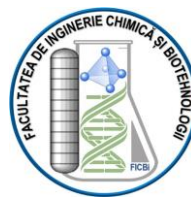


**UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE
POLITEHNICA BUCUREȘTI**



Facultatea de Inginerie Chimică și Biotehnologii

Teză de doctorat - Rezumat

Sisteme magnetice multifuncționale pe bază de compuși bioactivi

Conducător

Prof. Dr. Ing. Fikai Anton

Student

Ilie Cornelia-Ioana

BUCUREȘTI

2024

Cuprins

PARTEA I. Studiu de literatură	- 2 -
CAPITOLUL 1. Microbiota intestinală: impact asupra nutriției și sănătății	- 2 -
1.1. Introducere	- 2 -
1.2. Microbiota gastrointestinală și stresul oxidativ	- 3 -
1.3. Interacțiile microbiotei intestinale în cancerul colorectal	- 3 -
1.4. Modularea microbiotei intestinale	- 3 -
CAPITOLUL 2. Nanoparticule magnetice	- 4 -
2.1. Generalități	- 4 -
2.2. Sinteza nanoparticulelor magnetice	- 4 -
2.3. Aplicațiile biomedicale ale nanoparticulelor magnetice	- 4 -
CAPITOLUL 3. Tratamentul cancerului colorectal	- 5 -
3.1. Chemoterapeutice	- 5 -
3.2. Compuși naturali	- 5 -
3.3. Nanoterapeutice	- 5 -
PARTEA a II-a. Contribuții originale	- 6 -
CAPITOLUL 4. Obiective generale și specifice	- 6 -
CAPITOLUL 5. Compoziția chimică, proprietățile antioxidante și biologice ale extractelor de polen de albine	- 8 -
CHAPTER 6. Chemical, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Bee Bread Extracts	- 15 -
CHAPTER 7. Development of Magnetite-based Drug Delivery Nanocarriers	- 22 -
Capitolul 8. Concluzii generale și Originalitatea studiului	- 30 -
Concluzii generale	- 30 -
Contribuții originale și perspective	- 31 -
REFERINȚE	- 33 -

Cuvinte cheie: disbioză, produse apicole, compuși fenolici, sisteme de eliberare controlată, cancer colorectal.

PARTEA I. Studiu de literatură

CAPITOLUL 1. Microbiota intestinală: impact asupra nutriției și sănătății

1.1. Introducere

Microbiota umană este constituită din bacterii, fungi, archaea, viruși și protozoare care colonizează multe zone ale corpului, cum ar fi pielea, gura, glanda mamară, sistemul respirator, sistemul urogenital și tractul gastrointestinal (GIT) și aduc gazdei o zestre cu o mulțime de celule și gene decât ale sale. De asemenea, microbiota este cheia principală pentru menținerea și susținerea sănătății [1, 2]. Factorii determinanți precum nutriția, stilul de viață, vârsta, modificările hormonale sau genele ereditare influențează semnificativ echilibrul microbiotei, iar orice modificare (disbioză) poate determina alterarea treptată a echilibrului existent sau chiar boli. Sistemul imunitar este primul afectat de modificările homeostaziei umane, în special de disbioza GIT. În plus, dezechilibrul microbiotei intestinale este asociat cu rezistența ATB, inflamația cronică, tulburările neurologice și cardiovasculare și cancerul [1, 2]. GIT, cu bariera sa epitelială, are o suprafață totală de 400 m² și reprezintă un ecosistem complex, care conține > 10¹⁴ microorganisme (MO) care cuprind > două mii de specii și douăsprezece phyla diferite, iar microbiomul lor prezintă cu până la cinci sute de gene mai multe decât ADN-ul uman [3, 4]. Partea primară a microbiotei intestinale include *Actinomycetota (Actinobacteria)*, *Bacteroidota (Bacteroides)*, *Bacillota (Firmicutes)* și *Pseudomonadota (Proteobacteria)*. În plus, compoziția microbiotei GIT este influențată de numeroși factori precum condițiile etnico-geografice, metoda de livrare, genetica gazdei, dieta, istoricul medical, sistemul imunitar, indicele de masă corporală, nivelurile sanguine, vârsta, condițiile sanitare și socio-economice, somnul, medicamente (antibiotice-ATB, antihistaminice, metformină etc.), stil de viață etc. [5].

Compoziția microbiotei diferă în tractul gastrointestinal în funcție de condițiile de mediu din gură, esofag, stomac, intestin subțire și intestin gros [6-9]. Colonul (uman) cuprinde predominant la nivel de phylum: *Bacteroides*, *Firmicutes*, and *Proteobacteria* [10, 11]. Biodiversitatea microbiotei intestinale, în special a microbiomului fecal, este considerată un biomarker al sănătății, iar orice disbioză afectează în mod semnificativ homeostazia intestinală și imunologică. În plus, dezechilibrul microbiotei se reflectă în concentrația de MO și pierderea grosimii epiteliului intestinal, care devine mai susceptibil la agenții patogeni și la procesele inflamatorii [12].

1.2. Microbiota gastrointestinală și stresul oxidativ

Microbiota intestinală generează diverși metaboliți asociați cu multe procese biologice, în special cu reglarea sistemului imunitar. Mai mult, homeostazia microbiotei GIT este direct asociată de echilibrul REDOX, iar orice tulburare generează procese inflamatorii [13]. Mai mult, disbioza este corelată cu stresul oxidativ, iar expunerea prelungită la ROS generează mai multe boli intestinale, cum ar fi infecții enterice, boli inflamatorii intestinale (boala Crohn, colita ulceroasă) și cancerul colorectal (CRC) [14].

În general, multifuncționalitatea microbiotei intestinale este o caracteristică cheie în menținerea unei vieți sănătoase. Microbiota intestinală reglează proliferarea MO în GIT, transportul nutrienților, sistemul imunitar, vitaminele, enzimele, producția de acizi grași cu lanț scurt (SCFA) și metabolismul gazdei, degradează proteinele și carbohidrații [15].

1.3. Interacțiile microbiotei intestinale în cancerul colorectal

Compoziția microbiotei intestinale joacă un rol crucial în carcinogeneza colorectală. Comunitățile microbiene din intestin prezintă multe funcții, iar alterarea metabolismului și a funcției imune sunt factori determinanți în dezvoltarea CRC [16, 17].

Diversitatea microbiotei intestinale este modificată pentru pacienții diagnosticați cu CRC. În cea mai mare parte, speciile de bacterii cu potențial probiotic, cum ar fi: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Treponema*, *Faecalibacterium* spp., *Ruminococcus*, etc. sunt în concentrații scăzute, în timp ce *Fusobacteria*, *Akkermansia* spp, *Porphyromonadaceae*, *Methanobacterials*, și *Coriobacteridae* sunt în cantități ridicate [18]. În plus, *Fusobacterium* spp., *Clostridium septicum*, *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Streptococcus bovis*, *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecalis*, *Helicobacter pylori* sunt implicate în dezvoltarea CRC [19].

În plus, nivelurile de metaboliți microbieni sunt considerate biomarkeri pentru pacienții cu CRC. Evaluarea compoziției microbiene intestinale, a funcțiilor moleculare, a factorilor genetici și a asocierii cu profilele pacienților cu CRC ar putea servi ca biomarkeri pentru riscul sau screeningul CRC [20, 21].

1.4. Modularea microbiotei intestinale

Different treatment approaches comprising probiotics, prebiotics, symbiotics, postbiotics, ATBs, and fecal microbiota transplantation for modulation of gut microbiota and balance of the REDOX equilibrium state in GIT are applied [22, 23].

CAPITOLUL 2. Nanoparticule magnetice

2.1. Generalități

Istoria materialelor magnetice a început cu mii de ani în urmă, dar descoperirea magneților de dimensiuni nanometrice, cunoscuți sub numele de nanoparticule magnetice (MNP), a început odată cu începutul nanotehnologiei [24]. MNP-urile prezintă diferite proprietăți decât magneții de mărimi mari, ca urmare a dimensiunilor la scară nano, iar cele mai studiate MNP-uri cu proprietăți ferimagnetice sunt magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) și hematitul ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) [25, 26]. Proprietățile magnetice și de magnetorezistență ale magnetitei sunt asociate cu dimensiunea, forma și metoda de sinteză [25, 26].

2.2. Sinteza nanoparticulelor magnetice

În ultimii ani, cercetătorii au avut un mare interes în dezvoltarea diferitelor metode de obținere a NP-urilor cu forme regulate, stabilitate, proprietăți magnetice, biocompatibilitate etc. MNP-urile pot fi sintetizate folosind numeroase tehnici, care pot fi împărțite în convenționale (fizice, chimice sau biologice) și neconvenționale. Cele mai aplicate sunt metodele chimice datorită versatilității și diverselor căi, precum coprecipitarea, descompunerea termică, sol-gel, laser-ablația, hidrotermală, microemulsie etc [26-29].

2.3. Aplicațiile biomedicale ale nanoparticulelor magnetice

Nanoparticulele magnetice sunt utilizate în aplicațiile biomedicale datorită compatibilității lor biologice, proprietăților fizico-chimice și ușurinței de manipulare atunci când se utilizează un câmp magnetic. Utilizarea în aplicații biologice specifice depinde de proprietățile MNP-urilor, în special de distribuția dimensiunii particulelor, de forma și de interacțiunea dintre particule, proprietăți ce sunt datorate metodelor de sinteză [30, 31]. Condițiile pe care trebuie să le îndeplinească MNP-urile pentru a fi aplicate în aplicații biomedicale sunt toxicitatea minimă, stabilitatea chimică în fluidele biologice, compatibilitatea cu organismul și saturația mare a magnetizării [32].

Aplicațiile *in vivo* sunt reprezentate de metodele de diagnostic și de cele terapeutice (sisteme cu eliberare controlată și la loc țintit, hipertemia magnetica etc) [30, 33]. De asemenea, aplicațiile biomedicale se bazează pe interacțiunea cu câmpul magnetic sau cu lumina [34]. Studiile recente redau că utilizarea nanotehnologiei și a DDS denotă o alternativă în tratamentele antimicrobiene și antitumorală datorită biocompatibilității cu organismul și a posibilității de a fi administrate la locul dorit cu ajutorul câmpului magnetic [35, 36].

CAPITOLUL 3. Tratamentul cancerului colorectal

3.1. Chemoterapeutice

Tratamentul cancerului colorectal este diferit în funcție de stadiul, locul, numărul de tumori (metastaze) și starea imunologică a pacientului. În prezent, tratamentul standard implică intervenții chirurgicale, chimioterapie și radioterapie [37].

Unele dintre cele mai utilizate medicamente chimioterapeutice sunt fluoropirimidinele (5-fluorouracil și capecitabină), oxaliplatina și irinotecanul (IRI). 5-fluorouracil (5-FU) a fost utilizat în chimioterapie de mai bine de 60 de ani, iar în ultima perioadă, 5-FU este utilizat în combinație cu alte medicamente pentru a îmbunătăți proprietățile antitumorale [38]. Cu toate acestea, medicamentele chimioterapeutice generează mai multe efecte secundare care afectează întregul organism [39, 40]. Cu toate acestea, din cauza rezistenței la medicamente, a tratamentului inefficient și a efectelor severe ale medicamentelor chimioterapeutice pentru pacienții cu CRC, sunt necesare abordări noi, cum ar fi terapia combinată sau/și țintită.

3.2. Compuși naturali

În ultima perioadă, cercetătorii au acordat o mare atenție proprietăților terapeutice ale compușilor naturali în diferite forme de cancer. Având în vedere rezistența medicamentelor citostatice, combinația cu alți compuși este investigată intens [41]. Administrarea simultană a medicamentului farmaceutic cu un compus/extract natural bogat în compuși bioactivi ar putea crește eficacitatea medicamentului antitumoral și biodisponibilitatea acestuia, poate reduce doza și atenua efectele adverse [41].

3.3. Nanoterapeutice

Eficacitatea și efectele adverse în timpul tratamentului cancerului necesită abordări noi, iar în acest scop, utilizarea nanotehnologiei a câștigat un interes semnificativ în ultimii ani. Avantajele utilizării NP includ îmbunătățirea solubilității medicamentului, stabilității, biodisponibilității, biocompatibilității, diminuarea efectelor adverse și creșterea ratelor de supraviețuire [42]. Mai mult, dezvoltarea intensivă a nanocarriers și a nanomaterialelor este de interes datorită livrării de compuși bioactivi/biomolecule la locurile vizate, reducând drastic efectele adverse ale chimioterapicelor [42]. Nanopurtătorii au capacitatea de a transporta agenți bioactivi prin direcționarea pasivă în arhitectura neregulată și hipervascularizată a tumorilor. MNP-urile prezintă diverse aplicații, inclusiv terapia cancerului colorectal, datorită biocompatibilității, suprafeței efective, transportului țintit etc[43].

PARTEA a II-a. Contribuții originale

CAPITOLUL 4. Obiective generale și specifice

Motivul abordării problemei disbiozei microbiotei și aplicării nanotehnologiei provine din dezavantajele legate de metodele convenționale de furnizare a compușilor bioactivi. Homeostazia microbiotei umane este cheia principală pentru menținerea sănătății, iar un dezechilibru prelungit este asociat cu patologii severe, cum ar fi rezistența la ATB, inflamația cronică, bolile neurologice etc. corelat cu tulburarea sistemului imunitar și, respectiv, dezvoltarea cancerului colorectal.

În plus, datorită efectelor severe și rezistenței medicamentelor chimioterapeutice, microbiota intestinală este foarte deteriorată și sunt necesare abordări noi pentru recuperarea acesteia și terapia cancerului colorectal. Una dintre ele este reprezentată de administrarea simultană a medicamentelor citostatice cu fitochimice deoarece compușii naturali ar putea îmbunătăți eficacitatea medicamentului și biodisponibilitatea acestuia, pot reduce doza și pot atenua efectele adverse.

Cu toate acestea, nanotehnologia ar putea îmbunătăți proprietățile terapeutice ale compușilor bioactivi prin utilizarea DDS și a terapiei țintite, deoarece nanopurtătorii pot transporta agenți bioactivi prin direcționarea pasivă a arhitecturii neregulate și a sistemelor hipervasculare ale tumorilor. Pe de altă parte, NP-urile precum NP-urile magnetice au câștigat o atenție specială datorită stabilității, biodisponibilității, biocompatibilității, suprafeței efective și transportului vizat cu un câmp magnetic.

În consecință, această lucrare s-a concentrat pe studiul proprietăților chimice și biologice ale unei surse ieftine și ecologice de compuși biologic activi (produse apicole) și pe dezvoltarea DDS-urilor bazate pe utilizarea MNP-urilor și a combinației de medicamente chimioterapeutice cu extracte bogate în compuși fenolici.

Pe baza acestui obiectiv general, au fost clasificate trei obiective, cum ar fi:

1. Obținerea extractelor de polen și evaluarea compoziției chimice, activității antioxidante și a proprietăților biologice.
2. Obținerea extractelor de păstură și evaluarea proprietăților chimice, antioxidante și antimicrobiene.
3. Dezvoltarea unor sisteme de eliberare pe bază de nanoparticule magnetice ca transportori pentru compușii bioactivi.

Fiecare dintre obiectivele generale stabilite anterior va fi detaliat în termeni de activități specifice de sinteză, caracterizări fizico-chimice, evaluări din punct de vedere biologic și investigarea potențialului de utilizare a nanotransportorilor dezvoltati pentru evaluările *in vivo*.

