura de 4°C pentru 24 ore pentru finalizarea cristalizării complexilor, după care cristalele obținute s-au filtrat, s-au spălat cu puțin etanol și s-au uscat în exicator. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 3.34.

Tabel 3.34. Nanoîncapsularea acizilor grași C_{18:1}, C_{18:2} și C_{18:3} în α - și β -ciclodextrină.

Nr.	Complex	Acid gras		V _{EtOH} (ml)	α/β CD		V _{apă} (ml)	Complex (mg)	Randament (%)
		mg	mmoli		mg	mmoli			
1	Acid oleic/ α CD	141.2			540			494.6	72.61
2	Acid oleic/ β CD	141.2			671			585.5	85.95
3	Acid linoleic/ α CD	140.2	0.5	5	540	0.5	8	598.2	87.94
4	Acid linoleic/ β CD	140.2			671			599.9	73.95
5	Acid linolenic/ α CD	139.2			540			617.8	90.96
6	Acid linolenic/ β CD	139.2			671			480	59.24

3.5.1.3. Derivatizarea acizilor grași

Mod de lucru general:

Pentru analiza GC-MS a acizilor grași a fost necesară derivatizarea acestora cu obținerea esterilor metilici corespunzători (figura 3.135), mult mai volatili. Derivatizarea (esterificarea) s-a realizat în balon cu fund rotund de 100 ml, prevăzut cu refrigerent de reflux, în care s-au cântărit câte 100 mg acid oleic, linoleic sau linolenic, 5 ml soluție metanolic·BF₃ (20% BF₃, acid Lewis); s-a refluxat pe baie de apă timp de 2 minute, s-au introdus apoi 2 ml hexan și s-a continuat refluxarea încă un minut. După răcire, masa derivatizată a fost tratată cu 15 ml soluție saturată de NaCl, agitată energic timp de 15 secunde, apoi balonul a fost completat cu aceeași soluție de sare până la separarea stratului organic în gâtul balonului, de unde acesta a fost separat și uscat pe CaCl₂ anhidră.

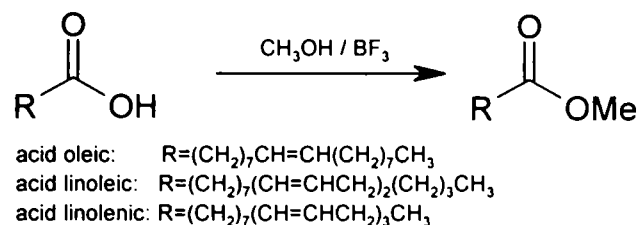


Figura 3.135. Derivatizarea acizilor grași (acizii oleic, linoleic și linolenic) în sistem metanol- BF_3 .

3.5.1.4. Recuperarea acizilor grași din complex

Mod de lucru general:

Pentru recuperarea acizilor grași din complexii cu α - sau β -ciclodextrină prin extracție repetată în hexan, s-au cântărit la balanța analitică probe de complex de câte 100 mg, care au fost dizolvate în 4 ml apă distilată într-un extractor termostatat, prevăzut cu manta, refrigerent eficient de răcire și sistem de agitare magnetică energică. S-au introdus apoi 2 ml hexan și s-a agitat energic timp de 20 de minute aproape de temperatura de fierbere a hexanului, după care s-a răcit, stratul organic superior s-a separat prin pipetare, iar stratul apos s-a extras din nou în mod similar, încă de trei ori cu câte 2 ml hexan. Extractele hexanice reunite au fost apoi uscate pe $CaCl_2$ anhidru, derivatizate și analizate prin GC-MS.

3.5.1.5. Derivatizarea probelor extrase din complex

Mod de lucru general:

Pentru derivatizarea probelor recuperate prin extracție repetată din complecși s-a lucrat în modul prezentat la derivatizarea acizilor grași (vezi 3.5.2.3) utilizând câte 5 ml extract hexanic (obținut la recuperarea din complecși).

3.5.1.6. Degradarea acizilor grași și a complexilor acestora cu α - și β -ciclodextrină

Mod de lucru pentru degradarea acizilor grași:

S-au pipetat în strat subțire și uniform volume de acid gras de aproximativ 100 mg (acid oleic, linoleic și linolenic, codificați prin OLA004-OLA006, LOLA004-LOLA007 și LNLA004-LNLA007, tabel 3.35) în recipiente de sticlă cu fund plat de dimensiuni $40 \times 40 \text{ mm}^2$, care au fost introduse în cuptor termostatat, cu posibilitate de reglare și măsurare a temperaturii. Probele au fost menținute la temperaturi de 50°C , 100°C și 150°C timp de două ore, în prezența aerului la presiune de 1 atm și umiditate relativă de 70%. După răcire, probele au fost reluate de cinci ori cu câte 1 ml hexan, iar soluția obținută a fost derivatizată și analizată prin GC-MS.

Mod de lucru pentru degradarea complexilor:

S-au cântărit câte 100 mg complex acid gras/ciclodextrină (codificate OLA/LOLA/LNLA 007/008/009_aCD/bCD, tabel 3.35) în recipiente de sticlă cu fund plat de dimensiuni $40 \times 40 \text{ mm}^2$, s-au divizat fin și s-au repartizat uniform pe toată suprafața, după care au fost introduse în cuptorul termostatat la temperaturi de 50°C , 100°C și 150°C pentru 2 ore, în prezența aerului (umiditate relativă 70%) la presiune atmosferică. După răcirea probelor, acestea au fost reluate de patru ori cu câte 1 ml apă distilată și supuse extracției repetate în hexan pentru recuperarea acizilor și a compușilor de degradare extractibili în modul prezentat (vezi 3.5.1.4).

Codurile și condițiile de degradare pentru acizii grași și pentru complexii acestora cu α - și β -ciclodextrină sunt prezentate sistematizat în tabelul 3.35.

Tabel 3.35. Condiții de degradare pentru acizii oleic, linoleic și linolenic, respectiv pentru complexii acestora cu α - și β -ciclodextrină.

Nr.	Denumire probă	Cod	m _{probă} (mg)	Temperatură (°C)	Timp (min)
1	Acid oleic	OLA004_050C	100	50	120
2		OLA005_100C		100	
3		OLA006_150C		150	
4	Acid oleic/ α -ciclodextrină	OLA007_aCD_050C	100	50	120
5		OLA008_aCD_100C		100	
6		OLA009_aCD_150C		150	
7	Acid oleic/ β -ciclodextrină	OLA010_bCD_050C	100	50	120
8		OLA011_bCD_100C		100	
9		OLA012_bCD_150C		150	
10	Acid linoleic	LOLA004_050C	100	50	120
11		LOLA005_100C		100	
12		LOLA006_150C		150	
13	Acid linoleic/ α -ciclodextrină	LOLA007_aCD_050C	100	50	120
14		LOLA008_aCD_100C		100	
15		LOLA009_aCD_150C		150	
16	Acid linoleic/ β -ciclodextrină	LOLA010_bCD_050C	100	50	120
17		LOLA011_bCD_100C		100	
18		LOLA012_bCD_150C		150	
19	Acid linolenic	LNLA004_050C	100	50	120
20		LNLA005_100C		100	
21		LNLA006_150C		150	
22	Acid linolenic/ α -ciclodextrină	LNLA008_aCD_100C	100	100	120
23		LNLA009_aCD_150C		150	
24	Acid linolenic/ β -ciclodextrină	LNLA011_bCD_100C	100	100	120
25		LNLA012_bCD_150C		150	

3.5.1.7. Derivatizarea acizilor grași degradați și a probelor extrase din complexii degradați

Mod de lucru general:

Pentru derivatizarea probelor de acizi grași degradați (soluții hexanice) sau a probelor obținute prin extracție repetată din complexii degradați (soluții hexanice) s-a lucrat în modul prezentat la derivatizarea acizilor grași (vezi 3.5.2.3) utilizând câte 5 ml extract hexanic. Derivatizarea cu soluție metanolică de BF_3 a condus la obținerea esterilor metilici în cazul acizilor mono- și dicarboxilici (figura 3.135) și a acetalilor sau cetalilor în cazul compușilor carbonilici (figura 3.136).

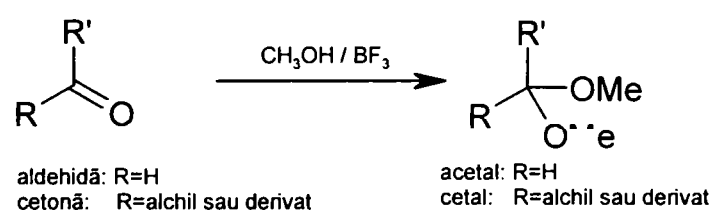


Figura 3.136. Derivatizarea compușilor carbonilici în sistem metanol- BF_3 .

3.5.1.8. Analiza GC-MS

Pentru analiza acizilor grași derivați sau a probelor degradate derivate s-a folosit un sistem de analiză gaz cromatografică cuplată cu un sistem de detecție de spectrometrie de masă. S-a utilizat un GC Hewlett Packard HP 6890 Series cuplat cu un spectrometru de masă Hewlett Packard 5973 Mass Selective Detector. Pentru determinările cantitative s-a folosit un factor de calibrare de 1.0 (standard extern dodecan), iar injecția s-a realizat cu ajutorul unui Autosampler HP atașat sistemului GC-MS. Factorul de calibrare a fost determinat ca panta dreptei obținute din reprezentarea ariei picului GC în

funcție de concentrația standardului (dodecan) ($A = 0.998 \cdot c$, $r = 0.999$) pentru cinci probe de concentrații diferite injectate automat (tabel 3.36):

Tabel 3.36. Arie GC (abundență) și concentrații ale soluțiilor de standard extern (dodecan, mg/ml) utilizate pentru determinarea factorului de calibrare.

Nr.	c (mg/ml)	Arie (abundență)
1	0.4	40937940
2	0.8	81846015
3	1.2	121253910
4	1.6	163670750
5	2.0	204589691

Condițiile de analiză GC au fost:

- coloana: HP-5 MS, lungime 30 m, diametru interior 0.25 mm, grosimea filmului de 0.25 μm ;
- program de temperatură: 50°C la 250°C cu o viteză de 4°C/min;
- temperatura injectorului: 280°C;
- temperatura detectorului: 280°C;
- volum de injecție: 2 μl ;
- gaz purtător: He.

Pentru detectorul MS s-a lucrat cu o energie EI de 70eV, la o temperatură a sursei de 150°C, domeniu de scanare 50-300 amu, viteză de scanare de 1 s⁻¹ pentru spectrometria de masă, iar spectrele obținute au fost comparate cu o bază de date NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library 2.0 (2002). Achiziția de date s-a realizat cu ajutorul pachetului de programe Hewlett Packard Enhanced ChemStation G1701BA ver. B.01.00/1998, iar prelucrarea datelor de gaz cromatografie și de spectrometrie de masă s-a realizat cu ajutorul programului Hewlett Packard Enhanced Data Analysis din pachetul de programe de mai sus. Datele analizelor MS pentru compușii de impurificare și de degradare din analiza probelor de acizi grași sunt prezentate în Anexa A.1.

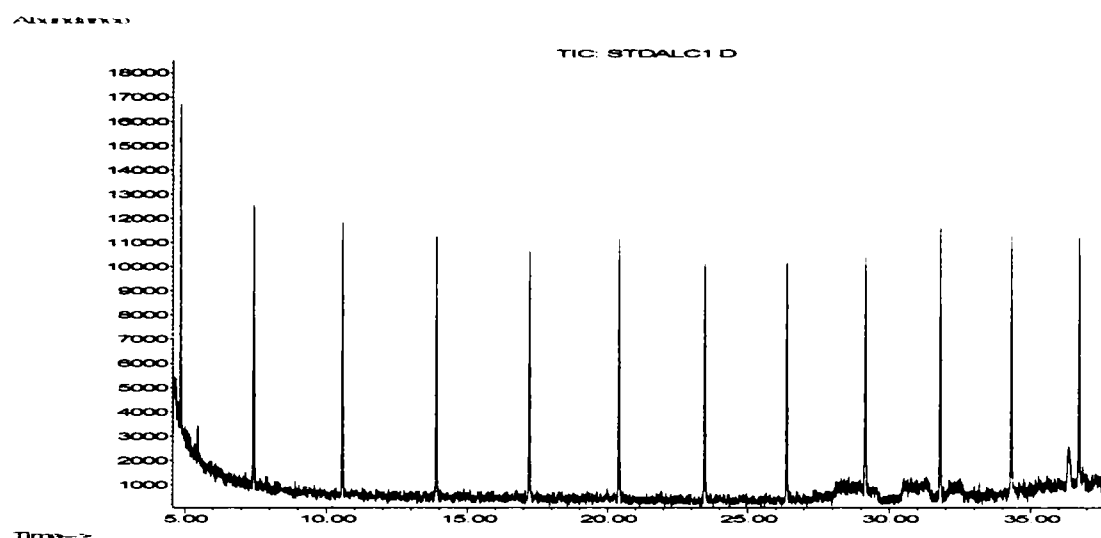
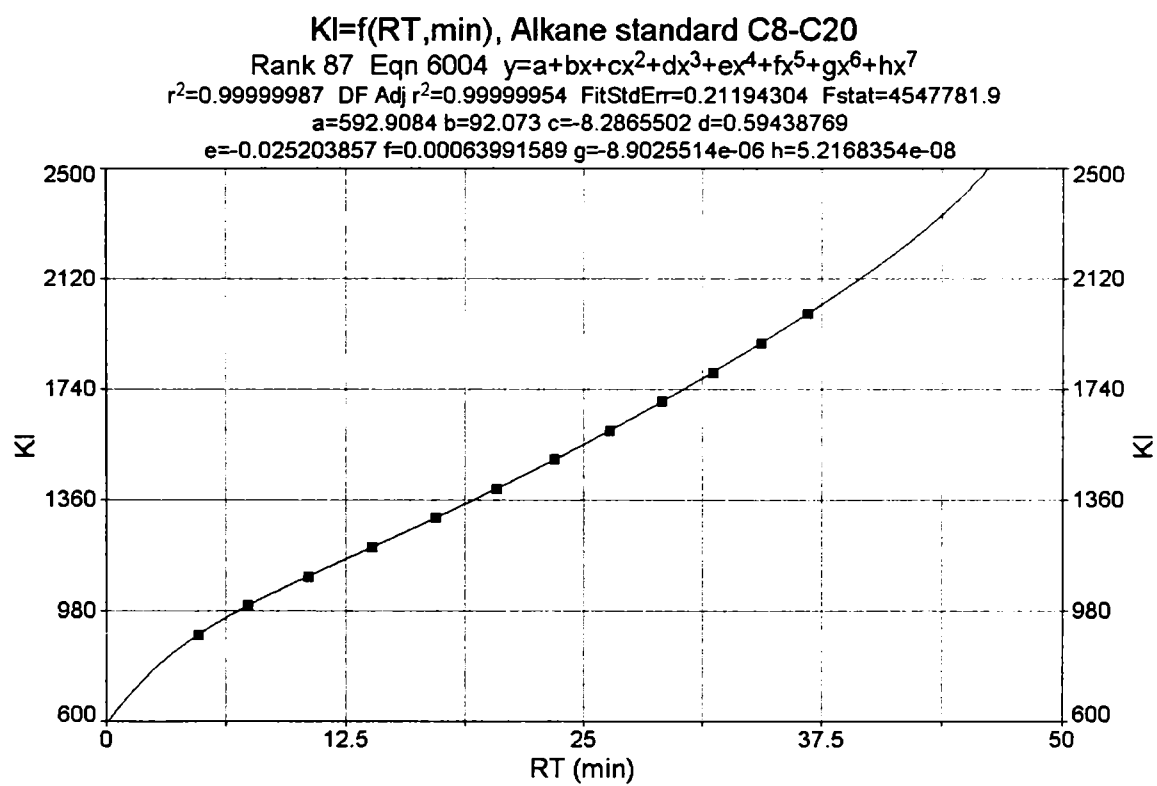
3.5.1.9. Determinarea indicilor de retenție Kovats (KI)

Identificarea compușilor în urma analizei GC-MS s-a realizat, în paralel cu identificarea pe baza spectrelor MS, și pe baza indicilor de retenție Kovats (KI) pentru cazurile în care s-a dispus de date privind indicii de retenție pentru etaloanele corespunzătoare. S-au putut identifica în acest mod acizii grași nesaturați principali (oleic, linoleic și linolenic) și unii acizi grași saturați (palmitic, stearic). Pe lângă posibilitatea identificării compușilor, pentru mulți dintre componenții probelor analizate, care au putut fi identificați clar pe baza spectrelor MS, s-au determinat indicii Kovats corespunzători pentru coloana GC utilizată (HP-5 MS). Valorile acestor indici nu depind decât de tipul coloanei utilizate. Programul de temperatură, temperaturile injectorului și detectorului sau debitul gazului purtător nu au nici o influență asupra acestui parametru.

Pentru determinarea indicilor de retenție Kovats s-a procedat în modul următor: s-a injectat o probă de 2 μl de amestec de soluție standard de alcani liniari C₈-C₂₀ (drept solvent a fost utilizat hexanul, iar octanul a fost în zona de apariție a solventului-delay-și nu a putut fi introdus în calcul) în gaz cromatograf, în aceeași coloană cromatografică și aceleași condiții de analiză ca în cazul probelor de acizi grași derivatizați. După confirmarea (pe baza spectrelor MS) structurilor de alcani liniari separați prin analiza GC (figura 3.137) s-a determinat tipul de retenție pentru fiecare componentă a amestecului. Corelarea indicilor de retenție Kovats convenționali (tabelul 3.37) cu timpii de retenție obținuți în urma analizei GC conduce la o curbă de etalonare (figura 3.138) polinomială (de ordin 7) care a fost utilizată pentru determinarea valorilor indicilor Kovats pentru compușii studiați prin interpolarea timpilor de retenție corespunzători (determinați din analiza GC) pe graficul KI vs RT.

Tabel 3.37. Valorile indicilor de retenție Kovats (KI) și a timpilor de retenție (RT) pentru alcanii liniari C₈-C₂₀.

Nr.	Alcan liniar	KI	RT (min)	Nr.	Alcan liniar	KI	RT (min)
1	octan, C ₈	800	-	8	pentadecan, C ₁₅	1500	23.47
2	nonan, C ₉	900	4.86	9	hexadecan, C ₁₆	1600	26.39
3	decan, C ₁₀	1000	7.44	10	heptadecan, C ₁₇	1700	29.16
4	undecan, C ₁₁	1100	10.57	11	octadecan, C ₁₈	1800	31.80
5	dodecan, C ₁₂	1200	13.89	12	nonadecan, C ₁₉	1900	34.32
6	tridecan, C ₁₃	1300	17.21	13	eicosan, C ₂₀	2000	36.72
7	tetradecan, C ₁₄	1400	20.41				

**Figura 3.137.** Gaz cromatograma pentru amestecul standard de alcani liniari C₉-C₂₀ (C₆ și C₈ au fost solvenți) utilizată pentru determinarea indicilor de retenție Kovats.**Figura 3.138.** Reprezentarea dependenței indicelui de retenție Kovats (KI) funcție de timpul de retenție (RT) pentru alcanii liniari C₉-C₂₀.

3.5.1.10. Calorimetria de scanare diferențială (DSC)

Calorimetria de scanare diferențială (DSC) a nanocapsulelor acizi grași/ciclodextrine s-a realizat cu ajutorul unui aparat DSC Netzsch 204. S-au cântărit la balanța analitică, direct în capsulele speciale de Al_2O_3 utilizate pentru analiza calorimetrică, mase aproximativ egale (10 ± 2 mg) din acizii oleic, linoleic sau linolenic, respectiv din nanocapsulele cu α - sau β -ciclodextrină care s-au supus analizelor DSC în următoarele condiții:

- program de temperatură de la $20^\circ C$ la $200^\circ C$, cu o viteză de încălzire de $4^\circ C/\text{minut}$ pentru probele solide (complecșii acizilor grași cu α - sau β -ciclodextrina);
- program de temperatură de la $-50^\circ C$ la $200^\circ C$, cu o viteză de încălzire de $4^\circ C/\text{min}$ pentru probele lichide (acizii grași); s-a lucrat pe acest interval de temperatură pentru evaluarea unor caracteristici termodinamice ale compușilor puri, răcirea efectuându-se cu azot lichid;
- achiziția de date s-a realizat cu ajutorul programului specific DSC Netzsch 204-Acquisition Soft/2000;
- prelucrarea datelor s-a efectuat cu programul Netzsch Proteus-Thermal Analysis ver. 4.0 / 2000.

Analizele DSC au indicat, în cazul acizilor grași puri, efecte endoterme corespunzătoare transformării de fază solid-lichid (topire) la $13.9^\circ C$, $-7.1^\circ C$ și, respectiv, $-12.8^\circ C$ (corespunzătoare punctelor de final al efectelor- t_{end} ; vezi figura 3.139, unde sunt trecute și valorile temperaturilor corespunzătoare minimului endotermic- t_{peak} și valorile "onset" corespunzătoare temperaturilor de început pentru efectul caloric considerat- t_{onset}) pentru acizii oleic, linoleic și linolenic, celelalte caracteristici ale analizei fiind prezentate în tabelul 3.38. În cazul acidului oleic mai apare un pic endoterm la aproximativ $-18^\circ C$, care nu a putut fi atribuit vreunei transformări. Pe intervalul 20 - $200^\circ C$ (neprezentat în figură) nu s-a observat apariția nici unui efect semnificativ.

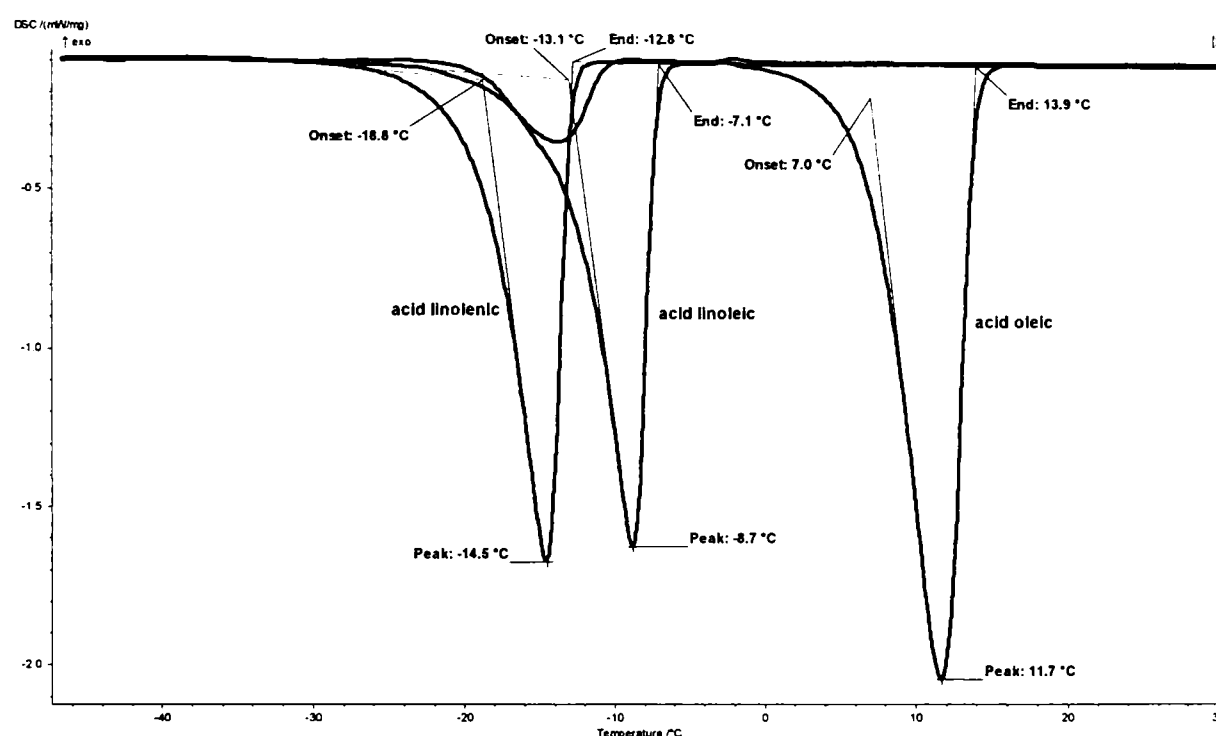


Figura 3.139. Analiza DSC a acizilor oleic, linoleic și linolenic.

Tabel 3.38. Caracteristicile analizei DSC pentru acizii oleic, linoleic și linolenic, comparativ cu datele de literatură [23,236]

Nr.	Acid gras nesaturat	t_{end} (°C)	t_{peak} (°C)	t_{onset} (°C)	t_{23J} (°C)	t_{236J} (°C)
1	Acid oleic	13.9	11.7	7	13.4/16.3 ^(a)	4
2	Acid linoleic	-7.1	-8.7	-13.1	-5	-12
3	Acid linolenic	-12.8	-14.5	-18.8	-11	

^(a) Acidul oleic prezintă două forme alotropice: α și β . temperaturile de topire sunt indicate în această ordine

Datorită faptului că acizii grași nu prezintă alte efecte calorice până la 20°C, iar ciclodextrinele pure prezintă efecte calorice corespunzătoare eliberării apei de cristalizare doar peste 60°C, analizele DSC pentru complecși s-au efectuat doar în intervalul 20-200°C. Determinarea efectului caloric corespunzător disocierii complexului acid gras/ciclodextrină s-a realizat după identificarea picului care se diferențiază de alura curbei corespunzătoare acizilor grași și ciclodextrinelor pure (care apare după pierderea apei de cristalizare remanente, mai evident în cazul complecșilor cu β -ciclodextrină și este mai puțin evident, dar posibil de prelucrat, în cazul complecșilor cu α -ciclodextrină). Un exemplu de calcul al acestui efect termic este prezentat în figura 3.140. Integrarea și transformarea automată în unități de energie s-a realizat utilizând trei variante de trasare a liniei de bază, lucru mai dificil de realizat datorită faptului că picurile corespunzătoare deshidratării și decomplexării sunt relativ apropiate. S-au utilizat linii de bază de tip liniar, tangențial și orizontal (intersecție cu curba DSC în la temperatura maximă corespunzătoare intervalului de determinare), pentru intervale de temperatură corespunzătoare punctelor de tangență a curbei DSC cu o aceeași dreaptă (care este și prima dintre liniile de bază). În figura 3.140 este prezentat un exemplu de trasare a liniilor de bază și de integrare automată pentru complexul acid oleic/ β -ciclodextrină. Datele de literatură [112] indică utilizarea preferențială, în aceste cazuri, a liniilor de bază de tip liniar sau tangențial și prin urmare, în calculele efectuate în continuare am utilizat valorile obținute cu prima variantă de linie de bază. Transformarea valorilor corespunzătoare efectului endoterm (considerate pozitive pentru efectul exoterm al interacțiunii, egal în valoare absolută cu efectul datorat disocierii) în kcal/mol (valori determinate și în cazul evaluării teoretice a interacțiunii) s-a realizat după relația simplă:

$$E(kcal/mol) = \frac{E(J/g) \cdot 1135}{1000 \cdot 4.185}$$

unde $E(kcal/mol)$ reprezintă energia de interacțiune ce se compară cu energia de interacțiune determinată teoretic, $E(J/g)$ este energia corespunzătoare efectului endoterm, determinată prin integrare automată pentru cazul unei linii de bază de tip liniar, 1135 g/mol este masa molară a β -ciclodextrinei (fără molecule de apă de cristalizare, care au fost eliberate la temperaturi mai scăzute), iar 1000·4.185 este coeficientul de transformare a unităților J în unități $kcal$.

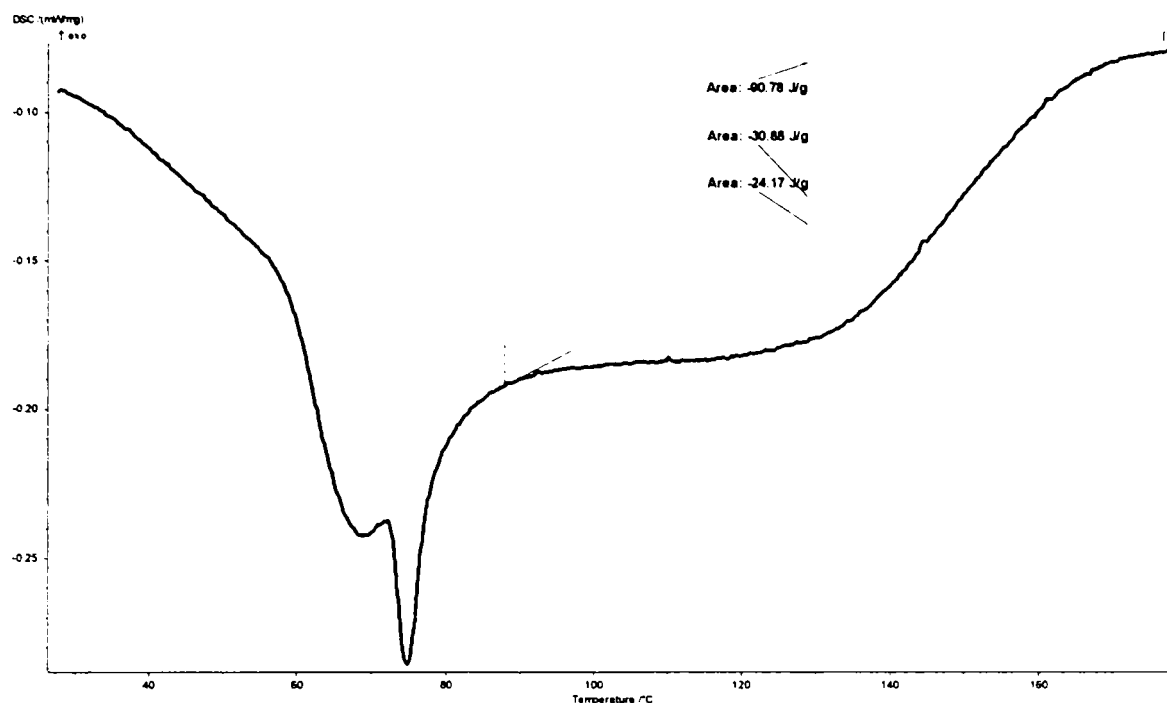


Figura 3.140. Analiza DSC a complexului acid oleic/ β -ciclodextrină și modul de trasare a liniei de bază, respectiv de integrare a ariei obținute.

3.5.1.11. Modelarea moleculară

Modelarea moleculară pentru acizii grași nesaturați (acizii oleic, linoleic și linolenic), pentru α - și β -ciclodextrină, respectiv docarea acizilor grași în ciclodextrine s-a realizat cu ajutorul pachetului de programe HyperChem (programul de mecanică moleculară MM+), folosindu-se un gradient RMS de 0.005 kcal/mol. Pentru optimizare s-a utilizat algoritmul Polak-Ribiere cu gradient conjugat.

Pentru modelarea moleculară a acizilor grași s-a procedat în modul următor: fiecare acid a fost construit separat cu ajutorul pachetului de programe amintit, ținând cont de configurațiile (*Z*) ale dublelor legături. S-au atribuit automat lungimile specifice legăturilor și unghiurile de legătură corespunzătoare, apoi s-au definit unghiurile de torsiune care să fie luate în considerare pentru efectuarea analizei conformaționale (vezi mai jos), în urma căreia s-au identificat conformațiile acizilor grași cele mai stabile din punct de vedere termodinamic, care au fost utilizate în continuare în experimentele teoretice de docare și determinare a energiei de interacțiune.

Modelarea moleculară a α - și β -ciclodextrinei s-a realizat tot prin mecanică moleculară, însă aceste structuri au fost construite în concordanță cu datele de raze *X* din literatura de specialitate [18], deoarece numărul foarte mare de unghiuri de torsiune necesare a fi variat într-o analiză conformațională este foarte mare. După construcția structurii ciclodextrinelor, acestea au fost optimizate prin metoda prezentată, cu obținerea unei conformații cu minim energetic local, care a fost utilizată în continuare în experimentele de docare.

Docarea acizilor grași în conformație de energie minimă în α - și β -ciclodextrină s-a realizat prin poziționarea structurii acidului gras cu partea hidrofobă fie spre baza mare a ciclodextrinei (ce conține grupele hidroxil secundare), fie spre baza mică a acesteia (ce conține grupele hidroxil primare), pe axa *OZ* (corespunzătoare structurii "tronconice" a ciclodextrinei, axă ce trece prin centrele celor două baze) la o distanță între centrele de greutate ale celor două structuri implicate în interacțiune de 8Å (figura 3.141). Cele mai mari energii de interacțiune (cea mai mică energie absolută a complexului, valoare care a fost scăzută din suma energiilor absolute ale celor două componente ale complexului, modelate molecular separat, pentru obținerea energiei de interacțiune, vezi tabelul 3.6) au fost obținute pentru cazul orientării structurii acidului gras spre baza mare a ciclodextrinei, ce conține grupările hidroxil secundare.

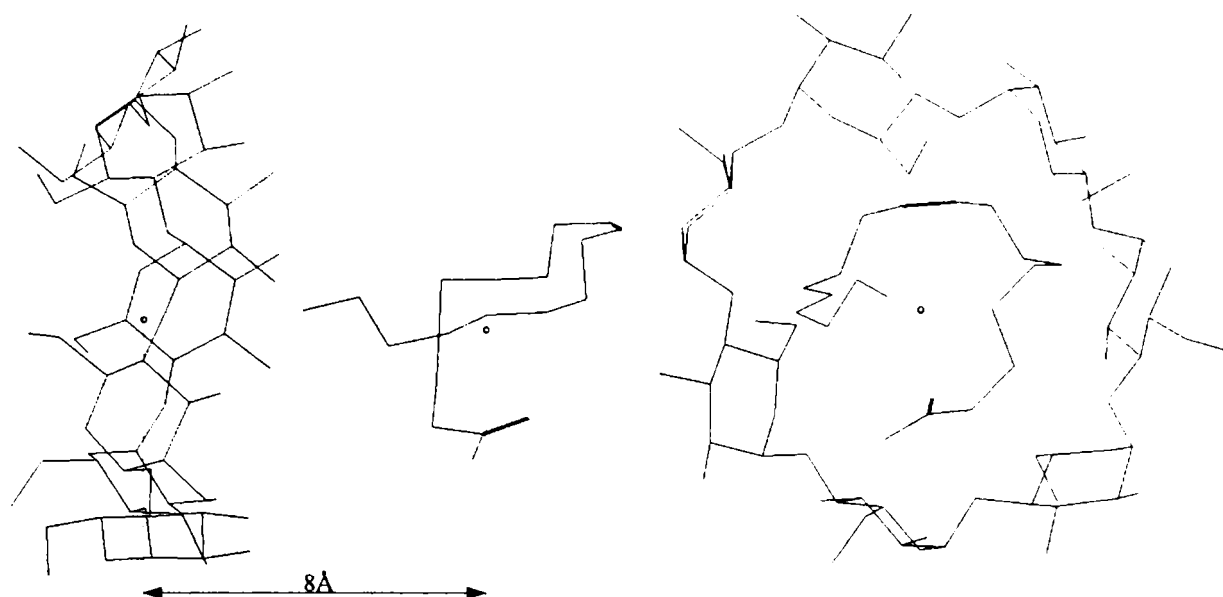


Figura 3.141. Poziții de start pentru acidul gras (aici acidul oleic) și ciclodextrină utilizate pentru experimentele de docare: distanța s-a calculat între centrele de greutate ale celor două molecule, pe direcția axei longitudinale ce străbate cele două centre ale bazelor tronconului cu care este aproximată structura ciclodextrinei (orientare după axa *OX*-stânga și după axa *OZ*-dreapta).

3.5.1.12. Analiza conformațională

Deoarece structurile acizilor oleic, linoleic și linolenic sunt foarte flexibile, numărul unghiurilor de torsiune necesare a fi variate a fost mare. Analiza conformațională s-a realizat cu programul Conformational Search din pachetul de programe HyperChem. S-a lucrat în modul următor: structura acidului gras într-o conformație oarecare, dar cu lungimi de legătură și unghiuri de legătură definite, a fost conectat la programul de analiză conformațională prin alocarea tuturor unghiurilor de torsiune definite. Au fost setate domeniile de variație ale unghiurilor de torsiune, criteriul energetic de acceptare a conformației, condițiile pentru anularea conformațiilor similare și a duplicatelor, programul de optimizare de mecanică moleculară, algoritmul de lucru și gradientul de optimizare, respectiv numărul maxim pentru iterații, optimizări și conformații reținute (înregistrate). Conformația de start pentru fiecare optimizare a fost aleasă aleator pe baza unui criteriu ce ține cont de ora indicată de calculator. S-a utilizat pentru experimentul de docare doar prima dintre conformații, cea mai stabilă (cu energia absolută cea mai mică). Condițiile de lucru sunt cele prezentate mai jos:

- variația unghiurilor de torsiune flexibile: $\pm 60^\circ - \pm 180^\circ$;
- criteriu energetic de acceptare a conformației: 4 kcal/mol peste minim;
- anularea conformațiilor: pentru atomii cu distanțe mai mici de 0.5 Å și pentru diferențe de unghiuri de torsiune sub 15° ;
- conformații duplicat: diferențe de energie sub 0.05 kcal/mol;
- program de optimizare: MM+;
- algoritm de optimizare: Polak-Ribiere;
- gradient RMS de optimizare: 0.005 kcal/mol;
- număr maxim de iterații: 500;
- număr maxim de optimizări: 500;
- număr de conformații maxim reținut: 50.

3.5.2. Nanoîncapsularea uleiurilor volatile

3.5.2.1. Materiale utilizate

Materialele utilizate pentru încapsularea moleculară au fost în principiu uleiurile volatile achiziționate din diverse surse (tabel 3.39) și β -ciclodextrina, de puritate >99%, achiziționată de la firma Merck&Co Inc. Soluția standard de alcani liniari C_8 - C_{20} și alcoolul etilic 96% au fost obținute de la Fluka Chemie AG, respectiv Chimopar-București.

Tabel 3.39. Uleiuri volatile utilizate pentru încapsulare.

Nr.	Cod	Denumire tradițională	Specie	Familie	Clasă	Sursă
1	04-UV	Chimen	<i>Carum carvi</i> L.	Apiaceae (Umbelliferae)	Dicotyledonatae (Magnoliatae)	S.C. Fares S.A. Orăștie
2	06-UV	Coriandru	<i>Coriandrum sativum</i> L.	Apiaceae (Umbelliferae)	Dicotyledonatae (Magnoliatae)	S.C. Natex S.A. Cluj Napoca
3	09-UV	Fenicol	<i>Foeniculum vulgare</i>	Apiaceae (Umbelliferae)	Dicotyledonatae (Magnoliatae)	S.C. Fares S.A. Orăștie
4	15-UV	Mărar	<i>Anethum graveolens</i> L.	Apiaceae (Umbelliferae)	Dicotyledonatae (Magnoliatae)	S.C. Fares S.A. Orăștie
5	03-UV	Busuioc	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Lamiaceae (Labiatae)	Dicotyledonatae (Magnoliatae)	S.C. Natex S.A. Cluj Napoca
6	05-UV	Cimbru	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Lamiaceae (Labiatae)	Dicotyledonatae (Magnoliatae)	S.C. Natex S.A. Cluj Napoca
7	13-UV	Lavandă	<i>Lavandula angustifolia</i>	Lamiaceae (Labiatae)	Dicotyledonatae (Magnoliatae)	S.C. Fares S.A. Orăștie
8	14-UV	Măghiran	<i>Majorana hortensis</i>	Lamiaceae (Labiatae)	Dicotyledonatae (Magnoliatae)	S.C. Natex S.A. Cluj Napoca
9	16-UV	Mentă	<i>Mentha piperita</i> L.	Lamiaceae (Labiatae)	Dicotyledonatae (Magnoliatae)	S.C. Natex S.A. Cluj Napoca
10	17-UV	Mentă creță	<i>Mentha spicata</i> L.	Lamiaceae (Labiatae)	Dicotyledonatae (Magnoliatae)	S.C. Natex S.A. Cluj Napoca
11	22-UV	Salvie	<i>Salvia officinalis</i> L.	Lamiaceae (Labiatae)	Dicotyledonatae (Magnoliatae)	S.C. Natex S.A. Cluj Napoca
12	01-UV	Bergamot	<i>Citrus aurantium</i> ssp. <i>bergamia</i> Risso	Rutaceae	Dicotyledonatae (Magnoliatae)	S.C. Natex S.A. Cluj Napoca
13	12-UV	Lămâie	<i>Citrus lemon</i> L.	Rutaceae	Dicotyledonatae (Magnoliatae)	S.C. Natex S.A. Cluj Napoca
14	21-UV	Portocale	<i>Citrus aurantium</i> sp. <i>sinensis</i> L.	Rutaceae	Dicotyledonatae (Magnoliatae)	S.C. Natex S.A. Cluj Napoca
15	07-UV	Cuișoare	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Myrtaceae	Dicotyledonatae (Magnoliatae)	S.C. Natex S.A. Cluj Napoca
16	08-UV	Eucalipt	<i>Eucalyptus globulus</i>	Myrtaceae	Dicotyledonatae (Magnoliatae)	S.C. Natex S.A. Cluj Napoca
17	23-UV	Scorțișoară	<i>Cinnamomum casia</i> L.	Lauraceae	Dicotyledonatae (Magnoliatae)	S.C. Natex S.A. Cluj Napoca
18	25-UV	Trandafir	<i>Rosaq damascena</i> L.	Rosaceae	Dicotyledonatae (Magnoliatae)	Piața autohtonă
19	27-UV	Usturoi	<i>Allium sativum</i> L.	Liliaceae	Monocotyledoneae	S.C. Natex S.A. Cluj Napoca
20	02-UV	Brad	<i>Abies alba</i>	Pinaceae	Pinatae (Coniferophyta)	S.C. Natex S.A. Cluj Napoca
21	18-UV	Molid	<i>Picea excelsa</i> L.	Pinaceae	Pinatae (Coniferophyta)	S.C. Fares S.A. Orăștie
22	24-UV	Terebentină	<i>Pistacia terebinthus</i>	Pinaceae	Pinatae (Coniferophyta)	S.C. Fares S.A. Orăștie
23	11-UV	Ienupăr (plantă)	<i>Juniperus communis</i> L.	Pinaceae	Pinatae (Coniferophyta)	S.C. Natex S.A. Cluj Napoca
24	11a-UV	Ienupăr (cetină)	<i>Juniperus communis</i> L.	Pinaceae	Pinatae (Coniferophyta)	S.C. Fares S.A. Orăștie
25	11b-UV	Ienupăr (fruct)	<i>Juniperus communis</i> L.	Pinaceae	Pinatae (Coniferophyta)	S.C. Fares S.A. Orăștie

3.5.2.2. Metoda de complexare

Mod de lucru general:

S-au cântărit la balanța analitică masele de β -ciclodextrină indicate în tabelul 3.34 și s-au dizolvat în 2 ml apă distilată la temperatura de $50 \pm 1^\circ\text{C}$. Peste această soluție s-au introdus, în picături, sub agitare, soluții etanolice de ulei volatil corespunzătoare unei molarități de 1:1, calculate în funcție de componenta majoritară a uleiului volatil (câte 5 ml soluție etanolică de concentrația indicată în tabelul 3.40). S-a agitat lent la temperatura de mai sus încă 15 minute, apoi s-a răcit lent (pe o baie de apă) în timp de 4 ore. S-a lăsat apoi la temperatura de 4°C pentru 24 ore pentru finalizarea cristalizării complexelor, după care s-au filtrat cristalele obținute, s-au spălat cu puțin etanol și s-au uscat în excicator. Probele astfel obținute au fost suspuse analizelor termogravimetrice sau extracției repetate în hexan a uleiului volatil din complecși.

