

**DESIGN DE PRODUS FARMACEUTIC PE BAZA
DE ULEI DE CAMELINA - PLANTA
OLEAGINOASA MULTIPOTENTA**

DESIGN DE BIOPRODUS DE UZ TOPIC

Director proiect : CS I, Prof. Univ. Dr. Natalia Rosoiu



Membru titular al Academiei Oamenilor de Știință din Romania

Doctorand farm. Cristina Danaila



RAPORT FINAL – Noiembrie 2019

CUPRINS

CAPITOLUL I: STUDII PRIVIND UTILIZAREA ULEIULUI DE CAMELINA IN FORMULARI DERMATOCOSMETICE	3
CAPITOLUL II: STUDII DE FORMULARE PENTRU PRODUSUL: LOTIUNE DE PLAJA PE BAZA DE ULEI DE CAMELINA; DETERMINAREA FACTORULUI DE PROTECTIE SOLARA (SPF) PENTRU ULEIUL DE CAMELINA	6
II.2. DETERMINAREA SPF PENTRU ULEIUL DE CAMELINA.....	6
CAPITOLUL III: TESTAREA EFICACITATII ULEIULUI DE CAMELINA	9

CAPITOLUL I: STUDII PRIVIND UTILIZAREA ULEIULUI DE CAMELINA IN FORMULARI DERMATOCOSMETICE

Camelina sativa este o plantă anuală, aparținând fam. *Brassicaceae*, originară din S-E Europei și S-V Asiei. Pe lângă utilizările din domeniul biocombustibililor, uleiul de camelină poate fi purificat prin procese tehnologice specifice și valorificat pentru obținerea de produse cu destinații diferite: suplimente alimentare, ingrediente pentru hrana animalelor, produse dermatocosmetice și farmaceutice. Scopul proiectului vizează evidențierea analitică de compoziție și corelarea cu efecte la nivel celular și molecular, precum și determinarea capacității fotoprotectoare a uleiului de camelină în vederea obținerii unui preparat dermatocosmetic. Stabilirea unui design de produs va reprezenta o etapă importantă pentru dezvoltarea unui preparat dermatocosmetic. Pentru obținerea uleiului presat la rece, se va utiliza camelina ecologică - materie primă pentru prototipul vizat.

Camelina este o plantă din ale cărei semințe se obține un ulei de calitate superioară din punct de vedere al compoziției. Acesta prezintă o fracție saponificabilă reprezentată de acizi grași, dintre care cei polinesaturați se găsesc în proporție mai mare de 55% și o fracție nesaponificabilă reprezentată de steroli și tocoferoli. Profilul acizilor grași, principalii componenți din uleiul de camelină, prezintă acidul linolenic ca fiind componetul major -28.0-50.3% , urmat de acidul linoleic -16.0-22.4%, acidul oleic- 14.9-18.7%, acidul eicosenoic- 11.6-17.5%. (Shukla și colab., 2002; Abramovič și Abram, 2005; Moser și colab., 2010; Jurcoane și colab., 2011; Toncea și colab., 2013; Katar, 2013; Belayneh și colab., 2015). Conținutul total de tocoferoli raportat de cercetători diferiți este cuprins între 634-780 mg/kg. (Belayneh și colab., 2015). Principalii steroli din uleiul de camelină sunt: colesterol (188 ppm), brasicasterol (133 ppm), campesterol (893 ppm), stigmasterol (103 ppm), sitosterol (1884 ppm), Δ 5-avenasterol (393 ppm). Uleiul de camelină are un conținut de colesterol mai mare chiar și decât cel al plantelor recunoscute ca fiind bogate în colesterol, precum și o cantitate ridicată de brasicasterol. (Shukla și colab., 2002). Importanța acizilor grași esențiali omega-3 (acidul linolenic) și omega-6 (acidul linoleic) pentru sănătatea pielii a fost adusă în atenție pentru prima dată de Burr și Burr, în 1929, când au demonstrat că starea de deteriorare a pielii generată de absența lipidelor din dietă, caracterizată de erupții cutanate eritematoase, descumare, pierdere ridicată de apă la nivel transepidermic, a fost îmbunătățită prin administrarea de omega-3 și omega-6 (McCusker, 2010).

