

---

PhD THESIS SUMMARY

Implications of extraction  
methods in the phytochemical  
and biological profiles of several  
plant materials presenting  
antitumor activity

---

---

PhD student **Octavia Dorina Gligor**

---

PhD supervisor Prof. dr. **Gianina Crișan**



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	15
<b>STATE OF THE ART</b>	
<b>1. General view on extraction methods</b>	19
1.1. Conventional extraction methods	19
1.1.1. Maceration	21
1.1.2. Soxhlet extraction	22
1.2. Innovative extraction methods	23
1.2.1. Ultrasound-assisted extraction	24
1.2.2. Turboextraction	25
<b>2. Bioactive compounds of plant origin</b>	27
2.1. General view on plant bioactive compounds	27
2.1.1. Polyphenolic compounds	28
2.1.2. Terpenoid compounds	32
2.1.3. Sterolic compounds	34
2.2. Plant bioactive compounds presenting antitumor activity	36
<b>3. Plant species containing bioactive compounds that present antitumor activity, selected for study</b>	37
3.1. <i>Trifolium pratense</i> L.	37
3.1.1. Historical and botanical aspects of <i>Trifolium pratense</i> L.	37
3.1.2. Bioactive compounds from <i>Trifolium pratense</i> L. and their biological effects. A general view	38
3.1.3. Antitumor compounds from <i>Trifolium pratense</i> L.	39
3.2. <i>Xanthium spinosum</i> L.	40
3.2.1. Historical and botanical aspects of <i>Xanthium spinosum</i> L.	40
3.2.2. Bioactive compounds from <i>Xanthium spinosum</i> L. and their biological effects. A general view	41
3.2.3. Antitumor compounds from <i>Xanthium spinosum</i> L.	42
3.3. <i>Coffea arabica</i> L. (green coffee beans)	45
3.3.1. Historical and botanical aspects of green coffee beans	46
3.3.2. Bioactive compounds from green coffee beans	46
3.3.3. Antitumor compounds from green coffee beans	47
<b>PERSONAL CONTRIBUTIONS</b>	
<b>1. General objectives</b>	51
<b>2. Study 1. Red clover and the importance of extraction processes</b>	53

## **- ways in which extraction techniques and parameters affect *Trifolium pratense* L. extracts' phytochemical profile and biological activities**

2.1. Introduction	53
2.2. Materials and Methods	54
2.2.1. Plant material	54
2.2.2. Chemicals, reagents, and devices	54
2.2.3. Selected extraction methods	54
2.2.4. Determination of total phenolic content (TPC)	56
2.2.5. Determination of total flavonoid content (TFC)	56
2.2.6. Antioxidant activity evaluation	56
2.2.7. HPLC-MS analysis	57
2.2.8. Assessment of antimicrobial activity	58
2.2.9. Determination of biological activities	59
2.3. Results	60
2.3.1. Effect of extraction parameters on TPC and TFC values	61
2.3.2. Effect of extraction parameters on antioxidant activity	62
2.3.3. HPLC-MS analysis of the extracts	63
2.3.4. Evaluation of antimicrobial activity	70
2.3.5. Evaluation of oxidative stress and inflammation markers	71
2.4. Discussion	72
2.5. Conclusions	75
<b>3. Study 2. Influences of different extraction techniques and their respective parameters on the phytochemical profile and biological activities of <i>Xanthium spinosum</i> L. extracts</b>	<b>77</b>
3.1. Introduction	77
3.2. Materials and Methods	78
3.2.1. Plant material	78
3.2.2. Chemicals and reagents	78
3.2.3. Extraction processes	79
3.2.4. Determination of TPC	80
3.2.5. Determination of TFC	80
3.2.6. Antioxidant activity analysis	80
3.2.7. HPLC-MS analysis	81
3.2.8. Determination of antimicrobial activity	82
3.2.9. Evaluation of biological activities	83

