

Proiect PN-III-P2-2.1-BG-2016-0119 ”Valorificarea superioară a subprodusului rezultat la obținerea uleiului de armurariu prin presare la rece”

Acronim: **VALSUSA**

Contract nr: **13BG/2016**

Consortiul implicat în realizarea proiectului:

- Universitatea din București, Facultatea de Chimie, coordonatorul proiectului (UB) (CO)
- Institutul Național CD pentru Științe Biologice București (INCDSB) (P1)
- HOFIGAL EXPORT-IMPORT S.A. (P2) partenerul economic

Echipa de cercetare

Universitatea din București

Prof. Andrei Florin Dăneț – Director de proiect,

Conf. dr. Mihaela Carmen Cheregi,

Asist. dr. Claudia Valentina Popa,

Hofigal

Drd. Alexandru Suci

Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare

pentru Științe Biologice (INCDSB)

CS I. dr. Simona Carmen Lițescu - responsabil

CS I prof. dr. ing. Gabriel Lucian Radu

CS II dr. Sandra Anamaria Victoria Eremia

CS III dr. Camelia Albu

CS III dr. Mirela Diaconu

CS dr. Andreia Alecu (Tache)

CS dr. Georgiana Ileana Badea (Truica)

Perioada de executie: 30.09.2016 - 01.10.2018

Valoarea proiectului: 460.000 lei

Obiectivele proiectului: a) științifice/tehnologice și b) de intensificare a colaborării mediului academic - agent economic și de pregătire a resursei umane.

a) obiectivele științifice/tehnologice constau din:

-elaborarea unor tehnologii de valorificare superioară a subprodusului rezultat la obținerea uleiului de armurariu. Realizarea acestui obiectiv principal implica realizarea următoarelor obiective subsidiare:

- caracterizarea din punct de vedere compozițional a extractului din subprodusul de la obținerea uleiului de armurariu (care conține silimarina, derivații săi și alți compuși, în special compuși polifenolici) precum și evaluarea acestuia din punct de vedere al eficacității antioxidante și a capacității antiproliferative;

- elaborarea și optimizarea tehnologiilor de extracție;

- obținerea unor extracte realizate în condiții optime și caracterizarea lor;

- testarea/validarea/demonstrarea tehnologiilor de extracție realizate la agentul economic.

b) obiectivele privind intensificarea colaborării mediului academic-agent economic și de pregătire a resursei umane constau din:

- asigurarea trainingului personalului agentului economic în laboratoarele academice (universitate și INCDSB);

- stagii de pregătire practică ale doctoranzilor și masteranzilor.

Impactul estimat al proiectului

Impactul estimat la nivel economic. Cantitățile de subprodus rezultat la obținerea uleiului de armurariu la HOFIGAL sunt în prezent de ordinul tonelor/an, cu perspective de a crește la zeci de tone/an în viitorul imediat, ceea ce justifică pe deplin dezvoltarea unei tehnologii de preparare a unui concentrat de silimarină din subprodusul studiat care va fi utilizat la obținerea unor preparate fitofarmaceutice cu activitate ridicată. În plus dacă studiile efectuate în cadrul proiectului confirmă o activitate antiproliferativă suficient de mare a concentratului de silimarină obținut, acesta va putea fi utilizat la prepararea unor produse fitofarmaceutice noi, cu activitate antitumorală.

Impactul estimat la nivel social și al stării de sănătate a populației

Concentratul de silimarină obținut în cadrul proiectului va fi folosit de HOFIGAL la producerea de noi suplimente alimentare și preparate fitofarmaceutice, cu eficacitate mult crescută. Aceste produse se vor folosi în special pentru prevenirea și tratarea afecțiunilor ficatului, dar și în alte domenii, de ex. prepararea de produse cosmetice.

Intensificarea colaborării mediului academic-agent economic și a trainingului efectuat de personalul specializat de la HOFIGAL va duce la: a) o creștere apreciabilă a calității activităților de cercetare și dezvoltare de produs, efectuate de agentul economic, care dispune de aparatură modernă performantă; b) valorificarea adecvată a experienței în cercetare și a cunoștințelor științifice ale personalului din mediu academic.

I. Raport științific și tehnic etapa I-a 2016

pag. 2

II. Raport științific și tehnic etapa a II-a 2017

pag. 16

Cuprins RST etapa I-a

	Pag
Scopul și obiectivele etapei I-a de implementare a proiectului	2
Rezumatul etapei	3
Prezentare generală a etapei I-a	4
Activitatea 1.1. Elaborarea metodelor de extracție a silimarinei utilizând drept solvenți de extracție : apa, alcool etilic și metilic, acetat de etil etc., sau amestecuri de solvent organic/apă	4
Activitatea 1.2. Determinarea fenolilor totali și a silimarinei, cu cele trei componente: silibin, silicristin și silidianin din extractele obținute	5
1.2.1. Determinarea fenolilor totali din extractele obținute	5
1.2.2. Determinarea silimarinei, cu cele trei componente: silibin, silicristin și silidianin din extractele obținute	9
Activitatea 1.3. Screeningul capacității antioxidante a extractelor obținute, determinând atât capacitatea antiradicalică cât și capacitatea antioxidantă - partea I-a.	14
Concluzii	15

Scopul etapei I-a a proiectului este acela de a determina profilul de compoziție a subprodusului de la obținerea uleiului de armurariu, cu accentul pe silimarină și alți compuși polifenolici; screeningul eficacității antioxidante a extractelor din subprodus.

Obiectivele etapei I-a a proiectului conform contract 13BG/2016:

1. Elaborarea metodelor de extracție a silimarinei utilizând drept solvenți de extracție apa, alcool etilic, alcool metilic, acetat de etil, sau amestecuri apă/solvent;
2. Determinarea fenolilor totali și a silimarinei, cu cele trei componente: silibin, silicristin și silidianin din extractele obținute;

3. Screeningul capacității antioxidante a extractelor obținute, determinând atât capacitatea antiradicalică cât și capacitatea antioxidantă- partea I-a.

Rezumatul etapei I-a de implementare a proiectului

Activitățile specifice etapei I-a de raportare au fost: 1.1. Elaborarea metodelor de extracție a silimarinei utilizând drept solvenți de extracție apa, alcool etilic și metilic, acetat de etil etc., sau amestecuri de solvent organic/apă; 1.2. Determinarea fenolilor totali și a silimarinei, cu cele trei componente: silibin, silicristin și silidianin din extractele obținute; 1.3. Screeningul capacității antioxidante a extractelor obținute, determinând atât capacitatea antiradicalică cât și capacitatea antioxidantă - partea I-a.

Rezultatele angajate contractual vizează elaborarea metodelor de extracție a silimarinei utilizând solvenți neinflamabili sau puțin inflamabili; determinarea fenolilor totali și a silimarinei din extractele obținute, precum și realizarea unui screening a capacității antioxidante a extractelor obținute.

În această etapă, s-a făcut extracția silimarinei și a altor derivați fenolici din subprodusul rezultat la obținerea uleiului de armurariu folosind metode de extracție lichid-lichid, și anume: macerarea și extracția continuă cu extractorul Soxhlet. S-au utilizat mai mulți solvenți de extracție: apa, etanolul, metanolul, acetatul de etil, precum și amestecuri apă : etanol = 50% v/v. S-a studiat influența temperaturii, a naturii solventului și a timpului de extracție (în cazul extracției cu apă la 100 °C) asupra extracției polifenolilor.

De asemenea, au fost evaluați produșii de extracție din punct de vedere al conținutului de fenoli totali folosind metoda Folin-Ciocalteu, din punct de vedere al conținutului de silimarină (silicristin, silibin A, silibin B și silidianin) folosind o metodă de analiză HPLC cu detecție DAAD (rețea de diode) și MS (spectrometrie de masă) precum și al capacității antiradicalice (antioxidante) folosind metoda cu DPPH și metoda cu ABTS. Au fost elaborate protocoale de analiză specifice pentru fiecare tip de determinare. S-au făcut corelații între conținutul de fenoli totali și silimarină din extracte în funcție de natura solventului, precum și în funcție de temperatura de extracție. Cei mai buni solvenți folosiți la extracția fenolilor totali -dar nu a silimarinei- din subprodus sunt metanolul și etanolul. Pentru separarea silimarinei cele mai bune rezultate s-au obținut cu acetat de etil, prin macerare la 70°C. Rezultate acceptabile pot fi obținute folosind și etanolul sau metanolul, atât prin macerare cât și cu extractorul Soxhlet. S-a tras concluzia că apa este solventul care dă cele mai slabe rezultate atât la extracția silimarinei cât și a fenolilor totali, indiferent de temperatura sau durata extracțiilor.

Screeningul activității antioxidante a extractelor obținute a indicat că $TEAC_{ABTS}$ prezintă valorile cele mai mari pentru extractele în metanol la 70°C și prin extracție Soxhlet. Valorile $TEAC_{ABTS}$ pentru extractele în etanol 97% și etanol 50% sunt destul de asemănătoare, atât la temperaturile de 50°C și 70°C, cât și prin extracție Soxhlet. Valoarea $TEAC_{ABTS}$ pentru extractul în acetat de etil, care conține cea mai mare cantitate de silimarină, este apropiată de cea a extractului în alcool etilic obținut în aceleași condiții, dar care conține o cantitate de silimarină de aproximativ cinci ori mai mică. S-a tras concluzia că activitatea antiradicalică (antioxidantă) a extractelor este determinată în cea mai mare măsură de alți compuși extrași din subprodusul studiat și mai puțin de silimarină. Valorile $TEAC_{DPPH}$ urmează același trend ca cel al $TEAC_{ABTS}$ dar sunt de 3-7 ori mai mici.

Prezentare generală a etapei I-a.

Activitățile de cercetare-dezvoltare efectuate în această perioadă de raportare a proiectului, 30.09.2016-15.12.2016, au vizat în primul rând evaluarea profilului de compoziție și a eficacității antiradicalice a subprodusului rezultat la obținerea uleiului de armurariu (*Silybum marianum*) prin presare la rece.

Activitățile desfășurate în colaborare de către coordonator, Universitatea din București-Facultatea de Chimie și partenerul P1-INCDDB au implicat elaborarea mai multor protocoale de extracție a principiilor active de tip silimarina, și anume silicristin, silidianin, silibinin A și B care, optimizate și asistate de fenomene de cavitație, de tip microunde, vor sta la baza elaborării tehnologiei de laborator din etapa următoare de implementare a proiectului. Protocoalele de extracție aplicate în această etapă de screening al compoziției și eficacității potențiale a subprodusului rezultat din prelucrarea *Silybum marianum*, nefiind selective, au condus la un complex de principii active, în afară de silimarina fiind extrași diferiți polifenoli.

Materialul de lucru, subprodusul obținut la procesarea armurariului a fost furnizat de către HOFIGAL.

Activitatea 1.1. Elaborarea metodelor de extracție a silimarinei utilizând drept solvenți de extracție: apa, alcool etilic și metilic și acetat de etil, sau amestecuri de solvent organic/ apă

Reactivi și materiale

Subprodus de armurariu; etanol 96% (RE Agents S.R.L.); metanol absolut (Chimopar, București); acetat de etil (Reactivul, București); baie termostată Raypa; instalație de extracție continuă de tip Soxhlet, alcătuită din extractor (50 mL), refrigerent ascendent, balon cu fund rotund (100 mL), baie electrică.

Mod de lucru

Extractele au fost obținute prin macerare și prin tehnica Soxhlet. În toate cazurile s-au supus extracție câte 5 g de subprodus de armurariu uscat și măcinat cu 50 mL solvent.

Obținerea extractelor prin macerare. Ca solvenți de extracție s-au folosit: apă; etanol:apă = 50% v/v; etanol 96%; metanol abs.; acetat de etil 100%. În 5 pahare Erlenmeyer (50 mL) de sticlă, cu dop rodat, s-au introdus câte 5 g subprodus și câte 50 mL de solvent (apă; etanol:apă = 50% v/v; etanol 96%; metanol; acetat de etil). Conținutul paharelor s-a supus extracției timp de 24 ore, cu agitare ocazională, la temperaturile de 50°C și de 70°C menținute cu ajutorul băii termostate. În toate cazurile extractele s-au decantat și apoi s-au filtrat în vase curate și uscate.

Cu instalația Soxhlet s-a făcut extracția cu alcool etilic 96%, cu alcool metilic și cu acetat de etil, timp de 4 ore.

Extracția cu apă fierbinte la 100 °C. S-au folosit vase termorezistente de 100 mL cu capac în care s-au introdus subprodusul de armurariu și apă la 100 °C. Vasele s-au închis și s-au introdus într-un vas cu apă care fierbe ușor pentru valori ale timpului menționate în tabelul 1. Probele s-au agitat din când în când.

Toate extractele obținute au fost păstrate la frigider (+ 4 °C).

Condițiile de obținere a extractelor din subprodusul de armurariu sunt prezentate pe scurt în tabelul 1.1.

Tabelul 1.1. Protocoale aplicate pentru extracția silimarinei (silicristin, silidianin, silibinin) din subprodusul rezultat la obținerea uleiului de armurariu.

Extract	Solvent	Volum solvent (mL)	Temperatura de extracție (°C)	Timp de extracție
M1	H ₂ O	50	50	24 h
M2	EtOH 50%		50	24 h
M3	EtOH 96%		50	24 h
M4	MeOH		50	24 h
M5	Acetat de etil		50	24 h
M6	H ₂ O		70	24 h
M7	EtOH 50%		70	24 h
M8	EtOH 96%		70	24 h
M9	MeOH		70	24 h
M10	Acetat de etil		70	24 h
M11	H ₂ O		100	30 min
M12	H ₂ O		100	60 min
M13	H ₂ O		100	120 min
M14	H ₂ O		100	180 min
M15	H ₂ O		100	240 min
S1	EtOH 96%			4h
S2	MeOH			4h
S3	Acetat de etil			4h

*M1 – M15 extracție prin macerare; S1 – S3 extracție Soxhlet.

Extracțele astfel formulate au fost analizate pentru stabilirea profilului de compoziție, conținut de fenoli totali, conținut în silimarină și a eficacității acestora, activitate antiradicalică/activitate antioxidantă. În această primă etapă au fost analizate doar din punctul de vedere al eficacității antiradicalice, prin metodele DPPH și ABTS (TEAC), urmând ca activitatea antioxidantă să fie evaluată ulterior, prin metoda ORAC.

Activitatea 1.2. Determinarea fenolilor totali și a silimarinei, cu cele trei componente: silibin, silicristin și silidianin din extractele obținute.

1.2.1. Determinarea fenolilor totali din extractele obținute.

Conținutul de fenoli totali din extractele obținute s-a determinat, aplicând metoda spectrofotometrică cu reactivul Folin-Ciocalteu. Reactivul Folin Ciocalteu este un amestec de acizi complecși fosfowolframici și fosfomolibdenici în starea de valență șase având următoarele formule: $3\text{H}_2\text{O}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\cdot 13\text{WO}_3\cdot 5\text{MoO}_3\cdot 10\text{H}_2\text{O}$; $3\text{H}_2\text{O}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\cdot 14\text{WO}_3\cdot 4\text{MoO}_3\cdot 10\text{H}_2\text{O}$, în mediu bazic poate avea loc un transfer de electroni la ionii de wolfram și molibden care trec în stări de valență mai mică și care generează formarea unor specii colorate.

Reactivi și materiale

Reactiv Folin-Ciocalteu (Fluka); carbonat de sodiu (Loba Chemie Wien-Fischamend); acid galic (Sigma); spectrofotometru UV-mini 1240 Shimadzu; mini centrifugă MCF-2360 (LMSI_MS CO.LTD, Korea).

Reactiv Folin-Ciocalteu de lucru: s-a diluat 1 parte reactiv Folin-Ciocalteu cu 1 parte apă. Soluția diluată s-a păstrat la temperatura camerei, la întuneric.

Soluție de carbonat de sodiu 1M (10,6 g/100 mL).

Soluție stoc de acid galic 200 mg/L.

Soluții pentru curba de calibrare, obținute prin diluarea cu apă a soluției stoc astfel încât să se obțină soluții cu concentrațiile de: 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 și 150 mg/L.

S-a utilizat apă bidistilată pentru toate determinările.

Mod de lucru

Pregătirea probelor. Înaintea determinărilor, câte 1,5 mL din fiecare extract au fost introduse în tuburi Eppendorf (1,5 mL) și si au fost centrifugate 2 minute la 6000 rpm. Pentru diluarea probelor analizate s-a folosit în toate cazurile apă bidistilată.

