

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

Acronim: VALSUSA

Contract nr: 13BG/2016

Consortiul implicat în realizarea proiectului:

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

Echipa de cercetare

Universitatea din București

Prof. Andrei Florin Danet – Director de proiect,

Conf. dr. Mihaela Carmen Cheregi,

Asist. dr. Claudia Valentina Popa,

Hofıgal

Drd. Alexandru Suci

Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare

pentru Științe Biologice (INCDSB)

CS I. dr. Simona Carmen Lițescu - responsabil

CS I prof. dr. ing. Gabriel Lucian Radu

CS II dr. Sandra Anamaria Victoria Eremia

CS III dr. Camelia Albu

CS III dr. Mirela Diaconu

CS dr. Andreia Alecu (Tache)

CS dr. Georgiana Ileana Badea (Truica)

Perioada de executie: 30.09.2016 - 01.10.2018

Valoarea proiectului: 460.000 lei

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

a) obiectivele științifice/tehnologice constau din:

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

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

- elaborarea și optimizarea tehnologiilor de extracție;

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

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

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

- asigurarea trainingului personalului agentului economic în laboratoarele academice (universitate și INCD);
- stagii de pregătire practică ale doctoranzilor și masteranzilor.

Impactul estimat al proiectului

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

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

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

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

Raport științific și tehnic etapa I-a 2016

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

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

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

3. Screeningul capacității antioxidante a extractelor obținute, determinând atât capacitatea antiradicalică cât și capacitatea antioxidantă- partea 1.

Rezumatul etapei I de implementare a proiectului

Activitățile specifice etapei I de raportare au fost: A I.1. Elaborarea metodelor de extracție a silimarinei utilizând drept solvenți de extracție apa, alcool etilic și metilic, acetat de etil etc., sau amestecuri de solvent organic/apă; A I.2. Determinarea fenolilor totali și a silimarinei, cu cele trei componente: silibina, silicristina și silidianina din extractele obținute; I.3. Screeningul capacității antioxidante a extractelor obținute, determinând atât capacitatea antiradicalică cât și capacitatea antioxidantă - partea 1.

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

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

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

Screeningul activității antioxidante a extractelor obținute a indicat că TEAC_{ABTS} prezintă valorile cele mai mari pentru extractele în metanol la 70°C și prin extracție Soxhlet. Valorile

TEAC_{ABTS} pentru extractele în etanol 97% și etanol 50% sunt destul de asemănătoare, atât la temperaturile de 50⁰C și 70⁰C, cât și prin extracție Soxhlet. Valoarea TEAC_{ABTS} pentru extractul în acetat de etil, care conține cea mai mare cantitate de silimarină, este apropiată de cea a extractului în alcool etilic obținut în aceleași condiții, dar care conține o cantitate de silimarină de aproximativ cinci ori mai mică. S-a tras concluzia că activitatea antiradicalică (antioxidantă) a extractelor este determinată în cea mai mare măsură de alți compuși extrași din subprodusul studiat și mai puțin de silimarină. Valorile TEAC_{DPPH} urmează același trend ca cel al TEAC_{ABTS} dar sunt de 3-7 ori mai mici.

Prezentare generală etapa I.

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

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

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

Activitatea I.1. Elaborarea metodelor de extracție a silimarinei utilizând drept solvenți de extracție: apa, alcool etilic și metilic și acetat de etil, sau amestecuri de solvent organic/ apă

Reactivi și materiale

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

Mod de lucru

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

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

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

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

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

Condițiile de obținere a extractelor din subprodusul de armurariu sunt prezentate sinoptic în tabelul 1.

Tabelul 1. Protocoale aplicate pentru extracția silimarinei (silicristin, silidianin, silibinin) din subprodusul rezultat la obținerea uleiului de armurariu.

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

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

Extractele astfel formulate au fost analizate pentru stabilirea profilului de compoziție, conținut de fenoli totali, conținut în silimarină și a eficacității acestora, activitate

antiradicalică/activitate antioxidantă. În această primă etapă au fost analizate doar din punctul de vedere al eficacității antiradicalice, prin metodele DPPH și ABTS (TEAC), urmând ca activitatea antioxidantă să fie evaluată ulterior, prin metoda ORAC.

