

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA” DIN BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL FARMACIE**

TEZĂ DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. GÎRD CERASELA-ELENA

Student-doctorand:

IVAN IONUȚ-MĂDĂLIN

2024



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA” DIN BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL FARMACIE

CERCETĂRI FITOCHIMICE ȘI BIOLOGICE ASUPRA
UNOR EXTRACTE VEGETALE CU POTENȚIALĂ
ACȚIUNE ANTITUMORALĂ
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. GÎRD CERASELA-ELENA

Student-doctorand:

IVAN IONUȚ-MĂDĂLIN

2024

Cuprins

INTRODUCERE	1
I. PARTEA GENERALĂ	4
1. Afecțiunile tumorale maligne	4
1.1. Aspecte generale	4
1.2. Incidență și etiopatogenie.....	5
1.3. Tratamente și perspective terapeutice	9
2. Produse vegetale cu potențială acțiune antitumorală	11
2.1. <i>Berberis vulgaris</i> L.....	15
2.1.1. Compoziție chimică.....	15
2.1.2. Studii <i>in vitro</i>	15
2.1.3. Studii <i>in vivo</i>	18
2.2. <i>Capsicum annuum</i> L.....	19
2.2.1. Compoziție chimică.....	19
2.2.2. Studii <i>in vitro</i>	19
2.2.3. Studii <i>in vivo</i>	21
2.3. <i>Chelidonium majus</i> L.	21
2.3.1. Compoziție chimică.....	22
2.3.2. Studii <i>in vitro</i>	22
2.3.3. Studii <i>in vivo</i>	25
II. CONTRIBUȚII PERSONALE	26
3. Ipoteza de lucru și obiectivele generale	26
4. Obținerea și evaluarea calității extractelor vegetale	27
4.1. Introducere	27
4.2. Materiale și metode	27
4.2.1. Prepararea extractelor vegetale.....	27
4.2.2. Evaluarea conținutului de principii active	29
4.2.2.1. Dozarea flavonelor.....	29
4.2.2.2. Dozarea AFC-urilor	30
4.2.2.3. Dozarea polifenolilor totali	31
4.3. Rezultate și discuții	32

4.4. Concluzii	34
5. Analiza cromatografică calitativă și cantitativă a compușilor din extractele vegetale	35
5.1. Introducere	35
5.2. Materiale și metode	36
5.2.1. UHPLC-HRMS/MS	36
5.2.2. HPLC-DAD	39
5.3. Rezultate și discuții	40
5.4. Concluzii	52
6. Determinarea acțiunii antioxidante <i>in vitro</i> a extractelor vegetale	53
6.1. Introducere	53
6.2. Materiale și metode	53
6.2.1. Metoda DPPH.....	53
6.2.2. Metoda ABTS.....	54
6.2.3. Metoda FRAP.....	56
6.3. Rezultate și discuții	56
6.4. Concluzii	57
7. Evaluarea citotoxicității <i>in vitro</i> a extractelor vegetale pe linii celulare tumorale umane și pe celule normale umane	59
7.1. Introducere	59
7.2. Materiale și metode	59
7.3. Rezultate și discuții	64
7.4. Concluzii	94
8. Evaluarea citotoxicității <i>in vivo</i> a extractelor pe modelele <i>Daphnia magna</i> și <i>Daphnia pulex</i>	97
8.1. Introducere	97
8.2. Materiale și metode	98
8.3. Rezultate și discuții	99
8.4. Concluzii	107
CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE.....	108
BIBLIOGRAFIE.....	112
ANEXE.....	148

INTRODUCERE

Conform Organizației Mondiale a Sănătății, prin Agenția Internațională de Cercetare a Cancerului, în anul 2022 la nivel mondial (într-un număr de 185 de țări), au fost înregistrate 19,97 milioane de cazuri de cancer, comparativ cu 19,30 milioane în anul 2020 [1, 2]. Pe lângă factorii genetici, alți multipli factori de risc au un rol important în apariția carcinogenezei: fumatul, consumul de alcool, obezitatea și sedentarismul, expunerea la doze ridicate de radiații, poluarea atmosferică, dar și alimentația. Factorii de mediu prezintă un rol mai important în apariția cancerului, comparativ cu factorii genetici ereditari [3].

În carcinogenză sunt alterate o serie de mecanisme funcționale: procesul de diviziune celulară, apoptoza, diferențierea celulară, procesul de angiogeneză, răspunsul imunologic al organismului și procesul complex de metabolism al ADN-ului [4].

Metodele de tratament actuale cauzează multiple efecte adverse, instalarea rezistenței și toxicitate la administrare îndelungată, putând afecta calitatea vieții pacientului pe o durată de timp variabilă de la câteva săptămâni, la ani de zile [5]. Din aceste motive, o direcție de cercetare o reprezintă dezvoltarea de noi molecule, iar fitocompușii sunt surse inepuizabile de agenți terapeutici bine tolerați și cu diferite mecanisme de acțiune. Un studiu statistic de amploare efectuat pentru perioada 1981-2019 a evidențiat că un procent de 33,51% din totalul moleculelor descoperite au provenit din surse naturale sau sunt derivate ale unor molecule obținute din surse naturale [6]. Printre primele medicamente chimioterapice autorizate au fost cele a căror substanțe active sunt derivați ai alcaloizilor, după cum urmează: vinblastină (cancer bronho-pulmonar și cancer de sân), vincristină (leucemie), vinorelbina (cancer de sân) și paclitaxel (cancer de sân, cancer ovarian, cancer bronho-pulmonar) [7].

Stresul oxidativ, datorat concentrațiilor ridicate de specii reactive de oxigen, este promotor al hiperproliferării celulelor tumorale. Polifenolii sau flavonoidele au un rol marcant în neutralizarea radicalilor liberi, manifestând astfel efect antiproliferativ. Totodată compușii polifenolici au numeroase acțiuni biologice care pot influența pozitiv managementul afecțiunilor tumorale: antiinflamatoare, antibacteriene, hepatoprotectoare, antiadipogenă și antivirală [8].

Studiind datele de literatură, mi-am îndreptat atenția asupra unor materii prime vegetale cu un conținut bogat în alcaloizi cu proprietăți biologice și compuși polifenolici, în scopul

obținerii unor extracte vegetale cu potențială acțiune antitumorală. *Berberis vulgaris* L. (dracilă) aparține familiei de plante *Berberidaceae* și în compoziția fitochimică au fost identificați mai mulți compuși polifenolici, dar și alcaloidul berberină [9]. *Capsicum annuum* L. (ardei iute) aparține familiei de plante *Solanaceae* și este studiată atât pentru conținutul în capsaicină, cât și pentru compușii polifenolici [10]. *Chelidonium majus* L. (rostopască) aparține familiei de plante *Papaveraceae* și conține numeroși alcaloizi cu acțiune biologică (berberină, chelidonină, cheleritrină, sanguinarină), precum și polifenoli [11].

Obiectivele generale de cercetare științifică au constat în:

- selectarea materiilor prime vegetale (*Berberidis cortex*, *Capsicii fructus* și *Chelidonii herba*);
- stabilirea metodologiei de obținere a extractelor vegetale și selectarea solventului optim pentru extracția principiilor active de interes;
- determinarea profilului fitochimic al extractelor vegetale uscate prin dozări spectrofotometrice și analize cromatografice de înaltă performanță calitative și cantitative;
- determinarea profilului antioxidant *in vitro* al extractelor vegetale prin mai multe metode standardizate;
- determinarea citotoxicității *in vitro* pe linii celulare tumorale umane și pe celule normale umane, precum și determinarea toxicității *in vivo* pe model experimental tip nevertebrat.

Această teză de doctorat este compusă din două părți, și anume: Partea generală, precum și Contribuții personale, adăugându-se Lista cu lucrări publicate, Lista cu abrevieri și simboluri, Introducerea, Concluzii și contribuțiile personale, Bibliografia și Anexe (Anexa nr. 1, 2 și 3).

I. PARTEA GENERALĂ

1. AFECȚIUNILE TUMORALE MALIGNE

În acest capitol s-au sintetizat date despre afecțiunile tumorale maligne: aspecte generale, incidență și etiopatogenie (factori de risc, cauze și mecanisme de acțiune), tratamente și perspective terapeutice.

2. PRODUSE VEGETALE CU POTENȚIALĂ ACȚIUNE ANTITUMORALĂ

În acest capitol au fost sintetizate informații despre: principalele clase de fitoconstituenți, acțiunile biologice, precum și extractele vegetale de *Berberis vulgaris* L., *Capsicum annuum* L. și *Chelidonium majus* L. (compoziția chimică, studii *in vitro* și studii *in vivo*).