3.3. Results	84
3.3.1. Influence of extraction parameters on TPC and TFC values	85
3.3.2. Influence of extraction parameters on antioxidant capacity	86
3.3.3. HPLC-MS analysis of the extracts	87
3.3.4. Determination of antimicrobial activity	92
3.3.5. Assessment of oxidative stress and proinflammatory markers	93
3.4. Discussion	95
3.5. Conclusions	96
<b>4. Study 3. The effect of extraction methods on phytochemicals and biological activities of green coffee beans extracts</b>	99
4.1. Introduction	99
4.2. Materials and Methods	100
4.2.1. Plant material, reagents, and laboratory equipment	100
4.2.2. Extraction methods	101
4.2.3. Assessment of TPC	102
4.2.4. Assessment of TFC	102
4.2.5. <i>In vitro</i> antioxidant capacity	102
4.2.6. Chromatographic analysis	103
4.2.7. Antimicrobial activity evaluation	104
4.2.8. Assessment of biological activities	105
4.3. Results	106
4.3.1. Influence of extraction parameters on TPC and TFC values	106
4.3.2. Influence of extraction parameters on <i>in vitro</i> antioxidant capacity	107
4.3.3. HPLC-MS analysis of the extracts	108
4.3.4. Determination of antimicrobial activity	111
4.3.5. Assessment of oxidative stress and inflammatory markers	113
4.4. Discussion	115
4.5. Conclusions	118
<b>5. Study 4. An <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> assessment of antitumor activity of extracts derived from three well-known plant species</b>	119
5.1. Introduction	119
5.2. Materials and Methods	121
5.2.1. Chemicals, reagents, and equipment	121
5.2.2. Plant extracts	121

---

5.2.3. HPLC-MS analysis of the plant extracts	122
5.2.4. <i>In vitro</i> assessment of antioxidant and antitumor activities	124
5.2.5. <i>In vivo</i> assessment of the antitumor activity	124
5.3. Results	127
5.3.1. HPLC-MS analysis of the extracts	127
5.3.2. Evaluation of biological activities in cell culture for the <i>X. spinosum</i> L. extracts	133
5.3.3. Evaluation of biological activities in cell culture for the <i>T. pratense</i> L. extracts	136
5.3.4. Evaluation of biological activities in cell cultures for green coffee bean extracts	138
5.3.5. <i>In vivo</i> antitumor activity assessment	
5.4. Discussion	127
5.5. Conclusions	
<b>6. General conclusions</b>	155
<b>7. Originality and innovative contributions of the thesis</b>	157
<b>REFERENCES</b>	159

**Keywords:** *Trifolium pratense* L., *Xanthium spinosum* L., green coffee beans, *Coffea arabica* L., antitumor activity, anti-inflammatory activity, antioxidant activity, extraction methods

## INTRODUCTION

The many known forms of cancer treatment are feared by their induced, often, grave side effects as well as chemoresistance. Phytotherapy stands as an alternative, with clinically tested and familiar plant-derived bioactive compounds. The present PhD thesis is structured within two parts. The first, representing the *State of the Art*, and the second, which displays the *Personal Contributions* offered. The *State of the Art* encompasses, firstly, a general view of extraction methods, followed secondly by a discussion over plant bioactive compounds. The third chapter contains botanical and historical aspects of the three plant species selected for study:

*Trifolium pratense* L., *Xanthium spinosum* L., and *Coffea arabica* L. Thus, the first study included in the *Personal Contributions*, is focused on the influence of extraction techniques and parameters over extracts obtained from *Trifolium pratense* L: the phytochemical profile of the extracts, the *in vivo* assessment of the antioxidant and anti-inflammatory activities in a rat inflammation model induced by carrageenan were performed. The second study investigated similar aspects, only for the species *Xanthium spinosum* L. The third study was focused on green coffee beans. The fourth study implied the *in vitro* evaluation of the antitumor and antioxidant effect of 3 selected extract from each of the plant species, in human cancer cell lines. The *in vivo* antitumor activity of the extracts was also assessed in a mouse model with Ehrlich ascites, in order to attempt a comparison between the respective biological responses. The studies revealed the importance of the effect of extraction methods and parameters over the phytochemical profiles and biological activities of plant extracts.

## STATE OF THE ART

Extraction methods serve as a critical part in the processes of the scientific investigation of any medicinal plant leading up to the manufacturing of industrialized herbal products. Conventional extraction methods are based on the extraction of bioactive compounds from a solid plant material using a selected solvent, while heat and/or mixing are applied. Over recent decades, attempts have been made to improve their disadvantages. Innovative extraction methods present low energy consumption, obtaining biodegradable, high purity extracts, through simplified processes, the use of green, alternative solvents. The three main classes of plant bioactive compounds are principally considered to be polyphenols, alkaloids, and terpenoids. Polyphenolic compounds, for example, have been researched for their antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, antiviral activities, as well as their cardioprotective effect, antidiabetic, and antitumor activity. The bioactive compounds from

three plants were studied: *Trifolium pratense* L., *Xanthium spinosum* L., and green coffee beans from the species *Coffea arabica* L.

