

**“VICTOR BABEȘ” UNIVERSITY OF MEDICINE AND
PHARMACY FROM TIMIȘOARA
FACULTY OF PHARMACY
1ST DEPARTMENT**

PARTENIE I. OANA – ADLA



PhD THESIS

**EVALUATION OF THE BIOLOGIC POTENTIAL OF
SOME EXTRACTS FROM BLACKCURRANT
LEAVES (*RIBES NIGRUM*) IN THE FIGHT AGAINST
HUMAN COLORECTAL ADENOCARCINOMA**

SUMMARY

Scientific coordinator
**PROF. UNIV. DR. DIANA-SIMONA
TCHIAKPE-ANTAL**

**Timișoara
2026**

TABLE OF CONTENTS

TABLE OF CONTENTS	II
INTRODUCTION.....	1
I. CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	2
II. PERSONAL CONTRIBUTIONS	5
1. MOTIVATION, AIM AND OUTLINE	5
2. OBTAINMENT OF THE CRUDE EXTRACT FROM <i>RIBES NIGRUM</i> LEAVES AND PREPARATION OF ITS FRACTIONS	8
3. PHYSICO-CHEMICAL ANALYSIS OF THE EXTRACTS FROM <i>RIBES NIGRUM</i> LEAVES.....	9
4. CHARACTERIZATION THROUGH HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF THE EXTRACTS FROM <i>RIBES NIGRUM</i> LEAVES.....	9
5. BIOLOGIC EVALUATION OF LOW AND MEDIUM POLARITY FRACTIONS: ANTIOXIDANT, ANTIMICROBIAL ANC CYTOTOXIC ACTIVITIES.....	11
6. BIOLOGIC EVALUATION OF HIGH POLARITY FRACTIONS: ANTIOXIDANT, ANTIMICROBIAL ANC CYTOTOXIC ACTIVITIES.....	13
III. FINAL CONCLUSIONS AND PERSONAL CONTRIBUTIONS	14
PUBLICATIONS FROM THE THESIS	18

SUMMARY OF THE PhD THESIS

INTRODUCTION

Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) is a shrub widespread in northern and central Europe, known for its black, edible fruits rich in phytonutrients. Both fruits and leaves have a long use in traditional medicine.

Within the Chair of Pharmaceutical Botany of the Victor Babes University of Medicine and Pharmacy Timisoara, broadening the therapeutic spectrum of local plant products is a central objective. Considering previous studies at national and international level, the present thesis wanted to address the potential of blackcurrant leaf extracts in colon cancer, a little-researched topic.

I. CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Colorectal cancer (CRC) is a form of cancer that develops in the rectum or colon. Worldwide, more than 2 million people are diagnosed annually with this condition. It is one of the most common types of cancer, having a high incidence, but also a good survival rate when detected in time. Statistics vary by region, age, risk factors, and access to screening.

. *In vitro* research carried out on various types of cell lines, such as HT29, HCT-116 and CaCo-2 colorectal cancer, HeLa cervical cancer, AGS gastric adenocarcinoma and PC-3 prostate cancer, has shown that treatments with *R. nigrum* extracts have a cytotoxic potential, having antiproliferative effects, which hinder cell development and decrease the viability of cancer cells.

Ribes nigrum L. is a shrub with a height of 1-2 m. It has deciduous, circular leaves, with 3-5 serrated lobes. The fruits are black, sour and aromatic berries. They have a diameter of 5-10 mm and contain several seeds.

Blackcurrant leaves are plant products included in the European Pharmacopoeia (11th edition) under the name *Ribis nigri folium*.

Given the interest in the multiple phytotherapeutic uses of the *R. nigrum* species, we have an updated perspective on the active compounds and their

pharmacological mechanisms, highlighting the potential therapeutic applications and future research directions in terms of biological properties. The new findings in this field were summarized in the doctoral student's review article, published in the scientific journal *Medicine in Evolution* (Coman et al., 2025 a).

II. PERSONAL CONTRIBUTIONS

1. MOTIVATION, AIM AND OUTLINE

Motivation. Blackcurrant leaves are a plant product with therapeutic effects appreciated in both traditional and modern phytotherapy. The recognition of the qualities of these leaves is mirrored both by the formal inclusion in the European Pharmacopoeia (11th ed.) and its monograph established by the European Medicines Agency.

Starting from the solid phytotherapeutic base, from the data of recent research attesting to the numerous health benefits (anti-inflammatory, antioxidant) but also motivated by the cytotoxic effects reported on several tumor cell lines, ***the main goal of the thesis was to explore the potential of blackcurrant leaves in the fight against colorectal cancer.***

In order to achieve the scope of the research, the following scientific objectives have been established:

- ***The first objective*** was the preparation of extracts from *R. nigrum* leaves. The effect of plant extracts is closely related to their chemical composition, and this is correlated with the solvents used in extraction. The reproducibility of a therapeutic effect is related to the consistency of the composition, and in order to highlight some effects during biomedical research, it is necessary to have extracts that contain a narrower range of compounds present in higher concentrations. Based on these considerations, the objective of the first phase of the doctoral research was to obtain extracts that concentrate constituents of different polarity, by the method of fractionation of a total extract. Each fraction (sub-extract) contained only substances with a narrow polarity range. Five sub-extracts were prepared, concentrating, respectively, non-polar substances (soluble in petroleum ether, EP), compounds with

a very low polarity (soluble in diethyl ether, DEE), compounds with medium polarity (soluble in ethyl acetate, EtOAc), substances with high polarity (soluble in *n*-butanol, BuOH), and polar substances (soluble in water). For the preparation of the extracts, classic extraction methods (maceration, ultrasonication, liquid-liquid separation) were used, followed by filtration, and concentration to dryness. The solvents used were chosen in accordance with the established methodology applied in bioguided fractionations, but also to build a scientific information base for future research directions.

- **The second objective** set for the achievement of the research goal was the phytochemical investigation of the sub-extracts obtained from the leaves of blackcurrant (RN-EP; RN-DEE; RN-EtOAc; RN-BuOH and RN-H₂O), in order to establish a complex pharmacological profile – a mandatory consideration for future biomedical applications of these extracts. The physicochemical characterization of the fractions was performed by infrared spectroscopy, in order to highlight the main organic groups (molecular fingerprint). The establishment of the complete phytochemical profile involved the determination of the total polyphenol content, by HPLC/LC-MS (High Pressure Liquid Chromatography (HPLC/LC) analysis coupled with Mass Spectrometry (MS).
- **The third objective** set for the achievement of the research goal was to evaluate the antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from leaves of *R. nigrum*.
 - **The fourth objective** was to evaluate the *in vitro* cytotoxicity of extracts obtained from *Ribes nigrum* leaves. In the above context, we aimed to establish a preliminary *in vitro* evaluation of the antitumor effects of dried leaf extracts of *R. nigrum* on a human colon cancer cell line (DLD-1). Therefore, we consider that this objective of the thesis - to investigate the effect of extracts that concentrate substances from narrow polarity ranges, on human colon cancer cells (DLD-1 - other than those reported in the specialized literature), represents **the novelty and originality aspect of the doctoral thesis**.

2. OBTAINMENT OF THE CRUDE EXTRACT FROM *RIBES NIGRUM* LEAVES AND PREPARATION OF ITS FRACTIONS

The study aimed to obtain extracts from *Ribes nigrum* leaves, that are the subject of bioactivity studies in the next stages of the doctoral study. In this regard, we proceeded to the preparation of enriched extracts containing a narrow range of compounds.

