

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

***STUDII COMPARATIVE PRIVIND PROPRIETĂȚILE  
CAFEINEI DIN SURSE NATURALE***

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:  
PROF. UNIV. DR. RODICA SÎRBU**

**Student-doctorand:  
FARM. LUIZA MĂDĂLINA CARACOSTEA (CIMA)**

**BUCUREȘTI**

**2020**

## CUPRINS

### INTRODUCERE

#### PARTEA A I-A STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

### CAPITOLUL 1. DATE PRIVIND CAFEINA ȘI ACȚIUNILE FARMACOLOGICE ALE ACESTEIA

#### 1.1. CAFEINA

#### 1.2. STRUCTURA CHIMICĂ , NOMENCLATOR ȘI PROPRIETĂȚI GENERICE

#### 1.3. PROPRIETĂȚI FIZICO-CHIMICE ALE CAFEINEI

#### 1.4. SURSE NATURALE

##### 1.4.1. CAFEAUA

##### 1.4.2. CEAIUL

#### 1.5. IZOLAREA CAFEINEI DIN PRODUSE VEGETALE

#### 1.6. PROCESUL DE DIFUZIE AL CAFEINEI ÎN DIFERITE MEDII APOASE LA NIVELUL TEMPERATURII FIZIOLOGICE

##### 1.6.1. CONCEPTELE DE DIFUZIE – ASPECTE TEORETICE

#### 1.7. ACȚIUNILE FARMACOLOGICE ALE CAFEINEI

### CAPITOLUL 2. METODE FIZICO-CHIMICE DE ANALIZĂ PENTRU STUDIUL CAFEINEI

#### 2.1. METODE CALITATIVE ȘI CANTITATIVE

##### 2.1.1. METODE ELECTROCHIMICE

###### 2.1.1.1. VOLTAMETRIA

###### 2.1.1.2. POTENȚIOMETRIA

###### 2.1.1.3. AMPEROMETRIA

##### 2.1.2. METODE CROMATOGRAFICE

##### 2.1.3. METODE SPECTROFOTOMETRICE

##### 2.1.4. METODE CUPLATE

##### 2.1.5. METODE ELECTROFORETICE

#### 2.2. METODE DE ANALIZĂ A CARACTERISTICILOR CAFELEI

##### 2.2.1. ACȚIUNEA ANTIOXIDANTĂ

##### 2.2.2. ACȚIUNEA ANTIMICROBIANĂ

### CAPITOLUL 3. FORME FARMACEUTICE PENTRU APLICAȚII TOPICE CU CAFEINĂ

#### 3.1. LIVRAREA TOPICĂ ȘI TRANSDERMICĂ

#### 3.2. STRUCTURA PIELII

#### 3.3. INFLUENȚA TRANSPORTULUI PRIN DIFUZIE A MEDICAMENTELOR CU DESTINAȚIE TOPICĂ

#### 3.4. CUANTIFICAREA CAFEINEI ȘI PROFILAREA ADÂNCIMII ÎN TRECEREA TRANSDERMICĂ

#### 3.5. STRATEGII DE FORMULARE PENTRU ELIBERAREA COFEINEI ÎN PIELE

- 3.5.1 UNGUENTE ȘI GELURI
- 3.5.2 POTENȚIATORI DE PENETRARE
- 3.5.3 EMULSII
- 3.5.4. NANOPARTICULE

## PARTEA A II-A CONTRIBUȚII PERSONALE

### MOTIVAȚIA CERCETĂRILOR

## **CAPITOLUL 4. STUDII COMPARATIVE PRIVIND DETERMINAREA CARACTERISTICILOR FIZICO-CHIMICE ȘI FITOCHIMICE DIN CAFEAUA VERDE ARABICA ȘI ROBUSTA**

- 4.1. INTRODUCERE
- 4.2. CARACTERISTICI FITOCHIMICE ALE GENULUI *COFFEA*
- 4.3. PREGĂTIREA MATERIALULUI VEGETAL
- 4.4. ANALIZA FIZICO-CHIMICĂ A CAFELEI ARABICA (CA) ȘI A CAFELEI ROBUSTA (CR)
  - 4.4.1. DETERMINAREA CAFEINEI DIN PROBELE DE CAFEA CA ȘI CR
    - 4.4.1.1. IZOLAREA CAFEINEI CU CLOROFORM
    - 4.4.1.2. DETERMINAREA CAFEINEI PRIN METODE SPECTROFOTOMETRICE
    - 4.4.1.3 DETERMINAREA CAFEINEI DIN CAFEAUA VERDE ARABICA ȘI ROBUSTA PRIN METODA HPLC ȘI VALIDAREA METODEI APLICATE
  - 4.4.2. DETERMINAREA CONȚINUTULUI TOTAL DE FENOLI PRIN METODA FOLIN-CIOCĂLTEU
  - 4.4.3. DETERMINAREA COMPOZIȚIEI MINERALE DIN PROBELE DE CAFEA VERDE ARABICA ȘI ROBUSTA
- 4.5. CONCLUZIILE STUDIULUI

## **CAPITOLUL 5. REALIZAREA UNOR FORMULĂRI SEMISOLIDE CU APLICAȚIE TOPICĂ CU EXTRACT DIN CAFEA ȘI CAFEINA DE SINTEZĂ**

- 5.1. INTRODUCERE
- 5.2. CAFEINA UTILIZATĂ ÎN COSMETICĂ
  - 5.2.1. CAFEINA UTILIZATĂ ÎN TRATAMENTUL ANTICELULITIC
  - 5.2.2. CAFEINA UTILIZATĂ ÎN PRODUSE COSMETICE CA ȘI ANTIOXIDANT
- 5.3. MATERIALE ȘI METODE
  - 5.3.1. PREPARAREA EXTRACTELOR DE CAFEA VERDE ȘI PRĂJITĂ ARABICA ȘI ROBUSTA
  - 5.3.2. FAZELE PROCESULUI TEHNOLOGIC ȘI METODA DE PREPARARE A COMPOZITELOR FARMACEUTICE
  - 5.3.3. FORMULAREA COMPOZITELOR SEMISOLIDE PE BAZĂ DE CAFEINĂ DE SINTEZĂ ȘI EXTRACT APOS DE CAFEA VERDE ȘI PRĂJITĂ
- 5.4. REZULTATE ȘI DISCUȚII
  - 5.4.1. REZULTATE PRIVIND CARACTERISTICILE ORGANOLEPTICE AL COMPOZITELOR C1-C12

5.4.2. REZULTATE PRIVIND DETERMINAREA VALORII pH AL COMPOZITELOR C1-C12

5.4.3. REZULTATE PRIVIND DETERMINAREA CAPACITĂȚII DE ÎNTINDERE AL COMPOZITELOR C1-C12

5.5. CONCLUZIILE STUDIULUI

## **CAPITOLUL 6. STUDII COMPARATIVE PRIVIND COMPORTAMENTUL REOLOGIC AL FORMULĂRILOR SEMISOLIDE CU CAFEINĂ OBȚINUTE**

6.1. INTRODUCERE

6.2. MATERIALE ȘI METODE

6.3. REZULTATELE STUDIILOR REOLOGICE PE COMPOZITE CU CAFEINĂ

6.4. DISCUȚII

6.5. CONCLUZIILE STUDIULUI

## **CAPITOLUL 7. STUDII COMPARATIVE PRIVIND ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ A EXTRACTELOR APOASE DIN CAFEAUA ARABICA ȘI ROBUSTA ȘI A UNOR COMPOZITE FARMACEUTICE CU CAFEINĂ OBȚINUTE**

7.1. INTRODUCERE

7.2. CERCETĂRI PRIVIND ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ A CAFELEI ARABICA (CA) ȘI A CAFELEI ROBUSTA (CR)

7.2.1. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE A EXTRACTELOR DIN CAFEAUA ARABICA ȘI ROBUSTA PRIN TESTUL DPPH

7.2.2. DETERMINAREA CAPACITĂȚII ANTIOXIDANTE TOTALE (*TEAC*) A EXTRACTELOR DIN CAFEA ARABICA ȘI ROBUSTA ȘI A COMPOZITELOR FARMACEUTICE CU CAFEINĂ PRIN METODA FOTOCHEMILUMINESCENȚEI

7.3. CONCLUZIILE STUDIULUI

## **CAPITOLUL 8. STUDII COMPARATIVE PRIVIND ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A EXTRACTELOR APOASE DIN CAFEAUA ARABICA ȘI ROBUSTA ȘI A UNOR COMPOZITE FARMACEUTICE CU CAFEINĂ OBȚINUTE**

8.1. INTRODUCERE

8.2. DETERMINAREA GRADULUI DE CONTAMINARE MICROBIANĂ A EXTRACTELOR APOASE DE CAFEA VERDE ȘI PRĂJITĂ

8.2.1. MATERIALE ȘI METODE

8.2.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

8.3. STUDIUL ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE A EXTRACTELOR APOASE DE CAFEA

8.3.1. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE A COMPUȘILOR BIOLOGIC ACTIVI DIN EXTRACTELE APOASE DE CAFEA CA0, CR0, CA2, CR2

8.3.1.1. MATERIALE ȘI METODE

8.3.1.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

8.3.2. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE A COMPOZITELOR C2, C3, C11, C12

8.3.2.1. MATERIALE ȘI METODE

### 8.3.2.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

### 8.4. CONCLUZIILE STUDIULUI

## CAPITOLUL 9. CONCLUZII GENERALE

9.1. STUDII COMPARATIVE PRIVIND DETERMINAREA CARACTERISTICILOR FIZICO-CHIMICE ȘI FITOCHIMICE DIN CAFEAUA VERDE ARABICA ȘI ROBUSTA

9.2. REALIZAREA UNOR FORMULĂRI SEMISOLIDE CU APLICAȚIE TOPICĂ CU EXTRACT DIN CAFEA ȘI CAFEINA DE SINTEZĂ

9.3. STUDII COMPARATIVE PRIVIND COMPORTAMENTUL REOLOGIC AL FORMULĂRILOR SEMISOLIDE CU CAFEINĂ OBȚINUTE

9.4. STUDII COMPARATIVE PRIVIND ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ A EXTRACTELOR DE CAFEA ARABICA ȘI ROBUSTA ȘI UNOR COMPOZITE FARMACEUTICE CU CAFEINĂ OBȚINUTE

9.5. STUDII COMPARATIVE PRIVIND ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A EXTRACTELOR DE CAFEA ARABICA ȘI ROBUSTA ȘI A COMPOZITELOR FARMACEUTICE CU CAFEINĂ

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

## LISTA CU LUCRĂRILE ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

# INTRODUCERE

În prezent se acordă o atenție majoră principiilor active existente în diferite plante datorită proprietăților lor terapeutice reprezentând o zonă de interes în domeniul alimentar, în industria farmaceutică și în industria cosmetică.

Consumul de cafeină are o istorie lungă datând din antichitate și sunt cunoscute multe surse naturale care conțin acest alcaloid purinic: cafeaua, guarana, yoco, mate și cassina care sunt utilizate cu succes pentru prepararea băuturilor care conțin cafeină. Cafeina (1,3,7-trimetilpurin-2,6-dionă) este o metilxantină, care este consumată ca o băutură, administrată ca medicament sau poate fi aplicată pe piele în scop cosmetic.

În cercetarea actuală, **ipoteza de lucru** a început de la valorificarea cafeinei provenită din principala sursă naturală de pe piața internațională, și anume, cafeaua verde, aparținând speciilor Arabica și Robusta (*Canephora*). Având în vedere faptul că, compoziția chimică de bază a cafelei verzi depinde în primul rând de aspectele genetice, spre exemplu speciile de cafea, de aspecte fiziologice, cum ar fi gradul de maturizare dar și de alți factori externi cum ar fi compoziția solului și arealul geografic din care provine planta, sunt necesare studii comparative fizico-chimice aprofundate pentru a confirma și cuantifica principalii compuși prezenți în

boabele de cafea, precum și proprietățile acestora. Deși în literatura de specialitate regăsim studii referitoare la compoziția cafelei, aceste studii conțin o mare variabilitate de date, greu corelabile, referitoare la proprietățile cafeinei, fapt ce ne-a impus realizarea unei prime direcții de cercetare prin studii proprii privind caracteristicile cafeinei obținută din două specii de plantă: Arabica și Robusta.

