

REZUMATUL ETAPEI 5

Etapa V a proiectului **SPOFLORAHYP** a avut ca obiectiv general al raportului prezent de demonstrare “**Realizarea tehnologiei de laborator de obtinere a granulelor si demonstrarea functionalitatii si utilitatii tehnologiei de obtinere a concentratelor de hipericina cu inalta bioactivitate**”.

In vederea indeplinirii cu succes a obiectivului etapei prezente, cercetarile au continuat pe mai multe directii convergente ce presupun:

- ⊗ Obținerea de loturi concentrate de hipericina din sunatoare care sa demonstreze ca tehnologia de separare a hipericinei din sunatoare conduce la obtinerea unor produse reproductibile si realizarea tehnologiei de extractie la faza de laborator;
- ⊗ Obținerea de concentrate cat mai bogate in hipericina si caracterizarea complexa a extractelor concentrate;
- ⊗ Obținerea polimerilor impreatati molecular cu hipericina prin cele doua metode abordate inca din etapele precedente si anume:
 - ❖ Obținerea granulelor polimerice prin procedeul in suspensie si caracterizarea morfo-structurata si termica a acestora
 - ❖ Obținerea perlelor polimerice prin metoda inversiei de faza si caracterizarea morfo-structurata si termica a acestora.
- ⊗ Realizarea tehnologiei de laborator de productie a granulelor polimerice impreatate cu hipericina si demonstrarea functionalitatii si utilitatii tehnologiei de productie a perlelor polimerice impreatate molecular pentru separarea selectiva a hipericinei.

In vederea obtinerii loturilor concentrate de hipericina de catre partenerul PLANTAVOREL, 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, din care s-a ales ca tehnologie de extractie cea corespunzatoare testului 3 de extractie. In cadrul acestuia a avut loc o extractie multipla (n=2) a produsului vegetal – sunatoare, inflorescente (*Hyperici flos*). 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 prime vegetale (min. 0,8% naftodiantrone totale exprimate in hipericina/p.v) este foarte importanta in obtinerea unui concentrat cu min. 0,3 % hipericina;

- prelucrarea preliminară a materialului vegetal prin decolorare și degresare (Soxhlet/reflux) asigură condiții pentru extracția optimă a hipericinei, prin înlăturarea substanțelor balast;

- în condițiile procesului de extracție cu materie primă integrală sau prelucrată prin extracția substanțelor balast la reflux, este necesară purificarea extractului primar (filtrarea substanțelor balast pe material adsorbant de tip talc);

- uniformitatea materialului vegetal influențează procesul de extracție al hipericinei și stabilirea unor intervale de lucru pentru parametrii optimi de extracție. Validarea s-a realizat pe trei serii consecutive de produs finit și urmărește dacă soluția concentrată de hipericină, întrunește condițiile stabilite de Specificația Tehnică. Soluția rezultată, **concentrat de hipericină** din sunătoare (*Hypericum perforatum*) este un complex de naftodiantrone cu conținut ridicat de hipericină, (concentrație de hipericină de min. 0,3 g/g s.u.- valori obținute între 0,5-0,57% g/g s.u.); Această valoare a concentrației de hipericină (**0,5731% g/g s.u.**) a furnizat datele necesare pentru stabilirea tehnologiei de extracție la faza de laborator. Prin tehnologia de extracție la faza de laborator elaborată s-a obținut un concentrat de hipericină din sunătoare (*Hypericum perforatum*). S-a efectuat un studiu de stabilitate a compusului bioactiv - hipericină în condițiile de păstrare a soluției concentrate de hipericină și comparativ a concentratului de hipericină uscat prin pulverizare pe suport de maltodextrină; s-a constatat că, concentratul uscat de hipericină este mai stabil pe durata de 6 luni de studiu (2,5% procent de degradare a hipericinei în concentratul uscat față de 5,0% în soluția concentrată).

În ceea ce privește *metoda de obținere a MIP*, coordonatorul proiectului a efectuat cercetări pentru elaborarea tehnologiei de laborator de producere a *granulelor impregnate molecular* cu un extract natural de naftodiantrone din *Hypericum Perforatum* ("fitotemplat"). Cercetările au presupus teste de re-adsorbție pentru sistemul pe baza de AM/AN (acid metacrilic/acrilonitril) în vederea definitivării tehnologiei. Astfel, au fost obținute valori ale parametrilor Q și F ridicate și totodată reproductibile (în etapa precedentă au fost obținute valori apropiate ale acestora), ceea ce demonstrează îndeplinirea cu succes a obiectivelor proiectului. Sistemul polimeric cu conținut în AM de 75% s-a dovedit a fi cel mai eficient. Totodată, este important de precizat faptul că polimerul impregnat conținând 100% AM adsorbă pseudohipericină (PH) cel mai mult. Valoarea cea mai ridicată a coeficientului relativ k' , a fost atribuită tot polimerului impregnat 100% AM, care adsorbă competitiv PH de peste 8 ori mai mult în raport cu H și polimerul neimpregnat omolog. Proprietățile de adsorbție ale polimerilor (F, k și k') sunt foarte

bune. Ei adsorb cu o selectivitate foarte ridicata pseudo-hipericina. Tinand cont de capacitatea foarte mare de adsorbție a polimerilor pentru pseudo-hipericina, Q, acest derivat poate fi extras din extract, supernatantul fiind astfel purificat si concentrat in hipericina. Luand in considerare rezultatele privind testele de re-adsorbție se poate confirma validarea parametrilor tehnologici. A fost definitivata tehnologia de obtinere a granulelor polimerice impregnate cu hipericina prin polimerizarea in suspensie.