Primul obiectiv a fost evaluarea proprietăților chimice și biologice ale probelor de BP (bee pollen/ polen de albine) achiziționate de la apicultori din România. Inițial, extractele de BP (BPE) au fost obținute din BP brut colectat într-o zonă lipsită de poluare. În al doilea rând, compoziția BP/BPE a fost evaluată folosind metoda spectrofotometrică (fenoli totali și flavonoide totale) și analiza cromatografică (UHPLC-DAD-ESI/MS și GC-MS). În plus, au fost evaluate capacitatea antioxidantă, proprietățile antimicrobiene și citotoxice. În ceea ce privește activitatea antimicrobiană, au fost evaluate inițial testele calitative și cantitative, urmate de un test semicantitativ de aderență la un substrat inert și efectul antimicrobian al BPE-urilor asupra capacității de aderență a tulpinilor microbiene cu potențial patogen. Mai mult, pentru a determina capacitatea BPE-urilor de a modula microbiota intestinală, a fost evaluat efectul prebiotic al BPE-urilor asupra capacității de aderență și creșterea tulpinilor bacteriene cu potențial probiotic. În plus, au fost evaluate efectele antimicrobiene sinergice ale BPE-urilor și compușilor solubili ai tulpinilor lactice (*L. rhamnosus* MF9 și *E. faecalis* 2M17) asupra capacității de aderență la substraturile celulare sensibile ale tulpinilor patogene selectate.

Al doilea obiectiv este de a determina compoziția chimică a probelor de păstură (BB- bee bread), proprietățile antioxidante și antimicrobiene. În primul rând, analiza palinologică a fost efectuată utilizând SEM și un microscop optic, iar compoziția chimică a probelor BB a fost determinată folosind spectroscopie FT-IR. În al doilea rând, au fost pregătite BBE-urile, iar bogăția PC a fost evaluată prin spectrofotometrie și metode cromatografice. Activitatea antioxidantă a fost realizată și prin analiză spectrofotometrică. Mai mult, proprietățile antimicrobiene ale BBE au fost evaluate atât pentru tulpinile patogene standard, cât și pentru cele clinice. În plus, au fost efectuate efecte inhibitorii asupra capacității de aderență microbiană la substratul inert generat de BBE.

Obiectivul final a fost dezvoltarea sistemelor de eliberare a medicamentelor pe bază de magnetită pentru a îmbunătăți activitatea antitumorală a 5-FU și pentru a diminua efectele adverse asupra microbiotei intestinale. Inițial, MNP-urile au fost sintetizate printr-o metodă de coprecipitare asistată de pulverizare și încărcate cu extracte BP/BB și medicamentul antitumoral. Sistemele dezvoltate au fost caracterizate morfologic și structural. Mai mult, profilurile de eliberare ale compușilor bioactivi au fost evaluate atât pentru agentul antitumoral, cât și pentru PC. În mod similar, activitatea antioxidantă a fost realizată prin trei metode. În plus, au fost evaluate proprietățile antibacteriene și antitumorale ale nanopurtătorilor. În plus, a fost evaluată influența MNP-urilor încărcate asupra *L. rhamnosus* MF9.

CAPITOLUL 5. Compoziția chimică, proprietățile antioxidante și biologice ale extractelor de polen de albine

Acest studiu a evaluat proprietățile chimice și biologice ale probelor de polen de albine din România. În primul rând, extractele alcoolice de polen de albine (BPE) au fost obținute din polenul crud recoltat de albinele *Apis mellifera carpatica*. Compoziția chimică a BPE a fost obținută prin determinarea conținutului total de fenoli și a conținutului total de flavonoide, analiza UHPLC-DAD-ESI/MS a compușilor fenolici și analiza GC-MS a acizilor grași, esterilor și terpenelor. În plus, activitatea antioxidantă a fost evaluată folosind metoda Trolox Equivalent Antioxidant Capacity. În plus, au fost evaluate proprietățile biologice ale BPE.

Materiale și Metode

Materiale

Probele de BP au provenit din polen recoltat de albine în 2020, de la specii de plante de floră spontană pe tot parcursul primăverii, la diferite intervale de timp în funcție de condițiile climatice și de diversitatea plantelor cu flori.

Prepararea Extractelor de Polen

Extracțiile au fost efectuate prin încălzirea a 2 g BP crud la 40 °C cu etanol 70% (v/v) [44-46]. Această metodă conține mai mulți pași, cum ar fi vortexarea, ultrasonicarea și centrifugarea.

Rezultate și Discuții

Compoziția Chimică a Extractelor de Polen

Polenul de albine are o compoziție complexă care depinde de mulți factori [47]. Clasele de compuși de interes, în ceea ce privește activitatea antioxidantă și antimicrobiană, sunt în principal compușii fenolici (PC), terpeni și FA, care vor fi prezentate mai jos.

Determinarea TPC, TFC și TEAC

Rezultatele TPC, TFC și TEAC sunt prezentate în **Table 1** ca medie ±SD.

Table 1. Conținutul total de fenoli, conținutul total de flavonoide și activitatea antioxidantă

Probă	TPC (GAE) ¹	TFC (QE) ²	TEAC ³
P1	15.51 ± 0.01 ^{c,d}	0.27 ± 0.01 ^d	0.06 ± 0.02 ^b
P2	16.15 ± 0.02 ^{c,d}	0.30 ± 0.01 ^d	0.07 ± 0.01 ^{b,d}
P3	13.24 ± 0.01 ^d	0.20 ± 0.02 ^d	0.04 ± 0.02 ^d
P4	14.46 ± 0.01 ^d	0.26 ± 0.01 ^d	0.05 ± 0.01 ^b
P5	10.77 ± 0.02 ^d	0.19 ± 0.01 ^d	0.03 ± 0.01 ^{a,d}

¹ TPC exprimat ca mg gallic acid/g BP; ² TFC exprimat mg quercetin/g BP; and ³ TEAC exprimat ca mmol Trolox/g BP.

Conform rezultatelor prezentate în tabelul anterior, P1, P2 și P4 au cele mai ridicate niveluri de TPC și TFC. Datele privind activitatea antioxidantă BPE (metoda TEAC) se corelează cu

rezultatele TPC și TFC. Se poate observa că P1, P2 și P4, care au un conținut mai mare atât de fenoli, cât și de flavonoide, au și cea mai bună activitate antioxidantă, ceea ce se corelează cu alte studii [48, 49].

Profilul compușilor fenolici prin analiza UHPLC-DAD-ESI/MS

Rezultatele prezentate în **Table 2** prezintă identificarea și cuantificarea a 20 de compuși fenolici din extractele de polen de albine.

Table 2. Concentrațiile de acizi fenolici și flavonoide din polen ($\mu\text{g/g}$).

Compus fenolic	Probă				
	P1	P2	P3	P4	P5
Acizi fenolici					
gallic acid	0.015	0.087	0.157	0.075	2.310
3,4-dihydroxybenzoic acid	0.254	0.401	0.454	0.209	0.549
4-hydroxybenzoic acid	7.603	19.770	8.455	4.458	2.685
chlorogenic acid	0.733	2.441	6.481	46.939	0.275
caffeic acid	0.404	0.471	0.734	1.167	0.275
syringic acid	0.090	ND	ND	ND	0.325
<i>p</i> -coumaric acid	1.227	1.151	1.153	1.256	1.036
ferulic acid	2.978	2.894	0.961	1.271	1.199
cinnamic acid #	0.898	0.227	2.236	1.286	0.400
Flavonoide					
epicatechin	0.868	1.029	0.070	1.286	0.137
catechin	1.257	0.959	0.332	0.224	0.587
rutin	45.662	1.691	135.301	69.451	ND
myricetin	0.943	0.506	0.052	0.224	0.012
quercetin	3.577	1.639	3.214	7.883	5.981
kaempferol	2.155	1.308	7.337	8.676	26.472
isorhamnetin	3.502	0.558	12.141	5.086	40.220
apigenin	0.015	0.052	0.070	0.165	2.735
pinocembrin	0.644	2.197	0.559	1.227	0.412
galangin	ND	0.506	0.017	0.239	0.175
chrysin	0.464	1.970	0.384	0.853	0.387

* ND (nedetectat)

Conform acestor rezultate, fiecare probă de BPE are profilul său fenolic. Unii acizi fenolici au fost prezenți în cantități semnificative, în timp ce flavonoidele au fost detectate uneori în cantități mai mari decât acizii fenolici.

Analiza extractelor de polen prin GC-MS

Pe baza analizei GC-MS, au fost detectați și cuantificați 28 de compuși. Unele terpenoide au fost prezentate ca părți minore (mai puțin de 1% compus/probă de BP). FA este identificat în procente mai mari, cum ar fi esterul metilic al acidului stearic (88,31% pentru P4), acidul linolenic (43,42% -P5; 43,23% -P3), acidul linoleic (19,40% -P1) și acidul palmitic (13,53% - P2). Rezultatele confirmă că variabilitatea profilului chimic al probelor de BP depinde de speciile de plante de la care au recoltat albinele [50-52]. Mai mult, unele extracte pot fi o sursă valoroasă de acizi grași nesaturați.

Activitatea Biologică a Extractelor de Polen de Albine**Evaluarea Calitativă a Activității Antimicrobiene**

În studiul nostru, toate BPE-urile testate au arătat activitate antimicrobiană împotriva tulpinilor patogene, iar bacteriile Gram-pozitive au fost mai sensibile decât bacteriile Gram-negative și fungi. Cele mai sensibile tulpini Gram-negative au fost *E. coli* ATCC 25922 și *P. aeruginosa* ATCC 25785. Cea mai sensibilă tulpină din speciile *Candida* sp. a fost *C. krusei*.

Evaluarea Cantitativă a Activității Antimicrobiene

Valorile CMI (concentrației minime inhibitorii) sunt reprezentate de cea mai mică concentrație a extractelor testate care inhibă dezvoltarea microbiană. Rezultatele sunt prezentate în **Table 3**, exprimate ca $\mu\text{g/mL}$.

Table 3. Determinarea valorilor CMI ($\mu\text{g/mL}$).

Tulpină	CMI				
	P1	P2	P3	P4	P5
Bacterii Gram-pozitive					
1. <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	1250	2150	4290	2510	3000
2. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25422	1250	1080	2150	630	380
Bacterii Gram-negative					
1. <i>Enterobacter cloacae</i>	2510	2150	540	2510	750
2. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25923	1250	540	540	1250	1500
3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25853	630	540	270	1250	1500
Fungi					
1. <i>Candida albicans</i> ATCC 1688	5010	2150	4290	630	750
2. <i>Candida famata</i>	1250	2150	1070	2510	3000
3. <i>Candida glabrata</i>	630	540	1070	1250	3000
4. <i>Candida guilliermondii</i>	630	2150	2150	1250	750
5. <i>Candida krusei</i>	2510	1080	270	1250	3000
6. <i>Candida lusitanae</i>	1250	2150	270	2510	3000

S. aureus ATCC 25422 a fost cea mai sensibilă bacterie Gram-pozitivă la influența probelor BPE, cu cele mai scăzute valori ale CMI pentru probele P4 și P5. Cele mai eficiente extracte antimicrobiene au fost obținute din polen brut derivat din *C. monogyna*, *T. officinale*, *Salix* sp., *Malus* sp. și *Prunus* sp. (P1, P2 și P3). Studiile recente [53-57] relatează că activitatea antimicrobiană se corelează cu activitatea antioxidantă a probelor.

Evaluarea Semicantitativă a Aderenței Microbiene la Substrat Inert

Influența BPE asupra aderenței tulpinilor microbiene patogene la substratul inert este prezentată în **Table 4**.

Table 4. Determinarea concentrației minime pentru eradicarea biofilmelor (MBEC)

Tulpină	MBEC ($\mu\text{g/mL}$)				
	P1	P2	P3	P4	P5
Bacterii Gram-pozitive					
1. <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	1250	2.150	2150	2510	3000
2. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25422	1250	1080	2150	1250	750
Bacterii Gram-negative					
1. <i>Enterobacter cloacae</i>	1250	1080	1070	2510	1500
2. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25923	2510	270	540	1250	1500
3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25853	630	540	270	1250	1500

Fungi					
1. <i>Candida albicans</i> ATCC 1688	2510	2150	2150	630	750
2. <i>Candida famata</i>	1250	2150	1070	2510	3000
3. <i>Candida glabrata</i>	630	540	1070	1250	3000
4. <i>Candida guilliermondii</i>	630	2150	2150	1250	750
5. <i>Candida krusei</i>	2510	1080	270	1250	1500
6. <i>Candida lusitanae</i>	630	2150	1070	2510	3000

Având în vedere valorile MIC și MBEC (Table 3 și Table 4), *S. aureus* ATCC 25422, *P. aeruginosa* ATCC 25853 și *C. glabrata* sunt cele mai sensibile tulpini testate. BPE-urile au avut o influență moderată asupra creșterii fungilor. Testele MIC și MBEC au confirmat testele calitative antimicrobiene și s-au corelat cu rezultatele analizei compoziției chimice.

Evaluarea Efectelor Inhibitorii a Extractelor de Polen asupra Abilității Tulpinilor Microbiene Testate de a se Atașa la Substrat Celular

Efectul antimicrobian al compușilor bioactivi din BPE asupra capacității de aderență a tulpinilor microbiene este prezentat în figurile de mai jos.

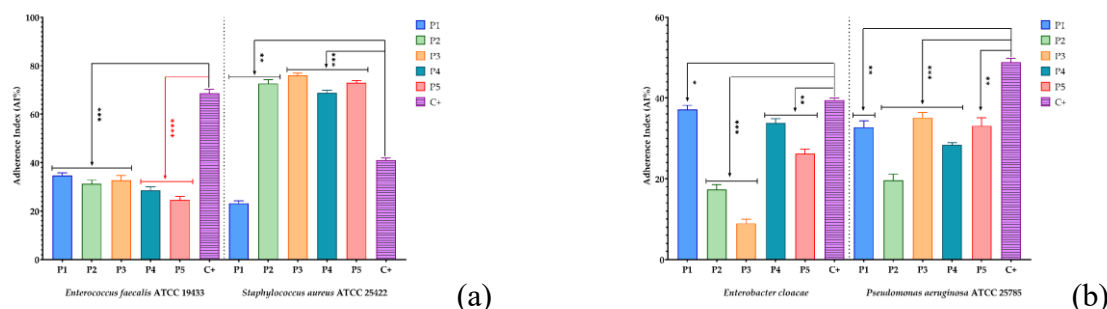


Figure 1. Reprezentarea grafică a valorilor AI% reprezentând influența BPE a capacității de aderență a bacteriilor Gram-pozitive (a) și Gram-negative (b) (P1–P5)-probe de BPE; (C+)–controlul de aderență bacteriană

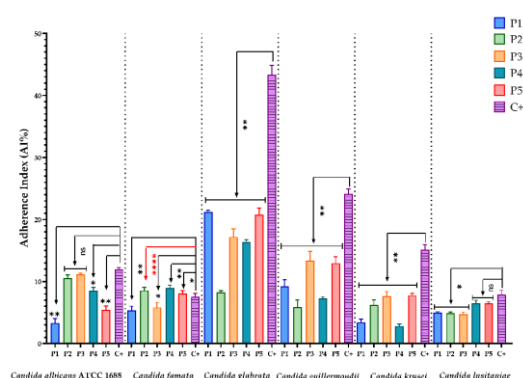


Figure 2. Reprezentarea grafică a valorilor AI% reprezentând influența BPE a capacității de aderență a fungilor (P1–P5)-probe de BPE; (C+)–controlul de aderență.

Datele experimentale arată că pentru drojdiile și tulpinile bacteriene Gram-negative, toate BPE-urile au redus capacitatea de aderență în comparație cu martor (Figure 1 și Figure 2). O excepție a fost *C. famata*, iar doar P1 și P3 au determinat sensibilitate. În ceea ce privește tulpinile bacteriene Gram-pozitive, același efect inhibitor a fost observat pentru *E. faecalis* ATCC 19433. Totuși, pentru *S. aureus* ATCC 25422, doar P1 inhibă capacitatea de a adera la substratul inert. Activitatea biologică a polenului de albine depinde de profilul compoziției chimice, în principal

flavonoide, acizi fenolici, AG, fitosteroli și enzime [58] sau tulpini *Lactobacillus* din BP crud [59-61]. Activitatea antimicrobiană este profund asociată conținutului fenolic [62].

Evaluarea Efectului Prebiotic al Extractelor de Polen asupra Abilității Tulpinilor Microbiene cu Potențial Probiotic de a Adera la Substrat Celular

Relația prebioticelor cu microbiota intestinală este esențială pentru îmbunătățirea sănătății umane. Ele pot modula compoziția, creșterea și populația microbiotei intestinale [63].

