
TEZA DE DOCTORAT

Stabilitatea și proprietățile biologice ale antocianilor liberi și încapsulați din fructe de pădure

(REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT)

Doctorand **Adela Maria Dăescu**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Adela Mariana Pinte**



1. Introducere

Antocianii, compuși majori din grupa flavonoidelor aparținând clasei polifenolilor, sunt compuși bioactivi responsabili de culoarea și protecția țesuturilor plantelor expuse la radiații UV (Richmond et al., 2019). În ciuda gamei largi de efecte benefice asupra sănătății pe care antocianii le exercită, cum ar fi activitatea antioxidantă (Carvalho și colab., 2016), antiangiogenică și antitumorală (Tarone și colab., 2020; Kauppinen și colab., 2016), aplicabilitatea lor este limitată nu doar de stabilitatea redusă, dar și de biodisponibilitatea scăzută (Wu et al., 2020). Antocianii sunt compuși instabili care suferă modificări structurale în prezența unor factori externi cum ar fi variațiile de pH, temperatura, lumina, oxigenul, enzime, etc., și care determină diminuarea efectelor lor terapeutice (Jiang et al., 2017).

Pentru a evita degradarea antocianilor și pentru a păstra astfel efectele lor benefice atunci când sunt ingerați sau utilizați în diferite tratamente medicale, aceștia pot fi încorporați în sistemele de livrare sau copigmentați cu alte molecule (Esfanjani et al., 2018; Fang et al. 2020). În consecință, oamenii de știință depun eforturi pentru a găsi modalități de a îmbunătăți stabilitatea antocianilor, biodisponibilitatea și preluarea lor celulară precum și pentru a înțelege mecanismele din spatele efectelor biologice și a localizării lor intracelulare (Bunea și colab., 2013; Rugina și colab., 2015).

Antocianii au demonstrat efecte benefice legate de inhibarea angiogenezei atât în studii *in vitro*, cât și *in vivo*, cu implicații în mai multe boli, inclusiv retinopatia diabetică (Khan și colab., 2018; Tsakiroglou și colab., 2019). De asemenea, antocianii au determinat o inhibare a dezvoltării tumorale, o reducere a proliferării celulelor canceroase de colon, blocarea leziunilor ADN în celulele de cancer mamar și inhibarea celulelor canceroase hepatice HepG2 (Li et al., 2009). Mai mult, antociani precum cianidin-3-glucozid, delphinidin-3-glucozid și petunidin-3-glucozid au demonstrat un control eficient asupra supraexpresiei și secreției anormale a factorilor inflamatori prin inhibarea factorului de transcripție NF- κ B (Lin et al., 2017). Reglarea stresului oxidativ și suprimarea apoptozei celulare indică faptul că antocianii pot proteja împotriva leziunilor pielii induse de UV-B și a altor patologii care implică leziuni oxidative. Pe lângă inhibarea expresiei factorilor inflamatori, antocianinele reduc și producția de substanțe inflamatorii (Qi et al., 2022). Antocianii au determinat o reducere a plăcilor de amiloid- β 1-42 și a markerilor neuro-apoptotici prin inhibarea căii ρ -JNK/NF- κ B/ ρ -GSK3 β în creierul șoarecilor (Kim et al., 2017).

2. Studiul de literatură

Capitolul 1 prezintă cele mai relevante și cele mai noi aspecte privind chimia și biochimia antocianilor. Primele subcapitole includ structura chimică și cei mai relevanți factori care afectează stabilitatea acestora: pH-ul, temperatura, lumina, oxigenul și prezența altor molecule. În continuare sunt trecute în revistă biosinteza antocianilor și de o prezentare mai detaliată a distribuției acestora în cele mai comune surse alimentare (fructe și legume). Al doilea subcapitol este dedicat proprietăților farmacologice ale antocianilor, începând cu biodisponibilitatea și absorbția acestora. Sunt detaliate efectele antioxidante, antiangiogenice, antitumorale, antiinflamatorii, antidiabetice, neuroprotectoare, subliniind cele mai relevante și recente dovezi științifice rezultate din studii *in vitro* și *in vivo*.