Activitatea I.2. Determinarea fenolilor totali și a silimarinei, cu cele trei componente: silibina, silicristina și silidianina din extractele obținute.

I.2.1. Determinarea fenolilor totali din extractele obținute

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

Reactivi și materiale

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

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

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

Soluție stoc de acid galic 200 mg/L.

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

S-a utilizat apă bidistilată pentru toate determinările.

Mod de lucru

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

Trasarea curbei de calibrare. S-a lucrat după modul de lucru descris în¹. Astfel, peste 250 μL din fiecare probă s-au pipetat 250 μL reactiv Folin Ciocalteu diluat 1:2, apoi probele s-au omogenizat prin agitare ușoară. S-au adăugat în ordine 2000 μL apă bidistilată și 250 μL soluție

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

1M de carbonat de sodiu. Probele au fost agitate pentru omogenizare și apoi au fost lăsate în repaus 60 minute, la temperatura camerei și la întuneric. În paralel s-a obținut proba de comparație. Aceasta a fost preparată la fel ca și proba de analizat cu excepția faptului că în loc de probă de analizat s-a introdus apa distilată. S-a determinat absorbanta la 725 nm față de proba de comparație în celule de sticlă de 1 cm.

Determinarea conținutului în fenoli totali a extractelor s-a făcut asemanator cu a soluțiilor etalon. Pentru fiecare probă (etalon/extract) s-au efectuat câte trei determinări.

În figura 1 se prezintă curba de calibrare absorbantă în funcție de concentrația acidului galic.

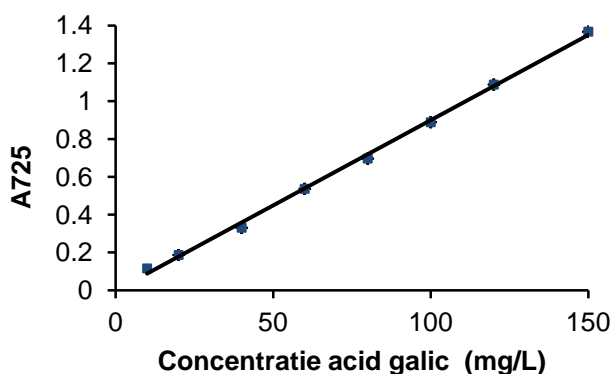


Figura 1. Curba de calibrare absorbantă vs. concentrația acidului galic.

Ecuția dreptei din figura 1 este:

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

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

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

În tabelul 2 sunt date valorile absorbantei determinate la 725 nm, diluția cu apa a extractelor, precum și conținutul de fenoli totali calculat în echivalenți acid galic/gram de subprodus, pentru extractele obținute prin macerare la două temperaturi (50 și respectiv 70 °C) și utilizând zece solvenți sau amestecuri de solvenți (apă, etanol:apă = 50% v/v, etanol 96%, metanol absolut și acetat de etil).

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

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

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

După cum se observă din tabelul 2 valorile conținutului în fenoli totali variază între 2,84 ± 0,061 și 15,7 ± 0,54 mg GAE/g subprodus. Cele mai mici valori s-au calculat pentru

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

În tabelul 3 sunt date valorile absorbanței determinate la 725 nm, diluția cu apă a extractelor, precum și conținutul de fenoli totali calculat în echivalenți acid galic pentru extractele obținute în apă la 100 °C, în funcție de timp.

Tabelul 3. Studiul influenței timpului de extracție în apă a polifenolilor din subprodus la 100 °C

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

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

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

Comparând rezultatele calculate pentru maceratele apoase la 50°C, 70°C și 100°C, se constată o creștere a valorilor conținutului în fenoli totali, de la 2,84 la 3,99 și apoi la 5,66 mg

GAE/g subprodus, chiar dacă timpul de extracție a fost în primele două cazuri de 24 de ore și în ultimul de 4 ore. Eficiența de extracție a apei este substanțial mai mare la temperatura de 100°C.