Pe langa efectele pe care le are administrarea orală a uleiului de camelină utilizat ca supliment alimentar, exista si studii ce confirma actiunea principalilor sai compusi la nivel dermo-epidermic:

Acidului linoleic: regenerarea țesuturilor (Zheng, 2005; Menis Ferreira, 2011); implicare în procesul de transport al lipidelor la nivel membranal (Zheng, 2005; Menis Ferreira, 2011); protejare împotriva agenților chimici și enzimatici (Zheng, 2005; Menis Ferreira, 2011); restaurarea barierei de permeabilitate a stratului cornos (McCusker, 2010);

Acidului linolenic: efect de iluminare a pielii (Ando și colab., 1998); restaurarea barierei de permeabilitate a pielii (McCusker, 2010);

EPA și DHA, compuși rezultați în urma metabolizării acidului linolenic: EPA- reducerea îngroșării pielii și inhibarea scăderii colagenului determinate de expunerea la lumină UV (inhibare metaloproteinaze- MMP-1 și MMP-9) (Kim, 2006); EPA- creșterea exprimării fibrelor de colagen și a fibrelor elastice (stimularea exprimării TGF- β) (Kim, 2006); EPA și DHA- reducerea inflamației generate în urma expunerii la UV (efect inhibitor împotriva eritemului indus de UVB) (Puglia și colab., 2005);

Vitamina E (γ -tocoferol): previne arsurile solare (eritem, inflamație, edem) aplicat consecutiv expunerii UV (Yasuoka, 2005); previne formarea edemului, inflamației aplicat înainte de expunerea la UV (Yasuoka, 2005); efectul antioxidant protector (Sivamani și colab., 2015); efect antiinflamator (Yoshida, 2006)

Fitosteroli: creșterea hidratării (conductanței)-colesterol și ester de colesterol aplicați pe piele iritată (Imokawa și colab., 1986); accelerarea procesului de vindecare și reducere a cicatricilor- β -sitosterolul (Atiyeh, 2002); refacerea funcției de barieră a pielii (susținută de diminuarea pierderii de apă)- β -sitosterolul (Atiyeh, 2002); potențial anti-inflamator- β -sitosterolul (Peniagua-Pérez, 2017); inhibă inflamația acută –stigmasterolul (Garcia și colab., 1999); reducerea gradul de iritare al pielii (scăderea pierderii transepidermice de apă, scăderea fluxului de sânge)-fracție îmbogățită cu steroli (β -sitosterol, campesterol, brasicasterol) (Lodén și Andersson, 1996); blocarea reducerii sintezei de colagen consecutiv expunerii UV (fitosteroli+ceramide) (Grether-Beck și colab.,2008); potențial de stimulare a sintezei de colagen (fitosteroli+ceramide) (Grether-Beck și colab.,2008); creșterea hidratării pielii

(fitosteroli+lignani) (Vettar și colab., 2006); reducerea nivelului de enzime implicate în degradarea colagenului (precum MMP-1)-diosgenină, stigmasterol și β -sitosterol (Chiang, 2012).