Trasarea curbei de calibrare. S-a lucrat după modul de lucru descris în¹. Astfel, peste 250 μ L din fiecare probă s-au pipetat 250 μ L reactiv Folin Ciocâlțeu diluat 1:2, apoi probele s-au omogenizat prin agitare ușoară. S-au adăugat în ordine 2000 μ L apă bidistilată și 250 μ L soluție 1M de carbonat de sodiu. Probele au fost agitate pentru omogenizare și apoi au fost lăsate în repaus 60 minute, la temperatura camerei și la întuneric. În paralel s-a obținut proba de comparație. Aceasta a fost preparată la fel ca și proba de analizat cu excepția faptului că în loc de probă de analizat s-a introdus apa distilată. S-a determinat absorbanta la 725 nm față de proba de comparație în celule de sticlă de 1 cm.

Determinarea conținutului în fenoli totali a extractelor s-a făcut asemanator cu a soluțiilor etalon. Pentru fiecare probă (etalon/extract) s-au efectuat câte trei determinări. În figura 1.1 se prezintă curba de calibrare absorbantă în funcție de concentrația acidului galic.

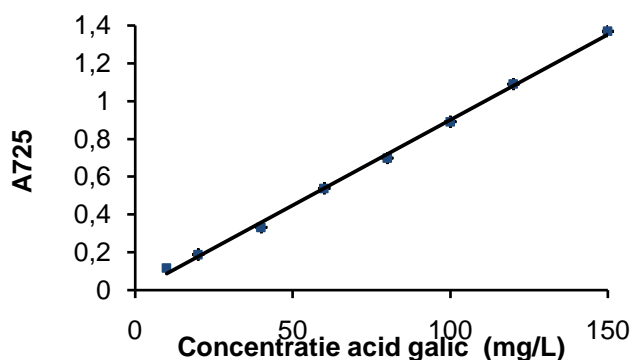


Figura 1.1. Curba de calibrare absorbantă vs. concentrația acidului galic.

Ecuția dreptei din figura 1 este:

$$y = 0,0090x - 0,0021,$$

unde y = absorbanta, iar x = concentrația acidului galic (mg/L).

Se constată o bună liniaritate pe un domeniu de concentrații cuprins între 10 și 150 mg/L acid galic, coeficientul de corelație fiind: $r^2 / n = 0,9981 / 8$ (n = numărul de determinări).

În tabelul 1.2 sunt date valorile absorbantei determinate la 725 nm, diluția cu apa a extractelor, precum și conținutul de fenoli totali calculat în echivalenți acid galic/gram de subprodus, pentru extractele obținute prin macerare la două temperaturi (50 și respectiv 70 °C) și

¹ Singleton V., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M., *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent.* Methods Enzymol. **1999**, 299, 152-178

utilizând zece solvenți sau amestecuri de solvenți (apă, etanol:apă = 50% v/v, etanol 96%, metanol absolut și acetat de etil).

Tabelul 1.2. Studiul influenței solventului și a temperaturii asupra extracției polifenolilor prin macerare 24 ore.

Simbol probă	Solventul de extracție	Temperatura (°C)	A ^{1 cm} _{725 nm}	Diluția	GAE ^a , mg/g subprodus
M1	apă	50	0,438	x5	2,774
			0,450		2,841
			0,460		2,897
					2,84 ± 0,061^b
M2	etanol 50%	50	0,556	x20	13,72
			0,574		14,12
			0,589		14,45
					14,10 ± 0,37
M3	etanol 96%	50	0,448	x20	11,32
			0,472		11,85
			0,540		13,36
					12,20 ± 1,06
M4	metanol 100%	50	0,460	x20	11,59
			0,484		12,12
			0,502		12,52
					12,08 ± 0,47
M5	acetat de etil	50	0,450	x10	5,682
			0,472		5,93
			0,527		6,54
					6,05 ± 0,44
M6	apă	70	0,272	x10	3,704
			0,305		4,071
			0,317		4,204
					3,99 ± 0,26
M7	etanol 50%	70	0,556	x20	13,72
			0,561		13,83
			0,606		14,83
					14,10 ± 0,61
M8	etanol 96%	70	0,436	x20	11,05
			0,478		11,99
			0,546		13,49
					12,20 ± 1,21
M9	metanol 100%	70	0,618	x20	15,09
			0,648		15,76
			0,666		16,16
					15,70 ± 0,54
M10	acetat de etil	70	0,658	x10	7,993
			0,684		8,282
			0,767		9,204
					8,49 ± 0,63

^a GAE: echivalenți acid galic; ^b deviația standard pentru 3 determinări

După cum se observă din tabelul 1.2 valorile conținutului în fenoli totali variază între 2,84 ± 0,061 și 15,7 ± 0,54 mg GAE/g subprodus. Cele mai mici valori s-au calculat pentru maceratele în apă, indiferent de temperatura la care s-a lucrat. Extractele obținute în acetat de etil au

prezentat valori de aproximativ două ori mai mari decât cele în apă. Cele mai mari valori s-au obținut pentru extractele în etanol : apă = 50% v/v (14,10 mg GAE/g) indiferent de temperatură și pentru maceratul în metanol la 70 °C (15,7 GAE/g). Temperatura de 70 °C a mărit capacitatea de extracție a apei, acetatului de etil și în special a metanolului.

În tabelul 1.3 sunt date valorile absorbanței, diluția extractelor și conținutul de fenoli totali în echivalenți acid galic, pentru extractele obținute în apă la 100 °C, în funcție de timp.

Tabelul 1.3. Studiul influenței timpului de extracție în apă a polifenolilor din subprodus la 100 °C

Simbol proba	Timpul de extracție (minute)	$1\text{ cm } A_{725\text{ nm}}$	Diluția	(GAE ^a , mg/g subprodus)
M11	30	0,192	x20	5,631
		0,226		6,387
		0,250		6,920
				6,31 ± 0,65^b
M12	60	0,325	x10	4,293
		0,350		4,571
		0,362		4,704
				4,52 ± 0,21
M13	120	0,299	x10	4,004
		0,334		4,393
		0,342		4,482
				4,29 ± 0,25
M14	180	0,284	x10	3,838
		0,340		4,460
		0,363		4,716
				4,34 ± 0,45
M15	240	0,413	x10	5,271
		0,426		5,416
		0,504		6,282
				5,66 ± 0,55

^a GAE: echivalenți acid galic; ^c deviația standard pentru 3 determinări

După o extracție de 30 minute, conținutul în fenoli totali a fost de $6,31 \pm 0,65$ mg GAE/g subprodus. Mărirea timpului de extracție la 60, 120 și 180 minute a dus la scăderea conținutului de polifenoli determinat în extracte. Totuși, după 240 de minute conținutul în fenoli totali din extractul apos a crescut la 5,66 mg GAE/g subprodus.

Comparând rezultatele calculate pentru maceratele apoase la 50 °C, 70 °C și 100 °C, se constată o creștere a valorilor conținutului în fenoli totali, de la 2,84 la 3,99 și apoi la 5,66 mg GAE/g subprodus, chiar dacă timpul de extracție a fost în primele două cazuri de 24 de ore și în ultimul de 4 ore. Eficiența de extracție a apei este substanțial mai mare la temperatura de 100 °C.

În tabelul 1.4 se prezintă datele experimentale și concentrațiile fenolilor totali în echivalenți acid galic/ gram subprodus, ale probelor obținute prin extracție Soxhlet timp de 4 ore.

Tabelul 1.4. Studiul influenței solventului asupra extracției polifenolilor din subprodus prin extracție Soxhlet 4 ore.

Simbol proba	Solventul de extracție	Numărul de sifonări	$1\text{ cm } A_{725\text{ nm}}$	Diluția	GAE ^a , mg/g subprodus
S 1	etanol 96%	10	0,447	x20	11,30
			0,484		12,12

			0,533		13,21
					12,21 ± 0,96^b
S2	metanol 100%	11	0,690	x20	16,70
			0,737		17,74
			0,783		18,76
					17,73 ± 1,03
S3	acetat de etil	17	0,479	x10	6,00
			0,492		6,15
			0,518		6,44
					6,20 ± 0,22

^a GAE: echivalenți acid galic; ^b deviația standard pentru 3 determinări

Din tabelul 1.4 se observă că valorile conținutului în fenoli totali variază între 6,20 ± 0,22 și 17,73 ± 1,03 mg GAE/g subprodus. Cea mai mică valoare s-a calculat pentru extractul în acetat de etil și cea mai mare- pentru extractul în metanol.

După cum se observă din tabelele 1.2, 1.3 și 1.4, cel mai bogat în polifenoli este extractul din subprodus de armurariu obținut prin extracție Soxhlet cu metanol, având o concentrație de 17,74 mg GAE/g subprodus.

1.2.2. Determinarea silimarinei, cu cele trei componente: silibin, silicristin și silidianin din extractele obținute.

Silimarina, ca principiu activ, este un complex de flavonolignani: silicristin, silidianin, silibinin A și B și isosilibinin A și B, fiind extrasă din fructele de armurariu (*Silybum marianum*), nespecific, împreună cu alți compuși cum sunt: flavone (apigenin), flavonoli (taxifolin, quercetin, kaemferol și dihidrokaempferol), acizi grași (acid linoleic, 35-55%, acid oleic, 24-30%, acid plamic, 8-12% și linolenic, 3-7%), fitosteroli (în special β-sitosterol) și monoterpene. Aceste extracții nespecifice îngreunează analiza cantitativă, fiind necesară o pre-tratare a extractelor, mai ales a celor apoase, obținute la temperaturi de extracție ridicate.

Extractele de armurariu pot fi normalizate/standardizate la unul dintre izomerii constituenți, determinările raportate de către Agenția Europeană a medicamentului (EMA)² prezentând informațiile referitoare la armurariu (*Silybum marianum*) pentru extracte standardizate ca și conținut în silibinin (cei doi diastereoizomeri, A și B), sau la 2 sau 4 dintre cei șase izomeri activi, cum ar fi silicristin, silidianin și silibinin A și B³. În această etapă de implementare a proiectului a existat disponibilitatea materială imediată pentru a realiza caracterizarea extractelor ca și conținut în silicristin și silibinin A și B. Având în vedere că este evidentă prezența silidianinului în extractele formulate (picuri de eluție caracteristice apar în cromatogramele obținute pentru probe) în etapa viitoare, înainte de a se stabili protocolul și tehnologia de extracție optimă, va fi determinat și conținutul în silidianin, pentru a se stabili, împreună cu HOFIGAL, care vor fi izomerii în raport cu care se va standardiza extractul final obținut prin valorificarea reziduului rezultat la obținerea uleiului de armurariu.

² European Medicine Agency, Assessment report on *Silybum marianum* fructus, 7 July 2015; EMA/HMPC/294188/2013

³ J. I. Lee, M. Narayan, J.S. Barrett, 2007, Journal of Chromatography B, 845 (1), 95–103

Pentru determinarea cantitativă a izomerilor din complexul de silimarina au fost dezvoltate două metode care au ca tehnică de separare de bază cromatografia de lichide de înaltă performanță, detecția fiind diferită: câmp de diode (DAD), respectiv spectrometrie de masă.

Metoda HPLC-DAD

Determinările au fost realizate folosind un sistem HPLC SHIMADZU 20AD, separarea făcându-se pe o colana C18 Kromasil 5,4.6x250 mm. Sistemul a fost cuplat cu un detector DAD. Condițiile optime de analiză au fost stabilite astfel încât să se asigure caracteristicile de performanță cele mai bune ale metodei. Condițiile cromatografice au fost: echilibrare coloană 60 minute înaintea injectării probelor, temperatura pe coloana fiind de 30 °C, volumul de injecție al probelor, ca și al standardelor, fiind de 10 μL. Faza mobilă a fost compusă din: apa cu 0,1% acid formic (A) și metanol (B), în raport de combinare 50%-50%. Debitul fazei mobile a fost de 0,6 mL min⁻¹. Timpul de analiză al unei probe a fost de 29 minute, coloana fiind re-echilibrată timp de 10 minute. Datorită particularității probelor, au fost necesare spălări repetate între injecțiile de probe. Probele au fost filtrate înainte de injectare în sistemul HPLC prin celule de ultra filtrare de 0,2 μm.

Semnalele specifice izomerilor din complexul de silimarina au fost monitorizate la lungimea de undă maximă, 288 nm. Caracteristicile de performanță ale metodei HPLC-DAD sunt prezentate în tabelul 1.5.

Tabelul 1.5. Caracteristicile de performanță ale metodei HPLC-DAD dezvoltate pentru determinarea componentelor silimarinei.

Analit	t _R (±SD) (min)	Ecuția curbei de etalonare	R	LoD (μg/mL)	Domeniul de liniaritate (μg/mL)
Silicristin	8,90 ± 0,13	A = 43827 × C + 2272.8	0,9996	0,1	0,2-10
Silibinin A	19,84 ± 0,35	A = 24979 × C - 106.4	0,9996	0,08	0,1-10
Silibinin B	22,27 ± 0,39	A = 26194 × C - 574.5	0,9994	0,01	0,1-10

A-aria pic; C - μg/mL

În figura 1.2 se prezintă cromatogramele HPLC-DAD suprapuse pentru 4 concentrații (0,7 ; 1 ; 5 ; 10 μg/mL) de silicristin, silibinin A și silibinin B, precum și dreptele de etalonare obținute.

Metoda HPLC-MS

Și în acest caz măsurătorile cromatografice au fost realizate folosind un sistem HPLC SHIMADZU, coloana fiind specifică pentru detecția mas-spectrometrică și anume C18 Kromasil 3,5; 2,1x100 mm. Sistemul a fost cuplat cu un detector MS, LCMS-2010, echipat cu o sursă de ionizare tip electrospray ESI. Pentru determinarea silimarinei s-a utilizat modul de ionizare negativ. Condițiile de lucru au fost următoarele: debit N₂ 0,18 L/min; temperatura CDL 230 °C; temperatura "heat block" 200 °C, voltaj detector 2 kV, voltaj interfață 4 kV. Probele au fost filtrate înainte de injectarea în sistemul HPLC prin celule de ultra filtrare Syringe Driven Filter Unit 0,2 μm (Macherey-Nagel). Coloana a fost echilibrată timp de 1 oră cu faza mobilă, înainte de injectarea probelor și apoi un volum de 20 μL de probă au fost injectați în sistemul HPLC, cuplat cu detectorul MS. Faza mobilă utilizată a fost compusă din apă cu acid acetic 2% (componentă A) și metanol (componentă B). Pentru o separare cât mai eficientă s-a folosit atât

gradient de compoziție a fazei mobile cât și gradient de debit al fazei mobile; secvențele de gradient de compoziție au fost următoarele: 0,01-3,00 minute 35% componentă B; 3,00-13,00

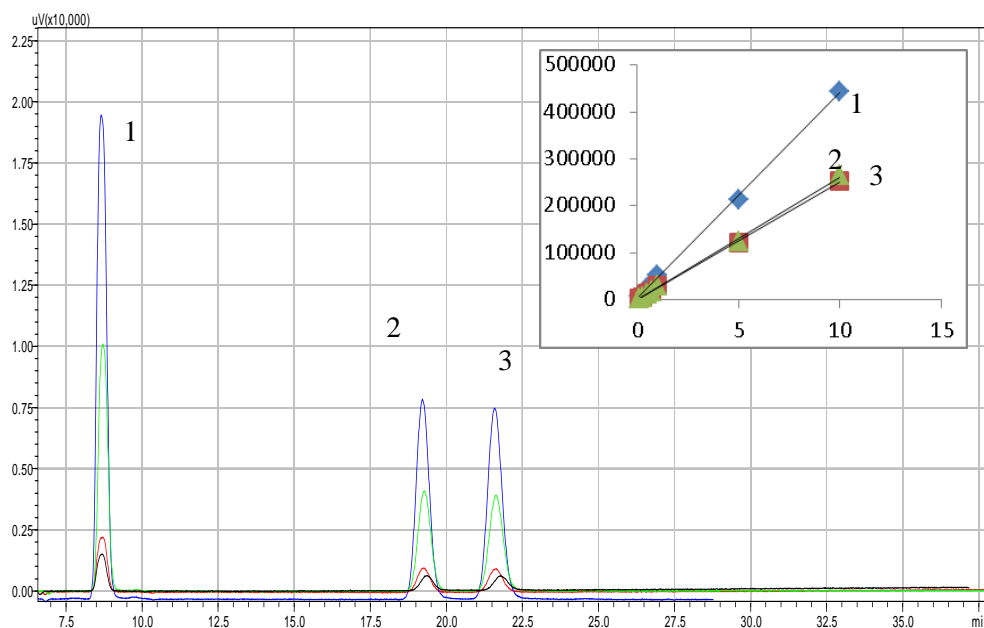


Figura 1.2. Cromatogramele HPLC-DAD suprapuse pentru 4 concentrații (0,7; 1; 5; 10 $\mu\text{g/mL}$) de silicristin (1), silibinin A (2) și silibinin B (3); inset dreptele de etalonare

minute 35-45% componentă B; 13,00-15,00 minute 45% componentă B; 15,01-25,00 minute 35% componentă B, iar cele de gradient de curgere au fost: 0,01-2,00 minute 0,2 mL/min debitul fazei mobile și 2,01-25 minute 0,25 mL/min debitul fazei mobile. Experimentele au fost realizate la o temperatură constantă a coloanei de 35⁰ C iar timpul necesar efectuării unei analize este de 25 de minute. Apoi coloana a fost re-echilibrată, timp de 10 minute, cu faza mobilă, folosind un debit al fazei mobile de 0,25 mL/min. Folosind condițiile cromatografice optime a fost realizată separarea izomerilor (figura 1.3).

