



MINISTERUL  
EDUCAȚIEI  
NAȚIONALE  
OIPOSDRU



**Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați**  
**Școala Doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești**



## **TEZĂ DE DOCTORAT**

**Caracterizarea chimică și studiul activității biologice a  
unor compuși prezenți în specia *Nymphaea alba* din  
Rezervația Biosferei Delta Dunării**

**Doctorand,  
Mihaela Cudălbeanu**

**Conducător științific,  
Prof. dr. habil. chim. Rodica Mihaela Dinică**

**Seria C: Chimie Nr. 3**

**Galați, 2022**



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI



Fondul Social European  
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale  
2007-2013



MINISTERUL  
EDUCAȚIEI  
NAȚIONALE  
OIPOSDRU



**Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați**

**Școala Doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești**



## **TEZĂ DE DOCTORAT**

**Caracterizarea chimică și studiul activității biologice a unor compuși prezenți în specia *Nymphaea alba* din Rezervația Biosferei Delta Dunării**

**Doctorand,**

**Mihaela Cudălbeanu**

**Președinte**

**Acad. Prof. dr. ing. Eugen Victor Cristian Rusu**

*Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați*

**Conducător științific**

**Prof. dr. habil. chim. Rodica Mihaela Dinică**

*Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați*

**Referenți științifici**

**CS I dr. chim. Fernanda Marujo Marques**

*Universidade de Lisboa, Portugalia*

**Prof. dr. habil. biochim. Simona Oancea**

*Universitatea Lucian Blaga din Sibiu*

**Prof. dr. habil. chim. Constantin Apetrei**

*Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați*

**Seria C: Chimie Nr. 3**

**Galați, 2022**

## *Cuprins*

<i>Introducere</i> .....	23
<b><i>PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</i></b> .....	27
<b><i>Capitolul 1 Caracterizarea speciei acvatice studiate</i></b> .....	27
<b>1.1 Generalități asupra plantelor acvatice</b> .....	27
<b>1.2 Descrierea speciei acvatice</b> .....	29
<b>1.3 Compoziția chimică a speciei acvatice</b> .....	32
1.3.1 Polifenoli - compuși aromatici polihidroxicili .....	32
1.3.2 Hidrocarburi și derivați oxigenați .....	38
1.3.3 Acizi grași și esteri ai acizilor grași .....	39
1.3.4 Terpene și terpenoide .....	39
1.3.5 Steroide și steroli .....	40
1.3.6 Alcaloizi .....	40
1.3.7 Macro și microelemente .....	41
<b>1.4 Importanța speciei acvatice studiate</b> .....	42
1.4.1 Aplicații în medicina tradițională .....	42
1.4.2 Proprietățile farmacologice .....	42
<b><i>PARTEA II. CONTRIBUȚII PERSONALE</i></b> .....	48
<b>Obiectivele tezei de doctorat</b> .....	48
<b><i>Capitolul 2 Extracția compușilor biologic activi din specia <i>N. alba</i></i></b> .....	49
<b>2.1 Introducere</b> .....	49
<b>2.2 Obiectivul principal</b> .....	49
<b>2.3 Materiale și metode</b> .....	49
2.3.1 Stabilirea ariei de studiu .....	49
2.3.2 Etapele de prelevare și pregătire ale materialului vegetal .....	50
2.3.3 Caracterizarea materialului vegetal .....	50
2.3.4 Etapele de extracție ale compușilor biologic activi din diferite părți anatomice de <i>N. alba</i> . .....	50
2.3.5 Etapele de separare ale compușilor biologic activi din extract de rădăcină de <i>N. alba</i> ....	51
<b>2.4 Rezultate și discuții</b> .....	53
2.4.1 Aria de studiu .....	53
2.4.2 Prelevarea și pregătirea materialului vegetal.....	54
2.4.3 Imagini microscopice ale materialului vegetal.....	55
2.4.4 Extracția compușilor biologic activi din diferite părți anatomice de <i>N. alba</i> .....	56
2.4.5 Separarea și izolarea compușilor biologic activi din extract de rădăcină de <i>N. alba</i> .....	58
<b>2.5 Concluzii parțiale</b> .....	59

<b>Capitolul 3</b>	<b><i>Analiza compușilor biologic activi din specia N. alba prin cromatografia de gaze cuplată cu spectrometria de masă.....</i></b>	<b>62</b>
<b>3.1</b>	<b>Introducere .....</b>	<b>62</b>
<b>3.2</b>	<b>Obiectivul principal .....</b>	<b>62</b>
<b>3.3</b>	<b>Materiale și metode.....</b>	<b>63</b>
<b>3.4</b>	<b>Rezultate și discuții .....</b>	<b>63</b>
<b>3.5</b>	<b>Concluzii parțiale.....</b>	<b>74</b>
<b>Capitolul 4</b>	<b><i>Analiza compușilor biologic activi din specia N. alba prin cromatografia de lichide de înaltă performanță .....</i></b>	<b>75</b>
<b>4.1</b>	<b>Introducere .....</b>	<b>75</b>
<b>4.2</b>	<b>Obiectivul principal .....</b>	<b>75</b>
<b>4.3</b>	<b>Materiale și metode.....</b>	<b>76</b>
4.3.1	Separarea, identificarea și cuantificarea compușilor biologic activi prin tehnica HPLC-DAD .....	76
4.3.2	Separarea, identificarea și confirmarea compușilor biologic activi prin tehnica LC-MS/MS .....	76
<b>4.4</b>	<b>Rezultate și discuții .....</b>	<b>77</b>
4.4.1	Separarea, identificarea și cuantificarea compușilor biologic activi prin tehnica HPLC-DAD .....	77
4.4.2	Separarea, identificarea și confirmarea compușilor biologic activi prin tehnica LC-MS/MS .....	89
<b>4.5</b>	<b>Concluzii parțiale .....</b>	<b>98</b>
<b>Capitolul 5</b>	<b><i>Identificarea și cuantificarea unor clase de compuși organici cu proprietăți biologic active din specia N. alba .....</i></b>	<b>100</b>
<b>5.1</b>	<b>Introducere .....</b>	<b>100</b>
<b>5.2</b>	<b>Obiectivul principal .....</b>	<b>100</b>
<b>5.3</b>	<b>Materiale și metode.....</b>	<b>100</b>
5.3.1	Extracția și dozarea conținutului total de pigmenți clorofilieni .....	100
5.3.2	Extracția și dozarea conținutului total de carotenoide.....	101
5.3.3	Dozarea conținutului total de acizi fenolici.....	101
5.3.4	Dozarea conținutului total de flavonoide .....	102
5.3.5	Dozarea conținutului total de taninuri condensate .....	102
<b>5.4</b>	<b>Rezultate și discuții .....</b>	<b>102</b>
5.4.1	Conținutul total de pigmenți clorofilieni .....	102
5.4.2	Conținutul total de carotenoide .....	104
5.4.3	Conținutul total de polifenoli .....	105
<b>5.5</b>	<b>Concluzii parțiale .....</b>	<b>113</b>

<b>Capitolul 6</b>	<b><i>Macro și microelemente prezente în diferite părți anatomice de <i>N. alba</i></i></b>	<b>114</b>
<b>6.1</b>	<b>Introducere</b>	<b>114</b>
<b>6.2</b>	<b>Obiectivul principal</b>	<b>114</b>
<b>6.3</b>	<b>Materiale și metode</b>	<b>114</b>
<b>6.4</b>	<b>Rezultate și discuții</b>	<b>115</b>
<b>6.5</b>	<b>Concluzii parțiale</b>	<b>119</b>
<b>Capitolul 7</b>	<b><i>Potențialul antioxidant al compușilor biologic activi din specia <i>N. alba</i></i></b>	<b>120</b>
<b>7.1</b>	<b>Introducere</b>	<b>120</b>
<b>7.2</b>	<b>Obiectivul principal</b>	<b>121</b>
<b>7.3</b>	<b>Materiale și metode</b>	<b>121</b>
7.3.1	Evaluarea activității antioxidante prin inhibarea radicalului liber DPPH	121
7.3.2	Evaluarea activității antioxidante utilizând metoda ABTS	122
7.3.3	Evaluarea activității antioxidante prin metoda FRAP	123
7.3.4	Evaluarea activității antioxidante utilizând metoda BCB	124
7.3.5	Evaluarea potențialului antioxidant prin voltametrie ciclică corelat cu UV-Vis	125
<b>7.4</b>	<b>Rezultate și discuții</b>	<b>125</b>
7.4.1	Activitatea antioxidantă prin inhibarea radicalului liber DPPH	125
7.4.2	Activitatea antioxidantă utilizând metoda ABTS	128
7.4.3	Activitatea antioxidantă utilizând metodele BCB și FRAP	131
7.4.4	Potențialul antioxidant evaluat prin voltametrie ciclică și corelat cu UV-Vis	131
<b>7.5</b>	<b>Concluzii parțiale</b>	<b>133</b>
<b>Capitolul 8</b>	<b><i>Proprietățile antimicrobiene ale compușilor biologic activi din specia <i>N. alba</i></i></b>	<b>135</b>
<b>8.1</b>	<b>Introducere</b>	<b>135</b>
<b>8.2</b>	<b>Obiectivul principal</b>	<b>135</b>
<b>8.3</b>	<b>Materiale și metode</b>	<b>136</b>
8.3.1	Evaluarea proprietăților antibacteriene ale compușilor biologic activi	136
8.3.2	Evaluarea proprietăților antifungice ale compușilor biologic activi	138
<b>8.4</b>	<b>Rezultate și discuții</b>	<b>139</b>
8.4.1	Proprietățile antibacteriene ale compușilor biologic activi	139
8.4.2	Proprietățile antifungice ale compușilor biologic activi	145
<b>8.5</b>	<b>Concluzii parțiale</b>	<b>148</b>
<b>Capitolul 9</b>	<b><i>Potențialul toxic și citotoxic al compușilor biologic activi din specia <i>N. alba</i></i></b>	<b>150</b>

<b>9.1</b>	<b>Introducere .....</b>	<b>150</b>
<b>9.2</b>	<b>Obiectivul principal .....</b>	<b>151</b>
<b>9.3</b>	<b>Materiale și metode.....</b>	<b>151</b>
9.3.1	Evaluarea efectelor toxice și citotoxice ale compușilor biologic activi .....	151
9.3.2	Evaluarea proprietăților antitumorale ale compușilor biologic activi .....	153
<b>9.4</b>	<b>Rezultate și discuții .....</b>	<b>154</b>
9.4.1	Efectele toxice ale compușilor biologic activi asupra germinării cariopselor de grâu ( <i>Triticum aestivum</i> L.).....	154
9.4.2	Efectele citotoxice ale compușilor biologic activi asupra celulelor fibroblaste pulmonare sănătoase.....	157
9.4.3	Potențialul citotoxic al compușilor biologic activi asupra celulelor tumorale ovariene .	160
9.4.4	Potențialul citotoxic al compușilor biologic activi asupra celulelor tumorale prostatice	168
9.4.5	Potențialul citotoxic al compușilor biologic activi asupra celulelor tumorale mamare ..	169
9.4.6	Potențialul citotoxic al compușilor biologic activi asupra celulelor tumorale leucemice.....	170
<b>9.5</b>	<b>Concluzii parțiale .....</b>	<b>171</b>
<b><i>Capitolul 10 Aplicații: Sono-biosinteza AuNPs utilizând extracte de N. alba</i></b>		<b>172</b>
<b>10.1</b>	<b>Introducere .....</b>	<b>172</b>
<b>10.2</b>	<b>Obiectivul principal .....</b>	<b>173</b>
<b>10.3</b>	<b>Materiale și metode.....</b>	<b>174</b>
10.3.1	Sono-biosinteza „verde” a AuNPs utilizând extract de rădăcină de <i>N. alba</i> .....	174
10.3.2	Caracterizarea AuNPs .....	175
10.3.3	Evaluarea proprietăților biologice ale AuNPs.....	177
<b>10.4</b>	<b>Rezultate și discuții .....</b>	<b>178</b>
10.4.1	Sono-biosinteza „verde” a AuNPs utilizând extract de rădăcină de <i>N. alba</i> .....	179
10.4.2	Caracterizarea AuNPs .....	179
10.4.3	Proprietățile biologice ale AuNPs .....	186
<b>10.5</b>	<b>Concluzii parțiale .....</b>	<b>190</b>
<b><i>Concluzii și direcții viitoare de cercetare .....</i></b>		<b>192</b>
<b><i>Referințe bibliografice.....</i></b>		<b>196</b>

## Introducere

Dintotdeauna plantele au constituit o sursă de hrană, dar și „farmacia naturii” pentru oameni și animale, acestea conținând o bogăție de compuși biologic activi. Astfel, foarte multe remedii utilizate din vremuri imemorabile în medicina tradițională au fost puse în valoare prin studierea compoziției chimice, separarea compușilor cu proprietăți biologice active și demonstrarea proprietăților lor farmacologice. Delta Dunării, ca urmare a interacțiunii dintre fluviul Dunărea și Marea Neagră, prezintă un interes științific deosebit datorită resurselor sale naturale regenerabile. Condițiile actuale existente în Delta Dunării au condus la dezvoltarea unei vegetații acvatice diversificată, deosebit de bogată în specii. Printre acestea se numără și specia *Nymphaea alba* (*N. alba*) [1, 2].

Diversi metaboliți secundari din clasa peptidelor, alcaloizilor, flavonoidelor, acizilor fenolici, terpenelor, steroizilor și a taninurilor au fost descoperiți ca fiind prezenți în plantele acvatice. Acești compuși sunt utilizați pe scară largă ca agenți antioxidanți, antiinflamatori, antitumorali, dar și ca antibiotice și antivirale [3, 4]. Numeroase studii arată că aproximativ 80 % din populația lumii folosește și medicina tradițională, astfel că cercetătorii studiază compușii biologic activi din surse naturale și obțin noi produși de semisinteză mai potenți terapeutic. De-a lungul anilor acești compuși naturali s-au identificat a fi instrumente valoroase în lupta atât împotriva bolilor cronice, cât și împotriva bolilor infecțioase. Plantele acvatice au o istorie lungă și bogată în acest domeniu, speciile din familia *Nymphaeaceae* fiind utilizate în medicina tradițională pentru a preveni, ameliora și/sau trata diferite maladii, cum ar fi diabet, boli cardiovasculare, boli inflamatorii, boli tumorale și altele [5, 6, 7, 8]. Potențialul terapeutic al acestor specii acvatice a fost recunoscut în industria farmaceutică datorită conținutului bogat de compuși cu importanță biologică, utilizați în obținerea medicamentelor pentru tratarea bolilor tropicale și orfane [9].

Este dovedit științific faptul că plantele acvatice conțin compuși chimici cu proprietăți biologice active. Specia *N. alba* prezintă un conținut bogat de compuși fitochimici din clasa polifenolilor, inclusiv acizi fenolici, flavonoide, taninuri, dar și alcaloizi, terpenoide, steroli și alte clase de compuși organici [5-8, 10, 11, 12]. În ultimile studii de cercetare, realizate *in vitro*, sunt prezentate cu succes rezultate referitoare la potențialul puternic antioxidant și antibacterian datorat compușilor polifenolici prezenți în specia *N. alba*, printre aceștia numărându-se acidul galic, acidul protocatehic, acidul siringic, quercetina, apigenina sau luteolina [7, 8, 11, 13, 14, 15]. Din specia *N. alba* au fost separați și identificați prin diferite tehnici analitice mai mulți compuși care aparțin clasei polifenolilor [6, 7]. Dintre aceștia, flavonoidele prezintă o varietate de funcții în plante, în principal ajutând la creșterea acestora în timpul stresului fiziologic și furnizează foto-protecție prin activitatea lor antioxidantă [16, 17]. Flavonoidele sunt considerate a fi cea mai proeminentă clasă de metaboliți secundari din speciile acvatice plutitoare [18]. Printre acestea, quercetina, naringina și apigenina au fost studiate pentru activitatea lor antitumorală dovedindu-se active împotriva tumorilor ovariene [19].

Prin urmare, studiul plantele acvatice, datorită potențialului lor de a produce compuși bioactivi, este în continuare un domeniu de interes pentru a identifica noi surse potențiale și valoroase de compuși cu proprietăți farmacologice [4, 20]. Astfel, **scopul** acestei teze de doctorat este de a pune în valoare planta acvatică *N. alba* din Rezervația Biosferei Delta Dunării, din

perspectiva evidențierii compușilor chimici importanți, a descoperirii unor noi proprietăți biologice active, dar și în descoperirea de noi molecule organice cu importanță pentru industria farmaceutică sau industria alimentară și aducând beneficii societății umane și contribuind la îmbunătățirea calității vieții.

Teza de doctorat intitulată „Caracterizarea chimică și studiul activității biologice a unor compuși prezenți în specia *Nymphaea alba* din Rezervația Biosferei Delta Dunării” cuprinde zece capitole, un capitol în care este prezentat stadiul actual al cunoașterii și care cuprinde date din literatura de specialitate despre compoziția chimică a speciei de nufăr studiate precum și diverse proprietăți biologice active ale acesteia, respectiv nouă capitole în care se prezintă, pentru prima dată, contribuția originală referitoare la compoziția chimică și proprietățile biologice ale speciei acvatice *N. alba*.

Teza de doctorat reprezintă un studiu complex și inedit care a avut ca **obiective principale:**

- ✿ Extracția utilizând diferite metode și separarea pentru prima dată a compușilor biologici activi din diferite părți anatomice (fruct, floare, frunză, tulpină și rădăcină) de *N. alba* din Rezervația Biosferei Delta Dunării;
- ✿ Utilizarea tehnicilor moderne de analiză, cromatografia de gaze și cromatografia de lichide, cuplate cu spectrometria de masă, pentru separarea și identificarea pentru prima dată a compușilor biologici activi din fruct, floare, frunză, tulpină și rădăcină de *N. alba* din Rezervația Biosferei Delta Dunării;
- ✿ Identificarea și cuantificarea unor clase importante de compuși organici (clorofile, carotenoide, polifenoli) din fruct, floare, frunză, tulpină și rădăcină de *N. alba* din Rezervația Biosferei Delta Dunării prin metode spectrofotometrice;
- ✿ Identificarea și cuantificarea unor macro și microelemente din fruct, floare, frunză, tulpină și rădăcină de *N. alba* din Rezervația Biosferei Delta Dunării, prin tehnica ICP-OES și AAS;
- ✿ Evaluarea pentru prima dată a potențialului antioxidant al diferitelor extracte de fruct, floare, frunză, tulpină și rădăcină de *N. alba* din Rezervația Biosferei Delta Dunării, prin diferite metode spectrofotometrice (DPPH, ABTS, FRAP, BCB) și electrochimice (CV);
- ✿ Evaluarea pentru prima dată a proprietăților antibacteriene și antifungice a compușilor biologici activi din diferite părți anatomice de *N. alba* din Rezervația Biosferei Delta Dunării;
- ✿ Evaluarea pentru prima dată a potențialului toxic și citotoxic al compușilor biologici activi din diferite părți anatomice de *N. alba* din Rezervația Biosferei Delta Dunării, asupra germinării cariopselor de grâu și a celulelor umane sănătoase;
- ✿ Evaluarea pentru prima dată a proprietăților antitumorale ale compușilor biologici activi din diferite părți anatomice de *N. alba* din Rezervația Biosferei Delta Dunării;
- ✿ Sono-biosinteza AuNPs utilizând extracte de *N. alba* și caracterizarea și evaluarea proprietăților biologice ale nanoparticulelor obținute.

Originalitatea tezei de doctorat reiese analizând datele din literatura de specialitate în care nu s-a găsit până în prezent nici un studiu mai amplu cu privire la analiza compoziția chimică și a potențialului biologic activ al celor cinci părți anatomice ale speciei *N. alba* (fruct, floare, frunză, tulpină și rădăcină) din Rezervația Biosferei Delta Dunării, și pentru prima dată obținând prin biosinteză AuNPs cu proprietăți biologice active.



## PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

### Capitolul 1 Caracterizarea speciei acvatice studiate

#### 1.2 Descrierea speciei acvatice

Specia *N. alba* sau *N. occidentalis*, cunoscută și sub numele popular de nufăr alb european sau trandafirul de apă alb (Figura 1.1), este una dintre cele mai atrăgătoare plante acvatice din genul *Nymphaea*. Specia *N. alba* este o plantă acvatică perenă care aparține subgenului *Nymphaea*, genul *Nymphaea*, subfamilia *Nymphaeoidae*, familia *Nymphaeaceae* și ordinul *Nymphaeales* [6-8, 10-13, 21, 22, 23].



Figura 1.1. Specia *N. alba* din Rezervația Biosferei Deltei Dunării

#### 1.3 Compoziția chimică a speciei acvatice

Compușii bioactivi prezenți în speciile din genul *Nymphaea*, aparțin mai multor clase de compuși organici, precum acizi fenoli, flavonoide, proantocianidine, antocianidine, taninuri, lignani, alcaloizi, antrachinone, saponine, terpenoide, steroli, esterii, zaharide (zaharuri reducătoare, glicozide și polizaharide), aminoacizi și proteine, hidrocarburi alifatiche superioare, fiind dovedit științific faptul că diferite părți componente ale plantelor conțin compuși chimici diferiți [24, 25, 26, 27, 28].

#### 1.4 Importanța speciei acvatice studiate

##### 1.4.1 Aplicații în medicina tradițională

Studiile de cercetare anterioare au demonstrat utilizarea speciilor *Nymphaea* în medicina tradițională pentru tratarea unor afecțiuni diverse, precum acnee, adenopatie, rectocolita ulcerohemoragică, arsuri, tumori, răceli, tuse, dermatoză, diaree, dizenterie, gripă, efelide (pistru), furunculi, gonoree, inflamații ale gâtului, leucoree, nefroză, dureri de dinți, stomatită, tuberculoză, uteroză, vaginoză, diabet sau boli cardiovasculare. Anumite specii de nufăr prezintă efecte tranchilizante și antiparazitare [10, 29, 30, 31].

##### 1.4.2 Proprietățile farmacologice

Familia *Nymphaeaceae* constituie o sursă importantă de antioxidanți, fiind cunoscută și pentru proprietățile sale antibacteriene, antitumorale, antihelmintice, hipolipomiantă, antihepatotoxice și antidiabetice [5, 6, 14, 32, 33, 34]. Unele studii *in vivo* ale speciei *N. alba* au raportat că această plantă prezintă diferite activități biologice, precum antidiabetice, analgezice, antidiareice, hepatoprotective, antioxidante și antiinflamatorii, de inhibare a  $\alpha$ -glucozidazei, de inhibare a stresului oxidativ, activitate anxiolitică și efect anticarcinogen. Studiile *in vitro* au raportat cu succes activități antioxidante și antibacteriene importante [7, 8, 11, 13-15].

## **PARTEA II. CONTRIBUȚII PERSONALE**

### **Obiectivele tezei de doctorat**

Obiectivul general al tezei de doctorat „Caracterizarea chimică și studiul activității biologice a unor compuși prezenți în specia *Nymphaea alba* din Rezervația Biosferei Delta Dunării” a fost identificarea și caracterizarea compușilor chimici din diferite părți anatomice de nufăr, cum ar fi fruct, floare, frunză, tulpină și rădăcină și evidențierea unor activități biologice a compușilor biologic activi identificați în specia *N. alba*.

Obiectivele specifice propuse au fost următoarele:

- ✿ Prelevarea materialului vegetal din Rezervația Biosferei Delta Dunării și pregătirea preliminară a eșantioanelor;
- ✿ Caracterizarea materialului vegetal cu ajutorul unui microscop inversat Zeiss Axio Observer Z1;
- ✿ Extracția compușilor biologic activi din specia *N. alba* prin trei metode de extracție: extracție simplă asistată de ultrasunete, extracție multiplă cu extractorul Soxhlet și extracție simplă cu agitare mecanică;
- ✿ Analiza cromatografică a compușilor biologic activi din specia *N. alba* prin cromatografia de gaze cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS);
- ✿ Analiza cromatografică a compușilor biologic activi din specia *N. alba* prin cromatografia de lichide de înaltă performanță cuplată cu detector cu șir de diode (HPLC-DAD) și cromatografia de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrometria de masă (LC-MS/MS);
- ✿ Identificarea și cuantificarea unor clase de compuși organici cu proprietăți biologice active din specia *N. alba* prin determinări *in vitro* microspectrofotometrice;
- ✿ Determinarea conținutului total de macro și microelemente cu ajutorul unui spectrometru de emisie optică cu plasmă cuplată inductiv (ICP-OES) și spectrofotometru de absorbție atomică în flacără (FAAS) și cuptor cu grafit (GFAAS);
- ✿ Evaluarea potențialului antioxidant al compușilor biologic activi din specia *N. alba*, prin metode microspectrofotometrice de inhibare a radicalilor liberi, precum DPPH, ABTS<sup>•+</sup> și FRAP, decolorarea  $\beta$ -carotenului, dar și prin metode electrochimice, precum voltametria ciclică;
- ✿ Evaluarea proprietăților antimicrobiene ale compușilor biologic activi din specia *N. alba* prin metode *in vitro* de inhibare a bacteriilor Gram-pozitive și Gram-negative, respectiv diferite specii de *Candida*;
- ✿ Determinarea potențialului toxic și citotoxic al compușilor biologic activi din specia *N. alba* prin teste de germinare și analize *in vitro* de citotoxicitate asupra fibroblastelor sănătoase și celulelor tumorale ovariene, mamare, prostatice și leucemice;
- ✿ Biosinteza AuNPs utilizând extracte de *N. alba* și evaluarea activității biologice a nanoparticulelor, cum ar fi activitatea antioxidantă, antibacteriană și antitumorală.

## Capitolul 2 Extracția compușilor biologic activi din specia *N. alba*

### 2.4 Rezultate și discuții

#### 2.4.1 Aria de studiu

Măsurile de protecție și conservare a diversității biologice din Rezervația Biosferei Delta Dunării și în cele din urmă, investigațiile chimice realizate asupra potențialelor habitate de creștere a speciilor de plante acvatice, fac din acest areal, habitatul cel mai potrivit pentru creșterea speciei acvatice studiate și anume, specia *N. alba*. Din totalitatea ecosistemelor acvatice deltaice s-a ales ca zonă de studiu Complexul acvatic Somova-Parcheș.

#### 2.4.2 Prelevarea și pregătirea materialului vegetal

O etapă importantă în realizarea studiului de cercetare și a obiectivelor propuse, o reprezintă prelevarea probelor vegetale. Eșantioanele de material vegetal au fost prelevate în perioada de maximă dezvoltare a speciei *N. alba* (Figura 2.3).

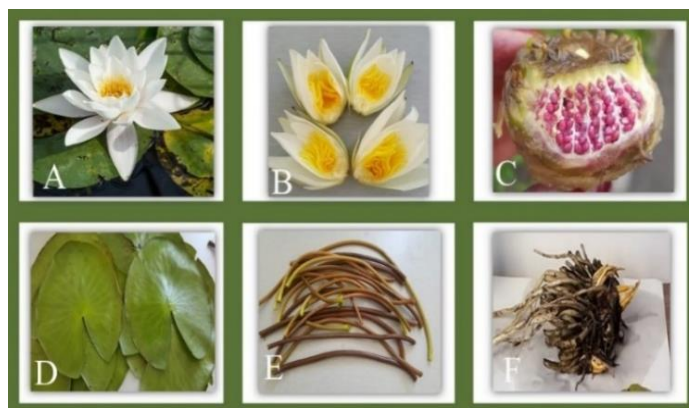


Figura 2.3. Părțile anatomice ale speciei *N. alba*: A - floare, B - stamine, C - fruct și semințe, D - frunză, E - tulpină, F - rădăcină și rizomi

#### 2.4.3 Imagini microscopice ale materialului vegetal

Pentru a realiza o caracterizare mai amplă a plantei acvatice studiate s-au înregistrat imagini microscopice 3D ale probelor proaspete de floare, frunză, tulpină și rădăcină ale speciei *N. alba* (Figura 2.5). Analiza microscopică a secțiunii transversale prin floare a evidențiat granulele de polen tipice, sferice sau elipsoidale, de culoare galbenă, netransparente, cu suprafața ornamentată granulat și cu diametre între 30 - 36  $\mu\text{m}$  (Figura 2.5a). Secțiunea transversală prin frunză prezintă spre epiderma superioară țesutul palisadic compact, cu celule prozenchimatic, cu spații intercelulare reduse, iar spre epiderma inferioară prezintă țesut lacunar cu celule parenchimatic, izodiametric, cu spații intercelulare mari (lacune), iar din loc în loc se pot observa și numeroși peri (Figura 2.5b). Imaginile microscopice ale secțiunilor transversale prin tulpină (Figura 2.5c) și rădăcina (Figura 2.5d) evidențiază celule poligonale sau globulare mari din parenchimul cortical, cu perete celular modificat secundar de tip sclerenchim, cu vacuole mari care împing periferic, atât constituenții citoplasmatici, cât și nucleul.