In vederea optimizarii tehnologiei s-a realizat un studiu amanuntit cu privire la influenta diferitilor (co-) monomeri: acid acrilic (AA), hidroxietil metacrilat (HEMA), acid itaconic (AI) si acid metacrilic (AM) la obtinerea polimerilor impregnati cu fitotemplat asupra asupra proprietatilor morfo-structurale si termice si asupra parametrilor specifici impregnarii moleculare. Analizele FT-IR au confirmat atât impregnarea moleculară cu extract cât și extracția templatului. Asa cum era de asteptat, impregnarea este cel mai bine pusa in evidenta la adaugarea a 10% extract in matrice. Analizele TGA/DTG au indicat faptul ca toti polimerii sunt foarte stabili termic deoarece incep sa se degradeze dupa 250 °C. Comparând degradarea polimerilor MIP, a celor extrasi si ne-extrasi, cu cea a polimerilor omologi NIP, au fost observate comportamente termice similare pentru toți polimerii, diferite mai mari observandu-se in cazul granulelor continand HEMA. Aceste comportamente pun in evidenta o stabilitate termica mai ridicata inainte de extractie, datorata legaturilor de hidrogen care se stabilesc intre polimer si templat. Analiza SEM a relevat morfologii interesante datorita suprafetelor mult mai netede si a absentei particulelor sparte si goale in interior comparativ cu morfologia particulelor pe baza de AM/AN. Aceste rezultate pot fi puse pe seama imbunatatirii metodei de extractie. Testele de re-adsorbție au indicat cele mai mari valori ale capacitatii de adsorbție Q pentru sistemul MIP AI-AA, cand valoarea Q pentru PH este cea mai mare din seriile de polimeri impregnati si neimpregnati, aproape dubla fata de cea pentru H. Aceste rezultate confirma reproductibilitatea si acuratetea studiilor de adsorbție a polimerilor pe baza de AM/AN. De asemenea, maximele pentru F (>3) sunt atribuite tot MIP AI-AA, prin urmare, acesta este cel mai eficient polimer comparativ cu ceilalti.

In ceea ce priveste cercetarile privind obtinerea perlelor impregnate molecular prin inversie de faza acestea au condus la definitivarea acestei metode inovatoare de impregnare moleculara pentru a produce absorbanti macroporosi cu proprietati avansate, selective pentru H. In cadrul acestei etape, au fost efectuate studii pentru optimizarea tehnologiei de laborator de productie a perlelor impregnate molecular cu un extract natural de naftodiantrone din Hypericum

Perforatum ("fitotemplat") care au presupus teste pentru demonstrarea reproductibilitatii materialelor obtinute prin inversie de faza. Au fost obtinute cu succes mai multe sisteme de polimeri imprentați molecular pe bază de AN-AM, cu diferite rapoarte masice 90:10, 85: 15, 80: 20 si 75: 25, capabili să rețină hipericina selectiv din extracte primare de *Hypericum Perforatum L.*

A fost studiat efectul fitotemplatului asupra formei finale a perlelor prin *studii reologice* ale solutiilor copolimerice neimprentate si imprentate cu extract CS x-y, la temperatura camerei (25 °C). comportamentul reologic al solutiilor s-a demonstrat a fi reproductibil prin schimbarea brusca a acestuia odata cu aditia fitotemplatului, de la pseudo-plastic la cvasi-Newtonian. Solutia CS 4-y a prezentat cea mai adecvata reologie pentru o solutie de referință deoarece caracterul curgerii este cel mai aproape de Newtonian. Analizele FTIR au confirmat atât imprentarea moleculară cu extract cât și extracția templatului. Asa cum era de asteptat, imprentarea este cel mai bine pusa in evidenta la adaugarea a 10% extract in matrice. Analizele TGA/DTG au indicat faptul ca toti polimerii sunt relativ stabili termic; prin creșterea conținutului de acid metacrilic în copolimer se produce o creștere a pierderii de masă, respectiv o reducere a cantității de reziduu rămasă la 800 °C. Toti polimerii, exceptand polimerul MIP 4-10, prezinta pierderi de masa mai mici dupa extractia fitotemplatului comparativ cu probele inainte de extractie iar cei neimprentati pierderi de masa mai mari decat omologii imprentati. Au fost realizate măsurători hidrodinamice pentru determinarea volumului intern al porilor pentru perlele neimprentate si imprentate cu 5 sau 10% extract. Majoritatea perlelor imprentate au prezentat un volum al porilor cuprins intre 72-90% față de volumul total. Toate perlele imprentate obtinute din copolimerii cu o cantitate scazută de acid metacrilic (10 si 15 %, MIP 1 si MIP 2) au prezentat un volum al porilor V mai ridicat decât omologii lor neimprentați. Rezultatele privind *parametrii specifici adsorbției* au relevat capacitati de adsorbție precum și factori de imprentare mai buni în cazul sistemelor cu un conținut de 25% AM (F MIP 4-5 = 2,89). S-a demonstrat faptul că valorile capacităților de adsorbție cresc odată cu continutul de AM din matricea polimerică si scad cu continutul de fito-extract adăugat. Acest efect a fost observat si la imprentarea cu extract efectuata in etapa precedenta, ceea ce demonstreaza reproductibilitatea rezultatelor. Aceste rezultate sunt sustinute de valorile coeficientilor de selectivitate, k, indicand valori maxime pentru MIP 2-5 (k ~4) si MIP 4-10 (k ~3). Mai mult decât atât, concentrația templatului a jucat un rol important asupra selectivității perlelor, rețeta optimă în acest sens fiind aleasă din seria perlelor pentru care s-a utilizat mai puțin fito-extract, adica MIP x-5.