II. CONTRIBUȚII PERSONALE

3. IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE GENERALE

Analizând datele literaturii de specialitate din partea generală a tezei și în scopul de a identifica alte terapii alternative pentru tratamentul tumorilor canceroase sau adjuvante în chimioterapie, mi-am îndreptat atenția asupra următoarelor produse vegetale: scoarța de dracilă (*Berberis vulgaris* L.), ardeiul iute (*Capsicum annuum* L.) și părțile aeriene de rostopască (*Chelidonium majus* L.).

Obiectivele generale propuse și ipoteza de lucru pentru realizarea studiilor doctorale au constat în:

- selectarea materiilor prime vegetale;
- identificarea particularităților morfologice și organoleptice specifice materiilor prime vegetale și analiza calitativă;
- stabilirea metodologiei de obținere a extractelor vegetale și alegerea solventului potrivit pentru extracția principiilor active de interes;
- determinarea profilului fitochimic al extractelor vegetale uscate prin dozări spectrofotometrice și analize cromatografice calitative și cantitative (UHPLC-HRMS/MS și HPLC-DAD);
- determinarea profilului antioxidant *in vitro* al extractelor vegetale prin metode standardizate (DPPH, ABTS și FRAP);
- determinarea citotoxicității *in vitro* pe linii celulare tumorale umane: Hep G2 (ficat), LoVo, HT-29 (colon), MDA-MB-231 (sân), SK-OV-3 (ovar) și PE/CA-PJ49 (limbă);
- determinarea citotoxicității *in vitro* pe celulele normale umane HUVEC;

- determinarea toxicității *in vivo* pe speciile nevertebrate *Daphnia magna* și *Daphnia pulex*;
- determinarea toxicității *in vivo* pe embrionii de *Daphnia magna*;
- analiza statistică a rezultatelor obținute pentru stabilirea potențialelor corelații între principiile active, proprietățile antioxidante și acțiunea antiproliferativă;
- publicarea de articole științifice în jurnale internaționale de profil cu rezultatele cercetărilor doctorale.

4. OBȚINEREA ȘI EVALUAREA CALITĂȚII EXTRACTELOR VEGETALE

Am ales obținerea extractelor vegetale prin liofilizare, deoarece se asigură un nivel ridicat de stabilitate și concentrații superioare pentru majoritatea compușilor activi, păstrându-se integritatea și efectul terapeutic al acestora. În liofilizare se utilizează temperaturi și presiuni scăzute, astfel solventul prezent din prelucrarea produsului vegetal sublimează și se obține un extract uscat (*Extracta sicca*) [12]. Pentru a identifica cel mai bun solvent pentru extracția diverșilor compuși chimici din produsele vegetale, cu diferite grade de polaritate, s-au realizat mai multe determinări experimentale pentru toate produsele vegetale. Astfel, a fost selectat ca solvent pentru extracție o soluție etanolică 50% în apă, având o toxicitate scăzută și bune proprietăți de dizolvare a principiilor active de interes. Pentru a determina calitatea produselor vegetale a fost evaluat conținutul de principii active (flavone, acizi fenolici și polifenoli) prin dozare spectrofotometrică.

Extractele vegetale s-au obținut cu randamente bune: 16,35% pentru *Berberidis extractum* (BVE), 7,65% pentru *Capsicii extractum* (CAE) și 18,45% pentru *Chelidonii extractum* (CME) [13, 14]. După efectuarea analizei cantitative spectrofotometrice, cele trei clase principale de compuși chimici activi responsabili pentru imprimarea efectului terapeutic (AFC-uri, flavone și polifenoli totali) au fost cuantificate doar în *Chelidonii extractum* (extractul de rostopască). În extractul de dracilă, flavonele nu au fost găsite, iar în extractul de ardei iute, acizii fenolcarboxilici nu au putut fi decelați prin tehnica Arnou (reacția cu reactivul Arnou a fost negativă atât la concentrații mari, cât și la concentrații mici ale probei) [13, 14]. În toate

extractele vegetale studiate s-au identificat și dozat spectrofotometric conținutul de polifenoli totali. În cazul extractului de dracilă (*Berberidis extractum*) s-a determinat cea mai mare concentrație de polifenoli totali (dracilă: $17,6780 \pm 3,9320$ g acid tanic/100 g extract uscat) comparativ cu celelalte extracte (rostopască: $10,0640 \pm 0,2455$ g acid tanic/100 g extract uscat; ardei iute: $4,7250 \pm 1,3619$ g acid tanic/100 g extract uscat) (Fig. 4.1.). Concentrațiile cele mai mari înregistrate pentru flavone au fost decelate în extractul de rostopască ($1,6067 \pm 0,0651$ g rutozidă/100 g extract uscat) și apoi în extractul de ardei iute ($1,1548 \pm 0,0442$ g rutozidă/100 g extract uscat), în extractul de dracilă acestea nefiind decelate prin tehnici de dozare spectrofotometrice (Fig. 4.2.). Decelarea acizilor fenolcarboxilici în *Berberidis extractum* a condus la obținerea unor concentrații mai mari (dracilă: $3,3886 \pm 0,3481$ g acid clorogenic/100 g extract uscat), comparativ cu celelalte extracte vegetale luate în lucru (rostopască: $3,0428 \pm 0,2057$ g acid clorogenic/100 g extract uscat) (Fig. 4.3.).

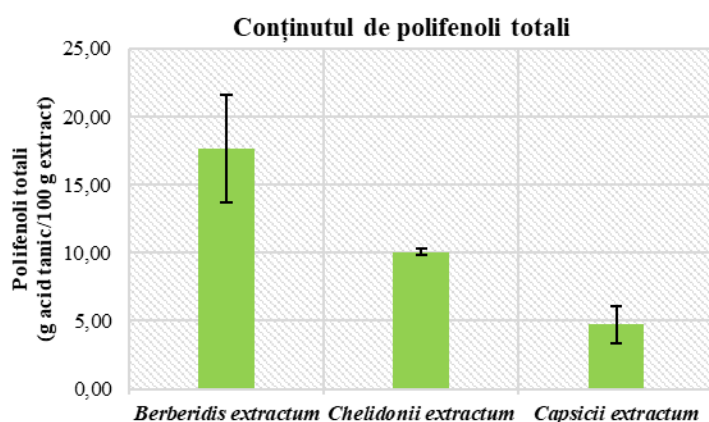


Figura 4.1. Conținutul de polifenoli totali în extractele vegetale

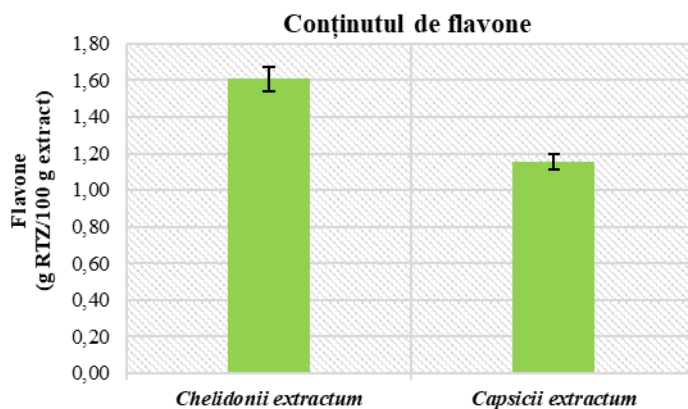


Figura 4.2. Conținutul de flavone în extractele vegetale

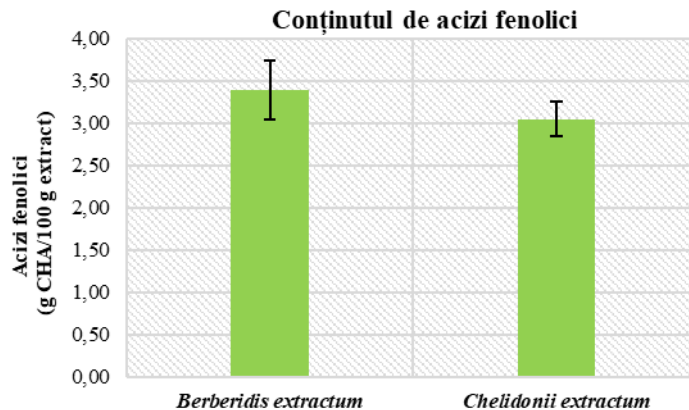


Figura 4.3. Conținutul de acizi fenolici în extractele vegetale

5. ANALIZA CROMATOGRAFICĂ CALITATIVĂ ȘI CANTITATIVĂ A COMPUȘILOR DIN EXTRACTELE VEGETALE

Ținând cont de posibilele variații de concentrație ale principiilor active, am identificat și am cuantificat conținutul de compuși polifenolici a extractelor vegetale studiate prin cromatografie de lichide ultra-performantă cuplată cu spectrometrie de masă de înaltă rezoluție (UHPLC-HRMS/MS). Alcaloizii au fost identificați fie prin UHPLC-HRMS/MS sau prin cromatografie de lichide de înaltă performanță cuplată cu o rețea de diode (HPLC-DAD). În cazul extractului hidroetanolic de dracilă au fost identificați în total 40 de compuși, hidroetanolic de ardei iute 70 de compuși polifenolici și 8 derivați ai capsaicinei, iar în extractul hidroetanolic de rostopască 59 de compuși polifenolici [13, 14]. În total, în extractele vegetale au fost identificate mai multe clase de compuși polifenolici, însumând 91 de compuși.