## PERSONAL CONTRIBUTIONS

The objective of this thesis consisted in studying the influence of extraction methods and parameters over the phytochemical profile of the three selected plant species.

### **Study 1. Red clover and the importance of extraction processes – ways in which extraction techniques and parameters affect *Trifolium pratense* L. extracts' phytochemical profile and biological activities**

The purpose of this study was to gain an insight into the manner in which several extraction processes affected bioactive compound yield, and subsequently to assess several of their biological activities. Red clover extracts were obtained using maceration, Soxhlet extraction, turbo-extraction, ultrasound-assisted extraction, and a combination of the last two. The resulting extracts were analyzed for total phenolic and flavonoid content. The extracts presenting the best results were subjected to a phytochemical assessment by way of HPLC-MS analysis. After a final sorting based on the phytochemical profiles of the extracts, the samples were assessed for their antimicrobial activity, anti-inflammatory activity, and oxidative stress reduction potential, using animal inflammation models. The Soxhlet extraction yielded the most satisfactory results both, with the ultrasound-assisted extraction offering comparable yields. The extracts showed a high potential against Gram-negative bacteria and induced a modest antioxidant effect on the experimental inflammation model in Wistar rats.

### **Study 2. Influences of different extraction techniques and their respective parameters on the phytochemical profile and biological activities of *Xanthium spinosum* L. Extracts**

The aim of this study was to identify possible influences of extraction methods as well as extraction parameters on the phytochemical and biological profiles of *Xanthium spinosum* L.

extracts. The same extraction methods were selected as before. The phytochemical profile was determined for the best-yielding extracts using HPLC-MS analysis. The biological activities were evaluated as in the previous study. Comparable results were achieved with Soxhlet extraction and ultrasound-assisted extraction, both surpassing all other tested methods in terms of yields. Bioactive compound concentrations tended to increase with the increase in extraction time and temperature. These maximal values lowered once the degradation points of the bioactive compounds were reached. Extracts demonstrated good protection against Gram-negative bacteria. Additionally, they provided good cellular protection and increased the antioxidant defense in the analyzed rat plantar tissue.

### **Study 3. The effect of extraction methods on phytochemicals and biological activities of green coffee beans extracts**

The objectives of the present study consisted of identifying the impact of extraction methods and parameters held over the phytochemistry and biological activities of green coffee beans. Identical extraction processes were performed. The extracts were also subjected to the same means of analysis as in the previous study. *In vivo*, a model of plantar inflammation in Wistar rats was used to determine antioxidant activity, by evaluating the oxidative stress reduction potential, and anti-inflammatory activity. *In vitro* antimicrobial activity was also determined. The Soxhlet extraction and ultrasound-assisted extraction gave the highest bioactive compound yields. Regarding the antioxidant activity, ultrasound-assisted extraction reached the highest levels. Chlorogenic acid was present in the highest concentration in the Soxhlet extracts. Sterolic compounds were found in high concentrations throughout all the analyzed extracts. A proportional increase between yields and extraction parameter values was observed. Increased inhibition of Gram-negative bacteria was observed. The 60 min Soxhlet extract presented a significant *in vivo* antioxidant activity, with a slight anti-inflammatory activity.



#### **Study 4. An *in vitro* and *in vivo* assessment of antitumor activity of extracts derived from three well-known plant species**

One of the objectives of this study consisted in the assessment of the antitumor activity of several extracts from three selected plant species: *Xanthium spinosum* L., *Trifolium pratense* L., and *Coffea arabica* L., and also offer a comparative study of this biological activity, with the aim of establishing the superior herbal extract regarding the antitumor benefits. The selected extracts were screened *in vitro* for their antitumor activity and antioxidant potential on two cancer cell lines. *In vivo* assessment of antitumor activity in an Ehrlich ascites mouse model was performed. The *X. spinosum* L. extracts presented the strongest anticancerous and antioxidant effects. Ascites cell viability decreased after *T. pratense* L. and green coffee bean extracts administration while the oxidative stress was important in tumor samples after *T. pratense* L. or cyclophosphamide administration associated with *X. spinosum* L. and *T. pratense* L. extracts. These results suggested that *T. pratense* L. or *X. spinosum* L. extracts in combination with chemotherapy can induce lipid peroxidation in tumor cells and decreased the tumor viability especially, *T. pratense* L. extract.

