

REZUMATUL ETAPEI 4

Diferite proceduri de separare și purificare bazate pe tehnica de imprimare moleculară pot să ofere o alternativă rapidă, simplă și selectivă pentru extracția anumitor componente active din matricile foarte complexe care rezultă la extracția clasică din produse naturale, cum ar fi spre exemplu plantele medicinale. Înșă, pentru a obține rezultate economice viabile care pot, să înlocuiască metodele greoaie și scumpe de separare și purificare a hipericinei (**H**) de pseudohipericina (**PH**) din extractele de sunătoare, trebuie să abordăm noi proceduri de imprimare. În acest sens, proiectul de față, tratează separarea **H** utilizând noi polimeri imprimați molecular (**MIP**). Această nouă abordare în prepararea **MIP** constă în introducerea unui extract concentrat de naftodiantrone pe post de "templă" care să genereze cavități imprimate selective pentru **H**. Această selectivitate pentru **H** a **MIP** este dată de diferența de solubilitate în apă dintre cei doi izomeri din extract (**H**-insolubil și **PH**-33 mg/L).

Pentru a putea valida tehnologia de obținere a perlelor imprimate molecular cu hipericina prin inversia de fază au fost realizate o serie de cercetări care au constatat în utilizarea ca templă pentru imprimare a hipericinei din mai multe surse, între care un extract hidroalcoolic concentrat și purificat ce conține doar hipericina și pseudohipericina (pentru care a fost elaborat un protocol original de a separa hipericina *in situ* direct în mediul de imprimare) și hipericina comercială cu puritate înaltă (98%). În etapa anterioară (etapa III) a fost discutată și detaliată procedura ce utilizează extractul hidroalcoolic de hipericina iar în această etapă, ca pas premergător și necesar al concretizării tehnologiei de imprimare prin inversie de fază, s-au efectuat cercetări pentru verificarea metodei de imprimare propuse utilizând ca templă hipericina comercială (pură). Cele două metode sunt comparate prin intermediul rezultatelor obținute pentru structura, comportament termic și parametrii specifici de adsorbție constându-se avantajele tehnologiei de imprimare cu fito-extract.

Abordarea originală utilizată pentru inversia de fază a condus la definitivarea unei metode inovatoare de imprimare moleculară pentru a produce absorbanti macroporoși cu proprietăți avansate, selective pentru Hipericina, folosind un extract natural de naftodiantrone din *Hypericum Perforatum* ca "templă". În procesul de imprimare "clasic", moleculele sablon trebuie să fie întotdeauna compuși puri după cum reflectă literatura de specialitate descrisă în prima etapă a proiectului. Studiul nostru ne-a arătat înșă că se poate lucra și cu extracte naturale. Folosind un principiu de bază care se referă la repartitia compusilor între doi solvenți cu diferite polarități, compuși izomeri cum sunt **H** și **PH** au fost separați "in situ" (în paralel cu inversia de fază a copolimerilor).

Pentru a valida ipotezele din etapa anterioara, necesare pentru elaborarea tehnologiei de laborator de preparare a perlelor impregnate molecular cu extract, a fost realizata in aceasta etapa si impregnarea cu hipericina pura (comerciala). Rezultatele obtinute cu hipericina pura au fost mai putin performante decat cele obtinute in etapa trecuta cu extractul naftodiantronic. Cu toate ca s-a folosit substanta pura pentru impregnare, se pare ca activitatea acesteia dupa multiple purificari (utilizate pentru obtinerea substantei comerciale pure) este diminuată. Aceasta scadere de activitate implica in acelasi timp si o denaturare conformationala a moleculei, care nu mai prezinta aceleasi site-uri active pe baza carora se poate induce o cavitate complementara specifica, numai pentru hipericina, in matricea polimerica. In concluzie se pare ca aceste perle sunt specifice pentru structuri similare naftodiantronic, aducand ca metoda cu abordarea "epitope" unde se utilizeaza doar o parte din molecula de templat pentru generarea unor cavitati impregnate ce pot separa o clasa de substante cu structura similara. Aceste rezultate confirma faptul ca impregnarea se poate realiza si cu un extract purificat si concentrat, ba chiar este indicat, deoarece conformatia compusilor tinta este direct legata de activitatea lor. Dupa cum s-a demonstrat in aceasta etapa, activitatea hipericinei comerciale este mult mai scazuta decat a celei din extractul proaspat.