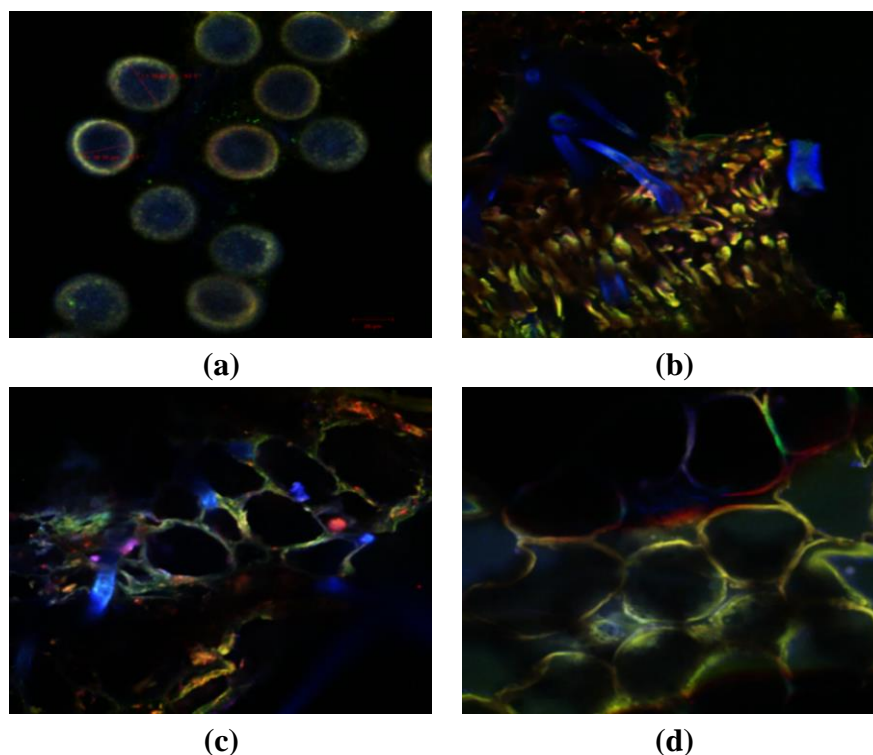


Figura 2.5. Imagini CLSM ale granulelor de polen (a) și ale secțiunilor transversale prin frunză (b), tulpină (c) și rădăcină (d) de *N. alba*

#### 2.4.4 Extracția compușilor biologic activi din diferite părți anatomice de *N. alba*

Pentru extracția compușilor biologic activi lipofili din diferite părți anatomice de *N. alba*, s-au utilizat solvenți nepolari (eter de petrol și ciclohexan), iar pentru extracția compușilor biologic activi hidrofili s-au folosit solvenți polari (metanol, etanol și apa ultrapură). Pentru a realiza cu succes extracția cu solvenți a compușilor organici naturali din diferite părți anatomice ale speciei *N. alba*, precum fruct, floare, frunză, tulpină și rădăcină s-au utilizat trei metode de extracție: extracție simplă asistată de ultrasunete (US), extracție multiplă cu extractorul Soxhlet (ES) și extracție simplă cu agitare mecanică (EM).

Tabel 2.1. Randamentul de extracție privind obținerea extractelor din diferite părți anatomice de *N. alba* prin diferite metode de extracție

Tip de material vegetal	Tip de solvent/extracție*	Masă extract (g)	Randament (%)
Fruct (FR)	EP-ES	0,15±0,02	0,75±0,02
	CH-EM	0,68±0,15	0,68±0,15
	M-US	0,51±0,10	2,53±0,10
	M-ES	0,46±0,20	2,31±0,20
	E-EM	1,97±0,42	1,97±0,42
	A-EM	5,67±0,69	5,67±0,69
Floare (FL)	EP-ES	0,24±0,02	1,18±0,02
	CH-EM	1,29±0,30	1,29±0,30
	M-US	3,23±0,72	16,16±0,72
	M-ES	2,99±0,51	14,99±0,51
	E-EM	13,44±1,41	13,44±1,41
	A-EM	10,78±0,99	10,78±0,99

Tip de material vegetal	Tip de solvent/extracție*	Masă extract (g)	Randament (%)
Frunză (F)	EP-ES	0,42±0,03	2,12±0,03
	CH-EM	1,95±0,29	1,95±0,29
	M-US	2,66±0,26	13,29±0,26
	M-ES	2,45±0,85	12,24±0,85
	E-EM	8,54±1,07	8,54±1,47
	A-EM	9,98±1,47	9,98±1,47
Tulpină (T)	EP-ES	0,26±0,01	1,32±0,01
	CH-EM	0,99±0,10	0,99±0,10
	M-US	2,76±1,21	13,79±1,21
	M-ES	2,70±0,61	13,54±0,61
	E-EM	9,52±1,21	9,52±1,21
	A-EM	9,75±0,92	9,75±0,92
Rădăcină (R)	EP-ES	0,06±0,01	0,31±0,01
	CH-EM	0,19±0,01	0,19±0,01
	M-US	5,55±0,85	27,75±0,85
	M-ES	5,45±1,15	27,24±1,15
	E-EM	24,80±2,07	24,80±2,07
	A-EM	8,45±0,77	8,45±0,77

\*EP – eter de petrol; CH – ciclohexan; M - metanol, E – etanol; A - apă ultrapură. US – extracție simplă asistată de ultrasunete; ES – extracție multiplă cu extractorul Soxhlet; EM – extracție simplă cu agitare mecanică. Rezultatele reprezintă media celor trei determinări efectuate ± deviația standard.

Masa de extract și randamentul de extracție sunt prezentate în Tabelul 2.1. S-a constatat că o cantitate mult mai mare de compuși naturali a fost extrasă cu solventul organic metanol comparativ cu solventul organic etanol. Cea mai mare cantitate de compuși naturali s-a extras din floarea și rădăcina speciei *N. alba*, atunci când s-a utilizat ca solvent metanol.

#### 2.4.5 Separarea și izolarea compușilor biologic activi din extract de rădăcină de *N. alba*

Separarea și izolarea compușilor biologic activi din specia *N. alba* s-a realizat pentru extractul R-E-EM, separare care a avut loc în șapte etape. În urma etapelor de separare s-au obținut 16 fracții reprezentative. Rezultatele analizelor CSS procurate în urma separării extractului R-E-EM de *N. alba* au scos în evidență prezența compușilor polifenolici [35]. Pentru analizele ulterioare, patru dintre cele 16 fracții reprezentative, notate F2, F5, F50 și F51, au fost luate în lucru pentru a dovedi proprietățile biologice ale compușilor prezenți.

### 2.5 Concluzii parțiale

Prelevarea speciei *N. alba* s-a realizat din Lacul Rotund, Complexul acvatic Somova-Parceș, Rezervația Biosferei Delta Dunării, care prezintă condiții de mediu speciale pentru dezvoltarea speciilor acvatice submerse. Pentru fiecare exemplar prelevat, s-au realizat subșantioane reprezentative în funcție de părțile anatomice ale plantei, respectiv fruct, floare, frunză, tulpină și rădăcină.

Caracterizarea probelor de *N. alba*, realizată prin microscopie CLSM a evidențiat în secțiunea transversală prin floare, granulele de polen sferice sau elipsoidale, de culoare galbenă, netransparente, cu suprafața ornamentată granulat și cu diametre între 30 - 36 μm. Secțiunea transversală prin frunză a evidențiat țesut palisadic compact, cu celule prozenchimatice, cu spații intercelulare reduse, precum și țesutul lacunar cu celule parenchimatice, izodiametrice, cu spații

intercelulare mari (lacune). Secțiunile transversale prin tulpină și rădăcină au evidențiat celule poligonale sau globulare din parenchimul cortical, cu perete celular modificat secundar de tip sclerenchim, cu vacuole mari care împing periferic, atât constituenții citoplasmatici, cât și nucleul.

Pentru a realiza cu succes extracția cu solvenți a compușilor organici naturali biologic activi din diferite părți anatomice ale speciei *N. alba*, precum fruct, floare, frunză, tulpină și rădăcină s-au utilizat trei metode de extracție: ultrasonare, utilizând extractorul Soxhlet și agitare mecanică. În total s-au obținut 30 de fracții, iar cantitatea cea mai mare de compuși naturali a fost extrasă cu solventul organic metanol, comparativ cu solventul organic etanol.

Separarea și izolarea compușilor biologic activi din specia *N. alba* s-a realizat pentru extractul R-E-EM, separare care a avut loc în șapte etape. În total s-au obținut 16 fracții reprezentative, iar analiza CSS a fracțiilor a pus în evidență prezența compușilor polifenolici. Patru dintre cele 16 fracții reprezentative au fost luate în lucru în analizele ulterioare pentru a fi analizate aprofundat și pentru a dovedi proprietățile biologice ale metaboliților secundari prezenți în specia *N. alba*.

## Capitolul 3 Analiza compușilor biologic activi din specia *N. alba* prin cromatografia de gaze cuplată cu spectrometria de masă

### 3.4 Rezultate și discuții

Analiza GC-MS a fost realizată pentru extractele lipofile EP-ES și CH-EM, obținute din diferite părți anatomice de *N. alba* (fruct, floare, frunză, tulpină și rădăcină). În Figura 3.1 este reprezentată cromatograma GC-MS a extractului FR-EP-ES de *N. alba*, în care s-au identificat 11 compuși chimici diferențiați pe baza analizei spectrelor de masă și accesând baza de date spectrale existentă. Compușii identificați, în ordinea timpului de retenție au fost: 2,6-dipalmitat de L-ascorbil (11,578 min), ftalat de dibutil (11,635 min), n-heneicosan (12,240 min), acid octadecanoic (stearic) (12,533 min), n-tetracosan (13,545 min), n-pentacosan (13,980 min), 2-monopalmitoil-sn-glicerol (1,3-dihidroxiopropan-2-il hexadecanoat) (14,036 min), n-nonacosan (15,001 min), 1-stearoil-sn-glicerol (2,3-dihidroxiopropil octadecanoat) (15,143 min), vitamina E (19,976 min) și  $\gamma$ -sitosterol (22,102 min). Elucidarea structurală a compușilor separați și identificați în cromatograma GC-MS s-a realizat prin comparație cu spectrele de masă din librăria spectrală (Tabel 3.1) și aplicarea regulilor de fragmentare moleculară.

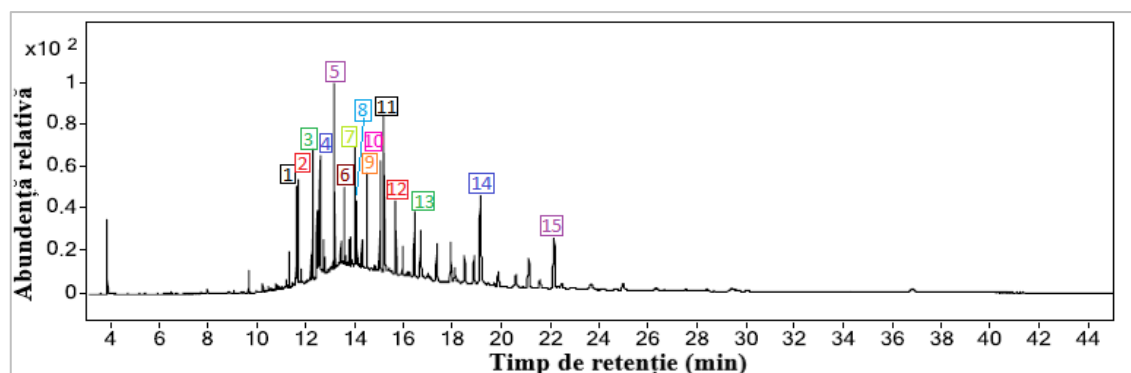


Figura 3.1. Cromatograma GC-MS a extractului FR-EP-ES de *N. alba*

Astfel, *compusul 1* (11,578 min) a fost identificat ca fiind **2,6-dipalmitat de L-ascorbil**, un ester al vitaminei C cu formula moleculară de  $C_{38}H_{68}O_8$ . Deoarece acidul ascorbic este o moleculă instabilă din punct de vedere termic, ionul molecular prezent este cel al acidului hexadecanoic ( $m/z = 256$ ), ca urmare a pierderii fragmentului  $C_6H_8O_6$  din ionul molecular (Figura 3.2).

*Compusul 11* (22,102 min) cu formula moleculară  $C_{29}H_{52}O_2$  ( $m/z = 432$ ) a fost identificat ca fiind  **$\gamma$ -sitosterol**, un fitosterol prezent în toate speciile *Nymphaea*. S-a identificat ionul molecular  $M^+ = 414$  și o serie de fragmente moleculare care indică prezența  $\gamma$ -sitosterolului în extractul eteric analizat (Figura 3.12).

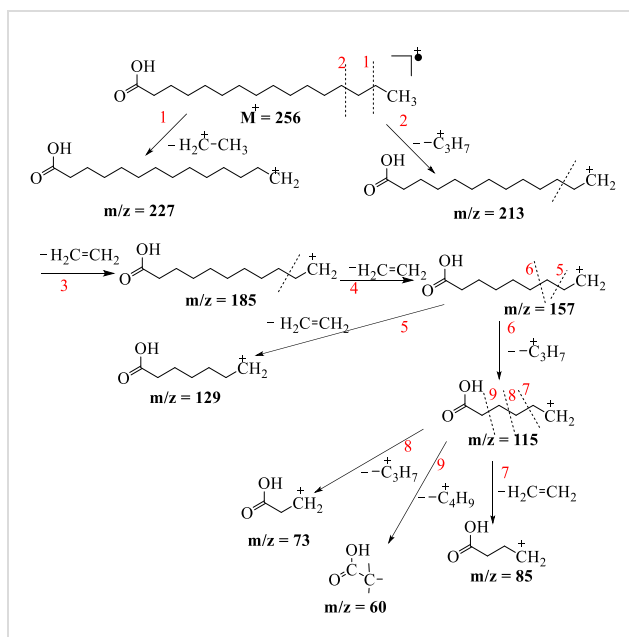


Figura 3.2. Mecanism de fragmentare al acidului hexadecanoic din L-2,6 dipalmitatul de L-ascorbil

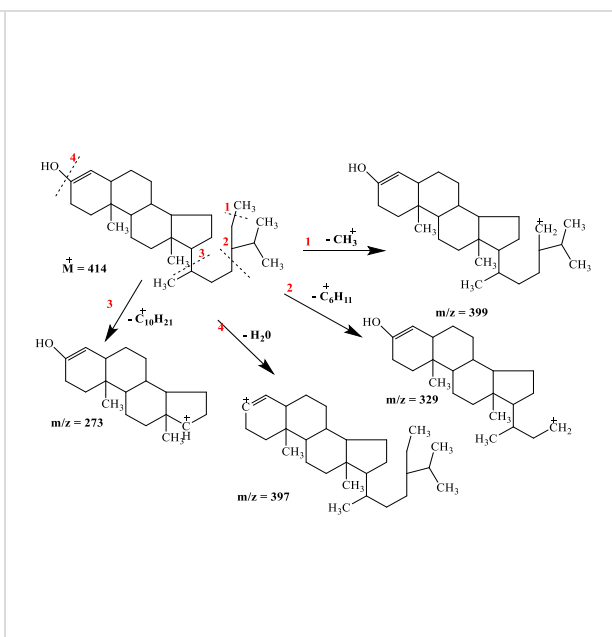


Figura 3.12. Mecanism de fragmentare propus pentru  $\gamma$ -sitosterol

Tabel 3.1. Date spectrale ale compușilor organici identificați în extractul FR-EP-ES de *N. alba* prin analiza GC-MS. Tabelul prezintă timpul de retenție, denumirea chimică a compusului, masa moleculară, formula moleculară, ionul molecular și fragmentele moleculare

Nr. crt.	RT <sup>a</sup> (min)	Denumirea chimică a compusului	MW <sup>b</sup> (g/mol)	Formula moleculară	M <sup>+c</sup> (m/z)	Fragmente moleculare (m/z)
1	11,578	2,6-dipalmitat de L-ascorbil	652,9	$C_{38}H_{68}O_8$	256,2	55,1; 57,1; 60,1; 69,1; 71,1; 73,1; 85,1; 129,1; 213,2; 256,2
2	11,635	ftalat de dibutil	278,34	$C_{16}H_{22}O_4$	278,2	56,1; 57,1; 93; 104; 105; 121; 149,1; 150; 205,1; 223,1
3	12,240	n-heneicosan	296,6	$C_{21}H_{44}$	269,4	55,1; 57,1; 69,1; 70,1; 71,1; 83,1; 85,1; 99,1; 113,1; 127,1
4	12,533	acid octadecanoic	285,5	$C_{18}H_{36}O_2$	284,3	55,1; 57,1; 60,1; 69,1; 71,1; 73,1; 83,1; 129,1; 185,1; 284,3

Nr. crt.	RT <sup>a</sup> (min)	Denumirea chimică a compusului	MW <sup>b</sup> (g/mol)	Formula moleculară	M <sup>+c</sup> (m/z)	Fragmente moleculare (m/z)
5	13,545	n-tetracosan	338,7	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub>	324,4	55,1; 57,1; 69,1; 71,1; 83,1; 85,1; 97,1; 99,1; 113,1; 127,1
6	13,980	n-pentacosan	352,7	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>	352,4	55,1; 57,1; 69,1; 71,1; 83,1; 85,1; 97,1; 99,1; 113,1; 127,1
7	14,036	2-monopalmitoil-sn-glicerol	568,9	C <sub>35</sub> H <sub>68</sub> O <sub>5</sub>	287,1	55,1; 57,1; 69,1; 71,1; 74,1; 84,1; 98,1; 134; 239,2; 287,1
8	15,001	n-nonacosan	408,8	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>	380,5	55,1; 57,1; 69,1; 71,1; 83,1; 85,1; 97,1; 99,1; 113,1; 127,1
9	15,143	1-stearoil-sn-glicerol	358,5	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	327,3	55,1; 57,1; 71,1; 74,1; 84,1; 97,1; 98,1; 112,1; 134,1; 267,3
10	19,076	vitamina E	430,7	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	430,4	55,1; 57,1; 121,1; 164,1; 165,1; 166,1; 205,1; 430,4; 431,4; 432,5
11	22,102	γ-sitosterol	432,7	C <sub>29</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>	414,4	57,1; 81,1; 95,1; 105,1; 107,1; 145,1; 213,2; 303,3; 329,3; 414,4

<sup>a</sup>RT – timp de retenție; <sup>b</sup>MW – masă moleculară; <sup>c</sup>M<sup>+</sup> - ion molecular.

### 3.5 Concluzii parțiale

Analiza GC-MS a extractelor EP-ES și CH-EM de *N. alba* a identificat în total 71 de compuși organici volatili, care au fost în principal hidrocarburi și derivați oxigenați, acizi grași și esteri ai acizilor grași, terpenoide și steroide. În extractul FR-EP-ES s-au identificat și caracterizat un număr total de 11 compuși organici, pe când în extractul FL-EP-ES s-au identificat și caracterizat un număr total de șase compuși organici, respectiv în extractul T-EP-ES s-au identificat și caracterizat un număr total de șapte compuși organici, iar în extractele F-EP-ES și R-EP-ES s-au identificat și caracterizat doar patru compuși volatili. În total, în extractele EP-ES de *N. alba* s-au separat, identificat și caracterizat un număr de 32 de compuși organici volatili. Totodată, în extractele CH-EM de *N. alba* s-au identificat și caracterizat un număr mai mare de compuși organici, decât în extractele EP-ES de *N. alba*. Din totalul a 39 de compuși organici, cel mai mare număr de compuși organici volatili s-au identificat în extractele FR-EP-ES și FR-CH-EM.

## Capitolul 4 Analiza compușilor biologic activi din specia *N. alba* prin cromatografia de lichide de înaltă performanță

### 4.4 Rezultate și discuții

#### 4.4.1 Separarea, identificarea și cuantificarea compușilor biologic activi prin tehnica HPLC-DAD

Pentru identificarea și cuantificarea compușilor bioactivi din extractele M-US, M-ES, E-EM și A-EM de *N. alba*, obținute din diferite părți anatomice (fruct, floare, frunză, tulpină și rădăcină), dar și din fracțiunile F2, F5, F50 și F51 (obținute după fracționarea extractului R-E-EM), s-au utilizat 14 compuși de referință (acidul tanic, acidul galic, (+) catehina, acidul cafeic, acidul



clorogenic, (-) epicatehina, acidul p-coumaric, daidzeina, hiperozida, rutina, naringina, quercetina, naringenina și genisteina). Pentru identificarea compușilor polifenolici, probele au fost analizate la șapte lungimi de undă  $\lambda$  diferite (230, 250, 280, 300, 320 și 370 nm) [36, 37]. Cuantificarea compușilor polifenolici identificați în extractele și fracțiunile de *N. alba* s-a realizat la  $\lambda_{\max}$  al fiecărui compus de referință [38, 39, 40].

În datele prezentate în Figura 4.2 se regăsește concentrația maximă a fiecărui compus polifenolic identificat în extractele M-US. Cantitatea cea mai mare de acid cafeic a fost identificată în extractul FL-M-US ( $1,83 \pm 0,09$  mg/kg, Figura 4.2b). Acidul galic, rutina și naringina s-au găsit în cea mai mare cantitate în extractul R-M-US, cu o concentrație de  $3,02 \pm 0,04$  mg/kg,  $10,48 \pm 0,11$  mg/kg, respectiv  $17,75 \pm 0,10$  mg/kg (Figura 4.2e). Acidul p-coumaric a fost identificat cu cea mai mare concentrație ( $2,56 \pm 0,05$  mg/kg) în extractul FR-M-ES de *N. alba*. Flavonoida naringină este cel mai abundent compus din extractele FL-M-ES și R-M-ES de *N. alba*, cu o concentrație de  $22,97 \pm 1,19$  mg/kg, respectiv  $40,56 \pm 2,38$  mg/kg. Glicozida rutină a fost identificată în cea mai mare concentrație în extractele F-M-ES ( $6,32 \pm 0,59$  mg/kg) și R-M-ES ( $11,41 \pm 0,87$  mg/kg).

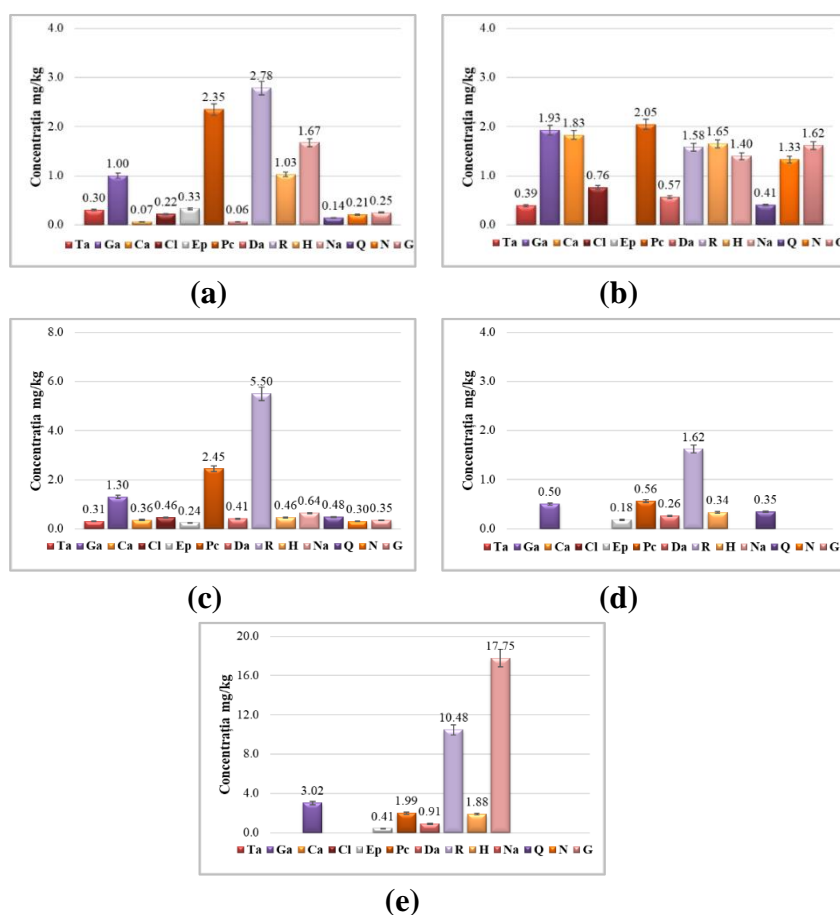


Figura 4.2. Identificarea și cuantificarea compușilor polifenolici din extractele: (a) FR-M-US, (b) FL-M-US, (c) F-M-US, (d) T-M-US și (e) R-M-US de *N. alba*. Ta – acid tanic, Ga - acid galic, Ca – acid cafeic, Cl – acid clorogenic, Ep – epicatehină, Pc – acid p-coumaric, Da – daidzeină, R – rutină, H – hiperozidă, Na - naringină, Q – quercetină, N – naringenină și G – genisteină

Aceeași flavonoidă naringina, este prezentă în cantitatea cea mai mare în extractele FR-E-EM și FL-E-EM de *N. alba*, cu o concentrație de  $4,24 \pm 0,23$  mg/kg, respectiv  $6,04 \pm 0,64$  mg/kg. În extractul R-E-EM a fost identificată cea mai mare cantitate de acid galic, cu o concentrație de

2,05±0,15 mg/kg. Extractia E-EM a favorizat extracția epicatehinei, care este prezentă într-o concentrație de 8,00±1,02 mg/kg în extractul T-E-EM și într-o concentrație de 19,11±2,19 mg/kg în extractul R-E-EM. La fel ca și în cazul extractelor T-M-US și R-M-US, nu a fost identificat acidul clorogenic în extractele T-E-EM și R-E-EM.

Flavonoida naringină, este prezentă în cantitatea cea mai mare în fracțiile F2, F5, F50 și F51 de *N. alba*, cu o concentrație de 2,47±0,31 mg/kg, 1,07±0,08 mg/kg, 3,42±0,28 mg/kg, respectiv 0,96±0,03 mg/kg. Cea mai mare cantitate de compuși polifenolici a fost identificată în fracția F2, iar cel mai mare număr de compuși polifenolici s-a regăsit în fracția F5.

#### 4.4.2 Separarea, identificarea și confirmarea compușilor biologic activi prin tehnica LC-MS/MS

Pentru identificarea și confirmarea compușilor polifenolici din extractele M-US de *N. alba*, s-au utilizat 10 compuși de referință (acid cafeic, acid clorogenic, acid p-coumaric, acid vanilic, (+) catehină, (-) epicatehină, naringină, naringenină, quercetină și rutină), care au fost confirmați în MS prin infuzie directă, iar în modul MRM au fost adăugați 17 compuși de referință (acidul tanic, acidul galic, acidul ferulic, acidul elagic, acidul chinic, pentozida acidului elagic, ramnozida acidului elagic, un derivat al acidului cinamic, corilagina, kaempferol, castalina, orientina, apigenina, luteolina, brevifolina, hexozida acidului HHDP și un compus neidentificat/geranina), utilizând date din literatura de specialitate (Tabelul 4.2) [41].

