

Raport științific și tehnic pentru etapa a III-a 2018

Obiectivul etapei a III-a a proiectului: Caracterizarea proprietăților amestecurilor de compuși extrași prin valorificarea superioară a subprodusului de la obținerea uleiului de armurariu, din punct de vedere al compoziției, al capacității antioxidante și al eficacității antiproliferative în raport cu linii celulare tumorale.

Cuprins	Pag.
Rezumatul etapei a III-a de implementare a proiectului.....	1
Act. 3.1. Dezvoltarea de tehnologii de laborator utilizând sisteme de solvenți asistate de fenomene de cavitație (microunde, ultrasunete)-partea a 2a.....	2
3.1.1. Dezvoltarea de tehnologii de laborator pentru extracția silimarinei din subprodusul rezultat la obținerea uleiului de armurariu prin presare la rece.....	2
3.1.1.1. Dezvoltarea de tehnologii de laborator pentru extracția silimarinei din subprodus după îndepărtarea uleiului rezidual prin extracție cu hexan.....	2
3.1.1.2. Dezvoltarea unei tehnologii de laborator pentru extracția silimarinei după degresarea prealabilă a subprodusului într-o unitate industrială specializată în acest scop.....	4
3.1.2. Determinarea HPLC a silimarinei din extractele de armurariu și din concentratul de armurariu obținut.....	5
3.1.2.1. Rezultate analitice pentru probele obținute aplicând modul de lucru descris la paragraful 3.1.1.1.	5
3.1.2.2. Rezultate analitice pentru probele obținute aplicând modul de lucru descris la paragraful 3.1.1.2.....	11
Act. 3.2. Screeningul eficacității antioxidante a extractelor de armurariu.....	16
3.2.1. Dezvoltarea unei metode portabile, ieftine și rapide pentru determinarea compușilor de interes din subprodusul de armurariu, din concentratul de silimarina și din alți produși de origine vegetală.....	18
Act. 3.3. Evaluarea eficacității antiproliferative pe culturi celulare tumorale.....	22
Act. 3.4. Dezvoltarea și eficientizarea schimbului de cunoștințe și bune practici între mediul academic și agentul economic.....	24
Act. 3.5. Diseminarea rezultatelor.....	25

Rezumatul etapei a III-a de implementare a proiectului

Activitățile de cercetare-dezvoltare efectuate în această perioadă de raportare a proiectului, ianuarie -30septembrie 2018, au vizat: 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 extracție asistată de microunde). S-au dezvoltat mai multe tehnologii de laborator pentru extracția silimarinei care au fost aplicate pentru recuperarea acesteia din subprodusul de armurariu. S-a stabilit profilul de concentrație al extractelor formulate. Tehnologiile de laborator dezvoltate au fost caracterizate în ce privește gradul de recuperare a silimarinei din subprodusul luat în studiu și al conținutului total al acesteia din concentratul obținut. S-a determinat de asemenea raportul dintre suma concentrațiilor de silibin A și B față de silimarina totală. S-a făcut o evaluare a

eficacității antioxidante și antiradicalice a extractelor formulate din subprodusul rezultat la obținerea uleiului de armurariu (*Silybum marianum*) prin presare la rece. A fost elaborată o nouă metodă de determinare a capacității antioxidante bazată pe utilizarea unor nano-oxizi. S-au prezentat rezultatele obținute în dezvoltarea și eficientizarea schimbului de cunoștințe și bune practici între mediul academic și agentul economic. S-au prezentat rezultatele obținute la diseminarea rezultatelor care s-a făcut prin participări la conferințe de specialitate și lucrări științifice trimise spre publicare.

Act. 3.1. Dezvoltarea de tehnologii de laborator utilizând sisteme de solvenți asistate de fenomene de cavitație (microunde, ultrasunete)-partea a 2a

Pornind de la concluziile rezultate după experimentele efectuate în etapa anterioară de execuție a proiectului, tehnologia de extracție utilizând fenomene de cavitație a implicat combinarea a două tehnici, și anume extracția asistată de microunde urmată de ultrasonicarea probelor, întrucât se obține astfel cel mai bun randament.

Extracția se aplică pe subprodus vegetal degresat, fișa tehnologică a acestui tip de tehnologie fiind prezentată succint mai jos.

Tehnologie utilizată: extracție cu solvenți siguri (etanol 90%) asistată de microunde și ultrasunete.

Materiale și metodă: 10 g material vegetal (degresat în prealabil) 100 mL EtOH 90%.

Materialul vegetal împreună cu solventul sunt supuse extracției asistate de microunde utilizând o putere a câmpului aplicat de 650 W, o frecvență de 2,5 kHz, timp de 30 minute. Apoi amestecul este supus imediat extracției asistate de ultrasunete, la o temperatură de 30 °C, timp de 10 minute.

Amestecul este filtrat și lichidul este supus concentrării la temperatura de maximum 45°C până se ajunge la o suspensie cu un volum de cca 10 mL. Aceasta este supusă unei duble spălări cu apă, fiecare spălare fiind urmată de centrifugare. Pulberea solidă rezultată se usucă la 60°C.

Materialul solid este analizat. Conform analizelor acesta conține complex de silimarină în concentrație de minim 60%.

3.1.1. Dezvoltarea de tehnologii de laborator pentru extracția silimarinei din subprodusul rezultat la obținerea uleiului de armurariu prin presare la rece

3.1.1.1. Dezvoltarea de tehnologii de laborator pentru extracția silimarinei din subprodus după îndepărtarea uleiului rezidual prin extracție cu hexan

Pe baza rezultatelor obținute anterior și ținând seama de cerințele beneficiarului (HOFIGAL Export Import) care ne-a solicitat ca tehnologia de extracție să fie simplă și solventul de extracție să nu fie toxic și să prezinte o inflamabilitate redusă, cercetările au fost focalizate pe extracția silimarinei din subprodus, folosind drept metodă de extracție macerarea și drept solvent de extracție alcoolul etilic 85%.

Studiile anterioare au indicat faptul că la extracția cu alcool 85% a silimarinei din subprodus, în extract trece de asemenea cea mai mare parte a uleiului rezidual rămas. La precipitarea silimarinei din extract se va depune și uleiul, care impurifică silimarina. Așa cum a fost descris în rapoartele anterioare, uleiul extras din subprodus odată cu silimarina poate fi îndepărtat cu bune rezultate folosind extracția cu hexan a acestuia. Întrucât folosirea hexanului în acest scop nu este agreată de beneficiar (datorită inflamabilității acestuia) s-a preferat îndepărtarea prealabilă a uleiului din

subprodus, urmând ca numai după această etapă să fie făcută extracția silimarinei prin macerare cu alcool 85%.

Pentru început au fost efectuate următoarele activități:

- Extracția silimarinei din subprodusul degresat primit de la Hofigal prin metoda Soxhlet cu alcool etilic 96% în vederea determinării conținutului de silimarină în subprodus;
- Degresarea subprodusului (primit nedegresat de la Hofigal în noiembrie 2016) folosind extracția Soxhlet cu hexan, urmată de extracția silimarinei prin macerare repetată cu alcool etilic 85%.

Extracția silimarinei din subprodusul degresat primit de la Hofigal folosind metoda Soxhlet cu alcool etilic 96%

Subprodusul degresat a fost primit de la Hofigal în noiembrie 2017 și a avut masa de 13 g. Din subprodus s-a extras uleiul rezidual cu hexan (eter de petrol). Studii anterioare au indicat faptul că dacă subprodusul nedegresat luat în lucru este înmuiat înainte de extracția cu alcool cu apă caldă, randamentul de extracție al silimarinei cu alcool crește apreciabil. În cele ce urmează ne-am propus să verificăm dacă acest lucru este valabil și pentru subprodusul degresat în prealabil.

Se cântăresc câte 6,5 g de subprodusul degresat care se prelucrează astfel:

1) S-au înmuiat 6,5 grame de subprodus (proba S1` tabelul 1) în 3,5 mL apă caldă (aproximativ 70-90 °C). S-a lăsat la temperatura de 25 °C timp de o oră. S-a făcut extracția Soxhlet cu alcool etilic 96% timp de 4,5 ore (8 sifonări). Volumul de alcool 96% folosit a fost de 50 mL.

2) S-a făcut extracția din 6,5 g subprodus (proba S1 tabelul 1) ca mai sus cu 50 mL alcool 96%, dar fără înmuiere prealabilă în apă a subprodusului, timp de 4,5 ore (7 sifonări).

Extracția cu hexan a uleiului din subprodusul rezultat la obținerea uleiului de armurariu, prin metoda Soxhlet urmată de extracția silimarinei prin macerare repetată cu etanol 85%. Obținerea uleiului și a silimarinei

S-au introdus 30 g subprodus (primit în noiembrie 2016) ca atare într-un cartuș de extracție și s-a degresat, aplicând metoda Soxhlet, cu 200 mL hexan. Extracția a fost însoțită de cel puțin 9 sifonări. Hexanul a fost îndepărtat prin evaporare din extractul obținut. Au rezultat 2,701 g ulei. S-a calculat cantitatea de ulei extrasă din probă, care a fost de 9,0 % din masa inițială a probei.

Materialul vegetal din care s-a făcut extracția s-a uscat, s-a cântărit (au rezultat 26,8 g) și apoi s-a îmbibat cu 16 mL apă caldă (aproximativ 70-90 °C). S-a lăsat la temperatura de 25 °C timp de o oră. Materialul respectiv s-a supus extracției prin macerare repetată de trei ori cu alcool etilic 85%. Toate trei extracțiile s-au făcut la temperatura de 25 °C.

Extracția I-a. Subprodusul s-a introdus într-o pâlnie de separare care are în partea de jos un dop de vată de sticlă. S-au introdus apoi 107 mL de alcool etilic 85%. Amestecul s-a omogenizat din când în când. După 180 de minute s-a îndepărtat alcoolul etilic din amestec prin aspirare la vid. Extractul obținut s-a notat cu **F1** (tabelul 1).

Extracțiile a II-a și a III-a se fac la fel ca extracția I cu excepția faptului că acestea vor dura 120 de minute în al doilea caz și 60 de minute în al treilea caz. Pentru extracția a III-a se vor utiliza 53 mL de solvent. De fiecare dată s-au măsurat și notat volumele de extract. Extractele obținute s-au notat cu **F2 și F3** (tabelul 1). În final cele trei extracte în alcool s-au reunit (**Ft** în tabelul 1).

Tabelul 1. Tipuri de extracție și date experimentale la extracția uleiului și a silimarinei din subprodus.

Denumire probă	Extracție	Timp	Cantitatea de material vegetal luată în lucru (g)	Volum solvent de extracție (mL)	Volum de extract obținut (mL)	Fracția
S1 fără înmuiere	SOXHLET în etanol 96%	4,5 ore	6,5	50	37	
S1` cu înmuiere	SOXHLET în etanol 96%	4,5 ore	6,5	50	38	
-	Degresare cu hexan (SOXHLET)	4 ore	30	200		
F1	Macerare repetată în etanol 85%	180 min	26,78	107 x 1	77,5	1
F2		120 min		107 x 1	102,0	2
F3		60 min		53 x 1	56,0	3

*Explicații în text

Din cei 225 mL de extract (volum total minus probele luate pentru analiză) s-a recuperat alcoolul prin distilare până se ajunge la aproximativ 10% din volumul inițial al soluției. Când se ajunge la aproximativ 15-20 % din volumul inițial, soluția nu mai este limpede la cald, devenind opalescentă, fără a se depune un precipitat. În final, soluția rece obținută este de culoare maro închis, opalescentă cu puțin precipitat și cu un miros specific înțepător.