Tabel 3.40. Nanoîncapsularea uleiurilor volatile (UV) în β -ciclodextrină (β CD).

Nr.	Ulei volatil (UV)	Component principal	$M_{\text{comp.princ.}}$ (g/mol)	$C_{\text{sol. UV}}$ (mg/ml)	UV (mg)	β CD (mg)	UV- β CD (mg)	Rnd. (%)
1	Chimen	(+)-carvonă	150	15.6	77.9	670.9	565.8	75.56
2	Coriandru	linalool	154	15.7	78.3	670.6	567.2	75.74
3	Fenicol	anetol	148	14.6	72.9	671.4	422.7	56.79
4	Mărar	(+)-carvonă	150	15.2	75.9	671.2	488.2	65.35
5	Busuioc	metil-cavicol	148	15.3	76.4	671.1	459.7	61.50
6	Cimbru	carvacrol	150	15.1	75.5	671.0	602.4	80.70
7	Lavandă	linalool/ antranilat de linalil	154/ 273	21.1	105.5	671.1	624.4	80.40
8	Măghiran	terpinen-4-ol	154	15.1	75.4	671.3	492.5	65.96
9	Mentă	(-)-mentol	156	17.2	86.0	670.7	489.5	64.69
10	Mentă creastă	(-)-carvonă	150	15.4	77.1	671.9	479.0	63.95
11	Salvie	antranilat de linalil/ linalool	273/ 154	15.6	77.8	672.4	619.6	73.74
12	Bergamot	linalool	154	13.7	68.3	671.0	563.8	76.26
13	Lămâie	limonen	136	14.1	70.7	671.0	404.7	54.56
14	Portocală	limonen	136	14.5	72.4	671.5	557.6	74.96
15	Cuișoare	eugenol	164	16.5	82.7	671.8	469.1	62.17
16	Eucalipt	eucaliptol	154	16.1	80.3	671.1	632.1	84.12
17	Scorțișoară	cinamaldehydă	132	13.8	69.2	672.5	499.7	67.37
18	Trandafir	β -feniletanol/ dimethylphtalate	122/ 194	23.2	115.9	671.1	569.0	72.30
19	Usturoi	dialil-trisulfură/ dialil-disulfură	178/ 146	18.0	90.0	671.1	552.7	72.62
20	Brad	limonen	136	13.7	68.3	671.0	538.2	72.80
21	Molid	limonen	136	14.8	73.8	671.0	581.4	78.06
22	Terebentină	α -pinen	136	15.5	77.4	674.6	611.2	81.28
23	Ienupăr (plantă)	α -pinen	136	14.2	70.9	671.4	589.6	79.43
24	Ienupăr (cetină)	α -pinen	136	17.4	87.2	670.8	549.9	72.55
25	Ienupăr (fruct)	α -pinen	136	14.3	71.6	671.0	579.0	77.97

3.5.2.3. Recuperarea uleiurilor volatile din complecși

Mod de lucru general:

Recuperarea uleiurilor volatile din complecșii β -ciclodextrină s-a realizat prin extracție repetată în hexan. S-au cântărit la balanța analitică probe de complex de câte 100 mg, care au fost dizolvate în 4 ml apă distilată într-un extractor termostatat, prevăzut cu manta, refrigerent eficient de răcire și sistem de agitare magnetică energetică. S-au introdus apoi 2 ml hexan și s-a agitat energetic timp de 20 de minute la temperatura de 60°C , după care s-a răcit, stratul organic superior s-a separat prin pipetare, iar stratul apos s-a extras din nou în mod similar, încă de trei ori cu câte 2 ml hexan. Extractele hexanice reunite au fost apoi uscate pe CaCl_2 anhidru și analizate prin GC-MS.

3.5.2.4. Analiza GC-MS

Pentru analiza uleiurilor volatile proaspete și recuperate din complexi s-a folosit același sistem de analiză gaz cromatografică cuplată cu un sistem de detecție de spectrometrie de masă (vezi 3.5.1.8). Indicii Kovats pentru compușii analizați (utilizați în paralel cu metodele amintite de comparație a spectrelor de masă obținute experimental cu cele din baza de date NIST, pentru identificarea compușilor) au fost determinați în mod analog metodei prezentate la punctul 3.5.1.9.

3.5.2.5. Analiza TG-DTG

Analiza termogravimetrică pentru complexii β -ciclodextrină/uleiuri volatile s-a efectuat în modul următor: s-au cântărit aproximativ 15 mg complex ulei volatil/ β -ciclodextrină în dispozitivul corespunzător al aparatului și s-a determinat pierderea de masă pentru o viteză constantă de încălzire a probei. S-a lucrat cu un aparat TG 209 NETZSCH în următoarele condiții:

- program de temperatură de 20-200°C cu o viteză de încălzire de 4°C/min, apoi 200-900°C cu o viteză de încălzire de 10°C/min;
- determinările s-au efectuat sub atmosferă de azot;
- achiziția s-a efectuat cu ajutorul programului specific TG Netzsch 209-Acquisition Soft/2000;
- prelucrarea datelor s-a realizat cu ajutorul programului Netzsch Proteus-Thermal Analysis ver. 4.0 / 2000.

3.5.2.6. Analiza componentelor principale (PCA) pentru nanocapsulele uleiuri volatile/ β -ciclodextrină

Analiza componentelor principale, utilizând ca date de intrare procentele masice GC ale compușilor identificați în uleiurile volatile proaspete și recuperate din complexi, s-a realizat cu ajutorul programului The Unscrambler 6.1 (Computer-Aided Modeling AS, Trondheim).

Analiza componentelor principale (PCA-Principal Component Analysis) formează baza pentru analiza multivariată a datelor [220,222,225,237,238]. PCA presupune o aproximare a tabelului de date, matricea de date X , printr-un produs de două matrici de dimensiuni mai reduse, T și P , ce rețin doar informația utilă din X . Reprezentarea grafică a coloanelor lui T dă o imagine privind "forme obiectului" pentru X și, în mod analog, reprezentarea liniilor matricii P conduce la "forme variabilelor".

Această metodă de analiză lucrează în modul următor:

- se caută o direcție în spațiul proprietăților după care datele au varianță maximă; direcția respectivă se numește prima componentă principală ($PC1$) și fiecare formă se proiectează pe această direcție, rezultând astfel o reprezentare monodimensională a datelor (figura 3.142).
- se poate căuta și o a doua componentă principală ($PC2$), a cărei direcție este perpendiculară pe prima și respectă condiția de varianță maximă.

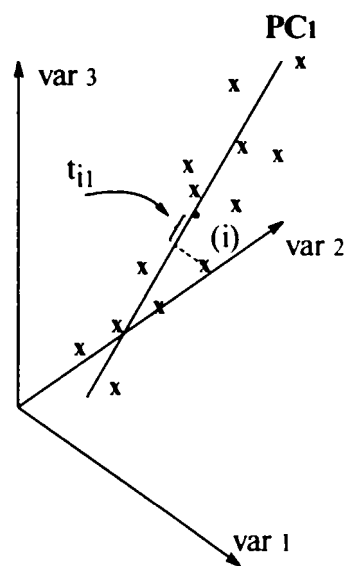


Figura 3.142. Matricea $X(N,K)$ a datelor, cu N puncte în spațiul K -dimensional. În figură se prezintă un spațiu tridimensional și prima componentă principală (PC1). "Scorul" unui obiect, (t_i), este proiecția sa ortogonală pe această direcție, iar coeficienții direcționali ai liniei formează vectorul "loading", p_k .

Fundamentul matematic al analizei PCA pornește de la centrarea coloanelor matricii X față de medii [220,225]:

$$x_{cent,ij} = x_{ij} - \bar{x}_j; \quad \bar{x}_j = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_{ij}$$

Găsirea noilor axe PC reprezintă, de fapt, rotirea axelor sistemului de coordonate original, astfel că:

$$T = X \cdot P$$

unde: $X(N,K)$ - matricea variabilelor independente;

$P(K,K)$ - matricea de rotație (cosinusurile directe de rotație).

Determinarea matricii de rotație P se poate face prin mai multe metode: manipularea relației matriciale de mai sus pentru a obține o problemă de vectori proprii - valori proprii, metode iterative (NIPALS), descompunere în valori singulare (SDV).

Matricea T va conține coloanele t_j , cu varianță din ce în ce mai mică, la deplasarea $1 \rightarrow K$, astfel încât conținutul de informație se va modifica în același mod. Se poate scrie:

$$t_1^T \cdot t_1 > t_2^T \cdot t_2 > \dots$$

Matricea P conține coloane ortogonale (din principiul metodei), astfel că inversa și transpusa acesteia sunt identice. Prin calcule simple, relația matricială de mai sus devine:

$$X = T \cdot P^{-1} = T \cdot P^T$$

cu X conținând atât informație utilă, cât și zgomot. Din considerentele prezentate mai sus rezultă că se poate stabili un număr de componente principale, A , ce posedă informația utilă, restul fiind doar zgomot ce se acumulează în așa-numita matrice a erorilor, E . Ecuația de mai sus devine:

$$X(N, K) = T(N, A) \cdot P^T(A, K) + E(N, K) = X(N, K) + E(N, K)$$

unde matricea T reprezintă matricea înregistrărilor (scores), iar P^T este matricea încărcărilor (loadings). Ținând cont de centrarea valorilor x_{ij} în jurul valorilor medii, relația devine:

$$X(N, K) = I(N, I) \cdot \bar{x}^T(I, K) + T(N, A) \cdot P^T(A, K) + E(N, K)$$

unde I este un vector cu elemente 1, iar \bar{x} este vectorul având ca elemente valorile medii.

Există mai multe metode de stabilire a numărului de componente principale, A , cele mai utilizate fiind procedeele care folosesc valorile proprii ale componentelor principale (descompunere în valori singulare), metodele de reprezentare grafică a varianțelor funcție de numărul de componente principale sau procedeele de validare încrucișată.

Reprezentarea vectorilor t unul față de altul ($t_p = f(t_q)$) poate da informații referitoare la similarități și posibila grupare a obiectelor studiate. În același mod, reprezentarea vectorilor $p_r = f(p_s)$ scoate în evidență similaritățile dintre proprietățile studiate, dar și importanța relativă a anumitor variabile (proprietăți) în construirea modelului.

Analiza multivariată în general și analiza componentelor principale (PCA) în special sunt instrumente de analiză statistică foarte puternice, care permit extragerea informațiilor utile din cantități mari de date, care pot fi mărimi mai mult sau mai puțin independente. În domeniul alimentar, analiza multivariată este foarte mult utilizată în special în analiza senzorială (unde nu există variabile dependente bine definite), dar și în clasificarea și evidențierea importanței unor caracteristici în cazul falsificării unor alimente, a stabilirii zonelor de proveniență sau găsirea similarităților între diferite sorturi alimentare.

Analiza PCA pentru nanocapsulele uleiuri volatile/ β -ciclodextrină s-a realizat în următoarele condiții:

- număr total de variabile pentru clasa botanică Dicotyledonatae: 36 (18 uleiuri volatile proaspete și 18 uleiuri volatile recuperate din complecși, codate în funcție de specie, familie botanică, sau tip de ulei-proaspăt sau recuperat din complex);
- număr total de cazuri pentru clasa botanică Dicotyledonatae: 143 (toți compușii volatili importanți care se regăsesc în unul sau mai multe uleiuri volatile, aranjați în funcție de indicii de retenție Kovats și codați fie ca denumire tradițională, fie după clasificarea prezentată în tabelul 3.33);
- număr total de variabile pentru clasa botanică Pinatae: 12 (6 uleiuri volatile proaspete și 6 uleiuri volatile recuperate din complecși, codate în modul prezentat mai sus);
- număr total de cazuri pentru clasa botanică Pinatae: 103 (vezi precizările corespunzătoare clasei Dicotyledonatae);
- număr total de variabile pentru clasele botanice Dicotyledonatae și Pinatae: 48;
- număr total de cazuri pentru clasele botanice Dicotyledonatae și Pinatae: 175;
- metoda de validare: "cross-validation";
- numărul maxim de componente principale: 20 și date centrate

3.5.3. Aplicații ale ale complexelor ulei volatil/ β -ciclodextrină

3.5.3.1. Materiale și metode

Materialele necesare obținerii produselor de patiserie "madalenas" au fost materiile prime clasice (făină de grâu, ouă, zahăr, colorant alimentar, conservant, agent de coacere) furnizate de firma de profil unde s-a realizat aplicarea nanocapsulelor ulei volatil de lămâie sau de portocale/ β -ciclodextrină pe linia industrială proprie. Amestecului nearomatizat (în cantitate de 50g sau 100 g, vezi tabel 3.41) i s-au adăugat cantitățile de ulei volatil, β -ciclodextrină sau complex ulei volatil/ β -ciclodextrină prezentate în tabelul 3.41, timpul de coacere în cuptorul automatizat industrial fiind de 12 minute sau 15 minute în funcție de masa unui singur produs (25 g și, respectiv, 50 g), iar temperatura de coacere a fost în toate cazurile 175°C. Toate probele au fost obținute în duplicat.

Tabel 3.41. Cantități și condiții pentru obținerea produselor de patiserie "madalenas" cu conținut de ulei volatil (UV), aromă clasică sau nanocapsule ulei volatil/ β -ciclodextrină (CD-UV).

Cod	Produs	$m_{\text{bază}}$ (g)	UV	CD (mg)	CD-UV (mg)	Timp (min)
01	Madalenas-UV portocale (25g) (a)	100	0.1 ml	-	-	12
02	Madalenas-UV portocale (25g) (b)	100	0.3 ml	-	-	12
03	Madalenas-UV lămâie (25g) (a)	100	0.1 ml	-	-	12
04	Madalenas-UV lămâie (25g) (b)	100	0.3 ml	-	-	12
05	Madalenas-Complex CD-UV lămâie (25g) (a)	50	-	-	10	12
06	Madalenas-Complex CD-UV lămâie (25g) (b)	50	-	-	50	12
07	Madalenas-Complex CD-UV lămâie (25g) (c)	100	-	-	10	12
08	Madalenas-Complex CD-UV lămâie (25g) (d)	100	-	-	50	12
09	Madalenas-Complex CD-UV portocale (25g) (a)	50	-	-	10	12
10	Madalenas-Complex CD-UV portocale (25g) (b)	50	-	-	50	12
11	Madalenas-Complex CD-UV portocale (25g) (c)	100	-	-	10	12
12	Madalenas-Complex CD-UV portocale (25g) (d)	100	-	-	50	12
13	Madalenas-CD+Aromă clasică de lămâie (25g) (a)	50	0.25 g	58	-	12
14	Madalenas-CD+Aromă clasică de lămâie (25g) (b)	50	0.25 g	104.7	-	12
15	Madalenas martor -Aromă clasică de lămâie (25g) (a)	100	0.25 g	-	-	12
16	Madalenas martor -Aromă clasică de lămâie (25g) (b)	100	0.25 g	-	-	12
17	Madalenas martor -Aromă clasică de lămâie (50g) (a)	100	0.25 g	-	-	15
18	Madalenas martor -Aromă clasică de lămâie (50g) (b)	100	0.25 g	-	-	15

3.5.3.2. Analiza componentelor principale (PCA) pentru analiza senzorială a produselor de patiserie

Analiza multivariată PCA pentru produsele de patiserie de tip "madalenas" s-a realizat în modul prezentat la punctul 3.5.2.6 utilizând ca date de intrare rezultatele obținute la analiza senzorială standard [233] a produselor, pe un panel format din 14 consumatori (78% femei și 22% bărbați) cu vârste cuprinse între 22 și 26 de ani; cantitatea mare de date culese la analiza senzorială nu este prezentată în detaliu.

Condițiile de lucru utilizate sunt similare celor prezentate mai sus, cu excepția numărului de variabile și de cazuri implicate, astfel:

- număr total de variabile: 5 (caracteristicile organoleptice: aspect, consistență, culoare, aromă, gust);
- număr total de cazuri: 224;

CONCLUZII FINALE

În urma studiilor efectuate privind posibilitățile de protejare a unor biomolecule și biosisteme (acizi grași nesaturați și uleiuri volatile) prin nanoîncapsulare în ciclodextrine se pot trasa următoarele concluzii principale:

1. S-au obținut nanocapsule acid oleic/ α - și β -ciclodextrină cu randamente de 72.6% și, respectiv 86%. Concentrația de acid oleic, rezultată din analiza GC-MS, în proba inițială a fost de aproape 99%, compușii de impurificare fiind în principal acizii grași inferiori, unii acizi dicarboxilici în urme și câțiva produși de degradare ai acidului oleic. În urma încapsulării acidului oleic s-a obținut o concentrare a acestuia, în special în cazul complexului cu β -ciclodextrină, unde acidul oleic a avut o concentrație de 99.5%.
2. Degradarea acidului oleic liber la temperaturi de 50-150°C (în prezența aerului atmosferic și a umidității) a condus la apariția unor compuși de degradare din clasa alchidelor, epoxizilor și acizilor dihidroxilați vicinali, rezultați prin reacții de oxidare, hidratare etc. În proba degradată la 50°C concentrația acidului oleic a fost tot de 99%, incidența compușilor de degradare fiind foarte mică; în schimb, în cazul probelor degradate la 100 și 150°C, concentrația acidului a scăzut la 95.1% și, respectiv la 81.7%, în ultimul caz fiind decelată o concentrație mică de acid elaidic (izomerul *trans* al acidului oleic), rezultat probabil printr-o reacție de adiție-eliminare de apă. S-au mai identificat concentrații semnificative de aldehide C₈-C₁₀, în special în cazul probei degradate la 150°C.
3. O capacitate mare de protecție a acidului oleic la oxidare în special, dar și la hidratare, piroliză și izomerizare, a fost observată la degradarea nanocapsulelor acid oleic/ciclodextrine. Compusul principal de degradare identificat în cazul nanocapsulelor a fost doar malon-dialdehida și unele aldehide inferioare. Cea mai bună capacitate de protecție a fost observată pentru complexul cu α -ciclodextrină, unde concentrația acidului oleic a fost în toate cazurile peste 97%, în cazul β -ciclodextrinei această concentrație fiind în intervalul 92.6-96.5%.
4. Acidul linolenic (omologul acidului oleic cu două duble legături) a fost încapsulat în α - și β -ciclodextrină cu randamente de 88% și, respectiv, 74%. Concentrația acestui acid, determinată prin GC-MS, a fost de 98%, compușii de impurificare fiind unii izomeri de poziție ai acidului linoleic, omologi cu trei duble legături și în concentrații mici unii compuși de degradare (aldehide). Analiza gaz cromatografică a extractelor hexanice din complexii cu ciclodextrine au relevat concentrații de 99.3% și, respectiv, 99.6% pentru acidul linoleic, identificându-se în concentrații mici acidul stearic și hexanalul.
5. Degradarea acidului linoleic neîncapsulat la temperaturi de 50°C, 100°C și 150°C a condus la micșorarea concentrației relative a acidului principal (de la 97.5% la 54.5% în intervalul 50-150°C) și la identificarea unor produși de degradare din clasele alchidelor, acizilor și epoxizilor: malon-dialdehida, hexanal, heptanal, acizi oxocarboxilici, acizi dicarboxilici, izomeri ai acidului linoleic și linolenic, derivați ai acidului 12,13-epoxilinoleic.
6. În cazul nanocapsulelor degradate la 50-150°C, în extractele hexanice obținute s-au identificat compuși de degradare în special în cazul temperaturilor superioare celei de 100°C. Astfel, degradarea la temperatura de 50°C nu a determinat apariția unor compuși secundari în concentrații semnificative, acidul linoleic găsindu-se în concentrații de peste 94% în ambele cazuri. Concentrații mult mai mici de acid linoleic s-au observat în cazul degradărilor la temperaturi peste 100°C, o parte a acestuia fiind izomerizată la acizi mai stabili din punct de vedere termodinamic, în special în cazul complexelor cu α -ciclodextrină, probabil datorită posibilității de încapsulare moleculară mai redusă a restului hidrofob mai rigid al acidului linoleic, determinată de prezența celor două duble legături în configurație *cis*, ceea ce permite accesul moleculelor de oxigen sau apă și prin urmare reacții care să conducă la diverși produși de degradare. În toate aceste cazuri însă compușii de degradare de tipul alchidelor, epoxizilor, acizilor dicarboxilici au fost identificați doar în urme sau au lipsit în totalitate.

7. Al treilea acid gras nesaturat din seria C₁₈, acidul linolenic, a fost încapsulat cu randamente scăzute și destul de diferite pentru cele două cazuri de matrici oligozaharidice (91% și 59.2%), cel mai probabil datorită faptului că acesta a fost de proveniență naturală și a fost în concentrație mult mai redusă decât cea corespunzătoare unui compus de puritate analitică. Compușii de impurificare identificați în concentrații însemnate au fost acizii linoleic și linolenic, dar și câțiva compuși de degradare de tipul aldehidelor inferioare, oxo-acizilor și acizilor dicarboxilici. Acidul linolenic a fost identificat în extractele hexanice din complexii cu ciclodextrine la concentrații relative apropiate de 90%.
8. La degradarea termică a acidului linolenic neîncapsulat o mare parte din acesta a fost polimerizat (acidul linolenic prezintă trei duble legături în configurație *cis*), principalii compuși de degradare identificați fiind hexanalul și unii acizi grași saturați sau cu grad de nesaturare mai redus în comparație cu cel al acidului linolenic. În cazul degradării nanocapsulelor de acid linolenic, principalul compus de degradare a fost malon-dialdehida, acidul linolenic regăsindu-se în probele extrase din complecși în concentrații relative de peste 88%, cu excepția complexului cu β -ciclodextrină degradat la peste 100°C, unde concentrația relativă de malon-dialdehidă a fost semnificativă (34% la 100°C).
9. Modelarea moleculară a interacțiunii acizilor grași nesaturați cu α - și β -ciclodextrina (experimente de docare) a permis identificarea conformațiilor nanocapsulelor în condiții de vid absolut, respectiv determinarea energiilor de interacțiune acid gras-ciclodextrină prin calcule de mecanică moleculară MM+. Conformațiile de energie minimă ale ciclodextrinelor au prezentat o formă tron-conică, cu baza mare formată din grupările hidroxilice secundare ale resturilor glucozidice și cu baza mică formată din radicalii mult mai flexibili hidroximetilici. Analiza conformațională a moleculelor de acizi grași nesaturați, ce prezintă o foarte mare mobilitate conformațională, a condus la identificarea a cel puțin 50 de conformații pentru fiecare acid, a căror energie potențială nu a depășit 4 kcal/mol față de energie conformației celei mai stabile. Aceste ultime conformații, cu aspect spiralat, au fost utilizate în experimentele de docare acizi grași-ciclodextrine.
10. În general, experimentele de docare au indicat faptul că acizii grași se acomodează mult mai bine în cavitatea β -ciclodextrinei, cu dimensiuni mai mari ale cavității hidrofobe. Interacțiunea principală este o interacțiune de tip van der Waals (hidrofobă) între cavitatea interioară a ciclodextrinelor și restul hidrofob (de obicei restul alchil legat la ultimul atom de carbon hibridizat sp²) al acidului gras nesaturat; mai apare o interacțiune secundară, de stabilizare, prin formarea unor legături de hidrogen între hidroxilul sau carbonilul grupării carboxilice a acidului și grupările hidroxilice secundare ale resturilor glucozidice din ciclodextrine.
11. Energiile de interacțiune determinate teoretic sunt superioare în cazul β -ciclodextrinei, în comparație cu cele obținute pentru interacțiunea acizilor grași cu α -ciclodextrina, acestea scăzând odată cu creșterea numărului de duble legături din molecula acidului gras; această constatare poate fi explicată pe baza hidrofobității moleculelor (exprimată prin logaritmul coeficientului de partiție 1-octanol/apă-log*P*), care scade în seria acizilor oleic, linoleic și linolenic (6.14, 5.88 și, respectiv, 5.62).
12. Pentru compararea datelor obținute teoretic cu cele experimentale, s-a realizat analiza complexilor acizi grași/ciclodextrine prin calorimetrie de scanare diferențială (DSC), care a permis evaluarea energiilor de interacțiune reale. S-a constatat aceeași dependență între numărul de duble legături din structura acizilor grași și valoarea energiei de interacțiune (considerată egală cu energia de disociere). Corelarea energiilor de interacțiune determinate teoretic, cu cele obținute pe cale experimentală a condus la o ecuație regresională valabilă din punct de vedere statistic, cu un coeficient de corelare foarte bun ($r = 0.915$).
13. O parte însemnată a acestui studiu a presupus nanoîncapsularea uleiurilor volatile de plante din diverse familii botanice în β -ciclodextrină în scopul protejării compușilor instabili la factorii degrădanți din mediu. S-au studiat 18 uleiuri volatile aparținând clasei Dicotyledonatae (familiile Apiaceae, Lamiaceae, Rutaceae, Myrtaceae, Lauraceae și Rosaceae), un singur ulei volatil din clasa Monocotyledoneae (familia Liliaceae) și 6 uleiuri volatile provenite din plante

aparținând clasei Pinatae (familiile Pinaceae și Cupressaceae). Complecșii cu β -ciclodextrina au fost analizați prin termogravimetrie (TG-DTG), iar uleiurile volatile proaspete și cele recuperate din complecși prin reextracție succesivă în hexan la reflux au fost analizate prin gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă, GC-MS (numărul maxim de extracții a fost patru; peste această valoare soluția hexanică nu a mai prezentat în analiza GC-MS componenți volatili).

14. În cazul uleiurilor volatile din familia Apiaceae (chimen, coriandru, fenicol și mărar) s-au obținut nanocapsule cu randamente între 56.8% și 76%, procentul de ulei încapsulat, determinat din analiza TG-DTG, fiind situat între 7.6-9%. Principalii compuși identificați în uleiurile volatile provenite din plante din familia Apiaceae au fost compușii oxigenați. Astfel, chimenul a conținut în principal carvonă (47.3%) și limonen (28.4%), linaloolul a fost componentul principal din uleiul volatil de coriandru (40.7%), anetolul a fost cel mai concentrat în uleiul de fenicol (60.4%), iar carvona și limonenul în uleiul volatil de mărar (38% și, respectiv, 34.3%). În general, încapsularea s-a realizat la concentrații relative mai mari față de uleiul original pentru compușii mai hidrofobi (raportul între concentrațiile relative ale compușilor în uleiul recuperat din complex și în cel proaspăt fiind de 1.93 în cazul limonenului, 0.8 și 1.01 în cazul carvonei din uleiul de chimen și, respectiv, mărar și 1.37 pentru anetol).
15. Cele mai multe uleiuri volatile luate în studiu au provenit din plante din familia Lamiaceae (busuioc, cimbru, lavandă, măghiran, mentă, mentă creată și salvie), randamentele de obținere a complecșilor cu β -ciclodextrina variind în domeniul 64-81%, iar procentele de ulei încapsulat în domeniul 6.6-9.1%. Componenții majoritari au fost cei fenolici, alcoolii, cetone și esteri terpenici. Uleiul volatil de busuioc a conținut 66.1% metil-cavicol, carvacrolul a fost cel mai concentrat compus în uleiul de cimbru (31.5%), linaloolul și antranilatul de linalil au fost principalii compuși în din uleiul de lavandă, iar terpinen-4-olul și γ -terpinenul au fost majoritari în uleiul volatil de măghiran. Încapsularea s-a realizat la rapoarte de concentrații 1.28 pentru metil-cavicol, 0.35 pentru carvacrol, 1.14 pentru linalool și antranilat de linalil și 1.3, respectiv 1.73 pentru terpinen-4-ol și γ -terpineol. Cum era de așteptat, mentolul și mentona au fost cele mai concentrate în uleiul de mentă (33%, respectiv 17.2%), care au fost încapsulate la rapoarte ale concentrațiilor 0.88 și, respectiv 1.36. În uleiul volatil de mentă creată principalul compus a fost (-)-carvona (50.3%), încapsulată în β -ciclodextrină la un raport supraunitar al concentrațiilor relative (1.22), iar în cel de salvie, cu antranilat de linalil și linalool drept componenți majoritari, rapoartele au fost de 1.68 și, respectiv, 0.7.
16. Din familia Rutaceae s-au supus aceluiași studii uleiurile volatile provenite din trei specii: bergamot, lămâie și portocale. Complecșii acestora cu ciclodextrina au fost obținuți cu randamente de 55-76%, principalii compuși identificați în uleiuri fiind linaloolul în primul caz și limonenul în celelalte două cazuri, acesta fiind încapsulat la rapoarte ale concentrațiilor relative (ulei recuperat/ulei proaspăt) supraunitare.
17. Doar două uleiuri volatile (de cuișoare și de eucalipt) au fost analizate în cazul familiei Myrtaceae, randamentele de încapsulare fiind de 62.2% și, respectiv, 84.1%, iar procentul de ulei încapsulat a fost 8.8% și 7.5%. În primul caz eugenolul a fost componentul majoritar (78%), în timp ce în al doilea caz principalul component identificat a fost eucaliptolul (85.6%), ambii componenți fiind încapsulați la rapoarte subunitare ale concentrațiilor relative (puțin peste 0.8).
18. Din familiile Lauraceae și Rosaceae a fost analizat doar câte un singur ulei volatil: scorțișoară și trandafir. Compușii volatili identificați au fost mult diferiți față de cei identificați în celelalte familii, în primul caz cea mai concentrată fiind cinamaldehyda (62.3%), în timp ce în cel de-al doilea caz alcoolul β -feniletlic (27.8%). Rapoartele între concentrațiile relative au fost de 1.12 în cazul cinamaldehydei și 0.61 în cazul alcoolului feniletlic.
19. Singurul ulei volatil provenit din plante din clasa Monocotyledoneae (familia Liliaceae) a fost cel de usturoi. Randamentul de obținere a complexului cu β -ciclodextrina a fost de 72.6%, iar procentul de ulei încapsulat a fost de 7.7%. Majoritatea compușilor identificați în acest ulei au fost compuși sulfurați (dialil mono-, di-, tri- și tetrasulfură, sulfuri asimetrice și ciclice).

Sulfurile aciclice au fost încapsulate la rapoarte ale concentrațiilor supraunitare, în timp ce compoziții ciclice au fost încapsulați la rapoarte subunitare.

20. Din clasa Pinatae s-au luat în studiu șase uleiuri volatile aparținând familiilor Pinaceae și Cupressaceae. În primul caz s-au analizat uleiurile volatile de brad, molid și terebentină, randamentele de încapsulare fiind situate în intervalul 72.8-81.3%, iar procentele de ulei volatil încapsulat între 7.2% și 8.9%. Majoritatea componentelor identificați în aceste uleiuri fac parte din clasa hidrocarburilor monoterpenice, cele mai concentrate fiind limonenul, 3-carenil, α - și β -pinenul, respectiv acetatul de bornil. Hidrocarburile au fost încapsulate în general la rapoarte supraunitare ale concentrațiilor, în timp ce acetatul de bornil prezentat o valoare subunitară a acestui raport (0.8).
21. Din familia Cupressaceae s-au utilizat uleiurile volatile din aceeași plantă, dar provenite din diferite părți ale acesteia (cetină, fruct sau întregul arbust). Randamentele de obținere a complexilor cu β -ciclodextrina au fost destul de apropiate (între 72.6% și 79.4%), ca de altfel și procentele de ulei volatil încapsulat (între 7.1% și 8.1%). Și în aceste cazuri cele mai concentrate au fost monoterpenele, respectiv α -pinenul, limonenul, *p*-cimenul și cariofilenul, dar și terpinen-4-olul, majoritatea acestora fiind încapsulate la rapoarte ale concentrațiilor apropiate de unitate sau mai mari.
22. Datele de gaz cromatografie obținute pentru cele 24 de uleiuri volatile luate în studiu (cu excepția uleiului volatil de usturoi din clasa Monocotyledoneae) au fost utilizate ca date de intrare pentru analiza statistică multivariată PCA (analiza componentelor principale), care permite extragerea informațiilor esențiale din cantitatea mare de date disponibile, aproape imposibil de prelucrat prin alte metode. Analiza PCA a fost realizată pentru clasele botanice considerate separat și împreună (Dicotyledonatae, Pinatae și, respectiv, Dicotyledonatae-Pinatae). În clasa Dicotyledonatae, s-a reușit gruparea clară a familiilor botanice din care provin uleiurile volatile studiate pe baza componentelor volatile identificate la concentrații semnificative. Variația datelor GC a fost explicată în proporție de 96% de primele trei componente principale, compușii volatili responsabili pentru această clasificare fiind cinamaldehida și antranilatul de linalil pentru prima componentă principală și unii alcooli, fenoli și esteri pentru cea de-a doua componentă principală.
23. În clasa Pinatae s-a obținut o clasificare excelentă din punct de vedere al tipului de ulei volatil: proaspăt sau recuperat din complex, respectiv în funcție de familiile botanice de proveniență, unde hidrocarburile monoterpenice mono- și diciclice au fost cele mai importante pentru gruparea după prima componentă principală, dar și hidrocarburile sesquiterpenice di- și triciclice pentru cea de-a doua componentă principală.
24. Analiza multivariată a întregii cantități de date GC, atât pentru clasa botanică Dicotyledonatae, cât și pentru Pinatae, a condus la o grupare foarte bună a celor două clase, în principal pe baza datelor pentru cinamaldehidă, antranilat de linalil, camfen și anetol pentru prima componentă principală, respectiv a carvacrolului și carvonei pentru cea de-a doua componentă principală. Din punct de vedere al claselor de compuși organici implicați în această clasificare, cei mai importanți au fost, în ordine, compușii aromatici fenolici și nefenolici, respectiv compușii monoterpenici aciclici și monociclici.

BIBLIOGRAFIE

1. Kim, H.-H.Y.; Băianu, I.C., "Novel Liposome Microencapsulation Techniques for Food Applications", *Trends Food Sci. & Technol.* **1991**, *2*, 55-61.
2. Loukas, Y.L.; Gregoriadis, G., *Drugs-in-Cyclodextrins-in-Liposomes: A Novel Approach for the Reduction of Drug Leakage from Liposomes*. In *The 24th International Symposium on "Controlled Release of Bioactive Materials"*, 1997, Stockholm, Controlled Release Society, Inc., 204-205.
3. Saarinen-Savolainen, P.; Järvinen, T.; Taipale, H.; Urtti, A., *New Drug Release Test for Liposomes*. In *The 24th International Symposium on "Controlled Release of Bioactive Materials"*, 1997, Stockholm, Controlled Release Society, Inc., 1041-1042.
4. *** *Microencapsulation. Methods and Industrial Applications*, ed. Benita, S., Marcel Dekker, Inc., New York - Basel - Hong Kong, 1996.
5. Grabielle-Madellmont, C.; Lesieur, S.; Ollivon, M., "Characterization of Loaded Liposomes by Size Exclusion Chromatography", *J. Biochem. Biophys. Methods* **2003**, *56*, 189-217.
6. Puglisi, G.; Fresta, M.; Mazzone, G.; Furneri, P.M.; Tempera, G., "Formulation Parameters of Fluoroquinolone-Loaded Liposomes and *in vitro* Antimicrobial Activity", *International Journal of Pharmaceutics* **1995**, *118*, 65-76.
7. Saravolac, E.G.; Kournikakis, B.; Gorton, L.; Wong, J.P., "Effect of Liposome-Encapsulation on Immunomodulating and Antiviral Activities of Interferon-gamma", *Antiviral Research* **1996**, *29*, 199-207.
8. Yen, G.-C.; Liu, M.-L., *Antioxidant and Prooxidant Activity of Xylose - Lysine Maillard Reaction Products*, In *The Maillard Reaction in Foods and Medicine*, O'Brien, J.; Nursten, H.E.; Crabbe, M.J.C.; Ames, J.M., Editors, 1998, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 231-236.
9. Li, R.H., "Materials for immunoisolated cell transplantation", *Advanced Drug Delivery Reviews* **1998**, *33*, 87-109.
10. Rihova, B., "Immunocompatibility and Biocompatibility of Cell Delivery Systems", *Advanced Drug Delivery Reviews* **2000**, *42*, 65-80.
11. Gombotz, W.R.; Wee, S.F., "Protein Release from Alginate Matrices", *Advanced Drug Delivery Reviews* **1998**, *31*, 267-285.
12. Bollag, D.M.; Rozycki, M.D.; Edelstein, S.J., *Protein Methods*, Wiley - Liss, New York - Chichester - Brisbane - Toronto - Singapore, 1996.
13. González-Siso, M.I.; Lang, E.; Carrenõ-Gómez, B.; Becerra, M.; Otero-Espinar, F.; Blanco-Méndez, J., "Enzyme Encapsulation on Chitosan Microbeads", *Process Biochemistry* **1997**, *32*(3), 211-216.
14. DeGroot, A.R.; Neufeld, R.J., "Encapsulation of Urease in Alginate Beads and Protection from α -Chymotrypsin with Chitosan Membranes", *Enzyme and Microbial Technology* **2001**, *29*, 321-327.
15. Elçin, Y.M., "Encapsulation of Urease Enzyme in Xanthan-Alginate Spheres", *Biomaterials* **1995**, *16*, 1157-1161.
16. Hearn, E.; Neufeld, R.J., "Poly(methylene co-guanidine) Coated Alginate as an Encapsulation Matrix for Urease", *Process Biochemistry* **2000**, *35*, 1253-1260.
17. Lemoine, D.; Wauters, F.; Bouchend'homme, S.; Pr at, V., "Preparation and Characterization of Alginate Microspheres Containing a Model Antigen", *International Journal of Pharmaceutics* **1998**, *176*, 9-19.
18. Szejtli, J., *Cyclodextrin Technology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht - Boston - London, 1988.
19. Venema, F., *Mono - Functionalised Cyclodextrins as Building Blocks for Supramolecular Systems*, 1996, Katholieke Universiteit Nijmegen, Nijmegen.
20. *** *Carbohydrate Chemistry*, ed. Boons, G.-J., Blackie Academic & Professional, London - Weinheim - New York - Tokyo - Melbourne - Madras, 1998.
21. Romberger, M.L., "Cyclodextrins", *Agro-Food-Industry Hi-Tech.* **1997**, *8*, 2-5.
22. Szente, L.; Szejtli, J., "Cyclodextrins as food ingredients", *Trends in Food Science & Technology* **2004**, *15*(3-4), 137-142.
23. *** *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry®*, 6th Edition, Electronic Release, 6 ed, Wiley-VCH & AND CompLex Publ. Tech., ver. 3.5, Chichester-New York-Brisbane-Toronto-Singapore, 2002.
24. Eckert, M., "Microencapsulated Flavours: Manufactue and Possible Applications (Part I)", *ZFL* **1996**, *47*(5), 67-70.
25. Eckert, M., "Microencapsulated Flavours: Manufactue and Possible Applications (Part II)", *ZFL* **1996**, *47*(6), 63-65.
26. Ertesvag, H.; Valla, S., "Biosynthesis and Applications of Alginates", *Polymer Degradation & Stability* **1998**, *59*, 85-91.

