

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“IULIU HAȚIEGANU” CLUJ NAPOCA
FACULTATEA DE FARMACIE**

**INFLUENȚA UNOR VITAMINE, ACIZI GRAȘI POLINESATURAȚI
ȘI ALȚI COMPUȘI (IMUNOGLOBULINE ȘI LACTOFERINĂ) DIN
LACTAȚIA UNOR BOVINE ASUPRA CALITĂȚII LAPTELUI
PRAF PENTRU SUGARI**

- Rezumatul tezei de doctorat -

Doctorand:

Ing. Chim. BAR ELENA

Conducator Științific:

Prof. dr. BOJIȚĂ MARIUȘ

**Cluj Napoca,
2011**

CUPRINS

PARTEA I. STADIUL CUNOAȘTERII

I. Date din literatură referitoare la compoziția laptelui colostru – descrierea principalelor componente

1.1	Vitamine liposolubile	5
1.1.1.	Vitamina A	5
1.1.2.	Vitamina E	10
1.1.3.	Vitamina D	12
1.2.	Vitamine hidrosolubile	14
1.2.1.	Vitamina B ₁	14
1.2.2.	Vitamina B ₂	19
1.2.3.	Vitamina B ₆	20
1.2.4.	Vitamina C	22
1.3.	Lactoferina	23
1.4.	Imunoglobuline	25
1.4.1.	Imunoglobulina A (IgA)	29
1.4.2.	Imunoglobulina G (IgG)	30
1.4.3.	Imunoglobulina M (IgM)	31
1.4.4.	Imunoglobulina D (IgD)	31
1.4.5.	Imunoglobulina E (IgE)	32
1.5.	Acizi grași polinesaturași (Acidul linoleic și Acidul alfa-linolenic)	32
1.6.	Informații generale despre colostru	36
1.6.1.	Definiții ale colostrului – legal versus actual	40
1.6.2.	Acțiunea imunostimulatoare și imunomodulatoare	40

PARTEA a II a. CONTRIBUȚII PERSONALE

II. Studiu comparativ al compoziției fizico-chimice a colostrului bovin de la diferite rase de animale

2.1.	Intocmirea unui protocol de lucru	42
2.2.	Prelevarea probelor, colectarea probelor de colostru bovin	42
2.3.	Recepția materiei prime și analiza calitativă inițială	44
2.4.	Analize fizico-chimice efectuate	44
2.4.1.	Metode de analiză	45
2.4.2.	Materiale și aparatură	49
2.4.3.	Rezultate obținute	51
2.5.	Dozarea conținutului de lactoferină	62
2.5.1.	Metoda de lucru utilizată	62
2.5.2.	Materiale și aparatură	62
2.5.3.	Rezultate obținute	63
2.6.	Determinarea conținutului de imunoglobuline (IgG)	69
2.6.1.	Metoda de lucru utilizată	69
2.6.2.	Materiale și aparatură	69
2.6.3.	Rezultate obținute	70
2.7.	Concluzii	77

III. Studiul influenței unor factori externi asupra compoziției colostrului bovin lichid	78
3.1. Influenta temperaturii	78
3.1.1. Modul de lucru	78
3.1.2. Materiale si aparatură	78
3.1.3. Rezultate obținute	79
3.2. Influența altor etape de procesare	81
3.2.1. Modul de lucru	81
3.2.2. Materiale si aparatură	81
3.2.3. Rezultate obținute	81
3.3. Concluzii	82
IV. Stabilirea unei relații matematice între imunoglobuline, lactoferină și densitatea produsului	83
4.1. Necesitatea utilizării acestei corelații matematice	83
4.2. Stabilirea unui protocol de lucru	85
4.3. Metode de lucru	86
4.4. Materiale si aparatură	87
4.5. Rezultate si discuții	87
4.6. Concluzii: Aplicabilitatea în practică – utilizarea colostrometrului	91
V. Fabricarea produsului pulbere și caracterizarea fizico-chimică a acestuia	92
5.1. Descrierea procesului de liofilizare	92
5.1.1. Etapa de congelare sau freezing	93
5.1.2. Etapa de uscare primară sau primary drying	93
5.1.3. Etapa de uscare secundară sau secondary drying	94
5.2. Fabricația colostrului pulbere - descriere	94
5.3. Caracterizarea fizico-chimică a produsului obținut	97
5.4. Analize fizico-chimice de rutină efectuate	100
5.4.1. Metode de analiză	100
5.4.2. Materiale si aparatură	100
5.4.3. Rezultate obținute	101
5.5. Dozarea conținutului de minerale	104
5.5.1. Metode de analiză	104
5.5.2. Materiale si aparatură	104
5.5.3. Rezultate obținute	105
5.6. Conținutul de imunoglobuline și lactoferină	108
5.6.1. Metode de analiză	108
5.6.2. Materiale si aparatură	108
5.6.3. Rezultate obținute	108
5.7. Concluzii	109
VI. Granularea colostrului pulbere obținut prin liofilizare	110
6.1. Stabilirea unui protocol de lucru	110
6.2. Teste de granulare	112
6.2.1. Evaluarea inițială a pulberii obținute	112
6.2.1. Descrierea metodelor de lucru	113
6.2.2. Materiale si aparatură	115
6.3. Rezultate obținute	116
6.3.1. Primul set de formulări	116

