
REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Studii privind separarea și bioaccesibilitatea unor produși naturali

Doctorand: **Alexandru NICOLESCU**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Gianina Cristina CRIȘAN**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

INTRODUCERE	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	3
1. Producții naturali.....	5
2. Extracție, separare și identificare.....	7
2.1. Extracție <i>versus</i> separare	7
2.2. Extracția modernă: optimizare, EAU și EAE	8
2.3. HPLC-MS în separarea și identificarea fitochimică.....	10
2.4. Metodele preliminare <i>in vitro</i> în fitochimie	11
3. Bioaccesibilitate.....	13
3.1. Introducere.....	13
3.2. Abordarea modernă.....	14
3.3. Bioaccesibilitatea polifenolilor	15
3.4. Bioaccesibilitatea carotenoidelor	16
CONTRIBUȚII PERSONALE	17
4. Ipoteză și obiective.....	19
5. Primul studiu. Potențiale aplicații terapeutice ale infuziilor și extractelor hidroalcoolice dezvoltate din <i>Salvia glutinosa</i> L. (cînsteț) și separarea și identificarea compușilor fenolici utilizând HPLC-MS	21
5.1. Introducere.....	21
5.2. Ipoteză și obiective.....	22
5.3. Materiale și metode	23
5.4. Rezultate	27
5.5. Discuții.....	33
5.6. Concluzii.....	35
6. Al doilea studiu. Dezvoltarea unui proces de extracție asistată de ultrasunete optimizată și enzimatică a compușilor fenolici din pseudo-fructele de <i>Rosa canina</i> L. (măceșe) și separarea și identificarea acestora utilizând HPLC-MS.....	37
6.1. Introducere.....	37
6.2. Ipoteză și obiective.....	38
6.3. Materiale și metode	38
6.4. Rezultate	42
6.5. Discuții.....	50
6.6. Concluzii.....	53

7. Al treilea studiu. Asocierea extracției enzimatică și a extracției apoase asistate de ultrasunete optimizate a glicozidelor flavonoidice din fructele uscate de <i>Hippophae rhamnoides</i> L. (cătăină albă) și analiza lor utilizând HPLC-MS.	55
7.1. Introducere	55
7.2. Ipoteză și obiective	56
7.3. Materiale și metode	56
7.4. Rezultate.....	60
7.5. Discuții	71
7.6. Concluzii	75
8. Al patrulea studiu. Determinări preliminare ale bioaccesibilității aplicate extractelor de <i>Salviae glutinosae herba</i> , <i>Cynosbati fructus</i> și <i>Hippophae fructus</i>	77
8.1. Introducere	77
8.2. Ipoteză și obiective	77
8.3. Materiale și metode	78
8.4. Rezultate.....	82
8.5. Discuții	85
8.6. Concluzii	86
9. Concluzii generale	89
10. Originalitate și contribuții inovative.....	91
REFERINȚE.....	93

Cuvinte cheie: separare, extracție, *Salvia glutinosa* L., *Rosa canina* L., *Hippophae rhamnoides* L., bioaccesibilitate.

LISTA DE PUBLICAȚII

Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. **Nicolescu A**, Babotă M, Dias MI, Calhelha R, Rocchetti G, Crișan G, Mocan A, Barros L, Pârnu EA. Potential therapeutic applications of infusions and hydroalcoholic extracts of Romanian glutinous sage (*Salvia glutinosa* L.). *Frontiers in Pharmacology* 2022;13:975800. doi:10.3389/fphar.2022.975800. *Factor de impact ISI JCR₂₀₂₂ – 5.600 (Studiu detaliat în Capitolul 5).*
2. **Nicolescu A**, Babotă M, Zhang L, Bunea CI, Gavrilaș L, Vodnar DC, Mocan A, Crișan G, Rocchetti G. Optimized Ultrasound-Assisted Enzymatic Extraction of Phenolic Compounds from *Rosa canina* L. Pseudo-Fruits (Rosehip) and Their Biological Activity. *Antioxidants* 2022;11(6):1123. doi:10.3390/antiox11061123. *Factor de impact ISI JCR₂₀₂₂ – 7.000 (Studiu detaliat în Capitolul 6).*

3. **Nicolescu A**, Babotă M, Barros L, Rocchetti G, Lucini L, Tanase C, Mocan A, Bunea CI, Crișan G. Bioaccessibility and bioactive potential of different phytochemical classes from nutraceuticals and functional foods. *Frontiers in Nutrition* 2023;10:1184535. doi: 10.3389/fnut.2023.1184535. *Factor de impact ISI JCR₂₀₂₃ – 4.000 (Studiu detaliat în Capitolul Stadiul Actual al Cunoașterii).*
4. **Nicolescu A**, Babotă M, Aranda CE, Inês Dias M, Añibarro-Ortega M, Cornea-Cipcigan M, Tanase C, Sisea CR, Mocan A, Barros L, Crișan G. Association of enzymatic and optimized ultrasound-assisted aqueous extraction of flavonoid glycosides from dried *Hippophae rhamnoides* L. (Sea Buckthorn) berries. *Ultrasonics Sonochemistry* 2024; 108: 106955. doi: 10.1016/j.ultsonch.2024.106955. *Factor de impact ISI JCR₂₀₂₃ – 8.700 (Studiu detaliat în Capitolul 7).*

INTRODUCERE

Această teză de doctorat a fost structurată având în vedere două obiective majore: posibilitățile de separare și respectiv evaluarea bioaccesibilității, aplicate diferitelor matrici care pot fi considerate a fi produși naturali de origine vegetală. Din acest motiv, primele studii au explorat diferite protocoale de extracție și separare și au aplicat analize fitochimice bazate pe HPLC-MS, fiind urmate de o evaluare preliminară a bioaccesibilității extractelor dezvoltate. În plus, având în vedere importanța produselor de origine vegetală în cercetarea alimentară, studiile de doctorat au fost finalizate cu un studiu de tip review al literaturii, în care a fost explorată bioaccesibilitatea în corelație cu bioactivitatea nutraceuticelor și a alimentelor funcționale.