**Motivația temei de cercetare** a fost generată de marea variabilitate și diversitate de date, care mi-a permis realizarea de studii comparative privind proprietățile cafeinei provenită din cele două specii naturale pentru o potențială utilizare în domeniul biomedical – farmaceutic. Raportându-ne la faptul că la nivel mondial cafeaua reprezintă cel de-al doilea produs valoros exportat pe piață și la datele referitoare la efectele cafelei asupra organismului uman, constatăm însă că, există relativ puține utilizări farmaco-cosmetice cu aplicație topică ceea ce face ca cercetările noastre cuprinse în această teză să asigure **importanța, noutatea și actualitatea temei**. În acest sens am dezvoltat în prezenta teză de doctorat, o a doua direcție de cercetare pentru realizarea unor noi formulări farmaceutice care conțin cafeină ca principal component din cafeaua verde studiată de noi.

Teza de doctorat este structurată în două părți principale. Partea I (partea generală) a tezei, care este alcătuită din 3 capitole și partea a II-a (contribuțiile originale), care este sistematizată în 5 capitole. Teza cuprinde o parte de Introducere, un capitol final de Concluzii generale și referințele bibliografice.

#### **Prima parte a lucrării:**

**Capitolul 1: Date privind cafeina și acțiunile farmacologice ale acesteia:** cuprinde informații din literatura de specialitate a datelor fizico-chimice ale cofeinei și face o trecere în revistă a principalelor surse naturale care conțin acest alcaloid purinic. De asemenea sunt prezentate și acțiunile farmacologice ale cofeinei, insistând asupra celor mai importante dintre ele.

**Capitolul 2: Metode fizico-chimice de analiză pentru studiul cafeinei:** prezintă metodele instrumentale care au dus la clarificarea structurii, la identificarea și cuantificarea cafeinei. S-au evidențiat metodele electrochimice (voltametria, potențiomtria și amperometria), metodele cromatografice, metodele spectrometrice, metodele cuplate precum și metodele electroforetice. De asemenea am evidențiat câteva acțiuni caracteristice ale cafeinei

din cafea precum activitatea antioxidantă și antimicrobiană, care au fost de folos și în desfășurarea cercetărilor din cadrul tezei.

**Capitolul 3: Forme farmaceutice pentru aplicații topice cu cafeină:** tratează aspecte legate de cinetica penetrării substanțelor active prin piele și descrie ecuațiile fizico-chimice care caracterizează fenomenul de difuzie prin membrane. Tot în acest capitol sunt prezentate, din literatura de specialitate, date asupra interacțiunilor cafeinei cu pielea, cu accent pe strategiile de eliberare topică. Vor fi analizate diversele abordări de formulare care au fost folosite până în prezent pentru a îmbunătăți penetrarea prin piele a cafeinei.

Partea a II-a Contribuții personale, cuprinde 5 capitole.

**Capitolul 4: Studii comparative privind determinarea caracteristicilor fizico-chimice și fitochimice din cafeaua verde Arabica și Robusta:** Scopul primului capitol din partea de cercetare, constă în evaluarea din punct de vedere fizico-chimic a extractului total obținut din boabele de cafea verde, în vederea confirmării și cuantificării, în special, a principalei metilxantine și anume cafeina, folosind metoda de izolare cu cloroform, metode spectrofotometrice (UV-VIS) și metode cromatografice (HPLC) de identificare și dozare a cafeinei. În cadrul metodei HPLC a fost inițial realizat un studiu pentru validarea metodei. Rezultatele obținute atestă faptul că, metoda HPLC prezintă o acuratețe față de metoda clasică cu cloroform, atestând un conținut mai mare în cofeină pentru extractele din cafeaua verde Robusta față de extractele din cafeaua verde Arabica. Un alt aspect important în ceea ce privește compoziția chimică a plantei *Coffea* a fost evidențierea conținutului total de fenoli (metoda Folin-Ciocalteu). Rezultatele obținute atestă un conținut mai mare în compuși fenolici în extractele de cafea Robusta comparativ cu extractele de cafea Arabica. De asemenea a fost pus în evidență și conținutul de minerale din probele de cafea verde Arabica și Robusta (spectrometrie de absorbție atomică) obținând rezultate diferite. Acest fapt este confirmat și de literatura de specialitate, care sugerează influența solului asupra compoziției chimice ale plantei. Toate aceste analize sunt foarte importante pentru a valorifica cafeina sub formă de extract natural în noi preparate farmaceutice topice semisolide.

**Capitolul 5: Realizarea unor formulări semisolide cu aplicație topică cu extract din cafea și cafeina de sinteză:** în acest capitol se tratează posibilitățile de realizare a diferitelor formulări farmaceutice cu acțiune anticelulitică și antioxidantă. Au fost concepute și dezvoltate 12 noi formulări farmaceutice topice semisolide având ca ingredient activ de bază fie cafeina de

sinteză, fie extractul apos obținut din boabele de cafea verde și prăjită aparținând speciilor de cafea Arabica și Robusta. S-a realizat caracterizarea formulărilor farmaceutice topice semisolide obținute prin evidențierea proprietăților organoleptice, prin determinarea pH-ului și a capacității de etalare (P. Ojeda și S. Arbussa).

**Capitolul 6: Studii comparative privind comportamentul reologic al formulărilor semisolide cu cafeină obținute:** în acest capitol se accentuează importanța comportamentului reologic al preparatelor semisolide pentru aplicații topice care este foarte important deoarece acest parametru exercită influențe la nivelul tehnologic, al utilizării preparatelor și al activității terapeutice. Acest studiu a fost realizat pe baza evaluărilor parametrilor reologici (vâscozitate, gradient de viteză de forfecare, tensiune de forfecare) cu încadrarea formulărilor obținute în modelul reologic Ostwald de Waele (respectarea legii puterii). Toate compozitele obținute au prezentat caracter pseudoplastic, tixotrop cu bucle de histerezis diferite. Excepție face preparatul C9 care nu prezintă fenomenul de tixotropie, nu prezintă buclă de histerezis având în compoziție cea mai mică concentrație de extract din cafeaua verde Robusta.

**Capitolul 7: Studii comparative privind activitatea antioxidantă a extractelor apoase din cafeaua Arabica și Robusta și a unor compozite farmaceutice cu cafeină obținute:** Obiectivul principal al acestui studiu a fost de a examina din punct de vedere comparativ capacitatea antioxidantă totală al extractelor din boabele de cafea verde și prăjită dar și a noilor formulări farmaceutice cu cafeină. Metodele de lucru utilizate în acest capitol au fost următoarele: metoda DPPH și metoda fotochemiluminescenței. Scopul prezentului studiu este de a urmări proprietățile antioxidante ale unguentelor-emulsii obținute din extracte apoase din boabe de cafea verde și prăjită, și pentru a evalua potențialul acestor preparate în tratamentul anticelulitic și pentru protecția și îngrijirea pielii. Cele două metode atestă faptul că la cafeaua verde din specia Robusta am obținut o valoare mai mare comparativ cu proba de cafea verde Arabica. Se constată că în urma prăjirii, activitatea antioxidantă se modifică, Arabica atingând un nivel mai mare față de cafeaua prăjită Robusta. Acest studiu a confirmat și o activitate antioxidantă foarte bună pentru toate compozitele analizate care conțin extracte apoase din cafeaua Arabica și din cafeaua Robusta.

**Capitolul 8: Studii comparative privind activitatea antimicrobiană a extractelor apoase din cafeaua Arabica și Robusta și a unor compozite farmaceutice cu cafeină obținute:** În acest capitol au fost efectuate analize privind determinarea gradului de contaminare



microbiană al extractelor totale obținute din boabele de cafea verde și prăjită, și de asemenea au fost efectuate cercetări privind efectul antimicrobian al cafelei asupra microorganismelor patogene (*S. aureus* ATCC 25923) și condiționat patogene (*E. coli* ATCC 25922 și *C. albicans* ATCC 10231) cu scopul de a evidenția și de a evalua eventualul potențial antimicrobian al probelor de cafea, sub formă de extracte apoase brute și sub formă de compozite farmaceutice. Acest studiu a confirmat prezența activității antimicrobiene în extractele de cafea prăjită, dar subliniază o activitate antimicrobiană foarte slabă pe extractele de cafea verde. În cazul compozitelor cu cafeină analizate se observă că doar 2 dintre compozitele semisolide preparate C2 și C3 care au în compoziție extract apos din cafeaua prăjită Arabica și Robusta, au prezentat o activitate antimicrobiană pe tulpinile bacteriene de referință *S. aureus* 25923 (Gram-pozitivă) și *E. Coli* ATCC 25922 (Gram-negativă). Toate cele patru compozite analizate prezintă activitate antimicrobiană influențată de prezenta extractelor apoase de cafea prăjită dar și de prezența substanțelor de sinteză și pot reprezenta o alternativă în realizarea unor noi preparate farmaceutice cu aplicație topică. În urma analizelor microbiologice putem concluziona că extractele de cafea Arabica și Robusta, prăjită mediu, pot fi utilizate ca potențiali aditivi antimicrobieni conservanți pentru diferite aplicații din domeniul medical, alimentar și cosmetic.

**Concluziile generale** reprezintă un capitol distinct care marchează finalul tezei de doctorat și în care sunt sistematizate cele mai importante aspecte legate de cercetările originale din această lucrare.

## **OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE ALE TEZEI DE DOCTORAT**

**Primul obiectiv** al contribuțiilor personale din prezenta teză de doctorat îl constituie realizarea de studii comparative pentru determinarea conținutului de cafeină din două specii de cafea verde Arabica și Robusta, stabilirea datelor de compoziție ale cafelei verzi (cafeina ca principal component bioactiv, determinarea conținutului de compuși fenolici și a conținutului în minereale) din cele două specii studiate pentru evidențierea proprietăților de interes terapeutic cum ar fi: proprietăți antioxidante și antibacteriene al extractelor totale din cafea.

**Al doilea obiectiv general** al tezei de doctorat îl constituie conceperea, dezvoltarea și caracterizarea a 12 formulări farmaceutice care conțin cafeină în extractele totale obținute din boabele de cafea al speciilor Arabica și Robusta și cafeina de sinteză (ca probă de control) în

vederea valorificării lor în scop terapeutic cu posibilitatea obținerii unor proprietăți anticelulitice și antioxidante.

Având în vedere obiectivele majore ale tezei, putem încadra tema tezei de doctorat în cadrul cercetărilor internaționale, referitoare la structura cafeinei și utilizările acesteia. Cercetările au fost complexe iar studiile comparative privind proprietățile cafeinei, ca extract total din două specii naturale ale genului *Coffea* de producție India, în vederea obținerii de produse cosmetice semisolide pentru aplicații topice, evidențiază caracteristicile terapeutice benefice.

Pentru realizarea **obiectivelor generale** ne propunem următoarele **obiective specifice**:

- ✓ Caracterizarea probelor solide de cafea verde cu evidențierea datelor de identificare pentru probele supuse studiului și stabilirea unui proces de extracție al cafelelor care implică mai multe etape cum ar fi: măcinarea, extracția compușilor țintă, pre-concentrare și purificarea probelor;
- ✓ Determinarea cantitativă și calitativă a principalei metilxantine utilizând diferite metode cum ar fi: izolarea cafeinei cu cloroform, metode spectrofotometrice (UV-VIS) și metode cromatografice (HPLC) de identificare și dozare a cafeinei pentru a realiza un studiu comparativ între cele două specii ale genului *Coffea*;
- ✓ Analiza extractelor obținute din boabele de cafea verde în vederea determinării conținutului totali de fenoli;
- ✓ Un obiectiv specific foarte important pentru a obține o formulare farmaceutică semisolidă destinată aplicațiilor topice este reprezentat de determinarea conținutului în minerale prezent în ambele probe de cafea verde Arabica și Robusta;
- ✓ Caracterizarea extractelor din punct de vedere fizico-chimic și din punct de vedere al capacității antioxidante și al activității antimicrobiene;
- ✓ Realizarea și dezvoltarea a 12 preparate farmaceutice tip unguent-emulsie cu respectarea fazelor procesului tehnologic precum și cu respectarea metodei de preparare al formelor farmaceutice topice semisolide.
- ✓ Caracterizarea formulărilor farmaceutice topice semisolide obținute cu extract apos de cafea verde și prăjită aparținând speciilor Arabica și Robusta dar și cele cu cafeină pură (realizate ca probă de control) în ceea ce privește comportarea reologică, capacitatea antioxidantă și activitatea antimicrobiană.

