

UNIVERSITATEA “BABES-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA

Facultatea de Biologie și Geologie

Școala doctorală Biologie Integrativă

**Proprietățile antioxidante, antimicrobiene și
antitumorale ale extractelor din frunze de *Allium
ursinum* (leurdă): o comparație între tehnicile de
macerare convențională și extracție asistată cu
ultrasunete**

-REZUMAT-

Student-doctorand:

Oravetz (căș. Moldovan) Kinga

Conducător științific:

Prof. dr. Rakosy-Tican Elena

Cluj-Napoca,

2025

Cuprins -Rezumat-

CAPITOLUL I – De la plante la terapii: Fitocompuși în lupta împotriva cancerului și bacteriilor rezistente.....	3
1. Fitocompuși: definiție, clasificare și rol.....	3
2.1. Incidența cancerului de sân și colorectal.....	4
2.2. Factori de risc	4
2.3. Strategii actuale de prevenție și tratamente a cancerului colorectal și de sân.....	4
1. Rezistența la antibiotice: impactul fitocompușilor asupra bacteriilor multirezistente	5
CAPITOLUL II. Fitocompuși din genul <i>Allium</i> cu proprietăți medicinale	6
1. Stadiu actual al cunoașterii compușilor cu proprietăți medicinale din genul <i>Allium</i>	6
2. Fitocompuși din genul <i>Allium</i> cu potențial antitumoral în cancerul colorectal.....	7
2.1. Mecanisme de acțiune antitumorale <i>in vitro</i> ale fitocompușilor din genul <i>Allium</i> , în cancerul colorectal.....	8
2.2. Mecanisme de acțiune antitumorale <i>in vivo</i> ale fitocompușilor din genul <i>Allium</i> , în cancerul colorectal.....	8
2. Fitocompuși din genul <i>Allium</i> cu proprietăți antitumorale în cancerul de sân.....	8
3.1. Mecanisme de acțiune antitumorale <i>in vitro</i> ale fitocompușilor din genul <i>Allium</i> în cancerul de sân	8
3.2. Mecanisme de acțiune antitumorale <i>in vivo</i> ale fitocompușilor din genul <i>Allium</i> în cancerul de sân	9
3. Fitocompuși din genul <i>Allium</i> cu proprietăți antibacteriene	9
5. Specia <i>Allium ursinum</i> : caracteristici generale și activități biologice	9
5.1. Caracteristicile generale ale plantei.....	9
5. 2. Activitățile biologice ale speciei <i>Allium ursinum</i>	10
Scopul și obiectivele studiului.....	12
CAPITOLUL III. Materiale și metode	13
1. Material vegetal și pregătirea extractelor vegetale.....	13
2.1. Determinarea cantității totale de polifenoli și flavonoide prin metode spectrofotometrice	13
2.2. Identificarea și cuantificarea compușilor fenolici și a sulfoxizilor prin LC/ESI+-MS ..	13
3. Determinarea activității biologice a extractelor	14
3.1. Determinarea activității antioxidante a extractelor	14
3.2. Evaluarea <i>in vitro</i> a activității antimicrobiene a extractelor metanolice de <i>A. ursinum</i> .	15
3.3. Evaluarea <i>in vitro</i> a activității antitumorale a extractelor metanolice de <i>A. ursinum</i>	15
CAPITOLUL IV – Rezultate	17
1. Randamentele extracției prin tehnicile UAE și CM	17
2. Analiza chimică calitativă și cantitativă a extractelor de <i>Allium ursinum</i>	17

2.1	Determinarea conținutului total de polifenoli și flavonoide prin metode spectrofotometrice.....	17
2.2.	Identificarea și cuantificarea compușilor fenolici și a sulfoxizilor prin LC/ESI-MS	18
3.	Activitatea antioxidantă a extractelor	20
4.	Activitatea antibacteriană a extractelor vegetale.....	20
5.	Activitatea antitumorală a extractelor vegetale.....	22
CAPITOLUL V – Discuții		24
1.	Analiza extractelor: randament și caracterizare fitochimică	24
1.1.	Randamentul de extracție a extractelor de leurdă	24
1.2.	Profilul fitochimic	24
2.	Extractele de <i>A. ursinum</i> și potențialul lor terapeutic	26
2.1.	Activitatea antioxidantă a extractelor	26
2.2.	Activitatea antimicrobiană a extractelor	26
2.3.	Activitatea antitumorală a extractelor	27
Concluzii generale și perspective de cercetare		29
Bibliografie		30

CAPITOLUL I – De la plante la terapii: Fitocompușii în lupta împotriva cancerului și bacteriilor rezistente

1. Fitocompușii: definiție, clasificare și rol

Plantele au fost folosite în scopuri terapeutice încă din cele mai vechi timpuri, când diferite extracte erau folosite pentru a trata diferite boli (Rodrigues & Delerue-Matos, 2022). Calea către utilizarea plantelor în terapie a fost marcată de numeroase încercări și erori și, treptat, oamenii au transformat această practică într-una dintre cele mai vechi științe – fitoterapie (Jamshidi-Kia et al., 2017). Cunoștințele transmise de-a lungul anilor, susținute astăzi de dovezi științifice, demonstrează că plantele sunt o sursă valoroasă de fitochimice cu rol atât preventiv, cât și terapeutic, contribuind la reducerea riscurilor majore de boli cronice (Liu, 2004).

Fitocompușii sunt clasificați în șase grupe majore, inclusiv compuși fenolici, alcaloizi, compuși care conțin azot, compuși organosulfurați, fitosteroli și carotenoizi, compușii fenolici fiind cei mai amplu studiați (Liu, 2004, 2013).

Compușii fenolici prezintă numeroase roluri terapeutice și au fost intens investigați. Acidul cafeic și acidul clorogenic sunt recunoscuți pentru proprietățile lor antioxidante și cardioprotectoare, reducând tensiunea arterială (Agunloye et al., 2019). S-a demonstrat că acidul galic protejează celulele de oxidare (Dludla et al., 2019). Acidul vanilic exercită efecte antitumorale prin inhibarea factorului 1 inductibil de hipoxie (HIF-1), un factor cheie în adaptarea celulelor canceroase la medii cu oxigen scăzut (Gong et al., 2019). Dintre flavonoide, naringenina și hesperidina au demonstrat efecte cardioprotectoare, antivirale și antitumorale împotriva cancerului de sân, prostată, plămân și colon (Motallebi și colab., 2022; Pyrzyńska, 2022; Stabrauskiene și colab., 2022; Syahputra și colab., 2022). Flavonele și izoflavonele prezintă proprietăți antiinflamatorii, antimicrobiene și anticancerigene (Catarino și colab., 2015; Jiang și colab., 2016). Quercetina are efecte antioxidante notabile, neutralizând radicalii liberi, cum ar fi peroxidul de hidrogen, superoxidul și radicalii hidroxil (Deepika & Maurya, 2022). Mai mult, quercetina a demonstrat activitate antitumorală împotriva cancerului de sân (H. Zhang și colab., 2014), ovarian (Gao și colab., 2012), colorectal (Darband și colab., 2018) și hepatic (Fernández-Palanca și colab., 2019), precum și activitate antibacteriană semnificativă împotriva speciilor rezistente la antibiotice (Bhattacharya, 2022).

Astfel, consumul unei game variate de produse pe bază de plante oferă o gamă largă de nutrienți și compuși bioactivi cu proprietăți terapeutice multiple, contribuind la reducerea diferitelor boli cronice (Liu, 2004).

2.1. Incidența cancerului de sân și colorectal

Conform datelor furnizate de GLOBOCAN în 2022, cancerul de sân este al doilea cel mai frecvent tip de cancer la nivel global, după cancerul pulmonar, cu aproximativ 2,3 milioane de cazuri noi diagnosticate în acel an. Aceasta reprezintă 11,5% din toate cazurile noi de cancer din întreaga lume, la ambele sexe. Cancerul de sân este principala cauză a mortalității cauzate de cancer în rândul femeilor, reprezentând 15,4% din totalul deceselor cauzate de cancer și provocând 666.103 decese la nivel global (Global Cancer Observatory, n.d.).

Cancerul colorectal (CRC) este al treilea cel mai frecvent diagnosticat de cancer la nivel mondial, după cancerul de sân și cel pulmonar, și este a treia cauză principală de decese cauzate de cancer. CRC reprezintă aproximativ 9,8% din toate cazurile de cancer, cu 1,85 milioane de cazuri noi raportate anual. Acest tip de cancer afectează atât bărbații, cât și femeile, cu o incidență puțin mai mare la bărbați (Marcellinaro et al., 2023).

Vârsta medie la diagnosticare este de 68 de ani pentru bărbați și 72 de ani pentru femei. Incidența ridicată a CRC în țările dezvoltate este asociată cu factori precum speranța de viață mai lungă și îmbătrânirea populației, care contribuie la creșterea poverii cancerului colorectal (Goodarzi și colab., 2019).

2.2. Factori de risc

Apariția cancerului de sân și a cancerului colorectal (CRC) este influențată de o varietate de factori de risc nemodificabili și modificabili, reflectând asemănările dintre cele două afecțiuni. Printre factorii comuni nemodificabili se numără vârsta, sexul, predispoziția genetică, antecedentele familiale și istoricul medical. Factorii de risc modificabili sunt în mare măsură influențați de stilul de viață, dietă, activitate fizică, consumul de alcool și fumat, care sunt factori modificabili comuni pentru ambele tipuri de cancer (Hagggar & Boushey, 2009; Majeed și colab., 2014).

2.3. Strategii actuale de prevenție și tratamente a cancerului colorectal și de sân

Situat pe locul al treilea în ceea ce privește incidența, CRC a devenit o povară financiară și o provocare globală; prin urmare, strategiile de prevenire sunt cruciale pentru reducerea riscului CCR și a numărului de cazuri noi (Xi & Xu, 2021). Spre deosebire de alte tipuri de cancer, CCR este o boală care poate fi prevenită și se estimează că aproximativ 75% din cazurile de CCR ar putea fi evitate prin adoptarea unui stil de viață sănătos (Giovannucci, 2001).

2.3.1. Prevenția primară

Anumite studii au evidențiat că defectele genetice sunt responsabile pentru doar 5%-10% din toate cazurile de cancer, restul de 90%-95% fiind atribuite factorilor de mediu și stilului de viață. Astfel, cea mai bună strategie de combatere a cancerului este prevenirea (Anand et al., 2008).

Prevenția primară are ca scop reducerea incidenței bolii prin promovarea unui stil de viață sănătos și a abordărilor proactive pentru eliminarea factorilor de risc. Acesta vizează indivizii sănătoși înainte de apariția bolii și include o combinație de intervenții axate pe modificări ale stilului de viață, dietă, intervenții farmacologice și, în unele cazuri, intervenții chirurgicale.

2.3.2. Prevenția secundară

Prevenția secundară se concentrează pe depistarea precoce a cancerului, înainte ca simptomele să devină vizibile, pentru a permite intervenția timpurie și pentru a reduce progresia bolii. Include metode de screening care ajută la identificarea persoanelor cu risc crescut de cancer, având ca scop reducerea mortalității prin detecție precoce (Kisling & Das, 2025).

2.3.3. Prevenția terțiară

Prevenția terțiară își propune să reducă impactul bolii după debutul acesteia prin prevenirea complicațiilor, recidivelor și metastazelor, îmbunătățind astfel calitatea vieții pacienților (Kisling & Das, 2025). În cazul cancerului, prevenirea terțiară poate include o combinație de intervenții chirurgicale, radioterapie și chimioterapie pentru a îndepărta tumora din organism și a preveni reapariția acesteia (Feinleib, 2001).

1. Rezistența la antibiotice: impactul fitocompușilor asupra bacteriilor multirezistente

Gestionarea agenților patogeni care provoacă numeroase boli infecțioase a fost întotdeauna o prioritate globală. Mai mult, din cauza contaminării încrucișate și a utilizării excesive a antibioticelor, au apărut tulpini microbiene rezistente, făcând această problemă mult mai complexă și mai urgentă (Kraemer et al., 2019).

Rezistența la antimicrobiene (RAM) este o problemă recunoscută la nivel mondial, estimată a fi direct responsabilă pentru 1,27 milioane de decese la nivel mondial în 2019 și a contribuit la 4,95 milioane de decese. Organizația Mondială a Sănătății (OMS) subliniază importanța utilizării prudente a antibioticelor și dezvoltarea urgentă a unor noi clase de antibiotice, deoarece în ultimii 40 de ani au fost dezvoltate doar două noi clase de antibiotice (Organizația Mondială a Sănătății, 2015).

Mai mult, în ciuda gamei largi de antibiotice disponibile pe piața farmaceutică globală, există o nevoie critică de a identifica noi agenți potențiali antimicrobieni care să utilizeze noi mecanisme antibacteriene pentru a preveni rezistența încrucișată și pentru a oferi opțiuni terapeutice eficiente împotriva infecțiilor cauzate de bacterii rezistente la antibiotice (Ivanov et al., 2022).