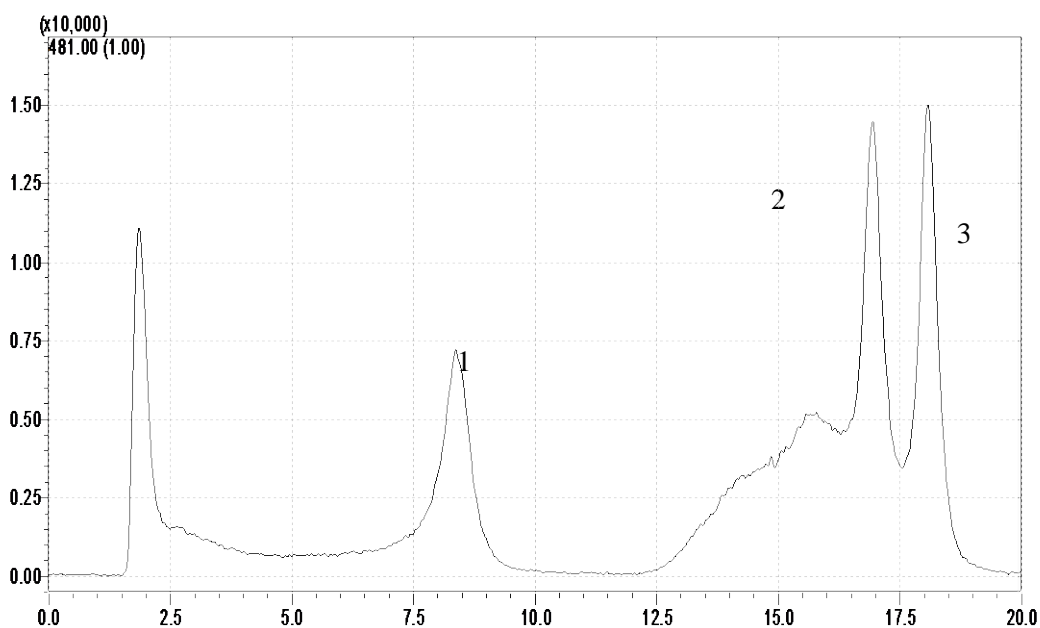


Figura 1.3. Cromatogramele HPLC-MS obținute pentru amestecul de standarde (1- silicristin, 2-silibinin A, 3-silibinin B; concentrație 0,5 $\mu\text{g/mL}$).

Au fost stabilite caracteristicile de performanță ale metodei HPLC-MS pentru cei 3 izomeri, rezultatele obținute fiind prezentate în tabelul 1.6.

Tabelul 1.6. Caracteristicile de performanță ale metodei HPLC-MS dezvoltate pentru determinarea componenșilor silimarinei

Analit	$t_R (\pm SD)$ (min)	[M-H] ⁻	Ecuția curbei de etalonare	R	LoD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Domeniul de liniaritate ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Silicristin	8,06 \pm 0,30	481	A=690401 \times C -7503,07	0,9994	0,014	0,05-10
Silibinin A	16,58 \pm 0,35		A=598010 \times C -798,37	0,9998	0,008	0,05-1,0
Silibinin B	17,71 \pm 0,40		A=685496 \times C - 1163,03	0,9991	0,008	0,025-1,0

După cum se poate observa din caracteristicile de performanță ale celor două metode, se înregistrează o bună liniaritate a răspunsului pe două decade în cazul metodei HPLC-DAD și pe cel puțin o decadă și jumătate în cazul metodei HPLC-MS, coeficienții de corelație, ca și pantele răspunsului demonstrând o precizie și o sensibilitate bună a metodelor. Metoda HPLC-MS poate fi aplicată pentru concentrații la nivel de zeci de ppb-uri, pe când metoda HPLC-DAD este recomandabilă pe domenii de concentrații de ordinul ppm – zeci de ppm.

Metodele dezvoltate au fost aplicate la determinarea conținutului în silimarină pentru extractele formulate, rezultatele obținute fiind prezentate în tabelul 1.7. Ținând seama de volumul de extracție și de masa de reziduu vegetal luată în lucru, rezultatele din tabelul 1.7 sunt exprimate ca și conținut de substanță activă în micrograme pe g de subprodus vegetal.

După cum se poate observa, ca și conținut total de izomeri care alcătuiesc silimarina extracțiile în alcool, respectiv acetat de etil sunt cele mai eficiente. Extractul M10, în acetat de etil obținut prin macerare la 70⁰C pentru 24 de ore are cel mai mare conținut total de silimarină pe g de subprodus de armurariu (cel mai mare conținut atât pentru silicristin cât și pentru silibinin A și silibinin B). În cazul extracției Soxhlet cu acetat de etil, extractul S3, are un conținut substanțial mai mic de silicristin, silibinin A și silibinin B, aproximativ 25%, 7% și 87% față de extractul M10 aceasta putându-se explica prin temperatura mai mică la care are loc extracția și durata mai scurtă a acesteia. În ceea ce privește etanolul și metanolul aceștia se comportă destul de asemănător în ceea ce privește extracția silicristin dar se pare ca metanolul este un solvent de extracție mai bun pentru silibinin. Amestecul etanol/apă 50% prezintă randamente de extracție a silicristin asemănătoare cu a etanolului dar mai mici în cazul silibinei. Extracțiile apoase au cel mai scăzut conținut în substanțe active de tip silimarină, și, în plus, formează emulsii.

Tabelul 1.7. Conținutul în silicristin, silibinin A și silibinin B, în mg substanță activă/g material solid, al extractelor obținute din reziduul rezultat la prelucrarea armurariului

Proba Analit	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	S1	S2	S3
Silicristin μg/g	813	1332 4.5	13743 .75	12146 .25	1209 6	1180. 50	9957. 75	10775 .25	9101. 25	45018 .75	2193. 75	1495. 50	1124. 70	900. 35	805. 24	14133 .75	16856 .25	1145 5.5
Silibinin A μg/g	17. 25	615	978	687	730.5	uLo D	123	uLoD	2872. 50	10087 .50	34.87	34.87	14.62	10.5 2	uLo D	649.5	1223. 25	712.5
Silibinin B μg/g	11. 25	795.7 5	3609	390.7 5	1959. 75	17.25	878.2 5	1059	3585	4158. 75	33.37	4.50	53.62	43.2 5	33.3 6	4998	2980. 5	3622. 5

uLoD- prezent, dar sub limita de determinare

Silidianinul, evidențiată ca fiind prezentă în probele a căror extracție s-a făcut în etanol, metanol și acetat de etil, are un nivel de concentrații cu prin între 2,56 și 45 ppm pentru M2, M3, M4 respectiv S2 și S3, determinarea cantitativă exactă urmând a fi realizată în etapa viitoare de implementare a proiectului.

Activitatea 1.3. Screeningul eficacității antioxidante a extractelor obținute, determinând atât capacitatea antiradicalică cât și capacitatea antioxidantă - partea I-a

Extractele obținute au fost caracterizate și din punct de vedere al eficacității antiradicalice, utilizând metodele DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) și ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)). Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 1.8 și sunt exprimate în Trolox Equivalent Antioxidat Capacity (TEAC).

Tabelul 1.8. Rezultate obținute la determinarea capacității antiradicalice (antioxidante) a extractelor analizate

Proba	TEAC _{DPPH} μmolL ⁻¹ /g material vegetal	TEAC _{ABTS} μmolL ⁻¹ /g material vegetal
M1	53,52	571,91
M2	481,71	1448,45
M3	240,86	1355,67
M4	321,14	1081,94
M5	117,75	833,33
M6	133,81	573,58
M7	380,02	1296,39
M8	272,97	1322,17
M9	417,48	2563,95
M10	187,33	1283,85
M11	235,50	668,90
M12	155,22	306,02
M13	347,90	749,16
M14	283,68	717,39
M15	198,04	752,51
S1	278,32	1260,31
S2	444,246	2569,77
S3	562,00	1727,43

Rezultatele sunt media a trei determinări.

Atât DPPH cât și ABTS au la bază mecanisme de reacție combinate, de tip transfer de electroni și de protoni, dar în timp ce DPPH nu reacționează cu flavonoidele care nu au nucleu aromatic -OH substituit sau cu nucleu cu un singur -OH, ABTS nu discriminează între -OH fenolice, furnizând un răspuns total corelat cu toți substituenții care pot stinge o reacție radicalică.

TEAC_{ABTS} prezintă valorile cele mai mari pentru extractele obținute în metanol la 70 °C (M8) și prin extracție Soxhlet (S2). Valorile TEAC_{ABTS} pentru extractele în etanol 97% și etanol 50% sunt destul de asemănătoare atât la temperaturile de 50 °C și 70 °C cât și prin extracție Soxhlet. Valoarea TEAC_{ABTS} pentru extractul în acetat de etil (M10), care conține cea mai mare cantitate de silimarină este apropiată de cea a extractului în alcool etilic (M8) obținut în aceleași condiții dar care conține o cantitate de silimarină de aproximativ cinci ori mai mică. Aceasta ne duce la concluzia că activitatea antiradicalică (antioxidantă) a extractului este determinată în cea mare măsură de alți compuși extrași din subprodusul studiat și nu de silimarină, cu toate că și silimarina are o activitate antioxidantă notabilă.

TEAC_{DPPH} prezintă în general valori de 3-7 ori mai mici decât TEAC_{ABTS}. La fel ca și în cazul TEAC_{ABTS}, valorile TEAC_{DPPH} determinate sunt mici pentru extractul M10 care conține cantitatea cea mai mare de silimarină, ceea ce ne conduce, ca și în cazul metodei cu ABTS la concluzia ca activitatea antioxidantă a extractelor este determinată în primul rând de alți compuși prezenți în extractele din subprodus și mai puțin de silimarină.

CONCLUZII

În această etapă de execuție a proiectului VALSUSA au fost îndeplinite toate obiectivele specifice etapei, rezultatele estimate fiind realizate:

- au fost elaborate metode de extracție sigură, bazate pe procedee de extracție lichid-lichid, utilizând mai mulți solvenți neinflamabili sau puțin inflamabili (apă, etanol, metanol, acetat de etil) sau amestecuri apă/solvent. S-a obținut un număr de 18 extracte din subprodus. Extracția s-a făcut prin macerare și cu ajutorul instalației de tip Soxhlet.
- S-au elaborat buletine și rapoarte de analiză privind conținutul de fenoli totali din extractele analizate. S-au făcut corelații între conținutul total de fenoli din extractele obținute și natura solventului de extracție folosit, temperatura de lucru, timpul de contact între subprodus și solvent (în cazul apei la 100 °C) și metoda de extracție utilizată (macerare sau Soxhlet).
- S-au elaborat buletine și rapoarte de analiză privind conținutul de silimarină, precum și activitatea antioxidantă a extractelor obținute. S-au făcut corelații între conținutul de silimarină a extractelor și condițiile de obținere a acestora și s-au stabilit condițiile experimentale cele mai favorabile pentru extracția silimarinei din subprodus.
- S-a făcut un screening al capacității antiradicalice (antioxidante) a extractelor obținute utilizând metodele cu DPPH și cu ABTS.
- Diseminarea rezultatelor se va face prin pagina web a proiectului.

Raport științific și tehnic, etapa a II-a 2017

Obiectivul etapei a II-a a proiectului: Dezvoltarea unor tehnologii de laborator pentru extracția silimarinei din subprodusul de la obținerea uleiului de armurariu folosind solvenți organici și apă.

Cuprins	Pag.
Rezumatul etapei a II-a de implementare a proiectului.	16
Act. 2.1. Screeningul eficacității antioxidante a extractelor obținute, determinând atât capacitatea antiradicalică cât și capacitatea antioxidantă -partea a II-a.	17
2.1.1. Determinarea capacității antioxidante totale a extractelor obținute în etapa I-a de implementare a proiectului, printr-o metodă chemiluminometrică bazată pe sistemul luminol/H ₂ O ₂ /Co(II)/EDTA.	17
2.1.2. Screeningul eficacității antioxidante a extractelor obținute, prin metoda cu DPPH sau ABTS determinând atât capacitatea antiradicalică cât și capacitatea antioxidantă -partea a II-a.	20
Act. 2.2. Dezvoltare tehnologie laborator utilizând sisteme de solvenți. Stabilirea profilului de compoziție a extractelor obținute.	23
2.2.1. Modul de lucru și rezultatele obținute la extracția silimarinei prin macerare din subprodus, folosind alcoolul etilic de concentrații 96%, 85% și 75%.	29
2.2.2. Modul de lucru pentru extracția prin macerare a silimarinei cu alcool etilic 85% din subprodus și pentru obținerea unui concentrat de silimarină în stare solidă cristalină.	30
Act. 2.3. Dezvoltare tehnologii de laborator utilizând sisteme de solvenți asistate de fenomene de cavitație (microunde, ultrasunete)-partea I-a. 2.4. Stabilirea profilului de compoziție a extractelor obținute.	33
Act. 2.4. Stagii de practică ale masteranzilor și doctoranzilor.	37
Act. 2.5. Dezvoltarea și eficientizarea schimbului de cunoștințe și bune practici între mediul academic și agentul economic HOFIGAL.	37
Act. 2.6. Diseminarea rezultatelor.	38
Concluzii generale.	39

Rezumatul etapei a II-a de implementare a proiectului.

Activitățile de cercetare-dezvoltare efectuate în această perioadă de raportare a proiectului, 15 decembrie 2016- 15 decembrie 2017, au vizat:

- evaluarea eficacității antiradicalice a extractelor formulate din subprodusul rezultat la obținerea uleiului de armurariu (*Silybum marianum*) prin presare la rece. S-au utilizat în acest scop o nouă metodă chemiluminometrică de analiză dezvoltată în cadrul laboratoarelor de la Universitatea din București și metodele spectrofotometrice convenționale cu DPPH și ABTS.

- stabilirea unor metode/tehnologii de extracție eficiente ale silimarinei din reziduul rezultat la obținerea uleiului de armurariu. Aceste tehnologii au implicat atât utilizarea unor sisteme clasice de extracție cât și a unor sisteme de extracție bazate pe fenomene de cavitație (ultrasonicare și,

respectiv, extracție asistată de microunde). S-au utilizat în acest scop următorii solvenți: alcool etilic, alcool metilic, acetonă și acetat de etil. S-a studiat influența solventului, a temperaturii de extracție, a presiunii și a umectării prealabile cu apă sau cu acid sulfuric 1,5% a subprodusului. S-a făcut un studiu al efectului concentrației alcoolului etilic (concentrații de 75, 85 și 95%) asupra randamentului de extracție al silimarinei din subprodus. A fost selectat drept solvent de extracție un amestec de 85% (m/m) alcool etilic, solvent care a fost agreat de agentul economic Hofigal. A fost dezvoltată o tehnologie de laborator pentru extracția silimarinei din subprodus, bazată pe extracția prin macerare la temperatura de 25 °C.

- stabilirea profilului de compoziție a extractelor formulate și a concentratului de silimarină obținut. S-a folosit în acest scop metoda cromatografică de analiză. Au fost determinați următorii compuși: taxifolin, silicristin, silidianin, silibin A și silibin B. Izo-silibin A și izo-silibin B au fost puși în evidență în cromatogramele obținute, urmând să fie determinați cantitativ ulterior.