27. Orive, G.; Gascón, A.R.; Hernández, R.M.; Igartua, M.; Pedraz, J.L., "Cell Microencapsulation Technology for Biomedical Purposes: Novel Insights and Challenges", *Trends Pharm. Sci.* **2003**, *24*, 207-210.
28. Whelan, J., "Nanocapsules for Controlled Drug Delivery", *Drug Discovery Today* **2001**, *6*(23), 1183-1184.
29. *** *Flavor Encapsulation*, ED. Risch, S.J.; Reineccius, G.A, Vol. 370, American Chemical Society, Washington DC, 1988.
30. Popa, A.; Luca, C.; Mihăiță, G., *Compuși de incluziune*, Ed. Științifică, București, 1992.
31. *** *Food Chemistry*, 3rd edition, ed. Fennema, Q.R., Marcel Dekker, Inc., New York - Basel - Hong Kong, 1996.
32. Belitz, H.-D.; Grosch, W., *Food Chemistry*, Springer - Verlag, New York - Berlin - Heidelberg - London - Paris - Tokyo - Hong Kong - Barcelona - Budapest, 1987.
33. Weenen, H., "Reactive Intermediates and Carbohydrate Fragmentation in Maillard Chemistry", *Food Chemistry* **1998**, *62*(4), 393-401.
34. Zeller, B.L.; Saleeb, F.Z.; Ludescher, R.D., "Trends in Development of Porous Carbohydrate Food Ingredients for Use in Flavor Encapsulation", *Trends Food Sci. & Technol.* **1999**, *9*, 389-394.
35. Vassileva, A.; Burhan, N.; Beschkov, V.; Spasova, D.; Radoevska, S.; Ivanova, V.; Tonkova, A., "Cyclodextrin Glucanotransferase Production by Free and Agar Gel Immobilized Cells of *Bacillus circulans* ATCC 21783", *Process Biochemistry* **2003**, *38*, 1585-1591.
36. Siebert, R., *Action of CGT on Beta Limit Dextrin of Amylopectin*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 95-100.
37. Seres, G.; László, E., *The Purification and Properties of Cyclodextrin Glycosyltransferase / CGT-ase of Bacillus macerans*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 133-134.
38. Péterfi, Z.; Seres, G., *A Rapid Method for Determination of CGT-ase Activity*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 135-136.
39. Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I., *Arome naturale. Arome din reacția Maillard, bioarome și arome încapsulate*, Ed. Augusta, Timișoara, 2004.
40. Bârla- Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Jianu, C.; Radu, F.; Nichita, I.; Jianu, I., *α -Cyclodextrin. Molecular Aspects and Their Flavor Interactions (I)*. In *Proceedings of the 6th National Symposium "Science, Processes, and Technology in the Food Industry. Timisoara Academic Days"*, 1999, Timișoara, Ed. Mirton, 169-174.
41. Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Mișcă, C.D.; Jianu, I., *β -Cyclodextrin. Molecular Aspects and Their Flavor Interactions (II)*. In *Proceedings of the National Conference on Biotechnology and Environmental Engineering*, 2000, Târgoviște, 31-37.
42. Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Mișcă, C.D.; Jianu, I., *γ -Cyclodextrin. Molecular Aspects and Its Flavor Interactions (III)*. In *Proceedings of the 7th National Symposium "Timisoara Academic Days"*, 2001, Timișoara, 155-160.
43. Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Mișcă, C.D.; Drugă, M.; Jianu, I., *Cyclodextrins. Molecular Aspects and Their Flavor Interactions*. In *Proceedings of the 3rd International Symposium "Young People and the Multidisciplinary Research"*, 2001, Timișoara, 274-281.
44. Kano, K., *Selectivities in Cyclodextrin Chemistry*. In *Bioorganic Chemistry Frontiers*, 1993, Springer - Verlag: Berlin, 1-23.
45. Wife, R.L.; Reed, D.E.; Leworthy, D.P.; Barnett, D.M.; Regan, P.D.; Volger., H.D., *Preparative Methods and NMR Analysis for Silylated Derivatives of Cyclodextrin*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 301-326.
46. Wife, R.L.; Reed, D.E.; Volger, H.C., *Cyclodextrin Derivatization: Directed Reaction of Silylated Intermediates*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 289-300.
47. Schubert, A.; Noszticzius, Z.; Patonay, G.; Haskó, T., *Transfer of Organic Molecules Through Aqueous Layers Mediated by CD's and CD - Derivatives*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 195-204.
48. Kobayashi, S.; Kainuma, K.; French, D., *The Preparation and Some Properties of Glucosyl-Cyclodextrins*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 51-60.
49. Barry, A.R.; Davies, N.M.; Tucker, I.G., *The Effect of Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin on the in vitro Corneal Permeability of Hydrocortisone and Correlation with in vivo Ocular Bioavailability*. In *The 26th International*

- Symposium on "Controlled Release of Bioactive Materials"*, 1999, Boston, Controlled Release Society, Inc., 561-562.
50. Toke, L.; Ágai, B.; Bitter, I.; Szabó, G.; Kajtár, M.; Szejtli, J., *Cyclodextrin - Crown Ether Combination*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 363.
51. Bibby, D.C.; Davies, N.M.; Tucker, I.G., *Synthesis of Microspheres Containing Poly(acrylic acid) Cross - Linked with β -Cyclodextrin or Maltose*. In *The 24th International Symposium on "Controlled Release of Bioactive Materials"*, 1997, Stockholm, Controlled Release Society, Inc., 545-546.
52. Szabó, P.; Ferenczy, T.; Serfozo, J.; Szejtli, J.; Lipták, A., *Absorption and Elimination of Cyclodextrin Derivatives by Rabbits and Rats*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 115-122.
53. Stezowski, J.J.; Czugler, M.; Eckle, E., *Structural Properties of Chemically Modified Cyclodextrins: The Crystal Structure of an Inclusion Complex between Adamantanol and per-2,6-O-Methyl- β -Cyclodextrin*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 151-162.
54. Davies, N.M.; Wang, G.; Tucker, I.G., *Effect of Degree of Complexation on the Ocular Bioavailability of a Hydrocortisone / Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Formulation*. In *The 24th International Symposium on "Controlled Release of Bioactive Materials"*, 1997, Stockholm, Controlled Release Society, Inc., 547-548.
55. Evrard, B.; Detullio, P.; Chiap, P.; Van-Hees, T.; Piel, G.; Crommen, J.; Losson, B.; Delattre, L., *The Effect of Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin on the Pharmacokinetics of Albendazole in Sheep*. In *The 26th International Symposium on "Controlled Release of Bioactive Materials"*, 1999, Boston, Controlled Release Society, Inc., 1164-1165.
56. Fenyvesi, É.; Szilasi, M.; Zsádon, B.; Szejtli, J.; Tüdös, F., *Water - Soluble Cyclodextrin Polymers and Their Complexing Properties*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 345-356.
57. Frömming, K.-H., *Cyclodextrin in Pharmaceutical Chemistry*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 367-376.
58. Zsádon, B.; Fenyvesi, É., *Cyclodextrin Polymers: Types and Specific Properties*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 327-336.
59. Lipták, A.; Fügédi, P.; Szurmai, Z.; Imre, J.; Nánási, P.; Szejtli, J., *The Chemistry of Cyclodextrin Derivatives*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 275-288.
60. Easton, C.J.; Lincoln, S.F., *Modified Cyclodextrins: Scaffolds and Templates for Supramolecular Chemistry*, 2000, <http://shop.barnesandnoble.com>.
61. *** *Cyclodextrin News*, 1998, <http://www.hungary.com/cyclolab/news.html>.
62. Lee, K.-P.; Choi, S.-L.; Ryu, E.-N.; Ryoo, J.J.; Park, J.H.; Kim, Y.; Hyun, M.H., "Preparation and Characterization of Cyclodextrin Polymer and Its High-Performance Liquid-Chromatography Stationary Phase", *Analytical Sciences* **2002**, *18*, 31-34.
63. Ikeda, A.; Hatano, T.; Konishi, T.; Kikuchi, J.-i.; Shinkai, S., "Host-guest Complexation Effect of 2,3,6-Tri-O-methyl- β -cyclodextrin on a C60-Porphyrin Light-to-photocurrent Conversion System", *Tetrahedron* **2003**, *59*, 3537-3540.
64. Martín, L.; León, A.; Olives, A.I.; del-Castillo, B.; Martín, M.A., "Spectrofluorimetric Determination of Stoichiometry and Association Constants of the Complexes of Harmine and Harmine with β -Cyclodextrin and Chemically Modified β -Cyclodextrins", *Talanta* **2003**, *60*, 493-503.
65. Heck, R.; Jicsinszky, L.; Marsura, A., "Synthesis of Symmetrically Modified α -Cyclodextrins: An Efficient and Easy Method", *Tetrahedron Letters* **2003**, *44*, 5411-5413.
66. Mura, P.; Maestrelli, F.; Cirri, M., "Ternary Systems of Naproxen with Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin and Aminoacids", *International Journal of Pharmaceutics* **2003**, *260*, 293-302.
67. Male, K.B.; Luong, J.H.T., "Chiral Analysis of Neurotransmitters using Cyclodextrin-Modified Capillary Electrophoresis Equipped with Microfabricated Interdigitated Electrodes", *Journal of Chromatography A* **2003**, *1003*, 167-178.
68. Guo, L.; Lin, S.J.; Yang, Y.F.; Qi, L.; Wang, M.X.; Chen, Y., "Fast Enantioseparation of Arylglycine Amides by Capillary Electrophoresis with Highly Sulfated- β -cyclodextrin as a Chiral Selector", *Journal of Chromatography A* **2003**, *998*, 221-228.

69. Ruderisch, A.; Pfeiffer, J.; Schurig, V., "Mixed Chiral Stationary Phase Containing Modified Resorcinarene and β -Cyclodextrin Selectors Bonded to a Polysiloxane for Enantioselective Gas Chromatography", *Journal of Chromatography A* **2003**, 994, 127-135.
70. Fan, Y.; Feng, Y.-Q.; Da, S.-L., "On-line Selective Solid-Phase Extraction of 4-Nitrophenol with β -Cyclodextrin Bonded Silica", *Analytica Chimica Acta* **2003**, 484, 145-153.
71. Duchene, D.; Wouessidjewe, D., "Industrial Uses of Cyclodextrins and Their Derivatives", *J. Coord. Chem.* **1992**, 27, 223-236.
72. Diakur, J.; Zuo, Z.; Wiebe, L.I., "Synthesis and Drug Complexation Studies with β -Cyclodextrins Fluorinated on the Primary Face", *J. Carbohydrate Chem.* **1999**, 18(2), 209-223.
73. Sinswat, P.; Tengamnuay, P., "Enhancing Effect of Chitosan on Nasal Absorption of Salmon Calcitonin in Rats: Comparison with Hydroxypropyl- and Dimethyl- β -cyclodextrins", *International Journal of Pharmaceutics* **2003**, 257, 15-22.
74. Culha, M.; Lavrik, N.V.; Schell, F.M.; Tipple, C.A.; Sepaniak, M.J., "Characterization of Volatile, Hydrophobic Cyclodextrin Derivatives as Thin Films for Sensor Applications", *Sensors and Actuators B* **2003**, 92, 171-180.
75. Crittenden, R.G.; Playne, M.J., "Production, Properties and Applications of Food - Grade Oligosaccharides", *Trends Food Sci. & Technol.* **1996**, 7, 353-361.
76. Cerchiara, T.; Luppi, B.; Bigucci, F.; Zecchi, V., "Effect of Chitosan on Progesterone Release from Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Complexes", *International Journal of Pharmaceutics* **2003**, 258, 209-215.
77. Aoki, N.; Nishikawa, M.; Hattori, K., "Synthesis of Chitosan Derivatives Bearing Cyclodextrin and Adsorption of p-Nonylphenol and Bisphenol A", *Carbohydrate Polymers* **2003**, 52, 219-223.
78. Hara, K.; Fujita, K.; Kuwahara, N.; Kitahata, S.; Koizumi, K., *Hetero - Branched Cyclodextrins and Method of Preparing Them*, . 1992. p. 1-14.
79. Kitahata, S.; Hara, K.; Fujita, K.; Kuwahara, N.; Koizumi, K., *Novel Branched Cyclodextrins and Method of Preparing Them*, . 1993. p. 1-19.
80. Yalpani, M., "A Survey of Recent Advances in Selective Chemical and Enzymic Polysaccharide Modifications", *Tetrahedron* **1985**, 41(15), 2957-3020.
81. Yamada, K.; Mita, K.; Yoshida, K.; Ishitani, T., "A Study of the Absorption of Fruit Juice Volatiles by the Sealant Layer in Flexible Packaging Containers (The Effect of Package on Quality of Fruit Juice, Part IV)", *Pack. Tech. & Sci.* **1992**, 5, 41-47.
82. Bhandari, B.R.; D'Arcy, B.; Bich, L.L.T., "Lemon Oil to β -Cyclodextrin Ratio Effect on the Inclusion Efficiency to β -Cyclodextrin and the Retention of Oil volatiles in the Complex", *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 1494-1499.
83. Hergert, L.A.; Escandar, G.M., "Spectrofluorimetric Study of the β -Cyclodextrin-Ibuprofen Complex and Determination of Ibuprofen in Pharmaceutical Preparations and Serum", *Talanta* **2003**, 60, 235-246.
84. Gazpio, C.; Sánchez, M.; Zornoza, A.; Martín, C.; Martínez-Ohárriz, C.; Vélaz, I., "A Fluorimetric Study of Pindolol and its Complexes with Cyclodextrins", *Talanta* **2003**, 60, 477-482.
85. Worth, G.M.; Thomas, M.; Farr, S.J.; Taylor, G., *Steroid / Cyclodextrin Complexes for Pulmonary Delivery*. In *The 24th International Symposium on "Controlled Release of Bioactive Materials"*, 1997, Stockholm, Controlled Release Society, Inc., 747-748.
86. Szilasi, M.; Otta, K.; Zsardon, B.; Szejtli, J.; Tüdös, F., *Separation of Cyclodextrins with Gel Chromatography and HPLC*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 61-68.
87. Shin, I.D.; Huang, L.; Tonelli, A.E., *NMR - Observation of the Conformations and Motions of Polymers Confined to the Narrow Channels of Their Inclusion Compounds*. In *Macromolecular Symposia - Polymer-Solvent Complexes and Intercalates II*, 1998, Ischia, Wiley - VCH, 21-40.
88. Zubiaur, M.; Jaime, C., "Complexation between *tert*-Butyl Ketones and β -Cyclodextrin. Structural Study by NMR and MD Simulations", *J. Org. Chem.* **2000**, 65(24), 8139-8145.
89. Neszmélyi, A., *Molecular Dynamics of CD - Complexes in Solution: A ¹³C-NMR Study*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 267-271.
90. Bender, H., *Enzymology of the Cyclodextrins*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 77-88.
91. Jodál, I., *Enzymatic Investigations with Cyclodextrins*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 137.

92. Fetzner, A.; Pfeuffer, L.; Schubert, R., *Enzymatic Degradation Studies of β -Cyclodextrin with Regard to the Development of Colonic Specific Release Formulations*. In *The 24th International Symposium on "Controlled Release of Bioactive Materials"*, 1997, Stockholm, Controlled Release Society, Inc., 801-802.
93. Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Bandur, G.; Lupea, A.X. *The Complexation of α - and β -Cyclodextrin with Odorant Compounds*. In *Proceedings of the 5th International Symposium "Young People and the Multidisciplinary Research"*, 2003, Timișoara, 494-501.
94. Rekkas, D.M.; Kagkadis, C.A.; Dallas, P.P.; Reppas, C., *Oral and Intramuscular Absorption of Ibuprofen after Administration of a Freeze-Dried Ibuprofen-2HP β CD Complex in Dogs*. In *The 24th International Symposium on "Controlled Release of Bioactive Materials"*, 1997, Stockholm, Controlled Release Society, Inc., 557-558.
95. McAllister, S.M.; Taylor, I.H., *Effect of Cyclodextrin Complexation on the Permeability of Testosterone Across CACO-2 Cell Monolayers*. In *The 26th International Symposium on "Controlled Release of Bioactive Materials"*, 1999, Boston, Controlled Release Society, Inc., 202-203.
96. Carli, F.; Bresciani, M.; Canal, T.; Frattini, C.; Lombardi, D., *Industrial Mechano - Chemical Production of Anti-Inflammatory Agent / β -Cyclodextrin Composite*. In *The 26th International Symposium on "Controlled Release of Bioactive Materials"*, 1999, Boston, Controlled Release Society, Inc., 873-874.
97. Sangalli, M.E.; Pavesi, P.; Zema, L.; Maroni, A.; Giordano, F.; Gazzaniga, A., *Influence of β -Cyclodextrin on the Release of Poorly Soluble Drugs from Hydrophilic and Inert Heterogeneous Matrices*. In *The 26th International Symposium on "Controlled Release of Bioactive Materials"*, 1999, Boston, Controlled Release Society, Inc., 887-888.
98. Rao, V.M.; Haslam, J.L.; Stella, V.J., *Controlled Release Matrices of Poorly Water Soluble Drugs Using (SBE) - β -CD as a Solubilizing Agent*. In *The 26th International Symposium on "Controlled Release of Bioactive Materials"*, 1999, Boston, Controlled Release Society, Inc., 929-930.
99. Bromet, M.R.D.; Arnold, A.P.; Jackson, W.G., *Second - Sphere Coordination of Cobalt (III) Complexes by Cyclodextrins*, 1998, <http://apamac.ch.adfa.oz.au/ozchemnet/chemdept/staff/aa/pubs/bromet>.
100. Diaz, D.; Escobar-Llanos, C.M.; Bernard-Bernard, M.J.; Garcia-Mora, J., *Binding, Molecular Mechanism and Thermodynamics of Cyclodextrin Inclusion Complexes with Ketoprofen in Aqueous Medium*, 1998, <http://www.dekker.com/e/p/pl/1083-7450/003/003/003>.
101. Hoier, H.; Aree, T.; Saenger, W., *Crystal Structure of alpha-Cyclodextrin - Acetonitrile - Hexahydrate*, 1998, <http://krystal.karlov.mff.cuni.cz/ecm/abstract/c/8/382.htm>.
102. Diaz, D.; Bernard-Bernard, M.J.; Garcia-Mora, J.; Escobar-Llanos, C.M., *Complexation and Solubility Behavior of Albendazole with Some Cyclodextrins*, 1998, <http://www.dekker.com/e/p.pl/1083-7450/003/003/012>.
103. Bellitto, V.J.; Hsu, F.H.; Hadley, J.; Trinh, T., *Study of Benzyl Salicylate / beta-Cyclodextrin Inclusion Complex Formation by Positron Annihilation*, 1996, <http://flux.aps.org/meetings/bapses96/abs/g0200012.html>.
104. Melo, P.S.; Justo, G.Z.; de-Azevedo, M.B.M.; Durán, N.; Haun, M., "Violacein and Its β -Cyclodextrin Complexes Induce Apoptosis and Differentiation in HL60 Cells", *Toxicology* **2003**, *186*, 217-225.
105. Gao, Z.; Zhao, X., "Enhancing Electrorheological Behaviors with Formation of β -Cyclodextrin Supramolecular Complex", *Polymer* **2003**, *44*, 4519-4526.
106. Granados, A.M.; de-Rossi, R.H.; Barbiric, D.A.; Castro, E.A., "Effect of β -Cyclodextrin on the Hydrolysis of *N*-Phenylphtalamide and *N*-Adamantylphtalamide - A Two- Sided Empirical Approach", *J. Mol. Struct. (Theochem)* **2002**, *619*, 91-100.
107. Lino, A.C.S.; Takahata, Y.; Jaime, C., " α - And β -Cyclodextrin Complexes with *n*-Alkyl Carboxylic acids and *n*-Alkyl-*p*-hydroxybenzoates. A Molecular Mechanics Study of 1:1 and 1:2 Associations", *J. Mol. Struct. (Theochem)* **2002**, *594*, 207-213.
108. Furuta, T.; Yoshii, H.; Kobayashi, T.; Nishitarumi, T.; Yasunishi, A., "Powdery Encapsulation of d-Limonene by Kneading with Mixed Powders of β -Cyclodextrin and Maltodextrin at Low Water Content", *Biosci. Biotech. Biochem.* **1994**, *58*(5), 847-850.
109. Yoshii, H.; Furuta, T.; Asada, M.; Sugisawa, H., "Quantitative Analysis by X-Ray Diffraction of the Inclusion Complex Formed by d-Limonene in a β -Cyclodextrin / Maltodextrin Mixed Powder", *Biosci. Biotech. Biochem.* **1992**, *56*(3), 384-387.
110. Yoshii, H.; Furuta, T.; Kawasaki, K.; Hirano, H.; Funatsu, Y.; Toyomi, A.; Nakayama, S., "Oxidative Stability of Powdery Tridocosahexaenoin Included in Cyclodextrin and Its Application to Fish Meal Paste", *Biosci. Biotech. Biochem.* **1997**, *61*(8), 1376-1378.
111. Hădărugă, N.; Hădărugă, D., *Arome naturale: arome din reacția Maillard, bioarome și arome încapsulate*, Ed. Augusta, E., Timișoara, 2004.

112. *** *Calorimetry and Thermal Analysis of Polymers*, ed. Mathot, V.B.F., Hanser Publ., Munich - Vienna - New York, 1994.
113. Rotich, M.K.; Brown, M.E.; Glass, B.D., "Thermal Studies on Mixtures of Benzoic Salicylic Acids with Cyclodextrins", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2003**, *73*, 671-686.
114. Veiga, M.D.; Merino, M.; Fernandez, D.; Lozano, R., "Characterization of Some Cyclodextrin Derivatives by Thermal Analysis", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2002**, *68*, 511-516.
115. Bettinetti, G.; Novak, C.; Sorrenti, M., "Thermal and Structural Characterization of Commercial α -, β -, and γ -Cyclodextrins", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2002**, *68*, 517-529.
116. Cvetkovskii, A.; Bettini, R.; Tasic, L.; Stupar, M.; Casini, I.; Rossi, A.; Giordano, F., "Thermal Properties of Binary Mixtures of β -Cyclodextrin with Carbamazepine Polymorphs", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2002**, *68*, 669-678.
117. Morin, N.; Chilouet, A.; Millet, J.; Rouland, J.-C., "Bifonazole- β -Cyclodextrin Inclusion Complexes Thermal Analysis and X-Ray Powder Diffraction Study", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2000**, *62*, 187-201.
118. Caira, M.R.; Bourne, S.A.; Mvula, E., "Thermoanalytical Study of the Dehydration of Cyclodextrin Inclusion Complexes of Clofibrac Acid", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **1999**, *56*, 1329-1334.
119. Kreaz, R.M.A.; Novak, C.; Eros, I.; Kata, M., "Thermoanalytical Studies on Complexes of Furosemide with β -Cyclodextrin Derivatives", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **1999**, *55*, 115-122.
120. Mura, P.; Maestrelli, F.; Cirri, M.; Furlanetto, S.; Pinzauti, S., "Differential Scanning Calorimetry as an Analytical Tool in the Study of Drug-Cyclodextrin Interactions", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2003**, *73*, 635-646.
121. Pose-Vilarnovo, B.; Sanchez, C.R.-T.; Moure, N.D.; Vila-Jato, J.L.; Torres-Labandeira, J.J., "Effect of Hydroxypropylmethyl Cellulose on the Complexation of Diclofenac with Cyclodextrins", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2003**, *73*, 661-670.
122. Caira, M.R.; de-Vries, E.J.C.; Nassimbeni, L.R., "Cyclodextrin Inclusion of *p*-Hydroxybenzoic Acid Esters", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2003**, *73*, 647-651.
123. Rotich, M.K.; Brown, M.E.; Glass, B.D., "Thermal Studies on Mixtures of Aminosalicic Acids with Cyclodextrins", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2003**, *73*, 687-706.
124. Brown, M.E.; Glass, B.D.; Worthington, M.S., "Binary Systems of Nifedipine and Various Cyclodextrins in the Solid State Thermal, FTIR, XRD Studies", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2002**, *68*, 631-646.
125. Pose-Vilarnovo, B.; Sanchez, C.R.-T.; Perez-Marcos, M.B.; Torres-Labandeira, J.J., "Sulphamethizole-Cyclodextrinhydroxypropylmethyl Cellulose Multicomponent Complexes", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2002**, *68*, 657-667.
126. Kernóczy, L.; Tétényi, P.; Mincovicz, E.; Zámbo, I.; Tyihák, E.; Szejtli, J., *Thermofractography of Cyclodextrin - Complexes by Classical and Overpressured TLC Techniques*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 227-236.
127. Simon, K.; Stadler, Á.; Hange, F., *Investigation of Cyclodextrin Complexes by X-Ray Powder Diffraction*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 251-260.
128. Veiga, M.D.; Merino, M., "Interactions of oxyphenbutazone with different cyclodextrins in aqueous medium and in the solid state", *J. Pharm. & Biomed. Anal.* **2002**, *28*, 973-982.
129. Nussinovitch, A., *Hydrocolloid Applications. Gum Technology in the Food and Other Industries*, Blackie Academic & Professional, London - Weinheim - New York - Tokyo - Melbourne - Madras, 1997.
130. Heurtault, B.; Saulnier, P.; Pech, B.; Benoit, J.P.; Proust, J.E., "Interfacial Stability of Lipid Nanocapsules", *Colloids&Surfaces B* **2003**, *30*, 225-235.
131. Shah, J.C.; Sadhale, Y.; Chilukuri, D.M., "Cubic Phase Gels as Drug Delivery Systems", *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *47*, 229-250.
132. Winterhalter, M.; Hilty, C.; Bezrukov, S.M.; Nardin, C.; Meier, W.; Fournier, D., "Controlling Membrane Permeability with Bacterial Porins: Application to Encapsulated Enzymes", *Talanta* **2001**, *55*, 965-971.
133. Gill, I.; Ballesteros, A., "Bioencapsulation within Synthetic Polymers (Part 2): Non-sol-gel Protein-polymer Biocomposites", *Tib. Tech.* **2000**, *18*, 469-479.
134. Arias, M.L.; Frontini, P.M.; Williams, R.J.J., "Analysis of the Damage Zone Around the Crack Tip for Two Rubber-Modified Epoxy Matrices Exhibiting Different Toughenability", *Polymer* **2003**, *44*, 1537-1546.

135. Miertus, S.; Chiellini, E.; Chiellini, F.; Kona, J.; Tomasi, J.; Solaro, R., *Modelling of Molecular Interactions and Inclusion Phenomena in Substituted β -Cyclodextrin: From Simple Probes to Proteins*. In *Macromolecular Symposia - Polymer-Solvent Complexes and Intercalates II*, 1998, Ischia, Wiley - VCH, 41-55.
136. Pothakamury, U.R.; Barbosa-Cánovas, G.V., "Fundamental Aspects of Controlled Release in Foods", *Trends Food Sci. & Technol.* **1995**, *6*, 397-406.
137. Matsuno, R.; Adachi, S., "Lipid Encapsulation Technology - Techniques and Applications to Food", *Trends Food Sci. & Technol.* **1993**, *4*, 256-261.
138. Goubert, I.; Dahout, C.; Sémon, E.; Guichard, E.; Le-Quéré, J.-L.; Voilley, A., "Competitive Binding of Aroma Compounds by β -Cyclodextrin", *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5916-5922.
139. Szejtli, J., *Cyclodextrins in Foods, Cosmetics and Toiletries*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 469-480.
140. Venczel, G., *Production and Application of β -Cyclodextrin Complexes in the Food Industry*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 481-486.
141. Stadler-Szoke, Á.; Szejtli, J., *A Forecast for Application of Cyclodextrins in the Pharma - Industry*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 377-388.
142. Uekama, K.; Fujinaga, T.; Hirayama, F.; Otagiri, M.; Seo, H.; Tsuruoka, M., *Enhanced Bioavailability of Digitalis Glycoside by Cyclodextrin Complexation*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 399-408.
143. Fónagy, A.; Gerlóczy, A.; Keresztes, P.; Szejtli, J., *Influencing Drug Absorption by β -Cyclodextrin Complexation*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 409-412.
144. Habon, I.; Szejtli, J., *Complex Equilibrium and Bioavailability*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 413-422.
145. Lengyel, M.T.; Szejtli, J.; Szabó, P.; Ferenczy, T., *Menadione - β -Cyclodextrin Complex: Chemical Properties and Biological Effects*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 423-430.
146. Ferenczy, T.; Szabó, P.; Serfozo, J.; Stadler-Szoke, Á.; Szejtli, J., *Pharmacological Effects of Lidocaine Dimethyl - β -Cyclodextrin Inclusion Complex*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 443-450.
147. Krieg, H.M.; Lotter, J.; Keizer, K.; Breytenbach, J.C., "Enrichment of Chlorthalidone Enantiomers by an Aqueous Bulk Liquid Membrane Containing β -Cyclodextrin", *J. Membr. Sci.* **2000**, *167*, 33-45.
148. Yaylayan, V.A., "Classification of the Maillard Reaction: A Conceptual Approach", *Trends Food Sci. & Technol.* **1997**, *8*, 13-18.
149. *** *Recent Developments in Flavor and Fragrance Chemistry*, ed. Hopp, R.; Mori, K., VCH Publ., Weinheim - New York - Basel - Cambridge, 1993.
150. *** *The Maillard Reaction in Foods and Medicine*, ed. O'Brien, J.; Nursten, H.E.; Crabbe, M.J.C.; Ames, J.M., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998.
151. *** *The Maillard Reaction. Consequences for the Chemical and Life Sciences*, ed. Ikan, R., John Wiley & Sons, Chichester - New York - Brisbane - Toronto - Singapore, 1996.
152. *** *Chemistry of Heterocyclic Compounds in Flavours and Aromas*, ed. Vemin, G., Ellis Horwood Ltd., Chichester, 1982.
153. Gerrard, J.A.; Brown, P.K.; Fayle, S.E., "Maillard Crosslinking of Food Proteins II: The Reactions of Glutaraldehyde, Formaldehyde and Glyceraldehyde with Wheat Proteins *in vitro* and *in situ*", *Food Chemistry* **2003**, *80*, 35-43.
154. Burdurlu, H.S.; Karadeniz, F., "Effect of Storage on Nonenzymatic Browning of Apple Juice Concentrates", *Food Chemistry* **2003**, *80*, 91-97.
155. Redgwell, R.J.; Trovato, V.; Curti, D., "Cocoa Bean Carbohydrates: Roasting - Induced Changes and Polymer Interactions", *Food Chemistry* **2003**, *80*, 511-516.
156. Selim, K.; Tsimidou, M.; Biliaderis, C.G., "Kinetic Studies of Degradation of Saffron Carotenoids Encapsulated in Amorphous Polymer Matrices", *Food Chemistry* **2000**, *71*, 199-206.
157. Boadi, D.K.; Neufeld, R.J., "Encapsulation of Tannase for the Hydrolysis of Tea Tannins", *Enzyme and Microbial Technology* **2001**, *28*, 590-595.

158. Martinac, A.; Filipovic-Grcic, J.; Zorc, M.B.B.; Voinovich, D.; Jalsenjak, I., "Gemfibrozil Encapsulation and Release from Microspheres and Macromolecular Conjugates", *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2002**, *17*, 207-216.
159. Saenger, W., *Structure Aspects of Cyclodextrin Inclusion Compounds*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 141-150.
160. Szente, L.; Gál-Füzy, M.; Szejtli, J., *Stabilization of Camomile Oil with β -Cyclodextrin*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 431-442.
161. Loukas, Y.L.; Gregoriadis, G., *Drugs - In - Cyclodextrins - In - Liposomes: A Novel Approach for the Reduction of Drug Leakage from Liposomes*. In *The 24th International Symposium on "Controlled Release of Bioactive Materials"*, 1997, Stockholm, Controlled Release Society, Inc., 204-205.
162. Otagiri, M.; Uekama, K.; Irie, T.; Sunada, M.; Miyata, T.; Kasé, Y., *Effects of Cyclodextrins on the Hemolysis Induced with Phenothiazine Neuroleptics*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 389-398.
163. Lenkey, B., *Investigations of Digitalis Glycosides and Their Cyclodextrin Complexes*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 451-452.
164. Pap, L., *Effect of Several Drugs and Their CD - Complexes on Heart - Rhythm of Blabera Craniifer*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 453-454.
165. Neumark, T.; Takáts, J.; Gerlóczy, A., *Reduction of Indomethacin Side Effect with β -Cyclodextrin in Gastro - Intestinal Tract*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 455-456.
166. Pitha, J.; Szejtli, J., *Cyclodextrins and Congeners in Parenteral Applications*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 457-465.
167. Barbato, F.; Cappello, B.; La-Rotonda, M.I.; Miro, A.; Morrica, P., *Nimesulide / β -Cyclodextrin Inclusion Compounds: Characterization and Dissolution Studies*. In *The 24th International Symposium on "Controlled Release of Bioactive Materials"*, 1997, Stockholm, Controlled Release Society, Inc., 385-386.
168. Croyle, M.A.; Roessler, B.J.; Amidon, G.L., *β -Cyclodextrins Enhance Gene Delivery to the Intestine*. In *The 24th International Symposium on "Controlled Release of Bioactive Materials"*, 1997, Stockholm, Controlled Release Society, Inc., 675-676.
169. Kobayashi, Y.; Sugibayashi, K.; Morimoto, Y.; Miyamoto, M., *Enhancing Effect of N-Acetyl-L-Cysteine on the in vitro Permeation of a Hydrophilic Model Drug, 5-Fluorouracil, Through Human Nail Plate*. In *The 24th International Symposium on "Controlled Release of Bioactive Materials"*, 1997, Stockholm, Controlled Release Society, Inc., 807-808.
170. Kobayashi, T.; Aomatsu, Y.; Kanehiro, H.; Hisanaga, M.; Nakajima, Y., "Protection of NOD Islet Isograft From Autoimmune Destruction by Agarose Microencapsulation", *Transplantation Proceedings* **2003**, *35*, 484-485.
171. Daemen, T.; Hoedemakers, R.; Stormb, G.; Scherphof, G.L., "Opportunities in Targeted Drug Delivery to Kupffer cells: Delivery of Immunomodulators to Kupffer Cells-activation of Tumoricidal Properties", *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, *17*, 21-30.
172. Nii, T.; Takamura, A.; Mohri, K.; Ishii, F., "Factors Affecting Physicochemical Properties of Liposomes Prepared with Hydrogenated Purified Egg Yolk Lecithins by the Microencapsulation Vesicle Method", *Colloids&Surfaces B* **2002**, *27*, 323-332.
173. Gentile, F.T.; Doherty, E.J.; Rein, D.H.; Shoichet, M.S.; Winn, S.R., "Polymer Science for Macroencapsulation of Cells for Central Nervous System Transplantation", *Reactive Polymers* **1995**, *25*, 207-227.
174. Gubin, S.P., "Metalcontaining Nano-particles within Polymeric Matrices: Preparation, Structure, and Properties", *Colloids&Surfaces A* **2002**, *202*, 155-163.
175. Jackson, J.K.; Liang, L.S.; Hunter, W.L.; Reynolds, M.; Sandberg, J.A.; Springate, C.; Burt, H.M., "The Encapsulation of Ribozymes in Biodegradable Polymeric Matrices", *Int. J. Pharmaceutics* **2002**, *243*, 43-55.
176. Madsen, S.-K.; Mooney, D.J., "Delivering DNA with Polymer Matrices: Applications in Tissue Engineering and Gene Therapy", *PSTT* **2000**, *3*, 381-384.
177. Renard, D.; Robert, P.; Lavenant, L.; Melcion, D.; Popineau, Y.; Guéguen, J.; Duclairoir, C.; Nakache, E.; Sanchez, C.; Schmitt, C., "Biopolymeric Colloidal Carriers for Encapsulation or Controlled Release Applications", *International Journal of Pharmaceutics* **2002**, *242*, 163-166.
178. Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Bandur, G.; Lupea, A.X. *The Complexation of α - and β -Cyclodextrin with Odorant Compounds*. In *Proceedings of the 5th International Symposium Young People and the Multidisciplinary Research*, 2003, Timișoara, Ed. Sudura, 494-501.

179. Koch, J., *Stabilisation and Controlled Release of Perfume in Detergents*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 487-496.
180. Tétényi, P., *Effect of Cyclodextrin on Growth Processes and Productivity of Plants*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 501-512.
181. Holland, J.; Korösi, L.; Tétényi, M.; Szejtli, J., *Manifestation of Growth Control Effect of Cyclodextrin (CD) in Biosynthesis of DNA, RNA and Proteins in Germinating Barley*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 513-518.
182. Tétényi, M., *Biological Effects of the Cyclodextrin Complexes of 2-Chloroethylphosphonic Acid*. In *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, 1981, Budapest, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 1982, 519-524.
183. El-Massry, K.F.; El-Ghorab, A.H.; Farouk, A., "Antioxidant Activity and Volatile Components of Egyptian *Artemisia judaica* L.", *Food Chemistry* **2002**, *79*, 331-336.
184. Ellnain-Wojtaszek, M.; Kruczynski, Z.; Kasprzak, J., "Variations in the Free Radical Scavenging Activity of *Ginkgo biloba* L. Leaves in the Period of Complete Development of Green Leaves to Fall of Yellow Ones", *Food Chemistry* **2002**, *79*, 79-84.
185. Foti, M.; Piattelli, M.; Baratta, M.T.; Ruberto, G., "Flavonoids, Coumarins, and Cinnamic Acids as Antioxidants in a Micellar System. Structure - Activity Relationship", *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 497-501.
186. Herodez, S.S.; Hadolin, M.; Skerget, M.; Knez, Z., "Solvent Extraction Study of Antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves", *Food Chemistry* **2003**, *80*, 275-282.
187. Hidalgo, F.J.; Alaiz, M.; Zamora, R., *Antioxidative Activity of Non - Enzymatically Brownd Proteins by Reaction with Lipid Oxidation Products*, In *The Maillard Reaction in Foods and Medicine*, O'Brien, J.; Nursten, H.E.; Crabbe, M.J.C.; Ames, J.M., Editors, 1998, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 225-230.
188. Kamil, J.Y.V.A.; Jeon, Y.-J.; Shahidi, F., "Antioxidative Activity of Chitosans of Different Viscosity in Cooked Comminuted Flesh of Hering (*Clupea harengus*)", *Food Chemistry* **2002**, *79*, 69-77.
189. Leja, M.; Mareczek, A.; Ben, J., "Antioxidant Properties of Two Apple Cultivars During Long - Term Storage", *Food Chemistry* **2003**, *80*, 303-307.
190. Lingnert, H.; Eriksson, C.E., "Antioxidative Maillard Reaction Products. I. Products from Sugars and Free Amino Acids", *J. Food Proc. & Presserv.* **1980**, *4*, 161-172.
191. Lingnert, H.; Eriksson, C.E., "Antioxidative Maillard Reaction Products. II. Products from Sugars and Peptides od Protein Hydrolysates", *J. Food Proc. & Presserv.* **1980**, *4*, 173-181.
192. Lingnert, H., "Antioxidative Maillard Reaction Products. III. Application in Cookies", *J. Food Proc. & Presserv.* **1980**, *4*, 219-233.
193. Lingnert, H.; Lundgren, B., "Antioxidative Maillard Reaction Products. IV. Application in Sausage", *J. Food Proc. & Presserv.* **1980**, *4*, 235-246.
194. Malecka, M., "Antioxidant Properties of the Unsaponifiable Matter Isolated from Tomato Seeds, Oat Grains and Wheat Germ Oil", *Food Chemistry* **2002**, *79*, 327-330.
195. Nagai, T.; Inoue, R.; Inoue, H.; Suzuki, N., "Preparation and Antioxidant Properties of Water Extract of Propolis", *Food Chemistry* **2003**, *80*, 29-33.
196. Negi, P.S.; Jayaprakasha, G.K.; Jena, B.S., "Antioxidant and Antimutagenic Activities of Pomegranate Peel Extracts", *Food Chemistry* **2003**, *80*, 393-397.
197. Rodríguez-Comesaña, M.; García-Falcón, M.S.; Simal-Gándara, J., "Control of Nutritional Labels in Beverages with Added Vitamins: Screening of β -Carotene and Ascorbic Acid Contents", *Food Chemistry* **2002**, *79*, 141-144.
198. Sandoval, M.; Okuhama, N.N.; Angeles, F.M.; Melchor, V.V.; Condezo, L.A.; Lao, J.; Miller, M.J.S., "Antioxidant Activity of the Cruciferous Vegetable Maca (*Lepidium meyenii*)", *Food Chemistry* **2002**, *79*, 207-213.
199. Siddhuraju, P.; Mohan, P.S.; Becker, K., "Studies on the Antioxidant Activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): A Preliminary Assessment of Crude Extract from Stem Bark, Leaves, Flowers, and Fruit Pulp", *Food Chemistry* **2002**, *79*, 61-67.
200. Smith, J.S.; Alfawaz, M., "Antioxidative Activity of Maillard Reaction Products in Cooked Ground Beef, Sensory and TBA Values", *J. Food Sci.* **1995**, *60*(2), 234-236.
201. Someya, S.; Yoshiki, Y.; Okubo, K., "Antioxidants Compounds from Bananas (*Musa cavendish*)", *Food Chemistry* **2002**, *79*, 351-354.
202. Trouillas, P.; Calliste, C.-A.; Allais, D.-P.; Simon, A.; Marfak, A.; Delange, C.; Duroux, J.-L., "Antioxidant, Anti-inflammatory and Antiproliferative Properties of Sixteen Water Plant Extracts Uses in the Limousin Countryside as Herbal Teas", *Food Chemistry* **2003**, *80*, 399-407.

