MEMORIU ȘTIINȚIFIC

privind teza de doctorat cu titlul

„Cercetări privind dezvoltarea de probiotice de generaţie nouă, microîncapsulate, înglobate în alimente funcţionale, cu rol în menţinerea sănătăţii microbiotei intestinale şi în prevenirea bolilor”

Student-doctorand: Pușcășelu (Gheorghiță) Roxana-Elena
Conducător de doctorat: Prof. univ. dr. Sîrbu Ioan Ovidiu

1. Motivarea cercetării

Teza răspunde unei probleme practice: probioticele administrate oral își pierd o mare parte din viabilitate în timpul procesării, depozitării și tranzitului gastrointestinal. Acest lucru le limitează eficiența și contribuie la neîncrederea consumatorilor în formulele probiotice.

Diabetul zaharat de tip 2 (T2DM) este asociat cu disbioza intestinală. Modularea microbiotei este o strategie adjuvantă tot mai studiată în managementul acestei patologii. În România, probioticele sunt încă percepute mai ales ca adjuvant al antibioterapiei. Formulele disponibile sunt predominant pulberi sau capsule, nu alimente de consum curent.

Doctoranda a pornit de la ipoteza că o matrice biopolimerică ieftină, comestibilă și biocompatibilă poate proteja tulpinile probiotice și le poate elibera țintit la nivel intestinal. Matricea propusă este alginat de sodiu – amidon de grâu, obținută prin extrudare. Ipoteza a doua: înglobată într-un aliment de bază (iaurtul), matricea poate produce efecte măsurabile asupra microbiotei și a parametrilor metabolici la pacienți cu T2DM.

Obiectivele cercetării au fost:

1. Identificarea compoziției biopolimerice optime pentru încapsularea unei substanțe active model (clorhidrat de metformină), cu stabilitate în fluide gastrointestinale simulate;

2. Optimizarea compoziției pentru încapsularea tulpinilor *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469 și *Bacillus clausii*, cu viabilitate ridicată și eliberare țintită și prelungită;

3. Dezvoltarea și caracterizarea unui prototip de aliment funcțional (iaurt) cu probiotice încapsulate;

4. Evaluarea efectelor consumului acestui produs asupra microbiotei intestinale (secvențiere Nanopore a genei ARNr 16S), a markerilor metabolici și a calității vieții la pacienți cu T2DM.

2. Structura tezei de doctorat

Teza are XI pagini preliminare, 119 pagini de text (Introducere, Partea generală, Partea specială), o bibliografie de 248 de titluri (pp. 120–143) și anexe. Conținutul este ilustrat de 34 de figuri și 17 tabele. Structura respectă raportul clasic între fundamentarea teoretică și contribuția proprie: partea specială ocupă aproximativ două treimi din text.

Secțiune	Conținut	Pagini
Pagini preliminare	Lista celor 3 lucrări publicate, abrevieri, liste de tabele și figuri, mulțumiri	I–XI
Introducere	Context, motivație, scop și obiective	1–4
Cap. 1	Microbiota intestinală: interacțiunea dietă–microbiotă–metaboliți, transplantul de microbiotă fecală, metagenomica, terapii personalizate, compoziția microbiotei la adultul sănătos	5–12
Cap. 2	Disbioza intestinală: definiție, mecanisme; implicații gastrointestinale, cardiovasculare, neurodegenerative (axa intestin–creier) și metabolice	13–21
Cap. 3	Probioticele: mecanisme de acțiune, rol în prevenție, sindrom metabolic și diabet, principii tehnologice ale încapsulării, siguranță și tolerabilitate	22–35
Cap. 4	Alimentele funcționale și impactul lor asupra microbiotei și parametrilor metabolici	36–38
Cap. 5	Materiale și metode: capsule cu metformină și cu probiotice (extrudare în $CaCl_2$ 5%), iaurtul funcțional, studiul clinic randomizat cu secvențiere nanopore, statistică, aspecte etice	39–58
Cap. 6	Rezultate, în trei etape: sisteme biopolimerice (6.1), produsul alimentar (6.2), testarea *in vivo* și secvențierea (6.3)	59–104
Cap. 7	Discuții, pe aceleași trei etape, raportate la literatura de specialitate	105–115
Cap. 8	Concluzii și contribuții personale, limite și direcții viitoare	116–119
Cap. 9	Bibliografie (248 de referințe)	120–143
Cap. 10	Anexe: chestionarul de sănătate RAND SF-36, formularul de consimțământ informat, lucrările publicate in extenso	I și urm