#### **General conclusions and originality of the thesis**

By means of the accomplished studies, the importance of phytotherapy as an alternative in the integrative oncological therapy was highlighted, due to the antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of the three studied plant species: *Trifolium pratense* L., *Xanthium spinosum* L., and *Coffea arabica* L.

The originality of the thesis consists in the development of analytical methods for the qualitative and quantitative determination of several xanthanolides and cafeoylquinic acids and the demonstration of their pharmacological properties. The *Personal*

---

REZUMAUL TEZEI DE DOCTORAT

Tehnici de extracție cu implicație  
în profilul fitochimic și biologic  
al unor produse vegetale cu  
activitate antitumorală

---

Doctorand **Octavia Dorina Gligor**

---

Conducător de doctorat Prof. dr. **Gianina Crișan**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	15
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Perspective generale asupra metodelor de extracție</b>	19
1.1. Metode convenționale de extracție	19
1.1.1. Macerarea	21
1.1.2. Extracția Soxhlet	22
1.2. Metode inovative de extracție	23
1.2.1. Extracția asistată de ultrasunete	24
1.2.2. Turboextracția	25
<b>2. Compuși bioactivi de origine vegetală</b>	27
2.1. Perspective generale asupra compușilor bioactivi de origine vegetală	27
2.1.1. Compuși polifenolici	28
2.1.2. Compuși terpenici	32
2.1.3. Compuși sterolici	34
2.2. Compuși bioactivi de origine vegetală cu activitate antiumorală	36
<b>3. Specii de plante selectate pentru studiu ce conțin compuși bioactivi cu activitate antiumorală</b>	37
3.1. <i>Trifolium pratense</i> L.	37
3.1.1. Aspecte istorice și botanice ale <i>Trifolium pratense</i> L.	37
3.1.2. Compușii bioactivi din <i>Trifolium pratense</i> L. și efectele lor biologice. Perspective generale.	38
3.1.3. Compușii antitumorali din <i>Trifolium pratense</i> L.	39
3.2. <i>Xanthium spinosum</i> L.	40
3.2.1. Aspecte istorice și botanice ale <i>Xanthium spinosum</i> L.	40
3.2.2. Compușii bioactivi din <i>Xanthium spinosum</i> L. și efectele lor biologice. Perspective generale.	41
3.2.3. Compușii antitumorali din <i>Xanthium spinosum</i> L.	42
3.3. <i>Coffea arabica</i> L. (semințe neprăjite de cafea)	45
3.3.1. Aspecte istorice și botanice ale semințelor neprăjite de cafea	46
3.3.2. Compușii bioactivi din semințele neprăjite de cafea	46
3.3.3. Compușii antitumorali din semințele neprăjite de cafea	47
<b>CONTRIBUȚII PERSONALE</b>	
<b>1. Obiective generale</b>	51
<b>2. Studiul 1. Trifoiul roșu și impotanța proceselor de extracție -</b>	53

## **moduri în care metodele și parametri de extracție influențează profilul fitochimic și activitățile biologice ale extractelor de *Trifolium pratense* L.**

2.1. Introducere	53
2.2. Material și Metodă	54
2.2.1. Produsul vegetal	54
2.2.2. Reactivi și aparatură	54
2.2.3. Metode de extracție selectate	54
2.2.4. Determinarea conținutului total de polifenoli (CTP)	56
2.2.5. Determinarea conținutului total de flavonoide (CTF)	56
2.2.6. Evaluarea activității antioxidante	56
2.2.7. Analiza HPLC-MS	57
2.2.8. Evaluarea activității antimicrobiene	58
2.2.9. Determinarea activităților biologice	59
2.3. Rezultate	60
2.3.1. Efectul parametrilor de extracție asupra valorilor de CTP și CTF	61
2.3.2. Efectul parametrilor de extracție asupra activității antioxidante	62
2.3.3. Analiza HPLC-MS a extractelor	63
2.3.4. Evaluarea activității antimicrobiene	70
2.3.5. Evaluarea markerilor de stres oxidativ și de inflamație	71
2.4. Discuții	72
2.5. Concluzii	75
<b>3. Studiul 2. Influența diferitelor metode și parametri de extracție asupra profilului fitochimic și activităților biologice ale extractelor de <i>Xanthium spinosum</i> L.</b>	<b>77</b>
3.1. Introducere	77
3.2. Material și Metodă	78
3.2.1. Produsul vegetal	78
3.2.2. Reactivi	78
3.2.3. Metode de extracție	79
3.2.4. Determinarea CTP	80
3.2.5. Determinarea CTF	80
3.2.6. Analiza activității antioxidante	80
3.2.7. Analiza HPLC-MS	81
3.2.8. Determinarea activității antimicrobiene	82
3.2.9. Evaluarea activităților biologice	83