Tabel 4.2. Date spectrele generale ale compușilor de referință utilizați în identificarea compușilor polifenolici din extractele M-US de *N. alba* prin tehnica LC-MS/MS

Compuși de referință	T <sub>R</sub> <sup>a</sup> (min)	Formula moleculară	M <sup>+c</sup>	[M-H] <sup>-b</sup> (m/z) Fragmente moleculare (AR % <sup>d</sup> )	Eroare de masă (ppm)	Referințe bibliografice
HHPD <sup>e</sup>	6,15	-	481	301 (50), 463 (40)	-1,85	7, 42, 43
Acid chinic	6,16	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	191	127 (33), 173 (50)	-2,21	7
Acid vanilic	15,35	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	167	123 (30), 125 (100), 152 (10)	-0,91	43
Acid galic	16,50	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	169	125 (100)	-3,42	7, 43, 44
Castalină	16,93	C <sub>27</sub> H <sub>20</sub> O <sub>18</sub>	631	301 (100), 299 (37)	-1,52	42
X <sub>1</sub> <sup>f</sup>	17,29	-	-	613 (50), 301 (100), 631 (30)	-2,03	-
Acid clorogenic	18,05	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	355	163 (70)	-4,52	45
Corilagină	18,17	C <sub>27</sub> H <sub>22</sub> O <sub>18</sub>	633	301 (100), 589 (10)	-0,76	42
Brevifolină	19,53	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	247	203 (75), 175 (20)	-4,28	7, 42
Acid cafeic	20,37	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	181	163 (95)	-3,98	45
Acid p-coumaric	23,85	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	163	145 (30), 119 (10), 103 (30), 89 (10), 127 (8)	-1,96	46
Acid tanic	24,61	C <sub>76</sub> H <sub>52</sub> O <sub>46</sub>	183	123 (100)	-2,45	44
Rutină	26,16	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	609	301 (100)	-2,50	45
Acid elagic	27,31	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	301	257 (100), 229 (50)	-0,10	7, 43
Ramnozida acidului elagic	27,80	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>12</sub>	447	359 (50), 403 (30) 385 (10), 315 (5), 301 (7), 275 (100)	-0,52	42
Quercetină	31,94	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	301	151 (70)	-0,37	45
Pentozida acidului elagic	32,07	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>12</sub>	433	291 (21), 405 (57), 301 (90), 275 (8), 247 (40), 229 (5)	-2,51	42, 43

Compuși de referință	T <sub>R</sub> <sup>a</sup> (min)	Formula moleculară	M <sup>+c</sup>	[M-H] <sup>-b</sup> (m/z) Fragmente moleculare (AR % <sup>d</sup> )	Eroare de masă (ppm)	Referințe bibliografice
Naringenină	32,46	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	271	151 (75), 177 (100), 165 (52), 107 (18), 125 (25)	-1,98	43
Naringină	34,30	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	579	151 (50), 119 (6), 271 (100)	-2,68	47
Kaempferol	36,60	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	285	241 (67), 217 (100)	-3,98	7
Luteolina	36,92	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	285	257 (40), 241 (100)	-4,58	42, 45
Acid ferulic	38,09	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	193	177 (7), 149 (50), 145 (100), 117 (32), 89 (62)	-2,98	46
Derivat al acidului cinamic	38,65	-	329	197 (50), 239 (35), 169 (100)	-0,58	42
(+) Catehină	39,67	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> x H <sub>2</sub> O	289	245 (50), 205 (100), 179 (20), 261 (42)	-0,37	7, 43, 44
(-) Epicatehină	39,67	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	289	245 (50), 205, (100) 179 (20), 261 (40)	-2,63	7, 43
Apigenină	47,80	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	269	223 (50), 179 (100)	-3,04	42, 45
Orientină	49,74	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	447	403 (100), 233 (50)	-1,61	42

<sup>a</sup>T<sub>R</sub> – timp de retenție; <sup>b</sup>[M-H]<sup>-</sup> – ionizare negativă; <sup>c</sup>M<sup>+</sup> – ion molecular; <sup>d</sup>AR – abundența relativă; <sup>e</sup>HHDP – hexozida acidului difenil hexahidroxilic, <sup>f</sup>X<sub>1</sub> – compus neidentificat/geranină.

Analiza calitativă LC-MS/MS a extractelor M-US de *N. alba* a indicat și confirmat 27 de compuși cu structură polifenolică (Figura 4.11).

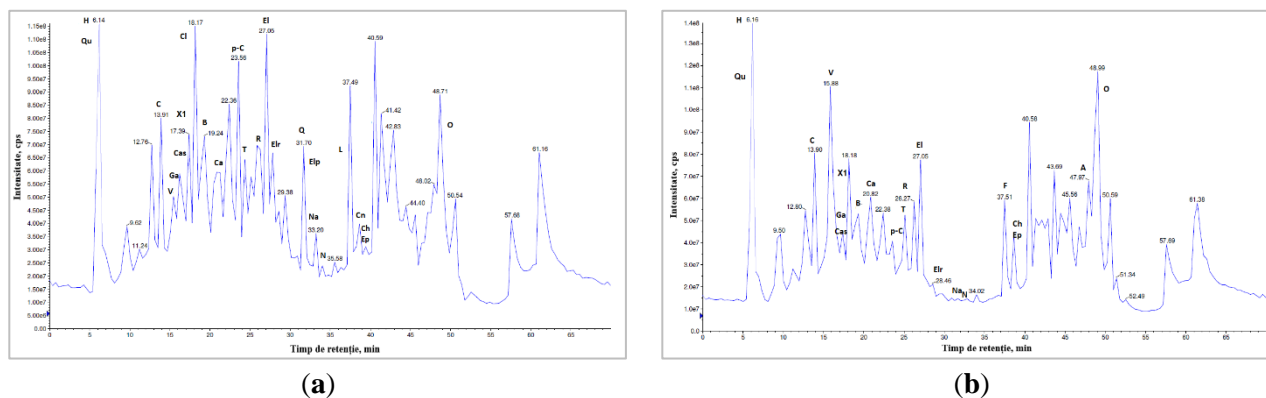


Figura 4.11. Cromatograme obținute la separarea LC-MS/MS a extractelor (a) F-M-US și (b) R-M-US de *N. alba*. H – HHDP, Qn – acid chinic, C – corilagină, V – acid vanilic, Cas – castalină, Ga – acid galic, X1 – fragment de geranină/compus neidentificat, Ca – acid cafeic, p-C – acid p-coumaric, T – acid tanic, R – rutină, El – acid elagic, Elr – ramnozida acidului elagic, Elp – pentozida acidului elagic, Cn – derivat al acidului cinamic, Na – naringină, N – naringenină, F – acid ferulic, Ch – catehină, Ep – epicatehină, Cl – acid clorogenic, Q – quercetină, A – apigenină, L – luteolină, B – brevifolină, K – kaempferol și O – orientină

## 4.5 Concluzii parțiale

S-au identificat și raportat pentru prima dată un număr de 27 de compuși polifenolici (hexozida acidului HHDP, acid chinic, corilagină, acid vanilic, castalină, acid galic, geranină, acid cafeic, acid p-coumaric, acid tanic, rutină, acid elagic, ramnozida acidului elagic, pentozida acidului elagic, derivat al acidului cinamic, naringină, naringenină, acid ferulic, (+) catehină, (-) epicatehină, acid clorogenic, quercetină, apigenină, luteolină, brevifolină, kaempferol și orientină) în extractele FL-M-US, F-M-US, T-M-US și R-M-US de *N. alba*.

Cea mai mare cantitate de compuși polifenolici a fost cuantificată în extractele de rădăcină de *N. alba* (R-M-US, R-M-ES, R-E-EM), iar cantitatea cea mai mică de compuși polifenolici s-a găsit în extractele de tulpină de *N. alba* (T-M-US, T-M-ES, T-E-EM). Extracția fracționată CH-EM a favorizat extracția epicatehinei, prezentă în extractele FR-A-EM, FL-A-EM și F-A-EM de *N. alba*. Naringina este prezentă în cea mai mare cantitate în extractele FL-M-ES și R-M-ES de *N. alba*. Cea mai mare concentrație de rutină a fost identificată în extractele R-M-ES și R-M-US. Cea mai mare cantitate de acid galic a fost identificată în extractul R-E-EM, iar cantitatea cea mai mare de acid cafeic a fost identificată în extractul FL-M-US. Acidul p-coumaric a fost identificat cu cea mai mare concentrație în extractul FR-M-ES de *N. alba*.

Rezultate obținute în acest subcapitol au fost publicate parțial în „Exploring New Antioxidant and Mineral Compounds from *Nymphaea alba* Wild-Grown in Danube Delta Biosphere”, Cudalbeanu & all, Molecules 2018.

## Capitolul 5 Identificarea și cuantificarea unor clase de compuși organici cu proprietăți biologice active din specia *N. alba*

### 5.4 Rezultate și discuții

#### 5.4.1 Conținutul total de pigmenți clorofilieni

Clorofila *a*, clorofila *b* și conținutul total de clorofilă au fost determinate spectrofotometric din probe proaspete de floare, frunză, tulpină și rădăcină de *N. alba* (Figura 5.3). Cantitatea cea mai mare de CHLA s-a găsit în proba de frunză a speciei *N. alba*, în concentrație de  $10,48 \pm 1,02$  mg/L. Cantitatea cea mai mică de CHLA s-a găsit în proba de rădăcină a speciei *N. alba*, în concentrație de  $1,6 \pm 0,65$  mg/L. Cantitatea cea mai mare de CHLT a fost găsită în proba de frunză a speciei *N. alba* ( $15,06 \pm 1,13$  mg/L). Cantitatea cea mai mică de CHLT a fost determinată în proba de rădăcină a speciei *N. alba* ( $1,87 \pm 0,97$  mg/L).

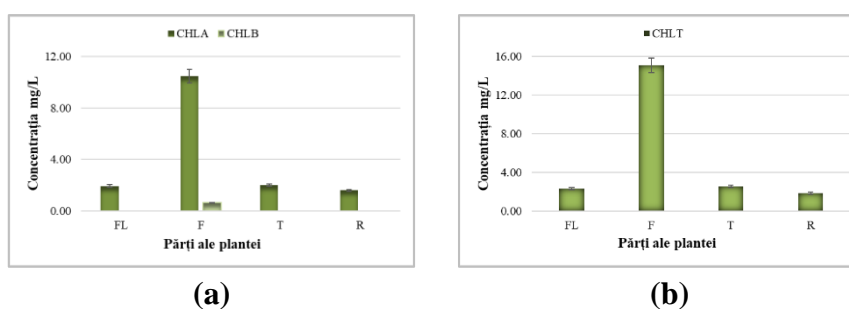


Figura 5.3. Determinarea conținutului de clorofilă *a* și clorofilă *b* (a), respectiv clorofilă totală (b) din floarea, frunza, tulpina și rădăcina speciei *N. alba*. FL – floare, F – frunză, T – tulpină, R – rădăcină, CHLA – clorofila *a*, CHLB – clorofila *b* și CHLT – clorofila totală

#### 5.4.2 Conținutul total de carotenoide

Cantitatea de carotenoide a fost determinată din probe uscate și măcinate de floare, frunză și tulpină de *N. alba*, utilizând o curbă liniară de  $\beta$ -caroten, iar rezultatele au fost exprimate în miligrame echivalenți  $\beta$ -caroten per gram de probă (mgEq $\beta$ C/g). Cea mai mare cantitate de

carotenoide a fost găsită în probele de floare și frunză, cu concentrații de  $0,39 \pm 0,02$  mg $\beta$ C/g probă, respectiv  $0,37 \pm 0,01$  mg $\beta$ C/g probă (Tabel 5.1).

Tabel 5.1. Conținutul total de carotenoide din diferite părți anatomice ale speciei *N. alba*

Părți ale plantei*	FL	F	T
mg $\beta$ C/g probă	$0,39 \pm 0,02$	$0,37 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,01$

\*FL – floare, F – frunză, T – tulpină.

### 5.4.3 Conținutul total de polifenoli

#### 5.4.3.1 Acizi fenolici

În determinarea conținutului total de acizi fenolici din extractele M-US, M-ES și E-EM, obținute din diferite părți anatomice de *N. alba*, precum fruct, floare, frunză, tulpină și rădăcină, s-au utilizat curbe de calibrare de acid tanic și acid galic, iar rezultatele au fost exprimate în miligrame echivalenți de acid tanic per gram de probă (mgEqAT/g probă), respectiv miligrame echivalenți acid galic per gram de probă (mgEqAG/g probă).

În Figura 5.6 este prezentat conținutul total de acizi fenolici determinat din extractele M-US de *N. alba*. Cea mai mare cantitate de acizi fenolici a fost identificată în extractul R-M-US, cu valori de  $212,79 \pm 2,50$  mgEqAT/g probă, respectiv  $204,84 \pm 3,33$  mgEqAG/g probă și în extractul F-M-US, cu valori de  $188,52 \pm 5,60$  mgEqAT/g probă, respectiv  $193,52 \pm 6,25$  mgEqAG/g probă.

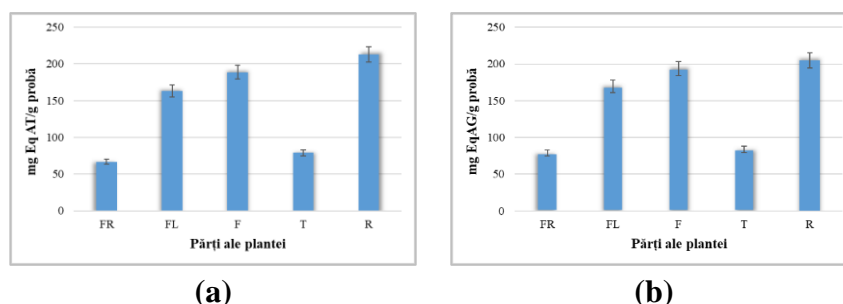


Figura 5.6. Conținutul total de acizi fenolici din extractele M-US de *N. alba*. (a) mgEqAT/g probă, (b) mgEqAG/g probă. FR – fruct, FL – floare, F – frunză, T – tulpină, R – rădăcină

Conținutul total de acizi fenolici determinat din extractele M-ES de *N. alba* a prezentat cantități mai mari decât conținutul total de acizi fenolici determinat din extractele M-US. Cantitate mai mare de acizi fenolici a fost determinată în extractele R-M-ES, F-M-ES și FL-M-ES, cu concentrații cuprinse între  $205,79 \pm 5,09$  –  $395,75 \pm 4,14$  mgEqAT/g probă, respectiv  $226,31 \pm 4,75$  –  $375,60 \pm 3,87$  mgEqAG/g probă. În optimizarea metodelor de extracție a compușilor biologic activi prezenți în diferite părți anatomice ale speciei *N. alba*, extracția E-EM s-a dovedit a fi o reușită. Extractele FR-E-EM, FL-E-EM, F-E-EM, T-E-EM și R-E-EM de *N. alba* furnizează cel mai mare conținut de acizi fenolici comparativ cu celelalte metode de extracție utilizate. Cea mai mare cantitate de acizi fenolici a fost cuantificată în proba R-E-EM, cu o concentrație  $606,35 \pm 5,26$  mgEqAT/g probă, respectiv  $572,16 \pm 4,91$  mgEqAG/g probă și în extractul F-E-EM, cu o concentrație  $440,65 \pm 4,30$  mgEqAT/g probă, respectiv  $456,17 \pm 6,28$  mgEqAG/g probă. Extractele FR-E-EM și T-E-EM de *N. alba* prezintă cel mai mic conținut de acizi fenoli, similar extractelor FR-M-US, FR-M-ES, T-M-US și T-E-ES de *N. alba*.

### 5.4.3.2 Flavonoide

Conținutul total de flavonoide din extractele M-US, M-ES și E-EM, obținute din diferite părți anatomice de *N. alba*, precum fruct, floare, frunză, tulpină și rădăcină, a fost determinat prin analiză microspectrofotometrică, în prezență de  $\text{AlCl}_3$ , folosind curbe de calibrare de rutină și quercetină, iar rezultatele au fost exprimate în miligrame echivalenți de rutină per gram de probă ( $\text{mgEqR/g}$  probă), respectiv miligrame echivalenți de quercetină per gram de probă ( $\text{mgEqQ/g}$  probă). Conținutul total de flavonoide determinat din extractele M-US de *N. alba* este prezentat în Figura 5.10. Cantitatea cea mai mare de flavonoide este prezentă în proba F-M-US, cu o valoare de  $39,23 \pm 1,91$   $\text{mgEqR/g}$  probă, respectiv  $59,63 \pm 2,87$   $\text{mgEqQ/g}$  probă. Extractul T-M-US prezintă cea mai mică cantitate de flavonoide, cu o valoare de  $10,59 \pm 1,25$   $\text{mgEqR/g}$  probă, respectiv  $14,67 \pm 0,83$   $\text{mgEqQ/g}$  probă.

După îndepărtarea fracției lipofile, cantitatea de flavonoide prezentă în extractele M-ES este mai mare decât în extractele M-US, prezentând valori ale conținutului total de flavonoide care variază de la  $11,97 \pm 0,75$   $\text{mgEqR/g}$  până la  $46,45 \pm 0,39$   $\text{mgEqR/g}$  probă, respectiv de la  $16,24 \pm 0,59$   $\text{mgEqQ/g}$  probă până la  $79,51 \pm 5,62$   $\text{mgEqQ/g}$  probă. În cazul extractelor E-EM, cel mai mare conținut de flavonoide a fost determinat pentru extractul F-E-EM ( $69,93 \pm 1,23$   $\text{mgEqR/g}$  probă, respectiv  $85,67 \pm 4,56$   $\text{mgEqQ/g}$  probă), urmată de proba FL-E-EM ( $51,87 \pm 2,05$   $\text{mgEqR/g}$  probă, respectiv  $63,58 \pm 1,85$   $\text{mgEqQ/g}$  probă) și extractul FR-E-EM ( $40,06 \pm 0,95$   $\text{mgEqR/g}$  probă, respectiv  $46,70 \pm 2,92$   $\text{mgEqQ/g}$  probă).

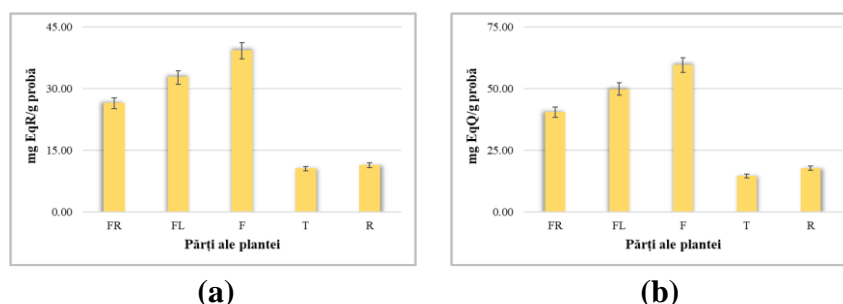


Figura 5.10. Conținutul total de flavonoide din extractele M-US de *N. alba*. (a)  $\text{mgEqR/g}$  probă, (b)  $\text{mgEqQ/g}$  probă. FR – fruct, FL – floare, F – frunză, T – tulpină, R – rădăcină

### 5.4.3.3 Taninuri condensate

Conținutul total de taninuri condensate din extractele M-US, M-ES și E-EM, obținute din diferite părți anatomice de *N. alba*, a fost determinat microspectrofotometric, în prezență de vanilină și HCl (Tabel 5.2).

Tabel 5.2. Conținutul total de taninuri condensate prezent în extractele de *N. alba*

Metoda de extracție	Părți anatomice ale speciei <i>N. alba</i> *				
	FR	FL	F	T	R
	<b>mgEqC/g probă sau neidentificat (-)</b>				
<b>M-US</b>	4,64±0,11	-	0,65±0,10	28,74±1,25	14,52±0,42
<b>M-ES</b>	4,85±0,64	-	0,88±0,21	30,97±3,30	16,87±1,75
<b>E-EM</b>	5,15±0,31	-	0,91±0,36	32,35±2,04	17,00±1,40

\*FR – fruct, FL – floare, F – frunză, T – tulpină, R – rădăcină. M - metanol, E – etanol. US – extracție simplă asistată de ultrasunete; ES – extracție multiplă cu extractorul Soxhlet; EM – extracție simplă cu agitare mecanică.

Catehina a fost utilizată ca standard de referință, iar rezultatele au fost exprimate în miligrame de catehină per gram de probă (mgEqC/g). Conținutul total de taninuri condensate a variat între  $0,65 \pm 0,10$  mgEqC/g probă și  $32,35 \pm 2,04$  mgEqC/g probă. Conținutul cel mai mare de taninuri condensate a fost determinat în extractele T-M-US, T-M-ES și T-E-EM de *N. alba* (M-US –  $28,74 \pm 1,25$  mgEqC/g probă; M-ES –  $30,97 \pm 3,30$  mgEqC/g probă; E-EM –  $32,35 \pm 2,04$  mgEqC/g probă).

## 5.5 Concluzii parțiale

În concluzie, prin analiza principalelor clase de compuși, metaboliți primari și secundari prezenți în probele speciei *N. alba*, s-a constatat prezența unor cantități însemnate de clorofile, carotenoide, acizi fenolici, flavonoide și taninuri condensate. Cantitatea cea mai mare de CHLA și CHLT s-a găsit în proba de frunză a speciei *N. alba*. Cantitatea cea mai mare de carotenoide a fost găsită în probele de floare și frunză ale speciei *N. alba*. Extractele R-M-US, R-M-ES și R-E-EM de *N. alba* au prezentat cea mai mare cantitate de acizi fenolici, iar extractele F-M-US, F-M-ES și F-E-EM au prezentat cea mai mare cantitate de flavonoide. Taninurile condensate sunt prezente în cea mai mare cantitate în extractele T-M-US, T-M-ES și T-E-EM de *N. alba*.

Rezultatele obținute la identificarea și cuantificarea principalilor metaboliți secundari (acizi fenolici, flavonoide și taninuri condensate) prezenți în diferite extracte M-US de *N. alba* au fost publicate în „*Exploring New Antioxidant and Mineral Compounds from Nymphaea alba Wild-Grown in Danube Delta Biosphere*”, Cudalbeanu & all, Molecules 2018.

## Capitolul 6 Macro și microelemente prezente în diferite părți anatomice de *N. alba*

### 6.4 Rezultate și discuții

În total 23 de macro și microelemente au fost identificate și cuantificate în probele de floare, frunză, tulpină și rădăcină de *N. alba*, macroelemente cu valori medii cuprinse între  $24,56 \pm 1,83$  -  $36712,48 \pm 589,24$  mg/kg, precum Al, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na și P (Tabel 6.3) și microelemente cu valori medii cuprinse între  $<0,10$  -  $64,09 \pm 2,40$  mg/kg, precum As, B, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Li, Mo, Ni, Pb, Se, Sn și Zn (Tabel 6.4) [40].

Probele de floare, frunză, tulpină și rădăcină de *N. alba* au indicat cantități mari de macroelementele, cum ar fi K ( $4931,32 \pm 17,76$  –  $10724,93 \pm 45,24$  mg/kg), Mg ( $1954,15 \pm 24,86$  –  $4084,08 \pm 36,25$  mg/kg), P ( $1762,59 \pm 14,70$  –  $5181,85 \pm 57,18$  mg/kg) și Na ( $4692,36 \pm 67,73$  –  $36712,48 \pm 589,24$  mg/kg). Proba de rădăcină conține cele mai mari cantități de Mg ( $4084,08 \pm 36,25$  mg/kg) și Ca ( $8621,94 \pm 113,28$  mg/kg), proba de floare prezintă cel mai mare conținut de K ( $10724,93 \pm 45,24$  mg/kg) și P ( $5181,95 \pm 57,18$  mg/kg), iar proba de tulpină conține cea mai mare cantitate de Na ( $36712,48 \pm 589,24$  mg/kg).

Probele de floare, frunză, tulpină și rădăcină de *N. alba* au indicat prezența unor microelemente, precum B, Ba, Co, Cr, Cu, Li, Ni, Pb și Zn. Microelementele Co, Cr, Li, Ni și Pb au fost identificate doar în proba de rădăcină (Co -  $2,04 \pm 0,12$  mg/kg; Cr -  $14,56 \pm 0,56$  mg/kg; Li -  $6,46 \pm 0,55$  mg/kg; Ni -  $7,55 \pm 0,57$  mg/kg; Pb -  $2,81 \pm 0,33$  mg/kg), iar B a fost identificat în floare ( $36,28 \pm 1,28$  mg/kg), frunză ( $32,18 \pm 1,12$  mg/kg) și tulpină ( $23,06 \pm 1,22$  mg/kg). Ba a fost

identificat în probele de frunză ( $13,47 \pm 0,81$  mg/kg), tulpină ( $5,72 \pm 1,00$  mg/kg) și rădăcină ( $55,11 \pm 2,21$  mg/kg).

Tabel 6.3. Conținutul de macroelemente din diferite părți anatomice de *N. alba*

Macroelemente	Părți anatomice ale speciei <i>N. alba</i>			
	mg/kg (substanță uscată)			
	Floare	Frunză	Tulpină	Rădăcină
Al	642,69±15,19	1075,76±58,73	224,96±12,10	7151,95±57,94
Ca	3817,11±69,80	8103,09±58,89	7293,97±38,07	8621,94±113,28
Fe	149,19±6,58	817,05±4,01	24,56±1,83	5396,28±20,54
K	10724,93±45,24	4931,32±17,76	6876,61±19,92	7453,42±18,85
Mg	2857,22±82,67	2057,35±68,45	1954,15±24,86	4084,08±36,25
Mn	69,17±1,72	508,36±14,63	345,79±6,25	379,02±6,96
Na	9745,81±55,99	16908,65±580,22	36712,48±589,24	4692,36±67,73
P	5181,85±57,18	2051,31±34,28	1762,59±14,70	3467,95±23,84

Tabel 6.4. Conținutul de microelemente din diferite părți anatomice de *N. alba*

Microelemente	Părți anatomice ale speciei <i>N. alba</i>			
	mg/kg (substanță uscată)			
	Floare	Frunză	Tulpină	Rădăcină
As	<1,00	<1,00	<0,50	<2,00
B	36,28±1,28	32,18±1,12	23,06±1,22	<2,00
Ba	<2,00	13,47±0,81	5,72±1,00	55,11±2,21
Cd	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
Co	<1,00	<1,00	<1,00	2,04±0,12
Cr	<1,00	<2,00	<1,00	14,56±0,56
Cu	6,28±0,47	2,99±0,36	<1,00	10,23±1,10
Hg	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50
Li	<1,00	<1,00	<1,00	6,46±0,55
Mo	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
Ni	<1,00	<2,00	<1,00	7,55±0,57
Pb	<0,50	<0,50	<0,50	2,81±0,33
Se	<1,00	<0,50	<0,50	<0,50
Sn	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00
Zn	64,09±2,40	16,07±1,77	12,73±1,01	44,79±2,94

## 6.5 Concluzii parțiale

Rezultatele studiului experimental cu privire la conținutul total de macro și microelemente confirmă bioacumularea elementelor din sediment și apă de către planta acvatică *N.alba*. Prin urmare, în procesele de creștere și dezvoltare, specia *N. alba* asimilează cantități substanțiale de elemente esențiale, dar și cantități reduse de elemente neesențiale.

Cantități mari de macroelementele, cum ar fi K, Mg, P și Na s-au identificat în probele de floare, frunză, tulpină și rădăcină de *N. alba*. Proba de rădăcină conține cele mai mari cantități de Mg și Ca, proba de floare prezintă cel mai mare conținut de K și P, iar proba de tulpină conține cea mai mare cantitate de Na. Microelemente, precum B, Ba, Co, Cr, Cu, Li, Ni, Pb și Zn s-au identificat în probele de floare, frunză, tulpină și rădăcină de *N. alba*. Microelementele Co, Cr, Li, Ni și Pb s-au identificat doar în proba de rădăcină, B a fost identificat în floare, frunză și tulpină, iar Ba a fost identificat în probele de frunză, tulpină și rădăcină.



Rezultatele obținute în acest subcapitol au fost publicate în „Exploring New Antioxidant and Mineral Compounds from *Nymphaea alba* Wild-Grown in Danube Delta Biosphere”, Cudalbeanu & all, *Molecules* 2018.

## Capitolul 7 Potențialul antioxidant al compușilor biologic activi din specia *N. alba*

### 7.4 Rezultate și discuții

#### 7.4.1 Activitatea antioxidantă prin inhibarea radicalului liber DPPH

Potențialul antioxidant, ce implică utilizarea radicalului liber DPPH, a fost determinat pentru extractele M-US, M-ES și E-EM, obținute din diferite părți anatomice de *N. alba*, precum fruct, floare, frunză, tulpină și rădăcină. În Figura 7.5 este reprezentat procentul de inhibare al radicalului liber DPPH al extractelor M-US de *N. alba*, obținut după 20 și 50 de minute de incubare. Cel mai mare procent de inhibare al radicalului liber DPPH îl prezintă extractele FL-M-US, R-M-US și F-M-US (în ordine descrescătoare), cu un procent de  $74,82 \pm 1,75$  %,  $73,32 \pm 0,98$  %, respectiv  $70,81 \pm 2,01$  % [40].

În ceea ce privește procentul de inhibare al radicalului liber DPPH al extractelor M-ES de *N. alba*, cel mai mare procent de inhibare al radicalului liber DPPH îl prezintă extractele FL-M-ES, R-M-ES și F-M-ES (în ordine descrescătoare), cu un procent de  $75,84 \pm 2,51$  %,  $74,02 \pm 1,67$  %, respectiv  $72,41 \pm 0,78$  %. Extractele E-EM de *N. alba* prezintă un potențial antioxidant mai scăzut decât extractele M-US și M-ES, deoarece pentru a obține un procent de inhibare de  $\pm 70$  % s-au utilizat concentrații de extracte de *N. alba* de  $500 \mu\text{g/mL}$ , în timp ce pentru extractele M-US și M-ES s-au utilizat concentrații de  $200 \mu\text{g/mL}$ .