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

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

Simbol proba	Solventul de extracție	Numărul de sifonări	1 cm $A_{725\text{ nm}}$	Diluția	GAE ^a , mg/g subprodus
S 1	etanol 96%	10	0,447	x20	11,30
			0,484		12,12
			0,533		13,21
					12,21 ± 0,96^b
S2	metanol 100%	11	0,690	x20	16,70
			0,737		17,74
			0,783		18,76
					17,73 ± 1,03
S3	acetat de etil	17	0,479	x10	6,00
			0,492		6,15
			0,518		6,44
					6,20 ± 0,22

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

Din tabelul 4 se observă că valorile conținutului în fenoli totali variază între $6,20 \pm 0,22$ și $17,73 \pm 1,03$ mg GAE/g subprodus. Cea mai mică valoare s-a calculat pentru extractul în acetat de etil și cea mai mare- pentru extractul în metanol.

După cum se observă din tabelele 2, 3 și 4, cel mai bogat în polifenoli este extractul din subprodus de armurariu obținut prin extracție Soxhlet cu metanol, având o concentrație de 17,74 mg GAE/g subprodus.

I.2.2. Determinarea silimarinei, cu cele trei componente: silibina, silicristina și silidianina din extractele obținute.

Silimarina, ca principiu activ, este un complex de flavonolignani: silicristin, silidianin, silibinin A și B și isosilibinin A și B, fiind extrasă din fructele de armurariu (*Silibum marianum*), nespecific, împreună cu alți compuși cum sunt: flavone (apigenin), flavonoli (taxifolin, quercetin, kaemferol și dihidrokaempferol), acizi grași (acid linoleic, 35-55%, acid oleic, 24-30%, acid plamic, 8-12% și linolenic, 3-7%), fitosteroli (în special β -sitosterol) și

monoterpene. Aceste extracții nespecifice îngreunează analiza cantitativă, fiind necesară o pre-tratare a extractelor, mai ales a celor apoase, obținute la temperaturi de extracție ridicate.

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

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

Metoda HPLC-DAD

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

Semnalele specifice izomerilor din complexul de silimarina au fost monitorizate la lungimea de undă maximă, 288 nm.

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

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

Caracteristicile de performanță ale metodei HPLC-DAD sunt prezentate în tabelul 5.

Tabelul 5. Caracteristicile de performanță ale metodei HPLC-DAD dezvoltate pentru determinarea silimarinei

Analit	$t_R (\pm SD)$ (min)	Ecuția curbei de etalonare	R	LoD ($\mu\text{g/mL}$)	Domeniul de liniaritate ($\mu\text{g/mL}$)
Silicristin	$8,90 \pm 0,13$	$A = 43827 \times C + 2272.8$	0,9996	0,1	0,2-10
Silibinin A	$19,84 \pm 0,35$	$A = 24979 \times C - 106.4$	0,9996	0,08	0,1-10
Silibinin B	$22,27 \pm 0,39$	$A = 26194 \times C - 574.5$	0,9994	0,01	0,1-10

A-aria pic; C - $\mu\text{g/mL}$

În figura 2 se prezintă cromatogramele HPLC-DAD suprapuse pentru 4 concentrații (0,7 ; 1 ; 5 ; 10 $\mu\text{g/mL}$) de silicristin, silibinin A și silibinin B, precum și dreptele de etalonare obținute.