În toate extractele vegetale s-au identificat diferite flavonoide: 6-metoxiluteolina, apigenin-7-O-glicozilglucozida, apigenina (apigenin-7-O-glucuronida și apigenin-8-C-glucozida/izovitexina au fost identificate doar la extractul BVE), galangina, kaempferol, kaempferol (sau luteolin)-O-glucozida/izomeri, kaempferol-3-O-rutinozida (cu excepția CME), lehmanina, naringenina, quercitina, quercetin-3-O-glucuronida, rutina (quercetin 3-rutinozida). Dintre izoflavone, genisteina și gliciteina s-au găsit în toate extractele vegetale, iar genistina, daidzeina, biochanin A, sisotrin (biochanin A 7-O-β-D-glucozida), irilona, baptigenina și pratensein în extractele hidroetanolice de rostopască și ardei iute. Referitor la acizii fenolici și acizii dicarboxilici, extractul de ardei iute a fost mai bogat în aceste componente comparativ cu

celelalte două extracte vegetale, acidul galic, acidul clorogenic/neoclorogenic, acidul ferulic, acidul *p*-cumaric, acidul azelaic, acidul rozmarinic, acidul abscisic și acidul hidroxiferulic s-au regăsit în toate extractele vegetale studiate. Dintre diterpene, carnosol și rosmanol metil eter au fost identificate în cele trei extracte, acidul carnosic în CME și CAE, lignanul în toate extractele, cianidin-3-O-glucozida și cianidin-3-sambubiozida în CME și CAE.

În ceea ce privește analiza cantitativă, în cazul extractului hidroetanolic de rostopască, CME, dintre compușii flavonici, hiperozida (482,93 μg/g), kaempferol (247,87 μg/g), crisina (194,24 μg/g), rutina (188,52 μg/g), naringenina (146,88 μg/g) și quercitina (113,82 μg/g) s-au găsit în concentrații mai mari de 100 μg/g, dintre izoflavone - doar daidzeina (194,55 μg/g), iar dintre acizii fenolici și dicarboxilici, acidul galic (1027,84 μg/g), acidul clorogenic (400,40 μg/g), acid *p*-cumaric (290,22 μg/g) și acidul ferulic (161,31 μg/g). Referitor la extractul BVE, naringenina (90,41 μg/g) și acidul galic (540,00 μg/g) au fost determinați în cele mai mari concentrații. Pentru extractul hidroetanolic de ardei iute, CAE, kaempferol (377,26 μg/g), quercitina (312,02 μg/g), hesperetina (292,81 μg/g), rutina (240,5 μg/g), hiperozida (212,78 μg/g), naringenina (152,96 μg/g), galangina (102,1 μg/g) și apigenina (101,31 μg/g) au fost compușii flavonici în concentrații mai mari de 100 μg/g, dintre izoflavone, gliciteina (148,91 μg/g), iar dintre acizii fenolici, acidul clorogenic (207,71 μg/g) și acidul *p*-cumaric (117,58 μg/g) au fost prezenți în cele mai mari concentrații. Compușii flavonici însumează cantitativ 1580,64 μg/g în CME, 440,26 μg/g în BVE și 1863,78 μg/g în CAE, iar dintre toți compușii din cele trei extracte hidroetanolice, hiperozida identificată în CME s-a determinat în cea mai mare concentrație (482,93 μg/g). Cea mai mare concentrație de izoflavone a fost calculată în cazul CME (329,16 μg/g), iar pentru acizii fenolici cel mai concentrat extract a fost CME (1905,71 μg/g), acidul galic fiind predominant (1027,84 μg/g).

6. DETERMINAREA ACȚIUNII ANTIOXIDANTE *IN VITRO* A EXTRACTELOR VEGETALE

Pentru a obține un profil antioxidant cât mai complex a extractelor studiate care au prezentat o compoziție fitochimică variată (polifenoli, flavone, acizi fenolici și metaboliți secundari), am utilizat trei metode spectrofometrice standardizate de determinare: DPPH, ABTS și FRAP [15]. Astfel, cu cât valorile concentrațiilor unui extract au fost mai scăzute, cu atât

efectul său antioxidant a fost mai pronunțat, acționând ca un potent scavenger de radicali liberi.

Dintre extractele studiate, cel de dracilă a prezentat cele mai scăzute valori ale CI_{50} și CE_{50} în toate metodele de determinare a acțiunii antioxidante ($CI_{50, DPPH} = 0,2610$ mg/mL; $CI_{50, ABTS} = 0,0442$ mg/mL; $CE_{50, FRAP} = 0,1398$ mg/mL) (Fig. 6.1.). Așadar, extractul de dracilă a avut acțiunea antioxidantă cea mai puternică, având o valoare CI_{50} foarte apropiată de cea a standardului utilizat ca referință, acidul ascorbic ($CI_{50, acid\ ascorbic} = 0,0165$ mg/mL) [14]. *Capsicii extractum* a prezentat activitatea antioxidantă cea mai slabă, în urma aplicării metodelor antioxidante, care au condus la obținerea celor mai mari valori CI_{50} ($CI_{50, DPPH} = 1,6699$ mg/mL; $CI_{50, ABTS} = 0,2006$ mg/mL; $CE_{50, FRAP} = 0,5613$ mg/mL) (Fig. 6.1.) [13]. Pentru *Chelidonii extractum*, comparativ cu celelalte extracte analizate, s-au obținut valori intermediare pentru capacitatea antioxidantă ($CI_{50, DPPH} = 0,7643$ mg/mL; $CI_{50, ABTS} = 0,1790$ mg/mL; $CE_{50, FRAP} = 0,2814$ mg/mL). În concluzie, valorile înregistrate pentru toate cele trei extracte analizate reliefează o putere antioxidantă foarte bună care se corelează cu conținutul de principii active prezente în fiecare extract vegetal și care poate explica potențiala asociere a acestora în diverse preparate farmaceutice destinate prevenției sau anihilării stresului oxidativ de la nivelul organismului.

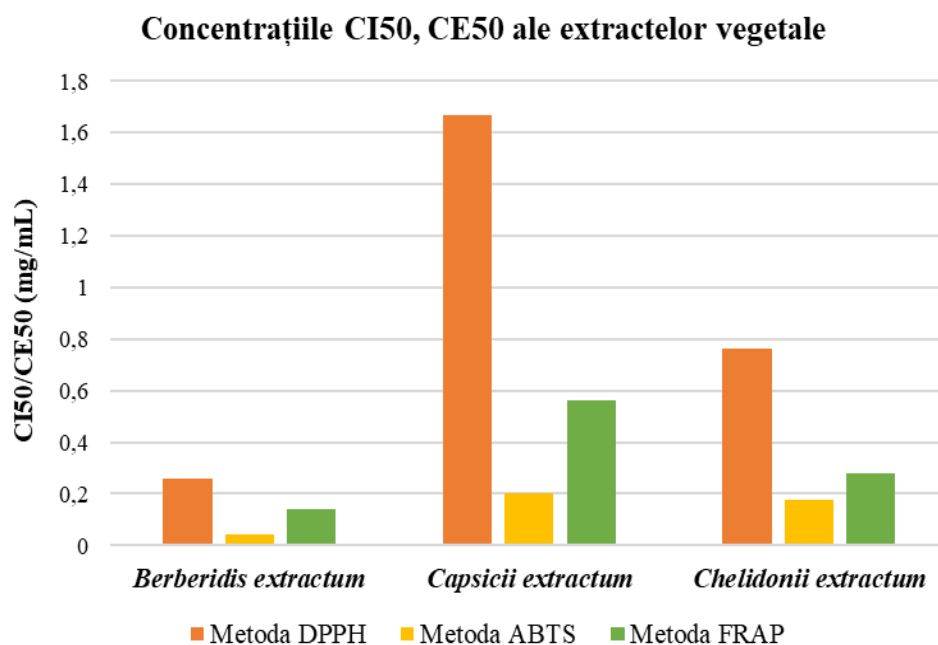


Figura 6.1. Valorile CI_{50} și CE_{50} ale extractelor vegetale prin cele trei metode

7. EVALUAREA CITOTOXICITĂȚII *IN VITRO* A EXTRACTELOR VEGETALE PE LINII CELULARE TUMORALE UMANE ȘI PE CELULE NORMALE UMANE

Conform Organizației Mondiale a Sănătății, tipurile de cancer hepatic, de colon, sân, ovar și al cavității bucale au avut o prevalență ridicată [1]. Studiile de citotoxicitate sunt preliminare pentru identificarea unor noi posibile terapii, iar tehnica MTS, o metodă MTT îmbunătățită, este considerată a fi una dintre cele mai sensibile metode cantitative [16]. Determinarea citotoxicității *in vitro* a fost realizată pe șase linii tumorale standardizate derivate din tumori de colon (LoVo, HT-29), din tumora mamară (MDA-MB-231), din tumora ovariană (SK-OV-3), din tumora hepatică (Hep G2), din tumora de limbă (PE/CA-PJ49) și, pentru control, pe celulele umane normale izolate din endoteliul cordonului ombilical (HUVEC). Efectul antiproliferativ al acestora a fost comparat cu cel al citostaticelor de referință cisplatină (Cis-Pt), 5-fluorouracil (5-FU) și doxorubicină (DOX).

