

STABILIZAREA UNOR PRINCIPII BIOACTIVE DIN PLANTE DIN FAMILIA *COMPOSITAE* PRIN NANOÎNCAPSULARE ÎN CICLODEXTRINE

Teză destinată obținerii
titlului științific de doctor inginer
la
Universitatea „Politehnica” din Timișoara
în domeniul INGINERIE CHIMICĂ
de către

Ing. Corina-Iuliana Costescu

Conducător științific:

Referenți științifici:

prof.univ.dr.ing. Alfa Xenia LUPEA

prof.univ.dr.ing. Dan CIUBOTARIU

prof.univ.dr.ing. Lucian RUSNAC

conf.univ.dr.ing. Marta STROESCU

Ziua susținerii tezei: 28.10.2011

Seriile Teze de doctorat ale UPT sunt:

- | | |
|---|--|
| 1. Automatică | 8. Inginerie Industrială |
| 2. Chimie | 9. Inginerie Mecanică |
| 3. Energetică | 10. Știința Calculatoarelor |
| 4. Ingineria Chimică | 11. Știința și Ingineria Materialelor |
| 5. Inginerie Civilă | 12. Ingineria sistemelor |
| 6. Inginerie Electrică | 13. Inginerie energetică |
| 7. Inginerie Electronică și Telecomunicații | 14. Calculatoare și tehnologia informației |

Universitatea „Politehnica” din Timișoara a inițiat seriile de mai sus în scopul diseminării expertizei, cunoștințelor și rezultatelor cercetărilor întreprinse în cadrul școlii doctorale a universității. Seriile conțin, potrivit H.B.Ex.S Nr. 14 / 14.07.2006, tezele de doctorat susținute în universitate începând cu 1 octombrie 2006.

Copyright © Editura Politehnica – Timișoara, 2011

Această publicație este supusă prevederilor legii dreptului de autor. Multiplicarea acestei publicații, în mod integral sau în parte, traducerea, tipărirea, reutilizarea ilustrațiilor, expunerea, radiodifuzarea, reproducerea pe microfilme sau în orice altă formă este permisă numai cu respectarea prevederilor Legii române a dreptului de autor în vigoare și permisiunea pentru utilizare obținută în scris din partea Universității „Politehnica” din Timișoara. Toate încălcările acestor drepturi vor fi penalizate potrivit Legii române a drepturilor de autor.

România, 300159 Timișoara, Bd. Republicii 9,
tel. 0256 403823, fax. 0256 403221
e-mail: editura@edipol.upt.ro

Cuvânt înainte

Cercetările efectuate pe parcursul elaborării prezentei teze de doctorat, abordând aspecte fundamentale și aplicative în domeniul chimiei supramoleculare, au avut ca scop principal evaluarea capacității de micro/nanoîncapsulare și protejare a unor principii bioactive din plante aparținând familiei *Compositae* de către ciclodextrine și liposomi.

Vreau să adresez deosebite mulțumiri și o profundă recunoștință doamnei Prof.dr.ing. Alfa Xenia Lupea, pentru sprijinul, răbdarea și ajutorul înalt calificat pe care mi le-a oferit pe toată perioada de elaborare a tezei de doctorat.

Pe parcursul desfășurării cercetărilor un ajutor deosebit mi-a fost acordat de doamna Conf.dr.ing. Nicoleta Gabriela Hădărugă de la Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului Timișoara și de domnul Ș.I.dr.ing. Daniel Ioan Hădărugă de la Universitatea „Politehnica” din Timișoara, către care se îndreaptă mulțumirile mele și deosebita recunoștință.

Îmi exprim întreaga considerație față de membrii comisiei de doctorat: domnul președinte al comisiei Prof.dr.ing. Petru Negrea de la Universitatea „Politehnica” din Timișoara, domnul Prof.dr.ing. Lucian Rusnac de la Universitatea „Politehnica” din Timișoara, domnul Prof.dr.ing. Dan Ciubotariu de la Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” din Timișoara, doamna Conf.dr.ing. Marta Stroescu de la Universitatea „Politehnica” din București, care au răspuns solicitării de a face parte din comisia de analiză a tezei, pentru timpul acordat.

Doresc să exprim mulțumirile mele domnului Prof.dr.ing. Dorel Pârvu pentru sprijinul, răbdarea și încurajările oferite pe întreg parcursul desfășurării cercetărilor care fac obiectul prezentei teze de doctorat. Totodată exprim sentimentul profundei gratitudini cadrelor didactice de la Facultatea de Tehnologie Produselor Agroalimentare a Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului Timișoara, care au contribuit la formarea profesională a subsemnatei.

Nu în ultimul rând, mulțumesc părinților mei și întregii familii, care mi-au fost alături și m-au susținut în toți acești ani.

Timișoara, octombrie 2011

Ing. Corina-Iuliana Costescu

În amintirea bunicii mele,

Costescu, Corina-Iuliana

Stabilizarea unor principii bioactive din plante din familia *Compositae* prin nanoîncapsulare în ciclodextrine

Teze de doctorat ale UPT, Seria 4, Nr. 51, Editura Politehnica, 2011, 220 pagini, 126 figuri, 30 tabele.

ISSN: 1842-8223

ISBN: 978-606-554-364-5

Cuvinte cheie:

ulei volatil, compuși bioactivi, ciclodextrine, nanoîncapsulare, eliberare controlată, GC-MS, TG, DSC, SEM, TEM, titrare Karl Fischer, modelare moleculară, analiză multivariată, PCA.

Rezumat:

În teza de doctorat intitulată „**Stabilizarea unor principii bioactive din plante din familia *Compositae* prin nanoîncapsulare în ciclodextrine**”, s-a încercat abordarea unui studiu care tratează posibilitatea de încapsulare și eliberare controlată a unor sisteme bioactive în matrici de încapsulare (ciclodextrine și liposomi), care permit obținerea unor forme pulverulente ușor manevrabile, creșterea hidrofiliei produselor, eliberarea lentă (retard) în mediul biologic și prelungirea timpului de acțiune a compușilor bioactivi. Astfel, s-au realizat studii privind încapsularea moleculară, în special în beta-ciclodextrină, a uleiurilor volatile de mușețel, coada șoricelului, anghinare, podbal și armurariu. De asemenea, s-a urmărit obținerea biocompușilor cu activitate hepatoprotectoare potențială prin metode optimizate în vederea nanoîncapsulării moleculare a acestora și a biocompușilor puri (silibina și silimarina), precum și eliberarea controlată a biocompușilor din nanoparticule. În majoritatea cazurilor se apelează la analize clasice cromatografice, spectroscopice și termogravimetrice, dar și microscopie electronică pentru caracterizarea structurii complexilor și a capsulelor.

CUPRINS

1. INTRODUCERE	9
2. STADIUL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU	13
2.1. Introducere – Familia <i>Compositae</i>	13
2.1.1. Mușețelul (<i>Matricaria chamomilla</i> L.)	14
2.1.2. Coada șoricelului (<i>Achillea millefolim</i> L.)	16
2.1.3. Anghinarea (<i>Cynara scolymus</i> L.)	17
2.1.4. Podbal (<i>Tussilago farfara</i> L.)	18
2.1.5. Armurariu (<i>Silybum marianum</i> L.)	19
2.2. Micro- și nanoîncapsulare	20
2.2.1. Introducere	20
2.2.1.1. Ciclodextrine	21
2.2.1.2. Liposomi	23
2.2.2. Obținerea micro- și nanocapsulelor	28
2.2.2.1. Procese de obținere a microcapsulelor	28
2.2.2.2. Procese de obținere a nanocapsulelor (complecși de incluziune ai ciclodextrinelor)	36
2.2.2.2.1. Mecanismul formării complecșilor de incluziune	36
2.2.2.2.2. Condițiile necesare pentru formarea complexului	38
2.2.2.2.3. Metode de preparare a complecșilor ciclodextrinelor	40
2.2.3. Analiza micro- și nanocapsulelor	43
2.2.3.1. Metode spectrofotometrice pentru analiza a compusului „oaspete”	43
2.2.3.2. Metode cromatografice de analiză a compusului „oaspete”	43
2.2.3.3. Metode termoanalitice	44
2.2.3.4. Alte metode termice	45
2.2.3.5. Difracția de raze X	46
3. CONTRIBUȚII PROPRII	47
3.1. Separarea și încapsularea moleculară a unor biosisteme (uleiuri volatile) din diverse părți anatomice ale unor plante din familia <i>Compositae</i>	47
3.1.1. Introducere	47
3.1.2. Materiale și metode	47
3.1.2.1. Materiale utilizate	47
3.1.2.2. Separarea biosistemelor (uleiuri volatile)	47
3.1.2.3. Degradarea uleiurilor volatile	49
3.1.2.4. Metoda de complexare	50
3.1.2.5. Reextracția biocompușilor din complex	50
3.1.2.6. Degradarea nanocapsulelor/nanoparticulelor	50
3.1.2.7. Analiza GC-MS	51
3.1.2.8. Analiza TG	51
3.1.2.9. Analiza DSC	51
3.1.2.10. Analiza SEM	51
3.1.2.11. Modelarea moleculară	51
3.1.2.12. Analiza conformațională	52
3.1.2.13. Analiza componentelor principale (PCA) pentru nanocapsulele uleiuri volatile/ β -ciclodextrină	53

6 Cuprins

3.1.3. Rezultate și discuții	56
3.1.4. Concluzii	87
3.2. Obținerea biocompușilor cu activitate hepatoprotectoare potențială prin metode optimizate în vederea nanoîncapsulării	88
3.2.1. Introducere	88
3.2.2. Materiale și metode	89
3.2.2.1. Materiale utilizate	89
3.2.2.2. Obținerea extractelor flavonoidice din <i>M. chamomilla</i> , <i>A. millefolium</i> și <i>S. marianum</i>	90
3.2.2.3. Analiza HPLC	94
3.2.2.4. Analiza UV-VIS	94
3.2.3. Rezultate și discuții	95
3.2.3.1. Optimizarea obținerii biocompușilor din <i>M. chamomilla</i> prin extracție solid-lichid	95
3.2.3.2. Obținerea și analiza biocompușilor din <i>M. chamomilla</i> , <i>A. millefolium</i> și <i>S. marianum</i> prin extracție solid-lichid	97
3.2.3.2.1. Obținerea curbelor de etalonare	98
3.2.3.2.2. Analiza extractelor de <i>Matricaria chamomilla</i>	104
3.2.3.2.3. Analiza extractelor de <i>Achillea millefolium</i>	107
3.2.3.2.4. Analiza extractelor de <i>Silybum marianum</i>	110
3.2.3.3. Analiza spectrofotometrică a biocompușilor din <i>M. chamomilla</i> și <i>S. marianum</i> obținuți prin extracție solid-lichid	112
3.2.4. Concluzii	116
3.3. Eliberarea controlată a biocompușilor din nanoparticule	117
3.3.1. Introducere	117
3.3.2. Materiale și metode	117
3.3.2.1. Materiale utilizate	117
3.3.2.2. Obținerea nanoparticulelor prin cristalizare din sistem etanol-apă	119
3.3.2.3. Obținerea micro/nanocapsulelor de tip liposomi multilamelari cu conținut de nanoparticule biocompuși/ciclodextrine	119
3.3.2.4. Obținerea micro/nanocapsulelor de tip liposomi unilamelari cu conținut de nanoparticule biocompuși/ciclodextrine	120
3.3.2.5. Analiza prin microscopie cu scanare electronică (SEM)	122
3.3.2.6. Analiza prin microscopie cu transmisie electronică (TEM)	122
3.3.2.7. Analiza prin calorimetrie de scanare diferențială (DSC)	123
3.3.2.8. Analiza apei prin titrare Karl Fischer (KFT)	123
3.3.2.9. Analiza spectrofotometrică a soluțiilor de biocompuși și a complexilor acestora cu ciclodextrine și evaluarea eliberării controlate a compușilor bioactivi	124
3.3.3. Rezultate și discuții	124
3.3.3.1. Obținerea și analiza nanoparticulelor extracte/ciclodextrine	124
3.3.3.2. Obținerea și analiza nanocapsulelor de tip liposomi cu conținut de nanoparticule biocompuși / ciclodextrine	136
3.3.3.3. Evaluarea eliberării controlate a biocompușilor din nanoparticulele cu ciclodextrină	139
3.3.4. Concluzii	154

4. CONCLUZII FINALE	155
<i>Bibliografie</i>	161
<i>Anexe</i>	175
<i>Anexa A.3.1. Cromatogramele din analiza GC-MS pentru uleiurile volatile din familia Compositae</i>	176
<i>Anexa A.3.2. Rezultatele analizelor HPLC pentru extractele solid-lichid în diferiți solvenți</i>	193
<i>Anexa A.3.3. Analiza UV-VIS a biocompușilor, extractelor și evaluarea eliberării controlate din complecși</i>	205

1. INTRODUCERE

Întotdeauna domeniul compușilor naturali a suscitat un interes deosebit, dar studiul structurii compușilor naturali și a impactului acestora asupra lumii vii din punct de vedere științific își are originile la începutul secolului trecut.

Problema nanoîncapsulării biomoleculilor este actuală în orice moment al cercetării și cunoașterii științifice odată cu descoperirea de noi metode și mijloace de investigare a proceselor lumii vii, a constituenților acesteia, a separării și utilizării eficiente a potențialului lor biologic.

În țară există puține studii științifice publicate pe plan național și/sau internațional, legate de modalitățile de protejare a componenților naturali prin încapsulare moleculară [1-12], însă publicațiile în acest domeniu pe plan mondial sunt în număr mare.

Problema stabilității constituenților naturali cu valoare alimentară, farmaceutică și cosmetică și încercarea de protejare a acestora la diferiți factori de mediu și de eliberare controlată în vederea măririi valorii lor de utilizare, ca și înțelegerea mecanismului de degradare și de interacțiune cu diferite medii chimice (alimentare, farmaceutice, cosmetice etc.), respectiv a mecanismului de interacțiune ciclodextrină-biomoleculă, prin coroborarea datelor experimentale cu rezultatele teoretice de modelare moleculară a acestor interacțiuni, acaparează tot mai mulți cercetători din diverse domenii adiacente chimiei compușilor naturali.

Stabilizarea proprietăților constituenților naturali prin nanoîncapsulare în matrici de tipul ciclodextrinelor se poate aplica în multe domenii ca [13, 14]:

- aditivi (arome, vitamine etc.) și constituenți alimentari (stabilizarea uleiurilor comestibile, mascarea unor gusturi și arome neplăcute pentru constituenți cu valoare nutritivă ridicată);
- parfumerie și cosmetică (stabilizarea și eliberarea controlată a unor odoranți foarte volatili, stabilizarea unor ingrediente cosmetice etc.);
- stabilizarea și eliberarea controlată a unor produse farmaceutice (obținerea medicamentelor retard);
- agricultură (condiționarea pesticidelor, generarea controlată a unor agenți de coacere);
- zootehnie și piscicultură;
- industria tutunului.

Ciclodextrinele, matrici ideale pentru nanoîncapsulare, obținute pe cale exclusiv biochimică, reprezintă o serie de oligozaharide ciclice formate din 6, 7, 8 (alpha-, beta- și gamma-ciclodextrină) sau chiar mai multe unități glucopiranozice, solubile în apă și cu capacitate mare de complexare a multor compuși hidrofobi, conducând la complecși solizi cu stabilitate ridicată și cu hidrosolubilitate mărită [13-15].

10 Introducere

Un interes deosebit este dat posibilităților de modificare chimică a acestor oligozaharide, cu aplicații în sinteze organice fine, sinteze enantioselective și cataliză cu transfer de fază; de asemenea, de amintit este posibilitatea utilizării unor rășini polimerice substituie cu ciclodextrine în separări cromatografice enantioselective [16-22], separări electroforetice [23, 24] sau obținerea unor senzori specifici [25].

De departe, cele mai multe studii privind obținerea nanocapsulelor bioactive sunt în domeniul farmaceutic. Cele mai recente studii privesc eliberarea controlată a diferitelor medicamente cum ar fi: propranolol, diclofenac, indometacin, buformin, clofazimin, ibuprofen, budezonid, pindolol, diverse vitamine și alți compuși naturali cu activitate biologică, din matrici ciclodextrinice naturale [12, 26-31] sau ciclodextrine modificate [32-36].

S-a încercat abordarea unor cercetări și în domeniul extractelor vegetale, dar fără un scop bine precizat. Astfel, s-au încercat studii privind încapsularea moleculară, în special în beta-ciclodextrină, a uleiurilor volatile de mușețel, coada șoricelului, anghinare, podbal și armurariu [13, 37, 38]. De asemenea, s-au efectuat studii privind încapsularea moleculară a unor compuși organici puri cu activitate biologică mai mult sau mai puțin evidentă, cum ar fi silibina și silimarina [39-42]. În majoritatea cazurilor se apelează la analize clasice cromatografice, spectroscopice și termogravimetrice, dar și microscopie electronică pentru caracterizarea structurii complexilor și a capsulelor.

Există relativ puține abordări teoretice ale interacțiunii dintre ciclodextrine și moleculele organice, majoritatea studiind aspectele sterice sau electronice privind nanoîncapsularea prin diverse metode de modelare moleculară; s-au realizat studii de dinamică moleculară sau de docare a unor compuși organici aleși arbitrar [43, 44].

Încapsularea a fost introdusă inițial în industriile de medicamente și alimentară pentru a obține materiale într-o formă uscată și pentru a realiza o protecție a acestor materiale [19]. Aplicarea tehnicilor de încapsulare pentru alte principii medicamentoase sau alimentare prezintă la ora actuală o atenție mărită, deoarece aceste tehnici reprezintă un mijloc de protecție a compușilor bioactivi față de mediul înconjurător și față de ceilalți compuși din mediu [22]. În plus, s-au descoperit și dezvoltat metode de încapsulare pentru protejarea unor compuși specifici care permit și o eliberare controlată a acestora.

Obiectivele prezentei teze de doctorat sunt: realizarea unui studiu care abordează posibilitatea de încapsulare și eliberare controlată a unor sisteme bioactive în matrici de încapsulare (ciclodextrine și liposomi), care permit, în plus, obținerea unor forme pulverulente ușor manevrabile, creșterea hidrofilității produselor, eliberarea lentă (retard) în mediul biologic și prelungirea timpului de acțiune a compușilor bioactivi din plante aparținând familiei *Compositae*.

Pentru aceasta se are în vedere:

- obținerea, caracterizarea și analiza multivariată a datelor pentru biosistemele supramoleculare uleiuri volatile/ciclodextrine. Se are în vedere utilizarea de uleiuri volatile din plante din clasa botanică *Compositae*;

- din plantele provenite din familia *Compositae* se vor studia uleiurile volatile: *Matricaria chamomilla* L. (mușețel), *Achillea millefolium* L. (coada șoricelului), *Artemisia absinthium* L. (pelin), *Aremisia dracunculus* L. (tarhon), *Tussilago farfara* L. (podbal), *Arnica montana* L. (arnică), *Calendula officinalis* L. (gălbenele), *Arctium lappa* L. (brusture), *Cynara cardunculus* L. (anghinare), *Silybum marianum* L. (armurariu), *Taraxacum officinale* L. (păpădie);
- uleiurile volatile vor fi încapsulate în β -ciclodextrină, iar nanocapsulele vor fi analizate prin termogravimetrie în scopul evaluării formării complexului și a concentrației de ulei volatil încapsulat. Pentru evaluarea competitivității la încapsulare a componentelor uleiurilor volatile se va realiza analiza GC-MS a uleiurilor volatile brute și a celor recuperate din complex prin extracție repetată în hexan;
- datele analizelor GC-MS (concentrațiile procentuale ale componentelor) vor fi prelucrate într-o abordare originală, prin analiză statistică multivariată modernă (PCA-analiza componentelor principale).
- se va evalua modul de grupare a speciilor *Matricaria*, *Achillea* și *Tussilago*, respectiv se va evidenția capacitatea de protecție a ciclodextrinelor împotriva acțiunii oxigenului atmosferic, în special asupra sesquiterpenelor labile.
- pentru evaluarea capacității de încapsulare a α - și β -ciclodextrinei în cazul principalilor biocompuși din specii ale familiei *Compositae* se va apela la modelarea moleculară a ciclodextrinelor, a biocompușilor, respectiv la experimente de docare, utilizând în special mecanică moleculară (MM+).
- se va studia degradarea termică a nanocapsulelor ulei volatil/ciclodextrină în aceleași condiții ca în cazul uleiurilor volatile neîncapsulate, recuperarea probelor încapsulate degradate prin extracție repetată în hexan și analiza GC-MS a acestora pentru evaluarea tipului și concentrației componentelor de degradare, respectiv evaluarea capacității de protejare a uleiurilor volatile de către ciclodextrine în condițiile degradării termice;
- se va studia obținerea unor extracte în diverși solvenți organici (diverse polarități): metanol, etanol 20-96%, benzen, toluen, hexan, acetona, acetat de etil, dicloretan, tetrahidrofuran, extracte care vor fi analizate prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC) și spectrofotometrie;
- pentru evaluarea eliberării controlate a biocompușilor din complexii cu ciclodextrină se va apela la analiza spectrofotometrică în timp a unor probe de complexi în ser fiziologic sau soluții etanolice de diverse concentrații (20-96%).
- se va testa posibilitatea aplicării practice a unor nanocapsule în industria farmaceutică (tablete cu activitate hepatoprotectoare) în scopul îmbunătățirii calității și stabilității acestora.

2. STADIUL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU

2.1. Introducere - Familia *Compositae*

Familia *Asteraceae* sau *Compositae*, cuprinde o serie de specii foarte valoroase din punct de vedere medical: *Matricaria chamomilla* L. (mușețel), *Achillea millefolium* L. (coada șoricelului), *Artemisia absinthium* L. (pelin), *Arenaria dracunculus* L. (tarhon), *Tussilago farfara* L. (podbal), *Arnica montana* L. (arnică), *Calendula officinalis* L. (gălbenele), *Arctium lappa* L. (brusture), *Cynara scolymus* (*cardunculus*) L. (anghinare), *Silybum marianum* L. (armurariu), *Taraxacum officinale* L. (păpădie) [45-50].

Numele *Asteraceae* derivă din genul *Aster*, pe când *Compositae*, un nume mai vechi dar încă valid, înseamnă „compus” și se referă la inflorescența caracteristică. Conform Royal Botanic Gardens of Kew această familie cuprinde peste 1600 de genuri și 23000 de specii. Cele mai mari genuri sunt: *Senecio* (1500 specii), *Vernonia* (1000 specii), *Cousinia* (600 specii) și *Centaurea* (600 specii) [47].

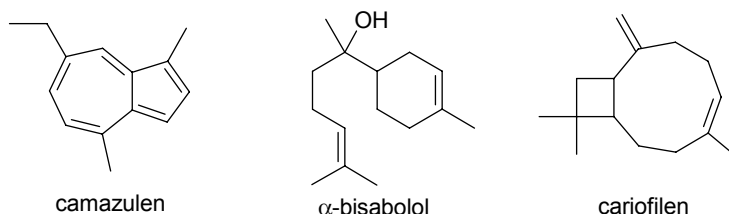
Numeroase specii aparținând acestei familii sunt cultivate în scopuri ornamentale, cum ar fi gălbenelele, crizantemele sau cârciumăresele. În mod surprinzător doar câteva sunt cultivate în scopuri alimentare, cum ar fi salata verde, coada șoricelului, andiva sau floarea soarelui. [47].

Asteraceae se pot întâlni în regiuni temperate precum și în munții tropicali. Familia a fost în mod universal recunoscută și inclusă în ordinul *Asterales* [50]. În general *Asteraceae* se prezintă sub forma unor ierburi, iar unele sub formă de arbust, copaci sau plante cățărătoare. Sunt ușor de distins, în special datorită inflorescenței specifice [49].

Particularitatea familiei *Compositae* constă în faptul că ceea ce pare la prima vedere o singură floare este, de fapt, un compus format din mai multe flori mici. Discul floral al acestor plante este format din sute de floricele mai mici, fiecare dintre acestea producând o singură sămânță. Fiecare disc floral are 5 petale unite, precum și 5 stamine fuzionate în jurul unui pistil cu stigmat sub forma unor antene. Studiind cu atenție petalele mari care înconjoară mijlocul florii, se poate observa că fiecare petală este la rândul ei o floare, numită o „floare radiară”, cu petalele fuzionate și atârând într-o parte. La maturitate semințele cad și lasă în urma lor un disc care seamănă izbitor cu o parcelă dintr-o grădină, în care au fost plantate floricele minuscule [46, 47].

Majoritatea speciilor din această familie prezintă compoziție chimică variată, unii compuși fiind regăsiți în aproape toate, în special saponozide triterpenice, substanțe amare cu structuri diverse, alantolactone, terpenoide, care le conferă importante proprietăți terapeutice ca: antiinflamatoare, antiseptice, tonice, antihemoragice, antispastice, hepatoprotectoare etc.

Multe dintre aceste proprietăți biologice sunt datorate prezenței uleiurilor volatile, în a căror componență intră sesquiterpenoide de tipul azulenelor (care le conferă uleiurilor volatile o culoare albastră), bisabolol, cariofilen etc [47, 51-58].



În procesul de separare a uleiurilor volatile, depozitare, transport, condiționare și utilizare, o parte din acești compuși sunt supuși acțiunii factorilor degradanți din mediu (cum este aerul, umiditatea etc.), ceea ce poate conduce la compuși de oxidare ai terpenoidelor cu impact negativ asupra calității și siguranței acestor produse (diepoxi-limonen, cariofilen-oxid etc.). [59-62].

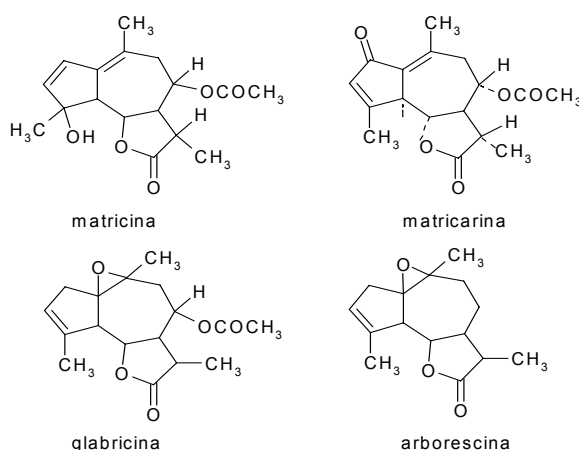
2.1.1. Mușețelul (*Matricaria chamomilla* L.)

Mușețelul (*Matricaria chamomilla* L.) face parte din familia *Compositae*, având mai multe denumiri populare cum ar fi mamoriță, mororiul câinelui, mătricea, morună, moșițel, musatea, mușețel de câmp, ochiul bouului, poala Sfântei Marii, roman, romaniță, romască, romanit [47].

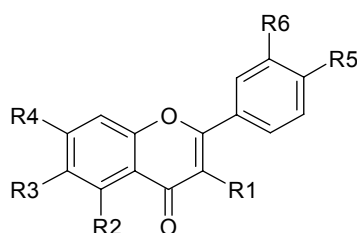
Compoziție chimică. Florile de mușețel conțin ulei volatil, substanțe amare de natură sescviterpenică (matricină și matricarină), proazulene care au fost izolate din florile ligulate și tubulare. Antodiile conțin 0,25% ulei volatil de culoare galbenă care în timpul antrenării cu vapori de apă, prin acest procedeu de extracție, devine albastru. Acestea mai conțin și apigenină (cantitatea acestor compuși s-a determinat în șase faze diferite de dezvoltare a florilor ligulate din culturi diploide și tetraploide. Conținutul florilor ligulate din plantele diploide în apigenin și principalii derivați acilați ai acestuia a fost mult mai mare înainte de înflorire în comparație cu conținutul acestora din plantele tetraploide [63]), unbeliferonă, eterul metilic al unbeliferonei, acid salicilic, spathulenol (spathulenol este singurul compus puternic influențat de vârsta răsadurilor la transplantare [64]), rezine, fitosterine, cvercimetrină, acid clorogenic, camilină, vitaminele B1 și C, substanțe minerale [47]. Din uleiul de *M. chamomilla* s-au izolat trei fracțiuni principale, cu un grad înalt de puritate în *E*- β -farnesene [65].



Din punct de vedere structural matricina și matricarina fac parte din grupa guaianolidei, mai ales sub formă de derivați epoxidați ca: glabricina și arborescina.



Un alt grup de substanțe este cel al flavonoidelor, reprezentate în deosebi prin flavone (quercetina, rutina) și flavonoli, sub formă de agliconi dar mai ales ca glicozide. Flavone identificate [66, 67]:



Denumirea	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Apigenol	H	OH	H	OH	OH	H
Luteol (luteolină)	H	OH	H	OH	OH	OH
Cverceto	OH	OH	H	OH	OH	OH
Patuletină	OH	OH	OCH ₃	OH	OH	OH
Crizoeriol	H	OH	H	OH	OH	OCH ₃
Axilarină	OH	OH	OCH ₃	OH	OH	OH
Crizopenol	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH
Eupaletină	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	H
5,4'Dihidroxi-3,6,7,3'-tetra-metoxi-flavonă	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃

Au mai fost puse în evidență două cumarine, herniarină, acizi ani-zic, siringic, vanilic, precum și acizi grași superiori (caprinic, palmitic, stearic, oleic, cerotic, linolic). Florile de mușețel mai conțin mucilag, colină, triacontan, un fitosterol, dar și substanțe cu structură încă neclarificată ca un farnesoloid, un alcool triciclic (C₁₅H₂₆O), o hidrocarbură triciclică (C₁₅H₂₄) și un cetoalcool cu formula brută C₁₅H₂₄O₂ (probabil toate substanțe sescviterpenoidice) [47].

În extractele metanolice din frunze de *Matricaria chamomilla* s-au identificat patru acizi fenolici (acidul *p*-hidroxibenzoic, vanilic, clorogenic și salicilic), iar după hidroliza acidă s-au eliberat cinci compuși adiționali (acidul *gentisic*, *syringic*, cafeic, sinapic și *o*-/*p*-cumaric) [68].

Principalii compuși identificați în uleiul volatil de *Matricaria chamomilla* au fost: α -bisabolol (56.86%), trans-trans-farnesol (15.64%), cis- β -farnesene (7.12%), guaiazulene (4.24%), α -cubebene (2.69%), α -bisabolol oxid A (2.19%) și chamazulene (2.18%) [63, 66, 67].

Acțiune farmacodinamică – utilizări terapeutice. Datorită uleiului volatil bogat în azulene, cât și apigeninei, florile de mușețel au acțiune antispastică anestezică, antiseptică, antifungică (împotriva *Aspergillus niger* L.) și antiinflamatorie, protectoare și curativă în reacțiile produse de iradiere. Preparatele pe bază de flori de mușețel administrate intern au proprietăți stomahice, ușurează digestia, diminuează secrețiile și reduc inflamațiile mucoaselor. Se utilizează intern pentru efectele carminative, ușor sedative, antispastice și tonic-aperitiv stimulente. Extern se utilizează pentru acțiunea cicatrizantă, emolientă, antiseptică și antiiflogistică. Au aplicații și în cosmetică. Intră în compoziția ceaiurilor: anticolicic, contra colicilor nr. 2, contra colicilor pentru copii, gastric, pentru gargară și sudorific, în produse farmaceutice etc. [47, 66].

2.1.2. Coadă șoricelului (*Achillea millefolium* L.)

Coadă șoricelului este o veche plantă medicinală, utilizată de multe popoare sub formă de ceaiuri, având proprietăți stomahice, hemostatice, antidiareice și pentru uz extern, în tratamentul rănilor. Este o plantă perenă, cu frunzele de tip bipenat sectat. Florile sunt de culoare albă, dispuse în inflorescență compusă de tip calatidiu [47].



Compoziția chimică. Părțile aeriene recoltate la înflorire și uscate ale plantei conțin 0,10-0,40% ulei volatil, iar inflorescențele până la 0,50%. Din unele zone ale țării s-au recoltat probe de inflorescențe care uscate în condiții naturale, la aer, au avut un conținut de până la 0,80% ulei volatil bogat în camazulenă. Randamentul în producția curentă este de cea 0,20% ulei volatil obținut din materia primă uscată corespunzător [47].

În frunzele din șase specii de coada șoricelului: *A. millefolium*, *A. filipendulina*, *A. tenuifolia*, *A. santolina*, *A. biebersteinii* și *A. eriophora* au fost identificați un total de 94 de compuși. Principalii constituenți din uleiul esențial de frunze în genotipurile testate s-au dovedit a fi: germacren-D, biciclogermacren, camforul, borneolul, 1,8-cineolul, spatulenolul și acetatul de bornil. Referitor la componenții principali, au fost definite patru chemotipuri și anume: (I) spatulenol (1.64 – 34.31%) + camfor (0.2 – 15.61%); (II1) germacren-D (18.78 – 23.93%) + borneol (7.93 – 8.26%) + și acetat de bornil (11.56 – 14.66%); (II2) germacren-D (13.28 – 36.28%) + biciclogermacren (5.93 – 8.4%) + 1,8-cineol (15.26 – 19.41%) + camfor (14.95 – 23.32%); (III) borneol + camfor (52.04 – 63.27); (IV) germacren-D (45.86 – 69.64%). Au fost determinate relațiile dintre chemotipuri și tipul de sol, precum și între chemotipuri și condițiile climatice ale regiunilor de colectare, probabil ca motive a variațiilor mari din compoziția uleiurilor esențiale. [69-75].

Proprietăți terapeutice: tonic amar și astringent, antispasmodic, antiinflamator, sedativ utero-ovarian, favorizează menstruațiile, colagog, hemostatic, diuretic, vermifug, cicatrizant extern [47, 75].