În ceea ce privește **metodele de cercetare abordate și metodologia cercetării** evidențiem faptul că, am utilizat metode fizico-chimice moderne de analize volumetrice și gravimetrice, dar și metode de chimie analitică instrumentală în funcție de specificul datelor analizate:

- ✓ Am utilizat metode analitice pentru cuantificarea cafeinei din produse vegetale: metodă fizico-chimică cu cloroform, prin metode spectrofotometrice în UV-VIS și prin metode cromatografice (HPLC) la care am realizat validarea metodei de analiză.
- ✓ La determinarea conținutului de polifenoli în cadrul metodei Folin-Ciocalteu am utilizat metode spectrofotometrice în UV-VIS.
- ✓ Pentru determinarea conținutului de minerale am utilizat metode de spectroscopie de absorbție atomică.
- ✓ Determinarea capacității antioxidante s-a realizat prin metode spectrofotometrice (testul DPPH) și TEAC prin metoda fotochemiluminescenței.
- ✓ Controlul microbiologic s-a realizat utilizând metodele specifice analizelor și anume: metoda microdiluțiilor și metoda orificiilor (godeurilor).
- ✓ Comportarea reologică, a celor 12 noi formulări farmaceutice a fost realizată utilizând un vâscozimetru rotațional Reovâscostar R pentru obținerea datelor de vâscozitate la diferite viteze de rotație: crescătoare și descrescătoare

În continuare va fi prezentată partea de contribuții personale în care sunt sistematizate cele mai importante aspecte legate de cercetările originale din această lucrare.

## **CAPITOLUL 4**

### **STUDII COMPARATIVE PRIVIND DETERMINAREA CARACTERISTICILOR FIZICO-CHIMICE ȘI FITOCHIMICE DIN CAFEAUA VERDE ARABICA ȘI ROBUSTA**

#### **4.4. ANALIZA FIZICO-CHIMICĂ A CAFELEI ARABICA (CA) ȘI A CAFELEI ROBUSTA (CR)**

##### **4.4.1. DETERMINAREA CAFEINEI DIN PROBELE DE CAFEA CA ȘI CR**

În prezentul capitol de analize fizico-chimice a cafelelor Arabica și Robusta am realizat determinarea cafeinei din cafeaua verde folosind metoda de izolare a cafeinei cu cloroform,

metode spectrofotometrice (UV-VIS) și metoda HPLC de identificare și dozare. Metoda HPLC a fost utilizată ca metodă de referință, luând în considerare că aceasta este cea mai fiabilă și precisă metodă de analiză.

#### 4.4.1.1. IZOLAREA CAFEINEI CU CLOROFORM

##### *Metoda de lucru*

Procedura de izolare a cafeinei a fost efectuată conform unei metode descrisă de Anghel Bușuricu (Anghel Bușuricu A. F., 2008), cu unele modificări. Concentrația cafeinei a fost calculată după următoarea ecuație (4.1):

$$\text{mg cafeină / g cafea} = \frac{(A_1 - A_2) \times 10}{0.410 \times m \times V} \quad (4.1)$$

unde:  $A_1 = \frac{(A_{250} - A_{296})}{2}$ ;  $A_2 = \frac{(A_{250} - A_{296})}{2}$ ; 10 = volumul soluției folosit în experiment; 0.410 = valoarea absorbantei pentru 1 mg cafeină;  $m$  = masa probei luată în lucru;  $V$  = volumul de extract folosit la determinare;  $A_1$  și  $A_2$  = valorile absorbantei la lungimea de undă  $\lambda_{273}$  pentru soluțiile 1 și 2.

Conținutul de cafeină pentru probele de cafea Arabica și cafea Robusta a fost calculat aplicând formula (4.1).

*Cafea Arabica* =  $\frac{(1.24 - 0.6065) \times 10}{0.410 \times 1 \times 10} = 1.54 \text{ mg cafeină / g cafea}$  - corespunzător pentru 154 mg/100 g cafea

*Cafea Robusta* =  $\frac{(0.98985 - 0.24745) \times 10}{0.410 \times 1 \times 10} = 1.82 \text{ mg cafeină / g cafea}$  - corespunzător pentru 182 mg/100 g cafea

#### 4.4.1.2. DETERMINAREA CAFEINEI PRIN METODELE SPECTROFOTOMETRICE

##### *Metoda de lucru*

Absorbția măsurătorilor UV-VIS au fost efectuate pe un Spectrofotometru VWR UV-6300PC cu fascicul dublu în domeniul 200-400 nm, utilizând halogen și surse de deuteriu pentru materialele vizibile și radiații ultraviolet, la temperatura controlată de 25°C, utilizând cuve pătrate cu cuarț cu traiectorie optică de 1 cm.

## Rezultate și discuții

Spectrele obținute pentru extractele din cafea verde Arabica și Robusta dar și pentru cafeina de sinteză sunt prezentate în Fig. 4.11., 4.12., 4.13., 4.14., 4.15. În analiza spectrofotometrică am folosit patru probe de cafea obținute prin extracția la cald (CA1, CR1) și prin extracție la rece (CA2, CR2). Am folosit ca și standard, cafeina de sinteză care a fost dizolvată în apă distilată conform procedurii de solubilitate din F.R. X de la monografia *Coffeinum*. Din analiza spectrală se confirmă prezența cafeinei în ambele specii de cafea studiate și concordă cu datele din literatura de specialitate (Belay A., 2008).

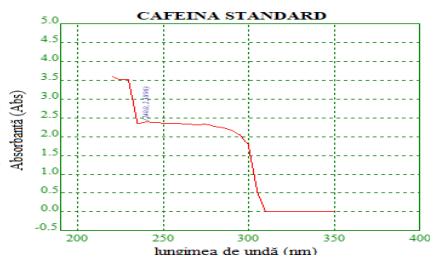


Fig. 4.11 Spectrul UV-VIS pentru cafeina standard

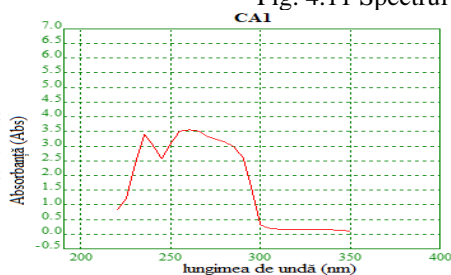


Fig. 4.12. Spectrul UV-VIS pentru proba de cafea CA1

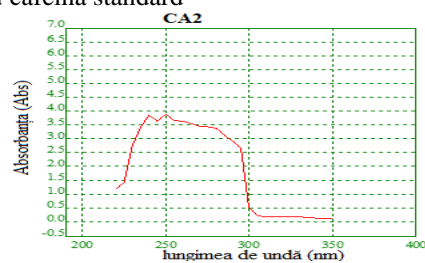


Fig 4.13. Spectrul UV-VIS pentru proba de cafea CA2

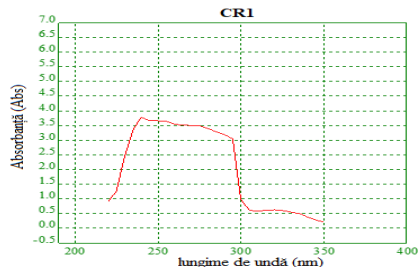


Fig 4.14. Spectrul UV-VIS pentru proba de cafea CR1

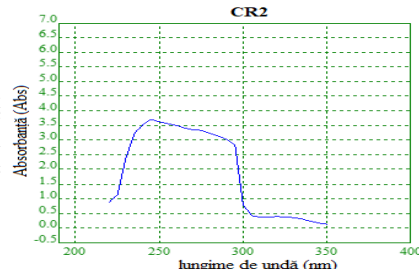


Fig 4.15. Spectrul UV-VIS pentru proba de cafea CR2

### 4.4.1.3 DETERMINAREA CAFEINEI DIN CAFEAUA VERDE ARABICA ȘI ROBUSTA PRIN METODA HPLC ȘI VALIDAREA METODEI APLICATE

Pentru a cunoaște nivelul cofeinei din diferite produse este necesar a stabili o metodă care să fie sigură (validată) pentru determinarea cafeinei din principala sursă naturală existentă pe piață și anume cafeaua verde. Astfel în acest subcapitol de analize fizico-chimice am ales

metoda HPLC, care se pretează cel mai bine a fi utilizată ca metodă în determinarea cafeinei din cafeaua verde Arabica și cafeaua verde Robusta achiziționate de la un distribuitor local de pe piața românească (orașul Iași).

### Rezultate și discuții

Pentru măsurarea conținutului de cafeină din extractele de cafea obținute a fost făcută o calibrare în intervale tipice. Pentru aceste extracte, calibrarea s-a realizat de la 1,25 mg/L la 20 mg/L pe 10 probe de concentrații diferite. În Tabelul IV.6. sunt prezentate rezultatele pentru 10 probe de cafea test supuse condițiilor cromatografice care au realizat picuri cromatografice specifice fiecărei concentrații. În Tabelul IV.7. este redată ecuația dreptei de etalonare, valorile coeficientului de regresie și domeniul concentrațiilor soluțiilor analizate. Măsurătorile au fost realizate în triplicat.

Tabelul IV.6. Ariile medii pe 10 soluții de concentrații diferite			Tabelul IV.7 Domeniul de liniaritate și coeficientul de corelație realizat în ecuația dreptei de regresie.		
Nr. de probe N	Concentrațiile soluțiilor test Xi	Ariile medii ale picurilor Yi	Coeficientul de corelație r	Domeniul de liniaritate	Ecuația dreptei de regresie
1	1.25	12945	0,9999	1,25-20 Mg/L	$y = 11823x - 2221.1$
2	2.5	27632			
3	5	57010			
4	8.5	98138			
5	10	115765			
6	12.5	145142			
7	14	162769			
8	16	186271			
9	18.5	215648			
10	20	236275			
Medie	10.825	125759.52			

Parametrii statistici care sunt utilizați în validarea metodei sunt următorii:

- Specificitatea și selectivitatea;
- Liniaritatea și domeniul de liniaritate;
- Precizia;
- Acuratețea (exactitatea);
- Precizia intermediară și reproductibilitatea;
- Limita de detecție (LOD) și limita de cuantificare (LOQ).

Parametrii de validare sunt calculați conform Standardului SR ISO 8466/1-2016 European Pharmacopoeia, Ed. 9.0 (2020) și a reglementărilor europene “*Conferința internațională privind*

armonizarea cerințelor tehnice pentru înregistrarea produselor farmaceutice de uz uman” ale ICH-Q2A-Text on Validation of Analytical Procedure (2003) și ICH-Q2B-Validation of Analytical Procedure: Methodology (2005).

În analiza de față, domeniul de liniaritate stabilit, pe care s-a lucrat este de 1,25mg/L – 20 mg/L. Pentru analitul considerat, folosind relațiile din Tabelul IV.8. S-a calculat ecuația dreptei de etalonare și coeficientul de corelație, obținute pentru variația ariilor medii în funcție de concentrații. Se pot evidenția panta și ordonata la origine, pentru dreapta de etalonare. S-au calculat LOD și LOQ determinate pentru un nivel de siguranță de 95% și n-2 grade de libertate. Calculele au fost realizate cu ajutorul programului Microsoft Excel 2016 pentru abaterea standard relativă RDS%=0,443 și repetabilitatea R%=1,253%. Valoarea obținută pentru coeficientul de corelație este  $r_{xy}=0,9999$  (Tabelul IV.8.). Din datele obținute putem considera criteriu de acceptanță deplin când valoarea  $r < 1$  și  $r > 0.995$  și liniaritatea curbei de calibrare este foarte bună.

