

**UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY
"VICTOR BABEȘ" FROM TIMISOARA
FACULTY OF PHARMACY
DEPARTMENT I**

PETRUSE V. GRAȚIANA



ABSTRACT

PHARMACOBOTANICAL STUDIES ON *COFFEA ARABICA* AND SOME EXTRACTS FROM GREEN SEED

Scientific Coordinator
PROF. UNIV. DR. TCHIAKPE-ANTAL DIANA-SIMONA

**Timișoara
2025**

TABLE OF CONTENTS

1. INTRODUCTION.....	1
2. STATE OF THE ART.....	2
3. AIM AND OBJECTIVES	6
4. PERSONAL CONTRIBUTIONS.....	8
4.1. MICROSCOPIC AND HISTOCHEMICAL STUDY OF <i>COFFEA ARABICA</i> SPECIES	8
4.2. EXTRACTION TECHNIQUE AND PHYTOCHEMICAL SCREENING OF GREEN SEEDS OF <i>COFFEA ARABICA</i>	9
4.3. MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF <i>COFFEA ARABICA</i> EXTRACTS	11
4.4. PRELIMINARY <i>IN VITRO</i> AND <i>IN OVO</i> EXPERIMENTAL BIOLOGICAL EVALUATION OF <i>COFFEA ARABICA</i> EXTRACTS	12

PHD THESIS ABSTRACT

1. INTRODUCTION

Coffea arabica, also known as Arabica coffee, accounts for over 70% of world coffee production and is a commercially dominant species. *Coffea arabica* seeds are recognized for their content of bioactive substances such as caffeine, polyphenols, chlorogenic acids, and trigonelline. These compounds contribute to coffee's organoleptic properties and support its pharmacological benefits. Furthermore, *Coffea arabica* seeds have attracted attention for potential applications in dermato-cosmetology due to their phytochemicals. The main phytochemical classes found in *Coffea arabica* seeds include alkaloids, phenolic compounds, lipids, and proteins. These classes contain specific compounds that contribute to the bioactivity of the seeds, in particular for skin health and cosmetic applications. Between the green and roasted seeds, there are some differences in chemical composition, which further highlights the versatility of *Coffea arabica* as an active ingredient in the cosmetics industry, offering opportunities for innovative product development.

Recently, *Coffea arabica* has attracted significant attention in terms of its potential therapeutic applications in the treatment of various diseases, largely attributed to its rich profile in bioactive compounds, dating back to antiquity. The variety of bioactive compounds, such as chlorogenic acids, flavonoids, and alkaloids, in particular caffeine, are known for their antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, and antitumor properties, making *Coffea arabica* a promising candidate for medicinal use.

Following the above, the PhD thesis is part of the research theme related to the extraction, characterization, and use of extracts obtained from *Coffea arabica* green seeds in the biomedical field, especially in skin cancer therapy. The topic is highly topical, given the rich profile of phytocompounds and their potential applications. Based on the results obtained, we will scientifically contribute to the multitude of benefits of *Coffea arabica* with therapeutic potential in modern medicine.

2. STATE OF THE ART

Coffea species are shrubs that belong to the family Rubiaceae, include 124 species, and are the fourth largest family of angiosperms, and the tribe Coffeeae. Two *Coffea* species are the most economically important and are used for coffee production - *Coffea arabica* and *Coffea canephora*, also known as Robusta coffee. *Coffea arabica* L. is an allotetraploid, which means that it has four sets of chromosomes derived from two diploid ancestors, resulting from spontaneous hybridization between *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner and *Coffea eugenioides* S. Moore. This genetic complexity contributes to its unique biochemical composition, which includes a variety of bioactive compounds.

In recent years, an impressive number of studies have focused on the investigation of different parts of *Coffea arabica*, especially with potential in dermato-cosmetology (leaves, green seeds, roasted seeds, oil, bark). Some of the most representative effects of *Coffea arabica* extracts are anti-inflammatory, antibacterial and antioxidant, and anti-aging effects. For example, the oil extracted from coffee grounds has been tested as a cleansing agent in make-up removal products, thus harnessing coffee grounds as a promising renewable source for cosmetic formulations. Coffee oil is valued in the cosmetics industry as an ingredient in sunscreen, moisturizing, or emollient products. It stimulates collagen synthesis and has antioxidant and anti-inflammatory potential. In addition, topical formulations of green coffee oil lead to faster wound healing, and coffee charcoal, resulting from the carbonization of roasted coffee beans, has been reported to have an astringent effect. The anti-aging properties attributed to the phenolic compounds underline the species' potential as a valuable ingredient in the cosmetics industry, highlighting the versatility of the extracts beyond food consumption. Its versatility in cosmetic formulations is also enhanced by its pleasant aroma and sensory attributes, which can improve the user experience and product appeal.

The high antioxidant capacity of *Coffea arabica*, largely attributed to chlorogenic acid and other polyphenols, makes this species a promising candidate for further nutraceutical development. In terms of therapeutic potential, the phytochemical profile of *Coffea arabica* contributes beneficially to conditions such as type II diabetes and neurodegenerative disorders, thus

reinforcing its role in modern therapeutic regimens. Caffeine and chlorogenic acids play an important role in attenuating neurodegenerative processes, and regular coffee consumption could influence the progression of Parkinson's and Alzheimer's diseases.

Green coffee beans predominantly contain various macronutrients and bioactive compounds, with carbohydrates making up about 59-61% of their total composition. Lipids account for 11-17%, while protein accounts for 10-16%. In addition, phenolic compounds account for 6-10%, and minerals contribute about 4%. Other constituents are fatty acids (2%), caffeine (1-2%), trigononine (1%), and free amino acids, which are present in amounts of less than 1%. The roasting process (heat treatment that induces a series of chemical transformations) has been reported to induce notable changes in the composition of green coffee beans. In particular, there is a significant reduction in the level of carbohydrates, protein, and phenolic compounds. In addition, a decrease in the level of free amino acids was also recorded.

Coffea arabica seeds are a rich source of various phytochemicals that have attracted attention for their potential applications in dermato-cosmetic formulations. The main classes of phytochemicals found in *Coffea arabica* seeds include alkaloids, phenolic compounds, lipids, and proteins. Each of these classes contains specific compounds that contribute to the bioactivity of the seeds, in particular for skin health and cosmetic applications.

Applications of *Coffea arabica* in dermato-cosmetic products are on the rise, due to its phytochemical profile and its beneficial properties for skin and hair health. The unique properties of *Coffea arabica*'s natural products, including its anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant, and hair growth-stimulating properties, make it a versatile ingredient in various cosmetic formulations.

The effectiveness of *Coffea arabica* extracts in cosmetic formulations is linked to the method used to obtain them. Most extraction techniques use water or an ethanol-water mixture as the extraction solvent, isolating polar compounds such as chlorogenic acid, phenolic acids, and caffeine. Extraction methods play a key role in determining therapeutic effects, due to their significant impact on the phytochemical profile of a plant material. Therefore, optimization of extraction techniques is essential to maximize therapeutic potential; from the method of processing the plant material to the solvents

used, all affect the concentration of bioactive compounds, secondary metabolites including flavonoids and phenolic compounds, essential for future biological activities. In addition, the choice of extraction parameters (temperature and time) contributes to the production of specific phytochemical compounds, improving the functional properties of the extracts.

Lately, *Coffea arabica* has begun to attract attention in biomedical research, particularly for its potential anti-melanoma properties. Investigations have highlighted the rich phytochemical profile of *Coffea arabica*, making it a candidate for therapeutic applications against various cancers, including melanoma.