6.3.2. Studiu comparativ – dozarea proteinei prin metoda Kjeldalh si metoda Lowry	120
6.3.3. Setul al doilea de formulări	123
6.4. Concluzii	127
VII. Studiu de stabilitate a produsului finit pulbere și a unor comprimate care conțin colostru bovin liofilizat	128
7.1. Stabilirea unui protocol de lucru	128
7.1.1. Produse supuse testării	128
7.1.2. Compoziția produselor supuse testării	130
7.1.3. Ambalarea produselor	131
7.1.4. Condiții de păstrare, intervalul de testare si parametrii analizați	131
7.2. Rezultate obținute si discuții	132
7.3. Concluzii	150
VIII. Prepararea unui produs nou pentru sugari cu aport suplimentar de imunoglobuline, lactoferină și vitamine	151
8.1. Compoziția laptelui pentru sugari reglementată de legislația europeană	151
8.2. Stabilirea unui protocol de lucru	155
8.3. Etape de fabricare a noului produs	156
8.4. Evaluarea fizico-chimică și microbiologică a materiilor prime folosite la fabricarea noului produs	157
8.5. Evaluarea compoziției fizico-chimice și microbiologice a noului produs	160
8.5.1. Dozarea conținutului de vitamine și acizi grași polinesaturați	163
8.5.1.1. Metode de analiză	163
8.5.1.2. Materiale și aparatură	165
8.6. Ambalare, etichetare și condiții de depozitare	168
8.7. Concluzii	169
IX. Concluzii generale	170
Bibliografie	
Anexa 1: Definiții ale mărimilor folosite la calculele statistice	
Anexa 2: Model ambalaj VITALACT IMMUNITY	

CUVINTE CHEIE: colostru bovin, vitamine, imunoglobuline, lactoferină, lapte praf pentru sugari

INTRODUCERE

Alimentația sugarilor este un subiect de interes atat pentru mame cat și pentru producatorii de produse adresate acestei clase de consumatori. Odată cu aderarea Romaniei la spațiul european, producția de lapte praf pentru sugari, impartit in două categorii „lapte de inceput” pentru perioada 0 - 12 luni și „lapte de continuare” pentru perioada 1 – 3 ani, este mult mai strict reglementată atit in ceea ce privește materiile prime acceptate a fi utilizate la fabricarea acestor produse cit mai ales la concentrația fiecărui component, stabilindu-se limite stricte pentru majoritatea claselor de substanțe din compoziția produselor.

Produsul propus la finalulul acestei lucrări aduce o noutate in Romania, la nivelul formulelor de inceput destinate sugarilor, prin folosirea ca și materie primă a laptelui colostru bovin liofilizat, acesta cistigand astfel un aport de anticorpi naturali și proteine

esențiale precum și vitamine și minerale naturale, cu o absorbție la nivelului organismului uman mult mai mare decit in cazul celor ingerate prin intermediul premixurilor (de sinteza).

Colostrul este primul aliment pe care toate mamiferele il gustă in prima zi de viață, primul lapte care este generat de glandele mamare imediat dupa nașterea noului-născut. Din punctul de vedere al compoziției, colostrul bovin diferă față de laptele crud (asimilat de organismul uman fara probleme cu excepția cazurilor de intoleranță la lactoză) din toate punctele de vedere. Deoarece rolul acestui produs este de a activa sistemul imunitar al noului născut și de al apăra (prin intermediul imunoglobulinelor) , inca de la primele secunde de viață, cind organismul acestuia este complet expus riscurilor de imbolnăvire, acest produs este bogat in proteină, grasime, vitamine și minerale precum și factori de imunizare, factori de creștere și proteine de protecție (lactoferină și aminoacizi).

Numeroase studii stiințifice au demonstrat acțiunea benefică a acestui produs ca și adjuvant in tratamentul unor boli grave, insistind asupra suportului adus organismului in etapa de prevenție sau de recuperare dupa boală.

Aceste considerente au stat la baza realizării prezentei teze de doctorat în care s-au intreprins studii de caracterizare a compoziției laptelui colostru bovin de la diferite rase de bovine, de studiere a modului de comportare al substanțelor active pe parcursul procesului de prelucrare (liofilizare), de evaluare a posibilității utilizării in practică a unei metode simple de evaluare a clasei de calitate a produsului lichid, de optimizare a procesului de granulare a colostrului pulbere prin metode specifice industriei farmaceutice, de evaluare a gradului de degradare a substanțelor active pe perioada de desfășurare a unor studii de stabilitate dar și optimizare a unui flux de fabricație a noii formule și de evaluare calitativă (fizico-chimică și microbiologică) a acesteia.

Lucrarea are două părți: o parte bibliografică și o parte de contribuții personale.

Partea bibliografică este structurată într-un singur capitol și reprezintă o sinteză a datelor din literatură de specialitate cu privire la vitamine (lipo și hidrosolubile), la acizii grasi polinesaturati, la imunoglobuline și lactoferină precum și la o scurtă descriere a colostrului.

Partea practică descrie pe larg rezultatele obținute in urma studiilor descrise mai sus precum și evaluarea statistică a datelor și emiterea concluziilor.

Lucrarea se încheie cu prezentarea concluziilor generale, referințe bibliografice și atașarea a trei articole in-extenso, publicate în reviste de specialitate.

CONTRIBUTII PERSONALE

1. EVALUAREA COMPOZIȚIEI LAPTELUI COLOSTRU DE LA DIFERITE RASE DE BOVINE

Deoarece compoziția colostrului bovin este diferită la fiecare rasă de bovine, prima etapă a studiului a fost constituită din evaluarea compoziției fizico-chimice, cu precadere a conținutului de imunoglobuline și lactoferină, din laptele colostru prelevat de la 3 rase diferite de bovine (Normandă, Holstein, Băltată Românească) și metisi, din ferme diferite, de varste și cu număr de fătări diferite, de pe teritoriul județului Alba. In urma efectuării testelor, rezultatele au arătat o variație a intregii compoziții, dar mai ales al conținutului de IgG și LF in functie de rasă, concentrația celor două componente fiind

descrescătoare în ordinea Normandă, Holstein, Băltată Românească și mețiși. În ceea ce privește variația conținutului de IgG în funcție de creșterea numărului de fătări și implicit a vârstei animalului, s-a observat o creștere direct proporțională a procentului de IgG cu aceste două variabile, astfel dacă la prima fătare media concentrației a fost 67.80 mg/ml IgG, la a patra fătare concentrația a crescut la aproximativ 99.01 mg/ml (valoare medie).