Alegerea culturii de camelină ca planta oleaginoasă al cărei ulei este ulterior valorificat are la bază și o serie de argumente agro-economice cum ar fi:

- cultura de camelină prezintă adaptabilitate crescută la condițiile climatice: temperate, medii semi-aride, regiuni cu anotimpuri scurte, îngheț și secetă (Ehrensing și Guy, 2008).
- camelina poate fi cultivată pe soluri ușoare, nisipoase, sărace în nutrienți, soluri saline sau cu fertilitate scăzută, chiar pe terenuri marginale, de calitate inferioară, aflate în zone cu un nivel ridicat de poluare (ex. Copșa Mică).
- cultura are costuri de întreținere și de înființare scăzute -cheltuielile de înființare a unui hectar de camelină se situează sub 1000 lei, fiind mai mici decât cele necesare pentru culturile de grâu și rapiță. (MADR, 2014);
- culturile de camelină prezintă rezistență deosebită la daunători și buruieni.
- camelina are un ciclu de viață scăzut (85-105 zile), ceea ce permite cultivarea acesteia în rotație cu alte plante. (Dobre și colab., 2011)

CAPITOLUL II: STUDII DE FORMULARE PENTRU PRODUSUL: LOTIUNE DE PLAJA PE BAZA DE ULEI DE CAMELINA; DETERMINAREA FACTORULUI DE PROTECTIE SOLARA (SPF) PENTRU ULEIUL DE CAMELINA

II.2. DETERMINAREA SPF PENTRU ULEIUL DE CAMELINA

Pentru analizarea capacității fotoprotectoare a uleiului de camelina s-au preparat 10 probe, soluții de ulei de camelină în hexan de concentrații cuprinse între 1 și 10%.

Am înregistrat spectrele de absorbție al probelor în domeniul 290-320 nm, la spectrofotometru UV-VIS, în cuva de 1 cm, față de hexan. Am notat valorile absorbanțelor din 2 în 2 nm.

Pentru calculul factorului de protecție am utilizat ecuația:

$$SPF = 10 \sum_{290}^{320} F(\lambda) * Abs(\lambda) \text{ unde,}$$

SPF – factorul de protecție solară determinat prin spectrofotometrie

F – factorul de corecție ale cărui valori depind de lungimea de undă

Abs – absorbanta soluției înregistrată la o anumită lungime de undă (λ)

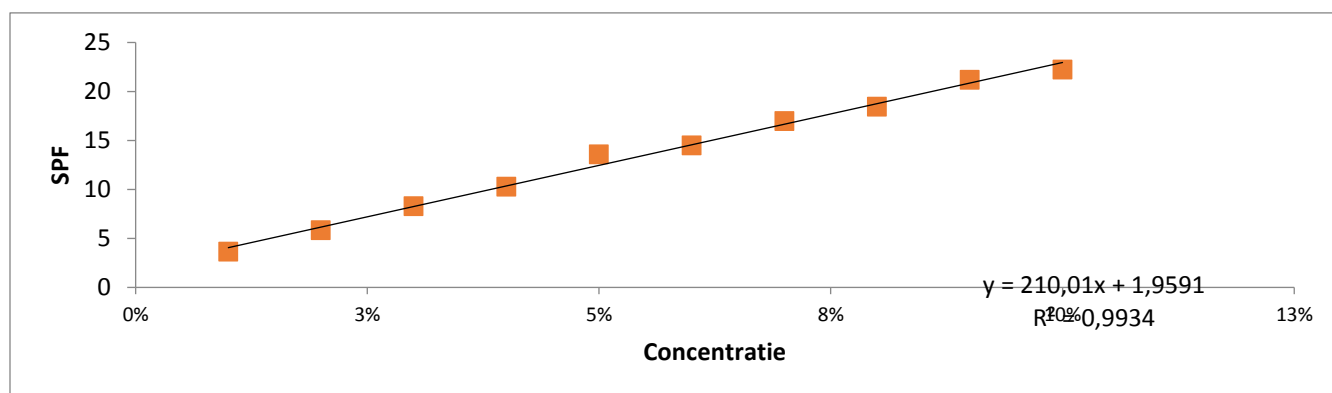
Valorile factorului de corecție F, la diferite lungimi de undă

Lungime de undă, λ, nm	F
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0837
320	0,0180