3. Contribuții originale

Capitolul 2. Ipoteza de lucru și obiectivele specifice

Scopul principal al acestei teze de doctorat a fost cel de a încorpora antociani într-un sistem de livrare, care ar putea crește stabilitatea chimică a acestor molecule și biodisponibilitatea lor. Utilizarea materialelor sensibile la pH pentru a construi acest nanosistem ne va permite să controlăm mai eficient eliberarea de antociani în interiorul celulelor tumorale B16-F10. Toate acestea nu înainte de o colectare consistentă de informații actualizate despre antociani ca fiind compuși bioactivi, dar și de testare a proprietăților antioxidante, a bioaccesibilității și stabilității lor în urma expunerii la factori externi (pH, temperatură, lumină, toate dependente de timp) pentru o înțelegere mult mai bună a modului de acțiune și a comportamentului chimic al acestor compuși.

Pentru realizarea acestui scop, cercetarea doctorală a fost îndreptată spre următoarele obiective:

Obiectivul 1: Extracția, identificarea și cuantificarea extractelor de antociani din *Amelanchier lamarckii*, *Aronia melanocarpa* și *Vaccinium corymbosum* folosind cromatografie lichidă de înaltă performanță cu fotodiodă și detecție prin spectrometrie de masă (HPLC-PDA, HPLC-MS)

Obiectivul 2: Determinarea activității antioxidante și a bioaccesibilității compușilor fenolici din *Amelanchier lamarckii* și a activității lor inhibitoare enzimatică împotriva α -glucozidazei, tirozinazei și acetilcolinesterazei

Obiectivul 3: Determinarea proprietăților protectoare și antioxidante ale extractelor bogate în antociani pe celulele epiteliale pigmentare retiniene umane (celule RPE, linie celulară D407) cultivate în condiții de stres oxidativ standard sau indus;

Obiectivul 4: Testarea stabilității antocianilor din extractul de *Amelanchier lamarckii* expus la diferite pH-uri, temperaturi și lumină, pentru diferite intervale de timp;

Obiectivul 5: Sinteza prin tehnica layer-by-layer și caracterizarea nanocapsulelor ce conțin antociani purificați din *A. melanocarpa*, polimeri biocompatibili încărcăți (+/-) și fluorofori;

Obiectivul 6: Monitorizarea eliberării controlate de pH a antocianilor din nanocapsule, internalizarea și citotoxicitatea acestora în celulele de melanom murin (B16-F10).

Capitolul 3 : Efectul antioxidant, inhibitor al enzimelor și protector al extractului de *Amelanchier lamarckii*

Scopul studiului. Acest studiu a avut ca scop determinarea compoziției chimice a boabelor de *A. lamarckii* cultivate în România, oferind informații originale și valoroase pentru industria nutraceutică și de sănătate privind activitatea antioxidantă și activitatea inhibitoare enzimatică a extractului de fructe. De asemenea, a determinat bioaccesibilitatea compușilor fenolici bioactivi majori.

Metodologie. Caracterizarea și cuantificarea compușilor fenolici și a fracției de antociani a fost efectuată prin HPLC-PDA și HPLC-ESI+-MS și calibrare externă. Activitatea antioxidantă a extractului de *A. lamarckii* (AME) a fost determinată prin testele FRAP și CUPRAC. Activitatea inhibitoare a extractului împotriva tirozinazei, α -glucozidazei și acetilcolinesterazei a fost determinată prin metode spectrofotometrice. Bioaccesibilitatea compușilor fenolici a fost determinată utilizând protocolul standardizat de digestie statică *in vitro* INFOGEST (Minekus et al, 2014). Efectul protector al extractului a fost investigat folosind un model celular de

retinopatie diabetică, în care celulele RPE umane au fost expuse la o concentrație ridicată de glucoză.

Rezultate și concluzii. Polifenolii *A. lamarckii*, dintre care acizii fenolici, antocianii, flavonolii și flavonele se dovedesc a avea o contribuție semnificativă la activitatea antioxidantă și la potențialul de inhibiție enzimatică asupra tirozinazei, α -glucozidazei și acetilcolinesterazei. Concentrația totală de polifenoli în AME a scăzut de șase ori după faza gastrică a digestiei comparativ cu cea inițială și de zece ori după faza intestinală. Bioaccesibilitatea totală a polifenolilor indică faptul că doar o mică parte a acestora este accesibilă pentru absorbție, probabil din cauza transformărilor chimice în diferite condiții de pH și a mediului ușor alcalin al intestinului subțire. Flavonolii și acizii hidroxicinamici au avut cea mai mare bioaccesibilitate, în timp ce antocianii și flavonele nu au putut fi detectate în digesta finală. Într-un model simulat de retinopatie diabetică, polifenolii din AME au exercitat un efect protector în cazul celulelor cultivate în mediu cu 30 mM de glucoză. În schimb, cultivarea în condiții ce mimează hiperglicemia extremă (glucoză 60 mM), efectul protector al AME asupra viabilității celulelor D407 este redus. În concluzie, toate aceste date sugerează că *A. lamarckii* ar putea fi o sursă valoroasă de compuși polifenolici cu potențial antioxidant și efecte de protecție împotriva bolilor metabolice. Aceste fructe merită să fie investigate și exploatate în continuare, pentru aplicații în industria alimentară sau a nutraceuticelor.