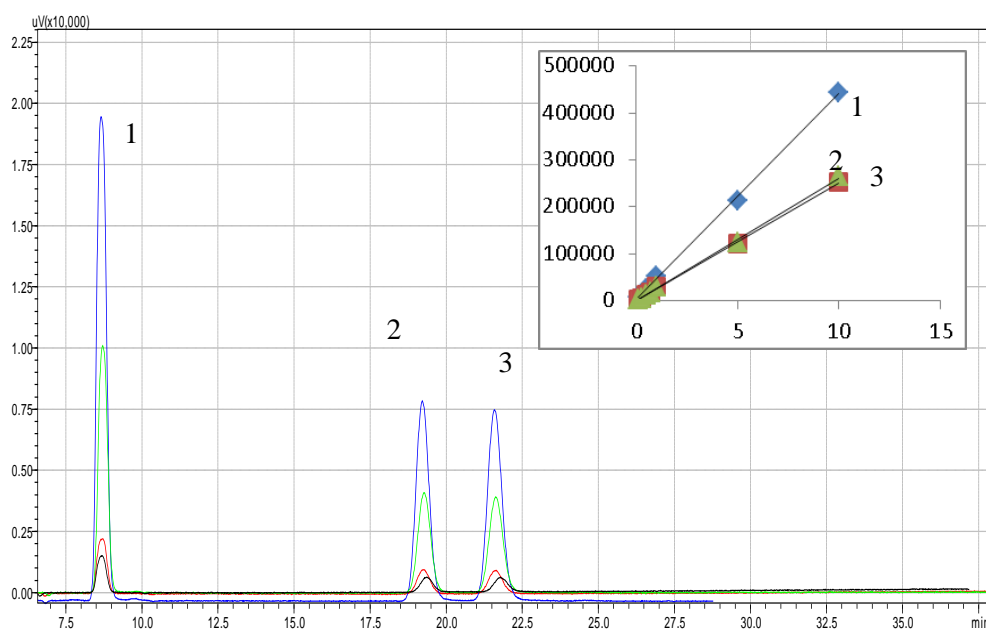


Figura 2. Cromatogramele HPLC-DAD suprapuse pentru 4 concentrații (0,7; 1; 5; 10 $\mu\text{g/mL}$) de silicristin (1), silibinin A (2) și silibinin B (3); inset dreptele de etalonare

Metoda HPLC-MS

Și în acest caz măsurătorile cromatografice au fost realizate folosind un sistem HPLC SHIMADZU, coloana fiind specifică pentru detecția mass-spectrometrică și anume C18 Kromasil 3,5; 2,1x100 mm. Sistemul a fost cuplat cu un detector MS, LCMS-2010, echipat cu o sursă de ionizare tip electrospray ESI. Pentru determinarea silimarinei s-a utilizat modul de ionizare negativ. Condițiile de lucru au fost următoarele: debit N_2 0,18 L/min; temperatura CDL 230°C; temperatura “heat block” 200°C, voltaj detector 2 kV, voltaj interfață 4 kV. Probele au

fost filtrate înainte de injectarea în sistemul HPLC prin celule de ultra filtrare Syringe Driven Filter Unit 0,2 μm (Macherey-Nagel). Coloana a fost echilibrată timp de 1 oră cu faza mobilă, înainte de injectarea probelor și apoi un volum de 20 μL de probă au fost injectați în sistemul HPLC, cuplat cu detectorul MS. Faza mobilă utilizată a fost compusă din apă cu acid acetic 2% (componentă A) și metanol (componentă B). Pentru o separare cât mai eficientă s-a folosit atât gradient de compoziție a fazei mobile cât și gradient de debit al fazei mobile; secvențele de gradient de compoziție au fost următoarele: 0,01-3,00 minute 35% componentă B; 3,00-13,00 minute 35-45% componentă B; 13,00-15,00 minute 45% componentă B; 15,01-25,00 35% componentă B, iar cele de gradient de curgere au fost: 0,01-2,00 0,2 mL/min debitul fazei mobile și 2,01-25 minute 0,25 mL/min debitul fazei mobile. Experimentele au fost realizate la o temperatura constantă a coloanei de 35⁰C iar timpul necesar efectuării unei analize este de 25 de minute. Apoi coloana a fost re-echilibrată, timp de 10 minute, cu faza mobilă, folosind un debit al fazei mobile de 0,25 mL/min.

Folosind condițiile cromatografice optime a fost realizată separarea izomerilor (figura 3).