203. Wright, J.S., "Predicting the Antioxidant Activity of Curcumin and Curcuminoids", *J. Mol. Struct. (Theochem)* **2002**, *591*, 207-217.
204. Yen, G.-C.; Duh, P.-D.; Tsai, H.-L., "Antioxidant and Pro-oxidant Properties of Ascorbic Acid and Gallic Acid", *Food Chemistry* **2002**, *79*, 307-313.
205. Yoshimura, Y.; Iijima, T.; Watanabe, T.; Nakazawa, H., "Antioxidative Effect of Maillard Reaction Products Using Glucose - Glycine Model System", *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 4106-4109.
206. Zabetakis, I.; Gramshaw, J.W.; Robinson, D.S., "2,5-Dimethyl-4-hydroxy-2H-furan-3-one and Its Derivatives: Analysis, Synthesis and Biosynthesis - A Review", *Food Chemistry* **1999**, *65*, 139-151.
207. Min, D.B.; Li, T.-L.; Lee, H.-O., *Effects of Processing Steps on the Contents of Minor Compounds and Oxidation of Soybean Oil*, In *Process-Induced Chemical Changes in Food*, Shahidi, F.; Ho, C.-T.; van-Chuyen, N., Editors, 1998, Plenum Press, New York-London, 161-180.
208. Wanasundara, P.K.J.P.D.; Shahidi, F., *Process-Induced Changes in Edible Oils*, In *Process-Induced Chemical Changes in Food*, Shahidi, F.; Ho, C.-T.; van-Chuyen, N., Editors, 1998, Plenum Press, New York-London, 135-160.
209. *** *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry® Electronic Release*, 6th edition, 1998.
210. Hădărugă, D.I.; Hădărugă, N.G., *Compuși odoranți și aromatizanți*, Ed. Politehnica, Timișoara, 2003.
211. Bârla- Hădărugă, N.G.; Biron, R.; Radu, F.; Mucete, D.; Mureșan, S.; Hădărugă, D.I.; Jianu, I., *The Separation and Analysis of the Essential oil of Garlic (Allium sativum)*. In *Proceedings of the 6th National Symposium "Science, Processes, and Technology in the Food Industry. Timisoara Academic Days"*, 1999, Timișoara, Ed. Mirton, 175-179.
212. Hădărugă, N.G.; Mișcă, C.D.; Mureșan, S.; Hădărugă, D.I.; Jianu, C.; Jianu, I., "Volatile Constituents of the Distilled Oils of Garlic *Allium sativum L.*", *Acta Phytotherapica Romanica* **2000**, *6*(1-2), 63-64.
213. Hădărugă, D.I.; Hădărugă, N.G.; Mureșan, S.; Dăescu, C.; Barbărasă, I., *GC-Olfactometry: An Useful Tool for Flavor Analysis*. In *Proceedings of the 2nd International Conference on Ecological Chemistry*, 2002, Chișinău, 22-29.
214. Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Lupea, A.X.; Bandur, G., "Bioactive Nanoparticles (1). The Complexation of the Essential Oil of Garlic with β -Cyclodextrin", *Scientifical Researches. Agroalimentary Processes and Technologies* **2004**, *10*, 121-127.
215. Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Bandur, G.; Lupea, A.X.; Knejevici, F.; Andrei, V.; Raba, D., "Bioactive Nanoparticles (2). The Complexation of the Caraway Essential Oil with β -Cyclodextrin", *Scientifical Researches. Agroalimentary Processes and Technologies* **2004**, *10*, 128-134.
216. Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Bandur, G.; Lupea, A.X.; Mișcă, C.D.; Ghiulai, M.; Rinovetz, A.; Radoslavievici, D.S., "Bioactive Nanoparticles (3). The Complexation of the Lemon Essential Oil with beta-Cyclodextrin", *Scientifical Researches. Agroalimentary Processes and Technologies* **2004**, *10*, 135-141.
217. Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Bandur, G.; Lupea, A.X.; Tatu, C.; Ordodi, V.L., *Bioactive Nanoparticles (4). The Complexation of the Essential Oils from the Lamiaceae Family Plants with beta-Cyclodextrin*. In *Proceedings of the 6th International Symposium "Young People and the Multidisciplinary Research"*, 2004, Timișoara, 635-644.
218. Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Bandur, G.; Lupea, A.X.; Tatu, C.; Ordodi, V.L., *Bioactive Nanoparticles (5). Thermal Stability of the Oleic Acid / alpha- and beta-Cyclodextrin Complexes*. In *Proceedings of the 6th International Symposium "Young People and the Multidisciplinary Research"*, 2004, Timișoara, 645-652.
219. *** *HyperChem Release 5.1 for Windows*, HyperCube, Autodesk, Inc., 2001.
220. Esbensen, K.; Schonkopf, S.; Midtgaard, T., *Multivariate Analysis in Practice*, CAMO Computer - Aided Modelling AS, Trondheim, 1996.
221. Dayal, B.S.; MacGregor, J.F., "Improved PLS Algorithms", *J. Chemometrics* **1997**, *11*, 73-85.
222. Gordon, A.D., *Classification. Methods for the Exploratory Analysis of Multivariate Data*, Chapman & Hall, London - New York, 1981.
223. Goutis, C., "A Fast Method to Compute Orthogonal Loadings Partial Least Squares", *J. Chemometrics* **1997**, *11*, 33-38.
224. Hădărugă, N.G.; Mișcă, C.D.; Drugă, M.; Hădărugă, D.I., *Sensory Evaluation for Yoghurt Products and Multivariate Analysis of the Data*. In *Proceedings of the 3rd International Symposium "Young People and the Multidisciplinary Research"*, 2001, Timișoara, 203-208.
225. Kurunczi, L., *Proiectarea Medicamentelor Asistată de Computer. QSAR - Relații Cantitative Structură-Activitate*, Lito UMF, Timișoara, 1998.

226. Lawless, H.T.; Heymann, H., *Sensory Evaluation of Food. Principles and Practices*, ed. Heldman, D.R., Chapman & Hall, New York, 1998.
227. *** *Statistical Procedures in Food Research*, ed. Piggott, J.R., Elsevier Appl. Sci., London - New York, 1986.
228. *** *Food Authenticity. Issues and Methodologies*, Eurofins Scientific, Nantes, 1998.
229. Meilgaard, M.; Civille, G.V.; Carr, B.T., *Sensory Evaluation Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton - Ann Arbor - Boston - London, 1991.
230. Page, S.W., "Pattern Recognition Methods for the Determination of Food Composition", *Food Technology* **1986**, *40*, 104-109.
231. Shaw, P.E.; Moshonas, M.G.; Buslig, B.S.; Barros, S.M.; Widmer, W.W., "Discriminant and Principal Component Analyses to Classify Commercial Orange Juices Based on Relative Amounts of Volatile Juice Constituents", *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 1949-1953.
232. Smilde, A.K., "Comments on Multilinear PLS", *J. Chemometrics* **1997**, *11*, 367-277.
233. *** *STAS 2213/1-88. Produse dulci. Analiză senzorială*, Institutul român de standardizare, București, 1988.
234. O'Mahony, M., *Sensory Evaluation of Food. Statistical Methods and Procedures*, Marcel Dekker, Inc., New York - Basel, 1986.
235. Stone, H.; Sidel, J.L., *Sensory Evaluation Practices*, ed. Taylor, S.L., Academic Press, Inc., San Diego - New York - Boston - London - Sydney - Tokyo - Toronto, 1993.
236. *** *The Merck Index 2000*, Chapman&Hall/CRC (on CD-ROM), 1999.
237. Livingstone, D.J., "Quantitative Structure - Activity Relationships: Correlation and Similarity Methods", *Analytical Proc. Including Analytical Communications* **1994**, *31*, 107-108.
238. Van de Waterbeemd, H.; Kansy, M.; Livingstone, D.J.; Blankley, C.J.; Lajiness, M.S., *Structure - Property Correlations in Drug Research*, Academic Press, Ltd., San Diego, 1996.

LUCRĂRI PUBLICATE CARE AU STAT LA BAZA ELABORĂRII TEZEI DE DOCTORAT

Cărți:

1. Hădărugă, D.I.; Hădărugă, N.G., *Compuși odoranți și aromatizanți*, Ed. Politehnica, Timișoara, 2003, 254 p, ISBN 973-625-038-5.
2. Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I., *Arome naturale: arome din reacția Maillard, bioarome și arome încapsulate*, Ed. Augusta, Timișoara, 2004, 120 p, ISBN 973-695-078-6.

Lucrări publicate:

1. Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Lupea, A.X.; Bandur, G., "Bioactive Nanoparticles (1). The Complexation of the Essential Oil of Garlic with β -Cyclodextrin", *Scientific Researches. Agroalimentary Processes and Technologies* 2004, 10, 121-127, ISSN 1453-1399.
2. Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Bandur, G.; Lupea, A.X.; Knejevici, F.; Andrei, V.; Raba, D., "Bioactive Nanoparticles (2). The Complexation of the Caraway Essential Oil with β -Cyclodextrin", *Scientific Researches. Agroalimentary Processes and Technologies* 2004, 10, 128-134, ISSN 1453-1399.
3. Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Lupea, A.X.; Bandur, G.; Mișcă, C.; Ghiulai, M.; Rinovetz, A.; Radoslavievici, D.S., "Bioactive Nanoparticles (3). The Complexation of the Lemon Essential Oil with β -Cyclodextrin", *Scientific Researches. Agroalimentary Processes and Technologies* 2004, 10, 135-141, ISSN 1453-1399.
4. Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Bandur, G.; Lupea, A.X.; Tatu, C.; Ordodi, V.L., "Bioactive Nanoparticles (4). The Complexation of the Essential Oils from the *Lamiaceae* Family Plants with β -Cyclodextrin", *Proceedings of the 6th International Symposium "Young People and the Multidisciplinary Research"*, Timișoara, 23-24 sept 2004, 635-644, ISBN 973-8359-26-0.
5. Hădărugă, D.I.; Hădărugă, N.G.; Bandur, G.; Lupea, A.X.; Tatu, C.; Ordodi, V.L., "Bioactive Nanoparticles (5). Thermal Stability of the Oleic Acid / α - and β -Cyclodextrin Complexes", *Proceedings of the 6th International Symposium "Young People and the Multidisciplinary Research"*, Timișoara, 23-24 sept 2004, 645-652. ISBN 973-8359-26-0.
6. Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Bandur, G.; Lupea, Alfa X., "The Complexation of α - and β -Cyclodextrin with Odorant Compounds", *Proceedings of the 5th International Symposium "Young People and the Multidisciplinary Research"*, Timișoara, 6-7 nov 2003, 494-501, ISBN 973-8359-18-X.
7. Hădărugă, N.G.; Mișcă, Corina D.; Mureșan, S.; Hădărugă, D.I.; Jianu, C.; Jianu, I., "Volatile Constituents of the Distilled Oils of Garlic (*Allium sativum* L.)", *Acta Phytotherapica Romanica* 2000, 6 (1-2), 63-64, ISSN 973-9306-10-1.
8. Bârla-Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Jianu, C.; Radu, Florina; Nichita, Ileana; Jianu, I., " α -Cyclodextrin. Molecular Aspects and Their Flavour Interactions (I)", *Zilele Academice Timișene*, ed. a VI-a, Simpozion "Științe, Procese și Tehnologii Agroalimentare", Timișoara, 27-28 mai 1999, 1, 169-174, ISBN 973-578-825-X.
9. Bârla-Hădărugă, N.G.; Biron, Ramona; Radu, Florina; Mucete, Daniela; Mureșan, S.; Hădărugă, D.I.; Jianu, C., "The Separation and the Analysis of the Essential Oil of Garlic (*Allium sativum* L.)", *Zilele Academice Timișene*, ed. a VI-a, Simpozion "Științe, Procese și Tehnologii Agroalimentare", Timișoara, 27-28 mai 1999, 1, 175-179. ISBN 973-578-825-X.
10. Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Mișcă, Corina; Jianu, I., " β -Cyclodextrin. Molecular Aspects and Their Flavor Interactions (II)", *Conferința Națională de Biotehnologie și Ingineria Mediului, Târgoviște*, 3-4 noiembrie 2000, 1, 31-37, ISBN 973-9391-86-9.
11. Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Mișcă, Corina D.; Jianu, I., " γ -Cyclodextrin. Molecular Aspects and Its Flavor Interactions (III)", *Zilele Academice Timișene*, ed. a VII-a, Timișoara, 25-27 mai 2001, 155-160, ISBN 973-8244-20-X.
12. Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Mișcă, Corina D.; Drugă, Marioara; Jianu, I., "Cyclodextrins. Molecular Aspects and Their Flavor Interactions", *Proceedings of the 3rd International Symposium "Young People and the Multidisciplinary Research"*, 8-9 nov 2001, 274-281, ISBN 973-99425-9-8.
13. Hădărugă, D.I.; Hădărugă, N.G.; Mureșan, S.; Dăescu, C.; Barbărasă, I., "GC-Olfactometry: An Useful Tool for Flavor Analysis", *IInd International Conference on Ecological Chemistry*, 11-12 octombrie 2002, Chișinău, Republica Moldova, pp 22-29, ISBN 9975-67-310-4.

14. **Hădărugă, N.G.**; Hădărugă, D.I.; Păunescu, V.; Tatu, C.; Ordodi, V.L.; Bandur, G.; Lupea, A.X., "Multivariate Analysis in the Essential Oil/ β -Cyclodextrin Complex Class", *Proceedings of the 8th International Conference ISIRR*, Szeged, Hungary, April 19-21, 2005, *accepted for presentation*.
15. **Hădărugă, N.G.**; Hădărugă, D.I.; Lupea, A.X.; Păunescu, V.; Tatu, C.; Ordodi, L.; Bandur, G., "Bioactive Nanoparticles (7). Essential Oil from Apiaceae and Pinaceae Family Plants/ β -Cyclodextrin Supramolecular Systems", *Revista de Chimie* 2005, *in press*.
16. **Hădărugă, N.G.**; Hădărugă, D.I.; Păunescu, V.; Tatu, C.; Ordodi, V.L.; Bandur, G.; Lupea, A.X., "Bioactive Nanoparticles (6). Thermal Stability of the Linoleic Acid/ α - and β -Cyclodextrin Complexes", *Food Chemistry* 2004, *submitted for publication*.
17. **Hădărugă, N.G.**; Hădărugă, D.I.; Bandur, G.; Lupea, A.X.; Păunescu, V.; Tatu, C.; Ordodi, L., "Thermal Analysis and Molecular Modeling of the Fatty Acid/ β -Cyclodextrin Supramolecular Systems", *Journal of Thermal Analysis & Calorimetry* 2005, *submitted for publication*.

Contracte de cercetare:

1. "Relații structură – proprietăți în clasa odoranților", CNCSIS, Ministerul Educației Naționale, Nr. contract: 35034, nr. temă: 20-1, cod CNCSIS: 37, valoare totală: 15 milioane lei, 1999-2000, membru al echipei de cercetare.
2. "Odoranți și Aromatizanți – Modelare Moleculară, Analiză Multivariată, QSAR", (*Faza 3.1 - Documentare, Construcție Bancă de Date, analiza Etaloanelor; Faza 3.2 - Modelare Moleculară, Analiză Conformațională și Calculul Parametrilor Structurali*) CNCSIS, Ministerul Educației și Cercetării, Nr. contract 33501, nr. temă: 3-1b, cod CNCSIS: 30, valoare totală: 30 milioane lei, 2002, membru al echipei de cercetare.
3. "Odoranți și Aromatizanți – Modelare Moleculară, Analiză Multivariată, QSAR", (*Faza 14 unică - Analiza compușilor și sistemelor odorante-aromatizante și Calculul parametrilor specifici. Clasificare și QSAR pentru sisteme odorante-aromatizante și Evaluarea situsurilor receptor*) CNCSIS, Ministerul Educației, Cercetării și Tineretului, Nr. contract 33550, nr. temă: 14-1b, cod CNCSIS: 2, valoare totală: 33.3 milioane lei, 2003, membru al echipei de cercetare.
4. "Nanocapsule Bioactive: Obținerea, Caracterizarea și Modelarea Sistemelor Ciclodextrine-Biomoleculare", (*Faza unică - Documentare, Analiza Sistemelor Bioactive și Obținerea Nanocapsulelor*) CNCSIS, Ministerul Educației și Cercetării, Nr. contract 32940/22.06.2004, nr. temă: 3-1b, cod CNCSIS: 25, valoare totală: 55 milioane lei + 11 milioane lei (adițional), 2004, membru al echipei de cercetare.
5. "Studii privind Stabilitatea unor Constituenți din Extracte Naturale prin Nanoîncapsulare", (*Faza unică: Studiul literaturii de specialitate în domeniul separării, purificării, analizei, stabilizării și eliberării controlate a constituenților naturali cu activitate biologică. Separarea și purificarea constituenților naturali cu importanță alimentară și analiza fizico-chimică a constituenților separați*), CNCSIS, Ministerul Educației și Cercetării, Nr. contract 33370/29.06.2004, nr. temă 10-1b, cod CNCSIS: 48, valoare totală: 50 milioane lei + 7 milioane lei (adițional), 2004, membru al echipei de cercetare.
6. "Studii Referitoare la Comportarea unor Cultivare de Legume în Condițiile Câmpiei Banatului, cu Emiterea de Recomandări și Documentația Tehnică pentru Introducerea în Cultură pe Scară Largă", SC GENAGRICOLA ROMANIA SRL, Sînicolau Mare, Timiș, Nr. contract 1/26.05.2004, valoare totală: 1500 €, membru al echipei de cercetare.

ALTE LUCRĂRI PUBLICATE ÎN DOMENIUL TEZEI DE DOCTORAT ȘI ÎN ALTE DOMENII ADIACENTE

Cărți:

1. Jianu, I.; Hădărugă, N.G., *Extracte naturale. Arome și compuși aromatizanti*, Ed. Eurostampa, Timișoara, 2000, I.S.B.N. 973-8027-40-3.
2. Jianu, I.; Ciobanu, C.; Trașcă, T.; Hădărugă, N.G.; Jianu, C.; Dogaru, D., *Concepte, sisteme și tehnici de analiză și control a produselor agroalimentare*, Ed. Eurostampa, Timișoara, 2000, I.S.B.N. 973-8027-43-8.
3. Jianu, I.; Ciobanu, C.; Hădărugă, N.G.; Șoimu, R.; Dogaru, D.; Jianu, C., *Sisteme de procesare agroalimentară*, Ed. Eurostampa, Timișoara, 2000, I.S.B.N. 973-8027-46-2.
4. Olah, M.; Mracec, Maria.; Ostopovici, Liliana; Rad, Ramona; Bora, Alina; Hădărugă, Nicoleta G.; Olah, Ionela; Banda, Magdalena; Simon, Z.; Mracec, M.; Oprea, T.I., "WOMBAT: World of Molecular Bioactivity". In: Oprea, T.I. (ed.), *Cheminformatics in Drug Discovery*, Wiley-VCH, New York, 2004, pp. 223-239.

Lucrări publicate și/sau comunicate:

1. Jianu, C.; Alexa, Ersilia; Hădărugă, Nicoleta G.; Mișcă, Corina D.; Jianu, I., "Studiul profilului cromatografic al acizilor grași izolați din uleiurile grase obținute din plante netradiționale", *Procese și tehnologii agroalimentare V*, Ed. Agroprint, Timișoara, 1999, 51-56.
2. Jianu, C.; Alexa, Ersilia; Hădărugă, Nicoleta G.; Nistor, Mariana; Jianu, I., "Studiul posibilității de valorificare a castanelor în industria fermentativă", *Procese și tehnologii agroalimentare V*, Ed. Agroprint, Timișoara, 1999, 40-45.
3. Alexa, Ersilia; Nistor, Mariana; Hădărugă, Nicoleta G.; Jianu, I.; Drugă, Marioara; Cioban, Camelia, "Possibilities of detecting the adulteration of vegetables oils", *Simpozion SIPA, Opportunities of Integrated Systems for Agrofood Production, 1999*.
4. Mișcă, Corina D.; Hădărugă, Nicoleta G.; Jianu, C.; Mișcă, C.B.; Biron, Ramona; Schiop, D., "Microbiological analysis of *Aristolochia Clematitidis* L. extract", *Acta Phytotherapica Romanica*, anul VI, nr. 1-2, Simpozionul de „Plante Medicinale. Realizări și Perspective”, ediția a VII-a, Piatra Neamț, 2000, 93.
5. Hădărugă, Nicoleta G.; Alexa, Ersilia; Jianu, C.; Jianu, I., "TLC of tensioactive reagents used as cleaners in the food industry", *Proceedings of the International Symposium on Planar Separations*, Lillafüred, Hungary, 26-26 June 2000, 205-217.
6. Hădărugă, D.I.; Hădărugă, Nicoleta G.; Mureșan, S.; Simon, Z., "Structure – Property Relationships in Maillard Reaction Class. Interactions and Classifications in Hydrolysed β -Lactoglobulin – Glucose/Ribose Systems (I)", *Ann. West Univ. (Timișoara)* 2001, 10(2), 821-832.
7. Mișcă, Corina D.; Hădărugă, Nicoleta G.; Jianu, I., "Efectele uleiului volatil de piper asupra unor microorganisme", *Zilele Academice Timișene*, ed. a VII-a, Timișoara, 25-27 mai 2001, 150-154.
8. Hădărugă, Nicoleta G.; Vladu, Elena; Jianu, I.; Gergen, I., "The Study of *Surimi* and Other Fish Products Falsification", *Zilele Academice Timișene*, ed. a VII-a, Timișoara, 25-27 mai 2001, 169-172.
9. Hădărugă, Nicoleta G.; Mișcă, Corina D.; Drugă, Marioara; Hădărugă, D.I., "Sensory Evaluation for Yoghurt Products and Multivariate Analysis of the Data", *Proceedings of the 3rd International Symposium "Young People and the Multidisciplinary Research"*, Timișoara, 8-9 nov 2001, 203-208.
10. Drugă, Marioara; Mișcă, Corina D.; Hădărugă, Nicoleta G.; Back, Gh.; Drugă, M., "Microbiological Quality of Fish That Are Sale in Timișoara", *Proceedings of the 3rd International Symposium "Young People and the Multidisciplinary Research"*, Timișoara, 8-9 nov 2001, 185-188.
11. Mișcă, Corina D.; Hădărugă, Nicoleta G.; Drugă, Marioara; Dârlea, Auruța, "Determination of Aflatoxin in the Beer with TLC", *Proceedings of the 3rd International Symposium "Young People and the Multidisciplinary Research"*, Timișoara, 8-9 nov 2001, 214-217.
12. Mișcă, Corina D.; Hădărugă, Nicoleta G.; Alexa, Ersilia; Drugă, Marioara; Mișcă, C.B., "Determination of Aflatoxins and Ochratoxin A in Wheat, Flour, Bread and Combined Feeds by TLC", *Proceedings of the 3rd International Symposium "Young People and the Multidisciplinary Research"*, Timișoara, 8-9 nov 2001, 218-223.
13. Hădărugă, Nicoleta G.; Mișcă, Corina D.; Drugă, Marioara; Jianu, I., "Separarea și analiza unei volatili de piper (*Piper nigrum* L.) și efectele lui asupra unor microorganisme", *Proceedings of the 3rd International Symposium "Young People and the Multidisciplinary Research"*, Timișoara, 8-9 nov 2001, 223-227.
14. Hădărugă, Nicoleta G.; Hădărugă, D.I., „Structure – HLB Relationships in Food Emulsifiers Class”, *Scientific Researches. Agroalimentary Processes and Technologies* 2003, 9, 192-199, ISSN 1453-1399.

15. Hădărugă, D.I.; **Hădărugă, Nicoleta G.**; Mureșan, S.; Simon, Z., "Structure – Property Relationships in Maillard Reaction Class. II. Interactions and Classifications in Hydrolyzated Casein – Glucose / Ribose Systems", *A XXVII-a Conferință Națională de Chimie*, 23-25 octombrie 2002, Călimănești – Căciulata, România, p. 18.
16. Ghiulai, M.V.; **Hădărugă, Nicoleta G.**; Hădărugă, D.I.; Jianu, I., "The Stability of the Peach Seed Concret Oil", *Proceedings of the 4th International Symposium "Young People and the Multidisciplinary Research"*, Timișoara, 10-11 nov 2002, 224-231.
17. **Hădărugă, Nicoleta G.**; Hădărugă, D.I.; Negrea, P.; Alexa, Ersilia C.; Beche, Daciana; Ciopec, Mihaela P., "The Quality of Parsley (*Petroselinum sativum* Hoffm.) from the West Side of Romania", *Proceedings of the 5th International Symposium "Young People and the Multidisciplinary Research"*, Timișoara, 6-7 nov 2003, 502-509, ISBN 973-8359-18-X.
18. Hegheș, A.; Ghiran, D.; **Hădărugă, N.G.**; Seiman, C.; Hădărugă, D.I.; Ciubotariu, D., "Quinolone Derivatives with Antibacterial Activity. A MTD Approach", *Rev. Med. Farm.* 2004, 50, 154-158.
19. Oprea, T.I.; Kappler, M.A.; Allu, T.K.; Mracec, Maria; Olah, M.; Rad, Ramona; Ostopovici, Liliana; Bora, Alina; **Hădărugă, Nicoleta G.**; Baroni, M.; Zamora, I.; Berellini, G.; Aristei, Yasmin; Cruciani, Gabrielle; Bologa, C.G.; Edwards, B.S.; Sklar, L.A.; Balakin, K.V.; Savchuk, N.; Brown, D.; Larson, R.S., "Mining Large Chemical Spaces in Lead and Drug Discovery", *Proceedings of the 15th European Symposium on Quantitative Structure-Activity Relationships & Molecular Modelling "QSAR & Molecular Modelling in Rational Design of Bioactive Molecules"*, Istanbul, Turkey, September 5-10, 2004, 6 pp., *in press*.
20. Oprea, T.I.; Olah, M.; Mracec, Maria; Rad, Ramona; Ostopovici, Ramona; Bora, Alina; **Hădărugă, Nicoleta G.**; Bologa, C.G., "Mapping Bioactivity Space for Fragment-Based Lead Discovery", *Proceedings of the 229th American Chemical Society National Meeting*, San Diego, CA, March 13-17, 2005, *accepted for presentation*.

ANEXA 1

A.1. Spectre MS din analiza nanocapsulelor acid oleic/ α - și β -ciclodextrină

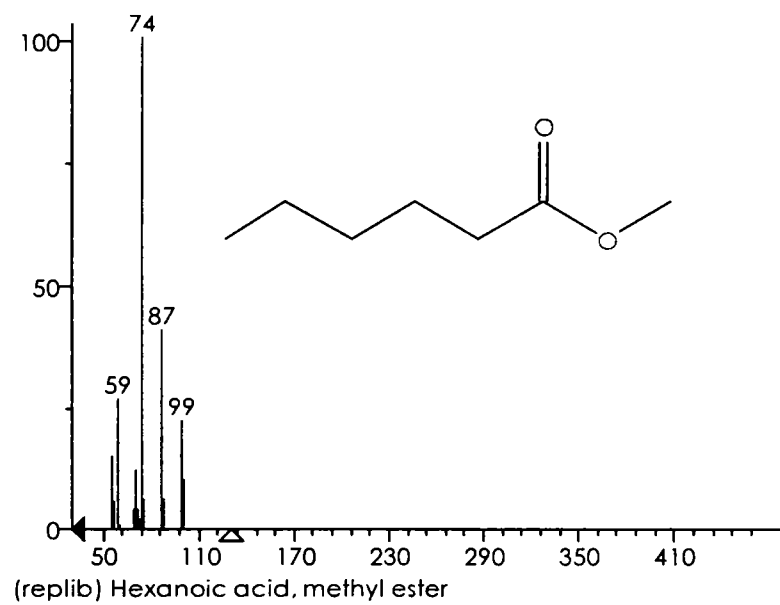
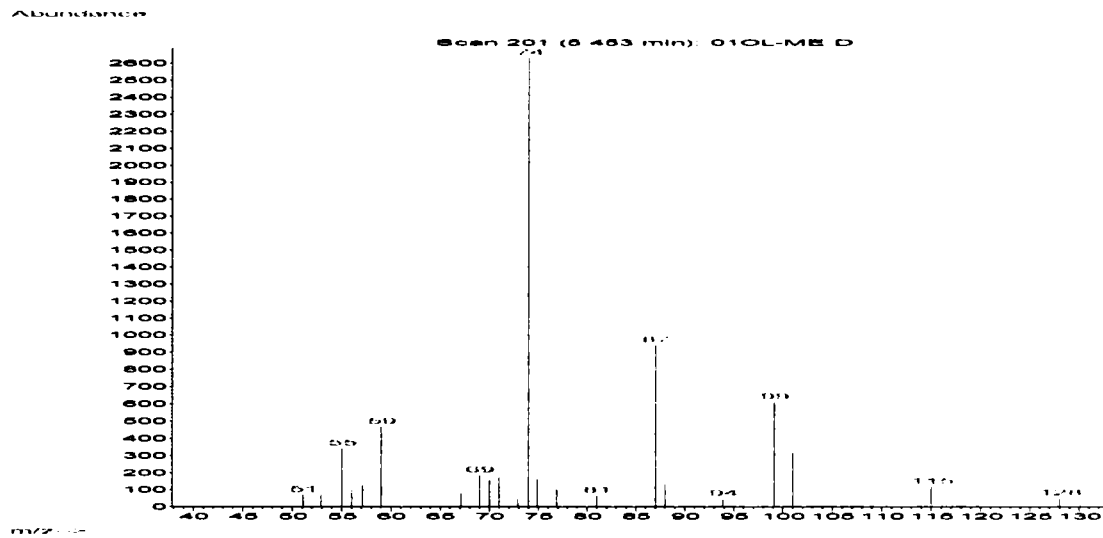


Figura A.1.1. Spectrul MS experimental (sus) și din baza de date NIST (jos) pentru acid caproic, C₆, derivatizat.

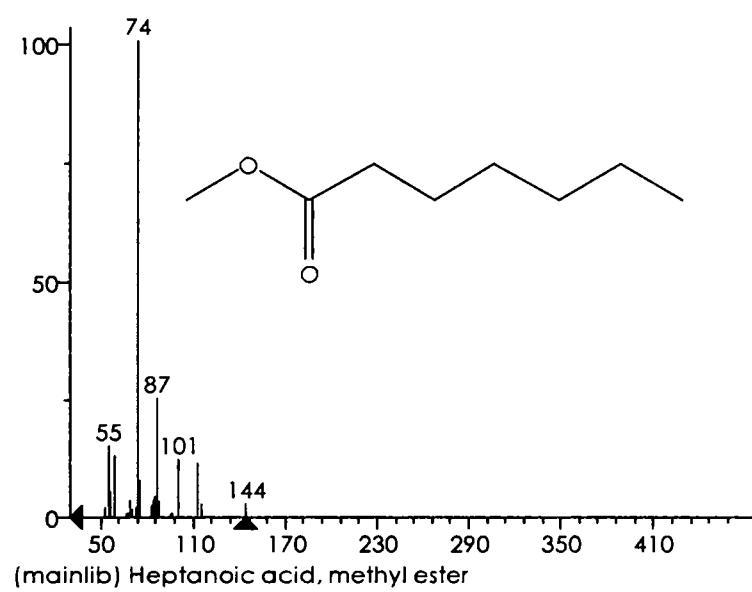
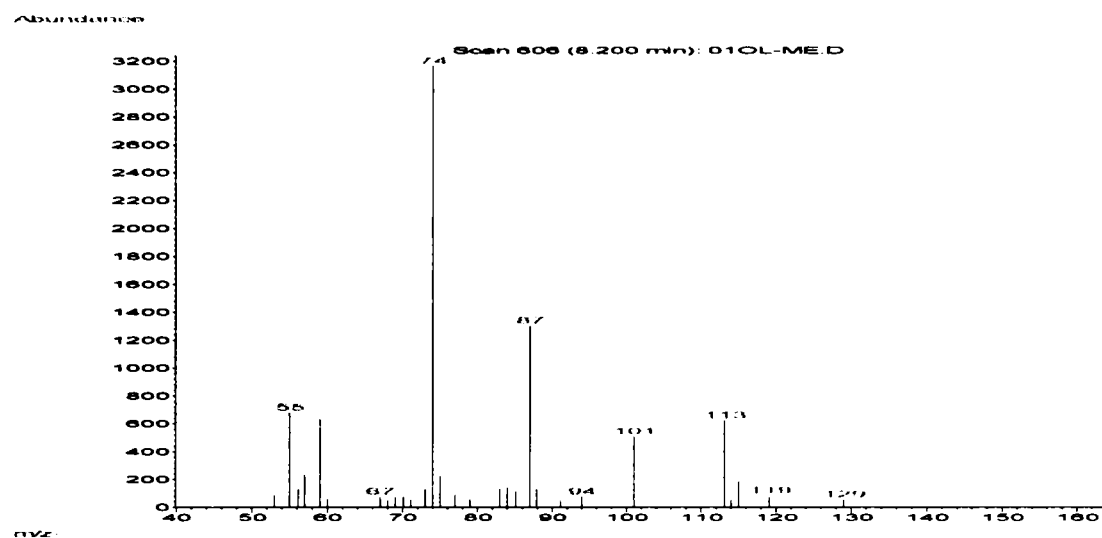


Figura A.1.2. Spectrul MS experimental (sus) și din baza de date NIST (jos) pentru acid oenantic, C₇, derivatizat.

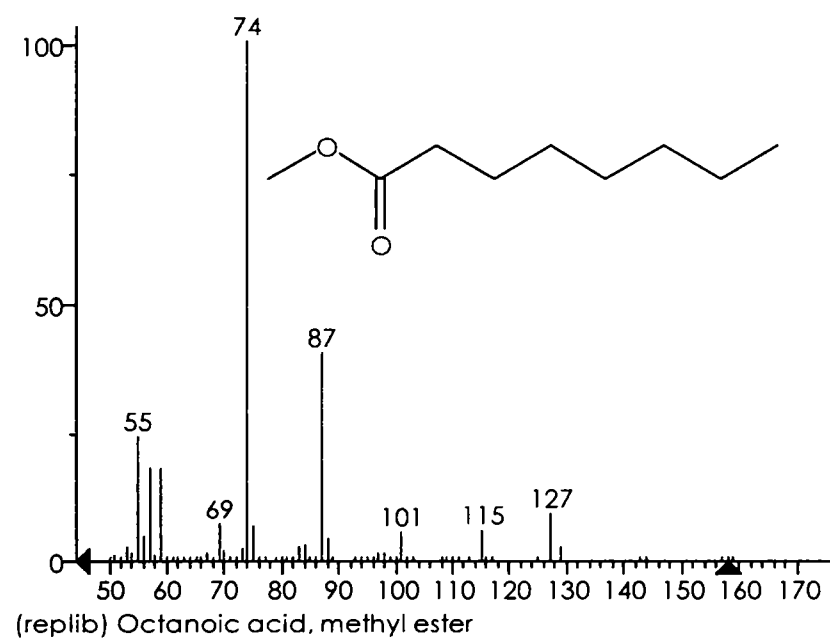
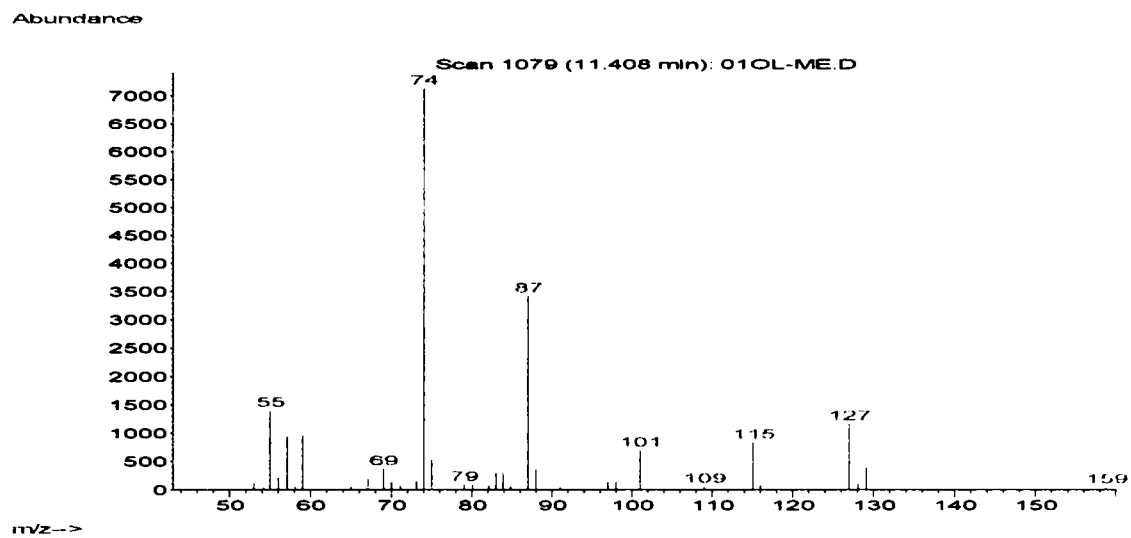


Figura A1.3. Spectrul MS experimental (sus) și din baza de date NIST (jos) pentru acid caprilic, C₈, derivatizat.

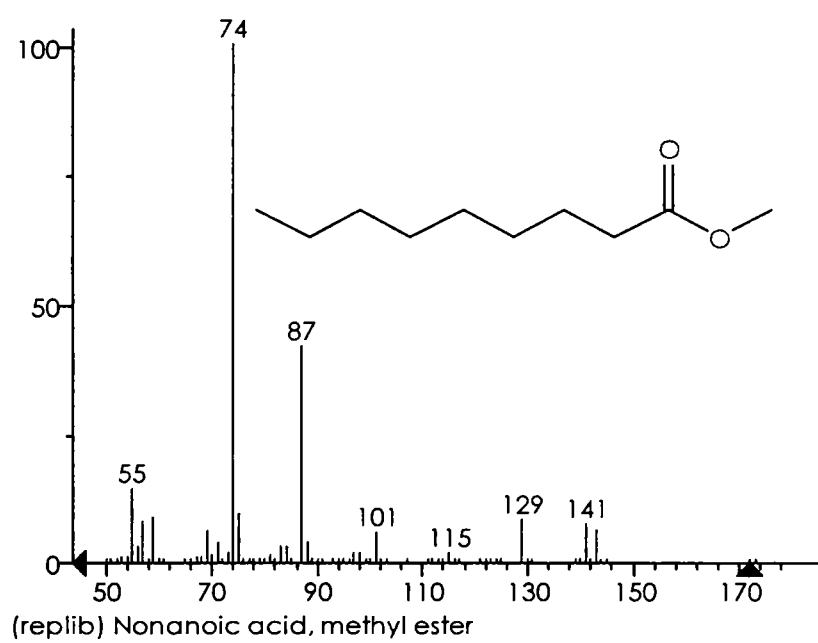
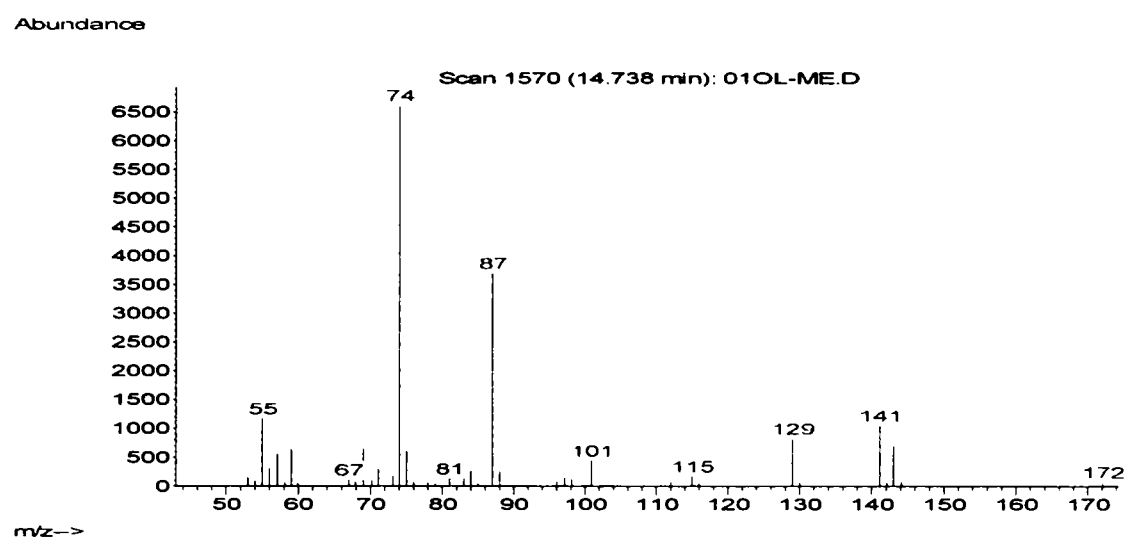


Figura A1.4. Spectrul MS experimental (sus) și din baza de date NIST (jos) pentru acid pelargonic, C₉, derivatizat.

