

## REZUMATUL ETAPEI 2

Tara noastra dispune de uriase rezerve de biomasa, printre care la loc de cinste se situeaza flora spontana, una din cele mai variate si mai putin modificate de poluare din Europa. In cadrul acestei flore spontane se remarca bogatia de plante medicinale, care constituie un izvor nesecat de principii active, utile fie pentru tratarea sau prevenirea unor boli, pentru materiale de igiena personala, cosmetica, coloranti, etc.

Problema cea mai mare in valorificare compusilor extrem de valorosi din plantele medicinale din flora spontana o reprezinta faptul ca acestia, de obicei, se gasesc in cantitati foarte mici si sunt insotiti de o multime de alti compusi, facand foarte dificila extractia si purificarea acestora.

Un exemplu de astfel de substanta extrem de valoroasa o reprezinta hipericina, care se gaseste in sunatoare, numele substantei derivand chiar din numele latinesc al plantei: *Hypericum perforatum*. Hipericina este considerata o substanta cu mare viitor in terapia fotochimica a cancerului de piele, dar studii recente au demonstrat si alte efecte farmaceutice, precum caracterul antiviral si actiunea antidepresiva. Extractia acestei substante intampina insa aceleasi dificultati ca si in cazul altor principii active, fiind necesara gasirea unor solutii tehnologice novatoare.

Imprentarea moleculara a polimerilor este un domeniu modern si in dezvoltare exploziva, care prezinta numeroase avantaje fata de tehnicile de separare si purificare clasice.

Scopul prezentului proiect este acela de a elabora o tehnologie de obtinere a unor materiale polimerice imprentate molecular cu hipericina adecvate pentru separarea acesteia din extractele primare si de utilizare a acestor materiale in separarea selectiva a extractelor de sunatoare, in scopul obtinerii de concentrate de hipericina inalt bioactive. Tehnologia elaborata precum si polimerii obtinuti trebuie deasemenea sa corespunda cerintelor aplicarii industriale.

Cercetarile de obtinere a materialelor polimerice imprentate molecular cu hipericina desfasurate in etapa a 2-a a proiectului au debutat cu o buna caracterizare prin HPLC a compozitiilor extractelor primare de sunatoare primite de la SC Plantavorel.

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

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

**La imprentarea prin inversie de faza**, pentru toate solutiile de copolimer imprentate cu hipericina, comportarea reologica este de tip pseudoplastica la gradienti de forfecare mici cu tendinta de trecere in newtonian la cresterea valorii gradientului de forfecare. Comportarea pseudoplastica se accentueaza odata cu cresterea continutului de acid metacrilic din copolimer.

Soluțiile impregnate cu hipericina au fost convertite în perle polimerice prin coagulare în 3 compoziții de baie de inversie. Perlele impregnate cu hipericina prezintă un aspect similar în toate cele 3 bari de coagulare încercate. Totuși, se poate observa că, odată cu creșterea concentrației de hipericina în soluția de polimer, culoarea perlelor devine mai închisă.

Atât polimerii impregnati cu hipericina (MIP), cât și cei neimpregnati (NIP) au fost supuși analizelor termice cu scopul de a identifica diferențe care să semnaleze prezența moleculei-tintă în matricea polimerică, precum și pentru determinarea stabilității termice a materialelor studiate.

Analizele perlelor polimerice impregnate au fost efectuate atât la ICECHIM cât și la UPB, pe probe diferite.

Analizele termice efectuate la ICECHIM evidențiază prezența hipericinei în sistemele impregnate molecular prin 4 semnale caracteristice:

1. pe curba derivatei de masă o cantitate mai mare de hipericina este evidențiată de temperatura mai mică a primei etape de descompunere termică, precum și de mărimea ariei de sub peak.

2. tot pe curba derivatei pierderii de masă se identifică un maxim caracteristic la  $310 \pm 30^\circ\text{C}$ , corelat cu descompunerea totală a structurii naftodiantronice a hipericinei.

3. pe curba pierderii de masă se observă diferențe semnificative de pierdere de masă pe intervalul de temperaturi  $80\text{-}480^\circ\text{C}$ , corelate cu conținutul de hipericina, curbele corespunzătoare sistemelor impregnate cu diverse cantități de hipericina prezentând o pierdere de masă cu atât mai mare cu cât procentul de hipericina în timpul impregnării este mai mare.

4. pe curba fluxului termic se observă că hipericina pare să amplifice efectul exoterm al reacției de ciclizare a segmentelor de poliacrilonitril din matrice, dar să micșoreze efectul slab exoterm al reacțiilor de dehidrogenare și aromatizare.

Analizele efectuate la UPB au arătat următoarele:

1. Din termogramele DSC se observă faptul că odată cu creșterea conținutului de hipericina din probe cantitatea de apă eliminată este mult mai mare. În plus, prin creșterea cantității de acid metacrilic, umărul de la  $250^\circ\text{C}$ , specific fenomenului de ciclizare, nu mai apare iar picurile exotermice se deplasează spre valori de temperatură mai ridicate.

2. Analiza TGA arată că prin creșterea conținutului de acid metacrilic din probele neimpregnate se produce o creștere a pierderii de masă, respectiv o reducere a cantității de reziduu rămasă la  $600^\circ\text{C}$ . De asemenea, odată cu creșterea conținutului de hipericina din probele impregnate crește și pierderea de masă.

3. Analiza DTG a evidențiat că toate probele neimpregnate și impregnate au mai multe etape de pierdere de masă. La toate probele descompunerea principală are loc în două trepte: o

treapta de descompunere cu maximele de temperatura cuprinse între 315-390 °C și alta treapta cu maxime de temperatura cuprinse între 390-420 °C.