Din rațiuni legate de gradul de răspândire a animalelor s-a ales utilizarea colostrului bovin recoltat de la rasa Holstein (83.90 mg/ml IgG și 315.355 mg/l LF) pentru a fi folosit ca și materie primă pentru testele următoare.

2. EVALUAREA PROCESULUI DE LIOFILIZARE ASUPRA SUBSTANȚELOR ACTIVE (VITAMINE, IMUNOGLOBULINE ȘI LACTOFERINĂ) ADAPTATE ȘI LA CERINȚELE HACCP

Pentru păstrarea intactă a imunoglobulinelor, lactoferinei și vitaminelor din colostru, procesarea acestuia în vederea obținerii pulberii s-a făcut prin liofilizare. Deoarece procesul de fabricație presupune uscarea acestuia la o temperatură și presiune cât mai joasă după o congelare prealabilă, am efectuat teste de evaluare a gradului de denaturare a proteinelor în condiții variabile de fabricație (variația temperaturii și a vitezei de centrifugare), în vederea optimizării procesului de fabricație. Astfel s-a observat că temperatura optimă de fabricație este de maxim 60°C, când gradul de denaturare este mic (aproximativ 13%) iar depășirea acestei valori cu 10 °C conduce la distrugerea a 50% din totalul de IgG. Utilizarea unei viteze de rotație cât mai mari în etapa de separare a smantinii, duce la scăderea semnificativă a procentului de grăsime (până la 0.5%) dar mai ales a numărului de celule somatice din produs (aproximativ 50%), îmbunătățind astfel calitatea produsului (se reduc riscurile de contaminare).

3. EVALUAREA RELAȚIEI MATEMATICE DINTRE IMUNOGLOBULINE, LACTOFERINA ȘI DENSITATEA COLOSTRULUI LICHID

Pentru evaluarea cantitativă a conținutului de IgG și LF din colostrul lichid am propus o metodă alternativă de lucru dar și de clasificare a colostrului în clase de calitate. Metoda respectivă are la bază stabilirea unei relații matematice dintre IgG, LF și densitatea produsului și poate fi utilizată în practică la recepția calitativă a colostrului. Ținând cont de această relație matematică am stabilit un “colostrometru” teoretic cu ajutorul căruia sunt eliminate probele a căror conținut de IgG este scăzut. Pentru fiecare categorie de calitate din cele trei stabilite, este disponibilă o limită a valorilor densității și a celor două componente astfel ca este ușor de aflat o compoziție orientativă pentru o probă.

4. OPTIMIZAREA PROCESULUI DE GRANULARE UMEDĂ A COLOSTRULUI PULBERE ȘI ȘTABILIREA UNEI FORMULE OPTIME DE GRANULARE

Datorită caracteristicilor fizice albe ale pulberii (aspect pufos și electrizat, densitate mică 0.2 g/ml, indice Carr mai mare de 35 și curgerea slabă), utilizarea în practică a acestui produs mai ales în omogenizare și comprimare este foarte dificilă. În acest scop s-a încercat optimizarea caracteristicilor fizice prin granulare umedă utilizând alcool etilic ca și agent de umectare și diferiți excipienți. În acest scop au fost preparate 14 formule la care s-a variat în faza inițială tipul excipientului (amidon, lactoză, celuloză cristalină, PVP dar și combinații ale acestora) iar în etapa următoare s-a variat

concentrația alcoolului etilic. Pe tot parcursul experimentului s-a urmărit gradul de denaturare al proteinelor (în special al imunoglobulinelor) influențat de efectul alcoolului etilic cumulat cu condițiile de uscare a granulelor (temperatură de 45°C).

Această etapă a experimentului a condus la dezvoltarea în laborator a unei metode de dozare a proteinelor adaptată după metoda clasică Lowry. Pentru verificarea aplicabilității acesteia s-au făcut evaluări statistice descrise pe larg în teză.

În urma efectuării tuturor analizelor, s-a constatat că gradul de denaturare al proteinelor este cel mai mic (sub 25%) în cazul utilizării unui alcool de concentrație 40% în combinație cu amidon (ca și excipient). Această concentrație a alcoolului etilic determină o creștere semnificativă a procentului de granule cu diametrul peste 650 microni dar și o sterilizare implicită a produsului a cărui încărcătură microbiană este foarte mare. Deși prelevarea colostrului lichid se face cu ajutorul unei instalații automate de muls, contaminarea microbiană este mare și greu de redus deoarece, datorită distrugerii imunoglobulinelor la temperatură, produsul nu poate fi supus nici unui tratament termic.

5. STUDII DE STABILITATE ALE COLOSTRULUI PULBERE ÎN FORMĂ VRAC ȘI ÎN FORME FARMACEUTICE (SUPLIMENTE ALIMENTARE)

Studiile de stabilitate au fost efectuate pe 5 probe paralele de produs finit prelevate din același lot și câte 3 loturi din două suplimente alimentare (Activit Imuno și Activit Imuno Forte fabricate de Aesculap Prod SRL, Tirgu Mureș) cu un conținut diferit de imunoglobuline (30 mg respectiv 60 mg per comprimat). Probele au fost păstrate pe o perioadă de 6 luni, în condiții normale (20 ± 5 °C, UR = 70 ± 5 %) și de degradare accelerată (40 ± 5 °C, UR = 70 ± 5 %), la lumină și la întuneric, iar analiza acestora a fost efectuată la intervale de timp bine stabilite și anume: inițial, 7, 14, 30, 90, 140 și 180 zile. Aceste teste au fost efectuate pentru determinarea termenului de valabilitate a colostrului pulbere, a condițiilor optime de păstrare dar și al gradului de degradare în timp a substanțelor active.