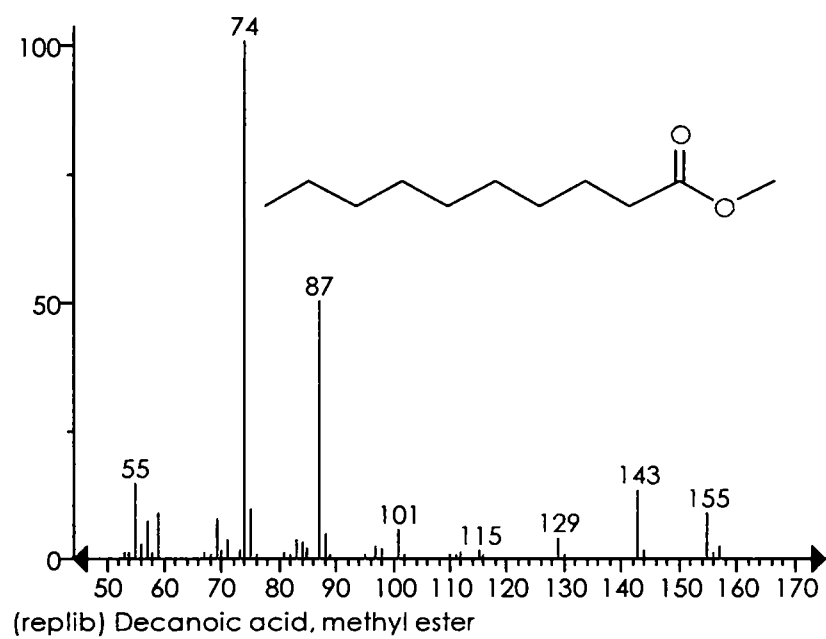
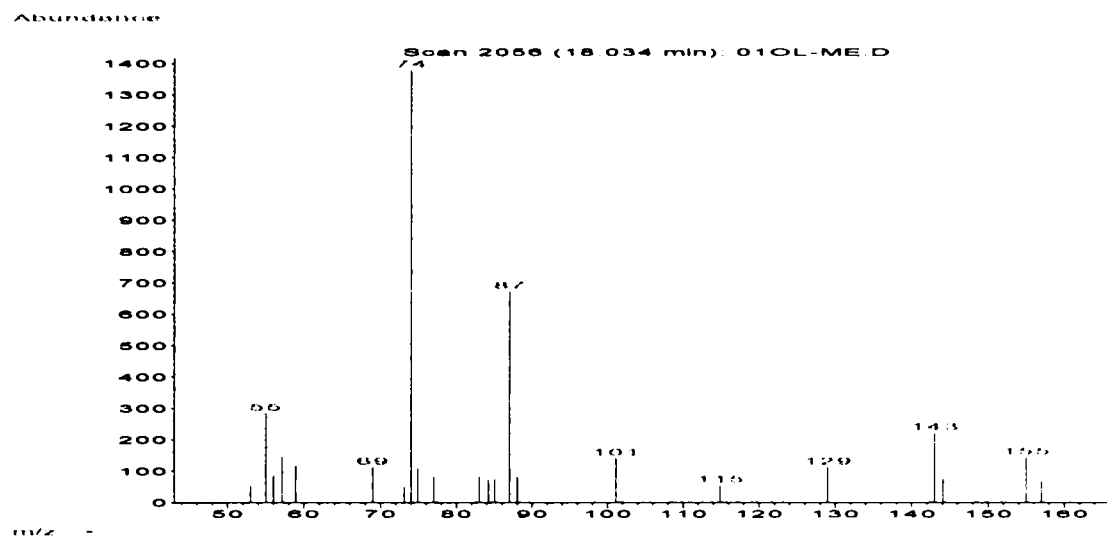


Figura A.1.5. Spectrul MS experimental (sus) și din baza de date NIST (jos) pentru acid caprinic, C₁₀, derivatizat.

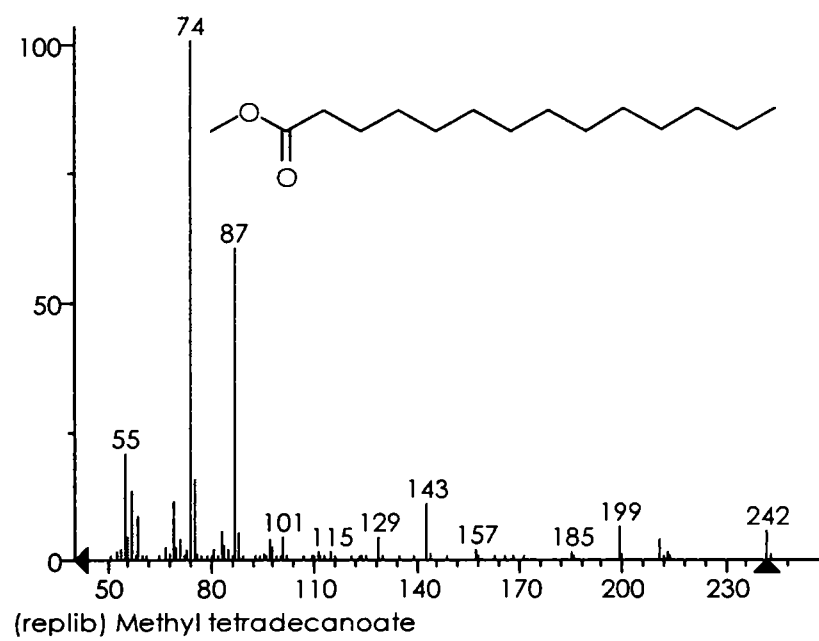
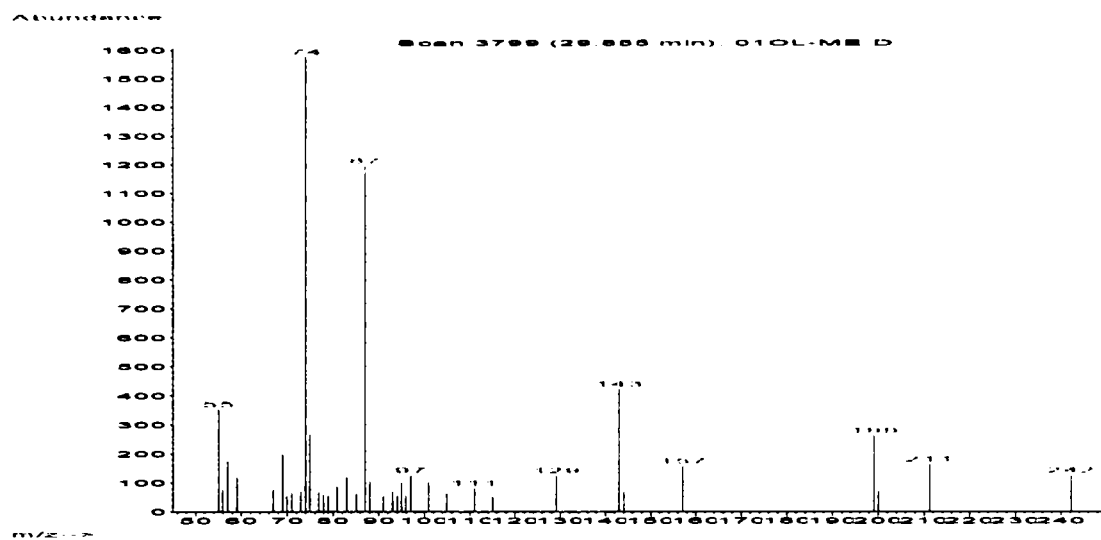


Figura A.1.6. Spectrul MS experimental (sus) și din baza de date NIST (jos) pentru acid miristic, C₁₄, derivatizat.

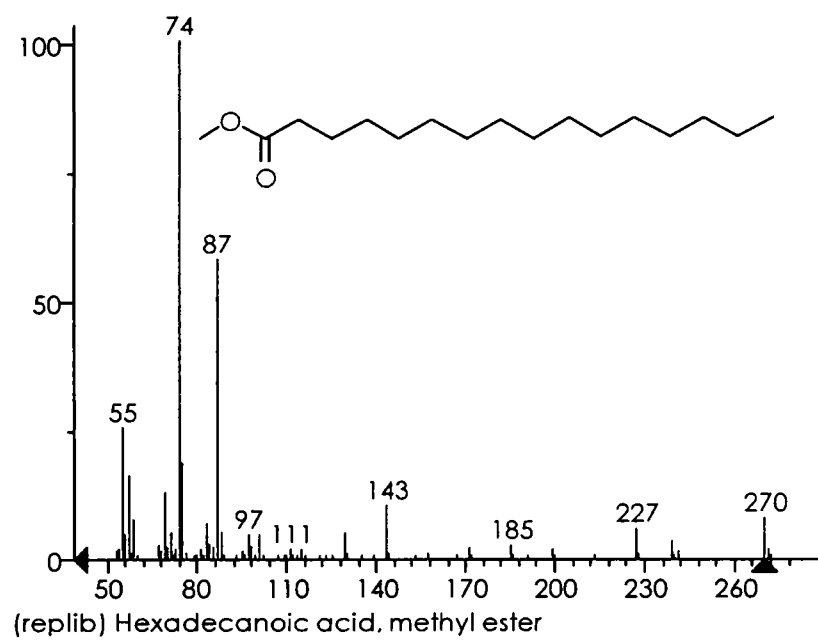
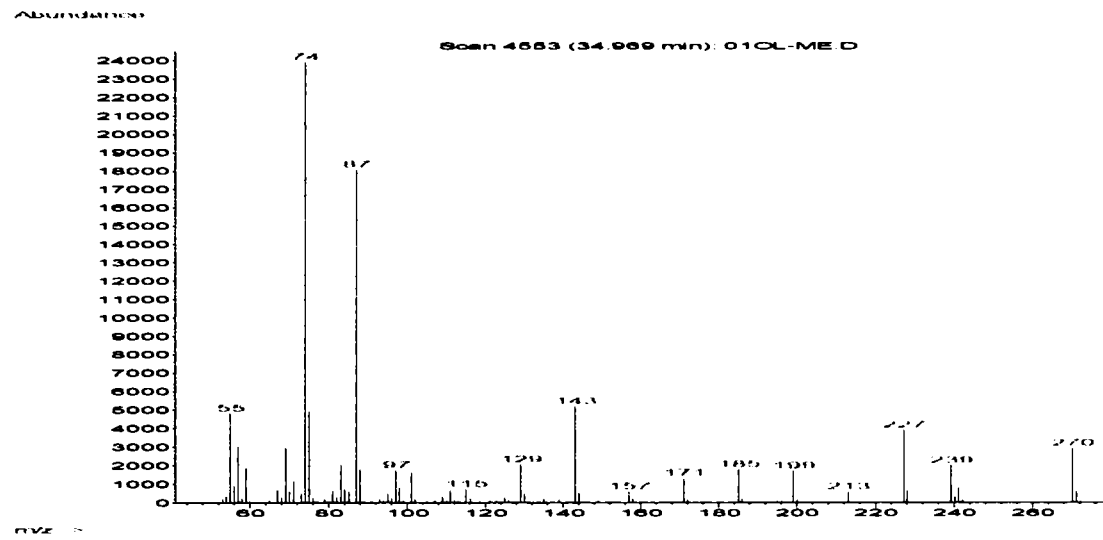


Figura A.1.8. Spectrul MS experimental (sus) și din baza de date NIST (jos) pentru acid palmitic, C₁₆, derivatizat.

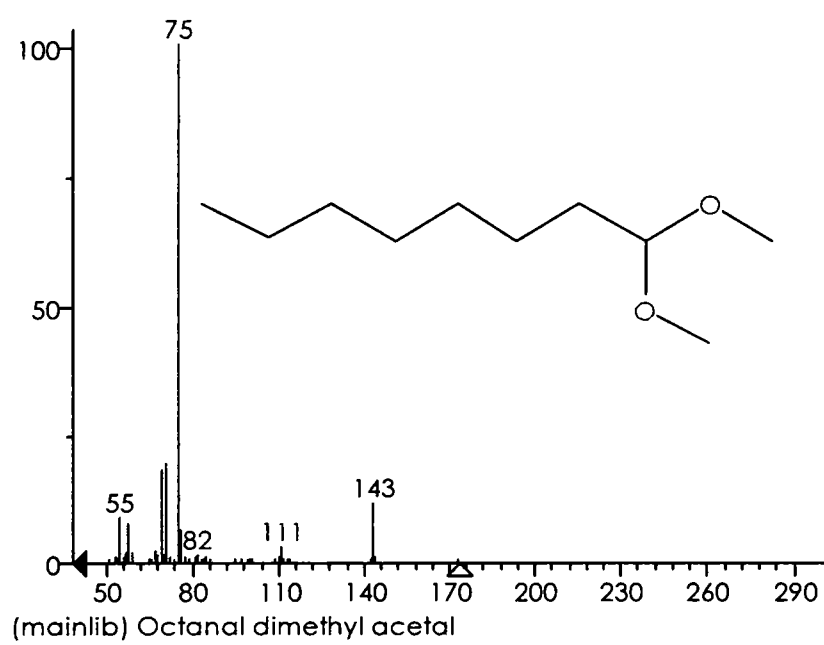
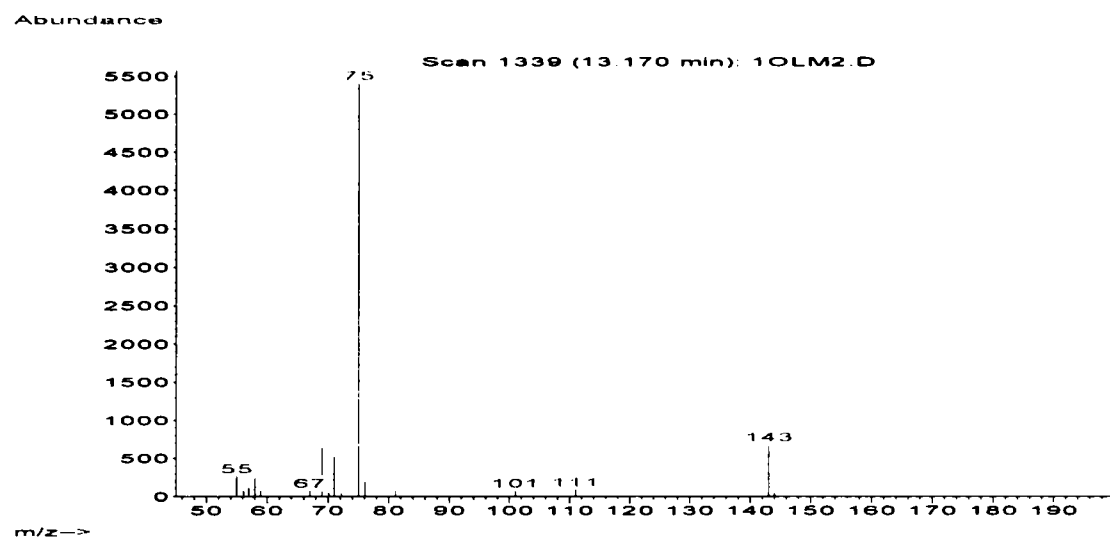


Figura A.1.9. Spectrul MS experimental (sus) și din baza de date NIST (jos) pentru octanal derivatizat.

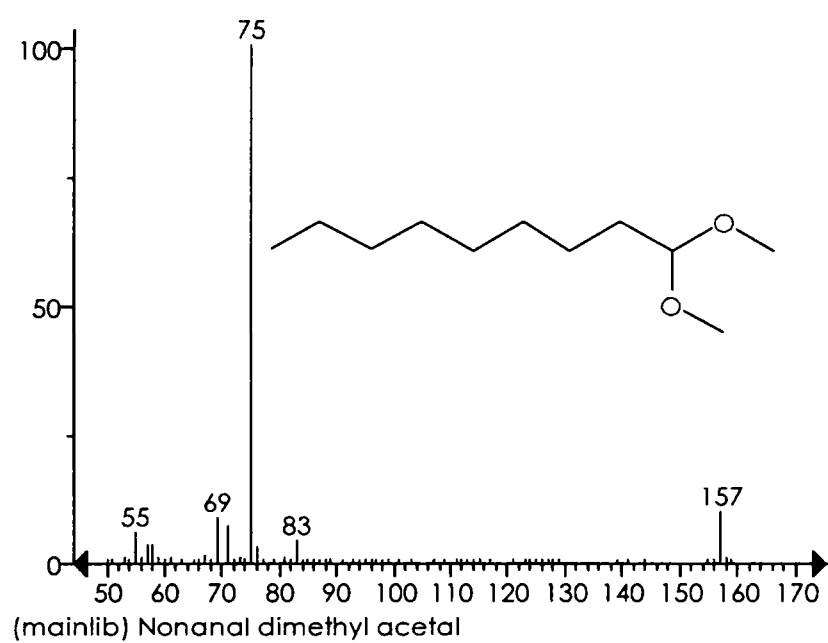
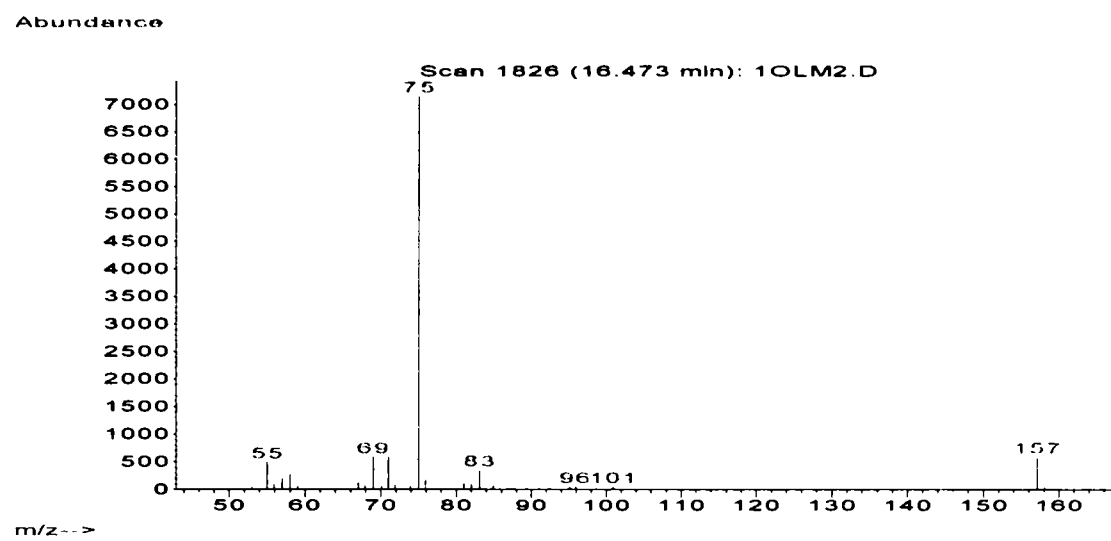


Figura A.1.10. Spectrul MS experimental (sus) și din baza de date NIST (jos) pentru nonanal derivatizat.

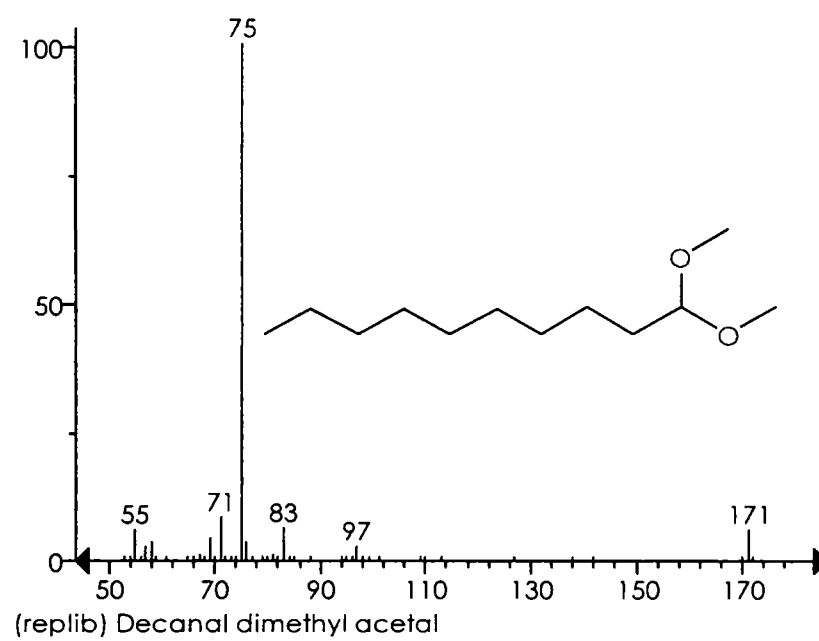
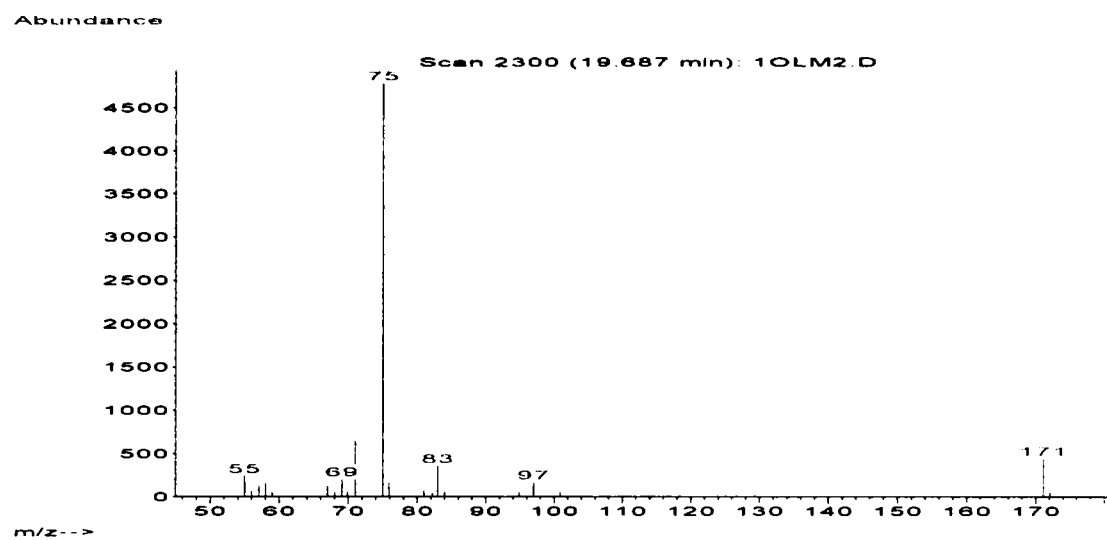


Figura A.1.11. Spectrul MS experimental (sus) și din baza de date NIST (jos) pentru decanal derivatizat.

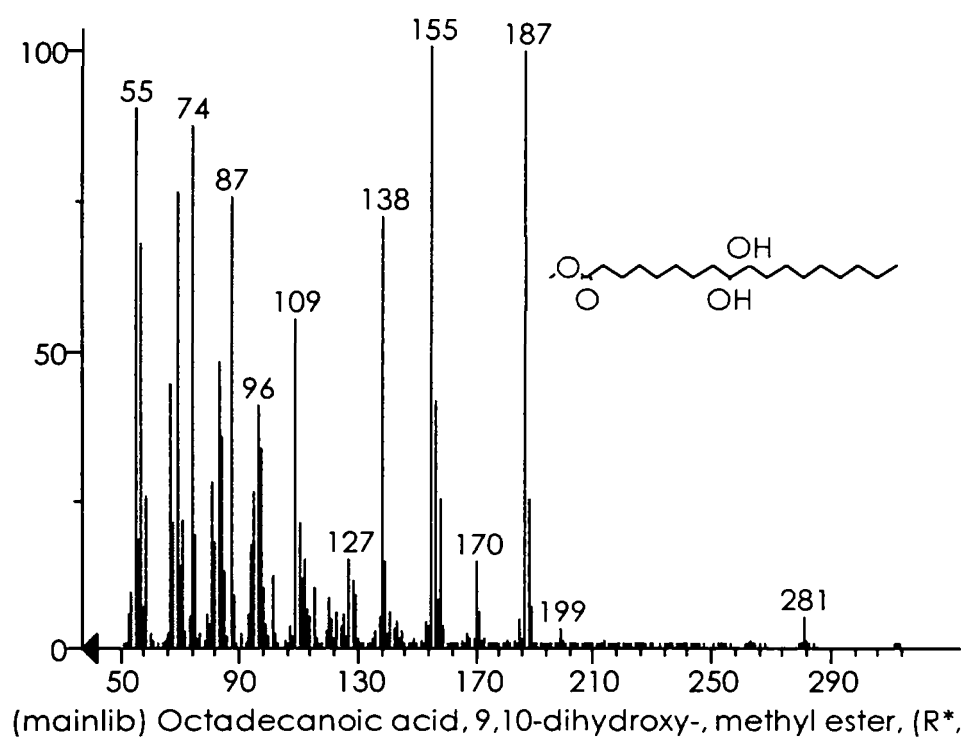
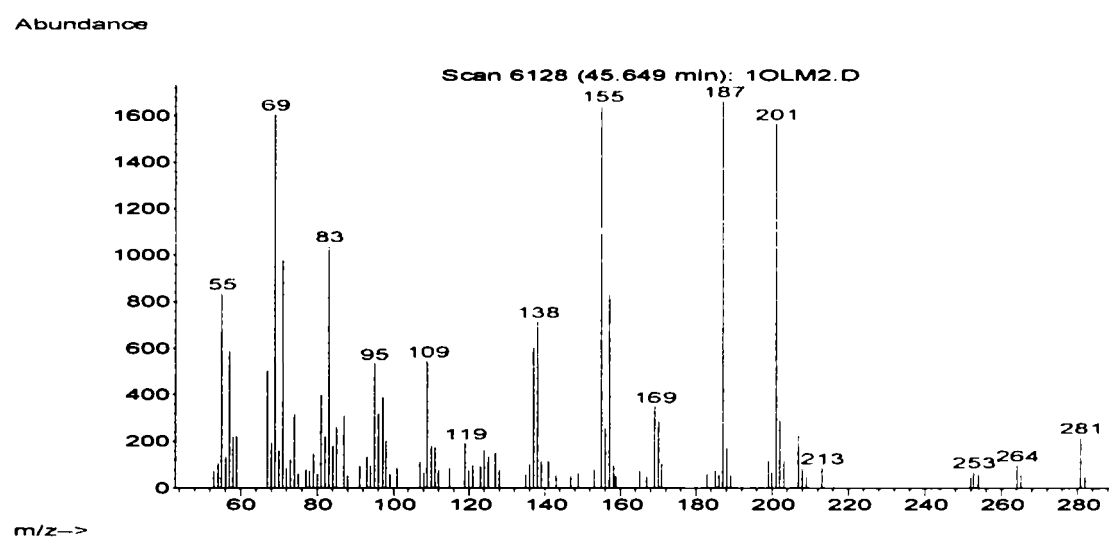


Figura A.1.12. Spectrul MS experimental (sus) și din baza de date NIST (jos) pentru derivatul 9,10-dihidroxilat al acidului oleic (ca ester metilic).

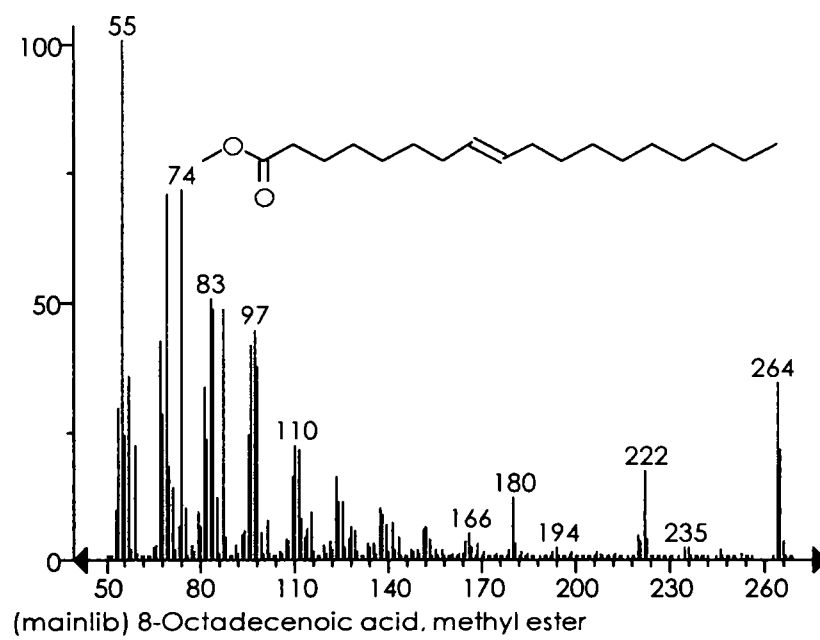
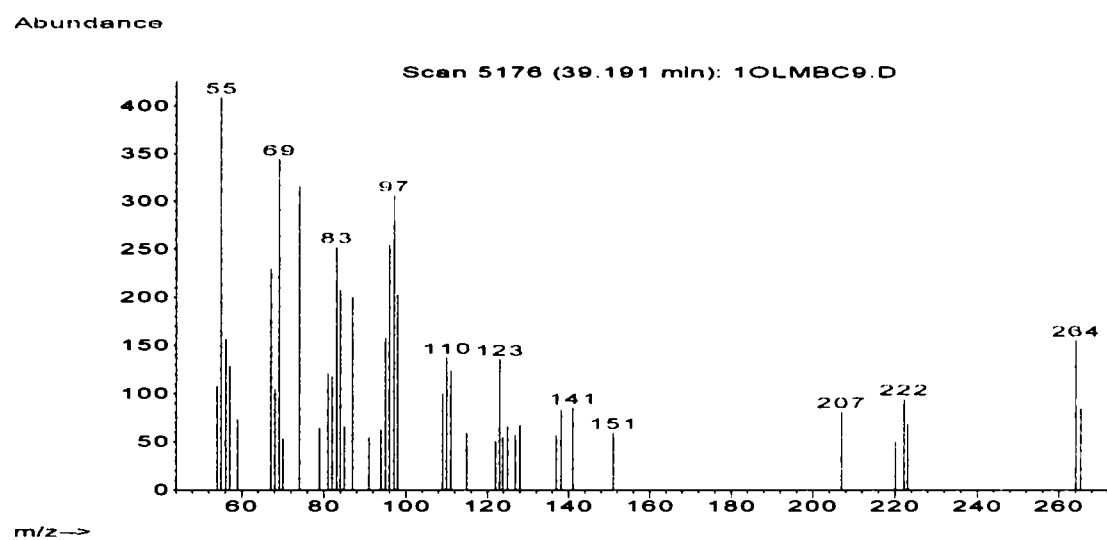


Figura A.1.13. Spectrul MS experimental (sus) și din baza de date NIST (jos) pentru acidul elaidic derivatizat.

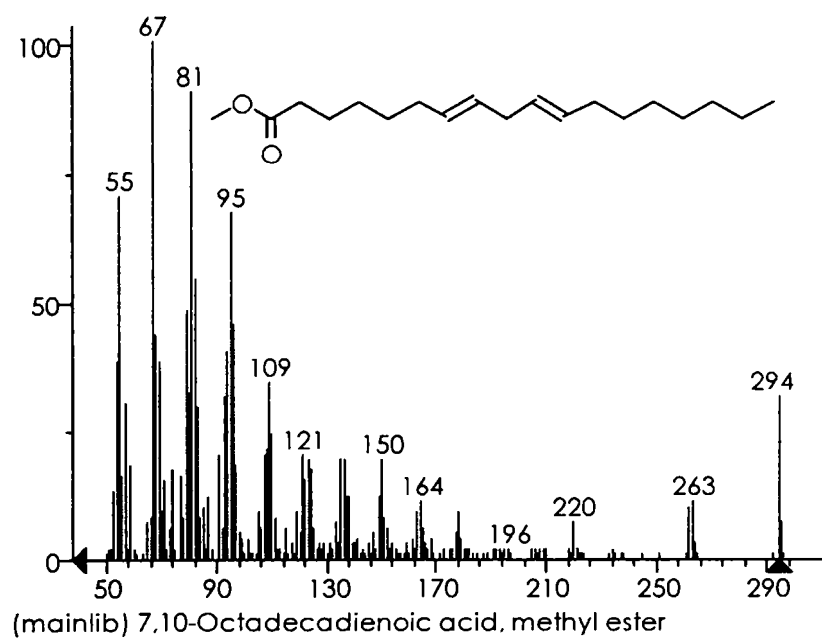
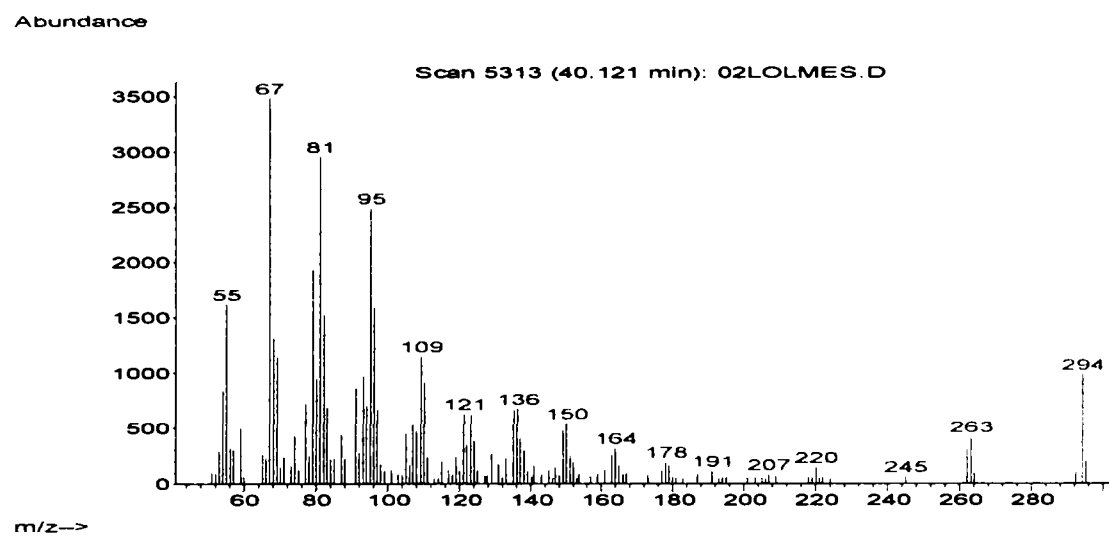


Figura A.1.14. Spectrul MS experimental (sus) și din baza de date NIST (jos) pentru acidul 7,10-octadecadienoic (izomer de poziție al acidului linoleic) derivatizat.

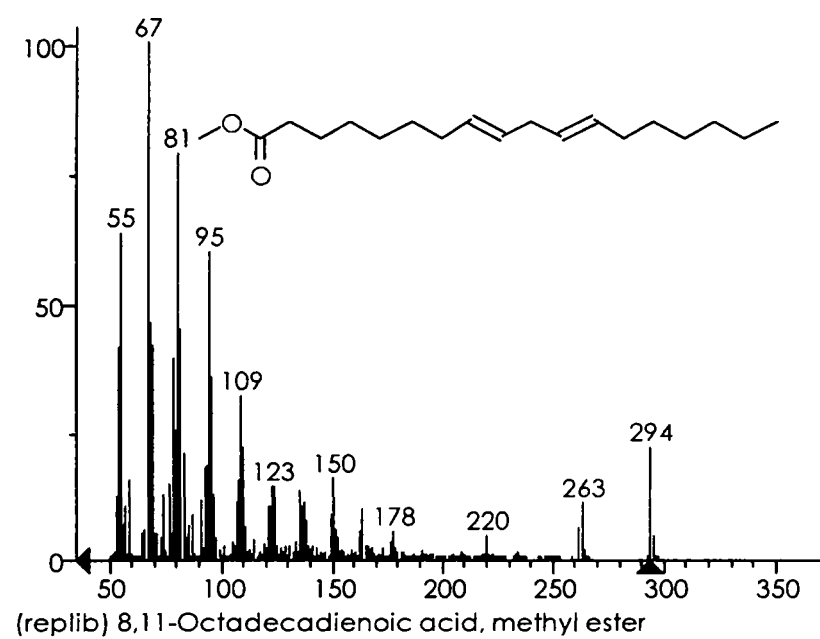
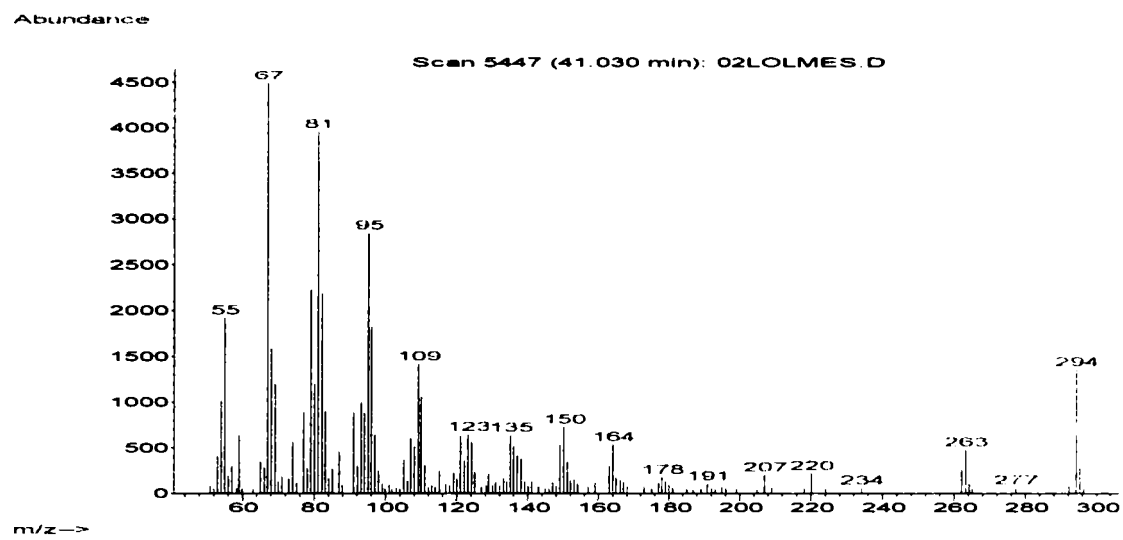


Figura A.1.15. Spectrul MS experimental (sus) și din baza de date NIST (jos) pentru acidul 8,11-octadecadienoic (izomer de poziție al acidului linoleic) derivatizat.

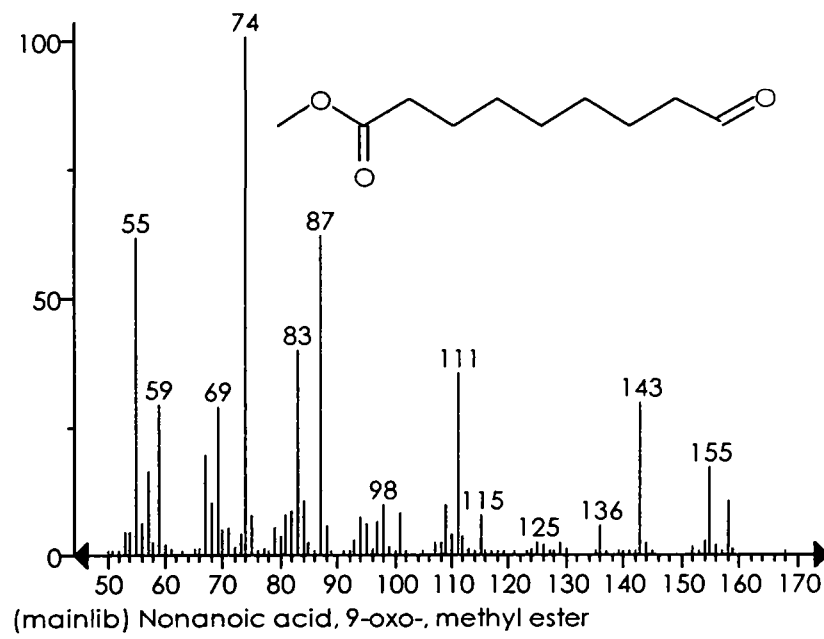
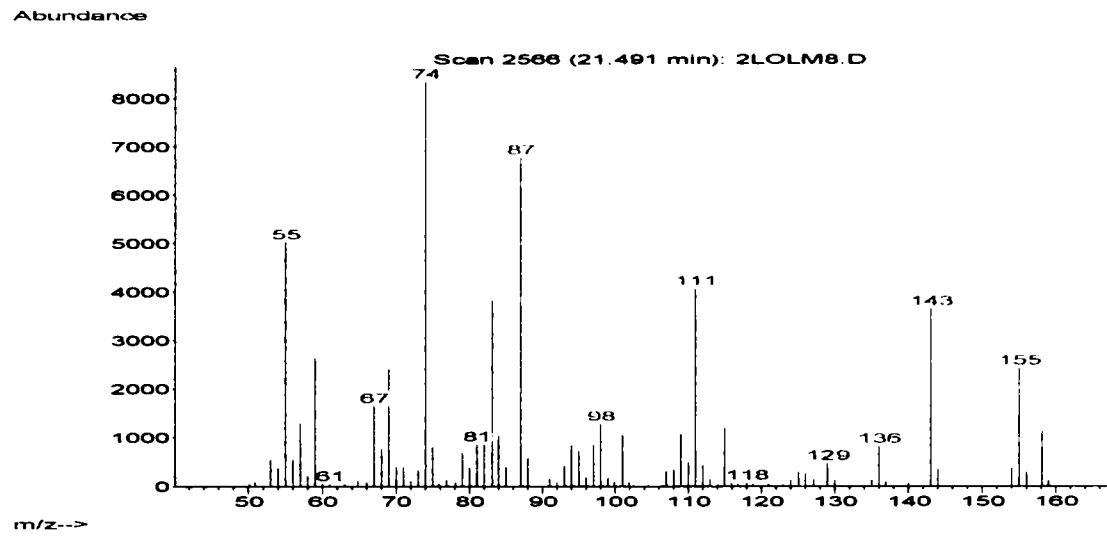


Figura A.1.16. Spectrul MS experimental (sus) și din baza de date NIST (jos) pentru acidul 9-oxononanoic derivatizat.