Importanța rezultatelor a fost demonstrată prin publicarea a patru lucrări științifice cu un factor de impact cumulat de 25,300. Dintre acestea, trei au reprezentat lucrări de cercetare originale, iar una a fost un review critic al literaturii, fiind publicate în articole aparținând primei și celei de-a doua quartile, conform *Journal Citation Reports™* (2025). Cea mai importantă realizare este publicarea Studiului 3 în revista *Ultrasonics Sonochemistry* (Q1, primul în categoria *Acustică*). În plus, rezultatele selectate din teza de doctorat au fost prezentate în cadrul unor conferințe internaționale (the Annual Meeting of the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, decembrie 2022) și naționale (Congresul Național de Farmacie, ediția a XIX-a, Cluj-Napoca, septembrie 2023).

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

În general, termenul „produs natural” este reprezentativ pentru metaboliții secundari, produși de organismele vii prin biosinteză. Speciile de plante prezintă o istorie îndelungată de a fi utilizate ca produși naturali, iar produsele derivate demonstrează aplicabilitate în domenii diverse. Importanța acestora este marcată de dezvoltarea diferitelor tipuri de suplimente alimentare sau nutraceutice, însă cel mai important aspect este descoperirea de noi compuși cu activitate farmacologică determinată. Valorificarea produselor botanice ca potențiali agenți terapeutici este un proces lung și anevoios, incluzând selectarea matricei, autentificarea, extracția, separarea, precum și analize chimice, farmacologice și toxicologice comprehensive.

Termenul „extracție” se referă la practica preliminară comună utilizată pentru îmbogățirea matricilor naturale în anumiți metaboliți și pentru eliminarea interferențelor din probă. Prin urmare, extractibilitatea se bazează pe diferența de solubilitate a compușilor chimici în produsul natural; se creează astfel o distincție subtilă față de termenul „separare”. Cu alte cuvinte, deși extracția și separarea pot fi procese distincte, acestea sunt fundamental interconectate în domeniul cercetării fitochimice. Pe de altă parte, strategiile de optimizare se referă la aplicabilitatea potențială a parametrilor de extracție, care pot induce randament și eficiență maxime în contextul unui anumit mediu și pe baza unui model matematic determinat empiric. În acest caz, mai mulți parametri pot fi de interes, precum natura și concentrația solventului, tipul de extracție, timpul și temperatura, precum și raportul dintre materialul vegetal și solvent. În plus, utilizarea tehnicilor analitice, cum ar fi testele de screening spectrofotometric și metoda HPLC-MS, prezintă o importanță crucială în cercetarea fitochimică.

Bioaccesibilitatea se referă la fracțiunea dintr-un anumit produs care poate fi accesibilă procesului de absorbție intestinală. Cele mai fiabile modele sunt tehnicile de digestie simulată *in vitro*, cu aplicabilitate în diferite domenii, cum ar fi nutriția umană și fitoterapia. Cei mai importanți factori care pot influența digestibilitatea sunt natura și compoziția plantei, natura chimică a compușilor bioactivi, cât și solubilitatea și permeabilitatea substanțelor fitochimice. În final, principalii metaboliți secundari prezintă un comportament specific în ceea ce privește digestibilitatea, acizii fenolici, flavonoidele și carotenoidele fiind exemplele majore.

CONTRIBUȚII PERSONALE

Studiul 1. Potențiale aplicații terapeutice ale infuziilor și extractelor hidroalcoolice dezvoltate din *Salvia glutinosa* L. (cîsteț) și separarea și identificarea compușilor fenolici utilizând HPLC-MS

Scop / Obiective: Mai multe specii de salvie sunt cunoscute pentru aplicațiile lor terapeutice valoroase. Acest studiu a avut ca scop evaluarea potențialelor efecte bioactive ale infuziilor și tincturilor de *Salvia glutinosa* L., folosind material vegetal colectat din două locații diferite din România. Astfel, obiectivele au fost: a) evaluarea preliminară a potențialului antioxidant, antiproliferativ, antiinflamator și antidiabetic al extractelor; și b) aplicarea tehnicii LC-DAD-ESI/MSⁿ pentru analiza metaboliților fenolici.

Material și metode: Părțile aeriene, *Salviae glutinosae herba*, au fost colectate din două zone din România, mai exact din județele Vâlcea și Brașov. A fost aplicată extracția clasică prin infuzie și macerare. Analiza fitochimică a fost aplicată folosind HPLC-MSⁿ, cu detecție DAD și ESI în modul negativ. În plus, au fost aplicate evaluări ale conținutului total de fenoli și flavonoide, ale potențialului antioxidant, ale activității antiglucozidazice, antiinflamatorii și antiproliferative.