Astfel, explorarea antimicrobienulelor pe bază de plante pentru a aborda criza RAM reprezintă o nouă direcție de cercetare, oferind o oportunitate de a descoperi noi soluții terapeutice care au potențialul de a oferi alternative sigure și eficiente la antibioticele convenționale, la care multe bacterii au dezvoltat rezistență (Ranjbar & Alam, 2023).

CAPITOLUL II. Fitocompuși din genul *Allium* cu proprietăți medicinale

Plantele din genul *Allium* au fost cultivate încă din antichitate, fiind apreciate pentru proprietățile lor culinare și medicinale. Cei mai cunoscuți reprezentanți ai acestui gen - *Allium* cepa (ceapă), *Allium sativum* (usturoi), *Allium porrum* (praz) și *Allium ascalonicum* (șalotă) - se disting prin numeroasele lor proprietăți terapeutice, inclusiv hipoglicemiente, hipolipidemiente, antimicrobiene, antiinflamatorii, antitumorale și cu efect inhibitor de agregare a trombocitelor, care au fost utilizate și utilizate în medicina tradițională (Rabinowitch & Goldstein, 2020).

Proprietățile terapeutice ale acestor plante sunt atribuite unor compuși activi care pot fi extrași sau uneori izolați în forma lor pură, oferind o bază valoroasă pentru aplicațiile lor medicinale (Stănescu și colab., 2002). Prin prelucrarea acestor plante s-au obținut extracte care, în funcție de solventul și organele plantelor folosite pentru extracție, diferă calitativ și cantitativ în ceea ce privește compoziția chimică și acțiunea terapeutică. Această diversitate contribuie la versatilitatea lor atât în medicina tradițională, cât și în cea modernă (Rodrigues & Delerue-Matos, 2022).

1. Stadiu actual al cunoașterii compușilor cu proprietăți medicinale din genul *Allium*

Speciile din genul *Allium* au în general o compoziție chimică similară datorită relațiilor lor filogenetice, dar pot apărea variații în concentrația și proporția acestor compuși, care pot influența activitatea biologică a acestor specii. Cele mai comune fitochimice includ compuși organosulfurați, polifenoli, saponine, vitamine, uleiuri volatile și prostaglandine (Beretta et al., 2017). Acești compuși bioactivi oferă numeroase beneficii pentru sănătate. Pot apărea variații din cauza diferențelor genetice, a factorilor de mediu, a stadiilor de dezvoltare a plantelor, a interacțiunilor cu factorii abiotici și a tratamentelor post-recoltare (Shahid și colab., 2022; Vuković și colab., 2023).

De exemplu, usturoiul este cunoscut pentru conținutul său ridicat de alicină, un compus cu sulf format prin acțiunea enzimei aliinazei asupra aliinei. Gustul și mirosul caracteristic acestor plante sunt atribuite în principal tiosulfinaților și aliinei (S-alil cisteină sulfoxid). În plus față de alicină, produșii de degradare ai aliinei includ disulfuri de dialil, ajoenă și vinil ditiine (Jabbes și colab., 2012). Descompunerea tiosulfinaților produce sulfuri, cum ar fi disulfura de dialil, sulfura de alil metil și disulfura de alil metil (Lanzotti și colab., 2014).

Dincolo de proprietățile lor aromatice, acești compuși organosulfurați oferă o serie de beneficii terapeutice, fiind responsabili de efectele antitumorale (Khanum și colab., 2004), antidiabetice (Eidi și colab., 2006), antiinflamatoare (Lee și colab., 2012), antimicrobiene (Harris și colab., 2003, 2003), 2013; Chen et al., 2013), cardioprotectoare (Higuchi și colab., 2003) și imunomodulatoare (Schafer & Kaschula, 2014). În plus, usturoiul este una dintre cele mai bogate

surse de compuși polifenolici, ceea ce îl face o sursă alimentară importantă de polifenoli (Martins et al., 2016).

Pe lângă alicină și polifenoli, usturoiul conține, de asemenea, lectine, prostaglandine, fructan, pectină, lipide, adenzină, vitaminele B1, B2, B6, C și E, biotină, acid nicotinic, acizi grași, glicolipide, fosfolipide, minerale și aminoacizi esențiali (Fenwick & Hanley, 1985). Anumite saponine, cum ar fi β -clorogenina, au efecte antifungice, antibacteriene, antitumorale, antiinflamatorii și hipocolesterolemice (Lanzotti, 2006; Rekowska & Skupień, 2009). Dintre aceste fitochimice medicinale, compușii cu sulf, flavonoidele și compușii fenolici sunt cei mai amplu studiați (Lanzotti et al., 2014).

2. Fitocompuși din genul *Allium* cu potențial antitumoral în cancerul colorectal

De când Weisberger și Pensky (1958) au demonstrat *in vitro* și *in vivo* că extractul de usturoi inhibă creșterea celulelor tumorale, cercetările asupra usturoiului au crescut semnificativ (Weisberger & Pensky, 1958). Alături de usturoi, au fost studiate și alte specii de *Allium* pentru a determina efectele lor chemopreventive, în special în ceea ce privește inhibarea creșterii tumorii și suprimarea proliferării celulare. Studiile arată că usturoiul și ceapa reduc riscul de sarcoame și carcinoame în diferite organe, inclusiv stomac, colon, esofag, prostată, ficat, plămâni, piele și creier (Corzo-Martínez et al., 2007).

Usturoiul (*Allium sativum*), o plantă bulboasă din familia *Liliaceae*, este una dintre speciile cele mai studiate pe larg din genul *Allium*, cu o vastă literatură științifică care demonstrează efectele sale antitumorale. După cum s-a menționat, usturoiul conține un amestec complex de metaboliți, inclusiv compuși fenolici, flavonoizi, carotenoizi, alcaloizi și compuși organosulfurați (OSC) (Ansary et al., 2020). Printre acestea, componentele bioactive care par să prevină CRC includ compuși organosulfurați precum aliina, alicina, ajoena, sulfura de dialil (DAS), disulfura de dialil (DADS), trisulfura de dialil (DATS), S-alilcisteina (SAC) și S-alilmercaptocisteina (SAMC) (Mitra, et al. Al-Wabel, 2010).

Astfel, usturoiul poate fi considerat un model excelent pentru ilustrarea potențialului antitumoral al întregului gen *Allium*, datorită conținutului său ridicat de compuși bioactivi și a rolului său important în alimentația umană, făcându-l una dintre plantele cele mai studiate pe larg pentru efectele sale benefice, în special în prevenirea cancerului colorectal.

Deoarece alte specii de *Allium* conțin compuși activi similari care contribuie la efectele lor antitumorale, aceștia nu vor fi detaliați în acest capitol. Prin urmare, acest capitol trece în revistă cele mai recente actualizări privind activitatea antitumorală a *Allium sativum*, ca principal reprezentant al genului *Allium*, atât *in vitro*, cât și *in vivo*, alături de constituenții săi fitochimici responsabili de astfel de activități biologice, cu accent pe mecanismele celulare și moleculare de acțiune.

2.1. Mecanisme de acțiune antitumorale *in vitro* ale fitocompușilor din genul *Allium*, în cancerul colorectal

Studiind mecanismele fitochimice ale usturoiului și proiectând tratamente eficiente, oamenii de știință au folosit linii celulare de cancer colorectal (CRC) bine caracterizate ca modele biologice. Pentru a sprijini studiile *in vitro*, 10 linii de celule CRC, cum ar fi Caco-2, DLD-1, HCT-15, HCT116, HT-29, COLO 205, SW480 și SW620, au fost utilizate de-a lungul anilor.

Numeroase studii *in vitro* au demonstrat activitățile antiproliferative (citostatice), inductoare de apoptoză/necroptoză (citotoxice), anti-migrație, anti-invazie și imunomodulatoare ale usturoiului și ale constituenților săi împotriva cancerului colorectal.

2.2. Mecanisme de acțiune antitumorale *in vivo* ale fitocompușilor din genul *Allium*, în cancerul colorectal

Activitatea *in vivo* a mai multor compuși bioactivi din *Allium sativum* a fost investigată pentru a determina capacitatea acestora de a inhiba carcinogeneza CRC și/sau progresia tumorii la diferite modele animale. Activitatea antitumorală a DAS, DADS și DATS a fost studiată la șoareci masculi nuzi BALB/c în vârstă de treizeci și șase de săptămâni injectați anterior cu celule COLO 205. Doi dintre acești compuși, DADS și DATS, dar nu DAS, au suprimat semnificativ xenogrefele tumorale (atât greutatea, cât și dimensiunea) în acest model animal, DATS fiind cel mai citotoxic dintre toți compușii testați. (Lai et al., 2012). De asemenea, s-a constatat că DATS este eficient la șoarecii cărora li s-a injectat celule CT-26, unde s-a observat o reducere atât a volumului, cât și a greutății tumorii. (Wu et al., 2011). Totuși, atât DATS, cât și DADS au demonstrat capacitatea de a induce expresia mai multor gene implicate în rezistența multiplă la medicamente, inclusiv MDR1, MRP1, MRP4 și MRP6 — un aspect care trebuie luat în considerare în studiile viitoare (Lai et al., 2012).

2. Fitocompuși din genul *Allium* cu proprietăți antitumorale în cancerul de sân

3.1. Mecanisme de acțiune antitumorale *in vitro* ale fitocompușilor din genul *Allium* în cancerul de sân

Deși studiile epidemiologice nu au arătat o corelație semnificativă între consumul de usturoi și un risc redus de cancer de sân, studiile *in vivo* și *in vitro* au demonstrat că diverși compuși de usturoi și extracte de usturoi întreg reduc semnificativ riscul de cancer mamar (Tsubura și colab., 2011). Aceste studii sugerează că usturoiul și compușii săi pot interfera prin mecanisme moleculare multiple, inclusiv inhibarea căilor de semnalizare intracelulară care contribuie la dezvoltarea, supraviețuirea și proliferarea celulelor tumorale, promovarea morții celulare și reducerea metastazelor. Aceste efecte sunt asociate cu modificări ale expresiei proteinelor cheie implicate în reglarea ciclului celular și procesele de migrare și invazie celulară (Pandey și colab.,

2023). Mecanismele lor de acțiune includ inducerea apoptozei prin căi de semnalizare specifice, inhibarea proliferării celulare și blocarea proceselor de metastază prin modularea proteinelor cheie precum Bcl-2, Bax și E-caderina.

3.2. Mecanisme de acțiune antitumorale *in vivo* ale fitocompușilor din genul *Allium* în cancerul de sân

Numeroși cercetători au investigat, de asemenea, activitatea *in vivo* a extractelor de usturoi și a compușilor acestora la șoareci albinos elvețieni, șoareci BALB/c, șobolani Sprague-Dawley și șoareci cu imunodeficiență combinată severă (SCID). Extractele de usturoi și compușii lor prezintă activitate chimiopreventivă, antitumorală și anti-metastatică. Mecanismele lor de acțiune includ stimularea apoptozei prin reglarea expresiei proteinei Bax și Bcl-2, blocarea căilor de semnalizare implicate în metastaze și reglarea în jos a metaloproteinazelor MMP-2 și MMP-9, precum și factori cheie de angiogeneză, cum ar fi VEGF-A și HIF-1 α . Mai mult, inhibarea ALDH1 sugerează că acești compuși pot contribui la epuizarea celulelor stem canceroase, care sunt responsabile de recidivă și metastază (Oravetz et al., 2023).

3. Fitocompuși din genul *Allium* cu proprietăți antibacteriene

Numeroase studii asupra efectelor antibacteriene ale extractelor de usturoi crud au investigat activitatea acestora atât împotriva speciilor bacteriene comensale, cât și a celor patogene (inclusiv *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Mycobacterium spp.*, MRSA (*Staphylococcus aureus* rezistent la metilicilină), *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Bacteroides spp.* și *Lactobacillus casei* (Daka, 2011; 1998; Roshan et al., 2017; Viswanathan et al., 2014);

Efectul sinergic dintre extractele de usturoi și antibiotice a fost demonstrat în mai multe studii, în care combinația de extract de usturoi proaspăt cu gentamicina a îmbunătățit eficacitatea antimicrobiană împotriva tulpinilor rezistente precum MRSA și *Klebsiella pneumoniae* (Magrys et al., 2021).

5. Specia *Allium ursinum*: caracteristici generale și activități biologice

5.1. Caracteristicile generale ale plantei

Leurda este o plantă monocotiledonată care aparține familiei *Liliaceae*. Leurda este o plantă spontană, răspândită în pădurile din Europa și Asia de Nord (Schmitt et al., 2005). O întâlnim la altitudini de maximum 1900m și nu mai departe de 64° latitudine nordică, extinzându-se din regiunea mediteraneană până în Scandinavia, preferând zonele umede și umbroase, dar se poate adapta la o varietate de condiții climatice și de sol (Oborny et al., 2011). Aceasta crește primăvara, de obicei între lunile martie și iunie, înainte de a înfrunzi complet arborii foioși din pădurile de fag și stejar, unde aceasta este frecvent întâlnită (Jandl et al., 1997).