Melanoma is a malignant tumor originating from melanocytes, pigment-producing cells found mainly in the skin, but also in the eyes and other parts of the body. Worldwide, it is recognized as one of the most aggressive forms of skin cancer due to its tendency to metastasize early when not detected at an early stage. The aggressive nature of melanoma is well documented, with the disease continuing to represent a significant clinical challenge despite advances in early detection and treatment. Emerging natural approaches in the treatment of melanoma offer promising opportunities as adjuncts to conventional therapy. Natural compounds with anti-tumor properties may enhance treatment efficacy and reduce side effects. Therefore, we consider that further research is imperative both to validate preliminary results and to fully characterize the safety, efficacy, and mechanism of action of natural compounds in melanoma therapy.

Regarding *Coffea arabica* as a natural product, one of the main reasons for its potential anti-melanoma efficacy is the presence of significant bioactive compounds such as chlorogenic acids, flavonoids, and terpenes, which are abundantly present in *Coffea arabica*. These compounds have marked antioxidant properties, which play a crucial role in mitigating oxidative stress, a key factor in the progression of melanoma and other cancers. Specifically, chlorogenic acid, one of the main phenolic constituents, exhibits antioxidant and anti-inflammatory properties that have been correlated with reduced cancer cell proliferation and improved survival rates in different models. In addition, the complex interactions of these bioactive compounds contribute to their cumulative antitumor effects, warranting further exploration of their mechanisms of action.

In vitro studies have shown that *Coffea arabica* extracts can inhibit the activity of tyrosinase, a crucial enzyme in melanogenesis, which may consequently reduce the risk of melanoma development in people with high UV exposure. The antioxidant activity associated with *Coffea arabica* extracts has been linked to their ability to dismantle reactive oxygen species (ROS) that are known to induce DNA damage, a precursor of tumorigenesis. Research has shown that the extracts may promote cellular mechanisms that counteract the adverse effects of UV-induced oxidative stress, thereby increasing cell resistance against potential malignant tumors. In addition, studies have highlighted the potential of *Coffea arabica* in cosmetic formulations to improve skin health, highlighting its role in alleviating skin ageing processes that may lead to increased susceptibility to melanoma. The ability of the extract to enhance collagen and elastin production contributes positively to the structural integrity of the skin, potentially reducing the incidence of skin cancers associated with ageing and prolonged sun exposure.

Emerging interest in the use of *Coffea arabica* in topical applications suggests that its bioactive compounds may provide ancillary benefits in dermatological treatments, including those targeting malignant cells through localized therapeutic interventions. Comprehensive studies on its phytochemical composition have identified a multitude of active compounds that may synergistically contribute to its anticarcinogenic prospects, requiring further investigation through in vitro and in vivo approaches to fully elucidate these pathways.

In conclusion, *Coffea arabica* holds substantial promise as a natural ingredient in the fight against melanoma, supported by its rich phytochemical content that significantly intersects with oncologic therapeutic pathways. The potency of its extracts against oxidative stress and the potential to influence skin biology underline the importance of further research to crystallize its applications in melanoma prevention and management.

3. AIM AND OBJECTIVES

This PhD thesis aimed to delineate the complex phytochemical profile of different extracts obtained from *Coffea arabica* green seeds, using polar and non-polar solvents, and to establish a preliminary *in vitro* and *in ovo* biological screening. The doctoral thesis makes an important contribution, because six types of extracts were obtained, based on different solvents (ethanol, ethyl acetate, butanol, petroleum ether, diethyl ether and distilled water), starting from the green seeds of *Coffea arabica*, after which the extracts thus obtained (CA-EtOH; CA-EtAc; CA-BU; CA-EU; CA-EP; CA-DEE and CA-H₂O) were investigated phytochemically to establish a complex pharmacological profile, which is a mandatory aspect for future biomedical applications of these extracts.

Regarding **the novelty and originality of this PhD thesis**, we consider that the investigation of the therapeutic effects of extracts obtained from *Coffea arabica* green seeds on human melanoma cells represents the novelty and originality of this PhD thesis, because in the scientific literature, no direct experimental evidence on melanoma cell lines is explicitly provided. Although direct studies on the effect of *Coffea arabica* extracts on melanoma cells remain limited, the cumulative evidence on their reported antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor activities indicates a multifaceted impact on melanoma cell viability. Therefore, we believe that future *in vitro* and *in vivo* investigations focused on melanoma models could elucidate the precise molecular mechanisms involved, including potential induction of apoptosis, cell cycle arrest, and modulation of tumor microenvironmental factors.

Therefore, **a first objective** set to achieve the aim of the thesis was the anatomical and histochemical analysis of leaves and seeds of *Coffea arabica*, using specific dyes and reagents for plant tissues, to identify and localize the accumulation zones of the different secondary metabolites present in the plant studied.

The second objective was to prepare several natural extracts from the green seeds of *Coffea arabica* using different extraction solvents. We decided to use classical extraction methods to avoid the unnecessary production costs that a more complicated extraction method might entail. The solvents used were chosen from the literature, but also to build a scientific database for future

research directions. We focused on obtaining extracts rich in biologically active compounds to be used as raw material in pharmaceutical formulations.

The establishment of the complete phytochemical profile, involving the determination of the total polyphenol content (using the Folin-Ciocalteu method), the phytochemical composition of the biologically active compounds (by LC-MS analysis), the identification of the functional groups of the organic molecules present in each extract (by FT-IR spectroscopy), constitutes **the third objective of the PhD thesis**.

The fourth objective of the PhD thesis was to evaluate the fundamental effects underlying the overall therapeutic potential, namely the determination of the antioxidant and antimicrobial activity of six types of extracts obtained from green seeds of *Coffea arabica*.

The fifth objective of the PhD thesis was to establish a preliminary in vitro screening of the antitumor effects of *Coffea arabica* green seed extracts on human melanoma. In addition, biosafety aspects of the use of the extracts obtained on a healthy human cell line were investigated.

In order to evaluate the *in vivo* safety use of *Coffea arabica* green seed extracts, the sixth objective of the PhD thesis consisted in the application of the HET-CAM (hen embryonated egg chorioallantoic membrane test), a semi-quantitative method used to analyze the inflammatory responses of the chorioallantoic membrane of the embryonated egg (CAM), suitable for the assessment of the response to different chemical compounds. This last objective also represents **another aspect of novelty and originality**, since, to our knowledge, these extracts have not been investigated for a possible irritative effect, in particular on the chorioallantoic membrane of the embryonated hen egg.

Based on the results obtained in this doctoral thesis, we can state that, we are scientifically contributing to the multitude of benefits of *Coffea arabica*, and our future research will focus on the development of pharmaceutical formulations with therapeutic potential in modern medicine, since this natural material is very promising for the development of natural products and therapeutic agents.

4. PERSONAL CONTRIBUTIONS

4.1. MICROSCOPIC AND HISTOCHEMICAL STUDY OF *COFFEA ARABICA* SPECIES

The results of this study are presented in the PhD thesis in **Chapter 4** and refer to the investigation of the anatomical and histochemical characteristics of leaves and seeds of *Coffea arabica* species, using plant tissue-specific reagents, to determine the localization of the accumulation zones of the different secondary metabolites present in the plant.

Microscopic cross-sectional studies showed that the leaves of the coffee bush have a bifacial structure, the mesophyll being differentiated into 2 zones: palisade parenchyma and lacunar parenchyma. The leaf of the coffee plant is protected by a single-cell epidermis on both the upper and lower surfaces, covered by a thin cuticle. In the uncolored preparation of the cross-section through the leaf blade, the chloroplast-rich palisade parenchyma and the lacunar parenchyma, which is adapted for gas exchange with the surrounding environment, are visible.