A fost definitivata tehnologia de productie a perlelor polimerice impregnate molecular prin inversia de faza. Perspectivele acestei tehnologii inovative sunt importante, atat din punct de vedere economic cat si al productivitatii in comparatie cu metodele de impregnare actuale. Studiul din aceasta etapa oferă o alta cale pentru a separa / concentra / purifica compusi naturali, scumpi. Aceasta tehnica ia in considerare criteriile de solubilitate si polaritate asigurand astfel selectivitatea MIP pentru una dintre componentele initiale.

In urmatoarea etapa va fi stabilita tehnologia de preparare a polimerilor impregnati molecular si prin procedeul de polimerizare in suspensie si investigatia va fi extinsa la experimentele de separare in faza solida cu ajutorul polimerilor impregnati molecular (MISPE).

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

In cazul perlelor impregnate cu hipericina pura analiza FTIR a pus in evidenta efectul introducerii templatului printr-un procedeul de inversie de faza intr-o structura polimerica deja formata. A mai fost subliniata si absenta altor benzi nou-formate care ar putea sa ateste alte tipuri de interactiuni covalente intre monomer si templat. Proprietatile termice ale perlelor sunt similare cu cele ale perlelor obtinute cu extract in etapa precedenta. In plus, analizele

TGA-DTG confirma modificarile structurale aduse de templat, prin deplasarea maximelor de ciclizare spre temperaturi mai mari in cazul perlelor ce contin in structura lor hipericina.

In cadrul Etapei au fost realizate 5 teste de extractie la faza de laborator, cu material vegetal cu continut variabil in hipericina (0,0431 – 0,0947% g/g p.v), in conditii diferite de extractie, la parametrii stabiliti prin studiul de cinetica de extractive realizat in cadrul Etapei III, in vederea elaborarii tehnologiei de obtinere a concentratelor de hipericina din sunatoare.

Studiile de extractie a naftodiantronelor totale (exprimate in hipericina) la faza de laborator, in conditiile de extractive precizate, au indicat faptul ca tipul (parte aeriana, inflorescente) si calitatea produsului vegetal (naftodiantrone totale exprimate in hipericina de min. 0,08% g/g s.u, conform Farmacopeei Europene) sunt definatorii in obtinerea unui concentrat in hipericina de min. 0,3% g/g s.u.

In realizarea testelor de extractie, in vederea stabilirii tehnologiei de extractie a naftodiantronelor totale exprimate in hipericina la faza de laborator, s-au luat in considerare urmatoarele aspecte:

- calitatea materiei prima vegetala (min. 0,8% naftodiantrine totale exprimate in hiperina/p.v) este foarte importanta in obtinerea unui concentrat cu min. 0,3 % hipericina;
- prelucrarea preliminara a materialului vegetal prin declorofilare si degresare (Soxhlet/reflux) asigura conditii pentru extractia optima a hipericinei, prin inlaturarea substantelor balast;
- in conditiile procesului de extractie cu materie prima integrala sau prelucrata prin extractia substantelor balast la reflux, este necesara purificarea extractului primar (filtrarea substantelor balast pe material adsorbant de tip talc);
- uniformitatea materialului vegetal influenteaza procesul de extractie al hipericinei si stabilirea unor intervale de lucru pentru parametrii optimi de extractie.

Testul 3 de extractie a condus la obtinerea unui continut superior in hipericina, de 0,5731% g/g s.u., furnizand datele necesare stabilirii tehnologiei de extractie la faza de laborator.

Prin tehnologia la faza de laborator elaborata s-a obtinut un concentrat de hipericina din sunatoare (*Hypericum perforatum*). S-a obtinut un fitocomplex concentrat in naftodiantrone din care compusul bioactiv de interes este hipericina (min.0,3%).

S-au suspus analizei o serie de extracte rezultate din testele de adsorbție pentru polimerii impregnati molecular preparati prin doua metode. Din testele efectuate rezulta ca ambele metode de preparare prezinta eficienta in separarea naftodiantronelor.

S-a urmarit si cresterea eficientei extractiei primare prin folosirea metodei noi de extractie accelerata cu solvent, in camp de microunde (ASE). S-a lucrat pe un aparat

DIONEX ASE 200 (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA) prevazut cu celule de 33 ml din otel inoxidabil si echipat cu un controler pentru solvent.

Din datele prezentate rezulta ca extractia accelerata cu solventi este mult mai eficienta decat procesele de extractie clasica in ceea ce priveste concentratiile de hipericina si psudohipericina. Metoda a fost optimizata.