Rezultate: Analiza HPLC-MS a contribuit la identificarea a zece metaboliți fenolici majori, inclusiv acizi fenolici și derivați flavonoidici. Cei mai abundenți compuși au fost reprezentați de acidul rozmarinic, acidul sagerinic și luteolin acetil-glucozida. În plus, au fost identificate unele tipuri de flavonoid-*O*- și *C*-hexozide, împreună cu metaboliți specifici pentru speciile de salvie, cum ar fi acizii fenolici trimeri denumiți acid salvianolic A și J. Evaluarea *in vitro* a potențialului bioactiv (antioxidant, antidiabetic, antiproliferativ și antiinflamator) sugerează că abundența în polifenoli a extractelor de cîsteț ar putea fi o bază semnificativă pentru aplicațiile terapeutice ale speciei, iar principala observație a fost că extractele hidroetanolice au prezentat o bioactivitate superioară comparativ cu infuziile.

Concluzii: Rezultatele susțin utilizarea extractelor hidroetanolice de *S. glutinosa* L. ca potențiale produse fitoterapeutice în tratamentul adjuvant al inflamațiilor și diabetului. Predominanța metaboliților fenolici bioactivi în cantități mari (cum ar fi acidul rozmarinic și luteolina) susține utilizarea cîstețului ca o alternativă la speciile comune de salvie.

Studiul 2. Dezvoltarea unui proces de extracție asistată de ultrasunete optimizată și enzimatică a compușilor fenolici din pseudo-fructele de *Rosa canina* L. (măceșe) și separarea și identificarea acestora utilizând HPLC-MS

Scop / Obiective: Acest studiu a dorit să dezvolte o metodă optimizată de extracție a fracțiunii fenolice conținute în pseudo-fructele de *R. canina* L. (măceșe) utilizând extracția asistată de ultrasunete (EAU) și enzimatică (EAE) pentru a stabili și descrie influența parametrilor de extracție asupra calității extractelor obținute. În continuare, un obiectiv a fost de a analiza extractele privind conținutul lor polifenolic individual și potențialul bioactiv, utilizând metode de decelare a potențialelor antioxidante și inhibitoare enzimatică *in vitro*. În cele din urmă, un obiectiv a fost corelarea rezultatelor bioactive cu profilurile fenolice ale acestor preparate vegetale.

Material și metode: Măceșele au fost uscate folosind un protocol optimizat și apoi supuse unui design experimental de optimizare pentru EAU. După validarea modelului, a fost aplicată EAU optimă în comparație cu EAU și EAE ca etapă de pre-tratament. Analiza fitochimică a fost aplicată utilizând UHPLC-HRMS, fiind urmată de evaluarea activității antioxidante și antienzimatice *in vitro*. În cele din urmă, au fost evaluate corelațiile dintre acești parametri.

Rezultate: Parametrii potențiali optimi de extracție, pe baza design-ului experimental de tipul D-optimal, au fost determinați ca fiind 50% amplitudine, 50 minute și raport 1:20. Modelarea matematică și analiza statistică au validat aceste rezultate. Determinările inițiale au sugerat că EAE și EAU a dus la un randament superior al polifenolilor totali în comparație cu EAU simplă. Cu toate acestea, folosind metode clasice de cuantificare, compoziția extractelor a arătat o diferență inversă semnificativă după liofilizare. Analiza UHPLC-HRMS a evidențiat un conținut ridicat de flavonoide (în special flavone, flavan-3-oli și flavonoli), în timp ce acidul galic a fost cel mai abundent compus în ambele extracte. A fost identificată o corelație între profilul fitochimic și potențialul antioxidant și inhibitor enzimatic *in vitro* al celor două extracte, sugerând relevanța măceșelor datorită conținutului lor în compuși bioactivi. S-a sugerat că utilizarea exclusivă a EAU a dus la un conținut fenolic cumulativ mai ridicat și la un potențial bioactiv mai mare, comparativ cu utilizarea asocierii EAE și EAU.

Concluzii: Studiul a stabilit pentru prima dată un protocol de EAU optimizată a măceșelor, bazată pe variația parametrilor de sonicare. În plus, a raportat pentru prima dată aplicarea potențială a EAE ca pre-tratament pentru EAU în acest protocol, oferind diverse direcții pentru cercetări viitoare în domeniul nutriției.

Studiul 3. Asocierea extracției enzimaticе și a extracției apoase asistate de ultrasunete optimizate a glicozidelor flavonoidice din fructele uscate de *Hippophae rhamnoides* L. (cătină albă) și analiza lor utilizând HPLC-MS

Scop / Obiective: Acest studiu a avut ca scop dezvoltarea unei metode EAU optimizată bazată pe extracția cu apă, folosind EAE ca pre-tratament înainte de EAU, în prezența sau absența tampoanelor extractive. Din acest motiv, abordarea metodologică a urmărit să descrie influența parametrilor de extracție aleși asupra profilului bioactiv și fenolic al formulărilor. În plus, studiul a dorit să evalueze bioactivitatea extractelor în corelație cu analiza fitochimică. Obiectivul major al studiului a fost dezvoltarea de extracte inovatoare folosind un protocol de optimizare nou, diferențele statistice fiind determinate pentru tipul de extracție și prezența tampoanelor de extracție.

Material și metode: Fructele de cătină au fost uscate și apoi supuse unui design experimental de optimizare al EAU. După validarea modelului, parametrii optimi au fost aplicați în comparație cu EAU și EAE ca etapă de pre-tratament. Tehnica HPLC-MS a fost utilizată pentru identificarea tentativă a metaboliților fenolici. Evaluarea bioactivității *in vitro* a fost aplicată folosind diverse teste pentru potențialul antioxidant și de inhibare enzimatică. În cele din urmă, analiza statistică a fost aplicată utilizând PCA și HCA.