Tabelul IV.8. Formule de calcul și rezultatele obținute pentru determinarea parametrilor de validare a metodei HPLC pentru cafeină

Parametrul de validare	Formula de calcul	Rezultate obținute
Ordonata la origine (sau interceptul) a	$y=a+bx$	a = - 2221.1
Panta b		b = 11823
Media valorilor Pentru x și pentru y N= 10 probe citite	$\bar{A}_p = \frac{\sum_i^n A_p}{n}$	Media $_x = 10.825$ Media $_y = 125\ 759.52$
Abaterea standard	$s = \sqrt{\frac{\sum_i^n (A_p^i - \bar{A}_p)^2}{n - 1}}$	S = 557.174
Abaterea standard relativă	$RSD\% = \frac{s * 100}{\bar{A}_p}$	RSD % = 0,443
Repetabilitatea R	$R\% = 2\sqrt{2}RSD\%$	R% = 1,253 %
Covarianța	$S_{xy} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x - \sum y}{n}}{n - 1}$	$S_{xy} = 0.07763$
Abaterea standard pentru populația valorilor lui x	$S_x = \frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n - 1}$	$S_x = 0.074$
Abaterea standard pentru populația valorilor lui y	$S_y = \frac{\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}}{n - 1}$	$S_y = 875.135$
Coeficientul de corelație	$r_{xy} = \frac{S_{xy}}{S_x S_y}$	$r_{xy} = 0,999886$
Abaterea standard pentru întreaga populație a valorilor	$S_0 = \sqrt{\frac{y^2 - A \sum y - B \sum xy}{n - 2}}$	$S_0 = 0,0776$

Calculul concentrațiilor cafeinei existente în probele analizate s-a făcut cu ecuația (4.3) (ISO Standard 20481, 2008; Indian Standard, IS 16028., 2012).

$$w_c = \frac{A_s p_{st} V \times 100}{A_{st} m_s} = \frac{A_s p_{st} \times 25}{A_{st} m_s} \quad (4.3)$$

unde:  $A_{st}$  - aria picului cafeinei în cromatograma HPLC a soluției standard;  $A_s$  - aria picului cafeinei în cromatograma HPLC a soluției probă;  $m_s$  - este masa în g., a porțiunii de testare;  $V$  - volumul, în litri, al soluției de probă extrase, ( $V = 0,25$  L);  $p_{st}$  - concentrația de masă, în grame pe litru, a soluției standard de cofeină.

Valorile au fost calculate ținând cont de formula de calcul dar și de faptul că s-a pornit de la 0.5 g de cafea pudră dizolvată în apă cu o diluție de 1:10. Rezultatele obținute au fost de 2.17% pentru cafeaua Robusta și de 1.595% pentru cafeaua Arabica.

În Tabelul IV.13. sunt prezentate procentele de cafeină regăsite în cafeaua Robusta și în cafeaua Arabica. Se constată ca rezultatele obținute prin metoda HPLC sunt cu o precizie și o acuratețe mai mare față de cele obținute la extracția cu cloroform.

Tabelul IV.13. Conținutul de cafeină din cafeaua verde Robusta și cafeaua verde Arabica determinată prin metoda HPLC și metoda de izolare cu cloroform

Metode de analiză	Cafea Robusta	Cafea Arabica
Cofeina prin HPLC	2,17%	1.595%
Cofeina prin extracția cu cloroform	1,82%	1.54%

Metode de analiză	Cafea Robusta (CR)	Cafea Arabica (CA)
Cofeina prin HPLC	2.17%	1.595%
Cofeina prin extracția cu cloroform	1.82%	1.54%

#### 4.4.2. DETERMINAREA CONȚINUTULUI TOTAL DE FENOLI PRIN METODA FOLIN-CIOCÂLTEU

Conținutul total de fenoli (TPC) a fost determinat conform metodei FC, folosind un spectrofotometru Jasco 550 UV-VIS cu dublu fascicol. S-a măsurat absorbanta la 681 nm în raport cu o curbă standard a acidului galic și rezultatele sunt exprimate mgGAE /100 g probă cafea. Toate probele au fost efectuate în trei exemplare și valoarea medie a fost raportată.

Pentru a calcula concentrația fenolilor totali a fost aplicată ecuația (4.4):

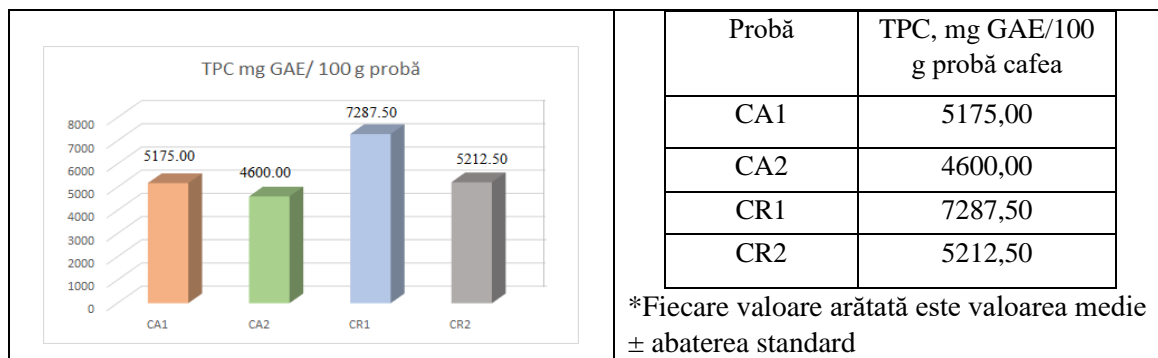
$$TPC (mg GAE/100g) = \frac{V_f \times c \times 5}{V_i \times m_{probă}} \quad (4.4)$$



Unde: c reprezintă concentrația (mg/L) citită pe curba de etalonare;  $V_f$  este volumul de extract filtrat al fiecărei probe;  $V_i$  este volumul de probă adăugat în balonul cotat de 50 mL pentru efectuarea determinării;  $m_{\text{probă}}$  este masa de material vegetal uscat (CA, CR) supus infuzării și macerării.

### Rezultate și discuții

Tabelul IV.14. Concentrația fenolilor totali (TPC) în extractele apoase din cafea



În Tabelul IV.14. sunt prezentate valorile pentru conținutul total de fenoli (mg GAE/100 g probă cafea) al fiecărui extract analizat în funcție de specia de cafea și de metoda de obținere a extractului, precum și în urma aplicării ecuației (4.4).

Din datele obținute în acest studiu reiese faptul că extractele de cafea preparate cu apă caldă au un conținut mai mare de polifenoli față de extractele de cafea preparate cu apă rece. Tot din aceste rezultate obținute putem sublinia și faptul că specia Robusta deține un conținut mai mare de polifenoli față de specia Arabica, indiferent de metoda de preparare al extractului.

#### 4.4.3. DETERMINAREA COMPOZIȚIEI MINERALE DIN PROBELE DE CAFEA VERDE ARABICA ȘI ROBUSTA

În această metodă am analizat în probele de cafea verde 12 elemente Fe, Mn, Cu, Cr, Ni, Pb, Cd, Zn, Ca, Mg, K, Na prin spectrometrie de absorbție atomică (AAS) folosind un Spectrometru de absorbție atomică ContraAA 700 Analytic Jenna. S-au folosit etaloane pentru fiecare metal în parte.

Pentru exprimarea concentrațiilor metalelor în mg metal/kg probă a fost aplicată ecuația (4.5):

$$\text{Concentrație metal (mg/Kg probă)} = \frac{V_b \times c}{m_{\text{probă}}} \quad (4.5)$$

### Rezultate și discuții

În Tabelul IV.16. sunt prezentate concentrațiile de metale din probele de cafea verde Arabica și Robusta. Rezultatele obținute în urma determinărilor s-au încadrat în limitele și intervalele impuse de literatură de specialitate.

Tabelul IV.16. Concentrația metalelor (mg/kg) în probele de cafea verde Arabica și Robusta

Metal	Cafea Arabica [mg/kg]	Cafea Robusta [mg/kg]
Fe	81.82±0.02	79.02±0.02
Mn	17.8±0.01	(-)
Cu	15.88±0.01	22.22±0.01
Cr	(-)	(-)
Ni	(-)	(-)
Pb	(-)	(-)
Cd	(-)	(-)
Zn	62.44±0.02	80.4±0.02
Ca	3334±0.01	5320±0.02
Mg	886±0.01	810.6±0.01
K	4004±0.01	4020±0.01
Na	1086.6±0.02	1135±0.01

Concluzia acestei cercetări ne indică faptul că probele de cafea verde Arabica și Robusta reprezintă o sursă foarte importantă al următoarelor elemente identificate: Ca, Mg, K, Na și Zn pentru ambele probe de cafea. Aceste elemente prezintă proprietăți benefice pentru corpul uman dar și pentru sănătatea pielii având o acțiune de protecție a celulelor împotriva stresului oxidativ, ajută la refacerea țesuturilor și îmbunătățesc elasticitatea pielii.

Din cele 12 elemente luate în studiu, doar patru dintre acestea (Cr, Ni, Pb, Cd) au avut concentrații sub limita de detecție. Acest lucru ne indică un beneficiu deoarece scopul actualei teze de cercetare este de a dezvolta noi formulări farmaceutice pentru aplicații topice și de aceea prezența lor ar fi putut fi toxică pentru piele.

## CAPITOLUL 5

### REALIZAREA UNOR FORMULĂRI SEMISOLIDE CU APLICAȚIE TOPICĂ CU EXTRACT DIN CAFEA ȘI CAFEINA DE SINTEZĂ

*Obiectivele capitolului:*

- ✓ Au fost concepute și dezvoltate 12 noi formulări farmaceutice topice semisolide cu cafeina tip unguent-emulsie ulei în apă și apă în ulei cu respectarea fazelor procesului tehnologic precum și cu respectarea metodei de preparare al formelor farmaceutice topice semisolide.
- ✓ Toate cele 12 formulări obținute au fost analizate din punct de vedere al caracteristicilor organoleptice, a fost măsurată valoarea pH-ului și a fost determinată capacitatea de etalare.

#### 5.4.1. REZULTATE PRIVIND CARACTERISTICILE ORGANOLEPTICE AL COMPOZITELOR C1-C12

Formulările obținute C1-C12, au un aspect omogen, culoare albă sau alb-crem, mirosul caracteristic componentelor; și se încadrează în limitele impuse de F.R. X. referitor la consistență și omogenitate. În următoarele imagini sunt prezentate două din formulările farmaceutice semisolide pentru aplicații topice dezvoltate în acest capitol C11, C12 (Fig. 5.16., 5.17.).



Fig. 5.16. Aspectul, culoarea și consistența compozitului C11



Fig. 5.17. Aspectul, culoarea și consistența compozitului C12

#### 5.4.2. REZULTATE PRIVIND DETERMINAREA VALORII pH AL COMPOZITELOR C1-C12

Conform determinării potențiometrice a pH-ului cu ajutorul pH-metrului, s-a constatat că valoarea pH a unguentelor-emulsii concepute și dezvoltate a fost cuprins în limitele impuse de Farmacopeea Română (4.5-8.5) și de asemenea având un pH apropiat de cel al pielii (4.2-5.8 conform F.R. X.). În următorul grafic sunt detaliate valorile pH obținute pentru fiecare compozit în parte (Fig 5.18.).

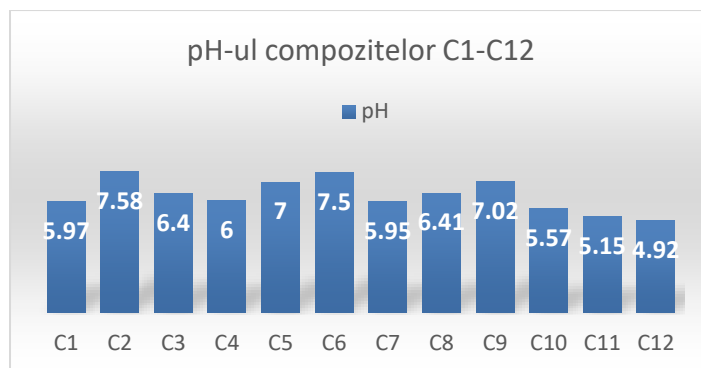


Fig. 5.18. Variația valorii pH pentru formulările farmaceutice C1-C12

### 5.4.3. REZULTATE PRIVIND DETERMINAREA CAPACITĂȚII DE ÎNTINDERE AL COMPOZITELOR C1-C12

Capacitatea de etalare a celor 12 compozite farmaceutice s-a determinat cu ajutorul metodei lui P. Ojeda și S. Arbussa. În următoarele grafice sunt detaliate valorile obținute pentru capacitatea de etalare a compozitelor în funcție de substanța de bază folosită.

Rezultatele obținute evidențiază o consistență corespunzătoare și o bună capacitate de etalare a celor 12 compozite obținute din extract apos de cafea Arabica și Robusta și cofeina de sinteză.