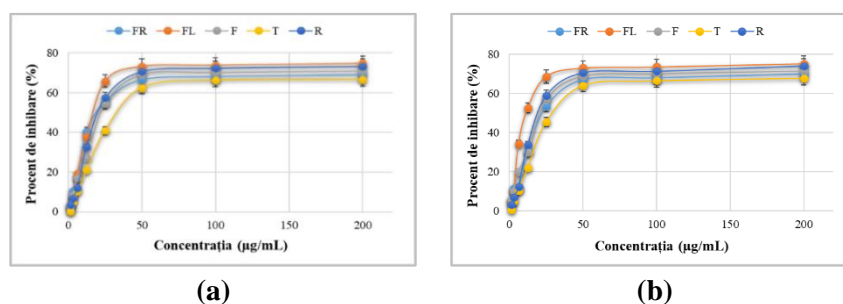


Figura 7.5. Procentul de inhibare al radicalului liber DPPH al extractelor M-US de *N. alba*, după 20 (a) și 50 (b) de minute de incubare. FR – fruct, FL – floare, F – frunză, T – tulpină și R – rădăcină

Procentele de inhibare ale extractelor de *N. alba* și ale compușilor de referință, obținute după 50 de minute de incubare, demonstrează faptul că activitatea antioxidantă a compușilor biologic activi este stabilă în timp. În ceea ce privește procentele de inhibare al radicalului liber DPPH ale compușilor de referință, în ordine descrescătoare, cel mai mare procent de inhibare îl prezintă acidul ascorbic, urmat de trolox și quercetină, cu un procent de  $91,15 \pm 2,93$  %,  $72,94 \pm 2,76$  %, respectiv  $71,05 \pm 4,05$  %, aceștia fiind compuși cunoscuți ca inhibitori ai radicalilor liberi [48, 49, 50]. Valorile  $IC_{50}$  ale compușilor de referință au fost: acid ascorbic –  $3,29 \pm 0,55 \mu\text{g/mL}$ , trolox –  $5,00 \pm 0,26 \mu\text{g/mL}$  și quercetină –  $7,03 \pm 0,85 \mu\text{g/mL}$  [51, 52]. Valorile AAI pentru compușii de

referință au fost: acid ascorbic –  $15,20 \pm 0,33$ , trolox –  $10,00 \pm 0,10$ , respectiv quercetină –  $7,11 \pm 0,53$ .

În Tabelul 7.1 este prezentat potențialul antioxidant al extractelor M-US, M-ES și E-EM de *N. alba*, exprimat astfel: valoare  $IC_{50}$ , echivalenți de activitate antioxidantă și indice de activitate antioxidantă. Valorile  $IC_{50}$  pentru extractele M-US de *N. alba* sunt următoarele: FR -  $17 \pm 0,50$   $\mu\text{g/mL}$ , FL -  $17 \pm 0,98$   $\mu\text{g/mL}$ , F -  $20 \pm 0,94$   $\mu\text{g/mL}$ , T -  $25 \pm 0,89$   $\mu\text{g/mL}$  și R -  $19 \pm 0,49$   $\mu\text{g/mL}$ . Valorile  $IC_{50}$  pentru extractele M-ES de *N. alba* sunt: FR -  $18 \pm 1,08$   $\mu\text{g/mL}$ , FL -  $15 \pm 0,73$   $\mu\text{g/mL}$ , F -  $18 \pm 0,77$   $\mu\text{g/mL}$ , T -  $30 \pm 1,10$   $\mu\text{g/mL}$  și R -  $16 \pm 0,69$   $\mu\text{g/mL}$ . Valorile  $IC_{50}$  pentru extractele E-EM sunt mai mari decât fracțiile M-US și M-ES (FR -  $30 \pm 2,27$   $\mu\text{g/mL}$ , FL -  $26 \pm 1,13$   $\mu\text{g/mL}$ , F -  $36 \pm 1,75$   $\mu\text{g/mL}$ , T -  $52 \pm 3,19$   $\mu\text{g/mL}$  și R -  $26 \pm 1,25$   $\mu\text{g/mL}$ ), ceea ce indică o putere antioxidantă mai scăzută. Datele experimentale demonstrează faptul că cea mai mare activitate antioxidantă, evaluată prin metoda DPPH, o prezintă extractul FL-M-ES de *N. alba*, având cea mai mare valoare AAI ( $3,33 \pm 0,32$ ), respectiv extractul R-M-ES de *N. alba*, prezentând o valoare AAI de  $3,13 \pm 0,26$ . Extractele T-M-US, T-M-ES și T-E-EM de *N. alba* au arătat cele mai mici valori AAI (M-US –  $2,00 \pm 0,16$ ; M-ES –  $1,67 \pm 0,64$ ; E-EM –  $0,96 \pm 0,21$ ).

Tabel 7.1. Potențialul antioxidant al extractelor M-US, M-ES și E-EM de *N. alba* exprimat astfel: valoare  $IC_{50}$ , echivalenți de activitate antioxidantă și indice de activitate antioxidantă

Parte anatomică*	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	mgEqT/g	mgEqAA/g	mgEqQ/g	AAI
<b>M-US</b>					
<b>FR</b>	$17 \pm 0,50$	$36,91 \pm 0,90$	$31,98 \pm 4,10$	$70,73 \pm 6,92$	$2,94 \pm 0,31$
<b>FL</b>	$17 \pm 0,98$	$40,66 \pm 2,90$	$35,08 \pm 1,57$	$77,66 \pm 6,40$	$2,94 \pm 0,18$
<b>F</b>	$20 \pm 0,94$	$38,08 \pm 4,91$	$32,95 \pm 5,31$	$72,89 \pm 1,05$	$2,50 \pm 0,04$
<b>T</b>	$25 \pm 0,89$	$35,43 \pm 1,31$	$30,77 \pm 0,91$	$68,01 \pm 4,85$	$2,00 \pm 0,16$
<b>R</b>	$19 \pm 0,49$	$39,69 \pm 0,80$	$34,28 \pm 1,40$	$75,87 \pm 8,02$	$2,63 \pm 0,24$
<b>M-ES</b>					
<b>FR</b>	$18 \pm 1,08$	$36,98 \pm 4,40$	$32,05 \pm 1,96$	$70,87 \pm 7,35$	$2,78 \pm 0,83$
<b>FL</b>	$15 \pm 0,73$	$41,32 \pm 3,82$	$35,62 \pm 2,13$	$78,87 \pm 1,10$	$3,33 \pm 0,32$
<b>F</b>	$18 \pm 0,77$	$39,11 \pm 1,53$	$33,80 \pm 0,40$	$74,79 \pm 4,14$	$2,78 \pm 0,27$
<b>T</b>	$30 \pm 1,10$	$34,85 \pm 7,20$	$30,28 \pm 1,46$	$66,93 \pm 3,07$	$1,67 \pm 0,64$
<b>R</b>	$16 \pm 0,69$	$40,15 \pm 3,44$	$34,66 \pm 2,60$	$76,71 \pm 5,93$	$3,13 \pm 0,26$
<b>E-EM</b>					
<b>FR</b>	$30 \pm 2,27$	$14,56 \pm 0,50$	$12,63 \pm 1,19$	$27,93 \pm 1,51$	$1,67 \pm 0,42$
<b>FL</b>	$26 \pm 1,13$	$16,02 \pm 1,09$	$13,83 \pm 0,90$	$30,61 \pm 1,96$	$1,92 \pm 0,43$
<b>F</b>	$36 \pm 1,75$	$15,34 \pm 1,35$	$13,27 \pm 2,41$	$29,35 \pm 1,71$	$1,39 \pm 0,55$
<b>T</b>	$52 \pm 3,19$	$13,75 \pm 2,73$	$11,96 \pm 0,59$	$26,43 \pm 1,48$	$0,96 \pm 0,11$
<b>R</b>	$26 \pm 1,25$	$15,59 \pm 2,95$	$13,47 \pm 3,27$	$29,82 \pm 0,97$	$1,92 \pm 0,15$

\*FR – fruct, FL -floare, F – frunză, T – tulpină, R – rădăcină. Rezultatele au fost exprimate ca valoare medie  $\pm$  deviația standard. Valorile  $IC_{50}$  au fost obținute din curbele doză-răspuns.

#### 7.4.2 Activitatea antioxidantă utilizând metoda ABTS

Potențialul antioxidant ce implică utilizarea radicalului liber  $ABTS^{\bullet+}$  a fost determinat pentru extractele M-US, M-ES și E-EM, obținute din diferite părți anatomice de *N. alba*, precum fruct, floare, frunză, tulpină și rădăcină. În Figura 7.9 este prezentat procentul de inhibare al radicalului liber  $ABTS^{\bullet+}$  al extractelor M-US de *N. alba*, după 30 și 60 de minute de incubare. Cel mai mare procent de inhibare al radicalului liber  $ABTS^{\bullet+}$  îl prezintă extractele R-M-US și F-M-US, cu un procent de inhibare  $78,20 \pm 0,12$  %, respectiv  $77,01 \pm 0,73$  % [53].

În ceea ce privește procentul de inhibare al radicalului liber ABTS<sup>•+</sup> al extractelor M-ES de *N. alba*, cel mai mare procent de inhibare al radicalului liber ABTS<sup>•+</sup> îl prezintă extractele R-M-ES și F-M-ES, cu un procent de inhibare de 75,39±1,67 %, respectiv 73,14±1,54 %. De asemenea, cel mai mare procent de inhibare al radicalului liber ABTS<sup>•+</sup> al extractelor E-EM de *N. alba*, îl prezintă fracțiile R-M-EM și F-M-EM, cu un procent de inhibare de 74,39±0,99 %, respectiv 73,77±2,16 %.

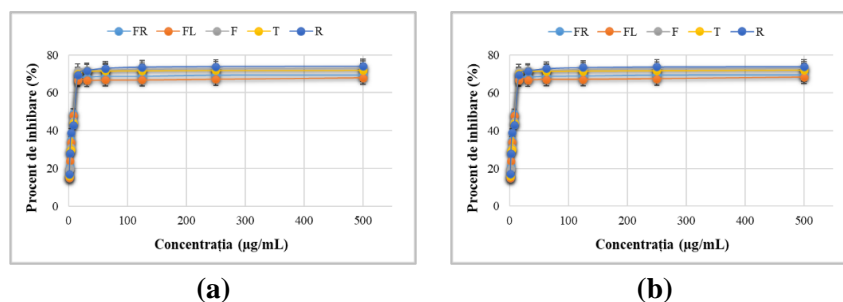


Figura 7.9. Procentul de inhibare al radicalului liber ABTS<sup>•+</sup> al extractelor M-US de *N. alba*, după 30 (a) și 60 (b) de minute de incubare. FR – fruct, FL – floare, F – frunză, T – tulpină și R – rădăcină

Compusul de referință trolox prezintă un procent de inhibare de 73,87±0,79 % (250 µg/mL) și o valoare IC<sub>50</sub> de 3,26±0,22 µg/mL [54]. În Tabelul 7.2 este prezentat potențialul antioxidant al extractelor M-US, M-ES și E-EM de *N. alba*, exprimat astfel: valoare IC<sub>50</sub> și echivalenți trolox de activitate antioxidantă. Valorile IC<sub>50</sub> pentru extractele M-US de *N. alba* sunt următoarele: FR - 13±0,64 µg/mL, FL - 15±0,78 µg/mL, F - 12±0,11 µg/mL, T - 12±0,57 µg/mL și R - 10±0,10 µg/mL. Valorile IC<sub>50</sub> pentru extractele M-ES de *N. alba* sunt: FR - 14±1,03 µg/mL, FL - 16±0,98 µg/mL, F - 13±0,23 µg/mL, T - 13±1,00 µg/mL și R - 12±0,80 µg/mL.

Tabel 7.2. Potențialul antioxidant al extractelor M-US, M-ES și E-EM de *N. alba* exprimat prin valoarea IC<sub>50</sub> și echivalenți de activitate antioxidantă

Parte anatomică*	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	mgEqT/g
<b>M-US</b>		
<b>FR</b>	13±0,64	0,96±0,02
<b>FL</b>	15±0,78	0,91±0,01
<b>F</b>	12±0,11	1,31±0,03
<b>T</b>	12±0,57	1,04 ±0,01
<b>R</b>	10±0,10	1,95±0,04
<b>M-ES</b>		
<b>FR</b>	14±1,03	0,95±0,01
<b>FL</b>	16±0,98	0,86±0,01
<b>F</b>	13±0,23	1,08±0,03
<b>T</b>	13±1,00	1,02±0,05
<b>R</b>	12±0,80	1,15±0,04
<b>E-EM</b>		
<b>FR</b>	15±1,34	0,90±0,02
<b>FL</b>	17±0,54	0,84±0,01
<b>F</b>	14±0,23	1,04±0,03
<b>T</b>	15±0,64	1,02±0,02
<b>R</b>	12±1,10	1,10±0,02

\*FR – fruct, FL -floare, F – frunză, T – tulpină, R – rădăcină. Rezultatele au fost exprimate ca valoare medie ± deviația standard. Valorile IC<sub>50</sub> au fost obținute din curbele doză-răspuns.

Valorile IC<sub>50</sub> pentru extractele E-EM sunt: FR - 15±1,34 μg/mL, FL - 17±0,54 μg/mL, F - 14±0,23 μg/mL, T - 15±0,64 μg/mL și R - 12±1,10 μg/mL. Frațiunile F-M-US, F-M-ES și F-E-EM de *N. alba* prezintă valori ale echivalenților de activitate antioxidantă cuprinse între 1,02 – 1,04 mgEqT/g, iar fracțiunile R-M-US, R-M-ES și R-E-EM prezintă valori ale echivalenților de activitate antioxidantă cuprinse între 1,10 – 1,95 mgEqT/g.

### 7.4.3 Activitatea antioxidantă utilizând metodele BCB și FRAP

Testele de activitate antioxidantă DPPH și ABTS au demonstrat puterea antioxidantă a extractelor F-M-US, F-M-ES și F-E-EM de *N. alba*, respectiv a extractelor R-M-US, R-M-ES și R-E-EM de *N. alba*, motiv pentru care în testele de activitate antioxidantă BCB și FRAP, s-au analizat doar fracțiunile F-M-US și R-M-US de *N. alba*, iar rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 7.3. Pe scurt, testele BCB și FRAP indică stabilitatea compușilor bioactivi prezenți în fracțiunile F-M-US și R-M-US de *N. alba*, ceea ce demonstrează că potențialele antioxidante și valorile IC<sub>50</sub> a extractelor rămân constante și acționează pe o perioadă mai lungă de timp [52].

Tabel 7.3. Activitatea antioxidantă a extractelor M-US de *N. alba* evaluată prin metodele BCB și FRAP

Test*	Extracte M-US de <i>N. alba</i>					
	F			R		
	Procent de inhibare (%)	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	mgTEq/g	Procent de inhibare (%)	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	mgTEq/g
<b>BCB</b>	78,6±0,19	33±0,86	28,93±0,89	90,1±0,90	21±0,55	79,37±1,03
<b>FRAP</b>	74,6±0,13	30±0,25	2,24±0,67	79,7±0,13	13±0,15	2,40±0,98

\*BCB – procesul de decolorare a β-carotenului; FRAP - puterea antioxidantă prin reducerea fierului. F – frunză și R – rădăcină.

Atât în cazul testului BCB, cât și în cazul testului FRAP, fracția R-M-US de *N. alba* a prezentat o activitate antioxidantă mai mare (un procent mai mare de inhibare, o valoare IC<sub>50</sub> mai mică și o cantitate mai mare de echivalenți trolox), decât fracția F-M-US de *N. alba*. Pentru fracția R-M-US de *N. alba* s-a înregistrat un procent de inhibare 90,1±0,90 (test BCB), respectiv 79,7±0,13 (test FRAP) și o valoare IC<sub>50</sub> de 21±0,55 μg/mL (test BCB), respectiv 13±0,15 μg/mL (test FRAP). Frația F-M-US de *N. alba* a prezentat un procent de inhibare de 78,6±0,19 (test BCB), respectiv 74,6±0,13 (test FRAP) și o valoare IC<sub>50</sub> de 33±0,86 μg/mL (test BCB), respectiv 30±0,25 μg/mL (test FRAP). Valorile exprimate în echivalenți trolox pentru fracția R-M-US de *N. alba* au fost următoarele: 79,37 mgTEq/g (test BCB), respectiv 2,40 mgTEq/g (test FRAP), iar pentru fracția F-M-US de *N. alba* au fost: 28,93 μgTEq/g (test BCB) și 2,24 mgTEq/g (test FRAP).

### 7.4.4 Potențialul antioxidant evaluat prin voltametrie ciclică și corelat cu UV-Vis

Investigațiile electrochimice privind potențialul antioxidant al extractelor F-M-US și R-M-US de *N. alba* au fost efectuate folosind voltametria ciclică (CV) și spectrofotometria UV-Vis. Probele de *N. alba* au indicat un potențial ușor pozitiv din măsurătorile de circuit deschis (OCV), proba F-M-US prezentând un potențial E de cca 30 mV, mai pozitiv comparativ cu proba R-M-US [52]. Quercetina (10<sup>-3</sup> M), compusul antioxidant major din extractele de *N. alba*, a indicat un profil al voltamogramei similar cu cel al fracțiilor F-M-US și R-M-US de *N. alba* (Figura 7.13a, linia albastră). Potențialul redox (E<sub>1/2</sub>) al fracțiilor F-M-US și R-M-US a fost de 0,410 V±10 mV comparativ cu valoarea potențialului quercetinei [55]. Au fost înregistrate cinci voltamograme

consecutive la viteze diferite de scanare (10 - 1000 mVs<sup>-1</sup>), iar intensitatea curentului a crescut odată cu viteza de scanare. Intensitatea curentului anodic variază liniar cu rata de scanare datorită proceselor tipice de control al difuziei (Figura 7.13b).

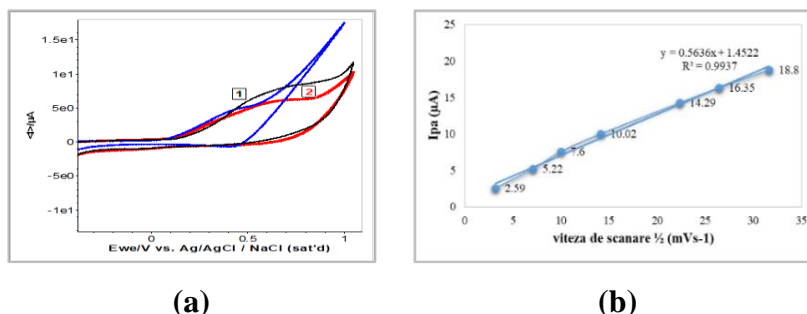


Figura 7.13. Voltamograme ciclice înregistrate pentru extractele F-M-US (1) și R-M-US (2) de *N. alba* în comparație cu quercetina (linia albastră).  $E = \pm 1V$  vs  $Ag/AgCl_{sat}$ , viteza de scanare de  $100\text{ mV s}^{-1}$  (a).  
Dependența curentului anodic față de rădăcina pătrată a vitezelor de scanare (b)

Au fost înregistrate spectre UV-Vis ale extractelor F-M-US și R-M-US de *N. alba* înainte și după măsurătorile electrochimice (Figura 7.14). Aceste rezultate confirmă existența compușilor antioxidanți în extractele de *N. alba*, deoarece absorbția flavonoidelor variază la  $\lambda$  de 240 - 400 nm.  $\lambda_{max}$  al quercetinei fiind la  $\lambda$  de 385 nm [54], iar procesul oxidativ al măsurătorilor electrochimice este evidențiat în Figura 7.14b. Prin urmare, evaluarea electrochimică observată susține activitatea antioxidantă a extractelor de *N. alba*, care poate fi atribuită flavonoidelor, quercetina fiind componentul major în fracția F-M-US de *N. alba* [54, 56].

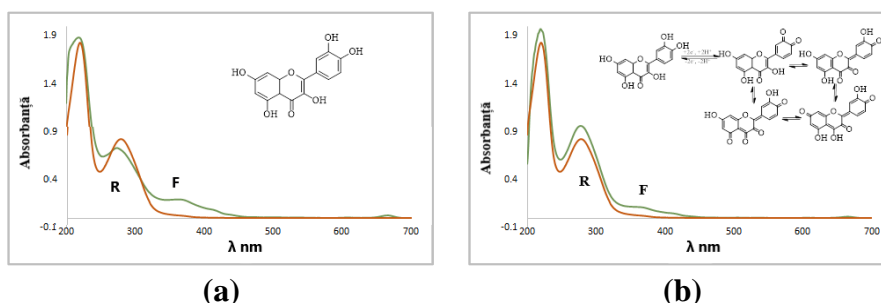


Figura 7.14. Spectrele UV-Vis înregistrate pentru extractele F-M-US și R-M-US de *N. alba* înainte de (a) și după (b) teste de voltametrie ciclică

## 7.5 Concluzii parțiale

Cea mai mare activitate antioxidantă, evaluată prin metoda DPPH, o prezintă fracțiile FL-M-ES și R-M-ES de *N. alba*. Extractele de *N. alba* prezintă o activitate antioxidantă puternică probabil datorită prezenței flavonoidelor, care ar putea fi implicate în creșterea potențialului antioxidant al acestora, fracțiile F-M-US, F-M-ES și F-E-EM, respectiv FL-M-US, FL-M-ES și FL-E-EM conținând cea mai mare cantitate de flavonoide.

Cel mai mare procent de inhibare al radicalului liber ABTS<sup>•+</sup> îl prezintă fracțiile R-M-US și F-M-US. Extractele R-M-US, R-M-ES și R-E-EM au prezentat cea mai mare cantitate de acizi fenolici. Testele BCB și FRAP indică stabilitatea compușilor bioactivi prezenți în extractele de *N.*

*alba*, ceea ce demonstrează că potențialele antioxidante și valorile IC<sub>50</sub> ale extractelor rămân constante și acționează pe o perioadă mai lungă de timp.

Rezultate obținute în acest subcapitol au fost publicate parțial în „*Exploring New Antioxidant and Mineral Compounds from Nymphaea alba Wild-Grown in Danube Delta Biosphere*”, Cudalbeanu & all, *Molecules* 2018 și „*Antifungal, Antitumoral and Antioxidant Potential of the Danube Delta Nymphaea alba Extracts*”, Cudalbeanu & all, *Antibiotics*, 2020.

## Capitolul 8 Proprietățile antimicrobiene ale compușilor biologic activi din specia *N. alba*

### 8.4 Rezultate și discuții

#### 8.4.1 Proprietățile antibacteriene ale compușilor biologic activi

##### 8.4.1.1 Metoda difuzimetrică Kirby-Bauer (MDKB)

Extractele M-US de *N. alba* prezintă cea mai bună activitate inhibitorie împotriva tulpinii bacteriene Gram-negative *E. hormaechei* ATCC 700322, cu un interval al zonelor de inhibiție între 20 – 24 mm (efect inhibitor moderat). Extractele FR-M-US și FL-M-US de *N. alba* prezintă zone de inhibiție de 9 mm asupra tulpinii de referință *P. aeruginosa* ATCC 27853, iar fracțiile F-M-US și R-M-US de *N. alba* prezintă zone de inhibiție de 10 mm asupra tulpinii de referință *P. aeruginosa* 477. Extractele M-US de *N. alba* prezintă efect inhibitor scăzut împotriva tulpinii bacteriene Gram-pozitive *S. aureus* ATCC 25923 (11 – 17 mm) (Tabelul 8.1).

Tabel 8.1. Rezultatele obținute la măsurarea zonelor de inhibiție ale extractelor M-US de *N. alba* împotriva bacteriilor Gram-negative și Gram-pozitive

Tulpina bacteriană	Extracte M-US* (diametrul în mm)					Control pozitiv (diametrul în mm)
	FR	FL	F	T	R	GE
<b>Gram-negativă</b>						
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	11	+	11	19-26
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	9	9	-	-	-	17-23
<i>P. aeruginosa</i> 477**	**	**	10	**	10	-
<i>E. hormaechei</i> ATCC 700322	20	20	20	21	24	-
<b>Gram-pozitivă</b>						
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	12	15	11	14	17	19-27
<i>S. aureus</i> NCTC8178**	**	**	10	**	13	-
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	-	-	-	-	-	-
<i>E. casseliflavus</i> ATCC 700327	-	-	-	-	-	-

- Fără acțiune antimicrobiană. \*\*Doar fracțiile F-M-US și R-M-US au fost testate pe tulpinile de referință *P. aeruginosa* 477 și *S. aureus* NCTC8178. + la o concentrație de extract mai mare de 8 mg/mL, extractele prezintă activitate antimicrobiană. \*FR – fruct, FL -floare, F – frunză, T – tulpină, R – rădăcină, GE - gentamicină. Valorile sunt exprimate ca medie a trei determinări.

La fel ca și în cazul extractelor M-US *N. alba*, fracțiile FR-M-ES și FL-M-ES, prezintă zone de inhibiție de 11 mm asupra tulpinii bacteriene *P. aeruginosa* ATCC 27853. Cu un efect inhibitor moderat, extractele M-ES de *N. alba* prezintă cea mai bună activitate inhibitorie împotriva tulpinii bacteriene Gram-negative *E. hormaechei* ATCC 700322 cu un interval al zonelor de inhibiție cuprins între 21 – 27 mm. Extractele M-ES de *N. alba*, prezintă efect inhibitor scăzut asupra tulpinii *S. aureus* ATCC 25923 (12 – 16 mm).

Evaluarea *in vitro* a activității antibacteriene a extractelor E-EM de *N. alba* asupra bacteriilor patogene Gram-negative și Gram-pozitive, folosind MDKB, a demonstrat faptul că fracțiile prezintă efect inhibitor moderat împotriva bacteriei Gram-negative *E. hormaechei* ATCC 700322 (20 – 25 mm) și efect inhibitor scăzut asupra bacteriei Gram-pozitive *S. aureus* ATCC 25923 (12 – 15 mm).

#### 8.4.1.2 Concentrația minimă inhibitorie

Extractele M-US de *N. alba* au prezentat valori CMI de 1 mg/mL asupra bacteriei *E. hormaechei* ATCC 700322. Fracțiile F-M-US și R-M-US au prezentat valori CMI de 1 mg/mL, respectiv 2 mg/mL, împotriva tulpinii bacteriene *E. coli* ATCC 25922. Fracțiile FR-M-US și FL-M-US au inhibat dezvoltarea tulpinii *P. aeruginosa* ATCC 27853, cu o valoare CMI de 1 mg/mL. În cazul tulpinilor bacteriene Gram-pozitive *S. aureus* ATCC 25923 și *S. aureus* NCTC8178, extractele M-US de *N. alba* prezintă valori CMI de 2 mg/mL (Tabel 8.4).

Tabel 8.4. Valorile CMI ale extractelor M-US de *N. alba* asupra bacteriilor Gram-negative și Gram-pozitive

Tulpina bacteriană	Fracție M-US*					Control pozitiv μg/mL
	FR	FL	F	T	R	
<b>Gram-negativă</b>						<b>GE</b>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	1	-	>2	0,25-1
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1	1	-	-	-	0,50-2
<i>P. aeruginosa</i> 477**	-	-	-	-	-	-
<i>E. hormaechei</i> ATCC 700322	1	1	1	1	1	-
<b>Gram-pozitivă</b>						<b>GE</b>
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	2	2	2	2	2	0,12-1
<i>S. aureus</i> NCTC8178**	-	-	2	-	2	-

Experimentele au fost efectuate în triplicat și s-a calculat valoarea medie CMI. – nu prezintă activitate/nu s-a determinat concentrația minimă inhibitorie. \*\*Doar fracțiile F-M-US și R-M-US au fost testate pe tulpinile de referință *P. aeruginosa* 477 și *S. aureus* NCTC8178. \*FR – fruct, FL - floare, F – frunză, T – tulpină, R – rădăcină, GE – gentamicină.

Cea mai bună activitate antibacteriană a extractelor M-ES de *N. alba* a fost obținută asupra bacteriilor *P. aeruginosa* ATCC 27853 și *E. hormaechei* ATCC 700322 (CMI = 1 mg/mL). Bacteria *S. aureus* ATCC 25923 a fost inhibată de extractele M-ES de *N. alba*, cu valori CMI de 2 mg/mL. La fel ca și în cazul extractelor M-US și M-ES, extractele E-EM prezintă valori CMI de 1 mg/mL asupra bacteriilor Gram-negative *P. aeruginosa* ATCC 27853 și *E. hormaechei* ATCC 700322 și valori CMI de 2 mg/mL asupra bacteriei Gram-pozitive *S. aureus* ATCC 25923.