Analizând rezultatele s-a concluzionat că perioada de valabilitate a colostrului pulbere poate fi acceptată la 24 luni, fără pierderi majore a componentelor principali, dacă sunt respectate condițiile de păstrare și anume: ambalat etanș, lipsit de aer (de preferință sub atmosferă inertă de azot), la întuneric și la temperaturi mai scăzute între 16 - 20°C

Din punct de vedere organoleptic, produsul suferă modificări datorită procentului mare de grăsimi care rămân în probe (între 8-10%) și care în timp, se degradează și determină modificări ale gustului și mirosului. Acest aspect de degradare al calităților organoleptice poate fi ținut sub control și redus prin granulara produsului cu alcool etilic care îmbunătățesc mirosul și gustul produsului.

La produsele farmaceutice, compoziția acestuia este relativ stabilă, dacă sunt respectate condițiile de păstrare (temperatură și umiditate). Comprimatele trebuie să fie ferite de lumină și căldură excesivă, păstrate în ambalajul lor original. Denaturarea proteinelor de interes (IgG și LF) poate fi de asemenea redusă prin utilizarea unui ambalaj primar brun, pentru a feri comprimatele de lumină. Acest aspect poate încetini și procesul de degradare al vitaminei C, destul de pronunțat, mai ales în condițiile accelerate, care arată o sensibilitate a acestei substanțe la lumină și temperatură ridicată.

Denaturarea proteinelor de interes (IgG și LF) este mai pronunțată în cazul probelor ținute la lumină. S-a constatat o scădere a concentrației de IgG de 5.49% în cazul probelor ținute la lumină comparativ cu doar 4.80% în cazul celor de la întuneric, astfel încât concentrația de IgG a ajuns la 21.88% în condiții de lumină și la 22.57% la

intuneric din conținutul inițial de 27.37%. Același lucru este valabil și în cazul lactoferinei, înregistrându-se o scădere a concentrației, de la o medie de 1.93% inițial, la 1.52% în cazul probelor tinute la lumină și la 1.70% pentru cele păstrate la întuneric. Ceilalți parametri analizați pentru probele de colostru au rămas relativ constanți, diferențele constatate pe parcursul etapelor de testare datorându-se neomogenității probelor sau erorii de lucru.

6. OPTIMIZAREA FORMULEI DE LAPTE PRAF PENTRU SUGARI ȘI EVALUAREA CALITATIVĂ ȘI CANTITATIVĂ A ACESTEIA (VITAMINE, ACIZI GRAȘI POLINEȘATURATI, IMUNOGLOBULINE ȘI LACTOFERINĂ)

Din punct de vedere al aspectului și al condițiilor organoleptice, amestecul de colostru bovin și lapte praf corespunde și poate fi utilizat pentru fabricarea de produse destinate alimentației sugarilor. Testele de solubilitate au arătat că produsul este solubil în proporție de peste 98% în apă caldă (în jur de 40°C).

Proporția optimă de mixare a celor două componente, astfel ca amestecul să respecte limitele fizico-chimice și microbiologice impuse de legislația europeană este de lapte praf : colostru = 86 : 14. Conținutul foarte mare de proteină din colostrul liofilizat (în jur de 70%) reprezintă o problemă în etapa de amestecare, de fabricație al noului produs deoarece limita maximă a proteinei acceptată pentru formulele de început este de 15.90%.

Analizele efectuate atât în laboratorul BIOEF (județul Alba, România) cât și în cel din Franța (Isigny Sainte Mère) au arătat că produsul obținut este bogat în aminoacizi esențiali, în vitamine și minerale. Conținutul de acid linoleic și alfa linolenic a fost determinat în Franța prin gaz – cromatografie iar raportul acestora din produsul final respecta limitele impuse. Pentru dozarea vitaminelor, analizate atât în Franța cât și în laboratorul BIOEF, s-au folosit metode cromatografice (HPLC și HPLC – MS) dezvoltate în laborator, validate și adaptate compoziției complexe a produsului.

Pentru determinarea parametrilor microbiologici, s-au folosit metode standardizate, conform cu standardelor impuse de ASRO, analizele fiind efectuate în cadrul laboratorului BIOEF (jud. Alba). Analizele au arătat că produsul are o încărcătură microbiană mică datorată tratamentului termic aplicat laptelui praf (uscarea la temperaturi cuprinse între 180 - 185°C), care împiedică dezvoltarea microbilor și datorită tratamentului de granulare aplicat colostrului pulbere.

Produsul nou propus în această teză va fi produs la scară industrială sub denumirea de VITALACT IMMUNITY, sub forma unei formule de început, destinată sugarilor cu vârste cuprinse între 0 – 12 luni.

CURRICULUM VITAE

Informații personale

Nume / Prenume: BAR ELENA

Adresă : Alba Iulia, Str. Poligonului, Nr. 10B, bl. B10, Ap.8

Telefon: 0258 764 635

Mobil: 0740063782; 0720100480

E-mail(uri): Elenabar24@yahoo.com

Elena.bar@roph.ro

Naționalitate: Româna

Data nașterii: 6 Septembrie 1982

Locul de muncă / Domeniul ocupațional:

3 octombrie 2005– prezent : Șef de laborator – S.C. BIOEF S.R.L., Alba

Experiența profesională

Perioada : octombrie 2005 - prezent - Șef de laborator

Activități și responsabilități principale:

Coordonarea activității de laborator, evaluarea calității rezultatelor analizelor, responsabil analize spectrofotometrie AAS, cromatografie HPLC si metode imunoenzimaticice (Elisa)

Responsabil calitate și siguranța alimentului in cadrul fabricii de lapte praf

Numele și adresa angajatorului:

SC BIOEF S.R.L., Brasov – punct de lucru «Fabrica de lapte praf », com. Dostat, jud. Alba

Tipul activității sau sectorul de activitate:

Activitate de bază: Producator lapte praf pentru sugari

Activitate secundară : laborator particular analize produse alimentare, nutrețuri, apă si produse medicamentoase