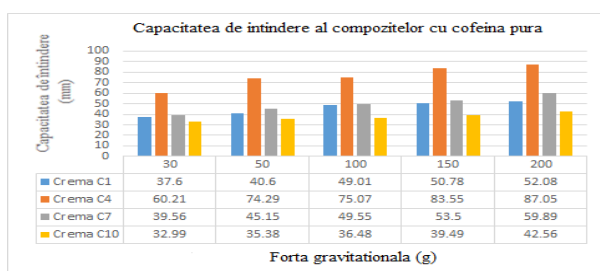


Fig. 5.19. Capacitatea de întindere al compozitelor cu cafeină pură

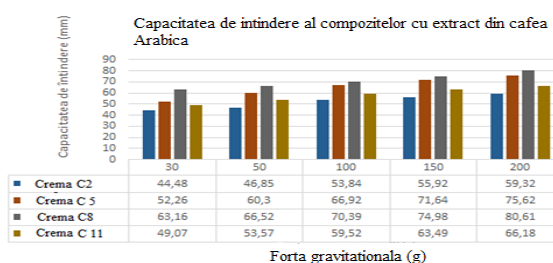


Fig. 5.20. Capacitatea de întindere al compozitelor cu extract apos din cafea Arabica

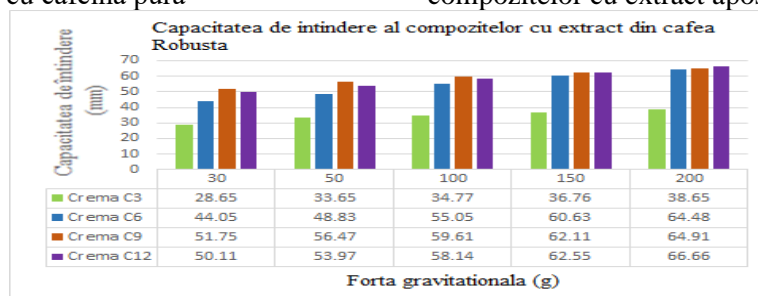


Fig. 5.21. Capacitatea de întindere al compozitelor cu extract apos din cafea Robusta

## CAPITOLUL 6

### STUDII COMPARATIVE PRIVIND COMPORTAMENTUL REOLOGIC AL FORMULĂRILOR SEMISOLIDE CU CAFEINĂ OBȚINUTE

Pentru cele 12 noi formulări farmaceutice realizate, C1-C12, care conțin cofeină pură (ca probă de control) și extract de cafea aparținând speciilor Arabica și Robusta, am realizat un studiu comparativ privind comportamentul reologic pe baza evaluării parametrilor reologici (vâscozitate, gradient de viteza de forfecare, tensiune de forfecare).

#### 6.3. REZULTATELE STUDIILOR REOLOGICE PE COMPOZITE CU CAFEINĂ

##### *Rezultate și discuții*

Construirea reogramelor și a curbelor de curgere s-a efectuat pe valori medii obținute ale parametrilor reologici. Citirile de vâscozitate aparentă  $\eta$  (cP) au fost efectuate în triplicat la creșterea și descreșterea vitezelor de rotație  $\omega$  (rpm). Calculele celorlalți parametri au fost efectuate în programul Microsoft Excel 2016.

În continuare, am prezentat rezultatele studiului reologic pentru compozitele C11 și C12.

Din analiza curbelor de curgere și a reogramelor se constată că C11 și C12 au un comportament reologic de fluid nenenewtonian, pseudoplastic. De asemenea, am evidențiat parametrii modelului Ostwald de Waele precum și sistematizarea valorilor parametrilor reologici obținute pentru cele două compozite C11 și C12 (Tabelul VI.24., Tabelul VI.25.)

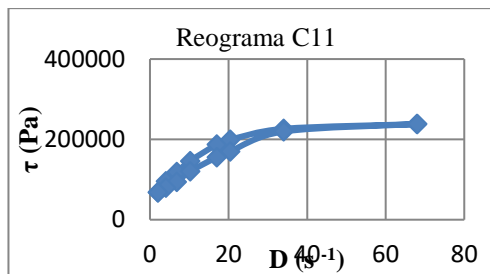


Fig. 6.32. Reograma pentru preparatul C11

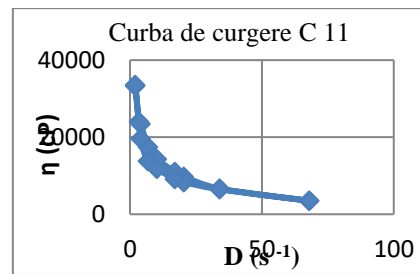


Fig. 6.33. Curba de curgere pentru preparatul C11

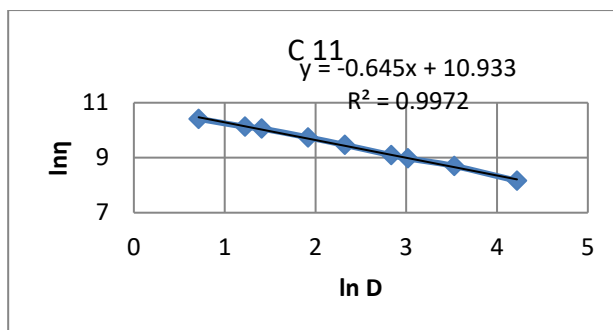


Fig. 6.34. Liniarizarea parametrilor reologici cu respectarea legii puterii pentru preparatul C11

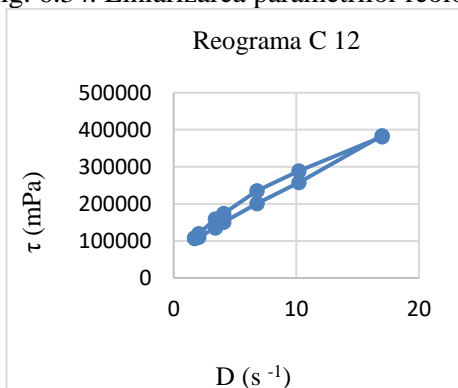


Fig. 6.35. Reograma pentru preparatul C12

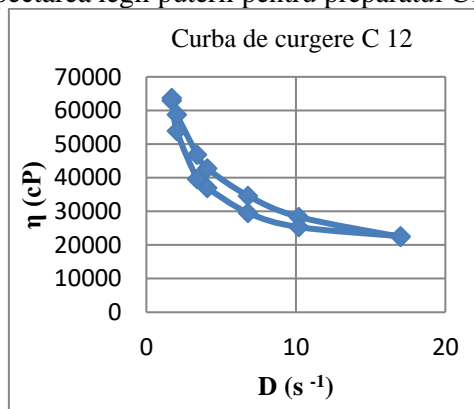


Fig. 6.36. Curba de curgere pentru preparatul C12

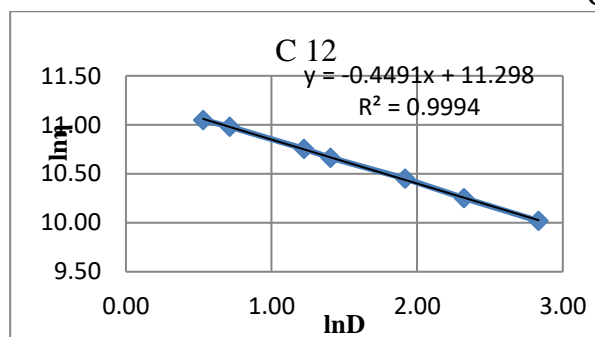


Fig. 6.37. Liniarizarea parametrilor reologici cu respectarea legii puterii pentru preparatul C12

Tabelul VI.24. Parametrii modelului Ostwald de Waele pentru crema C11

Parametru	K-Indice de consistență	n-Indice de curgere	R-Coefficient de corelație
Testul 1	10.993	0.355	0.9972
Testul 2	10.482	0.301	0.9968
Testul 3	11.521	0.395	0.9977
Medie	10.99866667	0.350333333	-
DS	0.519523179	0.047173439	-
CV(%)	4.723510536	13.46530129	-

Tabelul VI.25. Parametrii modelului Ostwald de Waele pentru crema C12

Parametru	K-Indice de consistență	n-Indice de curgere	R-Coefficient de corelație
Testul 1	11.298	0.5509	0.9994
Testul 2	10.852	0.513	0.9991
Testul 3	11.732	0.592	0.9997
Medie	11.294	0.551966667	-
DS	0.440013636	0.0395108	-
CV(%)	3.895994653	7.158185919	-

## 6.5. CONCLUZIILE STUDIULUI

Toate cremele preparate prezintă un comportament de fluid newtonian, pseudoplastic, tixotrop. Noile preparate respectă modelul reologic Ostwald de Waele cunoscut și sub denumirea legii puterii. În urma studiului comparativ realizat pe cele 12 noi compozite concretizate în cremele C1-C12, putem concluziona următoarele aspecte:

- Toate compozitele C1-C12 sub formă de unguente-emulsii H/L și L/H, luate în studiu, având caracter reologic, pseudoplastic și indicele de curgere  $n < 1$ , prezintă o scădere a vâscozităților aparente, odată cu creșterea vitezelor de forfecare.
- Din analiza reogramelor am observat că toate aceste compozite realizate cu extracte apoase de cafea verde Arabica și Robusta, cu extracte apoase de cafea prăjită Arabica și Robusta dar și cu cofeină de sinteză, luate în studiu, au prezentat tensiuni de forfecare mai mari la scăderea tensiunii de forfecare, decât cele măsurate la creșterea vitezelor de forfecare, înregistrându-se astfel bucle de histerezis. Excepție de la această constatare îl reprezintă compozitul C9 care nu prezintă bucla de histerezis, fiind singurul compozit care nu prezintă fenomenul de tixotropie. Totodată C9 prezintă cel mai mic conținut de extract de cafea verde Robusta și respectiv cea mai mică cantitate de extract vegetal de bază luat în lucru comparativ cu compozitele cu extract apos de cafea Arabica.

## CAPITOLUL 7

### STUDII COMPARATIVE PRIVIND ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ A EXTRACTELOR APOASE DIN CAFEAUA ARABICA ȘI ROBUSTA ȘI A UNOR COMPOZITE FARMACEUTICE CU CAFEINĂ OBTINUTE

#### 7.2.1. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE A EXTRACTELOR DIN CAFEAUA ARABICA ȘI ROBUSTA PRIN TESTUL DPPH

Am ales să evaluăm prin această metodă, extractele de cafea verde obținute prin infuzie și macerare pentru a verifica dacă procedeul de extracție afectează activitatea antioxidantă a cafelei verzi Arabica și Robusta.

##### *Rezultate și discuții*

Cea mai mare valoare în urma testului DPPH a fost obținută pentru concentrația de 4 mg/mL pentru toate extractele de cafea verde. Acest rezultat indică o valoare mai mare de captare a DPPH cu creșterea concentrației de cafeină, adică o micșorare importantă a moleculelor radicalilor 2,2-difenil-1-picrililhidrazil.

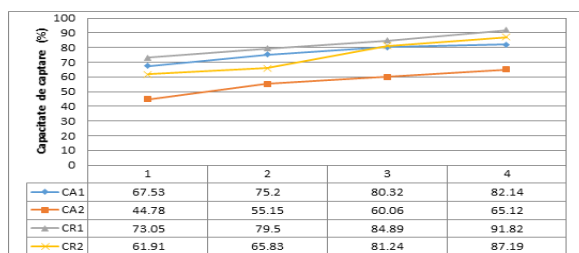


Fig. 7.4. Capacitatea de captare a radicalilor DPPH (%) pentru extractele de cafea verde la diferite concentrații

Din analiza graficului prezentat în Fig. 7.4. se constată că probele analizate din specia Robusta au o capacitate de captare a DPPH mai mare decât cele din specia Arabica. Extractele de cafea preparate prin infuzie cu apă caldă CA1, CR1 au capacitate de captare mai mare decât extractele preparate cu apă rece CA2, CR2, și putem evidenția faptul că folosind o temperatură ridicată la procesul de extracție obținem o cantitate mai mare de compuși cu caracter antioxidant care scindează radicalii de DPPH. În concluzie, conform datelor obținute, extractul din cafeaua verde Robusta deține cea mai mare valoare a capacității de captare a DPPH pentru toate concentrațiile și pentru toate probele luate în lucru, ceea ce ne indică că extractul de cafea verde Robusta prezintă o activitate antioxidantă mai mare decât extractul de cafea verde Arabica.