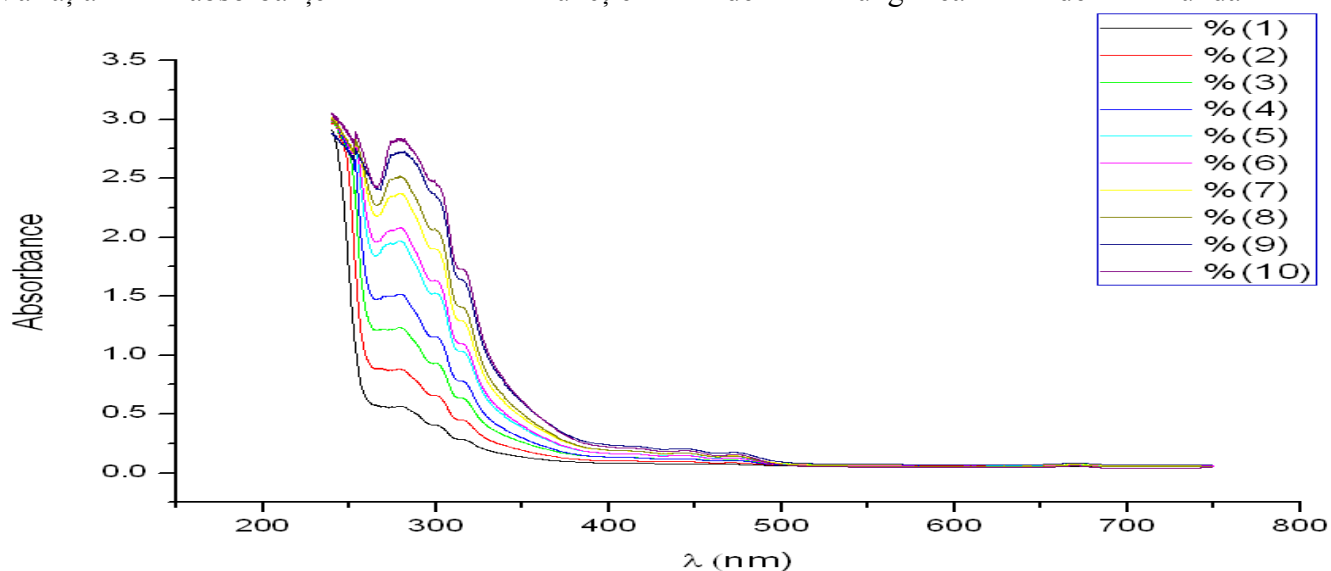
Valorile SPF la concentrații cuprinse între 1 și 10% sunt

Concentrație	SPF
1%	3.657678
2%	5.856703
3%	8.294034
4%	10.28616
5%	13.60183
6%	14.51623
7%	16.97487
8%	18.45847
9%	21.21408
10%	22.23692

Variația SPF în funcție de concentrație



Variația absorbanței în funcție de lungimea de undă



Analiza de regresie confirmă existența unei relații de liniaritate semnificativă între concentrație și SPF, în plus (RSquare = 0.9967). Factorul de protecție solară determinat cu ajutorul ecuației Mansur et al (1986) indică valori cuprinse între 3.65 și 22.32 ceea ce indică posibilitatea utilizării uleiului de camelină în formulări dermatocosmetice pentru protecție solară, prin urmare vom continua studiile în acest sens.

CAPITOLUL III: TESTAREA EFICACITATII ULEIULUI DE CAMELINA

Determinarea capacității antioxidante totale a uleiului de camelină, prin metoda fotochemiluminescenței

Determinarea cantitativă a eficienței antioxidantilor este într-o continuă creștere din punct de vedere al importanței ei. Antioxidanții sunt acum folosiți în diverse domenii mai ales în domeniul alimentar, industria farmaceutică și cosmetică pentru conservarea și protecția produselor.