Rezultate: Designul experimental D-optimal a permis identificarea potențialilor parametri optimi: 34% amplitudine a ultrasunetelor, 39,3 minute și un raport 1:10. Evaluarea extractelor a evidențiat importanța parametrilor de extracție în timpul EAU, precum și a EAE. Bioactivitatea *in vitro* a fost superioară pentru EAE și EAU în comparație cu EAU simplă. Profilul fenolic a fost evaluat utilizând separare HPLC cu detecție UV-VIS, urmată de analiza MSⁿ. Toate cele patru extracte au conținut diverși derivați O-glicozilați de izoramnetină, indicând faptul că flavonol-glicozidele reprezintă clasa principală de fenolici. În plus, extractele au prezentat compuși flavonoidici particulari, inclusiv flavan-3-oli (catechină și epigallocatechină) și derivați glicozidici ai quercetinei și luteolinei. Extractele E-EAU netamponate au prezentat cele mai mari valori pentru activitatea antioxidantă *in vitro*, precum și pentru conținutul fenolic cumulativ.

Concluzii: Optimizarea validată a protocolului de extracție a servit drept fundament pentru evaluarea parametrilor EAU ± EAE utilizând principiile chimiei verzi. Aceste rezultate susțin dezvoltarea produselor nutraceutice din extractele apoase de cătină, sugerând în același timp direcții de cercetare viitoare.

Studiul 4. Determinări preliminare ale bioaccesibilității aplicate extractelor de *Salviae glutinosae herba*, *Cynosbati fructus* și *Hippophae fructus*

Scop / Obiective: Obiectivul principal al acestui studiu a fost de a aplica un protocol standardizat de digestie *in vitro* extractelor dezvoltate în timpul primelor trei studii. În consecință, studiul a urmărit să evalueze bioaccesibilitatea preliminară a extractelor, creând un fundament pentru determinările viitoare legate de aceste trei matrici.

Material și metode: Protocoalele de extracție au fost aplicate pentru trei matrici vegetale diferite: părțile aeriene ale *Salvia glutinosa* L. (extracție hidroetanolică 70%), fructele de *Hippophae rhamnoides* L. și pseudo-fructele de *Rosa canina* L. (ambele prin EAU optimizată utilizând apă ca solvent). După elaborarea extractelor, a fost utilizat un model de digestie *in vitro* standardizat pe baza protocolului INFOGEST pentru determinarea bioaccesibilității potențiale. Evaluarea accesibilității a fost aplicată utilizând mai multe teste, cum ar fi conținutul total fenolic și flavonoidic (pentru screening fitochimic) cât și metodele DPPH, ABTS și FRAP (pentru capacitatea antioxidantă).

Rezultate: Rezultatele determinărilor bioaccesibilității au fost foarte variabile în funcție de fiecare matrice vegetală și fiecare metodă de determinare. Acest studiu a reprezentat prima aplicare a digestiei simulate la specia *S. glutinosa*. În cazul extractului de *S. glutinosa*, influența digestiei a fost limitată și numai totalul flavonoidic a prezentat o scădere rapidă a concentrației lor. În cazul extractului de *R. canina*, conținutul fenolic total s-a modificat ne semnificativ la finalul digestiei intestinale, în timp ce profilul antioxidant s-a transformat semnificativ. Pentru extractul de *H. rhamnoides*, conținutul fenolic total a prezentat un profil relativ constant, în timp ce toate celelalte determinări au sugerat o degradare avansată a speciilor flavonoidice și antioxidante. Rezultatele evidențiază importanța determinării mecanismelor și cineticii de degradare, pe lângă evaluarea bioaccesibilității.

Concluzii: Aceste determinări preliminare susțin aplicarea digestiei simulate în analiza curentă a extractelor de plante. Observațiile pot ghida viitoarele eforturi în optimizarea parametrilor de formulare pentru a crește eliberarea compușilor fitochimici bioactivi. Acest studiu poate fi continuat în mai multe direcții de cercetare, inclusiv prin aplicarea determinărilor LC-MS și a metodelor care pot determina capacitatea de absorbție a fracțiunilor bioaccesibile, cum ar fi modelul Caco-2.

CONCLUZII GENERALE

Experimentele efectuate în cadrul studiilor doctorale au reușit să îndeplinească scopurile și obiectivele prezentate inițial, ceea ce se reflectă în publicarea a trei studii experimentale în reviste de prestigiu din domeniul cercetării fitochimice, precum și un studiu de review a literaturii legat de determinarea bioaccesibilității. Acest studiu a evaluat corelația dintre bioaccesibilitatea *in vitro* și bioactivitatea speciilor fitochimice din nutraceutice și alimente funcționale.

Folosind HPLC-MS pentru a evalua compoziția fitochimică a tincturilor și infuziilor de *Salvia glutinosa* L., au fost identificați mai mulți metaboliți polifenolici, acidul rosmarinic, acidul sagerinic și luteolin acetil-glucozida fiind majoritari. Alte flavonoid-*O*- și *C*-hexozide, precum și acizii salvianolici A și J, au fost identificați în cantități mai mici. Extractele hidroetanolice au prezentat o bioactivitate *in vitro* superioară comparativ cu infuziile.

Optimizarea EAU a pseudo-fructelor de *Rosa canina* L. (măceșe) a determinat că amplitudinea de 50%, 50 min de extracție și raportul 1:20 au fost parametrii optimi. UHPLC-HRMS a fost utilizată pentru a evalua profilul fitochimic, relevând derivați flavonodici, acizi fenolici, precum și alte clase de polifenoli. Principalii metaboliți au fost antociani (delfinidină), flavone (luteolin-7-*O*-rutinozidă), flavanoli (epicatechină), flavonoli (morină) și acizi fenolici (acid galic, cafeoil-glucoză). Determinările bioactivității *in vitro* au indicat utilizarea potențială a extractelor optime de măceșe ca nutraceutice.