Rezultatele acestui studiu au fost publicate în: Adela Maria DĂESCU, Mădălina NISTOR, Alexandru NICOLESCU, Roxana POP, Andrea BUNEA, Dumitrița RUGINĂ, Adela PINTEA, 2024, Antioxidant, Enzyme Inhibitory, and Protective Effect of *Amelanchier lamarckii* Extract. *Plants* 2024, 13, 1347. <https://doi.org/10.3390/plants13101347>. Impact Factor 4.000, Q1

Capitolul 4. Activitatea antioxidantă *in vitro* a antocianidinelor din afinele cultivate

Scopul studiului. Acest studiu își propune să evalueze capacitatea antocianidinelor (agliconi), antioxidanți cu structură fenolică extrași din afine, de a îmbunătăți statusul antioxidant al celulelor RPE expuse la concentrații mari de glucoză, situație care mimează retinopatia diabetică. Obiectivele specifice ale studiului au fost: extracția și caracterizarea profilului de antocianidine din afine de cultură *Vaccinium corymbosum* L. varietatea Bluegold cultivate în România; de a determina activitatea antioxidantă a extractului prin metode chimice și de a evalua efectul extractului de antocianidine asupra statutului antioxidant al celulelor epiteliale pigmentare retiniene cultivate în condiții normale și în mediu cu conținut ridicat de glucoză.

Metodologie. Caracterizarea și cuantificarea antocianidinelor a fost efectuată prin HPLC-PDA cu calibrare externă. Activitatea antioxidantă a extractelor a fost determinată prin teste ABTS, FRAP și CUPRAC. Efectul protector al extractului a fost investigat folosind un model celular de retinopatie diabetică, în care celulele RPE umane au fost expuse la o concentrație ridicată de glucoză. Activitatea enzimelor antioxidante SOD, GPx, CAT și nivelul glutationului redus (GSH) au fost evaluate folosind kituri comerciale.

Rezultate și concluzii. Cultivarul Bluegold este o sursă valoroasă de antocianidine (95,02 ± 2,45 mg/100g FW), în special malvidină (31,68 ± 0,81 mg/100 FW), cu activitate antioxidantă remarcabilă (10,56 ± 1,87 μ mol TE/100 g FW; μ mol Fe²⁺/g FW - FRAP; 104,22 ± 9,44 μ mol TE/ g FW - CUPRAC). Extractul nu a prezentat citotoxicitate în celulele RPE la

concentrații de până la 250 μM . Pretratarea culturii RPE cu malvidină timp de 24 de ore a îmbunătățit viabilitatea celulelor cultivate în mediu bogat în glucoză. Mai mult, malvidina a determinat o scădere a generării de ROS atât în celulele de control (concentrații normale de glucoză), cât și în celulele expuse la stresul oxidativ indus de concentrația mare de glucoză. Administrarea extractului a indus o creștere a activității SOD, atât în condiții normale, cât și în condiții de stres oxidativ, dar nu a avut un efect semnificativ asupra activităților GPx și CAT. În plus, pre-tratamentul cu malvidină a crescut nivelul de GSH în celulele de control și a restabilit nivelul de GSH în celulele cultivate în condiții de hiperglicemie simulată. Inhibarea generării speciilor reactive de oxigen, creșterea concentrației GSH și a activității SOD întăresc ipoteza că malvidina poate contribui la sistemul de apărare antioxidant al celulelor RPE. Sunt necesare studii suplimentare pentru a înțelege mecanismele responsabile de proprietățile antioxidante ale antocianidinelor în celulele RPE.

Acest studiu a fost publicat în: Adela Maria DĂESCU, Dumitrița RUGINĂ, Andrea BUNEA, Adela PINTEA, 2024, *In vitro* Antioxidant Activity of Anthocyanidins from Cultivated Blueberries, *ProEnvironment*, 17/57, 57 – 66. BDI

Capitolul 5. Stabilitatea termică, fotochimică și la pH a antocianilor pe bază de cianidină din extractul de fructe de *Amelanchier lamarckii*.