Aplicațiile în aceste domenii includ atât analize de cercetare cât și uzuale ale produșilor finali sau a celor în stare brută privind monitorizarea calității. Criteriul important pentru utilitatea unei metode include timpul necesar al analizei respective cât și al pregătirii probei, cât și varietatea de probe ce poate fi măsurată cu această tehnică.

Multe din tehnicile cunoscute pentru determinarea antioxidantilor sunt greu aplicabile datorită modului laborios de preparare al probelor, timpilor mari de analiză sau necesitatea solubilității probelor pentru analiză. Cu tehnica de fotochemiluminescență încorporată în sistemul Photochem, atât antioxidantii solubili în apă cât și în lipide pot fi măsurați în câteva minute fără o preparare laborioasă a probelor.

Metoda fotochemiluminescenței (Metoda PCL)

Analytik Jena AG, Germania, a facut disponibil un sistem ce poate măsura capacitatea integrală antioxidantă (CIA) a unui amestec de substanțe, ce poate fi găsit în plasma sangvină, alimente, cosmetice și produse farmaceutice.

Prezentarea aparatului PHOTOCHEM, Analytik Jena AG, Germania



Caracteristici tehnice aparat:

- Principiul aparatului: se bazează pe metoda fotochemiluminescenței: excitarea fotochimică a probei duce la o creștere accelerată a reacțiilor de până la 100 de ori față de condițiile normale;
- Sursa de excitare: Lampă cu vapori Hg, cu strat de fosfor; Maximum de excitație la lungimea de undă de 351 nm;
- Detector: PMT (tub fotomultiplicator) cu mai multe domenii;
- Pompe peristaltice: capacitate de debit mare;
- Furtune: PTFE;

Finețe	Substanțe anti-oxidative non-enzimatice: Concentrația nanomolară
Timpi de măsurare	≤ 3 min
Reproductibilitate	CV 2-5 % (Trolox®)

MATERIAL ȘI METODĂ

Principiul de măsurare

Prin excitația optică (expunerea) a unei substanțe fotosensibile adăugată în volume standardizate la eșantionul care trebuie măsurat, se produc radicali. Acești radicali vor fi parțial eliminați prin reacție cu antioxidanții prezenți în eșantion. Radicalii reziduali fac substanța detectoare Luminol să strălucească. Luminiscenta se determină apoi cu precizie într-o celulă separată, cu ajutorul unui tub fotomultiplicator (PMT).

Semnalul de măsurare produs de luminiscentă este urmărit într-o perioadă selectabilă (2 min). În funcție de sistemul de măsurare, curbele de măsură indică un comportament variat. Capacitatea antioxidantă măsurată a eșantionului se poate menționa în unități echivalente ale substanței de calibrare. Principiul de măsurare constă în faptul că antioxidanții prezenți în probă elimină o parte din radicalii din soluția de analizat și astfel reduc intensitatea fluorescenței. O parte din radicali rămân în final în probă, urmând a se combina. Reactivul fotochimic sensibil rămas în probă care, în absența sursei de excitare externă are rol de detector de radicali liberi, se combină cu aceștia, iar în urma reacției chimice se emite o cantitate de lumină care este captată, amplificată și detectată de fotomultiplicator și transformată în curent electric care este măsurat.

Se măsoară capacitatea antioxidantă totală din semnalul electric al aparatului (în V) care este convertit în valori de concentrație.

Componentele kitului de reactivi pentru procedeul ACL (*Antioxidant Capacity in Lipids-soluble substances*), Analytik Jena, AG, Germany și schema de lucru, sunt

- R₁: solvent metanol pentru procedura ACL
- R₂: soluția tampon
- R₃: PS-1 Soluție stoc (fotosensibilizator și reactiv de detectare), 250 μL / flacon care se dizolvă în 750 μL R₂
- R₄: substanța de calibrare standard pentru cuantificarea antioxidantilor liposolubili, în echivalenți de Trolox.