2.1.3. Anghinarea (*Cynara scolymus* L.)

Anghinarea a fost cunoscută din antichitate (sec. IV î.e.n.) și a fost folosită în terapie încă din secolul al XVI-lea, însă acțiunea ei coleretică s-a stabilit abia în 1931. Este cunoscută ca legumă în Egiptul antic și Imperiul Roman. De prin secolul al XV-lea este folosită frecvent ca aliment. Planta este perenă, dar în culturi anuală, are tulpina ramificată, tomentoasă. Primele frunze sunt dispuse bazal în rozete, iar cele care apar ulterior sunt tulpinale, sesile, penat-sectate, fidate la vârf, terminate cu spini, tomentoase pe partea inferioară. Florile sunt hermafrodite, grupate într-un calatidiu solitar de culoare violacee. Fructul este o achenă ovoidală [47].



Anghinarea este o plantă erbacee veche originară din bazinul mediteranean. Partea comestibilă a plantei (partea florală) este deosebit de bogată în polifenoli, a căror proprietăți terapeutice sunt bine cunoscute [76, 77].

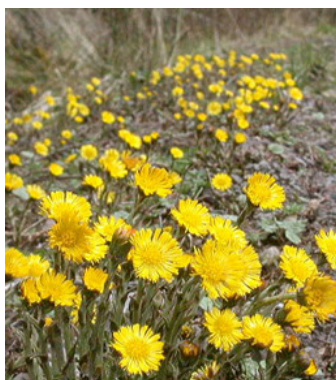
Componentii principali sunt cinarina, polifenoli, oxidaze, flavonozide (cinarozida, scolimozida), insulina, acidul clorogenic, glicozidele A și B, mucilagii, tanoizi, zaharuri, acizi (malic, lactic, glicerici și glicolici), derivați triterpenici, săruri de potasiu și magneziu. Principalii compuși identificați în frunzele de anghinare au fost derivații luteolin în anghinare și derivații apigenin în anghinarea de grădină și cea sălbatică [78-86].

Proprietăți terapeutice: frunzele de anghinare au efecte asupra bolilor de ficat și rinichi, întrucât măresc secreția biliară și diureza, reglează procesul de formare a colesterolului și reduce zahărul din sânge. S-a considerat că aceste proprietăți terapeutice se datorează conținutului în cinarina (acid 1,3-o-dicafeoilquinic) a acestor extracte. În numeroase sisteme de test farmacologic, extractul din frunze de anghinare a prezentat proprietăți hepatoprotectoare, anticarcinogenice, antioxidante, antibacteriene, anti-HIV, de secreție a bilei și diuretice precum și proprietăți de inhibare a sintezei colesterolului și de oxidare a LDL. Aceste numeroase indicații terapeutice nu pot fi atribuite unui singur, ci mai multor, compuși activi, care împreună au efecte cumulative sau farmacologice sinergice.

Acești compuși includ acizii mono- și dicafeoilquinic și flavonoide ca luteolina sau 7-o-glucozid-luteolina. De asemenea, acestea ar trebui să fie luate în considerare ca materii prime în obținerea aditivilor alimentari și ca nutrienți. [83, 87].

2.1.4. Podbal (*Tussilago farfara* L.)

Podbalul este o plantă cu flori galbene, ușor de recunoscut, care înflorește în martie-aprilie. Florea răspândește un miros puternic de miere. Podbalul este o plantă perenă, din familia *Compositae*. Din trunchiul rădăcinii cilindrice repente se ramifică numeroși rizomi. Primăvara timpurie, din rădăcini cresc tulpini păroase, cu solzi, de 10-30 cm lungime. La capătul tulpinilor se află câte o inflorescență. Frunzele mari, de mărimea unei palme, sub formă de inimă, se formează ulterior, după apariția florilor. Partea din spate a frunzelor este albă, păroasă, lănoasă. Tija frunzei este lungă, marginea puternic zimțată. [88].



Compoziție chimică: oficinale sunt frunzele fără pețiol (*Folium Farfarae*), florile și frunzele conțin tanin, substanțe mucilaginoase care prin hidroliză pun în libertate galactoză și pentoza, substanțe amare, tusilagina, inulina, nitrat de potasiu, steroli, tanin, acid galic, stearic, palmitic, cortenoizi, fitosterine, compuși ai zincului, magneziului, fosforului, etc. Florile conțin mucilagii, fitosterine, urme de ulei volatil, tanin, foradiol, arinidol, hiperina, rutozid, xantofile, săruri minerale, zaharuri. [47, 89].

Acțiune farmacologică: emolient și expectorant al aparatului respirator, antispastic bronhic, colagog, diuretic mărind cantitatea de urină, stimulează eliminarea bilei, relaxează țesuturile, reduce inflamațiile, distruge microorganismele patogene, antispastică. Intră în compoziția ceaiurilor antiastmatic, antibronșitic și în țigările antiastmatice. [47, 89].

2.1.5. Armurariu (*Silybum marianum* L.)

Armurariul (*Silybum marianum*), plantă țepoasă originară din regiunea Mediteranei, are frunze de un verde strălucitor împodobite cu vinișoare de un alb lăptos, de aproximativ un metru înălțime, flori roșiatice, care fac la maturitate semințe cu gust amarui. Semințele armurariului ascund substanțe cu o extraordinară acțiune benefică asupra ficatului. În Germania, unde au fost efectuate cele mai multe studii asupra efectelor armurariului, medicii îl utilizează în mod curent pentru a trata afecțiunile cronice ale ficatului și cirozele. [90].



Compoziție chimică și acțiune farmacologică: semințele de armurariu conțin silimarină formată din flavonoide, silibină, silidianină, silicristină, betaină, aminoacizi, glicină, cisteină, leucină, tiramină, acid glutamic, lipide, cu proprietăți eupeptice, tonic amare, hepatoprotectoare și acțiune de împiedicare a distrugerii și de reconstrucție a celulei hepatice [90-96].

În cazul leziunilor datorate alcoolului armurariul permite refacerea celulelor deteriorate de abuzul de alcool și restaurează capacitatea lor metabolică. În caz de hepatite cronice de origine virală armurariul inversează procesul degenerativ și mai mult poate dezrădăcina hepatitele cronice. [90, 97, 98].

Crește fenomenele de regenerare a țesutului hepatic, fiind un puternic antioxidant. Scade nivelele crescute peste normal ale colesterolului sanguin. Scade rezistența la insulină a celulelor pancreatice, la pacienții cu diabet zaharat tip 2. Inhibă creșterea celulelor tumorale la nivelul cervixului și prostatei. Reduce efectele secundare negative ale chimioterapiei, fiind folosit ca și puternic detoxifiant. Stimulează regenerarea ficatului în caz de hepatită virală A, B, C și D, hepatită toxică ori ciroză hepatică, și a dovedit efecte de inhibare a replicării virușilor hepatici. Se folosește ca adjuvant și în caz de dischinezie biliară, migrene, urticarie, psoriazis ori cancer de piele. [90, 99-102].

Septicemia este asociată cu producerea crescută de specii reactive la oxigen, care conduce la multiple disfuncții de organe. Bazat pe efectele antioxidante ale silimarinei, s-a investigat presupusul rol protector al silimarinei împotriva daunelor oxidative din țesuturile pulmonare și ale creierului, care produc septicemie. Silimarina reduce apariția septicemiei induse de leziuni ale organelor, cel puțin în parte, datorită proprietăților lor de a echilibra statutul de oxidant-antioxidant, de a inhiba infiltrarea neutrofilă și de a reglementa eliberarea mediatorilor inflamatori. [93].

2.2. Micro- și nanoîncapsulare

2.2.1. Introducere

Definiție: Microcapsulele sunt particule de dimensiuni reduse ce conțin un agent activ sau un material intern înconjurat de un material de acoperire sau de un înveliș.

Clasificare:

Nanocapsulele sunt particule cu dimensiuni mai mici de 1 μm ;

Microcapsulele sunt particule cu dimensiuni între 1 – 1000 μm (produsele comerciale sunt cu dimensiuni între 3-800 μm , cu un procent de parte activă – miez – de 10-90%);

Macrocapsulele sunt particule cu diametre mai mari de 100 μm .

Materiale ce se încapsulează: adezivi, aditivi alimentari, celule, enzime, aromatizanți, odoranți, medicamente, cerneluri.

Materiale de înveliș: oligo- și polimeri, grăsimi, ceruri, lipide etc.

Forma particulelor: sferice (cu miez ca fază continuă), miez multisferic în învelișul format dintr-o fază continuă (figura 2.2.1).

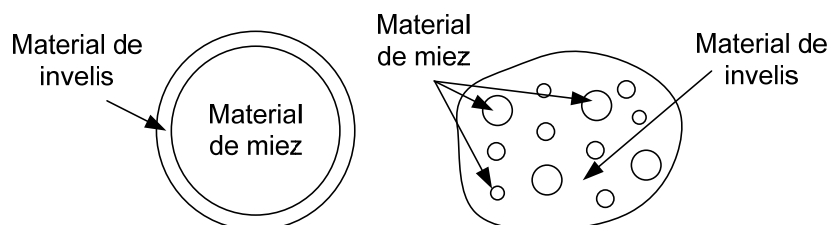


Figura 2.2.1. (a) Microcapsule continue miez/învelis; (b) microcapsule multinucleare [103]

2.2.1.1. Ciclodextrine

Ciclodextrinele au fost primii compuși studiați din punct de vedere al comportării la complexare și al proprietăților catalitice, obiectivul fiind acela de a mima enzimele. Prima publicație a apărut în 1891[13, 104-108], când *Villiers* a raportat izolarea a două tipuri diferite de compuși cristalini din degradarea amidonului tratat cu bacteria *Bacillus amylobacter*. Villiers a caracterizat acești compuși prin proprietățile lor fizice și i-a denumit "celulozine". Câțiva ani mai târziu Schardinger [13, 107, 109] a publicat mai multe date fizice relativ la acești compuși. El a continuat cu izolarea bacteriei responsabile pentru formarea ciclodextrinelor (*Bacillus macerans*) care este astăzi cea mai utilizată sursă din lume pentru producerea ciclodextrinelor. Datorită lucrărilor de pionierat ale acestuia, ciclodextrinele sunt adesea denumite dextrine Schardinger. Alte denumiri, cum ar fi cele din literatura veche, sunt cicloglucani, ciclotooligozaharide și cicloamiloze [110].

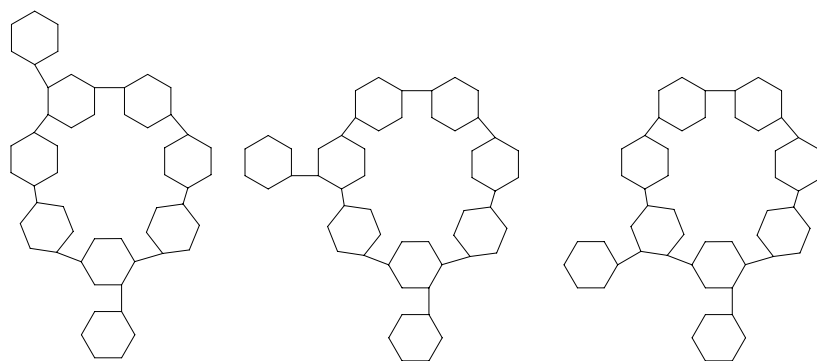


Figura 2.2.2. Structura di-glucozil- β -ciclodextrinelor

Sundararajan și *Rao* au demonstrat prin calcule de energie conformațională că nu se pot forma ciclodextrine cu mai puțin de șase membri în inel din motive sterice.

δ -Ciclodextrina este un inel ce conține nouă unități glucozidice, iar acestea și omologii superiori nu au fost caracterizate satisfăcător. Acestea sunt izomere cu ciclodextrinele substituie cu resturi glucozidice (figura 2.2.2). Solubilitatea acestor glucozil-ciclodextrine în apă este foarte bună și sunt dificil de izolat în formă cristalină din soluția mămă rezultată la obținerea β -ciclodextrinei [110, 111].

Maltozil- α -ciclodextrina a fost obținută din α -ciclodextrină și maltoză cu ajutorul microorganismului *Bacillus pullulanase* [13].

Teoretic se pot prepara ciclodextrine cu zece sau mai mulți membri, însă este de așteptat să aibă o solubilitate foarte mare în apă și o putere de complexare redusă; prin urmare acești compuși nu prezintă un interes deosebit [110].

Ciclodextrinele cu inel foarte mare, dacă acestea există, ar trebui să fie foarte flexibile. Creșterea diametrului nepolar al ciclodextrinelor ar putea incomoda creșterea numărului moleculelor de apă complexate și, în soluție apoasă, aceste molecule de apă "complexate" vor fi diferite din punct de vedere energetic față de cele din solvent. Drept consecință, formarea complexului într-un astfel de sistem nu va conduce la un minim energetic semnificativ. De asemenea, o cavitate prea mare a ciclodextrinei nu va putea reține suficient de strâns moleculele oaspete pentru a preveni eliberarea lor. [13, 107].

În figura 2.2.3 sunt reprezentate modelele α , β și γ -ciclodextrinei [13, 104, 105, 109, 112-117]. Ca o consecință a conformației C_1 a unității glucozilpiranozice, toate grupele secundare hidroxil sunt situate pe una din cele două margini ale inelului, iar cele primare pe cealaltă. Cavitatea este linearizată de către legăturile de hidrogen cu oxigenul glicozidic [110].

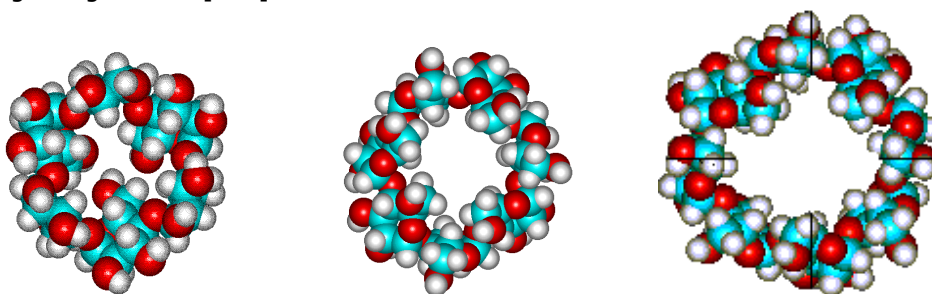


Figura 2.2.3. Modelele α , β și γ -ciclodexterinei [118]

Perechile de electroni neparticipanți ai punții de oxigen glicozidic sunt îndreptați spre interiorul cavității, producând o densitate mare de electroni și oferindu-i acesteia un caracter de bază Lewis. [13, 111, 118].

Grupul C_2 -OH al unei unități glucopiranozice poate forma legătură de hidrogen cu grupul C_3 -OH al unității glucozilpiranozice vecine. În molecula de ciclodextrină se formează o centură secundară din legăturile de hidrogen, rezultând o structură rigidă. Aceasta este o posibilă explicație pentru a arăta că β -ciclodextrina are cea mai mică solubilitate dintre toate ciclodextrinele [110].

Centura formată din legături de hidrogen este incompletă în cazul moleculei de α -ciclodextrină; de asemenea, o unitate glucopiranozică este distorsionată. γ -Ciclodextrina este necolpanară, având o structură foarte flexibilă și este cea mai solubilă dintre toate trei. Constantele de echilibru pentru schimbul hidrogen-deuteriu în hidroxilii secundari (0,65 pentru β -ciclodextrină, 0,75 pentru α -ciclodextrină și 0,85 pentru amiloză) indică faptul că cel mai puternic sistem cu legături de hidrogen apare în β -ciclodextrină. Figura 2.2.4 ilustrează caracteristicile structurale ale ciclodextrinelor. [13, 111, 118].

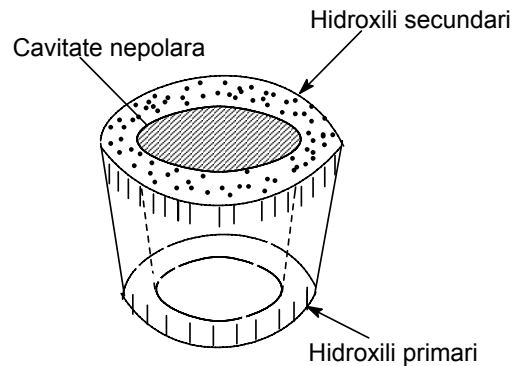


Figura 2.2.4. Schema structural-funcțională a ciclodextrinelor [13]

Rotația liberă a hidroxililor primari va reduce efectiv diametrul cavității pe partea unde aceasta se produce. Dimensiunile aproximative ale ciclodextrinelor sunt redată în figura 2.2.5. [13].

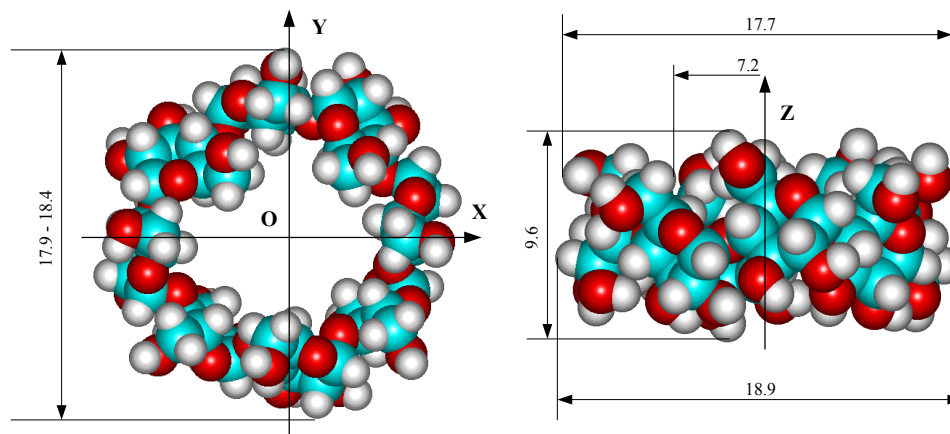


Figura 2.2.5. Principalele dimensiuni (Å) ale γ -ciclodextrinei în vid [111]

Conformația ciclodextrinelor în soluție este aproape identică cu conformația lor în stare cristalină. Studiile spectroscopice RMN și IR arată că unitățile D-glucozilpiranozice există în conformația C_1 , atât în DMSO (dimetilsulfoxid) cât și în D_2O . Aceasta indică faptul că grupările OH primare și secundare au o conformație similară atât în stare dizolvată cât și stare cristalină [13, 110].

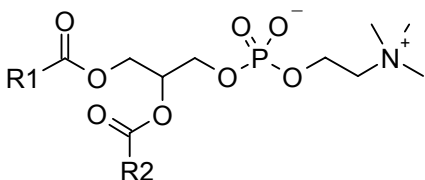
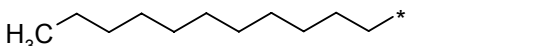
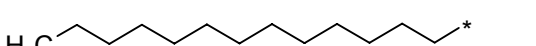
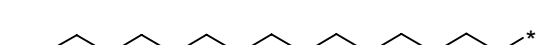

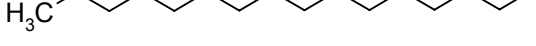
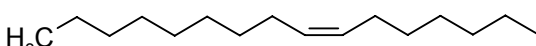
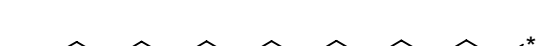

2.2.1.2. Liposomi

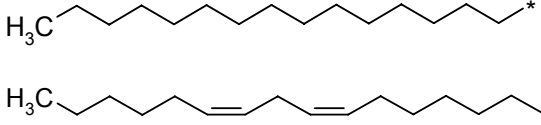
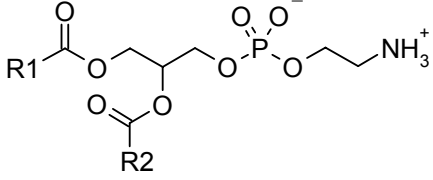
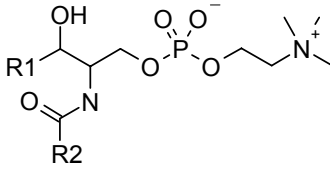
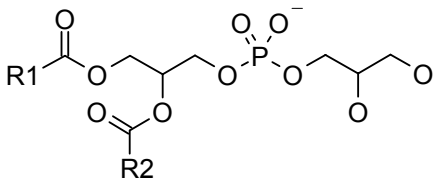
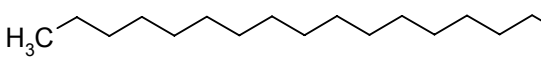
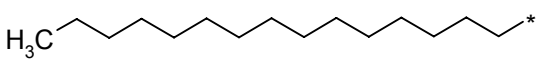
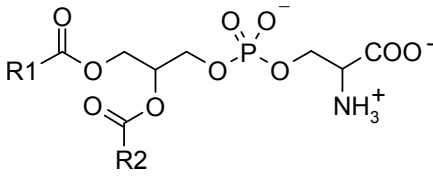
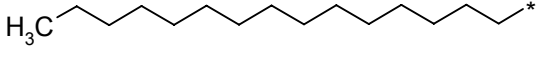
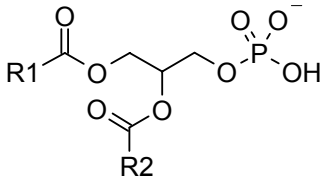
Cele mai utilizate sisteme de protejare și eliberare controlată a biomoleculelor sunt liposomii, în special în industria farmaceutică și în practica medicală [115, 119-135]. Liposomii au fost studiați pentru prima dată în 1965 ca modele pentru membrane biologice [115]; mai târziu au fost folosite drept agenți de transport pentru diferiți compuși cu activitate terapeutică, iar mai recent au fost obiectul unor studii și în sectorul cosmetic.

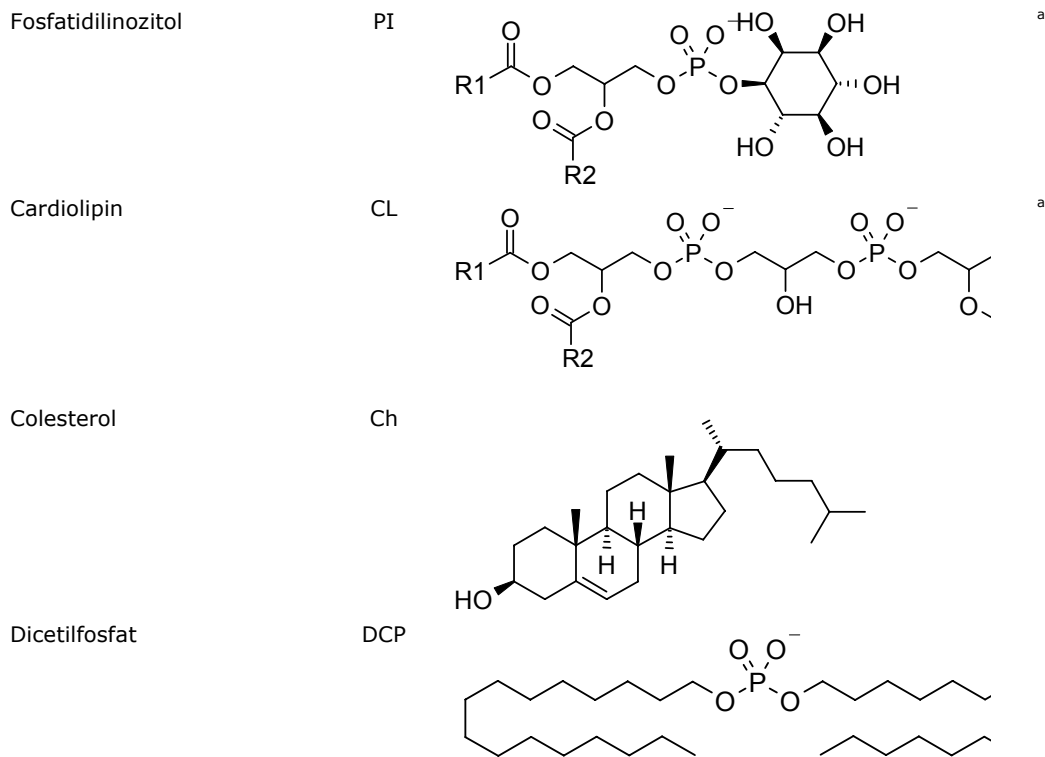
Liposomii sunt vezicule sferice ce prezintă central o cavitate hidrofiliă, înconjurată de un număr variabil de lamele biomoleculare, compuse din fosfolipide, cu dimensiuni între 15 și 3500 nm [115, 119, 120, 136-139]. De un interes deosebit se bucură materialele utilizate în transplantul celular (transplant de celule imunoizolate) [140, 141] sau încapsularea și eliberarea controlată a proteinelor, enzimelor sau antigenilor [142-148]. Acestea sunt de obicei microsferă pe bază de algiinați, agaroză și materiale compozite pe bază de agaroză/carboximetilceluloză, guma arabica, carraghenani, chitozani, pectine, respectiv diverși polimeri sintetici de tipul poliacrilaților.

Liposomii mimează foarte bine procesele care se desfășoară la nivelul membranelor celulare, datorită structurilor chimice care le formează și anume fosfolipidele, dintre care merită amintite: fosfatidilcolina (PC, cea mai întâlnită structură fosfolipidică în membranele naturale), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE) și sfingomielină (SM). Compușii care formează liposomii sunt listați în tabelul 2.2.1 [125-127, 149, 191].

Tabel 2.2.1. Denumirile și structurile compușilor constituenți ai liposomilor naturali

Denumire	Cod	Structură	R
Fosfatidilcolină	PC		
Dilauroilfosfatidilcolină 1,2-Dilauroil- <i>sn</i> -glicero-3- fosfocolină	DLPC		R ₁ ,R ₂
Dimiristoilfosfatidilcolină 1,2-Dimiristoil- <i>sn</i> -glicero-3- fosfocolină	DMPC		R ₁ ,R ₂
Dipalmitoilfosfatidilcolină 1,2-Dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3- fosfocolină	DPPC		R ₁ ,R ₂
Distearoilfosfatidilcolină 1,2-Distearoil- <i>sn</i> -glicero-3- fosfocolină	DSPC		R ₁ ,R ₂
Dioleoilfosfatidilcolină 1,2-Dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3- fosfocolină	DOPC		R ₁ ,R ₂
Palmitoilfosfatidilcolină 1-Palmitoil- <i>sn</i> -glicero-3- fosfocolină	Mono- PPC		R ₁ R ₂
Palmitoioleoilfosfatidilcolină 1-Palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> - glicero-3-fosfocolină	POPC		R ₁
			R ₂

Palmitoillinoleoilfosfatidilcolină 1-Palmitoil-2-linoleoil- <i>sn</i> - glicero-3-fosfocolină	PLPC		R ₁ R ₂
Fosfatidiletanolamină	PE		a
Sfingomielină	SM		a
Fosfatidilglicerol	PG		a
Distearoilfosfatidilglicerol 1,2-Distearoil- <i>sn</i> -glicero-3- fosfoglicerol	DSPG		R ₁ ,R ₂
Dipalmitoilfosfatidilglicerol 1,2-Dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3- fosfoglicerol	DPPG		R ₁ ,R ₂
Fosfatidilserină	PS		
Dipalmitoilfosfatidilserină 1,2-Dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3- fosfoserină	DPPS		R ₁ ,R ₂
Fosfatidic acid	PA		a



^a R₁, R₂ – depinde de sursă

Diametrul particulelor unilamelare variază de la zeci la mii de nanometri. Cei cu diametre între 25 și 100 nm se numesc "vezicule unilamelare mici" (SUV), cei cu dimensiuni între 100-1000 nm sunt "vezicule unilamelare mari" (LUV), iar cei cu diametre de 20-150 μm sunt "vezicule unilamelare foarte mari" (GUV) [125].

O variantă de obținere a liposomilor "goi" sau a micro/nanocapsulelor în care aceștia au rol de "gazdă", este cea de ultrasonare a unor fosfolipide dispersate în apă sau în soluția ce conține compușii de încapsulat [125]. Datorită stabilității mai reduse a liposomilor naturali, s-au obținut liposomi modificați cu polimeri de tipul polietilenglicolului (figura 2.2.6.), care-i conferă structurii "gazdă" o conformație mai densă, o stabilitate ridicată și o posibilitate de traversare a membranelor celulare mai mare (de exemplu în celulele canceroase) [126].

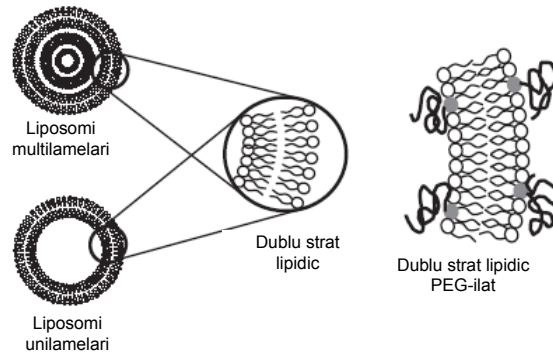


Figura 2.2.6. Descrierea schematică a liposomilor PEG-ilați

S-au realizat, de asemenea, sisteme compozite polimer/liposomi, pentru creșterea biodisponibilității (aportul liposomilor) și pentru mărirea stabilității (aportul polimerilor); un exemplu este obținerea învelișului polimeric de polilisină (cationică) și alginat de sodiu (anionic), ce conține liposomii cu compuși bioactivi (figura 2.2.7).

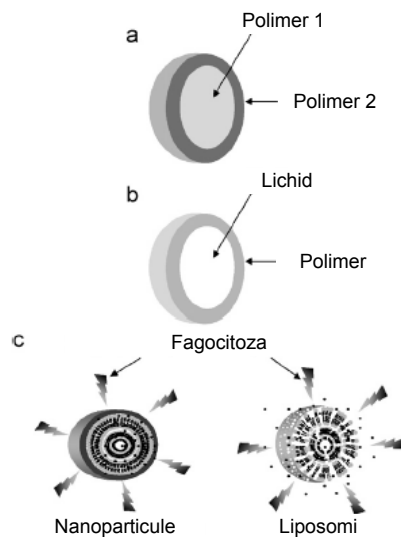
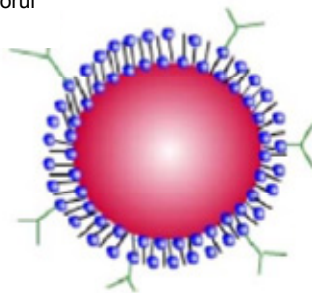


Figura 2.2.7. (a) Sistem polimeric înveliș/miez, ce conține ca polimer 1 – poli(1,3-bis(*p*-carboxifenoxipropan)-*co*-(sebacic anhidridă)); polimer 2 – poli(acid lactic); (b) Sistem polimeric înveliș/miez, cu miez lichid (polimer – bloc copolimeric PEG și poliester sau policarbonat; lichid – amestec solvent organic/apă); (c) Sistem polimeric înveliș/miez cu miez lipidic

Liposomii pot fi utilizați ca reactanți analitici sau bioanalitici, în biorecunoașterea diverselor elemente, respectiv în metode imunoanalitice omogene sau heterogene (de exemplu metode MEIA, ELISA, EMIT, FPIA) [127]. De asemenea, liposomii pot fi utilizați în cromatografia capilară condusă electric (în care liposomii joacă rol de fază pseudo-staționară sau staționară) [128].

Metodele de analiză a acestor sisteme presupun metode clasice termogravimetrice și calorimetrice, metode cromatografice și electroforetice [128].

Elementele de recunoaștere
pot fi imobilizate la exteriorul
liposomilor



Moleculele bioactive pot fi
încapsulate în interiorul
liposomilor

Figura 2.2.8. Reprezentarea schematică a liposomilor [129]

În domeniul farmaceutic liposomii își găsesc cele mai multe aplicații [115, 121-138, 149-157] o problemă majoră fiind însă stabilitatea acestora în fluxul sanguin. S-au obținut liposomi stabilizați, care sunt vezicule clasice cărora le-au fost atașate resturi polimerice, fie pe o singură parte, fie pe ambele părți ale acestora (liposomi Stealth) [158-163]. Acești liposomi stabilizați au aplicații în încapsularea unor medicamente anticancer (antracicline), antifungice, antivirale sau a unor antibiotice [120, 121, 136-138, 150].

În sfera alimentară aceștia și-au găsit mai puține aplicații. Totuși, liposomii au fost utilizați pentru eliberarea controlată a proteinazelor cu scopul îmbunătățirii dezvoltării aromelor unor tipuri superioare de brânză, pentru încapsularea unor faze apoase alimentare în scopul reducerii presiunii de vapori. S-au propus noi aplicații ale acestora în microîncapsularea unor enzime alimentare, antioxidanți, aromatizanți nevolatili, coloranți alimentari și vitamine [119].

2.2.2. Obținerea micro- și nanocapsulelor

2.2.2.1. Procese de obținere a microcapsulelor

Conceptul de obținere a microparticulelor datează din anii 1930. Acestea erau bazate doar pe procese fizice de obținere. [103].

Astăzi, procesele de obținere a microcapsulelor se bazează pe fenomene:

- fizice;
- chimice (polimerizare);
- combinate (fizice și chimice).

Procesele de obținere a acestor microcapsule se mai pot clasifica în (tabelul 2.2.2):

- procese chimice (de tip A);
- procese mecanice (de tip B) [103].