4. Atât în spectrele polimerilor imprimenți cât și în a celor neimprentați, se pot distinge cu ușurință benzile vibrațiilor caracteristice matricei polimerice. Pe lângă benzile caracteristice polimerului și apei intramoleculare se mai observă și apariția unei benzi suplimentare în intervalul 3600-3630  $\text{cm}^{-1}$  care se datorează vibrațiilor de întindere  $\nu_{\text{OH}}$  (Ar-OH) din hipericina.

Cercetările efectuate pe cea de a **două direcție de cercetare, polimerizare în suspensie**, au arătat următoarele:

1. Metoda de imprimență moleculară prin polimerizare în suspensie s-a bazat pe sistemul de polimerizare radicalică utilizându-se două tipuri de inițiatori.

2. Extracția templatului de hipericină din particulele de polimer s-a realizat cu doi solvenți diferiți.

3. Se observă că aspectul particulelor imprimențate, prin polimerizarea în suspensie se păstrează după extracție indiferent de mediu.

4. În spectrele FTIR ale polimerilor imprimenți ne-extrasi pe lângă benzile caracteristice polimerului și apei intramoleculare se mai observă și apariția unei benzi suplimentare din hipericină. După aplicarea celor două metode de extracție a hipericinei, această bandă dispare indicând o bună înlăturare a acesteia din polimer, generându-se astfel cavități imprimențate active.

5. Toate imaginile SEM evidențiază particule polimerice de tip sferic, însoțite de particule cu forme neregulate. Folosirea primului solvent de extracție permite o menținere a structurii sferice a particulelor în mai mare măsură decât în cazul folosirii etanolului, iar structura poroasă este evidentă la ambele tipuri de particule extrase.

6. Calculul capacității de reținere și factorul de imprimență, în urma analizelor HPLC s-a constatat că dintre cei 4 polimeri imprimenți cel mai bun esanțion prezintă valorile maxime ale capacității de adsorbție și ale factorului de imprimență atât pentru hipericină cât și pentru C1. De observat că polimerii extrasi au prezentat adsorbții foarte bune și valori ale factorilor de imprimență peste valoarea 1 pentru hipericină. Aceste rezultate indică atât formarea unui număr însemnat de cavități imprimențate cât și o activare mai eficientă a lor prin utilizarea acestei metode de extracție pentru înlăturarea templatului.

7. Efectul imprimențării asupra selectivității a fost cuantificat cu ajutorul unor parametrii specifici, calculați atât pentru polimerii imprimenți cât și pentru omologii lor neimprentați. Toți polimerii imprimenți prezintă valori peste 1 pentru coeficientul de selectivitate,  $k'$ , indicând o adsorbție preferențială pentru hipericină relativ cu competitorul C1.

Studiile efectuate pentru separarea selectiva a hipericinei din fitoextracte de sunatoare au demonstrat urmatoarele:

Extractele obtinute cu alcool etilic, la temperatura camerei si la reflux, se caracterizeaza printr-un continut bogat in naftodiantrone totale exprimate in hipericina, reprezentand astfel, o sursa importanta de principii cu potential bioactiv. Solventul hidroalcoolic 70% v/v utilizat la obtinerea extractelor mentionate anterior, a permis si extractia:

- pigmentilor clorofilieni si substantelor grase, aceste clase de compusi fiind considerate substante balast ce impiedica extractia optima a hipericinei din *Hypericum perforatum* (sunatoare, parte aeriana);
- substantelor polifenolice (acizi polifenolcarboxilici, compusi flavonoidici, taninuri), din categoria principiilor bioactive, dar fara interes in cazul studiilor intreprinse, si care pot impiedica extractia optima a compusilor naftodiantronic exprimat in hipericina.
- cromatogramele de identificare a hipericinei – dupa dezvoltare (la 254 si 366 nm) si dupa stropirea cu reactivul de identificare (la 366 nm) – au identificat prezenta spotului caracteristic hipericinei in probele analizate: EtOH70%-Hx si T70%-Hx. De asemenea, s-a observat ca procesul de declorofilare nu a fost complet.

Ca urmare a faptului ca hipericina este un compus fotosensibil si termolabil, etapele succesive de purificare a extractelor brute putand conduce la degradarea hipericinei, s-au luat in studiu si alte metode selective de obtinere a unor extracte cu un continut ridicat in hipericina, prin supunerea materialului vegetal la diferite procese de declorofilare si degresare, prelucrare avansata, ca etape preliminare in extractia compusilor naftodiantronic.

Din cele doua procedee de extractie a substantelor balast (la reflux si la Soxhlet), la Soxhlet s-a asigurat extractia completa a clorofilelor si substantelor grase. Selectarea conditiilor optime de prelucrare prealabila a materiei prime vegetale constituie punctul important de plecare in continuarea studiilor de extractie selectiva a hipericinei, cu stabilirea parametrilor optimi si a tehnologiei de extractie la faza de laborator, in extrapolarea acestora la faza micropilot si pilot, in vederea obtinerii unor extracte imbogatite in hipericina.

Extractul hidroalcoolic de sunatoare a fost supus unor protocoale de separare si concentrare a hipericinei prin diverse metode clasice combinate cu HPLC preparativ. Metoda optima a fost o combinatie a extractiei l-l combinata cu HPLC preparativ care a prezentat randamente de 95% si o concentratie finala a extractului de 130 mg/L.

Cercetarile efectuate au demonstrat posibilitatea obtinerii de materiale polimerice impregnate molecular cu hipericina si de utilizare a acestora la separarea selectiva din extractele de sunatoare. Cercetarile vor fi continuate in vederea elaborarii tehnologiilor de obtinere a polimerilor impregnati molecular si a tehnologiilor de separare selectiva.