As for the coffee seed, it lies inside the fruit, is green, has a hard surface, and an oval in shape. The dorsal surface is convex, the ventral surface is flattened and has a longitudinal space called hil. The interior of the coffee bean is green in color, covered by a thin silvery pellicle with a yellow to brown parchment-like coating.

Microscopic and histochemical analysis of green leaves and seeds of *Coffea arabica* revealed a differentiated distribution of secondary metabolites, correlated with functional tissue specialization. Reducing polyphenols, localized in the leaf mesophyll and cotyledons, suggests an important antioxidant role in the protection of metabolically active cells. Alkaloids, detected by the Dragendorff reagent in mesophyll and endosperm, indicate a systemic defensive function. Terpenoids, identified by the vanillin-sulphuric acid reagent in epidermis and seeds, are associated with the formation of a protective chemical barrier. These results confirm the relevance of histochemistry as an efficient method for the functional investigation of plant tissues.

4.2. EXTRACTION TECHNIQUE AND PHYTOCHEMICAL SCREENING OF GREEN SEEDS OF *COFFEA ARABICA*

Chapter 5 aimed to obtain and characterize *Coffea arabica* green seed extracts using different solvents to evaluate the extraction yield and the complex phytochemical profile. The extracts obtained were first physico-chemical characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) to identify the functional groups of the active components present in *Coffea arabica* green seed extracts. Further, their phenolic composition (using liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS)), their total phenolic content (using Folin-Ciocalteu reagent), and their antioxidant activity were determined to reveal their biological potential.

After obtaining the six types of extracts, the yield of the soluble fraction in the solvents used (petroleum ether, diethyl ether, ethyl acetate, and n-butanol) was calculated by dividing the amount of this fraction by the amount of crude extract subjected to the fractionation process. The results showed that the extraction yields varied depending on the solvent used, with the following values: 9.73% for CA-EtOH, 57.12% for CA-EP, 1.40% for CA-DEE, 8.6% for CA-EtAc, 19.35% for CA-BU, and 13.53% for CA-H₂O.

The phytochemical composition of the biologically active compounds in each extract (LC-MS analysis) showed that CA-BU and CA-EtAc extracts contained high concentrations of chlorogenic acid, exceeding 48 µg/mL. As for 4-O-caffeoylquinic acid, an important derivative of chlorogenic acid known for its antioxidant and antiviral properties, the CA-BU extract again showed the highest concentrations (7.931 µg/mL). When using ethanol as the extraction solvent (CA-EtOH), a low concentration of chlorogenic acid (below 4.6 µg/mL) was obtained, and when distilled water was used as the solvent, the main compound obtained was still chlorogenic acid (5-O-caffeoylquinic acid), followed by 4-O-caffeoylquinic acid. When diethyl ether (CA-DEE) was used, the lowest concentrations of chlorogenic acid (below 4 µg/mL) were obtained, suggesting that this solvent is not as efficient in the extraction of this specific compound. Caffeic acid, 4-O-caffeoylquinic acid, and ferulic acid were also identified qualitatively, but below the limit of quantification. Using petroleum ether as a solvent (CA-EP), no polyphenolic compounds were identified.

Following the total polyphenol content (TPC) investigation, the results showed a direct correlation between extraction efficiency and the polarity of the solvent used. Ethyl acetate was found to be the most efficient solvent (containing the highest concentration of polyphenols of 594.89 mg CAE/g), followed by CA-DEE extract with a concentration of 294.18 mg CAE/g and CA-H₂O extract with a concentration of 253.25 mg CAE/g.

The results obtained from the investigation of the functional groups of the organic molecules present in each type of extract showed that all the prepared *Coffea arabica* extracts (CA-EtOH, CA-H₂O, CA-BU, CA-EtAc, CA-EP, and CA-DEE) possess numerous functional groups attributed to polyphenols, flavonoids, alkaloids, and secondary metabolites present in the organic molecules of *Coffea arabica* green seed extracts.

The results on the antioxidant capacity of the extracts showed a DPPH free radical inhibitory potential depending on the dose of extract used and the analysis time applied. All extracts showed a moderate antioxidant potential, expressed by EC₅₀, compared to ascorbic acid used as standard, the linearity of *Coffea arabica* extracts being the following: CA-EtAc>CA-BU>CA-H₂O>CA-EtOH>CA-DEE>CA-EP. The only prepared extract whose antioxidant capacity was comparable to the standard was the CA-EtAc extract (94% vs. 97%).

We can state that the antioxidant activity of *Coffea arabica* extracts is largely attributed to their rich phenolic content, which includes compounds such as chlorogenic acid, known for its antioxidant properties. The presence of potent phenolic compounds, in particular chlorogenic acids and flavonoids, demonstrates a promising avenue for the use of these extracts in food supplements and functional food applications to reduce oxidative stress-related diseases.

4.3. MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF *COFFEA ARABICA* EXTRACTS

Chapter 6 presents the evaluation of the antimicrobial activity of *Coffea arabica* extracts on the most commonly known gram-positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, and *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615) and gram-negative (*Escherichia coli* ATCC 25922, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) and *Candida parapsilosis* ATCC 22019, bacterial strains. Thus, 6 extracts were tested, as follows: CA-EtOH; CA-EP; CA-DEE; CA-EtOAc - dissolved in DMSO; CA-BU, and CA-H₂O - dissolved in EtOH/water, at the concentration of 20 mg/mL.

The antimicrobial activities of *Coffea arabica* extracts were tested by the disk diffusion method and by determining the minimum inhibitory concentration by the dilution method, and evaluated according to the recommendations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and the Institute for Clinical Standards and Laboratories.

In terms of antimicrobial activity, the results indicated that extracts dissolved in DMSO (CA-EtOH, CA-EP, CA-DEE, CA-EtAc) and those dissolved in EtOH/water (CA-BU, CA-H₂O) generated zones of inhibition that showed variable antimicrobial activity. *Staphylococcus aureus* and *E. coli* were found to be the most sensitive strains to the bioactive compounds present in the butanolic extract, due to the relatively large zone of inhibition (12 mm) exhibited by this extract. For *Candida parapsilosis*, the antifungal activity of the extracts was weak. However, CA-EtAc, CA-BU, and CA-H₂O showed mild antifungal activity (11 mm), suggesting that these compounds may have limited antifungal potential.

Therefore, we can state that the results obtained in this study highlight the potential of *Coffea arabica* green seed extracts as antimicrobial agents, especially against Gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus*. Of the six extracts tested, the butanolic extract (CA-BU) showed the most notable antibacterial activity, generating considerable zones of inhibition, particularly against *S. aureus* and *E. coli*. In contrast, the antimicrobial activity against Gram-negative bacteria and the fungal species *Candida parapsilosis* was generally low, indicating a higher specificity of the bioactive compounds towards Gram-positive bacteria.

4.4. PRELIMINARY *IN VITRO* AND *IN OVO* EXPERIMENTAL BIOLOGICAL EVALUATION OF *COFFEA ARABICA* EXTRACTS

In **Chapter 7**, a preliminary *in vitro* study was performed to evaluate the antitumor potential of *Coffea arabica* green seed extracts on the human melanoma cell line A375 and to investigate the biosafety profile of these extracts by testing their effects on a healthy human cell line, HaCaT. Furthermore, the study aimed to assess the effects of the water-soluble fraction (CA-H₂O) from green *Coffea arabica* seeds on blood vessels in terms of angiogenesis. In addition, the study aimed to determine the potential irritant effect of the extracts on the chorioallantoic membrane.