A fost semnat un acord de practică pentru masteranda Vișan Paula, care a fost angajată prin concurs pe un post de masterand (referent) în cadrul contractului în perioada 1 noiembrie 2017 – 30 septembrie 2018. Stagiul de practică la Hofigal se va face o zi pe săptămână. Angajarea unui doctorand în cadrul proiectului a fost amânată pentru anul 2018.

Pentru eficientizarea schimbului de cunoștințe între mediul academic (UB și INCDSB) și agentul economic (HOFIGAL) a fost elaborată o strategie de transfer de cunoștințe care a implicat definirea:

- *domeniului de acțiune al schimbului de cunoștințe* (stabilirea segmentelor de piață în care concurează organizația),
- *modului de distribuire a resurselor*: la nivelul organizației există masa critică de resurse umane și de capital care să asigure implementarea cu succes a tehnologiei transferabile;
- *portofoliului activelor tangibile* care include:
 - protocoalele transferabile – tehnologii de extracție cu solvenți siguri și cu risc redus de inflamabilitate,
 - eventuale echipamente scalabile de la nivel de laborator la nivel tehnologic.
- *portofoliului activelor intangibile* care include know-how-ul privind tehnologiile de extracție și modalitățile de determinare a eficienței și a profilului de compoziție al produselor formulate.

Împreună cu HOFIGAL se va trece la stabilirea unui plan personalizat de schimb de cunoștințe în etapa finală de implementare a VALSUSA. Rezultatele științifice și tehnice obținute în cadrul proiectului au fost diseminate prin comunicări la două manifestări de prestigiu din țară și una în străinătate.

Activitate 2.1. Screeningul eficacității antioxidante a extractelor obținute, determinând atât capacitatea antiradicalică cât și capacitatea antioxidantă-partea a II-a

2.1.1. Determinarea capacității antioxidante totale a extractelor obținute în etapa I-a de implementare a proiectului, printr-o metodă chemiluminometrică bazată pe sistemul luminol/H₂O₂/Co(II)/EDTA.

Reactivi și materiale

Etanol (Riedel-de-Haen); soluție tampon borat de sodiu 0,1 M, pH 9; soluție 3×10^{-3} M sare disodică a acidului etilen-diamino tetraacetic; $2,4 \times 10^{-3}$ M soluție de CoCl₂ (Reactivul, București, România); $3,4 \times 10^{-4}$ M soluție de 5-amino-2,3 dihidro-1,4ftalazildionă (luminol, Aldrich); soluția de lucru pentru determinări chemiluminometrice (CL) (preparată zilnic), pentru care s-au amestecat 25 mL 3×10^{-3} M soluție de Na₂EDTA cu 25 mL $2,4 \times 10^{-3}$ M soluție de CoCl₂ și 25 mL soluție de

luminol $3,4 \times 10^{-4}$ M, toate în tampon borat. Înaintea efectuării determinărilor, o parte din această soluție a fost diluată cu o parte soluție tampon borat; soluție stoc de H_2O_2 (Sigma-Aldrich) 10^{-1} M; soluție de H_2O_2 6×10^{-4} M - a fost preparată zilnic; soluție stoc de acid galic (Sigma) 5×10^{-3} M; soluție stoc de acid cafeic (Sigma), 5×10^{-3} M; soluții de acid galic și, respectiv, acid cafeic pentru curba de calibrare cu concentrații cuprinse între 3×10^{-6} M și 10^{-3} M. Cu excepția cazurilor menționate toate soluțiile au fost preparate în apă bidistilată.

S-a lucrat cu luminometrul Turner 20/20ⁿ BioSystems (Promega) și pH-metru WTW.

Modul de lucru

În câte o cutie Petri de plastic transparent de dimensiuni adecvate s-au pipetat 1700 μL soluție de lucru (diluată 1 volum soluție de lucru + 1 volum soluție tampon), apoi 800 μL de H_2O_2 soluție 6×10^{-4} M. Omogenizarea s-a făcut prin agitare 8-10 s. După 1000 s de la adăugarea soluției de apă oxigenată, când valoarea semnalului luminos atinge un maxim și este pe un platou s-a măsurat valoarea acestuia care s-a notat cu I_0 . Apoi s-au pipetat în cutia Petri 25 μL de probă de analiză (standard/probă de analizat), s-a agitat amestecul 8-10 s și s-a măsurat valoarea intensității luminoase, care s-a notată cu I. Prin reprezentarea raportului I_0/I funcție de concentrația antioxidantului s-au putut obține drepte de calibrare pentru antioxidanții standard acid galic și acid cafeic. În tabelul 2.1 sunt date ecuațiile dreptelor de calibrare obținute.

Tabelul 2.1. Ecuațiile, coeficienții de determinare și domeniul de liniaritate pentru dreptele de calibrare obținute la analiza unor soluții etalon prin metoda chemiluminescentă.

Ecuația dreptei de calibrare	Coeficientul de determinare /n ^a	Domeniul de liniaritate ($\mu\text{mol/L}$)
$y = 0,0814x - 1,2249$ (acid galic)	0,9963 / 5	10 - 1000
$y = 0,0644x + 0,0365$ (acid cafeic)	0,9997 / 5	10 - 1000

unde $y = I_0/I$, iar $x =$ concentrația acidului galic sau a acidului cafeic ($\mu\text{mol/L}$). ^a număr de determinări

În tabelul 2.2 sunt date rezultatele experimentale obținute la analiza unor extracte, al caror mod de obținere este prezentat în raportul RST pe anul 2016.

Tabelul 2.2. Rezultatele obținute la determinarea capacității antioxidante totale a extractelor obținute prin macerare 24 ore. Studiul influenței solventului și a temperaturii asupra extracției.

Simbol probă	Solventul de extracție	Temperatura (°C)	I_0/I	Diluția	GAE ^a , mg/g subprodus	CAE ^b , mg/g subprodus
M1	apă	50	$46,7 \pm 2,0$	x1	$1,00 \pm 0,041^c$	$1,31 \pm 0,055$
M2	etanol 50%		$28,4 \pm 1,3$	x20	$12,4 \pm 0,54$	$15,9 \pm 0,72$
M3	etanol 96%		$56,9 \pm 4,1$	x10	$12,1 \pm 0,85$	$15,9 \pm 1,1$
M4	metanol		$52,8 \pm 4,0$	x10	$11,3 \pm 0,83$	$14,8 \pm 1,1$
M5	acetat de etil		$30,2 \pm 2,5$	x1	$0,657 \pm 0,051$	$0,845 \pm 0,069$
M6	apă	70	$62,5 \pm 4,7$	x1	$1,33 \pm 0,098$	$1,75 \pm 0,13$
M7	etanol 50%		$52,5 \pm 2,3$	x20	$22,5 \pm 0,97$	$29,4 \pm 1,3$
M8	etanol 96%		$28,1 \pm 2,3$	x20	$12,3 \pm 0,98$	$15,7 \pm 1,3$
M9	metanol		$27,2 \pm 2,4$	x20	$11,9 \pm 1,0$	$15,2 \pm 1,3$
M10	acetat de etil		$25,8 \pm 2,3$	x2	$1,13 \pm 0,095$	$1,44 \pm 0,13$

^a GAE: echivalenți acid galic; ^b CAE: echivalenți acid cafeic; ^c deviația standard pentru 3 sau 4 determinări. Modul de obținere a extractelor este descris în raportul pentru etapă I-a/2016.

După cum se observă din tabelul 2.2 valorile capacității antioxidante totale variază între $0,657 \pm 0,051$ și $22,5 \pm 0,97$ mg echivalenți acid galic/g subprodus și, respectiv între $0,845 \pm 0,069$ și $29,4 \pm 1,3$ mg echivalenți acid cafeic/g subprodus. Cele mai mici valori s-au calculat pentru maceratele în apă, indiferent de temperatura la care s-a lucrat. Cele mai mari valori s-au obținut pentru extractele în etanol : apă = 50% v/v indiferent de temperatură și pentru maceratul în metanol la 70 °C. Aceeași variație s-a constatat și pentru conținutul în fenoli totali (v. Raportul etapa I-a/2016)

În tabelul 2.3 sunt trecute rezultate experimentale de la determinarea capacității antioxidante totale a extractelor obținute prin macerare la 100 °C pentru diferite valori ale timpului de extracție.

Tabelul 2.3. Rezultate obținute la determinarea capacității antioxidante totale a extractelor obținute prin macerare la 100 °C.

Simbol probă	Timpul de extracție (minute)	I ₀ /I	Diluția	GAE ^a , mg/g subprodus)	CAE ^b , mg/g subprodus
M11	30	47,6 ± 3,9	x 3	3,06 ± 0,25^c	3,99 ± 0,33
M12	60	24,5 ± 1,9	x 3	1,61 ± 0,12	2,05 ± 0,16
M13	120	22,8 ± 2,1	x 3	1,51 ± 0,13	1,91 ± 0,18
M14	180	34,6 ± 1,5	x 3	2,25 ± 0,094	2,90 ± 0,13
M15	240	35,9 ± 3,1	x1	0,78 ± 0,065	1,00 ± 0,086

^a GAE: echivalenți acid galic; ^b CAE: echivalenți acid cafeic; ^cdeviația standard pentru 3 sau 4 determinări. Modul de obținere a extractelor este descris în raportul pentru etapă I-a/2016.

Cea mai mică capacitate antioxidantă a fost de $0,78 \pm 0,065$ mg echivalenți acid galic/g și de $1,00 \pm 0,086$ mg echivalenți acid cafeic/g, înregistrată pentru maceratul M15 (macerare 240 minute). Cea mai mare capacitate antioxidantă a fost de $3,06 \pm 0,25$ mg echivalenți acid galic/g și de $3,99 \pm 0,33$ mg echivalenți acid cafeic/g, înregistrată pentru maceratul M11 (macerare în apă 30 minute).

În tabelul 2.4 se prezintă datele experimentale și valorile capacității antioxidante totale în echivalenți acid galic și echivalenți acid cafeic a probelor obținute prin extracție Soxhlet timp de 4 ore în etanol, metanol și acetat de etil.

Tabelul 2.4. Rezultate obținute la determinarea capacității antioxidante totale a extractelor obținute prin extracție Soxhlet (4 ore).

Simbol proba	Solventul de extracție	I ₀ /I	Diluția	GAE ^a , mg/g subprodus	CAE ^b , mg/g subprodus
S1	etanol 96%	32,8 ± 2,1	x10	11,7 ± 0,55^c	15,3 ± 0,74^b
S2	metanol	54,6 ± 2,6	x20	14,2 ± 0,88	18,3 ± 1,2
S3	acetat de etil	28,1 ± 2,1	x1	0,614 ± 0,044	0,786 ± 0,059

^a GAE: echivalenți acid galic; ^b CAE: echivalenți acid cafeic; ^cdeviația standard pentru 3 sau 4 determinări. Modul de obținere a extractelor este descris în raportul pentru etapă I-a/2016.

Din tabelul 2.4 se observă că valorile capacității antioxidante variază între $0,614 \pm 0,044$ și $14,2 \pm 0,88$ mg echivalenți acid galic/g și, respectiv, între $0,786 \pm 0,059$ și $18,3 \pm 1,2$ mg echivalenți acid cafeic/g subprodus. Cea mai mică valoare s-a calculat pentru extractul în acetat de etil și cea mai mare pentru extractul în metanol.

După cum se observă din tabelele 2.2, 2.3 și 2.4, cea mai mare capacitate antioxidantă totală o are extractul din subprodusul de armurariu obținut prin macerare cu etanol 50% (v/v) la 70 °C, corespunzând unei concentrații de 22,5 mg echivalenți acid galic, respectiv 29,4 mg echivalenți

acid cafeic /g subpodus, dar și extractul obținut prin tehnica Soxhlet în metanol (14,2 mg echivalenți acid galic, respectiv 18,3 mg echivalenți acid cafeic /g subpodus).

2.1.2. Screeningul eficacității antioxidante a extractelor obținute, prin metoda cu DPPH sau ABTS determinând atât capacitatea antiradicalică cât și capacitatea antioxidantă - partea a II-a

În tabelul 2.5 sunt prezentate rezultatele determinării activității antioxidante a unor extracte al căror mod de obținere este prezentat pe scurt în tabelul 9. Detalii privind metoda de obținere a extractelor sunt prezentate la activitatea 2.2.

Tabelul 2.5. Rezultate obținute la determinarea activității antioxidante a unor extracte prezentate în tabelul 2.9, prin metoda cu DPPH și ABTS.

ID probă	Metoda de extracție/analiză	DPPH	ABTS
		TEAC, μM	
E1	Acetonă-înmuire, F1, 3h, 25 °C, p normală	50.69	1049
E1'	Acetonă-fara înmuire, F1, 25 °C, p normală	62.03	824.04
E2	Acetonă-înmuire, F2, 3h, 25 °C, p normală	25.40	358.3
E'2	Acetonă-fara înmuire, F2, 25 °C, p normală	8.29	406.9
E3	Acetonă-înmuire, F3, 3h, 25 °C, p normală	4.87	374.91
E'3	Acetonă-fara înmuire, F3, 25 °C, p normală	-	481.1
E4	Acetonă-înmuire, F1+2+3, 25 °C, p normală	18.79	648.7
E4'	Acetonă- fara înmuire, F1+2+3, 25 °C, p normală	2.84	395.4
E*5	Cloroform extr acetonă, F1, 25 °C, p normală	5.67	994.2
E'11	Acetat de etil-înmuire, F1, 3h, 70 °C, p normală	48.56	-
E'12	Acetat de etil-înmuire, F2, 3h, 70 °C, p normală	26.32	683.29
E'13	Acetat de etil-înmuire, F3, 3h, 70 °C, p normală	2.63	214.97
E14	Acetat de etil-înmuire, F1+2+3, 25 °C, p normală	3.68	415.86
E14'	Acetat de etil-înmuire, F1+2+3, 70 vC, p normală	22.69	653.86
H4	Acetonă-înmuire H ₂ SO ₄ , F1+2+3, 25 °C, p normală	17.72	579.65
H'4	Acetonă-înmuire H ₂ SO ₄ , F1+2+3, 25 C, p scăzută	10.66	282.78
H5	Etanol- înmuire H ₂ SO ₄ , F1, 3h, 25 °C, p normală	21.19	543.82
H6	Etanol-înmuire H ₂ SO ₄ , F2, 3 h, 25 °C, p normală	-	481.12
H7	Etanol-înmuire H ₂ SO ₄ , F3, 3 h, 25 °C, p normală	-	216.25
H8	Etanol- înmuire H ₂ SO ₄ , F1+2+3, 25 °C, p normală	16.66	444.0
H'8	Etanol-înmuire H ₂ SO ₄ , F1+2+3, 25 °C, p scăzută	15.24	423.5
H12	Acetat etil- înmuire H ₂ SO ₄ , F1+2+3, 70 °C, p normală	-	460.65
H'12	Acetat etil- înmuire H ₂ SO ₄ , F1+2+3, 70 °C, p scăzută	6.73	408.18

p: presiune; F: fracția

Rezultatele activității antioxidante a probelor din tabelul 2.16 sunt date mai jos.

ID probe	(DPPH)	(ABTS)	ID probă/ Metodă analiză	DPPH	ABTS
	TEAC, μM			TEAC, μM/mg produs	
F3	98.36	283.1	P2aq	519.02	860.33
F4	237.8	1359	P3aq	554.68	796.12
			P2pb	50.26	455.30
			P3pb	60.79	471.22

În tabelul 2.6 se prezintă valorile activității antiradicalice a unor extracte în echivalent Trolox, în funcție de protocolul de extracție și tipul de solvent utilizat.

Tabelul 2.6. Variația activității antiradicalice exprimate în echivalent Trolox, în funcție de protocolul de extracție și tipul de solvent, folosind metoda cu DPPH.