The objectives of the research were 1) to obtain a crude extract from blackcurrant leaves and 2) to fractionate it with the help of solvents having increasing polarity. The choice of this working method was based on the consideration that the systematic research of several sub-extracts (fractions) of a total extract allows to highlight the group of substances with maximum activity, from all the compounds present in the plant. These fractions enable then the development of pharmaceutical preparations with high efficacy and targeted indications.

The leaves of *R. nigrum* were purchased from S.C.Hypericum Impex S.R.L. (Baia Sprie, Romania), lot 0164, kept in suitable conditions at a temperature of $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ until processing. A box of leaves was kept as a control in the collection of plant products of the Chair of Pharmaceutical Botany (code RN-CO-01). The plant product was controlled with the help of a microscope, highlighting yellow secretory hairs specific to this plant, on the lower epidermis.

The procedure for obtaining fractions of different polarity began with the preparation of crude ethanolic extract (RN-EtOH). Two hundred grams of dried blackcurrant leaves were transformed to a powder, and then mixed with 1000 mL of absolute ethanol. The mixture was ultrasonicated for 30 minutes using an ultrasonic water bath, followed by a filtration procedure. The extract was subjected to solvent evaporation using a rotary evaporator. The plant material was then extracted with another 1000 mL of ethanol (99.8%). After evaporation of the solvent, 9.7g of crude extract was obtained.

Next, the majority (8.0g) of the crude extract was suspended in 50mL distilled water and subjected to a successive series of liquid-liquid partitions, using the separation funnel. Organic solvents were used in ascending order of polarity (petroleum ether, diethyl ether, ethyl acetate, n-butanol saturated with water). After the evaporation of the solvents in each extractive fraction, the

following yields were calculated: 36.5% for the fraction soluble in petroleum ether, 21.7% for the fraction soluble in diethyl ether; 18.2% for the fraction soluble in ethyl acetate; 11.3% for the fraction soluble in *n*-butanol and 11.0% for the water-soluble fraction.

3. PHYSICO-CHEMICAL ANALYSIS OF THE EXTRACTS FROM *RIBES NIGRUM* LEAVES

After obtaining the crude alcoholic extract from the leaves of *R. nigrum*, as well as its fractions according to the method described in the previous chapter, they were characterized from a physicochemical point of view by FTIR spectroscopy (Fourier Transform Infrared Spectroscopy). Through this qualitative technique, the presence of key functional groups of organic compounds, recorded at certain wave numbers, can be confirmed.

In FTIR spectroscopy, molecules absorb certain frequencies of infrared (IR) light depending on the chemical bonds they have (C–H, O–H, C=O, N–H, etc.). The result is a spectrum with bands that represent a chemical fingerprint of a sample. The recognition of the molecules recorded on the spectrum, in the 4000-400 cm^{-1} range of analysis, was achieved by comparing them with libraries of spectra from databases. During the thesis, the FT-IR spectra of the crude extract and the 5 fractions were recorded and discussed. The characteristic bands for each fraction were explained.

4. CHARACTERIZATION THROUGH HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF THE EXTRACTS FROM *RIBES NIGRUM* LEAVES

After a first FTIR characterization of blackcurrant leaf extracts, the next adopted step was the analysis by high-performance chromatography (HPLC), with UV and mass spectrometry detection. The aim was to identify and quantify representative compounds in the extracts. The chemical composition of black currant leaf extracts was determined using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), following two previously validated analytical protocols. Prior to HPLC analysis, each (dry) extract was dissolved in methanol at a concentration of 1mg/mL.

Within the extracts of blackcurrant leaves, the presence and content (where applicable) of 27 polyphenols were investigated by HPLC with UV and, respectively, MS detection: chlorogenic acid, p-coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid, synapic acid, gentisic acid, cichoric acid, caftaric acid, protocatechuic acid, vanillic acid, syringic acid, gallic acid, quercetol, kaempferol, fisetin, apigenin, patulatin, luteolin, rutoside, isoquercitrin, quercitrin, hyperoside, myricetin, (–)-epicatechin, (+)-catechin, epigallocatechin and epigallocatechin gallate.

Of the above metabolites, 13 compounds could be identified. They include phenolic acids such as: caffeic acid and its derivative chlorogenic acid, p-coumaric acid, protocatechuic acid, gentisic acid, gallic acid and its epigallocatechin derivative. Two aglycons (quercetol and kaempferol) have also been identified, along with glycosides: hyperoside, isoquercitrin, quercitrin, rutoside. These compounds migrated preferentially, depending on the polarity of the fraction, to different sub-extracts, where they accumulated. Of the 13 polyphenols identified by comparison with standard substances, 8 were quantified: p-coumaric acid, protocatechuic acid, gallic acid, epigallocatechin, hyperoside, isoquercitrin, rutoside and quercitrin.

In the crude extract, the compounds present in larger and quantifiable quantities were flavonolic glycosides: hyperoside, isoquercitrin, rutozide, quercitrin, all these substances representing derivatives of quercetin. Of these, isoquercitrin is the main compound. Also identified in the crude extract were: a phenol-carboxylic acid, protocatechuic acid, and an ester - chlorogenic acid.

The comparative analysis of the composition of the extracts made it possible to observe the extent to which different active substances are found, enriched, in the different fractions. Isoquercitrin is the only substance present in all fractions, due to its abundance. The largest amount is present in the sub-extract obtained with ethyl acetate. Quercitrin is the second substance, in abundance, in black currant leaves. This glycoside is less polar than isoquercitrin – it is present in a higher proportion in the RN-DEE fraction, but is absent from the aqueous fraction. It is preferentially distributed in the RN-EtOAc fraction. Rutoside is absent from the nonpolar fractions (RN-EP, RN-DEE), has the maximum concentration in the ethyl acetate-soluble fraction, is still well represented in the butanolic fraction. In the aqueous fraction it is the major phytochemical compound. Hyperoside is present only in the butanol fraction.

Among phenol-carboxylic acids, protocatechuic acid is mainly distributed in the diethyl ether fraction, but is also present in the ethyl acetate fraction. Para-coumaric acid, a hydroxycinnamic acid, is present exclusively in the RN-DEE fraction. Gallic acid, more hydrophilic due to the presence of the three hydroxy groups on the benzene nucleus, is distributed mainly in the RN-EtOAc phase, although it is also present in small quantities in the diethyl ether partition. Epigallocatechine, a flavan derivative, remains in the aqueous fraction after each partition and is found in the RN-H₂O subextract.

The chemical composition of the fractions is detailed in two research articles, published in the journals *Farmacia* (Coman et al, 2025 b) and *Medicine in Evolution* (Coman et al, 2025 c).

5. BIOLOGIC EVALUATION OF LOW AND MEDIUM POLARITY FRACTIONS: ANTIOXIDANT, ANTIMICROBIAL AND CYTOTOXIC ACTIVITIES

The crude leaf extract was fractionated into several sub-extracts, of which those with low and medium polarity (representing the petroleum ether, diethyl ether and ethyl acetate fractions) were subjected to research in the first stage. After the preparation of the sub-extracts, each sample underwent evaluations, which included antioxidant capacity, antimicrobial potential and cytotoxic effect on a colorectal cancer cell line, namely DLD-1. The results of this study are the subject of a research article published in the journal *Farmacia* (Coman et al, 2025 b).