Pe liniile celulare tumorale s-a observat un efect antiproliferativ dependent de concentrație și de timpul de expunere. Cea mai marcantă acțiune antiproliferativă s-a observat pe linia celulară tumorală derivată din adenocarcinom mamar MDA-MB-231, acestea fiind sub 80% la 48 ore, la toate extractele vegetale și la toate concentrațiile, cu excepția CME și CAE la concentrația de 6,25 μg/mL. Extractul hidroetanolic BVE a indus, la concentrația de 400 μg/mL și la 48 ore, o scădere a viabilităților celulare la 2,99% ± 0,44%, fiind astfel și cel mai mic procent de viabilitate celulară din aceste experimente. Raportându-mă la valorile CI_{50} , standardul de berberină (BS) s-a evidențiat cu cel mai puternic efect inhibitor al proliferării celulare, $CI_{50} = 20,22 \mu\text{g/mL} \pm 1,28 \mu\text{g/mL}$ (48 ore), în schimb valoarea CI_{50} a extractului hidroetanolic BVE a fost 117,30 μg/mL ± 2,65 μg/mL. În cazul extractului hidroetanolic CME și a extractului hidroetanolic de rostopască standardizat 2% (CME2), la 24 ore și la 48 ore, la concentrațiile de 400 μg/mL și 200 μg/mL, extractul CME a prezentat procente mai mici ale viabilităților celulare comparativ cu CME2. Comparând valorile CI_{50} ale celor două extracte hidroetanolic, în primele 24 ore, CME a prezentat un efect inhibitor mai accentuat (CME – 249,56 μg/mL ± 8,34 μg/mL; CME2 – 346,59 μg/mL ± 7,05 μg/mL), în schimb, la 48 ore, cele două valori au fost apropiate, extractul standardizat prezentând o valoare ușor mai scăzută (CME

– 186,26 $\mu\text{g/mL} \pm 2,87 \mu\text{g/mL}$; CME2 – 179,21 $\mu\text{g/mL} \pm 5,26 \mu\text{g/mL}$). Se poate concluziona că în cazul celor două produse vegetale rostopască (*Chelidonium majus* L.) și dracilă (*Berberis vulgaris* L.), la cele mai mari concentrații testate, cele mai scăzute procente de viabilitate celulară au fost obținute în cazul celulelor tratate cu extractele hidroetanolic totale și că întregul fitocomplex contribuie la acțiunea antitumorală (Fig. 7.1.).

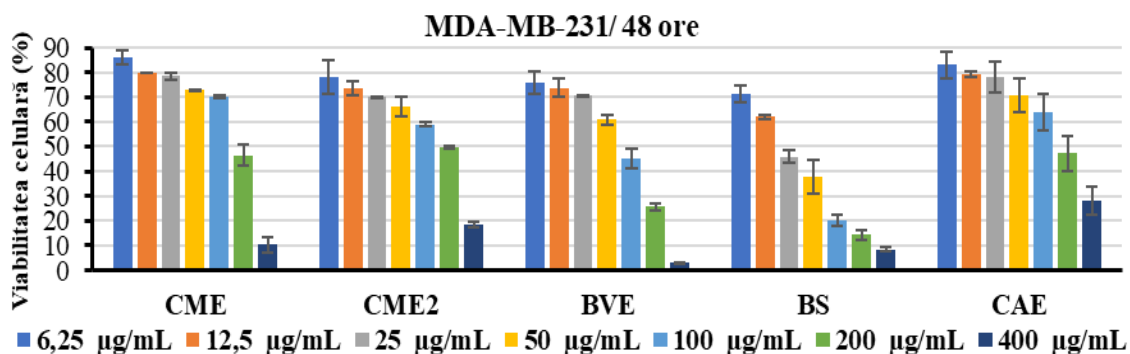


Figura 7.1. Viabilitatea celulară (%) la 48 ore a celulelor tumorale MDA-MB-231 tratate cu extractele vegetale

Al doilea cel mai scăzut procent de viabilitate celulară a fost observat pe linia celulară derivată din adenocarcinomul de colon LoVo, în cazul celulelor tratate cu BVE, la 48 ore și 400 $\mu\text{g/mL}$, și anume de $3,09\% \pm 2,66\%$. De asemenea, pe această linie celulară s-a obținut și cel mai scăzut procent de viabilitate celulară al extractului hidroetanolic CME – $3,63\% \pm 0,76\%$ la 48 ore și 400 $\mu\text{g/mL}$. Și în cazul acestei linii tumorale, extractele hidroetanolic totale au indus cea mai mare apoptoză celulară, subliniindu-se rolul întregului fitocomplex. Referitor la CI_{50} , valori apropiate s-au obținut pentru toate extractele vegetale, cea mai scăzută fiind însă pentru BS ($136,78 \mu\text{g/mL} \pm 1,97 \mu\text{g/mL}$) (Fig. 7.2.).

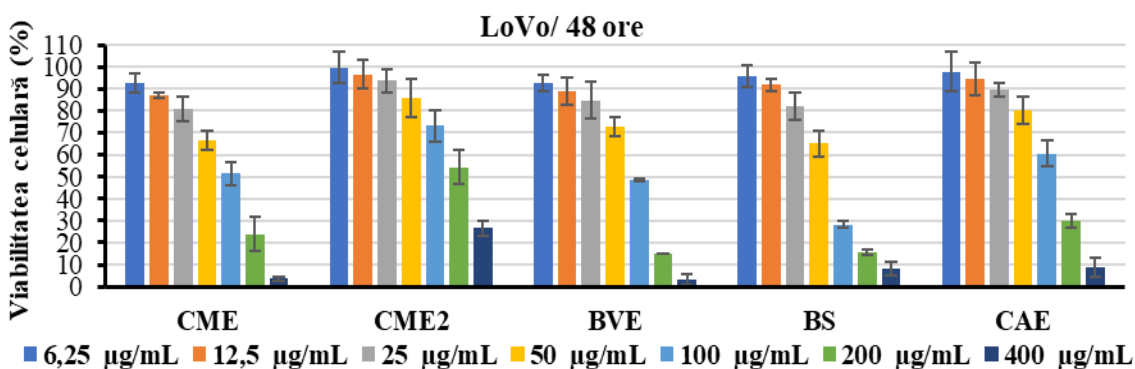


Figura 7.2. Viabilitatea celulară (%) la 48 ore a celulelor tumorale LoVo tratate cu extractele vegetale

În cazul celulelor derivate din tumora de limbă PE/CA-PJ49, standardul de berberină BS a determinat cea mai mare inhibare a proliferării celulare, viabilitate de $3,95\% \pm 0,66\%$ la cea mai mare concentrație și la 48 ore. Extractul hidroetanolic BVE ($4,70\% \pm 0,51\%$) a prezentat o valoare apropiată de a standardului la aceeași concentrație și interval de timp. În schimb, extractele hidroetanoliche CME și CME2 au avut o comportare diferită în sensul că, la cea mai mare concentrație, CME a avut un efect inhibitor al proliferării celulare mult mai pronunțat, scăzând viabilitățile celulare la $15,81\% \pm 6,02\%$ comparativ cu $48,21\% \pm 1,62\%$ în cazul CME2. La celelalte concentrații ale acestor extracte de rostopască (*Chelidonium majus* L.), viabilitățile celulare au fost mai apropiate ca valoare. Comparând CI_{50} ale extractelor vegetale, valorile la 48 ore pentru BVE și BS au fost apropiate, $150,42 \mu\text{g/mL} \pm 1,99 \mu\text{g/mL}$ pentru BVE și $101,74 \mu\text{g/mL} \pm 1,01 \mu\text{g/mL}$ pentru BS, iar dintre extractele hidroetanoliche CME, CME2 și CAE, cea mai scăzută valoare a prezentat-o CME, $198,67 \mu\text{g/mL} \pm 5,02 \mu\text{g/mL}$ (Fig. 7.3.).

