

Raport științific și tehnic final

Cuprins	Pag.
Rezumatul raportului final	1
Act. 1.1. Elaborarea metodelor de extracție a silimarinei utilizând drept solvenți de extracție: apa, alcool etilic și metilic, acetonă și acetat de etil sau amestecuri de solvent organic/apă....	3
Act. 1.2. Determinarea fenolilor totali și a silimarinei, cu cele trei componente: silibinul, silicristinul și silidianinul din extractele obținute	3
Act. 1.3. Screeningul capacității antioxidante a extractelor obținute, determinând atât capacitatea antiradicalică cât și capacitatea antioxidantă - partea I-a.....	4
Act. 2.1. Screeningul eficacității antioxidante a extractelor obținute, determinând atât capacitatea antiradicalică cât și capacitatea antioxidantă-parte a II-a.....	5
Act. 2.2. Dezvoltare tehnologie laborator utilizând sisteme de solvenți. Stabilirea profilului de compoziție a extractelor obținute.....	7
Act. 2.3. Dezvoltare tehnologii de laborator utilizând sisteme de solvenți asistate de fenomene de cavitație (microunde, ultrasunete)-partea I-a	11
Act. 2.4. Stabilirea profilului de compoziție a extractelor obținute.....	11
Act. 2.5. Stagii de practică ale masteranzilor și doctoranzilor.....	12
Act. 2.6. Dezvoltarea și eficientizarea schimbului de cunoștințe și bune practici între mediul academic și agentul economic HOFIGAL.....	12
Act. 2.7. Diseminarea rezultatelor.....	13
Act. 3.1. Dezvoltare de tehnologii de laborator utilizând sisteme de solvenți asistate de fenomene de cavitație (microunde, ultrasunete)-partea a 2a.....	14
3.1.1. Dezvoltarea de tehnologie de laborator pentru extracția silimarinei din subprodus după îndepărtarea uleiului rezidual prin extracție cu hexan	14
3.1.2. Dezvoltarea de tehnologie de laborator pentru extracția silimarinei după degresarea prealabilă a subprodusului într-o unitate industrială specializată în acest scop.....	16
3.1.3. Rezultate analitice pentru probele obținute aplicând modul de lucru descris la paragraful 3.1.1.....	16
3.1.4. Rezultate analitice pentru probele obținute aplicând modul de lucru descris la paragraful 3.1.2.....	19
Act. 3.2. Screeningul eficacității antioxidante a extractelor de armurariu	23
Act. 3.3. Evaluarea eficacității antiproliferative pe culturi celulare tumorale.....	24
Act. 3.4. Dezvoltarea și eficientizarea schimbului de cunoștințe și bune practici între mediul academic și agentul economic.....	26
Act. 3.5. Diseminarea rezultatelor.....	26
Concluzii generale.....	27

Rezumatul raportului final de implementare a proiectului

Proiectul a avut două obiective majore: a) dezvoltarea și transferul de tehnologii pentru valorificarea superioară a subprodusului rezultat la obținerea uleiului de armurariu prin presare la rece; b)

intensificarea colaborării mediu academic - agent economic și creșterea nivelului de expertiză al resursei umane. Proiectul a fost realizat în trei etape: Etapa I-a (2016) Determinarea profilului de compoziție a subprodusului de la obținerea uleiului de armurariu, cu accentul pe silimarină și alți compuși polifenolici; screeningul eficacității antioxidante a extractelor obținute din subproduș; Etapa a II-a (2017) Dezvoltarea unor tehnologii de laborator pentru extracția silimarinei din subprodușul de la obținerea uleiului de armurariu folosind solvenți organici și apă; Etapa a III-a (2018) 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. Determinarea profilului de compoziție a subprodusului, cu accentul pe silimarină s-a făcut folosind metodele HPLC-DAD și HPLC-MS; polifenolii totali au fost determinați folosind o metoda spectrofotometrică și activitatea antioxidantă s-a determinat folosind o metoda chemiluminometrică de analiza și metodele cu DPPH și ABTS. S-a elaborat o metodă nouă de determinare a activității antioxidante cu posibile aplicații la determinarea conținutului de polifenoli, bazată pe utilizarea unor nano-oxizi metalici. Pentru dezvoltarea unei tehnologii de laborator pentru extracția silimarinei din subproduș s-a folosit o varietate de solvenți de extracție: alcool etilic, alcool metilic, acetona, acetat de etil, apă și amestecuri ale solvenților respectivi cu apă. S-a studiat influența solventului, a temperaturii, presiunii, timpului și a unor fenomene de cavitație (generate de microunde și ultrasunete) asupra extracției silimarinei din subproduș. Pentru studiile efectuate s-a folosit atât subprodușul ca atare, cât și subprodușul degresat, elaborand-se tehnologii de extracție corespunzătoare. În final, ținând seama de cerințele agentului economic și anume ca solventul folosit la extracția silimarinei să fie neinflamabil sau cu o inflamabilitate scăzută și condițiile de lucru să fie blânde, s-a ales ca pentru tehnologia de extracție, propusă pentru extracția silimarinei să fie folosit drept solvent de extracție alcoolul etilic 85% (m/m), extracția să se facă prin macerare la temperatura ambiantă (24 - 25 °C) și să se folosească subprodușul degresat în prealabil. S-a determinat puritatea concentratului de silimarină obținut (conținut de taxifolin, silicristin, silidianin, silibin A, silibin B, izo-silibin A și izo-silibin B), randamentul de obținere al silimarinei din subproduș și raportul dintre suma silibin A + silibin B față de total silimarina. Conținutul total de silimarină în concentratul obținut este mai mare de 50%. S-a făcut o evaluare a concentratului din punct de vedere al eficacității antiproliferative pe culturi celulare tumorale, precum și o evaluare a capacității antioxidante. 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 membrii consorțiului, cât și bilaterale Universitatea București -Hofigal, respectiv INCDSB – Hofigal. 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 baza 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 stagiul de practică la întreprinderea Hofigal în perioada noiembrie 2017 – martie 2018. Diseminarea rezultatelor obținute în cadrul proiectului s-a făcut prin participarea cu comunicări la o conferință în Suedia în 2017 și mai multe comunicări la conferințe din țară în 2017 și 2018. O lucrare științifică a fost trimisă la publicare și alte două sunt în curs de redactare.