Mod de extracție/degresare	Solvent	Activitate antiradicalică, echivalent Trolox, $\mu\text{molL}^{-1}/\text{g}$ masă vegetală
Macerare 48h	MeOH-AcEt	367.77
Macerare 24h	MeOH-AcEt	397.91
MW/n-hexan	MeOH-AcEt	204.98
MW-US/n-hexan	MeOH	271.30
MW-US /n-hexan	AcEt	24.12
MW-US /n-hexan	EtOH	54.26
MW-US/n-hexan	MeOH-AcEt	390.11
MW-US/n-hexan	MeOH-H ₂ O	217.04
MW-US/n-hexan	EtOH-AcEt	192.93
MW-US/n-hexan	Acetonă	235.13
US/n-hexan	MeOH-AcEt 30min	235.13
US/n-hexan	MeOH 30min	428.06
US /n-hexan	AcEt 30min	247.19
US/n-hexan	EtOH 95% 30min	283.36
US / Cloroform	EtOH 95% 30min	191.41
US / Cloroform	EtOH 80% 30min	180.87
US / Cloroform	EtOH 90% 30min	217.04
US / Cloroform	EtOH 100% 30min	163.06
US / Cloroform	EtOH 90% 60min	283.57
US / Cloroform	EtOH 90% 90min	365.10
US / Cloroform	EtOH 90% 4x30min	295.71
US / Cloroform	EtOH 95% 45min	209.14
US / Cloroform	EtOH 95% 60min	391.30
US / Cloroform	Acetonă 30min	217.04
US /n-hexan	Acetonă 30min	145.33
US / Cloroform	Acetonă 45min	336.74
US / Cloroform	Acetonă 60min	436.00
US / Cloroform	Acetonă 90min	482.08

Pentru extracțiile asistate de fenomene de cavitație, condițiile optime de lucru sunt: se cântăresc aproximativ 5 grame de subprodus nedegresat (pulbere); peste subprodusul cântărit se adaugă 3 mL apă caldă, se lasă la umectat timp de 60 minute, cu apă caldă (aproximativ 70 °C) la temperatura camerei. După aceasta, se adaugă 20 mL cloroform și amestecul umectat se omogenizează timp de 18 ore sub agitare continuă. Cloroformul se elimină și se trece la extracția silimarinei. Peste masa umectată liberă de cloroform se adaugă 20 mL etanol 90% (raport masă umectată:volum solvent=1:4) și se supune extracției cu fenomene de cavitație -US timp de 60 min, se filtrează și se colectează fracția extrasă într-un cilindru gradat ($V_1=7.4$ mL). Din această se recoltează 1+1 mL pentru analiza profilului de compoziție și al eficienței antiradicalice al fracției 1, restul volumului, exact măsurat se stochează pentru a se utiliza la reconstituirea extractului final total. Reziduul solid

rămas este supus re-extracției cu același volum (20 mL) de etanol 90%, de 2 ori, timpul de aplicare al fenomenelor de cavitație fiind 30 min (extracția 2), respectiv 15 min (extracția 3). Frațiile 2 și 3 se colectează separat ($V_2=15\text{mL}$ și $V_3=17\text{mL}$), din fiecare dintre ele se recoltează câte 1+1 mL. În ambele cazuri, resturile de extract din fracția 2, respectiv fracția 3, sunt adăugate peste fracția 1, pentru reconstituirea extractului final total ($V_t=33\text{mL}$). Din extractul final total se recoltează 1+1 mL pentru analiza profilului de compoziție și al eficacității. Probele au fost denumite DF1, DF2, DF3 și DFt.

Utilizând același protocol de umectare și extracție, s-a abordat și varianta degresării extractelor obținute și nu a subprodusului. Probele au suportat aceleași etape de prelucrare, cu excepția degresării, care s-a efectuat astfel: peste un volum de 0.5 mL din fiecare fracție extrasă se pipetează 1 mL cloroform, apoi probele se omogenizează prin agitare la vortex timp de 15 minute. După acest timp, soluțiile sunt centrifugate 20 minute la 1400 rpm se preia supernatantul în tuburi Eppendorf (2 mL) și se aduc la sec. Reziduul astfel obținut se reia în metanol (1 mL) se filtrează prin celule de ultrafiltrare PVDF de 0,2 μm și se diluează cu metanol (raport diluție 1:20). Probele au fost denumite NDF1, NDF2, NDF3 și NDFt.

Rezultatele analizei HPLC pentru stabilirea profilului de compoziție (identificarea și cuantificarea componentelor silimarinei) sunt prezentate în tabelul 2.7.

Tabelul 2.7. Profilul de compoziție al extractelor formulate în iunie, utilizând extracția în etanol 90% asistată de fenomene de cavitație.

Proba	$\mu\text{g/mL}$			
	Silicristin	Silidianin	Silibin A	Silibin B
DF1	653.3	3329.8	243.5	481.0
DF2	205.7	1115.5	79.0	161.1
DF3	72.9	411.2	26.5	58.2
DFt	229.0	1203.0	85.8	172.9
NDF1	73.7	452.4	30.5	65.1
NDF2	90.7	514.4	34.8	74.4
NDF3	31.5	206.9	10.7	27.6
NDFt	5.6	57.3	0.3	5.8

Rezultatele sunt media a trei determinări.

Din datele obținute a fost evident că degresarea subprodusului inițial este mai eficientă decât degresarea extractelor, astfel încât ulterior s-a lucrat utilizându-se produs pentru extracție degresat, conform protocolului prezentat anterior.

Extractele obținute au fost caracterizate și din punct de vedere al eficacității antiradicalice, utilizând metodele DPPH și ABTS. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 2.8.

Tabelul 2.8. Eficacitatea antiradicalică a extractelor formulate utilizând extracție în etanol 90% asistată de fenomene de cavitație.

Proba	$\text{TEAC}_{\text{DPPH}}$	$\text{TEAC}_{\text{ABTS}}$
	$\mu\text{M}/\text{mg}$ material vegetal	$\mu\text{M}/\text{mg}$ material vegetal
DF1	356.04	1848.26
DF2	230.45	891.44
DF3	112.45	818.14
DFt	309.84	1055.86

După cum se observă eficacitatea fracției totale este mai mică decât a primei fracții, în ciuda conținutului mai mare de compuși activi individuali, ceea ce înseamnă că asocierea tuturor compușilor activi ai complexului de silimarină nu conduce neapărat la un efect antioxidant sinergic. Însă aceasta nu se traduce neapărat în necesitatea limitării extracției doar la prima fracție, deoarece asocierea tuturor acestor compuși activi vizează efecte multiple –reparatorii pentru celula hepatică, antiproliferative și, desigur și antioxidante, ceea ce pledează pentru valorificarea rezidului rezultat la obținerea prin presare la rece a uleiului de armurariu în vederea obținerii unui extract total cât mai bogat în silimarină (compus complex și nu izomer izolat și purificat).

Activitate 2.2. Dezvoltare tehnologie laborator utilizând sisteme de solvenți. Stabilirea profilului de compoziție a extractelor obținute.

Datele preliminare obținute în etapa I-a a proiectului în diferite condiții experimentale ne-au permis să tragem concluzia că cele mai bune rezultate se obțin la extracția silimarinei cu acetonă, acetat de etil, alcool etilic 96% și alcool metilic. Alcoolul metilic deși permite extracția cu randament mare a silimarinei a fost exclus datorită toxicității sale.

S-a studiat extracția silimarinei din subprodus în următoarele condiții experimentale:

- extracție după o prealabilă înmuiere a acestuia în apă,
- extracție fără înmuiere în apă,
- extracție cu înmuierea subprodusului în acid sulfuric 1,5%.
- extracție la presiune scăzută,
- extracție la temperatura ambiantă (25 °C),
- extracție la 70 °C.

Înmuierea în apă a fost făcută tratând subprodusul cu apă caldă (aprox, 70-80 °C). Se amestecă subprodusul cu apă și se lasă o oră la temperatura camerei. Cantitatea de apă folosită este de 50-60% din masa subprodusului. Înmuierea subprodusului s-a făcut și cu o soluție de acid sulfuric 1,5% procedându-se ca mai sus.

Extracția la presiune scăzută s-a făcut la o valoare a presiunii de aproximativ 0,89 hPa.

În toate cazurile s-a folosit pentru extracție o cantitate de 5 grame de subprodus. Pentru extracție s-a folosit metoda macerării. Extracția s-a repetat de trei ori utilizând volume de câte 20 mL de solvent. După adăugarea fiecărui volum de solvent peste subprodus s-a omogenizat amestecul cu o baghetă și s-a lăsat timp de trei ore pentru extracție. După efectuarea extracției s-a separat lichidul de masa solidă prin decantare și s-au luat două probe de câte 1 mL din faza lichidă pentru analize.

În tabelul 2.9 sunt prezentate pe scurt condițiile experimentale folosite la obținerea extractelor.

Tabelul 2.9. Condițiile experimentale folosite la obținerea extractelor.

Nr. Crt.	Simbol	T ^a (°C)	P ^b	Solvent	Nr. extracție	Timp	Volum (mL)
	1	2	3	4	5	6	7
1	E1	25	n. ^c	Acetonă (înmuiere)	1	3h	10
2	E2	25	n.	Acetonă (înmuiere)	2	3h	17
3	E3	25	n.	Acetonă (înmuiere)	3	3h	18
4	E4	25	n.	Acetonă (înmuiere)	1+2+3		45
5	E'1	25	n.	Acetonă (fără înmuiere)	1	3h	13,5
6	E'2	25	n.	Acetonă (fără înmuiere)	2	3h	18
7	E'3	25	n.	Acetonă (fără înmuiere)	3	3h	18,5

8	E'4	25	n.	Acetonă (fără înmuiere)	1+2+3		50
9	E''1	25	s. ^d	Acetonă (înmuiere)	1	3h	18
10	E''2	25	s.	Acetonă (înmuiere)	2	3h	19
11	E''3	25	s.	Acetonă (înmuiere)	3	3h	16
12	E''4	25	s.	Acetonă (înmuiere)	1+2+3	-	53
13	E*1	25	s.	Acetonă (fără înmuiere)	1	3h	13
14	E*2	25	s.	Acetonă (fără înmuiere)	2	3h	18,5
15	E*3	25	s.	Acetonă (fără înmuiere)	3	3h	18,5
16	E*4	25	n.	Acetonă (fără înmuiere)	1+2+3	-	50
17	E*5	25	n.	Extracție în cloroform (după extracția cu acetonă)	1	30min	22,5
18	E11	70	n.	Acetat de etil(fara înmuiere)	1	3h	6
19	E12	70	n.	Acetat de etil(fara înmuiere)	2	3h	12
20	E13	70	n.	Acetat de etil (fără înmuiere)	3	3h	18
21	E14	25	n.	Acetat de etil (fără înmuiere)	1+2+3		36
22	E'11	70	n.	Acetat de etil (înmuiere)	1	3h	15
23	E'12	70	n.	Acetat de etil (înmuiere)	2	3h	15
24	E'13	70	n.	Acetat de etil(înmuiere)	3	3h	18,5
25	E'14	25	n.	Acetat de etil (înmuiere)	1+2+3		48,5
26	E'15	70	n.	Acetat de etil (fără înmuiere)	1	3h	11
27	E'16	70	n.	Acetat de etil (fără înmuiere)	2	3h	20
28	E'17	70	n.	Acetat de etil (fără înmuiere)	3	3h	17,5
29	E'18	70	n.	Acetat de etil (fără înmuiere)	1+2+3		48,5
30	H1	25	n.	Acetonă (înmuiere, H ₂ SO ₄ 1,5%)	1	3h	7
31	H2	25	n.	Acetonă (înmuiere, H ₂ SO ₄ 1,5%)	2	3h	20
32	H3	25	n.	Acetonă (înmuiere, H ₂ SO ₄ 1,5%)	3	3h	23
33	H4	25	n.	Acetonă (înmuiere, H ₂ SO ₄ 1,5%)	1+2+3		50
34	H'1	25	s.	Acetonă (înmuiere, H ₂ SO ₄ 1,5%)	1	3h	7
35	H'2	25	s.	Acetonă (înmuiere, H ₂ SO ₄ 1,5%)	2	3h	20
36	H'3	25	s.	Acetonă (înmuiere, H ₂ SO ₄ 1,5%)	3	3h	23
37	H'4	25	s.	Acetonă (înmuiere, H ₂ SO ₄ 1,5%)	1+2+3		50
38	H5	25	n.	Etanol (înmuiere, H ₂ SO ₄ 1,5%)	1	3h	7
39	H6	25	n.	Etanol (înmuiere, H ₂ SO ₄ 1,5%)	2	3h	20
40	H7	25	n.	Etanol (înmuiere, H ₂ SO ₄ 1,5%)	3	3h	23
41	H8	25	n.	Etanol (înmuiere, H ₂ SO ₄ 1,5%)	1+2+3		50
42	H'5	25	s.	Etanol (înmuiere, H ₂ SO ₄ 1,5%)	1	3h	9
43	H'6	25	s.	Etanol (înmuiere, H ₂ SO ₄ 1,5%)	2	3h	20
44	H'7	25	s.	Etanol (înmuiere, H ₂ SO ₄ 1,5%)	3	3h	23
45	H'8	25	s.	Etanol (înmuiere, H ₂ SO ₄ 1,5%)	1+2+3		52
46	H9	70	n.	Acet-etil (înmuiere, H ₂ SO ₄ 1,5%)	1	3h	7
47	H10	70	n.	Acet-etil (înmuiere, H ₂ SO ₄ 1,5%)	2	3h	23
48	H11	70	n.	Acet-etil (înmuiere, H ₂ SO ₄ 1,5%)	3	3h	20
49	H12	70	n.	Acet-etil (înmuiere, H ₂ SO ₄ 1,5%)	1+2+3		50
50	H'9	70	s.	Acet-etil (înmuiere, H ₂ SO ₄ 1,5%)	1	3h	7
51	H'10	70	s.	Acet-etil (înmuiere, H ₂ SO ₄ 1,5%)	2	3h	20
52	H'11	70	s.	Acet-etil (înmuiere, H ₂ SO ₄ 1,5%)	3	3h	23
53	H'12	70	s.	Acet-etil (înmuiere, H ₂ SO ₄ 1,5%)	1+2+3		50

^aT: temperatură; ^bP: presiune; ^cn. : normală; ^ds. : scăzută

Metoda de identificare și cuantificare a componentelor silimarinei din extractele obținute constă în: sistem HPLC SHIMADZU 20AD, coloana C18 Kromasil 250 x 4.6 mm, 5 μm, temperatura coloanei 30 °C, volumul de injecție al probelor 10 μL, modul de eluție izocratic, faza mobilă compusă din: apă cu 0,1% acid formic (A) și metanol (B), în raport de combinare 55:45, debitul fazei mobile 0,6 mL/min, timp de analiză 20 minute, lungimea de undă monitorizată 288 nm.

Rezultatele analizei HPLC al unor extracte al căror mod de obținere este prezentat în tabelul 9, sunt prezentate în tabelul 2.10 de mai jos.

Tabelul 2.10. Rezultatele determinării componentelor silimarinei din extractele obținute din subprodusul de armurariu, pentru diferite condiții de lucru.

Nr. crt.	ID probă	μg/mL				Descriere			
		SC	SD	SBA	SBB	solvent extracție, fracția	înmuiere	solvent înmuiere	presiune
1	E1	519.5	3211	239.8	543.8	acetonă, F1	DA	apă	normală
2	E2	356.8	1726.8	132.5	313.7	acetonă, F2	DA	apă	normală
3	E3					acetonă, F3	DA	apă	normală
4	E4	197.4	1309.8	94.9	201.7	acetonă, F1+2+3	DA	apă	normală
5	E'1	356,8	1726,8	132,5	313,7	acetonă, F1	NU	-	normală
6	E'2	100,9	650,7	52,1	105,8	acetonă, F2	NU	-	normală
7	E'3	64,8	436,0	31,4	65,0	acetonă, F3	NU	-	normală
8	E'4	49.6	527.9	42	84	acetonă, F1+2+3	NU	-	normală
9	E*5	111.2	1291	97.3	203.5	Extracție în cloroform (după extracția cu acetonă)	-	-	normală
10	E'11	498,5	3052,7	237,5	460,7	acetat de etil, F1	DA	apă	normală
11	E'12	267,5	1607	123,1	245,6	acetat de etil, F2	DA	apă	normală
12	E'13	67,4	449,2	32,3	67,4	acetat de etil, F3	DA	apă	normală
13	E'14	239.5	436.2	121.7	237.7	acetat de etil, F1+2+3	DA	apă	normală
14	E14	129,8	875,5	68,3	136,6	acetat de etil, F1+2+3	NU	-	normală
15	H4	136	938.8	75	174.8	acetonă, F1+2+3	DA	H ₂ SO ₄ 1,5%	normală
16	H'4	170,0	173,7	79,7	189,3	acetonă, F1+2+3	DA	H ₂ SO ₄ 1,5%	scăzută
17	H5	290,3	1683,4	134,4	257,6	etanol, F1	DA	H ₂ SO ₄ 1,5%	normală
18	H6	109,4	619,2	47,9	93,0	etanol, F2	DA	H ₂ SO ₄ 1,5%	normală
19	H7	86,9	80,8	45,3	90,9	etanol, F3	DA	H ₂ SO ₄ 1,5%	normală
20	H8	112.9	750.8	60.9	123.1	etanol, F1+2+3	DA	H ₂ SO ₄ 1,5%	normală
21	H'8	123.1	771.8	60.1	120.1	etanol, F1+2+3	DA	H ₂ SO ₄ 1,5%	scăzută
22	H12	186,1	1023,4	88,5	165,9	acetat de etil, F1+2+3	DA	H ₂ SO ₄ 1,5%	normală
23	H'12	160.5	316.8	81.7	162	acetat de etil, F1+2+3	DA	H ₂ SO ₄ 1,5%	scăzută

SC: silicistin; SD: silidianin; SBA: silibin A; SBB: silibin B

Extractele obținute au fost caracterizate și din punct de vedere al eficacității antiradicalice, utilizând metodele DPPH și ABTS. Rezultatele sunt prezentate sub forma de μM echivalent trolox (TEAC)/ mg subprodus în tabelul 2.11.