## 7.2.2. DETERMINAREA CAPACITĂȚII ANTIOXIDANTE TOTALE (TEAC) A EXTRACTELOR DIN CAFEA ARABICA ȘI ROBUSTA ȘI A COMPOZITELOR FARMACEUTICE CU CAFEINĂ PRIN METODA FOTOCHEMILUMINESCENȚEI

### *Rezultate și discuții*

În Tabelul VII.5 sunt sistematizate rezultatele din analiza proprie a capacității antioxidante totale a extractelor de cafea verde și prăjită, aparținând speciilor Arabica și Robusta, folosind metoda fotochemiluminescenței.

Tabelul VII.5. Capacitatea antioxidantă totală (TEAC) obținută pentru soluții diluate de extracte din cafea verde și prăjită

N r. C r t.	Probă Extract Cafea	Volum de probă utilizat ( $\mu$ L)	Inhibiția maximă	Capacitate antioxidantă totală (TEAC) în echivalent unități Trolox (nmol equiv. Trolox/ volum probă)	Concluzii
1	CA0 sol. Stoc	5	0.999	15.122	Prezintă inhibiție și TEAC prea ridicată, depășește curba etalon
2	CA0 1:1	5	0.964	14.021	Prezintă inhibiție și TEAC prea ridicată, depășește curba etalon
3	CA0 1:100	5	0.820	10.292	Prezintă inhibiție și TEAC prea ridicată, depășește curba etalon
4	CA0 1:200	5	0.680	7.525	Prezintă inhibiție și TEAC foarte bună la diluția cea mai ridicată
5	CR0 sol. Stoc	5	0.999	15.123	Prezintă inhibiție și TEAC prea ridicată, depășește curba etalon
6	CR0 1:10	5	0.864	11.304	Prezintă inhibiție și TEAC prea ridicată, depășește curba etalon
7	CR0 1:100	5	0.567	5.731	Prezintă inhibiție și TEAC foarte bună
8	CA1 sol. Stoc	5	0.999	15.106	Prezintă inhibiție și TEAC prea ridicată, depășește curba etalon
9	CA1 1:100	5	0.645	6.939	Prezintă inhibiție și TEAC foarte bună
10	CR1 sol. Stoc	5	0.999	15.124	Prezintă inhibiție și TEAC prea ridicată, depășește curba etalon
11	CR1 1:100	5	0.585	6.001	Prezintă inhibiție și TEAC foarte bună
12	CA2 sol. Stoc	5	0.999	15.127	Prezintă inhibiție și TEAC prea ridicată, depășește curba etalon
13	CA2 1:100	5	0.618	6.496	Prezintă inhibiție și TEAC foarte bună
14	CR2 sol. Stoc	5	0.999	15.118	Prezintă inhibiție și TEAC prea ridicată, depășește curba etalon
15	CR2 1:100	5	0.689	7.688	Prezintă inhibiție și TEAC foarte bună

Pentru extractele totale din cafeaua verde și prăjită aparținând speciilor Arabica și Robusta a fost determinată capacitatea antioxidantă totală pentru soluția stoc și pentru diferite diluții ale soluției stoc 1:10, 1:100, respectiv 1:200 cu reactivul R<sub>1</sub>. Conform metodei ACL, capacitatea antioxidantă totală a probelor de cafea a fost citită prin raportare cu substanța standard Trolox, și volumul de probă utilizat în această analiză a fost de 5 μL.

Din analiza extractelor de cafea verde: CA1, CR1, CA2, CR2, Robusta prezintă cea mai bună inhibiție și *TEAC* pentru extractul CR2 (7.688 nmol equiv. Trolox/volum probă), iar pentru cafeaua verde Arabica cea mai bună inhibiție și *TEAC* a fost pentru CA1 (6.939 nmol equiv. Trolox/volum probă) CR2>CA1. Cafeaua Robusta verde ne indică o activitate antioxidantă mai mare decât cafeaua verde Arabica. În funcție de procedeele de obținere al extractelor avem variații ale compoziției chimice pentru cele două tipuri de cafea verde, Robusta și Arabica, dar nu semnificative.

Din analiza extractelor de cafea prăjită: CA0, CR0, la proba CA0, activitatea antioxidantă pare să se modifice în urma procesului de prăjire, Arabica depășind chiar și cafeaua Robusta în ceea ce privește activitatea antioxidantă CA0 > CR0 la diluția 1:200, respectiv, 1:100.

Pentru restul probelor (soluțiile stoc și diluțiile intermediare, unde este cazul) am obținut inhibiție și *TEAC* prea ridicată, depășind curba etalon.

Nu au fost înregistrate valori negative pentru aria de inhibiție sau echivalenții de unități Trolox, ceea ce ne demonstrează că toate extractele utilizate în acest studiu prezintă activitate antioxidantă remarcabilă.

Valorile obținute pentru capacitatea antioxidantă totală a compozitelor farmaceutice cu cafeină din surse naturale, sunt sistematizate în Tabelul VII.6.

Tabelul VII.6. Capacitatea antioxidantă totală (*TEAC*) obținută pentru compozitele C2, C3, C11, C12, solubilizate în alcool *n*-butilic

N r. C r t.	Compozit farmaceutic	Volum de probă utilizat (μL)	Inhibiția Maximă	Capacitate antioxidantă totală (TEAC) în echivalent unități Trolox (nmol equiv. Trolox/volum probă)	Concluzii
1	C2	5	0.568	5.741	Prezintă inhibiție și TEAC foarte bună
2	C3	5	0.208	1.653	Prezintă inhibiție și TEAC mai scăzută
3	C3	10	0.374	3.295	Prezintă inhibiție și TEAC bună la o concentrare a probei
4	C11	5	0.559	5.623	Prezintă inhibiție și TEAC foarte bună
5	C12	5	0.756	8.942	Prezintă inhibiție și TEAC foarte bună

Pentru toate cele patru compozite (C2, C3, C11, C12), care au fost solubilizate în prealabil în alcool *n*-butilic, s-a determinat capacitatea antioxidantă totală (TEAC) doar în cazul soluțiilor stoc, întrucât probele nu au necesitat diluție.

Cea mai ridicată valoare pentru activitatea antioxidantă s-a înregistrat pentru compozitul C12 8.942 (nmol equiv. Trolox/volum probă), urmat de compozitul C2 5.741 (nmol equiv. Trolox/ volum probă). Singurul compozit care a necesitat un volum suplimentar în analiză a fost compozitul C3 care la volumul de 5μL a prezentat inhibiție și TEAC mai scăzută, iar la volum de 10 μL a prezentat inhibiție și TEAC foarte bună (3.295 nmol equiv. Trolox/ volum probă). Rezultatul obținut în urma metodei PCL respectă următoarea ordine C12>C2>C11>C3.

Aceste constatări sunt în concordanță cu rezultatele obținute la analiza capacității antioxidante totale a extractelor de cafea verde și prăjită, unde am obținut cele mai bune valori pentru extractul CR2 (concentrație 10%) și pentru extractul CA0 (concentrație apoximativ 20%).

## **CAPITOLUL 8**

### **STUDII COMPARATIVE PRIVIND ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A EXTRACTELOR APOASE DIN CAFEUA ARABICA ȘI ROBUSTA ȘI A UNOR COMPOZITE FARMACEUTICE CU CAFEINĂ OBȚINUTE**

#### **8.2. DETERMINAREA GRADULUI DE CONTAMINARE MICROBIANĂ A EXTRACTELOR APOASE DE CAFEA VERDE ȘI PRĂJITĂ**

##### **8.2.1. MATERIALE ȘI METODE**

Materialele utilizate în acest studiu de detectare al gradului de contaminare microbiană sunt reprezentate de extractele de cafea verde și prăjită: CA0, CA2, CR0, CR2.

*Metodologia de lucru* s-a bazat pe Standardul SR EN ISO 21149 (SR EN ISO 21149, 2017) care oferă îndrumări generale pentru numărarea și detectarea bacteriilor aerobe mezofile în produsele cosmetice, folosind ca mediu de izolare, cultivare și numărare a microorganismelor (bacterii și fungi) mediul nediferențial TSA (Tryptic Soy Agar).

## 8.2.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

După expirarea timpului de incubare, s-au numărat coloniile din fiecare placă, înainte de filtrare, iar rezultatele au fost exprimate în UFC/mL, ca medie a 3 numărări (în triplicat) + DS (Deviația Standard), rezultatele fiind detaliate în Tabelul VIII.2.

Rezultatele experimentale obținute au evidențiat contaminarea microbiană a tuturor probelor și au impus, în consecință, sterilizarea prin filtrare, înainte de testările ulterioare pentru evaluarea activității antimicrobiene. Cafeaua prăjită este mult mai puțin contaminată, comparativ cu cafeaua verde, datorită unei sterilizări termice (incomplete) prin procedura de prăjire. Condițiile de lucru folosite, temperatura apei distilate folosite la prepararea extractelor, manipularea nesterilă a acestora, dar și tipul de cafea utilizat, sunt factorii care au determinat contaminarea microbiană.

Tabelul VIII.2. Încărcătura microbiană a extractelor de cafea

Cod Extract	Încărcătura microbiană (UFC/mL) înainte de filtrare, exprimată ca medie a 3 numărări+DS	Încărcătura microbiană (UFC/mL) după sterilizarea prin filtrare
CA0	4+3,7	0
CR0	2+2,5	0
CA2	110+2,3	0
CR2	>3000	0

Legendă: DS = deviația standard; UFC = nr. Unități Formatoare de Colonii

În concluzie, putem aprecia că pentru toate probele reprezentate de extractele apoase de cafea verde (CA2 și CR2) și prăjită (CA0 și CR0) s-a impus necesitatea sterilizării înainte de a putea fi adăugate în compozitele farmaceutice.

## 8.3.1. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE A COMPUȘILOR BIOLOGIC ACTIVI DIN EXTRACTELE APOASE DE CAFEA CA0, CR0, CA2, CR2

### 8.3.1.1. MATERIALE ȘI METODE

Materialele utilizate pentru a analiza activitatea antimicrobiană sunt reprezentate de extractele apoase din cafea, în variantele experimentale CA0, CR0, CA2, CR2. - Tulpinile patogene bacteriene și fungice: *Escherichia coli* ATCC 25922; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Candida albicans* ATCC 10231.

*Metoda de lucru:* Evaluarea activității antimicrobiene a extractelor vegetale de testat s-a realizat printr-o variantă a antibiogrammei difuzimetrice Kirby-Bauer, cantitative, prin metoda microdiluțiilor, ce permite stabilirea CMI (Concentrația Minimă Inhibitorie) și a CMB (Concentrația Minimă Bactericidă).

### 8.3.1.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele testării pentru aprecierea efectului antimicrobian al extractelor vegetale apoase din cafea sunt sistematizate și redate în Tabelul VIII.4.

Tabelul VIII.4. Activitatea antimicrobiană a extractelor de cafea prin metoda microdiluțiilor

Extracte	Tulpini Testate	Numar ufc/mL											
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	MC	MS
CA0	S. aureus	8	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	Steril
	E. coli	0	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	Steril
	C. albicans	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	Steril
CR0	S. aureus	0	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	Steril
	E. coli	0	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	Steril
	C. albicans	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	Steril
CA2	S. aureus	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	Steril
	E. coli	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	Steril
	C. albicans	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	Steril
CR2	S. aureus	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	Steril
	E. coli	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	Steril
	C. albicans	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	Steril

S-a constatat că, la volumul de 50 μL și la diluția 1/2 (Tabel VIII.4.), extractul CR0 a inhibat total cultura de *S. aureus* și *E. coli* și parțial cultura de *C. albicans*, spre deosebire de extractul CA0, care a inhibat total cultura de *E. coli* și parțial culturile de *S. aureus* și *C. albicans*. Extractele CA2 și CR2 prezintă activitate antimicrobiană foarte slabă apreciată (subiectiv) printr-o densitate microbiană mare (>100UFC/mL) în plăcile Petri cultivate cu microorganismul

de testat. Pe baza rezultatelor obținute, putem aprecia că, în cazul extractelor apoase din cafeaua prăjită, compușii bioactivi extrași exercită o activitate antimicrobiană eficientă pe tulpinile bacteriene Gram-negative de *E. coli*, al căror perete celular pare să fie sensibil la acești compuși biologic activi, moderată asupra tulpinilor bacteriene Gram-pozitive de *S. aureus*, mai bine protejate prin structura complexă a peretelui lor celular, și slabă împotriva fungilor oportuniști (*C. albicans*), tulpini microbiene relevante pentru siguranța microbiologică a alimentelor, cosmeticelor și pentru sănătatea umană, activitate antimicrobiană apreciată (subiectiv) printr-o densitate microbiană mare (>100UFC/mL) în plăcile Petri cultivate cu microorganismul de testat.