As for *in vitro* studies, incubation of HaCaT cells for 48h with *Coffea arabica* extracts showed that the highest tested concentrations (500 and 1000 µg/mL) of each extract affected cell viability; however, except for CA-BU, the other extracts expressed viability results of over 70% at the tested high concentrations. Butanolic extract (CA-BU) decreased cell viability more aggressively compared to the other extracts, even at the lower concentrations tested.

In terms of antitumor effect, the water-soluble fraction (CA-H₂O) from green coffee beans exerted a modest but concentration-dependent cytotoxic effect on human melanoma A375 cells. As the concentration of the extract increased, the viability of tumor cells decreased, an effect accompanied by a reduction in cell number and confluency, as well as increased lactate dehydrogenase (LDH) release, indicating cell membrane damage. Thus, cell shrinkage, cell deformation, and round cells were observed, especially at a concentration of 75 µg/mL. Analysis of nuclear morphology showed clear signs of apoptosis, including the presence of apoptotic bodies and a reduction in the size of the nuclei.

The comparative evaluation of *Coffea arabica* extracts demonstrates that the potential biological activity needs to be analyzed in the context of a well-defined toxicological profile. A high polyphenol content does not automatically equate to a favorable effect in the absence of adequate cellular tolerance. CA-H₂O stands out as the most balanced extract, combining an effective concentration of polyphenols with low cytotoxicity on keratinocytes. This characteristic makes it a priority candidate for further investigation, in

particular for dermato-cosmetic or oncologic applications with topical administration. Taking into account the chlorogenic acid content of 30 µg/mL in our extract, it can be assumed that the observed effect against melanoma is due to a synergistic effect of this major compound with other phytochemicals that are also present. Their identification and a better understanding of their combined mechanism of action warrant further significant studies. Instead, extracts with obvious toxicity (CA-BU, CA-EtAc) should be excluded or reformulated to ensure compatibility with normal tissues.

The water-soluble fraction (CA-H₂O) obtained from the green seeds of *Coffea arabica* was also evaluated *in vivo* for possible effects on the angiogenesis process. We tested the extracts at a concentration of 400 µg/mL by applying 5 µL of extract inside plastic rings placed beforehand on top of the developing CAMs, starting on day 8 of incubation. We monitored the areas of application daily by stereomicroscopy, and the relevant images were recorded, allowing further investigation of the changes that occurred during treatment with *Coffea arabica* extracts.

Concerning the potential irritant effect of the aqueous extract on the chorioallantoic membrane of embryonated hen egg, the results showed a significant effect in stimulating angiogenesis. The changes observed by this extract, including after 11 days of incubation, suggest a pronounced action on neovascularization without compromising tissue integrity and without showing signs of toxicity. The absence of signs of toxicity 6 days after administration is a strong indicator of the safety of this extract, which has proven to be essential for clinical and cosmetic applications.

The data presented in the PhD thesis have been the subject of three scientific articles, with the undersigned as first author, of which 2 articles indexed by Thompson Reuters, with a cumulative impact factor of 5.7, published in the Pharmaceuticals (MDPI) and Farmacia (Romania) journals, respectively, and one article indexed by BDI and PubMed data base, published in the Medicine and Pharmacy Reports (Romania) journal.

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

PETRUSE V. GRAȚIANA



REZUMAT

**STUDII FARMACOBOTANICE ASUPRA SPECIEI
COFFEA ARABICA ȘI A UNOR EXTRACTE DIN
SEMINȚE NETOREFIATE**

Coordonator Științific
**PROF. UNIV. DR. TCHIAKPE-ANTAL DIANA-
SIMONA**

**Timișoara
2025**

CUPRINS

1. INTRODUCERE	1
2. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	2
3. SCOP ȘI OBIECTIVE	6
4. CONTRIBUȚII PERSONALE	8
4.1. STUDIUL MICROSCOPIC ȘI HISTOCHIMIC AL SPECIILOR DE <i>COFFEA ARABICA</i>	8
4.2. TEHNICĂ DE EXTRACȚIE ȘI SCREENINGUL FITOCHIMIC AL SEMINȚELOR VERZI DE <i>COFFEA ARABICA</i>	9
4.3. EVALUAREA MICROBIOLOGICĂ A EXTRACTELOR DE <i>COFFEA</i> <i>ARABICA</i>	11
4.4. EVALUAREA BIOLOGICĂ EXPERIMENTALĂ PRELIMINARĂ <i>IN</i> <i>VITRO</i> ȘI <i>IN OVO</i> A EXTRACTELOR DE <i>COFFEA ARABICA</i>	12

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

1. INTRODUCERE

Coffea arabica, cunoscută sub denumirea de cafea Arabica, reprezintă peste 70% din producția mondială de cafea, fiind o specie dominantă din punct de vedere comercial. Semințele de *Coffea arabica* sunt recunoscute pentru conținutul lor de substanțe bioactive, cum ar fi cafeina, polifenolii, acizii clorogenici, respectiv trigonelina. Acești compuși contribuie la proprietățile organoleptice ale cafelei și susțin beneficiile sale farmacologice. Mai mult, semințele de *Coffea arabica* au atras atenția privind potențialele aplicații în dermato-cosmetologie, datorită substanțelor fitochimice. Principalele clase de substanțe fitochimice găsite în semințele de *Coffea arabica* includ alcaloizi, compuși fenolici, lipide și proteine. Aceste clase conțin compuși specifici care contribuie la bioactivitatea semințelor, în special în ceea ce privește sănătatea pielii și aplicațiile cosmetice. Între semințele verzi și cele prăjite sunt câteva diferențe în ceea ce privește compoziția chimică, fapt ce evidențiază și mai mult versatilitatea *Coffea arabica* ca ingredient activ în industria cosmetică, oferind oportunități pentru dezvoltarea de produse inovatoare.

Recent, *Coffea arabica* a atras o atenție semnificativă în ceea ce privește potențialele sale aplicații terapeutice în tratamentul diferitelor boli, interes atribuit în mare parte profilului său bogat în compuși bioactivi, ce datează încă din antichitate. Varietatea de compuși bioactivi, cum ar fi acizii clorogenici, flavonoidele și alcaloizii, în special cafeina, sunt cunoscuți pentru proprietățile lor antioxidante, antiinflamatorii, antimicrobiene și antitumorale, făcând din *Coffea arabica* un candidat promițător pentru uz medicinal.

În conformitate cu cele de mai sus, teza de doctorat se înscrie în tema de cercetare legată de extracția, caracterizarea și utilizarea unor extracte obținute din semințe verzi de *Coffea arabica* în domeniul biomedical, în special în terapia cancerului de piele. Subiectul abordat este de maximă actualitate, având în vedere profilul bogat de fitocompuși și a potențialele lor aplicații. Pe baza rezultatelor obținute, vom contribui științific la multitudinea de beneficii ale *Coffea arabica*, cu potențial terapeutic în medicina modernă.

2. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Speciile *Coffea* sunt arbuști care aparțin familiei Rubiaceae, include 124 de specii și este a patra cea mai mare familie de angiosperme, și tribul Coffeeae. Două specii de *Coffea* sunt cele mai importante din punct de vedere economic și sunt utilizate pentru producția de cafea - *Coffea arabica* și *Coffea canephora*, cunoscută ca și cafea Robusta. *Coffea arabica* L. este o alotetraploidă, ceea ce înseamnă că are patru seturi de cromozomi derivate din doi strămoși diploizi, rezultate din hibridizarea spontană dintre *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner și *Coffea eugenoides* S. Moore. Această complexitate genetică contribuie la compoziția sa biochimică unică, care include o varietate de compuși bioactivi.