Lăsându-se peste noapte se ajunge la un volum de aproximativ 14 mL. Peste soluția respectivă se adaugă apă, picătură cu picătură până când precipită un produs galben (slab roșcat). S-au adăugat 14 mL de apă. Pe fundul paharului s-a depus un precipitat maroniu, iar în soluție a rămas o suspensie de culoare galbenă, slab maronie.

Se filtrează la vid. Lichidul care trece este opalescent și are culoarea gălbuie (este notat **lichid de spălare, proba 2**). Filtrarea are loc foarte greu. Este mult mai indicată **centrifugarea**. După uscare la 100 °C s-au cântărit **1,1354** grame produs. Produsul inițial era ușor cleios. Dacă s-a tratat cu o cantitate mică de hexan, s-a omogenizat bine (s-au sfărâmat bulgării) și s-a lăsat să se evapore hexanul, s-a obținut un produs galben portocaliu bine definit. Produsul respectiv s-a notat cu **proba P1**. Proba de silimarină P1 s-a clătit cu 3 ml de hexan de trei ori. S-a agitat aproximativ 5 minute, s-a lăsat să se depună precipitatul aprox. 10 minute apoi s-a decantat. Hexanul s-a lăsat să se evapore. După evaporarea hexanului rămâne o cantitate de ulei corespunzătoare la aproximativ 4,4% din cantitatea inițială de silimarină obținută (proba P1).

În final, după uscarea silimarinei spălate cu hexan, s-a obținut o cantitate totală de **1,065** g silimarină. Produsul respectiv s-a notat: **proba P3**. Această cantitate reprezintă 93,8 % din cantitatea inițială de silimarină (înainte de a fi extras uleiul rezidual cu hexan).

3.1.1.2. Dezvoltarea unei tehnologii de laborator pentru extracția silimarinei după degresarea prealabilă a subprodusului într-o unitate industrială specializată în acest scop

Subprodusul degresat a fost furnizat de Hofigal în august 2018. Din acest produs s-a făcut extracția silimarinei cu alcool etilic 85% folosind metoda de extracție descrisă mai sus. Toate cele

trei extracții s-au făcut la temperatura de aproximativ 25 °C. S-au luat în lucru 110 g de subprodus degresat. În tabelul de mai jos sunt sumarizate volumele de solvent folosite și timpii de extracție.

Tabelul 2. Condiții de lucru la extracția silimarinei cu alcool 85% din produsul degresat.

Denumire probă	Extracție	Timp (min)	Volum solvent extracție (mL)	Volum de extract obținut (mL)	Fracția
Extracție I	Macerare cu alcool 85%	180	440	363	1
Extracție II	- // -	120	440	430	2
Extracție III	- // -	60	220	215	3

Volum total de extract 1008 mL

Prima variantă. Cele trei extracte reunite se distilă până la un volum de aproximativ 10% din volumul inițial. În acest fel se recuperează alcoolul. În vasul de distilare rămâne un lichid opalescent de culoare roșu închis cu volumul de aprox. 100 mL. Lichidul respectiv este în continuare concentrat la cald până la un volum de aprox. 60 mL. Peste acesta se adaugă sub agitare un volum de 40 mL de apă purificată. Se obține un precipitat galben roșcat. Se lasă în repaus până a doua zi. S-a separat prin decantare un lichid gălbui foarte opalescent cu volumul de 73-74 mL. Lichidul s-a filtrat prin hârtie de filtru. Prin filtru trece un lichid opalescent. Se notează cu **lichid spălare varianta I-a**.

Partea solidă s-a încercat să se aducă la sec. În final s-a obținut un produs cu aspect cleios care nu cristalizează. Acesta s-a dizolvat la cald în 20 mL alcool 85%, la soluția respectivă s-au adăugat 40 mL apă, picătură cu picătură și sub agitare. Se obține un precipitat galben roșcat, iar soluția rămâne opalescentă. A fost lăsat la rece până a doua zi. Se centrifughează. Lichidul obținut cu volumul de 68 mL se notează cu **lichid spălare recristalizare varianta I-a**. S-a centrifugat 30 de minute la 4200 rpm. S-a obținut un solid galben roșcat, notat **silimarină recristalizată**. S-a uscat la 100 – 105 °C timp de 8 ore. Solidul obținut după uscare are masa de 2,0234 g.

A doua variantă. Cele trei extracte reunite se distilă până la un volum de aproximativ 10% din volumul inițial. Lichidul respectiv este în continuare concentrat la cald până la un volum de aproximativ 60 mL. Peste lichidul obținut se adaugă sub agitare un volum egal de apă purificată (60 mL). Se obține un precipitat galben, slab maroniu, care conține silimarină. Se lasă în repaus până a doua zi la frigider. Se centrifughează la 4200 rpm, 20 de minute. Se obține un precipitat dens, compact, care se separă ușor de lichid. Lichidul de spălare are volumul de 108 mL. Se notează cu **lichid spălare varianta a II-a**. Se face uscarea timp de 8 ore la 100 – 105 °C. Solidul obținut după uscare are masa de 5,0027 g și este notat **silimarină varianta a II-a de lucru**. Se recomandă o spălare a precipitatului obținut (înainte de uscare) cu 15 mL apă, urmată de centrifugare și uscare.

3.1.2. Determinarea HPLC a silimarinei din extractele de armurariu și din concentratul de armurariu obținut.

3.1.2.1. Rezultate analitice pentru probele obținute aplicând modul de lucru descris la paragraful 3.1.1.1.

Rezultatele pentru extractele obținute din subprodus

Rezultatele au fost calculate prin două metode:

A. Conform USP: "Plot the areas of the sum of silybin A and silybin B peaks versus the concentration of USP Silybin RS în the *Silybin standard solutions*, and obtain a regression line for calibration. Identify the peaks due to silychristin, silydianin, silybin A, silybin B, isosilybin A, and

isosilybin B by comparison with the chromatogram of the Milk thistle standard solution and measure the peak areas of the relevant peaks.”

Ecuatia dreptei obtinute conform metodei USP de calcul este: $A=27902C -3340.2$

In tabelul 3 sunt prezentate rezultatele exprimate în $\mu\text{g g}^{-1}$ calculate ținând seama de cantitatea de material solid luat în lucru, volumul de solvent etc.

Tabelul 3. Concentrațiile izomerilor din complexul de silimarină, determinate conform modelului de calcul USP, exprimate în $\mu\text{g g}^{-1}$. Obținerea probelor este prezentată în tab. 1.

Conc $\mu\text{g g}^{-1}$	Proba						
	S1	S1'	F1	F2	F3	Suma F1-F3 (mg/g)	Ft
TX taxifolin	3240.5	3446.8	1315.1	644.0	218.1	2,177	2155.6
SC silicristin	7723.4	7993.6	3496.9	1636.2	544.2	5,677	5665.0
SD silidianin	10330.6	10787.0	8939.9	4495.2	1526.3	14,961	14972.6
SBA silibin A	3213.5	3202.4	747.0	359.4	118.7	1,225	1227.3
SBB silibin B	5409.9	5359.4	1356.2	666.0	219.3	2,241	2251.4
ISBA izo-silibin A	3759.3	3685.6	1798.8	902.9	299.4	3,001	3061.8
ISBB izo-silibin B	2499.5	2475.3	1328.1	674.8	224.1	2,227	2274.2
Total	36176.6	36950.0	18981.9	9378.5	3150.1	31,50	31607.9
Conc. mg g⁻¹	36.18	36,95	31,51				
% în subprodus	3,618	3,695	3,151				

B. Din ecuațiile curbelor de etalonare obținute pentru fiecare dintre izomeri, pentru substanțele etalon existente

In tabelul 4 sunt prezentate valorile concentrațiilor de izomeri din complexul de silimarină, obținute calculate prin interpolare pe ecuațiile dreptelor de etalonare, raportate la cantitatea de solid luată în lucru pentru efectuarea extracției. Excepție face izo-silibinul B a cărui arie a fost interpolată pe ecuația dreptei obținute pentru izo-silibin A.

Tabelul 4. Concentrațiile izomerilor din complexul de silimarină, calculate din ecuațiile dreptelor de calibrare, exprimate în $\mu\text{g g}^{-1}$.

Conc. $\mu\text{g g}^{-1}$	Proba						
	S1	S1'	F1	F2	F3	Suma F1-F3 (mg/g)	Ft
TX	1313.8	1397.3	533.8	263.6	90.1	0,8875	878.7
SC	6050.1	6261.8	2739	1279.5	424.8	4,446	4433.7
SD	8908.9	9302.6	7710.8	3875.8	1315.5	12,902	12911.8
SBA	6568.3	6545.4	1524.6	730.2	240.1	2,495	2499.5
SBB	10574	10475.2	2649.2	1298.5	426.7	4,374	4393.8
ISBA	2782.3	2725.4	1329.8	646.7	207.1	2,184	2229.4
ISBB	1833	1813.4	975.2	474.8	150.3	1,603	1635.9
Total	38030.4	38521.1	17462.4	8569.1	2854.6	28,89	28982.8
Conc. mg g⁻¹	38,03	38,52	28,88			28,89	
% în subprodus	3,803	3,852	2,888			2,889	

Analizând datele prezentate în tabelele 3 și 4 putem trage următoarele concluzii :

- Conținutul de silimarină în extractul obținut din subprodusul degresat furnizat de Hofigal în noiembrie 2017 este practic identic, indiferent de înmuierea sau neînmuirea prealabilă a

subprodusului cu apă (probele S1' și S1), atât în cazul utilizării pentru calcul a metodei USP, cât și în cazul utilizării dreptelor de etalonare. Rezultatele obținute aplicând metoda USP pentru aceste probe sunt ceva mai mici pentru extractul obținut cu alcool 85% și mai mari pentru probele S1 și S1', decât cele obținute la aplicarea metodei dreptelor de etalonare. Conținutul componentelor silimarinei în subprodusul furnizat de Hofigal în noiembrie 2017 diferă mult de conținutul componentelor subprodusului furnizat de Hofigal în noiembrie 2016 și care a fost luat în studiu la începutul proiectului.

- Conținutul de silimarină în suma fracțiilor extrase din subprodus ne indică un conținut de silimarină extras dintr-un gram de subprodus, exprimat în procente, mai mare în cazul aplicării metodei USP și anume **3,15%**, comparativ cu valoarea calculată utilizând dreptele de calibrare și anume **2,89%**.

Rezultate analitice pentru probele solide și pentru lichidele de spălare

Metoda USP Pharmacopeia

Varianta I-a

P1 (silimarină) și P3 (silimarină spălată cu hexan) – pulbere; P2 – lichid de spălare; diluție 1:10 și injecție (vol final 14 mL); P4 – material brut (produs degresat) supus extracției conform USP (40 mg în 100 mL MeOH și sonicare, apoi injecție). Masa =40mg; V=100mL MeOH; US 20 min, filtrare; Injecție în aparat – probe nediluate (excepție proba lichid de spălare la care am efectuat diluție 1:10). Datele sunt prezentate în tabelul 5.

Tabelul 5. Conținut procentual de silimarină în proba analizată, calculat prin însumarea procentelor individuale ale componentelor (metoda de calcul conform farmacopeciei).