În ceea ce privește caracteristicile morfologice, leurda este o plantă geofită vernală, perenă, înaltă până la 50 cm și care se înmulțește prin semințe (Sobolewska et al., 2015). Rădăcinile contractile încep să se dezvolte aproximativ de la vârsta de trei ani și au rolul de a trage bulbul adânc în sol pentru a-l fixa și pentru a facilita accesul la nutrienți. Bulbul său este îngust, alungit, având o lungime de aproximativ 1,5–6 cm, înconjurat de straturi de tunici transparente (Clapham et al., 1990). Frunzele au formă eliptică și culoare verde strălucitor pe partea superioară și mate pe partea inferioară. Limbul este întreg, de formă eliptică-lanceolată, cu dimensiuni de până la 25 cm lungime și 7 cm lățime, iar pețiolul are o lungime de până la 20 cm (Clapham et al., 1990). Inflorescențele umbeliforme sunt compuse din 3-30 flori albe, stelate, înconjurate de 2-3 bractee. Florile sunt alcătuite din 6 tepale de 16–20 mm, ovarul este superior, trilocular, stilul se termină cu un stigmat simplu, iar staminele sunt mai scurte decât periantul (Błażewicz-Woźniak & Michowska, 2011). Înflorirea leurdei începe, de regulă, în luna aprilie și se încheie în prima jumătate a lunii mai.

5. 2. Activitățile biologice ale speciei *Allium ursinum*

Datele din literatură au arătat că *Allium ursinum* prezintă activități antiinflamatorii, antioxidante, antitumorale, antimicrobiene și cardioprotectoare.

Numeroase studii care analizează extracte din diferite părți ale *A. ursinum* au demonstrat că toate prezintă activitate antioxidantă (Putnoky și colab., 2013; Štajner și colab., 2006). În plus, Pavlović și colab. (2017) au raportat că extractele de *A. ursinum* au o capacitate antioxidantă superioară în comparație cu alte specii sălbatice de *Allium* (Pavlović et al., 2017). Această superioritate a fost confirmată și într-un studiu comparativ care a analizat extracte din usturoi, arpagic, ceapă roșie, ceapă galbenă și ceapă albă, situând leurda pe locul doi, după usturoi în ceea ce privește activitatea antioxidantă.

Potențialul său ca agent antibacterian natural este susținut de un număr mare de studii care evidențiază eficacitatea extractelor de *A. ursinum* împotriva numeroaselor tulpini bacteriene, atât Gram-pozitive, cât și Gram-negative (Ivanova et al., 2009; Lupoae et al., 2013; Rank, Putnovic et al., 2021; Tomšik et al., 2019).

Datele disponibile din literatura de specialitate cu privire la efectele antitumorale ale extractelor de *A. ursinum* sunt foarte limitate. Un studiu a raportat citotoxicitatea scăzută până la moderată a extractelor metanolice din frunzele de *A. ursinum* împotriva melanomului murin B16 și a liniilor celulare de sarcom XC (Sobolewska și colab., 2006). În plus, s-au demonstrat efecte citotoxice împotriva liniilor celulare HeLa (adenocarcinom de col uterin uman) și LS174 (adenocarcinom de colon uman) (Stanisavljević și colab., 2020), precum și împotriva AGS și MKN74 (celule canceroase gastrice) (Singleton și colab., 1999).

Extracțele de *Allium ursinum* au fost caracterizate printr-o activitate cardioprotectoare puternică demonstrată prin inhibarea agregării plachetare. Extractul etanolic a prezentat activitate inhibitoare împotriva agregării induse de adenzin difosfat (ADP), cu un mecanism de acțiune similar cu cel al clopidogrelului, o clasă de medicamente antiplachetare (Hiyasat și colab., 2009).

Scopul și obiectivele studiului

Scopul studiului

Optimizarea extracției fitochimicalelor din *Allium ursinum* pentru conservarea proprietăților lor biologice

Obiectivele studiului

Objective 1. Prepararea extractelor de plante din frunzele de *Allium ursinum* folosind macerarea convențională (CM) și extracția asistată cu ultrasunete (UAE) pentru analiză comparativă.

Objective 2 Caracterizarea biochimică a extractelor vegetale metanolice obținute din frunze de *A. ursinum* prin tehnica asistată de ultrasunete (UAE) și macerare convențională (CM), din prisma conținutului de polifenoli și sulfoxizi prin metode spectrofotometrice, LC/ESI+-MS.

Obiectiv 3. Determinarea activității biologice a extractelor din *A. ursinum* din perspectiva activității antioxidante prin metodele CUPRAC și de captare a peroxidului de hidrogen, a activității antibacteriene prin metoda difuzimetrică în agar pe cinci tulpini patogene și a activității anti-tumorale pe liniile celulare de cancer mamar T47D, MDA-MB-231 și pe liniile celulare de cancer colorectal DLD-1 și HT29, prin metoda MTT.

Obiectiv 4. Analiza comparativă a eficienței extracției asistate cu ultrasunete (UAE) față de macerarea convențională (CM) având ca scop evaluarea îmbunătățirii proprietăților bioactive ale extractelor obținute.

CAPITOLUL III. Materiale și metode

1. Material vegetal și pregătirea extractelor vegetale

Materialul vegetal a constat din frunze de *Allium ursinum*. Acestea au fost colectate în aprilie 2019 din flora sălbatică a Pădurii Cărbunari, Comuna Dumbrăvița, județul Maramureș, România (47°34'28.4"N 23°40'13.9"E).

După colectare, frunzele au fost imediat pregătite pentru procesul de uscare, fiind lăsate să se usuce la aer în mod natural într-un mediu controlat la temperatura camerei, ferite de expunerea directă la lumină, pentru o perioadă de patru săptămâni.

Frunzele de *Allium ursinum* au fost extrase folosind metanol 70% (12,5 ml/g) prin macerare convențională (CM) și extracție asistată cu ultrasunete (UAE).

Pentru a îndepărta solventul, metanolul a fost evaporat la 40°C sub presiune redusă folosind un evaporator rotativ. Reziduurile uscate ale ambelor extracte au fost cântărite și ulterior utilizate pentru prepararea soluțiilor stoc la o concentrație de 100 mg/mL. Metanolul 70% a fost ales ca solvent pentru analiza biochimică, în timp ce dimetilsulfoxidul (DMSO) a fost utilizat pentru experimentele de citotoxicitate, extractele din ambii solvenți fiind utilizate pentru screening-ul activității antibacteriene. Înainte de a efectua procedurile analitice, extractele au fost filtrate în continuare printr-un filtru cu o dimensiune a porilor de 0,22 μm..

2. Analiza chimică calitativă și cantitativă a extractelor de leurdă

Pentru a sublinia spectrul de compuși din cele două extracte și pentru a cuantifica principiile bioactive, au fost utilizate metode analitice avansate, precum cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) și analiza spectrofotometrică.

2.1. Determinarea cantității totale de polifenoli și flavonoide prin metode spectrofotometrice

Determinarea conținutului total de polifenoli caracteristic fiecărui extract a fost efectuată prin metoda colorimetrică Folin-Ciocalteu (Singleton și colab., 1999) cu adaptări.

Conținutul total de flavonoide (TFC) al fiecărui extract a fost determinat folosind o metodă spectrofotometrică bazată pe formarea unui complex flavonoid-aluminiu, urmând metodologia descrisă de Zhishen și colaboratori (Zhishen și colab., 1999).

2.2. Identificarea și cuantificarea compușilor fenolici și a sulfoxizilor prin LC/ESI+-MS

În acest studiu, compușii fenolici și sulfoxizii au fost identificați și cuantificați folosind cromatografie lichidă (LC) combinată cu spectrometrie de masă (MS), folosind ionizare prin electrospray în mod pozitiv (ESI⁺) (LC/ESI⁺-MS). Această metodă a permis separarea eficientă a compușilor, urmată de analiza lor detaliată bazată pe spectre de masă.

Pentru a identifica compușii și a atribui vârfurile corespunzătoare pe cromatograme, timpul de retenție (Rt), spectrul de absorbție UV-VIS și spectrul de masă al fiecărui fitoconstituent au fost comparate cu vârfurile standardelor comerciale în aceleași condiții cromatografice. Standardele au inclus acid clorogenic, acid cafeic, quercetin-rutinozid, quercetin-glucozid, acid elagic și miricetină.

Pentru cuantificarea compușilor fenolici, curbele standard de calibrare au fost mai întâi determinate pentru acidul galic și rutin. Mai exact, conținutul de aliină a fost determinat folosind o curbă de calibrare bazată pe acid galic ($R^2 = 0,9978$), într-un interval de concentrație de 10-100 $\mu\text{g/mL}$, în timp ce conținutul de flavonol a fost evaluat folosind o curbă de calibrare bazată pe rutina ($R^2 = 0,9981$) cu același interval de concentrație.

3. Determinarea activității biologice a extractelor

3.1. Determinarea activității antioxidante a extractelor

Activitatea antioxidantă a extractelor a fost determinată folosind două metode: testul capacității antioxidante reducătoare cuprice (CUPRAC) și metoda de captare a peroxidului de hidrogen (HPS).

Rezultatele au fost exprimate ca echivalenți Trolox în micromoli pe litru de probă (TE $\mu\text{mol/L}$), pe baza unei curbe standard determinate anterior folosind diferite concentrații de Trolox (Fig. 1).

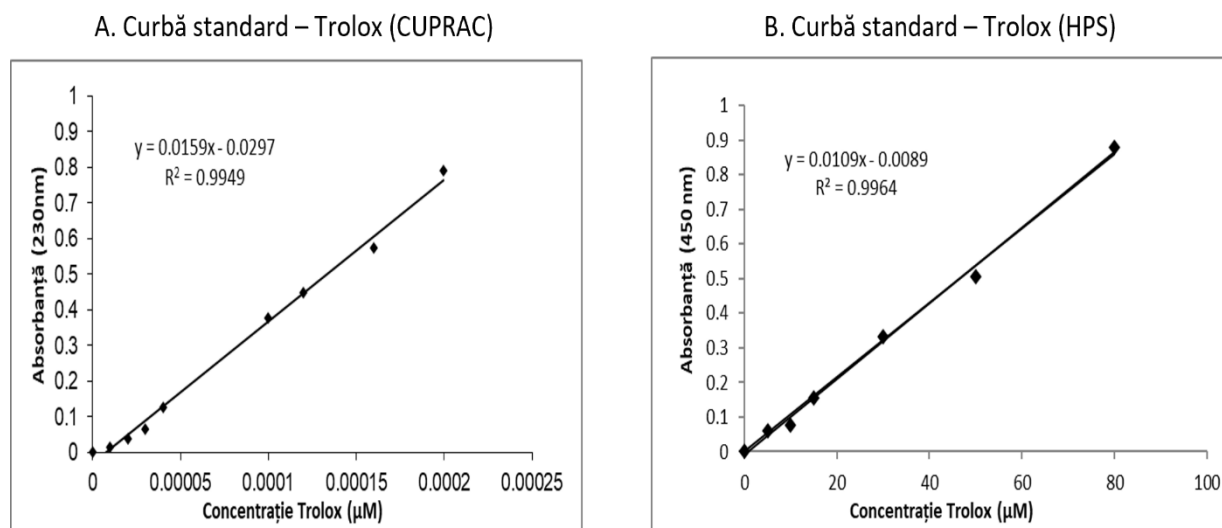


Fig. 1 Curbele de calibrare pentru standardele Trolox în metoda CUPRAC (A.) și în metoda captare a peroxidului de hidrogen (HPS) (B.) utilizate la determinarea activității antioxidante a celor două extracte vegetale de *A. ursinum*.

3.2. Evaluarea *in vitro* a activității antimicrobiene a extractelor metanolice de *A. ursinum*

Activitatea antimicrobiană a extractelor metanolice de *Allium ursinum* a fost evaluată prin metoda difuziei, o tehnică larg recunoscută pentru determinarea susceptibilității sau rezistenței bacteriene la diferite substanțe antimicrobiene (Bălan, 2022).

Pentru testarea antibacteriană a extractelor de usturoi sălbatic s-au folosit cinci tulpini bacteriene de referință: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, and *Escherichia coli* ATCC 25922.

Rezultatele au fost înregistrate prin măsurarea diametrului zonelor de inhibiție folosind o riglă, diametrele mai mari indicând o sensibilitate bacteriană mai mare la extractul testat (Carpa et al., 2014).

3.3. Evaluarea *in vitro* a activității antitumorale a extractelor metanolice de *A. ursinum*

3.3.1. Linii celulare și condiții de cultură

Activitatea antitumorală a extractelor de *Allium ursinum* a fost testată pe două linii celulare de cancer de sân (T47D și MDA-MB-231) și două linii celulare de carcinom colorectal (DLD-1 și HT29).

Toate liniile celulare utilizate în acest studiu au fost achiziționate de la Colecția Europeană de Culturi de Celule Autentificate (ECACC) și cultivate în mediu RPMI-1640.

Celulele au fost menținute într-un incubator la 37°C într-o atmosferă umidificată (90% umiditate) cu 5% CO₂.