Perioada: septembrie 2009 – prezent –

Responsabil managementul calității depozit medicamente

Activități și responsabilități principale:

Asigurarea respectării regulilor de bună practică de distribuție (RBPD) si a cerințelor de calitate conform ISO 9001:2008

Responsabil cu maparea spațiilor climatizate si calificarea instalațiilor aferente

Numele și adresa angajatorului:

ROPHARMA SA – Sucursala București, bul. Dimitrie Pompei, nr 55-55°, Sector 2, București

Educație și formare

- 1995 – 2000: Colegiul Național “Avram Iancu”, Cimpeni, jud Alba
- 2000 – 2005: Universitatea “Babeș – Bolyai” Cluj Napoca, Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Specializarea Ingineria Substanțelor Anorganice
- 2005 – 2006: Master in Chimia compușilor organici si a compușilor organometalici, Universitatea “Babeș – Bolyai” Cluj Napoca, Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică
- 2007 – prezent : doctorand la Catedra Controlul Medicamentului, Facultatea de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hatieganu”, Cluj Napoca

Cursuri postuniversitare:

- 19 – 20 iunie 2007: “Validarea metodelor de analiză. Aspecte practice si instrumente informatice”, București
- 02 – 04 iulie 2007: “Controlul calității in laboratoarele de incercări – metode statistice aplicate”, București
- 04 -05 septembrie 2007: “Metode de analiză cromatografică – bune practici și controlul calității”, București
- 08 – 10 septembrie 2007: “ Evaluarea incertitudinii de măsurare in laboratoarele de incercări. Studii de caz si aplicații”, Constanța
- 23 – 27 iunie 2008: “ Formare auditori pentru sistemul de management al calității intr-un laborator, in conformitate cu SR ISO 17025 :2005”, Constanța
- 02 -14.09.2009: “ Auditor in domeniul calității – SR ISO 9001:2008”, Sibiu

Lucrări publicate in extenso:

1. Elena Bar, Izabella Foris, Miron Mihai:”Alimente functionale și nutraceutice – marketing si legislație “ Sesiune de comunicări științifice, Cluj Napoca 2007
2. Elena Bar, Izabella Foris, Miron Mihai, Bojita Marius, Mihai Gheorghe:”Determination of the content of immunoglobulin (IgG) and lactoferrin in bovine colostrum – comparative study”, Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, 66, 1/2/2009, pag 157 – 161
3. Elena Bar, Ionela Tiris, Miron Mihai, Bojita Marius, Mihai Gheorghe: “The relationship between the content of immunoglobulin (IgG), lactoferrin and density in bovine colostrum – comparative study”, Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, 67 (1-2)/2010, pag 70 – 74
4. Elena Bar, Ionela Tiris, Daniela Sarbu, Cristina Iridon, Iuliana Ochea, Iuliana Bratu: “Full characterization of bovine colostrums, raw material for dietary supplements. His beneficial effect on the human immune system” Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology, XIV- 2, 2010
5. Elena Bar, Cristina Iridon, Daniela Sarbu, Ionela Tiris: “New spectrophotometric method for determination of urea from milk. Comparative study between different methods used to evaluate the content of urea from milk and milk products “ acceptat spre publicare in Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, 68 (1-2)/2011
6. Elena Bar, Cristina Iridon, Daniela Sarbu: “Effect of alcohol used in bovine colostrum powder granulation on the protein content and on the bacterial microflora” acceptat spre publicare in Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, 68 (1-2)/2011

Participari la manifestari stiintifice:

1. The 8th International Symposium: “Prospects for the 3rd Millennium Agriculture”, Sectiunea “Animal Science and Biotechbologies” – 7-10 octombrie 2009, Cluj Napoca – prezentare orală
2. The 9th International Symposium: “Prospects for the 3rd Millennium Agriculture”, Sectiunea “Animal Science and Biotechbologies” – 30 -2 octombrie 2010, Cluj Napoca – prezentare orală
3. International symposium: “Agricultural and Food Sciences, Process and Technologies”, 9-12 decembrie 2010, Sibiu –prezentare orală

**UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY
“IULIU HAȚIEGANU” CLUJ NAPOCA
FACULTY OF PHARMACY**

**THE INFLUENCE OF VITAMINS, POLYUNSATURATED FATTY
ACIDS AND OF OTHER COMPOUNDS (IMMUNOGLOBULIN AND
LACTOFERRIN) FROM BOVINE LACTATION ON THE QUALITY
OF INFANTS FORMULAE**

**The Summary of the Theses for achieving the title of Ph.D in Medical Sciences,
Pharmacy field**

PhD Candidate:

Ch. Eng BAR ELENA

Scientific Advisor:

Prof. Dr. BOJIȚĂ MARIUS

**Cluj Napoca
2011**

TABLE OF CONTENTS

Part I. PRESENT KNOWLEDGE

1. Data from literature regarding the composition of bovine colostrum milk – Description of the main components	5
1.1. Fat – Soluble vitamins	5
1.1.1 Vitamin A	10
1.1.2. Vitamin E	12
1.1.3. Vitamin D	14
1.2. Water – Soluble vitamins	14
1.2.1. Vitamin B ₁	19
1.2.2. Vitamin B ₂	20
1.2.3. Vitamin B ₆	22
1.2.4. Vitamin C	23
1.3. Lactoferrin	25
1.4. Immunoglobulins	29
1.4.1. Immunoglobulin A (IgA)	30
1.4.2. Immunoglobulin G (IgG)	31
1.4.3. Immunoglobulin M (IgM)	31
1.4.4. Immunoglobulin a D (IgD)	32
1.4.5. Immunoglobulin E (IgE)	32
1.5. Polyunsaturated fatty acids (linoleic acid and alfa-linolenic acid)	36
1.6. General information about bovine colostrum	40
1.6.1. Bovine colostrums definition – Scientific versus legal	40
1.6.2. Immunostimulating and immunomodulating action	