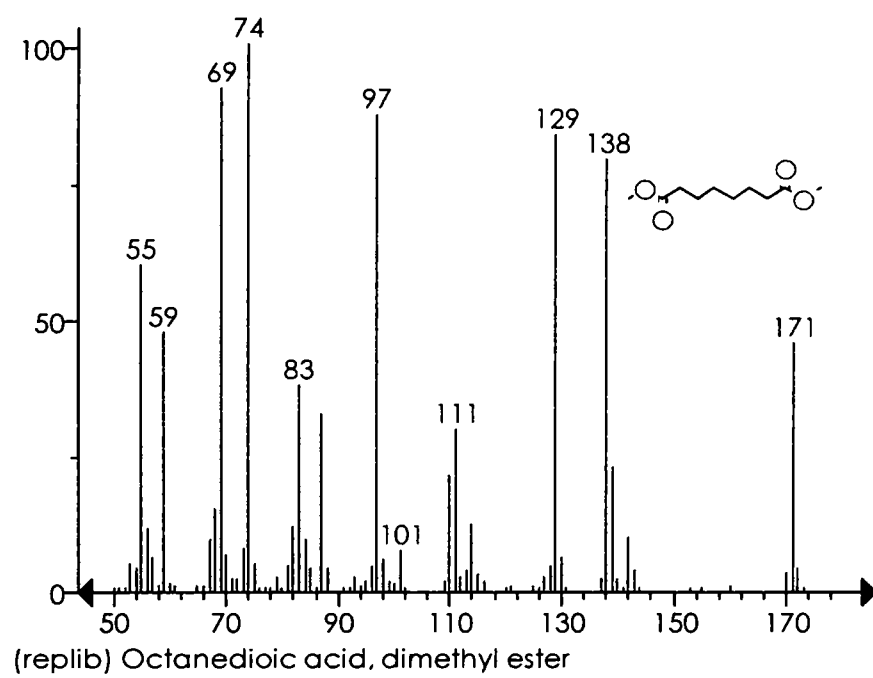
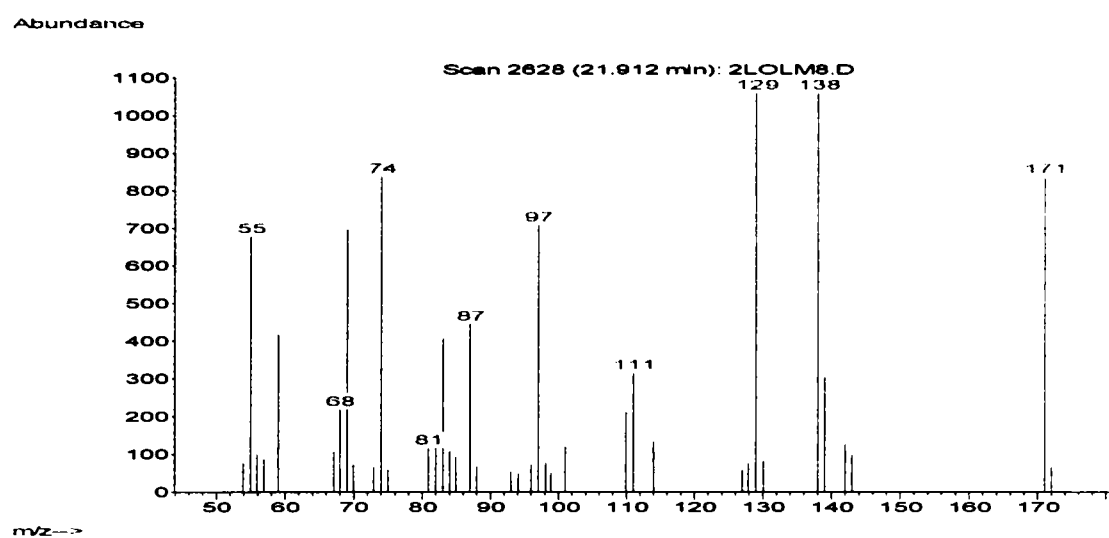


Figura A.1.17. Spectrul MS experimental (sus) și din baza de date NIST (jos) pentru acidul octandioic derivatizat.

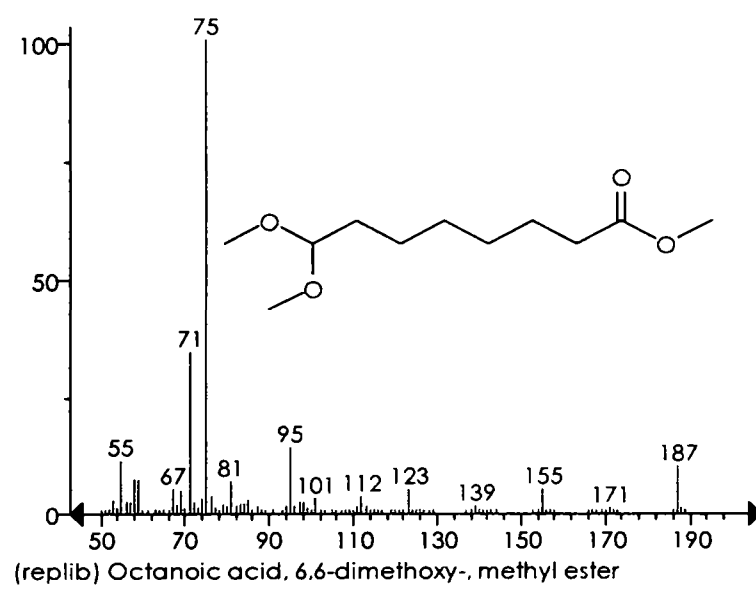
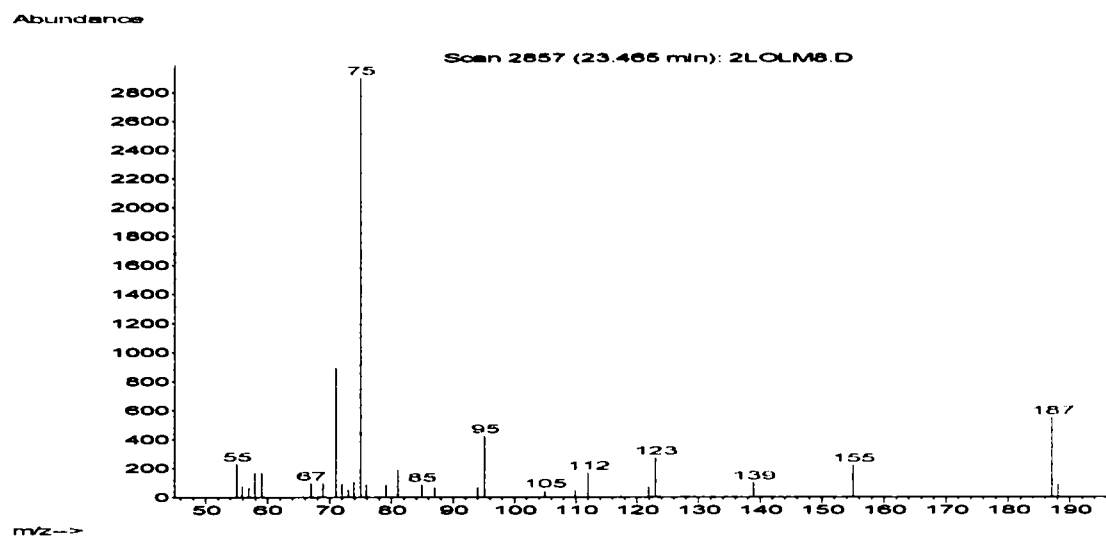


Figura A.1.18. Spectrul MS experimental (sus) și din baza de date NIST (jos) pentru acidul 6-oxooctanoic derivatizat.

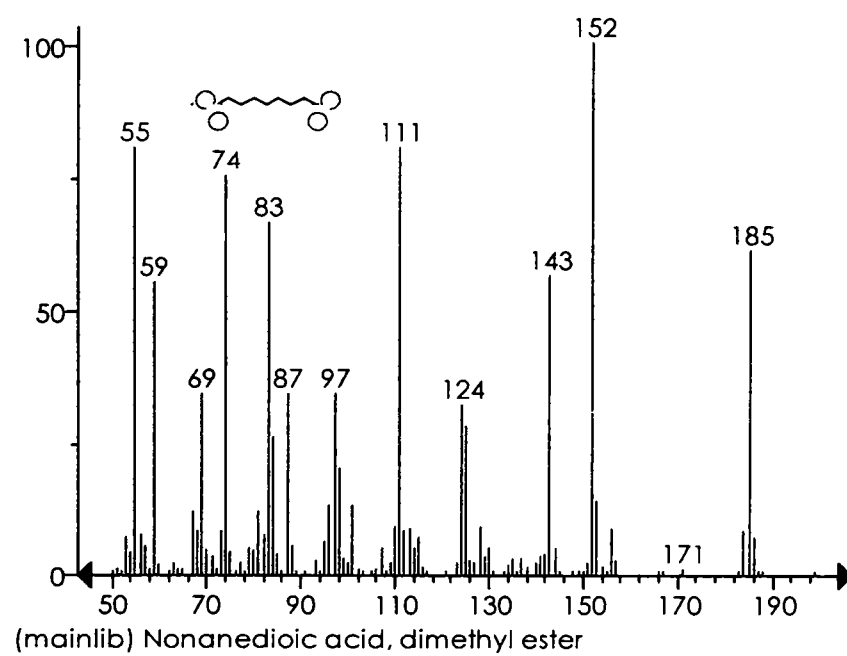
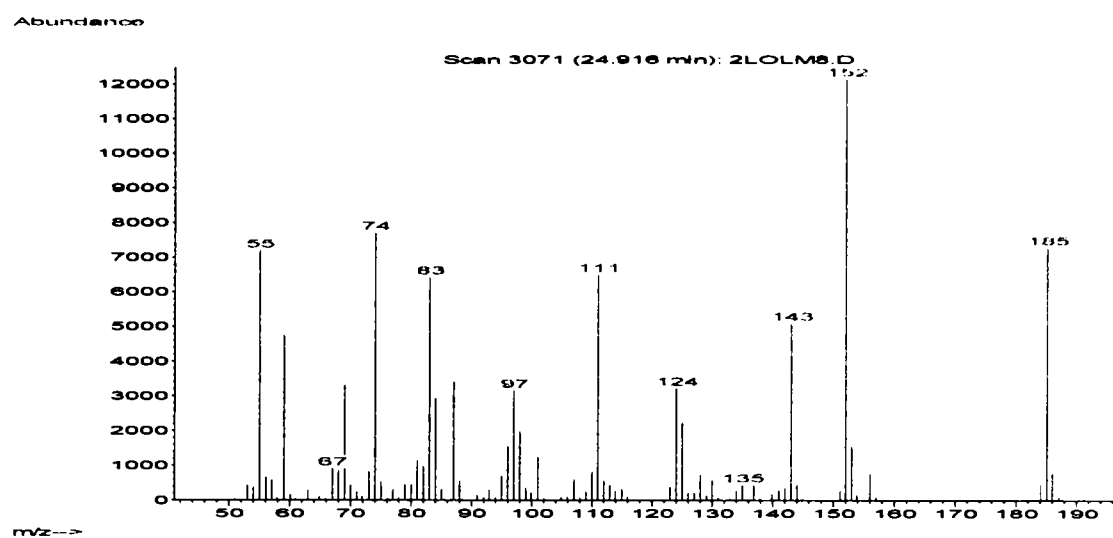


Figura A.1.19. Spectrul MS experimental (sus) și din baza de date NIST (jos) pentru acidul nonandioic derivatizat.

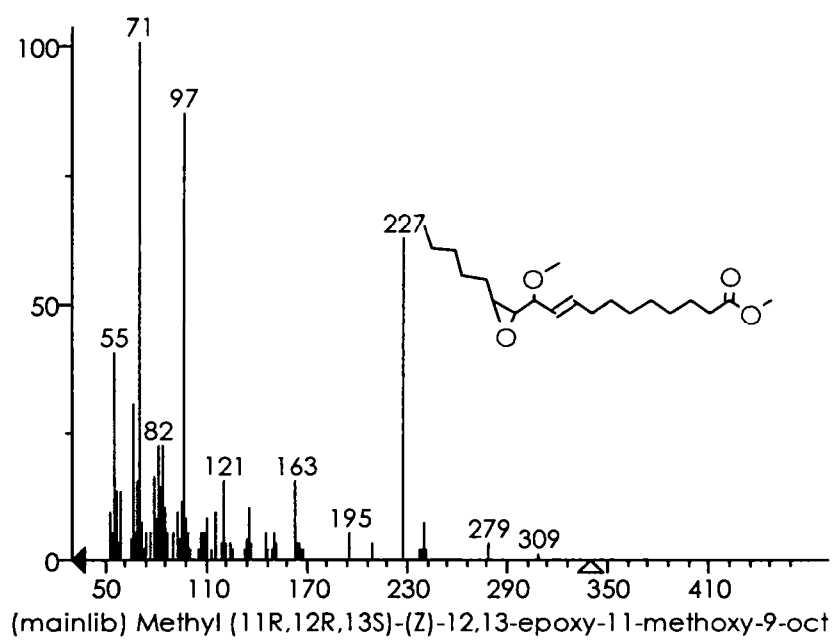
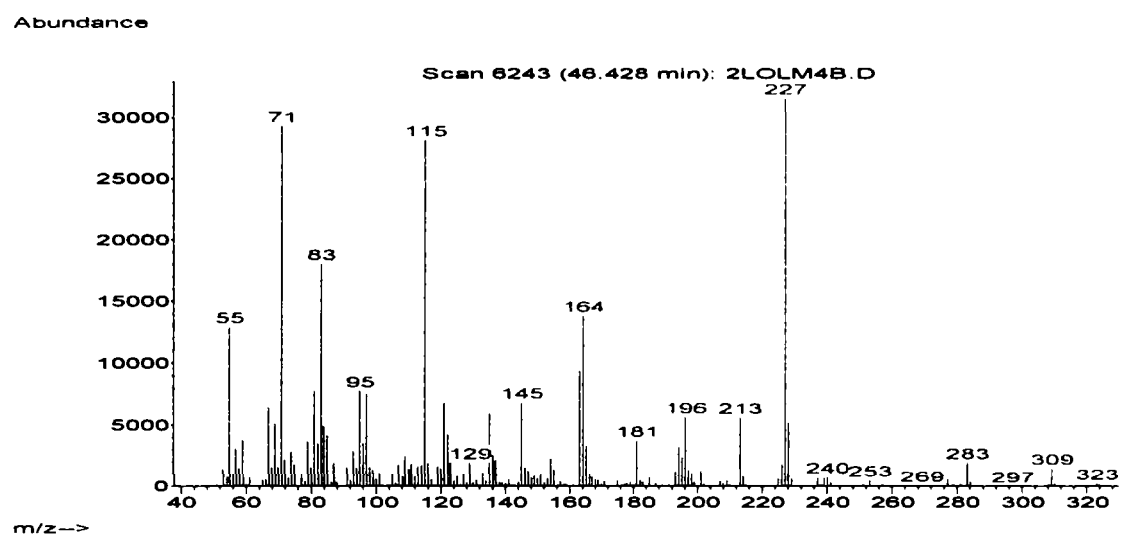


Figura A.1.20. Spectrul MS experimental (sus) și din baza de date NIST (jos) pentru derivatul 12,13-epoxidat al acidului linoleic (!).

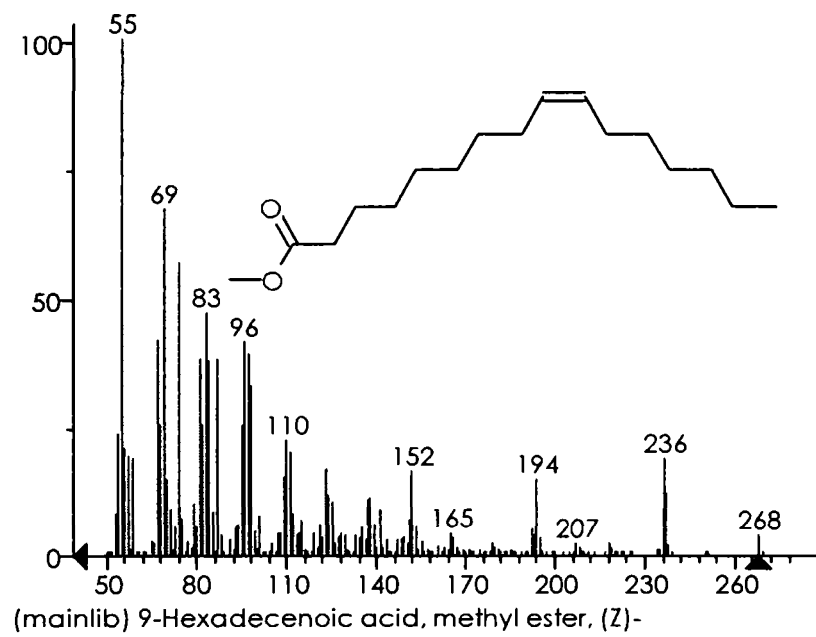
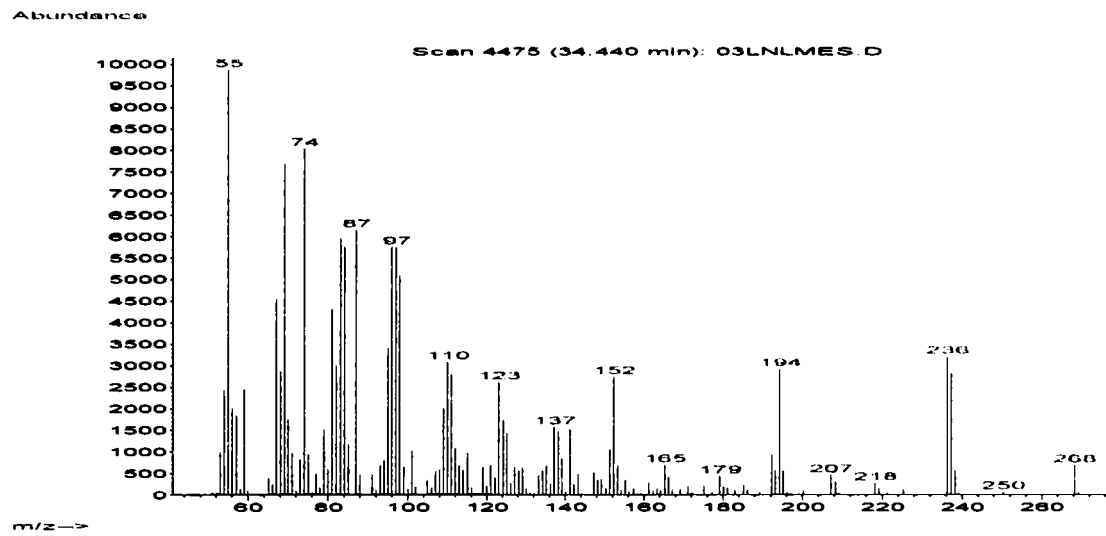


Figura A.1.21. Spectrul MS experimental (sus) și din baza de date NIST (jos) pentru acidul palmitoleic derivatizat.

ANEXA 2

A.2. Spectre MS din analiza uleiurilor volatile

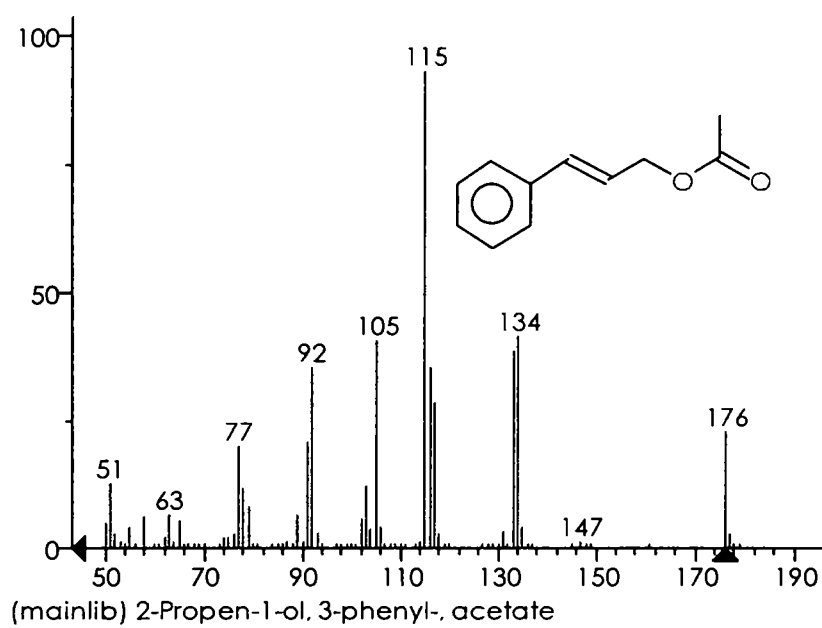
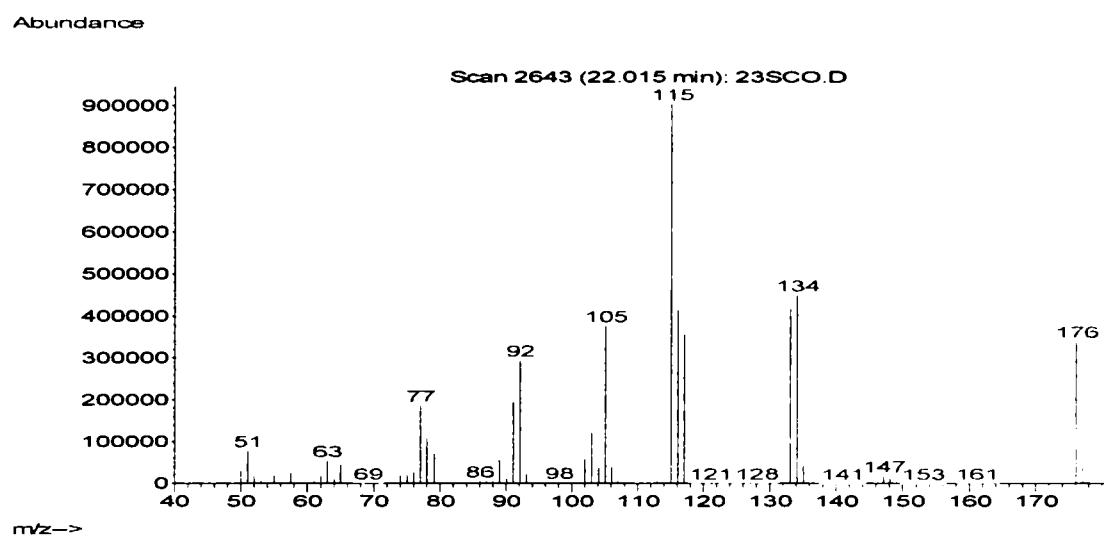


Figura A.2.1. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru acetat de cinamil.

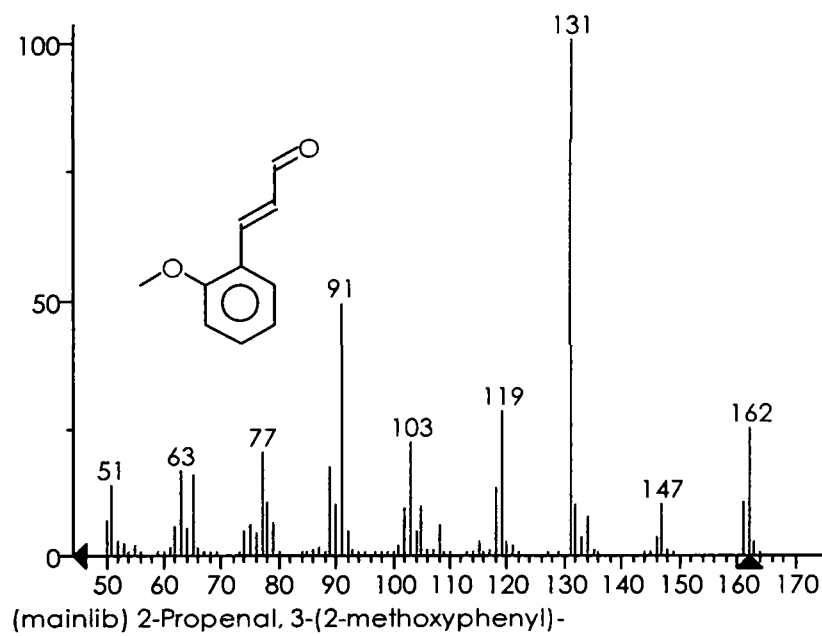
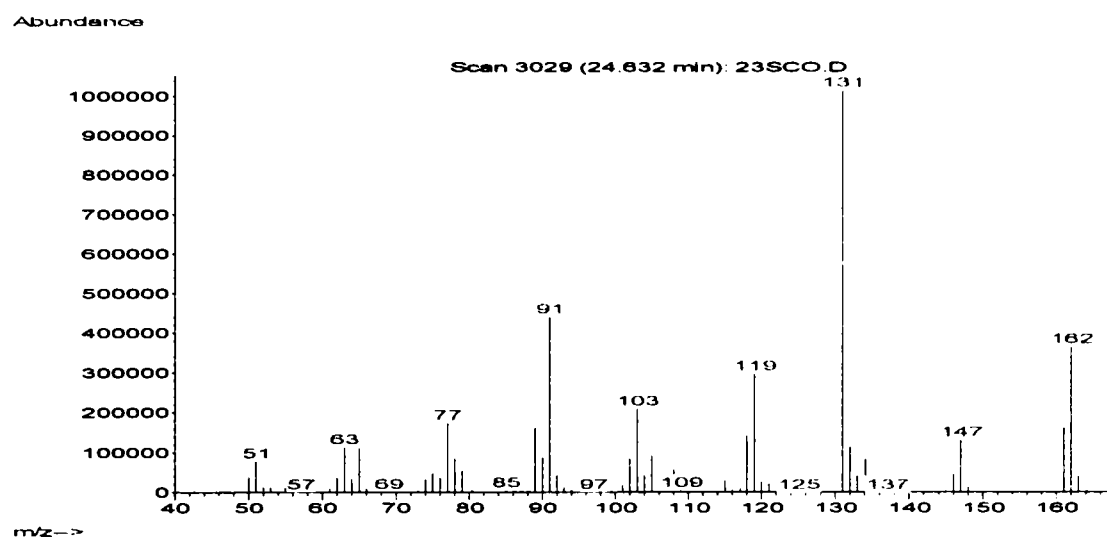


Figura A.2.2. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru *o*-metoxicinamaldehydă.

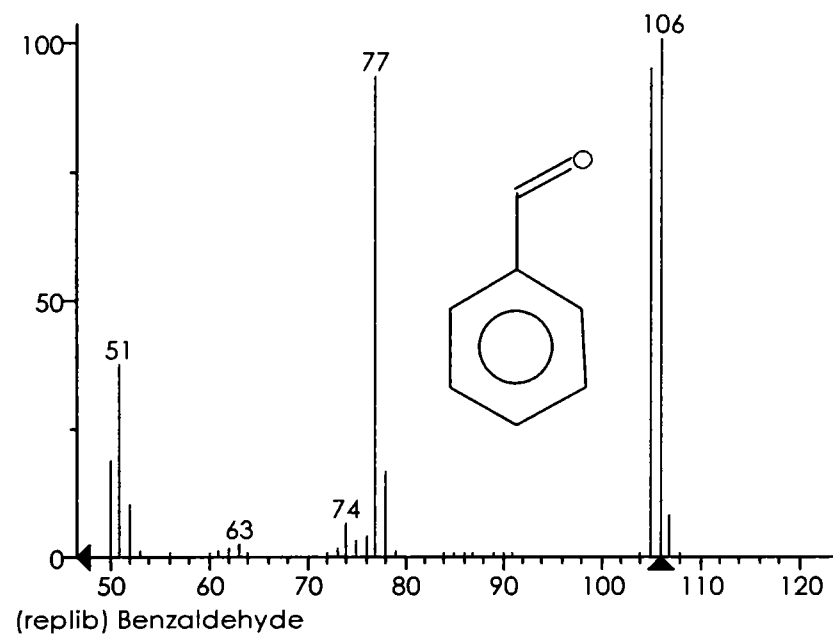
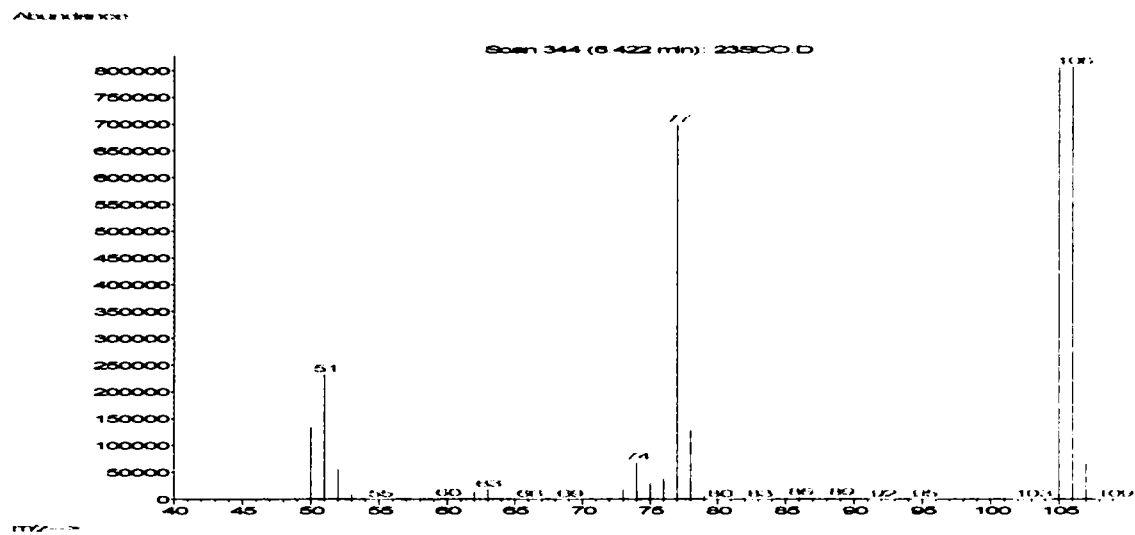


Figura A.2.3. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru benzaldehidă.

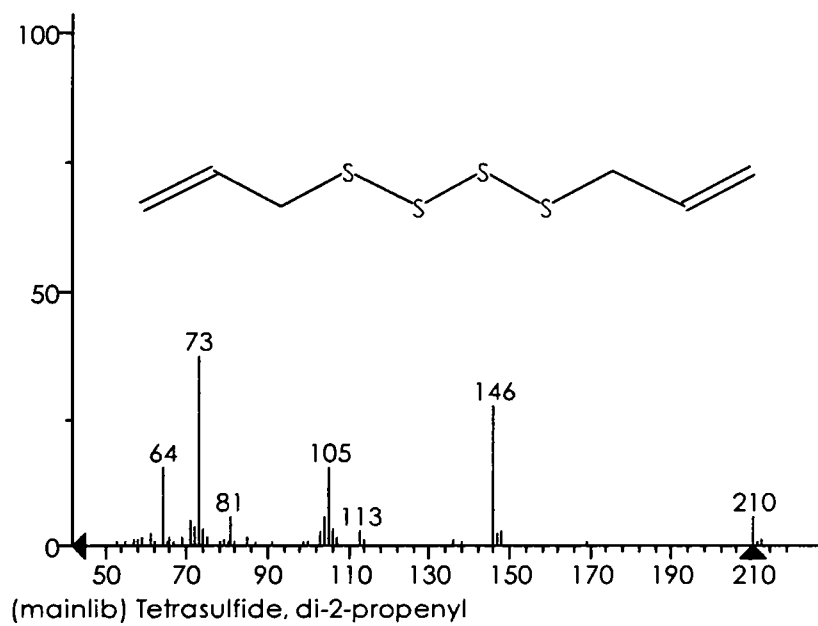
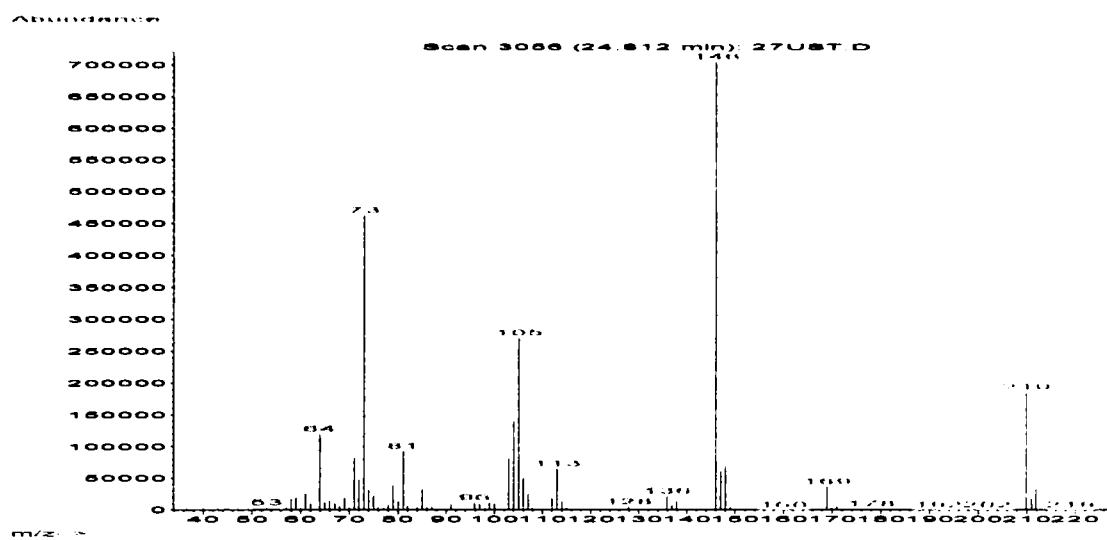


Figura A.2.4. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru dialil-tetrasulfură.

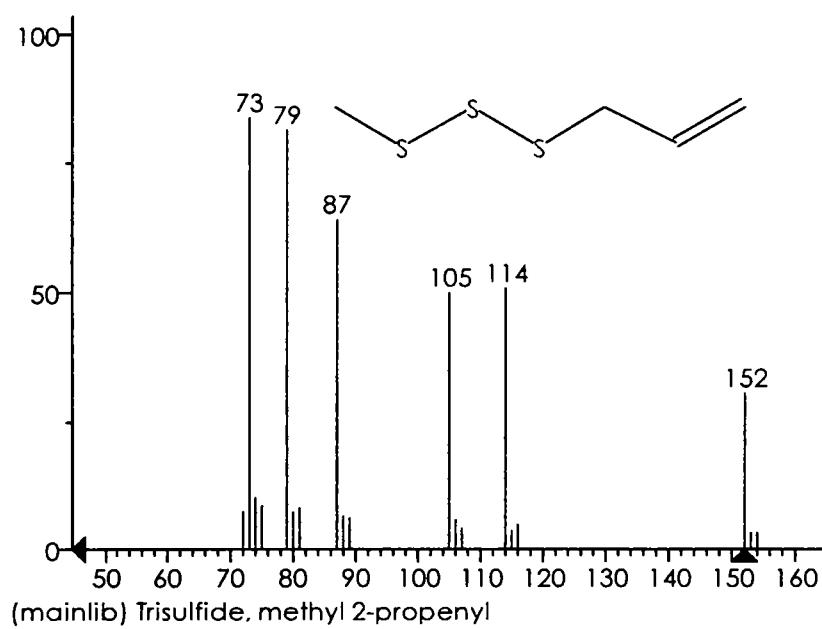
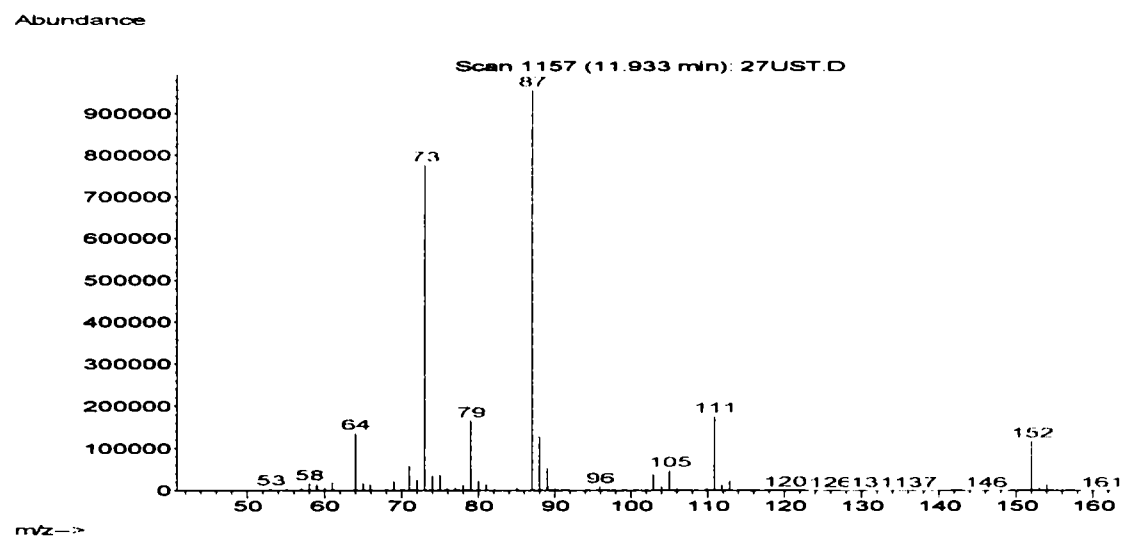


Figura A.2.5. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru alil-metil-trisulfură.

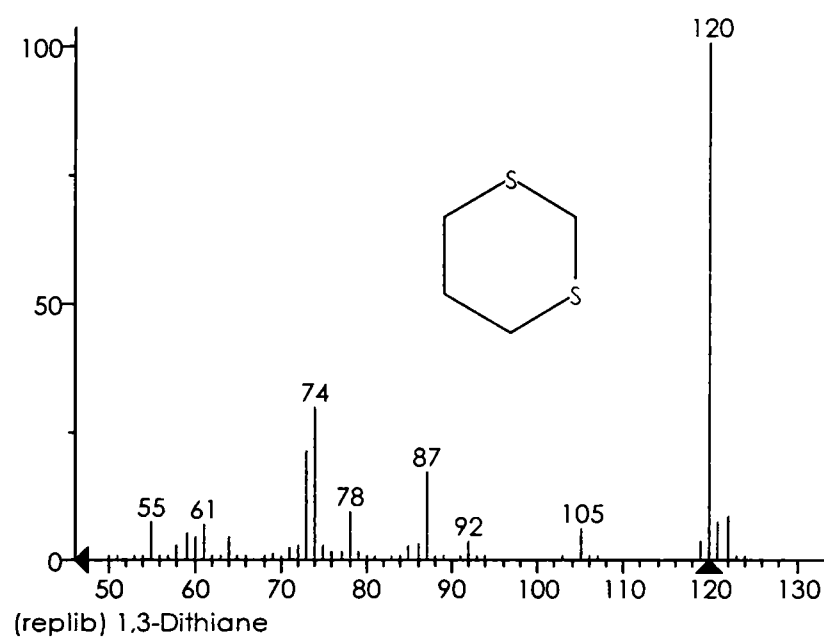
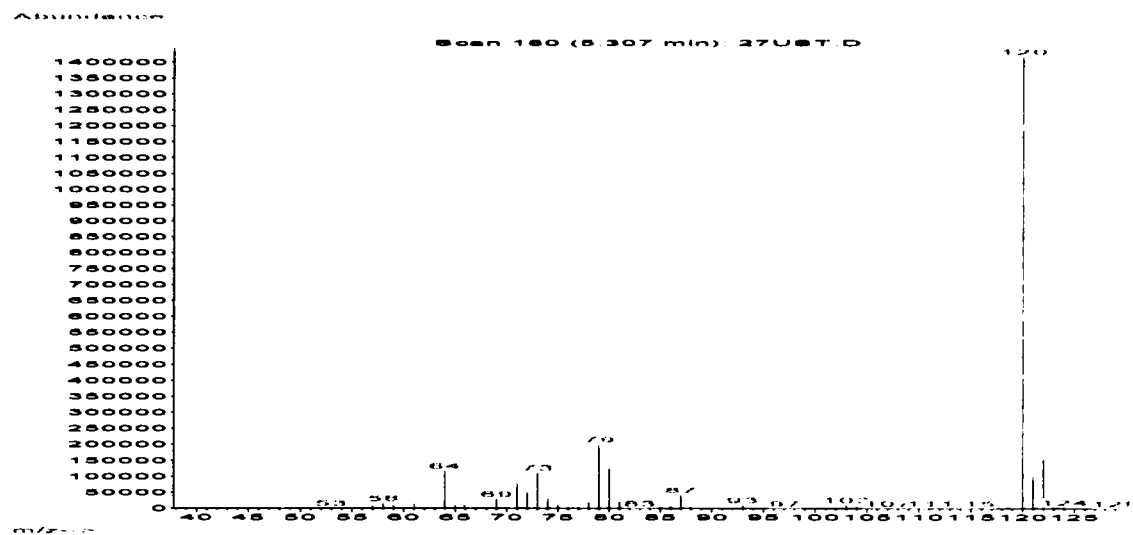


Figura A.2.6. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru 1,3-ditian.