Tabel 2.2.2. Procese de încapsulare tip A și B [103]

Tip A (procese chimice)	Tip B (procese mecanice)
Coacervare complexă	Pulverizare-uscare
Incompatibilitate polimer-polimer	Pat fluidizat
Polimerizare interfacială în mediu lichid	Depunere electrostatică
Polimerizare <i>in situ</i>	Extrudare centrifugală
Gelifiere termică și ionică în mediu lichid	Separare din suspensie pe sisteme rotative

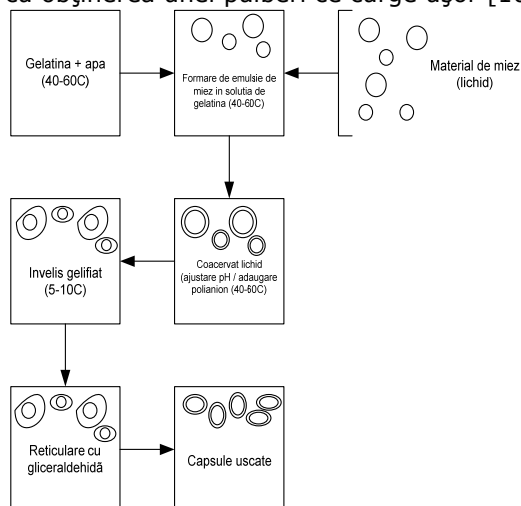
Capsulele obținute prin metode din tipul A (prin metode chimice) se obțin în fază lichidă, în reactoare cu agitare sau tubulare, iar cele obținute prin procese de tip B (prin metode mecanice) utilizează de obicei o fază gazoasă în procesul de încapsulare. Astfel, capsulele se pot forma:

- prin pulverizarea materialului de înveliș prin materialul de miez;
- prin solidificarea unor picături de material de înveliș într-o fază gazoasă;
- prin gelifierea unor picături pulverizate într-un material lichid ce trebuie capsulat. [103].

A. Procese de microîncapsulare tip A - Coacervarea complexă

Coacervarea complexă se bazează pe abilitatea polimerilor cationici și anionici solubili în apă să interacționeze cu apa pentru a forma o fază lichidă bogată în polimer, denumită coacervat complex. Cel mai utilizat polimer în acest sens este gelatina (un polimer cationic format în principal din colagen – proteină din om sau animale). [103].

Procesul de încapsulare are loc astfel (figura 2.2.9.): dispersarea materialului de miez în soluția apoasă de gelatină (40-60°C), adăugarea unui alt polimer anionic (cum ar fi guma arabică) sau ajustarea pH-ului cu obținerea formei de coacervat complex, apoi răcirea coacervatului. Gelatina din coacervat gelifică cu formarea unui înveliș flexibil; pentru reducerea acestei flexibilități are loc o subrăcire (la 10°C) și tratare cu glutaraldehidă ($\text{OHC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHO}$), care joacă rol de agent de reticulare (leagă lanțurile polimerice din gelatină între ele), iar în final coacervatul se uscă cu obținerea unei pulberi ce curge ușor [103].

**Figura 2.2.9.** Încapsulare prin coacervare* complexă [103]

* Coacervare – stadiu de emulsie, reversibil, între sol (dispersie coloidală într-un lichid) și gel (fază semisolidă)

Incompatibilitate polimer-polimer. Incompatibilitatea polimer-polimer apare datorită faptului că doi polimeri diferiți chimic, dizolvați într-un solvent comun, sunt incompatibili și nu se amestecă în soluție, formând două faze lichide distincte, una bogată în polimerul ce joacă rol de înveliș, iar alta bogată în cel de-al doilea polimer (polimerul incompatibil – ales doar pentru a se forma două faze; prin urmare se utilizează în concentrații minime și rămâne ca impuritate în capsula finală). [103, 164, 165].

Încapsularea are loc astfel (figura 2.2.10): dispersarea materialului de miez într-o soluție fierbinte (80°C) de etilceluloză în ciclohexan, apoi adăugarea de polietilenă cu masă moleculară mică, incompatibilă cu etilceluloza, ceea ce induce separarea fazelor, una bogată în etilceluloză, iar cealaltă bogată în polietilenă. Materialul de miez, neafectat de ciclohexan la 80°C, este apoi dispersat în acest sistem bifazic. Deoarece etilceluloza este mult mai polară decât polietilena, ea se va adsorbi preferențial pe suprafața materialului de miez (mai polar de obicei) și va determina formarea unui înveliș subțire. La răcire, etilceluloza precipită, cu obținerea microcapsulelor care se pot apoi separa. Un exemplu de astfel de încapsulare este aspirina și clorura de potasiu (KCl). [103, 164, 165].

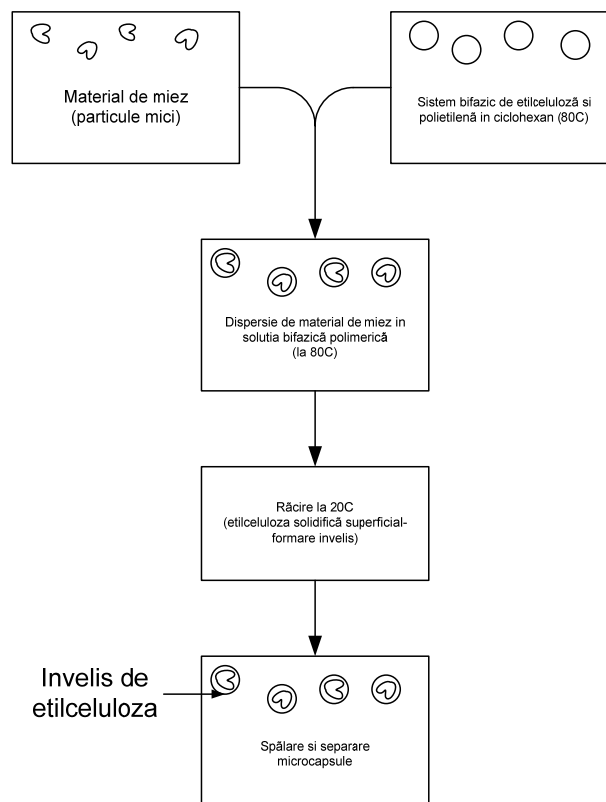
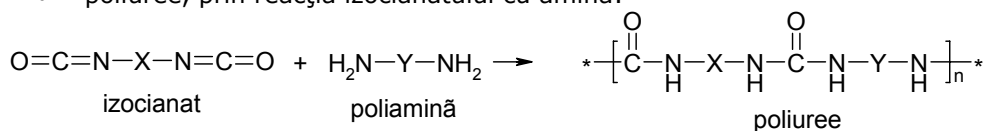


Figura 2.2.10. Încapsulare prin separare fazelor polimer-polimer incompatibili [103]

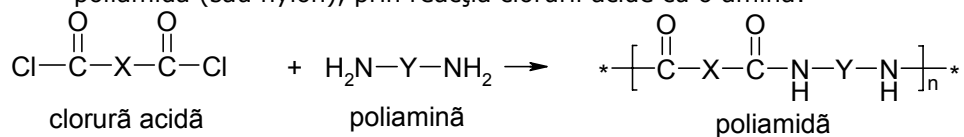
Polimerizare interfacială. Polimerizarea interfacială presupune formarea învelișului capsulelor la/pe suprafața picăturilor sau particulelor de material de miez prin polimerizarea unor monomeri reactivi. Acest tip de încapsulare se utilizează pentru încapsularea unor soluții apoase, lichide nemiscibile cu apa sau solide. [166].

Încapsularea are loc astfel (figura 2.2.11): dizolvarea monomerului multifuncțional (izocianat: OCN-X-NCO ; clorură acidă: ClOC-X-COCl ; combinații între cele două: OCN-X-COCl) în materialul de miez lichid, dispersarea soluției astfel obținute în picături de dimensiuni stabilite într-o soluție apoasă ce conține agent de dispersie, apoi introducerea unui coreactant (amină multifuncțională) ce determină o polimerizare rapidă la interfață cu generarea capsulelor. Se obțin astfel capsule cu învelișuri din [166]:

- poliuree, prin reacția izocianatului cu amină:



- poliamidă (sau nylon), prin reacția clorurii acide cu o amină:



- poliuretan, prin reacția izocianatului cu alcool:

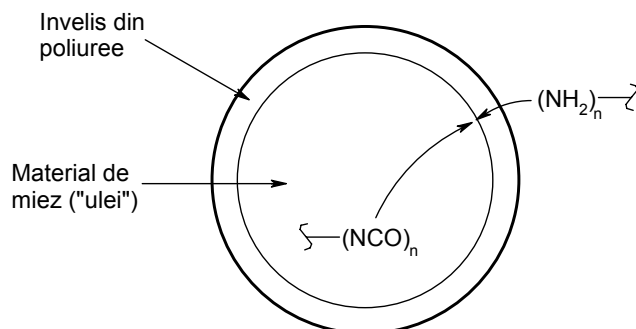
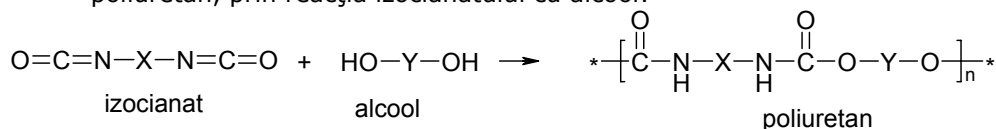


Figura 2.2.11. Microîncapsularea prin polimerizare interfacială (izocianat cu poliamină – poliuree) [103]

Polimerizarea *in situ*. Polimerizarea *in situ* presupune formarea învelișului capsulei datorită polimerizării monomerului adăugat în recipientul de încapsulare. În acest caz nu se introduce nici un alt agent reactiv pentru formarea învelișului. Polimerizarea apare exclusiv în fază continuă și în partea continuă a fazei de la interfața formată prin dispersarea materialului de miez în faza continuă. [167-169]. Exemple de astfel de încapsulări *in situ* sunt cele care utilizează uree și formaldehidă în mediu acid, pentru a încapsula materiale de miez nemiscibile cu apa. La polimerizarea *in situ* se obțin exclusiv capsule de dimensiuni reduse (3-6 μm), utilizate în special pentru încapsularea parfumurilor. Capsule de dimensiuni mai mari se obțin cu ulei mineral, utilizate în cosmetică. În toate cazurile capsulele prezintă o structură miez-înveliș continuă [169].

B. Procese de microîncapsulare tip B

Pulverizare-uscare. Prima etapă în pulverizare-uscare este dispersarea sau emulsionarea materialului de miez într-o soluție concentrată de material de înveliș (40-60% solut). Materialele de miez sunt de obicei nemiscibile cu apa, cum ar fi parfumuri, aromatizanți, vitamine etc. Emulsionarea se realizează până la o dimensiune a particulelor de ulei de 1-3 μm . Materialul de înveliș este de obicei un polimer solubil în apă (de exemplu guma arabică sau amidon modificat). Aceste materiale nu formează soluții foarte vâscoase chiar la concentrații mari la care se utilizează în pulverizare-uscare. Se mai utilizează amestecuri de astfel de polimeri cu amidonuri hidrolizate (maltodextrine) sau gelatine hidrolizate [170].

Încapsularea are loc astfel (figura 2.2.12): dispersia sau emulsia de material de miez în soluția de material de înveliș este transformată în picături în camera încălzită a aparatului de pulverizare-uscare (acest proces poate fi realizat cu ajutorul unui disc rotativ), apoi aceste picături sunt deshidratate rapid în camera de răcire, cu obținerea capsulelor uscate. Capsulele ajung în partea inferioară a camerei de pulverizare-uscare, unde sunt colectate. Capsulele produse astfel sunt de obicei de diametre de 10-300 μm , cu geometrie neregulată, care se pot agrega [170].

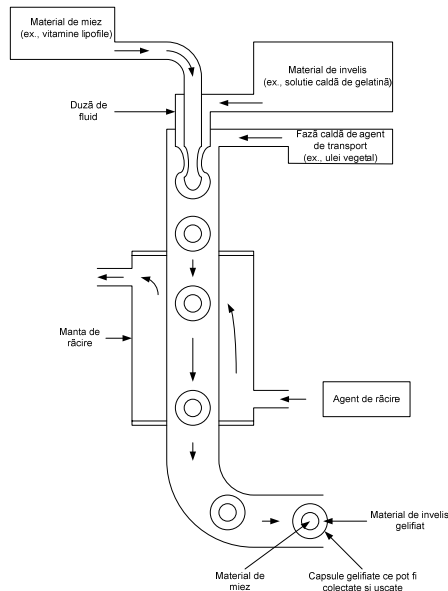


Figura 2.2.12. Încapsulare prin pulverizare-uscare [103]

Avantajele pulverizării-uscării:

- este o tehnologie bine pusă la punct;
- echipamentul este relativ simplu;
- productivitate mare;
- majoritatea materialelor de înveliș sunt aprobate pentru utilizare alimentară;
- materialele de înveliș sunt solubile în apă [170]

Dezavantaje:

- la utilizarea apei ca solvent, pulverizarea-uscarea este limitată la materialele de înveliș solubile sau dispersabile în apă;
- multe materiale de înveliș solubile în apă formează soluții prea vâscoase la concentrațiile necesare procesului și nu pot fi aplicate;
- concentrația de material de miez nu depășește 20-30%;
- prin pulverizare-uscarea pot să rămână suprafețe de material de miez libere [170].

Încapsulare în strat fluidizat. Acest tip de încapsulare se limitează la încapsularea particulelor solide sau a particulelor poroase în care se poate absorbi un material lichid. Sistemele de încapsulare în strat fluidizat funcționează prin suspendarea unui strat sau a unei coloane de particule solide într-un curent de gaz, de obicei aer. Se pulverizează lichidul de înveliș pe particulele individuale, iar capsulele proaspăt obținute sunt recirculate într-o zonă în care are loc uscarea materialului de înveliș, fie prin evaporarea solventului, fie prin răcire. Aceste secvențe de acoperire și uscare se repetă până la obținerea unei grosimi stabilite a învelișului. Încapsularea în strat fluidizat se utilizează preponderent pentru obținerea specialităților medicamentoase din industria farmaceutică [171].

Avantaje:

- posibilitatea de obținere a unui număr foarte mare de tipuri de capsule bioactive;
- posibilitatea utilizării ca material de înveliș a materialelor de înveliș topite, ca dispersii apoase, ca soluții organice sau ca soluții apoase;
- se pot utiliza unele tipuri de polimeri ca material de înveliș pentru medicamente, rezistenți la acidul gastric din stomac (pH 2), dar degradați de fluidul intestinal (pH 7) [171].

Există trei tipuri de procese în strat fluidizat: pulverizare de sus, pulverizare tangențială și pulverizare de jos. Acestea diferă prin localizarea duzelor de pulverizare a materialului de înveliș. În figura 2.2.13 sunt prezentate procesele ce utilizează pulverizarea de sus și pulverizarea de jos. În prima variantă (figura 2.2.13A) materialul de înveliș este pulverizat de sus în stratul fluidizat, picăturile pulverizate astfel mișcându-se în contracurent cu gazul de fluidizare, determinând impactul acestora cu particulele ce urmează a fi încapsulate (materialul de miez). Cele mai utilizate materiale de înveliș pentru acest tip de încapsulare sunt unii polimeri pentru medicamente și grăsimile [171].

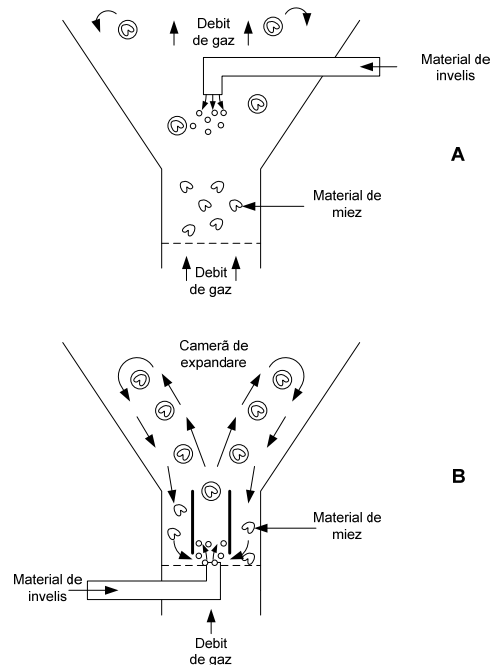


Figura 2.2.13. A) Încapsularea în strat fluidizat cu pulverizare de sus; **B)** Încapsularea în strat fluidizat cu pulverizare de jos [103]

În unitățile ce utilizează pulverizarea tangențială și pulverizarea de jos, picăturile de material de înveliș au aceeași direcție ca și particulele ce urmează a fi încapsulate, distanța parcursă până la impact fiind mică. Evaporarea solventului este minimizată, obținându-se un film de înveliș mult mai uniform comparativ cu varianta pulverizării de sus. În figura 2.2.13B este prezentat un astfel de sistem de încapsulare în strat fluidizat cu pulverizare de jos, utilizat în special pentru obținerea preparatelor medicamentoase. Plăcile de distribuție a gazului direcționează particulele ce urmează a fi încapsulate într-o mișcare circulară, în care ele intră în contact cu picăturile de material de înveliș, iar când ajung la partea superioară a unității materialul de înveliș se solidifică prin evaporarea solventului sau prin răcirea grăsimii topite. Acest ciclu se repetă până la atingerea unei anumite mase a capsulelor obținute. Dezavantajul acestei încapsulări este timpul mai mare de încapsulare, însă prezintă avantajul unei uniformități a capsulelor obținute [171].

Extrudare centrifugală. În acest tip de încapsulare materialele de miez și de înveliș, lichide nemiscibile, sunt pompate printr-o duză ce se rotește cu viteză mare, ceea ce determină apariția a două coloane de lichid (una inelară iar cealaltă cilindrică) ce se rupe spontan în particule sferice imediat la ieșirea din duză (figura 2.2.14). Fiecare picătură conține o regiune de miez continuă, înconjurată de un lichid de acoperire. Dacă materialul de acoperire este o topitură relativ vâscoasă, ce cristalizează rapid la răcire (ceruri, diverși polimeri) picăturile se solidifică la simpla cădere și colectare. Cele mai potrivite materiale de miez sunt soluțiile apoase, deoarece sunt nemiscibile cu cerurile sau cu alte materiale utilizate pentru încapsulare în topitură.

Dacă picăturile prezintă un material de înveliș format dintr-o soluție apoasă de polimeri ce pot gelifica rapid, atunci acestea sunt colectate într-o baie de gelifiere. Este cazul soluțiilor apoase de alginat de sodiu care se introduc în băi de gelifiere formate din soluție apoasă de CaCl_2 . Materialele de miez potrivite pentru astfel de încapsulări sunt uleiurile nemiscibile cu apa [172].

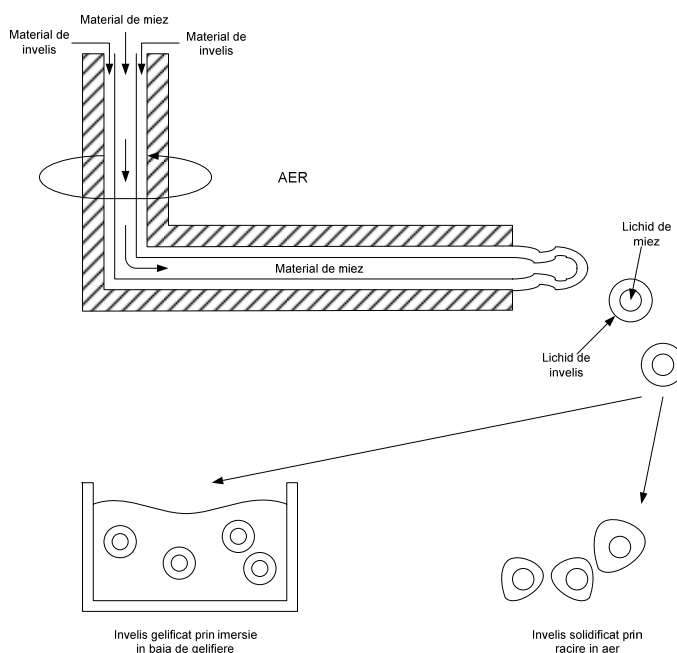


Figura 2.2.14. Încapsulare prin extrudare centrifugală [103]

Separarea din suspensie pe sisteme rotative. În procesul de obținere a microcapsulelor prin separare din suspensie pe sisteme rotative, materialul de miez este dispersat într-un lichid de înveliș, iar dispersia este trecută pe un disc rotativ. Particulele acoperite de filmul format din materialul de înveliș sunt aruncate afară de pe marginea discului rotativ, împreună cu picături de material de miez pur. După solidificarea filmului de acoperire (de exemplu prin răcire) se obțin microcapsule individuale. De asemenea, se solidifică și picăturile de material de miez pur care sunt colectate într-o zonă separată (figura 2.2.15) [173].

Această tehnologie este rapidă, ieftină, de productivitate mare și permite încapsularea unei mari varietăți de materiale bioactive solide, obținându-se microcapsule cu diametre medii de 150 μm . Pentru obținerea unei geometrii sferice a microcapsulelor, procesul presupune o etapă de granulare înaintea încapsulării [173].

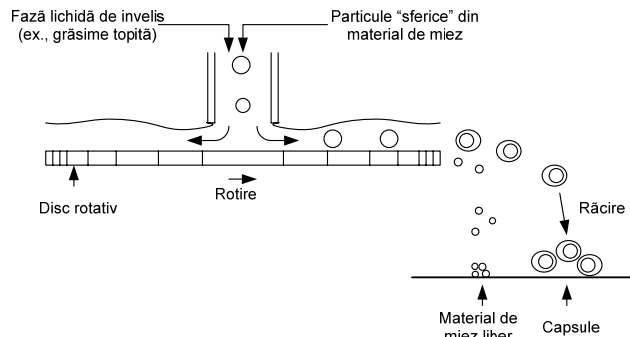


Figura 2.2.15. Încapsularea prin separare din suspensie pe sistem rotativ [103]

2.2.2.2. Procese de obținere a nanocapsulelor (complecși de incluziune ai ciclodextrinelor)

2.2.2.2.1. Mecanismul formării complecșilor de incluziune

Ciclodextrinele au o importantă capacitate de a forma complecși de incluziune cu diverși compuși care nu pot forma legături covalente. În general între ciclodextrine și compusul „oaspete” pot apărea următoarele tipuri de interacțiuni/legături:

- eliberarea unei „energii înalte” din cavitate;
- asocierea unui „oaspete” nepolar cu cavitatea nepolară (interacțiune hidrofobă);
- eliberarea tensiunii de conformație în inel;
- forțe van der Waals;
- legături de hidrogen;
- interacțiuni dipol - dipol;
- forțe de dispersie London [13, 104, 106, 174-179].

Selectarea compusului „oaspete” se face funcție de diametrul cavității ciclodextrinelor care depinde de numărul grupărilor glucopiranozice (ex: α -ciclodextrina 6 grupări glucopiranozice, β -ciclodextrina 7 grupări glucopiranozice, iar γ -ciclodextrina 8 grupări glucopiranozice). De exemplu, acidul propionic este compatibil doar cu α -ciclodextrinele și nu cu cavitățile mai mari ale β - și γ -ciclodextrinelor. Naftalina este prea mare pentru α -ciclodextrină, dar se potrivește în cavitatea γ -ciclodextrinei [13, 104, 106, 174-179].

Formarea complecșilor nu necesită întotdeauna includerea în întregime a moleculei „oaspete” în cavitatea ciclodextrinei. Chiar și moleculele foarte mari pot fi complexate, atâta timp cât ramificațiile lor, indiferent de lungime, se potrivește în cavitatea ciclodextrinei.

Polaritatea reprezintă iarăși un alt factor important în formarea complexului, datorită moleculelor insolubile sau mai puțin solubile în apă. Materialele amfotere pot fi excepții. De exemplu, acidul benzoic este foarte bine complexat de β -ciclodextrine, cu inelul său benzenic în interiorul cavității ciclodextrinei și gruparea carboxi formând o legătură de hidrogen cu una din grupările hidroxil secundare ale ciclodextrinei.

Când ciclodextrinele sunt modificate cu lanțuri laterale ionizabile, interacțiunea electrostatică între grupările ionice ale "gazdei" și "oaspetelui" poate fi un factor important în complexare. Este important de menționat că reacția de complexare între o ciclodextrină și o moleculă "oaspete" în soluție este un proces rapid și reversibil. Orice factor care ar influența echilibrul dinamic poate afecta stabilitatea complexului obținut [13, 104].

Creșterea temperaturii mărește agitarea moleculară, de aceea favorizează disocierea complexelor de incluziune ai ciclodextrinelor. Pe de altă parte, o temperatură ridicată poate crește solubilitatea unei ciclodextrine și a moleculei "oaspete", permițând un contact molecular suficient de îndelungat pentru a se forma complexul. Menținerea unui echilibru între aceste efecte este foarte important pentru prepararea complexelor, în special dacă este folosită β -ciclodextrina [13].

Alegerea solvenților este limitată datorită posibilității lor de a intra în competiție cu molecula "oaspete" în vederea ocupării cavității ciclodextrinei, sau în vederea formării unui compus ternar. Moleculele mici și polare, cum ar fi metanolul sau acetona sunt preferate, și în același timp se recomandă folosirea unei cantități minime de solvent [104, 106, 174-179].

Mecanismul de formare al compușilor de incluziune poate fi explicat, în mediul apos, astfel (figura 2.2.16).

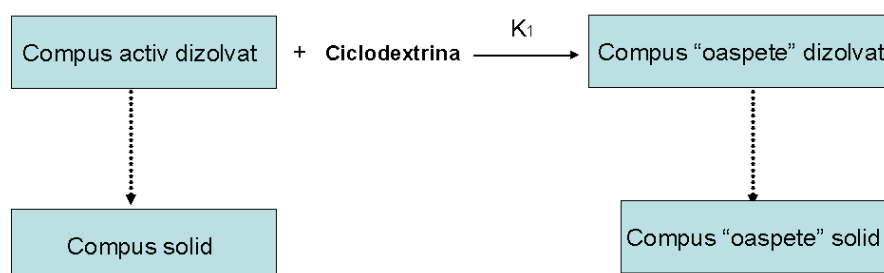


Figura 2.2.16. Mecanismul formării compusului de incluziune în mediul apos [13]

Constanta K_1 – constanta de stabilitate, guvernează viteza de formare a supramoleculii, cu tendința compusului „oaspete” de a disocia el însuși în prezența apei [13].

Ciclodextrinele sunt capabile să interacționeze cu o mare varietate de compuși ionici și moleculari. Compușii de incluziune rezultați aparțin tipului de complecși "gazdă-oaspete". Pentru formarea complexelor ciclodextrinelor atât gazda (ciclodextrina), cât și molecula „oaspete” (compusul aromatizant, de exemplu) trebuie să îndeplinească anumite cerințe, una dintre acestea fiind complementaritatea situsurilor de legare ale celor două molecule din punct de vedere steric și electronic. Trăsătura caracteristică a moleculei gazdă este faptul că situsurile de legare sunt orientate după aceeași direcție spațială, în timp ce în molecula oaspete situsurile de legare sunt divergente în complexul format. Aceste stări de fapt reprezintă asocierea situsurilor de legare convergente și divergente prin care are loc formarea complexului de tip gazdă – oaspete [13, 104].

2.2.2.2.2. Condițiile necesare pentru formarea complexului

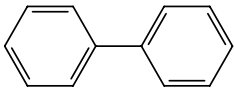

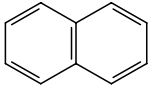
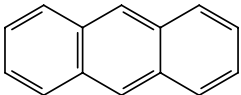
Compatibilități geometrice. Ciclodextrinele sunt capabile să formeze complecși de incluziune cu compuși ce au dimensiuni compatibile cu dimensiunile cavității. Factorii geometrici sunt de cele mai multe ori decisivi în determinarea tipului de moleculă „oaspete” ce poate penetra în interiorul cavității ciclodextrinei [13, 106].

Cele trei tipuri de ciclodextrine uzuale au diametre interioare diferite și sunt capabile să încapsuleze molecule de diferite mărimi (tabel 2.2.3) [13, 104, 106, 107, 180].

Structurile complecșilor de incluziune ai ciclodextrinelor diferă semnificativ în stare cristalină față de soluție. În soluție moleculele „oaspete” rămân în cavitate și întregul complex este înconjurat de un înveliș solvatant de molecule de apă. În stare cristalină, moleculele oaspete se pot acomoda nu doar în cavitatea moleculei gazdă, ci și în cavitățile intermoleculare formate de rețeaua cristalină, sau între două molecule complexante, tip *sandwich*. Unele dintre moleculele gazdă rămân neocupate, sau ele vor include apă [13, 104, 106, 107, 180].

Astfel de „intercalări” vor îmbunătăți raportul molar în favoarea moleculei „oaspete”, în timp ce prezența ciclodextrinelor „goale” va duce la un efect opus. Deci, complecșii cristalini ai ciclodextrinelor vor fi rareori de compoziție stoichiometrică, în timp ce în soluție raportul molar este de obicei 1:1 [13, 104, 106, 107, 180].

Tabel 2.2.3. Abilitatea ciclodextrinelor de formare a unor complecși cu diferite molecule oaspete

Denumire	Structură	α -CD	β -CD	γ -CD
Acid propionic	$\text{CH}_3\text{—CH}_2\text{—COOH}$	+	-	-
Acid butiric	$\text{CH}_3\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—COOH}$	+	+	-
Bifenil		+	+	+
Ciclohexan		+	+	+
Naftalen		-	+	+
Antracen		-	-	+
Cl_2		+	-	-
Br_2		+	+	-
I_2		+	+	+

Moleculele incluse sunt în mod normal orientate în molecula gazdă într-o astfel de poziție încât să realizeze un contact maxim între partea hidrofobă a „oaspelui” și cavitatea nepolară a ciclodextrinei. Partea hidrofilă a moleculei „oaspelui” rămâne, pe cât posibil, în afara complexului. Acest lucru asigură un contact maxim atât cu solventul, cât și cu grupele hidroxil ale gazdei [13, 104, 106, 180].

Există posibilitatea de formare a complexelor și cu molecule semnificativ mai mari decât cavitatea ciclodextrinelor. Acest lucru se realizează astfel încât doar unele grupări sau părți de lanț să penetreze cavitatea [13, 177].

Polaritatea și sarcina. Formarea complexelor cu ciclodextrine depinde, de asemenea, de polaritatea moleculei „oaspelui”. Moleculele puternic hidrofile (foarte solubile în apă), puternic hidratate sau cele ionizate nu sunt complexabile sau se complexează în mică măsură. Doar moleculele care sunt mai puțin polare decât apa pot fi complexate de ciclodextrine [13, 107].

Stabilitatea unui complex este proporțională cu caracterul hidrofob al substituenților, astfel că substituenții metil sau etil aflați în poziții favorabile vor determina creșterea stabilității. O grupare metil aflată în poziție *ortho* față de o grupare carbonil va avea un efect de ecranare asupra grupării carbonil hidrofile, crescând astfel caracterul hidrofob al întregii molecule. Un substituent similar aflat în poziție *para* va avea un efect relativ slab. Grupele hidroxil împiedică formarea complexului, dar efectele hidrofile ale acestora scad în ordinea *ortho* > *meta* > *para*. În cazul grupelor amino este foarte important dacă ele se găsesc în forma NH_2 sau NH_3^+ . Speciile ionice sunt de obicei defavorabile formării complexului [13].

Forțele coezive prea puternice dintre moleculele oaspelui vor împiedica separarea acestora, aceasta fiind o precondiție a incluziunii. O măsură a coeziunii dintre moleculele unei substanțe cristaline este punctul său de topire. Dacă acesta este mai mare de 250°C de obicei nu se pot obține complecși stabili ai ciclodextrinelor [13, 107].

Mediul. În principiu, nu este necesară prezența vreunui solvent pentru formarea complexului. Amestecând ciclodextrina cristalină pudră cu molecula „oaspelui”, de exemplu β -ciclodextrina cu acid salicilic și depozitând amestecul într-un recipient închis la temperatura ambiantă câteva luni va rezulta complexul de acid salicilic: β -ciclodextrină. Procesul poate fi monitorizat prin studiul cu raze X [13].

Cu molecule „oaspelui” nesublimabile acest proces nu este practicabil deoarece este prea lent. Complexarea se realizează de obicei în prezența apei. În schimb, procesul este mult mai rapid atunci când formarea complexului apare în soluție, și totuși substanțele care au o solubilitate mai bună, sunt în general complexate mai slab. Moleculele „oaspelui” complexate mai ușor sunt mai puțin solubile în apă. Pentru a obține un echilibru în soluție apoasă este nevoie fie de un timp de reacție mai mare, fie molecula „oaspelui” trebuie să fie dizolvată într-o cantitate mică de solvent organic. Selectarea solventului este restricționată: cu excepția câtorva molecule mici și a unor solvenți puternic hidrofilii, cum ar fi metanol, 2-metoxietanol, etilenglicol, dietilenglicol, glicerină etc., majoritatea nu pot fi aplicați deoarece formează complecși stabili, de exemplu piridina sau toluenul. Un inconvenient ar putea să apară atunci când, complexând molecula „oaspelui”, unii complecși ai solvenților ar putea rămâne în produsul separat.

Acești solvenți nu pot fi îndepărtați: ei sunt o parte integrantă a produsului fie drept complex ciclodextrină:solvent, fie ca un complex ternar, legați în cavitatea ciclodextrinei, pe lângă molecula „oaspete” principală. De exemplu, mulți complecși ai ciclodextrinelor cu medicamente sunt obținuți în prezență de etanol, care poate fi găsit în aceste produse în proporție de 0.1-2.0%. Dietileterul nu va forma singur un complex stabil, ci doar împreună cu o moleculă „oaspete” liniară, de exemplu un acid gras. Încălzind complexul ternar cu dietileter la 105°C câteva ore, nu se va putea îndepărta solventul [13, 107].