Compus	Proba 1	Proba 2	Proba 3	Proba 4
TX	4.04	-	4.00	0.19
SC	10.85	-	11.72	0.48
SD	21.37	-	22.39	1.17
SBA	2.60	-	2.61	0.11
SBB	4.59	-	4.67	0.19
ISBA	6.08	-	6.42	0.26
ISBB	4.78	-	5.03	0.20
Total % în materialul solid	54,3		56,8	2.61

Conținutul procentual de silimarină pentru subprodus, așa cum a fost determinat din analiză, este conform normelor specificate în farmacopecie.

Varianta a II-a

P1 (silimarină) și P3 (silimarină spălată cu hexan) – pulbere; P2 – lichid de spălare, diluție 1:10 și injecție (vol. final 14 mL); P4 – material brut (produs degresat) supus extracției conform USP (40 mg în 100 mL MeOH și sonicare, apoi injecție). Prelucrarea probelor 1 și 3 a fost făcută astfel: m P1 (=1,7mg) + 1.7 mL MeOH injecție directă în HPLC; m P3 (=2.0mg) + 2.0 mL MeOH injecție directă în HPLC.

- Conform USP, utilizând ecuația silibinei pentru interpolarea ariilor izomerilor din complexul de silimarină. În tabelul 6 sunt prezentate rezultatele obținute pentru probele 1, 3 și 4 iar în tabelul 7 pentru proba 2.

Tabelul 6. Rezultate obținute la determinarea complexului de silimarină prin metoda USP.

Concentrația $\mu\text{g g}^{-1}$	Proba			
	Proba1	Proba2	Proba3	Proba4
TX	36400	-	46440	1940
SC	105360	-	137760	4840
SD	199850	-	261180	11700
SBA	20060	-	11970	1090
SBB	38390	-	57020	1950
ISBA	56670	-	76990	2570
ISBB	44850	-	54990	2040
Total mg g⁻¹	501,6		646,35	28,08
% în materialul solid	50,16		64,635	2,808

Tabelul 7. Conținut de silimarină raportat ca silibin exprimat în $\mu\text{g/mL}$ în proba 2.

Conc. $\mu\text{g mL}^{-1}$	Proba2	Cantitatea aflată în cei 14 mL (mg)	Silimarină (mg) în 26,8g, din însumarea F1-F3 Metoda USP	% din componenții silimarinei rămași în lichidul de spălare față de cantitatea extrasă în F1-F3
TX	1038.4	14,53	58,34	24,90
SC	1544.5	21,62	152,15	14,21
SD	394.9	5,53	400,96	1,38
SBA	16.8	0,235	32,83	0,72
SBB	26.2	0,367	60,07	0,61
ISBA	9.0	0,126	80,43	0,16
ISBB	11.4	0,169	59.68	0,28
Total	3041.2	42,57	836,50	
% în subprodus			3.12%	

În tabelul 8 sunt date cantitățile calculate în μg de izomeri în volumele finale colectate.

Tabelul 8. Cantitățile totale de componenți ai silimarinei în volumele finale colectate calculate din ecuațiile dreptelor de calibrare

Conc μg în vol. final proba	Proba1 (V=1,7mL)	Proba2 (V=14 mL)	Proba3 (V=2 mL)	Proba4 (V=100mL)
TX	25.1	5883.3	37.7	40.8
SC	140.3	16939.7	215.8	143
SD	293,0	4761.9	450.5	398.2
SBA	69.6	463.53	48.7	75.7
SBB	127.4	703.2	222.8	141.8
ISBA	71.1	-	114.3	nd
ISBB	55.9	-	81.1	nd
Total mg g⁻¹	460,2		585,45	
% în subprodus	46,02		58,545	

În figurile 1 și 2 sunt date câteva cromatograme reprezentative pentru probele analizate. În toate cazurile s-a lucrat conform modului de lucru prezentat în rapoartele anterioare.

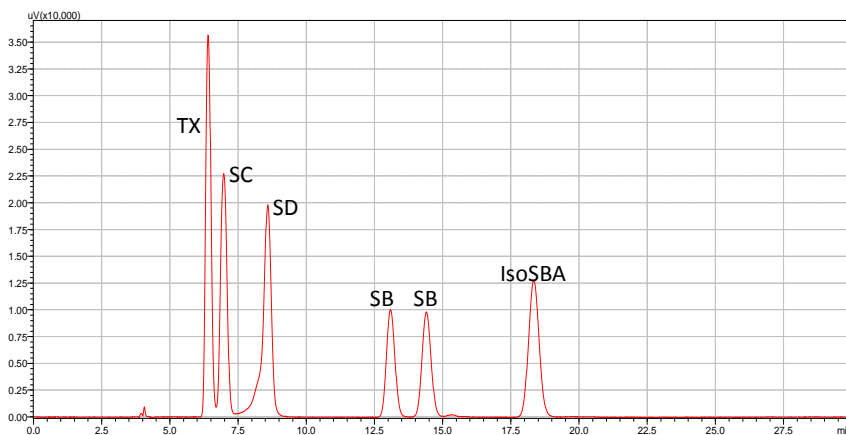


Figura 1. Cromatograma unui amestec de izomeri componenți (TX, SC, SD, SBA, SBB izoSBA) ai complexului de silimarină ($\lambda=288$ nm) de concentrație $5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

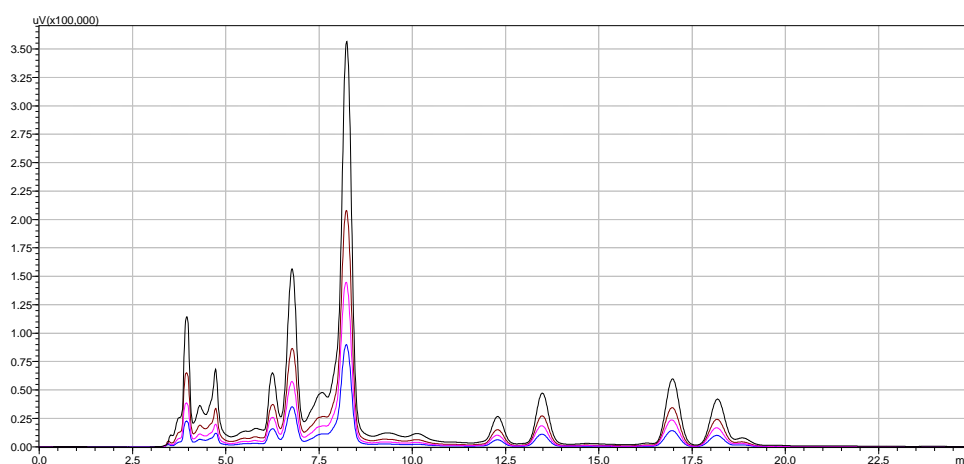


Figura 2. Cromatogramele suprapuse pentru probe Ft(negru), F1(maron), F2 (magenta), F3 (albastru), extracte complex de silimarină ($\lambda=288$ nm), volum de injecție $10 \mu\text{L}$.

Concluzii:

- spălarea silimarinei obținute conduce la pierderea unei cantități mari de izomeri din complexul de silimarină în special taxifolin și silicristin, în mai mică măsură silidianin, în timp ce pierderile de silibin A și B și izo-silibin A și B sunt foarte mici (tabelul 7). De fapt acești ultimi compuși sunt cei mai valoroși componenți ai complexului de silimarină.

Calculul conform USP conduce, în majoritatea cazurilor, la rezultate mai bune; există și excepții (vezi tabelul 3 comparativ cu tabelul 4 pentru probele S1 și S1').

Determinarea conținutului de silimarină în proba degresată de subprodus

Pentru a calcula randamentul de extracție al silimarinei din subprodusul degresat prin metoda bazată pe macerarea cu alcool 85% s-a efectuat o extracție a silimarinei din subprodus prin metoda Soxhlet. Extracția s-a făcut din 5 g de subprodus degresat (metoda Soxhlet cu hexan, 6 ore) cu 50 mL etanol 96%, timp de 6 ore. În tabelul 9 se prezintă rezultatele obținute, iar în figura 3 aspectul cromatogramei înregistrate.

Tabelul 9. Rezultate obținute la determinarea componenților silimarinei din subprodusul degresat după extracția Soxhlet cu alcool etilic 96% folosind metoda de calcul conform USP și cea bazată pe ecuațiile dreptelor de calibrare.

Compus	Calcul conform USP		Calcul pe baza ecuațiilor dreptelor de calibrare	
	Conc. $\mu\text{g mL}^{-1}$ în proba de analizat	mg/g subprodus degresat	Conc. $\mu\text{g mL}^{-1}$ în proba de analizat	mg/g subprodus degresat
TX	305.02	2,257	124.11	0,918
SC	910.23	6,734	712.75	5,274
SD	2144.38	15.87	1849.37	13,685
SBA	203.99	1,51	416.06	3,079
SBB	372.59	2,76	727.64	5,384
ISBA	483.18	3,58	355.23	2,629
ISBB	365.79	2,706	266.78	1,974
Total		35,417		32,943
% silimarină în subprodus		3,54		3,29

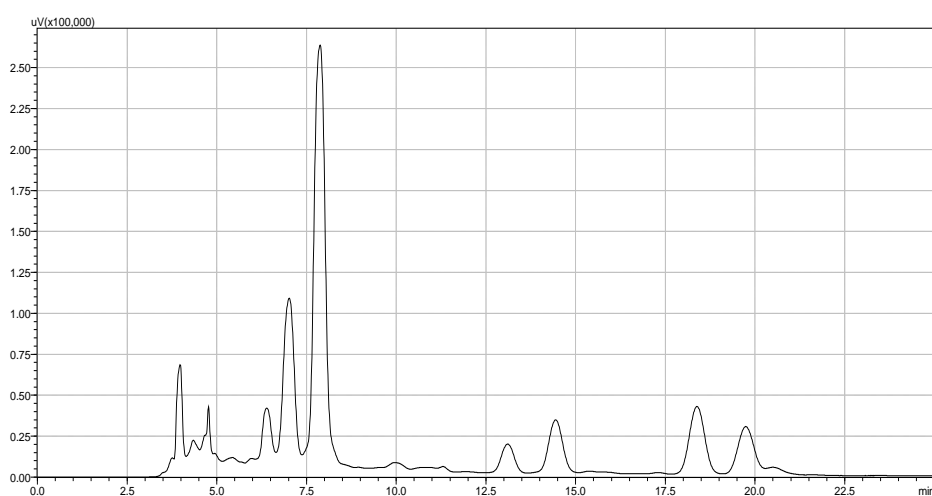


Figura 3. Cromatograma înregistrată la analiza extractului obținut din produsul degresat utilizând metoda Soxhlet. Volum de injecție 10 μL .

Concluzii

Pe baza conținutului de silimarină determinat în subprodusul degresat, care este de 3,42 % (ca medie a rezultatelor obținute prin cele două metode de mai sus) s-a putut calcula conținutul de silimarină în subprodusul din care s-a făcut extracția: $3,418/100 \times 26,78 \text{ g}$ (tabelul 1) = **0,915 g**.

Cantitatea totală de silimarină extrasă din cele 26,78 g subprodus prin metoda macerării este dată de cantitatea de silimarină extrasă dintr-un gram de subprodus ca medie a rezultatelor obținute prin cele două metode, înmulțită cu cantitatea de subprodus și anume: $3,0195\%/100$ (medie a 3,151 și 2,888 din tabelele 3 și 4) $\times 26,78 \text{ g}$ = **0,809 g**.