Scopul studiului. Studiul a fost axat pe determinarea stabilității extractului de antociani pe bază de cianidină din fructele *Amelanchier lamarckii*. Abordarea noastră a implicat determinarea efectelor cumulate ale glicozilării, pH-ului, temperaturii și luminii asupra stabilității antocianilor în timp. Astfel, extractul a fost expus simultan la diferite pH-uri, intensități luminoase sau variații de temperatură, pentru diferite intervale de timp.

Metodologie. În primul experiment, antocianii (ANTEX) au fost extrași din fructe de pădure și expuși la diferite valori de pH (1,1 ; 5,1 ; 8,0), la temperatura camerei, timp de 0h, 1h, 4h, 8h și 24h. În al doilea experiment, ANTEX a fost expus la aceleași condiții de pH și menținut la temperaturi diferite (4°C, 24°C, 37°C, 60°C și 100°C), timp de 0h, 1h, 4h, 8h și 24h. În al treilea experiment, ANTEX a fost expus la diferite intensități luminoase 10% (785 lux), 40% (6773 lux), 60% (10038 lux) și 80% (14296 lux), la diferite temperaturi 10°C, 24°C, 37°C și 50°C, pentru aceleași intervale de timp ca și mai sus. Identificarea antocianilor și cuantificarea lor pentru fiecare dintre condițiile experimentale a fost efectuată prin HPLC-PDA cu calibrare externă.

Rezultate și concluzii. Antocianii pe bază de cianidină au prezentat o stabilitate bună la temperaturi de până la 37°C, pentru toate valorile de pH, respectiv 1,1, 5,1 și 8,0. Totuși, pentru temperaturi ce depășesc 60°C, indiferent de pH, retenția antocianilor totali și individuali a scăzut semnificativ. La temperatura camerei și în absența luminii, derivații glicozilați, Cy-3-gal și Cy-3-arab, au fost mai stabili față de variația pH-ului comparativ cu agliconul liber Cy, în special pentru timpii de expunere mai lungi. La temperaturi ridicate, Cy a avut o retenție mai bună decât forma glicozilată, dar acest lucru se datorează cel mai probabil hidrolizei (parțiale) induse termic a derivaților glicozilați, având ca rezultat eliberarea agliconului. Între Cy-3-gal și Cy-3-arab, primul compus a fost în general mai stabil față de variația intensității luminii la temperaturi ridicate (>37°C) și o durată lungă de expunere (>4h), dar cu o stabilitate mai bună pentru Cy-arab în cazul variațiilor de pH la temperaturi ridicate (>37°C) și durată lungă de expunere (>4h). Contrar, în condițiile variațiilor de pH și temperatură, Cy-3-arab a avut o

retenție mai bună în aproape toate experimentele. Cu toate acestea, Cy-3-gal a fost compusul major din extract și, ca atare, a avut, de asemenea, cea mai mare contribuție la stabilitatea totală a antocianilor totali. De asemenea, este important de remarcat impactul duratei tratamentului. Un tratament termic la 60°C sau un proces de fierbere (100°C), prelungit până la maximum 1 oră la un pH ușor acid, a dus la o pierdere de aproximativ 23% și, respectiv, 46% din totalul antocianilor din extract. Antocianii pe bază de cianidină au un mare potențial ca și coloranți naturali în industria alimentară. Prin urmare, pentru a asigura păstrarea antocianilor în alimentele procesate cu un pH mai mic de 6, se recomandă reducerea duratei tratamentului termic în timpul procesării alimentelor înainte de a scădea pH-ul alimentelor. Studiile viitoare ar trebui să se concentreze pe elucidarea mecanismelor de interacțiune inter- și intramoleculară consecutive expunerii la temperatură și/sau la lumină derivată de cianidină. În plus, testarea stabilității antocianilor din sucul de *A. lamarckii* în timpul pasteurizării sau a obținerii de dulceață ar oferi informații suplimentare și utile. Acest studiu relevă importanța utilizării ambalajelor opace și a metodelor alternative de prelucrare termică alternativelor pentru a menține culoarea antocianilor atunci când se dorește utilizarea lor ca și coloranți naturali.

