
SUMMARY OF THE PhD THESIS

Analytical and biological studies of several bioactive compounds of the most used tree nuts and the positive impact on health

PhD candidate: **Marius Emil Rusu**

Scientific supervisor: **Prof. Laurian Vlase, PhD**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENT

INTRODUCTION	15
ACTUAL STATE OF KNOWLEDGE	
1. General knowledge about tree nuts	19
1.1. Tree nut overview	19
1.2. Macro and micronutrients in tree nuts	19
1.3. Phytochemicals in tree nuts	22
1.4. Health benefits of tree nut consumption	23
1.4.1. Tree nut consumption and cardiometabolic disorders	23
1.4.2. Tree nut consumption and blood lipid	25
1.4.3. Tree nut consumption and cancer	28
1.4.4. Tree nut consumption and cognitive disorders	31
1.4.5. Other possible beneficial associations	33
1.5. Potential mechanisms responsible for beneficial activities	34
1.5.1. Association between tree nuts and gastrointestinal microbiota	39
1.6. Agricultural waste and tree nut by-products	39
PERSONAL CONTRIBUTIONS	
1. General objectives	43
2. Study 1. Bioactive compounds of walnut (<i>Juglans regia</i> L.) septum and the antioxidant activity	45
2.1. Introduction	45
2.2. Materials and methods	46
2.2.1. Chemicals and samples	46
2.2.2. Preparation of extracts	46
2.2.3. Quantitative determination of total bioactive compounds	47
2.2.4. Phytochemical analysis by LC-MS/MS	48
2.2.5. Antioxidant activity assays	50
2.2.6. Tyrosinase inhibitory activity	50
2.2.7. Experimental conditions for phytochemical-rich extracts	51
2.2.8. Statistical analysis	51
2.3. Results and discussion	51
2.3.1. Fitting the experimental data with the models	51
2.3.2. The Influence of variables on studied parameters	56

2.3.3. Quantitative determinations of the bioactive compounds	60
2.3.4. Identification and quantification of individual polyphenols	62
2.3.5. Identification and quantification of phytosterols	63
2.3.6. Antioxidant activity	63
2.3.7. Tyrosinase inhibitory activity	65
2.4. Conclusions	65
3. Study 2. Assessment of tocopherols and biological effects of walnut (<i>Juglans regia</i> L.) septum	67
3.1. Introduction	67
3.2. Materials and methods	68
3.2.1. Reagents	68
3.2.2. Plant matrices	68
3.2.3. Tocopherol quantification by LC-MS/MS	68
3.2.4. Enzyme inhibitory activity	69
3.2.5. Antibacterial activity	70
3.2.6. Antifungal activity	71
3.2.7. Antimutagenic assay	71
3.2.8. Biological activities on cell lines	72
3.2.9. Statistical analysis	74
3.3. Results and discussion	74
3.3.1. Bioactive compounds present in septum	74
3.3.2. Biological activities	77
3.4. Conclusions	86
4. Study 3. The effects of walnut (<i>Juglans regia</i> L.) kernel and septum in induced-aged and naturally aged rats	87
4.1. Introduction	87
4.2. Materials and methods	88
4.2.1. Reagents	88
4.2.2. Animals and experimental protocol	88
4.2.3. Preparation of the walnut septum extract	89
4.2.4. Biological samples	90
4.2.5. Determination of total protein content	91
4.2.6. Hematological and biochemical analyses	91
4.2.7. Antioxidant cellular status	91
4.2.8. Oxidative stress biomarkers	92
4.2.9. Acetylcholinesterase activity	94
4.2.10. Histopathological and immunohistochemical analyses	94
4.2.11. Statistical analysis	95

4.3. Results	95
4.3.1. Body weight and organ indices	95
4.3.2. Hematological and biochemical analyses	96
4.3.3. Antioxidant cellular status	99
4.3.4. Oxidative stress biomarkers	100
4.3.5. Acetylcholinesterase activity	102
4.3.6. Histopathological and immunohistochemical analyses	103
4.4. Discussion	106
4.5. Conclusions	111
5. Study 4. Phytochemical profile and biological activities of hazelnut (<i>Corylus avellana</i> L.) involucre	113
5.1. Introduction	113
5.2. Materials and methods	114
5.2.1. Chemicals	114
5.2.2. Plant samples	114
5.2.3. Determination of bioactive compounds and antioxidant activity	115
5.2.4. Phytochemical analysis by LC-MS	117
5.2.5. Biological activities of the optimal HI extract	118
5.2.6. Biological activities of HI extract on cell lines	119
5.2.7. Statistical analysis	120
5.3. Results and discussion	121
5.3.1. Fitting the experimental data with the models	121
5.3.2. Influence of experimental conditions	124
5.3.3. Determination of bioactive compounds and antioxidant activity	125
5.3.4. Individual bioactive compounds	127
5.3.5. Enzyme inhibitory activities	130
5.3.6. Biological activities on cell lines	131
5.4. Conclusions	134
6. General conclusions	135
7. Originality of the thesis	137
REFERENCES	139