3.3.2. Determinarea activității antitumorale a extractelor prin testul MTT

Prezența celulelor viabile în culturile incubate cu extracte a fost evaluată folosind testul MTT.

În esență, celulele au fost însămânțate în plăci cu 96 de godeuri la o densitate inițială de 2×10^4 celule/godeu, cu 200 uL de mediu de cultură per godeu. După 24 de ore, mediul de cultură din fiecare godeu a fost înlocuit cu 180 μL de mediu proaspăt, la care s-au adăugat extractele de plante în nouă concentrații crescând progresiv: 50, 100, 150, 200, 250, 350, 500, 750 și 1000 μg/mL, cu șase replici testate în concentrații tehnice fiecare. Tratamentul, administrat într-un volum de 20 uL per godeu, a constat dintr-un amestec de soluție de extract stoc (concentrație de 100 mg/mL) și soluție salină fiziologică sterilă.

După o perioadă de incubare de 48 de ore la 37°C, într-o atmosferă de 5% CO₂, supernatantul a fost îndepărtat și s-au adăugat 100 uL de soluție MTT în fiecare godeu. După o oră de incubare, soluția MTT a fost îndepărtată și s-au adăugat 150 uL de DMSO 100% (Carl Roth GmbH) în

fiecare godeu pentru a solubiliza formazanul format. Absorbanța a fost măsurată spectrofotometric la o lungime de undă de 570 nm.

Pentru a exclude posibilitatea ca solventul utilizat în extractele finale, DMSO, să influențeze viabilitatea celulară, au fost efectuate experimente separate. DMSO ($\leq 1\%$) nu a arătat nicio citotoxicitate pe liniile celulare de cancer de sân (T47D, MDA-MB-231) și colorectal (DLD-1, HT29).

CAPITOLUL IV – Rezultate

1. Randamentele extracției prin tehnicile UAE și CM

Extractele din frunzele de *A. ursinum* au fost obținute folosind metanol 70%, pornind de la 4 g de material vegetal uscat, folosind două tehnici alternative de extracție: macerarea convențională (CM) și extracția asistată cu ultrasunete urmată de macerare (UAE+CM).

Sa observat că randamentul de extracție pentru metoda convențională de macerare (CM) a fost de 41,325%. Pe de altă parte, metoda combinată UAE+CM a prezentat o eficiență mai mare, obținând o rată de extracție de 45,825% (Tabelul 1).

Tabel 1. Randamentul de extracție pentru cele două extracte vegetale obținute prin macerare clasică (CM) și prin tehnica ultrasonicării urmată de macerație (UAE+CM), pornind de la 4 g de material vegetal uscat.

Extract	Material vegetal uscat [DW (g)]	Pudră extrasă [DW (g)]	Randament (%)
CM	4 g	1.653 g	41.325 %
UAE+CM	4 g	1.833 g	45.825 %

2. Analiza chimică calitativă și cantitativă a extractelor de *Allium ursinum*

Profilul fitochimic al celor două extracte de *A. ursinum* a fost evaluat folosind metode spectrofotometrice pentru a identifica constituenții majori cu potențiale proprietăți antibacteriene și antitumorale. Astfel, polifenolii și compușii care conțin sulf au fost evaluați în ambele extracte

Conținutul total de polifenoli și flavonoizi ale extractelor a fost determinat prin tehnici spectrofotometrice, în timp ce identificarea compușilor fenolici a fost realizată prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu detecție cu fotodiode (HPLC-PDA). Cuantificarea acestor compuși a fost efectuată prin spectrometrie de masă cu ionizare electrospray (ESI-MS).

2.1 Determinarea conținutului total de polifenoli și flavonoide prin metode spectrofotometrice

Rezultatele au arătat că extractul obținut prin macerare convențională (CM) a fost caracterizat printr-un conținut total de polifenoli (TPC) de 47,63 mg GAE (echivalent acid galic)/100 mL, indicând prezența unor cantități semnificative de compuși fenolici.

În comparație, extractul obținut prin macerare asistată cu ultrasunete (UAE+CM) a prezentat un conținut de polifenoli de 48,14 mg GAE/100 mL, reprezentând o ușoară creștere de 3,23% față de extractul CM. Astfel, ambele extracte au prezentat valori similare, această diferență relativ mică

sugerând că ambele metode de extracție sunt eficiente în obținerea unui conținut semnificativ de polifenoli din frunzele de *Allium ursinum*.

În ceea ce privește conținutul total de flavonoide, analiza a relevat că cele două extracte de *A. ursinum* obținute prin macerare convențională (MC) și macerare asistată cu ultrasunete (UAE+CM) prezintă valori similare. Extractul obținut prin macerare convențională are un conținut de 4,68 mg QE (echivalenți de quercetină)/mL, în timp ce cel obținut prin UAE+CM este cu 1,92% mai mare, cu o valoare de 4,59 mg QE/mL (Fig. 2).

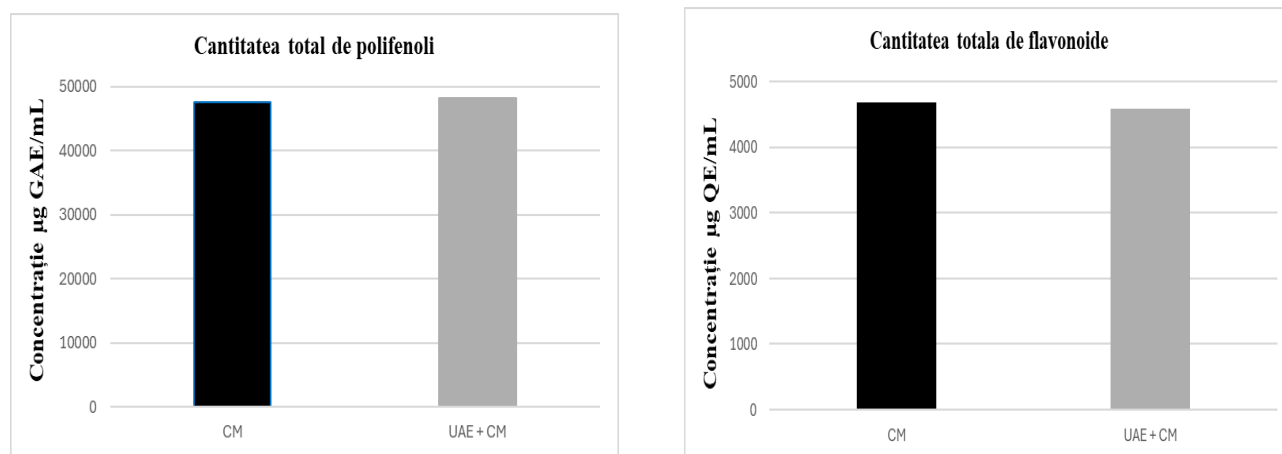


Fig. 2. Cantitatea totală de polifenoli și flavonoide în extractele obținute din frunzele de *A. ursinum*, conform metodelor spectrofotometrice. Rezultatele sunt exprimate în µg echivalenți acid galic (GAE) /mL extract, respectiv µg echivalenți quercetină /mL extract.

2.2. Identificarea și cuantificarea compușilor fenolici și a sulfoxizilor prin LC/ESI-MS

Analiza cromatografică a relevat prezența a șapte vârfuri majore în spectrele obținute, dintre care șase au fost atribuite flavonoidelor, iar un vârf corespunde sulfoxidului aliinei (vârful 1), un compus bioactiv specific genului *Allium* (Tabelul 2).

Acest studiu a constatat că ambele extracte, obținute prin macerare convențională (CM) și macerare asistată cu ultrasunete (UAE+CM), conțin cantități notabile de aliină, care a fost compusul major identificat în categoria sulfoxidului. În plus, concentrația de aliină a fost puțin mai mare în extractele obținute prin metoda UAE+CM comparativ cu metoda tradițională.

Cei șase flavonoli prezenți în extracte au fost identificați ca kaempferol-glucosil-glucosil-ramnozidă (vârful 2), kaempferol-diglucozidă (vârful 3), kaempferol-galactosil-ramnozida (vârful 4), kaempferol-rutinozida (vârful 5), quercetin-rutinozida) și (punctul 7-glucozid). În special, derivatul de quercetină, rutina, a fost găsit în cantități semnificative în ambele extracte analizate.

Cantitatea totală de compuși fenolici determinată în extractul obținut prin macerare convențională (CM) a fost de 12,539 mg/mL. Kaempferol-glucosil-glucosil-ramnozida a fost componenta majoră, reprezentând 29,49% din totalul compușilor identificați, urmat de kaempferol-rutinozida, care a reprezentat 17,75%. În plus, compusul sulfoxid aliina a fost

identificat ca un constituent semnificativ, cuprinzând 26,05% din totalul compușilor prezenți în extractul CM.

Pentru extractul UAE, rezultatele au arătat o compoziție similară atât în ceea ce privește diversitatea, cât și proporția de compuși individuali. Cu toate acestea, utilizarea UAE ca pas suplimentar în procesul de extracție a dus la o creștere generală de aproximativ 20% a concentrațiilor ambelor categorii principale, flavonoli și aliina. Această creștere a fost observată în mod constant în toate categoriile de compuși analizate.

Tabel 2. Identificarea și cuantificarea compusilor fenolici din extractele metanolice obținute din frunzele de *Allium ursinum*. Rt – timpul de retenție; UV $\lambda_{\max}$ – lungimea de undă cu absorbanță maximă; [M+H]⁺- ioni moleculari protonați. Cantitate exprimată în mg/ml.

Nr. vârf	R _t (min)	UV $\lambda_{\max}$ (nm)	[M+H] ⁺ (m/z)	Compuși fenolici	Subclasă	Leurdă CM	Leurdă UAE
1	2.91	230	178	Aliina	Sulfoxid	4.641	5.575
2	11.38	260, 350	757, 611, 449, 287	Kaempferol- glucozil- glucozil- ramnozid	Flavonol	5.068	5.967
3	12.65	260, 351	611, 449, 287	Kaempferol- diglucozid	Flavonol	1.759	2.259
4	14.65	261, 350	595, 287	Kaempferol- galactzil- raamnozid	Flavonol	0.925	1.120
5	15.56	261, 350	595, 287	Kaempferol- rutinozid	Flavonol	3.050	3.450
6	16.05	250, 350	611, 303	Quercetin- rutinozid	Flavonol	1.248	1.572
7	17.15	260, 351	449, 287	Kaempferol- glucozid	Flavonol	0.489	0.620
Total compuși						17.181	20.563

3. Activitatea antioxidantă a extractelor

Folosind metoda CUPRAC, extractul UAE a arătat o activitate antioxidantă de 87,07 μM Trolox/mL. Totuși, diferența față de extractul obținut prin macerare convențională (CM), care a avut o valoare de 85,68 μM Trolox/mL, nu a fost considerată semnificativă (Fig. 3).

Pe de altă parte, utilizarea metodei HPS pentru a determina capacitatea de captare a peroxidului de hidrogen a relevat diferențe mai pronunțate între cele două tipuri de extracte. Extractul UAE a prezentat o capacitate antioxidantă de 37,71 μM Trolox/mL, semnificativ mai mare decât cea de 22,82 μM Trolox/mL înregistrată pentru extractul obținut prin CM (Fig. 3).

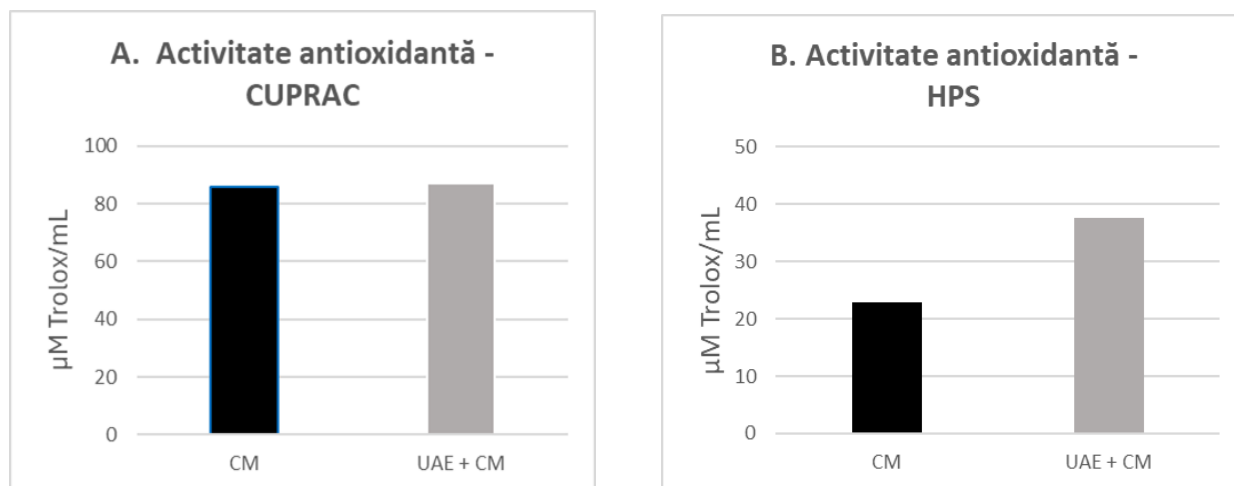


Fig. 3. Activitatea antioxidantă a extractelor obținute din frunzele de *A. ursinum*, conform: **A.** metodei CUPRAC **B.** metodei HPS.