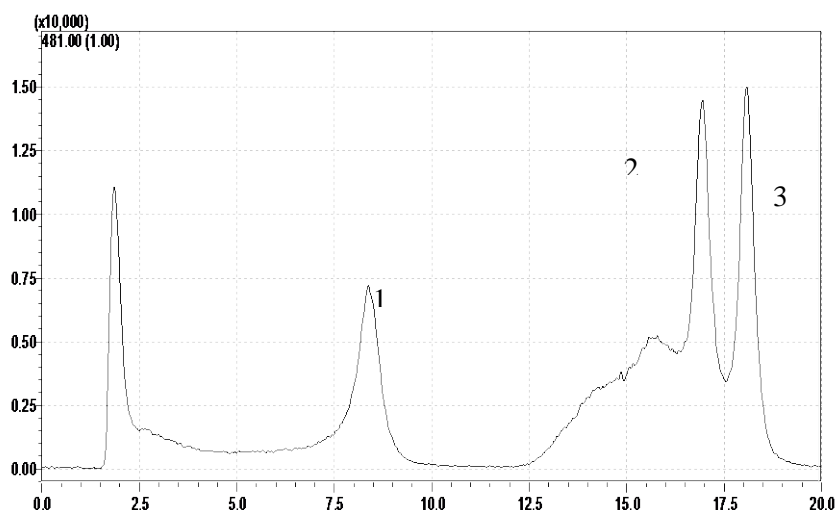


Figura 3. Cromatogramele HPLC-MS obținute pentru amestecul de standarde (1- silicristin, 2-silibinin A, 3-silibinin B; concentrație 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Au fost stabilite caracteristicile de performanță ale metodei HPLC-MS pentru cei 3 izomeri, rezultatele obținute fiind prezentate în tabelul 6.

Tabelul 6. Caracteristicile de performanță ale metodei HPLC-MS dezvoltate pentru determinarea silimarinei

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

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

Metodele dezvoltate au fost aplicate în determinarea conținutului în silimarină pentru extractele formulate, rezultatele obținute fiind prezentate în tabelul 7. Ținând seama de volumul de extracție și de masa de reziduu vegetal luată în lucru, rezultatele din tabelul 7 sunt exprimate ca și conținut de substanță activă în micrograme pe g de subprodus vegetal.

După cum se poate observa, ca și conținut total de izomeri care alcătuiesc silimarina extracțiile în alcool, respectiv acetat de etil sunt cele mai eficiente. Extractul M10, în acetat de etil obținut prin macerare la 70°C pentru 24 de ore are cel mai mare conținut total de silimarină pe g de subprodus de armurariu (cel mai mare conținut atât pentru silicristin cât și pentru silibinin A și silibinin B). În cazul extracției Soxhlet cu acetat de etil, extractul S3, are un conținut substanțial mai mic de silicristin, silibinin A și silibinin B, aproximativ 25%, 7% și 87% față de extractul M10 aceasta putându-se explica prin temperatura mai mică la care are loc extracția și durata mai scurtă a acesteia. În ceea ce privește etanolul și metanolul acestea se comporta destul de asemănător în ceea ce privește extracția silicristin dar se pare că metanolul este un solvent de extracție mai bun pentru silibinin. Amestecul etanol/apa 50% prezintă randamente de extracție a silicristin asemănătoare cu a etanolului dar mai mici în cazul silibinei. Extractiile apoase au cel mai scăzut conținut în substanțe active de tip silimarină, și, în plus, formează emulsii.

Tabelul 7. Conținutul în silicristin, silibinin A și silibinin B, în mg substanță activă/g material solid, al extractelor obținute din reziduul rezultat la prelucrarea armurariului

Proba	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	S1	S2	S3
Analit																		
Silicristin μg/g	813	13324.5	13743.75	12146.25	12096	1180.50	9957.75	10775.25	9101.25	45018.75	2193.75	1495.50	1124.70	900.35	805.24	14133.75	16856.25	11455.5
Silibinin A μg/g	17.25	615	978	687	730.5	uLoD	123	uLoD	2872.50	10087.50	34.87	34.87	14.62	10.52	uLoD	649.5	1223.25	712.5
Silibinin B μg/g	11.25	795.75	3609	390.75	1959.75	17.25	878.25	1059	3585	4158.75	33.37	4.50	53.62	43.25	33.36	4998	2980.5	3622.5

uLoD- prezent, dar sub limita de determinare

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

Activitatea I.3. Screeningul eficacității antioxidante a extractelor obținute, determinând atât capacitatea antiradicalică cât și capacitatea antioxidantă - partea 1

Extractele obținute au fost caracterizate și din punct de vedere al eficacității antiradicalice, utilizând metodele DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) și ABTS (*2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)*).

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 8 și sunt exprimate în *Trolox Equivalent Antioxidat Capacity* (TEAC).

Tabelul 8. Rezultate obținute la determinarea capacității antiradicalice (antioxidante) a extractelor analizate

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

Rezultatele sunt media a trei determinări.

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

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

mare măsură de alți compuși extrași din subprodusul studiat și nu de silimarină, cu toate că și silimarina are o activitate antioxidantă notabilă.

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

CONCLUZII

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

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