În general, prezența solvenților organici nu este dorită, dar în multe cazuri este inevitabilă. Moleculele „oaspete” mai puțin solubile nu pot fi complexate în proporții acceptabile fără folosirea unui solvent. Un complex de β -ciclodextrină:vitamina D₃ nu poate fi preparat fără folosirea etanolului sau a acetonei. Efectul solventului asupra incluziunii a fost studiat la complexarea etanol/pirenului și etanol/carboxil-adamantanului cu β -ciclodextrină [13].

Prezența unui solvent deshidratant favorizează separarea produsului cristalin. Filtrarea și uscarea produsului izolat este rapidă și produsul este, în general, o pudră fină. Fără solvenți, filtrarea este, în cele mai multe cazuri, mai puțin rapidă și după uscare complexul se prezintă sub formă de clustere tari, care se supun unor operații mecanice pentru obținerea sub formă de pulbere [13].

Stabilitatea și solubilitatea complexului format pot fi influențate de săruri anorganice, în parte datorită formării unor complecși sferici externi cu grupele hidroxil ale ciclodextrinei și, pe de altă parte, datorită efectului lor de deshidratare. Primul proces duce la creșterea solubilității ciclodextrinelor, iar cel de-al doilea reduce solubilitatea complexului. Formarea complexului în stare solidă este spontană din punct de vedere termodinamic, dar stabilitatea complexului este mai mare în soluții apoase [13].

2.2.2.2.3. Metode de preparare a complecșilor ciclodextrinelor

Termenul de „stabilitate a complexului” se referă la echilibrul de asociere/disociere dintre „oaspete” și gazdă în soluție. Nu există însă o corelație directă între stabilitatea complexului în soluție și solubilitatea acestuia. În multe cazuri constanta de stabilitate a complexului este calculată din prima parte a izotermelor de solubilitate (solubilitatea „oaspetelui” funcție de concentrația ciclodextrinei, după atingerea echilibrului). În cele mai multe cazuri solubilitatea prezintă o applatizare sau chiar o scădere după depășirea concentrației determinante de ciclodextrină. Acest lucru se explică prin atingerea solubilității limită a complexului sau, în multe cazuri, prin stoichiometrie multiplă, unde se pot detecta rapoarte de 1:1, 1:2 sau chiar mai mult, în funcție de concentrații. Complecșii cu stabilitate scăzută pot cristaliza ușor din soluție, dar complecșii cu stabilitate ridicată sunt mai dificil de izolat. Nu există metode generale de preparare a complecșilor ciclodextrinelor. Metoda trebuie să fie „croită” pentru molecula oaspete și pentru necesități; se lucrează fie la scară redusă, în laborator, fie la scară mare, pentru producția industrială [13, 107, 188-190, 192-194].

Prepararea complexului în soluție. Prepararea complexelor de incluziune este simplă, constând într-o agitare sau amestecare a unei soluții apoase de ciclodextrină cu molecula „oastete”, care este adăugată în soluția caldă de ciclodextrină. După atingerea echilibrului apa poate fi îndepărtată prin “freeze-drying”, “spray-drying” sau cu ajutorul altor metode potrivite. Se poate proceda, de asemenea, la separarea prin filtrare [13, 107, 188-190, 192-194].

Cristalizarea complexului poate fi urmărită prin înregistrarea turbidității soluției de ciclodextrină în timpul răcirii. Atât ciclodextrina, cât și molecula oaspete prezintă curbe de turbiditate individuale bine definite, din care se poate determina temperatura la care începe cristalizarea. Dacă temperatura de cristalizare a amestecului diferă de cea caracteristică pentru β -ciclodextrina pură în condițiile date, este foarte probabilă formarea complexului de incluziune [13, 107, 188-190, 192-194].

În figura 2.2.17 se prezintă curbele de turbiditate pentru soluții apoase de 1 – 7% de β -ciclodextrină. Se poate observa faptul că nu are loc cristalizarea la 1 – 2% β -ciclodextrină chiar și la 2°C, în timp ce la 3% β -ciclodextrină cristalizarea începe la 13°C și este completă la 10°C. La soluții mult mai concentrate cristalizarea începe la temperaturi mai mari și maximum de turbiditate se atinge într-un interval de 2°C. [13].

Într-o soluție de 3% β -ciclodextrină la pH 13 nu apare cristalizarea nici chiar la 0°C, la pH 8.5 precipitarea începe la 7°C și devine completă în timp scurt. La pH 1 (HCl 0.1N) cristalizarea începe la 16°C și este finalizată la 10°C. La răcirea unei soluții apoase de 3% β -ciclodextrină de la 60°C cu 4°C în timp de 1.5 ore, cristalizarea are loc în intervalul 8 – 6°C. Dacă răcirea se realizează în 3, respectiv 6 ore, cristalizarea este completă în intervalul 13 – 10°C și 19 – 15°C [13].

Multe sisteme aromatizante sunt atât de puțin solubile în apă (de exemplu uleiul de chimen) încât la introducerea soluției acestora într-un solvent oarecare în soluția apoasă de β -ciclodextrină, turbiditatea maximă apare aproape instantaneu. Alte arome, cum ar fi anetolul sau aroma multicomponent din zmeură, conduc la curbe de cristalizare bine definite. Formarea complexului cu vanilină solidă poate fi studiată în soluție etanolică: complexul ciclodextrinei nu precipită din soluție etanolică 10% până când nu se adaugă NaCl. Un complex de raport molar 1:1 al vanilinei va precipita chiar și fără adaos de NaCl dacă soluția este stocată la 2°C timp de 16 ore.

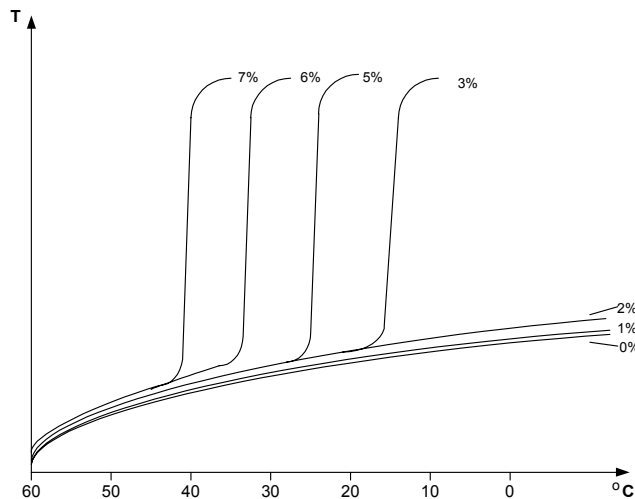


Figura 2.2.17. Curbele de turbiditate pentru soluțiile apoase de 1-7% ale β -ciclodextrinei ca funcție de scăderea temperaturii

Complecșii cu aromatizanți au fost obținuți prin adăugarea compușilor aromatizanți (uleiuri esențiale) dizolvați în etanol sub agitare puternică, la o soluție apoasă saturată de β -ciclodextrină la 50°C. Este important ca adăugarea soluției de compus aromatizant să se facă în picături pentru a preveni formarea unei emulsii. Cu substanțele aromatizante care conduc rapid la formarea unei emulsii la adăugarea în soluția apoasă de ciclodextrină, complexul se poate prepara într-o soluție etanolic – apoasă de 30%. În acest amestec de solvenți ciclodextrina are solubilitate maximă [13, 107, 188-190, 192-194].

Prepararea în suspensie. Pentru prepararea complexului în suspensie ciclodextrinele nu trebuie să fie dizolvate complet, complexarea completă realizându-se în 2-24 ore printr-o agitare continuă la temperatura ambiantă. Pentru scopuri industriale aceasta este cea mai recomandată metodă [13].

Prepararea prin amestecare. În acest caz ciclodextrina este amestecată în pastă la care se adaugă o cantitate mică de apă în care a fost adăugat compusul „oaspete” fără alt solvent sau cu o cantitate mică de etanol în care a fost suspendat compusul oaspete. Întrucât complexul ciclodextrină – apă este mai puțin favorabil din punct de vedere energetic decât complexul de incluziune ce urmează să se formeze cu molecula oaspete și rețeaua cristalină este diferită de cea a complexului ciclodextrinei cu apă, reacția tinde spre finalizarea incluziunii cu „oaspetele”. Datorită structurilor cristaline diferite, straturile moleculare ale complexului de incluziune, formate la suprafața ciclodextrinei, se disociază de cristalul ciclodextrinei. Întregul cristal de ciclodextrină devine dezorganizat și se transformă în complexul de incluziune [13, 107, 188-190, 192-194].

Prepararea complexilor cu derivați de ciclodextrine foarte solubili. În soluție apoasă de derivați de ciclodextrine foarte solubili complexarea poate fi realizată prin simplă agitare cu compusul „oaspete” sau prin agitare energetică până la atingerea solubilității maxime. Compusul „oaspete” nedizolvat este îndepărtat prin filtrare sau centrifugare și soluția apoasă limpede este evaporată la sec sub vid sau, preferabil, prin răcire – uscare (freeze-drying). S-ar putea să fie necesară dizolvarea compusului „oaspete” în etanol și, după amestecare cu soluția complexantă apoasă, etanolul este îndepărtat la vid [13].

Prepararea complexului prin topire. Complecșii de incluziune ai ciclodextrinelor pot fi obținuți și prin topirea compusului „oaspete” și amestecarea cu ciclodextrina fin mărunțită [13, 107, 188-190, 192-194].

2.2.3. Analiza micro- și nanocapsulelor

Mulți compuși nu pot fi complexați, iar alții formează complecși de incluziune veritabili în soluție, dar nu și în stare solidă. Produsul solid izolat poate fi doar un amestec fin dispersat de compus gazdă și „oaspete”. În multe cazuri, produsul este un amestec de complex, compus gazdă necomplexat și „gol” (ciclodextrină hidratată). Trebuie deci să se determine:

- conținutul de produs „oaspete” al produsului;
- este „oaspetele” inclus cu adevărat în cavitatea ciclodextrinei;
- cantitatea sau raportul de compus „oaspete” complexat și necomplexat [157].

2.2.3.1. Metode spectrofotometrice pentru analiza a compusului „oaspete”

Spectrofotometria (UV-VIS). Variația culorii unui sistem odată cu modificarea concentrației unor componente reprezintă baza analizei colorimetrice, un termen des utilizat în cazul analizei spectrofotometrice în domeniul vizibil. Dacă se măsoară intensitatea radiației emise de un compus în soluție, în scopul determinării concentrației acestuia, avem de-a face cu analiza fluorimetrică. Prin extinderea în ultraviolet a domeniului pentru lungimea de undă a radiației folosite în analiză se ajunge la analiza spectrofotometrică propriu-zisă [157, 181].

2.2.3.2. Metode cromatografice de analiză a compusului „oaspete”

Gaz cromatografia permite separarea unui amestec de compuși în constituenți individuali prin trecerea unei faze gazoase peste o fază staționară. Faza staționară poate fi solidă sau lichidă, astfel că mecanismele de separare sunt fie partiția, fie adsorbția. Există două tipuri de cromatografie de gaze: cromatografia gaz-lichid (GLC) și cromatografia gaz-solid (GSC). Această terminologie a fost înlocuită cu termenul mai simplu de gaz cromatografie (GC) [116, 157].

Cromatografia de lichide (LC). Termenul de cromatografie de lichide acoperă un domeniu mai mare de sisteme cromatografice, care include cromatografiile lichid-solid (LSC), lichid-lichid (LLC), cu schimbători de ioni și de excluziune moleculară, toate necesitând fază mobilă lichidă. Cromatografia lichidă pe coloană, clasică, utilizează coloane de sticlă de diametru mare, umplute cu fază staționară fin divizată, prin care era percolată faza mobilă sub acțiunea gravitației [56, 116, 157].

Astăzi se utilizează sisteme de înaltă performanță, cunoscute ca HPLC (high performance/pressure liquid chromatography), care prezintă următoarele avantaje:

- putere de rezoluție mare;
- viteză mare de separare;
- monitorizare continuă a efluentului din coloană;
- măsurare cantitativă precisă;
- analize repetate și reproductibile, utilizând aceeași coloană;
- automatizarea procedurii analitice și a introducerii probei.

Cromatografia în strat subțire. Cromatografia în strat subțire poate fi, de asemenea, folosită pentru verificarea formării complexului, întrucât valorile R_f sunt alterate considerabil de complexare. Acestea sunt considerabil diminuate, relevând faptul că complexul este suficient de stabil în amestec cu solventul utilizat. Valori R_f mai mici au fost, de asemenea, observate la compararea amestecurilor realizate mecanic cu moleculele „oaspete” pure, indicând faptul că formarea complexului poate avea loc și în timpul dezvoltării cromatogramei. Valorile R_f obținute cu amestecuri mecanice se situează între valoarea R_f a moleculei oaspete pure și cea a complexului [56].

2.2.3.3. Metode termooanalitice

În multe cazuri, astfel de metode au fost potrivite pentru determinări cantitative. Acestea oferă posibilitatea controlului calității complexelor (estimarea procentului de substanță „oaspete liberă” din produs).

- (a) *Termogravimetria (TG)* și *Termogravimetria Diferențială (DTG)* vor furniza date cantitative privind pierderea de masă odată cu creșterea temperaturii [182]
- (b) *Calorimetria de Scanare Diferențială (DSC)* este o măsură a variației cantității de căldură eliberată sau absorbită de probă în timpul unui program de temperatură [183]
- (c) *Analiza Eliberării de Gaz (EGA)* reprezintă măsurarea specifică a vitezei evoluției gazelor sau vaporilor ce părăsesc proba în timpul unui program de temperatură. Prin utilizarea măsurătorilor EGA poate fi estimată cantitatea de compus „oaspete” necomplexat [184].

Comportarea termică a β -ciclodextrinei este ilustrată în figura 2.2.18. Peste 100°C probele pierd conținutul lor de apă în curent de argon uscat. Pe curba DSC se poate observa un pic endotermic la 220°C, ce reprezintă o transformare reversibilă a β -ciclodextrinei.

Descompunerea termică, însoțită de oxidarea în aer, pornește de la 250°C, iar topirea apare aproape de 300°C (curba DSC). Aceasta influențează forma curbelor DTG și EGA datorită scăderii temporare a vitezei de descompunere. Autoaprinderea are loc peste 300°C [184].

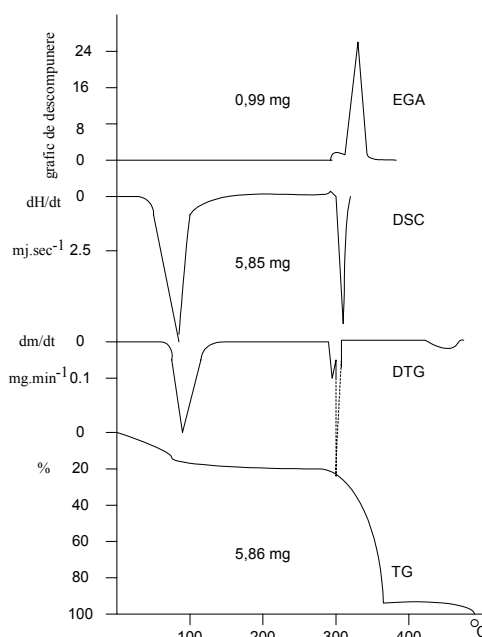


Figura 2.2.18. Curbele termoanalitice ale β -ciclodextrinei. EGA – Evolved Gas Analysis (TEA – Thermal Evolution Analysis); DSC – Differential Scanning Calorimetry; DTG – Differential ThermoGravimetry; TG – ThermoGravimetry [184]

2.2.3.4. Alte metode termice

- (a) *Uscarea*. Substanțele ușor volatile cum sunt solvenții, uleiurile volatile aromatizante etc. pot fi îndepărtate cantitativ prin uscarea produsului în jur de 100°C (atmosfera sau vid). Compușii „oaspete” complexați sunt reținuți la această temperatură cu o eficiență foarte bună. De exemplu, prin încălzirea unui amestec mecanic de ulei de mușețel și β -ciclodextrină la 150°C timp de 48 de ore nu s-a observat nici un component al uleiului de mușețel nemodificat. La tratarea similară a unui complex β -ciclodextrină – ulei de mușețel se rețin mai mult de 70% din componenții „oaspete” [56];
- (b) *Sublimare în vid*. Substanțele sublimabile pot fi studiate foarte eficient prin această metodă. Compusul „oaspete” necomplexat poate fi recuperat cantitativ din sistemul de răcire în timp ce compusul „oaspete” este foarte puternic legat. Prin această metodă pot fi determinate, de exemplu, unele substanțe aromatizante (mentol, camfor), medicamente (menadiona, acid salicilic) [56];

- (c) *TAS-cromatografia* (*Thermomikro-Abtrenn-Transfer und Auftragsverfahren von Substanzen, aplicarea și transferul substanțelor prin separare termomicro*). Această tehnică furnizează informații privind complexarea diferiților componenți în cazul unui sistem aromatizant multicomponent. Comportarea uleiului de măghian este tipică pentru acest tip de analiză. În formă pură sau în amestec cu β -ciclodextrină acesta este antrenat în totalitate la 100°C. Când este complexat este pentru prima dată detectat cromatografic la temperaturi de peste 160°C [183];
- (d) *Termofractografia* este similară metodei TAS. În această tehnică ambele capete ale tubului sunt deschise și în loc de vapori de apă se utilizează un curent continuu de azot pentru transportul substanțelor volatile pe placa TLC înainte de dezvoltare [183];
- (e) *Cromatografia de gaz pirolitică* este similară metodelor descrise mai sus. Se utilizează fie o conectare continuă, fie etapizată, la cromatograf, ce permite detectarea compuşilor volatili și conduce la date cantitative ca funcție de temperatură [56].

2.2.3.5. Difracția de raze X

Moleculele „oaspete” lichide nu produc forme de difracții, deși există diferențe între acestea față de ciclodextrina necomplexată, formarea complexului putând fi considerată probabilă. În cazul moleculelor „oaspete” lichide nevolatile, difracția de raze X este foarte utilă. Când componentul „oaspete” este o substanță solidă, se poate face o comparație între difractogramele complexului presupus și un amestec mecanic de „oaspete” și ciclodextrină (cristalizată în condiții identice ca și complexul). Când difractogramele sunt diferite (picurii caracteristici ai unuia sau mai multor componente dispar și apar noi picuri ca rezultat al experimentului de complexare), formarea complexului este foarte probabilă. În cazul moleculelor mici structura cristalului poate fi identică cu cea a ciclodextrinei hidratate [185].

Analiza structurală prin cristalografie de raze X este cea mai bună metodă pentru detectarea formării complexului. Se poate stabili o relație geometrică precisă între moleculele „oaspete” și gazdă și se pot identifica interacțiunile. Această tehnică este însă prea complicată pentru o utilizare de rutină [185].

3. CONTRIBUȚII PROPRII

3.1. Separarea și încapsularea moleculară a unor biosisteme (uleiuri volatile) din diverse părți anatomice ale unor plante din familia *Compositae*

3.1.1. Introducere

Prezentul studiu abordează posibilitatea de încapsulare și eliberare controlată a unor sisteme bioactive în matrici de încapsulare (ciclodextrine și liposomi), care permit, în plus, obținerea unor forme pulverulente ușor manevrabile, creșterea hidrofiliei produselor, eliberarea lentă (retard) în mediul biologic și prelungirea timpului de acțiune a compușilor bioactivi din plante aparținând familiei *Compositae*.

3.1.2. Materiale și metode

3.1.2.1. Materialele utilizate pentru încapsularea moleculară au fost biosistemele (uleiuri volatile) separate din diverse părți anatomice a cinci plante din familia *Compositae* (mușețel - *Matricaria chamomilla* L., coada șoricelului - *Achillea millefolium* L., anghinare - *Cynara scolymus* L., podbal - *Tussilago farfara* L., armurariu - *Silybum marianum* L.), colectate în primăvara-vara anului 2007 din zona de nord-vest a României (Munții Apuseni). *Soluția standard de alcani liniari C₈ - C₂₀*, necesară determinării indicilor Kovats pentru compușii analizați prin GC-MS, a fost obținută de la firma Fluka Chemie AG. Ciclodextrinele (α și β) au fost achiziționate de la firma Merck. Solvenții utilizați pentru analizele cromatografice (GC-MS și HPLC) au fost de puritate corespunzătoare, respectiv etaloanele existente au fost în majoritatea cazurilor de purități >95%.

3.1.2.2. Separarea biosistemelor (uleiuri volatile). Materialul vegetal utilizat pentru obținerea uleiurilor volatile a fost curățat, mărunțit și supus antrenării cu vapori de apă în condiții standard. Vaporii de apă au fost generați direct, la presiune atmosferică.

Obținerea biocompușilor prin hidrodistilare. În balonul de antrenare (2000 ml) (figura 3.1.1), cu trei găuri se introduce material vegetal și 1200 ml apă. În balonul în formă de pară de 25 ml se introduc 15 ml solvent de extracție (hexan). În ambele baloane se introduce bucățele de porțelan poros și se conectează la instalația de hidrodistilare. Uleiul volatil se colectează în hexan. Balonul de antrenare se încălzește pe baie de ulei la 120 - 130°C, iar balonul cu solvent pe o baie de apă la 59-60°C.

Hidrodistilarea se realizează 2.5-3 ore, după care se răcește sistemul și se colectează extractul din balonul de 25 ml și cel rămas în tubul central sub formă de U, se usucă pe sulfat de sodiu anhidru, se filtrează pe filtru creț și solvenul organic se distilă lent sub vid. Cantitatea de ulei volatil se măsoară și se determină randamentul în ulei brut. De asemenea, au fost determinate caracteristicile fizico-chimice ale uleiurilor.

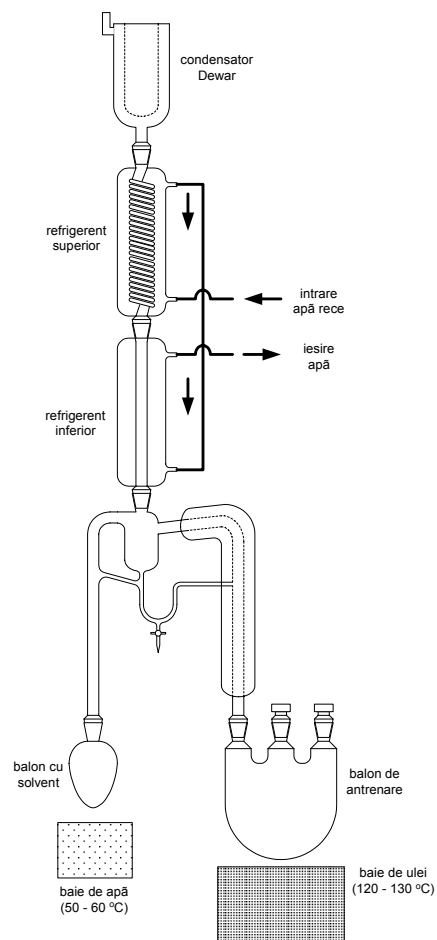


Figura 3.1.1. Instalația de hidrodistilare

Condițiile de extracție ale uleiurilor volatile și caracteristicile fizico-chimice sunt prezentate în tabelele 3.1.1 și 3.1.2.

Tabelul 3.1.1. Condiții de extracție și rezultate obținute la hidrodistilarea probelor de *M. chamomilla*, *A. millefolium* L., *C. scolymus* L., *Tussilago farfara* L. și *S. marianum*

Nr. crt.	Cod	Material vegetal utilizat	m (g)	V (solvent) (ml)	V (apă) (ml)	V (extract) (ml)
1	Cm_FI_UV	<i>M. chamomilla</i> (flori)	100.4	15	1200	1.1
2	Cm_Fr_UV	<i>M. chamomilla</i> (frunze)	100.7	15	1200	0.9
3	Cm_Rd_UV	<i>M. chamomilla</i> (rădăcină)	96.50	15	1200	0.4
4	Cm_Tu_UV	<i>M. chamomilla</i> (tulpină)	100.6	15	1200	0.3
5	Cs_FI_UV	<i>A. millefolium</i> L. (flori)	93.70	15	1200	0.5
6	Cs_Fr_UV	<i>A. millefolium</i> L. (frunze)	99.90	15	1200	0.7
7	Cs_Rd_UV	<i>A. millefolium</i> L. (rădăcină)	99.90	15	1200	0.9
8	Cs_Tu_UV	<i>A. millefolium</i> L. (tulpină)	103.5	15	1200	1.2
9	Ang_FI_UV	<i>C. scolymus</i> L. (flori)	98.40	15	1200	0.9
10	Ang_Fr_UV	<i>C. scolymus</i> L. (frunze)	101.1	15	1200	0.6
11	Ang_Rd_UV	<i>C. scolymus</i> L. (rădăcină)	100.3	15	1200	1.1
12	Ang_Tu_UV	<i>C. scolymus</i> L. (tulpină)	99.50	15	1200	0.8
13	Potb_Fr_UV	<i>T. farfara</i> L. (frunze)	100.1	15	1200	0.8
14	Potb_Rd_UV	<i>T. farfara</i> L. (rădăcină)	100.3	15	1200	0.5
15	Arm_Se_UV	<i>S. marianum</i> (semințe)	51.00	15	1200	0.25

Tabelul 3.1.2. Caracteristici fizico-chimice pentru extractele obținute la hidrodistilarea probelor de *M. chamomilla*, *A. millefolium* L., *C. scolymus* L., *Tussilago farfara* L. și *S. marianum*

Nr. crt	Cod	Ulei volatil	Indice de refracție	Densitate la 20°C
1	Cm_FI_UV	<i>M. chamomilla</i> (flori)	1.4501	0.9117
2	Cm_Fr_UV	<i>M. chamomilla</i> (frunze)	1.4445	0.9007
3	Cm_Rd_UV	<i>M. chamomilla</i> (rădăcină)	1.4349	0.8768
4	Cm_Tu_UV	<i>M. chamomilla</i> (tulpină)	1.4415	0.8754
5	Cs_FI_UV	<i>Achillea millefolium</i> L. (flori)	1.4503	0.9002
6	Cs_Fr_UV	<i>Achillea millefolium</i> L. (frunze)	1.4301	0.8799
7	Cs_Rd_UV	<i>Achillea millefolium</i> L. (rădăcină)	1.4381	0.7966
8	Cs_Tu_UV	<i>Achillea millefolium</i> L. (tulpină)	1.4412	0.9235
9	Ang_FI_UV	<i>Cynara scolymus</i> L. (flori)	1.4438	0.8797
10	Ang_Fr_UV	<i>Cynara scolymus</i> L. (frunze)	1.4399	0.9133
11	Ang_Rd_UV	<i>Cynara scolymus</i> L. (rădăcină)	1.4491	0.9215
12	Ang_Tu_UV	<i>Cynara scolymus</i> L. (tulpină)	1.4516	0.8956
13	Potb_Fr_UV	<i>Tussilago farfara</i> L. (frunze)	1.4411	0.8698
14	Potb_Rd_UV	<i>Tussilago farfara</i> L. (rădăcină)	1.4409	0.9216
15	Arm_Se_UV	<i>S. marianum</i> (semințe)	1.4507	0.9109

3.1.2.3. Degradarea uleiurilor volatile. S-au pipetat în strat subțire și uniform volume de ulei volatil de aproximativ 100 mg (mușețel - *Matricaria chamomilla* L., coada șoricelului - *Achillea millefolium* L., anghinare - *Cynara scolymus* L.) în recipiente de sticlă cu fund plat de dimensiuni 40 x 40 mm², care au fost introduse în cuptor termostatat, cu posibilitate de reglare și măsurare a temperaturii. Probele au fost menținute la temperaturi de 50°C și 100°C timp de două ore, în prezența aerului la presiune de 1 atm și umiditate relativă de 70%. După răcire, probele au fost reluate de cinci ori cu câte 1 ml hexan și analizate prin GC-MS.

3.1.2.4. Metoda de complexare. α - sau β -ciclodextrina (0.5 mmoli) s-a dizolvat în apă distilată la temperatura de $50 \pm 1^\circ\text{C}$. Peste această soluție s-au introdus, în picături, sub agitare, soluții etanolice de ulei volatil corespunzător unei molarități de 1:1 (CD:compus „oaspete” - pentru compusul principal: α -bisabolol pentru mușețel, β -pinen pentru coada șoricelului, β -cubeben pentru anghinare și α -felandren pentru podbal). Soluția obținută s-a agitat lent la temperatura de mai sus încă 15 minute, apoi s-a răcit lent timp de 4 ore (tabel 3.1.3). S-a lăsat apoi la temperatura de 4°C timp de 24 ore pentru finalizarea cristalizării complexilor, cristalele obținute s-au filtrat, s-au spălat cu puțin etanol și s-au uscat în excicator. Probele astfel obținute au fost suspuse analizelor TG, DSC și/sau SEM.

Tabelul 3.1.3. Condiții de obținere a complexilor de β -ciclodextrină și extractele etanolice de *M. chamomilla*, *A. millefolium* L. și *S. marianum*

Nr	Proba	m (bCD) (g)	V (apa) (ml)	V (extr) (ml)	m (cplx) (g)	Timp picu- rare (min)	Timp perf. (min)	Timp racire lenta (ore)	Rnd. %
1	<i>M. chamomilla</i> (flori)	0.671	4	4	0.3946	15	30	4	58.81
2	<i>M. chamomilla</i> (frunze)	0.672	4	4	0.3744	15	30	4	55.71
3	<i>M. chamomilla</i> (rădăcină)	0.6704	4	4	0.4148	15	30	4	61.87
4	<i>M. chamomilla</i> (tulpină)	0.6713	4	4	0.4038	15	30	4	60.15
5	<i>A. millefolium</i> L. (flori)	0.3356	2	2	0.1685	15	30	4	50.21
6	<i>A. millefolium</i> L. (frunze)	0.6702	4	4	0.4203	15	30	4	62.71
7	<i>A. millefolium</i> L. (rădăcină)	0.6707	4	4	0.4008	15	30	4	59.76
8	<i>A. millefolium</i> L. (tulpină)	0.6708	4	4	0.406	15	30	4	60.52
9	<i>S. marianum</i> (semințe)	0.6701	4	4	0.5074	15	30	4	75.72

3.1.2.5. Reextracția biocompușilor din complex. Pentru reextracția biocompușilor din complexii cu ciclodextrine, s-au dizolvat cantități corespunzătoare din complex în apă distilată, s-a introdus hexan pentru reextracție și s-a agitat energic timp de 20 de minute la temperatura de reflux a hexanului, după care s-a răcit, stratul organic superior s-a separat, iar stratul apos s-a reextras în mod similar, încă de trei ori cu hexan. Extractele organice reunite au fost apoi uscate și analizate prin GC-MS.

3.1.2.6. Degradarea nanocapsulelor/nanoparticulelor. S-au cântărit câte 100 mg complex ulei volatil/ciclodextrină în recipiente de sticlă cu fund plat de dimensiuni $40 \times 40 \text{ mm}^2$, s-au divizat fin și s-au repartizat uniform pe toată suprafața, după care au fost introduse în cuptorul termostatat la temperaturi de 50°C și 100°C pentru 2 ore, în prezența aerului (umiditate relativă 70%) la presiune atmosferică.

După răcirea probelor, acestea au fost reluate de patru ori cu câte 1 ml apă distilată și supuse extracției repetate în hexan pentru recuperarea compușilor volatili și a compușilor de degradare extractibili.

3.1.2.7. Analiza GC-MS. Pentru analiza biocompușilor s-a folosit un sistem de analiză gaz cromatografică cuplată cu un sistem de detecție de spectrometrie de masă. S-a utilizat un GC Hewlett Packard HP 6890 Series cuplat cu un spectrometru de masă Hewlett Packard 5973 Mass Selective Detector. Pentru determinările cantitative s-a utilizat dodecan drept standard extern.

Condițiile de analiză GC au fost: coloana: HP-5 MS, lungime 30 m, diametru interior 0.25 mm, grosimea filmului de 0.25 μm ; program de temperatură: 50°C la 250°C cu o viteză de 6°C/min; temperatura injectorului: 280°C; temperatura detectorului: 280°C; volum de injecție: 2 μl ; gaz purtător: He.

Pentru detectorul MS s-a lucrat cu o energie EI de 70eV, la o temperatură a sursei de 150°C, domeniu de scanare 50-300 amu, viteză de scanare de 1 s⁻¹ pentru spectrometria de masă, iar spectrele obținute (Anexe A.3.1: *M. Chamomilla* L.(figura A.3.1.1-GC, figurile A.3.1.2-A.3.1.11-MS), *A. Millefolium* L. (figurile A.3.1.12, A.3.1.24-A.3.1.29-GC, figurile A.3.1.13-A.3.1.23-MS), *C. Scolymus* L.(figurile A.3.1.30, A.3.1.36-A.3.1.38-GC), figurile A.3.1.31-A.3.1.35-MS), *T. Farfara* L. (figurile A.3.1.39, A.3.1.53-A.3.1.54-GC), figurile A.3.1.40-A.3.1.52-MS)) au fost comparate cu o bază de date NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library 2.0 (2002).

3.1.2.8. Analiza TG. Analiza termogravimetrică pentru complexii uleiuri volatili/ ciclodextrine s-a efectuat pe un aparat TG 209 NETZSCH, cu un program de temperatură de 20 – 200°C cu o viteză de încălzire de 4°C/min, apoi 200 – 900°C cu o viteză de încălzire de 10°C/min. Determinările s-au efectuat sub atmosferă de azot.

3.1.2.9. Analiza DSC. Calorimetria de scanare diferențială (DSC) a fost realizată pe un aparat DSC 204 Netzsch, cu un program de temperatură de -50÷200°C, cu o viteză de încălzire de 4°C/min.

3.1.2.10. Analiza SEM. Pentru unele nanoparticule uleiuri volatili/ciclodextrine s-a realizat analiza prin microscopie cu scanare electronică (SEM) pentru evaluarea morfologiei cristalelor și a dimensiunilor aproximative ale acestora. În acest scop s-a utilizat un aparat de microscopie electronică cu scanare tip JEOL JSM 5510-LV.