În ultimii ani, un număr impresionant de studii s-au focusat pe investigarea diferitelor părți din *Coffea arabica*, în special cu potențial în dermato-cosmetologie (frunze, semințe verzi, semințe prăjite, ulei, coajă). Unele dintre cele mai reprezentative efecte ale extractelor de *Coffea arabica* sunt efectele antiinflamatorii, antibacteriene, antioxidante și anti-îmbătrânire. De exemplu, uleiul extras din zațul de cafea a fost testat ca un agent de curățare în produsele de demachiere, valorificând astfel zațul de cafea ca o sursă regenerabilă promițătoare pentru formulările cosmetice. Uleiul de cafea este apreciat în industria cosmetică ca ingredient al produselor de protecție solară, hidratante sau emoliente. Acesta stimulează sinteza colagenului și are potențial antioxidant și antiinflamator. Mai mult, formulările topice de ulei de cafea verde determină o vindecare mai rapidă a rănilor, iar pentru cărbunele de cafea, rezultat din carbonizarea semințelor de cafea prăjite, a fost raportat un efect astringent. Proprietățile anti-îmbătrânire atribuite compușilor fenolici subliniază potențialul speciei ca ingredient valoros în industria cosmetică, evidențiind versatilitatea extractelor dincolo de consumul alimentar. Versatilitatea în formulările cosmetice este sporită și de aroma sa plăcută și de atributele sale senzoriale, care pot îmbunătăți experiența utilizatorului și atractivitatea produsului.

Capacitatea antioxidantă ridicată a *Coffea arabica*, atribuită în mare parte acidului clorogenic și a altor polifenoli, face din această specie un candidat promițător pentru dezvoltarea nutraceutică ulterioară. În ceea ce privește potențialul terapeutic, profilul fitochimic al *Coffea arabica* contribuie în

mod benefic la afecțiuni precum diabetul de tip II și tulburările neurodegenerative, consolidând astfel rolul său în regimurile terapeutice moderne. Cafeina și acizii clorogenici joacă un rol important în atenuarea proceselor neurodegenerative, iar consumul regulat de cafea ar putea influența evoluția bolilor Parkinson și Alzheimer.

Semințele de cafea verde conțin în mod predominant diverși macronutrienți și compuși bioactivi, glucidele constituind aproximativ 59-61% din compoziția lor totală. Lipidele reprezintă 11-17%, în timp ce proteinele reprezintă 10-16%. În plus, compușii fenolici reprezintă 6-10%, iar mineralele contribuie cu aproximativ 4%. Alți constituenți sunt acizii grași (2%), cafeina (1-2%), trigonelina (1%) și aminoacizii liberi, care sunt prezenți în cantități mai mici de 1%. S-a afirmat că, procesul de prăjire (tratamentul termic care induce o serie de transformări chimice), induce schimbări notabile în compoziția semințelor de cafea verde. În special, există o reducere semnificativă a nivelului de carbohidrați, a concentrației de proteine și compuși fenolici. În plus, o scădere a nivelului de aminoacizi liberi a fost de asemenea înregistrat.

Semințele de *Coffea arabica* sunt o sursă bogată de diverse substanțe fitochimice care au atras atenția pentru potențialele lor aplicații în formulările dermato-cosmetice. Principalele clase de fitochimicale găsite în semințele de *Coffea arabica* includ alcaloizi, compuși fenolici, lipide și proteine. Fiecare dintre aceste clase conține compuși specifici care contribuie la bioactivitatea semințelor, în special în ceea ce privește sănătatea pielii și aplicațiile cosmetice.

Aplicațiile *Coffea arabica* în produsele dermato-cosmetice sunt în creștere, datorită profilul său fitochimic și proprietăților sale benefice pentru sănătatea pielii și a părului. Proprietățile unice ale produselor naturale din *Coffea arabica*, inclusiv proprietățile lor antioxidante, antiinflamatorii, antimicrobiene și de stimulare a creșterii părului, le fac un ingredient versatil în diverse formulări cosmetice.

Eficacitatea extractelor de *Coffea arabica* în formulările cosmetice este legată de metoda utilizată pentru obținerea lor. Majoritatea tehnicilor de extracție utilizează ca solvent de extracție apa sau amestec etanol-apă, izolând compuși polari precum acidul clorogenic, acizii fenolici și cafeina. Metodele de extracție joacă un rol esențial în determinarea efectelor terapeutice, datorită impactului lor semnificativ asupra profilului fitochimic al

unui material vegetal. Prin urmare, optimizarea tehnicilor de extracție este esențială pentru maximizarea potențialului terapeutic; de la metoda de prelucrare a materialului vegetal la solvenții utilizați, toate afectează concentrația de compuși bioactivi, metaboliți secundari, inclusiv flavonoide și compuși fenolici, esențiali pentru activitățile biologice viitoare. În plus, alegerea parametrilor de extracție (temperatură și timp) contribuie la producerea de compuși fitochimici specifici, îmbunătățind proprietățile funcționale ale extractelor.

În ultimul timp, *Coffea arabica* a început să atragă atenția în cercetarea biomedicală, în special pentru potențialele sale proprietăți anti-melanom. Investigațiile au evidențiat profilul fitochimic bogat al *Coffea arabica*, făcând din aceasta un candidat pentru aplicații terapeutice împotriva diferitelor tipuri de cancer, inclusiv melanomul.

Melanomul este o tumoră malignă care provine din melanocite, celule producătoare de pigment care se găsesc în principal în piele, dar și în ochi și în alte părți ale corpului. La nivel mondial, este recunoscut ca fiind una dintre cele mai agresive forme de cancer de piele datorită tendinței sale de a metastaza precoce atunci când nu este detectat într-un stadiu incipient. Natura agresivă a melanomului este bine documentată, boala continuând să reprezinte o provocare clinică semnificativă în ciuda progreselor înregistrate în detectarea precoce și tratament. Abordările naturale emergente în tratamentul melanomului oferă oportunități promițătoare ca adjuvanți la terapia convențională. Compușii naturali cu proprietăți antitumorale pot spori eficacitatea tratamentului și pot reduce efectele adverse. Prin urmare, considerăm că sunt imperative cercetări suplimentare atât pentru validarea rezultatelor preliminare, cât și pentru caracterizarea completă a siguranței, eficacității și mecanismului de acțiune al compușilor naturali în terapia melanomului.

În ceea ce privește *Coffea arabica* ca și produs natural, unul dintre principalele motive pentru potențiala eficacitate anti-melanom este prezența unor compuși bioactivi semnificativi, cum ar fi acizii clorogenici, flavonoidele și terpenii, care sunt prezenți în abundență în *Coffea arabica*. Acești compuși prezintă proprietăți antioxidante marcate, care joacă un rol important în atenuarea stresului oxidativ, un factor-cheie atât în evoluția melanomului cât și a altor tipuri de cancer. În mod specific, acidul clorogenic, unul dintre principalii

constituenți fenolici, prezintă proprietăți antioxidative și antiinflamatorii care au fost corelate cu reducerea proliferării celulelor canceroase și îmbunătățirea ratelor de supraviețuire în diferite modele. În plus, interacțiunile complexe ale acestor compuși bioactivi contribuie la efectele lor antitumorale cumulative, justificând explorarea în continuare a mecanismelor lor de acțiune.

