

### **REZUMATUL ETAPEI 3**

Cercetarile din proiect au ca obiectiv practic obtinerea unor concentrate de hipericina din sunatoare cu bioactivitate marita.

In acest scop cercetarile se desfasoara pe 2 directii convergente: pe de o parte se studiaza imbunatirea conditiilor de extractie a hipericinei din sunatoare, prin metode clasice, pentru a obtine fitoextracte cu concentratia cat mai ridicata in hipericina, care sa constituie materia prima pentru concentrarea acestora, in continuare prin extractie in faza solida cu polimeri impreatati molecular (MIPSE) si astfel sa se obtina concentrate cat mai bogate in hipericina dar nu si in pseudohipericina.

Cercetarile de obtinere a materialelor polimerice impreatate molecular cu hipericina desfasurate in etapa a 3-a a proiectului s-au desfasurat pe baza rezultatelor obtinute in etapa a 2-a a proiectului.

Impreatarea moleculara a polimerilor s-a realizat prin doua metode:

- Impreatare prin inversie de faza
- Impreatare prin polimerizare in suspensie

Pentru obtinerea perlelor impreatate molecular cu hipericină, s-au utilizat cele patru matrici polimerice, CS x , pe baza de acrilonitril (AN) si acid metacrilic (AM), cu diferite rapoarte masice AN:AM, sintetizate cu succes în prima si a doua etapa a proiectului. Pulberea de CS a fost dizolvata in DMSO, sub agitare continua (200 rpm) in flacoane protejate de lumina. Dupa 24 h a fost adaugat un extract hidroalcoolic de sunatoare. Printr-un mecanism de dripping, solutiile obtinute s-au picurat in baia de inversie ce contine ca non-solvent apa.

Analizele perlelor polimerice impreatate au fost efectuate atat la ICECHIM cat si la UPB .

Atat polimerii impreatati cat si cei neimpreatati au fost analizati prin FTIR pentru a pune in evidenta efectul impreatarii asupra structurii polimerice si eficienta extractiei templatului din perle. Datorita faptului ca natura polimerilor difera doar din punct de vedere al raportului masic de monomeri si al cantitatii de extract adaugata inaintea inversiei de faza, spectrele FTIR ale polimerilor nu sufera modificari majore. Includerea naftodiantronelor in perle si extractia acestora ulterioara a fost dovedita prin aparitia si apoi dispartia benzilor de legatura  $-C=O$  chinona, caracteristice H si PH de la aproximativ  $1660\text{ cm}^{-1}$ .

Morfologia suprafetelor perlelor si a canalelor interconectate cu pereti macroporosi au fost puse in evidenta cu ajutorul unui microscop electronic de baleaj ambiental (ESEM) FEI

Quanta 200 (Philips) echipat cu un detector de electroni secundari in mediu gazos (GSED), adecvat pentru probe umede. Explicatia o constituie faptul ca inversia copolimerului din faza lichida in faza solid-amorfa este insotita de o mica scadere a volumului polimerului (contractare) ceea ce creaza un efect de exudare al solventului din interiorul perlei. Acest efect genereaza structura macroporoasa a peretilor canalelor interconectate si implicit legatura cu suprafata exterioara prin numerosi macropori. De aceea, toate perlele obtinute au prezentat un volum insemnat de pori (68-88% din volumul perlelor).

Prin cea de-a doua metoda de obtinere, procedeul de polimerizare in suspensie, au fost sintetizate particulele polimerice utilizand reteta polimerului P4 din etapa precedenta care a inregistrat atat un factor de imprinted peste valoarea 1, cat si un coeficient de selectivitate maxim dupa conditionare cu o solutie 0.1 M HCl.

Analizele structurale XPS ale particulelor imprinted si neimprinted pun in evidenta eficienta metodei de extractie cu NaOH si conditionare cu HCl. Particulele polimerice imprinted molecular P4,x si cele neimprinted P 6,x au fost analizate prin FTIR pentru a pune in evidenta efectul imprinted si eficienta conditionarii cu NaOH si HCl. Si in acest caz s-a observat natura necovalenta a imprinted, fara aparitia benzilor de combinare suplimentare sau a benzilor de vibratie caracteristice unor legaturi nou aparute. Structura polimerilor difera doar din punct de vedere al raportului masic de monomeri astfel incat spectrele lor sunt asemanatoare. S-au constatat insa unele mici deplasari ale frecventelor legaturilor C=O si C-OH, ceea ce arata ca acestea ar putea fi implicate in legaturi necovalente cu templatul.