Part II. PERSONAL CONTRIBUTIONS

II. Comparative study of physico – chemical composition of bovine colostrum from different bovine breeds	42
2.1. Establishing a working protocol	42
2.2. Sampling and collecting of samples of bovine colostrum from farms	44
2.3. Raw material reception and initial qualitative evaluation of the bovine colostrum	44
2.4. Physico – chemical parameters tested	45
2.4.1. Description of methods used	49
2.4.2. Materials and equipments	51
2.4.3. Results and discussion	62
2.5. Quantitative determination of lactoferrin	62
2.5.1. Description of method used	62
2.5.2. Materials and equipments	63
2.5.3. Results and discussion	69
2.6. Quantitative determination of immunoglobulin G (IgG)	69
2.6.1. Description of method used	69
2.6.2. Materials and equipments	70
2.6.3. Results and discussion	77

2.7. Conclusions	78
III. Evaluation of the influence had by external factors on the composition of liquid bovine colostrum	78
3.1. Temperature influence	78
3.1.1. Experimental tests	78
3.1.2. Materials and equipments	79
3.1.3. Results and discussion	81
3.2. Influence of process stages	81
3.2.1. Experimental tests	81
3.2.2. Materials and equipments	81
3.2.3. Results and discussion	82
3.3. Conclusions	83
IV. Establishing a mathematical relationship between immunoglobulin and lactoferrin versus product density	83
4.1. The benefits of using of this mathematical correlation	85
4.2. Establishing a working protocol	86
4.3. Experimental tests	87
4.4. Materials and equipments	87
4.5. Results and discussion	91
4.6. Conclusions: applicability – the use of the “colostrometer “	92
V. Production of colostrum powder (freeze –dry) and product analysis	92
5.1. Freeze –dry process : Description of the working stages and of the process control	93
5.1.1. Freezing stage	93
5.1.2. Primary drying	94
5.1.3. Secondary drying	94
5.2. Brief description of the manufacturing process - the technological flux	97
5.3. Physico-chemical characterization of the powder	100
5.4. General parameters	100
5.4.1. Methods of analysis	100
5.4.2. Materials and equipments	101
5.4.3. Results and discussion	104
5.5. Determination of minerals content	104
5.5.1. Methods of analysis	104
5.5.2. Materials and equipments	105
5.5.3. Results and discussion	108
5.6. Determination of immunoglobulin and lactoferrin	108
5.6.1. Methods of analysis	108
5.6.2. Materials and equipments	108
5.6.3. Results and discussion	109
VI. Wet – granulation of bovine colostrum powder	110
6.1. Establishing a working protocol	110
6.2. Formulation and evaluation of the granules	112
6.2.1. Initial powder – characterization	112
6.2.2. Description of the working method	113
6.2.3. Materials and equipments	115
6.3. Results and discussion	116

6.3.1. First set of formulation	116
6.3.2. Comparative study – determination of protein with two methods: Kjeldalh and Lowry	120
6.3.3. Second set of formulation	123
6.4. Conclusions	127
VII. Stability studies on the colostrums powder and some dietary supplements containing bovine colostrums (tablets)	128
7.1. Establishing a working protocol	128
7.1.1. Products used for tests	128
7.1.2. Products composition	130
7.1.3. Products packing	131
7.2. Results and discussion	131
7.3. Conclusions	132
VIII. A new infant formulae with a high concentration of natural immunoglobulin, lactoferrin and vitamins	150
8.1. European legislation regarding the composition of infant formulae	151
8.2. Working protocol	151
8.3. Description of the manufacturing stages of the new product	155
8.4. Chemical and microbiological characterization of the raw materials (powder milk and colostrums powder) used for the new formulae	156
8.5. Chemical and microbiological characterization of the infant formulae	157
8.5.1. Determination of the vitamins and PUFA'S	160
8.5.1. Methods of analysis used	163
8.5.2. Materials and equipments	163
8.6. Packaging, labeling and storage conditions	165
8.7. Conclusions	168
IX. General conclusions	169
References	170
Appendix 1: Statistical analysis - definitions	
Appendix 2: Vitalact Immunity – packing model	

Key words: bovine colostrum, vitamins, immunoglobulin, lactoferrin, infant formulae

INTRODUCTION

Infant nutrition is a subject of interest for both mothers and for the producers of the powder milk. Once Romania joined the EU, the production of milk powder for infants, witch is divided into two categories "infant formulae" for the period 0-12 months and "follow-on formulae" for the period 1-3 years, is more strictly regulated. This refers to accepted raw materials used in the manufacturing and especially to the concentration of each component, setting limits for most classes of substances found in the products.

The product proposed here, brings something new for Romania, in the field of infant formulae, using bovine colostrum powder as raw material. The novelty of this product is due to the natural antibody, essential proteins and natural vitamins and minerals added to it, with a higher absorption in the human body than those ingested through premixes (synthesis).

Colostrum is the first food that that every new-born mammal taste by all the mammals in the first day of life, the first milk that is generated by the mammary glands

immediately after birth. In terms of composition, bovine colostrum differs from raw milk (easily assimilated by the human body without any problems, except lactose intolerance cases) in every aspect. Because the role of this product is to activate the immune system of the newborn (via immunoglobulin) starting for the first day of his life, when the body is fully exposed to health risks, this product is rich in protein, fat, vitamins and minerals and immunization factors, growth factors and protective proteins (lactoferrin and amino acids).

Numerous scientific studies have demonstrated the beneficial action of this product as an adjuvant in the treatment of serious diseases, stressing its role on the in the prevention process.

These considerations lay down the basis of this doctoral thesis, in which studies were conducted to characterize the composition of the bovine colostrum from different breeds of cattle, study the behavior of active substances during processing (freeze-drying), demonstrate the applicability of two alternative methods in evaluation of the quality of the liquid product, optimize the wet – granulation process of colostrum powder, establish the degree of degradation of active substances during the stability studies but also to optimize the manufacturing process and characterization (chemical and microbiological) of new formulas.