Randamentul de extracție al silimarinei din subprodusul luat în lucru prin metoda macerării descrisă în acest raport este de $0,809/0,915 \times 100 = 88,42\%$.

Randamentul de obținere al silimarinei din extractul rezultat din subprodus este dat de masa produsului = 1,1354 g (proba P1) $\times 50,16$ (conținutul procentual de silimarină, dat ca medie a valorilor din tabelele 5, 6 și 8)/100, totul împărțit la 0,809 și înmulțit cu 100 = **70,40%**

Randamentul de obținere a silimarinei din extractul rezultat din subprodus este dat de masa produsului spălat cu hexan = 1,065 g (proba P3, silimarină rezultată spălată cu hexan) $\times 59,99$ (conținutul procentual de silimarină, dat ca medie a valorilor din tabelele 5, 6 și 8)/100, totul împărțit la 0,809 și înmulțit cu 100 = **78,97%**.

Randamentele relativ mici (70,40% și 78,97%) de recuperare a silimarinei din extractul obținut din subprodus prin macerare, se explică în primul rând prin pierderile importante de taxifolin (24,90%) și silicristin (14,21%), precum și în mai mică măsură de silidianin (1,38%), așa cum se poate vedea din tabelul 7, în urma procesului de precipitare al silimarinei din extractul concentrat. Pierderile de silibină A și B, precum și de izosilibină A și B care sunt componentele cele mai valoroase ale silimarinei sunt însă neglijabile, mai mici de 1% (tabelul 7).

3.1.2.2. Rezultate analitice pentru probele obținute aplicând modul de lucru descris la paragraful 3.1.1.2

Rezultatele obținute la analiza extractelor din subprodus

Rezultatele au fost calculate prin două metode, conform USP și pe baza dreptelor de calibrare. În tabelul 10 se prezintă rezultatele obținute.

Tabelul 10. Rezultate obținute la determinarea componentelor silimarinei în extractul obținut cu alcool 85%.

Extractele I + II + III	Conc. (μg/mL) *	Cant. în 1008 mL extract (mg) obținut din 110 g subprodus	Conc. (μg/mL) *	Cant. în 1008 mL extract (mg) obținut din 110 g subprodus
Compus	Calcul conform USP	Calcul conform USP	Calcul pe baza dreptelor de calibrare	Calcul pe baza dreptelor de calibrare
tx	133.3	330,32	327,7	134,37
sc	638.0	824,44	814,9	643,104
sd	1052.4	1230,2	1220,5	1060,82
sba	712.7	351,79	349,0	718,40
sbb	1131.3	583,63	579,0	1140,35
isba	276.3	381,53	378,5	278,51
isbb	173.9	244,44	242,5	175,29
Total în 1008 mL		3946,35		4150,85
% silimarină extrasă din subprodus		3,59%		3,77%

*Ținând cont de factorul de diluție (FD=10). ** Volum lichid 1008 mL.

În tabelul 11 se prezintă rezultatele obținute la extracția cu alcool 96% prin metoda Soxhlet a subprodusului degresat. S-a făcut extracția cu 50 mL alcool 96% din 5 g de subprodus degresat (17 sifonări). În final volumul de extract a fost de 41 mL.

Tabelul 11. Rezultate obținute la extracția silimarinei din subprodusul degresat prin metoda Soxhlet cu alcool 96%.

Extract Soxhlet	Conc (μg/mL) *	Conc (μg/mL) *	Conc (μg/g) **	% din fiecare component	Masa din fiecare comp în 110g subst (mg)	Conc (μg/g) **	% din fiecare component
Compus	Calcul pe baza dreptelor de calibrare	Calcul conform USP	Calcul pe baza dreptelor de calibrare	Calcul pe baza dreptelor de calibrare	Calcul pe baza dreptelor de calibrare	Calcul conform USP	Calcul pe baza dreptelor de calibrare
tx	178.9	440.7	1466.8	4,58	161,34	3613.5	14,27
sc	714.3	912.3	5857.6	18,29	644,35	7480.6	29,53
sd	568.1	659.2	4658.3	14,54	512,41	5405.2	21,34

sba	758.0	371.1	6215.9	19,40	683,75	3043.0	12,01
sbb	1177.7	602.7	9657.2	30,15	1062,30	4942.3	19,51
isba	298.8	408.3	2450.3	7,65	269,53	3348.2	13,22
isbb	210.8	291.5	1728.4	5,40	190.12	2390.1	9,44
Suma componente			32034,5		3523,80	25333.02	
% silimarină extrasă din subprodus			3,20%			3,02%	

*Ținând cont de factorul de diluție (FD=10). ** Ținând cont de factorul de diluție, de volumul final (41 mL) și de masa de solid (m=5g.)

Rezultate obținute la analiza concentratelor de silimarină și a lichidelor de spălare

În tabelul 12 se prezintă rezultatele obținute la analiza silimarinei recristalizate obținute prin prima variantă de lucru și în tabelul 13 se prezintă rezultate obținute la analiza silimarinei obținute prin varianta a II-a de lucru

Tabelul 12. Rezultate la analiza silimarinei recristalizate obținute prin prima variantă de lucru.

Silimarină Varianta I-a (recristalizată)	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. ($\mu\text{g/g}$) **	% din fiecare component	Conc. ($\mu\text{g/g}$) **
Compus	Calcul pe baza dreptelor de calibrare	Calcul conform USP	Calcul pe baza dreptelor de calibrare	Calcul pe baza dreptelor de calibrare	Calcul conform USP
tx	46.4	114.6	10779.4	1,28%	26642.0
sc	453.2	578.2	105396.8	12,55	134463.0
sd	721.4	836.3	167760.6	19,98	194477.3
sba	764.3	373.6	177748.3	21,17	86876.6
sbb	1207.8	617.6	280885.7	33,45	143636.3
isba	219.1	291.9	50943.9	6,07	67881.2
isbb	199.0	265.3	46284.0	5,50	61697.0
Total silimarină			83,98%		71,57%
% silimarină extrasă din subprodus. Silimarină extrasă prin Soxhlet =100%			48,26%		

*Probă injectată fără diluție. ** Ținând cont de masa de solid (m=8.6mg=0.0086g) și volumul de solvent (V=2mL). Masa totală solid = 2,0234 g

Tabelul 13. Rezultate la analiza silimarinei obținute prin varianta a II-a de lucru.

Silimarină Varianta a II-a	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Conc ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. ($\mu\text{g/g}$) **	% din fiecare component	Conc. ($\mu\text{g/g}$) **
Compus	Calcul pe baza dreptelor de calibrare	Calcul conform USP	Calcul pe baza dreptelor de calibrare	Calcul pe baza dreptelor de calibrare	Calcul conform USP
tx	18.3	45.1	13550.5	2,17%	33385.6
sc	119.2	152.2	88297.6	14,15	112708.3
sd	191.8	222.4	142055.0	22,76	164713.8
sba	157.7	77.2	116844.0	18,72	57148.0
sbb	250.8	128.3	185746.5	29,76	95016.3
isba	62.8	84.5	46525.8	7,45	62615.0
isbb	42.0	56.9	31130.2	4,99	42183.4

% silimarină în materialul solid			62,41%		57,69%
% silimarină extrasă din subprodus. Silimarină extrasă prin Soxhlet =100%			88,69%		

*Proba injectată fără diluție. ** Ținând cont de masa de solid ($m=2.7\text{mg}=0.0027\text{g}$) și volumul de solvent ($V=2\text{mL}$).*** Masa totală de solid 5,0027 g.

În tabelul 14 se prezintă rezultate obținute la analiza lichidului de spălare pentru varianta I-a, în tabelul 15 se prezintă rezultatele obținute la analiza lichidului de spălare varianta I-a (recristalizare) și în tabelul 16 rezultate obținute la analiza lichidului de spălare pentru varianta a II-a de lucru.

Tabelul 14. Rezultate obținute la analiza lichidului de spălare pentru varianta I-a.

Lichid de spălare varianta I-a	Conc. ($\mu\text{g/mL}$) *	Conc. ($\mu\text{g/mL}$) *	Cantitate totală în lichidul de spălare (mg)	% rămas în lichidul de spălare din cant. totală extrasă cu 85% alcool	Cantitate totală în lichidul de spălare (mg)
Compus	Calcul pe baza dreptelor de calibrare	Calcul conform USP	Calcul pe baza dreptelor de calibrare	Calcul pe baza dreptelor de calibrare	Calcul conform USP
tx	560.2	1385.0	39,21	29,20	96,95
sc	1120.6	1430.5	78,4	12,19	100.13
sd	518.1	601.2	36,26	3,42	42,07
sba	128.7	63.5	90,09	12,54	44,45
sbb	208.6	107.2	14,60	1,28	7,50
isba	17.9	35.5	1,25	0,45	2,485
isbb	10.4	25.6	0,73	0,42	1,79
Total			260,54		295,375

*Ținând cont de factorul de diluție (FD=10). ** Volum lichid 70 mL.

Tabelul 15. Rezultate obținute la analiza lichidului de spălare pentru varianta I-a (recristalizare).

Lichid de spălare Varianta I-a (la recristalizare)	Conc. ($\mu\text{g/mL}$) *	Conc. ($\mu\text{g/mL}$) *	Cantitate totală în lichidul de spălare (mg)	% din cant. totală extrasă cu 85% alcool
Compus	Calcul pe baza dreptelor de calibrare	Calcul conform USP	Calcul pe baza dreptelor de calibrare	Calcul pe baza dreptelor de calibrare
tx	165.2	406.7	11,23	8,35
sc	351.8	449.8	23,92	3,72
sd	1585.6	1838.6	107,82	10,16
sba	103.1	51.1	7,01	0,975
sbb	159.3	82.0	10,83	0,949
isba	24.0	43.7	1,63	0,585
isbb	12.3	28.1	0,836	0,48

*Ținând cont de factorul de diluție (FD=10). **Volum de lichid 68 mL.

Tabelul 16. Rezultate obținute la analiza lichidului de spălare pentru varianta a II-a de lucru.

Lichid de spălare Varianta a II-a	Conc. ($\mu\text{g/mL}$) *	Conc. ($\mu\text{g/mL}$) *	Cantitate totală în lichidul de spălare (mg)	% din cant. totală determinată prin extracție Soxhlet	% din cant. totală extrasă cu 85% alcool
Compus	Calcul pe baza dreptelor de calibrare	Calcul conform USP	Calcul pe baza dreptelor de calibrare	Calcul pe baza dreptelor de calibrare	Calcul pe baza dreptelor de calibrare
tx	450.1	1112.3	48,61	30,13	36,18
sc	773.2	987.3	83,51	12,96	12,99
sd	451.6	524.1	48,77	9,52	4,60
sba	73.3	36.5	7,92	1,16	1,10
sbb	113.8	58.7	12,29	1,16	1,08
isba	6.4	20.3	0,69	0,25	0,25
isbb	2.6	15.2	0,28	0,15	0,16

*Ținând cont de factorul de diluție (FD=10), **Volum de lichid 108 mL.