Studiile *in vitro* au demonstrat că extractele de *Coffea arabica* pot inhiba activitatea tirozinazei, o enzimă crucială în melanogeneză, ceea ce, în consecință, poate reduce riscul de dezvoltare a melanomului în rândul persoanelor cu expunere ridicată la UV. Activitatea antioxidantă asociată extractelor de *Coffea arabica* a fost legată de capacitatea acestora de a demonta speciile reactive de oxigen (ROS) care sunt cunoscute pentru a induce deteriorarea ADN-ului, un precursor al tumorogenezei. Cercetările au indicat că extractele pot promova mecanisme celulare care contracarează efectele adverse ale stresului oxidativ indus de UV, sporind astfel rezistența celulară împotriva tumorilor maligne potențiale. În plus, studiile au evidențiat potențialul *Coffea arabica* în formulările cosmetice destinate îmbunătățirii sănătății pielii, subliniind rolul său în ameliorarea proceselor de îmbătrânire a pielii care pot duce la creșterea susceptibilității la melanom. Capacitatea extractului de a spori producția de collagen și elastină contribuie pozitiv la integritatea structurală a pielii, reducând potențial incidența cancerelor de piele asociate cu îmbătrânirea și expunerea prelungită la soare.

Interesul emergent pentru utilizarea *Coffea arabica* în aplicații topice sugerează că, compușii săi bioactivi pot oferi beneficii auxiliare în tratamentele dermatologice, inclusiv cele care vizează celulele maligne prin intervenții terapeutice localizate. Studiile cuprinzătoare privind compoziția sa fitochimică au identificat o multitudine de compuși activi care pot contribui sinergic la perspectivele sale anticancerigene, necesitând investigații aprofundate prin abordări *in vitro* și *in vivo* pentru a elucida complet aceste căi.

În concluzie, *Coffea arabica* reprezintă o promisiune substanțială ca ingredient natural în lupta împotriva melanomului, susținută de conținutul său fitochimic bogat care se intersectează semnificativ cu căile terapeutice oncologice. Puterea extractelor sale împotriva stresului oxidativ și potențialul de a influența biologia pielii subliniază importanța cercetărilor suplimentare pentru cristalizarea aplicațiilor sale în prevenirea și gestionarea melanomului.

3. SCOP ȘI OBIECTIVE

Scopul acestei teze de doctorat a fost delimitarea profilul fitochimic complex al diferitelor extracte obținute din semințe verzi de *Coffea arabica*, prin utilizarea unor solvenți polari și nepolari, precum și stabilirea unui screening biologic preliminar *in vitro* și *in ovo*. Teza de doctorat aduce o contribuție importantă, datorită faptului că, s-au obținut șase tipuri de extracte, pe bază de solvenți diferiți (etanol, etil acetat, butanol, eter de petrol, dietileter și apă distilată), pornind de la semințele verzi de *Coffea arabica*, după care, extractele astfel obținute (CA-EtOH; CA-EtAc; CA-BU; CA-EP; CA-DEE și CA-H₂O) au fost investigate fitochimic pentru a stabili un profil farmacologic complex, ceea ce reprezintă un aspect obligatoriu pentru viitoarele aplicații biomedicale ale acestor extracte.

În ceea ce privește noutatea și originalitatea acestei teze de doctorat, considerăm că, investigarea efectelor terapeutice ale extractelor obținute din semințe verzi de *Coffea arabica* asupra celulelor de melanom uman – reprezintă elementul de noutate și originalitate al tezei de doctorat, deoarece în literatura științifică nu sunt furnizate în mod explicit dovezi experimentale directe privind liniile celulare de melanom. Deși studiile directe privind efectul extractelor de *Coffea arabica* asupra celulelor melanomului rămân limitate, dovezile cumulative privind activitățile lor antioxidante, antiinflamatorii și antitumorale raportate indică un impact multifacțat al acestora asupra viabilității celulelor melanomului. Prin urmare, considerăm că viitoarele investigații *in vitro* și *in vivo* axate pe modele de melanom ar putea elucida mecanismele moleculare precise implicate, inclusiv inducerea potențială a apoptozei, oprirea ciclului celular și modularea factorilor de micromediu ai tumorii.

Prin urmare, **un prim obiectiv stabilit** în vederea realizării scopului tezei, a fost analiza anatomică și histochimică a frunzelor și semințelor de *Coffea arabica*, utilizând coloranți și reactivi specifici pentru țesuturile vegetale, pentru a identifica și localiza zonele de acumulare a diferiților metaboliți secundari prezenți în planta studiată.

Al doilea obiectiv stabilit, a fost prepararea mai multor extracte naturale din semințele verzi de *Coffea arabica* folosind solvenți de extracție diferiți. Am decis să utilizăm metode clasice de extracție pentru a evita

costurile de producție inutile pe care le-ar putea implica o metodă de extracție mai complicată. Solvenții utilizați au fost aleși în concordanță cu literatura de specialitate, dar și pentru a construi o bază de date științifice pentru direcțiile de cercetare viitoare. Ne-am axat pe obținerea de extracte bogate în compuși biologic activi care să fie utilizate ca materie primă în formulările farmaceutice.

Stabilirea profilului fitochimic complet, care implică determinarea conținutului total de polifenoli (utilizând metoda Folin-Ciocalteu), compoziția fitochimică a compușilor biologic activi (prin analiză LC-MS), identificarea grupelor funcționale ale moleculelor organice prezente în fiecare extract (prin spectroscopie FT-IR), constituie **al treilea obiectiv al tezei de doctorat**.

Al patrulea obiectiv al tezei de doctorat a fost evaluarea efectelor fundamentale care stau la baza potențialului terapeutic general, și anume determinarea activității antioxidante și antimicrobiene a celor șase tipuri de extracte obținute din semințe verzi de *Coffea arabica*.

Al cincilea obiectiv al tezei de doctorat a constat în stabilirea unui screening preliminar *in vitro* privind efectele antitumorale ale extractelor de semințe verzi de *Coffea arabica* asupra melanomului uman. În plus, au fost investigate și aspectele de biosecuritate ale utilizării extractelor obținute pe o linie celulară umană sănătoasă.

Pentru a evalua utilizarea siguranței *in vivo* a extractelor de semințe verzi *Coffea arabica*, **cel de-al șaselea obiectiv al tezei de doctorat** a constat în aplicarea testului HET-CAM (testul membranei corioalantoice a ouălor embrionate de găină), o metodă semi-cantitativă utilizată pentru a analiza răspunsurile inflamatorii ale membranei corioalantoice a oului embrionat (CAM), adecvată pentru evaluarea răspunsului la diferiți compuși chimici. Acest ultim obiectiv reprezintă, de asemenea, **un alt aspect de noutate și originalitate**, deoarece, după cunoștințele noastre, aceste extracte nu au fost investigate în ceea ce privește un posibil efect iritativ, în special asupra membranei corioalantoice a oului de găină embrionat.

Pe baza rezultatelor obținute în această teză de doctorat, putem afirma că, contribuim științific la multitudinea de beneficii ale *Coffea arabica*, iar cercetările noastre viitoare se vor concentra pe dezvoltarea de formulări farmaceutice cu potențial terapeutic în medicina modernă, datorită faptului că acest material natural este foarte promițător pentru dezvoltarea de produse naturale și agenți terapeutici.