Keywords: tree nuts, by-products, walnut septum, hazelnut involucre, phytochemical profile, biological activity

INTRODUCTION

Due to nutritional choices, population aging, or sedentary lifestyle, the whole world is facing an increased incidence of cardiometabolic diseases, cancer, or neurodegenerative disorders associated with a decrease in the quality of life. Healthy diet is a modifiable lifestyle factor that has been associated with overall health. Tree nuts are complete functional foods containing valuable bioactive compounds that could prevent many diseases and delay age-related pathologies. Scientific findings also revealed that tree nut by-products could provide the same benefits. Guided by these facts, we analyzed several waste-products which were rarely mentioned in the scientific literature.

In the first chapter of the *Personal Contributions* section, we described the walnut septum (WS), a scarcely tested by-product. We obtained WS extract (WSE) with high content in bioactive compounds and antioxidant activity based on an original experimental design using Design of Experimental (DoE) approach. We characterized the phytochemical profile of the richest polyphenolic WSE using HPLC-MS/MS and evaluated its biological potential.

We extended the WSE knowledge in our second experiment. The tocopherol content was determined by LC-MS/MS. The *in vitro* inhibiting assessment against α -glucosidase and lipase attested a potential in diabetes or obesity management. Also, the WSE demonstrated antimicrobial potential and revealed antimutagenic inhibitory effects. The cytotoxicity of the extract was assessed on cancerous and normal cell lines. Additionally, the extract demonstrated antioxidant and anti-inflammatory *in vitro* activities.

In the third study, we assessed the antioxidant effects of walnut kernel (WK) and WSE added to the diet in D-galactose (D-gal) induced aging rats and in naturally aged rats. Both food supplementations positively influenced several body measurements, biochemical parameters and antioxidant biomarkers, as well as brain and liver histological architecture. Additionally, both WK and WSE lowered acetylcholinesterase activity, a potential strategy in managing neurodegenerative disorders. The findings provide scientific evidence that dietary supplementation with WK or WSE can have the ability to maintain health functions and may reduce the risk of age-related diseases or delay the onset of aging processes.

In the last chapter, the phenolic and sterolic compositions, as well as the antioxidant and biological activities of hazelnut involucre (HI) were evaluated. Experimental designs were developed to select the optimum extraction conditions. LC-MS/MS analyses revealed important amounts of individual polyphenols and phytosterols. The *in vitro* antioxidant tests, enzyme inhibitory assays, cytotoxic and antioxidant effects on two cancerous cell lines and on normal cells were performed.

ACTUAL STATE OF KNOWLEDGE

Tree nuts, almonds (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb), Brazil nuts (*Bertholletia excelsa* Bonpl.), cashews (*Anacardium occidentale* L.), hazelnuts (*Corylus avellana* L.), macadamias (*Macadamia integrifolia* Maiden & Betche), pecans (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K.Koch), pine nuts (*Pinus pinea* L.), pistachios (*Pistacia vera* L.), and walnuts (*Juglans regia* L.) have been part of the human diet for millennia ¹. Because of the protein content, healthy fat profile ², and biologically active secondary metabolites, including polyphenols, phytosterols, sphingolipids, lignans, they are considered important components of a healthy diet. As many clinical trials and prospective or retrospective studies demonstrated ³, tree nuts can improve lipid profile, decrease inflammatory biomarkers, favorably influence cardiometabolic and cancer risk factors ⁴, prevent or delay the onset of cognitive dysfunction during aging, overcome sarcopenia or osteoarthritis through different mechanisms ⁵. Several tree nut by-products were recognized as sources of bioactive compounds having diverse biological activities, such as antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, or antimutagenic.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

As few data are available about walnut septum and hazelnut involucre, the aim of this thesis was the in-depth assessment of the phytochemical profiles of these matrices and their biological activities.