Optimizarea EAU a fructelor de *Hippophae rhamnoides* L. (cătină) a concluzionat că amplitudinea de 34%, 39,33 min de extracție și raportul 1:10 au fost parametrii optimi. În plus, a fost aplicat un pre-tratament enzimatic. Analiza HPLC-MSⁿ a permis adnotarea mai multor derivați *O*-glicozilați de izoramnetină, precum și a 3-flavanolilor (catechină și epigallocatechină) și a glicozidelor de quercetină sau luteolină. Bioactivitatea *in vitro* a fost superioară pentru EAE și EAU în comparație cu EAU simplă.

În cele din urmă, evaluarea digestiei *in vitro* (folosind protocolul INFOGEST) a determinat informații preliminare privind bioaccesibilitatea extractelor menționate anterior. Rezultatele studiului au variat foarte mult. Impactul digestiei a fost minim în cazul tincturii de *S. glutinosa*. Profilul antioxidant al extractului de *R. canina* a suferit o transformare semnificativă, dar cu diferențe mici în conținutul fenolic. Extractul de *H. rhamnoides* a prezentat un profil relativ stabil pentru compușii fenolici, dar alte teste au indicat o degradare avansată.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE CERCETĂRII DOCTORALE

Factorul inovativ constă în dezvoltarea de protocoale optimizate pentru extracția asistată de ultrasunete a derivaților fenolici din pseudo-fructe de *Rosa canina* L. și fructele de *Hippophae rhamnoides* L., reprezentând un punct de plecare pentru dezvoltarea de noi produse nutraceutice. În acest context, influența idenificată a parametrilor de extracție funcționează ca o bază pentru viitoarele studii de cercetare. Ca urmare a separării și identificării HPLC-MS, au fost determinați noi metaboliți în specia *Salvia glutinosa* L.

Stabilirea protocoalelor de extracție asistată enzimatic reprezintă o altă etapă semnificativă a acestei teze, prezentând abordări noi pentru matricile vegetale alese. Asocierea EAU optimizate și EAE ca etapă de pre-tratament este o contribuție inovativă suplimentară, subliniind aplicabilitatea protocoalelor de extracție moderne și economice în dezvoltarea produselor nutraceutice. În final, evaluarea bioaccesibilității a fost aplicată pentru prima dată pentru specia *Salvia glutinosa* L.

PHD THESIS SUMMARY

Studies regarding the separation and bioaccessibility of some natural products

PhD Student: **Alexandru NICOLESCU**

PhD Coordinator: **Prof. Dr. Gianina Cristina CRIȘAN**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENT

INTRODUCTION	1
STATE OF THE ART	3
1. Natural products	5
2. Extraction, separation, and identification.....	7
2.1. Extraction <i>versus</i> separation.....	7
2.2. Modern extraction practices: optimization, UAE, and EAE.....	8
2.3. HPLC-MS in phytochemical separation and identification.....	10
2.4. <i>In vitro</i> screening methods in phytochemistry.....	11
3. Bioaccessibility	13
3.1. Introduction	13
3.2. Modern approach.....	14
3.3. Bioaccessibility of polyphenols	15
3.4. Bioaccessibility of carotenoids	16
PERSONAL CONTRIBUTIONS	17
4. Hypothesis and objectives	19
5. First study. Potential therapeutic applications of infusions and hydroalcoholic extracts developed from <i>Salvia glutinosa</i> L. (glutinous sage) and the separation and identification of phenolic compounds using HPLC-MS.....	21
5.1. Introduction	21
5.2. Hypothesis and objectives	22
5.3. Materials and method	23
5.4. Results	27
5.5. Discussions	33
5.6. Conclusions.....	35
6. Second study. The development of an optimized ultrasound-assisted enzymatic extraction of phenolic compounds from <i>Rosa canina</i> L. pseudo-fruits (rosehips) and their separation and identification using HPLC-MS.....	37
6.1. Introduction	37
6.2. Hypothesis and objectives	38
6.3. Materials and method	38
6.4. Results	42
6.5. Discussions	50
6.6. Conclusions.....	53

7. Third study. Association of enzymatic and optimized ultrasound-assisted aqueous extraction of flavonoid glycosides from dried <i>Hippophae rhamnoides</i> L. (sea buckthorn) berries and their analysis using HPLC-MS.	55
7.1. Introduction.....	55
7.2. Hypothesis and objectives.....	56
7.3. Materials and methods	56
7.4. Results.....	60
7.5. Discussion.....	71
7.6. Conclusions	75
8. Fourth study. Preliminary bioaccessibility determinations applied to the extracts of <i>Salviae glutinosae herba</i> , <i>Cynosbati fructus</i> , and <i>Hippophae fructus</i>	77
8.1. Introduction.....	77
8.2. Hypothesis and objectives.....	77
8.3. Materials and methods	78
8.4. Results.....	82
8.5. Discussion.....	85
8.6. Conclusions	86
9. General conclusions.....	89
10. Originality and innovative contributions	91
REFERENCES.....	93

Keywords: separation, extraction, *Salvia glutinosa* L., *Rosa canina* L., *Hippophae rhamnoides* L., bioaccessibility.