### 8.4.1.3 Concentrația minimă bactericidă/bacteriostatică

Fracția F-M-US prezintă efect bactericid (CMB = 2 mg/mL), iar fracția R-M-US prezintă efect bacteriostatic asupra tulpinii *E. coli* ATCC 25922. Extractele M-US, M-ES, E-EM de FR și FL de *N. alba* prezintă efecte bactericide asupra tulpinii bacteriene *P. aeruginosa* ATCC 27853 (CMB = 2 mg/mL). Extractele M-US, M-ES și E-EM de *N. alba* prezintă efecte bactericide asupra tulpinilor bacteriene *E. hormaechei* ATCC 700322 și *S. aureus* ATCC 25923 (CMB = 2 - 4 mg/mL), doar fracția R-E-EM prezintă efect bacteriostatic asupra tulpinii *S. aureus* ATCC 25923.

### 8.4.2 Proprietățile antifungice ale compușilor biologic activi

#### 8.4.2.1 Concentrația minimă inhibitorie

Activitatea antifungică *in vitro* (CMI) a fost evaluată împotriva a patru tulpini fungice de referință: *C. glabrata* CBS138, *C. albicans* SC5134, *C. parapsilosis* ATCC22019 și *C. tropicalis* ATCC750, utilizând extracte F-M-US și R-M-US de *N. alba*, cu concentrații cuprinse între 0,23 - 2000  $\mu\text{g/mL}$ , iar ca standard de referință s-a utilizat FLC, cu concentrații cuprinse între 0,23 - 250  $\mu\text{g/mL}$  [52]. S-a constatat faptul că extractele F-M-US și R-M-US de *N. alba* sunt active împotriva tulpinii *C. glabrata* CBS138, cu valori CMI de 1,717  $\mu\text{g/mL}$ , respectiv 1,935  $\mu\text{g/mL}$  și pentru FLC de 0,7639  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 8.3) [57].

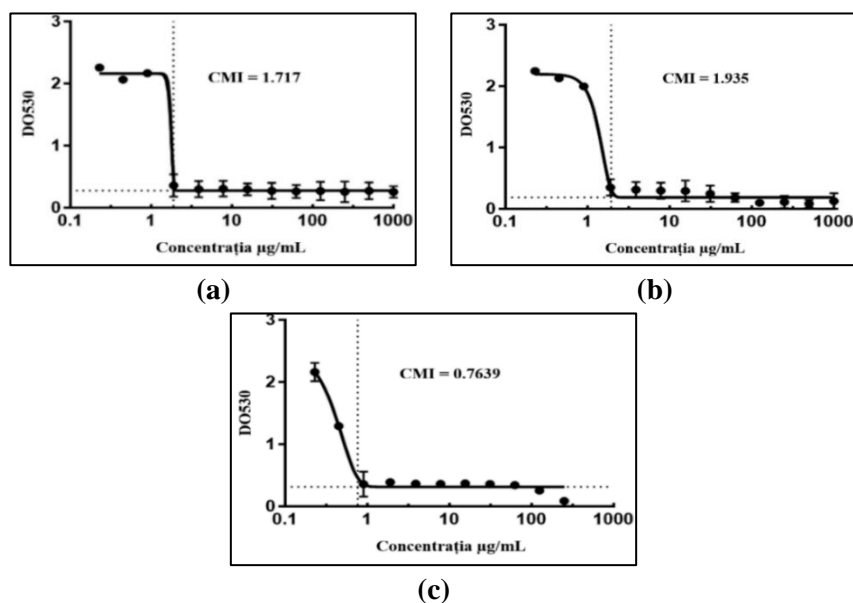


Figura 8.3. Valorile CMI ale extractelor de (a) F-M-US și (b) R-M-US de *N. alba* și (c) FLC asupra tulpinii *C. glabrata* CBS138

#### 8.4.2.2 Concentrația minimă fungicidă/fungistatică

Concentrația cea mai mare, 2000  $\mu\text{g/mL}$  și de asemenea, concentrația cea mai mică, 7,8  $\mu\text{g/mL}$ , de extracte F-M-US și R-M-US de *N. alba*, au prezentat același număr UFC/mL de tulpină fungică *C. glabrata* CBS138. De asemenea, s-au prezentat și rezultatele obținute la determinarea UFC/mL ale tulpinii *C. glabrata* CBS138 cultivate prezența unor concentrații diferite de FLC (Figura 8.4).



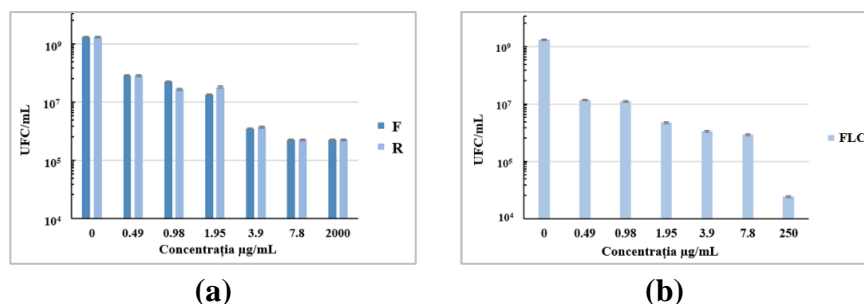


Figura 8.4. Valorile logaritmice ale UFC/mL ale tulpinii *C. glabrata* CBS138, cultivate în prezența unor concentrații diferite de extracte (a) F-M-US (F) și R-M-US (R) de *N. alba* și (b) FLC

#### 8.4.2.3 Potențialul de interacțiune al extractelor studiate cu fluconazol

Prezentul studiu experimental a evaluat posibile interacții dintre extractele de *N. alba* (F-M-US și R-M-US) și FLC asupra tulpinii fungice de referință *C. glabrata* CBS138, utilizând metoda tablei de șah și prin determinarea indicelui FIC. Tabelul 8.8 prezintă valorile medii ale indicelui FIC asociat cu tipul de interacțiune ( $1 < \Sigma FIC \leq 2$ ). Interacțiunea extractelor de *N. alba* și FLC s-a dovedit a fi indiferentă.

Tabel 8.8. Interacțiunea extractelor M-US de *N. alba* cu FLC asupra tulpinii *C. glabrata* CBS138

Tulpina fungică	Extract M-US			
	F-M-US		R-M-US	
<i>C. glabrata</i> CBS138	Indicele FIC 1,30	Interacțiune Indiferentă	Indicele FIC 1,06	Interacțiune Indiferentă

Experimentele au fost efectuate în triplicat și s-a calculat valoarea medie FIC.

## 8.5 Concluzii parțiale

Extractele de *N. alba* prezintă cea mai bună activitate inhibitorie împotriva tulpinii bacteriene Gram-negative *E. hormaechei* ATCC 700322 (efect inhibitor moderat). Frațiile M-US, M-ES și E-EM de FR și FL de *N. alba* prezintă zone de inhibiție cuprinse între 9 - 11 mm asupra tulpinii de referință *P. aeruginosa* ATCC 27853, iar fracțiile F-M-US și R-M-US de *N. alba* prezintă zone de inhibiție de 10 mm asupra tulpinii de referință *P. aeruginosa* 477. Extractele de *N. alba* prezintă efect inhibitor scăzut asupra tulpinii *S. aureus* ATCC 25923.

Extractele M-US, M-ES și E-EM de *N. alba* au prezentat valori CMI de 1 mg/mL asupra bacteriei Gram-negative *E. hormaechei* ATCC 700322 (efecte bactericide - CMB = 2 - 4 mg/mL). Frațiile M-US, M-ES și E-EM de FR și FL de *N. alba* au prezentat valori CMI de 1 mg/mL asupra bacteriei Gram-negative *P. aeruginosa* ATCC 27853 (efecte bactericide - CMB = 2 mg/mL). Frațiile F-M-US și R-M-US au prezentat valori CMI de 1 mg/mL, respectiv 2 mg/mL, împotriva tulpinii bacteriene *E. coli* ATCC 25922, fracția F-M-US prezentând efect bactericid (CMB = 2 mg/mL), iar fracția R-M-US prezentând efect bacteriostatic. Extractele M-US, M-ES și E-EM de *N. alba* au prezentat valori CMI de 2 mg/mL asupra bacteriei Gram-pozitive *S. aureus* ATCC 25923 (efecte bactericide - CMB = 2 - 4 mg/mL), însă fracția R-E-EM a prezentat efect bacteriostatic asupra bacteriei *S. aureus* ATCC 25923. La concentrația de 2 mg/mL, fracțiile F-M-US și R-M-US de *N. alba* au prezentat o descreștere substanțială a UFC/mL ale tulpinii *S. aureus* NCTC8178.

S-a constatat faptul că fracțiile F-M-US și R-M-US de *N. alba* sunt active împotriva tulpinii *C. glabrata* CBS138, cu valori CMI de 1,717  $\mu\text{g/mL}$ , respectiv 1,935  $\mu\text{g/mL}$  și pentru FLC de 0,7639  $\mu\text{g/mL}$ . Rezultatele obținute au arătat faptul că acțiunea antifungică a extractelor de *N. alba*, la concentrații mici, a fost specifică asupra tulpinii *C. glabrata* CBS138, având acțiune antifungică, la concentrații mult mai mari, asupra celorlalte tulpini de *Candida* testate (*C. albicans* CB138, *C. parapsilosis* ATCC22019 și *C. tropicalis* ATCC750). Concentrația cea mai mare, de 2000  $\mu\text{g/mL}$  și de asemenea, concentrația cea mai mică, de 7,8  $\mu\text{g/mL}$ , au prezentat același număr UFC/mL de tulpină fungică *C. glabrata* CBS138, deoarece fracțiile prezintă aceeași acțiune fungistică indiferent de concentrația utilizată. Interacțiunea extractelor de *N. alba* (F-M-US și R-M-US) și FLC asupra tulpinii fungice de referință *C. glabrata* CBS138, utilizând metoda tablei de șah și prin determinarea indicelui FIC, s-a dovedit a fi indiferentă.

Rezultatele obținute la evaluarea potențialului antifungic al extractelor M-US de *N. alba* asupra tulpinii *C. glabrata* CBS138 au fost publicate în lucrarea științifică „*Antifungal, Antitumoral and Antioxidant Potential of the Danube Delta Nymphaea alba Extracts*”, Cudalbeanu & all, Antibiotics 2020.

## Capitolul 9 Potențialul toxic și citotoxic al compușilor biologic activi din specia *N. alba*

### 9.4 Rezultate și discuții

#### 9.4.1 Efectele toxice ale compușilor biologic activi asupra germinării cariopselor de grâu (*Triticum aestivum* L.)

Efectul toxic al compușilor prezenți în extractele M-US de *N. alba* a fost determinat utilizând testul de germinare a cariopselor de grâu (*Triticum aestivum* L.), prin calcularea și evaluarea celor mai sensibili parametri fiziologici, precum procent de germinare, procent relativ de creștere a rădăcinii germenului, indicele de germinare și indicele de vigoare și prin captarea unor imagini ale germenilor tratați și netratați cu extractele M-US de *N. alba*, utilizând CLSM.

Rezultatele experimentale (Tabelul 9.1) au arătat faptul că aplicarea diferitelor concentrații de fracții F-M-US și R-M-US de *N. alba* nu a prezentat acțiune toxică asupra germinării cariopselor de grâu [52].

Tabel 9.1. Parametrii fiziologici ai cariopselor de grâu germinate sub tratamentul diferitelor concentrații de extracte M-US de *N. alba*

Parametrii fiziologici <sup>a</sup>	Concentrație ( $\mu\text{g/mL}$ )				Control ( $\text{H}_2\text{O}$ )
	10	100	500	1000	
<b>Extract F-M-US</b>					
<b>G %</b>	94,20±0,24	94,60±0,40	95,90±0,91	97,40±0,50	100,00±0,00
<b>RRG %</b>	84,60±1,20	101,13±0,87	103,43±1,13	103,55±0,97	100,00±0,00
<b>GI</b>	1,10±0,10	0,90±0,20	0,90±0,25	0,90±0,14	1,00±0,00
<b>VI</b>	120,20±0,43	146,20±0,35	117,90±0,10	113,80±0,10	66,60±0,14
<b>TI</b>	0,80±0,12	0,60±0,12	0,50±0,24	0,60±0,10	1,00±0,00
<b>Extract R-M-US</b>					
<b>G %</b>	94,70±0,52	96,00±0,37	96,00±0,15	97,40±1,00	100,00±0,00
<b>RRG %</b>	69,09±0,73	91,76±1,00	94,55±0,76	100,07±0,45	100,00±0,00

Parametrii fiziologici <sup>a</sup>	Concentrație (μg/mL)				Control (H <sub>2</sub> O)
	10	100	500	1000	
GI	1,40±0,10	1,00±0,21	1,00±0,50	1,00±0,45	1,00±0,00
VI	89,50±0,24	137,60±0,17	92,90±0,24	123,70±0,13	66,60±0,14
TI	0,70±0,43	0,50±0,12	0,50±0,11	0,80±0,10	1,00±0,00

Rezultatele au fost exprimate ca valoare medie ± deviație standard. <sup>a</sup>G% - procent de germinare, RRG% - procent relativ de creștere a rădăcinii germenului, GI – indice de germinare, VI – indice de vigoare, TI – indice de vigoare.

De asemenea, secțiunile prin tulpinile cariopselor de grâu germinate în prezența extractelor M-US de *N. alba* au prezentat țesuturi vegetale sănătoase, fără modificări morfologice și structurale, așa cum s-a observat prin CLSM (Figurile 9.2 – 9.3).

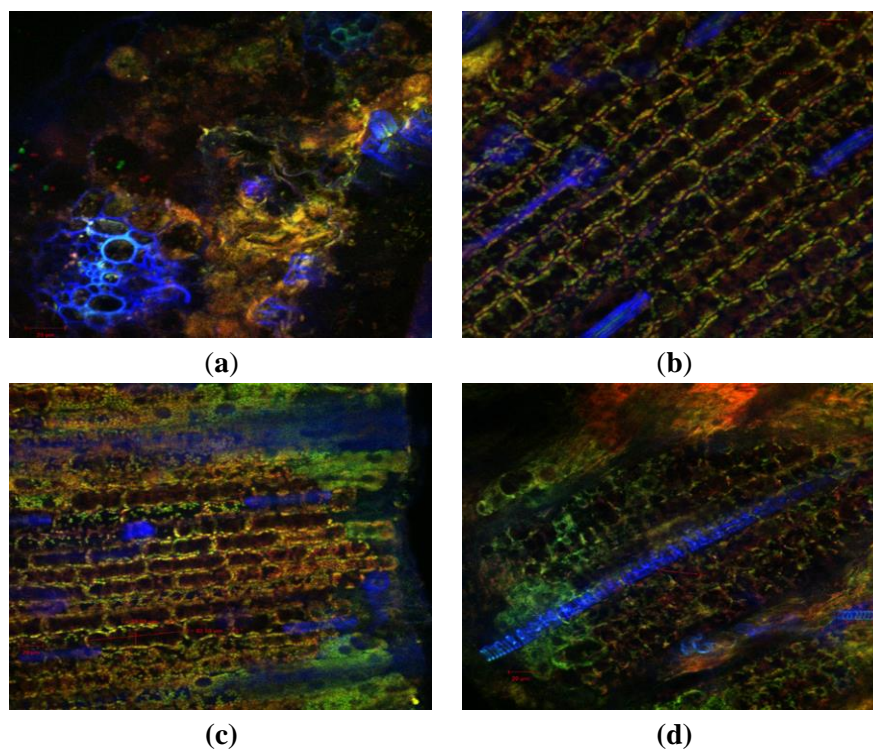
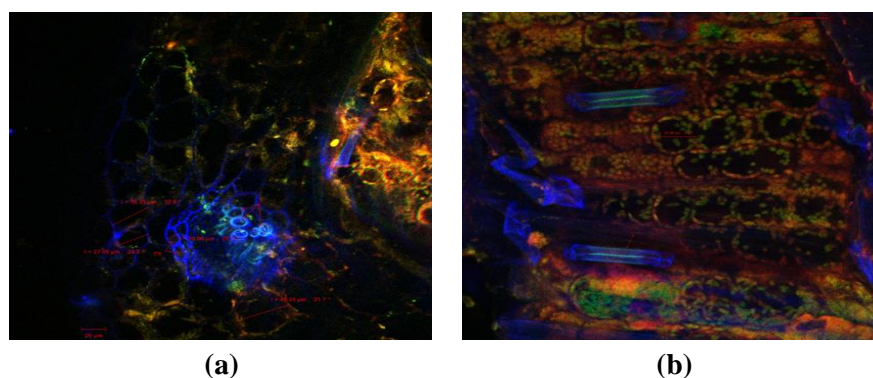


Figura 9.2. Imagini CLSM a diferitelor secțiuni de tulpină a cariopselor de grâu germinate sub tratamentul diferitelor concentrații de extract F-M-US de *N. alba*: a – 10 μg/mL, b – 100 μg/mL, c – 500 μg/mL și d – 1000 μg/mL



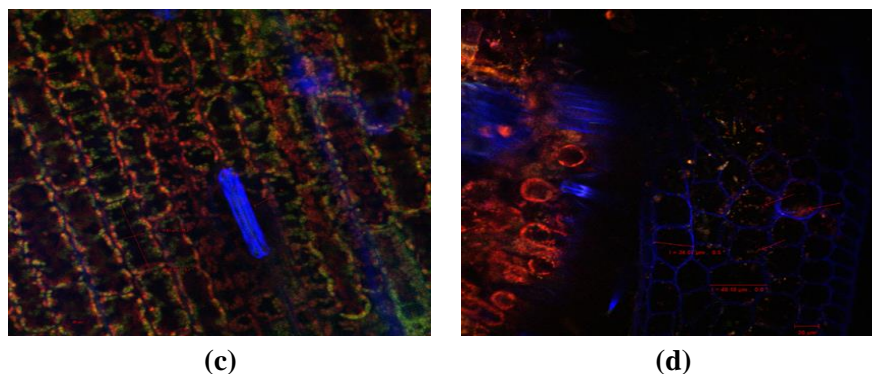


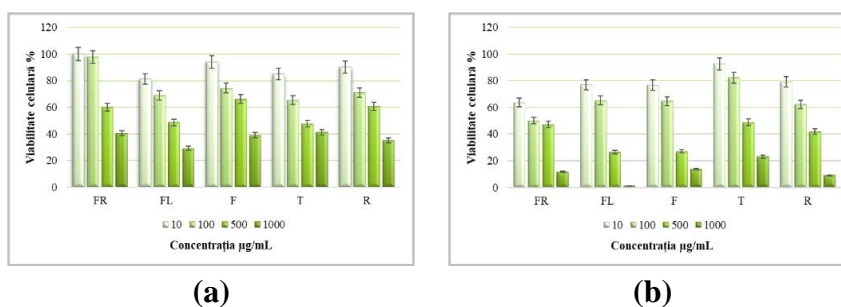
Figura 9.3. Imagini CLSM a diferitelor secțiuni de tulpină a cariopselor de grâu germinate sub tratamentul diferitelor concentrații de extract R-M-US de *N. alba*: a – 10 µg/mL, b – 100 µg/mL, c – 500 µg/mL și d – 1000 µg/mL

Diferențierea celulară nu a fost afectată de extractele de *N. alba* utilizate. Se poate observa epiderma unistratificată (Figura 9.3d), parenchimul cortical cu celule izodiametrice bogate în cloroplaste (țesut asimilator), periciclul care separă parenchimul cortical de cilindrul central (Figura 9.3d), precum și componente specifice țesuturilor conducătoare (în albastru): xylem (X) (Figura 9.3a, 9.2a, 9.2d) sau floem (Ph) (Figura 9.3a). În toate experimentele realizate, analiza microscopică a secțiunilor a arătat formațiuni epidermale normale cum ar fi numeroși peri (H) sau stomate de tip Zea (S) (în albastru), ceea ce înseamnă că extractele M-US de *N. alba* au permis sau chiar au facilitat diferențierea acestor structuri [52].

#### 9.4.2 Efectele citotoxice ale compușilor biologic activi asupra celulelor fibroblaste pulmonare sănătoase

Citotoxicitatea compușilor prezenți în extractele de *N. alba* a fost evaluată utilizând fibroblaste sănătoase pulmonare V79, iar viabilitatea celulară a fost măsurată prin testul MTT. S-au analizat fracții din diferite părți anatomice ale speciei (fruct, floare, frunză, tulpină și rădăcină), extrase prin diferite metode (US, ES, EM) și cu diferiți solvenți (eter de petrol, ciclohexan, metanol, etanol și apă), dar și fracții de R-E-EM (F2, F5, F50 și F51) (Figura 9.4).

Extractele EP-ES de *N. alba* prezintă o citotoxicitate redusă, cu o viabilitate celulară mai mare de 30 % la concentrația de 1000 µg/mL (Figura 9.4a). În ceea ce privește citotoxicitatea extractelor CH-EM de *N. alba*, la concentrația de 1000 µg/mL, fracțiile prezintă un procent al viabilității celulare mai mic de 15 % (Figura 9.4b). Fracțiile FR-M-US, FL-M-US și T-M-US de *N. alba* au prezentat o viabilitate celulară redusă la concentrația de 1000 µg/mL (Figura 9.4c) [52]. Cea mai mare citotoxicitatea a extractelor M-ES de *N. alba*, o prezintă fracțiile FL-M-ES și T-M-ES, cu un procent al viabilității celulare scăzut (Figura 9.4d).



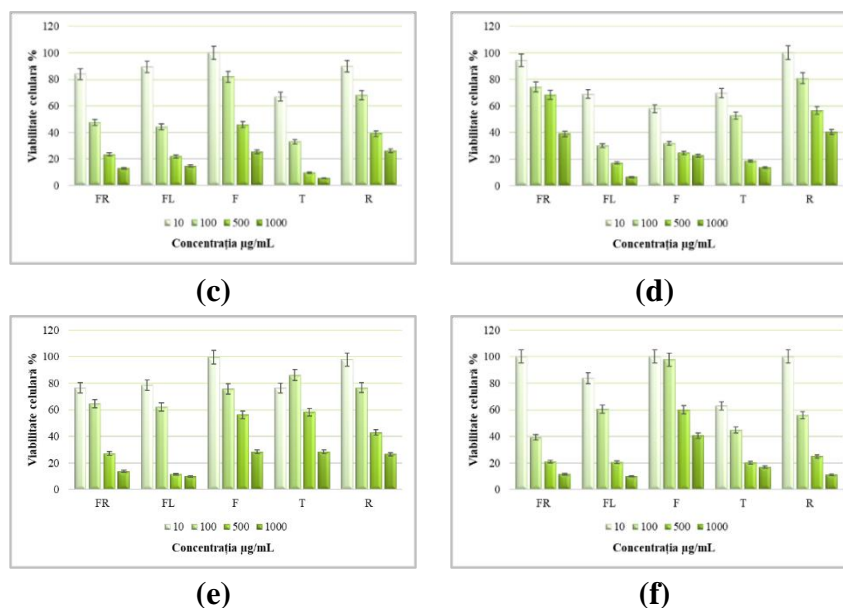


Figura 9.4. Citotoxicitatea extractelor de *N. alba* asupra celulelor fibroblaste pulmonare sănătoase V79: (a) EP-ES, (b) CH-EM, (c) M-US, (d) M-ES, (e) E-EM și (f) A-EM. FR - fruct, FL – floare, F -frunză, T – tulpină și R – rădăcină

Fracțiile FR-E-EM și FL-E-EM prezintă citotoxicitatea cea mai mare la concentrațiile de 100 µg/mL, respectiv 1000 µg/mL (Figura 9.4e). Valorile IC<sub>50</sub> ale extractelor de *N. alba* în raport cu linia celulară V79 sunt prezentate în Tabelul 9.2. Rezultatele demonstrează faptul că fracțiile de FR, FL și R de *N. alba* au prezentat citotoxicitate neglijabilă asupra celulelor fibroblaste pulmonare sănătoase V79, însă fracțiile de F și T de *N. alba* au prezentat o citotoxicitate ridicată asupra celulelor sănătoase.

Tabel 9.2. Valorile IC<sub>50</sub> ale extractelor de *N. alba* asupra celulelor fibroblaste pulmonare sănătoase V79

Parte anatomică <sup>a</sup>	Extract de <i>N. alba</i> <sup>b</sup> (µg/mL)		
	EP-ES	CH-EM	M-US
FR	722,45±50,43	71,79±4,51	90,09±5,39
FL	319,98±10,46	133,22±5,73	91,63±4,80
F	757,74±29,71	133,24±6,55	367,00±50,01
T	426,23±17,21	412,66±35,40	29,72±4,47
R	567,80±20,25	158,75±7,87	281,00±59,00
	M-ES	E-EM	A-EM
FR	802,81±36,31	133,24±5,72	88,63±9,75
FL	31,72±2,39	111,08±4,17	125,97±28,44
F	19,68±1,66	473,00±55,33	722,45±10,03
T	64,04±5,17	535,03±69,50	39,14±5,23
R	646,91±55,53	357,80±14,36	143,71±3,57

<sup>a</sup>FR – fruct, FL -floare, F – frunză, T – tulpină, R – rădăcină. <sup>b</sup>EP– extracte eterice, CH – extracte ciclohexanice, M – extracte metanolice, E – extracte etanolice, A – extracte apoase. US – obținute prin ultrasonare, ES – obținute cu extractorul Soxhlet, EM – obținute prin agitare mecanică. Datele au fost obținute din curbele doză-răspuns.

Fracțiile F2, F5, F50 și F51 prezintă o citotoxicitate redusă, cu o viabilitate celulară mai mare de 45 % la concentrația de 500 µg/mL (Figura 9.5a). Valorile IC<sub>50</sub> ale fracțiilor F2, F5, F50 și F51 în raport cu linia celulară V79, au prezentat o citotoxicitate neglijabilă asupra celulelor fibroblaste pulmonare sănătoase V79 (Figura 9.5b).

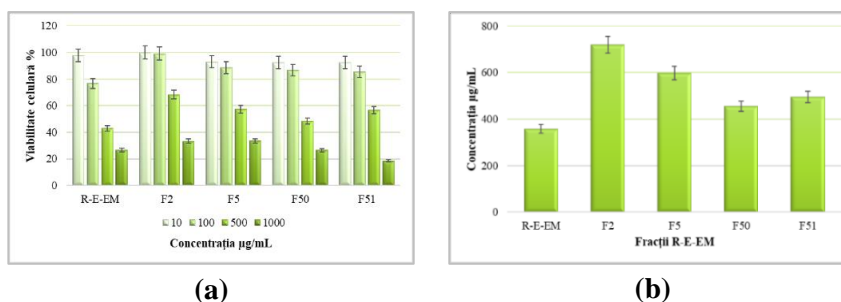


Figura 9.5. Citotoxicitatea fracțiilor F2, F5, F50 și F51 de *N. alba* asupra celulelor fibroblaste pulmonare sănătoase V79

### 9.4.3 Potențialul citotoxic al compușilor biologic activi asupra celulelor tumorale ovariene

Pentru evaluarea *in vitro* a citotoxicității extractelor de *N. alba* asupra celulelor tumorale ovariene sensibile A2780 s-au analizat extracte din diferite părți anatomice (fruct, floare, frunză, tulpină și rădăcină), obținute prin diferite metode (US, ES, EM) și cu diferiți solvenți (eter de petrol, ciclohexan, metanol, etanol și apă), dar și fracții R-E-EM (F2, F5, F50 și F51) (Figura 9.7).