1.1. Elaborarea metodelor de extracție ale silimarinei utilizând drept solvenți de extracție: apa, alcoolul etilic și metilic, acetona și acetatul de etil, sau amestecuri de solvent organic/apă

Condițiile de obținere a extractelor din subprodusul de armurariu sunt prezentate pe scurt în tabelul 1. În toate cazurile s-au supus extracției câte 5 g de subprodus de armurariu uscat și măcinat cu 50 mL solvent.

Tabelul 1. Protocoale aplicate pentru extracția silimarinei din subprodusul rezultat la obținerea uleiului de armurariu.

Extract	Solvent	Volu m 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.

Extractele astfel formulate au fost analizate pentru stabilirea profilului de compoziție, conținut de fenoli totali, conținut în silimarină și a eficacității acestora în ce privește activitatea antiradicalică/activitatea antioxidantă.

1.2. Determinarea fenolilor totali și a silimarinei, cu cele trei componente: silibinul, silicristinul și silidianinul din extractele obținute

Conținutul de fenoli totali din extractele obținute s-a determinat, aplicând metoda spectrofotometrică cu reactivul Folin-Ciocalteu. În tabelul 2 se prezintă rezultatele unui studiu privind influența solventului și a temperaturii asupra extracției polifenolilor prin macerare 24 ore.

Tabelul 2. Studiul influenței solventului și a temperaturii asupra extracției polifenolilor prin macerare 24 ore.

Simbol probă	Solventul de extracție	Temperatura (°C)	Diluția	GAE ^a , mg/g subprodus
M1	apă	50	x5	2,84 ± 0,061 ^b
M2	etanol 50%	50	x20	14,10 ± 0,37
M3	etanol 96%	50	x20	12,20 ± 1,06
M4	metanol 100%	50	x20	12,08 ± 0,47
M5	acetat de etil	50	x10	6,05 ± 0,44
M6	apă	70	x10	3,99 ± 0,26
M7	etanol 50%	70	x20	14,10 ± 0,61
M8	etanol 96%	70	x20	12,20 ± 1,21
M9	metanol 100%	70	x20	15,70 ± 0,54
M10	acetat de etil	70	x10	8,49 ± 0,63

^aGAE: echivalenți acid galic; ^bdeviația standard pentru 3 determinări

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

În tabelul 3 se prezintă datele experimentale și concentrațiile fenolilor totali în echivalenți acid galic/gram subprodus, ale probelor obținute prin extracție Soxhlet timp de 4 ore în etanol, metanol și acetat de etil.

Tabelul 3. Studiul influenței solventului asupra extracției polifenolilor din subprodus prin extracție Soxhlet (4 ore).

Simbol proba	Solventul de extracție	Numărul de sifonări	Diluția	GAE ^a , mg/g subprodus
S 1	etanol 96%	10	x20	12,21 ± 0,96 ^b
S2	Methanol 100%	11	x20	17,73 ± 1,03
S3	acetat de etil	17	X10	6,20 ± 0,22

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

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 (HPLC) detecția fiind diferită: rețea de diode (DAD), respectiv spectrometrie de masă (MS).

Au fost determinate și prezentate caracteristicile de performanță ale metodei HPLC-DAD și HPLC-MS care îndeplinesc pe deplin cerințele pentru a fi aplicate la analiza silmarinei în probele luate în studiu. Au fost determinați : silicristin, silibin A și silibin B în extractele studiate.

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 cu DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) și cu ABTS (*2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)*). Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 4 și sunt exprimate în *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC).

Tabelul 4. 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.

Concluzii

În prima etapă de execuție a proiectului VALSUSA au fost îndeplinite toate obiectivele specifice etapei:

- 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. Extracția s-a făcut prin macerare sau prin metoda 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 redactat 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.

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

În tabelele 5 și 6 sunt date rezultatele experimentale obținute la analiza unor extracte, al caror mod de obținere este prezentat în tabelele 2 și 3. S-a aplicat o metodă chemiluminometrică descrisă în detaliu în RST pentru anul 2017.

Tabelul 5. 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 ± 2,0	x1	1,00 ± 0,041 ^c	1,31 ± 0,055
M2	etanol 50%		28,4 ± 1,3	x20	12,4 ± 0,54	15,9 ± 0,72
M3	etanol 96%		56,9 ± 4,1	x10	12,1 ± 0,85	15,9 ± 1,1
M4	metanol		52,8 ± 4,0	x10	11,3 ± 0,83	14,8 ± 1,1
M5	acetat de etil		30,2 ± 2,5	x1	0,657 ± 0,051	0,845 ± 0,069
M6	apă	70	62,5 ± 4,7	x1	1,33 ± 0,098	1,75 ± 0,13
M7	etanol 50%		52,5 ± 2,3	x20	22,5 ± 0,97	29,4 ± 1,3
M8	etanol 96%		28,1 ± 2,3	x20	12,3 ± 0,98	15,7 ± 1,3
M9	metanol		27,2 ± 2,4	x20	11,9 ± 1,0	15,2 ± 1,3
M10	acetat de etil		25,8 ± 2,3	x2	1,13 ± 0,095	1,44 ± 0,13

^aGAE: echivalenți acid galic; ^bCAE: echivalenți acid cafeic; ^cdeviația standard pentru 3 sau 4 determinări.

Tabelul 6. Rezultate obținute la determinarea capacității antioxidante totale a extractelor obținute prin metoda 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

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

În tabelul 7 se prezintă valorile activității antiradicalice ale unor extracte în echivalent Trolox, în funcție de protocolul de extracție și tipul de solvent utilizat.