Volume de lucru, conform Kit-ului de reactivi pentru procedeul ACL (*Antioxidant Capacity in Lipids-soluble substances*), Analytik Jena, AG, Germany

Reactiv	R₁	R₂	R₃	R₄	Proba
Blank	2.300	200	25	0	0
Calibrare	2.300 - x	200	25	x	0
Masurare	2.300 - y	200	25	0	y

Inițial, are loc expunerea la lumină a substanței generatoare de radicali prezentă în probă prin introducerea reactivului respectiv de lucru (R₃), sensibil la lumină și temperatură (reactivul se păstrează numai la -18 °C), apoi se emite cuanta luminoasă detectată de fotomultiplicator.

Reactivul fotosensibil (R₃) îndeplinește următoarele roluri:

- formează radicalii liberi (este generator de radicali liberi);
- reacționează cu radicalii rămași (este detector de radicali).

Sursa externă de lumină este lampa de mercur, captușită cu fosfor, care asigură energie maximă la lungimea de undă de 351 nm.

Capacitatea antioxidantă măsurată este apoi cuantificată prin compararea cu substanța standard folosită la calibrare, *TROLOX* - derivat de vitamina E, este denumirea comercială Hoffman-LaRoche pentru 6-hidroxi-2,5,7,8-Acid tetrametilcroman-2-carboxilic. Este un antioxidant, cum ar fi vitamina E și este folosit în aplicații biologice sau biochimice pentru a reduce stresul oxidativ sau deteriorarea celulelor.

Testul echivalent de capacitate antioxidantă (*TEAC*) este un indicator al puterii antioxidante pe bază Trolox, măsurată în unități echivalente Trolox (*TE*). Datorită dificultăților de măsurare a componentelor antioxidante individuale dintr-un amestec complex, echivalența Trolox este utilizată ca punct de referință pentru capacitatea antioxidantă a unui astfel de amestec, nmoli / volum probă (μL)

➤ **Determinarea capacității antioxidante totale (*TEAC*) pentru uleiul vegetal**

Evaluarea comparativă a capacității antioxidante totale s-a realizat pentru un număr de 6 probe de ulei de camelină și respectiv pentru diluțiile acestuia de 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, cu metanol - reactivul de lucru R_1 al metodei ACL, Analytik Jena AG și au fost repetate în triplicate, iar rezultatele prezentate figurează ca valori medii ale celor trei măsurători.

Înainte de măsurare, probele s-au omogenizat rapid cu ajutorul unui agitator magnetic Vortex Velp Scientifica, Italy, în faza de metanol, iar din supernatant s-au luat volume de 5 -10 μL probă pentru măsurători.

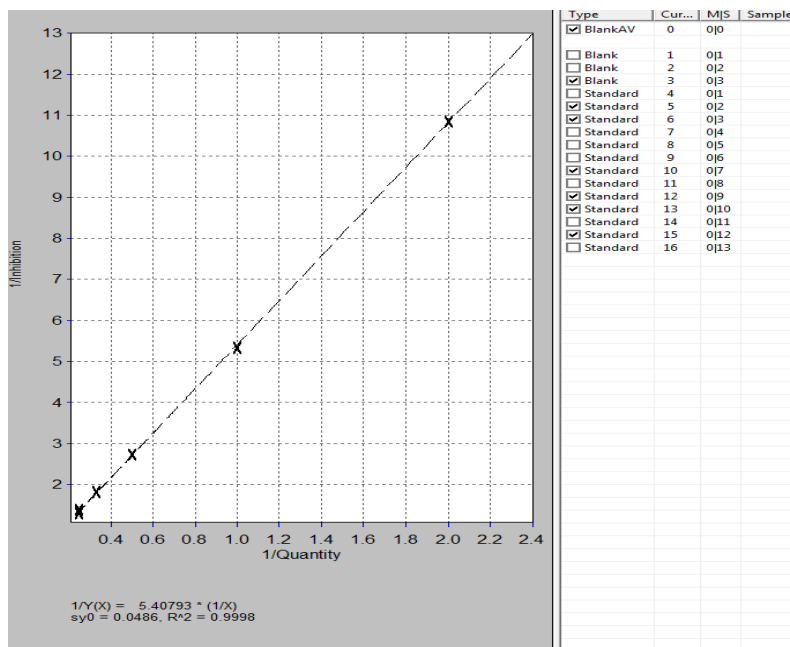
Evaluarea capacității antioxidante totale a extractelor hidroalcoolice vegetale s-a realizat cu ajutorul aparatului fotochemiluminometru PHOTOCHEM, Analytik Jena AG, Germany, cuplat la PC prevăzut cu soft pentru interpretarea datelor. Fiecare determinare a durat câte 120 secunde.