The bibliography is structured in a single chapter and represents a summary of the present knowledge on vitamins (lipo and water soluble), the polyunsaturated fatty acids, immunoglobulin and lactoferrin but also a brief description of the colostrum. The applicability section deals with the results generated following the studies above, the statistical evaluation of data, and conclusions. The thesis ends with the general conclusions, references, and three attached articles, published in scientific journals, as attachments and two annexes (composition of Vitalact Immunity and definition of statistical method used in paper).

PERSONAL CONTRIBUTION

1. EVALUATION OF THE COMPOSITION OF BOVINE COLOSTRUM FROM DIFFERENT BOVINE BREEDS

Because the composition of bovine colostrum is different in each breed of cattle, the first stage of the study involved the evaluation of its physical and chemical parameters, especially immunoglobulin and lactoferrin from colostrum taken from three different breeds of cows (Normandy, Holstein, Baltata Romaneasca) and half-breeds from different farms in Alba County. The results showed a variation of the whole composition (especially on the content of IgG and LF), based on breeds (the concentration of IgG decreases from Normandy, to Holstein, Baltata and half-breeds). As far as the link between IgG and calving is concerned, the content of the first one proportionally increases with age and number of times the animal has given birth. Thus, the first calving is characterized by 67.80 mg/ml IgG, whereas for the fourth one this value increased to nearly 99.01 mg/ml (mean value).

For reasons related to the spatial distribution of the animals we chose the bovine colostrum collected from the Holstein breed (83.90 mg/ml IgG and 315 355 mg/l LF).

2. EVALUATION OF THE EFFECT OF THE MANUFACTURING PROCES CONDITIONS ON THE ACTIVE SUBSTANCES (VITAMINS, IMMUNOGLOBULIN, AND LACTOFERRIN)

In order to keep the active substances (immunoglobulin, lactoferrin and vitamins) intact in the liquid colostrum, we choose to generate the powder in freeze – dry process. Because the manufacturing process involves drying at a relatively low temperature, we conducted some tests to evaluate the degree of protein denaturation in variable conditions (variation of temperature and rotational speed) in order to optimize the process of preparing the raw material. We observed that under 60°C, the degree of denaturing of IgG is relative small (about 13%) and increases to over 50%, when the temperature reaches 70°C. A higher speed of rotation produces a significant decrease in the percentage of fat but also of the somatic cells (over 50%), which improves the quality of the colostrum.

4. OPTIMIZATION OF THE WET – GRANULATION PROCESS OF COLOSTRUM POWDER

After the freeze – dry cycle, the powder presented poor physical characteristics (fluffy and electrified aspect, low density of 0.2 g /ml, a Carr index over 35 and low flowability), witch creates difficulties in using this product in practice, especially for mixing or compression. For this reasons, were prepared 14 formulations witch contained different types of excipients (starch, lactose, microcellulose crystalline, PVP but also combinations of them) and different concentrations of alcohol. The purpose of this experiment was to evaluate the degree of protein denaturation (especially of immunoglobulin) determined by the effect of alcohol combined with the temperature used for drying. We also designed and tested a new method for determination of proteins from solid milk products in the laboratory. The results, using this method and a classic one, were analyzed by one – way ANOVA test.

Following all the analysis, we found that the degree of protein denaturation is less than 25% when 40% alcohol is used in combination with starch (as excipient). The alcohol presence significantly increases the ratio of granules having more than 650 microns in diameter, and reduces the microbial load of the product.

5. STABILITY STUDY ON COLOSTRUM POWDER AND ON SOME DIETARY SUPPLEMENTS WITH BOVINE COLOSTRUM (TABLETS)

Stability studies involved five samples of bovine powder taken from the same batch and six batches of tablets (3 batches from Activit Imuno and 3 batches from Activit Imuno Forte produced by Aesculap Prod SRL, Tirgu Mures) with different concentration of IgG (30 mg and 60 mg per tablet). Samples were kept under normal conditions for 6 months (20 ± 5 ° C, RH = 70 ± 5 %) and accelerated degradation (40 ± 5 ° C, RH = 70 ± 5 %), in the light and in the dark, with and initial analysis followed others at 7, 14, 30, 90, 140, and 180 days. These tests were performed to determine the shelf life of colostrum powder, the optimal storage conditions, but also the degree of degradation over time for the immunoglobulin.

A shelf life of 24 months is accepted for colostrum powder, without major losses in the main components, but only if the storage condition are strictly enforced, namely

tightly packed without air (preferably under an inert atmosphere of nitrogen), away from light, and at temperatures between 16 - 20°C.

The denaturing of IgG and LF is more pronounced for samples kept in the light. A decrease of IgG concentration of 5.49 % was observed for samples kept in light and of 4.80 % for those kept in the dark, respectively, from an initial concentration of 27.37%. So the IgG concentration reaches 21.88% in light conditions and 22.57% in the dark.

This statement is correct also in the case of lactoferrin, whose levels dropped to 1.52% for samples kept in the light and to 1.70% for those kept in dark from an initial concentration of 1.93%.

For the pharmaceuticals samples (tablets), the composition is relatively stable and can be influenced only by the storage conditions (humidity and temperature). The tablets should be protected from light and heat, kept in their original packaging. Denaturing protein of interest (IgG and LF) can be reduced by using a brown package, for light protection. This can slow down the process of vitamin C degradation, which is quite pronounced for the samples kept under accelerated conditions, showing sensitivity to these substances for light and temperature.

6. OPTIMISATION OF THE NEW INFANT FORMULAE AND ITS QUALITATIVE AND QUANTITATIVE EVALUATION (VITAMINS, PUFAs, IMMUNOGLOBULIN, AND LACTOFERRIN CONTENT)

In terms of appearance and organoleptic conditions, the mixture of bovine colostrum and milk powder can be used in practice for infant feeding. Solubility tests showed that the product is soluble at a rate of over 98% in warm water (up to 40°C). Optimum mixing ratio of the two components, so that the mixture respects the physico-microbiological limits imposed by European legislation is milk powder: colostrum = 86: 14.