În figura 4 se prezintă cromatograme HPLC obținute pentru un amestec de standarde (TX+SC+SD+SBA+SBB+ISBA) (negru) și proba extract I+II+III, varianta a II-a (magenta); $\lambda=288\text{nm}$ iar în figura 5 se prezintă cromatograme HPLC obținute pentru un amestec de standarde (TX+SC+SD+SBA+SBB+ISBA) (negru) și proba lichid de spălare varianta I-a (recristalizare) (magenta); $\lambda=288\text{nm}$

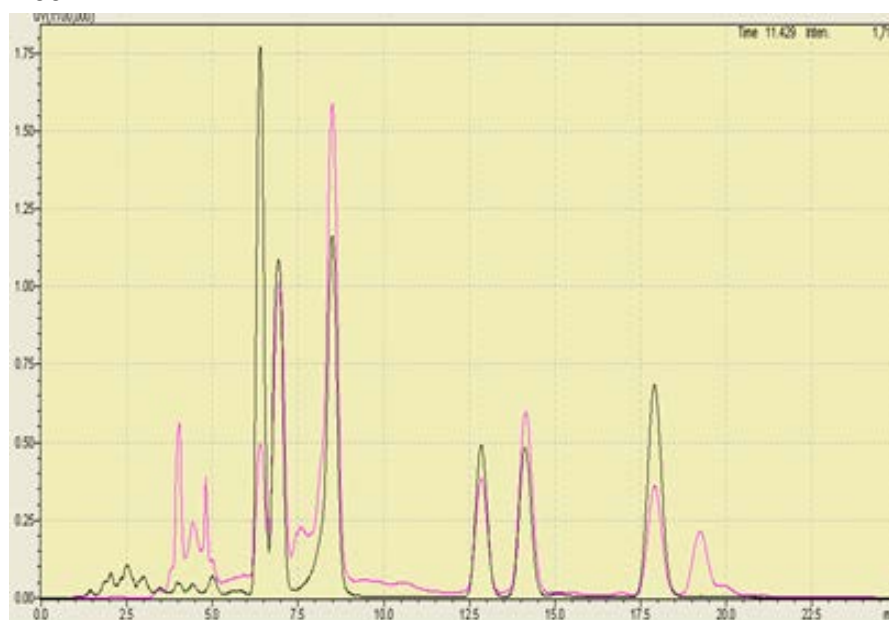


Figura 4. Cromatograme HPLC obținute pentru un amestec de standarde (TX+SC+SD+SBA+SBB+ISBA) (negru) și proba extract I+II+III, varianta a II-a (magenta); $\lambda=288\text{nm}$.

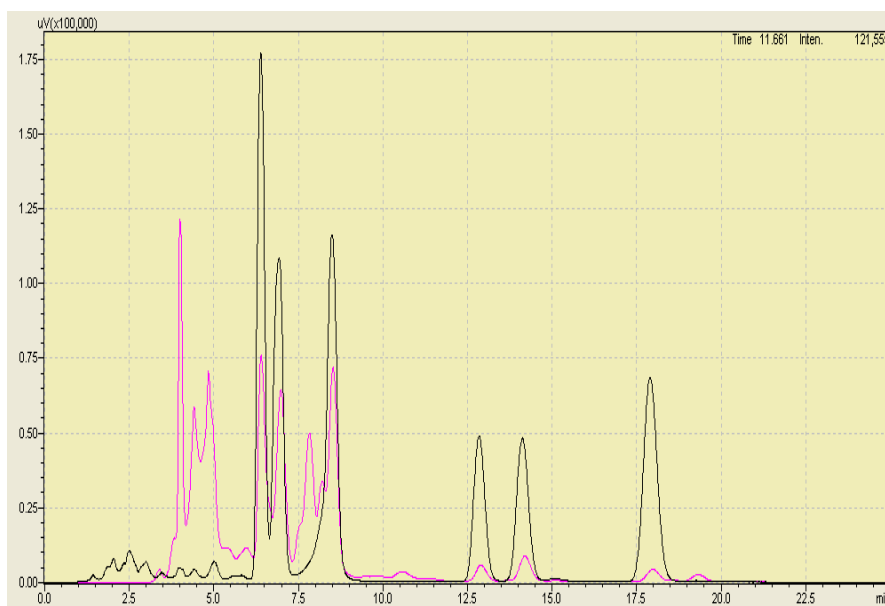


Figura 5. Cromatograme HPLC obținute pentru un amestec de standarde (TX+SC+SD+SBA+SBB+ISBA) (negru) și proba lichid de spălare varianta I-a (recrystalizare) (magenta); $\lambda=288\text{nm}$.

Rezultate obținute la INCDSB aplicând tehnologia de extracție a silimarinei descrisă la paragraful 3.1.1.2 varianta a II-a

Aplicând modul de lucru descris la **3.1.1.2 varianta a II-a** a fost obținută silimarină solidă cu o puritate de 66,75% (determinată prin metoda dreptelor de calibrare) și de 57,19% (determinată prin metoda USP). Rezultatele analitice obținute sunt prezentate în tabelul 17.

Tabelul 17. Rezultate analitice obținute pentru concentratul de silimarină obținut la INCDSB pe baza aplicării tehnologiei delucru descrise la paragraful 3.1.1.2 varianta a II-a.

Silimarină obținută	Conc. ($\mu\text{g/g}$) *	Conc. ($\mu\text{g/g}$) *
Compus	Calcul pe baza dreptelor de calibrare	Calcul conform USP
tx	8924,0	21848,7
sc	78106,1	99745,5
sd	135499,1	157136,5
sba	141524,9	69231,2
sbb	221159,1	113141,4
isba	51277,2	69313,7
isbb	31038,1	42454,3
Total % silimarină în concentratul obținut	66,75	57,19

*Ținând cont de factorul de diluție (FD=10), de masa de solid ($m=18.6\text{mg}=0,0186\text{g}$) și de volumul de solvent ($V=2\text{ mL}$). Precipitatul format inițial a fost spălat cu 15 mL de apă, centrifugat și uscat.

Concluzii

- S-a determinat conținutul de silimarină în subprodusul degresat rezultat la obținerea uleiului de armurariu prin presare la rece: 3,20% total silimarină folosind metoda dreptelor de calibrare și 3,02% prin metoda USP, tabelul 11.

- S-a elaborat o tehnologie de extracție a silimarinei din subprodusul degresat rezultat la obținerea uleiului de armurariu prin presare la rece prin macerare repetată cu alcool 85%.

- Prin aplicarea metodei descrise la paragraful **3.1.1.2 varianta a II-a** de lucru, s-a obținut un concentrat de silimarină având concentrația de 62,41% (determinat prin metoda dreptelor de calibrare) și de 57,69% (prin metoda USP) tabelul 13. Randamentul de obținere a silimarinei din subprodusul degresat este de 88,69% (considerând silimarina extrasă prin metoda Soxhlet 100%).

- Prin aplicarea variantei a II-a de lucru în lichidul de spălare s-au pierdut cantități importante de taxifolin, 30,13% din cantitatea totală, silicristin 12,96% și silidianin 9,52%. Cantitățile de silibin A, silibin B, izo-silibin A și izo-silibin B pierdute în lichidul de spălare sunt mici respectiv 1,16%, 1,16%, 0,25% și 0,15% față de cantitățile totale prezente (tabelul 16).

- Prin aplicarea variantei I-a de lucru descrisă la paragraful 3.1.1.1 (în care se prezintă recristalizarea produsului inițial obținut) se obține un concentrat de silimarină care conține 83,98% silimarină (metoda dreptelor de calibrare) respectiv 71,57% silimarină (determinat prin metoda USP). Randamentul de recuperare din subprodusul inițial este mai mic (48,26%), tabelul 12.

- suma conținuturilor de silibin A și B în concentratul obținut prin varianta a II-a de lucru este de 48,48% și respectiv 54,62% în concentratul de silimarină obținut prin varianta I-a de lucru (calculat prin metoda dreptelor de calibrare). Valorile respective sunt în concordanță cu cerințele din farmacopee.

- în urma aplicării metodei de lucru descrise la paragraful 3.1.1.2 **varianta a II-a** de lucru la INCDSB rezultatele obținute au fost apropiate de cele obținute la UB și sunt prezentate în tabelul 17. Astfel în concentratul de silimarină obținut s-a determinat un conținut de 66,75% (prin metoda dreptelor de calibrare) și de 57,19% (prin metoda USP).

- în vederea extracției silimarinei din subprodus, recomandăm degresarea prealabilă a subprodusului. Dacă extracția cu alcool 85% se face din subprodusul nedegresat în prealabil, atunci odată cu silimarina se extrage și uleiul rezidual (aproximativ 9,0-9,7% din masa acestuia) care nu poate fi separat de silimarină, decât prin extracție în hexan (sau alți solvenți similari) ceea ce complică procedeul de extracție.

- subprodusul degresat furnizat de Hofigal pentru efectuarea studiilor în august 2018 are o compoziție privind izomerii silimarinei mult diferită de produsul furnizat în noiembrie 2016.

3.2. Screeningul eficacității antioxidante a extractelor de armurariu.

Determinarea capacității antioxidante utilizând metoda TEAC

Determinarea capacității antiradicalice s-a făcut în raport cu capabilitatea de a stinge radicalii liberi cu viață lungă DPPH și ABTS cation radical, $ABTS^{+}$. Determinarea se face în raport cu un compus care are capacitatea antioxidantă cunoscută și anume Trolox-ul. Calculul capacității antiradicalice a extractelor s-a făcut utilizând următoarea formulă

$$TEAC_{proba} = \frac{1}{m} \times C_{Trolox} \times f \times \frac{A_{proba} - A_{blank}}{A_{Trolox} - A_{blank}} \quad \text{unde}$$

- A_{blank} reprezintă maximul absorbanței, citită la 3 minute după adăugarea a 2,5 mL ABTS, într-o celulă conținând 0,5 mL apă distilată/solvent;

- A_{Trolox} reprezintă maximul absorbanței, citită la 3 minute după adăugarea a 0,1 mL Trolox (10^{-3} M), într-o celulă conținând 2,5 mL ABTS și 0,4 mL apă distilată/solvent;

- $A_{\text{probă}}$ reprezintă maximul absorbantei, citită la 3 minute după adăugarea a 0,1 mL probă (aproximativ 2 mg/mL), într-oc elulă conținând 2,5 mL ABTS și 0,4 mL apă distilată/solvent;
- f reprezintă factorul de diluție al probei;
- C_{Trolox} reprezintă concentrația efectivă de Trolox, în $\mu\text{mol L}^{-1}$.
- m – masa de produs din care s-a obținut soluția de analizat, exprimată în mg/mL. In cazul extractelor se ține seama de masa de produs vegetal supusă analizei, de volumul total colectat și de volumul de probă analizat și se fac corecțiile de calcul necesare.

Probele lichide au fost analizate ca atare (0,1 mL probă în celula de analiză –vezi mai sus, condițiile menționate) ; excepție a făcut lichidul de spălare –P2 care a necesitat o diluție în etanol de 1:10 (v:v). In calculul valorilor TEAC s-a ținut seama de volumul de probă luat în lucru, respectiv de factorul de diluție. Probele solide au fost dizolvate în etanol, 1 mg mL^{-1} , din această soluție stoc fiind luat volumul de 0,1 mL pentru analiză. Valorile obținute sunt date în tabelul de mai jos.

Tabelul 18. Rezultate obținute la determinarea capacității antioxidante cu ABTS.