Partea specială are o logică secvențială. Fiecare etapă selectează formula folosită în etapa următoare: matricea testată cu metformină → capsula probiotică optimă (proba 9) → iaurtul funcțional → intervenția clinică.

3. Contribuții științifice esențiale

Contribuția principală a tezei este un lanț complet de cercetare translațională: o matrice de încapsulare alginat de sodiu – amidon de grâu, un aliment funcțional bazat pe ea și un studiu clinic randomizat, controlat placebo, la pacienți cu T2DM. Combinația dintre această matrice și tulpinile *L. rhamnosus* + *B. clausii* nu a mai fost raportată în literatură.

3.1. Efectul sinergic alginat–amidon într-un sistem cu eliberare țintită (metformina ca substanță model)

- Capsulele au avut diametre uniforme, de 104,90–116,34 μm (DS < 1 μm). Eficiența încapsulării a crescut cu proporția de alginat.

- În fluid gastric simulat, capsulele au rămas stabile. Solubilizarea a început în fluid intestinal simulat. După 8 ore, s-a eliberat cel mult 5,2–6,3% din metformină. Rezultatul indică un sistem cu eliberare prelungită.

- Alginatul formează prin gelifiere ionică o rețea rezistentă la pH acid. Amidonul modulează permeabilitatea și favorizează eliberarea la pH bazic. Acest efect sinergic a fost baza transferului matricei la încapsularea probioticelor.

3.2. Capsule probiotice optimizate (9 formule; raport alginat:amidon 5:1, 2:1, 1:1; încărcare probiotică 0, 10, 20% v/v)

- Eficiența încapsulării a fost de 71,20–96,67%. Valorile maxime au apărut la raportul 1:1 (proba 8: 96,67%; proba 9: 95,83%). Ele depășesc maximul de 91% raportat în literatură pentru sisteme alginat–FOS.

- Viabilitatea după încapsulare a fost > 96% în toate formulele. Supraviețuirea a fost de 81,38–90,24% în fluid gastric simulat și de 97,05% după expunere secvențială gastric + intestinal (proba 9).

- FTIR a confirmat încorporarea celulelor bacteriene (bandă suplimentară la 1120–1140 cm^{-1}, asociată peptidoglicanilor). Structura chimică a matricei s-a păstrat după tranzitul simulat. SEM a arătat bacili în capsule și o matrice mai densă la conținut mai mare de amidon.

- Cinetica de umflare a fost dependentă de pH: indice de umflare (SR) de 6,0–23,2% în fluid gastric și de până la 59,8% în fluid intestinal. Profilul susține protecția gastrică și eliberarea intestinală.

- Sistemul nu necesită crioprotectori sau alți aditivi. Tehnica de extrudare este mai simplă și mai ieftină decât uscarea prin pulverizare.

- Formula optimă selectată a fost proba 9: alginat:amidon 1500:1500 mg, cu 20% probiotice.

3.3. Aliment funcțional – iaurt cu probiotice încapsulate

- Pe 21 de zile de depozitare refrigerată, pH-ul a scăzut moderat (4,51 → 4,32). Sinereza a scăzut (52,0 → 42,5%), iar capacitatea de reținere a apei a rămas ridicată (73,81–81,56%), fără separare de zer.

- Activitatea antioxidantă (DPPH) a crescut de la 41,16% la 57,43% inhibiție. Culoarea s-a stabilizat după săptămâna a doua ($\Delta E = 1,26$ între săptămânile 2 și 3).

- Încărcătura viabilă a crescut în produs (~20 → ~30 × 10^3 UFC/capsulă). Matricea nu doar a protejat celulele, ci a permis și proliferarea lor. Conform doctorandei, 10 g de capsule per porție asigură peste 10^9 UFC.