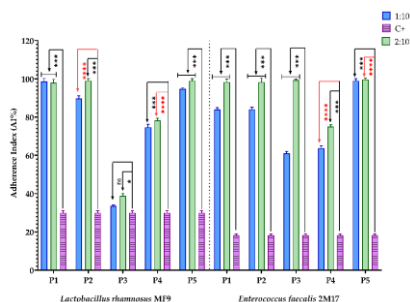


Figure 3. Influența extractelor de polen asupra capacității de aderență a tulpinilor bacteriene cu potențial probiotic (P1–P5)-probe de BPE; (C+)-control de aderență bacteriană.

Comparând cu controlul, toate extractele au stimulat capacitatea de aderență (Figure 3) a tulpinilor probiotice *L. rhamnosus* MF9 și *E. faecalis* 2M17.

Evaluarea Efectului Prebiotic al Extractelor asupra Curbelor de Creștere a Tulpinilor cu Potențial Probiotic

BP poate fi considerat o sursă esențială de compuși prebiotici, iar efectul extractelor de polen asupra creșterii *L. rhamnosus* MF9 și *E. faecalis* 2M17 este prezentat în Figure 4.

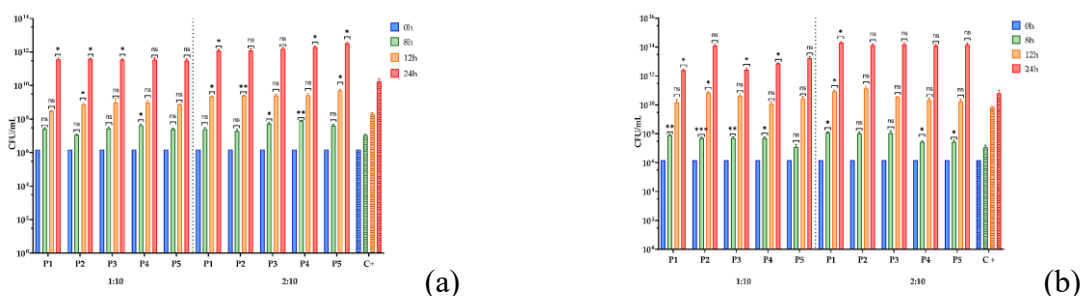


Figure 4. Influența BPE asupra creșterii *L. rhamnosus* MF9 (a) și *E. faecalis* 2M17 (b); (P1–P5)-BPE-probe; (C+) control de creștere.

În ceea ce privește efectul prebiotic al BPE asupra curbei de creștere pentru tulpinile probiotice testate, toate BPE-urile au stimulat creșterea tulpinilor microbiene cu potențial probiotic comparativ cu martorul, la ambele diluții 1:10 și 2:10.

Evaluarea efectului sinergic al extractelor și tulpinilor probiotice asupra capacității de aderență la substrat celular a unor tulpini patogene

Pe lângă evaluarea efectului antimicrobian al BPE și al compușilor solubili ai tulpinilor lactice asupra capacității de aderență la substratul celular sensibil al unor tulpini patogene, se poate

considera că BPE, împreună cu compușii solubili ai *L. rhamnosus* MF9 și *E. faecalis* 2M17, a inhibat fără excepție capacitatea de aderență a *C. guilliermondii* și *E. cloacae*, comparativ cu controlul pozitiv la 1:10 (**Figure 5**).

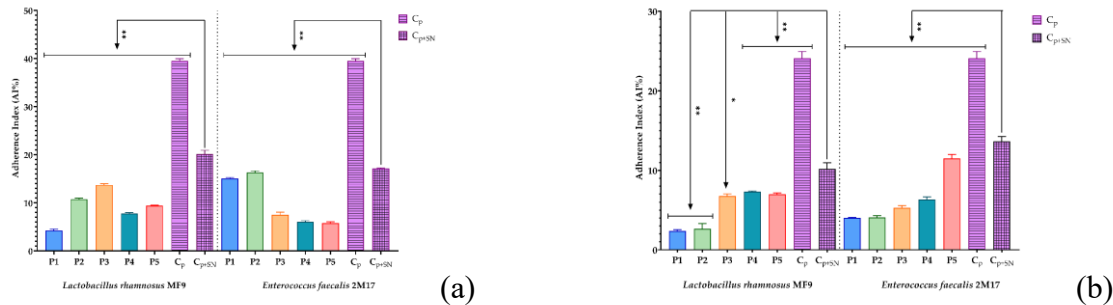


Figure 5. Influența BPE și a compușilor solubili ai tulpinilor probiotice (SN) asupra capacității de aderență a *Enterobacter cloacae* (a) și *Candida guilliermondii* (b); (P1–P5)-BPE probe, control de aderență al tulpinii patogene (Cp), control aderență format din tulpina patogenă împreună cu supernatant probiotic (C_{P+SN}).

Conform rezultatelor obținute în acest studiu, BPE-urile, bogate în compuși cu efecte prebiotice, au stimulat puternic creșterea tulpinilor probiotice. Mai mult, atunci când au fost în contact cu compușii solubili ai celor două tulpini lactice, au determinat un efect inhibitor sinergic asupra procesului de multiplicare a celor două tulpini clinice cu potențial patogen. Din cunoștințele noastre, nu există date disponibile în literatură care să confirme acest lucru.

Activitatea Citotoxică a extractelor de polen

Viabilitatea și proliferarea celulelor tumorale *in vitro* în prezența BPE-urilor au fost examinate folosind metoda MTT (**Figure 6a**), iar potențialul citotoxic al tuturor BPE-urilor pe celulele tumorale a fost evaluat prin testul LDH care indică numărul de celule moarte din cultură (**Figure 6b**).

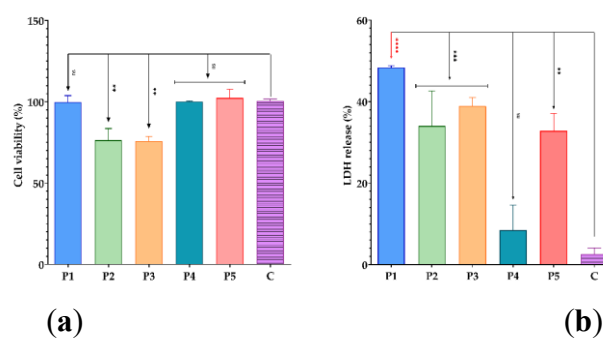


Figure 6. (a) MTT assay. (b) LDH assay; (P1–P5) BPE samples, C-cell culture control.

Analiza MTT a arătat că toate extractele de polen nu au stimulat proliferarea celulelor Hep-2 (**Figure 6**). P3 are cel mai mic procent de viabilitate celulară, prezentând un efect inhibitor, urmat de P2. Aceste rezultate sunt confirmate de nivelul crescut de LDH în prezența acestor două probe (**Figure 6b**). Proba P5 a stimulat proliferarea celulelor Hep-2, dar efectul stimulator a fost

ne semnificativ. Dintre BPE-urile testate, P4 a avut cel mai scăzut nivel de citotoxicitate, după cum arată cuantificarea LDH.

În schimb, P1 are cele mai ridicate niveluri de LDH (Figure 6a) dar nu a influențat semnificativ viabilitatea și proliferarea celulelor tumorale, aceste rezultate fiind contradictorii. În rest, P2 și P3 au prezentat cele mai bune efecte citotoxice asupra celulelor tumorale testate și s-au corelat cu rezultatele anterioare; pot fi considerați potențiali agenți inhibitori ai proliferării tumorale.

Concluzii

BP este o sursă excelentă de compuși fenolici și acizi grași, inclusiv compuși polinesaturați și terpenici, responsabili pentru activitatea antioxidantă. Probele P1, P2 și P4 au avut un conținut mai mare de fenoli și flavonoide și cea mai bună activitate antioxidantă. Fiecare probă de BPE a avut propriul profil fenolic. Mai mulți compuși fenolici au fost prezenți în cantități semnificative: acid 4-hidroxi benzoic (P2), acid clorogenic (P4), acid ferulic (P1, P2) și acid galic (P5). În ceea ce privește flavonoidele, au fost predominante rutin ($P3 > P4 > P1$), quercetin ($P4 > P5$), kaempferol ($P5 > P4 > P3$) și isorhamnetin ($P5 > P3$). Unele terpene au fost identificate ca părți/constituenți minori (globulol, metileugenol etc.). FA a fost în procente mai mari, cum ar fi esterul metilic al acidului stearic (P4), acidul linolenic (P3, P5) și acidul linoleic (P1).

Toate BPE-urile au prezentat activitate antimicrobiană împotriva tulpinilor patogene. Bacteriile Gram pozitive și *Candida* sp. au fost mai sensibile decât bacteriile Gram negative. Activitatea antibacteriană pare să fie legată de compoziția chimică a BP, iar un efect sinergic poate fi responsabil pentru activitatea antimicrobiană în unele cazuri.

Compușii fenolici din extractele studiate ar putea fi o sursă bogată de compuși prebiotici, având în vedere efectul stimulator al creșterii tulpinilor microbiene cu potențial probiotic. În plus, a fost observat un efect antimicrobian sinergic al BPE-urilor împreună cu compușii solubili ai *L. rhamnosus* MF9 și *E. faecalis* 2M17 împotriva a două tulpini patogene clinice. În plus, toate BPE-urile nu au stimulat proliferarea celulelor Hep-2, iar probele P2 și P3 au prezentat un efect inhibitor mai mare. De asemenea, activitatea antitumorală a P2 și P3 este confirmată prin testul de citotoxicitate.

Aceste rezultate indică potențialul polenului de albine de a fi utilizat ca agent antimicrobian, prebiotic și inhibitor al proliferării tumorale, care în asociere cu compușii prebiotici, menține și chiar îmbunătățește homeostazia intestinală prin promovarea refacerii microbiotei intestinale (rebioza), combaterea sau prevenirea bacteriilor. infecției și inhibarea apariției proceselor tumorale.

CAPITOLUL 6. Proprietățile Chimice, Antioxidante și Antimicrobiene ale Extractelor de Păstură

Prezentul studiu ilustrează analiza palinologică a douăsprezece probe de păstură (bee bread-BB), compoziția chimică și activitățile antioxidante și antimicrobiene. În primul rând, a fost efectuată analiza originii botanice folosind microscopia electronică de baleiaj (SEM) și un microscop optic (LM). Compoziția chimică a fost determinată prin spectroscopie FTIR, iar compușii fenolici au fost evaluați folosind metode spectrofotometrice (compuși fenolici totali și flavonoide totale) și metode cromatografice. În plus, capacitatea antioxidantă a fost determinată folosind un test spectrofotometric.

Activitatea antimicrobiană a extractelor de păstură (bee bread extracts -BBE) a fost evaluată calitativ și cantitativ pe unele tulpini patogene (standard și clinice). În plus, noutatea acestui studiu constă în activitatea inhibitorie a capacității de aderență microbiană (bacteriană și fungică) la substratul inert indusă de BBE, precum și activitatea lor antifungică asupra *Candida krusei* și *Candida kefyr*, care sunt raportate pentru prima dată. .

Materiale și Metode

Materiale

Probele de păstură au fost furnizate de apicultori români în perioada primăvara și vara anului 2022 și au fost depozitate la -45°C. Stupinele au fost distribuite în șapte județe ale României: Argeș, Călărași, Giurgiu, Prahova, Sibiu, Vâlcea și Teleorman. BB-urile provin din polenul recoltat de albine *Apis mellifera carpatica* din flora sălbatică și plantele de casă, iar din aceste motive s-a efectuat o analiză palinologică pentru a stabili cu exactitate originea botanică a păsturii.

Prepararea Extractelor de Păstură

Extractele au fost efectuate folosind o metodă descrisă în studiul/ capitolul anterior [46].

Rezultate și Discuții

Analiza palinologică

Atribuțiile/ Corelările taxonomice ale BB au fost efectuate folosind LM și SEM, iar figurile 7 și 8 reprezintă rezultatele detaliate.

Rezultatele analizei palinologice prezentate în Figura 7 indică faptul că au fost identificate 31 de familii și că există o interconexiune detaliată între familiile de plante și probele BB. De exemplu, BB8 a prezentat polen dintr-o listă extinsă de familii de plante (24), iar BB6 și BB7 au fost din 22. De asemenea, în probele BB1, BB3, BB5 și BB9, au fost identificate 21 de familii de

plante. BB10 a fost eșantionul cel mai puțin variat, care conținea polen din 9 familii de plante, cu familiile dominante *Salicaceae*, *Primulaceae* și *Fabaceae*.

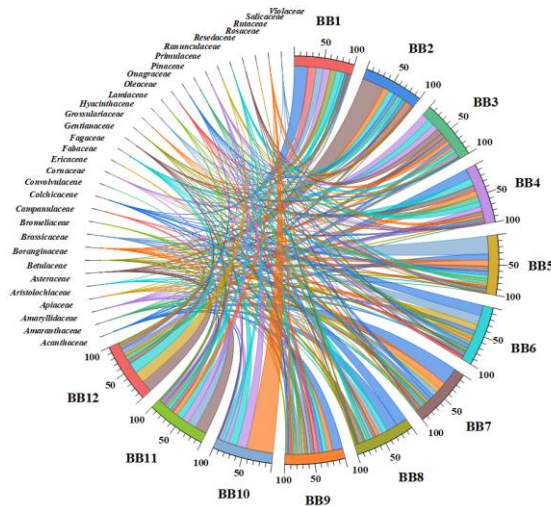


Figure 7. Diagrama Chord bazată pe relația dintre familiile botanice și probele de păstră

Analiza statistică multivariată a fost efectuată asupra familiilor de plante identificate în probe pentru diferențierea și gruparea acestora pe baza analizei palinologice. Graficul PCA al atribuțiilor taxonomice ale plantelor din BP (Figura 8a) a arătat o discriminare clară a BB12 și a unor familii de proveniență, care sunt corelate cu abundența relativă. În special, BB1 și BB4 sunt grupate în partea stângă a figurii 8a, iar *Resedaceae*, *Rosaceae*, *Hyanthaceae* și *Grossulariaceae* sunt familiile reprezentative/specifice din care provine polenul acestor probe. Celelalte familii sunt asociate cu BB5, BB6, BB7, BB8 și BB9.

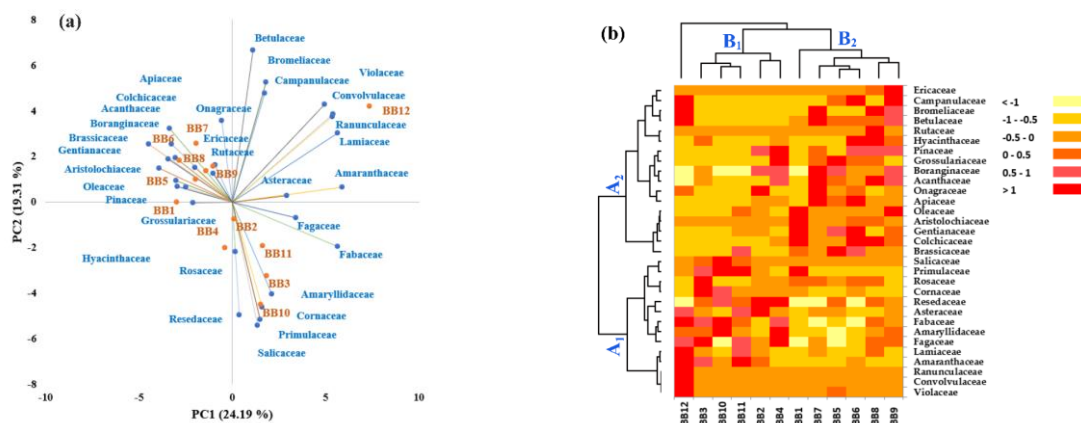


Figure 8. Discriminarea probelor de păstră pe baza unei analize palinologice. (a) Analiza componentelor principale și (b) analiza clusterului ierarhic și a hărții termice.