3.1.2.11. Modelarea moleculară. Modelarea moleculară pentru compușii principali din uleiurile volatili obținute din specii din familia *Compositae* (camazulenă, bisabolol, bisabolol-oxizii A și B, cariofilenă și compuși oxigenați), pentru α - și β -ciclodextrină, respectiv docarea biocompușilor în ciclodextrine s-a realizat cu ajutorul pachetului de programe HyperChem (programul de mecanică moleculară MM+), folosindu-se un gradient RMS de 0.01 kcal/mol. Pentru optimizare s-a utilizat algoritmul Polak-Ribiere cu gradient conjugat.

Pentru modelarea moleculară a biocompușilor s-a procedat în modul următor: fiecare compus a fost construit separat cu ajutorul pachetului de programe amintit. S-au atribuit automat lungimile specifice legăturilor și unghiurile de legătură corespunzătoare, apoi s-au definit unghiurile de torsiune care să fie luate în considerare pentru efectuarea analizei conformaționale (vezi mai jos), în urma căreia s-au identificat conformațiile cele mai stabile din punct de vedere termodinamic, care au fost utilizate în continuare în experimentele teoretice de docare și determinare a energiei de interacțiune.

Modelarea moleculară a α - și β -ciclodextrinei s-a realizat tot prin mecanică moleculară, însă aceste structuri au fost construite în concordanță cu datele de raze X din literatura de specialitate, deoarece numărul foarte mare de unghiuri de torsiune necesare a fi variat într-o analiză conformațională este foarte mare. După construcția structurii ciclodextrinelor, acestea au fost optimizate prin metoda prezentată, cu obținerea unei conformații cu minim energetic local, care a fost utilizată în continuare în experimentele de docare.

Docarea biocompușilor în conformație de energie minimă în α - și β -ciclodextrină s-a realizat prin poziționarea structurii biocompușilor (bisabolol, bisabolol-oxid A, bisabolol-oxid B, camazulenă, cariofilenă, cariofilen-oxid) fie spre baza mare a ciclodextrinei (ce conține grupele hidroxil secundare), fie spre baza mică a acesteia (ce conține grupele hidroxil primare), pe axa OZ (corespunzătoare structurii "tronconice" a ciclodextrinei, axă ce trece prin centrele celor două baze) la o distanță între centrele de greutate ale celor două structuri implicate în interacțiune de $\sim 8\text{\AA}$. Cele mai mari energii de interacțiune (cea mai mică energie absolută a complexului, valoare care a fost scăzută din suma energiilor absolute ale celor două componente ale complexului, modelate molecular separat, pentru obținerea energiei de interacțiune) au fost obținute pentru cazul orientării structurii biocompușului spre baza mare a ciclodextrinei, ce conține grupările hidroxil secundare.

3.1.2.12. Analiza conformațională. Analiza conformațională s-a realizat cu programul Conformational Search din pachetul de programe HyperChem. S-a lucrat în modul următor: structura biocompușului într-o conformație oarecare, dar cu lungimi de legătură și unghiuri de legătură definite, a fost conectat la programul de analiză conformațională prin alocarea tuturor unghiurilor de torsiune definite. Au fost setate domeniile de variație ale unghiurilor de torsiune, criteriul energetic de acceptare a conformației, condițiile pentru anularea conformațiilor similare și a duplicatelor, programul de optimizare de mecanică moleculară, algoritmul de lucru și gradientul de optimizare, respectiv numărul maxim pentru iterații, optimizări și conformații reținute (înregistrate). Conformația de start pentru fiecare optimizare a fost aleasă aleator pe baza unui criteriu ce ține cont de ora indicată de calculator. S-a utilizat pentru experimentul de docare doar prima dintre conformații, cea mai stabilă (cu energia absolută cea mai mică). Condițiile de lucru sunt cele prezentate mai jos:

- variația unghiurilor de torsiune flexibile: $\pm 60^\circ$ - $\pm 180^\circ$;
- criteriu energetic de acceptare a conformației: 4 kcal/mol peste minim;

- anularea conformațiilor: pentru atomii cu distanțe mai mici de 0.5 Å și pentru diferențe de unghiuri de torsiune sub 15°;
- conformații duplicate: diferențe de energie sub 0.05 kcal/mol;
- program de optimizare: MM+;
- algoritm de optimizare: Polak-Ribiere;
- gradient RMS de optimizare: 0.005 kcal/mol;
- număr maxim de iterații: 500;
- număr maxim de optimizări: 500;
- număr de conformații maxim reținut: 50.

Calculul parametrilor structurali. Clasele de descriptori structurali calculați pentru conformațiile de minimă energie au fost:

- Descriptori constituționali (47 descriptori);
- Descriptori topologici (262 descriptori);
- Descriptori de deplasare moleculară (21 descriptori);
- Descriptori topologici rezultați din matricea de adiacență, BCUT (64 descriptori);
- Descriptori topologici Galvez (21 descriptori);
- Descriptori de autocorelare 2D (96 descriptori);
- Descriptori de sarcină (14 descriptori);
- Descriptori ai aromaticității (4 descriptori);
- Descriptori ai profilului molecular Randic (41 descriptori);
- Descriptori geometrici (58 descriptori);
- Descriptori rezultați din funcțiile radiale centrate pe distanțele interatomice, RDF (150 descriptori);
- Descriptori 3D-Morse (160 descriptori);
- Descriptori WHIM (99 descriptori);
- Descriptori topologici Getaway (197 descriptori);
- Descriptori funcționali (121 descriptori);
- Descriptori ai fragmentelor centrate pe atomi (120 descriptori);
- Descriptori empirici (3 descriptori);
- Proprietăți moleculare (3 descriptori).

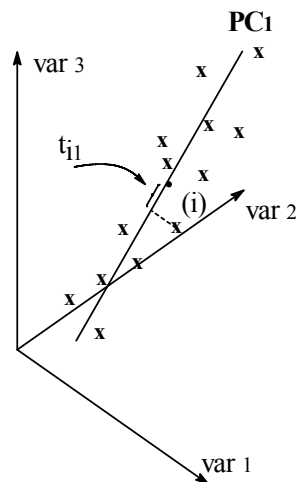
Pentru calculul acestor descriptori s-a utilizat programul *Dragon 2.1 2002* (Bracco Imaging S.p.A.), care permite importarea structurilor 3D din pachetul *HyperChem 7.01*.

3.1.2.13. Analiza componentelor principale (PCA) pentru nanocapsulele uleiuri volatile/ β -ciclodextrină. Analiza componentelor principale, utilizând ca date de intrare procentele masice GC ale compușilor identificați în uleiurile volatile proaspete și recuperate din complecși, s-a realizat cu ajutorul programului *The Unscrambler 6.1* (Computer-Aided Modeling AS, Trondheim).

Analiza componentelor principale (PCA-Principal Component Analysis) formează baza pentru analiza multivariată a datelor. PCA presupune o aproximare a tabelului de date, matricea de date X , printr-un produs de două matrici de dimensiuni mai reduse, T și P , ce rețin doar informația utilă din X . Reprezentarea grafică a coloanelor lui T dă o imagine privind "formele obiectului" pentru X și, în mod analog, reprezentarea liniilor matricii P conduce la "formele variabilelor".

Această metodă de analiză lucrează în modul următor:

- se caută o direcție în spațiul proprietăților după care datele au varianță maximă; direcția respectivă se numește prima componentă principală (*PC1*) și fiecare formă se proiectează pe această direcție, rezultând astfel o reprezentare monodimensională a datelor.
- se poate căuta și o a doua componentă principală (*PC2*), a cărei direcție este perpendiculară pe prima și respectă condiția de varianță maximă.



Matricea $X(N,K)$ a datelor, cu N puncte în spațiul K -dimensional

În figură se prezintă un spațiu tridimensional și prima componentă principală (*PC1*). "Scorul" unui obiect, (t_i) , este proiecția sa ortogonală pe această direcție, iar coeficienții direcționali ai liniei formează vectorul "loading", p_k .

Fundamentul matematic al analizei PCA pornește de la centrarea coloanelor matricii X față de medie:

$$x_{cent,ij} = x_{ij} - \bar{x}_j; \quad \bar{x}_j = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_{ij}$$

Găsirea noilor axe *PC* reprezintă, de fapt, rotirea axelor sistemului de coordonate original, astfel că:

$$T = X \cdot P$$

unde: $X(N,K)$ - matricea variabilelor independente;
 $P(K,K)$ - matricea de rotație (cosinusurile directoare de rotație).

Determinarea matricii de rotație P se poate face prin mai multe metode: manipularea relației matriciale de mai sus pentru a obține o problemă de vectori proprii - valori proprii, metode iterative (*NIPALS*), descompunere în valori singulare (*SDV*).

Matricea T va conține coloanele t_{ij} cu varianță din ce în ce mai mică, la deplasarea $1 \rightarrow K$, astfel încât conținutul de informație se va modifica în același mod. Se poate scrie:

$$t_1^T \cdot t_1 > t_2^T \cdot t_2 > \dots$$

Matricea P conține coloane ortogonale (din principiul metodei), astfel că inversa și transpusa acesteia sunt identice. Prin calcule simple, relația matricială de mai sus devine:

$$X = T \cdot P^{-1} = T \cdot P^T$$

cu X conținând atât informație utilă, cât și zgomot. Din considerentele prezentate mai sus rezultă că se poate stabili un număr de componente principale, A , ce posedă informația utilă, restul fiind doar zgomot ce se acumulează în așa-numita matrice a erorilor, E . Ecuația de mai sus devine:

$$X(N, K) = {}^*T(N, A) \cdot {}^*P^T(A, K) + E(N, K) = {}^*X(N, K) + E(N, K)$$

unde matricea *T reprezintă matricea înregistrărilor (scores), iar ${}^*P^T$ este matricea încărcărilor (loadings). Ținând cont de centrarea valorilor x_{ij} în jurul valorilor medii, relația devine:

$$X(N, K) = I(N, I) \cdot \bar{x}^T(I, K) + {}^*T(N, A) \cdot {}^*P^T(A, K) + E(N, K)$$

unde I este un vector cu elemente 1, iar \bar{x} este vectorul având ca elemente valorile medii.

Există mai multe metode de stabilire a numărului de componente principale, A , cele mai utilizate fiind procedeele care folosesc valorile proprii ale componentelor principale (descompunere în valori singulare), metodele de reprezentare grafică a varianțelor funcție de numărul de componente principale sau procedeele de validare încrucișată.

Reprezentarea vectorilor t unul față de altul ($t_p = f(t_q)$) poate da informații referitoare la similarități și posibila grupare a obiectelor studiate. În același mod, reprezentarea vectorilor $p_r = f(p_s)$ scoate în evidență similaritățile dintre proprietățile studiate, dar și importanța relativă a anumitor variabile (proprietăți) în construirea modelului. Analiza multivariată în general și analiza componentelor principale (PCA) în special sunt instrumente de analiză statistică foarte puternice, care permit extragerea informațiilor utile din cantități mari de date, care pot fi mărimi mai mult sau mai puțin independente. În domeniul alimentar, analiza multivariată este foarte mult utilizată în special în analiza senzorială (unde nu există variabile dependente bine definite), dar și în clasificarea și evidențierea importanței unor caracteristici în cazul falsificării unor alimente, a stabilirii zonelor de proveniență sau găsirea similarităților între diferite sorturi alimentare.

3.1.3. Rezultate și discuții

În cazul mușetelului (*Matricaria chamomilla* L.) s-au separat și analizat biosisteme de tip ulei volatil din flori, frunze, tulpină și rădăcină, cele mai bune randamente fiind obținute pentru flori (~0.5%). În tabelele 3.1.4a 3.1.4b, 3.1.5a, 3.1.5b sunt prezentate comparativ conținutul în principalii compuși ai:

- uleiurilor volatile brute obținute prin hidrodistilare;
- uleiurilor volatile obținute după eliberarea lor din complexul cu ciclodextrină;
- uleiurilor volatile brute/recuperate supuse degradării la 50°C respectiv 100°C.

Tabel 3.1.4a. Concentrațiile relative ale principalilor componenți ai uleiurilor volatile (uv) din *Matricaria chamomilla* L. (Salonta flori), brut, după recuperare din complex (cplx) și după degradare la 50°C și respectiv la 100°C

Nr.	RT (min)	Denumire	Area % (flori)	Area% (cplx) (flori)	Area% (uv*50) (flori)	Area% (uv*100) (flori)
1	3.636	Hexanal	0.11	0.1	0.1	0
2	4.359	Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester	0.54	0.4	0.5	0.2
3	4.488	2-Hexenal, (E)-	0.1	0.1	0.1	0
4	4.711	1-Hexanol	0.03	0.03	0.01	0.01
5	6.078	alpha-Pinen				
6	6.948	beta-Phellandrene				
7	7.112	beta-Pinen				
8	7.69	alpha-Phellandrene				
9	8.12	Cymene				
10	8.34	Eucaliptol				
11	8.572	Ocimen	0.51	0.5	0.4	0.3
12	8.854	Artemisia ketone	1.24	1.2	1.1	1.2
13	9.388	Artemisia alcohol	0.51	0.5	0.5	0.4
14	11.754	Borneol				
15	12.259	alpha-Terpineol				
16	13.91	Tuienyl acetate				
17	13.99	2-Cyclohexene-1-methanol, 2,6,6-trimethyl-				
18	17.373	Caryophyllene	0.7	0.7	0.7	0.3
19	17.878	beta-Farnesen	1.17	1.2	1	0.4
20	18.131	Humulen	0.11	0.1	0.1	0
21	18.243	Caryophyllene oxide	0.22	0.2	0.3	0.4
22	18.654	beta-Cubeben	0.59	0.5	0.5	0.4
23	18.954	Elixen	0.66	0.7	0.6	0.4
24	20.61	Spatulenol				
25	20.74	Caryophyllene oxide				
26	20.98	Ledol				
27	22.073	alpha-Bisabolol oxid B	18.83	19	19	21
28	22.626	alpha-Bisabolol	30.93	30	28.8	23.4
29	23.548	Camazulene	3.62	3.4	2.9	2.6
30	23.836	Bisabolol-oxid A	12.52	12.45	12.22	13.11
31	26.133	1,6-Dioxaspiro[4.4]non-3-ene, 2-(2,4-hexadiynylidene)-	13	12	13.01	12.8
32	27.22	Hexadecanoic acid				
33	27.731	Hexadecanoic acid, ethyl ester				
34	30.404	Ethyl Oleate				

uv* = ulei volatil

Tabel 3.1.4b. Concentrațiile relative ale principalilor componenți ai uleiurilor volatile (uv) din *Matricaria chamomilla* L. (Salonta frunze), brut, după recuperare din complex (cplx) și după degradare la 50°C și respectiv la 100°C

Nr.	RT (min)	Denumire	Area% (frunze)	Area% (cplx) (frunze)	Area% (uv*50) (frunze)	Area% (uv*100) (frunze)
1	3.636	Hexanal	0.09	0.1	0.1	0.02
2	4.359	Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester	0.02	0.01	0.01	0.01
3	4.488	2-Hexenal, (E)-	0.15	0.14	0.12	0.06
4	4.711	1-Hexanol	0.02	0.01	0.01	0.01
5	6.078	alpha-Pinen				
6	6.948	beta-Phellandrene				
7	7.112	beta-Pinen				
8	7.69	alpha-Phellandrene				
9	8.12	Cymene				
10	8.34	Eucaliptol				
11	8.572	Ocimen	0.4	0.3	0.35	0.28
12	8.854	Artemisia ketone	0.11	0.1	0.1	0.08
13	9.388	Artemisia alcohol	0.05	0.05	0.04	0.045
14	11.754	Borneol				
15	12.259	alpha-Terpeneol				
16	13.91	Tuienyl acetate				
17	13.99	2-Cyclohexene-1-methanol, 2,6,6-trimethyl-				
18	17.373	Caryophyllene	5.36	5.1	5.11	4.2
19	17.878	beta-Farnesen	0.2	0.2	0.2	0.16
20	18.131	Humulen	0.66	0.61	0.63	0.49
21	18.243	Caryophyllene oxide	0.12	0.1	0.13	0.92
22	18.654	beta-Cubeben	3.46	3.2	3	2.9
23	18.954	Elixen	0.56	0.5	0.49	0.44
24	20.61	Spatulenol				
25	20.74	Caryophyllene oxide				
26	20.98	Ledol				
27	22.073	alpha-Bisabolol oxid B	0.92	1	1.1	1.4
28	22.626	alpha-Bisabolol	3.38	3.2	3	2.92
29	23.548	Camazulene	18.69	18	18.2	16.34
30	23.836	Bisabolol-oxid A	0.42	0.4	0.4	0.39
31	26.133	1,6-Dioxaspiro[4.4]non-3-ene, 2-(2,4-hexadiynylidene)-	32.09	32	31.1	32
32	27.22	Hexadecanoic acid				
33	27.731	Hexadecanoic acid, ethyl ester				
34	30.404	Ethyl Oleate				

uv* = ulei volatil

Tabel 3.1.5a. Concentrațiile relative ale principalilor componenți ai uleiurilor volatile (uv) din *Matricaria chamomilla* L. (Salonta rădăcină), brut, după recuperare din complex (cplx) și după degradare la 50°C și respectiv la 100°C

Nr.	RT (min)	Denumire	Area% (răd)	Area% (cplx) (răd)	Area% (uv*50) (răd)	Area% (uv*100) (răd)
1	3.636	Hexanal	0.1	0.1	0.09	0.1
2	4.359	Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester				
3	4.488	2-Hexenal, (E)-	0.02	0.01	0.01	0.02
4	4.711	1-Hexanol	0.02	0.02	0.02	0.01
5	6.078	alpha-Pinen				
6	6.948	beta-Phellandrene				
7	7.112	beta-Pinen				
8	7.69	alpha-Phellandrene				
9	8.12	Cymene				
10	8.34	Eucaliptol				
11	8.572	Ocimen	0.19	0.18	0.15	0.16
12	8.854	Artemisia ketone				
13	9.388	Artemisia alcohol				
14	11.754	Borneol				
15	12.259	alpha-Terpineol				
16	13.91	Tuienyl acetate				
17	13.99	2-Cyclohexene-1-methanol, 2,6,6-trimethyl-				
18	17.373	Caryophyllene	6.37	6.2	5.5	5.1
19	17.878	beta-Farnesen	1.83	1.8	1.6	1.1
20	18.131	Humulen	0.92	0.9	0.81	0.65
21	18.243	Caryophyllene oxide	0.18	0.2	0.21	0.35
22	18.654	beta-Cubeben	4.8	4.5	4.6	3.9
23	18.954	Elixen	1	1	1	0.8
24	20.61	Spatulenol				
25	20.74	Caryophyllene oxide				
26	20.98	Ledol				
27	22.073	alpha-Bisabolol oxid B	0.86	0.88	0.91	1.1
28	22.626	alpha-Bisabolol	2.5	2.4	2.4	2.1
29	23.548	Camazulene	27.4	25	25.1	22.2
30	23.836	Bisabolol-oxid A	0.45	0.47	0.51	0.55
31	26.133	1,6-Dioxaspiro[4.4]non-3-ene, 2-(2,4-hexadiynylidene)-	4.64	4	4.1	3.93
32	27.22	Hexadecanoic acid				
33	27.731	Hexadecanoic acid, ethyl ester				
34	30.404	Ethyl Oleate				

uv* = ulei volatil

Tabel 3.1.5b. Concentrațiile relative ale principalilor componenți ai uleiurilor volatile (uv) din *Matricaria chamomilla* L. (Salonta tulpină), brut, după recuperare din complex (cplx) și după degradare la 50°C și respectiv la 100°C

Nr.	RT (min)	Denumire	Area% (tulp)	Area% (cplx) (tulp)	Area% (uv*50) (tulp)	Area% (uv*100) (tulp)
1	3.636	Hexanal	0.07	0.05	0.04	0.04
2	4.359	Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester				
3	4.488	2-Hexenal, (E)-	0.04	0.03	0.03	0.02
4	4.711	1-Hexanol	0.01			
5	6.078	alpha-Pinen				
6	6.948	beta-Phellandrene				
7	7.112	beta-Pinen				
8	7.69	alpha-Phellandrene				
9	8.12	Cymene				
10	8.34	Eucaliptol				
11	8.572	Ocimen	0.57	0.5	0.46	0.44
12	8.854	Artemisia ketone				
13	9.388	Artemisia alcohol				
14	11.754	Borneol				
15	12.259	alpha-Terpineol				
16	13.91	Tuienyl acetate				
17	13.99	2-Cyclohexene-1-methanol, 2,6,6-trimethyl-				
18	17.373	Caryophyllene	3.55	3.5	3.2	2.8
19	17.878	beta-Farnesen	5.07	5	4.8	4.9
20	18.131	Humulen	0.58	0.5	0.44	0.44
21	18.243	Caryophyllene oxide	0.11	0.2	0.19	1.1
22	18.654	beta-Cubeben	2.93	2.9	2.2	2.2
23	18.954	Elixen	1.4	1.4	1.2	1.2
24	20.61	Spatulenol				
25	20.74	Caryophyllene oxide				
26	20.98	Ledol				
27	22.073	alpha-Bisabolol oxid B	0.59	0.6	0.55	0.39
28	22.626	alpha-Bisabolol	1.53	1.5	1.4	1.2
29	23.548	Camazulene	16.08	15	14.6	12.2
30	23.836	Bisabolol-oxid A	0.6	0.6	0.63	0.65
31	26.133	1,6-Dioxaspiro[4.4]non-3-ene, 2-(2,4-hexadiynylidene)-	33.19	32	33.8	31.1
32	27.22	Hexadecanoic acid				
33	27.731	Hexadecanoic acid, ethyl ester				
34	30.404	Ethyl Oleate				

uv* = ulei volatil

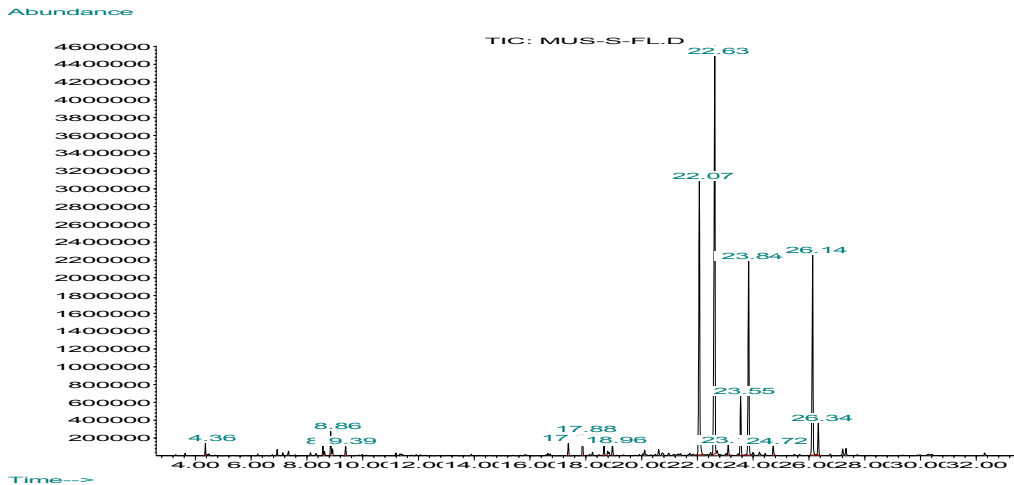


Figura 3.1.2. Cromatograma din analiza GC-MS pentru uleiul volatil din flori de mușețel

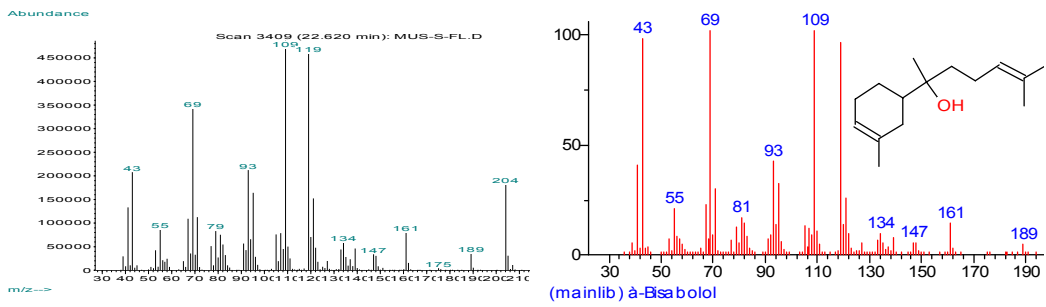


Figura 3.1.3. Spectrele MS experimental (stânga) și din baza de date NIST (dreapta) pentru α -bisabolol

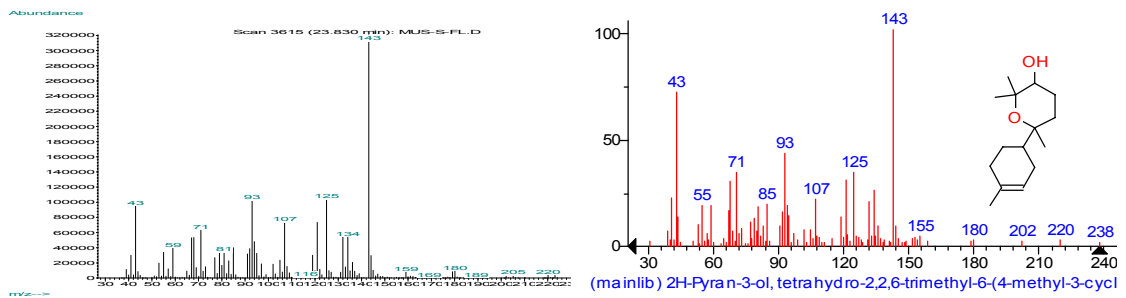


Figura 3.1.4. Spectrele MS experimental (stânga) și din baza de date NIST (dreapta) pentru bisabolol-oxid A

3.1 - Separarea și încapsularea moleculară a unor biosisteme 61

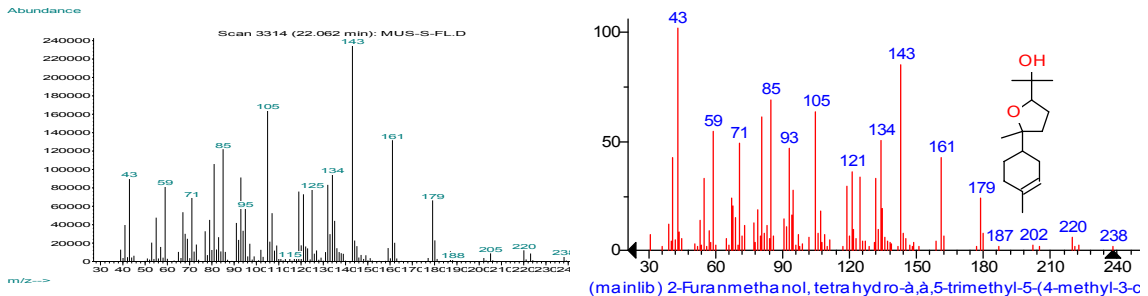


Figura 3.1.5. Spectrele MS experimental (stânga) și din baza de date NIST (dreapta) pentru bisabolol-oxid B

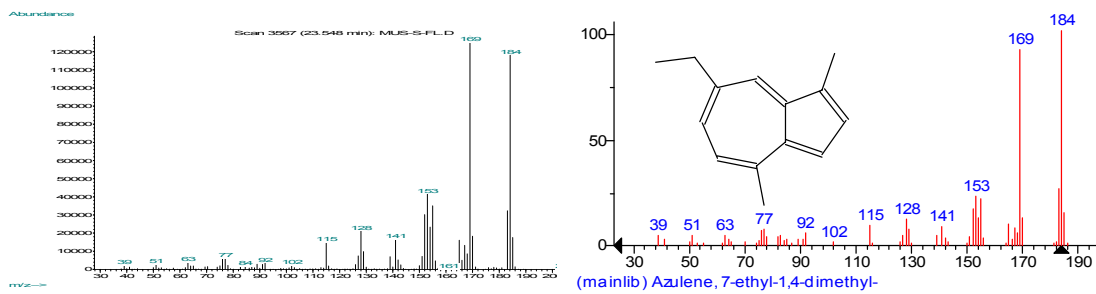


Figura 3.1.6. Spectrele MS experimental (stânga) și din baza de date NIST (dreapta) pentru camazulenă

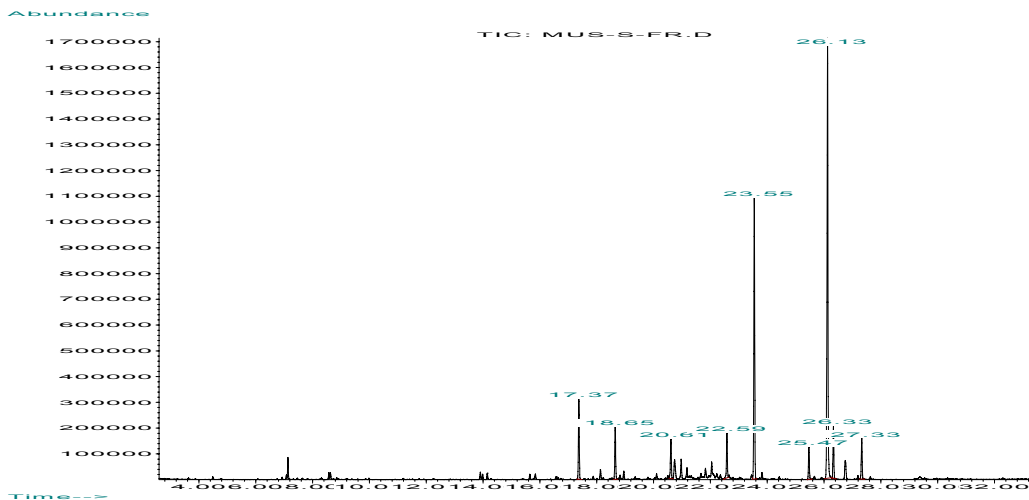


Figura 3.1.7. Cromatograma din analiza GC-MS pentru uleiul volatil din frunze de mușețel

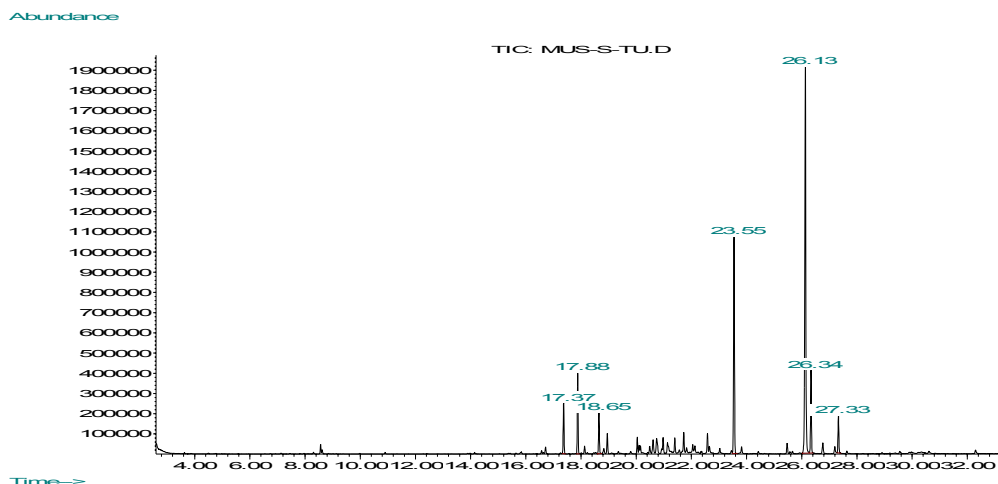


Figura 3.1.8. Cromatograma din analiza GC-MS pentru uleiul volatil din tulpină de mușețel

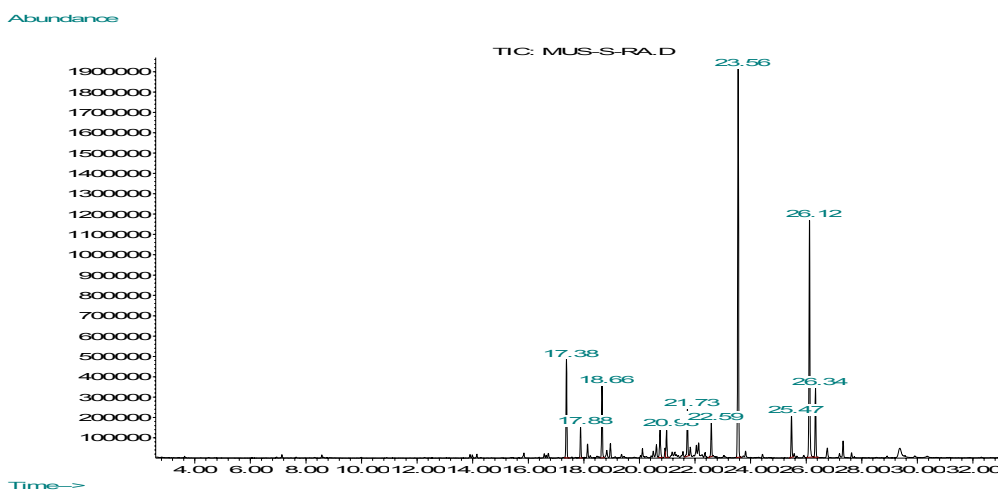


Figura 3.1.9. Cromatograma din analiza GC-MS pentru uleiul volatil din rădăcină de mușețel

Analiza GC-MS a biosistemelor a indicat concentrații însemnate pentru α -bisabolol (26-31%; la RT 22.6 min), bisabolol-oxizi A și B (12-14% și 18-26% la RT 23.8 și 22.1 min) și camazulenă (3-3.6% la la 23.5 min) în cazul uleiului volatil din flori (dependent de partea anatomică a plantei din care s-a extras uleiul volatil) (tabel 3.1.4a 3.1.4b, 3.1.5a, 3.1.5b și figurile 3.1.2-3.1.6).