Tabelul 7. 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, μmolL ⁻¹ /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

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

Cele mai bune rezultate se obțin la extracția silimarinei cu acetonă, acetat de etil, alcool etilic 96% și alcool metilic. Alcoolul metilic 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 aproximativ 0,89 hPa.

În toate cazurile s-a folosit pentru extracție o cantitate de 5 grame de subprodus. Extracția s-a făcut prin macerare și s-a repetat de trei ori utilizând volume de câte 20 mL de solvent. După fiecare adaugare de solvent s-a omogenizat amestecul și s-a lăsat timp de trei ore pentru extracție.

În tabelul 8 sunt prezentate pe scurt condițiile experimentale folosite la obținerea extractelor.

Tabelul 8. 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.	Ext. în CHCl ₃ (după ext. 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

Extracțiile obținute au fost caracterizate prin metoda HPLC din punct de vedere al conținutului de silicristin, silidianin, silibin A și silibin B. S-a făcut o determinare a eficacității lor antiradicalice utilizând metodele DPPH și ABTS. De remarcat este faptul că înmuierea cu apă a subprodusului, înainte de efectuarea extracției determină o creștere apreciabilă a randamentului de extracție a silimarinei.

În tabelul 9 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 8.

Tabelul 9. 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 studiile preliminare rezultă că cel mai bun solvent de extracție este acetona, urmată de acetatul de etil și de alcoolul etilic. Întrucât agentul economic HOFIGAL nu agreează folosirea acetonei și a acetatului de etil ne-am concentrat pe folosirea alcoolului etilic drept solvent de extracție (probele H8 și H'8). Pentru realizarea extracției s-a folosit subprodusul înmuiat în prealabil în apă.

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

S-a pornit de la 5 grame de subprodus. Extracția silimarinei se face de două ori cu câte 20 mL (primele două) și cu 10 mL (a treia extracție). Extracțiile se fac la temperatura de 25 °C. S-a 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. Filtrarea se face la vid. Extracția I-a se face timp de 180 minute, a doua 120 de minute, iar a treia timp de 60 de minute. Amestecul de probă cu alcool etilic se omogenizează din când în când. În final cele trei extracte în alcool etilic se reunesc, se filtrează și li se masoară volumul. Apoi alcool etilic se îndepartează din extractele reunite prin distilare până la un volum rezidual de aproximativ 15-20 %.

Metodele de identificare și cuantificare a componentelor silimarinei din extractele obținute sunt HPLC-DAD sau HPLC-MS descrise în raportul pentru etapa I-a. În figura 1 se prezintă grafic concentrațiile diferitelor componente ale silimarinei în extractele obținute.

În tabelul 10 se prezintă comparativ rezultatele obținute la determinarea componentelor silimarinei în extractele obținute la utilizarea alcoolului etilic de concentrații 96%, 85% și 75%.

Concluzii

Fracția 1 prezintă cea mai mare concentrație a compușilor de interes analizați, comparativ cu fracțiile următoare ale aceleași variante de extracție

- Metoda prin macerare prezintă un randament de extracție ridicat;
- Cele mai bune rezultate la extracția silimarinei se obțin la utilizarea alcoolului etilic de concentrație 85% (m/m).

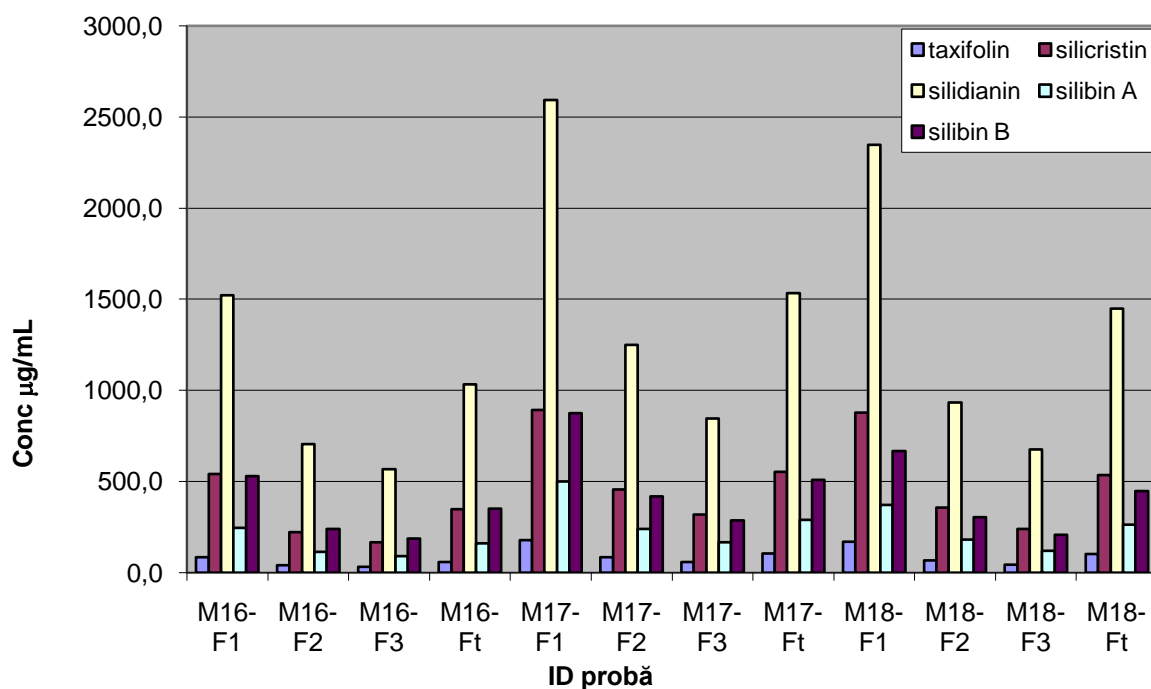


Figura 1. Reprezentarea grafică a concentrațiilor diferitelor componente ale silimarinei din extractele obținute din subprodus folosind alcool etilic de diferite concentrații.