Study 1. Bioactive compounds of walnut (*Juglans regia* L.) septum and the antioxidant activity

The main objectives of this study were: (1) to obtain WSEs with high content in bioactive compounds and antioxidant activity based on an original experimental design using DoE approach; (2) characterization of the phytochemical profile of the WSEs using LC-MS/MS; (3) evaluation of the biological potential of the richest polyphenolic WSE. The variables of the experimental design were: extraction method (maceration and Ultra-Turrax extraction), temperature, solvent (acetone and ethanol), and percentage of water in the solvent. The first quantifiable responses were: total phenolic content, total flavonoid content, condensed tannins, and ABTS antioxidant capacity. The phytochemical profile of lyophilized extracts obtained by Ultra-Turrax extraction, the most efficient method, was further determined by LC-MS/MS analysis of individual polyphenolic and phytosterol compounds. It is the first study to assay the

detailed composition of WS in hydrophilic and lipophilic compounds. The biological potential of the richest polyphenolic WSE was also evaluated by FRAP and DPPH antioxidant capacity and the inhibition of tyrosinase, an enzyme involved in the browning in fruits and vegetables, skin wrinkles and aging. Conclusion: The phytochemical profile of the analyzed extracts proves that WS can be a valuable source of biologically active compounds (polyphenols) for food and/or pharmaceutical industry and warrant the continuation of current research in further evaluating its bioactive potential ⁶.

Study 2. Assessment of tocopherols and biological effects of walnut (*Juglans regia* L.) septum

In this study, a rich phenolic WSE, previously selected, was further examined. The tocopherol content determined by LC-MS/MS revealed higher amounts of α -tocopherol compared to γ - and δ -tocopherols. Moreover, several biological activities were investigated. The *in vitro* inhibiting assessment against acetylcholinesterase, α -glucosidase, or lipase attested a real management potential in diabetes and obesity. The extract demonstrated very strong antimicrobial potential against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella enteritidis*. It also revealed moderate (36.08%) and strong (43.27%) antimutagenic inhibitory effects against TA 98 and TA 100 strains. The cytotoxicity of the extract was assessed on cancerous (A549, T47D-KBluc, MCF-7) and normal (human gingival fibroblasts (HGF)) cell lines. Flow cytometry measurements confirmed the cytotoxicity of the extract in the cancerous cell lines. Additionally, the extract demonstrated antioxidant activity on all four cell types, as well as anti-inflammatory activity by lowering the inflammatory cytokines (interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), interleukin-1 β (IL-1 β)) evaluated in HGF cells. To the best of our knowledge, most of the cellular model analyses were performed for the first time for this matrix. The results prove that walnut septum may be a potential phytochemical source for pharmaceutical and food industry ⁷.

Study 3. The effects of walnut (*Juglans regia* L.) kernel and septum in induced-aged and naturally aged rats

Antioxidant dietary intervention is considered a potential strategy in delaying age-related dysfunctions. In this study of 56 days, we assessed the antioxidant effects of WK and WSE in a D-gal-induced aging model and in a naturally aged rat model. Young Wistar rats, treated with D-gal (1200 mg/week), and old rats received daily WK or WSE added to the feed. After 8 weeks, blood, liver, and brain samples were collected and hematological, biochemical, oxidative stress biomarkers, histological, and immunohistochemical analyses were performed. Moreover, acetylcholinesterase activity was investigated in brain homogenates. The outcomes demonstrated significant improvement in cellular antioxidant activity and/or decrease of reactive

oxygen species, advanced glycation end products, nitric oxide, malondialdehyde, or increase of glutathione after WK or WSE intake in both models. Additionally, WSE showed hypoglycemic effect, and both WK and WSE lowered acetylcholinesterase activity. Both diets could protect neurons against the induced senescence and could reverse the pathological conditions in the physiological aged brain. Thus, dietary supplementation with WK or WSE can maintain the liver and brain health and reduce the risk of age-related diseases, as well as delaying the onset of aging processes ⁸.