The antioxidant activity was determined using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) assay. The antimicrobial activity of the tested compounds was evaluated against five clinically relevant pathogens: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Candida parapsilosis* ATCC 22019. For the evaluation of cytotoxicity *in vitro*, the cancer cell line DLD-1 was used. In terms of antioxidant activity, the RN-EtOAc fraction had a higher antioxidant activity than RN-EP and RN-DEE, with a significantly better DPPH radical scavenging capacity. This increased activity consistently correlates with its richer content of flavonoids, especially isoquercitrin and quercitrin, compounds known for their powerful antioxidant mechanisms. In

comparison, RN-EP and RN-DEE showed lower antioxidant efficacy, likely due to low polyphenol concentrations. These results underline the central role of solvent polarity in optimizing the extraction of antioxidant compounds from plant matrices. In contrast, the antimicrobial activity profile favored RN-DEE extract, which showed the most substantial inhibition against Gram-positive bacteria. The largest area of inhibition was observed for *Streptococcus pyogenes* (15 mm), followed by those for *Staphylococcus aureus* and *Candida parapsilosis*. The minimum inhibitory concentration for the RN-DEE fraction on *Streptococcus pyogenes* was 10mg/mL. Interestingly, Gram-negative strains, such as *E. coli* and *P. aeruginosa*, remained largely unaffected, regardless of the extract used. In terms of cytotoxic activity against the DLD-1 cancer cell line, by comparison, RN-DEE showed the most significant reductions in cell viability, even at the lowest concentrations tested, with an IC_{50} of only 43.56 μ g/mL. On the other hand, RN-EP produced an IC_{50} of 218.9 μ g/mL.

These results show that other classes of phytochemicals are responsible for the antibacterial and cytotoxic effects than those that imprint the antioxidant activity. In particular, the low polarity of the RN-DEE fraction, which is essential for antibacterial and cytotoxic effects, should be taken into account. The comparison of the chemical composition of the three evaluated fractions supports the role of phenol-carboxylic acids – protocatechuic acid and p-coumaric acid – in cytotoxic activity.

6. BIOLOGIC EVALUATION OF HIGH POLARITY FRACTIONS: ANTIOXIDANT, ANTIMICROBIAL AND CYTOTOXIC ACTIVITIES

The aim of this study was to investigate the bioactivity of polar fractions in *Ribes nigrum* leaves, in order to complement previously acquired knowledge on low and medium polarity fractions. The objectives consist of evaluating the antioxidant capacity, antimicrobial potential and cytotoxic effect (DLD-1 cell line) of two fractions separated from the crude leaf extract. The subjects of the research were the RN-BuOH fraction, containing compounds soluble in water-saturated n-butanol, and the aqueous fraction, remaining after the progressive depletion of the crude extract with petroleum ether, diethyl ether, ethyl acetate and n-butanol.

The results of this study are reported in a research article published in the journal *Medicine in Evolution* (Coman et al, 2025 c). They provide the groundwork for future research into the potential of *R. nigrum* extracts in the fight against bacterial infections and colorectal cancer.

The research of polar fractions in blackcurrant leaves revealed differentiated antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic actions. In terms of antioxidant and antimicrobial effect, the aqueous fraction has been shown to be more active than the butanolic one. Antimicrobial tests have demonstrated that the aqueous extract exhibits selective activity against Gram-positive bacteria, with significant inhibition observed against *Streptococcus pyogenes* and moderate effects against *Staphylococcus aureus*. No significant activity was recorded against the Gram-negative germs *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and the fungus *Candida parapsilosis*. Regarding the cytotoxic activity against human colorectal adenocarcinoma DLD-1 cells, the butanolic fraction was found to be more active than the aqueous one.

FINAL CONCLUSIONS AND PERSONAL CONTRIBUTIONS

Considering the efficacy and safety of *R. nigrum* leaves, supported by their long traditional use, but also encouraged by their therapeutic potential, we prepared a crude leaf extract with the help of ethanol, a solvent capable of extracting a wide range of metabolites from plant matrices. This extract was suspended in water and fractionated with the help of four organic solvents, resulting in five fractions having a narrow polarity range each, capable of concentrating specific classes of natural compounds. The fractions obtained were RN-EP (which concentrates non-polar substances soluble in petroleum ether), RN-DEE (which concentrates low-polarity compounds soluble in diethyl ether), RN-EtOAc (which contains medium-polarity metabolites soluble in ethyl acetate), RN-BuOH (which contains substances extractable with n-butanol) and RN-H₂O (the remaining fraction, which concentrates the most polar, water-soluble substances). The mentioned sub-extracts were physicochemically characterized by FTIR spectroscopy, and subsequently

analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with UV and MS detection.

The CONCLUSIONS drawn from the doctoral research are the following:

The liquid-liquid partition of the crude extract enabled the obtainment of five fractions, with the following yields: 36.5% for the fraction soluble in petroleum ether (RN-EP), 21.7% for the fraction soluble in diethyl ether (RN-DEE); 18.2% for the fraction soluble in ethyl acetate (RN-EtOAc); 11.3% for the fraction soluble in n-butanol (RN-BUOH) and 11.0% for the water-soluble fraction (RN-H₂O).

The success of fractionation was confirmed by HPLC analysis, which showed that: i) the concentration differences for a given compound in fractions with neighboring polarity are of an order of magnitude, and that ii) certain substances are found only in a single fraction (p-coumaric acid only in the RN-DEE fraction, epigallocatechin only in the RN-H₂O fraction).

FTIR spectroscopy evaluation showed that, compared to the crude ethanolic extract from the leaves of *R. nigrum* (RN-EtOH), characterized by a wide band $\nu(\text{O-H})$ at $\sim 3458\text{ cm}^{-1}$ and an intense band $\nu(\text{C-O/C-O-C})$ at $\sim 1080\text{ cm}^{-1}$ (indicating the predominance of polar compounds such as polyphenols and carbohydrates/glycosides), partitioning resulted in a separation by polarity classes.

The analysis of the crude extract and its fractions by HPLC with UV and MS detection allowed the identification of 13 polyphenols, of which 8 could be quantified: p-coumaric, protocatechuic and gallic acids, epigallocatechin, isoquercitrin, quercitrin, rutoside and hyperoside.

The major phytochemicals in blackcurrant leaves are flavonolic glycosides: isoquercitrin and quercitrin. These secondary metabolites preferentially accumulated in the ethyl acetate-soluble fraction.

The fraction with the most diverse phytochemical profile is the diethyl ether soluble fraction (RN-DEE), in which the following compounds have been quantified: protocatechuic acid, isoquercitrin, quercitrin, p-coumaric acid and gallic acid.

The aqueous fraction, the most representative for common use, contains in descending order of concentration: rutoside, isoquercitrin and epigallocatechin.

The fraction with the most intense antioxidant effect was the one soluble in ethyl acetate, followed by the one that concentrates water-soluble substances. For the RN-EtOAc fraction, this effect is correlated with the high concentration of flavonolic glycosides (the highest of all sub-extracts). For the RN-H₂O fraction, the intense antioxidant effect is probably due to the presence of substances other than those identified, since the concentrations determined by isoquercitrin, rutoside and epigallocatechin are too low to confer the antioxidant capacity, on their own.