Tabelul 10. 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 (µg/mL)	M16'	M17'	M18'	F3 (µg/mL)	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 (µg/mL)	M16''	M17''	M18''	Ftotal (µg/mL)	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

*Rezultatele sunt exprimate în µg/mL extract.

S-au analizat componenții silimarinei (silicristin, silidianin, silibin A și silibinB) în extractele obținute la folosirea alcoolului etilic de concentrațiile 96%, 85% și 75% precum și cantitatea totală de silimarină 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% este de 16,9 mg/gram subprodus și cea extrasă cu alcool etilic 75% de 23,3 mg/gram subprodus.

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).

Datorită particularității probelor și dificultăților întâmpinate în timpul analizei HPLC a componentelor silimarinei, a fost necesară introducerea unei etape suplimentare privind pregătirea probelor 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 agitare timp de 18 h la temperatura camerei. După evaporarea hexanului, masa de solid a fost uscată la etuvă, 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 11. Raportul între masa de material vegetal uscat luat în lucru și volumul de solvent utilizat pentru extracție a fost de 1: 10.

Tabelul 11. Sisteme de extracție aplicate pentru obținerea silimarinei (silicristin, sildianin, 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

Metoda dezvoltată a fost aplicată la determinarea conținutului în silimarină pentru extractele din tabelul 11, rezultatele obținute fiind prezentate în tabelul 12.

Tabelul 12. 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, și anume:

- ✓ Extracția s-a făcut prin tehnici asistate de microunde, ultrasonicare sau combinații între acestea două, în comparație cu tehnica convențională de macerare.
- ✓ Metoda de extracție asistată de fenomene de cavitație –ultrasunete- este cea mai eficientă metodă de extracție, indiferent de solventul utilizat.
- ✓ 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.

Deși s-au obținut rezultate foarte bune la utilizarea metodelor de extracție a silimarinei din subprodus bazate pe fenomene de cavitație, s-a preferat ca în continuare să se lucreze în condiții mai simple de lucru, o macerare simplă, pentru a nu complica instalația de recuperare a silimarinei care va fi realizată la agentul economic.

2.5. Stagiile 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 în perioada noiembrie 2017 – martie 2018. A efectuat un stagiul de practică la întreprinderea Hofigal în perioada noiembrie 2017 – martie 2018. După data de 1 martie 2018 a renunțat la postul obținut din motive personale. A continuat însă activitatea în laborator pentru realizarea lucrării de licență având o temă de cercetare strâns legată de tema contractului. Stagiul la Hofigal precum și activitatea desfășurată în cadrul contractului au contribuit substanțial la întocmirea lucrării de dizertație, care a fost susținută cu succes în iunie 2018, și a fost evaluată cu nota 9,90. Un al doilea masterand de la Facultatea de Chimie, și anume Bratu Adriana și-a realizat teza de dizertație cu o temă strâns legată de cea a contractului și pe care a susținut-o cu succes în iunie 2018. Din păcate nu a putut fi angajat un doctorand pe perioada de desfășurare a proiectului.

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

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

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 sistemele 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 au fost:
 - 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)
 - 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 s-a trecut la stabilirea unui plan personalizat de schimb de cunoștințe în etapa finală de implementare a VALSUSA.

În perioada de realizare a proiectului au fost prezentate agentului economic HOFIGAL trei rapoarte intermediare privind implementarea proiectului și anume în iunie 2017, în octombrie 2017 și în iulie 2018.

2.7. Diseminarea rezultatelor. Etapa a II-a

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. Dăneț, C.V. Popa, S. C. Lițescu, 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. Lițescu, A. F. Dăneț, 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. Lițescu, A. F. Dăneț, 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.

3.1. Dezvoltare 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 bazate pe fenomenul de cavitație, și anume, extracția asistată de microunde urmată de ultrasonificarea 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 metoda: 10 g material vegetal (degresat în prelabil). 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 și un 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 supus 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 silimarina în concentrație de minim 60%.

Pentru dezvoltarea tehnologiei de laborator pentru extracția silimarinei din subprodusul de armurariu s-a preferat utilizarea unei metode mai simple de extracție și anume cea bazată pe macerare fără a utiliza fenomene de cavitație.

3.1.1. Dezvoltarea de tehnologie 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. Din acest motiv s-a preferat îndepărtarea prealabilă a uleiului din subprodus, urmând ca numai după aceasta 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 silimarina în subprodus;
- Degresarea subprodusului (primit 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 masă de 13 g.

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 13) 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).

2) S-a făcut extracția din 6,5 g subprodus (proba S1, tabelul 13) 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-a folosit subprodus primit în noiembrie 2016. Uleiul a fost extras cu hexan folosind metoda Soxhlet. S-a determinat o cantitate de 9,0% ulei în proba inițială.

Materialul degresat (26,8 g) a fost supus extracției prin macerare repetată de trei ori, cu alcool etilic 85%. În tabelul 13 se prezintă tipurile de extracție folosite și datele experimentale la extracția uleiului și a silimarinei din subprodus.

Tabelul 13. 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 extracție (mL)	Volum de extract obținut (mL)	Fracția
S1 fara 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

Din extractul obținut s-a recuperat alcoolul prin distilare până se ajunge la aproximativ 10% din volumul inițial. Când se ajunge la aprox. 15-20 % din volumul inițial soluția nu mai este limpede la cald, devenind opalescentă, fără a se depune un precipitat. Peste soluția respectivă se adaugă apă, picătură cu picătură, când precipită un produs galben (slab roșcat). S-au adăugat 14 mL de apă. 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 galbuie (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 respectiv s-a notat cu **proba P1**. Proba de silimarina P1 s-a clătit cu 3 mL de hexan de trei ori. S-a agitat aprox. 5 minute, s-a lăsat să se depună precipitatul, aprox. 10 minute, apoi s-a decantat. Hexanul s-a lăsat să se evapore, când rămâne o cantitate de ulei corespunzătoare la aproximativ 4,4% din cantitatea inițială de silimarină (proba P1). În final s-a obținut după uscarea silimarinei spălate cu hexan o cantitate totală de **1,065** g silimarină. Produsul respectiv s-a notat: **proba P3**.