Study 4. Phytochemical profile and biological activities of hazelnut (*Corylus avellana* L.) involucre

The aim of the present study was to evaluate the phenolic and sterolic composition, as well as the antioxidant and other biological activities of HI extracts. Experimental designs were developed in order to select the optimum extraction conditions (solvent, temperature, time) using turbo-extraction by Ultra-Turrax for obtaining extracts rich in bioactive compounds. Qualitative and quantitative analyses were performed by LC-MS and LC-MS/MS and they revealed important amounts of individual polyphenols and phytosterols, molecules with antioxidant potential. The richest polyphenolic HI extract with the highest antioxidant activity by TEAC assay was further evaluated by other *in vitro* antioxidant tests (DPPH, FRAP) and enzyme inhibitory assays. Additionally, the cytotoxic and antioxidant effects of this extract on two cancerous cell lines and on normal cells were tested. This is the first study to analyze the composition of both hydrophilic and lipophilic bioactive compounds in HI extracts. Our findings ⁹ reveal that this plant by-product presents strong biological activities, justifying further research, and it could be considered an inexpensive source of natural antioxidants for food, pharmaceutical, or cosmetic industry.

General conclusions and originality

Tree nuts abound in macro and micronutrients of high biological value and are considered complete functional foods ¹⁰. Similarly, tree nut by-products can be rich in bioactive molecules with valuable biological activities. Our studies focused on two by-products, walnut septum and hazelnut involucre, with limited references in scientific literature and revealed their phytochemical profile and positive health benefits.

The originality of this PhD thesis can be found in each chapter as most of the experiments were performed for the first time on these matrices. Three review articles, from the *Actual State of Knowledge* section, and four original articles, from the *Personal Contributions* section, were published in Q1 and Q2 ISI indexed journals, all with impact factors over 3. The cumulative impact factor of the seven published articles is 31.44. The results successfully accomplished the planned objectives.

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Studii analitice și biologice ai unor compuși bioactivi din sâmburi și impactul pozitiv asupra sănătății

Doctorand: **Marius Emil Rusu**

Coordonator științific: **Prof. dr. Laurian Vlase**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Cunoștințe generale despre sâmburi (nuci/tree nuts)	19
1.1. Prezentare generală	19
1.2. Macro and micronutrienți	19
1.3. Compuși fitochimici	22
1.4. Beneficiile pentru sănătate ale consumului de sâmburi (nuci)	23
1.4.1. Tulburări cardiometabolice	23
1.4.2. Profil lipidic	25
1.4.3. Cancer	28
1.4.4. Tulburări cognitive	31
1.4.5. Alte posibile beneficii asociate	33
1.5. Mecanisme responsabile pentru activitățile benefice	34
1.5.1. Asocierea cu microbiota gastrointestinală	39
1.6. Produse secundare din cultura de sâmburi (nuci)	39
CONTRIBUȚII PERSONALE	
1. Obiective generale	43
2. Studiul 1. Compuși bioactivi din septumul de nucă (<i>Juglans regia L.</i>) și activitatea antioxidantă	45
2.1. Introducere	45
2.2. Materiale și metode	46
2.2.1. Reactivi și probe	46
2.2.2. Prepararea probelor	46
2.2.3. Determinarea cantitativă a compușilor bioactivi totali	47
2.2.4. Analiza fitochimică prin LC-MS/MS	48
2.2.5. Determinarea activității antioxidante	50
2.2.6. Activitatea inhibitorie a tirozinazei	50
2.2.7. Condiții optime de extracție	51
2.2.8. Analiza statistică	51
2.3. Rezultate și discuții	51
2.3.1. Ajustarea datelor experimentale cu modelele	51
2.3.2. Influența variabilelor asupra parametrilor studiați	56

2.3.3. Determinarea cantitativă a compușilor bioactivi	60
2.3.4. Identificarea și determinarea polifenolilor individuali	62
2.3.5. Identificarea și determinarea fitosterolilor	63
2.3.6. Activitatea antioxidantă	63
2.3.7. Activitatea inhibitorie a tirozinazei	65
2.4. Concluzii	65
3. Studiul 2. Evaluarea tocoferolilor și a efectelor biologice ale septumului de nucă (<i>Juglans regia</i> L.)	67
3.1. Introducere	67
3.2. Materiale și metode	68
3.2.1. Reactivi	68
3.2.2. Matrici vegetale	68
3.2.3. Determinarea tocoferolilor prin LC-MS/MS	68
3.2.4. Activitatea inhibitorie enzimatică	69
3.2.5. Activitatea antibacteriană	70
3.2.6. Activitatea antifungică	71
3.2.7. Analiza antimutagenică	71
3.2.8. Activitatea biologică investigată pe linii celulare	72
3.2.9. Analiza statistică	74
3.3. Rezultate și discuții	74
3.3.1. Compuși bioactivi din septum	74
3.3.2. Activitate biologică	77
3.4. Concluzii	86
4. Studiul 3. Efecte ale miezului și septumului de nucă (<i>Juglans regia</i> L.) asupra șobolanilor bătrâni sau cu îmbătrânire indusă	87
4.1. Introducere	87
4.2. Materiale și metode	88
4.2.1. Reactivi	88
4.2.2. Animale și protocol experimental	88
4.2.3. Prepararea extractului de septum	89
4.2.4. Probe biologice	90
4.2.5. Determinarea conținutului total de proteine	91
4.2.6. Analize hematologice și biochimice	91
4.2.7. Statusul celular antioxidant	91
4.2.8. Biomarkeri ai stresului oxidativ	92
4.2.9. Activitatea acetilcolinesterazei	94
4.2.10. Analize histopatologice și imunohistochimice	94
4.2.11. Analiza statistică	95