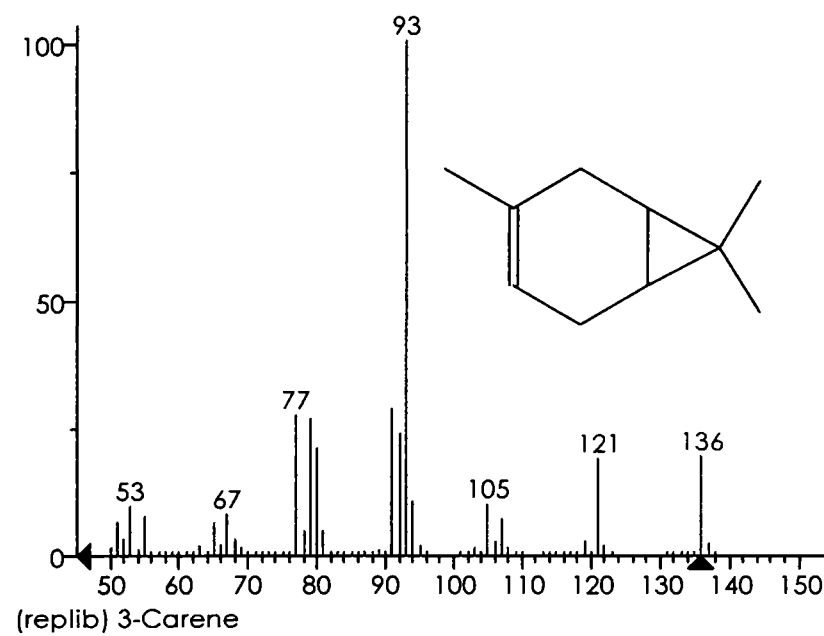
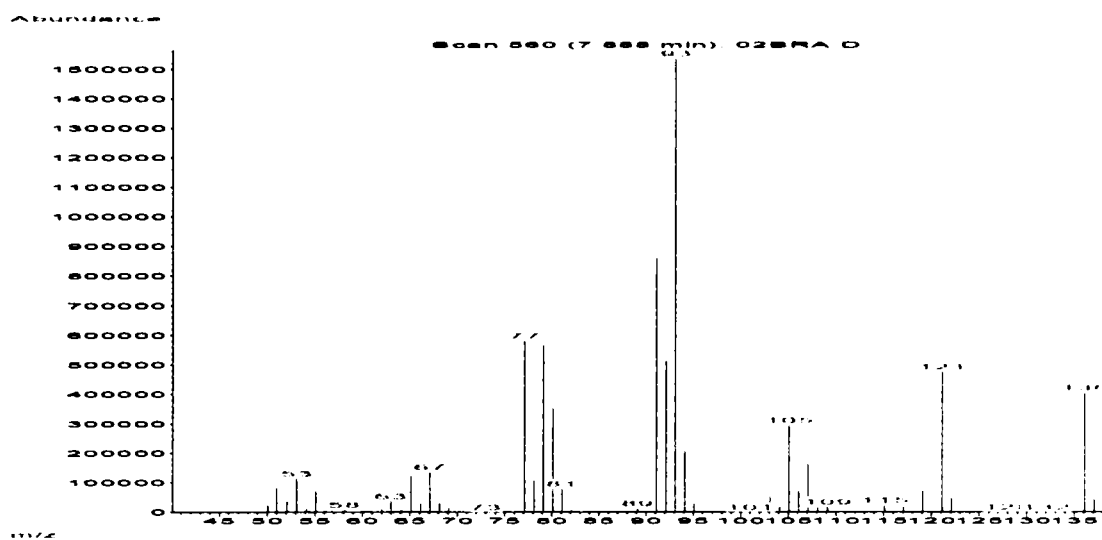


Figura A.2.7. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru 3-carene.

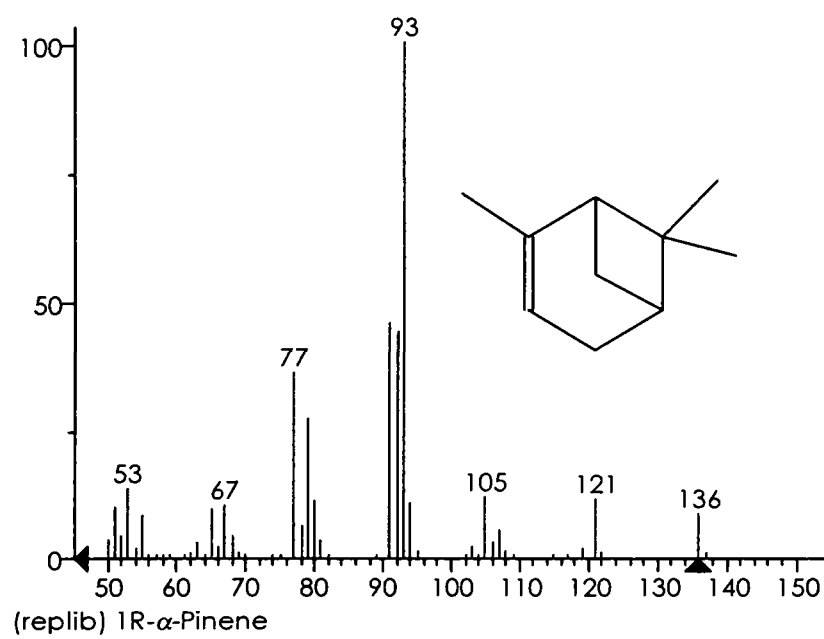
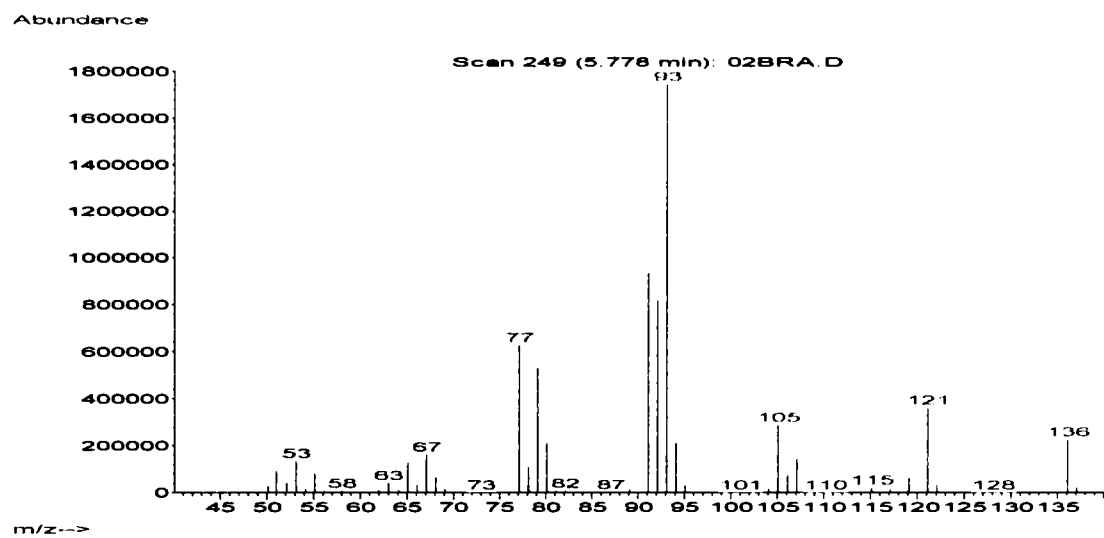


Figura A.2.8. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru α -pinen.

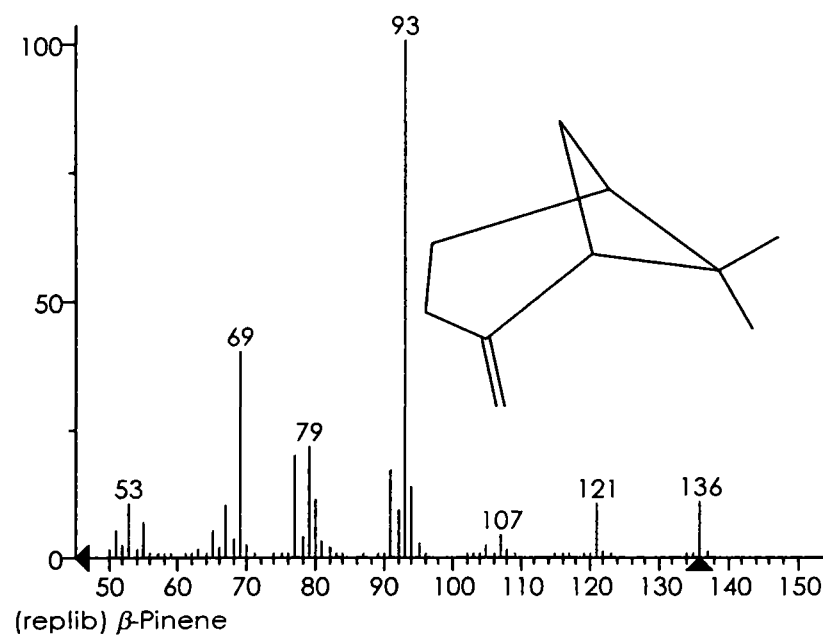
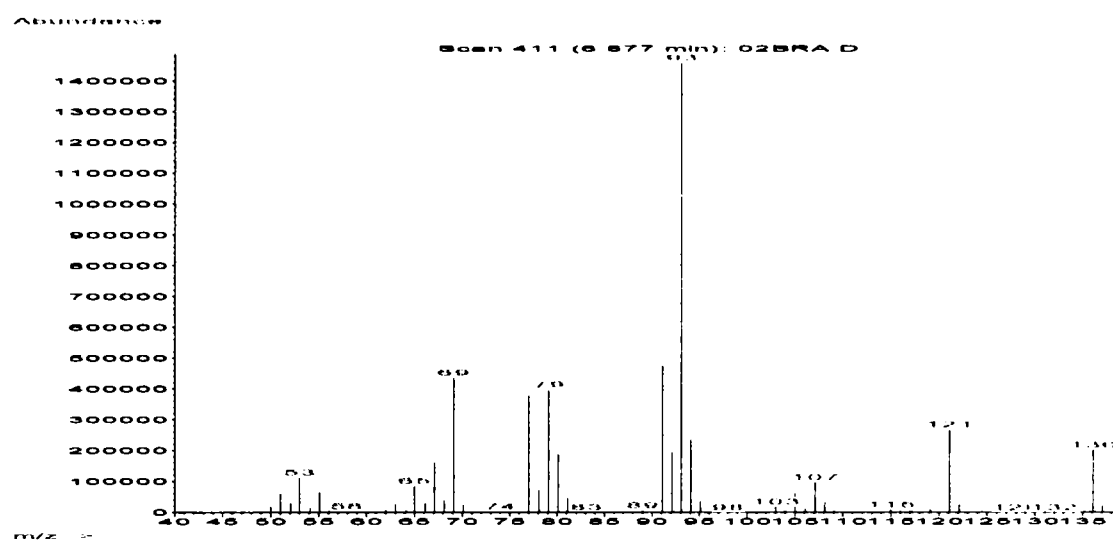


Figura A.2.9. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru β -pinen.

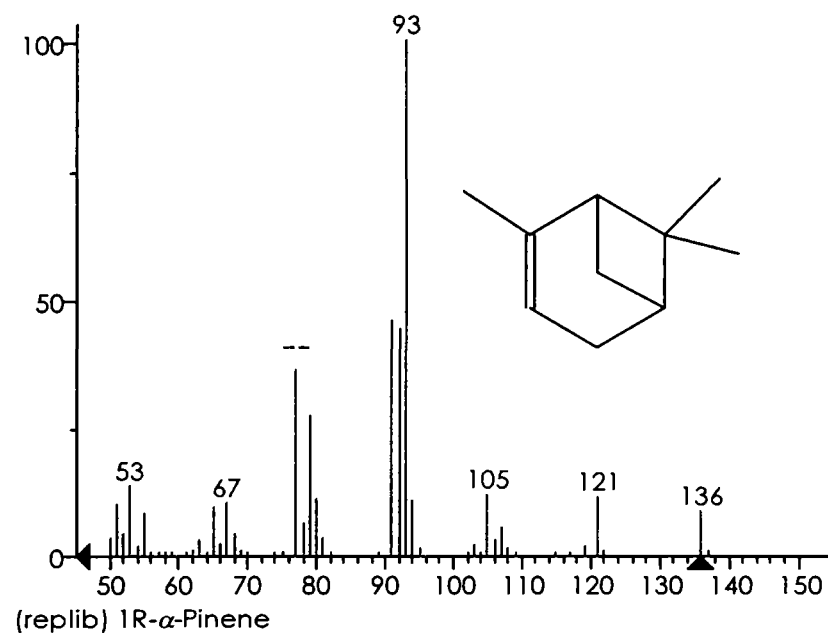
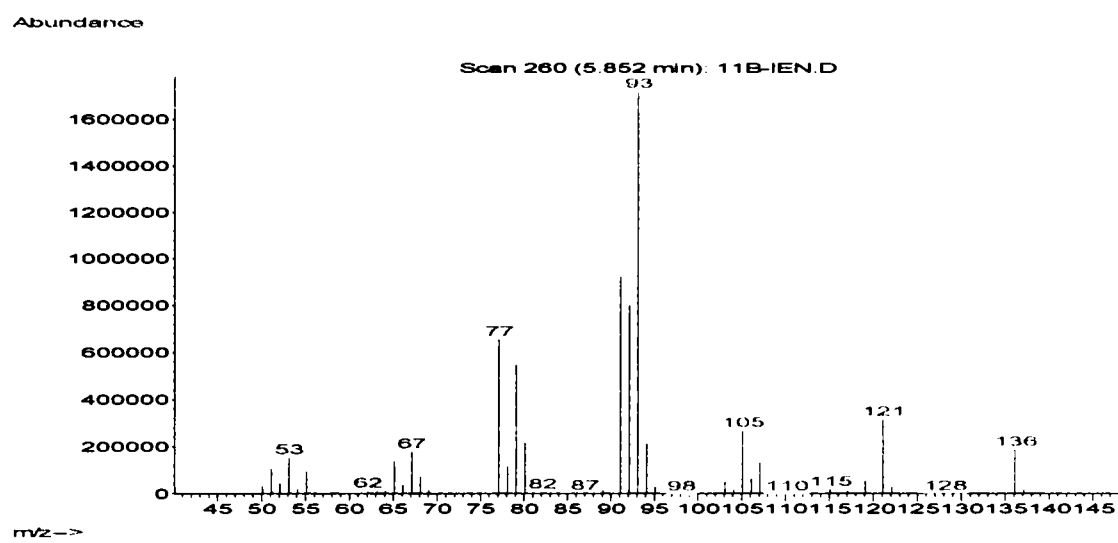


Figura A.2.10. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru α -pinen.

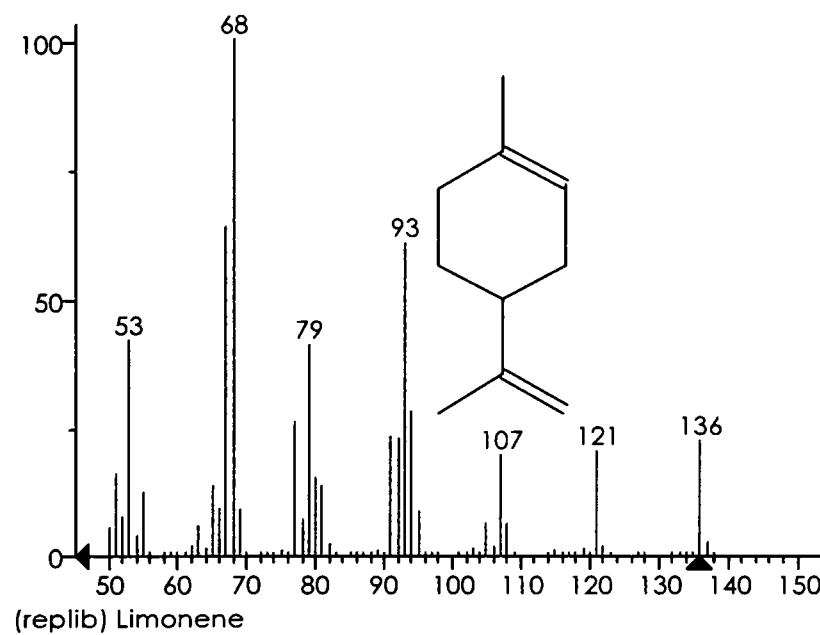
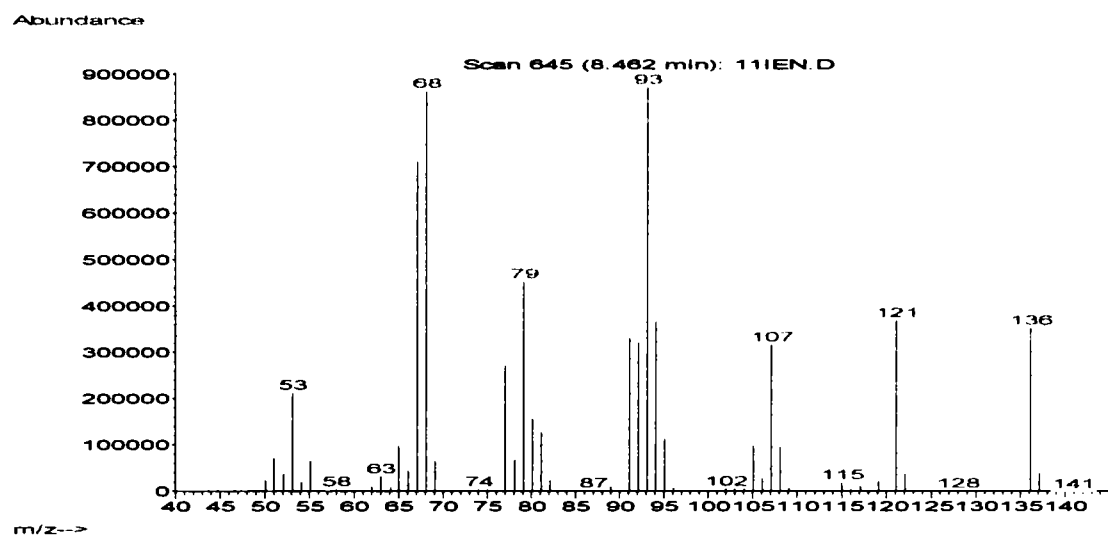


Figura A.2.11. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru limonen.

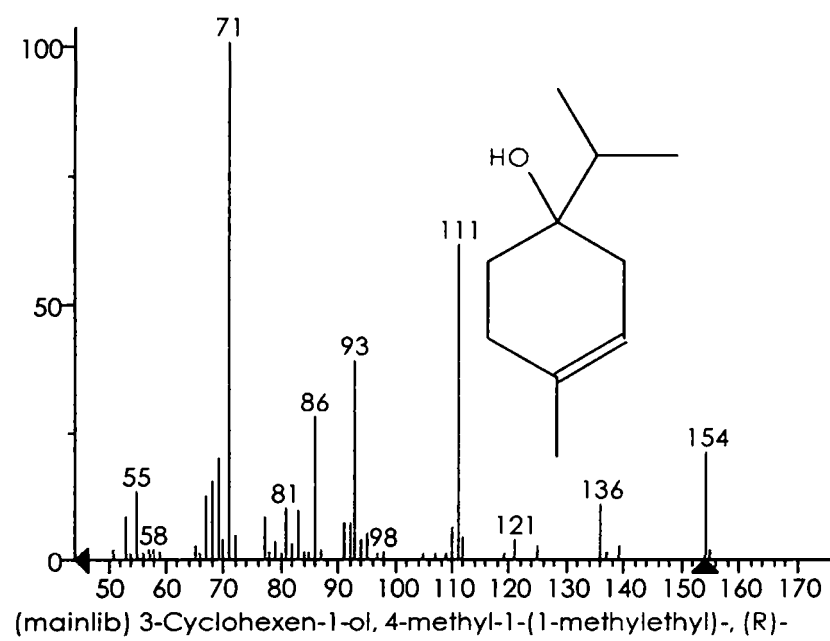
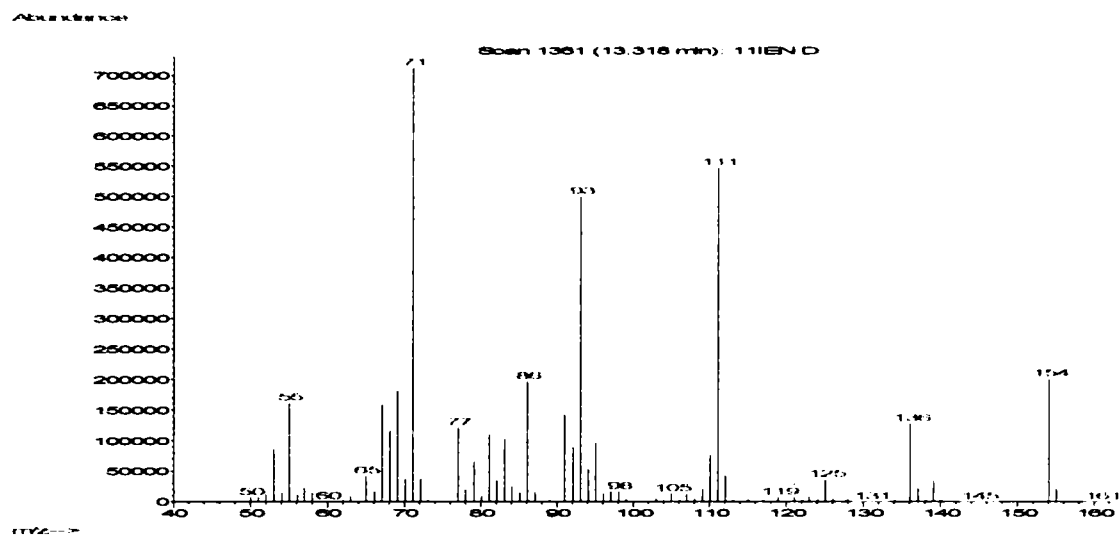


Figura A.2.12. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru terpinen-4-ol.

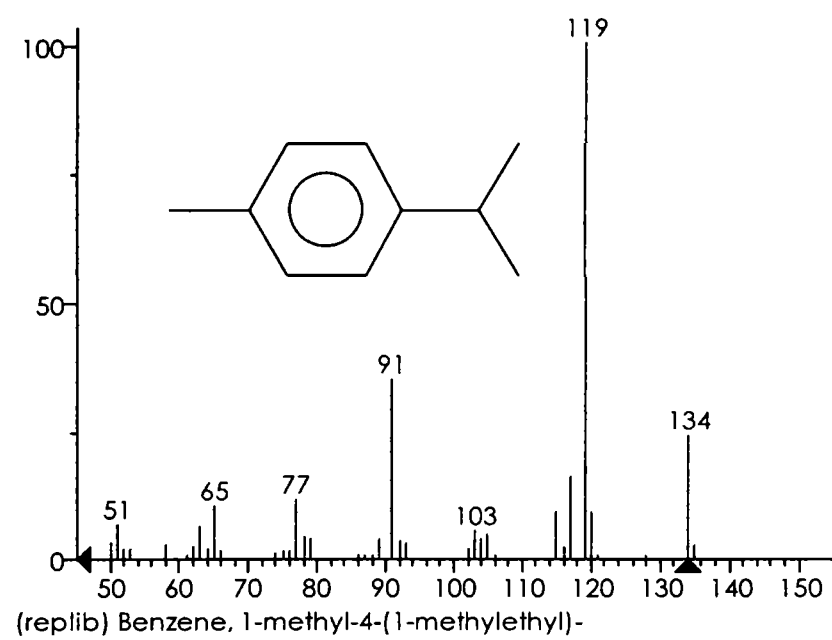
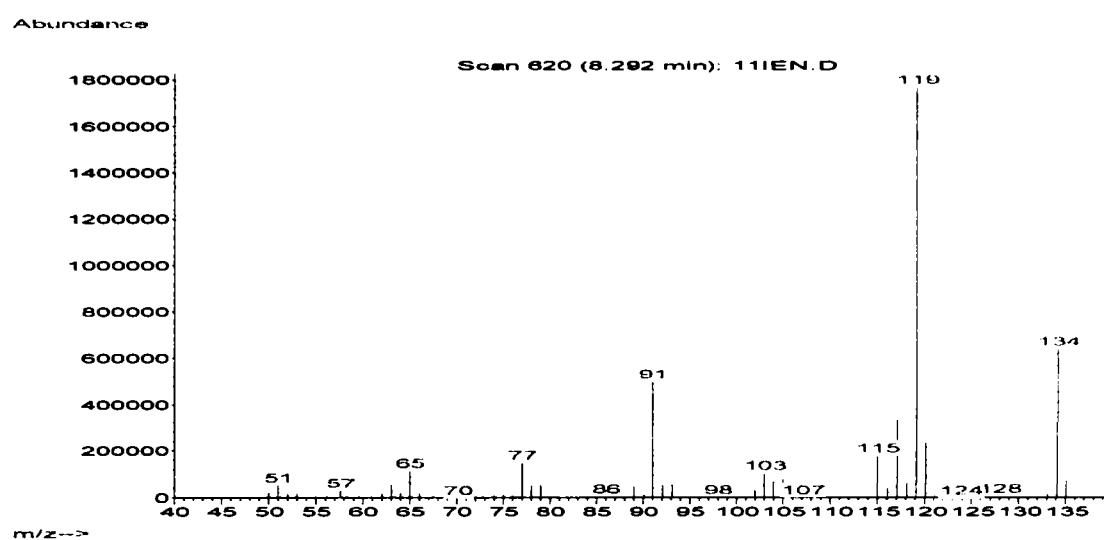


Figura A.2.13. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru *p*-cimen.

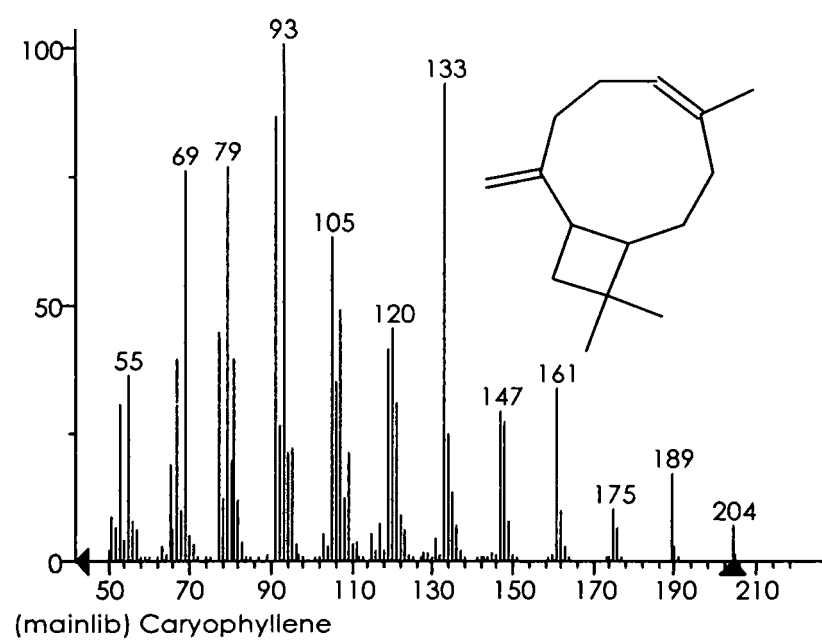
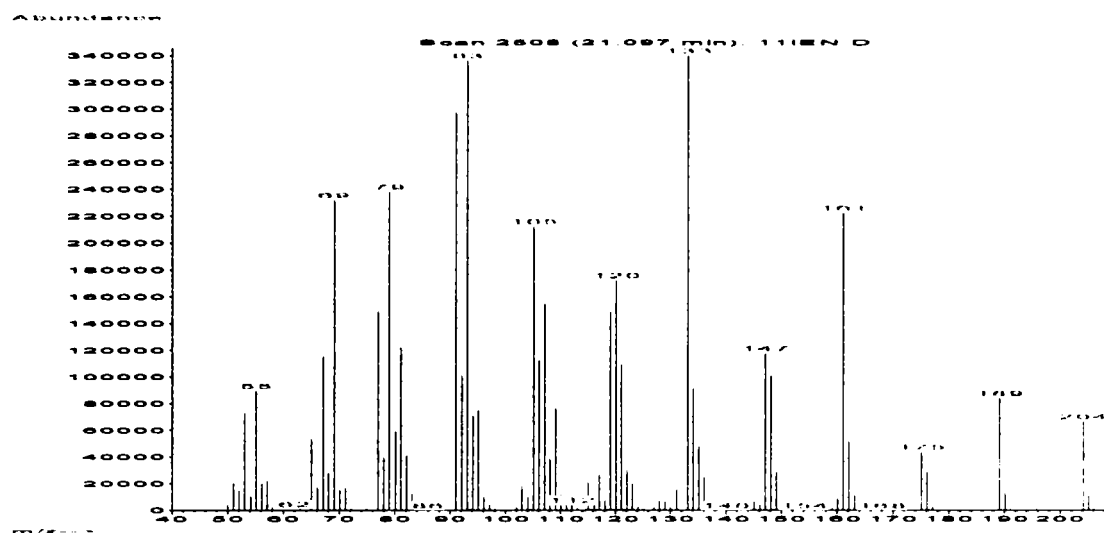


Figura A.2.14. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru cariofilen.

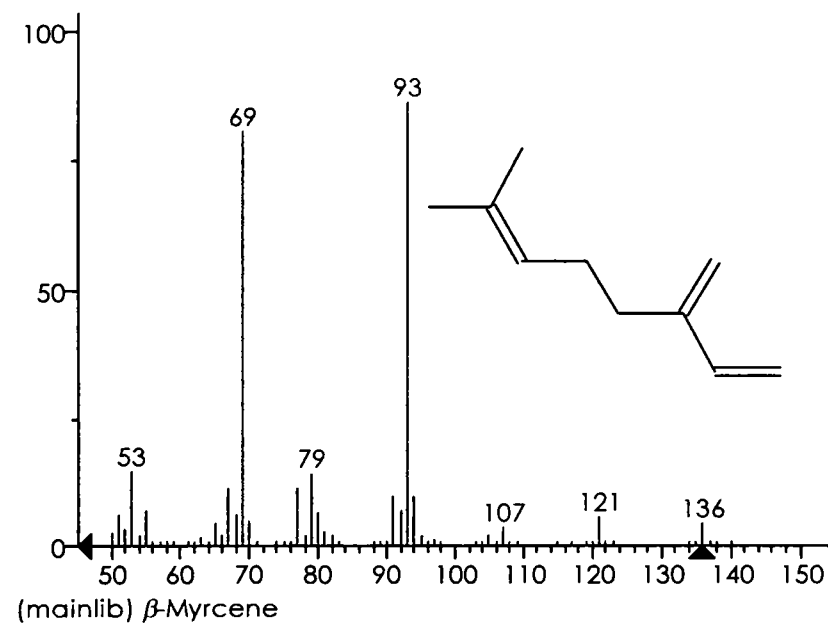
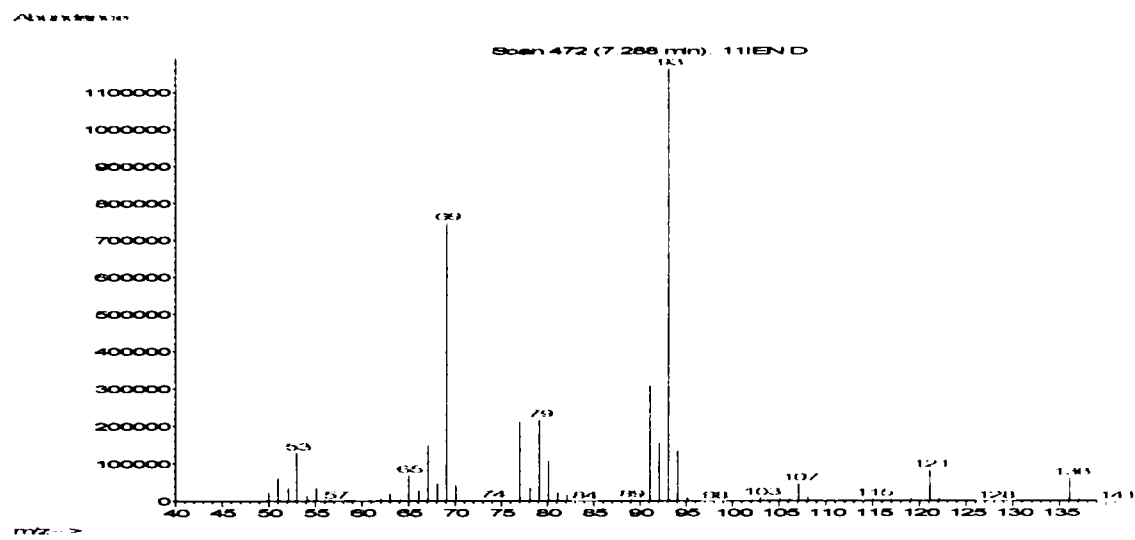


Figura A.2.15. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru mircen.

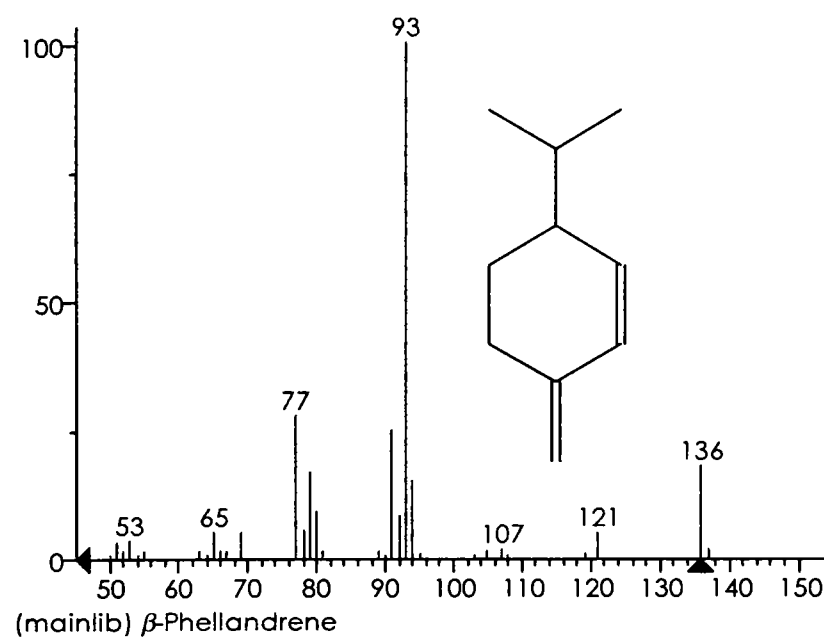
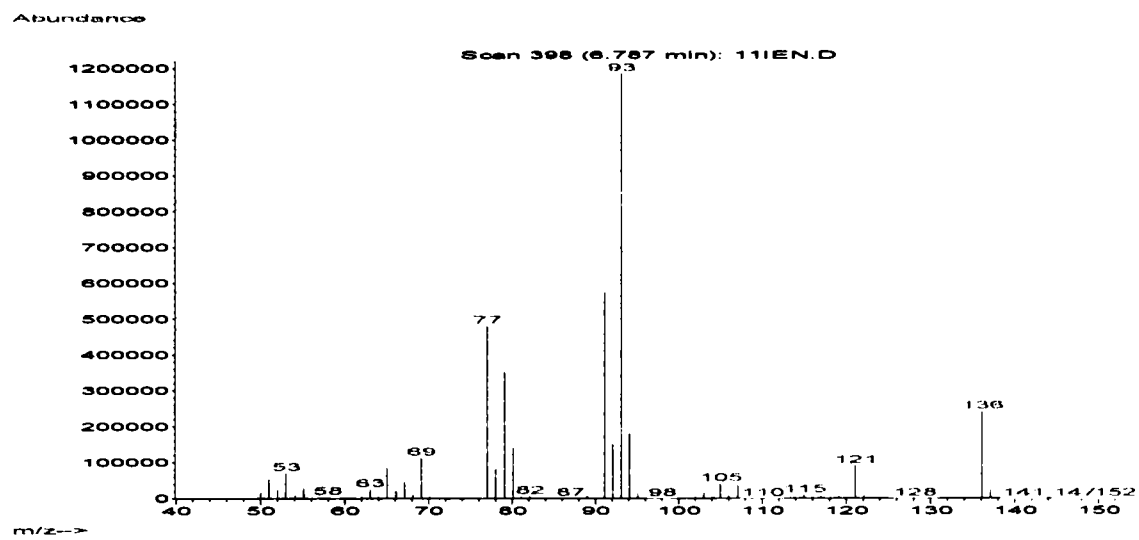


Figura A.2.16. Spectrele de masă experimental (sus) și din baza de date NIST pentru β -felandren.

Ph.D. THESIS ABSTRACT

“Politehnica” University of Timișoara
Faculty of Industrial Chemistry and Environmental Engineering

Dipl. Eng. Nicoleta G. HĂDĂRUGĂ

PROTECTION AND CONTROLLED RELEASE OF THE BIOACTIVE COMPOUNDS

- PhD Thesis Abstract -

Scientific promoter:
Prof. Eng. Alfa Xenia LUPEA, PhD

CONTENTS

1.	INTRODUCTION	5
2.	LITERATURE SURVEY	8
2.1.	MICRO- AND NANOENCAPSULATION	8
2.2.	MATRICES USED FOR PROTECTION AND CONTROLLED RELEASE OF THE BIOMOLECULES	8
2.2.1.	<i>Oligosaccharides</i>	8
2.2.2.	<i>Polysaccharides</i>	16
2.2.3.	<i>Lipids</i>	20
2.2.4.	<i>Synthetic polymers</i>	21
2.3.	MICRO- AND NANOCAPSULE APPLICATIONS	25
2.3.1.	<i>Food industry</i>	25
2.3.2.	<i>Pharmaceutical industry</i>	27
2.3.3.	<i>Cosmetic, agricultural, zootechnical and tobacco industries</i>	28
3.	NANOENCAPSULATION OF FATTY ACIDS AND ESSENTIAL OILS IN CYCLODEXTRINS	30
3.1.	INTRODUCTION	30
3.2.	FATTY ACID/CYCLODEXTRIN NANOCAPSULES (RESULTS AND DISCUSSION)	31
3.2.1.	<i>Oleic acid/α- and β-cyclodextrin nanocapsules</i>	31
3.2.2.	<i>Linoleic acid/α- and β-cyclodextrin nanocapsules</i>	38
3.2.3.	<i>Linolenic acid/α- and β-cyclodextrin nanocapsules</i>	45
3.2.4.	<i>Molecular modeling of the fatty acid/cyclodextrin interactions</i>	49
3.2.5.	<i>Partial conclusion</i>	57
3.3.	ESSENTIAL OIL/ β -CYCLODEXTRIN NANOCAPSULES (RESULTS AND DISCUSSION)	58
3.3.1.	<i>Dicotyledonatae botanical class essential oil/β-cyclodextrin nanocapsules</i>	58
3.3.2.	<i>Monocotyledoneae botanical class essential oil/β-cyclodextrin nanocapsules</i>	99
3.3.3.	<i>Pinatae botanical class essential oil/β-cyclodextrin nanocapsules</i>	103
3.3.4.	<i>Multivariate analysis (PCA) of the GC data for the essential oil/β-cyclodextrin complexes</i>	117
3.3.5.	<i>Partial conclusion</i>	131
3.4.	ESSENTIAL OIL/ β -CYCLODEXTRIN NANOCAPSULE APPLICATIONS (RESULTS AND DISCUSSION)	132
3.4.1.	<i>Partial conclusion</i>	134
3.5.	EXPERIMENTAL	135
	CONCLUSION	150
	REFERENCES	154
	ANNEX	169

KEYWORDS: nanoencapsulation, controlled release, protection, thermal stability, bioactive compounds, fatty acids, essential oils, cyclodextrins, DSC, TG, GC-MS, molecular modeling, docking, multivariate analysis, PCA, sensory analysis.

1. INTRODUCTION. LITERATURE SURVEY ON NANOENCAPSULATION

The goal of the present PhD thesis, named *Protection and Controlled Release of the Bioactive Compounds*, is the study of the nanoencapsulation and the protection capacity of the bioactive compounds or systems (unsaturated fatty acids and essential oils) by α - and β -cyclodextrins.

The protection of the bioactive compounds against the environmental, alimentary, or biological degradative factors (air/oxygen, light/UV radiation, humidity etc.) is a major problem due to the degradation products (especially those oxygenated) which have a negative impact to the human health. In the case of the unsaturated fatty acids, the epoxydes and hydroperoxydes, which can be formed in the presence of the oxygen, can lead to free radicals and interact with nucleic acids or proteins from the organism. The linear epoxydes (like those resulted by epoxydation of the oleic, linoleic, and linolenic acids) can easily penetrate the cell membrane and interact especially with the DNA. It is well known that the limonene-dioxide, a degradation compound that appears in the citrus essential oils or other biosystems by oxidation, has neoplastic activity.

One of the best matrices used to protect and controlled release of the bioactive molecules are cyclodextrins (CDs), which are natural cyclic oligosaccharides, containing six (α CD), seven (β CD), eight (γ CD), or more glucopyranose moieties. Cyclodextrins have structures like truncated cones, with hydrophobic inner cavities, which can accommodate geometric compatible bioactive molecules by van der Waals interactions, providing stable complexes (molecular inclusion compounds, supramolecular systems) with very good protecting properties.