3.3. Rezultate	84
3.3.1. Influența parametrilor de extracție asupra CTP și CTF	85
3.3.2. Influența parametrilor de extracție asupra capacității antioxidante	86
3.3.3. Analiza HPLC-MS a extractelor	87
3.3.4. Determinarea activității antimicrobiene	92
3.3.5. Evaluarea markerilor de stres oxidativ și de inflamație	93
3.4. Discuții	95
3.5. Concluzii	96
<b>4. Studiul 3. Efectul metodelor de extracție asupra profilului fitochimic și activităților biologice ale extractelor de semințe verzi de cafea</b>	99
4.1. Introducere	99
4.2. Material și Metodă	100
4.2.1. Produsul vegetal, reactivi și echipament de laborator	100
4.2.2. Metodele de extracție	101
4.2.3. Evaluarea CTP	102
4.2.4. Evaluarea CTF	102
4.2.5. Capacitatea antioxidantă <i>in vitro</i>	102
4.2.6. Analiza cromatografică	103
4.2.7. Evaluarea activității antimicrobiene	104
4.2.8. Evaluarea activităților biologice	105
4.3. Rezultate	106
4.3.1. Influența parametrilor de extracție asupra CTP și CTF	106
4.3.2. Influența parametrilor de extracție asupra capacității antioxidante <i>in vitro</i>	107
4.3.3. Analiza HPLC-MS a extractelor	108
4.3.4. Determinarea activității antimicrobiene	111
4.3.5. Evaluarea markerilor de stres oxidativ și de inflamație	113
4.4. Discuții	115
4.5. Concluzii	118
<b>5. Studiul 4. Evaluarea <i>in vitro</i> și <i>in vivo</i> a activității antitumorale a trei specii de plante bine cunoscute</b>	119
5.1. Introducere	119
5.2. Material și Metodă	121

5.2.1. Reactivi și aparatură	121
5.2.2. Extractele vegetale	121
5.2.3. Analiza HPLC-MS a extractelor vegetale	122
5.2.4. Evaluarea <i>in vitro</i> a activităților antioxidante și antitumorale	124
5.2.5. Evaluarea <i>in vivo</i> a activității antitumorale	124
5.3. Rezultate	127
5.3.1. Analiza HPLC-MS a extractelor	127
5.3.2. Evaluarea activităților biologice pe linii celulare ale extractelor de <i>X. Spinosum</i> L.	133
5.3.3. Evaluarea activităților biologice pe linii celulare ale extractelor de <i>T. pratense</i> L.	136
5.3.4. Evaluarea activităților biologice pe linii celulare ale extractelor de semințe neprăjite de cafea	138
5.3.5. Evaluarea activității antitumorale <i>in vivo</i>	
5.4. Discuții	127
5.5. Concluzii	
<b>6. Concluzii generale</b>	155
<b>7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	157
<b>REFERINȚE BIBLIOGRAFICE</b>	159

**Cuvinte cheie:** *Trifolium pratense* L., *Xanthium spinosum* L., semințe neprăjite de cafea, *Coffea arabica* L., activitate antitumorală, activitate antiinflamatoare, activitate antioxidantă, metode de extracție