3.4. Studiu clinic randomizat, controlat placebo, la pacienți cu T2DM (2 × 27 de pacienți înrolați; 26 + 25 secvențiați; 3 săptămâni)

- Markeri metabolici, doar în grupul cu probiotice: glicemia a scăzut cu 12,15 mg/dl (−8,9%, $p < 0,001$, Cohen $d = -1,40$). Trigliceridele au scăzut cu 7,60 mg/dl (−6,6%, $p < 0,001$), iar colesterolul total cu 10,39 mg/dl (−6,4%, $p < 0,001$). În grupul placebo, glicemia și colesterolul nu s-au modificat, iar trigliceridele au crescut (+3,92 mg/dl, $p = 0,027$). Diferențele dintre grupuri au fost semnificative pentru toți cei trei markeri (Mann–Whitney U, $p < 0,001$).

- Microbiota (962 de specii, 9 filumuri): compoziția la nivel de filum a fost stabilă. Singura modificare semnificativă a fost creșterea *Actinobacteria* în grupul cu probiotice (+86,4%, p = 0,048). La nivel de gen, în același grup, au scăzut *Clostridioides* (−53,5%, p = 0,001) și au crescut *Alistipes* (+133,4%, p = 0,002), *Parabacteroides* și *Oscillibacter*. Producătorii de SCFA au rămas stabili la probiotice (+3,3%) și au scăzut la placebo (−13,6%, p = 0,063).

- Corelațiile Spearman între modificările speciilor și ale markerilor au avut un tipar coerent, centrat pe glicemie, în grupul cu probiotice (de ex. *Muribaculum intestinale*, ρ = 0,62). În grupul placebo, tiparul a fost dominat de *Enterobacteriaceae*.

- Calitatea vieții (RAND SF-36, Cronbach α = 0,739–0,898): interacțiunea grup × timp a fost semnificativă pentru vitalitate (p = 0,001), starea de bine emoțională (p = 0,001) și limitările datorate problemelor fizice (p = 0,024).

3.5 Valoare aplicativă

Produsul face obiectul cererilor de brevet
OSIM A00200/02.04.2026: „Iaurt cu *Lacticaseibacillus rhamnosus* şi *Bacillus clausii* încapsulat și procedeu de obținere” şi
EPO 26464006.1/EP26464006/11.08.2026: “Yoghurt containing encapsulated *Lacticaseibacillus rhamnosus* and *Bacillus clausii* and a process for its production”.

Metoda continuă un produs anterior al doctorandei, iaurtul cu capsule biopolimerice cu suc natural de fructe (RO137317A2).

4. Contribuții personale

Doctoranda a parcurs personal toate etapele cercetării, de la conceperea formulelor la analiza datelor clinice. Contribuțiile proprii sunt:

- Formularea ipotezei de lucru și a designului experimental în patru etape succesive, fiecare validând premisele etapei următoare;

- Conceperea și optimizarea metodei de obținere a capsulelor prin extrudare (sistem tip Caviar-box, gelifiere în $CaCl_2$ 5%): 6 formule cu metformină și 9 formule probiotice;

- Caracterizarea completă a capsulelor: diametru, colorimetrie CIELab și ΔE, FTIR, SEM, eficiența încapsulării, viabilitate, supraviețuire în fluide gastrointestinale simulate, cinetica de umflare (SR, AUC, T50) și cinetica de eliberare a metforminei;

- Propunerea asocierii sinergice *L. rhamnosus* + *B. clausii*: prima tulpină pregătește mediul intestinal, a doua îl colonizează și are efect imunomodulator;

- Dezvoltarea tehnologiei iaurtului funcțional cu capsule probiotice, producția săptămânală pentru participanți și evaluarea lui pe 21 de zile (pH, sinereză, capacitatea de reținere a apei, culoare, DPPH, viabilitate);

- Organizarea studiului clinic randomizat cu două brațe, cu un produs placebo identic ca aspect: criterii de includere și excludere, consimțământ informat, avize etice (CECS UMFVBT 116/12.09.2022 rev. 2026; Comisia de Etică a USV nr. 273/23.01.2026) și colaborarea cu clinica parteneră;