Acest studiu a fost submitat spre publicare: **Adela Maria DĂESCU**, Roxana POP, Dumitrita RUGINĂ, Adela PINTEA, Thermal, photochemical, and pH stability of cyanidin-based anthocyanins in *Amelanchier lamarckii* fruit extract, Foods- 3177218 (în evaluare)

Capitolul 6. Nanocapsule sensibile la pH pentru livrarea de antociani, urmărirea intracelulară și eliberarea controlată în interiorul celulelor melanomului B16-F10.

Scopul studiului. Scopul prezentului studiu a fost fabricarea unui nanosistem funcționalizat (Nano@AntS) capabil să capteze antocianinele (AntS), să le transporte în interiorul celulelor de melanom, permițând monitorizarea cu ușurință a fluorescenței acestora și eliberând AntS pentru un potențial efect terapeutic. Pentru a obține Nano@AntS cu comportament sensibil la pH, s-au utilizat doi polielectroliți slabi sensibili la pH și doi fluorofori (FITC sensibil la pH, pKa 6-6,5 și RBITC insensibil la pH). Când unul dintre polielectroliți își pierde sarcina electrică în acest interval de pH, AntS ar trebui să fie eliberați direct în celulele de melanom pentru a-și exercita efectele.

Metodologie. Nanocapsulele (Nano@AntS) au fost sintetizate prin metoda layer-by-layer, bazată pe sarcina electrică a polimerilor, pe un miez de CaCO₃(+), cu PAA(-), urmată de AntS(+), PAA(-), fluorofori (RBITC(+); FITC(-), PAA(-) și stratul superior de PEI(+)). Nano@AntS au fost caracterizate prin microscopie cu fluorescență, SEM, TEM, DLS și potențial zeta. Viabilitatea celulele de melanom tratate cu Nano@AntS a fost determinată prin testul WST-1. Caracterizarea AntS și eficiența încorporării acestora a fost determinată prin HPLC-PDA.

Rezultate și concluzii. A fost dezvoltat un nou nanosistem de livrare, Nano@AntS, pentru antociani care poate fi livrat, monitorizat și localizat în interiorul celulelor melanomului B16-F10. Acest lucru este posibil datorită caracteristicilor sale: suprafață acoperită pozitiv, formă sferică, dimensiuni nanometrice, reacție la pH a polimerilor și fluoroforilor din structură și capacitate de încărcare a antocianilor de 63%. Eliberarea AntS din Nano@AntS expuse la trei soluții diferite (pH 4,5, pH 5,5, pH 6,5) timp de 24 de ore a fost investigată prin analiza HPLC-DAD. Eliberarea de AntS (155,7 μM Cy-3-gal) observată la un pH de 4,5 poate fi atribuită

stabilității ridicate a AntS în condiții acide (Enaru și colab., 2021). La un pH de 5,5, a fost eliberată o cantitate mai mică de AntS, poate din cauza formei de pseudobază carbinol a antocianilor la acest pH sau a unui raport de umflare scăzut al polimerilor. În consecință, deoarece PAA și PEI sunt sensibile la 6,0 - 6,5 pH, a accelerat eliberarea datorită proprietăților specifice ale polimerilor (Lim et al., 2017), ceea ce duce la o concentrație mai mare de AntS identificată (52,0 μM Cy-3-gal). Nano@AntS nu afectează viabilitatea celulelor tumorale, în schimb, AntS încapsulat (652,70 \pm 18,95 μM ca Cy-3-gal) exercită un efect citotoxic puternic asupra celulelor melanomului B16-F10. Nano@AntS se poate localiza în interiorul celulelor melanomului, fie în citoplasmă, fie în lizozomi. Nano@AntS reprezintă un potențial sistem de livrare pentru terapia melanomului și poate fi utilizat în co-terapie dacă în structura sa se încapsulează alte molecule terapeutice.

4. Concluzii generale și perspective de viitor

Studiile efectuate în cadrul cercetării doctorale au adus informații noi și valoroase cu privire la proprietățile chimice și biologice ale antocianilor din fructele de pădure cultivate în România.

A. lamarckii este o sursă importantă de compuși fenolici, inclusiv antociani, chiar dacă este mai puțin cunoscută în țara noastră. Extractul de *A. lamarckii* a arătat o activitate antioxidantă semnificativă și un potențial de inhibiție enzimatică împotriva tirozinazei, α -glucozidazei și acetilcolinesterazei. Digestia *in vitro* simulată indică faptul că doar o mică parte din compușii fenolici sunt disponibili pentru absorbție, dintre care flavonolii și acizii hidroxicinamici au fost cei mai bioaccesibili, în timp ce antocianii și flavonele au avut cea mai scăzută bioaccesibilitate. Polifenolii din extractul de *A. lamarckii* au demonstrat un efect protector într-un model celular de retinopatie diabetică, când celulele RPE au fost expuse la o concentrație moderată de glucoză (30 mM).