From the point of view of antimicrobial activity, it is exerted only on Gram-positive bacteria. The most sensitive bacterium is *Streptococcus pyogenes*, susceptible to both the aqueous and diethyl ether-soluble fractions (minimum inhibitory concentrations of 10 mg/mL for both). The tested fractions are inactive on Gram-negative germs.

Regarding cytotoxic activity on DLD-1 colorectal adenocarcinoma cells, the RN-DEE fraction showed the most intense effect with an IC₅₀=43.6 µg/mL, followed by RN-EtOAc with IC₅₀=127.6 µg/mL, RN-BuOH with IC₅₀=137.9 µg/mL, RN-EP with IC₅₀=218.9 µg/mL and RN-H₂O with IC₅₀=278.4 µg/mL.

The significantly more intense cytotoxic activity of the diethyl ether-soluble fraction, compared to other sub-extracts, can be correlated with the presence of protocatechuic (preferentially accumulated in this fraction) and p-coumaric acids (present only in this fraction). A synergistic effect of these phenolic acids with flavonol glycosides is also possible.

PERSONAL CONTRIBUTIONS:

- During the doctoral research, we achieved the aim to carry out a systematic study of black currant leaves, from a phytochemical point of view and to investigate antioxidant, antimicrobial and cytotoxic effects. The comparative analysis of the chemical composition showed that the migration of active substances in the different fractions lead to the obtainment of sub-extracts that concentrate high amounts of

phytochemicals with a narrow polarity range. We were also able to draw conclusions about the intensification of given biologic effects, in correlation with the chemical composition of each fraction.

- We have shown how important the choice of solvent is in order to obtain a extracts with targeted activity: the diethyl ether soluble fraction has the most intense cytotoxic effect, the water-soluble fraction has the most important antibacterial effect and the ethyl acetate-soluble fraction has the highest antioxidant capacity.
- Our research has shown that although the ethyl acetate-soluble fraction (RN-EtOAc) is the richest in flavonol glycosides, the less polar substances in the diethyl ether-soluble fraction (RN-DEE) are relevant for the cytotoxic effect. In this context, we hypothesized the importance of protocatechuic and p-coumaric acids for the cytotoxic effect.
- The doctoral study showed that the water-soluble fraction has the most intense antimicrobial effect. Antibacterial activity is highest on *Streptococcus pyogenes*, followed by *Staphylococcus aureus* (order according to the diameter of the inhibition zone). An adjuvant use of aqueous extracts from currant leaves (gargles) in bacterial pharyngitis (frequently caused by pyogenic streptococcus) is supported by our data. This fraction also has good antioxidant activity (it is the second in antioxidant capacity, after the soluble fraction in ethyl acetate), but it has the lowest cytotoxic performance on DLD-1 cells.
- The research carried out during the doctorate laid the basis for future directions that will allow the targeted evaluation of some therapeutic benefits:
 - Advanced bioguided fractionation for the identification of the low polarity compound(s) with cytotoxic effect, from the diethyl ether soluble fraction;
 - Extension of the research of the RN-DEE fraction to other cell lines;
 - To investigate a possible synergistic effect of the RN-DEE fraction with chemotherapeutics used in colorectal cancer;

- Advanced bioguided fractionation to identify the water-soluble compound(s) responsible for antibacterial and antioxidant effects;
- Formulation of pharmaceutical products with antibacterial effect, relevant in infections with *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus*;
- Expanding the research of the antibacterial effect of the aqueous fraction on oral bacteria.

PUBLICATIONS FROM THE THESIS

The doctoral thesis is based on the results published in three research articles:

1. **O. Coman**, C.A.M. Cobzariu Dan, M. Boța, L. Vlaia, D.S. Tchiakpe-Antal, I. Ioniță, I. Predescu, A. Smeu. *Recent advances regarding the phytochemical and therapeutic uses of Ribes nigrum leaves*. Medicine in Evolution (2025 a), 31(1), 113-119. <https://doi.org/10.70921/medev.v31i1.1294>
2. **O.A. Coman**, A. Smeu, D. Muntean, A.M. Vlase, L. Vlase, S. Toth, A. Vădan, A. Stoica, S. Liga, A. Moacă, A. Ciurba, D.S. Tchiakpe-Antal. *Comparative analysis of Ribes nigrum leaf extracts in different solvents: antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activity*. Farmacia (2025 b), 73(5), 1164-1174. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2025.5.10> (F.I.=1.3)
3. **O.A. Coman**, A. Smeu, A. Moacă, D. Muntean, A.M. Vlase, L. Vlase, S. Toth, A. Vădan, A. Stoica, S. Liga, D.S. Tchiakpe-Antal. *Phytochemical Characterization and Biological Evaluation of Ribes nigrum Leaf Extracts: A Study of Aqueous and Butanolic Fractions*. Medicine in Evolution (2025 c), 31(3), 269-280. <https://doi.org/10.70921/medev.v31i3.1314>

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"VICTOR BABEȘ" DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE FARMACIE
DEPARTAMENTUL I

PARTENIE I. OANA – ADLA



TEZĂ DE DOCTORAT

EVALUAREA POTENȚIALULUI BIOLOGIC AL
UNOR EXTRACTE DIN FRUNZELE DE COACĂZ
NEGRU (*RIBES NIGRUM*) ÎN LUPTA CU
ADENOCARCINOMUL COLORECTAL UMAN

REZUMAT

Coordonator științific
PROF. UNIV. DR. DIANA-SIMONA
TCHIAKPE-ANTAL

Timișoara
2026

CUPRINS

CUPRINS	II
INTRODUCERE	1
I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	1
II. CONTRIBUȚII PERSONALE	2
1. MOTIVAȚIE, SCOP ȘI OBIECTIVE	2
2. OBȚINEREA EXTRACTULUI VEGETAL BRUT DIN FRUNZELE DE <i>RIBES NIGRUM</i> ȘI PREPARAREA FRAȚIILOR SALE	3
3. CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ A EXTRACTELOR DIN FRUNZE DE <i>RIBES NIGRUM</i>	5
4. CARACTERIZAREA PRIN CROMATOGRAFIE DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ A EXTRACTELOR DIN FRUNZE DE <i>RIBES</i> <i>NIGRUM</i>	5
5. EVALUAREA BIOLOGICĂ A FRAȚIILOR CU POLARITATE JOASĂ ȘI MEDIE: ACTIVITATE ANTIOXIDANTĂ, ANTIMICROBIANĂ ȘI CITOTOXICĂ	7
6. EVALUAREA BIOLOGICĂ A FRAȚIILOR CU POLARITATE CRESCUTĂ: ACTIVITATE ANTIOXIDANTĂ, ANTIMICROBIANĂ ȘI CITOTOXICĂ	8
III. CONCLUZII FINALE ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE	9
ARTICOLE DIN TEZĂ	13

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

INTRODUCERE

Coacăzul negru (*Ribes nigrum* L.) este un arbust larg răspândit în nordul și centrul Europei, cunoscut pentru fructele sale negre, comestibile, bogate în fitonutrienți. Atât fructele cât și frunzele au o îndelungă utilizare în medicina tradițională.

În cadrul Catedrei universitare de Botanică farmaceutică a UMFVBT, lărgirea spectrului terapeutic al produselor vegetale autohtone este o preocupare centrală. Având în vedere studiile anterioare pe plan național și internațional, prezenta teză a dorit să abordeze potențialul extractelor din frunzele de coacăz negru în cancerul de colon, un subiect puțin cercetat.