4. CONTRIBUȚII PERSONALE

4.1. STUDIUL MICROSCOPIC ȘI HISTOCHIMIC AL SPECIILOR DE *COFFEA ARABICA*

Rezultatele acestui studiu sunt prezentate în teza de doctorat în **Capitolul 4** și se referă la investigarea caracteristicilor anatomice și histochemice ale frunzelor și semințelor speciei *Coffea arabica*, folosind reactivi specifici pentru țesuturile vegetale, pentru a stabili localizarea zonelor de acumulare a diferiților metaboliți secundari prezenți în plantă.

În urma studiilor microscopice efectuate prin secțiuni transversale, s-a constatat că frunzele arbustului de cafea au o structură bifacială, mezofilul fiind diferențiat în 2 zone: parenchim palisadic și parenchim lacunar. Frunza plantei de cafea este protejată de o epidermă unistratificată atât pe fața superioară, cât și pe cea inferioară, acoperită de o cuticulă subțire. În preparatul necolorat al secțiunii transversale prin limbul frunzei, se evidențiază parenchimul palisadic bogat în cloroplaste și parenchimul lacunar, care este adaptat pentru schimbul de gaze cu mediul înconjurător.

În ceea ce privește sămânța de cafea, aceasta se află în interiorul fructului, este verde, are o suprafață dură și o formă ovală. Suprafața dorsală este convexă, suprafața ventrală este aplatizată și prezintă un spațiu longitudinal numit hil. Interiorul seminței de cafea este de culoare verde, acoperit de o peliculă argintie subțire cu un înveliș pergament de culoare galbenă până la maro.

Analiza microscopică și histochimică a frunzelor verzi și a semințelor de *Coffea arabica* a evidențiat o distribuție diferențiată a metaboliților secundari, corelată cu specializarea funcțională a țesuturilor. Polifenolii reducători, localizați în mezofilul frunzelor și în cotiledoane, sugerează un rol antioxidant important în protecția celulelor metabolic active. Alcaloizii, detectați prin reactivul Dragendorff în mezofil și endosperm, indică o funcție defensivă sistemică. Terpenoidele, identificate cu reactivul vanilină-acid sulfuric în epidermă și semințe, sunt asociate cu formarea unei bariere chimice protectoare. Aceste rezultate confirmă relevanța histochimiei ca metodă eficientă în investigarea funcțională a țesuturilor vegetale.

4.2. TEHNICĂ DE EXTRAȚIE ȘI SCREENINGUL FITOCHIMIC AL SEMINȚELOR VERZI DE *COFFEA ARABICA*

În **Capitolul 5** s-a urmărit obținerea și caracterizarea extractelor de semințe verzi de *Coffea arabica* folosind solvenți diferiți pentru a evalua randamentul extracției și profilul fitochimic complex. Extractele obținute au fost mai întâi caracterizate fizico-chimic prin spectroscopie în infraroșu cu transformare Fourier (FT-IR), pentru a identifica grupele funcționale ale componentelor active prezente în extractele de semințe verzi de *Coffea arabica*. În continuare, au fost determinate compoziția lor fenolică [utilizând cromatografia de lichide cuplată cu spectrometria de masă (LC-MS)], conținutul lor fenolic total (utilizând reactivul Folin-Ciocalteu), precum și activitatea lor antioxidantă, pentru a dezvălui potențialul lor biologic.

După obținerea celor șase tipuri de extracte, randamentul fracțiunii solubile în solvenții utilizați (eter de petrol, eter dietilic, acetat de etil și n-butanol) a fost calculat prin împărțirea cantității acestei fracțiuni la cantitatea de extract brut supus procesului de fracționare. Rezultatele au arătat că randamentele de extracție variază în funcție de solventul utilizat, cu următoarele valori: 9,73% pentru CA-EtOH, 57,12% pentru CA-EP, 1,40% pentru CA-DEE, 8,6% pentru CA-EtAc, 19,35% pentru CA-BU și 13,53% pentru CA-H₂O.

Compoziția fitochimică a compușilor biologic activi din fiecare extract (analiză LC-MS) a arătat că extractele CA-BU și CA-EtAc conțin concentrații ridicate de acid clorogenic, depășind 48 μg/mL. În ceea ce privește acidul 4-O-cafeoilchinic, un derivat important al acidului clorogenic cunoscut pentru proprietățile sale antioxidante și antivirale, extractul CA-BU a prezentat din nou cele mai mari concentrații (7,931 μg/mL). Utilizând etanolul ca solvent de extracție (CA-EtOH), s-a obținut o concentrație scăzută de acid clorogenic (sub 4,6 μg/mL), iar atunci când s-a utilizat apă distilată ca solvent, principalul compus obținut a fost tot acidul clorogenic (acid 5-O-cafeoilchinic), urmat de acidul 4-O-cafeoilchinic. Atunci când a fost utilizat eterul dietilic (CA-DEE), s-au obținut cele mai mici concentrații de acid clorogenic (sub 4 μg/mL), ceea ce sugerează că acest solvent nu este la fel de eficient în extracția acestui compus specific. Acidul cafeic, acidul 4-O-cafeoilchinic și acidul ferulic au fost,

de asemenea, identificate calitativ, dar sub limita de cuantificare. Utilizând eterul de petrol ca solvent (CA-EP), nu au fost identificați compuși polifenolici.

În urma cercetării conținutului total de polifenoli (TPC), rezultatele au arătat o corelație directă între eficiența extracției și polaritatea solventului utilizat. Acetatul de etil s-a dovedit a fi cel mai eficient solvent (conținând cea mai mare concentrație de polifenoli de 594,89 mg CAE/g), urmat de extractul CA-DEE cu o concentrație de 294,18 mg CAE/g și extractul CA-H₂O cu o concentrație de 253,25 mg CAE/g.

Rezultatele obținute în urma investigării grupelor funcționale ale moleculelor organice prezente în fiecare tip de extract au arătat că toate extractele de *Coffea arabica* preparate (CA-EtOH, CA-H₂O, CA-BU, CA-EtAc, CA-EP și CA-DEE) posedă numeroase grupe funcționale atribuite polifenolilor, flavonoidelor, alcaloizilor și metaboliților secundari prezenți în moleculele organice ale extractelor de semințe verzi de *Coffea arabica*.

Rezultatele privind capacitatea antioxidantă a extractelor au arătat un potențial inhibitor al radicalilor liberi DPPH în funcție de doza de extract utilizată și de timpul de analiză aplicat. Toate extractele au prezentat un potențial antioxidant moderat, exprimat prin EC₅₀, în comparație cu acidul ascorbic utilizat ca standard, liniaritatea extractelor de *Coffea arabica* fiind următoarea: CA-EtAc>CA-BU>CA-H₂O>CA-EtOH>CA-DEE>CA-EP. Singurul extract preparat a cărui capacitate antioxidantă a fost comparabilă cu standardul a fost extractul CA-EtAc (94% vs. 97%).

Putem afirma că, activitatea antioxidantă a extractelor de *Coffea arabica* este în mare parte atribuită conținutului lor bogat în fenoli, care include compuși precum acidul clorogenic, cunoscut pentru proprietățile sale antioxidante. Prezența compușilor fenolici puternici, în special a acizilor clorogenici și a flavonoidelor, demonstrează o cale promițătoare de utilizare a acestor extracte în suplimente alimentare și aplicații alimentare funcționale, cu scopul de a reduce bolile legate de stresul oxidativ.