Prin utilizarea tehnicilor cromatografice, a testelor antioxidante chimice și a unui model celular de retinopatiei diabetică, am evaluat efectul antioxidant și citoprotector al antocianidinelor din soiul *Vaccinium corymbosum* var. Bluegold. Malvidina a fost identificată drept agliconul major din fructe de pădure, urmată de delfinidină și petunidină. Studiul nostru a demonstrat lipsa de toxicitate a extractului bogat în malvidină pe celulele RPE cultivate în condiții normale de glucoză. Mai mult, extractul a arătat efect protector asupra viabilității celulelor RPE cultivate în condiții de glucoză ridicată. Activitatea antioxidantă celulară a extractului bogat în malvidină a fost demonstrată prin inhibarea producției intracelulare de ROS, creșterea nivelului de glutation redus (GSH) și creșterea activității SOD. Cu toate acestea, lipsa efectului asupra altor enzime antioxidante și semnificația statistică redusă a unor rezultate reprezintă limitări ale acestui studiu. Sunt necesare investigații suplimentare pentru a înțelege mecanismele care guvernează proprietățile antioxidante ale antocianidinelor în celulele RPE.

Înțelegerea proprietăților optice (culoarea) și a comportamentului antocianilor în raport cu factorii de mediu este crucială pentru anticiparea schimbărilor care pot apărea în produsele alimentare în timpul procesării. Studiul nostru asupra antocianilor din *A. lamarckii* a îmbunătățit cunoștințele privind efectul temperaturii, pH-ului și luminii asupra stabilității acestor compuși. Faptul că toți antocianii identificați în aceste fructe au la bază același aglicon, cianidina, ne-a permis să facem comparații între stabilitatea formelor libere și glicozilate, dar și

între diferitele forme glicozilate, în funcție de natura fragmentului glucidic. Dintre factorii investigați, temperaturile ridicate ($>60^{\circ}\text{C}$) și pH-ul bazic au avut efectul cel mai dăunător asupra tuturor antocianilor, mai ales atunci când sunt aplicate simultan și pentru o durată de expunere îndelungată (>4 ore). Pentru cea mai mare intensitate luminoasă (14296 lux), la temperatură scăzută (10°C), după 24 de ore, retenția antocianilor totali și individuali a rămas în jur de 90 %, însă pe măsură ce temperatura crește (50°C), stabilitatea formelor glicozilate a scăzut semnificativ. În concluzie, pentru a conserva mai bine antocianii din alimentele procesate, expunerea la lumină și tratamentul termic trebuie reduse la minimum (atât temperatura cât și timpul) în timpul procesării alimentelor înainte de scăderea pH-ului alimentelor. Studiile ulterioare ar trebui să se concentreze pe elucidarea mecanismelor interacțiunilor inter și intramoleculare determinate de expunerea antocianilor la pH, temperatură și/sau lumină.

Antocianii din fructele de Aronia, care conțin derivați monoglicozilați ai cianidinei, au fost extrași, purificați, caracterizați prin cromatografie și în continuare încapsulați cu eficiență bună în nanocapsule polimerice inovatoare (Nano@AntS). Aceste capsule, care includ polimeri biocompatibili și fluorofori, sunt sensibile la pH și sunt capabile să livreze și să elibereze antocianii la nivel celular în celulele de melanom, așa cum a demonstrat analiza HPLC, și tehnicile de microscopie (SEM, TEM). Având capacitatea mare de încărcare, dimensiunea redusă, suprafața pozitivă și fiind lipsit de citotoxicitate, acest nanosistem ar putea fi utilizat pentru terapia melanomului sau pentru co-terapie.

Perspective de viitor

În următoarele decenii, putem asista la dezvoltarea de noi terapii pentru melanom, având în vedere potențialul citotoxic al antocianilor încapsulați în nanosisteme fluorescente. Această abordare de livrare țintită ar putea aduce noi strategii pentru tratamentul cancerului de piele, abordând problemele legate de recidivele frecvente și eficacitatea limitată a tratamentelor actuale. În plus, stabilitatea crescută a cianidinei în diferite condiții de mediu ar putea duce la formularea de produse alimentare și farmaceutice mai eficiente care păstrează proprietățile benefice ale antocianilor. Aceste progrese ar putea aduce contribuții nu doar pentru sănătate, cât și pentru industria alimentară, prin îmbunătățirea aportului de compuși bioactivi cât și a aspectului/culorii produselor alimentare pe bază de fructe bogate în antociani.