Analyses carried out both in the laboratory of Bioef (Romania) and in the laboratory of Isigny Sainte Mère (France) showed that the product obtained is rich in essential amino acids, vitamins, and minerals. The ratio of linoleic and alpha linolenic acids was determined in France by gas chromatography and the results showed that both concentration fall within limits. For the determination of vitamins (performed both in Romania and France), we used chromatographic methods (HPLC and HPLC – MS) developed and adapted for the requirements of the product (a complex matrix).

Microbiological conditions were analyzed in Bioef laboratory using a standardized method (purchased from the Romanian Standards Association ASRO). The result showed that the product presented a low microbial load due to the high temperature treatment used in the production of milk powder as well as the usage of alcohol during the granulation of colostrum.

The new formula will be produce under the name VITALACT IMMUNITY – a formula for infants with age between 0 -12 months.

CURRICULUM VITAE

Personal Information

First and Middle Name: Elena

Surname: Bar

Address: No. 10B, Bl. B10, Ap.8, Poligonului Street, Alba Iulia

Telephone: 0258-764635

Mobile: 0740-063782 sau 0720-100480

E-mail(s): Elenabar24@yahoo.com

Elena.bar@roph.ro

Nationality: Romanian

Birth Date: September 6, 1982

Work Place: October 3, 2005 - present: Laboratory Chief – S.C. BIOEF S.R.L., Alba

Professional Experience

Period: October 2005 - present - Laboratory Chief

Main Activities and Responsibilities:

Coordination of laboratory activities, quality assessment of the test results, responsible with the AAS spectrophotometric analysis, HPLC chromatography and immunoassay methods (ELISA)

Responsible for quality and food safety in the milk powder factory

Employer's Name: S.C. BIOEF S.R.L.

Type of Activity or Sector of Activity:

Basic Activity: Manufacturer and distribution of infant formula (milk powder)

Secondary activity: private laboratory for analysis of foods, animal feed, water and drugs

Period: September 2009 – present (part time) - Responsible with quality management

Main Activities and Responsibilities:

Ensure and verify compliance with the rules of good distribution practice (RBPD) and ISO 9001:2008 quality requirements

Employer's Name: ROPHARMA SA – Bucharest

Type of Activity or Sector of Activity: Pharmaceutical products distribution

Education

- 1995 – 2000: “Avram Iancu” College, Cimpeni, jud Alba
- 2000 – 2005: “Babeş – Bolyai” University, Cluj Napoca, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Department Inorganic Technology
- 2005 – 2006: Master in Chemistry of organic compounds and organometallic compounds, Babeş – Bolyai” University, Cluj Napoca, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering,
- 2007 – prezent : PhD in Control of Medicines Department, Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hatieganu", Cluj Napoca

Postgraduate:

- 19 to 20 June 2007: "Validation of analytical methods. Practical aspects and tools", Bucharest
- 2 to 4 July 2007: "Quality control in laboratory testing - applied statistical methods", Bucharest

-
- 04 -05 September 2007: "Methods for chromatographic analysis - best practice and quality control", Bucharest
 - 8 to 10 September 2007: "Evaluation of measurement uncertainty in testing laboratories. Case studies and applications ", Constanta
 - April 17, 2008: "ring-test, certified reference materials and high purity solvents - quality control", Bucharest
 - 23 to 27 June 2008: "Training of auditors for quality management system in a laboratory, in accordance with ISO 17025: 2005", Constanta
 - 02 -14.09.2009: "Quality Management Auditor - ISO 9001:2008", Sibiu

Scientific papers in extenso:

1. Elena Bar, Izabella Foris, Miron Mihai:”Alimente functionale și nutraceutice – marketing si legislație “ Sesiune de comunicări științifice, Cluj Napoca 2007
2. Elena Bar, Izabella Foris, Miron Mihai, Bojita Marius, Mihai Gheorghe:”Determination of the content of immunoglobulin (IgG) and lactoferrin in bovine colostrum – comparative study”, Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, 66, 1/2/2009, pag 157 – 161
3. Elena Bar, Ionela Tiris, Miron Mihai, Bojita Marius, Mihai Gheorghe: “The relationship between the content of immunoglobulin (IgG), lactoferrin and density in bovine colostrum – comparative study”, Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, 67 (1-2)/2010, pag 70 – 74
4. Elena Bar, Ionela Tiris, Daniela Sarbu, Cristina Iridon, Iuliana Ochea, Iuliana Bratu: “Full characterization of bovine colostrums, raw material for dietary supplements. His beneficial effect on the human immune system” Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology, XIV- 2, 2010
5. Elena Bar, Cristina Iridon, Daniela Sarbu, Ionela Tiris: “New spectrophotometric method for determination of urea from milk. Comparative study between different methods used to evaluate the content of urea from milk and milk products “ accepted for publishing in Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, 68 (1-2)/2011
6. Elena Bar, Cristina Iridon, Daniela Sarbu: “Effect of alcohol used in bovine colostrum powder granulation on the protein content and on the bacterial microflora” accepted for publishing in Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, 68 (1-2)/2011

Participation to scientific events:

7. The 8th International Symposium: “Prospects for the 3rd Millennium Agriculture”, Sectiunea “Animal Science and Biotechbologies” – 7-10 october 2009, Cluj Napoca – oral presentation
8. The 9th International Symposium: “Prospects for the 3rd Millennium Agriculture”, Sectiunea “Animal Science and Biotechbologies” – 30 -2 october 2010, Cluj Napoca – oral presentation
9. International symposium: “Agricultural and Food Sciences, Process and Technologies”, 9-12 december 2010, Sibiu – oral presentation.