4.3. EVALUAREA MICROBIOLOGICĂ A EXTRACTELOR DE *COFFEA ARABICA*

Capitolul 6 prezintă evaluarea activității antimicrobiene a extractelor de *Coffea arabica* asupra celor mai cunoscute tulpini bacteriene gram-pozitive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615) și gram-negative (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) și *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Astfel, au fost testate 6 extracte, după cum urmează: CA-EtOH; CA-EP; CA-DEE; și CA-EtOAc - dizolvate în DMSO; iar CA-BU și CA-H₂O - dizolvate în EtOH/apă, în concentrație de 20 mg/mL.

Activitățile antimicrobiene ale extractelor de *Coffea arabica* au fost testate prin metoda difuziei pe disc și prin determinarea concentrației inhibitoare minime, prin metoda diluției, și a fost evaluată în conformitate cu recomandările Comitetului European pentru Testarea Susceptibilității Antimicrobiene și cu ale Institutul pentru Standarde și Laboratoare Clinice.

În ceea ce privește activitatea antimicrobiană, rezultatele au indicat că extractele dizolvate în DMSO (CA-EtOH, CA-EP, CA-DEE, CA-EtAc) și cele dizolvate în EtOH/apă (CA-BU, CA-H₂O) au generat zone de inhibiție care au prezentat o activitate antimicrobiană variabilă. *Staphylococcus aureus* și *E. coli* s-au dovedit a fi cele mai sensibile tulpini la compușii bioactivi prezenți în extractul butanolic, datorită zonei de inhibiție relativ mari (12 mm) prezentate de acest extract. Pentru *Candida parapsilosis*, activitatea antifungică a extractelor a fost slabă. Cu toate acestea, CA-EtAc, CA-BU și CA-H₂O au prezentat o activitate antifungică ușoară (11 mm), sugerând că acești compuși pot avea un potențial antifungic limitat.

Prin urmare, putem afirma că, rezultatele obținute în acest studiu evidențiază potențialul extractelor de semințe verzi de *Coffea arabica* ca agenți antimicrobieni, în special împotriva bacteriilor Gram-pozitive, cum ar fi *Staphylococcus aureus*. Dintre cele șase extracte testate, extractul butanolic (CA-BU) a prezentat cea mai notabilă activitate antibacteriană, generând zone de inhibiție considerabile, în special împotriva *S. aureus* și *E. coli*. În schimb, activitatea antimicrobiană împotriva bacteriilor Gram-negative și a speciei fungice *Candida parapsilosis* a fost în general scăzută, indicând o specificitate mai mare a compușilor bioactivi față de bacteriile Gram-pozitive.

4.4. EVALUAREA BIOLOGICĂ EXPERIMENTALĂ PRELIMINARĂ *IN VITRO* ȘI *IN OVO* A EXTRACTELOR DE *COFFEA ARABICA*

În **Capitolul 7** au fost efectuat un studiu preliminar *in vitro*, ce a constatat în evaluarea potențialul antitumoral al extractelor de semințe verzi de *Coffea arabica* asupra liniei celulare de melanom uman A375, respectiv în investigarea profilul de biosecuritate al acestor extracte, prin testarea efectelor lor asupra unei linii celulare umane sănătoase, HaCaT. Mai mult, studiul a urmărit să evalueze efectele fracțiunii hidrosolubile (CA-H₂O) din semințele verzi de *Coffea arabica* asupra vaselor de sânge în ceea ce privește angiogeneza. În plus, studiul a urmărit să determine potențialul efect iritant al extractelor asupra membranei corioalantoice.

În ceea ce privește studiile *in vitro*, incubarea celulelor HaCaT timp de 48h cu extractele de *Coffea arabica* a arătat că cele mai mari concentrații testate (500 și 1000 μg/mL) ale fiecărui extract au afectat viabilitatea celulară; cu toate acestea, cu excepția CA-BU, celelalte extracte au exprimat rezultate de viabilitate de peste 70% la concentrații mari testate. Extractul butanolic (CA-BU) a scăzut viabilitatea celulară mai agresiv în comparație cu celelalte extracte, chiar și la concentrații mai mici testate.

În ceea ce privește efectul antitumoral, fracțiunea solubilă în apă (CA-H₂O) din semințele de cafea verde a exercitat un efect citotoxic modest, dar dependent de concentrație, asupra celulelor melanomului uman A375. Odată cu creșterea concentrației extractului, viabilitatea celulelor tumorale a scăzut, efect însoțit de o reducere a numărului de celule și a confluentei, precum și de creșterea eliberării de lactat dehidrogenază (LDH), indicând deteriorarea membranei celulare. Astfel, s-a evidențiat o micșorare a celulelor, o deformare a acestora cu apariția celulelor rotunde, semne observate în special de la concentrația de 75 μg/mL. Analiza morfologiei nucleare a arătat semne clare de apoptoză, inclusiv prezența corpurilor apoptotice și o reducere a dimensiunii nucleelor.

Evaluarea comparativă a extractelor de *Coffea arabica* demonstrează că potențiala activitate biologică trebuie să fie analizată în contextul unui profil toxicologic bine definit. Un conținut ridicat de polifenoli nu echivalează automat cu un efect favorabil în absența unei toleranțe celulare adecvate. CA-H₂O se detașează ca fiind extractul cel mai echilibrat, combinând o

concentrație eficientă de polifenoli cu o citotoxicitate scăzută asupra keratinocitelor. Această caracteristică îl recomandă drept candidat prioritar pentru investigații suplimentare, în special pentru aplicații dermato-cosmetice sau oncologice cu administrare topică. Luând în considerare conținutul de acid clorogenic de 30 µg/mL în extractul nostru, se poate presupune că efectul observat împotriva melanomului se datorează unui efect sinergic al acestui compus major cu alte substanțe fitochimice care sunt de asemenea prezente. Identificarea acestora și o mai bună înțelegere a mecanismului combinat de acțiune justifică continuarea studiilor semnificative. În schimb, extractele cu toxicitate evidentă (CA-BU, CA-EtAc) trebuie excluse sau reformulate pentru a asigura compatibilitatea cu țesuturile normale.

Fracțiunea solubilă în apă (CA-H₂O) obținută din semințele verzi de *Coffea arabica* a fost, de asemenea, supusă unei evaluări *in vivo* pentru posibile efecte asupra procesului de angiogeneză. Am testat extractele la o concentrație de 400 µg/mL, prin aplicarea a 5 µL extract în interiorul unor inele de plastic amplasate în prealabil deasupra CAM-urilor în curs de dezvoltare, începând cu ziua 8 de incubare. Am monitorizat zilnic zonele de aplicare prin stereomicroscopie, iar imaginile relevante au fost înregistrate, permițând investigarea suplimentară a schimbărilor care au avut loc în timpul tratamentului cu extracte de *Coffea arabica*.

În ceea ce privește potențialul efect iritant al extractului apos asupra membranei corioallantoice a oului de găină embrionat, rezultatele au arătat un efect semnificativ în stimularea angiogenezei. Modificările observate de acest extract, inclusiv după 11 zile de incubare, sugerează o acțiune pronunțată asupra neovascularizării fără a compromite integritatea țesutului și fără a prezenta semne de toxicitate. Absența semnelor de toxicitate la 6 zile după administrare este un indicator puternic al siguranței acestui extract, care s-a dovedit a fi esențial pentru aplicații clinice și cosmetice.

Datele prezentate în teza de doctorat, au făcut obiectul a trei articole științifice, cu subsemnata prim autor, din care 2 articole indexate și cotate Thompson Reuters, cu factor cumulat de impact de 5.7, publicate în jurnalele Pharmaceuticals (MDPI) și Farmacia (România), respectiv un articol indexat BDI și PubMed, publicat în jurnalul Medicine and Pharmacy Reports (România).