3.1.2. 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 subprodus s-a făcut extracția silimarinei cu alcool etilic 85% folosind metoda de extracție prezentată anterior (tabelul 13). Toate cele trei extracții s-au făcut la temperatura de aprox. 25 °C. S-au luat în lucru 110 g de subprodus. În tabelul de mai jos sunt sumarizate volumele de solvent folosite și timpii de extracție.

Tabelul 14. 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 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 galbui foarte opalescent cu volumul de 73-74 mL. Lichidul s-a notat **lichid de spălare varianta I-a**. Filtrarea decurge greu, iar prin filtru trece un lichid opalescent.

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%, apoi la soluția respectivă s-a adăugat 40 mL de apă, picătură cu picătură, sub agitare. Se obține un precipitat galben roșcat, iar soluția rămâne opalescentă. A fost lasat 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 minute la 4200 rpm. S-a obținut un solid galben roșcat, notat cu **silimarină recristalizată**. S-a uscat la 100 - 105 °C timp de 8 ore. Solidul obținut 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 aprox. 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 silimarina. Se lasă în repaus până a doua zi la frigider. Se observă un precipitat galben de silimarină, bine format. 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 și se notează cu **lichid de spălare varianta a II-a**. Se face uscarea timp de 8 ore la 100 – 105 °C. Solidul obținut are masa de 5,0027 g. Se notează cu **silimarină obținută prin 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.

3.1.3. Rezultate analitice pentru probele obținute aplicând modul de lucru descris la paragraful 3.1.1.

Rezultatele pentru extractele obținute din subprodus

Determinările s-au făcut prin HPLC iar rezultatele au fost calculate prin două metode:

A. Conform USP. În tabelul 15 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 15. 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. 13.

Conc. $\mu\text{g g}^{-1}$	Proba						
	S1	S1'	F1	F2	F3	Suma F1-F3 (mg/g)	Ft
TX	3240.5	3446.8	1315.1	644.0	218.1	2,177	2155.6
SC	7723.4	7993.6	3496.9	1636.2	544.2	5,677	5665.0
SD	10330.6	10787.0	8939.9	4495.2	1526.3	14,961	14972.6
SBA	3213.5	3202.4	747.0	359.4	118.7	1,225	1227.3
SBB	5409.9	5359.4	1356.2	666.0	219.3	2,241	2251.4
ISBA	3759.3	3685.6	1798.8	902.9	299.4	3,001	3061.8
ISBB	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 (tabelul 16)

Tabelul 16. 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 15 și 16 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 apa (probele S1' și S1). 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 de silimarină în suma fracțiilor extrase din subprodus calculat prin aplicarea metodei USP este mai mare și anume **3,15%**, comparativ cu valoarea calculată utilizând metoda dreptelor de calibrare și anume **2,89%**.

Rezultate analitice pentru probele solide și pentru lichidele de spălare

Metoda US Pharmacopoeia

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 injective. Datele sunt prezentate în tabelul 17.

Tabel 17. Conținut procentual de silimarină în proba analizată, calculat prin însumarea procentelor individuale ale componentelor (metoda de calcul conform farmacopeii).

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
% în materialul solid	54,3		56,8	2,61

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).

S-a lucrat conform USP. În tabelul 18 sunt prezentate rezultatele obținute pentru probele 1, 3 și 4, iar în tabelul 19 pentru proba 2.

Tabelul 18. Rezultate obținute la determinarea complexului de silimarina (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 19. Conținut de silimarină raportat ca silibin exprimat în $\mu\text{g/mL}$ în proba 2.

Concentrația $\mu\text{g mL}^{-1}$	Proba2	Cantitatea aflată în cei 14 mL (mg)	Silimarina (mg) în 26, 8 g, 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	
% in subprodus			3,12%	

În figura 2 este dată o cromatogramă reprezentativă privind etaloanele folosite la determinare. În toate cazurile s-a lucrat conform modului de lucru prezentat în rapoartele anterioare.

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 19). De fapt acești ultimi compuși sunt cei mai valoroși componenți ai complexului de silimarină.

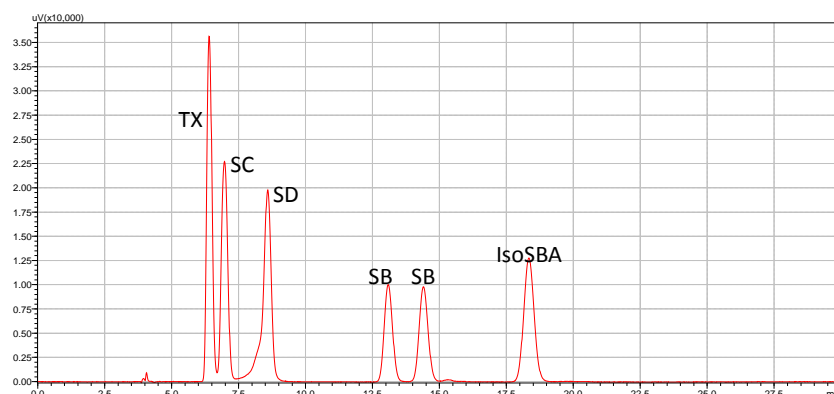


Figura 2. Cromatograma unui amestec de izomeri componenți (TX, SC, SD, SBA, SBB iso-SBA) ai complexului de silimarină ($\lambda=288$ nm) de concentrație $5 \mu\text{g mL}^{-1}$

Determinarea conținutului de silimarină în proba degresată de subprodus.