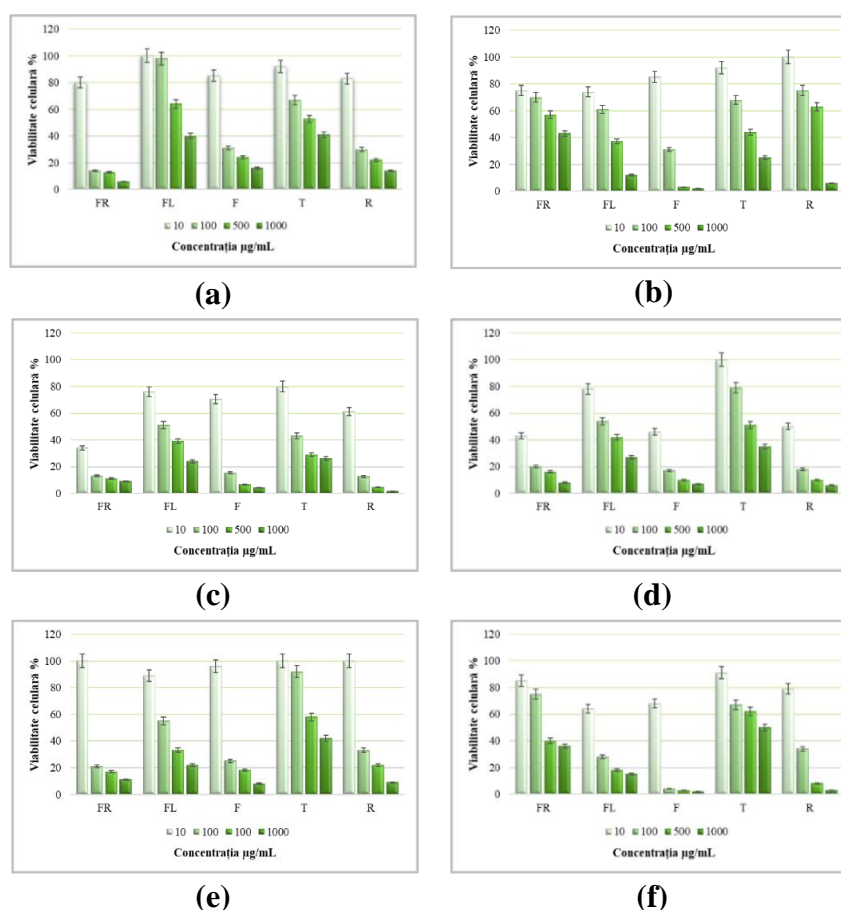


Figura 9.7. Citotoxicitatea extractelor de *N. alba* asupra celulelor tumorale ovariene sensibile A2780: (a) EP-ES, (b) CH-EM, (c) M-US, (d) M-ES, (e) E-EM și (f) A-EM. FR - fruct, FL - floare, F - frunză, T - tulpină și R - rădăcină

Fracția FR-EP-ES prezintă procentul de citotoxicitate cel mai mare (<10 %, la concentrația de 1000 µg/mL). Dintre toate extractele CH-EM de *N. alba*, fracția F-CH-EM s-a dovedit a fi cea

mai activă asupra celulelor tumorale ovariene sensibile A2780 (Figura 9.7b). Extractele M-US de *N. alba* prezintă cea mai mare citotoxicitate asupra celulelor tumorale ovariene sensibile A2780 (Figura 9.7c). Frația FR-M-US, este cea mai activă fracție (34 % la concentrația de 10  $\mu\text{g/mL}$ ). Active s-au dovedit și fracțiile F-M-US și R-M-US, la concentrațiile de 500 și 1000  $\mu\text{g/mL}$ , prezentând o viabilitate celulară de 7 și 4 %, respectiv 5 și 2 % [52]. Frațiile FR-M-ES, F-M-ES și R-M-ES de *N. alba* sunt cele mai active extracte M-ES, prezentând efecte considerabile asupra liniei celulare A2780 (Figura 9.7d). Cele mai citotoxice extracte E-EM de *N. alba*, care au inhibat dezvoltarea celulelor tumorale ovariene sensibile A2780 sunt fracțiile FR-E-EM, F-E-EM și R-E-EM (Figura 9.7e).

La 24 de ore de la tratamentul liniilor celulare A2780 cu fracții de *N. alba*, s-au obținut valori  $\text{IC}_{50}$  cuprinse între 1,70 – 840,23  $\mu\text{g/mL}$  (Tabel 9.3).

Tabel 9.3. Valorile  $\text{IC}_{50}$  ale extractelor de *N. alba* asupra celulelor tumorale ovariene sensibile A2780

Parte anatomică <sup>a</sup>	Extract de <i>N. alba</i> <sup>b</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	EP-ES	CH-EM	M-US
FR	28,96±1,76	787,15±72,80	1,70±0,29
FL	751,97±10,79	127,37±36,28	122,43±3,51
F	60,52±1,84	47,48±1,71	23,20±3,00
T	524,12±10,82	291,28±10,20	90,37±6,31
R	53,81±1,63	560,03±54,91	19,40±3,80
	M-ES	E-EM	A-EM
FR	4,87±0,99	52,32±2,44	357,59±47,36
FL	161,48±22,89	156,87±30,68	25,14±3,89
F	7,22±1,59	54,17±8,68	15,73±2,67
T	502,55±42,54	714,92±18,23	840,23±61,12
R	9,73±1,76	74,21±2,51	44,73±8,20

<sup>a</sup>FR – fruct, FL – floare, F – frunză, T – tulpină, R – rădăcină. <sup>b</sup>EP – extracte eterice, CH – extracte ciclohexanice, M – extracte metanolice, E – extracte etanolice, A – extracte apoase. US – obținute prin ultrasonare, ES – obținute cu extractorul Soxhlet, EM – obținute prin agitare mecanică. Datele au fost obținute din curbele doză-răspuns.

Fracțiile F2, F5, F50 și F51 au inhibat dezvoltarea celulelor tumorale ovariene sensibile A2780, atât la concentrația de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , cât și la concentrațiile de 100 și 500  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 9.5a). În ceea ce privește determinarea valorilor  $\text{IC}_{50}$ , după 24 de ore de la tratamentul liniilor celulare A2780 cu fracții F2, F5, F50 și F51, s-au obținut valori  $\text{IC}_{50}$  cuprinse între 43,10 – 91,95  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 9.8b).

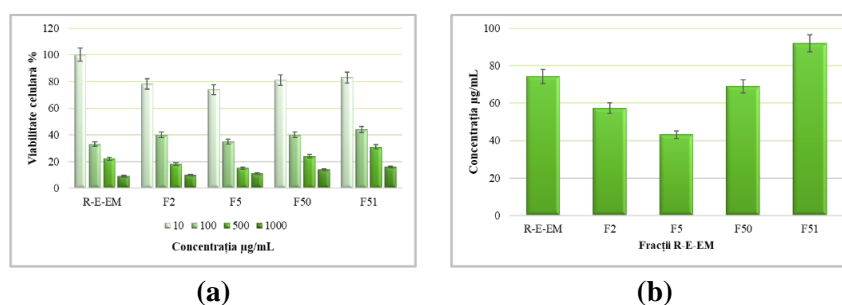


Figura 9.8. Citotoxicitatea fracțiilor F2, F5, F50 și F51 de *N. alba* asupra celulelor tumorale ovariene sensibile A2780

### 9.4.3.1 Potențialul de interacțiune al compușilor biologic activi studiați cu cisplatină asupra celulelor tumorale ovariene sensibile și rezistente la cisplatină

Pentru a evalua potențialul extractelor de *N. alba* prin intermediul terapiei combinate, s-au utilizat cele mai active și eficiente fracții asupra celulelor tumorale ovariene A2780, sensibile la cisplatină și care nu prezintă citotoxicitate ridicată asupra celulelor fibroblaste sănătoase V79. Astfel, liniile celulare tumorale ovariene sensibile la cisplatină A2780 și rezistente la cisplatină A2780cisR au fost tratate cu fracțiile F-M-US și R-M-US de *N. alba* și/sau cu Cis, timp de 24 de ore. S-a folosit un raport de 1/10, Cis/fracție [52].

La concentrația de 100  $\mu\text{g/mL}$ , fracția F-M-US prezintă o viabilitatea celulară de 15 %, iar în combinație cu Cis, în raportul 10/100 Cis/fracție, viabilitatea celulară scade la un procent de 2 % (Figura 9.10a). La fel ca și în cazul terapiei combinate asupra celulelor tumorale ovariene sensibile la cisplatină A2780, efectul sinergic al combinației Cis/fracție F-M-US asupra celulelor tumorale ovariene rezistente la cisplatină A2780cisR este prezent tot în raportul 10/100 Cis/fracție, de la un procent inițial al viabilității celulare de 35 %, procentul viabilității celulare scade la 7 % (Figura 9.11a). Fracția R-M-US în combinație cu Cis nu prezintă un potențial la fel de puternic ca și în cazul fracției F-M-US asupra liniilor celulare tumorale sensibile la cisplatină A2780 (Figura 9.10b) și rezistente la cisplatină A2780cisR (Figura 9.11b).

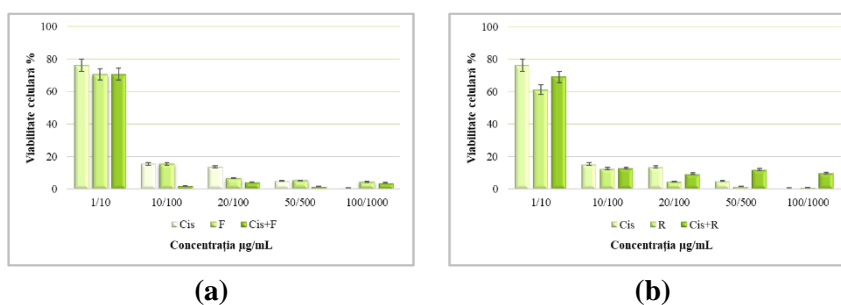


Figura 9.10. Citotoxicitatea fracțiilor (a) F-M-US (F) și (b) R-M-US (R) de *N. alba* combinate cu cisplatină (Cis) asupra celulelor tumorale ovariene sensibile la cisplatină A2780. Cis+F – cisplatină combinată cu fracția F-M-US, Cis+R – cisplatină combinată cu fracția R-M-US

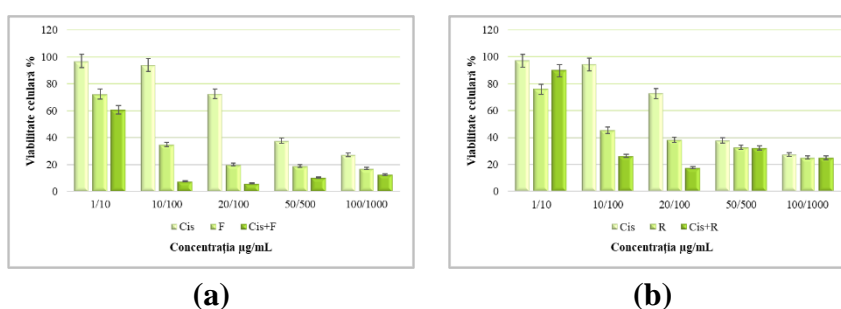


Figura 9.11. Citotoxicitatea fracțiilor (a) F-M-US (F) și (b) R-M-US (R) de *N. alba* combinate cu cisplatină (Cis) asupra celulelor tumorale ovariene rezistente la cisplatină A2780cisR. Cis+F – cisplatină combinată cu fracția F-M-US, Cis+R – cisplatină combinată cu fracția R-M-US

Rezultatele experimentale prezentate au demonstrat faptul că extractele de *N. alba* conțin compuși puternic antioxidanți (rutina, quercetina, naringenina, naringina, apigenina, luteolina), care permit diminuarea concentrației de Cis pentru a reduce supraviețuirea celulelor tumorale



ovariene A2780 și A2780ciR (Tabel 9.4). Interacțiunile sinergice dintre fracțiile F-M-US și R-M-US de *N. alba* și Cis au fost realizate prin metoda lui Chou [58]. Indicele de combinare (CI) și fracția afectată de doză (Fa) sunt prezentate în Tabelul 9.5. Rezultatele obținute pe baza combinației dintre Cis și fracțiile F-M-US și R-M-US de *N. alba* indică valori ale CI cuprinse între 0,05 și 0,5, sugerând un efect sinergic puternic [52].

Tabel 9.4. Valorile  $IC_{50}$  ale fracțiilor F-M-US și R-M-US de *N. alba* combinate cu cisplatină asupra celulelor tumorale ovariene sensibile la cisplatină A2780 și rezistente la cisplatină A2780ciR

Probă <sup>a</sup>	A2780 <sup>b</sup>	A2780ciR <sup>b</sup>
<b>F</b>	23,20±3,00	38,87±1,60
<b>R</b>	19,40±3,80	86,41±3,72
<b>Cis</b>	2,72±0,44	41,07±1,58
<b>Cis+F</b>	16,22±2,38	14,71±1,02
<b>Cis+R</b>	21,16±2,05	56,73±2,46

<sup>a</sup>F- F-M-US, R – R-M-US, Cis – cisplatină, Cis+F – cisplatină combinată cu fracția FR-M-US, Cis+R – cisplatină combinată cu fracția R-M-US. <sup>b</sup>A2780 - celule tumorale ovariene sensibile la cisplatină, A2780ciR - celule tumorale ovariene rezistente la cisplatină.

Tabel 9.5. Potențialul de interacțiune dintre fracțiile F-M-US și R-M-US de *N. alba* și Cis asupra liniilor celulare tumorale sensibile la cisplatină A2780 și rezistente la cisplatină A2780ciR

Concentrația de probă ( $\mu\text{g/mL}$ )		A2780 <sup>b</sup>		A2780ciR <sup>b</sup>	
<b>F</b> <sup>a</sup>	<b>Cis</b> <sup>a</sup>	<b>Fa</b> <sup>c</sup>	<b>CI</b> <sup>c</sup>	<b>Fa</b> <sup>c</sup>	<b>CI</b> <sup>c</sup>
10	1	0,70	2,07	0,60	0,57
100	10	0,02	0,35	0,07	0,05
200	20	0,04	1,22	0,06	0,08
500	50	0,01	1,03	0,10	0,44
1000	100	0,03	4,85	0,12	1,20
<b>R</b> <sup>a</sup>	<b>Cis</b> <sup>a</sup>	<b>Fa</b> <sup>c</sup>	<b>CI</b> <sup>c</sup>	<b>Fa</b> <sup>c</sup>	<b>CI</b> <sup>c</sup>
10	1	0,69	2,25	0,89	10,03
100	10	0,12	1,52	0,26	0,30
200	20	0,09	2,25	0,17	0,30
500	50	0,12	7,64	0,32	2,28
1000	100	0,10	12,59	0,25	2,81

<sup>a</sup>F- F-M-US, R – R-M-US, Cis – cisplatină, Cis+F – cisplatină combinată cu fracția F-M-US, Cis+R – cisplatină combinată cu fracția R-M-US. <sup>b</sup>A2780 - celule tumorale ovariene sensibile la cisplatină, A2780ciR - celule tumorale ovariene rezistente la cisplatină. <sup>c</sup>Fa - fracția afectată de doză, CI - indicele combinat.

Din totalul de 34 de extracte de *N. alba* evaluate, doar 11 dintre acestea au fost mai active și mai eficiente în inhibarea liniei celulare tumorale ovariene A2780. O pierdere semnificativă a viabilității celulare (<50 %) denotă faptul că extractele prezintă o selectivitate importantă asupra celulele tumorale. Cele 11 extracte de *N. alba* (extractele M-US, M-ES și E-EM de FR, F și R, respectiv extractele F-A-EM și R-A-EM) au fost studiate în continuare pe celule tumorale prostatice LNCaP, mamare MCF-7 și leucemice HL60.

## 9.5 Concluzii parțiale

Dintre cele patru linii celulare tumorale utilizate, A2780 și MCF-7 par a fi mai sensibile la tratamentul cu extractele de *N. alba*. S-a constatat că extractele de *N. alba* sunt de tip celular

selectiv și cel mai important este faptul că acestea prezintă o citotoxicitate redusă asupra celulelor sănătoase. În plus, s-a demonstrat faptul că fracția F-M-US de *N. alba* utilizată în terapia combinată cu Cis, în raport 10/100 Cis/fracție F-M-US, a inhibat cu un procent de 10 % mai mult dezvoltarea celulelor tumorale ovariene rezistente la cisplatină A2780cisR.

În paralel, s-au evaluat toxicitatea și citotoxicitatea extractelor de *N. alba* utilizând metoda de germinare a cariopselor de grâu, respectiv fibroblaste pulmonare sănătoase V79, pentru a demonstra lipsa toxicității a acestor compuși. În total au fost testate 34 de extracte de *N. alba*, 11 fracții s-au dovedit a fi foarte eficiente în inhibarea dezvoltării celulelor tumorale și de asemenea, nu prezintă efecte toxice și citotoxice. Cele mai eficiente extracte s-au dovedit a fi fracțiile F-M-US și R-M-US, având potențial antitumoral asupra celor patru linii celulare tumorale teste (A2780, MCF-7, LNCaP și HL60). De asemenea, FR-M-US, FR-M-ES și FR-E-EM de *N. alba* s-au dovedit a fi cele mai eficiente în inhibarea dezvoltării celulelor tumorale leucemice HL60.

Rezultate obținute în acest subcapitol au fost publicate parțial în „*Antifungal, Antitumoral and Antioxidant Potential of the Danube Delta Nymphaea alba Extracts*”, Cudalbeanu & all, Antibiotics 2020.

## Capitolul 10 Aplicații: Sono-biosinteza AuNPs utilizând extracte de *N. alba*

### 10.4 Rezultate și discuții

#### 10.4.1 Biosinteza „verde” a AuNPs utilizând extract de rădăcină de *N. alba*

În biosinteza AuNPR<sub>n</sub> s-au utilizat diferite concentrații de soluție de HAuCl<sub>4</sub> și extract de rădăcină de *N. alba*, timp de reacție diferit și pH diferit (Tabelul 10.1). Suspensiile purificate AuNPR<sub>n</sub> și redispersate în 2 mL apă ultrapură au fost stocate la întuneric, la temperatura camerei [59].

Tabel 10.1. Condiții de reacție utilizate în biosinteza AuNPR<sub>n</sub>

Probă	HAuCl <sub>4</sub> (mM)	R-E-EM* (mg/mL)	Volum reacție (mL)	pH reacție	Timp reacție (min)
AuNPR <sub>1</sub>	1,5	5,47	15,24	7,0	10
AuNPR <sub>2</sub>	1,5	7,39	20,30	6,4	10
AuNPR <sub>3</sub>	1,5	7,38	20,32	8,4	40
AuNPR <sub>4</sub>	2,0	8,16	18,38	7,8	40
AuNPR <sub>5</sub>	3,0	5,54	15,04	7,8	40

\*R-E-EM – fracție etanolică de rădăcină de *N. alba* obținută prin agitare mecanică.

#### 10.4.2 Caracterizarea AuNPs

Conținutul total de acizi fenolici, flavonoide și taninuri condensate din probele de AuNPR<sub>n</sub> a fost determinat utilizând metode microspectrofotometrice, în timp ce conținutul de Au a fost determinat prin tehnica PIXE. De asemenea, a fost determinat raportul de Au/fracție pentru probele AuNPR<sub>n</sub>. Așa cum a fost detaliat în partea experimentală, AuNPR<sub>n</sub> au fost caracterizate prin spectroscopie UV-Vis, măsurători DLS și de potențial zeta, spectroscopie ATR-FTIR, microscopie TEM și SEM și determinări XRD.

Screeningul fitochimic prin metode microspectrofotometrice a arătat prezența metaboliților secundari, prim urmare acizi fenolici, flavonoide și taninuri condensate (Tabelul 10.2). Rezultatele analizelor evidențiază faptul că în extractul R-E-EM de *N. alba*, conținutul total de acizi fenolici, flavonoide și taninuri condensate este mai mare decât cel al AuNPR<sub>n</sub> sintetizate, datorită capacității compușilor polifenolici de a forma un complex cu AuNPs [58].

Tabel 10.2. Conținutul total de acizi fenolici, flavonoide și taninuri condensate al probelor AuNPR<sub>n</sub>. Abrevieri: GA, acid galic; TA, acid tanic; Q, quercetină; R, rutin; C, catehină; Eq, echivalent

Probă	Acizi fenolici		Flavonoide		Taninuri condensate
	(mgEqGA/g)	(mgEqTA/g)	(mgEqQ/g)	(mgEqR/g)	(mgEqC/g)
R-E-EM*	572,16±4,91	606,35±5,26	22,35±0,96	14,38±0,97	1,70±0,13
AuNPR <sub>1</sub>	39,65±1,43	42,08±1,50	15,52±0,82	10,03±0,89	0,04±0,00
AuNPR <sub>2</sub>	0,43±0,05	0,46±0,03	-	-	-
AuNPR <sub>3</sub>	28,89±0,99	30,55±1,23	5,22±0,33	3,17±0,26	0,02±0,00
AuNPR <sub>4</sub>	33,00±1,17	34,95±2,01	-	-	-
AuNPR <sub>5</sub>	22,84±0,86	24,07±0,94	7,78±1,45	4,87±0,72	0,03±0,00

- Negativ/neidentificat. \*R-E-EM – extract etanolic de rădăcină de *N. alba* obținut prin extracție simplă cu agitare mecanică.

Spectrele UV-Vis ale AuNPR<sub>n</sub> au fost măsurate pentru a determina lungimea de undă a SPR și pentru a deduce forma și stabilitatea AuNPR<sub>n</sub>. Figura 10.1 prezintă spectrele UV-Vis ale AuNPR<sub>n</sub> sintetizate, iar pozițiile benzilor SPR în aceste spectre sunt prezentate în Tabelul 10.3. Lungimea de undă SPR a probelor AuNPR<sub>1-5</sub> sintetizate utilizând sonochimia, a fost în intervalul de  $\lambda$  de 587 - 628 nm. Deplasarea spre roșu (redshift) observată a benzii SPR în raport cu cea a NPs sferice a fost atribuită formei anizotrope inerente a NPs și/sau formării nanoagregatelor/aglomerărilor stabile, rezultate din interacțiunea dintre NPs sferice din cauza maturării Oswald [60, 61, 62].

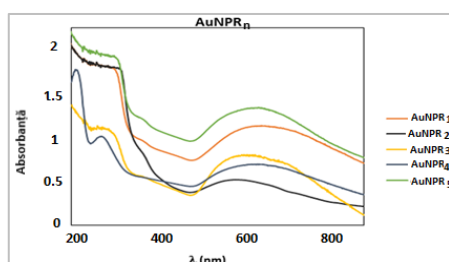


Figura 10.1. Spectrele UV-Vis ale probelor AuNPR<sub>n</sub> în apă ultrapură

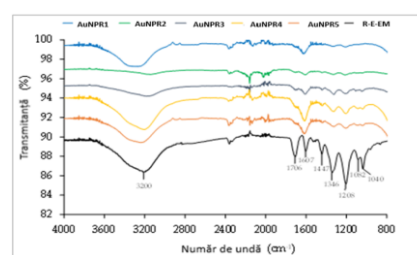


Figura 10.3 Spectrele ATR-FTIR ale probelor AuNPR<sub>n</sub> și a fracției R-E-EM

De asemenea, probele AuNPR<sub>3</sub> și AuNPR<sub>4</sub> au prezentat, două benzi de absorbție la  $\lambda < 350$  nm, corespunzătoare moleculelor polifenolice ale extractului R-E-EM [63], ceea ce sugerează că metaboliții secundari prezenți în fracția R-E-EM acționează ca un stabilizator eficient în aceste două probe, care au fost sintetizate cu o concentrație mai mare de fracție R-E-EM. Așadar, deplasarea spre roșu la maximele de absorbție/absorbția maximă a benzilor SPR, reflectă tendința AuNPR<sub>n</sub> de a forma NPs mai mari și/sau aglomerări de NPs în soluție, deoarece formarea de agregate ar duce la modificări evidente ale spectrelor UV-Vis [64, 65].

Tabel 10.3. Conținutul de aur, raportul de Au/extract, benzile SPR, dimensiunea hidrodinamică și potențialul zeta al probelor de AuNPR<sub>n</sub>

Probă	[Au]* mg/ml	Raport Au/extract	SPR $\lambda_{\max}$ (nm)	Dimensiune hidrodinamică (nm) (PDI)	Potențialul zeta ( $\zeta$ ) (mV)
AuNPR <sub>1</sub>	3,05±0,15	0,56	625	280,2 (0,23)	-52±7
AuNPR <sub>2</sub>	3,23±0,65	0,44	587	150,0 (0,20)	-46±7
AuNPR <sub>3</sub>	2,81±0,14	0,38	618	60,7 (0,22)	-62±11
AuNPR <sub>4</sub>	1,94±0,10	0,24	601	32,3 (0,35)	-56±9
AuNPR <sub>5</sub>	4,04±0,20	0,73	628	209,8 (0,28)	-60±9

\*Conținutul de Au a fost determinat prin tehnica PIXE.

După cum se poate observa în Tabelul 10.3, dimensiunea hidrodinamică depinde în cea mai mare măsură de raportul dintre Au/extract R-E-EM, raportul cu concentrațiile mai mari prezintă valori mai mari ale dimensiunilor hidrodinamice ale AuNPs. Valorile de potențial zeta ( $\zeta$ ) ale probelor de AuNPR<sub>n</sub> sintetizate au fost negative, cuprinzând intervalul  $-62\pm 11$  mV;  $-46\pm 7$  mV, confirmând stabilitatea NPs [66]. În comparație cu alte AuNPs obținute în urma utilizării extractelor de plante, AuNPR<sub>n</sub> prezintă valori  $\zeta$  mai mici [67].

Fracția R-E-EM solubilizată în apă a prezentat regiuni de absorbție IR caracteristice compușilor polifenolici. Aproape toate benzile au fost observate pentru toate probele AuNPR<sub>n</sub> în aceeași gamă de numere de undă [68]. Cu toate acestea, s-a putut observa că banda de la  $1706\text{ cm}^{-1}$  a suferit o scădere semnificativă a intensității sale. Din datele ATR-FTIR, se poate deduce că grupările acide ale compușilor polifenolici rămân atașate chimic la suprafața AuNPR<sub>n</sub> printr-o funcțiune acidă, care se poate datora grupărilor OH prezente în compușii polifenolici, compuși implicați în reducerea ionilor Au<sup>3+</sup> la Au<sup>0</sup> [69]. De asemenea, analiza spectrelor FTIR a confirmat concentrația scăzută de acizi fenolici și flavonoide din proba AuNPR<sub>2</sub> (Figura 10.3).

A fost efectuată o analiză PXRD pentru a evalua natura cristalinității probelor AuNPR<sub>n</sub> (Figura 10.4). Analiza structurală a probei AuNPR<sub>4</sub> (Figura 10.5) a evidențiat prezența a cinci vârfuri/picuri de difracție care au fost indexate la planurile de rețea/structură (111), (200), (220), (311) și (222) specifice structurii cubice centrate pe față (FCC) a aurului metalic, în acord cu baza de date Crystallography Open Database (COD 9008463). Absența altor faze cristaline confirmă natura cristalină pură a probelor AuNPR<sub>n</sub> [58].

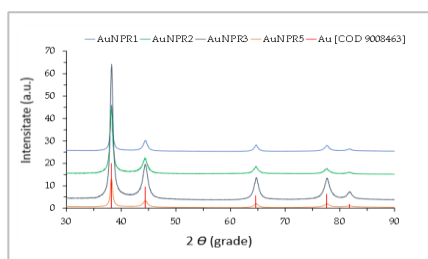


Figura 10.4. Analiza XRD a probelor AuNPR<sub>n</sub>

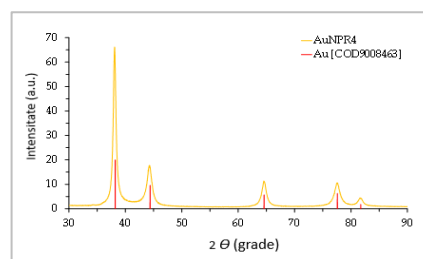


Figura 10.5. Analiza XRD a probei AuNPR<sub>4</sub>

Deși în biosinteza de NPs s-au utilizat diferite condiții experimentale, nu s-au observat diferențe semnificative în difractogramele XRD ale probelor AuNPR<sub>n</sub>. Singurele modificări observate au fost mici deplasări ale pozițiilor picurilor de difracție, reflectând diferențe constatate

în dimensiunile nucleului de Au. Probele AuNPR<sub>n</sub> au prezentat o dimensiune medie a nucleului de Au, mai mică de 20 nm (AuNPR<sub>4</sub> < AuNPR<sub>3</sub> ≈ AuNPR<sub>2</sub> < AuNPR<sub>5</sub> ≈ AuNPR<sub>1</sub>).

S-au efectuat analize SEM și TEM pentru a caracteriza din punct de vedere morfologic probele de AuNPR<sub>n</sub> biosintetizate, din punct de vedere al distribuției dimensiunilor și formelor. Figura 10.6 prezintă imagini reprezentative SEM și TEM ale AuNPR<sub>n</sub>. Imaginile SEM (Figura 10.6a,c,e) și TEM (Figura 10.6b,d,f) arată faptul că AuNPR<sub>n</sub> biosintetizate prezintă forme diferite, coexistând în forme cvasi-sferice, triunghiulare și stelare, printre alte forme neregulate, precum și o distribuție mare de dimensiuni, care confirmă datele spectrelor UV-Vis și măsurătorile DLS [58].