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Cancerul colorectal (CCR) reprezintă o formă de cancer care se dezvoltă în rect sau colon. La nivel mondial, peste 2 milioane de oameni sunt diagnosticați anual. Este unul dintre cele mai frecvente tipuri de cancer, având o incidență mare, dar și o rată de supraviețuire bună atunci când este detectat la timp. Statisticile variază în funcție de regiune, vârstă, factori de risc și accesul la screening.

Cercetările *in vitro* realizate pe diverse tipuri de linii celulare, cum ar fi cancerul colorectal HT29, HCT-116 și CaCo-2, cancerul de col uterin HeLa, adenocarcinomul gastric AGS și cancerul de prostată PC-3, au arătat că tratamentele cu extracte de *R. nigrum* au un potențial citotoxic, având efecte antiproliferative, care împiedică dezvoltarea celulară și scad viabilitatea celulelor canceroase.

Ribes nigrum L. este un arbust cu înălțimea de 1-2 m. Prezintă frunze caduce, circulare, cu 3-5 lobi serați. Fructele sunt bace negre, acrișoare și aromatice. Ele au un diametru de 5-10 mm și conțin mai multe semințe.

Frunzele de coacăz negru sunt produse vegetale incluse în Farmacopeea Europeană (ed. a 11-a) sub denumirea *Ribis nigri folium*.

Având în vedere interesul pentru multiplele utilizări fitoterapeutice ale speciei *R. nigrum*, dispunem o perspectivă actualizată asupra compușilor activi și a mecanismelor lor farmacologice, evidențiind potențialele aplicații terapeutice și direcțiile viitoare de cercetare prin prisma proprietatilor biologice. Noutățile din acest domeniu au fost sumarizate în articolul de tip review al doctorandei, publicat în revista științifică *Medicine in Evolution* (Coman et al., 2025 a).

II. CONTRIBUȚII PERSONALE

1. MOTIVAȚIE, SCOP ȘI OBIECTIVE

Motivație. Frunzele de coacăz negru sunt un produs vegetal cu efecte terapeutice apreciate atât în fitoterapia tradițională, cât și în cea modernă. Recunoașterea calităților acestor frunze este oglindită atât de oficializarea în Farmacopeea Europeană (ed. a 11-a) cât și de evidențierea în monografiile ale Agenției Europene a Medicamentului.

Pornind de la baza fitoterapeutică solidă, de la datele cercetărilor recente care atestă numeroasele beneficii pentru sănătate (antiinflamator, antioxidant) dar și motivat de efectele citotoxice semnalate pe câteva linii celulare tumorale, **scopul principal al tezei a fost explorarea potențialului frunzelor de coacăz negru în lupta contra cancerului colorectal.**

Pentru atingerea scopului cercetării, s-au stabilit următoarele obiective științifice:

- **Primul obiectiv** a fost reprezentat de prepararea unor extracte din frunze de *R. nigrum*. Efectul extractelor vegetale este în strânsă legătură cu compoziția lor chimică, iar aceasta este corelată cu solvenții folosiți la extracție. Pe baza acestor considerente, obiectivul primei faze a cercetărilor doctorale a fost obținerea unor extracte care concentrează constituenți de polaritate diferită, prin metoda fracționării unui extract total. Fiecare fracție (sub-extract) a conținut doar substanțe dintr-un domeniu îngust de polaritate. Au fost preparate cinci sub-extracte, concentrând, respectiv, substanțe nepolare (solubile în eter de petrol, EP), compuși foarte puțin polari (solubili în dietil eter, DEE), compuși având polaritate

medie (solubili în acetat de etil, EtOAc), substanțe cu polaritate crescută (solubile în *n*-butanol, BuOH), și substanțe polare (solubile în apă). Pentru prepararea extractelor s-au folosit metode clasice de extracție (macerare, ultrasonare, separare lichid-lichid), urmate de filtrarea, concentrarea și aducerea le sec a acestora. Solvenții utilizați au fost aleși în concordanță cu metodologia consacrată aplicată în fracționarea bioghidată, dar și pentru a construi o bază de informații științifice pentru direcțiile viitoare de cercetare.

- **Cel de-al doilea obiectiv** stabilit pentru atingerea scopului cercetării a fost investigarea fitochimică a sub-extractelor obținute din frunzele uscate de coacăz negru (RN-EP; RN-DEE; RN-EtOAc; RN-BuOH și RN-H₂O). A fost realizată caracterizarea fizico-chimică a fracțiilor prin spectroscopie FTIR, pentru evidențierea grupărilor organice (amprenta moleculară). Stabilirea profilului fitochimic complet a implicat determinarea conținutului total de polifenoli, prin analiză HPLC/LC-MS (Cromatografie lichidă de înaltă presiune (HPLC/LC) cuplată cu Spectrometrie de masă (MS).
- **Cel de-al treilea obiectiv** stabilit pentru atingerea scopului cercetării a fost evaluarea activității antioxidante și antimicrobiene a extractelor obținute din frunze uscate de *R. nigrum*.
 - **Cel de-al patrulea obiectiv** a fost evaluarea citotoxicității *in vitro* a extractelor obținute din frunze de *R. nigrum*. În contextul de mai sus, ne-am propus stabilirea unei evaluări preliminare *in vitro* a efectelor antitumorale ale extractelor asupra unei linii celulare umane de cancer de colon (DLD-1). Prin urmare, considerăm că acest obiectiv al tezei - de a investiga efectul unor extracte care concentrează substanțe din domenii înguste de polaritate, asupra liniei celulare DLD-1 reprezintă **aspectul de noutate și originalitate al tezei de doctorat**.

2. OBȚINEREA EXTRACTULUI VEGETAL BRUT DIN FRUNZELE VERZI DE *RIBES NIGRUM* ȘI PREPARAREA FRAȚIILOR SALE

Studiul a avut ca scop obținerea extractelor din frunze de *Ribes nigrum* care reprezintă subiectul studiilor de bioactivitate din etapele următoare ale

studiului doctoral. În acest sens s-a avut în vedere prepararea unor extracte care să conțină fiecare o plajă îngustă de compuși, prezenți în concentrație crescută.

Obiectivele cercetării au fost 1) obținerea unui extract brut din frunzele de coacăz negru și 2) fracționarea acestuia cu ajutorul unor solvenți cu polaritate tot mai mare. Raționamentul pe care s-a bazat alegerea acestei metode de lucru a fost că cercetarea sistematică a mai multor sub-extracte (fracții) a unui extract total permite evidențierea grupului de substanțe cu activitate maximă, din totalitatea compușilor prezenți în plantă, cu posibilitatea de a se concretiza în dezvoltarea unor preparate farmaceutice cu eficacitate și indicații țintite.

Frunzele de *R. nigrum* au fost achiziționate de la S.C.Hypericum Impex S.R.L. (Baia Sprie, România), lotul 0164, menținute în condiții adecvate la o temperatură de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ până la procesare. O cutie de frunze a fost păstrată ca martor în colecția de produse vegetale a Catedrei de Botanică farmaceutică (cod RN-CO-01). Produsul vegetal a fost controlat cu ajutorul lupei binoculare, evidențiind peri secretori galbeni specifici pentru această plantă, pe epiderma inferioară. Procedura de obținere a fracțiilor de polaritate diferită a început prin prepararea extractului etanolic brut (RN-EtOH). Două sute de grame de frunze uscate de coacăz negru au fost mărunțite până la obținerea unei pulberi, iar apoi au fost amestecate cu 1000 mL etanol absolut. Amestecul a fost ultrasonat timp de 30 de minute folosind o baie de apă cu ultrasunete, urmată de o procedură de filtrare. Extractul a fost supus evaporării solventului folosind un evaporator rotativ. Materialul vegetal a fost ulterior extras cu încă 1000 mL de etanol (99,8%). După evaporarea solventului, s-au obținut 9,7g extract brut.