Conform figurii 8b, datele obținute confirmă rezultatele anterioare. Ca în Figura 8a, eșantioanele BB au fost grupate în două grupuri principale (B1 și B2), iar acest lucru a evidențiat o discriminare a BB12. Harta termică combinată cu clusterule a exprimat un instantaneu al originii botanice a probelor BB și a fost reprezentată de un cluster principal, care a fost fuzionat în două subcluster (A1 și A2).

Compoziția chimică a Extractelor de Păstură

Compoziția complexă a BB poate varia foarte mult din cauza multor factori, cum ar fi speciile de plante și albine, aria geografică, schimbările sezoniere, tulpinile de fermentație, activitățile apiculturilor etc. [64, 65]. Extractele alcoolice (BBE) au fost analizate pentru a stabili compoziția chimică a probelor.

Spectroscopia FTIR

Spectrele FTIR pentru toate probele BB au fost măsurate între 4000 și 400 cm^{-1} , așa cum este ilustrat mai jos. Figura 9 arată că toate probele BB au prezentat spectre FTIR similare, care au fost caracterizate în studiile anterioare [45, 66, 67]. De asemenea, toate probele BB au prezentat benzi de adsorbție cu diferențe spectrale minore. Spectrele FTIR au sugerat prezența apei, gruparea funcțională a aminelor I și II, amidele (care sugerează prezența aminoacizilor și proteinelor), carbohidrații, lipidele, PC-urile și FA.

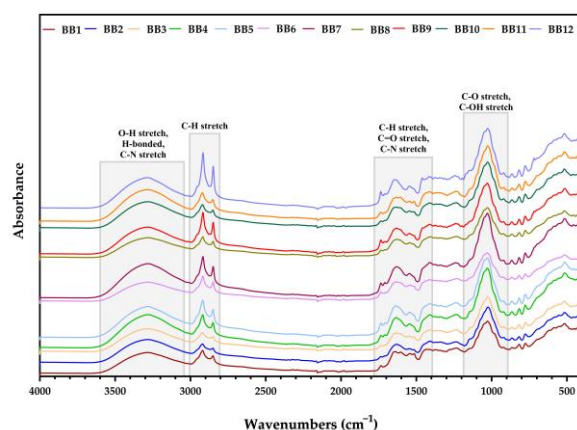


Figure 9. Spectrele FTIR ale BB

Determinarea TPC, TFC și TEAC

Rezultatele TPC, TFC și TEAC sunt prezentate în Tabelul 5.

Table 5. Conținutul de fenoli totali, flavonoide și a activității antioxidante

Sample	TPC (GAE) ¹	TFC (QE) ²	TEAC ³
BBE1	12.40 ± 0.010	0.87 ± 0.502	0.07 ± 0.020
BBE2	7.10 ± 0.005	0.52 ± 0.031	0.02 ± 0.010
BBE3	12.50 ± 0.005	1.86 ± 0.516	0.03 ± 0.005
BBE4	14.40 ± 0.010	0.53 ± 0.020	0.04 ± 0.006
BBE5	11.40 ± 0.005	0.50 ± 0.052	0.04 ± 0.009
BBE6	13.60 ± 0.005	0.60 ± 0.051	0.06 ± 0.010
BBE7	11.20 ± 0.025	0.45 ± 0.035	0.04 ± 0.004
BBE8	18.30 ± 0.029	0.52 ± 0.090	0.05 ± 0.020
BBE9	15.80 ± 0.047	0.59 ± 0.030	0.05 ± 0.008
BBE10	18.30 ± 0.051	0.70 ± 0.050	0.05 ± 0.050
BBE11	14.90 ± 0.017	0.95 ± 0.011	0.03 ± 0.030
BBE12	11.20 ± 0.015	0.85 ± 0.500	0.02 ± 0.005

¹ TPC expressed as mg gallic acid equivalents/g BB; ² TFC expressed as mg quercetin/g BB; ³ TEAC expressed as mmol Trolox/g BB.

Rezultatele prezentate în Tabelul 5 arată că BBE8 și BBE10 au prezentat cele mai mari valori ale TPC. Corelarea rezultatelor TPC și TFC cu valorile TEAC este, de asemenea, uneori dificilă. Totuși, chiar dacă acizii fenolici și flavonoizii sunt principalii compuși care determină activitatea antioxidantă, alte biomoleculă pot influența acest lucru [68-73]. Activitatea TPC, TFC și antioxidantă depind de speciile de plante din care probele provin.

Analiza compușilor fenolici prin UHPLC-DAD-ESI/MS

În total de 24 de compuși, inclusiv acizi fenolici, flavonoide și derivați și stilben *t*-resveratrol, au fost identificați. Conform datelor cantitative, flavonoidele au fost cantificate în cantități mai mari decât acizii fenolici, ceea ce este în concordanță cu conținutul TPC și TFC din BB și cu datele din literatură [74]. Mai mult, extractele conțin alți compuși fenolici, cum ar fi rutin, hesperidin, resveratrolul și acidul abscisic (ABA). În general, probele au avut cantități semnificative de acizi fenolici, cum ar fi acidul *p*-cumaric, acidul galic, acidul cafeic și acidul cinamic. S-au observat conținuturi ridicate pentru quercetin, kaempferol, izorhamnetin și ABA.

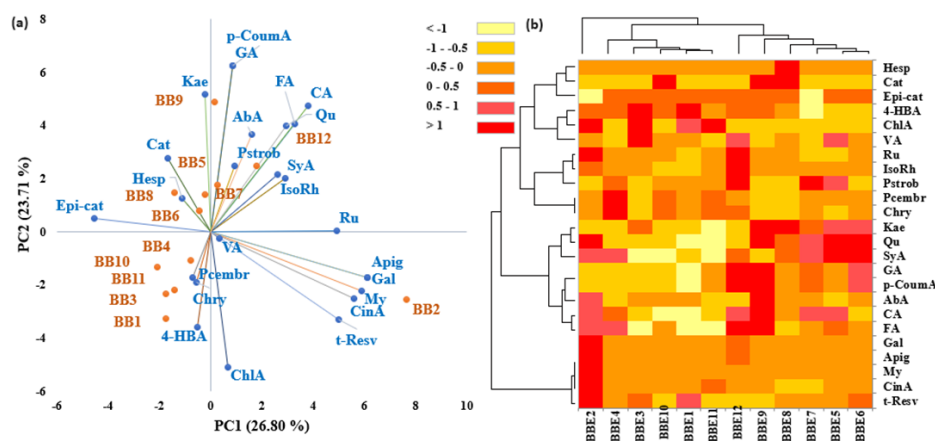


Figure 10. Discriminarea probelor de păstură pe baza biomarkerilor cantitativi ai compușilor fenolici: (a) analiza componentelor principale și (b) analiza clusterului ierarhic și a hărții termice

Analiza statistică multivariată, inclusiv analiza componentelor principale (PCA) și analiza hărții termice (HMA) au fost aplicată datelor cantitative pentru a diferenția probele de BB cu origini diferite (Figura 10). Din analiza PCA s-a observat o discriminare clară a probei BB2, care ar putea fi corelată cu originea botanică deoarece această probă a prezentat cel mai mare procent din speciile de plante din familia *Asteraceae* (Figura 7).

În plus, apigeninul (Apig), galanginul (Gal), miricetinul (My), acidul cinamic (CinA), *t*-resveratrolul (t-Resv) și acidul clorogenic (ChlA) reprezintă compuși fenolici specifici pentru BB2 și sunt distribuite în dreapta- zona de jos din figura 10a. De asemenea, partea dreaptă a figurii indică compuși fenolici specifici pentru BB7 și BB12, cum ar fi rutin (Ru), izorhamnetin (IsoRh), acid siringic (SyA), pinostrombin (Pstrob), acid abscisic (AbA), acid ferulic (FA), acid cafeic (CA), quercetin (Qu), acid galic (GA) și acid *p*-cumaric (*p*-CoumA). Corespunzător analizei

palinologice, proba BB12 este specifică BP a speciilor de plante de *Amaranthaceae*, *Betulaceae*, *Bromeliaceae*, *Convolvulaceae*, *Lamiaceae*, *Onagraceae* și *Violaceae*. Proba BB7 are și polen de plante din familiile menționate, prezentând un conținut ridicat de polen din familia *Acanthaceae*.

Conform originii botanice (Figurile 7 și 8), BB3, BB10 și BB11 prezintă conținut semnificativ în polen de la speciile de plante din familiile *Amaryllidaceae*, *Cornaceae*, *Fabaceae*, *Fagaceae*, *Primulaceae*, *Resedaceae* și *Salicaceae*. Legând aceste rezultate cu Figura 10a, pinocembrin (Pcembr), crisin (Chry) și acidul 4-hidroxi benzoic (4-HBA) sunt distribuiți la BB1, BB3, BB4, BB10 și BB11, care sunt grupate în partea stângă de jos a graficului PCA. Kaempferol (kae), catechina (cat), epicatechin (Epi-cat) și hesperidin (Hesp) reprezintă compuși fenolici specifici pentru BB5, BB6, BB8 și BB9, care sunt grupate în partea stângă a figurii 10a. De asemenea, *Acanthaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Boraginaceae*, *Brassicaceae*, *Colchicaceae*, *Oleaceae*, *Onagraceae* și *Pinaceae* au fost familiile distinctive pentru aceste mostre. În special, Hesp este legată de speciile de plante *Ericaceae* și este prezent doar în BB8 și BB9, care au și un conținut semnificativ de acizi fenolici și flavonoide.

Harta termică a clusterelor ierarhice confirmă rezultatele PCA, care evidențiază discriminarea BB2. Așa cum se vede în Figura 10b, celelalte eșantioane BB sunt grupate în două grupuri principale, corespunzând la partea de jos din stânga a graficului PCA și la partea superioară. Harta termică a profilurilor compușilor fenolici indică un cluster principal, care corespunde cu t-resv, CinA, My, Apig și Gal și, respectiv, eșantionului BB2. Clusterul principal este împărțit în două sub-cluster, care sunt distribuite în alte grupuri la aceeași distanță.

Activitatea biologică a Extractelor de Păstură

Evaluarea Calitativă a Activității Antimicrobiene

Activitatea antimicrobiană a fost evaluată prin determinarea diametrelor zonelor de inhibiție a creșterii care au apărut în jurul spotului și exprimându-le ca valori medii \pm SD (Fig 11).

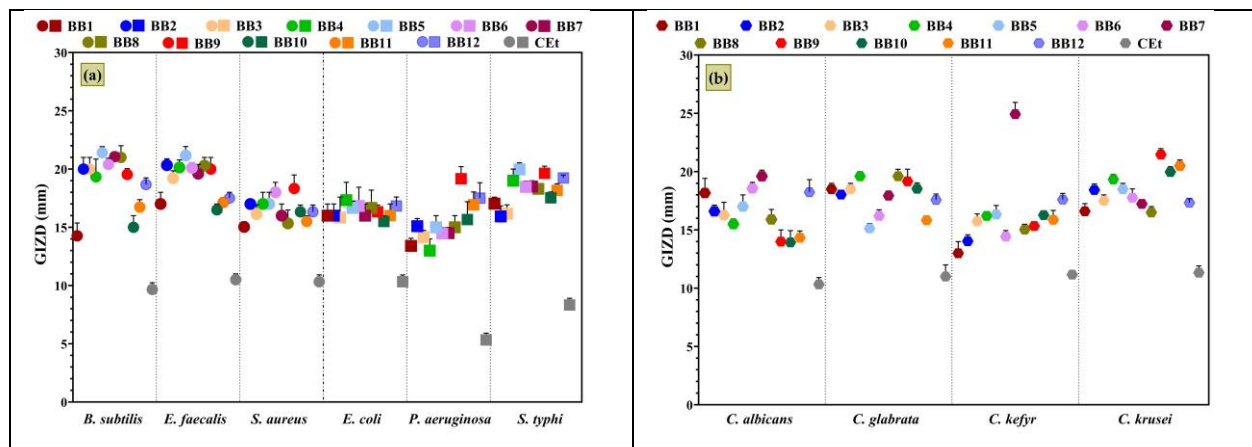


Figure 11. Diametrele zonei de inhibiție a creșterii (GIZD) ale BBE pe tulpini patogene selectate: (a) bacterii Gram-pozitive și Gram-negative; (b) *Candida* sp.

Probele de BBE au prezentat un efect antimicrobian semnificativ asupra creșterii tuturor tulpinilor microbiene testate, iar tulpinile cele mai sensibile au fost *B. subtilis*, *E. faecalis*, *S. typhi*, *C. krusei* și *C. glabrata*.

Extractul cu cea mai mare activitate antibacteriană asupra bacteriilor Gram-pozitive a fost BBE5, urmat de BBE8, BBE1, BBE2, BBE6 și BBE9. Datele obținute sunt legate de originile botanice, deoarece aceste mostre sunt, de asemenea, grupate în Figura 8.

În cazul bacteriilor Gram-negative, BBE5, BBE4, BBE9 și BBE12 au prezentat cel mai mare efect inhibitor. Profilurile antimicrobiene pentru *Candida* sp. au fost diferite, dar BBE7 și BBE9 au prezentat sensibilitatea cea mai crescută. Totuși, conform cunoștințelor noastre, nu există date care să compare rezultatele noastre cu privire la activitatea antimicrobiană a BBE împotriva *C. kefir* și *C. krusei*.

Evaluarea Cantitativă a Activității Antimicrobiene

Valoarea CMI a fost caracterizată de cea mai mică concentrație de BBE testate care inhibă dezvoltarea microbiană. Rezultatele sunt prezentate în Figura 12, exprimate ca pg/mL.

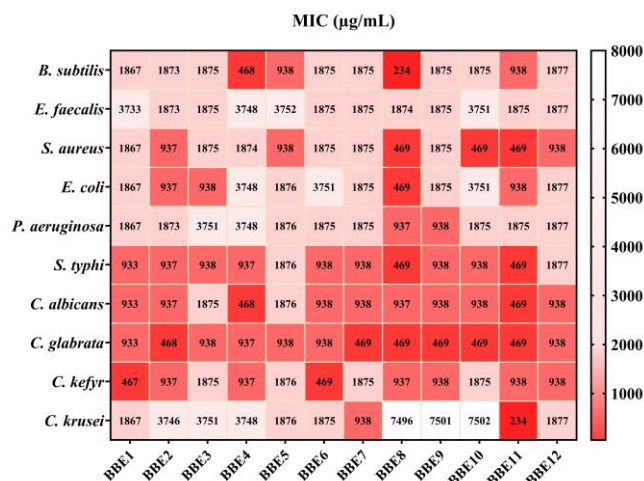


Figure 12. Heat map a valorilor concentrației minime inhibitorii

Figura 12 evidențiază activitatea antimicrobiană semnificativă a BBE asupra tulpinilor patogene. *S. typhi* și *C. glabrata* au fost cele mai sensibile tulpini testate și, în contrast, *E. faecalis* a fost cea mai rezistentă la BBE. Cea mai mică valoare CMI a fost obținută pentru BBE8, urmată de BBE4 asupra *B. subtilis*. De asemenea, extractele au arătat o inhibiție semnificativă a dezvoltării *S. aureus*, iar BBE8, BBE10, BBE11, BBE2 și BBE12 au indus cea mai mare sensibilitate.

În general, BBE8, BBE9, BBE2 și BBE4 au prezentat cea mai mare activitate antimicrobiană, corelată cu compoziția chimică. Mai mult decât atât, conform analizelor statistice, probele menționate s-au evidențiat față de celelalte. În acord cu testele PCA, BBE2 a fost asociat cu atribuții taxonomice precise și cu compuși fenolici. De asemenea, BBE12 este asociat cu FA, CA și Qu și cu familii botanice specifice (Figura 8).

Evaluarea Semicantitativă a Aderenței Microbiene la Substrat Inert

Influența BBE asupra aderenței tulpinilor microbiene testate la substratul inert este ilustrată în Figura 13, care reprezintă valorile concentrației minime de eradicare a biofilmului (MBEC).