Tabelul 2.11. Eficacitatea antiradicalică a extractelor obținute din subprodusul de armurariu, în diferite condiții de lucru.

Nr crt	ID probă/ metodă analiză	DPPH	ABTS
		TEAC, $\mu\text{M}/\text{mg}$ subprodus	
1	E1	50.69	1049.25
2	E'1	62.03	824.04
3	E2	25.40	358.28
4	E'2	8.29	406.90
5	E3	4.87	374.91
6	E'3	-	481.12
7	E4	18.79	648.74
8	E'4	2.84	395.39
9	E*5	5.67	994.23
10	E'11	48.56	--
11	E'12	26.32	683.29
12	E'13	2.63	214.97
13	E14	3.68	415.86
14	E'14	22.69	653.86
15	H4	17.72	579.65
16	H'4	10.66	282.78
17	H5	21.19	543.82
18	H6	-	481.12
19	H7	-	216.25
20	H8	16.66	444.01
21	H'8	15.24	423.54
22	H12	-	460.65
23	H'12	6.73	408.18

După cum se poate vedea din tabelele de mai sus cele mai bune rezultate se obțin la utilizarea drept solvent de extracție a acetatului de etil, E'11 – E'14, E14; H12 și H'12, urmând apoi acetona E1 – E4, E'1 – E'4 și alcoolul etilic H5- H8, H'8.

Important de remarcat este faptul că înmuierea cu apă a subprodusului, înainte de efectuarea extracției determină o creștere apreciabilă a randamentelor de extracție a silimarinei. Pentru diferiții constituenți ai silimarinei are loc o creștere cuprinsă între 45% pentru silicristin și 86% pentru silidianin. O creștere și mai mare a concentrației celor trei componente ale silimarinei se obține pentru cele trei extracte reunite, proba E4 cu înmuiere și proba E'4 fără înmuiere (402% (silicristin), 248% (silidianin), 226 % (silibin A și 239 silibin B). Se pot trage următoarele concluzii:

- ✓ Înmuierea subprodusului într-o soluție de acid sulfuric 1,5% (proba H4) determină o creștere a gradului de extracție cu acetona, comparativ cu proba neînmuiaată (E'4)
- ✓ Folosirea unei presiuni mai scăzute nu aduce avantaje în ceea ce privește randamentele de extracție.
- ✓ Extracția cu alcool 96% din subprodusul înmuiaat în acid sulfuric 1,5%, la presiune scăzută (proba H'8) determină o ușoară variație a randamentului de extracție comparativ cu extracția efectuată la presiune normală.
- ✓ Extracția cu alcool 96% din subprodusul înmuiaat în acid sulfuric 1,5% (proba H8) prezintă un randament de extracție de 83% pentru silicristin, de 80% pentru silidianin, 80% pentru silibina A și 70,4% pentru silibin B, comparativ cu extracția în acetona (proba H4). efectuată în aceleași condiții.
- ✓ Extracția cu acetat de etil pentru subprodusul înmuiaat în apă (proba E'14) comparativ cu extracția în acetona în condiții similare (proba E4) determină o creștere a randamentelor de

extracție pentru silicristin de 21%, o scădere pentru silidianin de 67%, o creștere pentru silibin A de 28% și o creștere pentru silibin B de 18%.

- ✓ Extracția cu acetat de etil pentru subprodusul înmuiat în apă (proba E'14) comparativ cu extracția în acetat de etil cu înmuierea subprodusului în acid sulfuric 1,5% determină o scădere a randamentelor de extracție cuprinse între 33% și 28% pentru cei patru componenți analizați.
- ✓ Nu este indicată folosirea cloroformului pentru îndepărtare uleiului extras cu acetonă odată cu silimarină deoarece sunt extrași și componenți ai silimarinei în cantitate mare (proba E*5).

În tabelul 2.12 se prezintă volumele efective de extract, cantitățile totale de SC, SD, SBA și SBB extrase și masa totală de silimarină extrasă dintr-un gram de subprodus.

Tabelul 2.12. Volumele efective de extract, cantitățile totale de SC, SD, SBA și SBB extrase și masa totală de silimarină extrasă dintr-un gram de subprodus.

Nr. crt.	Simbol	Volum efectiv de extract (mL)	SC	SD	SBA	SBB	Total silimarină mg	Total silimarină mg/g subprodus
			Total extras (mg)	Total extras (mg)	Total extras (mg)	Total extras (mg)		
1	E1	10	5.195	32.11	2.398	5.348	45.05	9.01
2	E2	17	3.344	20.17	1.437	3.077	28.03	5.61
3	E3	18	1.6056	10.29	1.521	1.4814	14.90	2.98
4	E4	45	8.883	58.94	4.271	9.077	81.17	16.2
5	E'1	13.5	4.817	23.31	1.789	4.235	34.15	6.83
6	E'2	18	1.816	10.90	0.9378	1.904	15.56	3.11
7	E'3	18.5	1.199	8.066	0.581	1.203	11.05	2.21
8	E'4	50	2.48	26.4	2.10	4.20	25.18	7.04
9	E*5	22.5	2.511	29.05	2.189	4.579	38.33	7.67
10	E'11	15	7.478	45.79	3.563	6.911	63.74	12.7
11	E'12	15	4.013	24.11	1.847	3.684	33.65	6.73
12	E'13	18.5	1.247	8.310	0.598	1.247	11.40	2.28
13	E'14	48.5	11.62	21.16	5.902	11.53	50.21	10.04
14	E14	36	4.673	31.52	2.459	4.918	43.57	8.71
15	H4	50	6.800	46.94	3.750	8.740	66.23	13.25
16	H'4	50	8.500	8.685	3.985	9.465	30.64	6.13
17	H5	7	2.0321	11.78	0.941	1.803	16.56	3.31
18	H6	20	2.188	12.24	0.958	1.860	17.25	3.45
19	H7	23	1.999	1.858	1.042	2.091	6.989	1.40
20	H8	50	5.645	37.54	3.045	6.155	52.39	10.5
21	H'8	52	6.401	40.13	3.125	6.245	55.90	11.2
22	H12	50	9.305	51.17	4.425	8.295	73.20	14.6
23	H'12	50	8.025	15.84	4.085	8.100	36.05	7.21

*Cantitățile de silimarină calculate prin însumarea cantităților prezente în F1 + F2 + F3 este mai mare decât cantitățile calculate din volumul însumat al fracțiilor înmulțit cu silimarinei din F4, deoarece din fiecare fracție (F1-F4) s-au luat probe pentru analiză.

În tabelul 2.13 se prezintă rezultatele obținute privind conținutul de silimarină în reziduul uscat obținut la evaporarea lichidului și uscare (la temperatura de 100 °C, în etuvă) pentru mai multe probe selecționate din tabelul 9.

Tabelul 2.13. Concentrația de silimarină în masa solidă obținută după evaporarea solventului de extracție pentru mai multe probe semnificative.

Nr. crt.	ID probă	Masa totală extrasă (mg)	Total silimarină (mg/extract)	% silimarină în masa solidă obținută după evaporarea solventului
1	E1	180	44.14	24.5
2	E'1	270	34.15	12.7
3	E4	450	81.17	18.04
4	E'4	400	35.18	8.80
5	E*5	360	38.32	10.6
6	E'14	388	50.21	12.9
7	H4	400	66.23	16.6
8	H8	500	52.39	10.5
9	H'8	520	55.90	10.8
10	H'12	600	36.05	6.01

Din tabelul 2.13 se poate constata că valoarea concentrației de silimarină în reziduul solid obținut este maximă la folosirea acetonei pentru extracție din subprodusul înmuiat în apă (E1 și E4). Dacă subprodusul nu este înmuiat în apă, procentul de silimarină scade apreciabil (E'1 și E'4). La folosirea acetatului de etil pentru extracție din produsul înmuiat în apă (E'14), procentul de silimarină determinat în reziduul obținut este de asemenea mare, dar scade apreciabil dacă subprodusul este înmuiat în acid sulfuric 1,5% (H'12).

Din studiile preliminare rezultă că cel mai bun solvent de extracție este acetona, urmată de acetatul de etil și de alcoolul etilic. Intrucât agentul economic HOFIGAL nu agreează folosirea acetonei și a acetatului de etil ne-am concentrat pe folosirea alcoolului etilic drept solvent de extracție. Pentru realizarea extracției s-a folosit subprodusul înmuiat în prealabil în apă.

În figura 2.1 se prezintă cromatogramele HPLC-DAD suprapuse pentru două extracte E4 (acetona) și E'14 (acetat de etil), obținute în aceleași condiții de extracție (înmuier, F1+2+3, presiune normală, temperatura 25 °C).

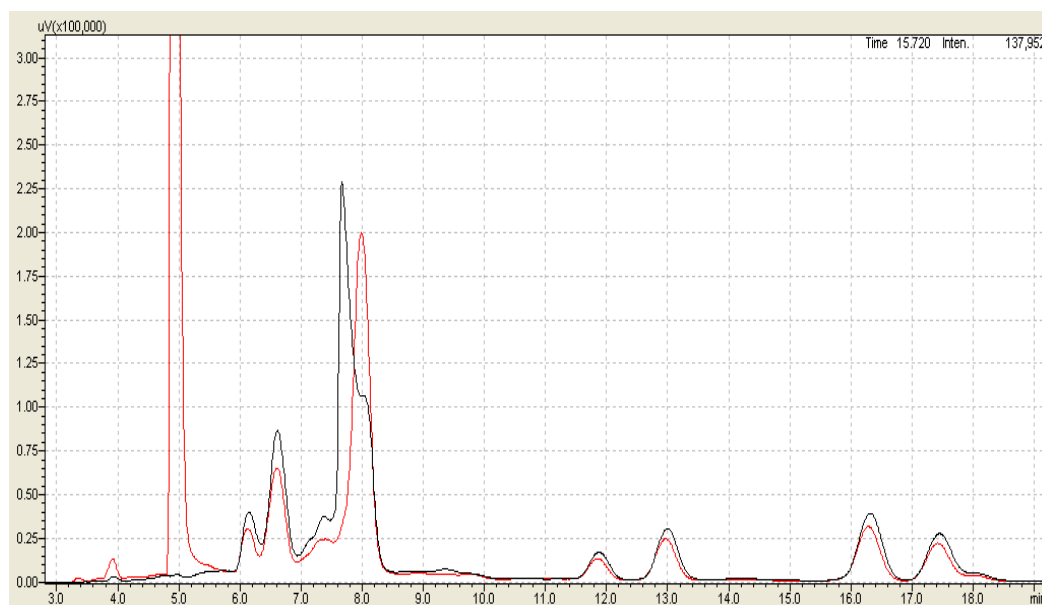


Figura 2.1. Cromatograme HPLC-DAD suprapuse pentru proba E4 (roșu) și proba E'14 (negru); silicristin ($t_R=6.56\text{min}$), silidianin ($t_R=8.01\text{min}$), silibinin A ($t_R=11.88\text{min}$) și silibinin B ($t_R=13.00\text{min}$).

2.2.1. Modul de lucru și rezultate obținute la extracția silimarinei prin macerare din subprodus folosind alcoolul etilic de concentrații 96%, 85% și 75%.

Se cântăresc 5 grame de subprodus care se introduc într-un pahar Berzelius. Peste subprodus se adaugă 3,0 mL apă distilată caldă (aproximativ 80 - 100 °C) în mici porțiuni. Cu o baghetă se omogenizează conținutul paharului astfel încât apa să impregneze întreaga cantitate de subprodus. Se lasă pentru înmuiere la temperatura de 25 °C timp de o oră.

Extracția silimarinei din subprodus se face de trei ori cu câte 20 mL de alcool etilic 96%. Toate trei extracțiile se fac la temperatura de 25 °C. În cadrul laboratorului nostru am folosit un montaj constituit dintr-o pâlnie de separare de 250 mL având fixat în partea de jos un dop de vată de sticlă prin care soluția alcoolică a fost filtrată după extracție. Pâlnia de separare a fost conectată la un vas de vid cuplat la o pompă de apă.

Extracția I-a. Subprodusul care a fost umectat în prealabil cu apă, în etapa de mai sus, se introduce în pâlnia de separare. Se introduc apoi 20 mL de alcool etilic 96%. Amestecul se omogenizează din când în când cu o baghetă. După 180 de minute se îndepartează alcoolul etilic din amestec prin aspirare la vid.

Extracțiile II și III se fac la fel ca extracția I cu excepția faptului că vor dura 120 de minute, în al doilea caz și 60 de minute în al treilea caz. În acest ultim caz se face extracția cu 10 mL de alcool.

În final cele trei extracte în alcool etilic se reunesc, se filtrează și li se măsoară volumul. Apoi alcool etilic 96% se îndepartează din extractele reunite prin distilare până la un volum rezidual de aproximativ 15-20 %.

Metoda de identificare și cuantificare a componentelor silimarinei din extractele obținute este aceeași ca cea prezentată anterior în acest raport. În figura 2.2 se prezintă grafic concentrațiile diferitelor componente ale silimarinei în extractele obținute.

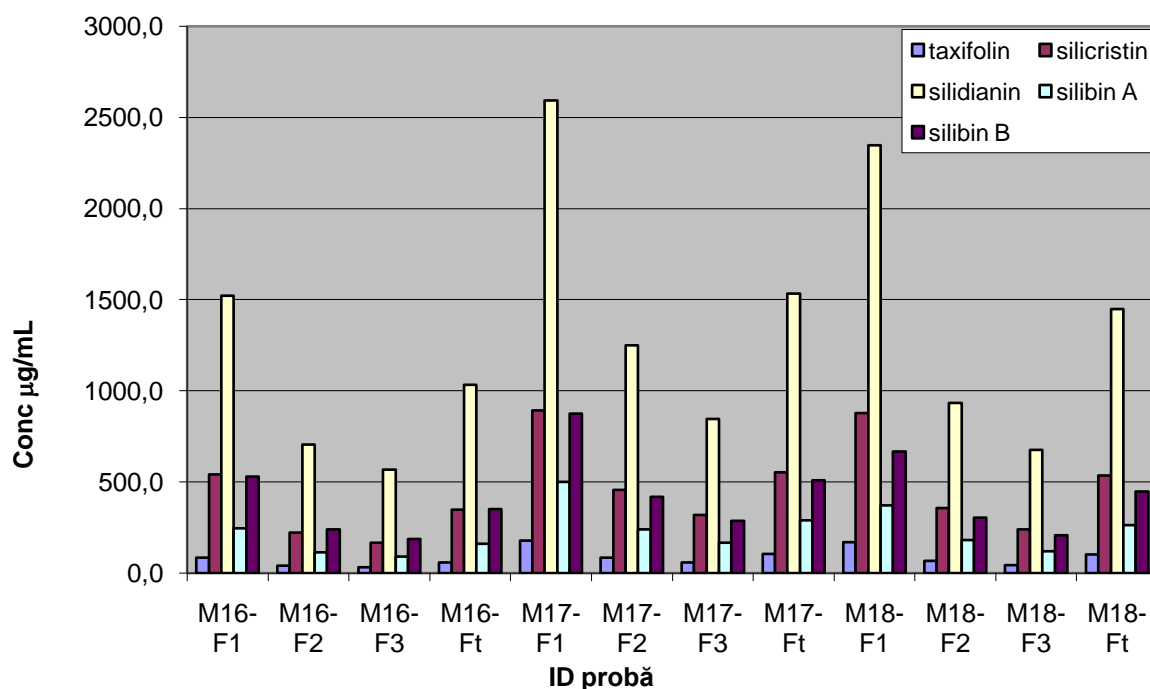


Figura 2.2. Reprezentarea grafică a concentrațiilor diferitelor componente ale silimarinei din extractele obținute din subprodus folosind alcool etilic de diferite concentrații.