5. Originalitate și contribuții personale

Rezultatele cercetării doctorale actuale contribuie cu elemente noi la chimia și biochimia antocianilor din fructe de pădure, reprezentând o contribuție originală la cunoștințele deja existente în domeniul acestor compuși bioactivi polifenolici.

Au fost obținute date originale privind compoziția chimică și activitatea antioxidantă a fructelor de *Amelanchier lamarckii* cultivate în România. Extractele polifenolice bogate în antociani din *A. lamarckii* au exercitat activitate inhibitorie asupra tirozinazei, α -glucozidazei și acetilcolinesterazei, printr-o abordare *in vitro* utilizată pentru a descoperi potențiale molecule antidiabetice, anti-pigmentare și anti- neurodegenerative. Screening-ul pentru potențiale efecte antidiabetice a fost extins la un model de cultură celulară a retinopatiei diabetice folosind celule RPE expuse la condiții de glucoză ridicată. Din cunoștințele noastre, acesta este primul studiu care a evaluat efectele antioxidante, inhibitorii enzimatică și citoprotectoare ale polifenolilor din *A. lamarckii* împreună cu evaluarea bioaccesibilității acestora.

În ciuda numeroaselor studii care asociază afinele cu protecția ochilor și îmbunătățirea vederii, studiul nostru oferă noi informații despre mecanismul antioxidant al antocianidelor extrase din *Vaccinium corymbosum* cv. într-un model celular de retinopatie diabetică. Dincolo de activitatea de neutralizare a radicalilor stabili (ABTS) și de reducere a metalelor (Fe^{3+} , Cu^{2+}) demonstrată de testele chimice, am demonstrat că extractul bogat în malvidină a neutralizat eficient speciile reactive de oxigen generate în celulele RPE în condiții de hiperglicemie simulată și a îmbunătățit starea antioxidantă a celulelor.

Cercetările noastre au oferit, de asemenea, noi informații privind stabilitatea antocianilor, compuși sensibili la efectele nocive ale factorilor externi în timpul depozitării și procesării fructelor. Folosind o sursă europeană mai puțin investigată, *Amelanchier lamarkii*, am obținut un extract care a fost analizat prin cromatografie HPLC pentru a urmări stabilitatea la variațiile de pH, temperatură și lumină ale antocianilor totali și individuali. Acesta este primul studiu axat pe stabilitatea extractului de *A. lamarkii*, care relevă impactul glicozilării asupra stabilității antocianilor pe bază de cianidină în raport cu factorii mai sus menționați. Aceste date vor avea un impact semnificativ asupra menținerii proprietăților antocianilor în fructele proaspete și procesate sau în extractele derivate, având în vedere proprietățile de colorare ale acestor compuși și potențialele lor efecte farmacologice.

În final, această teză a oferit un model inovator de nanosistem ce vizează dezvoltarea de noi terapii/sau co-terapie pentru cel mai letal tip de cancer de piele, melanomul, o boală cu impact major din cauza recidivelor frecvente și a răspunsului limitat la terapiile convenționale. Antocianii extrași și purificați din fructele de *Aronia* au fost încapsulați cu succes în nanocapsulele fluorescente sensibile la pH (Nano@AntS), care pot fi preluate în celule și pot elibera antociani (AntS). Nano@AntS nu afectează viabilitatea celulelor melanomului B16-F10, chiar dacă o concentrație de AntS identică cu cea încapsulată în Nano@AntS s-a dovedit că exercită un efect citotoxic puternic. Un alt aspect original a fost monitorizarea intracelulară a Nano@AntS prin co-încapsularea celor doi fluorofori, izotiocianatul de fluoresceină (FITC) și izotiocianatul de rodamină B (RBITC). Conform imaginilor TEM și a microscopiei cu fluorescență, Nano@AntS au fost găsite din abundență în citoplasma celulelor melanomului B16-F10, dar și în interiorul lizozomilor. Nano@AntS poate fi transpus de la scară de laborator într-o aplicație medicală viitoare pentru exploatarea în terapii noi pentru melanom.