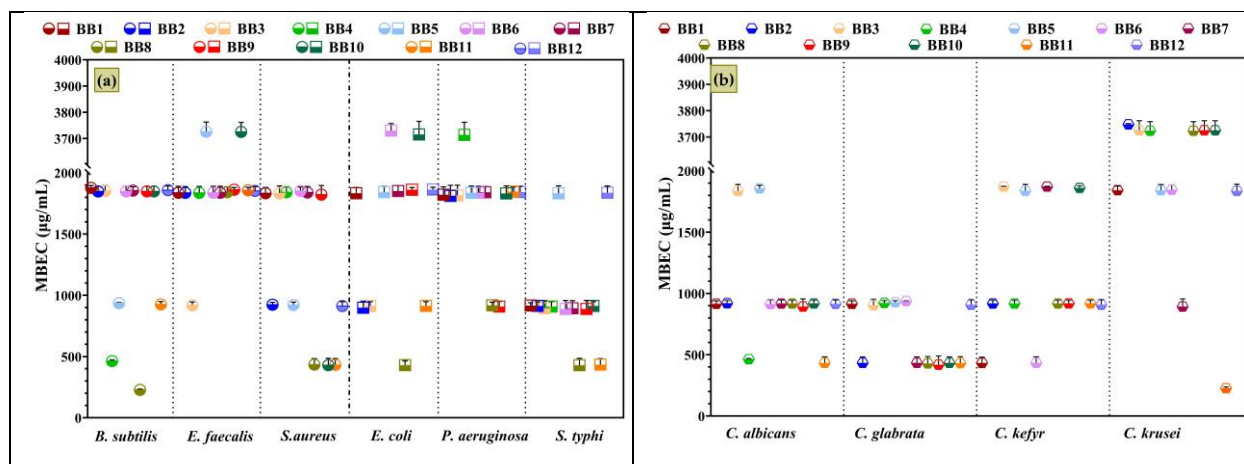


Figure 13. Ilustrarea grafică a valorilor MBEC (a) bacterii Gram-pozitive și Gram-negative; (b) *Candida* sp.

Datele din Figura 13 confirmă rezultatele calitative (Figura 11) și MIC (Figura 12) și sunt corelate cu compoziția chimică și originea botanică a BB.

Concluzii

Păstura este o sursă promițătoare de compuși și antioxidanți. Obiectivul principal al acestui studiu a fost de a investiga relația dintre originea botanică, compoziția chimică, activitatea antioxidantă și efectul asupra tulpinilor patogene selectate. Analiza palinologică a indicat o abundență relativă mare de polen de la plantele aparținând familiilor *Salicaceae*, *Asteraceae*, *Brassicaceae* și *Acanthaceae*. În total, au fost identificate treizeci și una de familii.

Extractele au conținut în principal rutin, hesperidin și resveratrol, precum și un conținut ridicat de quercetin, kaempferol, izorhamnetin și acid abscisic. Au existat, de asemenea, cantități semnificative de acid *p*-cumaric, acid galic, acid cafeic și acid cinamic. Probele BBE2, BBE8, BBE9 și BBE12 au avut cele mai ridicate niveluri de acizi fenolici, flavonoide și heterozide.

Activitatea antimicrobiană a extractelor de păstură este strâns legată de compoziția chimică, activitatea antioxidantă și originea botanică a polenului. Profilurile fenolice ale extractelor de păstură sunt complexe și diferite și este dificil să atribuim efectul inhibitor unui singur compus sau unui tip de polen dintr-o anumită familie botanică. În plus, un efect sinergic între compușii bioactivi este cel mai probabil responsabil pentru proprietățile biologice ale păsturii. Extractele de păstură au prezentat un impact antimicrobian semnificativ asupra creșterii tuturor tulpinilor microbiene testate. *S. typhi* și *C. glabrata* au fost cele mai sensibile tulpini testate.

Bogată în compuși fenolici și cu proprietăți antimicrobiene semnificative, păstura poate fi o sursă valoroasă de nutrienți naturali și compuși bioactivi care îmbunătățesc sănătatea umană.

CAPITOLUL 7. Dezvoltarea de Sisteme cu Eliberare Controlată pe bază de Nanoparticule Magnetice

Disbioza microbiotei intestinale care apare adesea în terapia cancerului necesită dezvoltarea unor opțiuni de tratament mai eficiente. În acest sens, abordarea de cercetare actuală este de a dezvolta sisteme cu eliberare controlată (DDS) bazate pe nanoparticule magnetice (MNP), care acționează nanotransportori pentru compuși bioactivi. În primul rând, MNP-urile au fost sintetizate prin metoda de coprecipitare asistată de pulverizare, urmată de încărcarea extractelor BP sau BB și a unui medicament antitumoral (5-fluorouracil/5-FU). MNP-urile încărcate au fost caracterizate morfologic și structural prin analize TEM, SAED, SEM, XRD, FT-IR, DLS și termogravimetrice. Spectroscopia UV-Vis a fost aplicată pentru a stabili profilurile de eliberare și activitatea antioxidantă. În plus, a fost evaluată activitatea antibacteriană și antitumorală a MNP-urilor încărcate.

Materiale și Metode

Materiale

Toți reactivii au fost achiziționați de la Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germania). Toate tulpinile testate în această lucrare au fost furnizate din Colecția de Microorganisme a Departamentului de Microbiologie, Facultatea de Biologie a Universității din București.

Sinteza nanoparticulelor magnetice și încărcarea cu compuși bioactivi

Metoda de coprecipitare asistată de pulverizare a sintetizat NP-urile Fe_3O_4 stabilizate cu citrat trisodic anhidru [75, 76]. După aceea, 1 g din NP magnetice obținute anterior au fost încărcate cu 10 mL BPE/ BBE prin mojarare până când solventul a fost evaporat. BPE-urile și BBE-urile utilizate au fost caracterizate anterior [46, 77]. 5-FU a fost solubilizat în etanol și încărcat pe suprafața Fe_3O_4 @BPE/ BBE-uri urmând aceeași metodă.

Rezultate și Discuții

Caracterizarea Sistemelor Magnetice Multifuncționale

În studiul de față, MNP-urile acoperite cu citrat sintetizate au fost mai întâi încărcate cu BPE și BBE, care au prezentat cea mai mare concentrație de compuși fenolici și proprietăți antioxidante și antimicrobiene determinate anterior [46, 77].

Microscopia electronică prin Transmisie

Morfologia MNP-urilor acoperite cu citrat a fost evaluată prin evaluările TEM, HR-TEM și SAED (Figura 14). După cum se poate observa, NP-urile au o formă cvasi-sferică și au o tendință crescută de aglomerare din cauza interacțiunii momentului dipolar magnetic dintre particule.

Distribuțiile sunt considerabil înguste, ceea ce sugerează că dimensiunea nanoparticulelor magnetice este între 5 și 10 nm (dimensiunea medie a particulelor de $7,0 \pm 2$ nm), ceea ce ar putea demonstra în continuare capacitatea lor de utilizare în aplicațiile dorite. În plus, rezultatele SAED confirmă faptul că modelele sunt legate de caracteristicile indicilor Miller pentru Fe_3O_4 [78, 79].

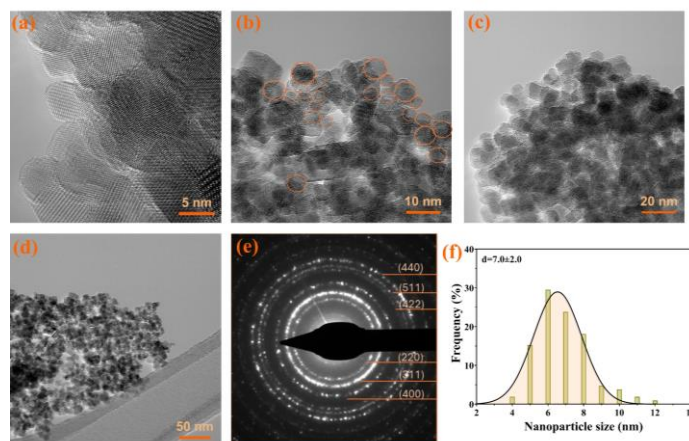


Figure 14. Imaginile TEM, SAED pattern și distribuția pentru Fe_3O_4 NPs

Difracția de raze X

Structura nanotransportorilor obținuți a fost determinată prin difracția cu raze X, care a confirmat structura cubică a MNP-urilor pentru toate probele (Figura 15). În consecință, adăugarea de compuși bioactivi din extracte și 5-FU nu conduce la formarea oxizilor secundari de fier.

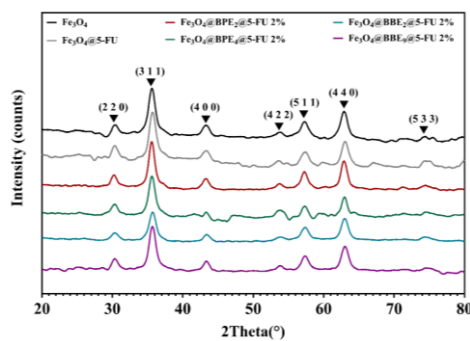


Figure 15. Difractogramele pentru sistemele magnetice dezvoltate

Figura 15 prezintă vârfurile caracteristice ale cristalelor de magnetită tetraedrice și poliedrice [75, 80].

Spectroscopia FT-IR

Analiza FT-IR a fost efectuată pentru a stabili legăturile și grupurile funcționale prezente în cadrul MNP-urilor obținute.

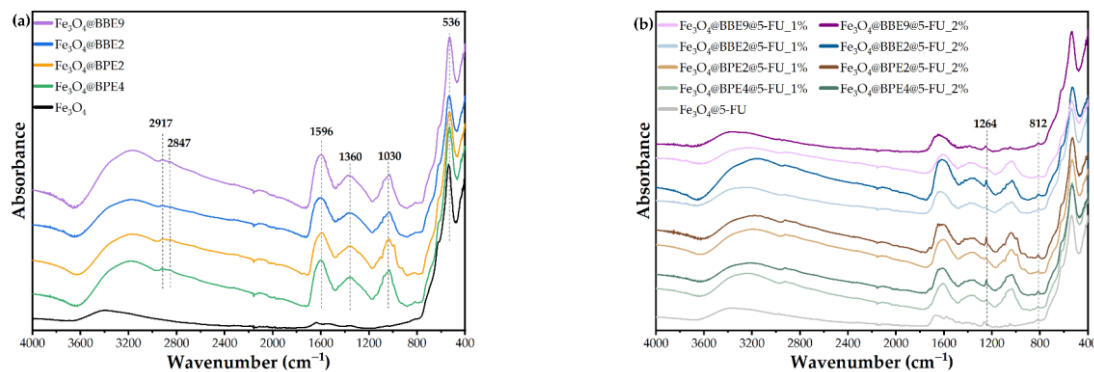


Figure 16. Spectrele FT-IR pentru sistemele magnetice dezvoltate

Spectrul FT-IR al probei goale de Fe_3O_4 (Figura 16a) prezintă vârfuri distinctive în concordanță cu structura moleculară a magnetitului (Fe_3O_4). Banda de absorbție proeminentă la 536 cm^{-1} indică vibrațiile de întindere a legăturii Fe–O, o caracteristică definitorie a magnetitei. În plus, vârful larg centrat în jurul a 3400 cm^{-1} este atribuit vibrațiilor de întindere O–H, probabil din apă absorbită sau grupări hidroxil de pe suprafața probei.

Fe_3O_4 NP acoperite cu BPE și BBE au afișat în mod similar vârfurile caracteristice ale vibrațiilor de întindere Fe–O la aceleași lungimi de undă. Cu toate acestea, vârfurile largi atribuite vibrațiilor O–H s-au mutat la numere de undă mai scurte, în jur de 3180 cm^{-1} , și ar putea fi atribuite vibrațiilor de întindere O–H atât din extracte, cât și din moleculele de apă reziduale de pe suprafața NP-urilor.

Mai exact, vârfurile suplimentare ale nanoparticulelor acoperite apar din grupuri funcționale specifice prezente în extractele BP și BB, cum ar fi la 2917 cm^{-1} și 2847 cm^{-1} , corespunzătoare întinderii simetrice și asimetrice a grupărilor C–H prezente în carbohidrați și lipide. sau vârful mare la 1030 cm^{-1} corespunzător vibrațiilor C–O și C–OH în carbohidrați și compuși fenolici [74].

În ceea ce privește probele încărcate cu 5-FU, Figura 16b arată conservarea semnalelor menționate mai sus, comune extractelor cu magnetită, BP și BB. Benzi de absorbție la 1264 cm^{-1} și 812 cm^{-1} , corespunzătoare întinderii C–H (în plan) și întinderii C–F în 5-FU [81], au fost observate în proba de magnetită încărcată cu substanța activă ($\text{Fe}_3\text{O}_4@5\text{-FU}$). Semnalele s-au distins pentru probele încărcate cu medicament acoperite cu extracte și s-a observat că intensitatea acestor benzi a variat în funcție de concentrații, vizibil mai intensă în cazul probelor încărcate la concentrații mai mari de 5-FU. (2% versus 1%).

Analiza DLS

Stabilitatea nanotransportorilor a fost evaluată prin măsurătorile potențialul zeta, diametrul hidrodinamic și indicele de polidispersitate (PDI) (Figura 18). Diametrul hidrodinamic crește

atunci când este încărcat cu 1% 5-FU, dar scade când este adăugat cu 2% 5-FU. Se poate presupune că 5-FU este hidrofil, iar adăugarea lui la concentrații mici crește hidrofilicitatea MNP-urilor.

În schimb, 5-FU se suprapune grupărilor funcționale din BPE/BBE la concentrații mai mari și scade interacțiunea cu solventul (PBS). Din acest motiv, proba $\text{Fe}_3\text{O}_4@5\text{-FU}$ 2% a prezentat o valoare mai mare a diametrului hidrodinamic. Conform valorilor potențialului zeta pentru $\text{Fe}_3\text{O}_4@5\text{-FU}$ 2%, $\text{Fe}_3\text{O}_4@BBE_2@5\text{-FU}$ 1% și $\text{Fe}_3\text{O}_4@BBE_9@5\text{-FU}$ 1% și valorile mai mari ale diametrului hidrodinamic pot fi datorate aglomerării NP-urilor. Luând în considerare valorile PDI mai mici de 0,6, acestea indică o distribuție îngustă a particulelor. Valorile PDI mai mici indică stabilitatea și uniformitatea pe termen lung [82-84].

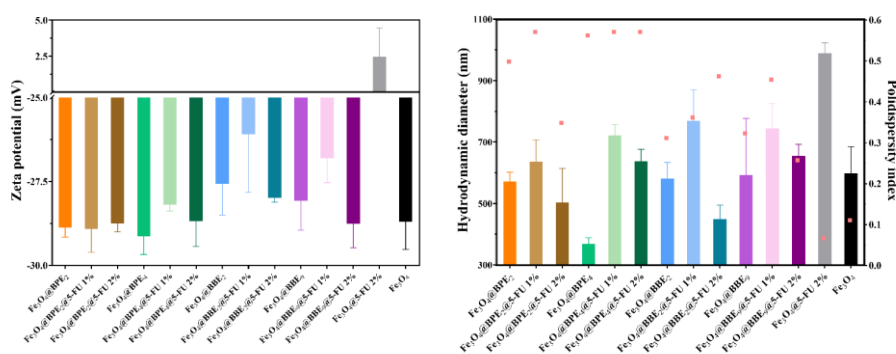


Figure 17. Potențialul zeta, diametrul hidrodinamic (ilustrate în coloane) și valorile PDI (ilustrate ca puncte)

Comportamentul de Eliberare al Agenților Bioactivi

Profilurile de eliberare a medicamentelor și a compușilor fenolici (PC) (Figura 19) au fost evaluate în PBS (pH = 7,4) la 37°C.