### **8.3.2. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE A COMPOZITELOR C2, C3, C11, C12**

#### **8.3.2.1. MATERIALE ȘI METODE**

Materialele utilizate în studiul microbiologic sunt reprezentate de 4 compozite semisolide propuse de noi, a căror formulare farmaceutică și preparare a fost descrisă în Capitolul 5 "Realizarea unor formulări semisolide cu aplicație topică cu extract din cafea și cafeina de sinteză" al prezentei teze de doctorat.

Activitatea antimicrobiană pe compozite s-a testat pentru aceleași tulpini de referință: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 - Gram-pozitivă; *Escherichia coli* ATCC 25922 - Gram-negativă și pe o specie levurică *Candida albicans* ATCC10231.

Pentru efectuarea testelor biologice, tulpinile bacteriene au fost cultivate pe mediul de cultură Plate Count Agar (PCA), la temperatura de 37°C ±0.5, timp de 22 ±2 de ore. Evaluarea cantitativă a activității antimicrobiene s-a realizat prin metoda orificiilor. Citirea și interpretarea rezultatelor a fost făcută doar calitativ, prezența oricărei zone de inhibiție fiind interpretată ca sensibilitate (S), iar absența acesteia ca rezistență (R).

#### **8.3.2.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII**

Pentru testarea activității antimicrobiene a compozitelor C2, C3, C11 și C12, propuse de noi, prin metoda orificiilor s-a observat prezența activității antimicrobiene a compozitelor C2 și C3 (Fig. 8.12.) pe tipul de bacterie gram-pozitivă (*S. aureus*) la diametrul de 11mm, respectiv 15mm și pe tipul de bacterie gram-negativă (*E. coli*) la diametrul de 11mm, respectiv 15mm,

fapt evidențiat de existența unei arii de inhibiție în jurul preparatului ceea ce semnifică sensibilitatea bacteriană față de preparat.

În cazul formulărilor C11 și C12 (Fig. 8.13.) se observă o activitate antimicrobiană slabă pe tulpinile bacteriene de referință *S. aureus* 25923 (Gram-pozitivă) și *E. Coli* ATCC 25922 (Gram-negativă), fapt evidențiat de existența unei arii de inhibiție reduse la diametrul 11 mm și 15 mm în jurul preparatului ceea ce semnifică sensibilitatea bacteriană față de preparat. Această activitate antimicrobiană a compozitelor C11 și C12 se datorează probabil prezenței în compoziția lor a componentului sulfadiazina de argint. *C. albicans* a manifestat cea mai mare rezistență la acțiunea compozitelor C2, C3, C11 și C12 (Fig. 8.12. dreapta, Fig. 8.13. dreapta) fapt evidențiat de lipsa haloului de inhibiție în jurul orificiului de dispunere a compozitului, indiferent de diametrul acestuia.



Fig. 8.12. Rezultatele obținute pentru determinarea activității antimicrobiene a compozitelor C2 și C3 pe cele trei tulpini microbiene testate



Fig. 8.13. Rezultatele obținute pentru determinarea activității antimicrobiene a compozitelor C11 și C12 pe cele trei tulpini microbiene testate

## CAPITOLUL 9

### CONCLUZII GENERALE

#### 9.1. STUDII COMPARATIVE PRIVIND DETERMINAREA CARACTERISTICILOR FIZICO-CHIMICE ȘI FITOCHIMICE DIN CAFEAUA VERDE ARABICA ȘI ROBUSTA

În urma analizelor, din acest capitol se pot trage următoarele concluzii:

- Din descrierea fitochimică pentru clasificarea botanică a cafelei și caracterizarea probelor solide de cafea verde am tras concluzia că, C. Arabica și C. Robusta (*Canephora*) diferă în multe feluri, drept urmare, condițiile de prelucrare, climatul ideal

de creștere, aspectele fizice și caracteristicile infuziei făcute poate afecta conținutul și compoziția chimică a probelor de cafea.

- Am obținut patru tipuri de extracte totale din cafea verde Arabica și Robusta folosind două metode de extracție: extracția la cald (CA1, CR1) și extracția la rece (CA2, CR2). Am concluzionat faptul că, temperatura folosită la extracție poate influența de asemenea compoziția chimică a cafelei.
- Am determinat cantitativ cafeina utilizând metoda de izolare cu cloroform. S-a observat o cantitate mai mare de cafeină în proba de cafea verde Robusta (182 mg cafeina / 100 g cafea) față de proba de cafea verde Arabica (154 mg cafeina / 100 g cafea) fiind în concordanță cu datele din literatură.
- A fost testată și validată o metodă HPLC prin evaluarea parametrilor statistici utilizați conform cerințelor ICH (ICH-Q2A/2003 și ICH-Q2B/2005) și conform standardului ISO 8466/1-2016. Am determinat cafeina în proba de cafea verde Arabica și în proba de cafea verde Robusta, iar această metodă s-a dovedit a prezenta o acuratețe mărită pentru determinarea alcaloidului purinic, cafeina, în ambele probe de cafea pentru care am obținut cele mai reprezentative valori. În concluzie și în urma analizelor putem confirma faptul că proba de cafea Robusta deține o concentrație mai mare de cafeină.
- Structura și morfologia cafeinei din extractele de cafea verde Arabica și Robusta a fost confirmată și prin analize spectrofotometrice (UV-VIS). În metoda de analiză spectrofotometrică (UV-VIS), extractele CA1, CA2, CR1, CR2 au fost dizolvate în diclormetan 25:25 (v/v) pentru o extracție mai bună a cafeinei din cafea și absorbanta a fost măsurată cu un Spectrofotometru VWR UV-6300PC în intervalul 200-500 nm. S-a confirmat prezența cafeinei în toate cele 4 extracte de cafea verde.
- Am analizat conținutul total de fenoli (TPC) folosind metoda Folin-Ciocalteu și în urma rezultatelor am obținut un conținut mai mare pentru probele de cafea extrase cu apă caldă. De asemenea am obținut în proba de cafea Robusta o concentrație mai mare de TPC față de proba Arabica. Conținutul de polifenoli generează o activitate antioxidantă semnificativă pentru forma farmaceutică în care se vor încorpora extractele de cafea verde.
- Un aspect foarte important a fost identificarea conținutului de minerale prin metode spectrale de absorbție atomică. S-au identificat Fe, Cu, Zn, Ca, Mg, K, Na în ambele



probe de cafea verde. Mn a fost singurul element care a fost absent în proba de cafea Robusta. Concluzia acestei determinări ne indica faptul că probele de cafea verde Arabica și Robusta reprezintă o sursă foarte importantă al următoarelor elemente: Ca, Mg, K, Na și Zn. Din analiza conținutului de minerale, am observat concentrații sub limita de detecție pentru Cr, Ni, Cd, Pb din ambele tipuri de cafea, toxice pentru organism, fapt ce confirmă că, proba de cafea verde prezintă elemente benefice pentru sănătatea umană și poate avea un potențial de utilizare în formularea unor noi preparate cu aplicație topică;

## **9.2. REALIZAREA UNOR FORMULĂRI SEMISOLIDE CU APLICAȚIE TOPICĂ CU EXTRACT DIN CAFEA ȘI CAFEINA DE SINTEZĂ**

Din aceste studii au fost evidențiate următoarele aspecte:

- Am conceput și am dezvoltat 12 preparate farmaceutice semisolide (C1-C12) pentru aplicații topice care au în compoziție extract apos obținut din boabele de cafea verde, boabele de cafea prăjită dar și cafeină de sinteză. Am elaborat aceste preparate având ca obiectiv obținerea de noi compozite cu o eficiența terapeutică mărită și accentuată de fiecare component în parte pentru a obține o potențială acțiune anticelulitică și antioxidantă.
- Am obținut extractele totale din boabele de cafea verde și prăjită folosind apa distilată la trei temperaturi diferite: fierbinte, caldă, rece. Toate extractele au fost proaspăt preparate înaintea introducerii în formulările semisolide.
- În final, în funcție de gradul de dispersie al substanței medicamentoase în baza de unguent, am obținut unguente-emulsii tip H/L: C1, C2, C3, și L/H: C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12;
- Referitor la caracteristicile organoleptice, toate cele 12 compozite farmaceutice pe care le-am conceput prezintă: un aspect omogen pentru toate probele, mirosul caracteristic componentelor, încadrându-se în prevederile F.R. X. în ceea ce privește consistența și omogenitatea.
- Referitor la valoarea pH-ului, toate cele 12 compozite farmaceutice au valori ale pH-ului care s-a încadrat în limitele impuse de F.R. X., fiind cuprins între 4.92- 7.58, apropiat de pH-ul fiziologic al pielii.

- Referitor la capacitatea de etalare, toate cele 12 compozite farmaceutice au fost analizate prin metoda lui P. Ojeda și S Arbussa. S-a evidențiat influența extractelor apoase obținute din cafeaua Arabica și Robusta cu încadrarea în domeniul specific preparatelor semisolide, prezentând o bună capacitate de întindere specifică preparatelor semisolide pentru aplicații topice.

### **9.3. STUDII COMPARATIVE PRIVIND COMPORTAMENTUL REOLOGIC AL FORMULĂRILOR SEMISOLIDE CU CAFEINĂ OBȚINUTE**

În urma studiilor reologice realizate pe cele 12 preparate concepute și dezvoltate în Teza de doctorat au fost evidențiate următoarele aspecte:

- Din analiza curbelor de curgere și a reogramelor obținute se constată că toate cele 12 creme au un comportament reologic de fluid nenenewtonian, pseudoplastic, tixotrop.
- Comportamentul reologic al celor 12 compozite obținute respectă legea puterii dată de modelul Ostwald de Waele.
- Toate formulările obținute sub formă de unguente-emulsii tip H/L (C1, C2, C3) sau L/H (C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12) luate în studiu, având caracter reologic, pseudoplastic și indicii de curgere  $n < 1$ , prezintă o scădere a vâscozităților aparente, odată cu creșterea vitezelor de forfecare;
- În ceea ce privește indicii de consistență al celor 12 compozite, cea mai mare valoare ca medie o înregistrează crema C2 ( $K=13.32$ ), iar cea mai mică valoare medie o înregistrează crema C5 ( $K=9.266$ ). În concluzie preparatul C2 prezintă o consistența mai mare datorită faptului că acest compozit este singurul care deține extract de cafea prăjită Arabica 20% și reprezintă un tip de unguent-emulsie H/L.
- În urma studiilor reologice al cremelor preparate cu extracte din cafea Robusta și anume C3, C6, C9, C12 constatăm din analiza reogramelor și a curbelor de curgere că aceste compozite prezintă caracter tixotrop excepție făcând preparatul C9 care nu prezintă buclă de histerezis, fiind singurul preparat care nu prezintă fenomenul de tixotropie. Vâscozitatea cea mai mare o prezintă crema C3 cu un interval de 28206-783857 cP urmat de crema C12 cu un interval de 22429-63700 cP.
- În urma studiilor reologice al cremelor preparate cu extracte din cafea Arabica și anume: C2, C5, C8 și C11, cel mai mic interval de vâscozitate îl prezintă crema C5 (980-6750

cP) care conține alcool etilic, mentol cristale și un conținut mai mare de apă în compoziție, iar cel mai mare interval de vâscozitate îl prezintă crema C11 (3500-33519 cP) care conține cel mai mic conținut de apă în compoziție și cea mai mare cantitate de extract de cafea verde Arabica.

- În urma studiilor reologice al cremelor preparate cu cafeină pură considerate ca probe de comparație și anume: C1, C4, C7, C10, cel mai mic interval de vâscozitate îl prezintă crema C4 (1650-18350 cP), iar cel mai mare interval de vâscozitate îl prezintă crema C10 (10094-74590 cP), având o cantitate mai mare de bază de unguent față de crema C4.