4.3. Rezultate	95
4.3.1. Greutate corporală și indici ai organelor	95
4.3.2. Analize hematologice și biochimice	96
4.3.3. Statusul celular antioxidant	99
4.3.4. Biomarkeri ai stresului oxidativ	100
4.3.5. Activitatea acetilcolinesterazei	102
4.3.6. Analize histopatologice și imunohistochimice	103
4.4. Discuții	106
4.5. Concluzii	111
5. Studiul 4. Profilul fitochimic și activitățile biologice ale involucrului de alun (<i>Corylus avellana</i> L.)	113
5.1. Introducere	113
5.2. Materiale și metode	114
5.2.1. Reactivi	114
5.2.2. Probe vegetale	114
5.2.3. Determinarea compușilor bioactivi și activității antioxidante	115
5.2.4. Analiza fitochimică prin LC-MS	117
5.2.5. Activitatea biologică a extractului optim	118
5.2.6. Activitatea biologică asupra liniilor celulare	119
5.2.7. Analiza statistică	120
5.3. Rezultate și discuții	121
5.3.1. Ajustarea datelor experimentale cu modelele	121
5.3.2. Influența condițiilor experimentale	124
5.3.3. Determinarea compușilor bioactivi și a activității antioxidante	125
5.3.4. Compuși bioactivi individuali	127
5.3.5. Activitatea inhibitorie enzimatică	130
5.3.6. Activitatea biologică asupra liniilor celulare	131
5.4. Concluzii	134
6. Concluzii generale	135
7. Originalitatea tezei	137
REFERINȚE	139

Cuvinte cheie: sămburi (nuci/tree nuts), produse secundare, septum de nucă, involucru de alun, profil fitochimic, activitate biologică

INTRODUCERE

Din cauza alegerilor nutriționale, a îmbătrânirii populației sau a stilului de viață sedentar, întreaga lume se confruntă cu o incidență crescută a bolilor cardiometabolice, cancerului sau tulburărilor neurodegenerative asociate cu o scădere a calității vieții. Dieta sănătoasă este un factor de viață modificabil care a fost asociat cu sănătatea generală. Sâmburii (nuci, alune, migdale, etc.) sunt alimente complete care conțin compuși bioactivi, care ar putea preveni multe boli și întârzia patologiile legate de vârstă. Descoperirile științifice au arătat, de asemenea, că produsele secundare ale sâmburilor menționați ar putea oferi aceleași avantaje. Ghidați de aceste considerente, am analizat mai multe produse secundare care au fost mai puțin studiate până în prezent.

În primul capitol din secțiunea *Contribuții Personale*, am descris septumul de nucă, un produs secundar studiat mai rar. Bazat pe un design experimental original, am obținut extracte de septum cu un conținut ridicat de compuși bioactivi și activitate antioxidantă. Am caracterizat profilul fitochimic folosind LC-MS/MS și am evaluat potențialul biologic al extractelor cu conținut bogat în polifenoli.

Am extins cunoștințele despre septum în al doilea experiment. Conținutul de tocoferoli a fost determinat prin LC-MS/MS. Inhibarea *in vitro* a mai multor enzime atestă un potențial în managementul diabetului sau obezitității. De asemenea, extractul de septum a demonstrat potențial antimicrobian și antimutagen. Citotoxicitatea extractului a fost evaluată pe linii celulare canceroase și normale. În plus, extractul a demonstrat activitate antioxidantă și antiinflamatoare.