## INTRODUCERE

Numeroasele forme cunoscute de tratament ale cancerului sunt îngrijorătoare pentru efectele induse, adesea grave, precum și chimiorezistența acestora. Fitoterapia constituie o alternativă prin cunoștii compuși bioactivi de origine vegetală, testați clinic. Prezenta teză de doctorat este structurată în două părți. Prima, *Stadiul Actual al Cunoașterii*, și cea de-a doua, *Contribuțiile Personale*. *Stadiul Actual al Cunoașterii* cuprinde, în primul rând, o perspectivă generală asupra metodelor de extracție, urmată de o discuție asupra

compușilor bioactivi din plante. Cel de-al treilea capitol conține aspecte botanice și istorice asupra celor trei specii de plante selectate pentru studiu: *Trifolium pratense* L., *Xanthium spinosum* L. și *Coffea arabica* L. Astfel, primul studiu inclus în *Contribuțiile Personale*, este focalizat asupra influenței metodelor și parametrilor de extracție asupra extractelor obținute din specia *Trifolium pratense* L.: profilul fitochimic al extractelor, evaluarea *in vivo* a efectelor antioxidante și antiinflamatoare într-un model de inflamație indusă de caragenan la șobolani. Al doilea studiu a investigat aspecte similare, însă pentru specia *Xanthium spinosum* L. Al treilea studiu a fost centrat pe semințele neprăjite de cafea. Al patrulea studiu a implicat evaluarea *in vitro* a efectului antitumoral și antioxidant a 3 extracte selectate provenind de la fiecare specie vegetală asupra unor linii canceroase umane. Activitatea antitumorală *in vivo* a extractelor a fost, de asemenea, evaluată într-un model murin de ascită Ehrlich, pentru a stabili o comparație între răspunsurile biologice respective. Studiile au dezvăluit importanța efectului metodelor și parametrilor de extracție asupra profilului fitochimic și activităților biologice ale extractelor vegetale.

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Metodele de extracție servesc ca și o componentă critică în procesele științifice investigatorii ale oricărei specii vegetale, ducând până la producția de produse vegetale industrializate. Metodele convenționale de extracție au la bază extracția de compuși bioactivi dintr-o matrice vegetală solidă folosind un solvent ales, în timp ce sunt aplicate căldurași/sau omogenizarea. Recent, au existat încercări pentru a îmbunătăți dezavantajele acestora. Metodele inovative de extracție prezintă consum scăzut de energie, obținere de extracte biodegradabile, de înaltă puritate, prin procedee simplificate și solvenți alternavi. Cele trei clase principale de compuși bioactivi sunt considerate a fi polifenolii, alcaloizii și terpenoidele. Compușii polifenolici, de exemplu, au fost cercetați pentru activitățile lor antioxidante, antiinflamatoare, antibacteriene, antivirale, precum și pentru efectul lor cardioprotector, activitatea antidiabetică și

antitumorală. Au fost studiați compușii bioactivi aparținând celor trei specii vegetale: *Trifolium pratense* L., *Xanthium spinosum* L. și semințele neprăjite de cafea de la specia *Coffea arabica* L.

## CONTRIBUȚII PERSONALE

Scopul acestei teze a constat în studierea influenței metodelor și parametrilor de extracție asupra profilului fitochimic a celor trei specii de plante selectate.

**Studiul 1. Trifoiul roșu și importanța proceselor de extracție - moduri în care metodele și parametrii de extracție influențează profilul fitochimic și activitățile biologice ale extractelor de *Trifolium pratense* L.**

Scopul acestui studiu a fost de a obține o perspectivă asupra modului în care anumite procedee de extracție influențează concentrația de compuși bioactivi și în consecință de a evalua unele din activitățile lor biologice. Extractele de trifoi roșu au fost obținute folosind macerarea, extracția Soxhlet, turboextracția, extracția asistată de ultrasunete și o combinație între ultimele două metode. Conținutul total de polifenoli și de flavonoide al extractelor rezultate a fost analizat. Extractele ce au prezentat cele mai favorabile rezultate au fost supuse evaluării fitochimice prin analiza HPLC. După o selecție finală bazată pe profilul fitochimic, activitatea antimicrobiană, antiinflamatoare și potențialul de reducere a stresului oxidativ al extractelor au fost evaluate, folosind modele animale de inflamație. Extractele au prezentat un înalt potențial împotriva bacteriilor Gram-negative și au indus un efect antioxidant asupra modelului de inflamație la șobolanii Wistar.