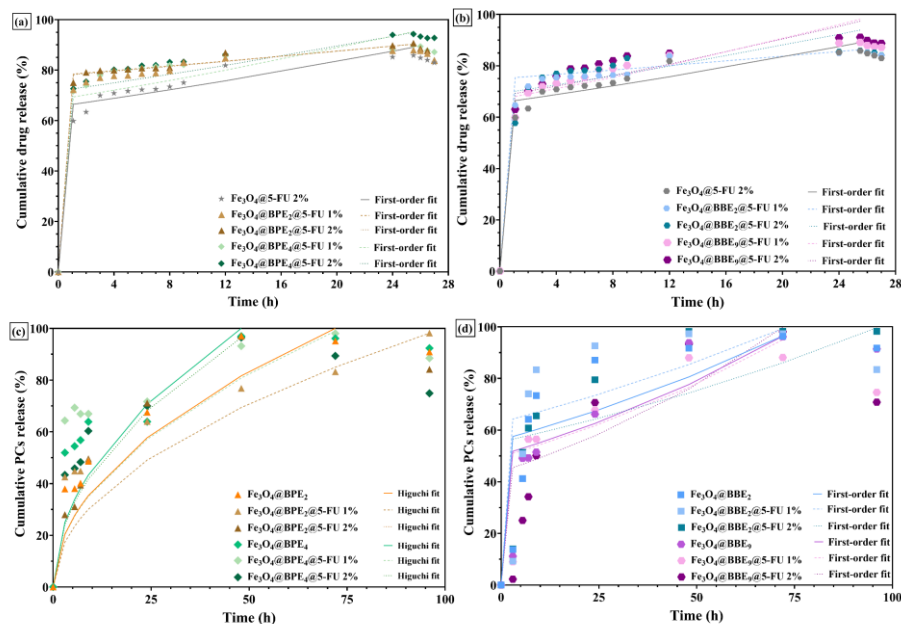


Figure 18. Antitumoral drug and PCs release profiles of nanocarriers loaded with BPEs (a,c) and BBEs (b,d).

Profilurile de eliberare a medicamentelor 5-FU ale nanopurtătorilor încărcăți cu BPE și BBE au arătat că medicamentul antitumoral se eliberează rapid în prima oră, dar cu o rată mai mică pentru probele fără extracte (Figura 19 a și b). De asemenea, se poate observa că în două ore, 5-FU are o rată de eliberare maximă/rapidă (~75% eliberată), urmată de un platou. Nanopurtătorii cu 5-FU și extracte au prezentat un procent mai mare de medicament eliberat după 24-25,5 ore, iar o eliberare mai lentă a moleculelor de medicament/ degradare poate fi observată imediat [85, 86].

În schimb, profilurile de eliberare ale PC-urilor (Figura 19 c și d) ilustrează modele similare cu rate de eliberare prelungite. În ambele cazuri, PC-urile sunt eliberate treptat din MNP, atingând un platou după 48 de ore, menținut până la 96 de ore, urmată de o scădere care sugerează degradarea PC-urilor. Timpul de eliberare mai mare al PC-urilor în comparație cu 5-FU este atribuit flavonoidelor din extracte.

Activitatea Antioxidantă

Au fost evaluate diferite concentrații de MNP pentru a stabili concentrația de antioxidant care elimină 50% din radicalul inițial DPPH, care este cunoscut sub numele de IC_{50} (Figura 20). Valorile mai mici ale IC_{50} corespund unei activități antioxidante mai mari [87].

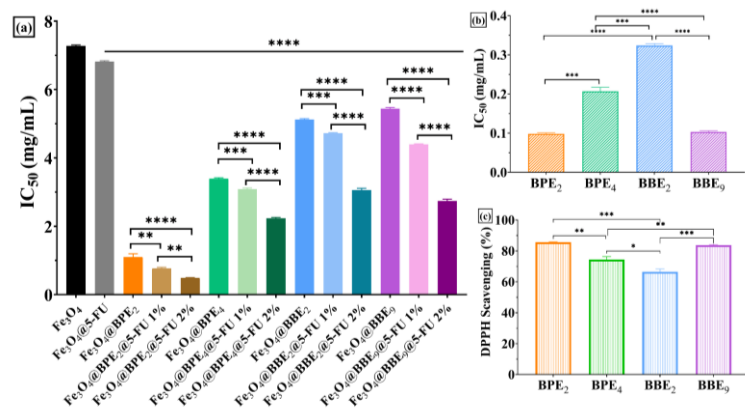


Figure 19. Activitatea antioxidantă a MNP-urilor dezvoltate prin testul DPPH. (a) Valori IC_{50} pentru nanotransportori, (b) Valori IC_{50} pentru extracte și (c) DPPH% pentru extracte.

MNP-urile dezvoltate au prezentat capacitatea de a elimina radicalul DPPH, așa cum era de așteptat, având în vedere studiile anterioare privind activitatea antioxidantă a BPE și BBE (metoda TEAC) [46, 77]. Figura 20 evidențiază valorile IC_{50} mai scăzute pentru MNP-urile încărcate cu BPE și BBE decât $Fe_3O_4@5-FU$ 2% sau probele de Fe_3O_4 , ceea ce indică faptul că nanotransportorii obținuți sunt antioxidanți mai puternici care ar putea induce toxicitate mai mică pentru pacienți. [88]. În plus, Figura 20a a afișat o scădere a valorilor IC_{50} simultan cu concentrația de 5-FU încărcată pe MNP, ceea ce implică un efect sinergic între medicamentul antitumoral și PC-urile din extracte. Rezultate similare sunt raportate pentru Fe_3O_4 încărcat cu PC-uri (acid galic, quercetină, extracte din plante) [88-90].

Activitatea Antibacteriană

Evaluarea concentrației Minime Inhibitorii

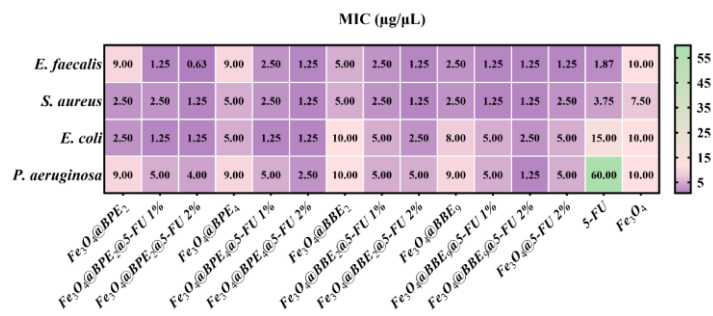


Figure 20. Heat map a valorilor concentrațiilor minime inhibitorii (MIC). Rezultatele marcate în mov intens indică cele mai mici valori ale MIC și cea mai mare sensibilitate a tulpinilor.

Datele calitative au fost confirmate prin testul MIC, iar bacteriile Gram-pozitive au reprezentat cele mai sensibile tulpini. În schimb, MNP-urile cu BBE au prezentat o inhibiție moderată asupra bacteriilor Gram-negative, iar *P. aeruginosa* a fost cea mai rezistentă. În plus, pentru majoritatea MNP-urilor, valorile MIC au fost mai mici decât Fe₃O₄@5-FU 2% și 2% 5-FU. Adăugarea de extracte a inhibat semnificativ dezvoltarea tulpinilor, ceea ce poate fi explicat prin activitatea antioxidantă a BPE și BBE, precum și prin comportamentul de eliberare al PC-urilor. Din cunoștințele noastre, nu există referințe pentru a compara rezultatele noastre cu privire la impactul pozitiv al MNP-urilor asupra proprietăților antibacteriene ale agentului antineoplazic, în special efectele sinergice dintre extracte, 5-FU și MNP.

Evaluarea Semicantitativă a Aderenței Bacteriene la Substrat Inert

A fost evaluată influența MNP-urilor încărcate asupra aderenței tulpinilor patogene la substratul inert. Valorile MBEC au fost reprezentate grafic în Figura 25. Datele antibiofilm confirmă rezultatele calitative (Figura 23) și cantitative/ MIC (Figura 24). Prin urmare, *S. aureus* și *E. faecalis* au fost cele mai sensibile tulpini în prezența MNP-urilor dezvoltate. De asemenea, MNP-urile încărcate au inhibat semnificativ aderența *E. coli* și au avut activitate moderată asupra *P. aeruginosa*.

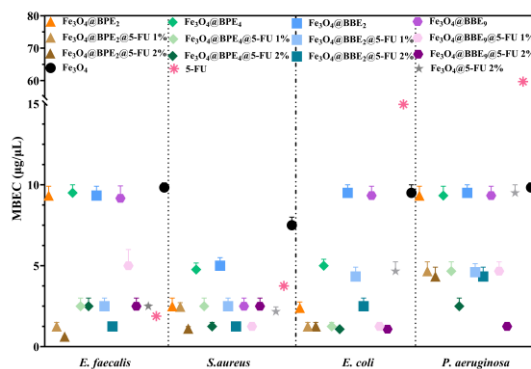


Figure 21. Ilustrarea grafică a valorilor MBEC: (a)- *E. faecalis*, (b)- *S. aureus*, (c)-*E. coli*, (d)-*P. aeruginosa*.

MNP-urile încărcate cu BPE au prezentat profiluri antibacteriene similare, iar cea mai puternică activitate antibiofilm a fost prezentată de MNP-urile încărcate cu BPE4. Conform cunoștințelor noastre, nu există date de referință pentru a compara rezultatele noastre privind îmbunătățirea activității antibacteriene 5-FU atunci când este încărcat pe suprafața MNP-urilor cu BPE sau BBE.

Influența Compușilor Bioactivi Împotriva unei Tulpini cu Potențial Probiotic

Efectul asupra creșterii *L. rhamnosus* MF9 sub influența MNP-urilor încărcate după 24 de ore este reprezentat în Figura 26.

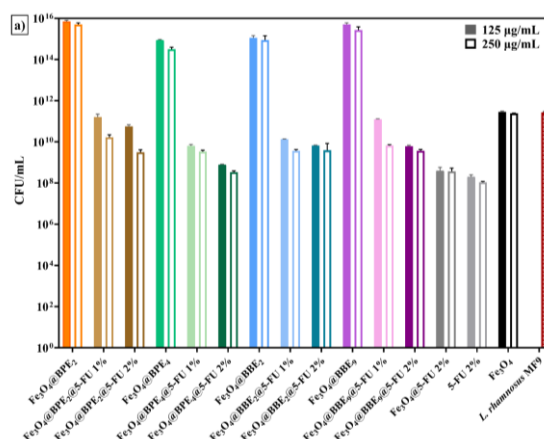


Figure 22. Influența sistemelor magnetice multifuncționale asupra creșterii *L. rhamnosus* MF9 (după 24h).

Nanoparticulele de Fe_3O_4 nu influențează creșterea *L. rhamnosus* MF9, dar sunt stimulate semnificativ (mai mult de patru unități logaritmice) de toate BPE-urile și MNP-urile încărcate cu BBE (Figura 26a). De asemenea, Figura 26a confirmă impactul 5-FU asupra creșterii bacteriilor probiotice. La concentrații de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MNP, creșterea *L. rhamnosus* MF9 a fost influențată negativ de probele cu 2% agent antineoplazic, mai puțin $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{BPE}_2@5\text{-FU } 2\%$.

Conform rezultatelor activității antioxidante, MNP-urile încărcate cu 5-FU 1% au prezentat cea mai mare activitate antioxidantă și ar putea fi corelată cu capacitatea acestor probe de a atenua stresul oxidativ indus de medicamentul antitumoral împotriva microbiotei intestinale. În plus, profilurile prelungite de eliberare ale PC-urilor (Figura 19c și d) sugerează o posibilitate îmbunătățită de recuperare a microbiotei.

Evaluarea Antiproliferativă

Viabilitatea celulelor tumorale *in vitro* și proliferarea celulelor HT-29 în prezența sistemelor magnetice multifuncționale sintetizate au fost examinate folosind analiza MTT (Figura 27).

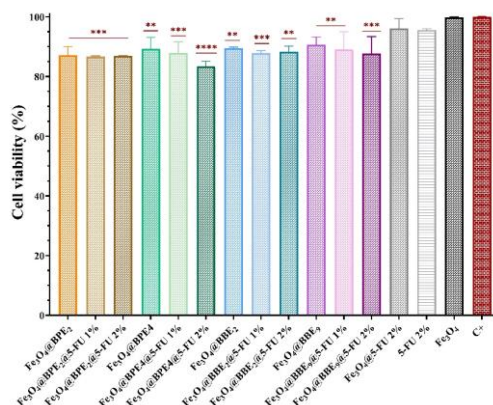


Figure 23. Influența sistemelor magnetice asupra viabilității celulare și a proliferării celulelor tumorale (C+).

Figura 27 prezintă diferențele semnificative dintre magnetita și MNP-urile încărcate. Probele Fe₃O₄@BPE@5-FU/ Fe₃O₄@BBE@5-FU și Fe₃O₄@BPE/Fe₃O₄@BBE prezintă o viabilitate celulară mai mică decât Fe₃O₄@5-FU 2%. De asemenea, adăugarea de 5-FU îmbunătățește inhibarea proliferării celulelor tumorale, ceea ce ar putea fi explicat printr-un efect inhibitor sinergic între PC-urile din extracte și 5-FU. În caz contrar, acest studiu și-a propus să investigheze efectele 5-FU și ale extractelor, în special influența acestora asupra microbiotei intestinale. Din acest motiv, a folosit concentrații mici de 5-FU și MNP și nu se așteaptă o activitate antitumorală semnificativă.

Concluzii

Prezentul studiu și-a propus să dezvolte sisteme de administrare a medicamentelor bazate pe nanoparticule magnetice stabilizate cu citrat, care acționează ca nanocarriers/ nanotransportori pentru compușii fenolici din extracte și pentru medicamentul antitumoral. Rezultatele au demonstrat obținerea nanoparticulelor/ sistemelor magnetice cu distribuții de dimensiuni înguste și o medie a dimensiunilor nanoparticulelor de ~ 10 nm. Mai mult, s-a demonstrat că medicamentul antitumoral și compușii fenolici au avut rate rapide de eliberare în primele 24 de ore din sistemele magnetice multifuncționale. În plus, compușii fenolici au avut un comportament de eliberare prelungită, iar încărcarea nanoparticulelor magnetice cu extracte a crescut proprietățile antioxidante și antibacteriene. În plus, au fost demonstrate proprietățile netoxice ale magnetitei și potențialul prebiotic al sistemelor magnetice multifuncționale dezvoltate pe *L. rhamnosus* MF9, care subliniază rolul aportului de antioxidanți (compuși fenolici) asupra microbiotei intestinale. Activitatea antiproliferativă moderată pe o linie de celule tumorale colorectale la concentrații mici de MNP și 5-FU sugerează potențialul sistemelor magnetice de a atenua efectele adverse ale medicamentelor antitumorale și de a îmbunătăți echilibrul intestinal.

Capitolul 8. Concluzii generale și Originalitatea studiului

Concluzii generale

Teza examinează cele mai importante patologii cauzate de dezechilibrele microbiotei intestinale, în special în cazul cancerului colorectal. De asemenea, sunt studiate strategii de îmbunătățire a eficienței tratamentului pentru cancerul colorectal și menținerea/recuperarea microbiotei intestinale. Obiectivele specificate în cadrul tezei au fost organizate pentru a se concentra asupra oricăror limitări prezente în studiile anterioare sau, pe de altă parte, pentru a introduce noțiuni originale care nu au fost studiate anterior în urma revizuirii literaturii de specialitate.

Teza de doctorat a fost structurată în părți primare și, ulterior, împărțită în diferite capitole. Prima parte este axată pe o revizuire amplă a datelor recente din literatura științifică, intenționând să introducă subiectul principal al tezei, în special impactul microbiotei intestinale asupra nutriției și sănătății umane. Au fost, de asemenea, discutate principalele abordări pentru modularea microbiotei intestinale și avantajele compușilor naturali și nanotehnologiei în tratamentul CRC. A doua parte a tezei prezintă partea originală/experimentală, enumerând obiectivele și îndeplinirea acestora prin afișarea rezultatelor obținute ca articole publicate.

Capitolul 1 a prezentat un rezumat al microbiotei umane, subliniind importanța factorilor determinanți care influențează semnificativ echilibrul microbiotei.