Proba	TEAC μmolL^{-1}
F1	205,6
F2	133,6
F3	111,8
FT	162,4
S1	161,2
S1'	178,8
P1-silimarină	96,4
P3 -silimarină -hexan	105,1
P4 -reziduu Hofigal	200,5
P2 –lichid spălare	711,3
Proba obț. prin extracție Soxhlet cu alcool 96% a subprodusului	192,5

Determinarea capacității antiradicalice utilizând metoda DPPH

Determinarea se bazează pe capacitatea compusului/extractului/amestecului de analizat de a schimba electroni și protoni cu radicalul liber cu viață lungă DPPH; reacția este urmărită la lungimea de undă specifică DPPH, 516-519 nm. Scăderea valorii absorbantei înregistrate la această lungime de undă este generată de capacitatea antiradicalică a probei de analizat, cele două proprietăți variind direct proporționale. Probele luate în lucru au suportat aceleași etape de tratament ca și cele folosite pentru determinarea capacității antiradicalice utilizând metoda TEAC. Valorile obținute sunt date în tabelul 19.

Tabelul 19. Rezultate obținute la determinarea capacității antioxidante cu DPPH.

Proba	TEAC μmolL^{-1}
F1	30.7
F2	19.3
F3	13.6
FT	24.3
S1	28.3
S1'	31.4

P1-silimarina	9.7
P3 -silimarina -hexan	14.6
P4 -reziduuHofigal	30.2
P2 -lichidspalare	162.6
Probă obținută prin extracție Soxhlet cu alcool 96% a subprodusului	59.0

Probele F1 – F3, FT, S1. S'1 sunt cele din tabelul 1, P1, P2, P3, P4 sunt prezentate la paragraful 3.1.1.1.

Prin aceste determinări se confirmă că spălările conduc la pierderi importante de eficacitate antioxidantă (vezi valorile TEAC pentru P2-lichid de spălare).

3.2.1. Dezvoltarea unei metode portabile, ieftine și rapide pentru determinarea compușilor de interes din subprodusul de armurari, din concentratul de silimarina și din alți produși de origine vegetală

În prezent există un interes pentru dezvoltarea de dispozitive de detecție portabile [1-3] pentru utilizare în locuri mai greu accesibile sau în locuri cu resurse limitate. În cele ce urmează se descrie obținerea și caracterizarea unei matrice de detectare colorimetrică pe bază de hârtie de filtru impregnată cu nano-oxizi metalici [1-3]. Compușii de interes din probele de analizat pot forma spoturi colorate cu nano-oxizii impregnați în hârtie în urma unor reacții de complexare sau redox. Culoarea și intensitatea culorii spotului format va depinde de tipul și concentrația compușilor care reacționează cu nano-oxidul respectiv. În continuare hârtia cu spoturile colorate obținute se scanează, iar imaginea înregistrată se analizează cu ajutorul unui soft adecvat. Pentru fiecare spot se obține valoarea intensităților corespunzătoare culorilor roșu, verde și albastru. Prin reprezentarea $1/\text{intensitatea culorii}$ în funcție de \log concentrației unei specii chimice (care reacționează cu nano-oxidul) se pot obține drepte de calibrare.

Datele experimentale obținute pot fi utilizate în mai multe moduri:

- Determinarea capacității antioxidante a probelor de analizat. Se folosește un senzor bazat pe nano-oxidul de ceriu (CeO_2) care reacționează printr-un mecanism redox cu compușii cu caracter antioxidant din proba de analizat. Datele înregistrate se interpolează într-un grafic de calibrare obținut pentru un antioxidant etalon, iar capacitatea antioxidantă se exprimă ca echivalenți antioxidant/g substanță.
- Determinarea conținutului total de substanțe capabile de a reacționa cu un anumit nano-oxid (printr-o reacție de complexare). Se folosește de exemplu un senzor bazat pe nano-oxidul de magneziu (MgO). Se procedează ca mai sus, iar în final se exprimă conținutul total de compuși chimici capabili să reacționeze cu nano-senzorul respectiv, exprimați în echivalenți de etalon (de ex. quercetină)/ g substanță analizată).
- Determinarea compoziției unor amestecuri de compuși (de ex. amestecuri de 3-5 compuși) care reacționează cu nano-oxizii dispuși într-o rețea (4 - 6 nano-oxizi). Rezultatele obținute sunt prelucrate chemometric prin metoda PLS și pot fi utilizate la determinarea compoziției amestecurilor respective. În acest caz este însă necesar să se știe calitativ compușii prezenți în amestecul analizat și să se facă o calibrare prealabilă a rețelei.

Reactivi, materiale și aparatură

- Nano-oxizi de: zinc (< 100 nm), magneziu (\leq 50 nm, BET), aluminiu (< 50 nm, TEM), molibden (<100 nm, TEM); titan (IV) (<100 nm, BET); staniu (< 100 nm); zirconiu (< 100 nm, BET); indiu (III) (< 100 nm, TEM); ceriu (soluție 20% în acid acetic 2,5%) (toate Aldrich);
- Acid clorogenic, acid cafeic, kaemferol, quercetol, quercitrin, hiperozidă, epicatechină, naringenină, morin, crysin, luteolină, hesperidin, apigenină, acid 2,4-dihidroxibenzoic, acid elagic, acid tanic, capsaicină, silimarină, silibinină, fructoză, acid D-malic, acid L-ascorbic, acid rozmarinic, acid galic, rutin, glucoză, galactoză, ramnoză, sucroză, acid cinamic, acid oxalic (toate Sigma); succinat de sodiu (Merck), acid citric (The Chemical Company), catechină (Supleco), etanol 96% (Merck), dimetilsulfoxid, DMSO (Riedel-de Haen), acid acetic glacial (Chemical Company Romania), hârtie de filtru (Filtrak, grade 3 hw).

Dispersii de nano-oxizi metalici 2% în apă: Dispersiile de MgO, ZnO, Al₂O₃, SnO₂, MoO₃, TiO₂ și ZrO₂ s-au preparat în apă; dispersia de In₂O₃ 2% s-a preparat în acid acetic (HAc) 2,5%; dispersia de CeO₂ 4 % s-a obținut din dispersia stoc de 20% în acid acetic 2,5% în soluție de acid acetic 2,5%.

Soluțiile stoc din compușii studiați de concentrație 10⁻² M s-au preparat în alcool etilic 96%, 80% și 60% sau apă (acolo unde a fost necesar s-a aplicat ultrasonare). Din soluția stoc s-au preparat soluțiile de lucru cu concentrații cuprinse între 8x 10⁻³ (10⁻³) și 10⁻⁴ M.

Aparatură: scanner EPSON PERFECTION V500 PHOTO

Mod de lucru

Hârtiile de filtru cu diametrul de 10 cm au fost impregnate cu dispersia de nano-oxid, uscate la etuvă la 80-90 °C apoi la temperatura camerei 2 ore. Pe hârtiile de filtru au fost spotate volume de câte 2,5 μL din soluțiile de analizat, iar apoi au fost uscate 2 ore la temperatura camerei. Hârtiile s-au scanat și spoturile colorate formate s-au analizat din punct de vedere al intensității culorii roșii, verzi și albastre, cu ajutorul programului IMAGE J.

Fiecare soluție standard s-a aplicat de câte 3 ori iar fiecare soluție a probelor de analizat de câte cinci ori. Scanarea s-a făcut la un interval de maximum câteva ore de la spotarea probelor. S-a obținut o dreaptă de calibrare prin reprezentarea 1/BCI x 1000 în funcție de logaritmul concentrației (M) a unei substanțe etalon (de ex. acid galic). Valorile obținute pentru substanțele analizate s-au comparat cu cele obținute pentru substanța etalon (BCI – blue colour intensity).

Mod de calcul

Valorile intensității culorii albastre (blue colour intensity, BCI), măsurate cu ajutorul programului IMAGE J, s-au copiat și prelucrat în continuare în EXCEL. Astfel, s-au trasat curbe de calibrare 1/BCI x 1000 în funcție de logaritmul concentrației (M) a substantelor standard și din ecuațiile dreptelor de etalonare s-a determinat concentrația probelor de analizat, exprimată în mg echivalenți substanță standard/gram substanță de analizat.

Rezultate și discuții

Pentru toți nano-oxizii studiați s-a obținut o dependență liniară între 1/BCI și log conc. (M) compusului studiat (acolo unde are loc o reacție între nano-oxid și compus). S-au obținut drepte de calibrare pentru CGA: acid clorogenic, CA: acid cafeic, RA: acid rozmarinic, GA: acid galic, EA: acid elagic, TA: acid tanic, DHBA: acid 2,4 dihidroxibenzoic, Q: quercetol, R: rutin, Hi: hiperozidă, He: hesperitin, A: apigenin, N: naringenin, L:luteolin, K: kaemferol, M: morin, C: crysin, silibin și

silimarină, utilizând nano-oxizi de zinc, magneziu, aluminiu, ceriu, molibden, titan, zirconiu, indiu și staniu.

În tabelul 20 sunt trecute ca exemplificare ecuațiile dreptelor de calibrare și coeficienții de determinare obținuți pentru acid galic, quercetol, silibin și silimarină. Domeniul de măsură este cuprins între 8×10^{-4} M și 1×10^{-2} M. Se constată o bună liniaritate pe un domeniu de concentrații cuprins între aprox. 0,4 și 10 milimoli/L pentru majoritatea dreptelor de calibrare.

Tabelul 20. Ecuațiile dreptelor de calibrare și coeficienții de determinare obținuți pentru acid galic, quercetol, silibin și silimarină.

Nano-oxid/ Antioxidant	Acid galic		Quercetol		Silibin		Silimarină	
	Ecuația	r^2/n ^c	Ecuația	r^2/n	Ecuația	r^2/n	Ecuația	r^2/n
MgO	$y^a = 0,5963 x^b + 6,210$	0,9860 / 5	$y = 1,355x + 8,951$	0,9933 / 5	-	-	$y = 0,6427 x + 6,062$	0,9673/5
ZnO	$y = 0,3029 x + 5,074$	0,9994 / 4	$y = 4,643x + 19,88$	0,9924 / 5	-	-	$y = 0,4603 x + 5,7216$	0,9846/7
Al ₂ O ₃	$y = 0,2907 x + 5,104$	0,9620 / 4	$y = 0,7211 x + 6,607$	0,9710 / 6	-	-	$y = 0,2416 x + 5,0748$	0,9779/5
CeO ₂	$y = 1,083 x + 7,746$	0,9948 / 4	$y = 1,9197 x + 11,21$	0,9962 / 5	$y = 0,1996 x + 5,156$	0,5797/4	$y = 1,3108 x + 7,7006$	0,9436/4
MoO ₃	$y = 1,0974 x + 7,4015$	0,9455/ 4	$y = 2,1267 x + 11,$	0,9878/ 6	$y = 0,3029x + 5,6707$	0,6642/ 5	Nu s-a analizat	
TiO ₂	-	-	$y = 0,1207 x + 4,7453$	0,8347/4	-	-	Nu s-a analizat	
ZrO ₂	-	-	$y = 1,3149 x + 8,589$	0,9819/ 6	-	-	-	-
In ₂ O ₃	-	-	$y = 1,298 x + 8,718$	0,9832 / 6	-	-	$y = 0,1895 x + 5,0507$	0,5338/6
SnO ₂	-	-	$y = 0,8664 x + 6,4978$	0,9534/ 4	-	-	Nu s-a analizat	

^a $y = 1/BCI$; ^b $x =$ concentrația antioxidantului (moli/L). ^c $r^2/n =$ coeficient de determinare/număr de determinări.