În cel de-al treilea studiu am evaluat efectele antioxidante ale nucilor și extractului de septum adăugate în dietă asupra șobolanilor cu îmbătrânire indusă prin D-galactoză și asupra șobolanilor bătrâni. Suplimentarea dietei a influențat pozitiv o serie de indici biochimici și biomarkeri ai stresului oxidativ în creier și ficat. În plus, cele două produse testate au redus activitatea acetilcolinesterazei, o strategie posibilă în gestionarea tulburărilor neurodegenerative. Rezultatele oferă dovezi științifice că suplimentarea dietei cu nuci sau extract de septum poate avea capacitatea de a menține sănătatea și poate reduce riscul de boli legate de vârstă sau poate întârzia debutul proceselor de îmbătrânire.

În ultimul capitol au fost evaluate compozițiile fenolică și sterolică, precum și activitățile antioxidante și biologice ale involucrului de alun. Au fost dezvoltate modele experimentale pentru a selecta condițiile optime de extracție. Analizele LC-MS/MS au arătat existența unor cantități importante de polifenoli și fitosteroli individuali în această matrice. Au fost efectuate teste antioxidante *in vitro*, analize inhibitoare ale unor enzime și s-au testat efectele citotoxice și antioxidante pe două linii celulare canceroase și pe celulele normale.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Sâmburii (semințele oleaginoase/tree nuts), din care fac parte migdalele (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb), nucile braziliene (*Bertholletia excelsa* Bonpl.), caju-ul (*Anacardium occidentale* L.), alunele (*Corylus avellana* L.), macadamia (*Macadamia integrifolia* Maiden & Betche), pecanele (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K.Koch), semințele de pin (*Pinus pinea* L.), fisticul (*Pistacia vera* L.) și nucile (*Juglans regia* L.) au făcut parte din dieta umană timp de milenii ¹. Datorită conținutului lor de proteine, profilului de grăsimi sănătoase ² și metaboliților secundari activi biologic, incluzând polifenoli, fitosteroli, sfingolipide, lignani, sunt considerați componente importante ale unei diete sănătoase. După cum au demonstrat numeroase studii clinice și studii prospective sau retrospective ³, sâmburii pot îmbunătăți profilul lipidic, pot reduce biomarkerii inflamatori, pot influența favorabil factorii de risc cardiometabolic și cancer ⁴, pot preveni sau întârzia debutul disfuncției cognitive în timpul îmbătrânirii, pot întârzia sarcopenia sau osteoartrita prin diferite mecanisme de acțiune ⁵. Mai multe produse secundare au fost cercetate și s-a demonstrat ca fiind surse de compuși bioactivi cu diverse activități biologice, cum ar fi activitate antioxidantă, antiinflamatorie, antimicrobiană sau antimutagenică.

CONTRIBUȚII PERSONALE

Deoarece puține date sunt disponibile despre septumul de nucleă și involucrul de alun, scopul acestei teze a fost evaluarea în profunzime a profilurilor fitochimice ale acestor matrice și a activităților lor biologice.

Studiul 1. Compuși bioactivi din septumul de nucleă (*Juglans regia* L.) și activitatea antioxidantă

Obiectivele principale ale acestui studiu au fost: (1) obținerea de extracte de septum cu conținut ridicat în compuși bioactivi și activitate antioxidantă pe baza unui design original; (2) caracterizarea profilului fitochimic al extractelor folosind LC-MS/MS; (3) evaluarea potențialului biologic al celui mai bogat extract în polifenoli. Variabilele experimentului au fost: metoda de extracție, temperatura, solventul (acetona și etanol) și procentul de apă din solvent. Primele răspunsuri cuantificabile au fost: conținutul fenolic total, conținutul total de flavonoide, taninurile condensate și capacitatea antioxidantă ABTS. În continuare s-au determinat prin analiza LC-MS/MS polifenolii și fitosterolii individuali din extractele liofilizate obținute prin metoda Ultra-Turrax (cea mai eficientă metodă de extracție testată). Este primul studiu din literatura de specialitate care descrie compoziția detaliată a septumului în compuși hidrofilii și

lipofili. De asemenea, s-a testat capacitatea antioxidantă FRAP și DPPH și de inhibare a tirozinazei a celui mai bogat extract în polifenoli. În concluzie, profilul fitochimic al extractelor analizate dovedește că septumul poate fi o sursă valoroasă de compuși biologic activi (polifenoli) pentru industria alimentară și/sau farmaceutică și se verifică continuarea cercetărilor curente în evaluarea suplimentară a potențialului său bioactiv ⁶.