În tabelul 2.14 se prezintă comparativ rezultatele obținute la determinarea componentelor silimarinei în extractele obținute la utilizarea alcoolului etilic de concentrații 96%, 85% și 75%.

Tabelul 2.14. Rezultatele obținute la determinarea componentelor silimarinei în extractele obținute la utilizarea alcoolului etilic de concentrații 96%, 85% și 75%.

Fracția/ componentul	EtOH 96%	EtOH 85%	EtOH 75%	Fracția/ componentul	EtOH 96%	EtOH 85%	EtOH 75%
F1	M16'	M17'	M18'	F3	M16'''	M17'''	M18'''
taxifolin	84.1	177.4	170.4	taxifolin	32.9	57.2	44.9
silicristin	541.8	894.0	877.3	silicristin	167.7	318.9	240.1
silidianin	1523.1	2592.3	2346.6	silidianin	567.0	847.1	677.4
silibin A	245.2	499.2	370.8	silibin A	90.8	165.4	120.4
silibin B	528.4	876.5	668.3	silibin B	188.3	285.8	208.4
F2	M16''	M17''	M18''	Ftotal	M16	M17	M18
taxifolin	40.1	85.0	67.9	taxifolin	59.2	105.4	103.5
silicristin	221.2	456.4	356.6	silicristin	347.1	552.9	537.1
silidianin	706.4	1249.4	933.2	silidianin	1032.0	1534.9	1448.6
silibin A	113.4	240.1	180.2	silibin A	160.8	290.3	264.5
silibin B	238.6	417.5	305.0	silibin B	351.4	510.4	448.3

Concluzii

Fracția 1 prezintă cea mai mare concentrație a compușilor de interes analizați, comparativ cu fracțiile următoare ale aceleiași variante de extracție (fără a ține cont de masa de probă luată în lucru);

- Metoda prin macerare prezintă un randament de extracție ridicat;
- Concentrația indicată a solventului de extracție, etanolul, pentru obținerea celor mai însemnate cantități de silimarină din extractele este cea de 85%.

În tabelul 2.15 se prezintă rezultatele analizei componentelor silimarinei în extractele obținute la folosirea alcoolului etilic de concentrațiile 96%, 85% și 75% precum și cantitatea de silimarină totală extrasă dintr-un gram de subprodus. Cel mai adecvat solvent de extracție a silimarinei din subprodus este alcoolul etilic de concentrație 85%. La folosirea sa s-a putut extrage o cantitate de 25,3 mg/ gram subprodus. Cantitatea de silimarină extrasă cu alcool etilic 96% reprezintă 66,8 % din cea extrasă cu alcool 85% iar cea extrasă cu alcool 75% reprezintă 92%.

2.2.2. Modul de lucru pentru extracția prin macerare a silimarinei cu alcool etilic 85% din subprodus și pentru obținerea unui concentrat de silimarină în stare solidă cristalină.

Modul de lucru este identic cu cel folosit la extracția silimarinei cu alcool de 96%, 85% și 75%. S-a pornit însă de la 75 g subprodus, volumele de alcool pentru extracție fiind multiplicat corespunzător. Subprodusul a fost tratat cu 40 mL de apă caldă (aproximativ 70-95 °C) în porțiuni mici. Amestecul subprodus - apă a fost bine omogenizat și s-a lăsat apoi în repaus o oră la temperatura ambiantă (aprox. 25 °C) pentru înmuiere.

Extracția I-a. Amestecul de alcool 85% și subprodus se omogenizează din când în când. S-a lucrat la temperatura ambiantă (25 °C). După 180 de minute se îndepărtează faza lichidă din suspensie prin aspirare la vid. Se măsoară volumul total de extract care se notează cu F1. **Volum F1 = 228 mL.** **Extracțiile II și III** se fac la fel ca extracția I cu excepția faptului că timpul de contact subprodus, alcool etilic va fi de 120 de minute, în al doilea caz și 60 de minute în al treilea caz. În al treilea caz se face extracția cu 150 mL. **Volum F2 = 281 mL. Volum F3 150 mL.**

Tabelul 2.15. Concentrațiile de SC, SD, SBA, SBB și taxifolin precum și cantitatea totală de silimarină (mg) extrasă /gram de subprodus la extracția cu alcoolul etilic 96% , 85% și 75%.

Simbol	Volum efectiv extract (mL)	SC		SD		SBA		SBB		Taxifolin		Total silimarină mg	Total silimarină mg/g sp*
		mg/mL	Total extras	mg/mL	Total extras	mg/mL	Total extras	mg/mL	Total extras	mg/mL	Total extras		
M16'	16	0,5418	8,669	1,5231	24.37	0,2452	3.923	0,5284	8,454	0,0841	1,346	46.80	9.36
M16''	19	0,2212	4.203	0,7064	13.42	0.1134	2.155	0.2386	4.533	0.0401	0.762	25.07	5.01
M16'''	12	0,1677	2.012	0,5670	6.804	0.0908	1.090	0.1883	2.260	0.0329	0.395	12.57	2.51
total	-		14.89		44.59		7.168		15.25		2.503	84.44	16.9
M16	38	0.3471	13.19	1.032	39.22	0.1608	6.110	0.3514	13.35	0.0592	2.250	74.12	
M17'	12	0.894	10.73	2.592	31.10	0.499	5.990	0.877	10.52	0.177	2.124	60.47	12.1
M17''	20	0.456	9.128	1.249	24.99	0.2401	4.802	0.418	8.360	0.085	1.700	48.98	9.80
M17'''	10	0.1389	3.189	0.8471	8.471	0.1654	1.654	0.2858	2.858	0.0572	0.572	16.74	3.35
total			23.05		64.56		12.45		21.74		4.396	126.2	25.3
M17	36	0.5529	19.90	1.5349	55.26	0.290	10.45	0.510	18.37	0.1054	3.79	107.8	
M18'	15	0.8773	13.16	2.3466	35.199	0.3708	5.562	0.6683	10.02	0.1704	2.556	66.50	13.3
M18''	18.5	0.3566	6.597	0.9332	17.264	0.1802	3.334	0.305	5.643	0.0679	1.256	34.09	6.82
M18'''	9.5	0.2401	2.281	0.6774	6.435	0.1204	1.144	0.2084	1.980	0.0449	4.266	16.10	3.22
total			22.04		58.90		10.04		17.64		8.078	116.7	23.3
M18	37	0.5371	19.87	1.4486	53.60	0.2645	9.787	0.4483	16.59	0.1035	3.830	103.7	

*sp: subprodus

Din fiecare fracție F1, F2 și F3 se ia câte o probă de 5 mL din care se determină reziduu solid prin încălzire la etuvă 6-7 ore la aproximativ 90-100 °C. S-au obținut următoarele valori ale masei uscate/5mL extract: 155,8 mg pentru F1, 47,5 mg pentru F2 și 26,7 mg pentru F3.

În final cele trei extracte în alcool etilic se reunesc și se filtrează. Apoi volumul final obținut se împarte în trei părți egale care se prelucrează astfel:

PI) Proba se evaporă la sec apoi se ține la etuvă la 90-100 °C timp de 6 ore și se cântărește. Reziduu obținut are culoare maro închis, în acesta este vizibil un amestec de substanță solidă care conține silimarină și ulei. Nu se obțin cristale de silimarină. Reziduu se dizolvă în 100 mL alcool 85%. Apoi se distilă alcoolul până la un volum rezidual de aprox. 17-18 mL. S-a făcut o extracție cu 17 mL de cloroform. S-a agitat 20 de minute. Fazele s-au separat foarte greu. Extracția cu cloroform se repeta de două ori. Cantitatea totală de substanță solidă extrasă de cloroform a fost de 2,7205 g, ceea ce reprezintă aproximativ 10,88% din masa de subprodus din care s-a făcut extracția. În masa solidă astfel obținută se vede un reziduu galben portocaliu de silimarină ceea ce ne indică că silimarina a fost extrasă parțial de cloroform, dar o parte importantă a rămas în faza apoasă. Din acest motiv această metodă de separare a silimarinei nu a mai fost studiată în continuare.

PII) Volumul respectiv se concentrează prin distilarea și recuperarea alcoolului la aproximativ 10 % din volumul inițial (19-20 mL). Apoi se extrage cu un volum egal de hexan prin agitare 20 minute. Ulei extras de hexan: 1,5541 g. Reprezintă 6,22 % din masa subprodusului din care s-a făcut extracția. Uleiul nu conține silimarină.

Partea apoasă se evaporă, se usucă la etuvă 7-8 ore și se cântărește. S-a obținut 2,040 g. Masa solidă de concentrat se răcește și se mojarază. Se obține o pulbere maro închis, se tratează cu alcool etilic absolut aproximativ 1,5 mL și apoi cu 10 mL de apă (aproximativ) apoi din nou cu alcool astfel încât la sfârșit să fie aproximativ 18 mL de solvent cu o concentrație de aproximativ 45% alcool. Uleiul se depune sub forma unei mase negre. Volumul de lichid este redus la aproximativ 10 mL prin evaporare la cald. Se lasă la cristalizat până a doua zi. Se obțin cristale galbene + masa de ulei. Se decantează faza apoasă, de culoare maro închis, aceasta are volumul de 5,6 mL. Masa solidă rămasă se spală cu 2 mL de apă de trei ori (la temperatura camerei). După fiecare spălare cu apă se decantează lichidul după 20 minute. Lichidul de spălare se amestecă cu restul de lichid. Volumul de fază apoasă obținută va fi în total de $5,6 + 3 \times 2 = 11,6$ mL. Lichidul obținut a fost notat cu **P2aq**.

Substanța solidă rămasă se usucă și se ține în exicator până a doua zi. Se cântărește, se obțin 0,8896 g. Masa solidă se spală de trei ori cu câte 4 mL cloroform (la temperatura camerei). Se filtrează prin G4. Masa reziduu obținut este de 0,8110 g. Produsul respectiv se notează cu **P2pb**.

PIII) Ca mai sus cu excepția faptului că se fac două extracții cu hexan. Volumul obținut după distilare a fost de aprox. 17 mL. S-au făcut două extracții cu volume de 17-18 mL hexan. Agitare 20 minute, separare 10 minute. După extracția cu hexan și concentrarea la cald a fazei apoase la aproximativ 9-10 mL faza apoasă a fost lăsată peste noapte la temperatura ambiantă (20 -24 °C). Au precipitat cristale galbene frumoase. Faza apoasă a fost decantată cu ușurință. Volumul acesteia a fost de 9 mL, este slab opalescentă și are o culoare galbenă. Faza solidă rămasă s-a spălat cu câte 2 mL de apă de trei ori. După fiecare tratare cu apă se decantează lichidul după 20 minute. Lichidele de spălare se amestecă cu restul de lichid. Solidul rămas se usucă și se cântărește (v. figura 2.3). Se obțin 0,6818 g. Proba respectivă se notează cu **P3pb**.



Figura 2.3. Aspectul concentratului de silimarină obținut. Proba **P3pb**.

Identificarea și cuantificarea HPLC a componentelor silimarinei din extractele obținute.

Rezultatele analizei HPLC, exprimate în $\mu\text{g/mL}$ pentru fiecare component al silimarinei (calculate din ecuația dreptelor de etalonare) sunt prezentate în tabelul 2.16.

Tabelul 2.16. Rezultate obținute la analiza probelor F3, F4, P2aq, P2aq, P2pb si P3pb,

ID probă	Taxifolin	Silicristin	Silidianin	Silibin A	Silibin B	Suma
F3	39.48	197.61	613.80	91.92	183.11	1125,92
F4	91.02	477.28	1359.31	237.82	436.80	2602,23
P2aq	496.59	1648.13	216.97	86.11	144.02	
P3aq	432.54	1040.04	219.74	4.08	15.30	
P2pb	14.04	77.56	53.47	31.97	66.23	
P3pb	39.66	218.71	521.22	103.85	214.90	

*Rezultatele sunt exprimate exprimate în $\mu\text{g/mL}$

Probele P2pb si P3pb au fost solubilizate în EtOH 90% (1,2 mg respectiv, 2 mg într-un mL de EtOH 90%) și diluate pentru analiză HPLC-DAD. Raportând în $\mu\text{g/mg}$ solid pentru probele P2pb si P3pb se obțin rezultatele prezentate în tabelul 2.17.

Tabelul 2.17. Rezultate determinării componentilor silimarinei din concentratele obținute.

ID probă	Taxifolin	Silicristin	Silidianin	Silibin A	Silibin B	Total
	$\mu\text{g/mg}$ solid					
P2pb	11.7	64.63	44.55	26.64	55.191	202.7
P3pb	19.83	109.35	260.61	51.92	107.45	549.17

În cazul probei P3pb s-a obținut un concentrat de silimarină cu un conținut de 54,92 % silimarină și cu masa de 0,6818 g.

Act. 2.3. Dezvoltare tehnologii de laborator utilizând sisteme de solvenți asistate de fenomene de cavitație (microunde, ultrasunete) - partea I-a. 2.4. Stabilirea profilului de compoziție a extractelor obținute.

Metode de extracție cu solvenți asistate sau nu de fenomene de cavitație (INCDSB) ianuarie 2017.

Datorită particularității probelor și dificultăților întâmpinate în timpul analizei HPLC a componentelor silimarinei, a fost necesară introducerea unei etape suplimentare privind pregătirea probei pentru analiză, degresarea, utilizând n-hexan pentru eliminarea interferențelor de tipul lipidelor și/sau polizaharidelor.

Înainte de începerea extracției, o cantitate de material vegetal uscat (pulbere) a fost supusă degresării prin amestecarea cu un volum de n-hexan, în raport 1:3, și agitată timp de 18 h la temperatura camerei. Solventul a fost apoi eliminat complet iar masa de solid a fost uscată la etuvă, la 25⁰ C, timp de 90 de minute.

Pulberea astfel obținută a fost folosită mai departe pentru extracția propriu-zisă. Pornind de la 1 g material vegetal (pulbere subprodus), s-au realizat mai multe tipuri de extracte prezentate în tabelul 2.18.

Raportul între masa de material vegetal uscat luat în lucru și volumul de solvent utilizat pentru extracție a fost de 1: 10.

Tabelul 2.18. Sisteme de extracție aplicate pentru obținerea silimarinei (silicristin, silidianin, silibinin) din subprodusul rezultat la obținerea uleiului de armurariu.

ID probă	Solvent	Timp de extracție	Mod de extracție
1	MeOH ^a : AcEt ^b (1:1)	24 h	Macerare (temp. camerei), agitare
2	MeOH: AcEt (1:1)	48 h	Macerare (temp. camerei), agitare
3	MeOH: AcEt (1:1)	30 min	Ultrasonicare (US)
4	MeOH: AcEt (1:1)	2x5sec (MW)	Microunde (MW) 350W
5	MeOH: AcEt (1:1)	2x5sec (MW)+15 min (US)	Microunde (MW) + US
6	MeOH	30 min	Ultrasonicare (US)
7	MeOH	2x5sec (MW)+15 min(US)	Microunde (MW) + US
8	MeOH:H ₂ O(1:1)	2x5sec (MW)+15 min (US)	Microunde (MW) + US
9	AcEt	30 min	Ultrasonicare (US)
10	AcEt	2x5sec (MW)+15 min (US)	Microunde (MW) + US
11	EtOH ^c : H ₂ O (95:5)	30 min	Ultrasonicare (US)
12	EtOH abs. (EtOH)	2x5sec (MW)+15 min (US)	Microunde (MW) + US
13	EtOH:AcEt (1:1)	2x5sec (MW)+15 min (US)	Microunde (MW) + US

^aMeOH: metanol; ^bAcEt: acetat de etil; ^cEtOH: etanol

Metoda HPLC-DAD

Caracteristicile de performanță ale metodei HPLC-DAD au fost prezentate în raportul RST al proiectului pe 2016. Metoda dezvoltată a fost aplicată la determinarea conținutului în silimarină pentru extractele din tabelul 2.18, rezultatele obținute fiind prezentate în tabelul 2.19. Ținând seama de volumul de extracție și de masa de reziduu vegetal luată în lucru, rezultatele sunt exprimate ca și conținut de substanță activă în micrograme pe g de subprodus vegetal.