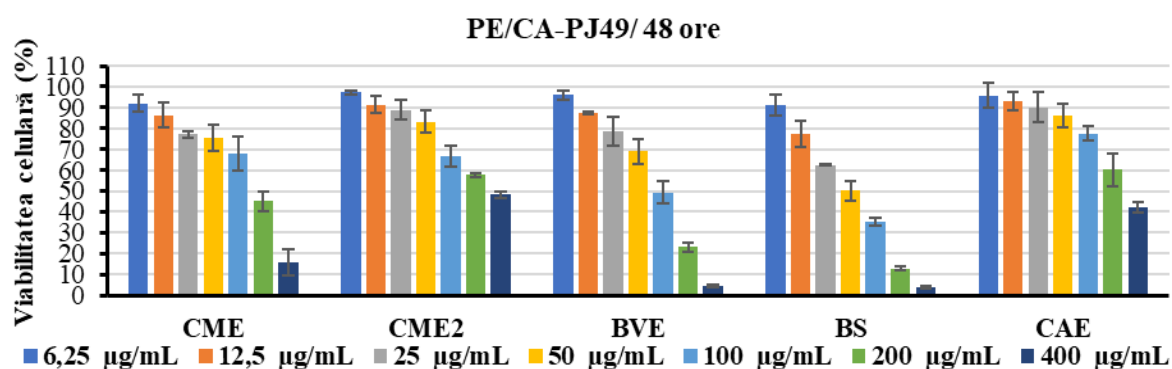


Figura 7.3. Viabilitatea celulară (%) la 48 ore a celulelor tumorale PE/CA-PJ49 tratate cu extractele vegetale

Pe linia celulară SK-OV-3 cele mai mici valori ale viabilităților celulare și ale CI_{50} au fost obținute în cazul celulelor tratate cu berberina standard BS $10,05\% \pm 0,80\%$ la 48 ore și $400 \mu\text{g/mL}$ și $141,75 \mu\text{g/mL} \pm 1,43 \mu\text{g/mL}$, valori mai scăzute decât ale extractului hidroetanolic de dracilă BVE. În cazul extractelor de rostopască, extractul hidroetanolic CME a prezentat valori mai scăzute ale viabilităților celulare ($32,72\% \pm 6,98\%$) decât extractul standardizat 2% CME2 ($51,73\% \pm 0,27\%$), iar CI_{50} a putut fi calculat doar pentru extractul total ($282,29 \mu\text{g/mL} \pm 7,31 \mu\text{g/mL}$). Extractul de ardei iute CAE ($20,32\% \pm 1,92\%$) a inhibat proliferarea celulară într-un procent mai mare comparativ cu cele două extracte de rostopască și a prezentat un efect inhibitor accentuat la 48 ore, în primele 24 ore toate viabilitățile celulelor tratate cu acest extract au prezentat viabilități mai mari de 95% (Fig. 7.4.).

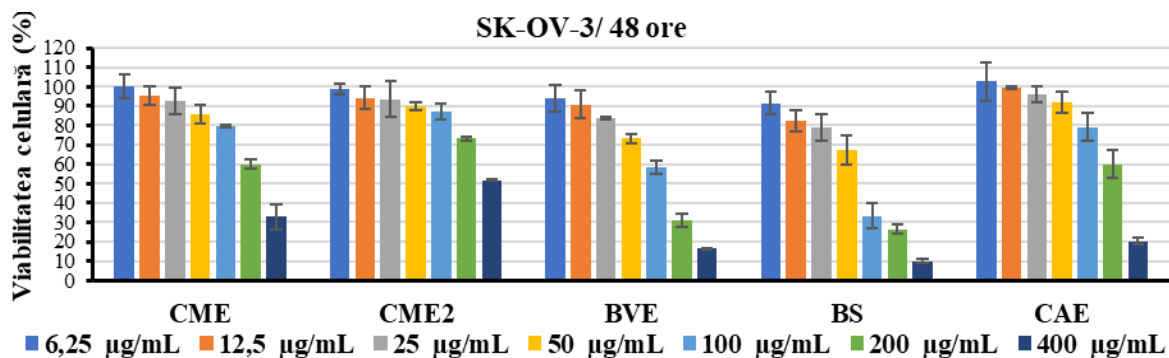


Figura 7.4. Viabilitatea celulară (%) la 48 ore a celulelor tumorale SK-OV-3 tratate cu extractele vegetale

Efectul inhibitor al extractelor vegetale nu a fost atât de pronunțat în cazul liniei celulare derivată din tumora de ficat Hep G2, în cazul CME2 și CAE viabilitățile celulare fiind, la ambele intervale de timp, mai mari de 80%. Cel mai scăzut procent a fost identificat la celulele tratate cu BS la 48 ore și 400 µg/mL, 21,82% ± 6,02%. Cel mai slab efect inhibitor al extractelor vegetale a fost pe linia celulară tumorală HT-29 (Fig. 7.5. și Fig. 7.6.).

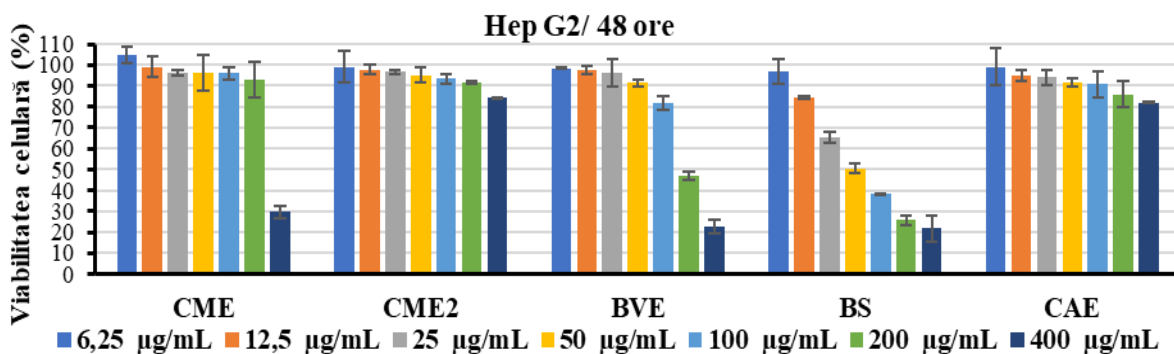


Figura 7.5. Viabilitatea celulară (%) la 48 ore a celulelor tumorale Hep G2 tratate cu extractele

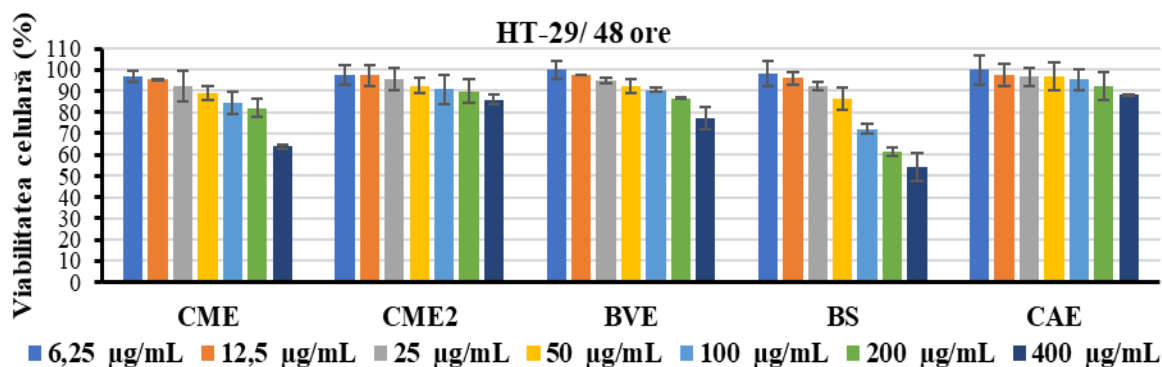


Figura 7.6. Viabilitatea celulară (%) la 48 ore a celulelor tumorale HT-29 tratate cu extractele vegetale

În cazul celulelor derivate din endoteliul venei ombilicale umane HUVEC, viabilitatea acestora nu a fost influențată prin tratarea cu diluții scalare ale extractelor vegetale la nicio concentrație sau interval de timp, cu câteva excepții, la 48 ore și concentrația de 400 $\mu\text{g/mL}$, BVE (75,48% \pm 0,09%), BS (56,10% \pm 0,09%) și CAE (52,81% \pm 3,59%). Comparativ cu viabilitățile celulelor tumorale tratate cu aceste extracte vegetale, la aceeași concentrație și interval de timp, viabilitățile acestora au fost mai scăzute, cu excepția celulelor Hep G2 și HT-29 tratate cu CAE (Fig. 7.7.).