În continuare, majoritatea (8,0g) extractului brut a fost suspendată în 50mL apă distilată și supusă unei serii succesive de partiții lichid-lichid, folosind pâlnia de separare. Solvenții organici au fost utilizați în ordinea crescătoare a polarității (eter de petrol, dietil eter, acetat de etil, *n*-butanol saturat cu apă).

După evaporarea solvenților din fiecare fracție extractivă au fost calculate următoarele randamente: 36.5% pentru fracția solubilă în eter de petrol, 21.7% pentru fracția solubilă în dietil eter; 18.2% pentru fracția solubilă în acetat de etil; 11.3% pentru fracția solubilă în *n*-butanol și 11.0% pentru fracția hidrosolubilă.

3. CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ A EXTRACTELOR DIN FRUNZE DE *RIBES NIGRUM*

După obținerea extractului alcoolic brut din frunze de *R. nigrum*, precum și a fracțiilor sale după metoda descrisă în capitoul precedent, acestea au fost caracterizate din punct de vedere fizico-chimic prin spectroscopie FTIR (spectroscopie în IR cu transformată Fourier). Prin această tehnică calitativă poate fi confirmată prezența grupelor funcționale cheie ale compușilor organici, înregistrate la anumite numere de undă.

În cadrul spectroscopiei FTIR, moleculele absorb anumite frecvențe ale luminii infraroșii (IR) în funcție de legăturile chimice pe care le au (C–H, O–H, C=O, N–H etc.). Rezultatul este un spectru (un grafic) cu benzi/picuri care reprezintă o amprentă chimică a unei probe. Recunoașterea moleculelor înregistrate pe spectru, în domeniul de analiză $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, a fost realizată prin compararea acestora cu biblioteci de spectre din baze de date. În cadrul tezei au fost înregistrate și discutate spectrele FT-IR ale extractului brut și celor 5 fracții. Au fost evidențiate și interpretate benzile caracteristice pentru fiecare.

4. CARACTERIZAREA PRIN CROMATOGRAFIE DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ A EXTRACTELOR DIN FRUNZE DE *RIBES NIGRUM*

După o primă caracterizare prin FT-IR a extractelor din frunze de coacăz negru, următorul pas adoptat a fost analiza prin cromatografie de înaltă performanță, cu detecție în UV și prin spectrometrie de masă. Scopul a fost identificarea și cuantificarea unor compuși reprezentativi din extracte. Compoziția chimică a extractelor din frunze de coacăze negre a fost determinată utilizând cromatografia lichidă cuplată cu spectrometria de masă în tandem (LC-MS/MS), urmând două protocoale analitice validate anterior. Înainte de analiza prin HPLC, fiecare extract (uscăt) a fost dizolvat în metanol, într-o concentrație de 1mg/mL.

În cadrul extractelor din frunzele de coacăz negru au fost cercetată prin HPLC cu detecție UV și, respectiv MS, prezența și conținutul (unde a fost cazul) unui număr de 27 de polifenoli: acid clorogenic, acid p-cumaric, acid cafeic, acid ferulic, acid sinapic, acid gentisic, acid cicoric, acid caftaric, acid protocatechuic, acid vanilic, acid siringic, acid galic, quercetol, kaempferol, fisetină, apigenină, patuletină, luteolină, rutozidă, izoquercitrină, quercitrină, hiperozidă, miricetină, (–)-epicatechină, (+)-catechină, epigallocatechină și galat de epigallocatechină.

Dintre aceștia, au putut fi identificați 13 compuși. Ei includ acizi fenol-carboxilici precum: acidul cafeic și derivatul său acidul clorogenic, acidul p-cumaric, acidul protocatechuic, acidul gentisic, acidul galic și derivatul său epigallocatechină. De asemenea, au fost identificați doi agliconi (quercetol și kaempferol), împreună cu glicozidele: hiperozidă, izoquercitrină, quercitrină, rutozidă. Acești compuși au migrat preferențial, în funcție de polaritatea fracției, în diferite sub-extracte, unde s-au acumulat. Dintre cei 13 polifenoli identificați prin comparație cu substanțe etalon, 8 au fost cuantificați: acidul p-cumaric, acidul protocatechuic, acidul galic, epigallocatechină, hiperozida, izoquercitrina, rutozida și quercitrina.

În extractul total, compușii prezenți în cantități mai mari și cuantificabile au fost glicozide flavonolice: hiperozida, izoquercitrina, rutozida, quercitrina, toate aceste substanțe reprezentând derivați ai quercetinei. Dintre aceasta, izoquercitrina este majoritară. De asemenea, în extractul total au mai fost identificați: un acid fenol-carboxilic, acidul protocatechuic, și un derivat esteric - acidul clorogenic.

Analiza comparativă a compoziției extractelor cercetate a permis observarea măsurii în care diferite substanțe active se regăsesc, îmbogățite, în diferitele fracții. Izoquercitrina este singura substanță prezentă în toate fracțiile, datorită abundenței sale. Cantitatea cea mai mare este prezentă în sub-extractul obținut cu acetat de etil. Quercitrina este a doua substanță, ca abundență, în frunzele de coacăz negru. Această glicozidă este mai puțin polară decât izoquercitrina – este prezentă în proporție mai mare în fracțiile RN-EP și RN-DEE, dar lipsește din fracția apoasă. Se distribuie preferențial în fracția RN-EtOAc. Rutozida este absentă din fracțiile nepolare (RN-EP, RN-DEE), are concentrația maximă în fracția solubilă în acetat de etil, este încă

bine reprezentată în fracția butanolică, iar în cea apoasă este fitocompusul majoritar. Hiperozida este prezentă doar în fracția butanolică.

Dintre acizii fenol-carboxilici, acidul protocatechuic se distribuie majoritar în fracția dietil eterică, dar mai este prezent și în cea de acetat de etil.

Acidul p-cumaric, un acid hidroxi-cinamic, este prezent exclusiv în fracția RN-DEE. Acidul galic, mai hidrofil datorită prezenței celor trei grupări hidroxi pe nucleul benzenic, se distribuie cu precădere în faza RN-EtOAc, deși este prezent în mici cantități și în partiția dietil eterică. Epigallocatechina, un derivat flavanic, rămâne în fracția apoasă după fiecare partiție și se regăsește în subextractul RN-H₂O

Compoziția chimică a fracțiilor este detaliată în cadrul a două articole originale, publicate în revistele Farmacia (Coman et al, 2025 b) și Medicine in Evolution (Coman et al, 2025 c).