Rezultate obținute la analiza extractelor din subprodusul de armurariu și a concentratului de silimarină

S-a determinat conținutul compușilor din probele de analizat capabili de a reacționa cu nano-oxizii studiați, exprimați în echivalenți mM acid galic. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 21. La utilizarea nano-oxidului de ceriu, CeO₂, deoarece acesta are proprietăți redox, se poate determina capacitatea antioxidantă a probelor de analizat și în acest caz rezultatele se exprimă în echivalenți mM acid galic.

Tabelul 21. Rezultate obținute la analiza extractelor, a concentratului și a subprodusului de armurariu.

Proba	GAE ^a (mM)				
	ZnO	MgO	Al ₂ O ₃	MoO ₃	CeO ₂
F1	20,8 ± 1,3	4,87 ± 0,20	2,42 ± 0,21	4,15 ± 0,11	1,29 ± 0,11
F2	3,60 ± 0,080	0,928 ± 0,092	1,00 ± 0,060	1,56 ± 0,11	1,11 ± 0,11

F3	$2,28 \pm 0,10$	$0,396 \pm 0,035$	$0,478 \pm 0,032$	$1,31 \pm 0,13$	$0,743 \pm 0,070$
FT	$9,95 \pm 0,24$	$0,925 \pm 0,024$	$1,73 \pm 0,12$	$2,69 \pm 0,14$	$1,23 \pm 0,11$
S1	140 ± 11	$3,99 \pm 0,35$	$2,96 \pm 0,23$	$3,96 \pm 0,38$	$1,60 \pm 0,082$
S'1	225 ± 15	$10,9 \pm 0,48$	$6,46 \pm 0,28$	$6,18 \pm 0,12$	$2,02 \pm 0,14$
P2	$25,7 \pm 1,0$	$9,62 \pm 0,62$	$1,04 \pm 0,042$	$8,40 \pm 0,48$	$0,618 \pm 0,061$
P3 1 mg/mL	0	0	$0,449 \pm 0,014$	0	$1,38 \pm 0,12$
P3 5 mg/mL	$6,31 \pm 0,25$	$0,293 \pm 0,013$	$0,754 \pm 0,051$	$0,655 \pm 0,26$	$0,920 \pm 0,067$

^aGAE: în mM echivalenți acid galic; Probele F1 – F3, FT, S1, S'1 sunt cele din tabelul 1, iar P1, P2, P3 sunt prezentate la paragraful 3.1.1.1.

Probele respective nu au putut fi analizate utilizând nano-oxizi de titan și zirconiu deoarece au format spoturi foarte puțin colorate cu aceștia. După cum se poate observa din tabelul 21, rezultatele au variat în limite mari. Cele mai mari valori s-au obținut pentru extractele analizate pe oxid de zinc (aproximativ 225 mM GAE). Cele mai mici valori s-au calculat pentru fracțiile 2 și 3 ale extractului obținut prin macerare repetată.

Studiul interferenței unor compuși și solvenți

Efectele speciilor interferente au fost investigate prin testarea a 10 substanțe ce se regăsesc în băuturi, ceaiuri, vinuri și care ar putea da un răspuns colorimetric pe hârtie impregnată cu nano-oxid. Astfel au fost testate soluții 0,5 M în apă de acizi: ascorbic, malic, succinic, oxalic și citric, ramnoză, galactoză, zaharoză, fructoză și glucoză. Substanțele testate nu au format spoturi colorate pe hârtia impregnată cu nano-oxizi chiar la concentrații de 50 de ori mai mari decât speciile chimice analizate prin această metodă. De asemenea, s-a studiat influența etanolului 96%, metanolului și a dimetilsulfoxidului și s-a constatat că acești solvenți nu formează spoturi colorate, cu excepția senzorului bazat pe utilizarea nano-oxidului de ceriu, pentru care etanolul dă o ușoară colorație.

Concluzii

S-a studiat o metodă de determinare a conținutului de compuși (din probe complexe) capabili să reacționeze prin formarea de spoturi colorate cu nano-oxizi impregnați în hârtie de filtru. Rezultatele se exprimă ca mM echivalenți acid galic. S-au trasat drepte de calibrare pentru un număr de 19 compuși, în special flavonoizi, catechine și acizi organici cu efect antioxidant, care pot fi prezenți într-o diversitate de plante. S-au folosit în acest scop un număr de 9 nano-oxizi. Cele mai bune rezultate se obțin în cazul flavonozilor și la folosirea nano-oxidilor de zinc, magneziu, aluminiu, molibden și ceriu. Metodele dezvoltate au fost aplicate la analiza extractelor obținute din subprodusul de armurariu studiat, precum și a silimarinei solide obținute. Datele sunt raportate sub forma mM echivalent acid galic pentru soluțiile analizate.

S-a realizat o rețea de nanosenzori bazată pe folosirea nano-oxidilor de zinc, ceriu, aluminiu, magneziu, titan și molibden pentru determinarea cantitativă în amestec a următorilor compuși: acid elagic, quercetrin, acid cafeic, acid rozmarinic și acid galic. S-au folosit la început un mare număr de

amestecuri (30 de amestecuri) cu concentrații cunoscute din compușii respectivi aflate în raporturi foarte diferite, pentru calibrarea rețelei respective, iar apoi pe baza datelor obținute s-au analizat probe reale de ceaiuri care conțin compușii respectivi. Interpretarea rezultatelor s-a făcut folosind metoda chemometrică PLS. Rezultatele obținute vor fi trimise la publicat la o revistă științifică din domeniu.

Metoda studiată permite determinări la distanță, cu un echipament ieftin și ușor accesibil (un scanner și un calculator) și cu consum de reactivi mic, are un cost foarte scăzut și durata unei măsurători este scurtă.

Bibliografie

1. Sharpe, E., Andreescu, S. "Portable nanoparticle based sensors for antioxidant analysis." *Advanced Protocols in Oxidative Stress III* (2015): 221-231.
2. Sharpe, E., Frasco, T., Andreescu, D., Andreescu, S. "Portable ceria nanoparticle-based assay for rapid detection of food antioxidants (NanoCerac)." *Analyst* 138.1 (2013): 249-262.
3. Sharpe, E., Bradley, R., Frasco, T., Jayathilaka, D., Marsh, A., Andreescu, S. "Metal oxide based multisensor array and portable database for field analysis of antioxidants." *Sensors and Actuators B: Chemical* 193 (2014): 552-562.

3.3. Evaluarea eficacității antiproliferative pe culturi celulare tumorale

Evaluarea *in vitro* a extractelor vegetale de silimarină s-a realizat pe linia celulară de fibroblaste normale de tip NCTC (clona L929) pentru stabilirea potențialului cito-toxic al extractelor formulate, evaluarea eficacității antiproliferative fiind realizată pe culturi celulare tumorale. Rezultatele pentru eficacitatea antiproliferativă nu sunt concludente. Rezultatele privind studiile de cito-toxicitate au condus la următoarele observații și concluzii:

- după 48 h de incubare a celulelor cu extracte de *P1-silimarină pulbere*, *P2-silimarină -hexan*, *P3-silimarină extract obținut utilizând fenomene de cavitație*, s-a observat că acestea nu au avut efect citotoxic asupra celulelor, la nici una dintre cele cinci concentrații (100;250;500;750;1000 μg/mL) folosite în experiment (figura 6)

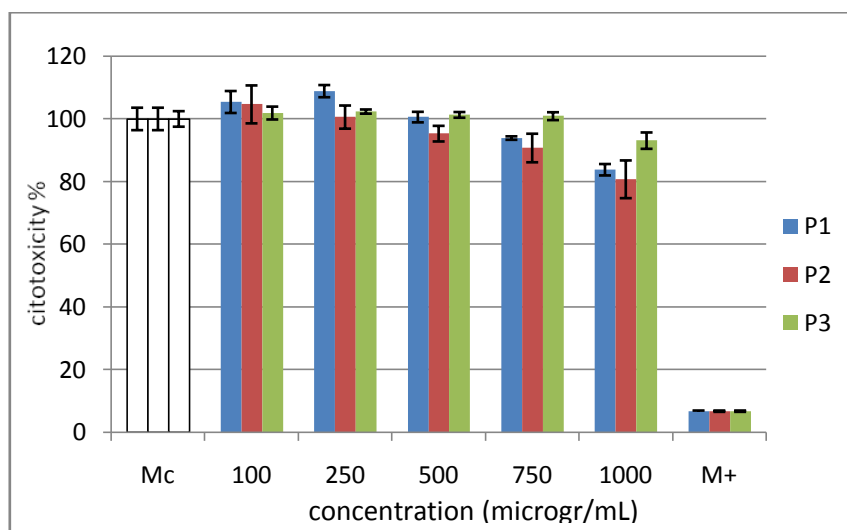


Figura 6. NCTC 48 h

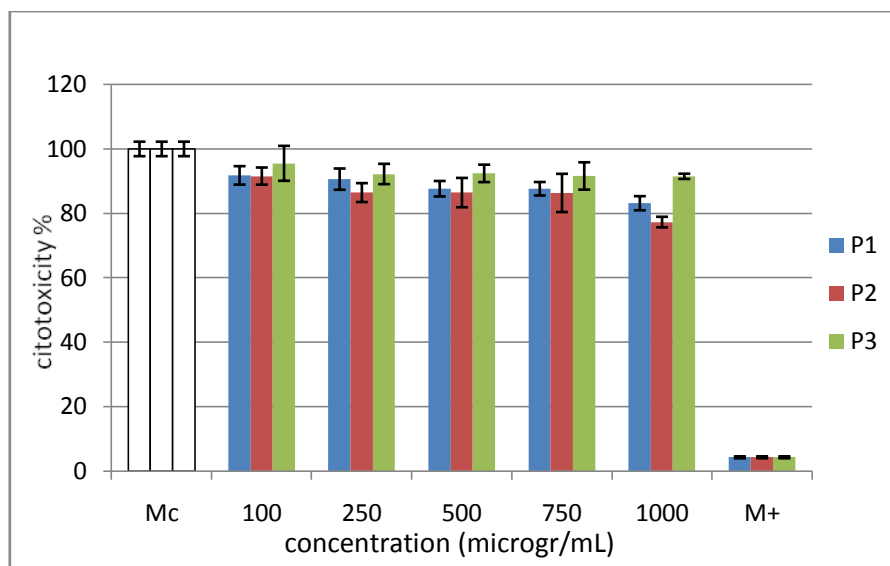
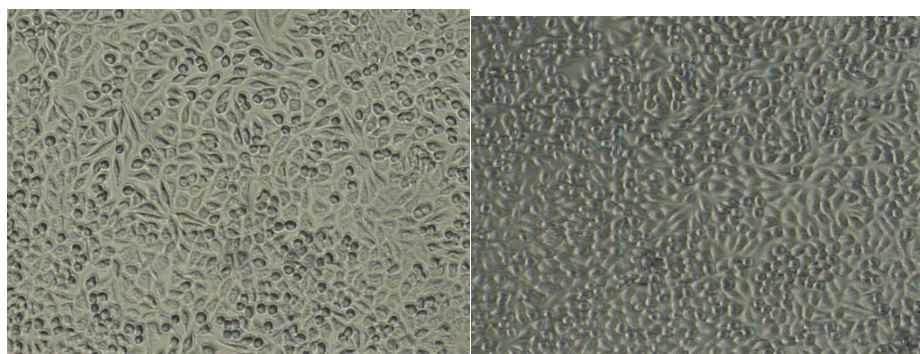