Conform informațiilor disponibile, aceasta este prima dată când capacitatea antioxidantă a extractelor metanolice de *A. ursinum* a fost măsurată folosind metoda de captare a peroxidului de hidrogen.

4. Activitatea antibacteriană a extractelor vegetale

Activitatea antimicrobiană a extractelor de *A. ursinum* a fost evaluată în raport cu cinci tulpini bacteriene deosebit de relevante din punct de vedere clinic: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* și *Escherichia coli*. Evaluarea a fost realizată utilizând metoda difuziei pe discuri.

Rezultatele au arătat că ambele tipuri de extracte de *A. ursinum* au demonstrat activitate antibacteriană semnificativă împotriva tuturor tulpinilor bacteriene testate, în comparație cu solvenții vehicul, care nu au arătat niciun efect antimicrobian. Valorile detaliate ale zonelor de inhibiție pentru fiecare extract și combinație de microorganisme sunt rezumate în Tabelul 3.

Table 3. Activitatea antimicrobiană a extractelor din frunze de *Allium ursinum* obținute prin macerare convențională (CM) și extracție asistată de ultrasunete (UAE) asupra microorganismelor patogene Gram+ și Gram–

Activitate antibacterială	Extracte								Controale					
	MET CM		DMSO		MET UAE		DMSO		MET		DMSO		Gentamicină	
	(1)		CM (2)		(3)		UAE (4)		(M)		(D)			
	DIZ (mm)	PI	DIZ (mm)	PI	DIZ (mm)	PI	DIZ (mm)	PI	DIZ (mm)	PI	DIZ (mm)	PI	DIZ (mm)	PI
Gram-pozitive														
<i>Staphylococcus aureus</i>	10.0	++	10.0	++	11.9	++	12.0	++	0	--	0	--	20	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	8.5	+-	11.0	++	8.5	+-	12.1	++	0	--	0	--	17.8	++
<i>Streptococcus mutans</i>	11.9	++	12.0	++	11.5	++	12.5	++	0	--	0	--	18.2	++
Gram-negative														
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	12.9	++	12.0	++	15.1	++	10.5	++	0	--	0	--	14.5	++
<i>Escherichia coli</i>	8.0	+-	17.1	++	8.5	+-	15.0	++	0	--	0	--	18.5	++

MET—metanol 70% (solvent); DMSO—dimetil sulfoxid 100% (solvent); DIZ—diametru de inhibiție; PI—potențial de inhibiție.

Un aspect deosebit de important al studiului nostru este faptul că, potrivit cunoștințelor de care dispunem, aceasta reprezintă prima evaluare a activității antibacteriene a extractelor de *A. ursinum* împotriva tulpinilor *S. mutans* și *P. gingivalis*, organisme bacteriene adesea implicate în infecțiile orale și gingivale.

În concluzie, rezultatele obținute în cadrul acestui studiu subliniază faptul că activitatea antimicrobiană a extractelor de leurdă a fost cea mai puternică împotriva bacteriilor Gram-negative, în special *Escherichia coli* și *Porphyromonas gingivalis*, pentru care s-au obținut zone de inhibiție semnificative (17,1 mm, respectiv 15,1 mm). Aceste valori indică o eficiență comparabilă cu cea a gentamicinei, un agent de referință în testele de control pozitiv. Importanța solventului și a metodei de extracție s-a dovedit a fi esențială în obținerea activității antimicrobiene optime. Astfel, utilizarea DMSO ca solvent sau aplicarea metodei UAE, care a demonstrat o capacitate mai mare de extragere a compușilor bioactivi din plantă, a condus la o creștere semnificativă a eficienței antimicrobiene, în special împotriva *E. coli*. De asemenea, observațiile au fost similare și pentru tulpinile bacteriene Gram-pozitive, unde atât DMSO, cât și metoda UAE au fost factori determinanți în îmbunătățirea activității antimicrobiene a extractelor. Prin urmare,

extractul obținut prin UAE utilizând DMSO a prezentat cea mai puternică activitate antimicrobiană pentru toate tulpinile bacteriene testate, evidențiind potențialul acestei combinații în dezvoltarea unor tratamente antimicrobiene eficiente pe baza plantelor medicinale (Fig. 4).

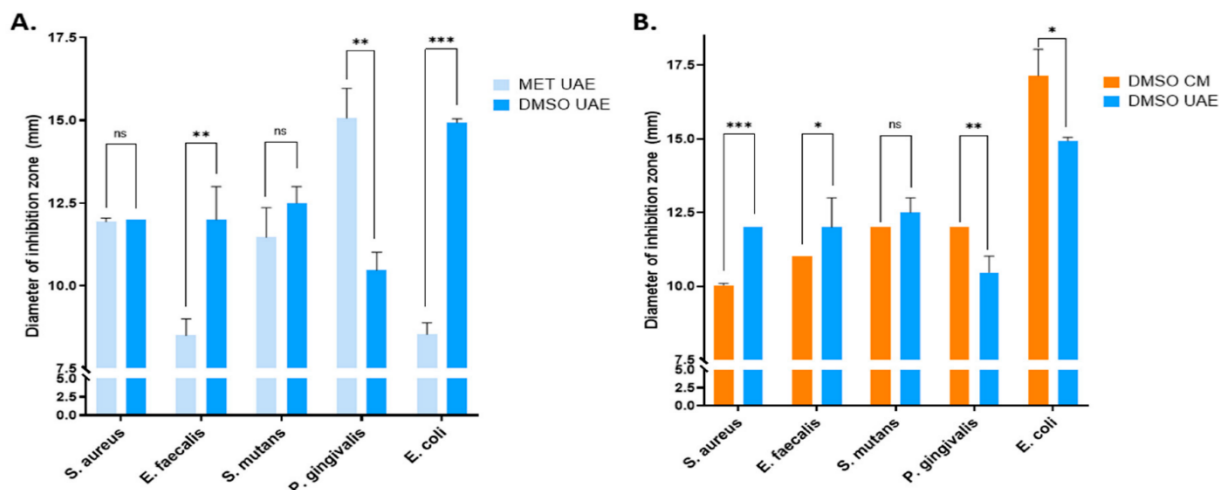


Fig 4. Activitatea antimicrobiană a extractelor din frunze de *Allium ursinum* obținute prin macerare convențională (CM) și extracție asistată de ultrasunete (UAE) asupra microorganismelor patogene Gram+ și Gram– (A). Compararea extractelor UAE în solvenți metanol 70% și DMSO, în funcție de diametrul zonei de inhibiție (DIZ), pentru toate tulpinile bacteriene. (B) Compararea extractului UAE cu extractul CM în solvent DMSO, în funcție de diametrul zonei de inhibiție (DIZ), pentru toate tulpinile bacteriene ($0.05 > p^* \geq 0.01$ semnificativ; ns, nesemnificativ).

5. Activitatea antitumorală a extractelor vegetale

Prezentul studiu și-a propus să evalueze activitatea antitumorală in vitro a extractelor de frunze de *Allium ursinum* împotriva a patru linii celulare tumorale: două linii celulare de cancer de sân (T47D și MDA-MB-231) și două linii celulare de cancer colorectal (DLD-1 și HT29). Conform literaturii disponibile, acest studiu reprezintă prima investigație documentată care testează extractele de *Allium ursinum* pe liniile celulare de cancer de sân și liniile celulare de cancer colorectal DLD-1 și HT29.

În experiment, ambele tipuri de extracte testate au demonstrat activitate antitumorală dependentă de doză, indicând o relație direct proporțională între concentrația extractului și efectul citotoxic. O reducere progresivă a viabilității celulare a fost observată pentru toate cele patru linii de celule tumorale pe măsură ce concentrația de extracte administrate a crescut (Fig. 5). Cu toate acestea, citotoxicitatea observată poate fi considerată moderată, în conformitate cu standardele farmacologice generale, deoarece nu a atins niveluri ridicate de toxicitate.

Cele mai scăzute concentrații necesare pentru a inhiba 50% din viabilitatea celulară (IC₅₀), 658,1 pg/mL și 755,8 pg/mL, au fost obținute pentru extractul CM împotriva celulelor HT29 și, respectiv, DLD-1. Pentru celelalte linii celulare, valorile IC₅₀ au depășit pragul de 1 mg/mL

(Tabelul 4). Deși extractele CM au arătat o activitate mai promițătoare împotriva liniilor de celule de cancer colorectal (HT29 și DLD-1), extractul UAE s-a dovedit a fi mai eficient împotriva liniilor de celule de cancer de sân (T47D și MDA-MB-231). Cu toate acestea, diferențele de eficacitate citotoxică dintre cele două extracte nu au fost semnificative statistic.

Table 4. Valorile IC₅₀ (μg/mL) ale extractelor de *A. ursinum* pe liniile celule T47D, MDA-MB-231, DLD-1 și HT29

IC ₅₀ ^a	Extract CM	Extract UAE
T47D	1,693 μg/mL	1,361 μg/mL
MDA-MB-231	0,9948 μg/mL	0,9454 μg/mL
DLD-1	0,7558 μg/mL	9,444 μg/mL
HT29	0,6581 μg/mL	1,092 μg/mL
^a Concentrațiile raportate de extract vegetal la care doar jumătate dintre celulele tratate mai sunt viabile		

CAPITOLUL V – Discuții

1. Analiza extractelor: randament și caracterizare fitochimică

1.1. Randamentul de extracție a extractelor de leurdă

Rezultatele au arătat o diferență semnificativă între cele două tehnici de extracție. Randamentul de extracție obținut pentru CM a fost de 41,32%, în timp ce metoda UAE+CM a dus la o rată de extracție mai mare de 45,82%. Această creștere a randamentului folosind metoda UAE+CM se aliniază cu studiile anterioare care demonstrează că încorporarea ultrasunetelor în procesele de extracție îmbunătățește eficiența și randamentul în extracția compușilor bioactivi în comparație cu metodele tradiționale (Chemat et al., 2017). Ultrasunetele afectează peretele celular al plantei, facilitând eliberarea compușilor intracelulari în solvent, maximizând astfel extracția substanțelor bioactive.

Randamentul de extracție obținut în acest studiu folosind 70% metanol depășește atât valoarea maximă de 33,50% raportată într-un studiu anterior pentru același solvent, cât și randamentul de 43,06% obținut cu apă distilată, considerat cel mai mare în studiul realizat de (Pavlović et al., 2017).

În plus, dimensiunile mai mici ale particulelor, cum ar fi cele obținute prin măcinarea materialului vegetal într-o pulbere fină, măresc suprafața disponibilă pentru interacțiunea cu solventul, facilitând difuzia compușilor din materialul vegetal în solvent, ceea ce poate duce la randamente de extracție mai mari (Meng & Cheng, 2019). Astfel, măcinarea frunzelor de *Allium ursinum* pentru a obține o pulbere fină este o etapă care poate contribui semnificativ la creșterea randamentului (Meng & Cheng, 2019).

În concluzie, studiul nostru demonstrează că utilizarea unei tehnici avansate de extracție, cum ar fi UAE, împreună cu un solvent eficient precum 70% metanol, contribuie semnificativ la creșterea randamentelor de extracție a frunzelor de *Allium ursinum*. Această metodă a permis un randament de extracție de 45,82%, superior metodelor tradiționale sau celor raportate în alte studii similare. În plus, optimizarea dimensiunii particulelor prin măcinare joacă un rol important în maximizarea eficienței extracției.

1.2. Profilul fitochimic

Profilurile de sulfoxid și polifenoli ale *Allium ursinum* variază în funcție de factori precum organul plantei, timpul de recoltare și procesare. Astfel, extractele de flori conțin mai multă alicină (1,946 mg alicină/ml) decât extractele de frunze (0,028 mg alicină/ml) (Pârvu, 2011) și cea mai mare cantitate de aliină a fost observată în extractele de frunze care au fost recoltate între martie și aprilie (Schmitt et al., 2005). De asemenea, frunzele uscate de usturoi sălbatic conțin 0,7–1,7% aliină, în timp ce frunzele proaspete de usturoi sălbatic conțin cantități mai mici, cuprinse

între 0,25 și 1,15% (Bagiu și colab., 2012). În conformitate cu aceste date, în acest studiu au fost observate cantități semnificative de aliină în ambele tipuri de extracte analizate, obținute din frunzele de *A. ursinum* recoltate în aprilie și uscate la aer.

De asemenea, frunzele de *A. ursinum* au un conținut total de polifenoli semnificativ mai mare în comparație cu alte organe ale plantelor, cum ar fi florile sau bulbii (Kovarovič, 2019). Derivații de kaempferol au fost predominanți în frunze în comparație cu semințe și tulpini. Frunzele colectate în luna mai au prezentat cea mai mare concentrație de compuși fenolici, ajungând la 128 mg/100 g FW (Mahmutovic și colab., 2009). Un studiu a arătat că în extractul etanolic din frunze de usturoi sălbatic obținut prin macerare la temperatura camerei timp de 12 ore, cantitatea de polifenoli exprimată în echivalenți de acid galic a fost mai mare decât cea obținută prin extracția asistată cu ultrasunete. În schimb, într-un alt studiu, extracția asistată cu ultrasunete s-a dovedit a fi mai eficientă în maximizarea extracției polifenolilor din *A. ursinum* (Gitin și colab., 2012; Tomšik și colab., 2016).