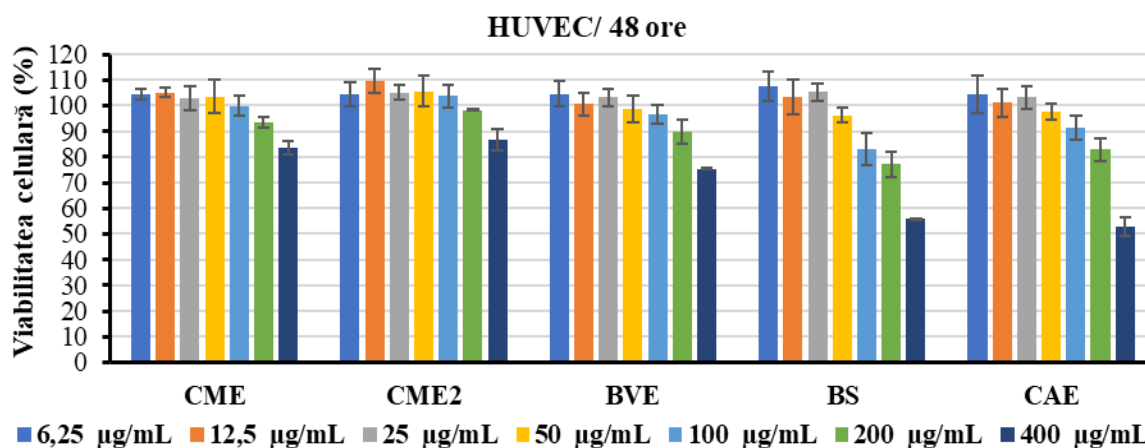


Figura 7.7. Viabilitatea celulară (%) la 48 ore a celulelor HUVEC tratate cu extractele vegetale

Interpretarea statistică realizată pentru fiecare extract vegetal, cu privire la compoziția fitochimică, acțiunea antioxidantă și potențialul antitumoral, a demonstrat o corelație negativă între viabilitățile celulare și acești parametri variabili. Astfel, s-a stabilit o proporționalitate directă între fitoconstituenți, efectul antiradicalar și proprietățile antitumorale. Suplimentar, s-a demonstrat o corelație pozitivă între efectul antiradicalar și compoziția fitochimică.

8. EVALUAREA CITOTOXICITĂȚII *IN VIVO* A EXTRACTELOR PE MODELELE *DAPHNIA MAGNA* ȘI *DAPHNIA PULEX*

Determinarea citotoxicității *in vivo* pe nevertebrate este una dintre cele mai accesibile și utilizate metode, evidențiindu-se determinările efectuate pe dafnide, în special pe *Daphnia magna* și *Daphnia pulex*. Dafnidele sunt folosite în testări pentru evaluarea citotoxicității a extractelor vegetale, a poluanților, a medicamentelor sau a coloranților.

Toxicitatea extractelor vegetale și a standardelor asupra celor două crustacee a fost dependentă de timpul de expunere. Dintre dafnidele studiate, extractul hidroetanolic de ardei iute a prezentat o toxicitate ușor mai accentuată față de *Daphnia pulex* ($CL_{50, 48 \text{ ore}} = 148,1 \mu\text{g/mL}$), comparativ cu *Daphnia magna* ($CL_{50, 48 \text{ ore}} = 178,9 \mu\text{g/mL}$). Ambele valori au fost sub $200 \mu\text{g/mL}$, evidențiind astfel o toxicitate medie a extractului, iar curbele de letalitate au prezentat un profil asemănător (Tabel VIII.1. și Tabel VIII.2.).

În cazul extractului hidroetanolic de dracilă și a alcaloidului berberină, au prezentat o sensibilitate mai mare crustaceele de *Daphnia magna* la ambele intervale de expunere ($CL_{50, 24 \text{ ore, BVE, D. magna}} = 30,5 \mu\text{g/mL}$, $CL_{50, 24 \text{ ore, BVE, D. pulex}} = 143,0 \mu\text{g/mL}$, $CL_{50, 48 \text{ ore, BVE, D. magna}} = 6,7 \mu\text{g/mL}$, $CL_{50, 48 \text{ ore, BVE, D. pulex}} = 37,4 \mu\text{g/mL}$, $CL_{50, 24 \text{ ore, BS, D. magna}} = 8,7 \mu\text{g/mL}$, $CL_{50, 24 \text{ ore, BS, D. pulex}} = \text{ND} \mu\text{g/mL}$, $CL_{50, 48 \text{ ore, BS, D. magna}} = 5,3 \mu\text{g/mL}$, $CL_{50, 48 \text{ ore, BS, D. pulex}} = 6,6 \mu\text{g/mL}$). BS s-a evidențiat cu un efect toxic mai pronunțat comparativ cu extractul hidroetanolic pe cele două crustacee, dar la 48 ore pe *Daphnia magna* au prezentat valori apropiate ale CL_{50} , efectul fiind corelat cu timpul de expunere în ambele cazuri (Tabel VIII.1. și Tabel VIII.2.).

Referitor la extractul hidroetanolic de rostopască CME și cel standardizat CME2, crustaceele au fost mai sensibile la acțiunea CME. Dintre cele două nevertebrate CL_{50} au fost mai scăzute pe *Daphnia pulex* la ambele intervale de timp ($CL_{50, 24 \text{ ore, CME, D. magna}} = 982,0 \mu\text{g/mL}$, $CL_{50, 24 \text{ ore, CME, D. pulex}} = 680,6 \mu\text{g/mL}$, $CL_{50, 48 \text{ ore, CME, D. magna}} = 295,2 \mu\text{g/mL}$, $CL_{50, 48 \text{ ore, CME, D. pulex}} = 383,4 \mu\text{g/mL}$). Comparând toate extractele vegetale și standardele, cele mai scăzute valori ale CL_{50} au fost calculate pentru BVE și BS la 48 ore pe *Daphnia magna* ($CL_{50, 48 \text{ ore, BVE, D. magna}} = 6,7 \mu\text{g/mL}$, $CL_{50, 48 \text{ ore, BS, D. magna}} = 5,3 \mu\text{g/mL}$). CAE și CME au prezentat o toxicitate medie, cu un efect mai potențat pe *Daphnia pulex* (Tabel VIII.1. și Tabel VIII.2.).

În ceea ce privește dezvoltarea embrionilor de *Daphnia magna* tratați cu extractele vegetale și standardele, cele mai mari modificări morfologice au fost observate în cazul celor tratați cu BVE, o inhibiție generală de peste 80%. Formarea ochiului compus a fost principalul efect teratogenic observat la tratarea cu CAE și CME. Dacă în cazul CAE și CME, efectul teratogenic al extractelor ar putea fi explicat datorită prezenței alcaloizilor, efecte comparabile cu ale standardelor, în cazul BVE, acest extract a avut un efect toxic mult mai pronunțat comparativ cu BS, indicând astfel că teratogenitatea este datorată întregului fitocomplex.

Tabelul VIII.1. Valorile concentrațiilor letale 50 (CL₅₀) și ale intervalelor de încredere 95% (95%CI) ale extractelor vegetale și ale standardelor pe crustaceele de *Daphnia magna*

Extract	CL ₅₀ la 24 ore	95%CI la 24 ore	CL ₅₀ la 48 ore	95%CI la 24 ore
BVE	30,5 μg/mL	22,6–41,1 μg/mL	6,7 μg/mL	3,7–11,9 μg/mL
BS	8,7 μg/mL	6,5–11,8 μg/mL	~5,3 μg/mL	ND**
CAE	311,0 μg/mL	133,2–726,2 μg/mL	178,9 μg/mL	150,5–212,8 μg/mL
Capsaicină	ND*	ND*	ND*	ND*
CME	~ 982,0 μg/mL	ND**	295,2 μg/mL	216,8–402,0 μg/mL
CME2	ND*	ND*	ND*	ND*

ND = nedeterminat, * = letalitate < 10%, ** = domeniu vast

Tabelul VIII.2. Valorile concentrațiilor letale 50 (CL₅₀) și ale intervalelor de încredere 95% (95%CI) ale extractelor vegetale și ale standardelor pe crustaceele de *Daphnia pulex*