PUBLICATION LIST

Papers published *in extenso* as a result of PhD research

1. **Nicolescu A**, Babotă M, Dias MI, Calhelha R, Rocchetti G, Crișan G, Mocan A, Barros L, Pârvu EA. Potential therapeutic applications of infusions and hydroalcoholic extracts of Romanian glutinous sage (*Salvia glutinosa* L.). *Frontiers in Pharmacology* 2022;13:975800. doi:10.3389/fphar.2022.975800. *ISI Impact factor JCR₂₀₂₂* – 5.600 (Study detailed in Chapter 5).
2. **Nicolescu A**, Babotă M, Zhang L, Bunea CI, Gavrilaș L, Vodnar DC, Mocan A, Crișan G, Rocchetti G. Optimized Ultrasound-Assisted Enzymatic Extraction of Phenolic Compounds from *Rosa canina* L. Pseudo-Fruits (Rosehip) and Their Biological Activity. *Antioxidants* 2022;11(6):1123. doi:10.3390/antiox11061123. *ISI Impact factor JCR₂₀₂₂* – 7.000 (Study detailed in Chapter 6).

3. **Nicolescu A**, Babotă M, Barros L, Rocchetti G, Lucini L, Tanase C, Mocan A, Bunea CI, Crișan G. Bioaccessibility and bioactive potential of different phytochemical classes from nutraceuticals and functional foods. *Frontiers in Nutrition* 2023;10:1184535. doi: 10.3389/fnut.2023.1184535. *ISI Impact factor JCR₂₀₂₃ – 4.000 (Study detailed in State of the Art)*.
4. **Nicolescu A**, Babotă M, Aranda CE, Inês Dias M, Añibarro-Ortega M, Cornea-Cipcigan M, Tanase C, Sisea CR, Mocan A, Barros L, Crișan G. Association of enzymatic and optimized ultrasound-assisted aqueous extraction of flavonoid glycosides from dried *Hippophae rhamnoides* L. (Sea Buckthorn) berries. *Ultrasonics Sonochemistry* 2024; 108:106955. doi: 10.1016/j.ultsonch.2024.106955. *ISI Impact factor JCR₂₀₂₃ – 8.700 (Study detailed in Chapter 7)*.

INTRODUCTION

This PhD thesis was structured following two major objectives: the separation possibilities and the bioaccessibility determinations, applied to different matrices, which can be regarded as natural products of plant origin. For this reason, the first studies explored different extraction and separation protocols and phytochemical analyses based on HPLC-MS, followed by a preliminary bioaccessibility assessment of the developed extracts. Moreover, considering the importance of plant matrices in food research, PhD studies were finished with a literature review documentation, in which the bioaccessibility in correlation with the bioactivity of nutraceuticals and functional foods was explored.

The importance of the results was demonstrated through the publication of four scientific papers with a cumulative impact factor of 25.300. From these, three represented original research papers and one was a critical literature review, and they were published in articles belonging to the first and second quartiles, according to *Journal Citation Reports™* (2025). The most important achievement is the publication of Study 3 in the *Ultrasonics Sonochemistry* journal (Q1, first in the category of *Acoustics*). Moreover, selected results from the PhD thesis were presented during international (the Annual Meeting of the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, December 2022) and national (National Congress of Pharmacy, 19th Edition, Cluj-Napoca, September 2023) conferences.

STATE OF THE ART

Generally speaking, the term “natural product” is representative of secondary metabolites produced biosynthetically by organisms. Plant species present a long history of utilization as natural products, with their derivatives demonstrating applicability in diverse fields. Their importance is signified by the development of various types of nutritional supplements or nutraceuticals, yet the most important aspect is the discovery of new compounds with established pharmacological activity. The valorization of botanical products as potential therapeutic agents is a long and tedious process, including the selection of the matrix, authentication, extraction, separation, as well as the comprehensive chemical, pharmacological, and toxicological analyses.

The term “extraction” refers to the common preliminary practice used for the enrichment of natural matrices in certain metabolites and for the elimination of interferences from the sample. Therefore, extractability is based on the difference in solubility of chemical compounds in the natural product; this creates a subtle distinction from the term “separation”. In other words, while extraction and separation might be distinct processes, they are fundamentally interconnected in the field of phytochemical research. On the other hand, optimization strategies relate to the potential applicability of extraction parameters, which can induce maximal yield and efficiency in the context of a specified environment and based on an empirically determined mathematical model. In this case, several parameters can be of interest, such as the nature and concentration of solvent, the type of extraction, the time and temperature, and the ratio between the plant material and the solvent. Furthermore, the use of analytical techniques, such as spectrophotometry screening assays and HPLC-MS, presents a crucial importance in phytochemical research.

Bioaccessibility refers to the fraction of a specified product that may be accessible to the process of intestinal absorption. The most reliable models are *in vitro* simulated digestion techniques, with applicability in different fields, such as human nutrition and phytotherapy. The most important factors that can influence the digestibility are the nature and the composition of the plant, the chemical nature of the bioactive compounds, and the solubility–permeability of the phytochemicals. Lastly, the major secondary metabolites present specific behavior in relation to digestibility, with phenolic acids, flavonoids, and carotenoids being major examples.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

Study 1. Potential therapeutic applications of infusions and hydroalcoholic extracts developed from *Salvia glutinosa* L. (glutinous sage) and the separation and identification of phenolic compounds using HPLC-MS

Aim / Objectives: Several sage species are already established for their valuable therapeutic applications. This study aimed to evaluate the potential bioactive benefits of *Salvia glutinosa* L. infusions and tinctures, using plant material collected from two different locations in Romania. Thus, the objectives were to a) preliminarily evaluate the antioxidant, antiproliferative, anti-inflammatory, and antidiabetic potential of the extracts; and b) apply the LC-DAD-ESI/MSⁿ technique for the analysis of phenolic metabolites.