S-a determinat un conținut de silimarină de 3,54% prin metoda USP și de 3,29% prin metoda dreptelor de calibrare. Extracția s-a făcut prin metoda Soxhlet folosind alcool 96%.

Concluzii

Pe baza conținutului de silimarină determinat în subprodusul degresat, care este de 3,42 % (ca medie a rezultatelor obținute prin cele două metode) s-a calculat conținutul de silimarină în subprodus: $3,418/100 \times 26,78 \text{ g}$ (tabelul 1) = **0,915 g**. Cantitatea totală de silimarină extrasă din cele 26,78 g subprodus este de **0,809 g**. Randamentul de extracție al silimarinei din subprodus este de **88,42%**. Randamentul de obținere al silimarinei din extractul rezultat din subprodus, calculat pentru probele P1 și P3 este de **70,40%** și respectiv **78,97%**. În toate cazurile s-a luat în calcul media rezultatelor obținute prin cele două metode de analiză (metoda USP și a curbelor de calibrare). 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 19, în urma procesului de precipitare al silimarinei din extractul concentrat. Pierderile de silibin A și B, precum și de izo-silibin A și B care sunt componentele cele mai valoroase ale silimarinei sunt însă neglijabile, mai mici de 1% .

3.1.4. Rezultate analitice pentru probele obținute aplicând modul de lucru descris la paragraful 3.1.2.

Rezultatele obținute la analiza extractelor din subprodus

Determinările s-au făcut prin HPLC și rezultatele au fost calculate prin doua metode, conform USP si pe baza dreptelor de calibrare. In tabelul 20 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, volum final 41 mL.

Tabelul 20. 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 in 110 g sub (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			32034,5		3523,80	25333.02	
% silimarina extrasa			3,20%			3,02%	

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

Rezultate obținute la la analiza concentratelor de silimarină și a lichidelor de spalare.

Aplicând prima variantă de lucru s-a obținut în **silimarina recristalizată** un conținut de silimarină de 83,98%, utilizând metoda dreptelor de calibrare și de 71,57% utilizând metoda USP. Gradul de recuperare al silimarinei din materia prima a fost de 48,26% (considerând silimarina extrasă prin metoda Soxhlet 100%). In tabelul 21 se prezinta rezultatele de la analiza silimarinei obținute prin varianta a II-a de lucru.

Tabelul 21. Rezultate de la analiza silimarinei obținute prin varianta a II-a de lucru.

Silimarina Varianta a II-a	Conc. (μg/mL)	Conc. (μg/mL)	Conc. (μg/g) **	% din fiecare component	Conc (μg/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 extrasa. Silimarina extrasă prin Soxhlet =100%			88,69%		

Proba injectată fara diluție. ** Tinând cont de masa de solid (m=2.7mg=0.0027g) si volumul de solvent (V=2mL). *** Masa totală de solid 5,0027 g.

În tabelul 22 se prezintă rezultatele obținute la analiza lichidului de spălare varianta I-a, în tabelul 23 se prezintă rezultatele obținute la analiza lichidului de spălare varianta I-a (recristalizare) și în tabelul 24 rezultatele obținute la analiza lichidului de spălare pentru varianta a II-a de lucru.

Tabelul 22. Rezultate obținute la analiza lichidului de spălare, varianta I-a.

Lichid de spălare varianta I-a	Conc. (μg/mL) *	Conc (μg/mL) *	Cantitate totala în lichidul de spălare (mg)	% ramas în lichidul de spălare din cant. totală extrasă cu 85% alcool	Cantitate totala 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

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

Tabelul 23. Rezultate obținute la analiza lichidului de spălare varianta I-a (recristalizare).

Lichid de spălare. Varianta I-a (la recristalizare)	Conc. (μg/mL) *	Conc. (μg/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

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

Tabelul 24. Rezultate obținute la analiza lichidului de spălare pt. varianta a II-a de lucru.

Lichid de spălare. Varianta a II-a	Conc. (μg/mL) *	Conc (μg/mL) *	Cantitate totală în lichidul de spălare (mg)	% din cant. totală determ. prin extr. Soxhlet	% din cant. totala 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

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

In figura 3 se prezintă doua cromatograme HPLC suprapuse, obținute pentru un amestec de standarde (TX+SC+SD+SBA+SBB+ISBA) (negru) și proba extract I+II+III, varianta a II-a (magenta); $\lambda=288\text{nm}$.

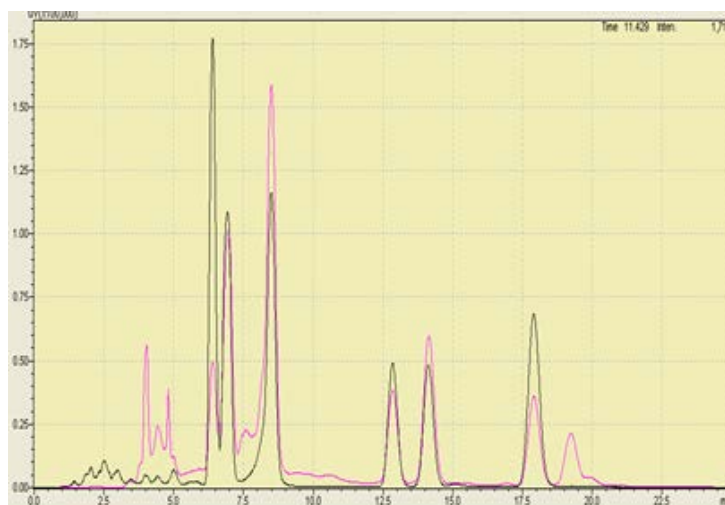


Figura 3. Cromatograme HPLC suprapuse obținute pentru un amestec de standarde (TX+SC+SD+SBA+SBB+ISBA) (negru) și proba extract I+II+III, varianta a II-a (magenta); $\lambda=288\text{nm}$.