Extract	CL ₅₀ la 24 ore	95%CI la 24 ore	CL ₅₀ la 48 ore	95%CI la 24 ore
BVE	~143,0 μg/mL	ND**	37,4 μg/mL	28,8–48,7 μg/mL
BS	ND*	ND*	6,6 μg/mL	4,6–9,5 μg/mL
CAE	261,7 μg/mL	204,7–334,6 μg/mL	148,1 μg/mL	125,4–175,0 μg/mL
Capsaicină	ND*	ND*	ND*	ND*
CME	680,6 μg/mL	592,2–782,0 μg/mL	383,4 μg/mL	351,3–418,5 μg/mL
CME2	ND***	~ 1162 μg/mL	ND***	ND**

ND = nedeterminat, * = letalitate < 10%, ** = domeniu vast, *** = letalitate < 40%

CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

Concluzii

Un număr semnificativ de noi molecule provenite din surse naturale sau derivate ale acestora au fost descoperite și introduse în terapie, astfel fitocompușii reprezintă o sursă inepuizabilă de soluții terapeutice. Cancerul este o preocupare intensă a multor cercetători, atât în ceea ce privește mecanismele de acțiune implicate, cât și din perspectiva tratamentelor, acestea fiind adesea destul de greu tolerate, cu multiple reacții adverse, rezistență și toxicitate marcantă la administrare îndelungată. În scopul identificării unor extracte vegetale cu potențial terapeutic, obiectivele științifice propuse care au constat în selectarea materiilor prime vegetale (*Berberidis cortex*, *Capsicii fructus* și *Chelidonii herba*), stabilirea metodologiei de obținere a extractelor vegetale și selectarea solventului optim pentru extracția principiilor active de interes,

determinarea profilului fitochimic a extractelor vegetale uscate prin dozări spectrofotometrice și analize cromatografice de înaltă performanță calitative și cantitative, determinarea profilului antioxidant *in vitro* a extractelor vegetale prin mai multe metode standardizate, determinarea citotoxicității *in vitro* pe șase linii celulare tumorale umane și pe celule normale umane, precum și determinarea toxicității *in vivo* pe speciile nevertebrate *Daphnia magna* și *Daphnia pulex*, le consider îndeplinite.

Contribuții personale

În capitolul 4, am prezentat obținerea extractelor prin liofilizare utilizând ca solvent pentru extracție o soluție apoasă etanolică 50%. Randamentele de obținere au fost bune (16,35% pentru *Berberidis extractum*, 7,65% pentru *Capsicii extractum* și 18,45% pentru *Chelidonii extractum*), iar analizele calitative ale principalelor clase de principii active au susținut alegerea solventului. În extractul de dracilă s-au determinat cele mai mari concentrații de acizi fenolici ($3,3886 \pm 0,3481$ g acid clorogenic/100 g extract) și polifenoli totali ($17,6780 \pm 3,9320$ g acid tanic/100 g extract), iar extractul de rostopască a fost cel mai bogat în flavone ($1,6067 \pm 0,0651$ g rutozidă/100 g extract).

În capitolul 5, în extractele vegetale au fost identificați, prin UHPLC-HRMS/MS și HPLC-DAD, în total 91 de compuși polifenolici și 9 alcaloizi. În *Berberidis extractum* 39 compuși polifenolici și berberină, în *Capsicii extractum* 70 de compuși polifenolici și 8 derivați ai capsaicinei, iar în *Chelidonii extractum* au fost determinați 59 de compuși polifenolici. Printre compușii identificați s-au remarcat acidul galic, apigenina, quercitina, kaempferolul cunoscuți în literatură pentru proprietățile antitumorale. Analiza cantitativă a evidențiat o concentrație a polifenolilor de 1091,68 $\mu\text{g/g}$ (dracilă), 2459,39 $\mu\text{g/g}$ (ardei iute) și 3815,50 $\mu\text{g/g}$ (rostopască).

În capitolul 6, evaluarea proprietăților antiradicalare s-a efectuat prin trei metode (DPPH, ABTS, FRAP). Extractul de dracilă s-a remarcat cu cele mai accentuate proprietăți antioxidante: DPPH ($\text{CI}_{50} = 0,2610$ mg/mL), ABTS ($\text{CI}_{50} = 0,0442$ mg/mL) și FRAP ($\text{CE}_{50} = 0,1398$ mg/mL). Extractele de rostopască ($\text{CI}_{50, \text{DPPH}} = 0,7643$ mg/mL, $\text{CI}_{50, \text{ABTS}} = 0,1790$ mg/mL și $\text{CE}_{50, \text{FRAP}} = 0,2814$ mg/mL) și ardei iute ($\text{CI}_{50, \text{DPPH}} = 1,6699$ mg/mL, $\text{CI}_{50, \text{ABTS}} = 0,2006$ mg/mL și $\text{CE}_{50, \text{FRAP}} = 0,5613$ mg/mL) au demonstrat un efect mediu.

În capitolul 7, rezultatele au demonstrat un efect inhibitor al proliferării celulare dependent de concentrație și de timpul de expunere. Cel mai pronunțat efect antiproliferativ s-a observat pe linia celulară tumorală derivată din adenocarcinom mamar MDA-MB-231, acestea fiind sub

80% la 48 ore pentru toate extractele vegetale. De asemenea, pe aceeași linie celulară, extractul hidroetanolic de dracilă la concentrația de 400 $\mu\text{g/mL}$ și la 48 ore a inhibat proliferarea celulară cel mai accentuat, scăzând valoarea viabilităților celulare la $2,99\% \pm 0,44\%$, cea mai mică valoare a viabilității înregistrată în aceste experimente ($\text{CI}_{50} = 117,30 \mu\text{g/mL} \pm 2,65 \mu\text{g/mL}$). Al doilea cel mai scăzut procent de viabilitate celulară, $3,09\% \pm 2,66\%$ ($\text{CI}_{50} = 146,32 \mu\text{g/mL} \pm 3,45 \mu\text{g/mL}$), s-a obținut în cazul *Berberidis extractum* la 400 $\mu\text{g/mL}$ și 48 ore pe linia celulară derivată din adenocarcinomul de colon LoVo. Extractul de rostopască, la aceeași concentrație și timp, a prezentat o valoare apropiată, $3,63\% \pm 0,76\%$ ($\text{CI}_{50} = 149,12 \mu\text{g/mL} \pm 6,12 \mu\text{g/mL}$), fiind și cea mai scăzută viabilitate calculată pentru acesta (*Chelidonii extractum*) dintre toate liniile studiate. De asemenea, și în cazul celulelor derivate din tumora de limbă PE/CA-PJ49, extractul hidroetanolic de dracilă a inhibat proliferarea celulară similar cu celelalte linii menționate anterior, diminuând viabilitatea până la $4,70\% \pm 0,51\%$ ($\text{CI}_{50} = 150,42 \mu\text{g/mL} \pm 1,99 \mu\text{g/mL}$) la 400 $\mu\text{g/mL}$ și 48 ore. Extractul hidroetanolic de rostopască, la cea mai mare concentrație, a avut un efect inhibitor al proliferării celulare pronunțat, scăzând viabilitățile celulare la $15,81\% \pm 6,02\%$ ($\text{CI}_{50} = 198,67 \mu\text{g/mL} \pm 5,02 \mu\text{g/mL}$). Pe linia celulară SK-OV-3, *Berberidis extractum* ($16,29\% \pm 0,37\%$) și *Capsicii extractum* ($20,32\% \pm 1,92\%$) la 48 ore și 400 $\mu\text{g/mL}$ au prezentat valori apropiate ale viabilităților celulare. Pentru extractul de ardei iute s-a observat o potențare marcantă a inhibării proliferării prin prelungirea timpului de tratare, în primele 24 ore viabilitățile celulare au fost peste 95% la toate concentrațiile testate. Extractul hidroetanolic de rostopască a avut un efect inhibitor al proliferării celulare mai scăzut (viabilitate celulară $32,72\% \pm 6,98\%$). Efectul inhibitor al extractelor vegetale nu a fost atât de pronunțat în cazul liniei celulare derivată din tumora de ficat Hep G2, extractul de dracilă a prezentat, la 48 ore și 400 $\mu\text{g/mL}$, o valoare a viabilităților celulare de $22,62\% \pm 3,36\%$, iar cel de rostopască de $29,61\% \pm 3,09\%$. Extractele vegetale nu au prezentat un bun efect antiproliferativ în cazul liniei celulare tumorale HT-29 derivată din tumora de colon, viabilitățile celulelor tratate cu acestea au fost peste 50% la 24 ore și la 48 ore la toate concentrațiile testate. În cazul celulelor normale derivate din endoteliul venei ombilicale umane HUVEC, în general viabilitatea nu a fost influențată prin tratarea lor cu diluții scalare ale extractelor vegetale, ilustrându-se selectivitatea acestora. Acțiunea antiproliferativă a extractelor a fost comparată cu cea a medicamentelor de referință (cisplatină, doxorubicină și 5-fluorouracil), dar și cu sulfatul de berberină sau cu extractul de rostopască standardizat 2% din comerț. Rezultatele au indicat, în special pe liniile

celulare MDA-MB-231 și LoVo, o acțiune mai promițătoare a extractelor hidroetanolic comparativ cu referințele, indicând astfel efectul sinergic al tuturor fitoconstituenților. Interpretarea statistică realizată pentru fiecare extract vegetal, cu privire la compoziția fitochimică (polifenoli totali, flavone și acizi fenolcarboxilici), acțiunea antioxidantă (metodele DPPH, ABTS, FRAP) și acțiunea antitumorală, a demonstrat o corelație negativă între viabilitățile celulare și acești parametri variabili. Astfel, s-a stabilit o proporționalitate directă între fitoconstituenți, efectul antiradicalar și proprietățile antitumorale. Suplimentar, s-a demonstrat o corelație pozitivă între efectul antiradicalar și compoziția fitochimică.