Capitolul 2 a prezentat o privire de ansamblu asupra sintezei, caracterizării și aplicațiilor biomedicale ale MNP-urilor și, respectiv, capacitatea de a le utiliza ca nanotransportori pentru compuși activi biologic.

Capitolul 3 a subliniat utilizarea medicamentelor tradiționale/convenționale pentru tratamentul cancerului colorectal și efectele asociate. Mai mult, a prezentat potențialul compușilor naturali și al nanoterapicelor pentru îmbunătățirea eficacității, atenuarea efectelor adverse și reducerea chimiorezistenței medicamentelor antitumorale.

Partea a doua a prezentat obiectivul principal al tezei, care este împărțit în trei părți (Capitolele 5-7): (i) obținerea extractelor de polen de albine și evaluarea compoziției lor chimice, antioxidante și proprietăți biologice; (ii) obținerea extractelor de păstură și evaluarea proprietăților lor chimice, antioxidante și antimicrobiene și (iii) dezvoltarea nanosistemelor pe bază de nanoparticule magnetice ca nanotransportori pentru compuși bioactivi.

Capitolul 5 a stabilit compoziția chimică și proprietățile biologice a cinci probe de polen de albine (crud). Pe lângă, proprietățile antimicrobiene și antitumorale au fost studiate în efectele

prebiotice/capacitatea extractelor de polen de albine bogate în compuși fenolici și acizi grași de a modula dezvoltarea a două tulpini probiotice, ceea ce indică potențialul extractelor de polen de a menține și de a îmbunătăți recuperarea microbiotei intestinale.

Capitolul 6 a investigat relația privind sursa botanică, compoziția chimică, activitatea antioxidantă și influențele antimicrobiene asupra tulpinilor patogene testate din douăsprezece probe de păstură, ceea ce denotă că păstura este o sursă promițătoare de compuși fenolici și nutrienți naturali care au prezentat proprietăți antimicrobiene semnificative.

Capitolul 7 a vizat dezvoltarea nanosistemelor multifuncționale pe bază de nanoparticule magnetice acoperite cu citrat, care au acționat ca nanotransportori pentru compușii fenolici din BBE/BPE și 5-fluorouracil. Acest studiu leagă strâns capitolele anterioare deoarece evidențiază potențialul terapeutic al extractelor bogate în compuși bioactivi. În plus, nanosistemele dezvoltate au prezentat capacitatea de a atenua efectele adverse induse de 5-FU prin eliberarea prelungită a PC-urilor care au stimulat dezvoltarea bacteriilor lactice.

Contribuții originale și perspective

Noutatea primului studiu a implicat efectul antimicrobian sinergic al BPE-urilor și compușilor solubili ai tulpinilor lactice (*L. rhamnosus* MF9 și *E. faecalis* 2M17) împotriva capacității de aderență a tulpinilor patogene izolate clinic selectate (*C. guillermondii* și *E. cloacae*). Mai mult, efectele inhibitorii ale extractelor de polen asupra capacității tulpinilor microbiene de a se atașa la substratul celular au fost raportate pentru prima dată. În general, extractele de polen de albine au inhibat semnificativ aderența tulpinilor potențial patogene testate (*E. faecalis* ATCC 19433, *S. aureus* ATCC 25422, *E. cloacae*, *P. aeruginosa* ATCC 25785, *C. albicans* 1688, *C. glabra famata*, *C. glabrata*, *C. krusei* și *C. lusitaniae*). Având în vedere conținutul bogat în compuși fenolici și acizi grași, respectiv relația dintre activitatea antioxidantă, compoziția chimică, efectele citotoxice asupra unei linii celulare tumorale, efectul prebiotic și impactul asupra tulpinilor patogene, polenul prezintă un potențial agent prebiotic și antitumoral pentru microbiota intestinală.

Perspective: dezvoltarea sistemelor de transport/ eliberare controlată prin încorporarea/încărcarea extractelor de polen în alte nanomateriale, cum ar fi silice poroasă, polimeri sensibili la pH, etc. și garantează o livrare țintă la țesutul dorit.

Al doilea obiectiv s-a bazat pe corelarea dintre proprietățile antimicrobiene și antioxidante, compoziția chimică și analiza palinologică a probelor de păstură. Noutatea acestui studiu implică efectele inhibitorii ale extractelor de păstură împotriva capacității de aderență microbială la substratul inert. Mai mult, extractele de păstură induc sensibilitate antifungică, iar pentru *C. krusei* și *C. kefyr*, este raportată pentru prima dată.

Perspective: evaluarea potențialului prebiotic și probiotic al păsturii, respectiv proprietățile antitumorale. A doua perspectivă constă în dezvoltarea de sisteme de eliberare inteligente, care acționează ca nanotransportori pentru compușii bioactivi din extractele de păstură în mai multe patologii (inflamație cronică, IBD, cardiovasculare, disbioză intestinală etc.).

Noutatea ultimului obiectiv a implicat dezvoltarea nanosistemelor multifuncționale de eliberare a medicamentelor pe bază de magnetită pentru a spori eficacitatea antitumorală a 5-FU și pentru a diminua efectele adverse împotriva microbiotei intestinale. În plus, proiectarea DDS a evidențiat activitățile antibacteriene, prebiotice și antiproliferative ale BPE și BBE. De asemenea, sistemele magnetice multifuncționale sporesc activitatea antimicrobiană a compușilor bioactivi. Mai mult, un alt element de noutate constă în sensibilitatea tulpinilor bacteriene de a adera la substratul inert indus de sistemele dezvoltate.

Perspective: Optimizarea dozării formulărilor de 5-FU și extracte de polen de albine/păstură cu cele mai bune profiluri de eliberare, antioxidante și antimicrobiene pentru a efectua evaluări *in vivo*. O altă perspectivă reprezintă utilizarea nanosistemelor magnetice dezvoltate în terapia țintită prin aplicarea unui câmp magnetic extern la frecvențe diferite și cu o eliberare controlată de compuși bioactivi în țesutul tumoral țintă. În plus, o altă perspectivă este de a evalua proprietățile antiinflamatorii ale nanosistemelor dezvoltate. Datorită nivelurilor ridicate de compuși fenolici ale produselor apicole și ale efectelor biologice asociate, o altă perspectivă este de a dezvolta nanosisteme magnetice pe bază de compuși fenolici puri și medicamente antitumorale în scopul obținerii unor formulări farmaceutice mai eficiente și reproductibile.

Listă de publicații (Ca prim-autor și asociate tezei):

1. **C.-I. Ilie**, E. Oprea, E.-I. Geana, A. Spoiala, M. Buleandra, G. Gradisteanu Pircalabioru, I. A. Badea, D. Fikai, E. Andronescu, A. Fikai, L.-M. Ditu, *Bee Pollen Extracts: Chemical Composition, Antioxidant Properties, and Effect on the Growth of Selected Probiotic and Pathogenic Bacteria*, *Antioxidants* **2022**, 11, 959. <https://doi.org/10.3390/antiox11050959>, **Q1, IF = 7.00**.
2. **C.-I. Ilie**, A. Spoiala, E.-I. Geana, C. Chircov, A. Fikai, L.-M. Ditu, E. Oprea, *Bee Bread: A Promising Source of Bioactive Compounds with Antioxidant Properties — First Report on Some Antimicrobial Features*, *Antioxidants* **2024**, 13, 353. <https://doi.org/10.3390/antiox13030353>, **Q1, IF = 6.00**.
3. **C.-I. Ilie**, A. Spoiala, C. Chircov, G. Dolete, O.-C. Oprea, B.-S. Vasile, A. S. Crainiceanu, A.-I. Nicoara, I. C. Marinas, M. S. Stan, L.-M. Ditu, A. Fikai and E. Oprea, *Antioxidant, Antitumoral, Antimicrobial and Prebiotic Activity of Magnetite Nanoparticles Loaded with Bee Pollen/ Bee Bread Extracts and 5-Fluorouracil*, *Antioxidants* **2024**, **Q1, IF = 6.00**.
4. **C.-I. Ilie**, A. Spoială, D. Fikai, A.-I. Nicoară, O.-C. Oprea, V.-A. Surdu, R. D. Trușcă, E. Andronescu, L.-M. Dițu, A. Fikai - *Magnetic platforms based on magnetite and polyphenols with antimicrobial activity*, U.P.B. Sci. Bull., Series B, Vol. 84, Iss. 4, 45-58, **2022**.

REFERINȚE

1. Ogunrinola G. A., Oyewale J. O., Oshamika O. O., Olasehinde G. I., The Human Microbiome and Its Impacts on Health, *Int J Microbiol* 2020, **2020**, 1-7.
2. Lazar V., Ditu L. M., Pircalabioru G. G., Gheorghe I., Curutiu C., Holban A. M., Picu A., Petcu L., Chifiriuc M. C., Aspects of Gut Microbiota and Immune System Interactions in Infectious Diseases, Immunopathology, and Cancer, *Frontiers in Immunology* 9, **2018**, 1830.
3. Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K. S., Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., Yamada T., Mende D. R., Li J., Xu J., Li S., Li D., Cao J., Wang B., Liang H., Zheng H., Xie Y., Tap J., Lepage P., Bertalan M., Batto J. M., Hansen T., Le Paslier D., Linneberg A., Nielsen H. B., Pelletier E., Renault P., Sicheritz-Ponten T., Turner K., Zhu H., Yu C., Li S., Jian M., Zhou Y., Li Y., Zhang X., Li S., Qin N., Yang H., Wang J., Brunak S., Dore J., Guarner F., Kristiansen K., Pedersen O., Parkhill J., Weissenbach J., Meta H. I. T. C., Bork P., Ehrlich S. D., Wang J., A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing, *Nature* 464(7285), **2010**, 59-65.
4. Neish A. S., Microbes in gastrointestinal health and disease, *Gastroenterology* 136(1), **2009**, 65-80.
5. Lazar V., Ditu L. M., Pircalabioru G. G., Picu A., Petcu L., Cucu N., Chifiriuc M. C., Gut Microbiota, Host Organism, and Diet Trialogue in Diabetes and Obesity, *Frontiers in Nutrition* 6, **2019**, 21.
6. McCallum G., Tropini C., The gut microbiota and its biogeography, *Nature Reviews Microbiology* 22(2), **2024**, 105-118.
7. Rinninella E., Raoul P., Cintoni M., Franceschi F., Miggiano G. A. D., Gasbarrini A., Mele M. C., What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases, *Microorganisms* 7(1), **2019**.
8. Yersin S., Vonaesch P., Small intestinal microbiota: from taxonomic composition to metabolism, *Trends in Microbiology*, **2024**.
9. May M., Abrams J. A., Emerging Insights into the Esophageal Microbiome, *Curr Treat Options Gastroenterol* 16(1), **2018**, 72-85.
10. Kennedy M. S., Chang E. B., The microbiome: Composition and locations, *Prog Mol Biol Transl Sci* 176, **2020**, 1-42.
11. Nowicki C., Ray L., Engen P., Madrigrano A., Witt T., Lad T., Cobleigh M., Mutlu E. A., Comparison of gut microbiome composition in colonic biopsies, endoscopically-collected and at-home-collected stool samples, *Frontiers in Microbiology* 14, **2023**, 1148097.
12. Melo N. C. O., Cuevas-Sierra A., Fernandez-Cruz E., de la O. V., Martinez J. A., Fecal Microbiota Composition as a Metagenomic Biomarker of Dietary Intake, *International Journal of Molecular Sciences* 24(5), **2023**.
13. Kunst C., Schmid S., Michalski M., Tumen D., Buttenshon J., Muller M., Gulow K., The Influence of Gut Microbiota on Oxidative Stress and the Immune System, *Biomedicines* 11(5), **2023**.
14. Riaz Rajoka M. S., Thirumdas R., Mehwish H. M., Umair M., Khurshid M., Hayat H. F., Phimolsiripol Y., Pallares N., Marti-Quijal F. J., Barba F. J., Role of Food Antioxidants in Modulating Gut Microbial Communities: Novel Understandings in Intestinal Oxidative Stress Damage and Their Impact on Host Health, *Antioxidants (Basel)* 10(10), **2021**.
15. Perez-Reytor D., Puebla C., Karahanian E., Garcia K., Use of Short-Chain Fatty Acids for the Recovery of the Intestinal Epithelial Barrier Affected by Bacterial Toxins, *Frontiers in Physiology* 12, **2021**, 650313.
16. Siddiqui R., Boghossian A., Alharbi A. M., Alfahemi H., Khan N. A., The Pivotal Role of the Gut Microbiome in Colorectal Cancer, *Biology (Basel)* 11(11), **2022**.
17. Hu B., Elinav E., Huber S., Strowig T., Hao L., Hafemann A., Jin C., Wunderlich C., Wunderlich T., Eisenbarth S. C., Flavell R. A., Microbiota-induced activation of epithelial IL-6 signaling links inflammasome-driven inflammation with transmissible cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(24), **2013**, 9862-7.
18. Chen G. Y., The Role of the Gut Microbiome in Colorectal Cancer, *Clin Colon Rectal Surg* 31(3), **2018**, 192-198.

19. Ahmad A., Mahmood N., Raza M. A., Mushtaq Z., Saeed F., Afzaal M., Hussain M., Amjad H. W., Al-Awadi H. M., Gut microbiota and their derivatives in the progression of colorectal cancer: Mechanisms of action, genome and epigenome contributions, *Heliyon* 10(8), **2024**, e29495.
20. Ionescu V. A., Gheorghe G., Georgescu T. F., Buica V., Catanescu M.-S., Cercel I.-A., Budeanu B., Budan M., Bacalbasa N., Diaconu C., Exploring the Role of the Gut Microbiota in Colorectal Cancer Development, *Gastrointestinal Disorders* 6(2), **2024**, 526-537.
21. Colombo F., Illescas O., Noci S., Minnai F., Pintarelli G., Pettinicchio A., Vannelli A., Sorrentino L., Battaglia L., Cosimelli M., Dragani T. A., Gariboldi M., Gut microbiota composition in colorectal cancer patients is genetically regulated, *Sci Rep* 12(1), **2022**, 11424.
22. Fong W., Li Q., Yu J., Gut microbiota modulation: a novel strategy for prevention and treatment of colorectal cancer, *Oncogene* 39(26), **2020**, 4925-4943.
23. Singh V., Ahlawat S., Mohan H., Gill S. S., Sharma K. K., Balancing reactive oxygen species generation by rebooting gut microbiota, *Journal of Applied Microbiology* 132(6), **2022**, 4112-4129.
24. Issa B., Obaidat I. M., Albiss B. A., Haik Y., Magnetic nanoparticles: surface effects and properties related to biomedicine applications, *International Journal of Molecular Sciences* 14(11), **2013**, 21266-305.
25. Mitra A., Mohapatra J., Aslam M., Magnetic and electronic properties of anisotropic magnetite nanoparticles, *Materials Research Express* 11(2), **2024**.
26. de Souza T. C., Costa A. F. S., Vinhas G. M., Sarubbo L. A., Synthesis of Iron Oxides and Influence on Final Sizes and Distribution in Bacterial Cellulose Applications, *Polymers (Basel)* 15(15), **2023**.
27. Stiufluic G. F., Stiufluic R. I., Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Use in Biomedical Field, *Applied Sciences* 14(4), **2024**.
28. Mørup S., Hansen M. F., Frandsen C., 1.14 - Magnetic Nanoparticles, in: D.L. Andrews, G.D. Scholes, G.P. Wiederrecht (Eds.), *Comprehensive Nanoscience and Technology*, Academic Press, Amsterdam, 2011, pp. 437-491.
29. Ali A., Shah T., Ullah R., Zhou P., Guo M., Ovais M., Tan Z., Rui Y., Review on Recent Progress in Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Diverse Applications, *Frontiers in Chemistry* 9, **2021**, 629054.
30. Hedayatnasab Z., Abnisa F., Daud W. M. A. W., Review on magnetic nanoparticles for magnetic nanofluid hyperthermia application, *Materials & Design* 123, **2017**, 174-196.
31. Reddy L. H., Arias J. L., Nicolas J., Couvreur P., Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications, *Chemical Reviews* 112(11), **2012**, 5818-78.
32. Amiri M., Salavati-Niasari M., Akbari A., Magnetic nanocarriers: Evolution of spinel ferrites for medical applications, *Adv Colloid Interface Sci* 265, **2019**, 29-44.
33. Ghazanfari M. R., Kashefi M., Shams S. F., Jaafari M. R., Perspective of Fe₃O₄ Nanoparticles Role in Biomedical Applications, *Biochem Res Int* 2016, **2016**, 7840161.
34. Kritika, Roy I., Therapeutic applications of magnetic nanoparticles: recent advances, *Materials Advances* 3(20), **2022**, 7425-7444.
35. Gudkov S. V., Burmistrov D. E., Serov D. A., Rebezov M. B., Semenova A. A., Lisitsyn A. B., Do Iron Oxide Nanoparticles Have Significant Antibacterial Properties?, *Antibiotics (Basel)* 10(7), **2021**.
36. Spoiala A., Ilie C. I., Motelica L., Fikai D., Semenescu A., Oprea O. C., Fikai A., Smart Magnetic Drug Delivery Systems for the Treatment of Cancer, *Nanomaterials (Basel)* 13(5), **2023**.
37. Abedizadeh R., Majidi F., Khorasani H. R., Abedi H., Sabour D., Colorectal cancer: a comprehensive review of carcinogenesis, diagnosis, and novel strategies for classified treatments, *Cancer Metastasis Rev* 43(2), **2024**, 729-753.
38. Gmeiner W. H., Recent Advances in Therapeutic Strategies to Improve Colorectal Cancer Treatment, *Cancers (Basel)* 16(5), **2024**.
39. He X., Lan H., Jin K., Liu F., Can immunotherapy reinforce chemotherapy efficacy? a new perspective on colorectal cancer treatment, *Frontiers in Immunology* 14, **2023**, 1237764.
40. Fluorouracil, in: J.K. Aronson (Ed.), *Meyler's Side Effects of Drugs*, Elsevier B.V.2016, pp. 382-394.