#### **9.4. STUDII COMPARATIVE PRIVIND ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ A EXTRACTELOR DE CAFEA ARABICA ȘI ROBUSTA ȘI UNOR COMPOZITE FARMACEUTICE CU CAFEINĂ OBȚINUTE**

Din acest capitol se poate concluziona că:

- Am realizat studii comparative privind capacitatea antioxidantă a extractelor totale de cafea, precum și a unor formulări farmaco-cosmetice realizate care conțin cafeină sub formă de extracte din cafeaua Arabica și Robusta.
- Am analizat capacitatea antioxidantă totală folosind două tipuri de analize: metoda DPPH și metoda fotochemiluminescenței.
- În urma metodei DPPH, din rezultatele obținute, cea mai mare valoare a fost pentru concentrația de 4 mg/mL pentru toate extractele de cafea verde. Acest rezultat indică o valoare mai mare de captare a DPPH cu creșterea concentrației extractului în soluțiile analizate, adică o micșorare importantă a moleculelor radicalilor 2,2-difenil-1-picrililhidrazil.
- Valorile obținute în urma analizei DPPH (%) a extractelor apoase de cafea verde Arabica și Robusta a variat de la 44,78% la 91,82%. Extractele de cafea preparate prin infuzie cu apă caldă CA1, CR1 au capacitate antioxidantă mai mare decât extractele preparate cu apă rece CA2, CR2, ceea ce indică mai mulți compuși care scindează radicalii și concentrații mai mari de astfel de compuși au fost prezenți în probele de cafea extrase la cald.

- În urma rezultatelor obținute prin metoda DPPH, extractul din cafeaua verde Robusta deține cea mai mare valoare a capacității de captare a DPPH pentru toate concentrațiile, iar aceste rezultate proprii ne indică și faptul că extractul de cafea Robusta prezintă o activitate antioxidantă mai mare decât extractul de cafea Arabica.
- Metoda fotochemiluminescenței pentru evidențierea capacității antioxidante (TEAC) a fost aplicată pentru extractele apoase obținute din cafea prăjită (CA0, CR0), din cafea verde (CA1, CR1, CA2, CR2) și pentru compozitele farmaceutice semisolide C2, C3, C11, C12 luate în studiu, folosind Trolox ca standard.
- În cazul extractelor de cafea verde și prăjită s-a determinat TEAC pentru soluția stoc și pentru diferite diluții ale soluției stoc 1:10, 1:100, respectiv 1:200 cu reactivul R1. În urma rezultatelor obținute toate extractele luate în lucru au prezentat activitate antioxidantă. Cele mai bune valori, în cazul tuturor probelor, s-au înregistrat la diluția cea mai mare: pentru CA0 la diluția 1:200, pentru CR0 la diluția 1:100; pentru CA1 la diluția 1:100; pentru CR1 la diluția 1:100; pentru CA2 la diluția 1:100 și pentru CR2 la diluția 1:100.
- În urma acestor rezultate putem să subliniem faptul că, activitatea antioxidantă a cafelei Robusta verde este mai mare decât cea a cafelei Arabica verde. Rezultatul obținut pentru probele de cafea prăjită a fost interesant și semnificativ deoarece la proba de cafea Arabica prăjită - CA0, activitatea antioxidantă pare să se modifice în urma procesului de prăjire, obținându-se o valoare de (7.525 nanomoli unitati Trolox / volum proba) depășind chiar și cafeaua Robusta prăjită la care am obținut o valoare de (5.731 nanomoli unitati Trolox / volum proba).
- Cercetările privind activitatea antioxidantă a compozitelor preparate în laborator ne demonstrează că formulările C2, C11, C12 prezintă activitate antioxidantă foarte bună la un volum de 5μL. Singurul preparat care a necesitat un volum suplimentar în această analiză este compozitul C3 care la volumul de 5 μL prezintă inhibiție și TEAC mai scăzută, iar la volumul de 10 μL a prezentat inhibiție și TEAC bună la mărirea concentrației probei.
- Acest capitol de cercetare ne confirmă faptul că extractele din cafea verde și prăjită, prezintă capacitate antioxidantă, și introduse în formulări farmaceutice propuse de către noi, asociate cu diferite substanțe, își mențin o proprietate antioxidantă foarte bună și pot

fi utilizate cu succes în formulări farmaceutice cu scop anticelulitic, antirid, și de a oferi fermitate pielii.

## **9.5. STUDII COMPARATIVE PRIVIND ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A EXTRACTELOR DE CAFEA ARABICA ȘI ROBUSTA ȘI A COMPOZITELOR FARMACEUTICE CU CAFEINĂ**

Din acest capitol se poate concluziona că:

- Au fost efectuate teste privind determinarea gradului de contaminare microbiană al extractelor totale obținute din boabele de cafea verde și prăjită, și de asemenea au fost efectuate cercetări privind efectul antimicrobian al cafelei asupra microorganismelor patogene (*S. aureus* ATCC 25923) și condiționat patogene (*E. coli* ATCC 25922 și *C. albicans* ATCC 10231) cu scopul de a evidența și de a evalua eventualul potențial antimicrobian al probelor de cafea, sub formă de extracte apoase brute și sub formă de compozite farmaceutice.
- În urma testelor privind determinarea gradului de contaminare microbiană, rezultatele experimentale obținute au evidențiat contaminarea microbiană a tuturor probelor și au impus, în consecință, sterilizarea prin filtrare, înainte de testările ulterioare pentru evaluarea activității antimicrobiene, atât în cazul probei CR2 (peste 3000 UFC/mL înainte de filtrare) și CA2 (110 UFC/mL), cât și în cazul probelor de extract apos de cafea CR0 (2UFC/mL) și CA0 (4UFC/mL), care au avut un grad de contaminare foarte scăzut.
- Am evidențiat faptul că nivelul de contaminare microbiană este diferit pentru extractele luate în studiu, în funcție de tipul de cafea folosit, verde sau prăjită, dar și de alte condiții, cum ar fi prelucrarea umedă sau uscată. Cafeaua prăjită este mult mai puțin contaminată, comparativ cu cafeaua verde, datorită unei sterilizări termice (incomplete) prin procedura de prăjire. Condițiile de lucru folosite, temperatura apei distilate folosite la prepararea extractelor, dar și tipul de cafea utilizat, sunt factorii care au determinat contaminarea microbiană. Astfel, pentru toate probele reprezentate de extractele apoase de cafea verde (CA2 și CR2) și prăjită (CA0 și CR0) s-a impus necesitatea sterilizării înainte de a putea fi adăugate în compozitele farmaceutice.

- Am realizat cercetări privind determinarea activității antimicrobiene a compușilor biologic activi din extractele apoase de cafea CA0, CR0, CA2, CR2. Pe baza rezultatelor obținute, putem aprecia că, în cazul extractelor apoase din cafeaua prăjită (CA0, CR0), compușii bioactivi extrași exercită o activitate antimicrobiană eficientă pe tulpinile bacteriene Gram-negative de *E. coli*, al căror perete celular pare să fie sensibil la acești compuși biologic activi, moderată asupra tulpinilor bacteriene Gram-pozitive de *S. aureus*, mai bine protejate prin structura complexă a peretelui lor celular, și slabă împotriva fungilor oportuniști (*C. albicans*), tulpini microbiene relevante pentru siguranța microbiologică a alimentelor, cosmeticelor și pentru sănătatea umană. Pentru extractele de cafea verde (CA2, CR2) am obținut o activitate antimicrobiană foarte slabă.
- În cazul celor 4 formulări farmaceutice semisolide pe baza de extracte apoase obținute din cafeaua verde și prăjită, acestea au exercitat un efect antimicrobian diferit asupra tulpinilor de referință *S. aureus*, *E. coli* și *C. albicans*.
- Prin metoda orificiilor se observă că, doar 2 dintre compozitele semisolide preparate C2 și C3 au prezentat o activitate antimicrobiană crescută pe tulpinile bacteriene de referință *S. aureus* 25923 (Gram-pozitivă) și *E. Coli* ATCC 25922 (Gram-negativă), fapt evidentiat de existența unei arii de inhibiție în jurul preparatului semnifică sensibilitatea bacteriană față de preparat. În cazul compozitelor C11 și C12 care au în compoziție extract CA2 și CR2 și sulfadiazina de argint putem observa o activitate antimicrobiană scăzută datorită rezultatului în ceea ce privește activitatea antimicrobiană testată pe aceleași tulpini patogene (*S. aureus*, *E. coli* și *C. albicans*), al extractele apoase CA2 și CR2 care prezintă o activitate antimicrobiană foarte slabă.
- Plecând de la obiectivul de a obține formulări farmaceutice cu activitate anticelulitică, putem concluziona că o bună formulare necesită o activitate antimicrobiană evidentă. În urma prezentului studiu din Capitolul 8, activitatea antimicrobiană pentru noile formulări trebuie asigurată prin utilizarea unor componente care să confere activitate antimicrobiană alături de extractele de cafea verde. În cazul formulărilor studiate de noi, acest lucru îl asigură utilizarea sulfadiazinei de argint.
- Pe de altă parte, în urma analizelor microbiologice putem concluziona că extractele de cafea Arabica și Robusta, prăjită mediu, pot fi utilizate ca potențiali aditivi

antimicrobieni conservanți pentru diferite aplicații din domeniul medical, alimentar și farmaco-cosmetic.

### BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Anghel Bușuricu A. F., Negreanu Pârjol T., (2008), Chemical composition of roasted coffee and corresponding coffee beverages , Jurnal TMJ, Volumul 58, Nr. 2, p. 407-412.
- Antonio A. G., Moraes R. S., Perrone D., Maia L. C., Santos K. R. N., Iorio N. L. P., et al. (2010). Species, roasting degree and decaffeination influence the antibacterial activity of coffee against *Streptococcus mutans*. Food Chemistry, 118, p. 782–788.
- Belay A., Ture K., Redi M. and Asfaw A., (2008). Measurement of caffeine in coffee beans with UV/Vis spectrometer. Food Chemistry. 108: p. 310–315.
- Farah A. (2017). Nutritional and health effects of coffee. In Achieving Sustainable Cultivation of Coffee; Lashermes, P., Ed.; Burleigh Dodds Science Publishing: Cambridge, UK; ISBN 978-1-78676-152-1., p. 1–31.
- Indian Standard, IS 16028. (2012) Coffee and Coffee Products — Determination of the Caffeine Content Using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) — Reference Method.
- ISO Standard 20481 (2008). Coffee and coffee products – Determination of caffeine content by HPLC, Jan. 2011 (ISO 20481).

### LISTA CU LUCRĂRILE ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

#### LUCRĂRI PUBLICATE ÎN REVISTE COTATE BDI

1. **Luiza-Mădălina Caracostea**, Rodica Sîrbu, Florica Bușuricu. *Determination of caffeine content in Arabica and Robusta green coffee of Indian origin.* (2020). European Journal of Medicine and Natural Sciences, [S.I], Vol. 4(3). ISSN 2601-6400, p. 16-24.
2. **Luiza-Mădălina Caracostea**, Rodica Sîrbu, Anca Cristina Lepădatu. *Microbiological comparative studies of crude aqueous extracts from Arabica and Robusta coffee.* (2020). European Journal of Medicine and Natural Sciences, [S.I], Vol. 4(3). ISSN 2601-6400, p. 25-32.

## LUCRĂRI PUBLICATE ÎN VOLUME ALE UNOR CONFERINȚE COTATE ISI

3. **Caracostea Luiza (Cima)**, Sîrbu Rodica. *The public health impact of Caffeine in Coffee*. Nordsci Conference on social sciences 2018. NORDSCI2018, 17-19 July, Helsinki, Finland, Conference Proceedings, Vol. 1, ISBN 2603-4107, p. 491-498.
4. **Caracostea Luiza Mădălina**, Sîrbu Rodica, *Characterization of pollutant compounds in coffee*, 15<sup>th</sup> International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2015, 18-24 June, 2015, Bulgaria, Conference Proceedings, Vol. I, ISBN 978-619-7105-42-1, p. 319-326.
5. Cristina-Luiza Erimia, **Caracostea Luiza Mădălina**, *The limitation of the free movement of goods on the internal market of the European Union justified by environmental protection*, 15<sup>th</sup> International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2015, 18-24 June, 2015, Bulgaria, Conference Proceedings, Vol. II, ISBN 978-619-7105-40-7, p. 811-816.

## LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE REALIZATE ÎN CADRUL PROGRAMULUI POSDRU ȘI PREZENTATE LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE

6. **Luiza Caracostea**, Dumitrescu Ana-Maria, Cadâr Emin, Cristina-Luiza Erimia, Rodica Sîrbu, *Identification of toxic compounds in the technology of processing Coffee*, The first edition of the International Conference "From Science to Guidance and Practice" 19th - 21st October 2015, Bucharest, Romania, ISBN 978-973-708-854-3, poster presentation.