Referințe

1. Bunea, A., Rugina, D., Sconta, Z., Pop, R. M., Pinte, A., Socaciu, C., Tabaran, F., Grootaert, C., Struijs, K., & VanCamp, J. (2013). Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells. *Phytochemistry*, 95:436-44.
2. Da Silva Carvalho, A.G., Da Costa Machado, M.T., Da Silva, V.M., Sartoratto, A., Rodrigues, R.A.F., & Hubinger, M.D. (2016). Physical properties and morphology of spray dried microparticles containing anthocyanins of jussara (*Euterpe edulis* Martius) extract. *Powder Technology*, 294:421-428.
3. Esfanjani, A.F., Assadpour, E., & Jafari, S.M. (2018). Improving the bioavailability of phenolic compounds by loading them within lipid-based nanocarriers. *Trends in Food Science & Technology*, 76:56-66.
4. Fang, J.L., Luo, Y., Yuan, K., Guo, Y., & Jin, S.H. (2020). Preparation and evaluation of an encapsulated anthocyanin complex for enhancing the stability of anthocyanin. *LWT*, 117.

5. Jiang, H.L., Yang, J.L., & Shi, Y.P. (2017). Optimization of ultrasonic cell grinder extraction of anthocyanins from blueberry using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34:325-331.
6. Jung Y.K., Joo, K.S., Rho, S.J., & Kim, Y.R. (2020). *PH-dependent antioxidant stability of black rice anthocyanin complexed with cycloamylose*. *LWT*, 129.
7. Kauppinen, A., Paterno, J.J., Blasiak J., Salminen A., & Kaarniranta K. (2016). Inflammation and its role in age-related macular degeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73:1765-1786.
8. Khan, M.I., Shin, J.H., Shin, T.S., Kim, M.Y., Cho, N.J. & Kim, J.D., (2018). Anthocyanins from *Cornus kousa* ethanolic extract attenuate obesity in association with anti-angiogenic activities in 3T3-L1 cells by down-regulating adipogenesis and lipogenesis. *PLoS ONE*, 13, e0208556.
9. Kim, M.J., Rehman, S.U., Amin, F.U. & Kim, M.O., (2017). Enhanced neuroprotection of anthocyanin-loaded PEG-gold nanoparticles against A β 1-42-induced neuroinflammation and neurodegeneration via the NF-KB /JNK/GSK3 β signaling pathway. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.*, 13:2533–2544.
10. Li, W., Hydamaka, A.W., Lowry, L. & Beta, T. (2009). *Comparison of antioxidant capacity and phenolic compounds of berries, chokecherry and seabuckthorn*. *Central European Journal of Biology*, 4, Issue: 4, Pagina 499-506.
11. Lin, B.W., Gong, C.C., Song, H.F., & Cui, Y.Y., (2017). Effects of anthocyanins on the prevention and treatment of cancer. *British Journal of Pharmacology*, 174, Issue 11, 1226-1243.
12. Qi, Q., Chu, M., Yu, X., Xie, Y., Li, Y., Du, Y., Liu X., Zhang, Z., Shi, J., & Yan, N. (2022). Anthocyanins and Proanthocyanidins: Chemical Structures, Food Sources, Bioactivities, and Product Development. *Food Reviews International*, 39(7):4581-4609 .
13. Richmond, R., Bowyer, M., & Vuong, Q. (2019). *Australian native fruits: Potential uses as functional food ingredients*. *Journal of Functional Foods*, 62,
14. Rugina, D., Diaconeasa, Z., Coman, C., Bunea, A., Socaciu, C. & Pinteaa, A. (2015). Chokeberry Anthocyanin Extract as Pancreatic beta-Cell Protectors in Two Models of Induced Oxidative Stress. *Oxid. Med. Cell. Longev*, 429075.
15. Tarone, A.G., Cazarin, C.B.B., & Marostica, J.M.R. (2020). Anthocyanins: New techniques and challenges in microencapsulation. *Food Research International*, 133.
16. Tsakiroglou, P., VandenAkker, N.E., Del Bo', C., Riso, P. & Klimis-Zacas, D., (2019). Role of Berry Anthocyanins and Phenolic Acids on Cell Migration and Angiogenesis: An Updated Overview. *Nutrients*, 11(5), 1075.
17. Wu, Y., Han, Y., Tao, Y., Li, D., Xie, G., Show, P.L., & Lee Z.Y. (2020). *In vitro* gastrointestinal digestion and fecal fermentation reveal the effect of different encapsulation materials on the release, degradation and modulation of gut microbiota of blueberry anthocyanin extract. *Food Research International*, 132.