Materials and methods: The aerial parts, *Salviae glutinosae herba*, were collected from two regions in Romania, specifically Vâlcea and Braşov County. Classical extraction was applied using infusion and maceration. Phytochemical analysis was applied using HPLC-MSⁿ, with DAD detection and ESI in negative mode. In addition, total phenolic and flavonoid content, antioxidant potential, anti-glucosidase, anti-inflammatory, and antiproliferative activity evaluations were applied.

Results: HPLC-MS analysis helped to identify ten major phenolic metabolites, including phenolic acids and flavonoid derivatives. The most abundant compounds were represented by rosmarinic acid, sagerinic acid, and luteolin acetyl-glucoside. Moreover, some types of flavonoid-*O*- and *C*-hexosides were identified, along with specific metabolites for sage species, such as the trimer phenolic acids salvianolic acid A and J. The *in vitro* assessment of potential bioactivity (antioxidant, antidiabetic, antiproliferative, and anti-inflammatory) might suggest that the polyphenol-rich composition of SG extracts could be a significant foundation for the therapeutic applications of the species, and the main observation was that the hydro-ethanolic extracts displayed higher bioactivity compared to the infusions.

Conclusions: The results support the use of hydroethanolic extracts of *S. glutinosa* L. as potential phytotherapeutic products in the adjuvant treatment of inflammations and diabetes. The predominance of bioactive phenolic metabolites in high quantities (such as rosmarinic acid and luteolin) supports the usage of glutinous sage as an alternative to common sage species.

Study 2. The development of an optimized ultrasound-assisted enzymatic extraction of phenolic compounds from *Rosa canina* L. pseudo-fruits (rosehips) and their separation and identification using HPLC-MS

Aim / Objectives: This study aimed to develop an optimized extraction method for the phenolic fraction contained in *R. canina* pseudo-fruits (rosehips) using UAE and EAE in order to establish and describe the influence of extraction parameters on the quality of the obtained extracts. Consequently, one objective was to further analyze the extracts for their individual phenolic content and bioactive potential, using *in vitro* antioxidant and enzyme-inhibitory activities. Lastly, an aim was to correlate the bioactive results with the phenolic profiles of these herbal preparations.

Materials and methods: Rosehips were dried using an optimized protocol and then subjected to an optimization experimental design for UAE. After the validation of the model, optimal UAE was applied in comparison to UAE and EAE as a pre-treatment step. Phytochemical analysis was applied using UHPLC-HRMS, being followed by the assessment of *in vitro* antioxidant and anti-enzymatic activity. Lastly, correlations were evaluated for these parameters.

Results: The potential optimal extraction parameters, based on a D-optimal experimental design, were determined to be 50% amplitude, 50 min of exposure, and a 1:20 ratio. Mathematical modeling and statistical analysis validated these results. Initial determinations suggested that EAE with UAE resulted in a higher recovery of total phenolics in comparison to only UAE. However, using classical quantification methods, the composition of extracts showed a significant reverse difference after lyophilization. The UHPLC-HRMS analysis revealed a high content of flavonoids (especially flavones, flavan-3-ols, and flavonols), while gallic acid was the most abundant compound in both extracts. There was a correlation between the phytochemical profile and the *in vitro* antioxidant and enzyme inhibitory potentials of the two extracts, suggesting the relevance of rosehips due to their content in beneficial bioactive compounds. It was suggested that using exclusively UAE resulted in a higher cumulative phenolic content and a higher bioactive potential, as compared to using the association of EAE and UAE.

Conclusions: The study established for the first time an optimized water-based UAE of rosehips, based on the variation of ultrasound parameters. Furthermore, it reported for the first time the potential application of EAE as a pre-treatment for UAE in this protocol, providing various directions for future research in nutrition.

Study 3. Association of enzymatic and optimized ultrasound-assisted aqueous extraction of flavonoid glycosides from dried *Hippophae rhamnoides* L. (sea buckthorn) berries and their analysis using HPLC-MS

Aim / Objectives: This study aimed to develop an optimized UAE method based on water extraction, using EAE as a pre-treatment before UAE, in the presence or absence of buffers. For this reason, the methodological approach aimed to describe the influence of the chosen extraction parameters on the bioactive and phenolic profile of the formulations. Furthermore, the study aimed to evaluate the bioactivity of the extracts in correlation with phytochemical analysis. The major objective of the study was the development of innovative extracts using a novel optimization protocol, with the statistical differences being determined for the extraction type and the presence of buffers.

Materials and methods: Sea buckthorn berries were dried and then subjected to an optimization experimental design for UAE. After the validation of the model, optimal parameters were applied in comparison to UAE and EAE as a pre-treatment step. HPLC-MS was used for the tentative identification of phenolic metabolites. The evaluation of *in vitro* bioactivity was applied using various assays for antioxidant and enzyme-inhibition potential. Lastly, statistical analysis was applied using PCA and HCA.

Results: The D-optimal experimental design allowed the identification of potential optimal parameters: 34% of ultrasound amplitude, 39.3 min of exposure, and a 1:10 ratio. The assessment of the extracts highlighted the significance of extraction parameters during UAE, as well as EAE. The *in vitro* bioactivity was higher for EAE and UAE in comparison to only UAE. The phenolic profiling was applied using an established HPLC separation with UV-VIS detection, followed by MSⁿ analysis. It was determined that all four extracts contained various *O*-glycosylated isorhamnetin derivatives, indicating the fact that flavonol-glycosides are the major class of phenolics. Furthermore, the extracts presented additional particular flavonoid compounds, including flavan-3-ols (catechin and epigallocatechin) and glycoside derivatives of quercetin and luteolin. Non-buffered E-UAE extracts presented the highest values for *in vitro* antioxidant activity, as well as for the cumulative phenolic content.