Studiul 2. Evaluarea tocoferolilor și a efectelor biologice ale septumului de nucleu (*Juglans regia L.*)

În acest studiu s-a continuat studiul extractului de septum cel mai bogat în polifenoli. Conținutul de tocoferoli determinat prin LC-MS/MS a evidențiat cantități mai mari de α -tocoferoli comparativ cu γ - și δ -tocoferoli. Au fost investigate mai multe activități biologice ale WSE. Evaluarea *in vitro* a capacității de inhibare a acetilcolinesterazei, α -glucozidazei sau lipazei a arătat un potențial de management real în diabet sau obezitate. Extractul a demonstrat totodată potențial antimicrobian puternic față de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Salmonella enteritidis*. De asemenea, s-au evidențiat efecte antimutagenice moderate (36,08 %) și puternice (43,27 %) față de tulpinile TA 98 și TA 100. Citotoxicitatea extractului a fost evaluată pe linii de celule canceroase (A549, T47D-KBluc, MCF-7) și normale (HGF). Măsurătorile de citometrie au confirmat citotoxicitatea extractului pe liniile celulare canceroase. În plus, extractul a demonstrat activitate antioxidantă pe toate cele patru tipuri de celule, precum și activitate antiinflamatoare prin scăderea citokinelor inflamatorii (interleukin-6, interleukin-8, interleukin-1 β) evaluată în celulele HGF. În conformitate cu cunoștințele noastre, majoritatea analizelor pe model celular au fost efectuate pentru prima dată pe această matrice vegetală. Rezultatele demonstrează că septumul de nucleu ar putea fi o sursă importantă de compuși fitochimici pentru industria farmaceutică și alimentară ⁷.

Studiul 3. Efecte ale miezului și septumului de nucleu (*Juglans regia L.*) asupra șobolanilor bătrâni sau cu îmbătrânire indusă

Intervenția dietară antioxidantă este considerată ca potențială strategie de întârziere a instalării disfuncțiilor legate de vârstă. În acest studiu de 56 de zile, am evaluat efectele antioxidante ale miezului de nucleu și ale extractului de septum de nucleu într-un model de îmbătrânire indus cu D-galactoză și la șobolani bătrâni. Șobolani Wistar tineri (3 luni), tratați cu D-galactoză (1200 mg/săptămână), și șobolani bătrâni (20 luni) au primit zilnic miez sau extract de septum de nucleu adăugate în hrană. După 8 săptămâni, s-au recoltat probe de sânge, ficat și creier, s-au analizat biomarkeri hematologici, biochimici, de stres oxidativ și s-au efectuat analize histologice și imunohistochimice. De asemenea, s-a investigat activitatea acetilcolinesterazei în omogonate de creier. Rezultatele au demonstrat o îmbunătățire semnificativă a

activității antioxidante celulare și/sau scăderea speciilor reactive de oxigen, a produșilor de glicare avansată, a oxidului nitric, a malondialdehidei sau creșterea nivelului de glutation total după aport de miez de nucă sau de extract de septum de nucă în ambele modele. În plus, extractul de septum a prezentat un efect hipoglicemiant clar și ambele matrici vegetale au redus activitatea acetilcolinesterazei la nivel cerebral. Cele doua suplimentări alimentare ar putea proteja neuronii împotriva senescenței induse și ar putea încetini evoluția condițiilor patologice asociate vârstei în creierul îmbătrânit fiziologic. Astfel, suplimentarea alimentară cu miez de nucă sau extract de septum ar putea menține sănătatea ficatului și a creierului, reduce riscul de boli asociate îmbătrânirii și ar putea întârzia debutul proceselor de îmbătrânire ⁸.

Studiul 4. Profilul fitochimic și activitățile biologice ale involucrului de alun (*Corylus avellana* L.)

Scopul acestui studiu a fost de a evalua compoziția fenolică și sterolică, activitatea antioxidantă și alte activități biologice ale extractelor de involucru. Pe baza unui plan experimental și folosind turbo-extracția cu Ultra-Turrax, s-au identificat și selectat condițiile optime de extracție (solvent, temperatură, timp) pentru obținerea de extracte bogate în compuși bioactivi. Analizele calitative și cantitative efectuate prin LC-MS și LC-MS/MS au relevat cantități importante de polifenoli și fitosteroli individuali, molecule cu potențial antioxidant. Cel mai bogat extract în polifenoli, cu cea mai mare activitate antioxidantă prin testul TEAC, a fost analizat suplimentar *in vitro* pentru activitatea anti-antioxidantă (DPPH, FRAP) și capacitatea inhibitorie enzimatică. În plus, au fost testate efectele citotoxice și antioxidante ale acestui extract pe două linii celulare canceroase și pe celulele normale. Acesta este primul studiu care analizează compoziția compușilor bioactivi atât hidrofilii cât și lipofili din extracte de involucru. Rezultatele noastre ⁹ arată că involucrul exercită efecte biologice puternice, justificând cercetări suplimentare. De asemenea, această matrice ar putea fi considerată ca o sursă ieftină de antioxidanți naturali pentru industria alimentară, farmaceutică sau cosmetică.