Rezultate obținute la INCDSB aplicând tehnologia de laborator descrisă pentru extracția silimarinei, varianta a II-a.

A fost obținută silimarină solidă, aplicând tehnologia de laborator descrisă variant a II-a, 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 25.

Tabelul 25. Rezultate analitice pentru concentratul de silimarină obținut la INCDSB pe baza aplicării tehnologiei de lucru descrise la paragraful 3.1.2 varianta a II-a.

Silimarina 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 un conținut de 3,20% silimarină în subprodusul degresat folosind metoda dreptelor de calibrare și un conținut de 3,02% prin metoda USP.

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

- Prin aplicarea metodei descrise la paragraful **3.1.2 varianta a II-a** de lucru, s-a obținut un concentrat de silimarină având concentrația în silimarină de 62,41% (determinat prin metoda dreptelor de calibrare) și de 57,69% (prin metoda USP) tabelul 21. Randamentul de obținere al 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 extrasă, 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 extrase (tabelul 24).

- Prin aplicarea variantei I-a de lucru se obține un concentrat de silimarină care conține 83,98% silimarină (metoda dreptelor de calibrare) respectiv 71,57% silimarină (prin metoda USP). Randamentul de recuperare din subprodusul inițial este mai mic (48,26%).

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

- În urma aplicării metodei de lucru descrise la paragraful **3.1.2 varianta a II-a** de lucru la INCDSB rezultatele obținute au fost apropiate de cele obținute la UB și sunt prezentate în tabelul 25. Astfel, în concentratul de silimarină s-a determinat un conținut de 66,75% (prin metoda dreptelor de calibrare) și de 57,19% (prin metoda USP).

3.2. Screeningul eficacității antioxidante a extractelor de armurariu

Determinarea capacității antioxidante utilizând metoda TEAC

Probele lichide au fost analizate ca atare (0,1 mL proba în celula de analiză, condițiile de lucru au fost menționate în raportul pt. etapa a III-a); excepție a făcut lichidul de spălare –P2 care a necesitat o diluție în etanol de 1:10 (v :v). În 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 26. 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 -silimarina -hexan	105,1

P4 –reziduu Hofigal	200,5
P2 –lichid spălare	711,3
Proba obținută prin extracție Soxhlet cu alcool 96% a subprodusului	192,5

Determinarea capacității antiradicalice utilizând metoda cu DPPH

Valorile obținute sunt date în tabelul 27.

Tabelul 27. 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-silimarină	9,7
P3 -silimarină -hexan	14,6
P4 -reziduu hofigal	30,2
P2 -lichid spălare	162,6
Proba obținută prin extracție Soxhlet cu alcool 96% a subprodusului	59,0

Probele F1 – F3, FT, S1. S'1 sunt cele din tabelul 1, iar P1, P2, P3, P4 sunt prezentate la paragraful 3.1.1.

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

Dezvoltarea unei metode portabile, ieftine și rapide pentru determinarea compușilor de interes din subprodusul de armurariu, din concentratul de silimarină și din alți produși de origine vegetală

Metoda respectivă a fost descrisă în raportul științific și tehnic pentru etapa a III-a proiectului și nu mai revenim asupra acesteia în raportul final.

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 $\mu\text{g/mL}$) folosite în experiment (figura 4)

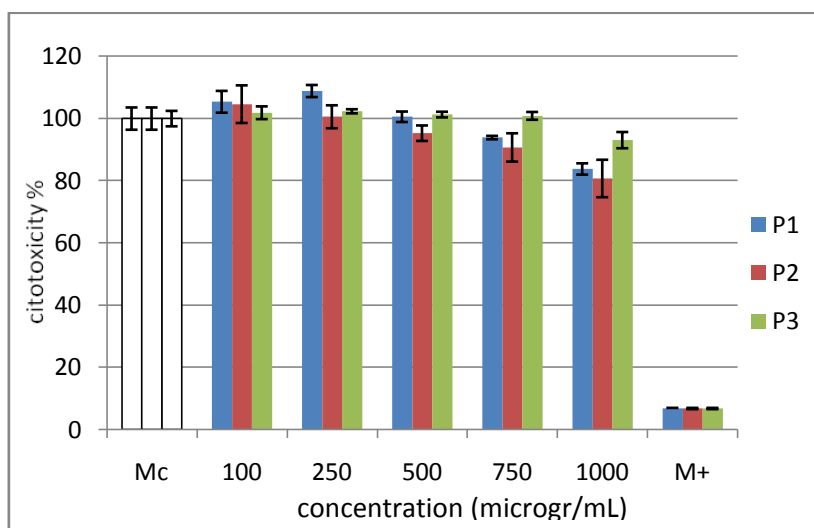


Figura 4. NCTC 48 h

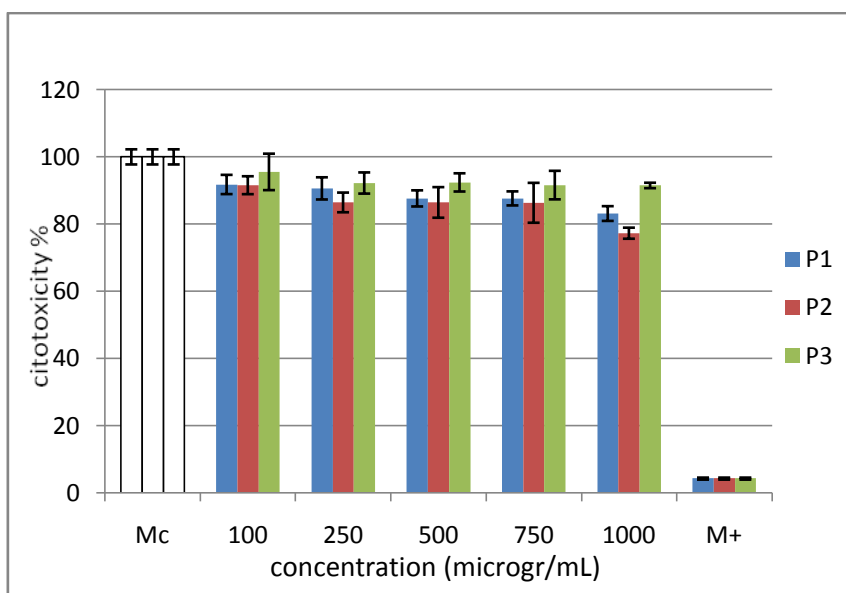


Figura 5. NCTC la 72 h

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 µg/mL, unde a prezentat un efect ușor citotoxic (figura 5).