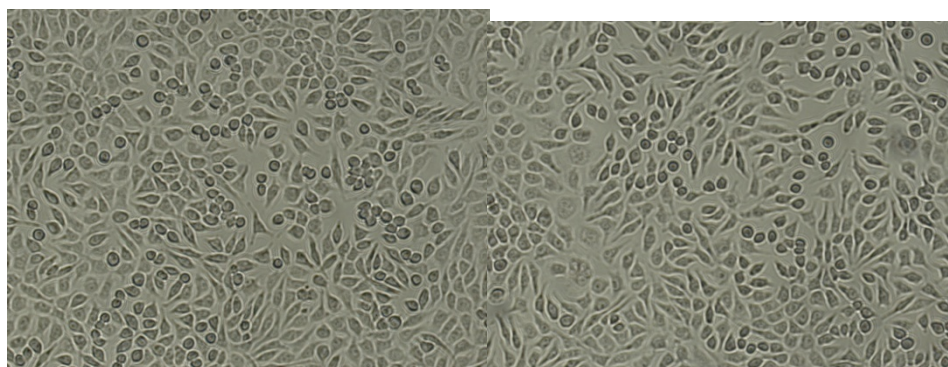
Figura 7. NCTC la 72 h

Determinarea spectrofotometrică după metoda MTT, la 72 de ore de incubare a celulelor normale de tip NCTC în prezența extractelor P1, P2, P3, a demonstrat că acestea nu au determinat vreun efect citotoxic asupra celulelor, excepție făcând proba P2, doar la concentrația de 1000 $\mu\text{g/mL}$, unde a prezentat un efect ușor citotoxic (figura 7)



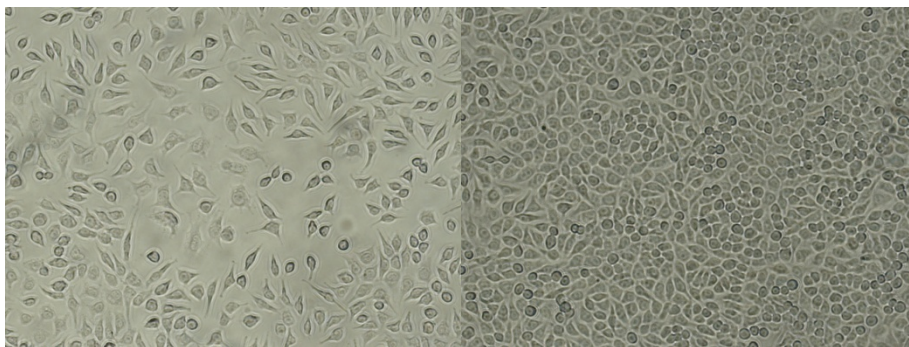
a). Martor de cultură

b). P1 - 250 $\mu\text{g/mL}$

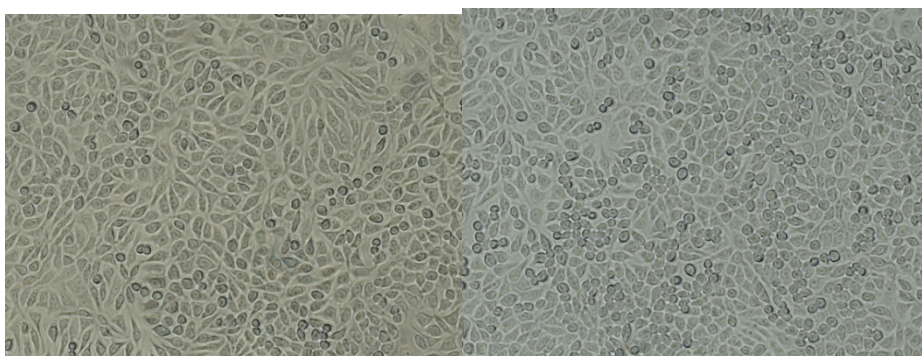


c). P1 - 750 $\mu\text{g/mL}$

d). P2 - 100 $\mu\text{g/mL}$



e). P2 la 1000 µg/mL cultura de NCTC f). P3 - 250 µg/mL



g). P3 – 750 µg/mL h). P3 – 1000 µg/mL

Figura 8. Imagini probe culturi celulare

Morfologie

Celulele de tip NCTC (L929) tratate cu extractele P1, P2, P3, au prezentat un aspect normal, cu 2-3 prelungiri, citoplasmă fină, monocromă, observându-se celule rotunjite atât la proba martor cât și la variantele tratate (figura 8). Observațiile de morfologie pe celule L929 tratate cu extracte în domeniul de concentrație 100-1000 µg/mL au demonstrat că acestea nu au modificat fenotipul celulelor, care au prezentat un aspect normal, specific liniei celulare.

Proba P2 nu a produs modificări morfologice până la concentrația de 750 µg/mL dar, la concentrații mai mari (1000 µg/mL) (figura 8e), a modificat ușor densitatea celulară, demonstrând un efect slab citotoxic. Celulele sunt uniforme, citoplasma monocromă, fără resturi celulare, doar cu densitatea celulară puțin mai scăzută decât martorul de cultură.

Probele P1 și P3 nu au produs modificări ale liniei celulare NCTC la nici una dintre cele cinci concentrații analizate, nici ca structură și nici ca densitate celulară.

3. 4. Schimbul de cunoștințe și bune practici între mediul academic și agentul economic

Schimbul de cunoștințe a vizat inovarea de produs, care înseamnă, în cazul practic VALSUSA o nouă tehnologie care să conducă la obținerea unui randament ridicat de extracție a complexului de silimarină.

Pe baza strategiei elaborate în etapa anterioară pentru eficientizarea schimbului de cunoștințe între mediul academic (UB și INCDSB) și agentul economic (HOFIGAL) s-a trecut la implementarea următoarelor puncte:

- **portofoliul activelor tangibile** prin care s-a realizat transferul protocolului de extracție de la coordonator către agentul economic - tehnologia de extracție cu solvenți siguri; acest protocol a fost predat agentului economic împreună cu o parte din produsul de extracție obținut și caracterizat anterior.
- **portofoliului activelor intangibile**- ținând seama de diferențele obținute la caracterizare între participanții la consorțiu s-a considerat necesară organizarea unei sesiuni de discuții între parteneri și agentul economic prin care să se realizeze însușirea cunoștințelor privind modalitățile de determinare a profilului de compoziție al produselor formulate.

În cadrul proiectului, mecanismul de schimb de cunoștințe intens aplicat a fost cercetarea în parteneriat, atât între partenerii academici cât și între aceștia și partenerul economic, existând atât schimburi de informații care au implicat toți trei membrii consorțiului cât și bilaterale Universitatea București -Hofigal, respectiv INCDSB – Hofigal. Mai mult, verificări intermediare ale conținutului de silimarină din diverse materiale au fost realizate de către INCDSB la solicitarea Hofigal pe parcursul acestei etape de implementare a proiectului.

În perioada de raportare IMM-ul beneficiar al transferului de tehnologie a fost susținut prin asistență directă acordată de către INCDSB și de către coordonator –Universitatea din București, pentru soluționarea de probleme punctuale legate de producția pe bază de silimarină.

O studentă de la Facultatea de Chimie, Alina Paula Vișan, masterandă la Facultatea de Chimie, a fost angajată în cadrul contractului de cercetare 13 BG/2016 la Universitatea din București și a efectuat un stagiu de practică la întreprinderea Hofigal în perioada noiembrie 2017–martie 2018. Stagiul la Hofigal precum și activitatea desfășurată în cadrul contractului au contribuit substanțial la întocmirea lucrării de dizertație, care a fost susținută în iunie 2018, fiind evaluată cu nota 9,90.

3.5. Diseminarea rezultatelor

Au fost prezentate două lucrări (poster) la The Fifth Edition of International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences, IC-ANMBES 2018, May 23th – May 25th, 2018, Brasov, România.

1. VALORIZATION OF BY-PRODUCT RESULTED IN PROCESSING OF MILK THISTLE OIL BY COLD PRESSING. RECOVERY OF SILYMARIN

Autori: Simona-Carmen LIȚESCU, Andrei-Florin DĂNET, Claudia Valentina POPA, Georgiana BADEA, Viorica TAMAȘ, Alexandru SUCIU

2. ANTIOXIDANT CAPACITY DETERMINATION BY USING NANO-OXIDES OF MoO₃ AND CeO₂

Autori : Alina VASILESCU, Claudia Valentina POPA, Simona-Carmen LITESCU, Andrei-Florin DĂNET

Se va prezenta o lucrare (poster) la simpozionul : Prioritățile chimiei pentru o dezvoltare durabilă, PRIOCHEM Ediția XIV-a, 10-12 oct. 2018, București, RECOVERY OF SILYMARIN FROM THE BY-PRODUCT RESULTED IN PROCESSING OF MILK THISTLE OIL BY COLD-PRESSING
 Autori: LIȚESCU Simona-Carmen, DĂNET Andrei-Florin, POPA Claudia Valentina, BADEA Georgiana, TAMAȘ Viorica, SUCIU Alexandru

A fost susținută lucrarea de dizertație intitulată : *Determinarea unor antioxidanți și a capacității antioxidante a unor probe complexe bazată pe utilizarea de nano-oxizi* de către masteranda Alina Paula Vișan, angajată în cadrul proiectului 13 BG/2016. Lucrarea a fost apreciată cu nota 9.90. O altă studentă, Adriana Elena Bratu a susținut lucrarea de dizertație *Determinarea unor antioxidanți și a*

conținutului total de fenoli a unor extracte din subprodus de armurariu, partea experimentală a acestei lucrări fiind strâns legată de activitățile desfășurate în cadrul contractului 13 BG/2016. Ambele studente sunt absolvente ale masterului din cadrul facultății de chimie intitulat : *Chimia medicamentelor și a produselor cosmetice* în anul 2018.

A fost susținută o comunicare la a 14-a Sesiune de Comunicări Științifice Studențești din cadrul Facultății de Chimie, care a avut loc în perioada 25-26 mai 2018. Lucrarea este intitulată *Determination of antioxidant capacity and total phenols of the by-product resulted in the processing of milk thistle oil by cold pressing*. Autori. M. R. Cornoiu, A.E. Bratu, C.V. Popa. Tematica lucrării comunicate a fost strâns legată de activitățile desfășurate în cadrul proiectului.

Articolul "Evaluation of the efficacy of various green extraction methods for high valorisation of vegetal antioxidant sources" autori Georgiana I. Badea, Simona C. Lițescu-Filipescu, Gabriel L. Radu, Ioana Diaconu este sub recenzie la Revista de Chimie (depunere 5.09.2018), contractul 13BG (VALSUSA) fiind "acknowledged".

Se vor redacta două articole având tematica strâns legată de activitatea științifică desfășurată în proiectul 13 BG/2016 cu următoarele titluri, nedefinitivate încă: *Valorisation of the by-product resulted in processing of milk thistle oil by cold pressing* și *Nano-oxide sensors array for the determination of constituents of plant extracts*, care vor avea drept coautori persoanele implicate în realizarea proiectului. Pentru ambele lucrări contractul 13BG (VALSUSA) va fi "acknowledged".