În studiul de față, conținutul total de polifenoli (TPC) și conținutul de flavonoide (TFC) au fost similare pentru ambele tipuri de extracte investigate. În studiul nostru, diferențele dintre cele două metode de extracție sunt minore și ar putea indica o eficiență similară în extracția polifenolilor (Gitin et al., 2012). Cu toate acestea, este important de luat în considerare că aceste metode de cuantificare sunt încă destul de rudimentare.

În studiul de față, utilizarea metanolului 70% a dus la un conținut total de polifenoli (TPC) comparabil cu valorile raportate în literatură, ceea ce poate indica faptul că un conținut mai scăzut de metanol nu compromite semnificativ extracția globală a polifenolilor. Diferențele dintre valorile obținute în acest studiu și cele raportate anterior ar putea fi atribuite mai multor factori, precum metoda de extracție utilizată, originea materialului vegetal, perioada de recoltare, sau condițiile de mediu care pot influența compoziția fitochimică a usturoiului sălbatic.

Identificarea tentativă a celor șase flavonoli principali a confirmat prezența derivaților de kaempferol și quercetină, în acord cu literatura specifică. Mai mult, analiza fitochimică a relevat că cei mai importanți compuși fenolici detectați în extractele noastre sunt glicozidele de kaempferol, care susțin rezultatele studiilor anterioare (Burton et al., 2023; Furdak et al., 2023; Oszmianański et al., 2013).

2. Extractele de *A. ursinum* și potențialul lor terapeutic

2.1. Activitatea antioxidantă a extractelor

Cea mai mare activitate antioxidantă a fost observată la frunze, în timp ce cea mai scăzută a fost înregistrată la bulbi, cu valori de 83,7 $\mu\text{mol Trolox/g}$ pentru frunze și 33,9 $\mu\text{mol Trolox/g}$ pentru bulbi (Lachowicz et al., 2018). Aceste constatări sunt susținute de cercetarea lui Voća și colab. (2022), care au raportat că activitatea antioxidantă a usturoiului sălbatic este cu până la 28% mai mare înainte de înflorire decât în timpul înfloririi, sugerând niveluri mai mari de compuși bioactivi înainte de această etapă (Voća et al., 2022). Petkova și colab. (2021) au demonstrat că metoda UAE aplicată florilor de *A. ursinum* a avut ca rezultat o activitate antioxidantă ridicată conform testului CUPRAC, demonstrând influența semnificativă a tehnicilor de extracție asupra randamentului compușilor bioactivi.

Studiul de față a arătat un conținut mai mare de polifenoli în extractul obținut de UAE comparativ cu cel obținut prin macerare convențională (CM), sugerând că extracția asistată cu ultrasunete poate îmbunătăți extracția compușilor cu potențial antioxidant. Determinările efectuate folosind metodele CUPRAC și HPS au indicat un potențial antioxidant mai mare pentru extractele obținute de UAE, confirmând în continuare datele din literatură care sugerează că metodele de extracție pot influența semnificativ activitatea antioxidantă a extractelor de *A. ursinum*.

2.2. Activitatea antimicrobiană a extractelor

Numeroase studii au demonstrat activitatea antimicrobiană a extractelor de *Allium ursinum* împotriva diversilor agenți patogeni; cu toate acestea, eficacitatea lor variază semnificativ de la un studiu la altul, în funcție de solventul și metoda de extracție utilizate, de organele plantelor selectate și de caracteristicile agenților patogeni incluși în experimente.

Extractul metanolic a demonstrat o eficacitate mai mare, inhibând creșterea bacteriilor precum *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* și *Salmonella enteritidis*, precum și a ciupercilor, inclusiv *Candida lipolytica* și *Aspergillus niger* (Sobolewska et al., 2015).

Extractele etanolicе din frunze și flori de *A. ursinum* au prezentat o eficacitate ridicată împotriva ciupercilor, cum ar fi *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Botrytis paeoniae*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium gladioli* și *Sclerotinia sclerotiorum*. Rezultatele au indicat că extractele de flori au prezentat o activitate antifungică mai mare, probabil datorită conținutului lor mai mare de alicină (Pârvu, 2011).

În acest studiu, cele mai puternice efecte antimicrobiene au fost observate împotriva bacteriilor Gram-negative, în special *E. coli* și *P. gingivalis*, extractele prezentând activitate antimicrobiană comparabilă cu cea a gentamicinei, care a fost folosită ca martor pozitiv.

Rezultatele noastre par să contrazică rapoartele anterioare, care sugerează că extractele de *A. ursinum* sunt mai eficiente împotriva bacteriilor Gram-pozitive decât împotriva celor Gram-

negative și că tulpinile de *E. coli* sunt mai puțin sensibile decât *E. faecalis* (Stupar și colab., 2022) sau *S. aureus* (Barbu și colab., 2023; Ivanovapic și colab., 2023; Krivopic et al. 2022). Este important de menționat că niciunul dintre aceste studii nu a folosit extracția asistată cu ultrasunete (UAE) sau DMSO ca solvent final, ambele putând influența puternic rezultatele.

Când 70% metanol a fost folosit ca solvent în macerarea convențională, rezultatele noastre au indicat că extractul de *A. ursinum* a prezentat cea mai scăzută activitate antimicrobiană împotriva *E. coli* (DIZ = 8,0) în comparație cu toate tulpinile bacteriene Gram-pozitive, așa cum era de așteptat. Cu toate acestea, utilizarea DMSO, cunoscut pentru proprietățile sale excelente de solvent pentru compușii bio-organici la concentrații mari (Modrzyński et al., 2019) sau aplicarea metodei UAE, despre care s-a demonstrat în acest studiu că extrage cantități mai mari de compuși bioactivi, au îmbunătățit semnificativ activitatea antimicrobiană a extractului împotriva *E. coli*.

O tendință similară a fost observată pentru toate tulpinile bacteriene Gram-pozitive utilizate în acest studiu: atât extracția cu DMSO, cât și UAE au crescut semnificativ activitatea antimicrobiană a extractelor. În consecință, pentru toate tulpinile bacteriene testate, extractul obținut prin UAE folosind DMSO a prezentat cea mai puternică activitate antimicrobiană.

Compoziția biochimică a extractelor explică activitatea lor antimicrobiană înregistrată, deoarece diferiți tiosulfinați și compuși polifenolici sunt bine cunoscuți pentru capacitatea lor de a conferi activitate antimicrobiană speciilor *Allium* (El-Saber Batiha et al., 2020; Stupar et al., 2022).

2.3. Activitatea antitumorală a extractelor

Extractele de *Allium ursinum* au arătat efecte anticancer *in vitro* notabile asupra mai multor linii celulare, inclusiv melanomul murin (B16), sarcomul murin (XC) și cancerul gastric uman (AGS).

Atât cancerele de sân, cât și cele colorectale utilizate în acest studiu sunt influențate semnificativ de factorii dietetici, sugerând că anumite alimente pot juca un rol important în prevenirea lor (Buja și colab., 2020; Hou și colab., 2013). În plus, compușii derivați din plante au fost propuși ca terapii complementare valoroase în tratamentul acestor tipuri de cancer (Rejchová și colab., 2018; Y. Zhang și colab., 2020). Cu toate acestea, eterogenitatea ridicată a tumorilor, atât între diferitele tipuri de cancer, cât și în cadrul aceluiași tip, duce la variații considerabile în sensibilitatea celulelor canceroase la compușii naturali. În acest context, studiul de față reprezintă prima investigație de testare a extractelor de *A. ursinum* pe linii celulare de cancer de sân, precum și pe liniile celulare de cancer colorectal DLD-1 și HT29.

Deși a fost observată o scădere dependentă de doză a viabilității celulare pentru ambele tipuri de extract, CM și UAE, în toate cele patru linii de celule canceroase, citotoxicitatea acestor

extracte rămâne relativ moderată atunci când este analizată din perspectiva standardelor farmacologice generale.

Concluzii generale și perspective de cercetare

Cele două extracte metanolice obținute din frunzele de *A. ursinum* prin macerare convențională și extracție asistată cu ultrasunete au fost bogate în polifenoli și sulfoxizi.

Extracția asistată cu ultrasunete (UAE) a fost mai eficientă decât macerarea convențională, producând cu 20% mai mulți compuși bioactivi. Analiza LC/ESI+-MS a identificat șase flavonoide și un sulfoxid, constituenții principali fiind derivații de kaempferol, rutina și aliina - compuși cunoscuți pentru proprietățile lor biologice active. Descoperirile studiului susțin datele existente din literatură, confirmând că frunzele de *A. ursinum* sunt o sursă importantă de compuși bioactivi.

În ceea ce privește potențialul terapeutic al *A. ursinum*, extractele prezintă activitate antioxidantă și antibacteriană puternică, dar activitate antitumorală moderată. Ambele extracte au demonstrat activitate antimicrobiană împotriva tulpinilor bacteriene Gram-pozitive *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 și Gram-negative *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 și *Escherichia coli* ATCC 25922.. Activitatea antimicrobiană, deosebit de notabilă împotriva bacteriilor Gram-negative, subliniază importanța acestei plante în gestionarea infecțiilor bacteriene. Rezultatele au indicat citotoxicitate moderată, dependentă de doză pentru ambele tipuri de extract analizate (CM și UAE). Deși nu au existat diferențe semnificative statistice între cele două tipuri de extracte, a fost observată o tendință în care extractul CM a apărut mai eficient împotriva cancerului colorectal, în timp ce extractul din UAE a prezentat o activitate citotoxică mai puternică împotriva cancerului de sân. Această variabilitate în răspunsul celular evidențiază influența eterogenității tumorii asupra eficacității compușilor naturali.

Originalitatea acestui studiu constă în investigarea pentru prima dată a capacității antioxidante a extractelor de *A. ursinum* folosind peroxid de hidrogen (H_2O_2) activitate de capturare. Mai mult, acesta este primul studiu care evaluează extractele de *A. ursinum* împotriva tulpinilor de bacterii *Streptococcus mutans* și *Porphyromonas gingivalis*, precum și activitatea antitumorală pe linii de celule de cancer de sân și linii de celule de cancer colorectal DLD-1 și HT29.

Studiile viitoare ar trebui să exploreze efectele procesării termice asupra profilului său biochimic, să investigheze mecanismele moleculare și antimicrobiene implicate și să evalueze potențialul de sinergie cu diverse antibiotice. În plus, cercetările viitoare ar trebui să evalueze citotoxicitatea selectivă a extractelor de *A. ursinum* asupra celulelor tumorale față de celulele normale.

Bibliografie

1. Agunloye, O. M., Oboh, G., Ademiluyi, A. O., Ademosun, A. O., Akindahunsi, A. A., Oyagbemi, A. A., Omobowale, T. O., Ajibade, T. O., & Adedapo, A. A. (2019). Cardio-protective and antioxidant properties of caffeic acid and chlorogenic acid: Mechanistic role of angiotensin converting enzyme, cholinesterase and arginase activities in cyclosporine induced hypertensive rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 109, 450–458. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.044>
2. Ansary, J., Forbes-Hernández, T. Y., Gil, E., Cinciosi, D., Zhang, J., Elempuru-Zabaleta, M., Simal-Gandara, J., Giampieri, F., & Battino, M. (2020). Potential Health Benefit of Garlic Based on Human Intervention Studies: A Brief Overview. *Antioxidants*, 9(7), 619. <https://doi.org/10.3390/antiox9070619>
3. Bagiu, R. V., Vlaicu, B., & Butnariu, M. (2012). Chemical Composition and in Vitro Antifungal Activity Screening of the *Allium ursinum* L. (Liliaceae). *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2), 1426–1436. <https://doi.org/10.3390/ijms13021426>
4. Bălan, G. (2022). *COMPUȘI NOI CU ACȚIUNE ASUPRA MICROORGANISMELOR IZOLATE DIN ULCERE TROFICE*. Școala Doctorală în domeniul Științe medicale.
5. Barbu, I. A., Ciorîță, A., Carpa, R., Moț, A. C., Butiuc-Keul, A., & Pârnu, M. (2023). Phytochemical Characterization and Antimicrobial Activity of Several *Allium* Extracts. *Molecules*, 28(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/molecules28103980>
6. Beretta, H. V., Bannoud, F., Insani, M., Berli, F., Hirscheegger, P., Galmarini, C. R., & Cavagnaro, P. F. (2017). Relationships Between Bioactive Compound Content and^[1]the Antiplatelet and Antioxidant Activities of Six *Allium* Vegetable Species. *Food Technology and Biotechnology*, 55(2), 266–275. <https://doi.org/10.17113/ftb.55.02.17.4722>
7. Błażewicz-Woźniak, M., & Michowska, A. (2011). The growth, flowering and chemical composition of leaves of three ecotypes of *Allium ursinum* L. *Acta Agrobotanica*, 64(4), Article 4. <https://doi.org/10.5586/aa.2011.058>
8. Buja, A., Pierbon, M., Lago, L., Grotto, G., & Baldo, V. (2020). Breast Cancer Primary Prevention and Diet: An Umbrella Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/ijerph17134731>
9. Burton, G. P., Prescott, T. A. K., Fang, R., & Lee, M. A. (2023). Regional variation in the antibacterial activity of a wild plant, wild garlic (*Allium ursinum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 202, 107959. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107959>
10. Capasso, A. (2013). Antioxidant action and therapeutic efficacy of *Allium sativum* L. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(1), 690–700. <https://doi.org/10.3390/molecules18010690>
11. Carpa, R., Drăgan-Bularda, M., & Muntean, V. (2014). *Microbiologie generală: Lucrări practice*. Presa Universitară Clujeană.
12. Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
13. Chen, S., Shen, X., Cheng, S., Li, P., Du, J., Chang, Y., & Meng, H. (2013). Evaluation of Garlic Cultivars for Polyphenolic Content and Antioxidant Properties. *PLoS ONE*, 8(11), e79730. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079730>
14. Chihara, T., Shimpo, K., Kaneko, T., Beppu, H., Mizutani, K., Higashiguchi, T., & Sonoda, S. (2010). Inhibition of 1, 2-dimethylhydrazine-induced mucin-depleted foci and O⁶-methylguanine DNA adducts in the rat colorectum by boiled garlic powder. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 11(5), 1301–1304.
15. Clapham, A. R., Tutin, T. G., & Moore, D. M. (1990). *Flora of the British Isles*. CUP Archive.