Morfologie

Celulele de tip NCTC (L929) tratate cu extractele P1, P2, P3, au prezentat un aspect normal, cu 2-3 prelungiri, citoplasma fină, monocromă, observandu-se celule rotunjite atât la proba martor cât și la variantele tratate. 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 modificari morfologice pana la concentrația de 750 $\mu\text{g/mL}$ dar, la concentrații mai mari (1000 $\mu\text{g/mL}$) 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

Această temă a fost dezvoltată pe larg la punctul 2.4 din raportul final și nu vom reveni asupra ei.

O studenta de la Facultatea de Chimie, Alina Paula Vișan, masteranda 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 cu succes 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, Romania. 1) VALORIZATION OF BY-PRODUCT RESULTED IN PROCESSING OF MILK THISTLE OIL BY COLD PRESSING. RECOVERY OF SILYMARIN. Autori: Simona-Carmen LITESCU, Andrei-Florin DANET, Claudia Valentina POPA, Georgiana BADEA, Viorica TAMAS, Alexandru SUCIU; 2) ANTIOXIDANT CAPACITY DETERMINATION BY USING NANO-OXIDES OF MoO_3 AND CeO_2 . Autori : Alina VASILESCU, Claudia Valentina POPA, Simona-Carmen LITESCU, Andrei-Florin DANET

Se va prezenta o lucrare (poster) la simpozionul : Prioritatile chimiei pentru o dezvoltare durabila, PRIOCHEM Editia XIV-a, 10-12 oct. 2018, Bucuresti: RECOVERY OF SILYMARIN FROM THE BY-PRODUCT RESULTED IN PROCESSING OF MILK THISTLE OIL BY COLD-PRESSING. Autori: LITESCU Simona-Carmen, DANET Andrei-Florin, POPA Claudia Valentina, BADEA Georgiana, TAMAS Viorica, SUCIU Alexandru

A fost susținută lucrarea de dizertație (în 2018) 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 fos apreciată cu nota 9.90. O alta 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 Stiințifice Studentești din cadrul Facultății de Chimie (25-26 mai 2018). Comunicarea 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. Litescu-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 doua articole având tematica strâns legată de activitatea științifică desfășurată în cadrul proiectului 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 persoane implicate în realizarea proiectului. Pentru ambele lucrări, contractul 13BG (VALSUSA) va fi “acknowledged”.

Concluzii generale

Au fost atinse toate obiectivele pe care ni le-am propus în contractul de cercetare nr. 13 BG/2016. Astfel:

- In etapa I-a (2016) s-a facut determinarea profilului de compoziție a subprodusului de la obținerea uleiului de armurariu, cu accentul pe silimarina și alți compuși polifenolici și screeningul eficacității antioxidante a extractelor obținute din subprodus;
- In etapa a II-a (2017) au fost dezvoltate tehnologii de laborator pentru extracția silimarinei din subprodusul de la obținerea uleiului de armurariu folosind solvenți organici și apă;
- In etapa a III-a (2018) s-a facut o caracterizare a 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. In plus a fost elaborată o nouă metodă de determinare a capacității antioxidante și a conținutului de compuși chimici de interes din plante (inclusiv din armurariu), metodă bazată pe folosirea unor nano-oxizi metalici.
- A fost elaborată o tehnologie de laborator pentru recuperarea silimarinei din subprodusul rezultat la obținerea uleiului de armurariu prin presare la rece, bazată pe extracția silimarinei cu alcool etilic 85% (m/m). Tehnologia propusă a fost caracterizată din punct de vedere al randamentului de extracție al silimarinei din subprodus, al randamentului de obținere al silimarinei din extractul în alcool 85% și al conținutului celor șase compuși ai silimarinei (taxifolin, silicristin, silidianin, silibin A, silibin B, izo-silibin A și izo-silibin B) în concentratul obținut. Pentru analize s-au folosit metodele HPLC-DAD și HPLC-MS. S-au determinat pierderile din fiecare component al silimarinei în procesul de obținere al concentratului și s-a lucrat în astfel de condiții încât pierderile de silibin A și silibin B, considerați cei mai valoroși componenți ai silimarinei să fie minime.. Tehnologia de laborator pentru obținerea silimarinei a fost predată beneficiarului. Rezultatele obținute au fost supuse unor verificări interparteneri pe toată durata proiectului. Partenerii consideră că studiile pot fi continuate pentru introducerea în producție a unor preparate fitofarmaceutice sanogene care conțin silimarina.
- Un masterand a fost angajat în cadrul contractului, acesta a facut un stagiul de practică la Hofigal, și a finalizat și susținut teza de dizertație cu un subiect strans legat de tema contractului.
- S-a realizat un schimb de cunoștințe și de bune practici între mediul academic și agentul economic.
- Rezultatele obținute în cadrul proiectului au fost diseminate prin participarea cu lucrări la manifestări științifice din țară (cu șase lucrări) și străinătate (o lucrare). O lucrare a fost trimisa la publicare și încă două sunt în faza de redactare. Pentru toate lucrările sau comunicările, contractul 13BG VALSUSA este “acknowledged”.