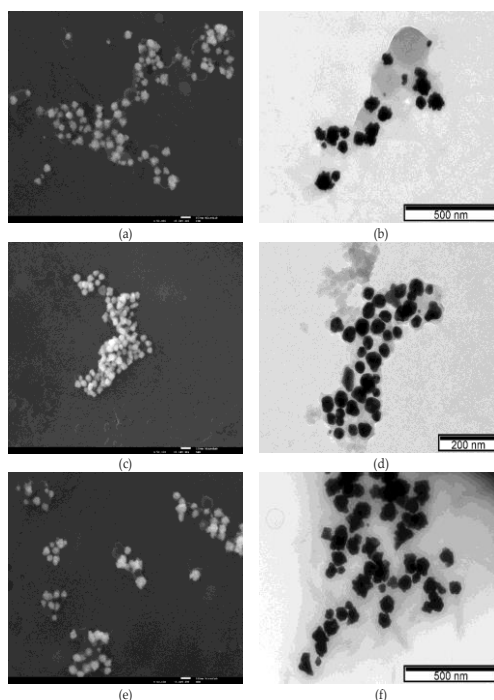


Figura 10.6. Imagini SEM și TEM a AuNPR<sub>1</sub> (a, b), AuNPR<sub>4</sub> (c, d) și AuNPR<sub>5</sub> (e, f). Imaginile SEM sunt obținute la puterea de mărire 50,000×

Coexistența în soluția coloidală a NPs de o mare diversitate de morfologii, în care acestea sunt înconjurate de o matrice bioorganică, este o caracteristică comună și este atribuită unei funcții de protecție și stabilizare, care împiedică agregare a NPs [70, 71]. Dimensiunea medie a NPs, obținută prin analiza TEM, a fost mai mare decât cea obținută în urma analizelor de difracție. Astfel, cu cât este mai mare distribuția dimensiunilor și formelor NPs în soluția coloidală, cu atât este mai mare discrepanța valorilor obținute de aceste două tehnici [72, 73]. Având în vedere determinările dimensiunilor AuNPR<sub>n</sub> biosintetizate utilizând extract R-E-EM de *N. alba*, în diferite condiții de reacție, se poate stabili o ordine în funcție de tehnica folosită: DLS > TEM > XRD, în acord cu rezultatele pentru NPs sintetizate utilizând extracte de plante [74, 75].

### 10.4.3 Proprietățile biologice ale AuNPs

#### 10.4.3.1 Activitatea antioxidantă a AuNPs

Un test privind inhibarea radicalului liber DPPH a fost utilizat în scopul de a evalua activitatea antioxidantă a probelor AuNPR<sub>n</sub>. După cum se poate observa în Tabelul 10.6, probele

AuNPR<sub>n</sub> au demonstrat o activitate antioxidantă mai mare decât proba R-E-EM, cu excepția probei AuNPR<sub>2</sub>, rezultat care demonstrează încă o dată conținutul scăzut de fracție R-E-EM în învelișul AuNPR<sub>2</sub> [58].

Tabel 10.6. Activitatea antioxidantă a probelor AuNPR<sub>n</sub> determinată prin metoda DPPH

Probă	Procent de inhibare	Echivalenți activitate antioxidantă		
		mgEqT/g	mgEqAA/g	mgEqQ/g
R-E-EM*	72,20±0,33	15,59±2,95	13,47±3,27	29,82±0,97
AuNPR <sub>1</sub>	95,77±1,25	10,83±1,76	9,24±0,87	20,51±1,69
AuNPR <sub>2</sub>	56,47±2,03	5,76±0,46	5,06±0,38	11,16±1,03
AuNPR <sub>3</sub>	92,38±2,54	10,39±1,07	8,88±0,94	19,70±1,47
AuNPR <sub>4</sub>	94,29±3,14	10,64±0,67	9,08±0,57	20,16±2,01
AuNPR <sub>5</sub>	90,05±0,99	10,09±0,87	8,63±0,89	19,15±1,40

\*R-E-EM – extract etanolic de rădăcină de *N. alba* obținut prin extracție simplă cu agitare mecanică. Rezultatele au fost exprimate ca valoare medie ± deviația standard. mgEqQ/g – miligrame echivalenți quercetină per gram de probă; mgEqAA/g - miligrame echivalenți acid ascorbic per gram de probă; mgEqT/g - miligrame echivalenți trolox per gram de probă.

#### 10.4.3.2 Activitatea antibacteriană a AuNPs

Proprietățile antimicrobiene ale probelor AuNPR<sub>n</sub> și comparativ, ale sării de aur HAuCl<sub>4</sub> au fost evaluate asupra bacteriilor: Gram-pozitivă *S. aureus* Newman și Gram-negativă *E. coli* ATCC25922, prin determinarea valorilor CMI, utilizând metoda microdiluției (Tabel 10.7).

Tabel 10.7. Valorile CMI estimate ale probelor AuNPR<sub>n</sub> și HAuCl<sub>4</sub> asupra bacteriilor *S. aureus* Newman și *E. coli* ATCC25922

Bacteria	CMI (μgAu/mL)					
	AuNPR <sub>1</sub>	AuNPR <sub>2</sub>	AuNPR <sub>3</sub>	AuNPR <sub>4</sub>	AuNPR <sub>5</sub>	HAuCl <sub>4</sub>
<i>S. aureus</i> Newman	200	>200	200	100	>200	50
<i>E. coli</i> ATCC25922	>200	>200	200	200	>200	6,25

Rezultatele reprezintă media a trei experimente independente efectuate cu câte două replicări.

Sarea de Au (III) HAuCl<sub>4</sub> a prezentat o activitate antimicrobiană puternică asupra bacteriilor *S. aureus* Newman și *E. coli* ATCC25922, cu valori CMI de 50 μgAu/mL, respectiv 6,25 μgAu/mL. Proba AuNPR<sub>4</sub> a avut cea mai mare activitate antimicrobiană împotriva bacteriei Gram-pozitivă *S. aureus* Newman, cu o valoare CMI de 100 μgAu/mL. De asemenea, proba AuNPR<sub>4</sub> a prezentat activitate antimicrobiană moderată împotriva bacteriei *E. coli* ATCC25922, cu o valoare CMI de 200 μgAu/mL. Aceste rezultate sunt comparabile cu alte rezultate raportate în literatura de specialitate, demonstrând o dependență inversată între activitatea antibacteriană și dimensiunea NPs [58].

#### 10.4.3.3 Activitatea antitumorală a AuNPs

Efectul citotoxic al AuNPR<sub>n</sub> biosintetizate asupra unei linii celulare tumorale (A2780) a fost evaluat pentru a obține informații cu privire la valoarea prospectivă a acestor NPs ca agenți chimioterapeutici. Citotoxicitatea AuNPs sintetizate utilizând extracte de plante depinde de proprietățile fizico-chimice ale particulei (dimensiune, formă, sarcina de suprafață și constituenții fitochimici). Toate aceste proprietăți fizico-chimice joacă roluri cheie în absorbția celulelor și în ceea ce privește gradul de citotoxicitate.

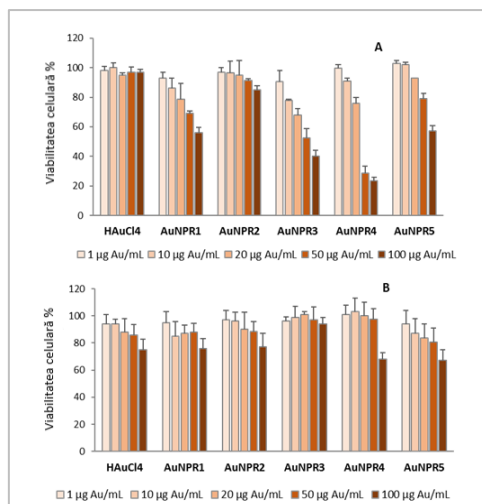


Figura 10.7. Viabilitatea celulară a celulelor tumorale A2780 (A) și fibroblastelor sănătoase V79 (B) după tratamentul cu concentrații seriale de AuNPR<sub>n</sub> timp de 48 de ore. Rezultatele reprezintă media ± deviația standard a două experimente independente efectuate în câte șase replicări pe experiment

Rezultatele obținute asupra celulelor tumorale A2780, tratate timp de 48 de ore cu diluții seriale de AuNPR<sub>n</sub> (1 µgAu/mL până la 100 µgAu/mL) și HAuCl<sub>4</sub>, sunt prezentate în Figura 10.7. Rezultatele au prezentat o scădere dependentă de concentrație a viabilității celulare cu creșterea a concentrației probelor de AuNPR<sub>n</sub>. Valorile IC<sub>50</sub>, calculate pe baza curbelor doză-răspuns (Figura 10.7A și 7B), au fost 108,7±15,0 µgAu/mL, >100 µgAu/mL, 51,9±7,7 µgAu/mL, 33,5±6,3 µgAu/mL și 136,1 ± 15,0 µgAu/mL pentru nanoparticulele AuNPR<sub>1</sub>, AuNPR<sub>2</sub>, AuNPR<sub>3</sub>, AuNPR<sub>4</sub>, respectiv AuNPR<sub>5</sub>. De asemenea, precursorul sării de aur HAuCl<sub>4</sub> a fost testat, dar s-a dovedit a fi fără efect citotoxic. Probele AuNPR<sub>3</sub> și AuNPR<sub>4</sub> au prezentat cele mai mici valori IC<sub>50</sub> ceea ce demonstrează faptul că sunt cele mai active din punct de vedere antitumoral dintre toate probele AuNPR<sub>n</sub> testate. Aceste NPs au reușit să inhibe cu 50% viabilitatea celulelor tumorale A2780 la concentrația de 33,5 ± 6,3 µgAu/mL, respectiv 51,9±7,7 µgAu/mL. Nanoparticulele AuNPR<sub>3</sub> și AuNPR<sub>4</sub> au o dimensiune hidrodinamică și o dimensiune a nucleului de Au mai mică în raport cu celelalte NPs, ceea ce ar putea justifica activitatea lor antitumorală puternică. Selectivitatea citotoxică a AuNPR<sub>n</sub> împotriva celulelor tumorale față de celulele sănătoase a fost evaluată asupra fibroblastelor sănătoase V79. După cum este reprezentat în Figura 7B, s-a observat un efect dependent de doză chiar și pentru proba de HAuCl<sub>4</sub> [58].

## 10.5 Concluzii parțiale

Condițiile experimentale, cum ar fi pH-ul de reacție, raportul Au/extract și timpul de reacție sunt parametri importanți pentru a controla biosinteza, deoarece ajustează dimensiunea și sarcina AuNPs. Dimensiunea hidrodinamică a AuNPR<sub>n</sub> crește odată cu raportul Au/extract R-E-EM: un raport mai mare corespunde unei dimensiuni hidrodinamice mai mari, pe de altă parte dimensiunea nucleului de Au (dimensiunea medie de cristalit), caracterizată prin tehnica PXRD, nu a prezentat diferențe semnificative și a prezentat o dimensiune de cristalit inferioară la 20 nm.

Toate probele de AuNPR<sub>n</sub> au avut o valoare a potențialului zeta ridicată, negativă, de la -62±11 mV la -46±7 mV. AuNPR<sub>n</sub> au prezentat o anumită eterogenitate a formei și o distribuție moderată și monodispersă, după cum arată analizele TEM și SEM. Spectrele ATR-FTIR au indicat

faptul că AuNPR<sub>n</sub> interacționează în principal cu grupările hidroxil prezente în compușii polifenolici din extractul R-E-EM, care participă la reducerea Au<sup>3+</sup> la Au<sup>0</sup> și stabilizarea NPs. De asemenea, analiza ATR-FTIR a confirmat o concentrație scăzută de acizi fenolici și flavonoide în proba AuNPR<sub>2</sub>. Imaginile SEM au arătat că NPs prezintă un înveliș format din material organic (extract R-E-EM), care exercită o funcție de protecție și stabilizare, împiedicând agregarea acestora. În afară de AuNPR<sub>2</sub>, toate AuNPR<sub>n</sub> au prezentat o capacitate antioxidantă ridicată, superioară celei obținute pentru extractul R-E-EM, utilizată în biosinteză. AuNPR<sub>n</sub> stabilizate au prezentat activitate antibacteriană și antitumorală dependentă de dimensiune, ambele crescând odată cu scăderea dimensiunii particulelor. De fapt, cele mai mari AuNPs (AuNPR<sub>2</sub> și AuNPR<sub>5</sub>) au fost cele mai puțin biologic active. Pe lângă dimensiune, această activitate biologică redusă reflectă cu siguranță și conținutul scăzut de compuși polifenolici.

Rezultatele acestui capitol au fost publicate în „*Sono-Biosynthesis and Characterization of AuNPs from Danube Delta Nymphaea alba Root Extracts and Their Biological Properties*”, Cudalbeanu & all, *Nanomaterials* 2021.

## ***Concluzii și direcții viitoare de cercetare***

### ***Concluzii generale***

Teza de doctorat „Caracterizarea chimică și studiul activității biologice a unor compuși prezenți în specia *Nymphaea alba* din Rezervația Biosferei Delta Dunării” a urmărit separarea și identificarea compușilor biologic activi prezenți în diferite părți anatomice (fruct, floare, frunză, tulpină și rădăcină) din specia de nufăr *N.alba*, aplicând tehnici moderne de analiză (cromatografice cuplate cu spectrometrie de masă, microspectrofotometria și spectrometria), dar și evaluarea *in vitro* a potențialelor proprietăți bioactive, cum ar fi antioxidante, antibacteriene, antifungice și antitumorale, dar și de reducere și stabilizare aplicate în biosintetiza AuNPs.

Compușii biologic activi identificați în specia *Nymphaea alba* aparțin mai multor clase de compuși organici, precum acizi fenoli, flavonoide, proantocianidine, antocianidine, taninuri, lignani, terpenoide, steroli, esteri, hidrocarburi alifatiche superioare, rezultatele cercetărilor din această teză confirmând dovezile științifice care subliniază faptul că diferite părți componente ale plantelor au compoziție chimică diferită.

Interesul pentru acest subiect de cercetare se datorează faptului că în literatura de specialitate specia *N. alba* este prezentată ca fiind o sursă importantă de compuși naturali biologic activi, cu variate proprietăți farmacologice. Încurajându-ne astfel în cercetarea aprofundată unei specii autohtone de *N. alba* prezentă în Rezervația Biosferei Delta Dunării. Această cercetare contribuie la valorificarea speciilor acvatice din punctul de vedere al dezvoltării unor noi metode de separare, identificare și analiză a compușilor chimici interesanți pentru industria farmaceutică sau alimentară.

### ***Concluzii personale***

Cercetările acestei teze s-au îndreptat spre un studiu complex al compușilor biologic activi prezenți în diferite părți anatomice ale speciei *N. alba*. Astfel, contribuțiile științifice personale, originale și sinteza rezultatelor experimentale sunt prezentate în cele ce urmează:



- ❁ Specia *N. alba* a fost prelevată din Lacul Rotund, Complexul acvatic Somova-Parcheș, Rezervația Biosferei Delta Dunării, habitat care prezintă condiții de mediu speciale pentru dezvoltarea speciilor acvatice submerse.
- ❁ Extracția cu solvenți a compușilor organici naturali din diferite părți anatomice ale speciei *N. alba*, precum fruct, floare, frunză, tulpină și rădăcină, s-a realizat pentru prima dată, prin trei metode de extracție: extracție simplă asistată de ultrasunete (US), extracție multiplă cu extractorul Soxhlet (ES) și extracție simplă cu agitare mecanică (EM). În total s-au obținut 30 de fracții, iar cantitatea cea mai mare de compuși naturali a fost extrasă cu solventul organic metanol comparativ cu solventul organic etanol.
- ❁ Separarea și izolarea compușilor biologic activi din specia *N. alba* s-a realizat, pentru prima dată, pentru extractul de rădăcină R-E-EM de *N. alba*, separare care a avut loc în șapte etape. În total s-au obținut 16 fracții, iar patru fracții reprezentative dintre cele 16 fracții au fost luate în lucru în analizele ulterioare pentru a dovedi proprietățile biologice a metaboliților secundari prezenți în specia *N. alba*.
- ❁ Analiza GC-MS a fracțiilor lipofile de *N. alba* (EP-ES și CH-EM) a condus la identificarea a 71 de compuși organici volatili, care au fost în principal hidrocarburi cu catenă lungă, și derivați oxigenați, acizi grași și esteri ai acizilor grași, terpenoide și steroide.
- ❁ În studiul experimental HPLC (HPLC-DAD și LC-MS/MS) al fracțiilor hidrofile de *N. alba* (M-US, M-ES și E-EM) s-au identificat și raportat pentru prima dată un număr de 27 de compuși polifenolici (HHDP, acid chinic, corilagina, acid vanilic, castalina, acid galic, geranina, acid cafeic, acid p-coumaric, acid tanic, rutina, acid elagic, ramnozida acidului elagic, pentozida acidului elagic, derivat al acidului cinamic, naringenina, naringina, acid ferulic, catehina, epicatehina, acid clorogenic, quercetina, apigenina, luteolina, brevifolina, kaempferol și orientina), compuși cunoscuți și pentru proprietățile lor biologice active.
- ❁ Analiza principalelor clase de compuși, metaboliți primari și secundari prezenți în fracțiile de *N. alba*, a evidențiat prezența unor cantități însemnate de clorofile, carotenoide, acizi fenolici, flavonoide și taninuri condensate. Rezultatele obținute sunt în concordanță cu datele din literatura de specialitate și cu cele obținute prin tehnicile HPLC-DAD și LC-MS/MS și confirmă prezența în diferite fracții de *N. alba* a unui conținut ridicat de acizi fenolici, flavonoide și taninuri condensate.
- ❁ Rezultatele studiului experimental cu privire la conținutul total de macro și microelemente confirmă bioacumularea elementelor din sediment și apă de către planta acvatică *N. alba*. Prin urmare, în procesele de creștere și dezvoltare, specia *N. alba* asimilează cantități substanțiale de elemente esențiale, dar și cantități reduse de elemente neesențiale. Cantități mari de macroelementele, cum ar fi K, Mg, P și Na s-au identificat în probele de floare, frunză, tulpină și rădăcină de *N. alba*. Microelemente, precum B, Ba, Co, Cr, Cu, Li, Ni, Pb și Zn s-au identificat pentru prima dată, în probele de floare, frunză, tulpină și rădăcină de *N. alba*.
- ❁ Prezența unui număr relativ mare de compuși în fracțiile analizate, compuși cu proprietăți biologice active importante, justifică utilizarea, cunoscută, a speciei *N. alba* în medicina tradițională pentru tratarea și prevenirea diferitelor afecțiuni. În preocupările actuale privind nevoia de a descoperi noi agenți terapeutici fără ca aceștia să prezinte efecte toxice negative, în acest studiu s-a evaluat, pentru prima dată, potențialul antioxidant al fracțiilor M-US, M-ES și E-EM de *N. alba*, folosind metodele DPPH, ABTS, BCB, FRAP și CV.

Rezultatele obținute evidențiază proprietățile biologice ale speciilor autohtone de *N. alba* din Rezervația Biosferei Delta Dunării și sunt comparabile cu datele din literatura de specialitate, care prezintă extracte de plante cu potențial biologic activ conținând același tip de compuși. Frajeciile M-US, M-ES și E-EM de *N. alba* prezintă o activitate antioxidantă puternică la concentrații  $\pm 500 \mu\text{g/mL}$ , iar prezența quercetinei în fracjeciile de *N. alba* a fost încă o dată confirmată și prin tehnica CV.

- ✿ Frajeciile de *N. alba* prezintă activitate antimicrobiană împotriva tulpinilor bacteriene Gram-negative *E. hormaechei* ATCC 700322, *P. aeruginosa* ATCC 27853 și *E. coli* ATCC 25922 și asupra tulpinilor bacteriene Gram-pozitive *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* NCTC8178 și *S. pyogenes* ATCC 19615.
- ✿ Frajeciile de frunză F-M-US și rădăcină R-M-US de *N. alba* sunt active împotriva tulpinii *C. glabrata* CBS138, cu valori CMI de 1,717  $\mu\text{g/mL}$ , respectiv 1,935  $\mu\text{g/mL}$  și pentru FLC de 0,7639  $\mu\text{g/mL}$ . Rezultatele obținute au arătat faptul că acțiunea antifungică a fracjeciilor de *N. alba*, la concentrații mici, a fost specifică asupra tulpinii *C. glabrata* CBS138, având acțiune antifungică, la concentrații mult mai mari, asupra celorlalte tulpini de *Candida* testate (*C. albicans* CB138, *C. parapsilosis* ATCC22019 și *C. tropicalis* ATCC750).
- ✿ În căutarea de noi compuși chimioterapeutici naturali s-a evaluat, pentru prima dată, citotoxicitatea fracjeciilor de *N. alba* asupra liniilor celulare tumorale ovariane A2780/A2780cisR, mamare MCF-7 și prostatice LNCaP, folosind testul MTT, dar și celulele tumorale leucemice HL60, folosind testul WST-8. Dintre cele patru linii celulare tumorale utilizate, A2780 și MCF-7 par a fi mai sensibile la tratamentul cu fracjeciile de *N. alba*. S-a constatat faptul că fracjeciile de *N. alba* sunt de tip celular selectiv și cel mai important este faptul că acestea prezintă o citotoxicitate redusă asupra celulelor sănătoase. Efectul indus de compușii biologic activi prezenți în fracjeciile de *N. alba* demonstrează potențialul acestora de a fi studiați preclinic ca agenți antitumorali.
- ✿ Frajecia de frunză F-M-US de *N. alba* utilizată în terapia combinată cu Cis, în raport 10/100 Cis/fracjecie F-M-US, a inhibat cu un procent de 10 % mai mult dezvoltarea celulelor tumorale ovariene rezistente la cisplatină A2780cisR. În paralel, s-au evaluat toxicitatea și citotoxicitatea fracjeciilor de *N. alba* utilizând metoda de germinare a cariopselor de grâu, respectiv celule fibroblaste pulmonare sănătoase V79.
- ✿ În total au fost testate 34 de fracjecii de *N. alba*. Activitatea biologică a acestor fracjecii este variabilă datorită compoziției chimice diferite, care depinde de metoda de extracție, dar și de tipul de solvent folosit. Dintre toate fracjeciile testate, 11 fracjecii s-au dovedit a fi foarte eficiente în inhibarea dezvoltării celulelor tumorale și de asemenea, nu prezintă efecte toxice și citotoxice asupra țesuturilor sănătoase. Rezultatele obținute la evaluarea citotoxicității *in vitro* a fracjeciilor de *N. alba* se corelează și cu capacitatea antioxidantă a compușilor.
- ✿ Cele mai eficiente fracjecii s-au dovedit a fi fracjeciile de frunză F-M-US și rădăcină R-M-US, având potențial antitumoral asupra celor patru linii celulare tumorale teste (A2780, MCF-7, LNCaP și HL60). Frajeciile FR-M-US, FR-M-ES și FR-E-EM de *N. alba* s-au dovedit a fi cele mai eficiente în inhibarea dezvoltării celulelor tumorale leucemice HL60. În concluzie, s-a demonstrat pentru prima dată potențialul antitumoral al compușilor prezenți în diferite fracjecii de *N. alba*, specie prelevată din Rezervația Biosferei Delta Dunării.

- ✿ Pentru prima dată s-a dovedit faptul că fracția de rădăcină R-E-EM de *N. alba* permite stabilizarea nanoparticulelor de aur, AuNPs, obținute printr-o singură reacție, la temperatura camerei, folosind sonochimia ca metodă simplă, ieftină, eficientă și ecologică. Analiza experimentală s-a axat pe biosinteza AuNPs în prezența de fracției R-E-EM de *N. alba*, cu activitate biologică dublă, antimicrobiană și antitumorală. Această performanță cu multiple perspective, selectivitate moderată și citotoxicitate redusă, poate poziționa probele AuNPR<sub>n</sub> ca agenți terapeutici eficienți, cu avantajul suplimentar al unui impact redus asupra mediului.

### ***Direcții viitoare de cercetare***

Pe baza rezultatelor experimentale obținute pe parcursul anilor de studii doctorale, perspectivele viitoare de cercetare se vor axa pe următoarele activități:

- ✿ Consolidarea investigațiilor asupra compușilor polifenolici prezenți în diferite părți anatomice de *N. alba*, care au prezentat activitate antioxidantă, antibacteriană, antifungică și antitumorală semnificativă, prin înțelegerea aprofundată a mecanismului lor de acțiune, atât prin analize *in vitro*, cât și prin analize *in vivo*.
- ✿ Evaluarea *in vitro* și *in vivo* a potențialului activ al compușilor polifenolici prezenți în diferite părți anatomice de *N. alba* cu accent pe proprietăți antidiabetice, antivirale și anti-inflamatorii.
- ✿ Purificarea avansată a compușilor biologic activi naturali, prezenți în diferite părți anatomice de *N. alba*, în special a celor cu activitate biologică interesantă.
- ✿ Frațiile de *N. alba* s-au dovedit a fi active împotriva tulpinii *C. glabrata* CBS138, cu valori CMI de 1,717 μg/mL, respectiv 1,935 μg/mL astfel că extinderea cercetării pentru includerea acestora în forme farmaceutice (creme, geluri, etc.) pentru uz extern și testarea acestora împotriva infecțiilor fungice va constitui o altă direcție de cercetare.
- ✿ Mecanismele moleculare care stau la baza acțiunii antitumorale a compușilor fitochimici prezenți în specia *N. alba*, în special asupra celulelor tumorale ovariene, prostatice, mamare și leucemice, nu sunt încă foarte clare, iar rezultatele obținute stimulează continuarea cercetărilor mai aprofundat, atât prin analize *in vitro*, cât și prin analize *in vivo* pentru o înțelegere a mecanismelor de acțiune.
- ✿ În cercetări viitoare, probele de AuNPR<sub>n</sub>, în special AuNPR<sub>3</sub> și AuNPR<sub>4</sub>, ar putea fi exploatate ca potențiali candidați pentru aplicații în industria farmaceutică, datorită proprietăților lor biologice, cum ar fi activitatea lor antitumorală împotriva celulelor tumorale ovariene sensibile la cisplatină A2780, beneficiind în același timp și de potențialul lor antibacterian.
- ✿ Probele AuNPR<sub>3</sub> și AuNPR<sub>4</sub> utilizate în terapia combinată cu medicamente antitumorale sau medicamente pe bază de plante ar putea îmbunătăți profilul biologic al acestora, *in vitro* și *in vivo*, prevenind astfel dezvoltarea rezistenței la medicamente, reducând toxicitatea sistemică a medicamentelor și totodată pot contribui la îmbunătățirea rezultatelor terapeutice.
- ✿ Biosinteza nanoparticulelor de Au, Ag, Cu, Pt și Sn și obținerea unor biofilme subțiri, cu proprietăți antibacteriene și antifungice cu posibilă aplicare în domeniul farmaceutic și/ sau biomedical.