**Studiul 2. Influența diferitelor metode și parametri de extracție asupra profilului fitochimic și activităților biologice ale extractelor de *Xanthium spinosum* L.**

Scopul acestui studiu a fost de a identifica posibilele influențe ale metodelor de extracție, precum și ale parametrilor de extracție asupra profilelor fitochimice și biologice ale extractelor de *Xanthium spinosum* L. Au fost utilizate aceleași metode extractive menționate



anterior. Profilul fitochimic a fost determinat folosind analiza HPLC-MS pentru extractele cu concentrațiile cele mai înalte. Activitățile biologice au fost evaluate conform studiului anterior. Cu privire la concentrații, s-au obținut rezultate comparabile între extracția Soxhlet și cea asistată de ultrasunete, ambele întrecând toate celelalte metode testate. Aceste valori maxime au scăzut odată ce au fost atinse punctele de degradare ale compușilor bioactivi. Extractele au demonstrat protecție înaltă împotriva bacteriilor Gram-negative. În plus, acestea au oferit o bună protecție celulară și au crescut apărarea antioxidantă în țesutul plantar analizat.

### **Studiul 3. Efectul metodelor de extracție asupra profilului fitochimic și activităților biologice ale extractelor de semințe neprăjite de cafea**

Acest studiu a constatat în identificarea impactului metodelor și parametrilor de extracție asupra fitochimiei și activităților biologice ale semințelor neprăjite de cafea. Au fost utilizate procedee identice de extracție. Extractele au fost, de asemenea, supuse aceluiași metode de analiză precum în studiul anterior. *In vivo*, un model de inflamație plantară la șobolanii Wistar a fost utilizat pentru a determina activitatea antioxidantă, prin evaluarea potențialului de reducere a stresului oxidativ și a efectului antiinflamator. Extracția Soxhlet și extracția asistată de ultrasunete au dat concentrațiile cele mai înalte de compuși bioactivi. În privința activității antioxidante, extracția asistată de ultrasunete a atins cele mai înalte concentrații. Acidul clorogenic a fost prezent în cea mai mare concentrație în extractele Soxhlet. Compușii sterolici s-au găsit în concentrații înalte în toate extractele analizate. S-a observat o creștere proporțională între concentrații și parametrii de extracție. A fost observată o inhibiție crescută a bacteriilor Gram-negative. Extractul Soxhlet de 60 minute a prezentat o activitate antioxidantă semnificativă *in vivo*, cu o ușoară activitate antiinflamatoare.

### **Studiul 4. Evaluarea *in vitro* și *in vivo* a activității antitumorale a unor extracte derivate din trei specii de plante bine cunoscute**

Unul dintre obiectivele acestui studiu a fost evaluarea activității antitumorale a unor extracte derivate din cele trei specii vegetale selectate: *Xanthium spinosum* L., *Trifolium pratense* L. și *Coffea arabica* L., precum și de a oferi un studiu comparativ al acestei activități biologice, cu scopul de a determina extractul vegetal superior cu privire la beneficiile antitumorale. Activitatea antitumorală și potențialul antioxidant *in vitro* au fost evaluate pe două linii celulare pentru extractele selectate. S-a efectuat evaluarea activității antitumorale *in vivo* într-un model murin de ascită Ehrlich. Extractele de *Xanthii spinosi herba* au prezentat cel mai înalt efect antitumoral. Viabilitatea celulelor de ascită a scăzut după administrarea extractelor de *T. pratense* L. și de semințe neprăjite de cafea, în timp ce efectul antioxidant a fost important în probele de celule tumorale după administrarea de *T. pratense* L. De asemenea, viabilitatea a fost scăzută și după ciclofosamidă asociată cu extracte de *X. spinosum* L., respectiv *T. pratense* L. Aceste rezultate sugerează că extractele de *T. pratense* L. sau de *X. spinosum* L. în combinație cu chimioterapia pot induce peroxidarea lipidică în celulele tumorale și au scăzut viabilitatea tumorală, în special extractul de *T. pratense* L.

### **Concluzii generale și originalitatea tezei**

Prin studiile întreprinse, am reușit să evidențiem importanța fitoterapiei ca adjuvant în terapia integrativă oncologică, datorită proprietăților antioxidante, antiinflamatoare și citotoxice ale celor trei specii vegetale studiate: *Trifolium pratense* L., *Xanthium spinosum* L. și *Coffea arabica* L.

Originalitatea tezei constă în dezvoltarea unor metode analitice pentru determinarea calitativă și cantitativă a unor xanthanoliide și acizi cafeoil- chinici și demonstrarea proprietăților farmacologice. *Contribuțiile Personale* au fost publicate în lucrări științifice originale din tema cercetării, în reviste indexate ISI din quartilele Q1 și Q2, cu un factor de impact cumulativ de 21,187.