În cazul uleiului volatil din frunze, α -bisabololul a fost doar 2.4-3.3%, bisabolol-oxizii 0.4-2.4%, iar camazulena 18.7%, aici sesquiterpenele fiind majoritare (figura 3.1.7).

Tulpina și rădăcina au prezentat un număr redus de compuși, cei interesați (bisabololi și camazulene), fiind în concentrații mai puțin semnificative (figurile 3.1.8 și 3.1.9).

În cazul uleiului volatil extras din diverse părți din **coada șoricelului (*Achillea millefolium* L.)**, în cazul florilor, componentele principale au fost mono- și sesquiterpenele (pineni, cariofilen, cubeben), dar și α -bisabololul (0.7-2.6%, la RT 22.6 min) și camazulena (11.7-12.9% la RT 23.6 min) (tabelele 3.1.6a, 3.1.6b, 3.1.7a și 3.1.7b, figurile 3.1.10 și 3.1.11).

Tabel 3.1.6a. Concentrațiile relative ale principalilor componenți ai uleiurilor volatile (uv) din *Achillea millefolium* L. (Salonta flori), brut, după recuperare din complex (cplx) și după degradare la 50°C și respectiv la 100°C

Nr.	RT (min)	Denumire	Area% (flori)	Area% (cplx) (flori)	Area% (uv*50) (flori)	Area% (uv*100) (flori)
1	3.636	Hexanal				
2	4.359	Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester				
3	4.488	2-Hexenal, (E)-				
4	4.711	1-Hexanol				
5	6.078	alpha-Pinen	3.4	3.2	3.3	3
6	6.948	beta-Phellandrene	12.1	12	11.4	10.3
7	7.112	beta-Pinen	17.2	17.2	16.3	13.9
8	7.69	alpha-Phellandrene				
9	8.12	Cymene				
10	8.34	Eucaliptol	6.8	6.7	6.7	5.9
11	8.572	Ocimen	0.4	0.5	0.4	0.2
12	8.854	Artemisia ketone				
13	9.388	Artemisia alcohol				
14	11.754	Borneol	1.5	1.5	1.3	1.3
15	12.259	alpha-Terpineol	2.1	2	2	1.8
16	13.91	Tuienyl acetate	1.3	1.3	1.1	1
17	13.99	2-Cyclohexene-1-methanol, 2,6,6-trimethyl-				
18	17.373	Caryophyllene	6	5.9	5.8	4.9
19	17.878	beta-Farnesen				
20	18.131	Humulen				
21	18.243	Caryophyllene oxide				
22	18.654	beta-Cubeben	4.2	4	4	3.8
23	18.954	Elixen				
24	20.61	Spatulenol				
25	20.74	Caryophyllene oxide	2.1	2	2.2	3
26	20.98	Ledol	2.5	2.4	2.4	2.4
27	22.073	alpha-Bisabolol oxid B				
28	22.626	alpha-Bisabolol	0.68	0.6	0.6	0.56
29	23.548	Camazulene	12.9	12.6	12.4	11.4
30	23.836	Bisabolol-oxid A	0.08			
31	26.133	1,6-Dioxaspiro[4.4]non-3-ene, 2-(2,4-hexadiynylidene)-				
32	27.22	Hexadecanoic acid				
33	27.731	Hexadecanoic acid, ethyl ester				
34	30.404	Ethyl Oleate				

uv* = ulei volatil

În uleiul volatil din frunze acești compuși s-au găsit în concentrații de 9.6-16% și, respectiv, 8.7-9.7% (figura 3.1.12).

În anexele A.3.1 (figurile A.3.1.26-A.3.1.29) sunt prezentate cromatogramele pentru același tip de extract din *Achillea millefolium* L. recoltată din altă locație (Câmpeni – Alba).

Tabel 3.1.6b. Concentrațiile relative ale principalilor componenți ai uleiurilor volatile (uv) din *Achillea millefolium* L. (Salonta frunze), brut, după recuperare din complex (cplx) și după degradare la 50°C și respectiv la 100°C

Nr.	RT (min)	Denumire	Area% (frunze)	Area% (cplx) (frunze)	Area% (uv*50) (frunze)	Area% (uv*100) (frunze)
1	3.636	Hexanal	0.02			
2	4.359	Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester				
3	4.488	2-Hexenal, (E)-	0.04			
4	4.711	1-Hexanol	0.01			
5	6.078	alpha-Pinen	1.2	1.1	1.1	0.9
6	6.948	beta-Phellandrene	8	8.1	7.8	7.7
7	7.112	beta-Pinen	9.9	9.8	9.6	9
8	7.69	alpha-Phellandrene				
9	8.12	Cymene				
10	8.34	Eucaliptol	7.7	7.5	8.1	8
11	8.572	Ocimen	0.18	0.2	0.14	0.15
12	8.854	Artemisia ketone				
13	9.388	Artemisia alcohol				
14	11.754	Borneol	2.3	2.2	2.2	2.1
15	12.259	alpha-Terpineol	3.3	3.1	3	2.9
16	13.91	Tuienyl acetate	0.55	0.6	0.54	0.51
17	13.99	2-Cyclohexene-1-methanol, 2,6,6-trimethyl-				
18	17.373	Caryophyllene	2.3	2.2	2.1	1.6
19	17.878	beta-Farnesen	0.6	0.56	0.6	0.5
20	18.131	Humulen	0.3	0.3	0.2	2
21	18.243	Caryophyllene oxide	0.24	0.3	0.27	0.8
22	18.654	beta-Cubeben	1.15	1.1	1	0.7
23	18.954	Elixen	0.52	0.5	0.5	0.44
24	20.61	Spatulenol				
25	20.74	Caryophyllene oxide	2.7	2.8	2.9	3.2
26	20.98	Ledol	1.8	1.8	1.7	1.4
27	22.073	alpha-Bisabolol oxid B	7.3	7.6	7.6	8.1
28	22.626	alpha-Bisabolol	16	15.7	15.6	14.9
29	23.548	Camazulene	9.7	9.8	9.8	10.1
30	23.836	Bisabolol-oxid A	2.8	2.8	2.9	3.1
31	26.133	1,6-Dioxaspiro[4.4]non-3-ene, 2-(2,4-hexadiynylidene)-	1.7	1.5	1.5	1.5
32	27.22	Hexadecanoic acid				
33	27.731	Hexadecanoic acid, ethyl ester				
34	30.404	Ethyl Oleate				

uv* = ulei volatil

Tulpina și rădăcina au prezentat și în acest caz concentrații reduse din acești compuși, deși concentrațiile relative au fost ridicate în cazul camazulenei.

Tabel 3.1.7a. Concentrațiile relative ale principalilor componenți ai uleiurilor volatile (uv) din *Achillea millefolium* L. (Salonta rădăcină), brut, după recuperare din complex (cplx) și după degradare la 50°C și respectiv la 100°C

Nr.	RT (min)	Denumire	Area% (răd)	Area% (cplx) (răd)	Area% (uv* 50) (răd)	Area% (uv* 100) (răd)
1	3.636	Hexanal	0.11			
2	4.359	Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester				
3	4.488	2-Hexenal, (E)-				
4	4.711	1-Hexanol				
5	6.078	alpha-Pinen	0.4	0.4	0.3	0.3
6	6.948	beta-Phellandrene	2.56	2.5	2.3	2.2
7	7.112	beta-Pinen	4.2	4	3.8	3.5
8	7.69	alpha-Phellandrene				
9	8.12	Cymene				
10	8.34	Eucaliptol	0.64	0.6	0.6	0.62
11	8.572	Ocimen	0.08			
12	8.854	Artemisia ketone				
13	9.388	Artemisia alcohol				
14	11.754	Borneol	0.64	0.6	0.6	0.49
15	12.259	alpha-Terpineol	0.36	0.3	0.28	0.26
16	13.91	Tuienyl acetate	0.32	0.3	0.3	0.3
17	13.99	2-Cyclohexene-1-methanol, 2,6,6-trimethyl-				
18	17.373	Caryophyllene	5.04	5	5.1	4.3
19	17.878	beta-Farnesen	0.42	0.4	0.41	0.38
20	18.131	Humulen	0.63	0.6	0.55	0.57
21	18.243	Caryophyllene oxide	0.22	0.35	0.38	0.44
22	18.654	beta-Cubeben	3.59	3.6	3.4	3.3
23	18.954	Elixen	0.71	0.7	0.7	
24	20.61	Spatulenol				
25	20.74	Caryophyllene oxide	4.43	4.7	4.8	5.4
26	20.98	Ledol	3.62	3.6	3.5	3.3
27	22.073	alpha-Bisabolol oxid B	3.48	3.61	3.88	4.11
28	22.626	alpha-Bisabolol	10.27	10.1	10.1	9.8
29	23.548	Camazulene	33.82	33	32.8	31.1
30	23.836	Bisabolol-oxid A	0.97	1.1	1.1	1.2
31	26.133	1,6-Dioxaspiro[4.4]non-3-ene, 2-(2,4-hexadiynylidene)-				
32	27.22	Hexadecanoic acid				
33	27.731	Hexadecanoic acid, ethyl ester				
34	30.404	Ethyl Oleate				

uv* = ulei volatil

Tabel 3.1.7b. Concentrațiile relative ale principalilor componenți ai uleiurilor volatile (uv) din *Achillea millefolium* L. (Salonta tulpină), brut, după recuperare din complex (cplx) și după degradare la 50°C și respectiv la 100°C

Nr.	RT (min)	Denumire	Area% (tulp)	Area% (cplx) (tulp)	Area% (uv*50) (tulp)	Area% (uv*100) (tulp)
1	3.636	Hexanal				
2	4.359	Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester				
3	4.488	2-Hexenal, (E)-				
4	4.711	1-Hexanol				
5	6.078	alpha-Pinen	0.67	0.6	0.6	0.55
6	6.948	beta-Phellandrene	3.18	3	2.9	2.8
7	7.112	beta-Pinen	0.11	0.1	0.1	
8	7.69	alpha-Phellandrene				
9	8.12	Cymene				
10	8.34	Eucaliptol	0.2	0.2		
11	8.572	Ocimen				
12	8.854	Artemisia ketone				
13	9.388	Artemisia alcohol				
14	11.754	Borneol	0.45	0.4	0.4	0.38
15	12.259	alpha-Terpineol	0.66	0.6	0.56	0.5
16	13.91	Tuienyl acetate	0.87	0.8	0.79	0.88
17	13.99	2-Cyclohexene-1-methanol, 2,6,6-trimethyl-				
18	17.373	Caryophyllene	7.67	7.6	7.3	6.7
19	17.878	beta-Farnesen	0.11			
20	18.131	Humulen	1.02	1.1	1.1	0.7
21	18.243	Caryophyllene oxide	0.19	0.2	0.2	0.1
22	18.654	beta-Cubeben	5.6	5	5.1	4.9
23	18.954	Elixen	0.51	0.5	0.5	
24	20.61	Spatulenol				
25	20.74	Caryophyllene oxide	2.42	2.5	2.5	3.1
26	20.98	Ledol	3.24	3.1	3.2	3.1
27	22.073	alpha-Bisabolol oxid B	0.69	0.71	0.7	0.8
28	22.626	alpha-Bisabolol	0.76	0.6	0.55	0.53
29	23.548	Camazulene	45.79	45.2	43.9	41.3
30	23.836	Bisabolol-oxid A				0.11
31	26.133	1,6-Dioxaspiro[4.4]non-3-ene, 2-(2,4-hexadiynylidene)-				
32	27.22	Hexadecanoic acid				
33	27.731	Hexadecanoic acid, ethyl ester				
34	30.404	Ethyl Oleate				

uv* = ulei volatil

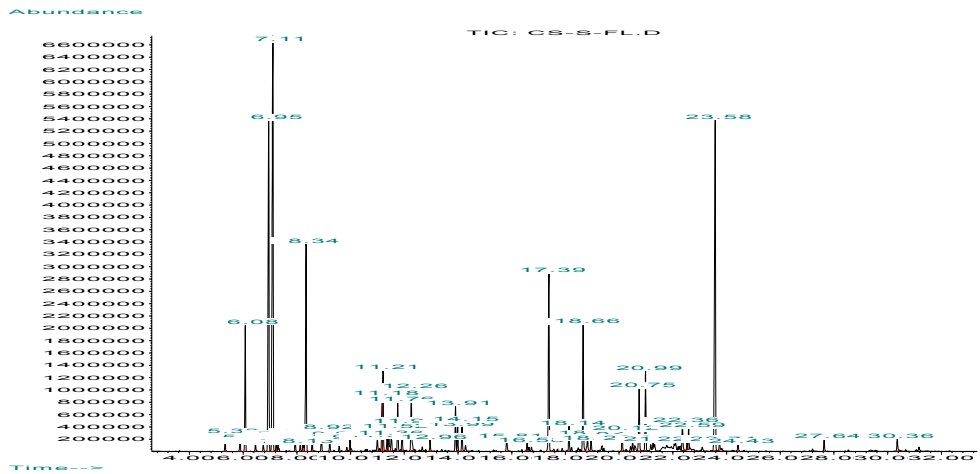


Figura 3.1.10. Cromatograma din analiza GC-MS pentru uleiul volatil din flori de coada șoricelului

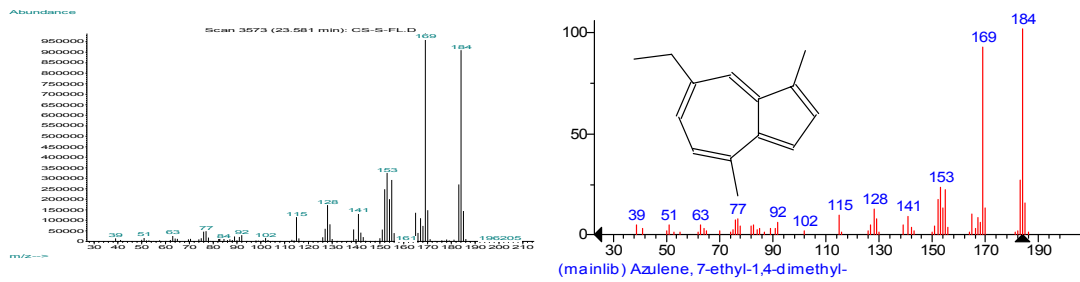


Figura 3.1.11. Spectrele MS experimental (stânga) și din baza de date NIST (dreapta) pentru camazulenă (din coada șoricelului)

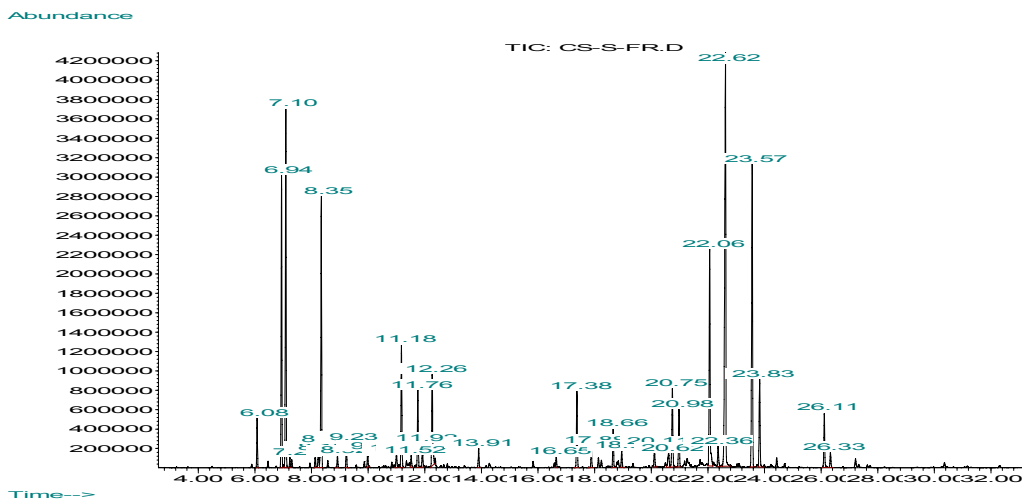


Figura 3.1.12. Cromatograma din analiza GC-MS pentru uleiul volatil din frunze de coada șoricelului

În cazul **anghinarei (*Cynara scolymus* L.)**, principalul compus identificat a fost β -cubebenul, în special în flori, tulpină și rădăcină (38%, 39% și, respectiv, 25%) (tabelele 3.1.8a, 3.1.8b, 3.1.9a și 3.1.9b, figurile 3.1.13 și 3.1.14), în frunze fiind identificat (E)-2-hexenalul (20%).

Tabel 3.1.8a. Concentrațiile relative ale principalilor componenți ai uleiurilor volatile (uv) din *Cynara scolymus* L. (Câmpeni flori), brut, după recuperare din complex (cplx) și după degradare la 50°C și respectiv la 100°C

Nr.	RT (min)	Denumire	Area% (flori)	Area% (cplx (flori))	Area% (uv* 50) (flori)	Area% (uv* 100) (flori)
1	3.636	Hexanal	2.91	2.7	2.83	2.1
2	4.359	Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester	0.16	0.1	0.14	
3	4.488	2-Hexenal, (E)-	4.08	4.1	3.78	3.45
4	17.373	Caryophyllene	5.01	5.03	4.67	4.22
5	17.878	beta-Farnesen	0.07	0.1		
6	18.131	Humulen	1.18	1.2	1.2	1.01
7	18.243	Caryophyllene oxide	0.06			
8	18.654	beta-Cubeben	38.24	37.69	36.6	33.88
9	18.954	Elixen	5.43	5.3	5.1	4.8
10	20.61	Spatulenol	1.52	1.5	1.34	1.31
11	20.74	Caryophyllene oxide	3.71	3.5	3.1	2.56
12	20.98	Ledol	0.6			
13	22.073	alpha-Bisabolol oxid B	1.22	1.1	1.1	
14	22.626	alpha-Bisabolol	2.66	2.43	2.1	1.89
15	23.548	Camazulene	0.09			
16	23.836	Bisabolol-oxid A				

uv* = ulei volatil

Tabel 3.1.8b. Concentrațiile relative ale principalilor componenți ai uleiurilor volatile (uv) din *Cynara scolymus* L. (Câmpeni frunze), brut, după recuperare din complex (cplx) și după degradare la 50°C și respectiv la 100°C

Nr.	RT (min)	Denumire	Area% (frunze)	Area% (cplx (frunze))	Area% (uv*50) (frunze)	Area% (uv*100) (frunze)
1	3.636	Hexanal	5.2	5	5.1	4.6
2	4.359	Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester	0.9	0.8	0.8	0.6
3	4.488	2-Hexenal, (E)-	20.24	20.4	19.89	17.8
4	17.373	Caryophyllene	0.55	0.56	0.49	0.39
5	17.878	beta-Farnesen				
6	18.131	Humulen	0.32	0.3	0.3	0.25
7	18.243	Caryophyllene oxide				
8	18.654	beta-Cubeben	6.46	6.4	6.1	5.78
9	18.954	Elixen	2.59	2.5	2.5	2.34
10	20.61	Spatulenol	3.77	3.5	3.2	2.89
11	20.74	Caryophyllene oxide	4.51	4.59	5.01	5.56
12	20.98	Ledol				
13	22.073	alpha-Bisabolol oxid B	1.33	1.32	1.2	1.08
14	22.626	alpha-Bisabolol	0.51	0.45	0.4	0.4
15	23.548	Camazulene				
16	23.836	Bisabolol-oxid A				

uv* = ulei volatil

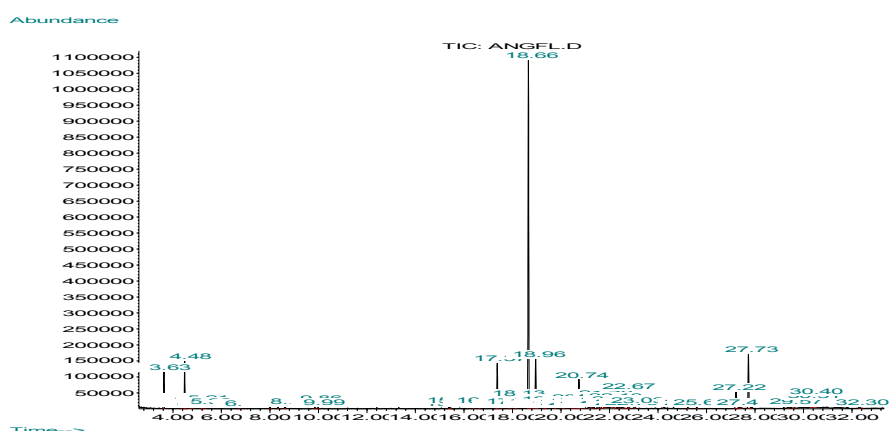


Figura 3.1.13. Cromatograma din analiza GC-MS pentru uleiul volatil din flori de anghinare

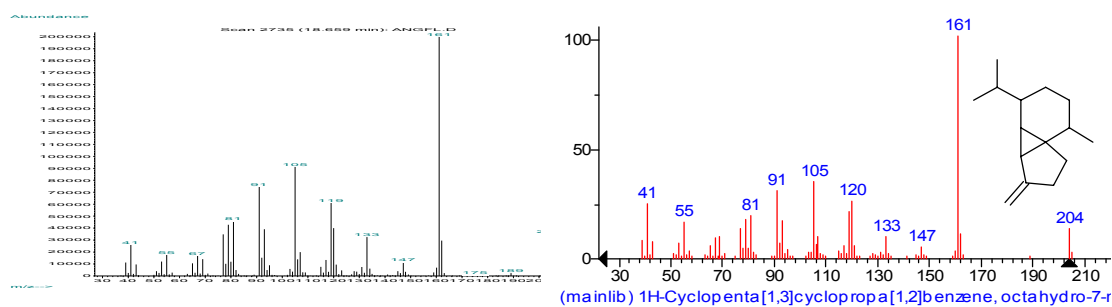


Figura 3.1.14. Spectrele MS experimental (stânga) și din baza de date NIST (dreapta) pentru β -cubeben (din anghinare)

Tabel 3.1.9a. Concentrațiile relative ale principalilor componenți ai uleiurilor volatile (uv) din *Cynara scolymus* L. (Câmpeni rădăcină), brut, după recuperare din complex (cplx) și după degradare la 50°C și respectiv la 100°C

Nr.	RT (min)	Denumire	Area% (răd)	Area% (cplx)	Area% (uv*50)	Area% (uv*100)
1	3.636	Hexanal	2	1.7	1.8	1.5
2	4.359	Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester				
3	4.488	2-Hexenal, (E)-	0.83	0.8	0.8	0.6
4	17.373	Caryophyllene	3.49	3.3	3.1	2.88
5	17.878	beta-Farnesen				
6	18.131	Humulen	0.73	0.7	0.7	0.49
7	18.243	Caryophyllene oxide				
8	18.654	beta-Cubeben	25.21	24.55	23.5	21.1
9	18.954	Elixen	3.32	3.2	3.4	3.1
10	20.61	Spatulenol				
11	20.74	Caryophyllene oxide	4.61	4.68	5.01	5.67
12	20.98	Ledol				
13	22.073	alpha-Bisabolol oxid B	13.31	13.1	13.9	14
14	22.626	alpha-Bisabolol	1.32	1.3	1.45	1.47
15	23.548	Camazulene				
16	23.836	Bisabolol-oxid A				

uv* = ulei volatil

Tabel 3.1.9b. Concentrațiile relative ale principalilor componenți ai uleiurilor volatile (uv) din *Cynara scolymus* L. (Câmpeni tulpină), brut, după recuperare din complex (cplx) și după degradare la 50°C și respectiv la 100°C

Nr.	RT (min)	Denumire	Area% (tulp)	Area% (cplx) (tulp)	Area% (uv*50) (tulp)	Area% (uv*100) (tulp)
1	3.636	Hexanal	2.82	2.8	2.6	2.54
2	4.359	Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester	0.18			
3	4.488	2-Hexenal, (E)-	5.52	5.5	5.2	4.6
4	17.373	Caryophyllene	4.68	4.6	4.1	3.78
5	17.878	beta-Farnesen	0.36	0.3		
6	18.131	Humulen	0.98	0.1	0.91	0.65
7	18.243	Caryophyllene oxide	0.04			
8	18.654	beta-Cubeben	39.07	39	37.68	34.55
9	18.954	Elixen	4.95	4.4	4.34	4.1
10	20.61	Spatulenol	1.53	1.5	1.43	1.44
11	20.74	Caryophyllene oxide	4.17	4.56	5.01	5.55
12	20.98	Ledol	0.88	0.6		
13	22.073	alpha-Bisabolol oxid B	1.16	1.3	1	1.4
14	22.626	alpha-Bisabolol	5.79	5.9	6.2	6.15
15	23.548	Camazulene				
16	23.836	Bisabolol-oxid A				

uv* = ulei volatil

Pentru **podbal** (*Tussilago farfara* L.), α -bisabololul a fost cel mai concentrat în frunze (21%, RT 22.6 min), însă a prezentat o concentrație relativ ridicată și în rădăcină și tulpină (14-17%). În ultimele două cazuri, felandrenul și cimenul au fost identificate în concentrații relativ ridicate (8.7-16.9%, RT 7.7 min și 12.7-22.3% RT 8.1 min, tabel 3.1.10a, 3.1.10b și figurile 3.1.15-3.1.17).

Tabel 3.1.10a. Concentrațiile relative ale principalilor componenți ai uleiurilor volatile (uv) din *Tussilago farfara* L. (Câmpeni frunze), brut, după recuperare din complex (cplx) și după degradare la 50°C și respectiv la 100°C

Nr.	RT (min)	Denumire	Area% (frunze)	Area% (cplx) (frunze)	Area% (uv*50) (frunze)	Area% (uv*100) (frunze)
1	3.636	Hexanal				
2	4.359	Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester				
3	4.488	2-Hexenal, (E)-	1.08	1.1	0.69	0.6
4	4.711	1-Hexanol				
5	6.078	alpha-Pinen				
6	6.948	beta-Phellandrene				
7	7.112	beta-Pinen				
8	7.69	alpha-Phellandrene	0.79	0.7	0.7	
9	8.12	Cymene				
10	11.754	Borneol	0.75	0.7	0.7	0.61
11	12.259	alpha-Terpineol				
12	13.91	Tuienyl acetate				
13	13.99	2-Cyclohexene-1-methanol, 2,6,6-trimethyl-	2.81	2.8	2.7	2.7
14	17.373	Caryophyllene	6.59	6.3	6.1	5.67

Tabel 3.1.10a. Continuare

Nr.	RT (min)	Denumire	Area% (frunze)	Area% (cplx) (frunze)	Area% (uv*50) (frunze)	Area% (uv*100) (frunze)
15	17.878	beta-Farnesen				
16	18.131	Humulen	1.63	1.6	1.34	1.22
17	18.243	Caryophyllene oxide				
18	18.654	beta-Cubeben	6.52	6.5	6.1	5.89
19	18.954	Elixen	1.15	1.1	1.1	0.94
20	20.61	Spatulenol	2.25	2.2	2.05	1.88
21	20.74	Caryophyllene oxide	12.31	12.3	12.1	11.1
22	20.98	Ledol	3.76	3	3.1	2.8
23	22.073	alpha-Bisabolol oxid B	2.76	2.7	2.8	2.97
24	22.626	alpha-Bisabolol	20.65	20	19.5	17.9
25	23.548	Camazulene	7.18	7.3	6.78	6.33
26	23.836	Bisabolol-oxid A	0.91	0.79	0.9	

uv* = ulei volatil

Tabel 3.1.10b. Concentrațiile relative ale principalilor componenți ai uleiurilor volatile (uv) din *Tussilago farfara* L. (Câmpeni rădăcină), brut, după recuperare din complex (cplx) și după degradare la 50°C și respectiv la 100°C

Nr.	RT (min)	Denumire	Area% (räd)	Area% (cplx) (räd)	Area% (uv*50) (räd)	Area% (uv*100) (räd)
1	3.636	Hexanal	3	3.1	2.45	2.21
2	4.359	Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester				
3	4.488	2-Hexenal, (E)-	1.83	1.8	1.56	1.5
4	4.711	1-Hexanol				
5	6.078	alpha-Pinen				
6	6.948	beta-Phellandrene				
7	7.112	beta-Pinen				
8	7.69	alpha-Phellandrene	16.89	15	14.6	13.8
9	8.12	Cymene	22.28	22	21.8	21.5
10	11.754	Borneol				
11	12.259	alpha-Terpineol				
12	13.91	Tuienyl acetate				
13	13.99	2-Cyclohexene-1-methanol, 2,6,6-trimethyl-				
14	17.373	Caryophyllene	3.46	3.4	2.89	2.5
15	17.878	beta-Farnesen				
16	18.131	Humulen				
17	18.243	Caryophyllene oxide				
18	18.654	beta-Cubeben				
19	18.954	Elixen				
20	20.61	Spatulenol				
21	20.74	Caryophyllene oxide	8.39	8.4	8.8	9.2
22	20.98	Ledol	1.24	1	1.1	1
23	22.073	alpha-Bisabolol oxid B				
24	22.626	alpha-Bisabolol	14.23	14	13.24	13.1
25	23.548	Camazulene	3.17	3.1	2.8	2.7
26	23.836	Bisabolol-oxid A				

uv* = ulei volatil

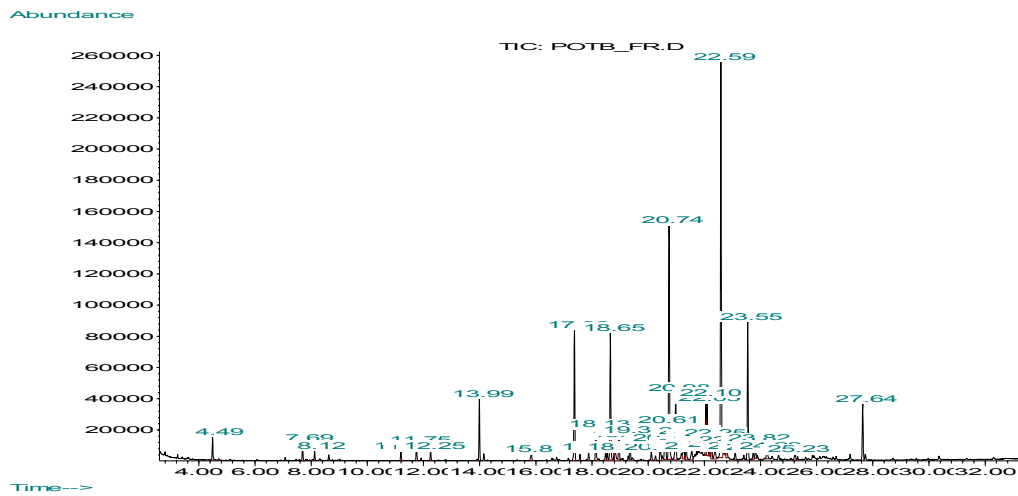


Figura 3.1.15. Cromatograma din analiza GC-MS pentru uleiul volatil din frunze de podbal

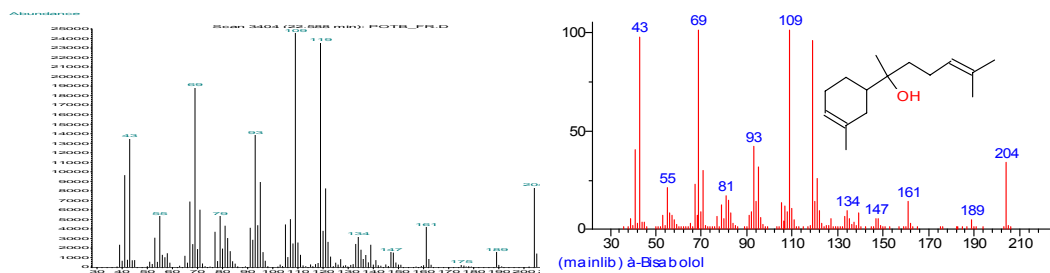


Figura 3.1.16. Spectrele MS experimental (stânga) și din baza de date NIST (dreapta) pentru α -bisabolol (din podbal)

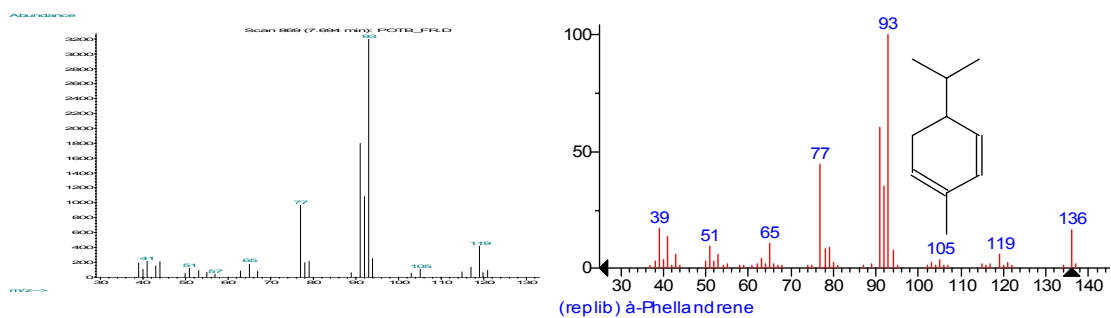


Figura 3.1.17. Spectrele MS experimental (stânga) și din baza de date NIST (dreapta) pentru α -felandren (din podbal)

În cazul uleiului volatil obținut din semințe de **armurariu (*Silybum marianum* L.)**, principalii compuși identificați au fost carvona (~3.83%, la RT 15.1 min) și camazulena (~1.07%, la RT 25.7 min).