- Prelucrarea probelor de materii fecale: extracție ADN, amplificare și barcodare 16S ARNr, secvențiere nanopore pe MinION Mk1B, analiză bioinformatică EPI2ME;

- Analiza statistică: ANOVA bidirecțională/OLS cu test Tukey HSD (OriginPro); ANOVA mixtă 2 × 2, teste Wilcoxon și Mann–Whitney U, corelații Spearman (R 4.3.1); agregare taxonomică pe filum, gen și grupuri funcționale pentru a reduce multiplicitatea testelor;

- Valorificarea rezultatelor prin 3 articole în reviste Q1 (plus un articol publicat in revista Q1 după depunerea tezei) și o cerere de brevet de invenție la OSIM şi EPO.

5. Listă lucrări

Articole științifice publicate din teză (reviste cotate Web of Science, cu factor de impact):

1. Roxana Elena Gheorghita, Andrei Lobiuc, Mihai Covasa, Alina Crina Muresan, Ioan Ovidiu Sirbu. Biopolymer-Based Gel Capsules for Improved Probiotic Delivery. *Gels*, 2026, 12, 212. IF 5,3 (Q1). https://doi.org/10.3390/gels12030212 — **prim autor**

2. Roxana Gheorghita, Ioan-Ovidiu Sirbu, Andrei Lobiuc, Mihai Covasa. Sodium Alginate–Starch Capsules for Enhanced Stability of Metformin in Simulated Gastrointestinal Fluids. *Biomimetics*, 2024, 9, 716. IF 3,9 (Q1). https://doi.org/10.3390/biomimetics9110716 — **prim autor**

3. Olga Adriana Caliman-Sturdza, Josiana A. Vaz, Ancuta Veronica Lupaescu, Andrei Lobiuc, Codruta Bran, Roxana Elena Gheorghita. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Probiotic Strains. *International Journal of Molecular Sciences*, 2026, 27(2), 1079. IF 4,9 (Q1). https://doi.org/10.3390/ijms27021079 — **ultim autor**

4. Gheorghita, Roxana Elena, Delia Viola Reurean Pintilei, Olga Adriana Caliman Sturdza, Roxana Filip, Alina Crina Muresan, Monica Iavorschi, Ioan Ovidiu Sirbu. 2026. Probiotic-Enriched Yogurt with Encapsulated Lacticaseibacillus rhamnosus and Bacillus clausii: Product Characterization and Quality of Life Assessment in Type 2 Diabetes. *Nutrients* 2026, 18(21), 3523. IF 5,8 (Q1). https://doi.org/10.3390/nu18213523 – **prim autor,** publicat după depunerea tezei.

Factorul de impact cumulat este 14,1 (+ 5,8, articolul publicat după depunerea tezei; rezultatele acestui articol se regăsesc in corpul tezei).

Proprietate intelectuală:

- Cerere de brevet de invenție OSIM A00200/02.04.2026: „Iaurt cu *Lacticaseibacillus rhamnosus* şi *Bacillus clausii*încapsulat și procedeu de obținere”. Autori: Roxana Elena Gheorghiță, Ioan Ovidiu Sîrbu, Mihai Covaşă, Delia Reurean Pintilei, Andrei Lobiuc.

- Cerere de brevet de invenție European Patent Office (EPO) 26464006.1/EP26464006/11.08.2026: “Yoghurt containing encapsulated *Lacticaseibacillus rhamnosus* and *Bacillus clausii* and a process for its production”. Autori: Roxana Elena Gheorghiță, Ioan Ovidiu Sîrbu, Mihai Covaşă, Delia Reurean Pintilei, Andrei Lobiuc.

6. Comentariu critic

Teza este o lucrare originală și unitară, cu un parcurs translațional rar întâlnit într-un singur proiect doctoral: de la formularea materialului la produs și apoi la pacient. Calitatea ei este confirmată de cele trei articole publicate în reviste Q1 și de cererile de brevet.

Puncte forte:

- Coerența designului: fiecare etapă selectează, pe baza datelor, formula folosită în etapa următoare.