41. Gavrilas L. I., Cruceriu D., Mocan A., Loghin F., Miere D., Balacescu O., Plant-Derived Bioactive Compounds in Colorectal Cancer: Insights from Combined Regimens with Conventional Chemotherapy to Overcome Drug-Resistance, *Biomedicines* 10(8), **2022**.
42. Ojha A., Jaiswal S., Bharti P., Mishra S. K., Nanoparticles and Nanomaterials-Based Recent Approaches in Upgraded Targeting and Management of Cancer: A Review, *Cancers (Basel)* 15(1), **2022**.
43. Kasi P. B., Mallela V. R., Ambrozkiwicz F., Trailin A., Liska V., Hemminki K., Theranostics Nanomedicine Applications for Colorectal Cancer and Metastasis: Recent Advances, *International Journal of Molecular Sciences* 24(9), **2023**.
44. Perveen S., Orfali R., Al-Taweel A. M., Khan A., Alghanem B., Shaibah H., Simultaneous identification of phenolic and flavonoid contents in bee pollen by HPLC-ESI-MS data, *Biomedical Research* 30(5), **2019**, 770-774.
45. Oroian M., Ursachi F., Dranca F., Ultrasound-Assisted Extraction of Polyphenols From Crude Pollen, *Antioxidants (Basel)* 9(4), **2020**, 322-337.
46. Ilie C. I., Oprea E., Geana E. I., Spoiala A., Buleandra M., Gradisteanu Pircalabioru G., Badea I. A., Ficai D., Andronescu E., Ficai A., Ditu L. M., Bee Pollen Extracts: Chemical Composition, Antioxidant Properties, and Effect on the Growth of Selected Probiotic and Pathogenic Bacteria, *Antioxidants (Basel)* 11(5), **2022**.
47. Yang K., Wu D., Ye X., Liu D., Chen J., Sun P., Characterization of chemical composition of bee pollen in China, *J Agric Food Chem* 61(3), **2013**, 708-718.
48. Leja M., Mareczek A., Wyżgolik G., Klepacz-Baniak J., Czekońska K., Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species, *Food Chemistry* 100(1), **2007**, 237-240.
49. Ronald L. Prior X. W., Karen Schaich, Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(10), **2005**, 4290-4302.
50. Mayda N., Özkök A., Ecem Bayram N., Gerçek Y. C., Sorkun K., Bee bread and bee pollen of different plant sources: determination of phenolic content, antioxidant activity, fatty acid and element profiles, *Journal of Food Measurement and Characterization* 14(4), **2020**, 1795-1809.
51. Prdun S., Svecnjak L., Valentic M., Marijanovic Z., Jerkovic I., Characterization of Bee Pollen: Physico-Chemical Properties, Headspace Composition and FTIR Spectral Profiles, *Foods* 10(9), **2021**, 1-25.
52. Kaškonienė V., Kaškonas P., Maruška A., Volatile compounds composition and antioxidant activity of bee pollen collected in Lithuania, *Chemical Papers* 69(2), **2015**, 291-299.
53. Rzepecka-Stojko A., Stojko J., Kurek-Gorecka A., Gorecki M., Kabala-Dzik A., Kubina R., Mozdierz A., Buszman E., Polyphenols from Bee Pollen: Structure, Absorption, Metabolism and Biological Activity, *Molecules* 20(12), **2015**, 21732-21749.
54. Mărgăoan R., Özkök A., Keskin Ş., Mayda N., Urcan A. C., Cornea-Cipcigan M., Bee collected pollen as a value-added product rich in bioactive compounds and unsaturated fatty acids: A comparative study from Turkey and Romania, *Food Sci. Technol.* 149, **2021**, 111925-111936.
55. Martinelli F., Perrone A., Yousefi S., Papini A., Castiglione S., Guarino F., Cikatelli A., Aelaei M., Arad N., Gholami M., Salami S. A., Botanical, Phytochemical, Anti-Microbial and Pharmaceutical Characteristics of Hawthorn (*Crataegusmonogyna* Jacq.), Rosaceae, *Molecules* 26(23), **2021**, 7266-7286.
56. Di Napoli A., Zucchetti P., A comprehensive review of the benefits of *Taraxacum officinale* on human health, *Bulletin of the National Research Centre* 45(1), **2021**, 110-117.
57. Eugenia Martínez Valenzuela M., Díaz Peralta K., Jorquera Martínez L., Chamy Maggi R., *Taraxacum* Genus: Potential Antibacterial and Antifungal Activity, *Herbal Medicine*, London, United Kingdom, 2019, pp. 247-270.
58. Denisow B., Denisow-Pietrzyk M., Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review, *J Sci Food Agric* 96(13), **2016**, 4303-4309.
59. Belhamra Z., Harzallah D., Naili O., Belhadj H., Probiotic potential of lactobacillus strains isolated from fresh bee pollen, *Der Pharmacia Lettre* 8, **2016**, 357-365.
60. Asama T., Arima T. H., Gomi T., Keishi T., Tani H., Kimura Y., Tatefuji T., Hashimoto K., *Lactobacillus kunkeei* YB38 from honeybee products enhances IgA production in healthy adults, *Journal of Applied Microbiology* 119(3), **2015**, 818-826.

61. Belhadj H., Harzallah D., Bouamra D., Khennouf S., Dahamna S., Ghadbane M., Phenotypic and Genotypic Characterization of Some Lactic Acid Bacteria Isolated from Bee Pollen: A Preliminary Study, *Bioscience of Microbiota, Food and Health* 33(1), **2014**, 11-23.
62. Daoud A., Malika D., Bakari S., Hfaiedh N., Mnafgui K., Kadri A., Gharsallah N., Assessment of polyphenol composition, antioxidant and antimicrobial properties of various extracts of Date Palm Pollen (DPP) from two Tunisian cultivars, *Arabian Journal of Chemistry* 12(8), **2019**, 3075-3086.
63. Davani-Davari D., Negahdaripour M., Karimzadeh I., Seifan M., Mohkam M., Masoumi S. J., Berenjian A., Ghasemi Y., Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications, *Foods* 8(3), **2019**, 1-27.
64. Li J.-L., Li W.-L., Zhang J., Pang Y.-t., Xiong J., Wu P., Wei B.-r., Li X.-J., Huang Q., Tang Q.-H., Zhao C.-H., Wang Q., Liu Z.-L., Chen Y., Dong Z.-x., Zhao Y.-z., Guo J., Seasonal Dynamics of the Microbiota and Nutritional Composition in Bee Bread from *Apis cerana* and *Apis mellifera* Colonies, *Food Research International*, **2023**.
65. Leponiemi M., Freitag D., Moreno-Torres M., Pferschy-Wenzig E. M., Becker-Scarpitta A., Tiusanen M., Vesterinen E. J., Wirta H., Honeybees' foraging choices for nectar and pollen revealed by DNA metabarcoding, *Sci Rep* 13(1), **2023**, 14753.
66. Isopescu R. D., Spulber R., Josceanu A. M., Mihaiescu D. E., Popa O., Romanian bee pollen classification and property modelling, *Journal of Apicultural Research* 59(4), **2020**, 443-451.
67. Spulber R., Dogaroglu M., Babeanu N., Popa O., Physicochemical characteristics of fresh bee pollen from different botanical origins, *Romanian Biotechnological Letters* 23(1), **2018**, 13357-13365.
68. Tremil J., Lelakova V., Smejkal K., Paulickova T., Labuda S., Granica S., Havlik J., Jankovska D., Padrtova T., Hosek J., Antioxidant Activity of Selected Stilbenoid Derivatives in a Cellular Model System, *Biomolecules* 9(9), **2019**.
69. Julia M., Eugenia Marta K., María José N., Agustín G. A., Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments, in: C.J. Goncalo (Ed.), *Flavonoids*, IntechOpen, Rijeka, 2017, p. Ch. 11.
70. Srivastava R., Physicochemical, antioxidant properties of carotenoids and its optoelectronic and interaction studies with chlorophyll pigments, *Sci Rep* 11(1), **2021**, 18365.
71. Bechir B., Imen R., Potential Antioxidant Activity of Terpenes, in: P. Shagufta, A.-T. Areej Mohammad (Eds.), *Terpenes and Terpenoids*, IntechOpen, Rijeka, 2021, p. Ch. 5.
72. Rocchetti G., Senizza B., Zengin G., Okur M. A., Montesano D., Yildiztugay E., Lobine D., Mahomoodally M. F., Lucini L., Chemical Profiling and Biological Properties of Extracts from Different Parts of *Colchicum Szovitsii* Subsp. *Szovitsii*, *Antioxidants (Basel)* 8(12), **2019**.
73. Tawfik A. I., Ahmed Z. H., Abdel-Rahman M. F., Moustafa A. M., Effect of some bee bread quality on protein content and antioxidant system of honeybee workers, *International Journal of Tropical Insect Science* 43(1), **2022**, 93-105.
74. Dranca F., Ursachi F., Oroian M., Bee Bread: Physicochemical Characterization and Phenolic Content Extraction Optimization, *Foods* 9(10), **2020**.
75. Ilie C.-I., Spoiala A., Fikai D., Nicoara A.-I., Oprea O.-C., Surdu V.-A., Trusca R. D., Andronescu E., Ditu L.-M., Fikai A., Magnetic platforms based on magnetite and polyphenols with antimicrobial activity, *U.P.B. Sci. Bull., Series B* 84(4), **2022**, 45-58.
76. Vlad I. M., Nuță D. C., Ancuceanu R. V., Caproiu M. T., Dumitrascu F., Marinas I. C., Chifiriuc M. C., Măruțescu L. G., Zarafu I., Papacocea I. R., Vasile B. Ș., Nicoară A. I., Ilie C.-I., Fikai A., Limban C., New O-Aryl-Carbamoyl-Oxymino-Fluorene Derivatives with MI-Crocibidal and Antibiofilm Activity Enhanced by Combination with Iron Oxide Nanoparticles, *Molecules* 26(10), **2021**.
77. Ilie C. I., Spoiala A., Geana E. I., Chircov C., Fikai A., Ditu L. M., Oprea E., Bee Bread: A Promising Source of Bioactive Compounds with Antioxidant Properties-First Report on Some Antimicrobial Features, *Antioxidants (Basel)* 13(3), **2024**.
78. Sabur M. A., Gafur M. A., Wang X., Crystallographic, Morphological, Magnetic, and Thermal Characterization of Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles (Fe₃O₄) Synthesized by Chemical Coprecipitation Method and Calcined at 250°C for 4 hr, *Journal of Nanomaterials* 2024, **2024**, 1-9.

79. Niculescu A. G., Morosan A., Birca A. C., Gherasim O., Oprea O. C., Vasile B. S., Purcareanu B., Mihaiescu D. E., Radulescu M., Grumezescu A. M., Microwave-Assisted Silanization of Magnetite Nanoparticles Pre-Synthesized by a 3D Microfluidic Platform, *Nanomaterials (Basel)* 13(20), **2023**.
80. Sato J., Kobayashi M., Kato H., Miyazaki T., Kakihana M., Hydrothermal synthesis of magnetite particles with uncommon crystal facets, *Journal of Asian Ceramic Societies* 2(3), **2018**, 258-262.
81. Cheralayikkal S., Manoj K., Safna Hussan K. P., Formulation and evaluation of a smart drug delivery system of 5-fluorouracil for pH-sensitive chemotherapy, *Heliyon* 8(7), **2022**, e09926.
82. Mudalige T., Qu H., Van Haute D., Ansar S. M., Paredes A., Ingle T., Chapter 11 - Characterization of Nanomaterials: Tools and Challenges, in: A. López Rubio, M.J. Fabra Rovira, M. Martínez Sanz, L.G. Gómez-Mascaraque (Eds.), *Nanomaterials for Food Applications*, Elsevier 2019, pp. 313-353.
83. Shimojo A. A. M., Fernandes A. R. V., Ferreira N. R. E., Sanchez-Lopez E., Santana M. H. A., Souto E. B., Evaluation of the Influence of Process Parameters on the Properties of Resveratrol-Loaded NLC Using 2(2) Full Factorial Design, *Antioxidants (Basel)* 8(8), **2019**.
84. Predoi D., Balas M., Badea M. A., Ciobanu S. C., Buton N., Dinischiotu A., Dextran-Coated Iron Oxide Nanoparticles Loaded with 5-Fluorouracil for Drug-Delivery Applications, *Nanomaterials (Basel)* 13(12), **2023**.
85. Ayyanaar S., Bhaskar R., Esthar S., Vadivel M., Rajesh J., Rajagopal G., Design and development of 5-fluorouracil loaded biodegradable magnetic microspheres as site-specific drug delivery vehicle for cancer therapy, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 546, **2022**.
86. Sanli O., Kahraman A., Solak E. K., Olukman M., Preparation of magnetite-chitosan/methylcellulose nanospheres by entrapment and adsorption techniques for targeting the anti-cancer drug 5-fluorouracil, *Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology* 44(3), **2016**, 950-959.
87. Martinez-Morales F., Alonso-Castro A. J., Zapata-Morales J. R., Carranza-Álvarez C., Aragon-Martinez O. H., Use of standardized units for a correct interpretation of IC50 values obtained from the inhibition of the DPPH radical by natural antioxidants, *Chemical Papers* 74(10), **2020**, 3325-3334.
88. Ullah M., Kim D.-S., Hun Park K., Evaluating antioxidant activity of phenolic mediated Fe₃O₄ nanoparticles using *Usnea Longissima* methanol extract, *Results in Chemistry* 4, **2022**.
89. Shah S. T., W A. Y., Saad O., Simarani K., Chowdhury Z., A A. A., Al-Ani L. A., Surface Functionalization of Iron Oxide Nanoparticles with Gallic Acid as Potential Antioxidant and Antimicrobial Agents, *Nanomaterials (Basel)* 7(10), **2017**.
90. Shah S. T., Yehye W. A., Chowdhury Z. Z., Simarani K., Magnetically directed antioxidant and antimicrobial agent: synthesis and surface functionalization of magnetite with quercetin, *PeerJ* 7, **2019**, e7651.