Calcul

Pentru calculul și interpretarea rezultatelor sunt folosiți algoritmi matematici superiori încorporați.

$$\text{Capacitatea antioxidantă totală (TEAC) } [\mu\text{g/mg}] = \text{Cantitate} \times \text{Factor de diluție} \times M \times \text{Volum extracție} / \text{Volum pipetat} \times \text{Masa probei inițiale}$$

Cantitate:	nmoli (echivalenți Trolox)
M:	Masa molară Trolox (250,3 ng/nmol)
Volum pipetat:	Volum de probă luat în lucru [μL]
Masă probă:	Masa inițială a probei [mg]
Volum extracție:	Volum de solvent de extracție [mL]
Diluție:	(pentru probele la care s-a făcut diluție în lucru, ex. factor de diluție =100)



Curba de calibrare pentru substanța standard Trolox, procedeul ACL, Analytik Jena AG

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Valorile medii ale rezultatelor înregistrate privind capacitatea antioxidantă totală (*TEAC*) a uleiului de camelină în hexan, sunt prezentate în următorul tabel.

Capacitatea antioxidantă totală (*TEAC*) a uleiului de camelină în hexan, sol. stoc și diluții

Nr. crt.	Tipul probei	Volum de probă luat în lucru (μL)	Inhibiție maximă radicali liberi	Cantitate (<i>TEAC</i>) (nmol echiv. Trolox/vol. probă)
1	Ulei de camelină în hexan, sol. stoc	10	1.000	8.901 Concentrație prea mare, depășește curba de calibrare
2	Ulei de camelină în hexan, sol. stoc	5	0.935	7.159 Concentrație prea mare, depășește curba de calibrare
3	Ulei de camelină în hexan,	5	0.740	4.350

diluție 1:10 cu R ₁				
4	Ulei de camelină în hexan,	5	0.629	3.417
diluție 1:20 cu R ₁				
5	Ulei de camelină în hexan,	5	0.506	2.738
diluție 1:50 cu R ₁				
6	Ulei de camelină în hexan,	5	0.321	1.764
diluție 1:100 cu R ₁				

În urma rezultatelor obținute s-au observat următoarele:

- Pentru soluția stoc de ulei de camelină, atât la volumul de lucru 10 μL , cât și la 5 μL , s-au înregistrat valori prea ridicate ale capacității antioxidante totale care au depășit curba de calibrare a aparatului, în consecință proba de ulei a necesitat diluții în rapoarte molare 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, cu metanol - reactivul de lucru R₁, conform procedurii ACL.
- La volumul minim de lucru de 5 μL , s-au înregistrat valori optime ale capacității antioxidante totale (*TEAC*) în cazul uleiului de camelină pentru toate diluțiile aplicate, valorile fiind cuprinse între 4.350 nmol echiv. Trolox/vol. probă și 1.764 nmol echiv. Trolox/vol. probă.
- S-a observat că la o diluție a probei mai mare de 1:100 cu metanol - reactivul de lucru R₁, pentru același volum de lucru de 5 μL , valorile înregistrate pentru capacitatea antioxidantă totală au fost prea scăzute, situându-se sub curba de calibrare a aparatului.