Cyclodextrins were used especially for drug and food additive complexation in order to improve the solubility, the stability, to mask disagreeable odor and taste, and to provide systems with controlled release of the encapsulated biomolecules. In the pharmaceutical field, some studies were performed on the solubilization of the trimethoprim, sulfadiazine, and sulfamethoxazole by molecular encapsulation in CDs and modified CDs, the encapsulation of the alkylparabens, carbamazepine, and oxyphenbutazone in natural CDs, or the complexation of the barbiturates or steroids with modified CDs. In the case of barbiturates, molecular dynamic studies were performed in order to evaluate the encapsulation process. A very interesting review was recently published on the possibility of application of the cyclodextrins in food industry, authors reviewing over than 14 years of determinations on the flavoring compounds/ β CD complexes.

2. NANOENCAPSULATION OF THE FATTY ACIDS AND ESSENTIAL OILS IN CYCLODEXTRINS

The nanoencapsulation was performed on the unsaturated fatty acid and essential oil classes in order to protect the bioactive compounds against the degradative factors. The encapsulation of the oleic, linoleic, and linolenic acids in α - and β CD from the first class was performed by ethanol-water solution method, at 50°C; the suspension was cooled, crystallized, filtered, washed, and dried. The dried complexes were analyzed by differential scanning calorimetry (DSC) and the pure fatty acids or those recovered from complexes by hexane multiple extractions, were analyzed by GC-MS after derivatization to the corresponding esters. The pure fatty acids and complexes were thermally degraded at 50°C, 100°C, and 150°C in air. The resulting degraded samples from raw fatty acids or from complexes after recovering in the same manner were derivatized with MeOH·BF₃ and analyzed by GC-MS. In order to confirm the formation of the fatty acid/CD complex (revealed by DSC analysis), a molecular modeling study was performed for the encapsulation of the fatty acids in α - and β CD, using the minimal energy conformations obtained by conformational analysis for compounds implied in the docking experiments.

The essential oil/ β CD complexes were obtained by the same ethanol-water solution method, using 18 essential oils from Dicotyledonatae botanical class, one essential oil from the Monocotyledoneae class, and 6 essential oils from the Pinatae class. Complexes were analyzed by thermogravimetry (TG), the raw and the recovered (by hexane multiple extraction) from complexes essential oils were analyzed by GC-MS. The GC data were used for the multivariate analysis (principal component analysis-PCA) in order to classify the samples and to identify the main compound implied in these classifications.

2.1. Fatty acid/CD nanocapsules (Results and discussion)

The nanoencapsulation of the fatty acids in α - and β CD was achieved in good yields of 60-91%, the higher ones being obtained in the case of α CD. Due to the high quantity of data, only the case of oleic acid is presented here.

The DSC analysis (Figure 1) clearly indicates the formation of the complex. For the pure CDs the DSC analysis indicate the dehydration in the range of 80-130°C for α CD and 70-115°C for β CD. The DSC analysis indicate no physical or chemical modification. The DSC analysis shows that the oleic acid/ α CD complex do not contain any quantity of water; some transitions appear at 116°C and 147°C. A small quantity of water (and/or ethanol) is present in the oleic acid/ β CD complex.

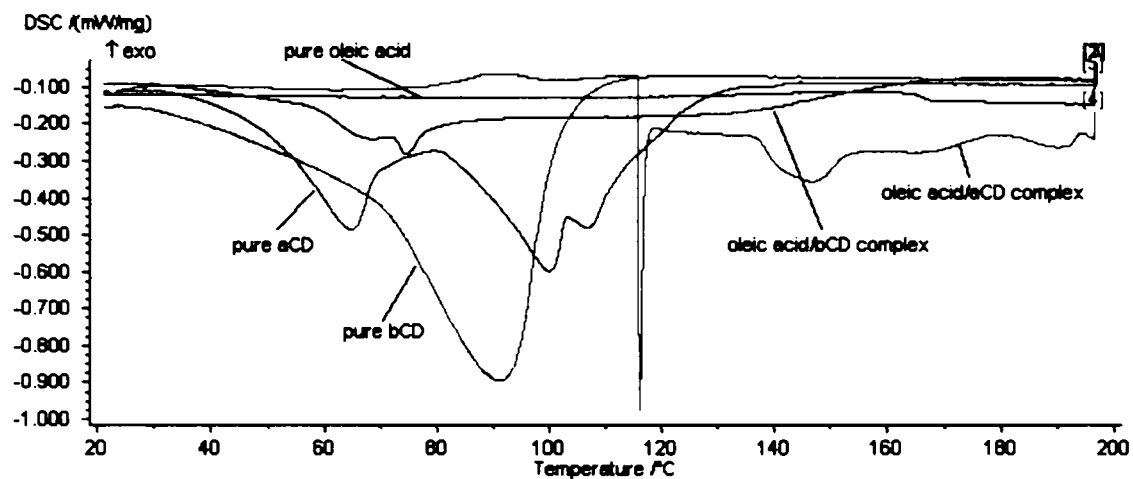


Figure 1. DSC analysis for pure oleic acid, pure CDs, and for the oleic acid/ α - and β CD complexes.

In order to establish the free and degraded oleic acid sample composition, the GC-MS analysis was performed for the free oleic acid sample not degraded and degraded at 50-150°C temperature range, and for the samples separated from the complexes not degraded or degraded at 50-150°C temperature range. The concentration of pure oleic acid was 98.8% (as methyl ester), the trace impurities being caproic, enanthic, caprylic, pelargonic, caprinic, myristic, and palmitic acid, and some dicarboxylic acids. A small quantity of ethyl oleate was identified in the samples extracted from the complexes, probably formed in the complexation process.

After the thermal degradation of the free oleic acid, in air at normal pressure, a series of degradation products could be identified, especially for the samples degraded at temperatures above 100°C. These compounds belong to the aldehyde class (by oxydation processes), epoxy derivatives and dihydroxy-acids resulting by epoxydation-hydratation processes. The concentration of oleic acid in the sample degraded at 50°C was approximately 99%, the number and the quantity of degradation products being very small. The concentration of oleic acid in the samples degraded at 100°C and 150°C was 95.1% and 81.7%, respectively. A small quantity of elaidic acid (*E* isomer of oleic acid) of 8% could be identified in the sample degraded at 150°C, probably resulted from an addition-eliminating reaction with one water molecule.

In the first half of the GC chromatogram aldehydes were the main degradation products of the oleic acid (identified as corresponding dimethyl-acetals). The higher concentration was determined for octanal (in concentration of 0.03, 0.16, and 0.18% for the samples degraded at 50, 100, and 150°C, respectively). The same variation was observed for nonanal and decanal. For the sample degraded at 100°C the 9,10-epoxi and 9,10-dihydroxy derivative of oleic acid were identified.

The excellent protective capacity of CDs can be observed from the GC-MS analyses of the oleic acid/CDs samples degraded in the same conditions. For the oleic acid/ α CD sample degraded at 50°C, no important degradation products were identified, the concentration of oleic acid (as methyl ester) being 99.8%. For the sample degraded at 100°C, the oleic acid (as methyl ester) concentration was

97.4%. The main degradation product was malon-aldehyde (identified as acetal, 0.9%). The *E* isomer of oleic acid (elaidic acid) was not identified neither in the samples degraded at 50-100°C, nor in those degraded at 150°C (Figure 2).

For the oleic acid/ β CD complex degraded at 50-150°C, small quantities of C₆-C₉ aldehydes were identified, but the concentration of oleic acid was relatively higher (96.5% in both samples degraded at 50-100°C, and 92.8% in the sample degraded at 150°C; 5.8% of elaidic acid was identified in this case).

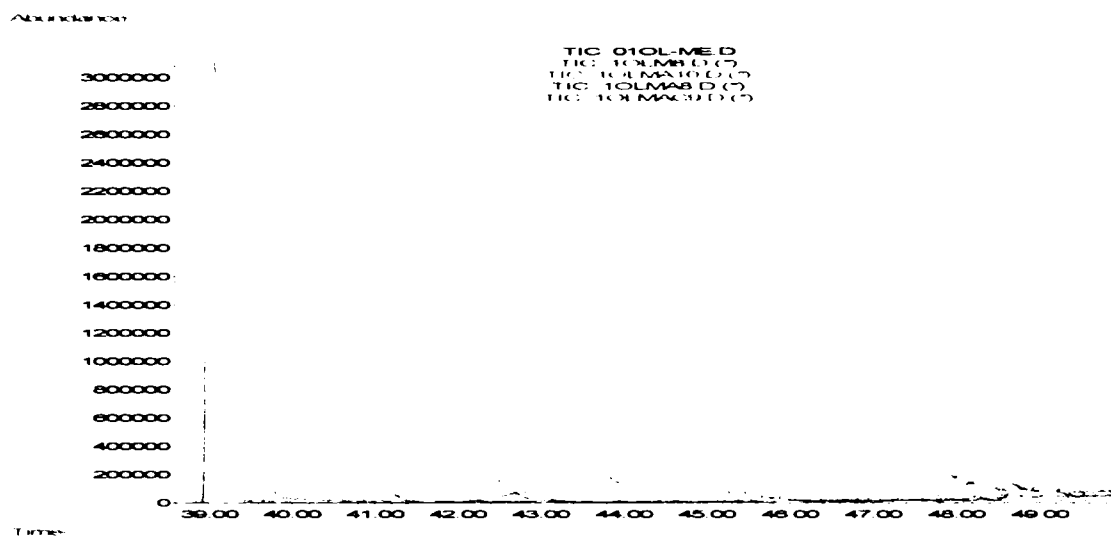


Figure 2. The superposition of the GC chromatograms for free oleic acid not degraded (black) and degraded at 150°C (green), and for the samples corresponding to the oleic acid/ α CD complex degraded at 50°C (violet), 100°C (yellow), and 150°C (cyan), respectively (the KI range of 2100-2600).

For the theoretical evaluation of the interaction energy, the most stable fatty acid conformation was orientated along to the Z axis, with the hydrophobic moiety of the fatty acid pointed to CD. The best docking results were obtained in the case of orientation of the fatty acid conformation to the secondary OH-groups of the CDs. The optimized conformations of the complexes indicate the formation of the van der Waals bonds between the inner cavity of the CD and the hydrophobic moiety of the fatty acid structure and the formation of the *H*-bonds between the secondary OH-groups of the CD and carbonyl or hydroxyl groups from the fatty acid carboxyl (Figure 3).

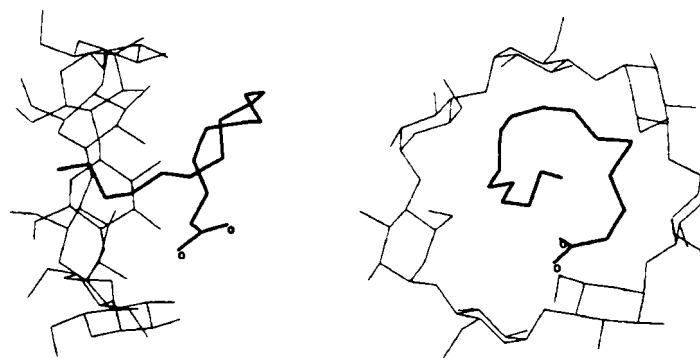


Figure 3. Molecular modeling (MM+) of the interaction of the oleic (bolded) with β CD; two representations (along to the *OX*-left and *OZ*-right axes) of the optimized conformations of complexes are presented.

The attempt to correlate the interaction energy obtained by DSC analysis and by molecular mechanics calculations conducts to a very good correlational equation, with a correlation coefficient of 0.92.

$$E_{\text{int(MM+)}} = 17.368(\pm 0.933) + 1.457(\pm 0.321) \cdot E_{\text{int(DSC)}}$$

$$n = 6; r = 0.92; s = 1.62; F = 21$$

2.2. Essential oil/ β CD nanocapsules (Results and discussion)

Eighteen essential oil/ β CD nanocapsules (caraway, coriander, fennel, dill-Apiaceae family, basil, thyme, lavender, marjoram, mint, spearmint, sage-Lamiaceae family, bergamot, lemon, orange-Rutaceae family, clove, eucalyptus-Myrtaceae family, cinnamomum-Lauraceae family, and rose-Rosaceae family from Dicotyledonatae botanical class), one essential oil (garlic-Liliaceae family, Monocotyledoneae class)/ β CD complex, and six bionanocapsules (fir, spruce, turpentine-Pinaceae family, juniperus plant, leaf, and fruit-Cupressaceae family) were obtained with good yields of 55-84%, but only the Apiaceae family (especially the case of caraway essential oil) are presented here.

The thermogravimetric analysis indicates that the concentration of the Apiaceae family essential oils encapsulated was in the range of 7.6% (for the coriander oil/ β CD complex) to 9% (for the fennel oil/ β CD complex) (Figure 4), comparatively with the pure β CD analysis, that revealed a mass loss of 14.1% (up to 200°C), corresponding to 12 water molecules (the pure β CD are crystallized with water molecules).

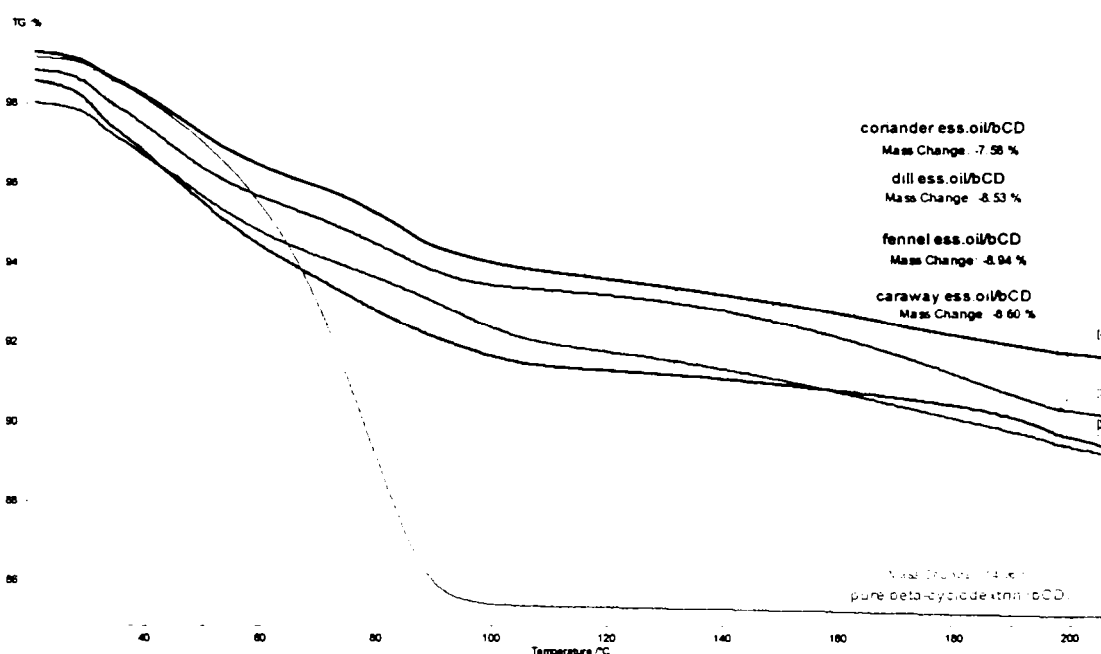


Figure 4. TG analysis of the essential oils from Apiaceae family plants/ β CD complexes.

The main components identified in the essential oils from the Apiaceae family plants were the oxygenated compounds like (*S*)-(+)-carvone, linalool and anethol. More than 170 compounds were separated by GC analysis of the caraway essential oil (Figure 5), the main compound being carvone (47.3%) and limonene (28.4%) (Figure 6). The minor components were α - and β -pinene, carveole and some sesquiterpenes (β -elemene, β -cubebene, β -bourbonene, γ -cadinene). In order to evaluate decomposition of the encapsulated oil, this was recovered in hexane by multiple extraction (no more than four extractions because the fifth one indicate only traces of essential oil compounds by GC-MS analysis). The recovered essential oil was analyzed in the same way and the composition was compared with that of the raw essential oil (by means of the ratio between the concentrations of compounds in the recovered and raw essential oils). Limonene (a hydrophobic monoterpene) was encapsulated in higher relative concentration (the concentration in the recovered essential oil) than in the raw essential oil, the ratio between these concentrations being 1.9. In the case of carvone, this ratio was < 1 , probably due to the presence of the carbonyl group (which decrease the hydrophobicity of the molecule and the hydrophobic interaction with the inner cavity of the cyclodextrin).

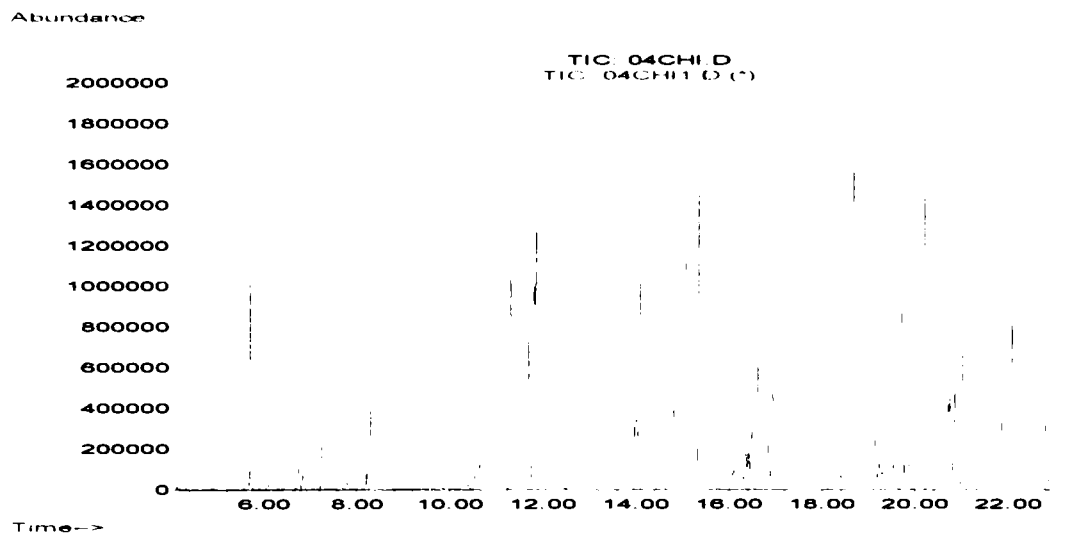


Figure 5. The superimposed GC chromatograms of the raw (black) and recovered caraway essential oils.

The multivariate analysis (PCA-principal component analysis) of the GC data (concentration of the compounds), both for the raw and recovered essential oils from the Dicotyledonatae and Pinatae botanical classes, indicates a good classification of these samples. The Dicotyledonatae class was very good classified in the along to the PC1 and PC3 components and the Pinaceae class was grouped in the upper region, along to the PC2 component (Figure 6). These three principal components explain 95% from the variance of the data (73% PC1, 14% PC2 and 8% PC3). Only dual grouping of the raw and recovered samples was obtained in the attempt to classify these raw and complexed essential oils (not shown). The most important compounds for the classification of the samples are cinnamaldehyde, linalyl anthranilate, camphene, anethol for the first principal component (PC1), carvone and carvacrol for PC2.

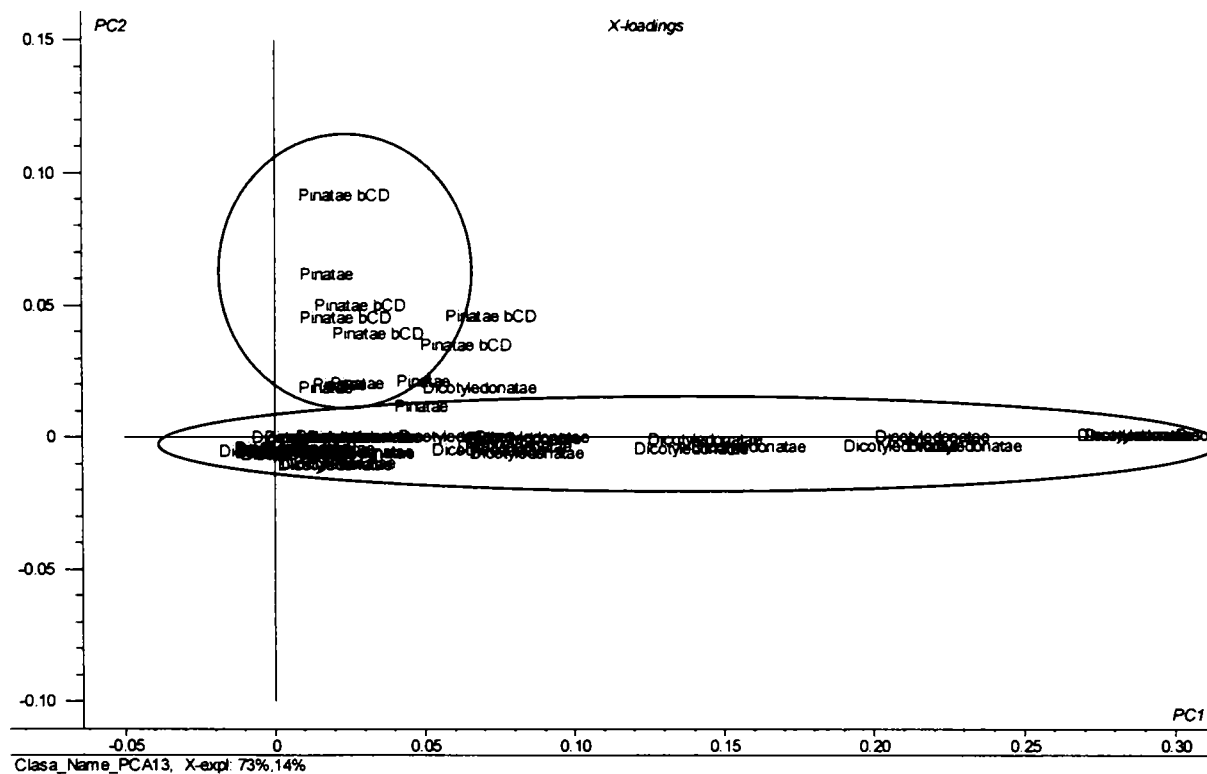


Figure 6. PC2 vs PC1 loadings plot for the GC data of the essential oils from the Dicotyledonatae and Pinatae botanical classes.

CONCLUSION

- The unsaturated fatty acid/CD complexes were obtained with good yields and the DSC analysis suggests the formation of the complex. The DSC analysis also indicates that a part of the encapsulated molecules can be ethanol and water molecules. The peak corresponding to the dissociation of the complex (with energy assumed to be equal with the interaction energy) has an elongated profile and the interaction energy is difficult to evaluate. The experimental interaction energy of the oleic acid/CD decrease to a half for the linoleic acid/CD and forward for the linolenic acid/CD. The same variation can be observed in the case of the theoretical interaction energy evaluated by molecular mechanics calculations. A linear correlation can be observed between the experimental and theoretical interaction energies that confirm the formation of the fatty acid/CD complexes;
- Higher relative concentration of degradation products can be identified in the case of thermally degraded fatty acid samples, the main compounds being aldehydes (malondialdehyde, hexanal, heptanal, octanal, nonanal, decanal) resulted by oxidation processes, especially at higher temperature. A relatively high concentrations of the fatty acids were transformed (probably by hydration-dehydration processes) to the more stable isomers, most of them in the case of samples degraded at 100 and 150°C;
- Very good thermal stability was observed for fatty acid/ α - and β CD complexes, the relative concentration of the fatty acid recovered from the complex being >90% in the most case (especially for the oleic and linoleic acids), comparatively with the non-encapsulated samples degraded at the same temperatures, where these concentration were lower;
- The nanoencapsulation of the essential oils from plants belong to the Dicotyledonatae, Monocotyledoneae, and Pinatae botanical classes in β -cyclodextrin was performed with good yields of 55-84%. The total encapsulated sample determined by thermogravimetry was in the range of 6.5-11.5%. Probably, a part of the mass loss is due to the remanent water molecules from the cyclodextrin crystal. A competitive binding can occur between the hydrophobic flavoring compound from the essential oils and ethanol (used in the encapsulation process);
- The main compounds in the essential oils from the Dicotyledonatae botanical class were oxygenated compounds (exception for the Rutaceae family essential oils), which are encapsulated in relative concentrations in the recovered essential oils close to those from the raw ones. A large number of compounds (especially mono- and sesquiterpenes) were observed in the case of essential oils from the Pinatae botanical class, the main compounds being α -pinene and limonene. All concentrated monoterpene hydrocarbons were encapsulated in higher relative concentrations comparatively with the corresponding concentration in the raw essential oils;
- The complexation of the essential oil of garlic (from Monocotyledoneae class) in β CD provides a product with no "garlic" odor. The relative concentration of the unsaturated acyclic sulfur compounds in the recovered essential oil is higher than for the saturated acyclic and cyclic sulfur compounds;
- From the multivariate analysis of the GC data, the botanical classes were clearly classified by cinnamaldehyde, linalyl anthranilate, camphene, anethol, carvone and carvacrol, but the attempt of grouping the raw and recovered essential oils provides only poor classifications. Very good results were obtained in the case of Cupressaceae family, which are clearly grouped in two classes (raw and recovered essential oils) by α -pinene.
- These good results obtained for the nanoencapsulation of the bioactive compounds, recommends the CDs (GRAS accepted natural food additives) for the protection of biomolecules in the industrial processes (some attempts were made for the application of the Rutaceae essential oil/CDs in the pastry industry) and the multivariate PCA methods for HACCP system implementation.

REFERENCES

- Szente, L.; Szejtli, J., "Cyclodextrins as food ingredients", *Trends in Food Science & Technology* **2004**, *15*(3-4), 137-142.
- Hădărugă, D.I.; Hădărugă, N.G., *Compuși odoranți și aromatizanți*, Ed. Politehnica, Timișoara, 2003.
- Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I., *Arome naturale: arome din reacția Maillard, bioarome și arome încapsulate*, Ed. Augusta, Timișoara, 2004.
- Olah, M.; Mracec, Maria.; Ostopovici, Liliana; Rad, Ramona; Bora, Alina; Hădărugă, Nicoleta G.; Olah, Ionela; Banda, Magdalena; Simon, Z.; Mracec, M.; Oprea, T.I., "WOMBAT: World of Molecular Bioactivity". In: Oprea, T.I. (ed), *Cheminformatics in Drug Discovery*, Wiley-VCH, New York, 2004, pp. 223-239.
- Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Lupea, A.X.; Bandur, G., "Bioactive Nanoparticles (1). The Complexation of the Essential Oil of Garlic with β -Cyclodextrin", *Scientifical Researches. Agroalimentary Processes and Technologies* **2004**, *10*, 121-127.
- Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Bandur, G.; Lupea, A.X.; Knejevici, F.; Andrei, V.; Raba, D., "Bioactive Nanoparticles (2). The Complexation of the Caraway Essential Oil with β -Cyclodextrin", *Scientifical Researches. Agroalimentary Processes and Technologies* **2004**, *10*, 128-134.
- Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Lupea, A.X.; Bandur, G.; Mișcă, C.; Ghiulai, M.; Rinovetz, A.; Radoslavievici, D.S., "Bioactive Nanoparticles (3). The Complexation of the Lemon Essential Oil with β -Cyclodextrin", *Scientifical Researches. Agroalimentary Processes and Technologies* **2004**, *10*, 135-141.
- Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Bandur, G.; Lupea, A.X.; Tatu, C.; Ordodi, V.L., "Bioactive Nanoparticles (4). The Complexation of the Essential Oils from the *Lamiaceae* Family Plants with β -Cyclodextrin", *Proceedings of the 6th International Symposium "Young People and the Multidisciplinary Research"*, Timișoara, 23-24 sept **2004**, 635-644.
- Hădărugă, D.I.; Hădărugă, N.G.; Bandur, G.; Lupea, A.X.; Tatu, C.; Ordodi, V.L., "Bioactive Nanoparticles (5). Thermal Stability of the Oleic Acid / α - and β -Cyclodextrin Complexes", *Proceedings of the 6th International Symposium "Young People and the Multidisciplinary Research"*, Timișoara, 23-24 sept **2004**, 645-652.
- Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Bandur, G.; Lupea, A.X., "The Complexation of α - and β -Cyclodextrin with Odorant Compounds", *Proceedings of the 5th International Symposium "Young People and the Multidisciplinary Research"*, Timișoara, 6-7 nov **2003**, 494-501.
- Hădărugă, N.G.; Mișcă, Corina D.; Mureșan, S.; Hădărugă, D.I.; Jianu, C.; Jianu, I., "Volatile Constituents of the Distilled Oils of Garlic (*Allium sativum* L.)", *Acta Phytotherapica Romanica* **2000**, *6* (1-2), 63-64.
- Bârlea-Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Jianu, C.; Radu, Florina; Nichita, Ileana; Jianu, I., " α -Cyclodextrin. Molecular Aspects and Their Flavour Interactions (I)", *Zilele Academice Timișene*, ed. a VI-a, Simpozion "Științe. Procese și Tehnologii Agroalimentare", Timișoara, 27-28 mai **1999**, *1*, 169-174.
- Bârlea-Hădărugă, N.G.; Biron, Ramona; Radu, Florina; Mucete, Daniela; Mureșan, S.; Hădărugă, D.I.; Jianu, C., "The Separation and the Analysis of the Essential Oil of Garlic (*Allium sativum* L.)", *Zilele Academice Timișene*, ed. a VI-a, Simpozion "Științe, Procese și Tehnologii Agroalimentare", Timișoara, 27-28 mai **1999**, *1*, 175-179.
- Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Mișcă, Corina; Jianu, I., " β -Cyclodextrin. Molecular Aspects and Their Flavor Interactions (II)", *Conferința Națională de Biotehnologie și Ingineria Mediului, Târgoviște*, 3-4 noiembrie **2000**, *1*, 31-37.
- Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Mișcă, Corina D.; Jianu, I., " γ -Cyclodextrin. Molecular Aspects and Its Flavor Interactions (III)", *Zilele Academice Timișene*, ed. a VII-a, Timișoara, 25-27 mai **2001**, 155-160.
- Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Mișcă, Corina D.; Drugă, Marioara; Jianu, I., "Cyclodextrins. Molecular Aspects and Their Flavor Interactions", *Proceedings of the 3rd International Symposium "Young People and the Multidisciplinary Research"*, 8-9 nov **2001**, 274-281.
- Hădărugă, D.I.; Hădărugă, N.G.; Mureșan, S.; Dăescu, C.; Barbărasă, I., "GC-Olfactometry: An Useful Tool for Flavor Analysis", *IInd International Conference on Ecological Chemistry*, 11-12 octombrie **2002**, Chișinău, pp 22-29.
- Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Păunescu, V.; Tatu, C.; Ordodi, V.L.; Bandur, G.; Lupea, A.X., "Multivariate Analysis in the Essential Oil/ β -Cyclodextrin Complex Class", *Proceedings of the 8th International Conference ISIRR*, Szeged, Hungary, April 19-21, **2005**, *accepted for presentation*.
- Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Lupea, A.X.; Păunescu, V.; Tatu, C.; Ordodi, L.; Bandur, G., "Bioactive Nanoparticles (7). Essential Oil from Apiaceae and Pinaceae Family Plants/ β -Cyclodextrin Supramolecular Systems", *Revista de Chimie* **2005**, *in press*.
- Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Păunescu, V.; Tatu, C.; Ordodi, V.L.; Bandur, G.; Lupea, A.X., "Bioactive Nanoparticles (6). Thermal Stability of the Linoleic Acid/ α - and β -Cyclodextrin Complexes", *Food Chemistry* **2004**, *submitted for publication*.
- Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Bandur, G.; Lupea, A.X.; Păunescu, V.; Tatu, C.; Ordodi, L., "Thermal Analysis and Molecular Modeling of the Fatty Acid/ β -Cyclodextrin Supramolecular Systems", *Journal of Thermal Analysis & Calorimetry* **2005**, *submitted for publication*.

CURRICULUM VITAE

NICOLETA-GABRIELA HĂDĂRUGĂ

Master of Science

300501-Timișoara, Letea 14, RO

Date & Place of Birth: 1971, October 13 – Baia de Arieș, Alba, RO

PROFESSIONAL PROFILE

- Dynamic communicator with good teaching, mentoring, relationship-building, and problem-solving abilities
- Experienced researcher with extensive training and expertise in the isolation, purification, and semi-synthesis of the odorant and/or flavoring compounds (perfumes and aromas), nanoencapsulation of the bioactive compounds
- Possess solid knowledge on the physico-chemical (GC-FID, GC-MS, HPLC) and statistical (ANOVA and multivariate analysis-PCA) analyses
- Computer-proficient in Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft PowerPoint, Microsoft Visio, Adobe Acrobat, advanced chemistry software (Advances Chemistry Development package, HyperChem package, Isis Base&Draw package), statistics software (Statistica package, TableCurve package, Origin), and Web browsers
- Dedicated scientist with exceptional organizational, troubleshooting, and problem-solving skills

EDUCATION

- **Master of Science (MS), Engineering, Agro-Food Products**, Banat's University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine-Timișoara, Romania, June 1999
- **Bachelor of Science, Engineering, Food Products Technology**, Banat's University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine-Timișoara, Romania, June 1998

ACADEMIC TEACHING EXPERIENCE

- **Teaching Assistant**, Food Quality Department, Banat's University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine-Timișoara, Romania, Decembre 1998 to present
 - ◆ Flavors and flavoring systems
 - ◆ Spices
 - ◆ Natural extracts and natural food additives
 - ◆ Bioflavors

PROFESSIONAL AFFILIATIONS&ACTIVITIES

- **The Romanian Chemistry Society**, member from 2004
- **The Association for Multidisciplinary Research from the West Side of Romania**, member from 2000
- **Member of the Organization Comitee**, The 6th International Symposium Young People and the Multidisciplinary Research, Timișoara, Romania, September 2004

PUBLICATIONS

○ BOOKS

- ◆ Hădărugă, D.I.; **Hădărugă, N.G.**, *Odorant and Flavoring Compounds*, Politehnica, Timișoara, 2003, 254 pp, ISBN 973-625-038-5
- ◆ **Hădărugă, N.G.**; Hădărugă, D.I. *Natural Flavors: Maillard Reaction Flavors, Bioflavors, and Encapsulated Flavors*, Augusta, Timișoara, 2004, 120 p, ISBN 973-695-078-6
- ◆ Olah, M.; Mracec, Maria.; Ostopovici, Liliana; Rad, Ramona; Bora, Alina; **Hădărugă, Nicoleta G.**; Olah, Ionela; Banda, Magdalena; Simon, Z.; Mracec, M.; Oprea, T.I., "WOMBAT: World of Molecular Bioactivity". In: Oprea, T.I. (ed.), *Cheminformatics in Drug Discovery*, Wiley-VCH, New York, 2004, pp. 223-239

○ JOURNAL PAPERS

- ◆ **Hădărugă, N.G.**; Hădărugă, D.I.; Lupea, A.X.; Bandur, G., "Bioactive Nanoparticles (1). The Complexation of the Essential Oil of Garlic with β -Cyclodextrin", *Scientifical Researches. Agroalimentary Processes and Technologies* **2004**, *10*, 121-127, ISSN 1453-1399
- ◆ **Hădărugă, N.G.**; Hădărugă, D.I.; Bandur, G.; Lupea, A.X.; Knejevici, F.; Andrei, V.; Raba, D., "Bioactive Nanoparticles (2). The Complexation of the Caraway Essential Oil with β -Cyclodextrin", *Scientifical Researches. Agroalimentary Processes and Technologies* **2004**, *10*, 128-134, ISSN 1453-1399
- ◆ **Hădărugă, N.G.**; Hădărugă, D.I.; Lupea, A.X.; Bandur, G.; Mișcă, C.; Ghiulai, M.; Rinovetz, A.; Radoslavievici, D.S., "Bioactive Nanoparticles (3). The Complexation of the Lemon Essential Oil with β -Cyclodextrin", *Scientifical Researches. Agroalimentary Processes and Technologies* **2004**, *10*, 135-141, ISSN 1453-1399
- ◆ Hegheș, A.; Ghiran, D.; **Hădărugă, N.G.**; Seiman, C.; Hădărugă, D.I.; Ciubotariu, D., "Quinolone Derivatives with Antibacterial Activity. A MTD Approach", *Rev. Med. Farm.* **2004**, *50*, 154-158
- ◆ **Hădărugă, N.G.**; Hădărugă, D.I.; Lupea, A.X.; Păunescu, V.; Tatu, C.; Ordodi, L.; Bandur, G., "Bioactive Nanoparticles (7). Essential Oil from Apiaceae and Pinaceae Family Plants/ β -Cyclodextrin Supramolecular Systems", *Revista de Chimie* **2005**, *in press*.

○ PROCEEDINGS

- ◆ Hădărugă, D.I.; **Hădărugă, N. G.**; Mureșan, S.; Dăescu, C.; Barbărasă, I., "GC-Olfactometry: An Useful Tool for Flavor Analysis", *Proceedings of the 11th International Conference on Ecological Chemistry 2002*, October 11-12, Chișinău, Republic of Moldova, pp 22-29, ISBN 9975-67-310-4
- ◆ **Hădărugă, N. G.**; Hădărugă, D.I.; Bandur, G.; Lupea, A.X., "The Complexation of α - and β -Cyclodextrin with Odorant Compounds", *Proceedings of the 5th International Symposium "Young People and the Multidisciplinary Research" 2003*, November 6-7, Timișoara, Romania, pp 494-501, ISBN 973-8359-18-X
- ◆ **Hădărugă, N.G.**; Hădărugă, D.I.; Negrea, P.; Alexa, E.C.; Beche, D.; Ciopec, M.P., "The Quality of Parsley (*Petroselinum sativum* Hoffm.) from the West Side of Romania", *Proceedings of the 5th International Symposium "Young People and the Multidisciplinary Research" 2003*, November 6-7, Timișoara, Romania, pp 502-509, ISBN 973-8359-18-X
- ◆ **Hădărugă, N.G.**; Hădărugă, D.I.; Bandur, G.; Lupea, A.X.; Tatu, C.; Ordodi, V.L., "Bioactive Nanoparticles (4). The Complexation of the Essential Oils from the *Lamiaceae* Family Plants with β -Cyclodextrin", *Proceedings of the 6th International Symposium "Young People and the Multidisciplinary Research" 2004*, September 23-24, Timișoara, Romania, pp 635-644, ISBN 973-8359-26-0
- ◆ Hădărugă, D.I.; **Hădărugă, N.G.**; Bandur, G.; Lupea, A.X.; Tatu, C.; Ordodi, V.L., "Bioactive Nanoparticles (5). Thermal Stability of the Oleic Acid / α - and β -Cyclodextrin Complexes", *Proceedings of the 6th International Symposium "Young People and the Multidisciplinary Research" 2004*, September 23-24, Timișoara, Romania, pp 645-652, ISBN 973-8359-26-0.
- ◆ Oprea, T.I.; Kappler, M.A.; Allu, T.K.; Mracec, Maria; Olah, M.; Rad, Ramona; Ostopovici, Liliana; Bora, Alina; **Hădărugă, Nicoleta G.**; Baroni, M.; Zamora, I.; Berellini, G.; Aristei, Yasmin; Cruciani, Gabrielle; Bologa, C.G.; Edwards, B.S.; Sklar, L.A.; Balakin, K.V.; Savchuk, N.; Brown, D.; Larson, R.S., "Mining Large Chemical Spaces in Lead and Drug Discovery", *Proceedings of the 15th European Symposium on Quantitative Structure-Activity Relationships & Molecular Modelling "QSAR & Molecular Modelling in Rational Design of Bioactive Molecules"*, Istanbul, Turkey, September 5-10, **2004**, 6 pp., *in press*.
- ◆ **Hădărugă, N.G.**; Hădărugă, D.I.; Păunescu, V.; Tatu, C.; Ordodi, V.L.; Bandur, G.; Lupea, A.X., "Multivariate Analysis in the Essential Oil/ β -Cyclodextrin Complex Class", *Proceedings of the 8th International Conference ISIRR*, Szeged, Hungary, April 19-21, **2005**, *accepted for presentation*.
- ◆ Oprea, T.I.; Olah, M.; Mracec, Maria; Rad, Ramona; Ostopovici, Ramona; Bora, Alina; **Hădărugă, Nicoleta G.**; Bologa, C.G., "Mapping Bioactivity Space for Fragment-Based Lead Discovery", *Proceedings of the 229th American Chemical Society National Meeting*, San Diego, CA, March 13-17, **2005**, *accepted for presentation*.

○ **GRANTS**

- ◆ **STRUCTURE-PROPERTY RELATIONSHIPS IN THE ODORANT COMPOUND CLASS**, Ministry of National Education, AT N° 20, CNCSIS code 37, contr. N° 35034 / 2000 (member of the research team)
- ◆ **ODORANT AND FLAVORING COMPOUNDS: MOLECULAR MODELING, MULTIVARIATE ANALYSIS, QSAR**, Education & Research Ministry (member of the research team)
 - AT N° 3, CNCSIS code 30, contr. N° 33501 / 2002
 - AT N° 14, CNCSIS code 2, contr. N° 33550 / 2003
- ◆ **BIOACTIVE NANOCAPSULES: CYCLODEXTRIN-BIOMOLECULE SYSTEMS**, Education & Research Ministry, AT N° 3, CNCSIS code 25, contr. N° 32940 / 2004 (member of the research team)
- ◆ **STUDIES REGARDING THE NATURAL COMPOUNDS STABILITY BY NANOENCAPSULATION**, Education & Research Ministry, A N° 10, CNCSIS code 48, contr. N° 33370 / 2004 (member of the research team)

TIMIȘOARA
2005, FEBRUARY 15

NICOLETA HĂDĂRUGĂ, MS