Tabelul 2.19. Conținutul în silicristin, sildianin, silibinin A și silibinin B, în μg substanță activă/g material solid

Solvent	Sistem de extracție	SC	SD	SBA	SBB
MeOH ^a : AcEt ^b (1:1)	M ^d 24h	2650	17750	1220	2510
MeOH: AcEt (1:1)	M 48h	2720	17760	1340	2710
MeOH: AcEt (1:1)	US ^e	1540	10150	730	1530
MeOH: AcEt (1:1)	MW ^f	1060	6870	530	1100
MeOH: AcEt (1:1)	MW-US	1190	7800	580	1190
MeOH	US	2120	12270	900	1900
MeOH	MW- US	3170	18710	1360	2870
MeOH-H ₂ O	MW-US	1520	4860	200	450

AcEt	US	130	1680	110	240
AcEt	MW-US	1	750	40	120
EtOH ^c 95%	US	1400	8230	650	1350
EtOH abs	MW-US	260	1930	130	300
EtOH:AcEt (1:1)	MW-US	240	1850	130	300

^aMeOH: metanol; ^bAcEt: acetat de etil; ^cEtOH: etanol, ^dM: macerare; ^eUS: ultrasonicare; ^fMW: microunde

În urma acestei etape de realizare a experimentelor s-au conturat unele concluzii parțiale, și anume:

- ✓ S-au obținut mai multe extracte din subprodus, extracția s-a făcut prin tehnici asistate de microunde, ultrasonicare sau combinații între acestea două, în comparație cu tehnica convențională de macerare.
- ✓ Din corelațiile între conținutul de silimarină a extractelor și condițiile de obținere a acestora s-a stabilit că metanolul reprezintă solvenul cu cel mai mare randament de extracție al silimarinei.
- ✓ Extracția cu cel mai bun randament și cel mai ridicat conținut în silimarină o reprezintă combinarea a două tehnici bazate pe fenomenul de cavitație, și anume, extracția asistată de microunde urmată de ultrasonicarea probelor.
- ✓ Degresarea probelor conduce la cromatograme mai bine definite și reduce driftul liniei de baza în cazul analizei HPLC-DAD a extractelor formulate.

Metode de extracție cu solvenți asistate sau nu de fenomene de cavitație (INCDSB)

Degresarea probei uscate (pulbere) a fost realizată astfel:

a) degresare utilizând n-hexan: timp de 18 h, agitare continuă, raport masă solid:volum solvent de 1:10, temperatura laboratorului;

b) degresare utilizând cloroform: timp 18 h, agitare continuă, raport masă solid:volum solvent de 1:10, temperatura laboratorului.

Pornind, ca și anterior, de la aproximativ 1 g (pentru fiecare extract cântărirea s-a efectuat cu exactitate și raportarea conținutului s-a făcut la masa de material vegetal cântărită) subprodus, rezultat la obținerea uleiului de armurariu (pulbere degresată) s-au realizat mai multe tipuri de extracte prezentate în tabelul 2.20. Raportul între masa de material vegetal degresat luat în lucru și volumul de solvent utilizat pentru extracție a fost de 1: 10.

Tabelul 2.20. Sisteme de extracție aplicate pentru extracția silimarinei (silicristin, silidianin, silibinin) din subprodusul rezultat la obținerea uleiului de armurariu.

ID probă	Solvent	Timp de extracție	Mod de extracție
1	2	3	4
1	MeOH ^a : AcEt ^b (1:1)	30 min	US ^d
2	MeOH: AcEt (1:1)	2x5sec	MW ^e 350W
3	MeOH: AcEt (1:1)	2x5sec+15 min	MW-US
4	MeOH	30 min	US
5	MeOH	2x5sec+15 min	MW - US
6	MeOH:H ₂ O(1:1)	2x5sec+15 min	MW - US
7	AcEt	30 min	US
8	AcEt	2x5sec+15 min	MW - US
9	EtOH: H ₂ O (95:5)	30 min	US
10	EtOH abs.	2x5sec+15 min	MW - US
11	EtOH ^c :AcEt (1:1)	2x5sec+15 min	MW - US

12	Acetonă	30 min	US
14	EtOH: H ₂ O (90:10)	30 min	US
15	EtOH: H ₂ O (80:20)	30 min	US
16	Acetonă	30 min	US
17	Acetonă	45 min	US
18	EtOH: H ₂ O (95:5)	30 min	US
19	EtOH: H ₂ O (95:5)	45 min	US
20	EtOH 100%	30 min	US
21	EtOH: H ₂ O (90:10)	60 min	US
22	Acetonă	60 min	US
23	Acetonă	90 min	US
24	EtOH: H ₂ O (95:5)	60 min	US

^aMeOH: metanol; ^bAcEt: acetat de etil; ^cEtOH: etanol, ^dUS: ultrasonicare; ^eMW: microunde

Determinarea profilului de compoziție a fost realizată utilizând aceeași metoda HPLC-DAD dezvoltată pentru caracterizarea complexului de silimarină ca și anterior. Valorile obținute pentru toate cele patru componente ale silimarinei în extractele analizate sunt exprimate în mg substanță activă/g material solid luat în lucru pentru extracție (pulbere) și sunt prezentate în tabelul de mai jos.

Tabelul 2.21. Conținutul în silicristin, sildianin, silibinin A și silibinin B, în μg substanță activă/g material solid

Nr crt.	Tehnologie extracție & sistem degresare	Solvenți/timp extracție	μg substanță activă/g material solid			
			SC	SD	SBA	SBB
1	2	3	4	5	6	7
1	MW ^a -US ^b –degresare n-hexan	MeOH* ^c	1480	8720	650	1360
2	MW-US –degresare n-hexan	MeOH-AcEt* ^d	1190	7800	580	1190
3	MW-US –degresare n-hexan	MeOH-Apa*	1520	4860	200	450
4	MW-US –degresare n-hexan	AcEt*	1	750	40	120
5	MW-US –degresare n-hexan	EtOH ^e 100%*	260	1930	130	300
6	MW-US –degresare n-hexan	EtOH –AcEt*	240	1850	130	300
7	MW-US degresare cloroform	Acetonă 30 min	3060	17430	1370	2600
8	MW- degresare n-hexan	MeOH-AcEt*	10600	6870	530	1100
9	US- degresare n-hexan	MeOH-AcEt 30min	1540	10150	730	1530
10	US- degresare n-hexan	MeOH 30 min	2120	12270	900	1900
11	US- degresare n-hexan	AcEt 30 min	130	1680	110	240
12	US- degresare n-hexan	EtOH 95% 30min	1400	8230	650	1350
13	US-degresare cloroform	EtOH 100% 30min	2080	10900	880	1610
14	US-degresare cloroform	EtOH 95% 30 min	1520	6420	540	940
15	US-degresare cloroform	EtOH 95% 45min	1890	9680	750	1380
16	US-degresare	EtOH 95% 60min	4380	22690	1620	330

	cloroform					
17	US-degresare cloroform	EtOH 90% 30min	2450	11770	850	1720
18	US-degresare cloroform	EtOH 90% 60min	2770	14600	1110	2060
19	US-degresare cloroform	EtOH 80% 30min	2180	9570	680	1380
20	US-degresare cloroform	Acetonă 30min	3470	20620	1530	3100
21	US- degresare cloroform	AcEt30min	560	4420	400	780
22	US-degresare cloroform	Acetonă 45min	3640	22260	1660	3150
23	US-degresare cloroform	Acetonă 60min	3970	23870	1730	3490
24	US-degresare cloroform	Acetonă 90min	4670	27360	1840	3790

*unde nu este indicat timpul de extracție, acesta este conform tabelului 18 si 19 pentru solvenții si sistemul de extracție indicat.

^aMW: microunde; ^bUS: ultrasonicare; ^cMeOH: metanol; ^dAcEt: acetat de etil; ^eEtOH: etanol

CONCLUZII

- Metoda de extracție asistată de fenomene de cavitație –ultrasunete-este cea mai eficientă metodă de extracție, indiferent de solventul utilizat.
- Silidianin este componenta cu cea mai mare concentrație în aproape toate extracțiile încercate iar silibinul prezintă un raport de 1:2 între cei doi diasteroisomeri, silibin A și silibin B în toate extractele obținute. Deși poate părea în contradicție cu unele date de literatură, rezultatele trebuie privite ținând seama de specificitatea tipului de plantă și de modul de expresie al acesteia în funcție de condițiile de cultivare, stocare, prelucrare preliminară.
- ✓ Utilizarea cloroformului ca solvent pentru degresare a condus la un conținut mai ridicat de silimarina.
- ✓ Acetona reprezintă solventul cu cel mai mare randament de extracție al silimarinei, urmat de etanol 95%.

Activitatea 2.4. Stagii de practică ale masteranzilor și doctoranzilor.

Masteranda Vișan Paula a fost angajată prin concurs pe un post de masterand (referent), o jumătate de normă, la Universitatea din București, în cadrul contractului 13 BG/2016 pe perioada 1 noiembrie 2017 – 30 septembrie 2018. Vișan Paula va efectua un stagiul de practică la Hofigal o zi pe săptămână în perioada angajării sale. Tema lucrării sale de dizertație pe care o va susține în 2018 este strâns legată de cea a contractului 13BG/2016. Până în prezent nu a fost încă angajat un doctorand în cadrul contractului, se vor întreprinde demersuri în acest scop în 2018. Un al doilea masterand de la Facultatea de Chimie, și anume Bratu Adriana își va realiza teza de dizertație cu o temă strâns legată de activitățile desfășurate în cadrul proiectului 13 BG/2016.

Activitatea 2.5. Dezvoltarea și eficientizarea schimbului de cunoștințe și bune practici între mediul academic și agentul economic HOFIGAL.

Schimbul de cunoștințe vizează inovarea de produs, care înseamnă, o nouă tehnologie care să conducă la obținerea unui randament ridicat de extracție a complexului de silimarina.

Pentru eficientizarea schimbului de cunoștințe cu agentul economic (HOFIGAL) a fost necesară elaborarea unei strategii minimale de transfer de cunoștințe care a implicat definirea:

- **domeniului de acțiune al schimbului de cunoștințe** (stabilirea segmentelor de piață în care concurează organizația): în cazul nostru industria fito-farmaceutică și sisteme de nișă (ex: producători de suplimente nutriționale etc.)
- **modului de distribuire a resurselor**: la nivelul organizației există masa critică de resurse umane și de capital care să asigure implementarea cu succes a tehnologiei transferabile.
- **portofoliului activelor tangibile** care include:
 - protocoalele transferabile – tehnologii de extracție cu solvenți siguri și cu risc redus de inflamabilitate, extracție asistată sau nu de fenomene de cavitație;
 - eventuale echipamente scalabile de la nivel de laborator la nivel tehnologic.
- **portofoliului activelor intangibile** care include know-how-ul privind tehnologiile de extracție și modalitățile de determinare a eficienței și a profilului de compoziție al produselor formulate.

S-a trecut apoi la proiectarea unui set de instrumente pentru a facilita schimbul de cunoștințe:

- mecanismele de schimb de cunoștințe aplicabile în cazul VALSUSA sunt:
 - cercetare în parteneriat (prezentarea rapoartelor intermediare în cadrul celei de a doua etape de realizare au condus la orientarea cercetărilor și optimizarea parametrilor tehnologiei de extracție în funcție de necesitățile specifice ale HOFIGAL, ca urmare a discuțiilor între reprezentanții HOFIGAL și directorul de proiect),
 - mobilitatea personalului (au fost stabilite principiile deplasării masterandului și, când poziția vacantă va fi ocupată se doctorand),
 - publicare în parteneriat, dacă va fi cazul, sau înlocuirea publicării în parteneriat cu brevetarea tehnologiei cu participarea HOFIGAL.
- instrumente de comunicare pentru agentul economic: protocol detaliat de implementare a tehnologiei.
- asigurarea suportului de resursă umană pentru aplicarea în practica industrială (linia tehnologică HOFIGAL) a cunoștințelor transferate.

Împreună cu HOFIGAL se va trece la stabilirea unui plan personalizat de schimb de cunoștințe în etapa finală de implementare a VALSUSA.

Activitatea 2.6. Diseminarea rezultatelor.

S-a realizat prin participarea cu trei comunicări sub forma de poster la manifestări de prestigiu din țară și din străinătate după cum urmează:

1. A. F. Danet, C.V. Popa, S. C. Litescu, A. Vasilescu, G L. Radu, M. Cheregi, "Nano Metal Oxides Based Method for the Assessment of The Antioxidant Capacity" (poster), XIXth EUROANALYSIS 2017, 28 August - 1 September 2017, Stockholm, Sweden.
2. C.V. Popa, S. C. Litescu, A. F. Danet, A.E. Bratu, "Recovery of Silymarin from the Byproduct Resulted from Cold-Pressing of Milk Thistle Seeds" (poster), 3rd International Conference New Trends on Sensing- Monitoring- Telediagnosis for Life Sciences, September 7-9, 2017, Bucharest, Romania.
3. C.V. Popa, S. C. Litescu, A. F. Danet, G. Badea, L. Lungu, "Antioxidant Capacity Assay of some Extracts from Byproduct Obtained by Cold-Pressing of Milk Thistle Seeds" (poster), PRIOCHEM 13th Edition, 25-27 October 2017, Bucharest, Romania.

Concluzii generale

Activitățile prevăzute în planul de lucru pentru 2017 al proiectului 13 BG/2016 au fost realizate astfel:

Activitatea 2.1. *Screeningul eficacității antioxidante a extractelor obținute, determinând atât capacitatea antiradicalică cât și capacitatea antioxidantă*-partea a II-a a fost finalizată **100%**. S-au folosit în acest scop atât metodele convenționale de determinare a capacității antioxidante cu ABTS și DPPH cât și o nouă metodă chemiluminometrică dezvoltată în laboratoarele Universității din București.

Activitatea 2.2. *Dezvoltare tehnologie laborator utilizând sisteme de solvenți. Stabilirea profilului de compoziție a extractelor obținute* a fost finalizată în proporție de 100%. În cadrul acestei activități au fost studiate peste 50 sisteme de extracție a silimarinei din subprodusul de la obținerea uleiului de armurariu. Pe baza rezultatelor obținute și ținând seama de cerințele beneficiarului a fost ales drept solvent de extracție alcoolul etilic 85% și drept metodă de extracție macerarea la temperatura camerei. Folosind această metodă a fost obținut un concentrat de silimarină în stare cristalină cu o concentrație de peste 50% silimarină.

Activitățile 2.3. *Dezvoltare tehnologii de laborator utilizând sisteme de solvenți asistate de fenomene de cavitație (microunde, ultrasunete)*-partea I-a și 2.4. *Stabilirea profilului de compoziție a extractelor obținute*, au fost finalizate în proporție de 100%. Au fost testate zeci de sisteme de extracție asistate de fenomene de cavitație, cu sau fără degresare prealabilă a subprodusului, care și-au dovedit utilitatea la extracția silimarinei din subprodus. Concluziile complete privind realizările obținute vor fi trase la finalizarea părții a II-a a acestei activități.

Activitatea 2.5. *Stagii de practică ale masteranzilor și doctoranzilor*. A fost semnat un acord de practică la Hofigal pentru masteranda Vișan Paula, care a fost angajată prin concurs pe un post de masterand, o jumătate de normă, în cadrul contractului 13 BG/2016. Stagiul de practică la Hofigal se va face o zi pe săptămână în perioada angajării masterandei. Nu s-a reușit încă angajarea unui doctorand în cadrul contractului. Se va angaja în 2018. O altă masterandă (Bratu Adriana) își va face lucrarea de dizertație în cadrul proiectului.

Activitatea 2.6. *Dezvoltarea și eficientizarea schimbului de cunoștințe și bune practici între mediul academic și agentul economic HOFIGAL* a fost realizată în proporție de 100%.

Activitatea 2.7. *Diseminarea rezultatelor* a fost realizată prin prezentarea a trei comunicări la manifestări științifice de prestigiu din străinătate (Euroanalysis2017, Stockholm, Suedia) și două manifestări științifice din țară.