Tabel 3.1.11. Concentrațiile relative ale principalilor componenți al uleiului volatil brut din *Silybum marianum* L. (semințe – Macea, Arad)

Nr.	RT (min)	Compus	Area% (semințe)
1	5.699	beta-trans-Ocimene	0.07
2	6.797	beta-Thujene	0.11
4	7.543	2-Heptenal, (Z)-	0.14
5	8.113	D-Limonene	0.91
6	8.525	m-Cymene	0.21
7	9.018	4-Thujanol	0.23
9	13.137	alfa-Terpineol	0.18
10	13.789	Anisole, p-allyl-	0.14
11	15.093	(+)-Carvone	3.83
12	15.558	2,4-Decadienal, (E,E)-	0.52
13	16.092	Benzene, 1-methoxy-4-(1-propenyl)-	3.99
14	16.210	p-Cymen-2-ol	2.08
15	16.398	alfa-Terpineol acetate	2.34
16	17.420	Nonadecane	0.61
18	21.016	Tetradecane, 2,6,10-trimethyl-	0.42
20	21.321	Nonadecane	0.46
21	22.949	Tetradecane, 2,6,10-trimethyl-	0.26
22	23.131	Nonadecane	0.36
23	23.384	trans-Z-alfa-Bisabolene epoxide	0.11
24	25.681	Camazulene	1.07
25	27.350	Coumarin, 7-methoxy-	2.13

În cazul uleiurilor volatile analizate și încapsulate în β -ciclodextrină, din analiza termogravimetrică (figura 3.1.18) a rezultat un procent de ulei volatil încapsulat în proporție de 4-7.5%. Cel mai mare procent a fost observat în cazul uleiului volatil din flori de mușetel. Randamentul etapei de complexare a fost între 63-85%.

Din analiza TG și DSC s-a observat formarea complexelor prin diferențele apărute comparativ cu ciclodextrina pură.

Analiza prin microscopie cu scanare electronică (SEM) a complexelor a indicat dimensiuni ale particulelor la nivel de sute de nanometri-micrometri (figura 3.1.19).

De asemenea, din analiza GC-MS a uleiurilor volatile recuperate din complexi s-a observat încapsularea în concentrații relative mai mari a monoterpenelor și chiar a compușilor de interes, comparativ cu sesquiterpenele.

S-a observat clar o protejare a biocompușilor labili la acțiunea oxidantă a aerului, fapt observat în special la reducerea concentrației compușilor sesquiterpenici în favoarea formării compușilor de oxidare/epoxidare în condiții neprotejate (bisabolol-oxizi și cariofilen-oxid).

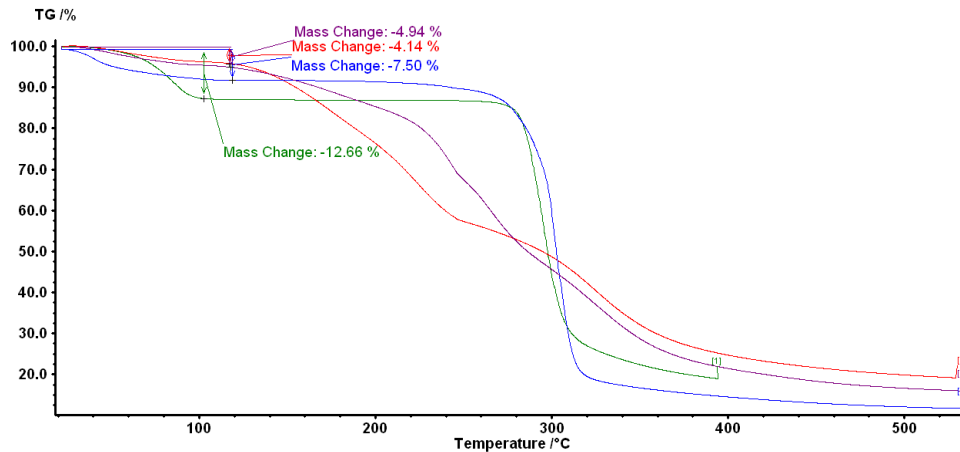


Figura 3.1.18. Analiza TG a nanoparticulelor ulei volatil din mușețel (flori: albastru, frunze-tulpină: violet și rădăcină: roșu)/ β -ciclodextrină, comparativ cu ciclodextrina pură (verde)

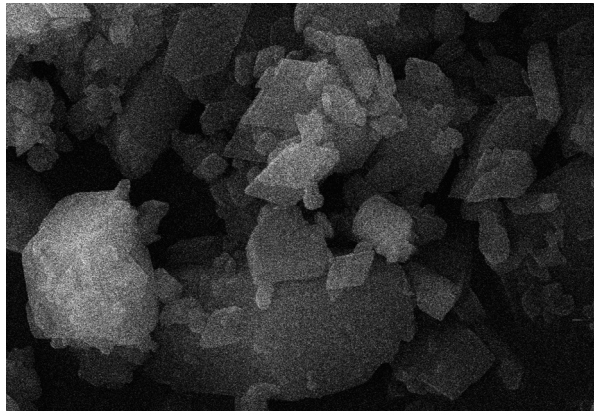
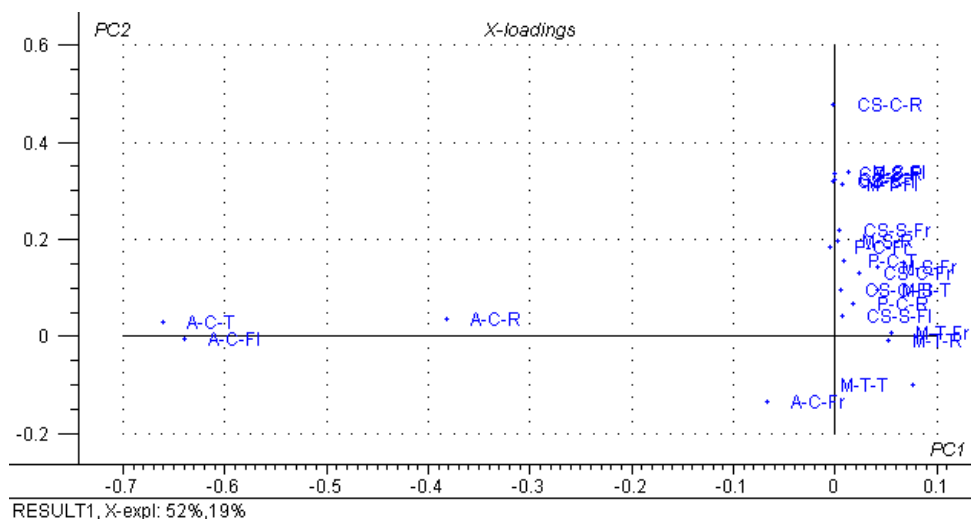


Figura 3.1.19. Analiza prin microscopie cu scanare electronică (SEM) a nanoparticulelor ulei volatil de mușețel/ β -ciclodextrină

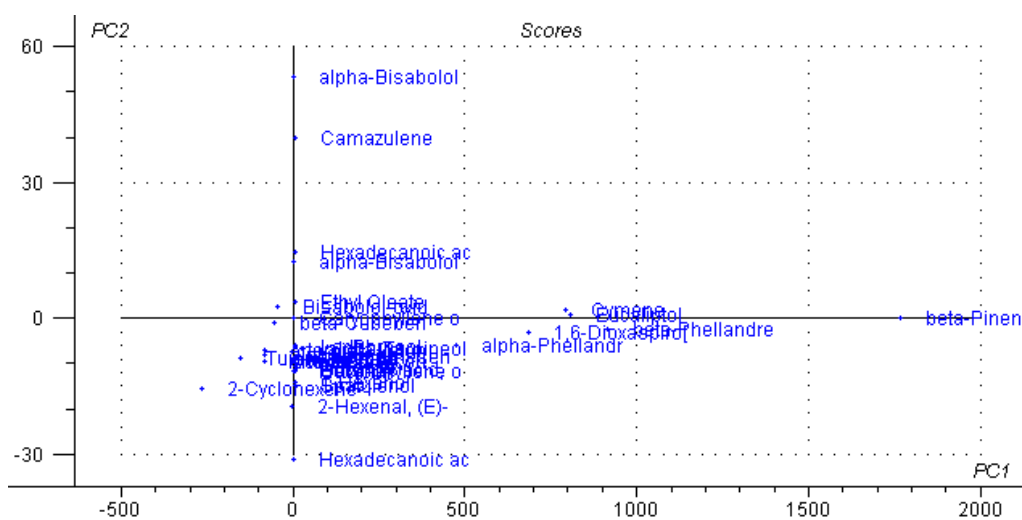
Pentru prelucrarea statistică avansată a rezultatelor separărilor/analizelor gaz-cromatografice a uleiurilor volatile din plante ale familiei *Compositae*, respectiv a rezultatelor de degradare a acestor uleiuri volatile și a complexilor (nanoparticulelor) cu ciclodextrine, s-a apelat la metoda de analiză a componentelor principale (PCA), care permite extragerea informațiilor semnificative din multitudinea de date obținute.

Astfel, la prelucrarea PCA a datelor pentru toate uleiurile volatile s-a obținut o clasificare evidentă a probelor, anghinarea (A) fiind poziționată în special în partea stângă a graficului înregistrărilor (figura 3.1.20), în timp ce mușețelul (M), coada șoricelului (CS) și podbalul (P) sunt situate în partea dreaptă, mult mai bine grupate. Variația explicată a datelor este de 52% pentru prima componentă principală (PC1) și de 19% pentru cea de-a doua. Această clasificare este dată în special de β -pinen, bisabolol și camazulenă (figura 3.1.21).



RESULT1, X-expl: 52%,19%

Figura 3.1.20. Graficul înregistrărilor în cazul analizei GC-MS a biocompușilor din specii ale familiei *Compositae*



RESULT1, X-expl: 52%,19%

Figura 3.1.21. Graficul înregistrărilor în cazul analizei GC-MS a biocompușilor din specii ale familiei *Compositae*

O foarte bună clasificare se observă în cazul speciilor utilizate în funcție de partea de plantă utilizată, indiferent de concentrațiile de încapsulare în ciclodextrine sau de temperatura de degradare. Variația explicată este în toate cazurile peste 80% și este datorată în principal concentrației bisabololului și derivaților oxidați ai acestuia (figurile 3.1.22-3.1.26).

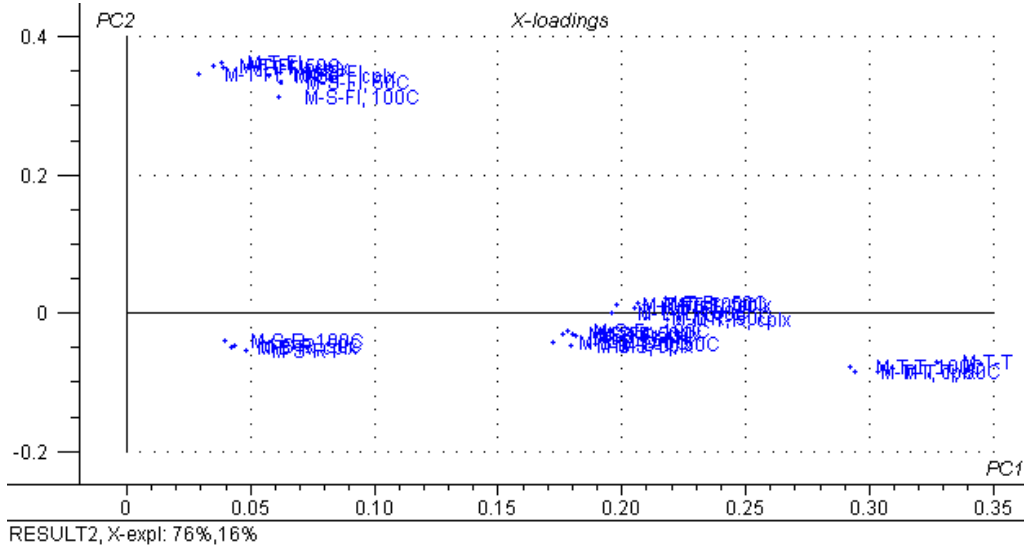


Figura 3.1.22. Graficul înregistrărilor în cazul analizei GC-MS a biocompușilor din specii *Matricaria* (M)

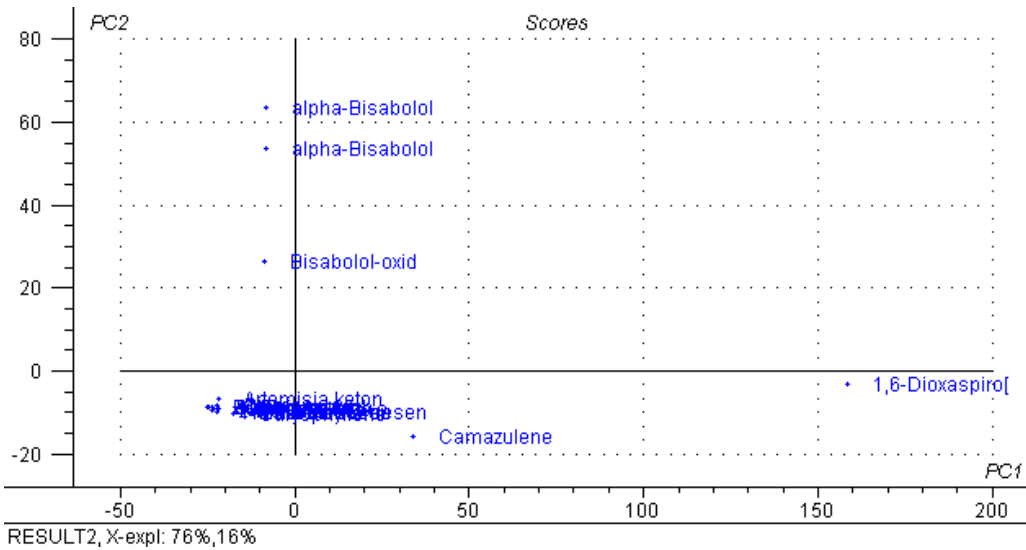
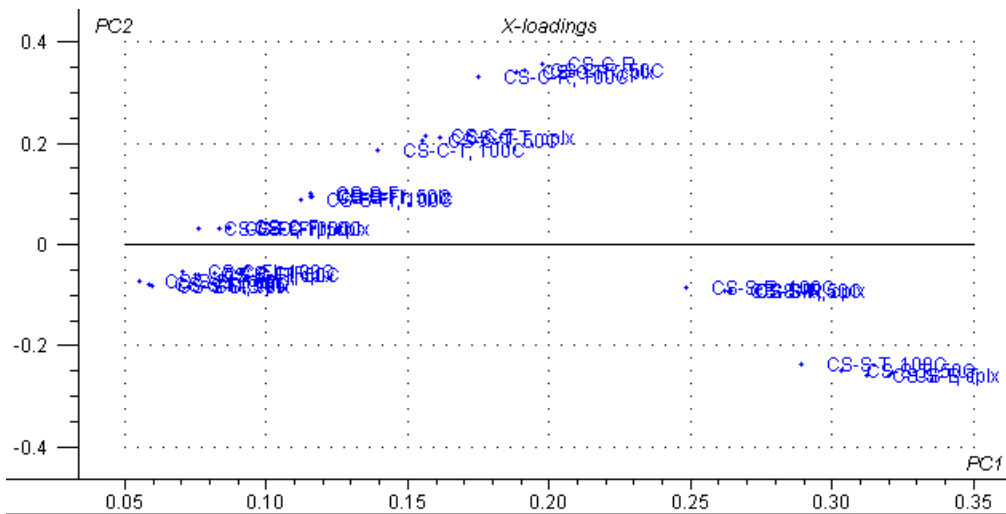
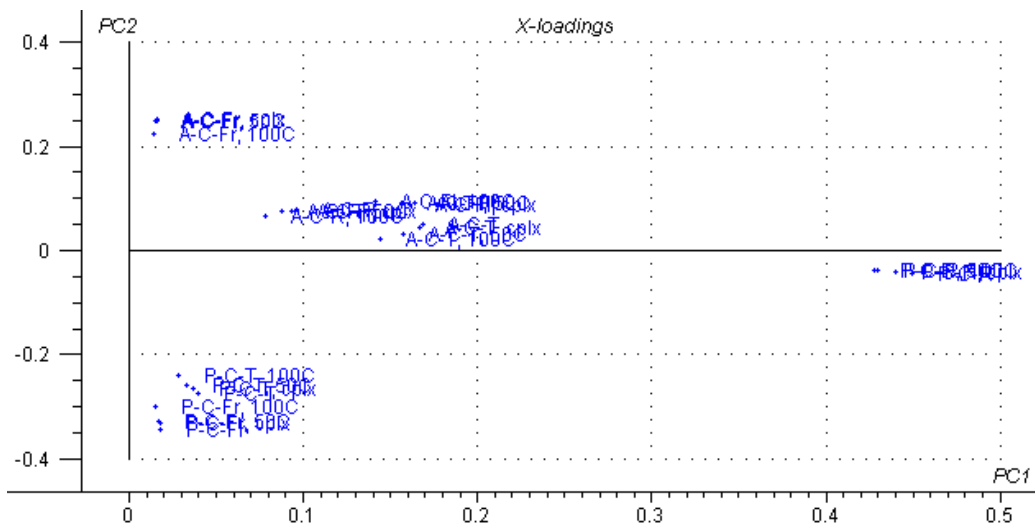


Figura 3.1.23. Graficul scorurilor în cazul analizei GC-MS a biocompușilor din specii *Matricaria* (M)



RESULT3, X-expl: 53%,44%

Figura 3.1.24. Graficul înregistrărilor în cazul analizei GC-MS a biocompușilor din specii *Achillea millefolium* L. (CS)



RESULT4, X-expl: 67%,15%

Figura 3.1.25. Graficul înregistrărilor în cazul analizei GC-MS a biocompușilor din specii *Cynara scolymus* L. (A) și podbal-*Tussilago farfara* L. (P)

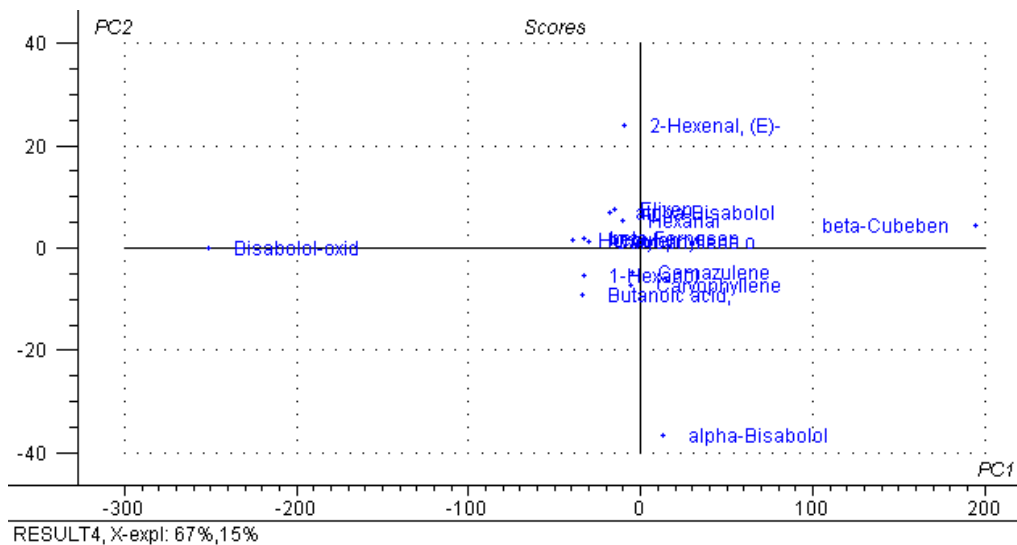


Figura 3.1.26. Graficul scorurilor în cazul analizei GC-MS a biocompușilor din specii *Cynara scolymus* L. (A) și *podbal-Tussilago farfara* L. (P)

În cazul utilizării datelor de cromatografie pentru biocompușii recuperați din complexi și pentru cei de degradare la 100°C s-a constatat aceeași clasificare funcție de specie, primele două componente principale explicând 76% din variația datelor (figura 3.1.27).

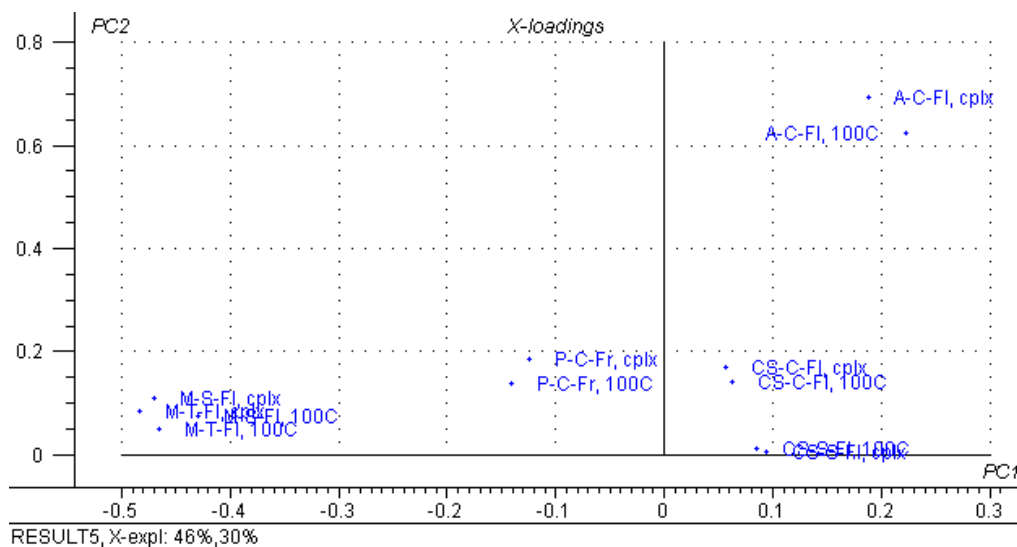


Figura 3.1.27. Graficul înregistrărilor în cazul analizei GC-MS a biocompușilor recuperați din complexii cu β -ciclodextrină și cei de degradare la 100°C în cazul speciilor din *Compositae*

Pentru evaluarea capacității de încapsulare a α - și β -ciclodextrinei în cazul principalilor biocompuși din specii ale familiei *Compositae* (bisabolol, bisabolol-oxid A, bisabolol-oxid B, camazulenă, cariofilenă, cariofilen-oxid) s-a apelat la modelarea moleculară a ciclodextrinelor, a biocompușilor, respectiv la experimente de docare, utilizând în special mecanică moleculară (MM+) (metodele semi-empirice AM1 și PM3 nu au condus la modificarea semnificativă a rezultatelor finale).

Modelarea moleculară în cazul α - și β -ciclodextrinei s-a realizat prin mecanică moleculară, utilizând drept conformații de start conformații ciclice ale resturilor de amidon (legături α -(1 \rightarrow 4)-glucozidice), în care unghiurile de legătură interglucozidice au fost tensionate la 127° în cazul α -ciclodextrinei și la 119° în cazul β -ciclodextrinei. Conformațiile stabile (optimizate prin mecanică moleculară MM+) ale ciclodextrinelor, în absența altor molecule sunt prezentate în figura 3.1.28. Energiile totale relative obținute prin această metodă de modelare moleculară au fost de 71.5 kcal/mol în cazul α -ciclodextrinei și 82.7 kcal/mol în cazul β -ciclodextrinei (tabel 3.1.12).

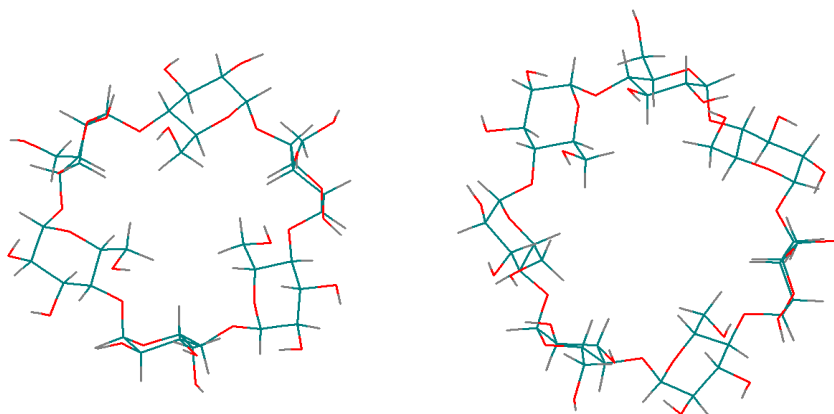


Figura 3.1.28. α - și β -Ciclodextrină optimizată

Biocompușii studiați au fost analizați din punct de vedere conformațional utilizând mecanica moleculară MM+, în scopul obținerii conformației celei mai stabile termodinamic (cu energia cea mai mică).

În modelarea moleculară a interacțiunii biocompus/ciclodextrină, procese desfășurate în absența altor molecule (cum ar fi cele de solvent), s-au utilizat doar conformațiile de minimă energie a moleculelor implicate în interacțiune. Energiile relative totale ale conformațiilor stabile termodinamic pentru acești biocompuși au fost: 13.19 kcal/mol pentru bisabolol, 25.5 și 22 kcal/mol pentru bisabolol-oxidii A și B, 11.15 kcal/mol pentru camazulenă, 53.05 kcal/mol pentru cariofilen și o valoare de patru ori mai mare pentru epoxidul cariofilenei (tabel 3.1.12).

Biocompușii studiați par să se "acomodeze" (*docare*) mult mai bine în interiorul cavității β -ciclodextrinei, decât în cel al α -ciclodextrinei, ceea ce se poate observa

din experimentele de docare ale acestor compuși în ciclodextrine, prin utilizarea câmpului de forțe de mecanică moleculară MM+ la modelarea moleculară a acestor interacțiuni.

În cazul nanoîncapsulării bisabololului și oxizilor acestuia în α -ciclodextrină, calculele teoretice indică o interacțiune hidrofobă (de tip *van der Waals*) între restul hidrofob al biocompusului și interiorul ciclodextrinei. Pentru cele trei cazuri de docare au fost calculate energiile de interacțiune în vid ca diferență între suma energiilor potențiale ale biocompușilor și α - sau β -ciclodextrina în conformațiile cele mai stabile și energia potențială totală a complexului format, valorile acestor energii fiind prezentate în tabelul 3.1.12. În cazul α -ciclodextrinei interacțiunea eficientă pare să fie cu bisabololul și bisabolol-oxidul B (14.3-14.7 kcal/mol), în timp ce interacțiunea cea mai eficientă în cazul β -ciclodextrinei este cu bisabololul (22.8 kcal/mol). În mediu apos însă, interacțiunea nu este cea mai eficientă (probabil datorită interacțiunii resturilor hidrofile cu moleculele de apă) (vezi figurile 3.1.29-3.1.35).

Tabel 3.1.12. Energiile de interacțiune în cazul biocompușilor din specii *Compositae* cu α - și β -ciclodextrină

Nr.	Cod	E (CD) (kcal/mole)	E (Biocmpd) (kcal/mole)	E (CD+Biocmpd) (kcal/mole)	E (CD- Biocmpd) (kcal/mole)	deltaE (kcal/mol)
1	aCD-B	71.49	13.19	84.68	70.31	14.37
2	aCD-BoA	71.49	25.50	96.99	83.73	13.26
3	aCD-BoB	71.49	22.00	93.49	78.80	14.69
4	aCD-Cz	71.49	11.15	82.64	66.47	16.17
5	aCD-Cr	71.49	53.05	124.54	105.09	19.45
6	aCD-Cro	71.49	205.82	277.31	262.53	14.78
7	bCD-B	82.70	13.19	95.89	73.07	22.82
8	bCD-BoA	82.70	25.50	108.20	88.57	19.63
9	bCD-BoB	82.70	22.00	104.70	83.38	21.32
10	bCD-Cz	82.70	11.15	93.85	76.68	17.17
11	bCD-Cr	82.70	53.05	135.75	115.18	20.57
12	bCD-Cro	82.70	205.82	288.52	267.96	20.56

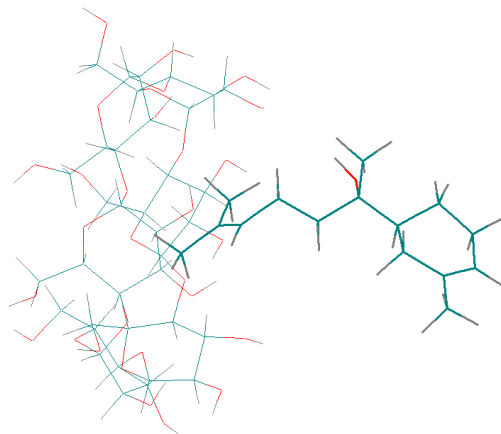


Figura 3.1.29. Complex bisabolol/ α -ciclodextrină

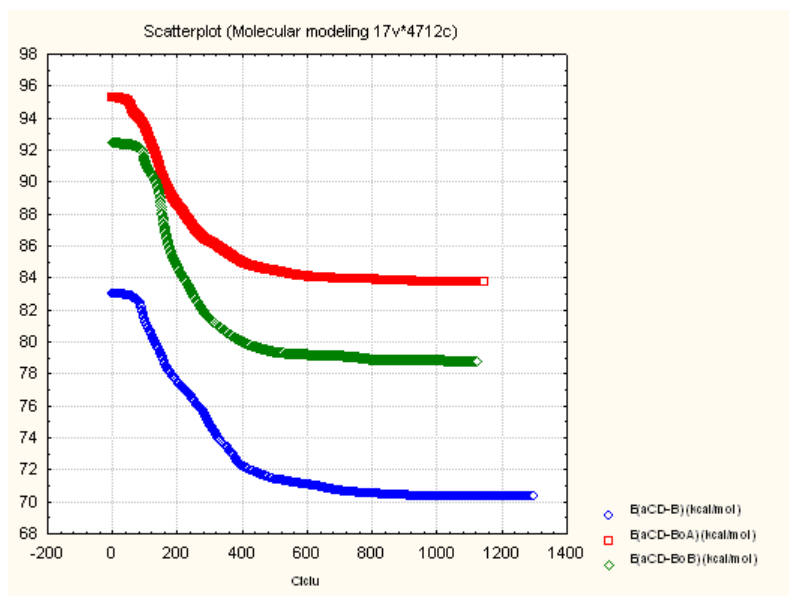


Figura 3.1.30. Energia de interacțiune (kcal/mol) bisabolol (B), bisabololoxid A (BoA), bisabololoxid B (BoB) / α -ciclodextrină din experimentele de docare

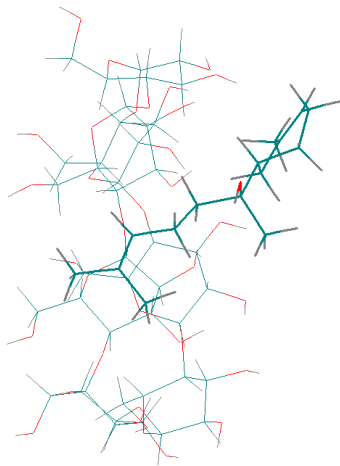


Figura 3.1.31. Complex bisabolol/ β -ciclodextrină

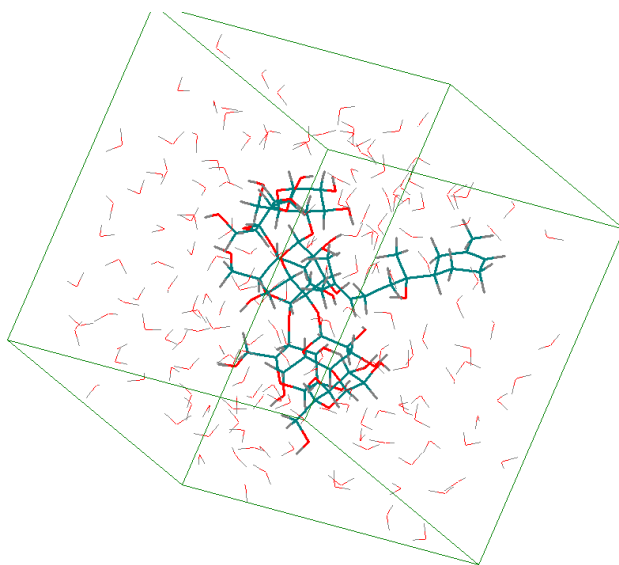


Figura 3.1.32. Complex bisabolol/ β -ciclodextrină (în mediu apos)

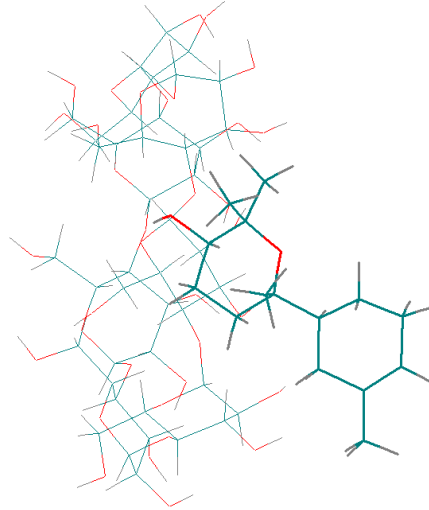


Figura 3.1.33. Complex bisabolol-oxid A/ β -ciclodextrină

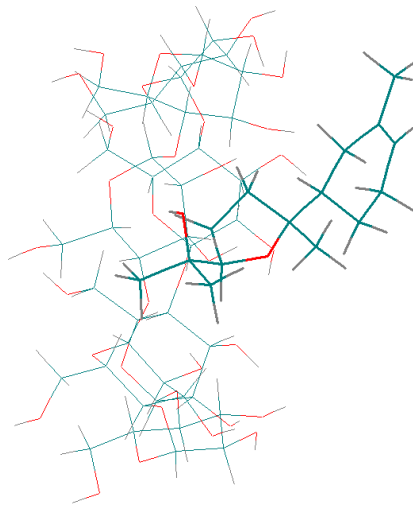


Figura 3.1.34. Complex bisabolol-oxid B/ β -ciclodextrină

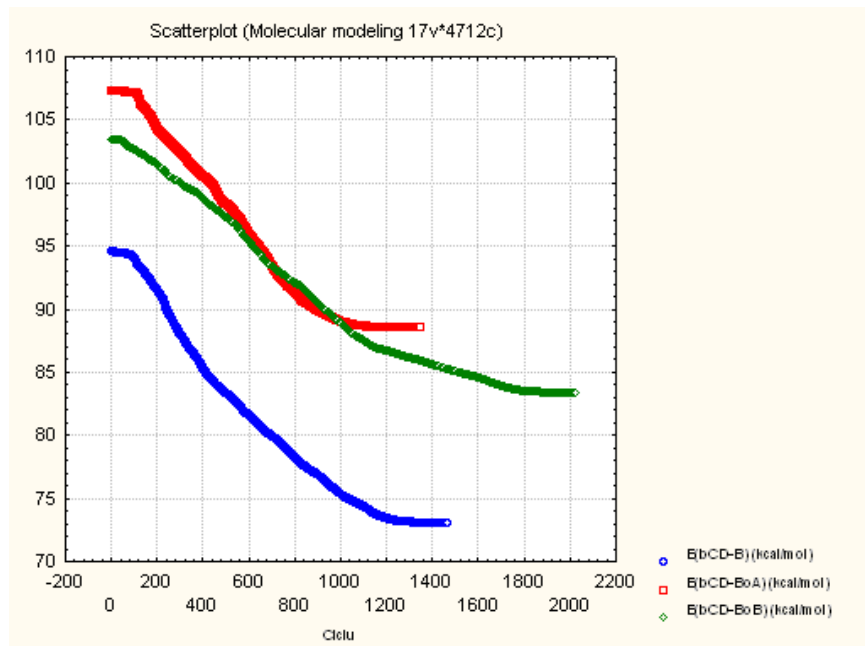


Figura 3.1.35. Energia de interacțiune (kcal/mol) bisabolol (B), bisabolol-oxid A (BoA), bisabolol-oxid B (BoB) / β -ciclodextrină din experimentele de docare

Camazulena și cariofilena permit o încapsulare eficientă în special în zona cu împiedicare sterică minimă (rest ciclopentanic la camazulenă și rest ciclobutanic la cariofilenă), chiar și în cazul prezenței moleculelor de apă (figurile 3.1.36-3.1.39). O diferență semnificativă față de aceste rezultate se poate observa în cazul docării cariofilen-oxidului (tabel 3.1.12 și figurile 3.1.39-3.1.40), pentru care energia de interacțiune cu α -ciclodextrina este mult mai mică (14.8 kcal/mol).