5. EVALUAREA BIOLOGICĂ A FRAȚIILOR CU POLARITATE JOASĂ ȘI MEDIE: ACTIVITATE ANTIOXIDANTĂ, ANTİMİCROBIANĂ ȘI CITOTOXICĂ

Extractul brut din frunze a fost fracționat în mai multe subextracte, dintre care cele cu polaritate joasă și medie (reprezentând fracțiunile solubile în eter de petrol, dietil eter și acetat de etil) au fost supuse cercetării în prima etapă. În acest sens, după prepararea subextractelor, fiecare probă a fost supusă unor evaluări, care au inclus capacitatea antioxidantă, potențialul antimicrobian și efectul citotoxic asupra unei linii celulare de cancer colorectal, și anume DLD-1. Rezultatele acestui studiu fac obiectul unui articol original publicat în revista Farmacia (Coman et al, 2025 b).

Activitatea antioxidantă a fost determinată utilizând testul DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Activitatea antimicrobiană a compușilor testați a fost evaluată în raport cu cinci agenți patogeni relevanți din punct de vedere clinic: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 și *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Pentru evaluarea citotoxicității *in vitro* a fost utilizată linia celulară canceroasă DLD-1.

În ceea ce privește activitatea antioxidantă, fracția RN-EtOAc are o activitate antioxidantă superioară față de RN-EP și RN-DEE, cu o capacitate semnificativ mai bună de eliminare a radicalilor DPPH. Această activitate sporită se corelează coerent cu conținutul său mai bogat în flavonoide, în special izoquercitrină și quercitrină, compuși cunoscuți pentru mecanismele lor antioxidante puternice.

În schimb, profilul activității antimicrobiene a favorizat extractul RN-DEE, care a prezentat cea mai substanțială inhibare împotriva bacteriilor Gram-pozitive. Cea mai mare zonă de inhibare a fost observată pentru *Streptococcus pyogenes* (15 mm), urmată de cele pentru *Staphylococcus aureus* și *Candida parapsilosis*. Concentrația minimă inhibitorie pentru fracția RN-DEE asupra *Streptococcus pyogenes* a fost de 10mg/mL. Interesant este faptul că tulpinile Gram-negative, precum *E. coli* și *P. aeruginosa*, au rămas în mare parte neafectate, indiferent de extractul utilizat. În ceea ce privește activitatea citotoxică împotriva liniei celulare canceroase DLD-1, prin comparație, RN-DEE a prezentat cele mai semnificative reduceri ale viabilității celulare, chiar și la cele mai mici concentrații testate, cu un IC_{50} de numai 43,56 μ g/mL. La polul opus, RN-EP a produs un IC_{50} de 218,9 μ g/mL.

Din aceste rezultate reiese faptul că pentru acțiunea antibacteriană și citotoxică sunt responsabile alte clase de fitocompuși decât cele care imprimă acțiunea antioxidantă. În special trebuie ținut cont de polaritatea joasă a fracției RN-DEE, care este esențială pentru efectele antibacteriene și citotoxice. Comparația compoziției chimice a celor trei fracții evaluate susține rolul acizilor fenol-carboxilici – acid protocatechuic și acid p-cumaric – în activitatea citotoxică.

6. EVALUAREA BIOLOGICĂ A FRAȚIILOR CU POLARITATE CRESCUTĂ: ACTIVITATE ANTIOXIDANTĂ, ANTIMICROBIANĂ ȘI CITOTOXICĂ

Scopul acestui studiu a fost investigarea bioactivității fracțiilor polare din frunze de *Ribes nigrum*, pentru a completa cunoștințele dobândite anterior privind fracțiile cu polaritate joasă și medie. Obiectivele constau în evaluarea capacității antioxidante, a potențialului antimicrobian și efectului citotoxic (linia celulară DLD-1) a două fracții separate din extractul brut etanolic al frunzelor.

Subiectele cercetării au fost fracția butanolică, conținând compuși solubili în *n*-butanol saturat cu apă, și fracția apoasă, rămasă după depleția progresivă a extractului brut cu eter de petrol, dietil eter, acetat de etil și *n*-butanol.

Rezultatele studiului de față fac obiectul unui articol original publicat în revista *Medicine in Evolution* (Coman et al, 2025 c). Ele pun bazele pentru cercetări viitoare privind potențialul extractelor de *R. nigrum* în lupta împotriva infecțiilor bacteriene și cancerului colorectal.

Cercetarea fracțiilor polare din frunzele de coacăz negru au relevat acțiuni antioxidante, antimicrobiene și citotoxice diferențiate. Din punct de vedere al efectului antioxidant dar și antimicrobian, fracția apoasă s-a dovedit a fi mai activă decât cea butanolică. Testele antimicrobiene au demonstrat că extractul apos prezintă activitate selectivă împotriva bacteriilor Gram-pozitive, cu o inhibare semnificativă observată împotriva *Streptococcus pyogenes* și efecte moderate împotriva *Staphylococcus aureus*. În ceea ce privește activitatea citotoxică împotriva celulelor adenocarcinomului colorectal uman DLD-1, fracția butanolică s-a dovedit a fi mai activă decât cea apoasă.

II. CONCLUZII FINALE ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

Având în vedere eficacitatea și siguranța frunzelor de *R. nigrum*, susținute de îndelungata utilizare tradițională, dar și încurajați de potențialul lor terapeutic, am preparat un extract brut din frunze cu ajutorul etanolului, solvent capabil să extragă o largă plajă de metaboliți din matricile vegetale. Acest extract a fost suspendat în apă și fracționat cu ajutorul a patru solvenți organici, obținându-se cinci fracții cu un domeniu îngust de polaritate, capabil să concentreze clase diferite de compuși naturali. Frațiile obținute au fost RN-EP (care concentrează substanțe nepolare solubile în eter de petrol), RN-DEE (care concentrează compuși cu polaritate redusă solubili în dietil eter), RN-EtOAc (care conține metaboliți cu polaritate medie solubili în acetat de etil), RN-BuOH (care conține substanțe extractibile cu *n*-butanol) și RN-H₂O (fracția rămasă, care concentrează substanțele cele mai polare, hidrosolubile). Sub-extractele menționate au fost caracterizate din punct de vedere fizico-chimic

prin spectroscopie FTIR, după care au fost analizate cu ajutorul cromatografiei de înaltă performanță (HPLC) cuplată cu detecție UV și MS. În continuare au fost evaluate activitatea antioxidantă, antimicrobiană și citotoxicitatea asupra unei linii celulare de adenocarcinom colorectal (DLD-1).

CONCLUZIILE desprinse în urma cercetărilor doctorale sunt următoarele:

- Partiția lichid-lichid a extractului brut a permis obținerea a cinci fracții, cu următoarele randamente: 36.5% pentru fracția solubilă în eter de petrol (RN-EP), 21.7% pentru fracția solubilă în dietil eter (RN-DEE); 18.2% pentru fracția solubilă în acetat de etil (RN-EtOAc); 11.3% pentru fracția solubilă în *n*-butanol (RN-BUOH) și 11.0% pentru fracția hidrosolubilă (RN-H₂O).
- Succesul fracționării a fost confirmat de analiza prin HPLC, care a arătat că: i) diferențele de concentrație ale aceleiași substanțe în fracțiile “vecine” ca polaritate sunt de câte un ordin de mărime, respectiv că ii) anumite substanțe nu se regăsesc decât într-o singură fracție (acidul p-cumaric doar în fracția RN-DEE, epigallocatechina doar în fracția RN-H₂O).
- Evaluarea prin spectroscopie FTIR a arătat că, comparativ cu extractul etanolic brut din frunze de *R. nigrum* (RN-EtOH), caracterizat printr-o bandă largă $\nu(\text{O-H})$ la $\sim 3458 \text{ cm}^{-1}$ și o bandă intensă $\nu(\text{C-O/C-O-C})$ la $\sim 1080 \text{ cm}^{-1}$ (indicând predominanța compușilor polari precum polifenoli și carbohidrați/glicozide), partiția a dus la o separare pe clase de polaritate.
- Analiza extractului brut și a fracțiilor sale prin HPLC cu detecție UV și MS a permis identificarea a 13 polifenoli, dintre care 8 au putut fi cuantificați: acizii p-cumaric, protocatechuic și galic, epigallocatechina, izoquercitrina, quercitrina, rutozida și hiperozida.
- Fitocompușii majoritari în frunzele de coacăz negru sunt glicozidele flavonolice: izoquercitrina și quercitrina. Acești metaboliți secundari s-au acumulat preferențial în fracția solubilă în acetat de etil.
- Fracția cu profilul fitochimic cel mai divers este cea solubilă în dietil eter (RN-DEE), în care au fost cuantificate: acidul protocatechuic, izoquercitrina, quercitrina, acidul p-cumaric și acidul galic.