În capitolul 8, sensibilitatea dafnidelor la acțiunea extractelor vegetale a fost dependentă de concentrație și de timpul de expunere. Valorile concentrațiilor letale 50 au fost mai scăzute pe *Daphnia pulex*, cu excepția extractului hidroetanolic de dracilă care a prezentat cel mai pronunțat efect toxic dintre extractele studiate pe ambele nevertebrate ($CL_{50, 48 \text{ ore, BVE, } D. magna} = 6,7 \mu\text{g/mL}$, $CL_{50, 48 \text{ ore, BVE, } D. pulex} = 37,4 \mu\text{g/mL}$). Evaluarea toxicității pe embrionii de *Daphnia magna* a identificat, în cazul tuturor extractelor, dificultăți în formarea ochiului compus, iar o inhibiție generală, de peste 80%, a dezvoltării embrionilor s-a observat în cazul celor tratați cu *Berberidis extractum*. Sulfatul de berberină nu a avut acest efect retard marcant la același domeniu de concentrații, evidențiindu-se un posibil sinergism al fitocomplexului.

Perspective

În viitor îmi propun să studiez proprietățile antitumorale ale acestor extracte și pe alte linii celulare tumorale, evaluarea mecanismelor antiproliferative, studii *in vivo* pe model murin, asocierea produselor vegetale studiate în vederea formulării unui fitopreparat, dar și extinderea studiilor asupra altor produse vegetale din flora autohtonă.

BIBLIOGRAFIE

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.*, 71, 209–249, 2021. DOI: 10.3322/caac.21660.
2. Morgan E, Arnold M, Camargo MC, Gini A, Kunzmann AT, Matsuda T, Meheus F, Verhoeven RHA, Vignat J, Laversanne M, Ferlay J, Soerjomataram I. The current and future incidence and mortality of gastric cancer in 185 countries, 2020–40: A population-based modelling study. *eClinicalMedicine*, 47, 101404, 2022. DOI: 10.1016/j.eclinm.2022.101404.
3. Czene K, Lichtenstein P, Hemminki K. Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish family-cancer database. *Int. J. Cancer*, 99, 260–266, 2002. DOI: 10.1002/ijc.10332.
4. Chen X, Zhang T, Su W, Dou Z, Zhao D, Jin X, Lei H, Wang J, Xie X, Cheng B, Li Q, Zhang H, Di C. Mutant p53 in cancer: from molecular mechanism to therapeutic modulation. *Cell Death Dis.*, 13, 974, 2022. DOI: 10.1038/s41419-022-05408-1.
5. De Ruyscher D, Niedermann G, Burnet NG, Siva S, Lee AWM, Hegi-Johnson F. Radiotherapy toxicity. *Nat. Rev. Dis. Primer*, 5, 13, 2019. DOI: 10.1038/s41572-019-0064-5.
6. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.*, 83, 770–803, 2020. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.
7. Mohan K, Jeyachandran R. Alkaloids as anticancer agents. *Ann. Phytomedicine*, 1, 46–53, 2012.
8. Prabhu S, Molath A, Choksi H, Kumar S, Mehra R. Classifications of polyphenols and their potential application in human health and diseases. *Int. J. Physiol. Nutr. Phys. Educ.*, 6, 293–301, 2021. DOI: 10.22271/journalofsport.2021.v6.i1e.2236.
9. El-Zahar KM, Al-Jamaan ME, Al-Mutairi FR, Al-Hudiab AM, Al-Einzi MS, Mohamed AA-Z. Antioxidant, Antibacterial, and Antifungal Activities of the Ethanolic Extract Obtained from *Berberis vulgaris* Roots and Leaves. *Molecules*, 27, 6114, 2022. DOI: 10.3390/molecules27186114.

10. Razola-Díaz M del C, Gómez-Caravaca AM, López de Andrés J, Voltes-Martínez A, Zamora A, Pérez-Molina GM, Castro DJ, Marchal JA, Verardo V. Evaluation of Phenolic Compounds and Pigments Content in Yellow Bell Pepper Wastes. *Antioxidants*, 11, 557, 2022. DOI: 10.3390/antiox11030557.
11. Warowicka A, Qasem B, Dera-Szymanowska A, Wołuń-Cholewa M, Florczak P, Horst N, Napierała M, Szymanowski K, Popenda Ł, Bartkowiak G, Florek E, Goździcka-Józefiak A, Młynarz P. Effect of Protoberberine-Rich Fraction of *Chelidonium majus* L. on Endometriosis Regression. *Pharmaceutics*, 13, 931, 2021. DOI: 10.3390/pharmaceutics13070931.
12. Gîrd CE, Duțu LE, Popescu ML, Costea T, Ioniță EI, Luță EA, Costea L. Analiza farmacognostică a produselor vegetale cu metaboliți primari și secundari. Editura Universitară „Carol Davila”, București, 2021.
13. **Ivan IM**, Popovici V, Chițescu CL, Popescu L, Luță EA, Ilie EI, Brașoveanu LI, Hotnog CM, Olaru OT, Nițulescu GM, Boscencu R, Gîrd CE. Phytochemical Profile, Antioxidant and Cytotoxic Potential of *Capsicum annuum* (L.) Dry Hydro-Ethanol Extract. *Pharmaceutics*, 16, 245, 2024. DOI: 10.3390/pharmaceutics16020245.
14. **Ivan IM**, Olaru OT, Popovici V, Chițescu CL, Popescu L, Luță EA, Ilie EI, Brașoveanu LI, Hotnog CM, Nițulescu GM, Boscencu R, Gîrd CE. Antioxidant and Cytotoxic Properties of *Berberis vulgaris* (L.) Stem Bark Dry Extract. *Molecules*, 29, 2053, 2024. DOI: 10.3390/molecules29092053.
15. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4290–4302, 2005. DOI: 10.1021/jf0502698.
16. Wang Y, Nguyen DT, Yang G, Anesi J, Kelly J, Chai Z, Ahmady F, Charchar F, Golledge J. A Modified MTS Proliferation Assay for Suspended Cells to Avoid the Interference by Hydralazine and β -Mercaptoethanol. *ASSAY Drug Dev. Technol.*, 19, 184–190, 2021. DOI: 10.1089/adt.2020.1027.

Lista cu lucrările științifice publicate

Articole publicate în reviste cotate ISI

1. **Ivan IM**, Popovici V, Chițescu CL, Popescu L, Luță EA, Ilie EI, Brașoveanu LI, Hotnog CM, Olaru OT, Nițulescu GM, Boscencu R, Gîrd CE. Phytochemical profile, antioxidant and cytotoxic potential of *Capsicum annuum* (L.) dry hydro-ethanolic extract. *Pharmaceutics*, 16 (2), 245, 2024. FI₂₀₂₃ = 4,9; <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16020245> (capitolele 4, 5, 6, 7 și 8).

2. **Ivan IM**, Olaru OT, Popovici V, Chițescu CL, Popescu L, Luță EA, Ilie EI, Brașoveanu LI, Hotnog CM, Nițulescu GM, Boscencu R, Gîrd CE. Antioxidant and cytotoxic properties of *Berberis vulgaris* (L.) stem bark dry extract. *Molecules*, 29, 2053, 2024. FI₂₀₂₃ = 4,2; <https://doi.org/10.3390/molecules29092053> (capitolele 4, 5, 6, 7 și 8).

Participări la proiecte

Student-doctorand în Proiectul „Net4SCIENCE: Rețea de cercetare doctorală și postdoctorală aplicativă în domeniile de specializare inteligentă Sănătate și Bioeconomie”, contract POCU/993/6/13/154722, în perioada decembrie 2022 – septembrie 2023. Proiectul a fost organizat de Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București. Stagiile practice au fost realizate la Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau” al Academiei Române.