Imaginile inregistrate pe un microscop electronic de baleiaj Gemini® Supra 40VP cu detector de electroni secundari (SE2) pe probe acoperite cu aur pentru cresterea conductivitatii probelor au aratat ca polimerii obtinuti in suspensie prezinta suprafete macroporoase chiar si in sectiune. Diametrele de particula pentru polimerii imprinted sunt cuprinse intre 30-80  $\mu\text{m}$ , potrivite pentru viitoarele aplicatii de extractie in faza solida (MISPE). Suprafetele polimerilor imprinted, atat inainte de extractie cat si dupa extractie si conditionare, sunt nanostructurate si macroporoase. Analizele termice ale polimerilor de suspensie au aratat ca toti copolimerii imprinted, testati inainte de extractia "templatului" prezinta o singura treapta de degradare termica corespunzatoare catenei principale, cu un maxim al vitezei in jurul valorii de 400  $^{\circ}\text{C}$ . Acest fapt atesta atat omogenitatea ridicata a copolimerilor obtinuti cat si o crestere a stabilitatii termice pentru gruparile pendante carboxil (MA) angajate in interactiuni fizice cu "templatul". Degradarea termica are loc aproximativ total pentru polimerii netratati cu reziduuri de maxim 2,5%. Polimerii de referinta (neimprinted) P 6,x au prezentat caracteristici termice similare cu

ale celor imprimati cu aparitia unor umeri caracteristici eliberarii de CO<sub>2</sub> din MAA si EDMA inainte de 400 °C, ce apar discret in jurul valorii de 260 °C.

Determinarile de separare selectiva a hipericinei de pseudohipericina au arata ca toti polimerii imprimati prezinta valori peste 1 pentru coeficientul de selectivitate,  $k'$ , in cazul re-adsorbției PH indicand o adsorbție preferentiala pentru PH relativ cu H. Dupa cum era de asteptat, valoarea cea mai ridicata a factorului relativ  $k'$ , a fost atribuita tot polimerului imprimat P 4,1, care adsoarbe competitiv PH de peste 132 ori mai mult in raport cu H si polimerul neimprimat omolog P 6,1.

Analizele structurale ale polimerilor imprimati molecular au avut ca scop corelarea intre morfologie si proprietatile de adsorbție. Din acest motiv polimeri imprimati si cei neimprimati au fost analizati in diferite etape de prelucrare, inainte de extractie, dupa extractie /conditionare si dupa etapa finala de spalare.

In cazul perlelor imprimate analiza FTIR a pus in evidenta efectul introducerii templatului printr-un procedeu de inversie de faza intr-o structura polimera deja formata. Iar in cazul particulelor preparate in suspensie a fost subliniata absenta altor benzi noi formate care sa ateste tipuri de interactiuni covalente intre monomer si templat. Analiza XPS a particulelor polimerice atesta modificarile facute pe suprafata in urma conditionarii. Proprietatile termice ale particulelor sunt superioare fata de cele ale perlelor obtinute in etapa precedenta. In plus, analizele TGA-DTG confirma modificarile structurale aduse de templat si de etapele de conditionare.

Experimentarile la faza de laborator privind extractia hipericinei din sunatoare prin procedee de extractie solid- lichid si lichid -lichid s-au realizat in urmatoarele directii:

- selectarea materialului vegetal – sunatoare, flori -, cu un continut ridicat in hipericina.
- studii cinetice de extractie a hipericinei din materialul vegetal integral, in vederea stabilirii parametrilor optimi de extractie.
- studii de extractie selectiva a hipericinei din extractele primare obtinute din materialul vegetal integral – sunatoare, flori.
- studii de extractie a hipericinei din materialul vegetal declorofilat si degresat.

Evaluarea procesului de extractie a hipericinei din materialul integral (sunatoare, flori) a condus la obtinerea informatiilor cu privire la parametrii procesului si abordarea studiului de cinetica de extractie si stabilirea parametrilor optimi.

In conditii de extractie la parametrii optimi stabiliti prin studiul de cinetica de extractie, s-au realizat **studii de extractie selectiva a hipericinei din extractele primare** obtinute din materialul vegetal integral – sunatoare, flori. S-au folosit doua metode:

- extractia selectiva a hipericinei, din extractul primar, cu solventi cu polaritati diferite (eter de petrol si acetat de etil

- declorofilarea si degresarea extractului primar, cu materiale adsorbante (talc, stearat de magneziu, oxid de magneziu).

S-a constatat de catre partenerul UB PROTMED ca secventa de extractie incluzând două etape de degresare cu amestec de Et<sub>2</sub>O si EtOAc si o cantitate mai mare de apă conduce la un randament optim de recuperare a naftodiantronelor.

Extractia asistata de microunde (MAE) este o alternativa atractiva comparativ cu metodele conventionale cum ar fi extractie Soxhlet, percolare, digestie, extractie sub reflux, sonicare si distilare cu vapori. Temperaturile ridicate atinse de încălzirea cu microunde reduc dramatic atât timpul de extractie cat si volumul de solvent necesar.

S-au suspus analizei o serie de extracte de sunatoare rezultate din testele de adsorbție pentru polimerii impantati molecular preparati prin doua metode. Din testele efectuate rezulta ca metoda de preparare prin suspensie pare a fi superioara metodei de obtinere prin inversie de faza.