Concluzii generale și originalitate

Sâmburii (semințele oleaginoase/tree nuts) abundă în macro și micronutrienți cu valoare biologică ridicată și sunt considerați alimente funcționale complete ¹⁰. În mod similar, produsele lor secundare pot fi bogate în molecule bioactive cu activități biologice valoroase. Studiile noastre s-au concentrat pe două produse secundare provenind de la specii autohtone, septumul de nucă și involucrul de alun, cu rare referințe în literatura științifică, și au revelat profilul lor fitochimic și beneficiile pozitive pentru sănătate.

Originalitatea acestei teze de doctorat reiese din fiecare capitol, majoritatea experimentelor fiind realizate pentru prima dată pe aceste matrici. Trei articole de tip review din secțiunea Stadiul Actual al Cunoașterii și patru articole științifice originale din secțiunea Contribuție Personală au fost publicate în reviste indexate ISI din quartilele Q1 și Q2, toate cu factori de impact peste 3. Factorul de impact cumulativ al celor șapte articole publicate este de 31,44. Rezultatele au îndeplinit cu succes obiectivele planificate.

SELECTIVE REFERENCES/REFERINȚE SELECTIVE

1. Casas-Agustench P, Salas-Huetos A, Salas-Salvadó J. Mediterranean nuts: origins , ancient medicinal benefits and symbolism. *Public Heal Nutr.* 2011;14(12A):2296-2301. doi:10.1017/S1368980011002540
2. Rusu ME, Gheldiu A-M, Mocan A, Vlase L, Popa D-S. Anti-aging potential of tree nuts with a focus on phytochemical composition, molecular mechanisms and thermal stability of major bioactive compounds. *Food Funct.* 2018;9(5):2554-2575. doi:10.1039/C7FO01967J
3. Aune D, Keum N, Giovannucci E, et al. Nut consumption and risk of cardiovascular disease, total cancer, all-cause and cause- specific mortality: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMC Med.* 2016;14(1):207. doi:10.1186/s12916-016-0730-3
4. Rusu ME, Mocan A, Ferreira ICFR, Popa D-S. Health Benefits of Nut Consumption in Middle-Aged and Elderly Population. *Antioxidants (Basel).* 2019;8(8):302. doi:10.3390/antiox8080302
5. Rusu ME, Sîmedrea R, Gheldiu A-M, et al. Benefits of tree nut consumption on aging and age-related diseases: Mechanisms of actions. *Trends Food Sci Technol.* 2019;88(2):104-120. doi:10.1016/j.tifs.2019.03.006
6. Rusu ME, Gheldiu A-M, Mocan A, et al. Process Optimization for Improved Phenolic Compounds Recovery from Walnut (*Juglans regia* L.) Septum: Phytochemical Profile and Biological Activities. *Molecules.* 2018;23(11):2814. doi:10.3390/molecules23112814
7. Rusu ME, Fizeșan I, Pop A, et al. Walnut (*Juglans regia* L.) Septum: Assessment of Bioactive Molecules and In Vitro Biological Effects. *Molecules.* 2020;25(9):2187. doi:10.3390/molecules25092187
8. Rusu ME, Georgiu C, Pop A, et al. Antioxidant Effects of Walnut (*Juglans regia* L.) Kernel and Walnut Septum Extract in a D-Galactose-Induced Aging Model and in Naturally Aged Rats. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(5):424. doi:10.3390/antiox9050424
9. Rusu ME, Fizeșan I, Pop A, et al. Enhanced Recovery of Antioxidant Compounds from Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Involucre Based on Extraction Optimization: Phytochemical Profile and Biological Activities. *Antioxidants (Basel).* 2019;8(10):460. doi:10.3390/antiox8100460
10. Alasalvar C, Salvadó J-S, Ros E. Bioactives and health benefits of nuts and dried fruits. *Food Chem.* 2020;314:126192. doi:10.1016/j.foodchem.2020.126192