16. Corzo-Martínez, M., Corzo, N., & Villamiel, M. (2007). Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology*, 18(12), 609–625.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.07.011>
17. D. Catarino, M., M. Alves-Silva, J., R. Pereira, O., & M. Cardoso, S. (2015). Antioxidant Capacities of Flavones and Benefits in Oxidative-Stress Related Diseases. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15(2), 105–119.
18. Daka, D. (2011). Antibacterial effect of garlic (*Allium sativum*) on *Staphylococcus aureus*: An in vitro study. *African Journal of Biotechnology*, 10(4), Article 4.
19. Darband, S. G., Kaviani, M., Yousefi, B., Sadighparvar, S., Pakdel, F. G., Attari, J. A., Mohebbi, I., Naderi, S., & Majidinia, M. (2018). Quercetin: A functional dietary flavonoid with potential chemo-preventive properties in colorectal cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 6544–6560. <https://doi.org/10.1002/jcp.26595>
20. Deepika, & Maurya, P. K. (2022). Health Benefits of Quercetin in Age-Related Diseases. *Molecules*, 27(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/molecules27082498>
21. Dłudla, P. V., Nkambule, B. B., Jack, B., Mkandla, Z., Mutize, T., Silvestri, S., Orlando, P., Tiano, L., Louw, J., & Mazibuko-Mbeje, S. E. (2019). Inflammation and Oxidative Stress in an Obese State and the Protective Effects of Gallic Acid. *Nutrients*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/nu11010023>
22. Eidi, A., Eidi, M., & Esmaeili, E. (2006). Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 13(9–10), 624–629.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2005.09.010>
23. El-Saber Batiha, G., Magdy Beshbishy, A., G. Wasef, L., Elewa, Y. H. A., A. Al-Sagan, A., Abd El-Hack, M. E., Taha, A. E., M. Abd-Elhakim, Y., & Prasad Devkota, H. (2020). Chemical Constituents and Pharmacological Activities of Garlic (*Allium sativum* L.): A Review. *Nutrients*, 12(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/nu12030872>
24. Feinleib, M. (2001). A Dictionary of Epidemiology, Fourth Edition—Edited by John M. Last, Robert A. Spasoff, and Susan S. Harris. *American Journal of Epidemiology*, 154(1), 93–94. <https://doi.org/10.1093/aje/154.1.93-a>
25. Fenwick, G. R., & Hanley, A. B. (1985). The genus *Allium*—Part 1. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 22(3), 199–271.
<https://doi.org/10.1080/10408398509527415>
26. Fernández-Palanca, P., Fondevila, F., Méndez-Blanco, C., Tuñón, M. J., González-Gallego, J., & Mauriz, J. L. (2019). Antitumor Effects of Quercetin in Hepatocarcinoma In Vitro and In Vivo Models: A Systematic Review. *Nutrients*, 11(12), Article 12.
<https://doi.org/10.3390/nu11122875>
27. Furdak, P., Pieńkowska, N., Kapusta, I., Bartosz, G., & Sadowska-Bartos, I. (2023). Comparison of Antioxidant and Antiproliferative Effects of Various Forms of Garlic and Ramsons. *Molecules*, 28(18), Article 18. <https://doi.org/10.3390/molecules28186512>
28. Gao, X., Wang, B., Wei, X., Men, K., Zheng, F., Zhou, Y., Zheng, Y., Gou, M., Huang, M., Guo, G., Huang, N., Qian, Z., & Wei, Y. (2012). Anticancer effect and mechanism of polymer micelle-encapsulated quercetin on ovarian cancer. *Nanoscale*, 4(22), 7021–7030.
<https://doi.org/10.1039/C2NR32181E>
29. Giovannucci, E. (2001). An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 10(7), 725–731.
30. Gitin, L., Dinica, R.-M., & Parnavel, R. (2012). The Influence of Extraction Method on the Apparent Content of Bioactive Compounds in Romanian *Allium* spp. Leaves. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40, 93–97.
<https://doi.org/10.15835/nbha4017212>

31. Gong, J., Zhou, S., & Yang, S. (2019). Vanillic Acid Suppresses HIF-1 α Expression via Inhibition of mTOR/p70S6K/4E-BP1 and Raf/MEK/ERK Pathways in Human Colon Cancer HCT116 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/ijms20030465>
32. Goodarzi, E., Beiranvand, R., Naemi, H., Momenabadi, V., & Khazaei, Z. (2019). Worldwide incidence and mortality of colorectal cancer and human development index (HDI): An ecological study. *World Cancer Research Journal*, 6(November 2019). https://doi.org/10.32113/wcrj_201911_1433
33. Hagggar, F., & Boushey, R. (2009). Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, 22, 191–197. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1242458>
34. Harris, J. C., Cottrell, S. L., Plummer, S., & Lloyd, D. (2001). Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(3), 282–286. <https://doi.org/10.1007/s002530100722>
35. Higuchi, O., Tateshita, K., & Nishimura, H. (2003). Antioxidative activity of sulfur-containing compounds in *Allium* species for human low-density lipoprotein (LDL) oxidation in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(24), 7208–7214. <https://doi.org/10.1021/jf034294u>
36. Hiyasat, B., Sabha, D., Grotzinger, K., Kempfert, J., Rauwald, J.-W., Mohr, F.-W., & Dhein, S. (2009). Antiplatelet activity of *Allium ursinum* and *Allium sativum*. *Pharmacology*, 83(4), 197–204. <https://doi.org/10.1159/000196811>
37. Hou, N., Huo, D., & Dignam, J. J. (2013). Prevention of colorectal cancer and dietary management. *Chinese Clinical Oncology*, 2(2), Article 2. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3865.2013.04.03>
38. Ivanov, M., Novović, K., Malešević, M., Dinić, M., Stojković, D., Jovčić, B., & Soković, M. (2022). Polyphenols as Inhibitors of Antibiotic Resistant Bacteria—Mechanisms Underlying Rutin Interference with Bacterial Virulence. *Pharmaceuticals*, 15(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/ph15030385>
39. Ivanova, A., Mikhova, B., Najdenski, H., Tsvetkova, I., & Kostova, I. (2009). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Wild Garlic *Allium ursinum* of Bulgarian Origin. *Natural Product Communications*, 4(8), 1934578X0900400808. <https://doi.org/10.1177/1934578X0900400808>
40. Jabbes, N., Arnault, I., Auger, J., Al Mohandes Dridi, B., & Hannachi, C. (2012). Agromorphological markers and organo-sulphur compounds to assess diversity in Tunisian garlic landraces. *Scientia Horticulturae*, 148, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.08.013>
41. Jain, I., Jain, P., Bisht, D., Sharma, A., Srivastava, B., & Gupta, N. (2015). Use of traditional Indian plants in the inhibition of caries-causing bacteria—*Streptococcus mutans*. *Brazilian Dental Journal*, 26(2), 110–115. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201300102>
42. Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., & Amini-Khoei, H. (2017). Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.15171/jhp.2018.01>
43. Jandl, R., Kopeszki, H., & Glatzel, G. (1997). Effect of a dense *Allium ursinum* (L.) ground cover on nutrient dynamics and mesofauna of a *Fagus sylvatica* (L.) woodland. *Plant and Soil*, 189(2), 245–255. <https://doi.org/10.1023/A:1004223011834>
44. Jiang, N., Doseff, A. I., & Grotewold, E. (2016). Flavones: From Biosynthesis to Health Benefits. *Plants (Basel, Switzerland)*, 5(2), 27. <https://doi.org/10.3390/plants5020027>
45. Khanum, F., Anilakumar, K. R., & Viswanathan, K. R. (2004). Anticarcinogenic properties of garlic: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(6), 479–488. <https://doi.org/10.1080/10408690490886700>

46. Kisling, L. A., & Das, J. M. (2025). Prevention Strategies. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537222/>
47. Kovarović, J. (2019). EVALUATION AND COMPARISON OF TOTAL POLYPHENOLS CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF WILD GARLIC (*ALLIUM URSINUM* L.) IN SELECTED MORPHOLOGICAL PARTS. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(Special issue), Article Special issue. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019.9.special.492-495>
48. Kraemer, S. A., Ramachandran, A., & Perron, G. G. (2019). Antibiotic Pollution in the Environment: From Microbial Ecology to Public Policy. *Microorganisms*, 7(6), 180. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060180>
49. Krivokapic, M., Bradic, J., Petkovic, A., & Popovic, M. (2022). Phytochemical and Pharmacological Properties of *Allium Ursinum*. *Experimental and Applied Biomedical Research (EABR)*, 22(4), 357–362. <https://doi.org/10.2478/sjecr-2018-0003>
50. Kumar, M., & Berwal, J. S. (1998). Sensitivity of food pathogens to garlic (*Allium sativum*). *Journal of Applied Microbiology*, 84(2), 213–215. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00327.x>
51. Lachowicz, S., Kolniak-Ostek, J., Oszmiański, J., & Wiśniewski, R. (2017). Comparison of Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Bear Garlic (*Allium ursinum* L.) in Different Maturity Stages. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1), e12921. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12921>
52. Lachowicz, S., Oszmiański, J., & Wiśniewski, R. (2018). Determination of triterpenoids, carotenoids, chlorophylls, and antioxidant capacity in *Allium ursinum* L. at different times of harvesting and anatomical parts. *European Food Research and Technology*, 244(7), 1269–1280. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3042-3>
53. Lai, K.-C., Kuo, C.-L., Ho, H.-C., Yang, J.-S., Ma, C.-Y., Lu, H.-F., Huang, H.-Y., Chueh, F.-S., Yu, C.-C., & Chung, J.-G. (2012). Diallyl sulfide, diallyl disulfide and diallyl trisulfide affect drug resistant gene expression in colo 205 human colon cancer cells in vitro and in vivo. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 19(7), 625–630. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.02.004>
54. Lanzotti, V. (2006). The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography. A*, 1112, 3–22. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.016>
55. Lanzotti, V., Scala, F., & Bonanomi, G. (2014). Compounds from *Allium* species with cytotoxic and antimicrobial activity. *Phytochemistry Reviews*, 4(13), 769–791. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9366-0>
56. Lee, D. Y., Li, H., Lim, H. J., Lee, H. J., Jeon, R., & Ryu, J.-H. (2012). Anti-Inflammatory Activity of Sulfur-Containing Compounds from Garlic. *Journal of Medicinal Food*, 15(11), 992–999. <https://doi.org/10.1089/jmf.2012.2275>
57. Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 134(12 Suppl), 3479S–3485S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.12.3479S>
58. Liu, R. H. (2013). Dietary Bioactive Compounds and Their Health Implications. *Journal of Food Science*, 78(s1). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12101>
59. Lupoae, M., Coprean, D., Dinica, R., Lupoae, P., Gurau, G., & Bahrim, G. (2013). *ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACTS OF WILD GARLIC (Allium ursinum) FROM ROMANIAN SPONTANEOUS FLORA*. 221–227.
60. Mahmutovic, O., Mujic, E., Toromanovic, J., Mustovic, F., Muradic, S., Huseinovic, S., & Sofic, E. (2009). Comparative analysis of total phenols and sulfur content in some plant organs of ramsons and two garlic species. *Planta Medica*, 75, PD43. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1234522>
61. Majeed, W., Aslam, B., Javed, I., Khaliq, T., Muhammad, F., Ali, A., & Raza, A. (2014). Breast cancer: Major risk factors and recent developments in treatment. *Asian Pacific*

- Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 15(8), 3353–3358.
<https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.8.3353>
62. Marcellinaro, R., Spoleitini, D., Grieco, M., Avella, P., Cappuccio, M., Troiano, R., Lisi, G., Garbarino, G. M., & Carlini, M. (2023). Colorectal Cancer: Current Updates and Future Perspectives. *Journal of Clinical Medicine*, 13(1), 40.
<https://doi.org/10.3390/jcm13010040>
 63. Meng, F., & Cheng, Y. (2019). Subcritical Water Extraction of Phenolic Compounds and Analysis of Inorganic Elements from *Erigeron breviscapus*. *ChemistrySelect*, 4(24), 7173–7180. <https://doi.org/10.1002/slct.201900921>
 64. Mitra, S., Das, R., Emran, T. B., Labib, R. K., Islam, F., Sharma, R., Ahmad, I., Nainu, F., Chidambaram, K., Alhumaydhi, F. A., Chandran, D., Capasso, R., & Wilairatana, P. (2022). Diallyl Disulfide: A Bioactive Garlic Compound with Anticancer Potential. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 943967. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.943967>
 65. Modrzyński, J. J., Christensen, J. H., & Brandt, K. K. (2019). Evaluation of dimethyl sulfoxide (DMSO) as a co-solvent for toxicity testing of hydrophobic organic compounds. *Ecotoxicology*, 28(9), 1136–1141. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02107-0>
 66. Motallebi, M., Bhia, M., Rajani, H. F., Bhia, I., Tabarraei, H., Mohammadkhani, N., Pereira-Silva, M., Kasaii, M. S., Nouri-Majd, S., Mueller, A.-L., Veiga, F. J. B., Paiva-Santos, A. C., & Shakibaei, M. (2022). Naringenin: A potential flavonoid phytochemical for cancer therapy. *Life Sciences*, 305, 120752. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120752>
 67. Nagini, S. (2008). Cancer chemoprevention by garlic and its organosulfur compounds—panacea or promise? *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 8(3), 313–321.
<https://doi.org/10.2174/187152008783961879>
 68. Nguyen, T. L. A., & Bhattacharya, D. (2022). Antimicrobial Activity of Quercetin: An Approach to Its Mechanistic Principle. *Molecules*, 27(8), Article 8.
<https://doi.org/10.3390/molecules27082494>
 69. Noman, Z. A., Anika, T. T., Sachi, S., Ferdous, J., Sarker, Y. A., Sabur, Md. A., Rahman, Md. T., & Sikder, M. H. (2023). Evaluation of antibacterial efficacy of garlic (*Allium sativum*) and ginger (*Zingiber officinale*) crude extract against multidrug-resistant (MDR) poultry pathogen. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 10(2), 151–156. <https://doi.org/10.5455/javar.2023.j664>
 70. Oborny, B., Botta-Dukát, Z., Rudolf, K., & Morschhauser, T. (2011). *Population ecology of Allium ursinum, a space-monopolizing clonal plant*.
<https://doi.org/10.1556/abot.53.2011.3-4.18>
 71. Omar, S. H., & Al-Wabel, N. A. (2010). Organosulfur compounds and possible mechanism of garlic in cancer. *Saudi Pharmaceutical Journal: SPJ: The Official Publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 18(1), 51–58.
<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2009.12.007>
 72. Oszmianański, J., Kolniak-Ostek, J., & Wojdyło, A. (2013). Characterization and Content of Flavonol Derivatives of *Allium ursinum* L. Plant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(1), 176–184. <https://doi.org/10.1021/jf304268e>
 73. Pandey, P., Khan, F., Alshammari, N., Saeed, A., Aqil, F., & Saeed, M. (2023). Updates on the anticancer potential of garlic organosulfur compounds and their nanoformulations: Plant therapeutics in cancer management. *Frontiers in Pharmacology*, 14.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1154034>
 74. Pârvu, A. (2011). Antifungal properties of *Allium ursinum* L. ethanol extract. *J. Med. Plants Res.*
https://www.academia.edu/61327777/Antifungal_properties_of_Allium_ursinum_L_ethanol_extract
 75. Pavlović, D. R., Veljković, M., Stojanović, N. M., Gočmanac-Ignjatović, M., Mihailov-Krstev, T., Branković, S., Sokolović, D., Marčetić, M., Radulović, N., & Radenković, M.

- (2017). Influence of different wild-garlic (*Allium ursinum*) extracts on the gastrointestinal system: Spasmolytic, antimicrobial and antioxidant properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69(9), 1208–1218. <https://doi.org/10.1111/jphp.12746>
76. Putnoky, S., Caunii, A., & Butnariu, M. (2013). Study on the stability and antioxidant effect of the *Allium ursinum* watery extract. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 21. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-21>
 77. Pyrzynska, K. (2022). Hesperidin: A Review on Extraction Methods, Stability and Biological Activities. *Nutrients*, 14(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/nu14122387>
 78. Rabinowitch, H. D., & Goldstein, R. K. (2020). *Allium* crops. In *The physiology of vegetable crops* (pp. 421–456). <https://doi.org/10.1079/9781786393777.0421>
 79. Ranjbar, R., & Alam, M. (2023). Antimicrobial Resistance Collaborators (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *Evidence-Based Nursing*, ebnurs-2022-103540. <https://doi.org/10.1136/ebnurs-2022-103540>
 80. Rankovic, M., Krivokapic, M., Bradic, J., Petkovic, A., Zivkovic, V., Sretenovic, J., Jeremic, N., Bolevich, S., Kartashova, M., Jeremic, J., Bolevich, S., Jakovljevic, V., & Tomovic, M. (2021). New Insight Into the Cardioprotective Effects of *Allium ursinum* L. Extract Against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Frontiers in Physiology*, 12, 690696. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.690696>
 81. Rejhová, A., Opattová, A., Čumová, A., Slíva, D., & Vodička, P. (2018). Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 144, 582–594. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.039>
 82. Rekowska, E., & Skupień, K. (2009). The Influence of Selected Agronomic Practices on the Yield and Chemical Composition of Winter Garlic. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 70(1), 173–182. <https://doi.org/10.2478/v10032-009-0017-8>
 83. Rodrigues, F., & Delerue-Matos, C. (Eds.). (2022). *Plant Extracts: Chemical Composition, Bioactivity and Potential Applications*. MDPI - Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/books978-3-0365-2876-2>
 84. Roshan, N., Riley, T. V., & Hammer, K. A. (2017). Antimicrobial activity of natural products against *Clostridium difficile* in vitro. *Journal of Applied Microbiology*, 123(1), 92–103. <https://doi.org/10.1111/jam.13486>
 85. Schafer, G., & H. Kaschula, C. (2014). The Immunomodulation and Anti-Inflammatory Effects of Garlic Organosulfur Compounds in Cancer Chemoprevention. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 14(2), 233–240.
 86. Schmitt, B., Schulz, H., Storsberg, J., & Keusgen, M. (2005). Chemical characterization of *Allium ursinum* L. depending on harvesting time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(18), 7288–7294. <https://doi.org/10.1021/jf0504768>
 87. Shahid, S., Shahid, W., Ihsan, A., Anjum, F., & Shahid, M. (2022). Phytochemical and Antioxidant Profiling of *Allium Sativum* Germinated under Biotic and Abiotic Stress. *Pakistan Journal of Medical and Health Sciences*, 16, 211–214. <https://doi.org/10.53350/pjmhs20221611211>
 88. Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152–178). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
 89. Sobolewska, D., Janeczko, Z., Kisiel, W., Podolak, I., Galanty, A., & Trojanowska, D. (2006). Steroidal glycosides from the underground parts of *Allium ursinum* L. and their cytostatic and antimicrobial activity. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 63(3), 219–223.
 90. Sobolewska, D., Podolak, I., & Makowska-Wąs, J. (2015). *Allium ursinum*: Botanical, phytochemical and pharmacological overview. *Phytochemistry Reviews*, 14(1), 81–97. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9334-0>

91. Stabrauskiene, J., Kopustinskiene, D. M., Lazauskas, R., & Bernatoniene, J. (2022). Naringin and Naringenin: Their Mechanisms of Action and the Potential Anticancer Activities. *Biomedicines*, 10(7), 1686. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071686>
92. Štajner, D., Milić, N., Čanadanović-Brunet, J., Kapor, A., Štajner, M., & Popović, B. M. (2006). Exploring *Allium* species as a source of potential medicinal agents. *Phytotherapy Research*, 20(7), 581–584. <https://doi.org/10.1002/ptr.1917>
93. Stanisavljević, N., Soković Bajić, S., Jovanović, Ž., Matić, I., Tolinački, M., Popović, D., Popović, N., Terzić-Vidojević, A., Golić, N., Beškoski, V., & Samardžić, J. (2020). Antioxidant and Antiproliferative Activity of *Allium ursinum* and Their Associated Microbiota During Simulated in vitro Digestion in the Presence of Food Matrix. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.601616>
94. Stefan, G., Dragoja, R., & Sandra, V. (2023). Phytochemical characterization and antioxidant potential of *Allium ursinum* L. cultivated on different soil types- a preliminary study. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 35, 904–914. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2022.v34.i11.2958>
95. Stupar, A., Šarić, L., Vidović, S., Bajić, A., Kolarov, V., & Šarić, B. (2022). Antibacterial Potential of *Allium ursinum* Extract Prepared by the Green Extraction Method. *Microorganisms*, 10(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071358>
96. Syahputra, R. A., Harahap, U., Dalimunthe, A., Nasution, M. P., & Satria, D. (2022). The Role of Flavonoids as a Cardioprotective Strategy against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: A Review. *Molecules*, 27(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/molecules27041320>
97. Tomšik, A., Pavlić, B., Vladić, J., Ramić, M., Brindza, J., & Vidović, S. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 502–511. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.11.005>
98. Tomšik, A., Šarić, L., Bertoni, S., Protti, M., Albertini, B., Mercolini, L., & Passerini, N. (2019). Encapsulations of wild garlic (*Allium ursinum* L.) extract using spray congealing technology. *Food Research International*, 119, 941–950. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.081>
99. Tsubura, A., Lai, Y.-C., Kuwata, M., Uehara, N., & Yoshizawa, K. (2011). Anticancer Effects of Garlic and Garlic-derived Compounds for Breast Cancer Control. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 11(3), 249–253. <https://doi.org/10.2174/187152011795347441>
100. Viswanathan, V., Phadatare, A. G., & Mukne, A. (2014). Antimycobacterial and Antibacterial Activity of *Allium sativum* Bulbs. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76(3), 256–261.
101. Voća, S., Šić Žlabur, J., Fabek Uher, S., Peša, M., Opačić, N., & Radman, S. (2022). Neglected Potential of Wild Garlic (*Allium ursinum* L.)—Specialized Metabolites Content and Antioxidant Capacity of Wild Populations in Relation to Location and Plant Phenophase. *Horticulturae*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8010024>
102. Vuddhakul, V., Bhoopong, P., Hayeebilan, F., & Subhadhirasakul, S. (2007). Inhibitory activity of Thai condiments on pandemic strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Microbiology*, 24(4), 413–418. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.04.010>
103. Vuković, S., Moravčević, D., Gvozdanović-Varga, J., Dojčinović, B., Vujošević, A., Pećinar, I., Kilibarda, S., & Kostić, A. Ž. (2023). Elemental Profile, General Phytochemical Composition and Bioaccumulation Abilities of Selected *Allium* Species Biofortified with Selenium under Open Field Conditions. *Plants*, 12(2), 349. <https://doi.org/10.3390/plants12020349>
104. Weisberger, A. S., & Pensky, J. (1958). Tumor inhibition by a sulfhydryl-blocking agent related to an active principle of garlic (*Allium sativum*). *Cancer Research*, 18(11), 1301–1308.

105. Wu, P.-P., Liu, K.-C., Huang, W.-W., Chueh, F.-S., Ko, Y.-C., Chiu, T.-H., Lin, J.-P., Kuo, J.-H., Yang, J.-S., & Chung, J.-G. (2011). Diallyl trisulfide (DATS) inhibits mouse colon tumor in mouse CT-26 cells allograft model in vivo. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 18(8–9), 672–676. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.01.006>
106. Xi, Y., & Xu, P. (2021). Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Translational Oncology*, 14(10), 101174. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101174>
107. Xu, X., Song, G., Yu, Y., Ma, H., Ma, L., & Jin, Y. (2013). Apoptosis and G2/M arrest induced by *Allium ursinum* (ramson) watery extract in an AGS gastric cancer cell line. *OncoTargets and Therapy*, 6(null), 779–783. <https://doi.org/10.2147/OTT.S45865>
108. Zhang, H., Wang, K., Lin, G., & Zhao, Z. (2014). Antitumor mechanisms of S-allyl mercaptocysteine for breast cancer therapy. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 270. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-270>
109. Zhang, Y., Liu, X., Ruan, J., Zhuang, X., Zhang, X., & Li, Z. (2020). Phytochemicals of garlic: Promising candidates for cancer therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 123, 109730. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109730>