- Frația apoasă, cea mai reprezentativă pentru utilizarea uzuală conține în ordine descrescătoare a concentrației: rutozidă, izoquercitrină și epigallocatechină.
- Frația cu cel mai intens efect antioxidant a fost cea solubilă în acetat de etil, urmată de cea care concentrează substanțe hidrosolubile. Pentru fracția RN-EtOAc, acest efect este corelat cu concentrația înaltă de glicozide flavonolice. Pentru fracția RN-H₂O, efectul antioxidant intens se datorează probabil prezenței altor substanțe decât cele identificate.,
- Din punct de vedere al activității antimicrobiene, aceasta se manifestă doar asupra bacteriilor Gram-pozitive. Bacteria cea mai sensibilă este *Streptococcus pyogenes*, susceptibilă atât față de fracția apoasă cât și față de cea solubilă în dietil eter (concentrații minime inhibitorii de 10 mg/mL pentru ambele). Frațiile testate sunt inactice pe germenii Gram-negativi.
- În ceea ce privește activitatea citotoxică asupra celulelor de adenocarcinom colorectal DLD-1, fracția RN-DEE a prezentat cel mai intens efect cu un IC₅₀=43,6 μg/mL, urmată de RN-EtOAc cu IC₅₀=127,6 μg/mL, RN-BuOH cu IC₅₀=137,9 μg/mL, RN-EP cu IC₅₀=218,9 μg/mL și RN-H₂O cu IC₅₀=278,4 μg/mL.
- Activitatea citotoxică semnificativ mai intensă a fracției solubile în dietil eter, în comparație cu celelalte sub-extracte, poate fi corelată cu prezența acizilor protocatehuic (acumulat preferențial în această fracție) și p-cumaric (prezent doar în această fracție). Un efect sinergic al acestor acizi fenol-carboxilici cu glicozidele flavonolice este de asemenea probabil.

CONTRIBUTII PERSONALE:

- În cursul cercetării doctorale a fost atins scopul de a realiza un studiu sistematic al frunzelor de coacăz negru, sub raport fitochimic și al investigării efectelor antioxidant, antimicrobian și citotoxic. Analiza comparativă a compoziției fracțiilor cercetate a permis observarea migrării substanțelor active în diferitele fracții, obținerea unor sub-extracte concentrate în compuși care au o plajă îngustă de polaritate. Am putut trage concluzii și cu privire la intensificarea fiecărui efect urmărit, în corelație cu fracția cercetată și compoziția chimică.

- Am arătat cât de importantă este alegerea solventului pentru a obține un extract vegetal cu activitate țintită: fracția solubilă în dietil eter are cel mai intens efect citotoxic, fracția hidrosolubilă are cel mai important efect antibacterian iar fracția solubilă în acetat de etil prezintă cea mai mare capacitate antioxidantă.
- Cercetările noastre au arătat că, deși fracția solubilă în acetat de etil (RN-EtOAc) este cea mai bogată în glicozide flavonolice, pentru efectul citotoxic sunt relevante substanțele mai puțin polare din fracția solubilă în dietil eter (RN-DEE). În acest context, am formulat ipoteza importanței acizilor protocatehuic și p-cumaric pentru efectul citotoxic.
- Studiul doctoral a arătat că fracția hidrosolubilă are cel mai intens efect antimicrobian. Activitatea antibacteriană este maximă pe *Streptococcus pyogenes*, urmat de *Staphylococcus aureus* (ordine în funcție de diametrul zonei de inhibiție). O utilizare adjuvantă a extractelor apoase din frunze de coacăz (gargarisme) în faringita bacteriană (cauzată frecvent de streptococul piogen) este susținută de datele noastre. Această fracție are și o activitate antioxidantă bună (este a doua ca și capacitate antioxidantă, după fracția solubilă în acetat de etil), dar are cea mai slabă performanță citotoxică pe celule DLD-1.
- Cercetările efectuate în cursul doctoratului au pus baza unor viitoare direcții care vor permite evaluarea țintită a unor beneficii terapeutice:
 - Fraționarea bioghidată avansată pentru identificarea compusului/compușilor de joasă polaritate cu efect citotoxic, din fracția solubilă în dietil eter;
 - Extinderea cercetării fracției RN-DEE pe alte linii celulare;
 - Investigarea unui posibil efect sinergic al fracției RN-DEE cu chimioterapice antitumorale utilizate în cancerul colorectal;
 - Fraționare bioghidată avansată pentru identificarea compusului/compușilor hidrosolubili responsabili pentru efectele antibacterian și antioxidant;
 - Formularea de produse farmaceutice cu efect antibacterian, relevante în infecții cu *Streptococcus pyogenes* și *Staphylococcus aureus*;
 - Extinderea cercetării efectului antibacterian al fracției apoase asupra bacteriilor orale.

ARTICOLE DIN TEZA DE DOCTORAT

Teza de doctorat se bazează pe rezultatele a trei articole, în care subsemnata este primul autor, publicate astfel:

1. **O. Coman**, C.A.M. Cobzariu Dan, M. Boța, L. Vlaia, D.S. Tchiakpe-Antal, I. Ioniță, I. Predescu, A. Smeu. *Recent advances regarding the phytochemical and therapeutic uses of Ribes nigrum leaves*. Medicine in Evolution (2025 a), 31(1), 113-119.
<https://doi.org/10.70921/medev.v31i1.1294>
2. **O.A. Coman**, A. Smeu, D. Muntean, A.M. Vlase, L. Vlase, S. Toth, A. Vădan, A. Stoica, S. Liga, A. Moacă, A. Ciurba, D.S. Tchiakpe-Antal. *Comparative analysis of Ribes nigrum leaf extracts in different solvents: antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activity*. Farmacia (2025 b), 73(5), 1164-1174. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2025.5.10> (F.I.=1.3)
3. **O.A. Coman**, A. Smeu, A. Moacă, D. Muntean, A.M. Vlase, L. Vlase, S. Toth, A. Vădan, A. Stoica, S. Liga, D.S. Tchiakpe-Antal. *Phytochemical Characterization and Biological Evaluation of Ribes nigrum Leaf Extracts: A Study of Aqueous and Butanolic Fractions*. Medicine in Evolution (2025 c), 31(3), 269-280.
<https://doi.org/10.70921/medev.v31i3.1314>