- Caracterizarea fizico-chimică și microbiologică a capsulelor este amplă și folosește metode complementare (FTIR, SEM, colorimetrie, cinetică de umflare și de eliberare), cu analiză statistică factorială.

- Studiul clinic are un braț placebo cu un produs identic ca aspect și avize etice. Eficacitatea este evaluată prin interacțiunea grup × timp și prin compararea modificărilor între grupuri, nu doar prin comparații intra-grup.

- Materialele sunt accesibile și tehnologia este simplă, deci scalabilă industrial. Vehiculul este un aliment de consum curent, ceea ce favorizează complianța.

- Interpretarea rezultatelor microbiotei este prudentă: doctoranda discută explicit diferența dintre efectele funcționale și modificările taxonomice.

Limite și aspecte de aprofundat (recunoscute de către doctorandă):

- Eșantionul este mic (26 + 25 de pacienți analizați), iar intervenția este scurtă (3 săptămâni). HbA1c și greutatea corporală nu au putut fi evaluate, din cauza variantei nule între vizite.

- Grupurile au fost dezechilibrate la momentul inițial. Grupul experimental a avut scoruri SF-36 semnificativ mai mari pe toate subdomeniile și o glicemie medie inițială mai mică (136,9 vs. 168,6 mg/dl). Datele favorabile vor trebui confirmate într-un studiu cu randomizare stratificată și analiză ajustată pentru valorile inițiale.

- Datorită rezoluției la nivel de specie a secvențierii 16S si a eșantionului mic, corelațiile specie–marker sunt doar exploratorii: 46 din 1.458 de teste (grupul cu probiotice) și 72 din 1.542 (grupul placebo) au fost semnificative nominal, proporții apropiate de rata de 5% așteptată întâmplător. Niciun gen nu a atins pragul FDR (*Clostridioides*și *Alistipes*, q = 0,17).

- Deoarece studiul nu a confirmat direct prezența tulpinilor administrate în materiile fecale și nu a măsurat SCFA. Mecanismul funcțional propus rămâne, deocamdată, o ipoteză.

Aceste limite nu diminuează valoarea contribuției. Ele definesc direcțiile de continuare propuse chiar de către doctorandă: cohorte mai mari, durată mai lungă, doze și combinații diferite de tulpini, parametri clinici suplimentari și monitorizarea stilului de viață.

7. Concluzii

Teza demonstrează că matricea alginat de sodiu – amidon de grâu (1:1), obținută prin extrudare, este un sistem eficient de livrare a probioticelor. Încapsularea atinge ~96%, iar supraviețuirea după tranzitul gastrointestinal simulat este de 97%. Sistemul este stabil în medii acide și asigură eliberare intestinală țintită.

Matricea a fost transpusă cu succes într-un aliment funcțional, iaurtul cu *L. rhamnosus* și *B. clausii* încapsulate. Produsul a rămas stabil 21 de zile, a menținut și chiar a crescut viabilitatea tulpinilor și face obiectul unei cereri de brevet.

Într-un studiu randomizat, controlat placebo, consumul produsului timp de 3 săptămâni de către pacienți cu T2DM a fost asociat cu scăderi semnificative ale glicemiei, trigliceridelor și colesterolului total. S-au observat și modularea funcțională a microbiotei și ameliorarea unor dimensiuni ale calității vieții. Modificările taxonomice la nivel de filum au fost limitate.

Lucrarea are caracter interdisciplinar: microbiologie, biotehnologie, știința alimentelor, nutriție și cercetare clinică. Rezultatele au fost valorificate prin 3 articole Q1 (IF cumulat 14,1), o cerere de brevet OSIM şi una EPO. Apreciez că teza îndeplinește cerințele de originalitate, rigoare științifică și valorificare a rezultatelor pentru susținerea publică. Recomand comisiei acordarea titlului științific de doctor în domeniul Medicină.

Conducător de doctorat: Prof. univ. dr. Sîrbu Ioan Ovidiu Sirbu



Student-doctorand: Pușcășelu (Gheorghiță) Roxana-Elena