Conclusions: The successful optimization of the extraction protocol served as a basis for the evaluation of UAE ± EAE parameters using the principles of green chemistry. These results support the development of nutraceuticals from the aqueous extracts of sea-buckthorns while suggesting future research directions.

Study 4. Preliminary bioaccessibility determinations applied to the extracts of *Salviae glutinosae herba*, *Cynosbati fructus*, and *Hippophae fructus*

Aim / Objectives: The main objective of this study was to apply a standardized *in vitro* digestion protocol to the extracts developed during the first three studies. Consequently, the study aimed to assess the preliminary bioaccessibility of the developed extracts, creating a foundation for future determinations related to these three matrices.

Materials and methods: Extraction protocols were applied for three different plant matrices: the aerial parts of *Salvia glutinosa* L. (70% hydroethanolic maceration), the fruits of *Hippophae rhamnoides* L., and the pseudo-fruits of *Rosa canina* L. (both through optimized UAE water extraction). After the development of the extracts, an established *in vitro* digestion model based on the INFOGEST protocol for the determination of potential bioaccessibility was used. The assessment of the accessibility was applied using several assays, such as total phenolic and flavonoid content (for phytochemical screening), DPPH, ABTS, and FRAP methods (for antioxidant capacity).

Results: The results of bioaccessibility determinations were highly variable according to every plant matrix and determination method. This study represented the first application of simulated digestion to *S. glutinosa*. In the case of *S. glutinosa* extract, the influence of digestion was limited, and only total flavonoids showed a rapid decline in their concentration. For the extract of *R. canina*, the total phenolic content changed slightly at the end of intestinal digestion, yet the antioxidant profile transformed significantly. For the *H. rhamnoides* extract, the total phenolic content showed a relatively constant profile, while all the other determinations suggested an advanced degradation of the flavonoid and antioxidant species. The results highlight the importance of the determination of degradation mechanisms and kinetics in addition to bioaccessibility evaluations.

Conclusions: These preliminary determinations support the application of simulated digestion in the current analysis of plant extracts. The observations can guide future endeavors in the optimization of formulation parameters to increase the delivery of bioactive phytochemicals. This study can be continued on several courses, including the application of LC-MS determinations and methods that can determine the absorption capacity of the bioaccessible fractions, such as the Caco-2 model.

GENERAL CONCLUSIONS

The experiments conducted during the PhD program managed to fulfill the initially presented aims and objectives, which is reflected in the publishing of three experimental studies in prestigious journals from the field of phytochemical research, in addition to one literature review study focused on bioaccessibility determinations. This study evaluated the correlation between *in vitro* bioaccessibility and bioactivity of phytochemical species from nutraceuticals and functional foods.

Using HPLC-MS to evaluate the phytochemical composition of *Salvia glutinosa* L. tinctures and infusions, several polyphenol metabolites were identified, rosmarinic acid, sagerinic acid, and luteolin acetyl-glucoside being major. Other flavonoid-*O*- and *C*-hexosides, as well as salvianolic acids A and J, were identified in lower quantities. The hydro-ethanolic extracts displayed higher *in vitro* bioactivity compared to the infusions.

The optimization of UAE for *Rosa canina* L. pseudo-fruits (rose hips) concluded that 50% ultrasound amplitude, 50 min of extraction, and a 1:20 ratio were optimal parameters. UHPLC-HRMS was used to evaluate the phytochemical profile, revealing flavonoid derivatives, phenolic acids, as well as other classes of phenolics. Major metabolites were anthocyanins (delphinidin), flavones (luteolin-7-*O*-rutinoside), flavanols (epicatechin), flavonols (morin), and phenolic acids (gallic acid, caffeoyl-glucose). Consequent *in vitro* bioactivity determinations indicated the potential use of rosehip optimal extracts as nutraceuticals.

The optimization of UAE for *Hippophae rhamnoides* L. berries concluded that 34% ultrasound amplitude, 39.33 min of extraction, and a 1:10 ratio were optimal parameters. Moreover, an enzymatic pre-treatment was applied. HPLC-MSⁿ analysis allowed the annotation of several *O*-glycosylated isorhamnetin derivatives, as well as flavan-3-ols (catechin and epigallocatechin), and quercetin/luteolin-glycosides. The *in vitro* bioactivity was higher for EAE and UAE in comparison to only UAE.

Lastly, the evaluation of *in vitro* bioaccessibility (using the INFOGEST protocol) determined preliminary data for the abovementioned extracts. The outcomes of the study varied greatly. The impact of digestion was minimal in the case of *S. glutinosa* tinctures. *R. canina* extract's antioxidant profile underwent a dramatic transformation, with small differences for total phenolics. *H. rhamnoides* extract displayed a relatively stable profile for phenolics, but other assays indicated advanced breakdown.

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS

The innovation factor consists of the development of optimized protocols for the green-chemistry water ultrasound-assisted extraction of phenolic derivatives from *Rosa canina* L. pseudo-fruits and *Hippophae rhamnoides* L. fruits, which function as starting points for the development of novel nutraceutical products. In this context, the influence of extraction parameters functions as a basis for future research endeavors. As a result of HPLC-MS separation and identification, new metabolites were determined for *Salvia glutinosa* L.

The establishment of enzymatic-assisted extraction protocols represents another significant milestone of this thesis, representing novel approaches for the chosen plant matrices. The association of optimized UAE and EAE as a pretreatment step is an additional accomplishment, highlighting the applicability of modern, innovative, economically friendly extraction protocols in the development of nutraceuticals. Bioaccessibility evaluation was applied for the first time for the species *Salvia glutinosa* L.