## Referințe bibliografice

1. Popescu A., Sanda V., Oroian S. Vegetația Deltei Dunării. Studia Scientiarum Naturalae, Târgu-Mureș, 1997, vol. XXV. pag. 119-242.
2. Driga B.V. Delta Dunării. Sistemul circulației apei. Casa Cărții de Știință. Cluj-Napoca. 2004, 256.
3. Bhowmik, S.; Datta, B.K.; Saha, A.K. Ethno-medicinal and phytochemical screening of some hydrophytes and marsh plants of Tripura, India. World Applied Sciences Journal. 2013, 22 (10), 1453-1459. doi:10.5829/idosi.wasj.2013.22.10.374.
4. Saxena, M.K.; Singh, N.; Kumar, S.; Dobhal, M.P.; Datta, S. Review potent pharmaceutical products from aquatic plants-review. Asian J. Pharm Clin. Res. 2021. 14, 1, 48-63. doi:10.22159/ajpcr.2021v14i1.39992.
5. Raja, M.K.M.M.; Sethiya, N.K.; Mishra, S. H. A comprehensive review on *Nymphaea stellata*: A traditionally used bitter. Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research. 2010, 1, 3, 311 - 319 . doi:10.4103/0110-5558.72424.
6. Yin, D.D.; Yuan, R.Y.; Wu, Q.; Li, S.S.; Shao, S.; Xu, Y.J.; Hao, X.H.; Wang, L.S. Assessment of flavonoids and volatile compounds in tea infusions of water lily flowers and their antioxidant activities. Food Chemistry. 2015, 187, 20 - 28. doi:10.1016/j.foodchem.2015.04.032.
7. Bakr, R.O. Wasfi, R.; Swilam, N.; Sallam, I.E. Characterization of the bioactive constituents of *Nymphaea alba* rhizomes and evaluation of anti-biofilm as well as antioxidant and cytotoxic properties. Journal of Medicinal Plants Research. 2016, 10, 26, 390 - 401. doi:10.5897/JMPR2016.6162.
8. Raju, N.J.; Sai, P.; Santhi, V.; Lavanya, L.; Vani, B.S. *In Vitro* Anthelmintic Activity of Leaves Extracts of *Nymphaea Alba*. Indo American Journal of Pharmaceutical Research. 2016, 6, 3, 1 - 4.
9. Garba, M.H.; Kabiru, A.Y.; Yusuf, A.M.; Muhammad, A.H.; Lekene, B.J.; Kabir, M.; Joseph, A. *In vivo* trypanocidal activity of *Nymphaea lotus* Linn. methanol extract against Trypanosoma brucei Brucei. Asian Pacific Journal Trop Dis. 2015; 5, 10, 808 - 812. doi:10.1016/S2222-1808(15)60935-5.
10. Njoku, P.K.; Echeme, J.O.; Uchegbu, R.I.; Ogoko, E.C. Isolation and Characterization of Zygadenine-N-ribofuranoside from the Leaves of *Nymphaea alba* Lily. American Chemical Science Journal. 2016, 12, 4, 1 - 5. doi:10.9734/ACSJ/2016/19929.
11. Batool, R.; Kalsoom, A.; Akbar, I.; Arshad, N.; Jamil, N. Antilisterial Effect of *Rosa damascena* and *Nymphaea alba* in Mus musculus. Hindawi BioMed Research International. 2018. doi:10.1155/2018/4543723.
12. Rehman, S.; Ashfaq, U.A.; Ijaz, B.; Riazuddin, S.; Anti-hepatitis C virus activity and synergistic effect of *Nymphaea alba* extracts and bioactive constituents in liver infected cells. Microbial Pathogenesis. 2018, 121, 2018, 198 – 209. doi:10.1016/j.micpath.2018.05.023.
13. Madhusudhanan, N.; Lakshmi, T.; Gowtham Kumar, S.; Ramakrishana, N.; Konda, V.G.R.; Roy, A.; Geetha, R.V. *In vitro* Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of Aqueous and Ethanolic Flower Extract of *Nymphaea alba*. International Journal of Drug Development & Research. 2011, 3, 3, 252 - 258.
14. Nazir, S.; Qureshi, M.A.; Chat, O.A. Anti-tumor, Anti-oxidant and Anti-microbial potential of *Nymphaea alba* and *Nymphaea mexicana* flowers – a comparative study. Advances in Biomedicine and Pharmacy. 2015, 2, 4, 196 - 204.
15. Nomso, C.; Aduema, W. Effects of Ethanol Extract Leaves of *Nymphaea lotus* (water lily) on Learning and Memory in CD-1 Mice. Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences. 2018, 4, 3, 1 - 8. doi:10.19080/GJPPS.2018.04.555638.
16. Agati, G.; Azzarello, E.; Pollastri, S.; Tattini, M. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. Plant Science. 2012, 196, 67-76. doi:10.1016/j.plantsci.2012.07.014.
17. Huang, H.; Xiao, X.; Ghadouani, A. Effects of natural flavonoids on photosynthetic activity and cell integrity in *Microcystis aeruginosa*. Toxins, 2015, 7(1), 66-80. doi:10.3390/toxins7010066.
18. Keddy, P.A. Wetland Ecology: Principles and Conservation. Cambridge: Cambridge University Press. 2010. doi:10.1017/CBO9780511778179.
19. Jiang, G.; Liu, J.; Ren, B.; Zhang, L.; Owusu, L.; Liu, L.; Zhang, J.; Tang, Y.; Li, W. Anti-tumor and chemosensitization effects of Cryptotanshinone extracted from *Salvia miltiorrhiza* Bge. on ovarian cancer cells *in vitro*. Journal of Ethnopharmacology. 2017 205, 33–40. doi:10.1016/j.jep.2017.04.026.
20. Ramesh, S.; Rajan, R.; Santhanam, R. Freshwater Phytochemical Compounds. Taylor & Francis Group. 2013. International Standard Book Number-13: 978-1-4665-8456-3.

- 
21. Abarike, E.D.; Amenogbe, E.; Ampofo-Yeboah, A.; Abobi, S.M.; Atindaana, S.A.; Alhassan, E.H.; Akongyuure, D.N. Exploring the Nutrient Potential of *Nymphaea alba* (Water Lilly), for Use as Livestock Feed. UDS International Journal of Development. 2015, 2, 1 - 11.
22. Koushik, O.S.; Himaja, V.; Babu, P.S.; Karthikeyan, R. Anti - Inflammatory Activity of Flowers of *Nymphaea alba* by HRBC Membrane Stabilization Method. Research in Plant Biology. 2015, 5, 4, 18 - 20.
23. Ulfah, M.; Irawan, A.; Putra, T.A. Antibacterial Activity of Acetone and Ethyl Acetate Leaves, Stems and Rhizomes Extract of White Water Lily (*Nymphaeae alba*) Against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Jurnal Farmasi Sains dan Praktis. 2019, 5, 2, 52 – 60.
24. Sharaibi, O.J.; Ogundipe, O.T.; Magbagbeola, O.A.; Kazeem, M.I.; Afolayan, A.J. Acute and Sub-acute Toxicity Profile of Aqueous Leaf Extract of *Nymphaea lotus* Linn (*Nymphaeaceae*) in Wistar Rats. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2015, 14, 7, 1231 - 1238. doi:10.4314/tjpr.v14i7.16.
25. Pottier, M.; de Lima Albuquerque, B.N.; Bezerra-Silva, P.C.; Lino da Rocha, S.K.; Maia, A.C.M.; Hallwass, F.; Navarro-Vázquez, A.; do Amaral Ferraz Navarro, D.M. Dolabella-3,7,18-triene, the main constituent of the essential oil of the white lotus flower (*Nymphaea lotus*, *Nymphaeaceae*). Flavour and Fragrance Journal. 2016. doi:10.1002/ffj.3323.
26. Raja, M.M.; Mishra, S.H.; Tamboli, R.S.; Agilandeswari, D. Antidiabetic and antiplatelet aggregation study of various methanol fractions of *Nymphaea stellata* Willd leaves. Herba Polonica. 2017; 63, 3, 25 – 34. doi:10.1515/hepo-2017-0016.
27. Singh, M.; Jain, A.P. A Review on Genus *Nymphaea*: Multi-Potential Medicinal Plant. Asian Journal of Pharmaceutical Education and Research. 2017, 6, 4, 1-9.
28. Singh, J.; Jayaprakasha, G.K.; Patil, B.S. Extraction, Identification, and Potential Health Benefits of Spinach Flavonoids: A Review. Advances in Plant Phenolics: From Chemistry to Human Health ACS Symposium Series. 2018, Chapter 6, 107 - 136. doi:10.1021/bk-2018-1286.ch006.
29. Supaphon, P.; Keawpiboon, C.; Preedanon, S.; Phongpaichit, S.; Rukachaisirikul, V. Isolation and antimicrobial activities of fungi derived from *Nymphaea lotus* and *Nymphaea stellata*. Mycoscience. 2018, 59, 415 - 423. doi:10.1016/j.myc.2018.02.012.
30. Agnihotri, V.K.; ElSohly, H.E.; Khan, S.I.; Smillie, T.J.; Khan, I.A., Walker, L.A. Antioxidant constituents of *Nymphaea caerulea* flowers. Phytochemistry. 2008, 69, 10, 2061 - 2066. doi:10.1016/j.phytochem.2008.04.009.
31. Bello, F.H.; Maiha, B.B.; Anuka, J.A. The effect of methanol rhizome extract of *Nymphaea lotus* Linn. (*Nymphaeaceae*) in animal models of diarrhoea. Journal of Ethnopharmacology. 2016, 190, 13 - 21. doi:10.1016/j.jep.2016.05.036.
32. Bajpai, V.K.; Alam, M.B.; Ju, M.K.; Kwon, K.R.; Huh, Y.S.; Han, Y.K. Lee, S.H. Antioxidant mechanism of polyphenol-rich *Nymphaea nouchali* leaf extract protecting DNA damage and attenuating oxidative stress-induced cell death via Nrf2-mediated heme-oxygenase-1 induction coupled with ERK/p38 signaling pathway. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2018, 103, 1397 - 1407. doi:10.1016/j.biopha.2018.04.186.
33. Antonisamy, P.; Subash-Babu, P.; Alshatwi, A.A.; Aravinthan, A.; Ignacimuthu, S.; Choi, K.C.; Kim, J.H. Gastroprotective effect of nymphyol isolated from *Nymphaea stellate* (Willd) flowers: Contribution of antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic activities. Chemo-Biological Interactions. 2014, 224, 157 - 163. doi:10.1016/j.cbi.2014.09.020.
34. Oyeyemi, I.T.; Yekeen, O.M.; Odusina, P.O.; Ologun, T.M.; Ogbaide, O.M.; Olaleye, O.I.; Bakare, A.A. Genotoxicity and antigenotoxicity study of aqueous and hydro-methanol extracts of *Spondias mombin* L., *Nymphaea lotus* L. and *Luffa cylindrical* L. using animal bioassays. Interdisciplinary Toxicology. 2015; 8, 4, 184 - 192. doi:10.1515/intox-2015-0028.
35. Ye, Q.; Wang, H.; Xu, J. Application of NMR Spectroscopy for the Characterization of Dietary Polyphenols. Applications of NMR Spectroscopy. 2015, 3, 37-77.
36. Sakakibara, H.; Honda, Y.; Nakagawa, S.; Ashida, H.; Kanazawa, K. Simultaneous Determination of All Polyphenols in Vegetables, Fruits, and Teas. J. Agric. Food Chem. 2003, 51, 571-581. doi:10.1021/jf020926l.
37. Sa, R.R.; Matos, R.A.; Silva, V.C.; da Cruz Caldas, J.; da Silva Sauthier, M.C.; dos Santos, W.N.L.; Magalhães, H.I.F.; de Freitas Santos Júnior, A. Determination of bioactive phenolics in herbal medicines containing *Cynara scolymus*, *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reiss and *Ptychopetalum uncinatum* by HPLC-DAD. Microchemical Journal. 2017, 135, 10–15. doi:10.1016/j.microc.2017.07.009.
38. Chokki, M.; Cudälbeanu, M.; Zongo, C.; Dah-Nouvlessounon, D.; Ghinea, I.O.; Furdui, B.; Raclea, R.; Savadogo, A.; Baba-Moussa, L.; Avamescu, S.M.; Dinica, R.M.; Baba-Moussa, F. Exploring Antioxidant and

- 
- Enzymes (A-Amylase and B-Glucosidase) Inhibitory Activity of *Morinda lucida* and *Momordica charantia* Leaves from Benin. *Foods* 2020, 9, 434. <https://doi.org/10.3390/foods9040434>.
39. Balanescu, F.; Mihaila, M.D.I.; Cârâc, G.; Furdui, B.; Vînătoru, C.; Avramescu, S.M.; Lisa, E.L.; **Cudalbeanu, M.**; Dinica, R.M. Flavonoid Profiles of Two New Approved Romanian *Ocimum* Hybrids. *Molecules* 2020, 25, 4573. <https://doi.org/10.3390/molecules25194573>.
40. Ghinea, I.O.; Ionica Mihaila, M.D.; Blaga, G.-V.; Avramescu, S.M.; **Cudalbeanu, M.**; Isticioaia, S.-F.; Dinica, R.M.; Furdui, B. HPLC-DAD Polyphenolic Profiling and Antioxidant Activities of *Sorghum bicolor* during Germination. *Agronomy* 2021, 11, 417. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030417>.
41. **Cudalbeanu, M.**; Ghinea, I.O.; Furdui, B.; Dah-Nouvlessounon, D.; Raclea, R.; Costache, T.; Cucolea, I.E.; Urlan, F.; Dinica, R.M. Exploring New Antioxidant and Mineral Compounds from *Nymphaea alba* Wild-Grown in Danube Delta Biosphere. *Molecules* 2018, 23, 1247. <https://doi.org/10.3390/molecules23061247>.
42. Bakr, R.O., El-Naa, M.M., Zaghloul, S.S., Omar, M.M. Profile of bioactive compounds in *Nymphaea alba* L. leaves growing in Egypt: hepatoprotective, antioxidant and anti-inflammatory activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2017, 17, 52. [10.1186/s12906-017-1561-2](https://doi.org/10.1186/s12906-017-1561-2).
43. Mena P., Calani L., Dall'Asta C., Galaverna G., García-Viguera C., Bruni R., Crozier A. and Del Rio D., Rapid and Comprehensive Evaluation of (Poly)phenolic Compounds in Pomegranate (*Punica granatum* L.) Juice by UHPLC-MSn. *Molecules*. 2012, 17, 14821-14840; doi:10.3390/molecules171214821.
44. Hamad, H. O., Alma, M. H., Gulcin, I., Yilmaz, M. A., Karaođul, E. Evaluation of Phenolic Contents and Bioactivity of Root and Nutgall Extracts from Iraqi *Quercus infectoria* Olivier. *Records of Natural Products*. 2017, 11 (2), 205-210.
45. Lin, Y., Xu, W., Huang, M., Xu, W., Li, H., Ye, M., Zhang, X., Chu K. Qualitative and Quantitative Analysis of Phenolic Acids, Flavonoids and Iridoid Glycosides in Yinhua Kanggan Tablet by UPLC-QqQ-MS/MS. *Molecules* 2015, 20, 12209-12228, [10.3390/molecules200712209](https://doi.org/10.3390/molecules200712209).
46. Bystrom, L.M., Lewis, B.A., Brown, D.L., Rodriguez, E., Obendorf, R.L. Characterization of phenolics by LC–UV/Vis, LC–MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. ‘Montgomery’ fruits. *Food Chemistry* 2008, 111, 1017–1024, [10.1016/j.foodchem.2008.04.058](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.058).
47. Fang, T.; Wang, Y.; Ma, Y.; Su, W.; Bai, Y.; Zhao, P. A rapid LC/MS/MS quantitation assay for naringin and its two metabolites in rats plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006, 40, 454 – 459. doi:10.1016/j.jpba.2005.07.031.
48. Kim, D.O.; Lee, K.W.; Lee, H.J.; Lee, C.Y. Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 3713 – 3717. doi: 10.1021/jf020071c.
49. Kim, B.H.; Choi, J.S.; Yi, E.H.; Lee, J.K.; Won, C.; Ye, S.K.; Kim, M.H. Relative Antioxidant Activities of Quercetin and Its Structurally Related Substances and Their Effects on NF-κB/CRE/AP-1 Signaling in Murine Macrophages. *Mol. Cells*. 2013, 35, 410 – 420. doi:10.1007/s10059-013-0031-z.
50. Frangu, A.; Ashrafi, A.M.; Sýs, M. Arbnesi, T.; Metelka, R.; Adam, V.; Vlcek, M.; Richtera, L. Determination of Trolox Equivalent Antioxidant Capacity in Berries Using Amperometric Tyrosinase Biosensor Based on Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Appl. Sci.* 2020, 10, 2497. doi:10.3390/app10072497.
51. Al-Laith, A.A.; Alkhuzai, J.; Freije, A. Assessment of antioxidant activities of three wild medicinal plants from Bahrain. *Arabian Journal of Chemistry*. 2019, 12, 2365 - 2371. doi:10.1016/j.arabjc.2015.03.004.
52. Rivero-Cruz, J.F.; Granados-Pineda, J.; Pedraza-Chaverri, J.; Pérez-Rojas, J.M.; Kumar-Passari, A.; Diaz-Ruiz, G.; Rivero-Cruz, B.E. Phytochemical Constituents, Antioxidant, Cytotoxic, and Antimicrobial Activities of the Ethanolic Extract of Mexican Brown Propolis. *Antioxidants*. 2020, 9, 70. doi:10.3390/antiox9010070.
53. **Cudalbeanu, M.**; Furdui, B.; Cârâc, G.; Barbu, V.; Iancu, A.V.; Marques, F.; Leitão, J.H.; Sousa, S.A.; Dinica, R.M. Antifungal, Antitumoral and Antioxidant Potential of the Danube Delta *Nymphaea alba* Extracts. *Antibiotics* 2020, 9, 7. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010007>.
54. Noreen, H.; Semmar, N.; Farman, M.; McCullagh, J.S.O. Measurement of total phenolic content and antioxidant activity of aerial parts of medicinal plant *Coronopus didymus*. *Asian Pac J Trop Med*. 2017, 10, 8, 792 - 801. doi:10.1016/j.apjtm.2017.07.024.
55. Bancirova, M. Changes of the Quercetin Absorption Spectra in Dependence on Solvent. *Chemistry Journal*. 2015, 1(2), 31-34.
56. Iqbal, J.; Abbasi, B.A.; Batool, R.; Mahmood, T.; Ali, B.; Khalil, A.T.; Kanwal, S.; Shah, S.A.; Ahmad, R. Potential phytochemicals for developing breast cancer therapeutics: Nature’s healing touch. *Eur. J. Pharmacol.* 2018, 827, 125 - 148. doi:10.1016/j.ejphar.2018.03.007.

- 
57. Samaranayake, Y.H.; Cheung, B.P.K.; Wang, Y.; Yau, J.Y.Y.; Yeung, K.W.S.; Samaranayake, L.P. Fluconazole resistance in *Candida glabrata* is associated with increased bud formation and metallothionein production. *J. Med. Microbiol.* 2013, 62, 303–318. doi:10.1099/jmm.0.044123-0.
58. Chou, T.C. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Research.* 2010, 70, 2. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1947.
59. Cudalbeanu, M.; Peitinho, D.; Silva, F.; Marques, R.; Pinheiro, T.; Ferreira, A.C.; Marques, F.; Paulo, A.; Soeiro, C.F.; Sousa, S.A.; Leitão, J.H.; Tăbăcaru, A.; Avramescu, S.M.; Dinica, R.M.; Campello, M.P.C. Sono-Biosynthesis and Characterization of AuNPs from Danube Delta *Nymphaea alba* Root Extracts and Their Biological Properties. *Nanomaterials* 2021, 11, 1562. <https://doi.org/10.3390/nano11061562>.
60. Anuradha, J.; Abbasi, T.; Abbasi, S.A. An eco-friendly method of synthesizing gold nanoparticles using an otherwise worthless weed pistia (*Pistia stratiotes* L.). *J. Adv. Res.* 2015, 6, 711–720.
61. Liebig, F.; Thünemann, A.F.; Koetz, J. Ostwald ripening growth mechanism of gold nanotriangles in vesicular template phases. *Langmuir* 2016, 32, 10928–10935.
62. Oliveira, J.P.; Prado, A.R.; Keijok, W.J.; Ribeiro, M.R.N.; Pontes, M.J.; Nogueira, B.V.; Guimarães, M.C.C. A helpful method for controlled synthesis of monodisperse gold nanoparticles through response surface modeling. *Arab. J. Chem.* 2020, 13, 216–226.
63. Rodríguez-León, E.; Rodríguez-Vázquez, B.E.; Martínez-Higuera, A.; Rodríguez-Beas, C.; Larios-Rodríguez, E.; Navarro, R.E.; López-Esparza, R.; Iñiguez-Palomares, R.A. Synthesis of gold nanoparticles using mimosa tenuiflora extract. Assessments of cytotoxicity, cellular uptake, and catalysis. *Nanoscale Res. Lett.* 2019, 14, 334.
64. Jiang, J.; Oberdörster, G.; Biswas, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle disper-sions for toxicological studies. *J. Nanopart. Res.* 2009, 11, 77–89.
65. Barreto, Â.; Luis, L.G.; Girão, A.V.; Trindade, T.; Soares, A.M.V.M. Behavior of colloidal gold nanoparticles in different ionic strength media. *J. Nanopart. Res.* 2015, 17, 493.
66. Salopek, B.; Krasic, D.; Filipovic, S. Measurement and application of zeta-potential. *Rud. Geol. Naft. Zb.* 1992, 4, 147–151.
67. Akintelu, S.A.; Olugbeko, S.C.; Folorunso, A.S. A review on synthesis, optimization, characterization and antibacterial application of gold nanoparticles synthesized from plants. *Int. Nano Lett.* 2020, 10, 237–248.
68. Sadeghi, B.; Mohammadzadeh, M.; Babakhani, B. Green synthesis of gold nanoparticles using Stevia rebaudiana leaf extracts: Characterization and their stability. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2015, 148, 101–106.
69. Aromal, S.A.; Philip, D. facile one-pot synthesis of gold nanoparticles using tannic acid and its application in catalysis. *Phys. E* 2012, 44, 1692–1696.
70. Lee, K.X.; Shameli, K.; Miyake, M.; Bt Ahmad Khairudin, N.B.; Bt Mohamad, S.E.; Hara, H.; Bt Mad Nordin, M.F.; Yew, Y.P. Gold nanoparticles biosynthesis: A simple route for control size using waste peel extract. *IEEE Trans. Nanotechnol.* 2017, 16, 954–957.
71. Stozhko, N.Y.; Bukharinova, M.A.; Khamzina, E.I.; Tarasov, A.V.; Vidrevich, M.B.; Brainina, K.Z. The effect of the antioxidant activity of plant extracts on the properties of gold nanoparticles. *Nanomaterials* 2019, 9, 1655.
72. Osonga, F.J.; Akgul, A.; Yazgan, I.; Akgul, A.; Eshun, G.B.; Sakhaee, L.; Sadik, O.A. Size and shape-dependent antimicrobial activities of silver and gold nanoparticles: A model study as potential fungicides. *Molecules* 2020, 25, 2682.
73. Rabiei, M.; Palevicius, A.; Monshi, A.; Nasiri, S.; Vilkauskas, A.; Janusas, G. Comparing methods for calculating nano crystal size of natural hydroxyapatite using X-ray diffraction. *Nanomaterials* 2020, 10, 1627.
74. Ahmad, T.; Bustam, M.A.; Zulfiqar, M.; Moniruzzaman, M.; Idris, A.; Iqbal, J.; Asghar, H.M.A.; Ullah, S. Controllable phytosynthesis of gold nanoparticles and investigation of their size and morphology-dependent photocatalytic activity under visible light. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2020, 392, 112429.
75. Doan, V.D.; Huynh, B.A.; Nguyen, T.D.; Cao, X.T.; Nguyen, V.C.; Nguyen, T.L.H.; Nguyen, H.T.; Le, V.T. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using aqueous extract of *Codonopsis pilosula* roots for antibacterial and catalytic applications. *J. Nanomater.* 2020, 2020, 8492016.

## ***Listă de lucrări***

*Mihaela Cudălbeanu* <https://orcid.org/0000-0003-2158-3877>

### ***Capitol de carte***

1. Sorin Avramescu, Irina Fierascu, Radu Claudiu R. Fierascu, ***Mihaela Cudalbeanu***. Extraction of Natural Products from Agro-Industrial Wastes: A Green and Sustainable Approach. Chapter 4: Pressurized liquid extraction of natural products. Elsevier 2021. Acceptat, în curs de publicare.

### ***Lucrări publicate ISI din teza de doctorat***

1. ***Mihaela Cudalbeanu***, David Peitinho, Francisco Silva, Rosa Marques, Teresa Pinheiro, Ana C Ferreira, Fernanda Marques, António Paulo, Catarina F Soeiro, Sílvia Andreia Sousa, Jorge Humberto Leitão, Aurel Tăbăcaru, Sorin Marius Avramescu, Rodica Mihaela Dinica, Maria Paula Cabral Campello. Sono-Biosynthesis and Characterization of AuNPs from Danube Delta *Nymphaea alba* Root Extracts and Their Biological Properties. *Nanomaterials*. 2021; 11(6):1562. <https://doi.org/10.3390/nano11061562>. ***Factor de impact: 5.076, Q2.***

2. ***Mihaela Cudalbeanu***, Bianca Furdui, Geta Cârâc, Vasilica Barbu, Alina Viorica Iancu, Fernanda Marques, Jorge Humberto Leitão, Sílvia Andreia Sousa, Rodica Mihaela Dinica. Antifungal, Antitumoral and Antioxidant Potential of the Danube Delta *Nymphaea alba* Extracts. *Antibiotics*. 2020, 9, 7; doi:10.3390/antibiotics9010007. ***Factor de impact: 4.639, Q1.***

3. ***Mihaela Cudalbeanu***, Ioana Otilia Ghinea, Bianca Furdui, Durand Dah-Nouvlessounon, Robert Raclea, Teodor Costache, Iulia Elena Cucolea, Florentina Urgan, Rodica Mihaela Dinica. Exploring New Antioxidant and Mineral Compounds from *Nymphaea alba* Wild-Grown in Danube Delta Biosphere. *Molecules* 2018, 23(6), 1247; doi:10.3390/molecules23061247. ***Factor de impact: 4.412, Q2.***

**Factor de impact cumulat: 14,127.**

### ***Lucrări publicate ISI prin colaborare***

1. Costea IF, Melinte RG, Noapteș SN, ***Cudălbeanu M***, Dediu AV, Dinică RM, Cârâc G. Factors of influence for functionalised of chitosan with n-heterocyclic salt in aqueous medium. *Journal of Physics: Conference Series* 1960. 2021, 012001. doi:10.1088/1742-6596/1960/1/012001.

2. Ioana O. Ghinea, Maria D. Ionica Mihaila, Giorgiana-Valentina Blaga, Sorin M. Avramescu, ***Mihaela Cudalbeanu***, Simona-Florina Isticioaia, Rodica M. Dinica, Bianca Furdui. HPLC-DAD Polyphenolic Profiling and Antioxidant Activities of *Sorghum bicolor* during Germination. *Agronomy* 2021, 11, 417. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030417>. ***Autor de corespondență. Factor de impact: 3.417, Q1.***

3. Balanescu Fania, Maria Daniela Ionica Mihaila, Geta Cârâc, Bianca Furdui, Costel Vînătoru, Sorin Marius Avramescu, Elena Lacramioara Lisa, ***Mihaela Cudalbeanu***, Rodica Mihaela Dinica.



Flavonoid Profiles of Two New Approved Romanian *Ocimum* Hybrids. *Molecules*. 2020, 25, 4573. doi:10.3390/molecules25194573. **Autor de corespondență. Factor de impact: 4.412, Q2.**

4. Chokki Michaelle, Cheikna Zongo, Durand Dah-Nouvlessounon, **Mihaela Cudălbeanu**, Pacôme Noumavo, Ioana Otilia Ghinea, Bianca Furdui, Aly Savadogo, Rodica Dinica, Lamine Baba-Moussa, Farid Baba-Moussa. Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Momordica charantia* L. and *Morinda lucida* Benth extracts from Benin. *African Journal of Microbiology Research*. 2020, 14, 8, 426-435. doi:10.5897/AJMR2020.9347.

5. Chokki Michaelle, **Mihaela Cudălbeanu**, Cheikna Zongo, Durand Dah-Nouvlessounon, Ioana Otilia Ghinea, Bianca Furdui, Robert Raclea, Aly Savadogo, Lamine Baba-Moussa, Sorin Marius Avramescu, Rodica Mihaela Dinica and Farid Baba-Moussa. Exploring Antioxidant and Enzymes (A-Amylase and B-Glucosidase) Inhibitory Activity of *Morinda lucida* and *Momordica charantia* Leaves from Benin. *Foods*. 2020, 9, 434. doi:10.3390/foods9040434. **Factor de impact: 4.350, Q1.**

6. Tăbăcaru A., Dinică R.M., **Cudălbeanu M.**, Nicolescu C.M., Bumbac M. Catalytic Effect of Photoluminescent Zinc Oxide Nanoparticles Formed in the Presence of Quaternary Ammonium Salts. *Materials*. 2019,12, 2066; doi:10.3390/ma12132066. **Factor de impact: 3.623, Q2.**

**Factor de impact cumulat: 15,802.**

### ***Lucrări publicate BDI***

1. Baroiu Liliana, Drăgănescu Miruna, Arbune Manuela, Iancu Alina, Dumitru Caterina, Lucreția Anghel, **Cudălbeanu Mihaela**, Dumitru Irina Magdalena, Rugină Sorin. Epidemiological Aspects of *Clostridium* Difficile Infection in the Southeast Region of Romania. *ARS Medica Tomitana*. 2019, 3, 25, 107-113. doi:10.2478/arasm-2019-0022.