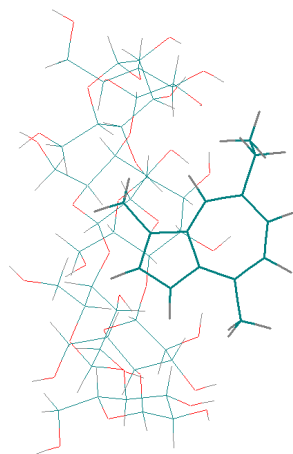


Figura 3.1.36. Complex camazulenă/ β -ciclodextrină

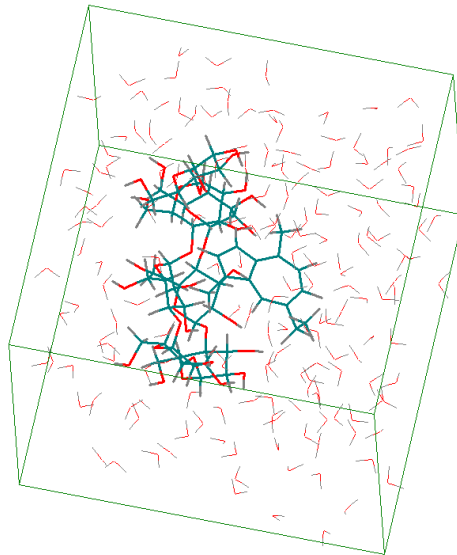


Figura 3.1.37. Complex camazulenă/β-ciclodextrină (în apă)

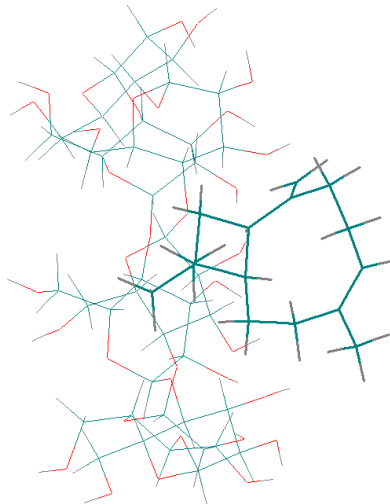


Figura 3.1.38. Complex cariofilen/β-ciclodextrină

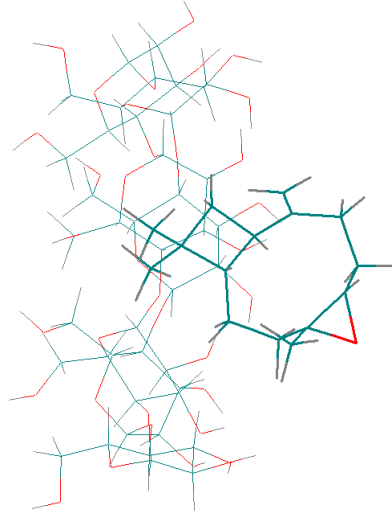


Figura 3.1.39. Complex cariofilenoxid/ β -ciclodextrină

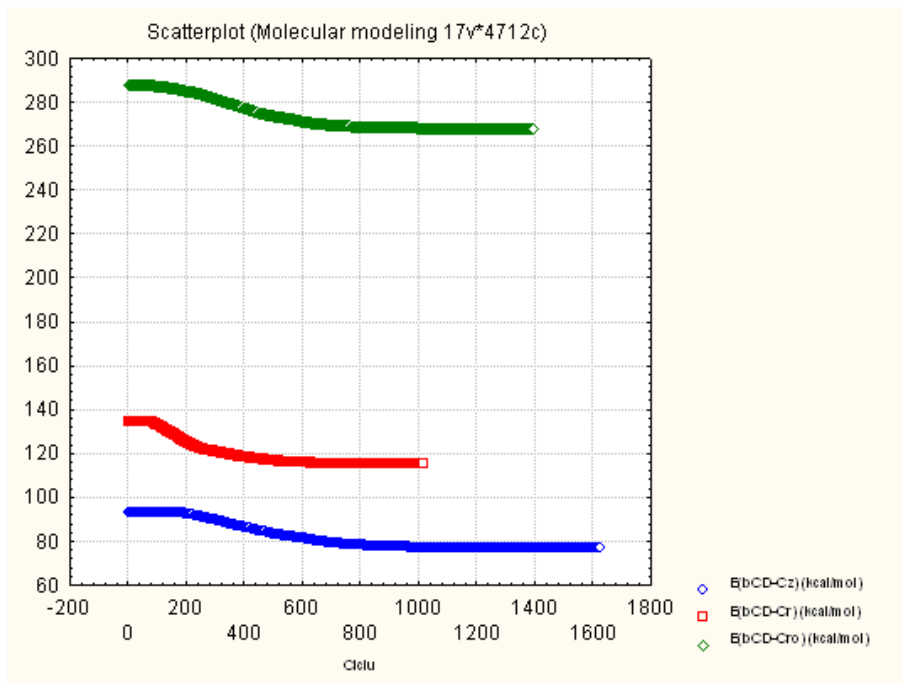


Figura 3.1.40. Energia de interacțiune (kcal/mol) camazulenă (Cz), cariofilen (Cr), cariofilenoxid (Cro) / β -ciclodextrină din experimentele de docare

3.1.4. Concluzii

În urma studiilor efectuate privind obținerea, analiza, nanoîncapsularea și evaluarea proprietăților biocompușilor din specii ale familiei *Compositae* se pot trage următoarele concluzii principale:

- S-au separat 23 tipuri de biosisteme de tip ulei volatil din plante aparținând familiei *Compositae* (mușețel, coada șoricelului, anghinare, podbal) cu randamente sub 1%, care au fost analizate prin GC-MS;
- S-au cuantificat compușii din uleiurile volatile obținute, concentrațiile cele mai mari fiind observate în cazul uleiurilor obținute din flori, astfel: α -bisabololul, bisabolol-oxizii A și B și camazulena au fost principalii compuși din uleiurile volatile din mușețel și coada șoricelului, iar β -cubebenul și 2-hexenalul au fost principalii compuși din uleiurile volatile de anghinare;
- S-au obținut 23 de complecși ulei volatil/ β -ciclodextrină, cu randamente cuprinse între 63% și 85%, cu un conținut în principii bioactive între 4 și 7.5%; complecșii au fost analizați prin TG, DSC și SEM, demonstrându-se formarea compușilor de incluziune și evaluându-se morfologia și dimensiunile particulelor;
- S-a realizat recuperarea și cuantificarea biocompușilor încapsulați în β -ciclodextrină, constatându-se o încapsulare mai avansată a monoterpenelor, bisabololului, oxizilor acestuia și camazulenei, și o încapsulare mai redusă a sesquiterpenoidelor;
- S-au analizat statistic rezultatele obținute, analiza statistică multivariată relevând similitudinea speciilor *Matricaria*, *Achillea* și *Tussilago*, respectiv s-a evidențiat capacitatea de protecție a ciclodextrinelor împotriva acțiunii oxigenului atmosferic, în special asupra sesquiterpenelor labile (cum este cariofilenul);
- S-au evaluat energiile de interacțiune dintre β -ciclodextrină și principalii biocompuși din specii ale familiei *Compositae*, demonstrându-se capacitatea de încapsulare pentru compușii valoroși din punct de vedere terapeutic.

3.2. Obținerea biocompușilor cu activitate hepatoprotectoare potențială prin metode optimizate în vederea nano-încapsulării

3.2.1. Introducere

Obținerea biocompușilor cu activitate hepatoprotectoare potențială prin metode optimizate în vederea nano-încapsulării și testării activității biologice a presupus parcurgerea următoarelor etape (inclusiv optimizarea preliminară a metodelor de obținere):

1. Aplicarea metodei „two-level factorial design” pentru optimizarea preliminară a obținerii biocompușilor din *Matricaria chamomilla* (mușețel);
2. Obținerea efectivă a biocompușilor din *M. chamomilla*, *A. millefolium* și din *S. marianum* (armurariu; etalon pentru activitatea hepatoprotectoare);
3. Analiza biocompușilor prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC) în cazul extractelor în solvenți;
4. Analiza biocompușilor prin spectrofotometrie (UV-VIS) pentru extractele în solvenți.

Proiectarea unui experiment chimic și **optimizarea** parametrilor procesului studiat presupune:

- determinarea faptului dacă modificarea condițiilor de lucru (parametrilor de proces) va avea influență semnificativă asupra randamentului, selectivității, purității etc.;
- predicția condițiilor potrivite de proces care să ducă la îmbunătățirea rezultatelor;
- realizarea unor experimente adiționale care să conducă la obținerea unor informații complementare;
- determinarea condițiilor optime de proces.

Prin urmare se poate stabili o relație funcțională de tipul:

$$\text{Rezultat} = f(\text{condiții experimentale})$$

Pentru optimizarea unui proces chimic trebuie luate în considerare următoarele aspecte:

- variabilele independente ale procesului (factori experimentali): pH, temperatură, concentrații, viteză de agitare etc. Aceste variabile pot fi de două tipuri: variabile continue (temperatură, concentrații) și variabile discrete (tipul de solvent);
- domeniul experimental: specificarea tuturor variabilelor continue și a limitelor minime și maxime între care acestea pot varia, respectiv specificarea tuturor variabilelor discrete și a posibilităților de alegere;

- răspunsul: reprezintă valorile măsurate în cadrul experimentelor (randament, selectivitate, etc.). Răspunsul măsurat, y , nu va fi niciodată egal cu valoarea "adevărată", η , relația de dependență fiind următoarea:

$$y = \eta + e$$

unde e reprezintă eroarea. Astfel, y va fi un bun estimator pentru η . Deoarece valoarea "adevărată" este funcție de variabilele experimentale, x_i , se poate scrie:

$$\eta = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_k)$$

$$y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_k) + e$$

Optimizarea reprezintă o cercetare sistematică a unui proces cu scopul îmbunătățirii răspunsului. Nu este potrivită utilizarea metodei de optimizare ce presupune varierea unui singur parametru pentru o serie de experimentare pentru că se poate obține un maximum fals. Atunci când este posibil se va apela la proiectarea și optimizarea multivariată. În acest sens se apelează la diverse modele și anume:

- modele Taylor cu variabile experimentale continue;
- modele tip suprafață de răspuns;
- modele multiliniare;
- modele de interacțiune de ordin doi;
- modele polinomiale;
- modele etapizate.

Pentru optimizarea proceselor de separare a biocompușilor de interes din speciile studiate (*M. chamomilla*, *A. millefolium* și *S. marianum*) s-a apelat la modelele etapizate de tip "two-level factorial design" pentru stabilirea răspunsului optim.

Metodele de obținere sunt extracția solid-lichid în solvent de diverse polarități a biocompușilor din specii *M. chamomilla*, *A. millefolium* și *S. marianum*. Parametri de proces care au putut fi variați au fost: hidrofobicitatea solventului, timpul de extracție, temperatura de extracție, gradul de concentrare (posibil efect degradativ). Răspunsul utilizat pentru optimizarea proceselor de extracție a fost eficacitatea separării biocompușilor exprimată prin aria totală ponderată a picurilor cromatografici HPLC corespunzători biocompușilor separați.

3.2.2. Materiale și metode

3.2.2.1. Materiale utilizate. Principalele materiale utilizate în obținerea biocompușilor cu posibilă activitate hepatoprotectoare au fost colectate în toamna anului 2009 din zona cultivată sau spontană (*M. chamomilla* și *A. millefolium*, Salonta, România), respectiv din zona de vest a României (*S. marianum*, Grădina botanică Macea, Universitatea „Vasile Goldiș” din Arad), probele fiind frunze, rădăcină, tulpină, flori în primul caz și semințe în cel de-al doilea; s-au utilizat probe proaspete, congelate la -20°C până în momentul utilizării. Înainte de utilizare probele au fost mărunțite cu ajutorul unui blender și supuse separării biocompușilor. Pentru captarea compușilor volatili rezultați la hidrodistilare s-a utilizat hexan (HPLC grade, Merck), iar pentru extracția solid-lichid s-au utilizat următorii solvenți: metanol (HPLC, Merck), etanol 96% (reagent grade, Chimopar),

hexan (GC grade, Merck), benzen, toluen (reagent grade, Chimopar), acetat de etil (reagent grade, Merck), dicloretan (HPLC, Merck), tetrahidrofuran (reagent grade, Merck). Pentru cuantificarea compușilor din clasa flavonoidelor s-au utilizat rutină (>90%, Merck), quercetină (98%, Merck) și silibină (>98%, Fluka). Pentru analizele GC-MS s-a utilizat hexan (GC grade), iar pentru analizele cromatografice s-au utilizat eluenți de puritate HPLC (acetonitril, metanol, Fluka).

3.2.2.2. Obținerea extractelor flavonoidice din *M. chamomilla*, *A. millefolium* și *S. marianum*. Extracția solid-lichid s-a realizat cu ajutorul unui aparat de extracție de 100 ml, utilizând cantitățile de material vegetal prezentate în tabelul 3.2.1. S-au utilizat 70 ml etanol (conc. 20%, 40%, 60%, 80% și 96%), iar în cazul solvenților: metanol, benzen, toluen, hexan, acetonă, acetat de etil, tetrahidrofuran s-a utilizat 15 ml solvent. Încălzirea s-a realizat pe baie de apă la 55-60°C; durata extracției a fost de 1.5 ore. Din extractele inițiale obținute cu etanol 20-96% au fost reținuți câte 10 ml pentru analize fizico-chimice. Restul de extract a fost concentrat într-un rotavapor. Rezultatele extracțiilor sunt prezentate în tabelul 3.2.1.

În cazul extractelor etanolice în care s-a utilizat 70 ml solvent (de diferite conc. 20%, 40%, 60%, 80% și 96%) raportul material vegetal/solvent a fost de aproximativ de 1:14.

Tabel 3.2.1a. Extracția probelor de *M. chamomilla*, *S. marianum* și *A. millefolium* cu etanol 20%

Nr. crt	Cod	Material vegetal utilizat	m (g)	V (solvent) (ml)	V (extr) (ml)	V (extr. conc.) (ml)
1	Cm_Rd_20	<i>M. chamomilla</i> (rădăcină)	5.37	70	29.5	10.3
2	Cm_Tu_20	<i>M. chamomilla</i> (tulpină)	5.20	70	28.5	8.9
3	Cm_Fr_20	<i>M. chamomilla</i> (frunze)	5.53	70	27	8.0
4	Cm_Fl_20	<i>M. chamomilla</i> (flori)	5.31	70	30	11.5
5	Arm_Se_20	<i>S. marianum</i> (semințe)	5.51	70	28.5	9.7
6	Cs_Rd_20	<i>A. millefolium</i> (rădăcină)	5.2802	70	25	6.2
7	Cs_Tu_20	<i>A. millefolium</i> (tulpină)	5.1459	70	28.5	9.6
8	Cs_Fr_20	<i>A. millefolium</i> (frunze)	5.0942	70	28.25	9.1
9	Cs_Fl_20	<i>A. millefolium</i> (flori)	5.1092	70	27.25	8.2

Tabel 3.2.1b. Extracția probelor de *M. chamomilla*, *S. marianum* și *A. millefolium* cu etanol 40%

Nr. crt	Cod	Material vegetal utilizat	m (g)	V (solvent) (ml)	V (extr) (ml)	V (extr. conc.) (ml)
1	Cm_Rd_40	<i>M. chamomilla</i> (rădăcină)	5.35	70	30	10.7
2	Cm_Tu_40	<i>M. chamomilla</i> (tulpină)	5.28	70	29	9.9
3	Cm_Fr_40	<i>M. chamomilla</i> (frunze)	5.17	70	30.5	11.3
4	Cm_Fl_40	<i>M. chamomilla</i> (flori)	5.40	70	30	11.2
5	Arm_Se_40	<i>S. marianum</i> (semințe)	5.52	70	29.5	10.5
6	Cs_Rd_40	<i>A. millefolium</i> (rădăcină)	5.15	70	30	11
7	Cs_Tu_40	<i>A. millefolium</i> (tulpină)	5.42	70	29.5	10.3
8	Cs_Fr_40	<i>A. millefolium</i> (frunze)	5.17	70	27.5	8.2
9	Cs_Fl_40	<i>A. millefolium</i> (flori)	5.18	70	29	10.1

Tabel 3.2.1c. Extracția probelor de *M. chamomilla*, *S. marianum* și *A. millefolium* cu etanol 60%

Nr. crt	Cod	Material vegetal utilizat	m (g)	V (solvent) (ml)	V (extr) (ml)	V (extr. conc.) (ml)
1	Cm_Rd_60	<i>M. chamomilla</i> (rădăcină)	5.02	70	30.5	11.5
2	Cm_Tu_60	<i>M. chamomilla</i> (tulpină)	5.48	70	30	10.4
3	Cm_Fr_60	<i>M. chamomilla</i> (frunze)	5.32	70	29.5	11
4	Cm_Fl_60	<i>M. chamomilla</i> (flori)	5.16	70	30	9.7
5	Arm_Se_60	<i>S. marianum</i> (semințe)	5.57	70	30.0	10.9
6	Cs_Rd_60	<i>A. millefolium</i> (rădăcină)	5.27	70	30	10.8
7	Cs_Tu_60	<i>A. millefolium</i> (tulpină)	5.03	70	28.5	9.6
8	Cs_Fr_60	<i>A. millefolium</i> (frunze)	5.40	70	29	9.7
9	Cs_Fl_60	<i>A. millefolium</i> (flori)	5.12	70	29.5	10.5

Tabel 3.2.1d. Extracția probelor de *M. chamomilla*, *S. marianum* și *A. millefolium* cu etanol 80%

Nr. crt	Cod	Material vegetal utilizat	m (g)	V (solvent) (ml)	V (extr) (ml)	V (extr. conc.) (ml)
1	Cm_Rd_80	<i>M. chamomilla</i> (rădăcină)	5.17	70	30	10.2
2	Cm_Tu_80	<i>M. chamomilla</i> (tulpină)	5.61	70	28	8.6
3	Cm_Fr_80	<i>M. chamomilla</i> (frunze)	5.11	70	29.5	10.1
4	Cm_Fl_80	<i>M. chamomilla</i> (flori)	5.32	70	30	10.0
5	Arm_Se_80	<i>S. marianum</i> (semințe)	5.26	70	25.5	6.3
6	Cs_Rd_80	<i>A. millefolium</i> (rădăcină)	5.32	70	30	10.9
7	Cs_Tu_80	<i>A. millefolium</i> (tulpină)	5.12	70	27.5	8.5
8	Cs_Fr_80	<i>A. millefolium</i> (frunze)	5.37	70	26.5	7.8
9	Cs_Fl_80	<i>A. millefolium</i> (flori)	5.33	70	28	8.9

Tabel 3.2.1e. Extracția probelor de *M. chamomilla*, *S. marianum* și *A. millefolium* cu etanol 96%

Nr. crt	Cod	Material vegetal utilizat	m (g)	V (solvent) (ml)	V (extr) (ml)	V (extr. conc.) (ml)
1	Cm_Rd_100	<i>M. chamomilla</i> (rădăcină)	3.85	70	25	5.8
2	Cm_Tu_100	<i>M. chamomilla</i> (tulpină)	5.42	70	28.5	9.1
3	Cm_Fr_100	<i>M. chamomilla</i> (frunze)	5.13	70	25	5.5
4	Cm_Fl_100	<i>M. chamomilla</i> (flori)	5.40	70	30	11
5	Arm_Se_100	<i>S. marianum</i> (semințe)	5.46	70	26.5	7.6
6	Cs_Rd_100	<i>A. millefolium</i> (rădăcină)	5.24	70	28.5	9.7
7	Cs_Tu_100	<i>A. millefolium</i> (tulpină)	5.10	70	28.5	9.8
8	Cs_Fr_100	<i>A. millefolium</i> (frunze)	5.18	70	25	5.9
9	Cs_Fl_100	<i>A. millefolium</i> (flori)	5.33	70	27.5	8.7

În cazul extractelor în următorii solvenți: metanol, benzen, toluen, hexan, acetonă, acetat de etil, dicloretan și tetrahidrofuran s-a utilizat 15 ml solvent, iar raportul material vegetal/solvent a fost de aproximativ de 1:5.

Tabel 3.2.1f. Extracția probelor de *M. chamomilla*, *S. marianum* și *A. millefolium* cu metanol

Nr. crt	Cod	Material vegetal utilizat	m (g)	V (solvent) (ml)	V (extr) (ml)	V (extr. conc.) (ml)
1	Cm_Rd_M	<i>M. chamomilla</i> (rădăcină)	2.50	15	10.0	-
2	Cm_Tu_M	<i>M. chamomilla</i> (tulpină)	2.59	15	8.3	-
3	Cm_Fr_M	<i>M. chamomilla</i> (frunze)	2.22	15	7.5	-
4	Cm_Fl_M	<i>M. chamomilla</i> (flori)	3.40	10	5.8	-
5	Arm_Se_M	<i>S. marianum</i> (semințe)	2.35	15	8.2	-
6	Cs_Rd_M	<i>A. millefolium</i> (rădăcină)	2.44	15	9.3	-
7	Cs_Tu_M	<i>A. millefolium</i> (tulpină)	2.54	15	8.2	-
8	Cs_Fr_M	<i>A. millefolium</i> (frunze)	2.31	15	7.4	-
9	Cs_Fl_M	<i>A. millefolium</i> (flori)	2.42	15	6.2	-

Tabel 3.2.1g. Extracția probelor de *M. chamomilla*, *S. marianum* și *A. millefolium* cu benzen

Nr. crt	Cod	Material vegetal utilizat	m (g)	V (solvent) (ml)	V (extr) (ml)	V (extr. conc.) (ml)
1	Cm_Rd_B	<i>M. chamomilla</i> (rădăcină)	2.82	15	7.0	-
2	Cm_Tu_B	<i>M. chamomilla</i> (tulpină)	2.75	15	10.1	-
3	Cm_Fr_B	<i>M. chamomilla</i> (frunze)	2.85	15	8.2	-
4	Cm_Fl_B	<i>M. chamomilla</i> (flori)	2.97	15	6.5	-
5	Arm_Se_B	<i>S. marianum</i> (semințe)	2.63	15	6.6	-
6	Cs_Rd_B	<i>A. millefolium</i> (rădăcină)	2.29	15	8.1	-
7	Cs_Tu_B	<i>A. millefolium</i> (tulpină)	2.40	15	8.4	-
8	Cs_Fr_B	<i>A. millefolium</i> (frunze)	2.70	15	7.6	-
9	Cs_Fl_B	<i>A. millefolium</i> (flori)	2.63	15	7.7	-

Tabel 3.2.1h. Extracția probelor de *M. chamomilla*, *S. marianum* și *A. millefolium* cu toluen

Nr. crt	Cod	Material vegetal utilizat	m (g)	V (solvent) (ml)	V (extr) (ml)	V (extr. conc.) (ml)
1	Cm_Rd_T	<i>M. chamomilla</i> (rădăcină)	2.41	15	8.8	-
2	Cm_Tu_T	<i>M. chamomilla</i> (tulpină)	2.59	15	9.2	-
3	Cm_Fr_T	<i>M. chamomilla</i> (frunze)	2.36	15	7.6	-
4	Cm_Fl_T	<i>M. chamomilla</i> (flori)	3.30	10	4.0	-
5	Arm_Se_T	<i>S. marianum</i> (semințe)	2.66	15	9.1	-
6	Cs_Rd_T	<i>A. millefolium</i> (rădăcină)	2.34	15	9.7	-
7	Cs_Tu_T	<i>A. millefolium</i> (tulpină)	2.33	15	10.1	-
8	Cs_Fr_T	<i>A. millefolium</i> (frunze)	2.50	15	7.6	-
9	Cs_Fl_T	<i>A. millefolium</i> (flori)	2.76	15	7.7	-

Tabel 3.2.1i. Extracția probelor de *M. chamomilla*, *S. marianum* și *A. millefolium* cu hexan

Nr. crt	Cod	Material vegetal utilizat	m (g)	V (solvent) (ml)	V (extr) (ml)	V (extr. conc.) (ml)
1	Cm_Rd_H	<i>M. chamomilla</i> (rădăcină)	2.90	15	5.1	-
2	Cm_Tu_H	<i>M. chamomilla</i> (tulpină)	2.54	15	6.0	-
3	Cm_Fr_H	<i>M. chamomilla</i> (frunze)	2.15	15	5.8	-
4	Cm_Fl_H	<i>M. chamomilla</i> (flori)	3.26	10	5.2	-
5	Arm_Se_H	<i>S. marianum</i> (semințe)	2.65	15	4.3	-
6	Cs_Rd_H	<i>A. millefolium</i> (rădăcină)	2.55	15	6.7	-
7	Cs_Tu_H	<i>A. millefolium</i> (tulpină)	2.89	15	6.2	-
8	Cs_Fr_H	<i>A. millefolium</i> (frunze)	2.15	15	4.3	-
9	Cs_Fl_H	<i>A. millefolium</i> (flori)	2.40	15	6.8	-

Tabel 3.2.1j. Extracția probelor de *M. chamomilla*, *S. marianum* și *A. millefolium* cu acetonă

Nr. crt	Cod	Material vegetal utilizat	m (g)	V (solvent) (ml)	V (extr) (ml)	V (extr. conc.) (ml)
1	Cm_Rd_Ac	<i>M. chamomilla</i> (rădăcină)	2.54	15	9.8	-
2	Cm_Tu_Ac	<i>M. chamomilla</i> (tulpină)	2.62	15	9.2	-
3	Cm_Fr_Ac	<i>M. chamomilla</i> (frunze)	2.11	15	7.8	-
4	Cm_Fl_Ac	<i>M. chamomilla</i> (flori)	3.75	10	3.8	-
5	Arm_Se_Ac	<i>S. marianum</i> (semințe)	2.65	15	8.3	-
6	Cs_Rd_Ac	<i>A. millefolium</i> (rădăcină)	2.60	15	7.8	-
7	Cs_Tu_Ac	<i>A. millefolium</i> (tulpină)	2.53	15	8.2	-
8	Cs_Fr_Ac	<i>A. millefolium</i> (frunze)	2.43	15	6.1	-
9	Cs_Fl_Ac	<i>A. millefolium</i> (flori)	2.38	15	7.8	-

Tabel 3.2.1k. Extracția probelor de *M. chamomilla*, *S. marianum* și *A. millefolium* cu acetat de etil

Nr. crt	Cod	Material vegetal utilizat	m (g)	V (solvent) (ml)	V (extr) (ml)	V (extr. conc.) (ml)
1	Cm_Rd_AcEt	<i>M. chamomilla</i> (rădăcină)	2.35	15	11.5	-
2	Cm_Tu_AcEt	<i>M. chamomilla</i> (tulpină)	2.37	15	11.7	-
3	Cm_Fr_AcEt	<i>M. chamomilla</i> (frunze)	2.60	15	9.8	-
4	Cm_Fl_AcEt	<i>M. chamomilla</i> (flori)	2.86	15	8.7	-
5	Arm_Se_AcEt	<i>S. marianum</i> (semințe)	2.78	15	7.5	-
6	Cs_Rd_AcEt	<i>A. millefolium</i> (rădăcină)	2.78	15	11.5	-
7	Cs_Tu_AcEt	<i>A. millefolium</i> (tulpină)	2.58	15	12.2	-
8	Cs_Fr_AcEt	<i>A. millefolium</i> (frunze)	2.60	15	8.4	-
9	Cs_Fl_AcEt	<i>A. millefolium</i> (flori)	2.53	15	7.3	-

Tabel 3.2.1l. Extracția probelor de *M. chamomilla*, *S. marianum* și *A. millefolium* cu dicloretan

Nr. crt	Cod	Material vegetal utilizat	m (g)	V (solvent) (ml)	V (extr) (ml)	V (extr. conc.) (ml)
1	Cm_Rd_DCE	<i>M. chamomilla</i> (rădăcină)	2.59	15	8.5	-
2	Cm_Tu_DCE	<i>M. chamomilla</i> (tulpină)	2.49	15	8.9	-
3	Cm_Fr_DCE	<i>M. chamomilla</i> (frunze)	2.45	15	8.1	-
4	Cm_Fl_DCE	<i>M. chamomilla</i> (flori)	2.85	15	7.8	-
5	Arm_Se_DCE	<i>S. marianum</i> (semințe)	2.76	15	7.3	-
6	Cs_Rd_DCE	<i>A. millefolium</i> (rădăcină)	2.57	15	9.3	-
7	Cs_Tu_DCE	<i>A. millefolium</i> (tulpină)	2.36	15	9.4	-
8	Cs_Fr_DCE	<i>A. millefolium</i> (frunze)	2.87	15	6.1	-
9	Cs_Fl_DCE	<i>A. millefolium</i> (flori)	2.71	15	7	-

Tabel 3.2.1m. Extracția probelor de *M. chamomilla*, *S. marianum* și *A. millefolium* cu tetrahidrofuran

Nr. crt	Cod	Material vegetal utilizat	m (g)	V (solvent) (ml)	V (extr) (ml)	V (extr. conc.) (ml)
1	Cm_Rd_Thf	<i>M. chamomilla</i> (rădăcină)	2.50	15	8.5	-
2	Cm_Tu_Thf	<i>M. chamomilla</i> (tulpină)	2.46	15	8.7	-
3	Cm_Fr_Thf	<i>M. chamomilla</i> (frunze)	2.03	15	8.9	-
4	Cm_Fl_Thf	<i>M. chamomilla</i> (flori)	2.95	15	7.8	-
5	Arm_Se_Thf	<i>S. marianum</i> (semințe)	2.71	15	7.2	-
6	Cs_Rd_THF	<i>A. millefolium</i> (rădăcină)	2.63	15	8	-
7	Cs_Tu_THF	<i>A. millefolium</i> (tulpină)	2.18	15	6.8	-
8	Cs_Fr_THF	<i>A. millefolium</i> (frunze)	2.69	15	6.1	-
9	Cs_Fl_THF	<i>A. millefolium</i> (flori)	2.43	15	6.2	-

Tabel 3.2.1n. Extracția probelor de *M. chamomilla*, *S. marianum* și *A. millefolium* cu etanol 96%

Nr. crt	Cod	Material vegetal utilizat	m (g)	V (solvent) (ml)	V (extr) (ml)	V (extr. conc.) (ml)
1	Cm_Rd	<i>M. chamomilla</i> (rădăcină)	5.10	15	8.5	-
2	Cm_Tu	<i>M. chamomilla</i> (tulpină)	5.23	15	9.5	-
3	Cm_Tu1	<i>M. chamomilla</i> (tulpină)	5.10	15	3.0	-
4	Cm_Fr	<i>M. chamomilla</i> (frunze)	5.43	15	8.0	-
5	Cm_Fl	<i>M. chamomilla</i> (flori)	5.13	15	6.5	-
6	Arm_Se	<i>S. marianum</i> (semințe)	5.15	15	8.0	-
7	Cs_Rd	<i>A. millefolium</i> (rădăcină)	5.24	15	8	-
8	Cs_Tu	<i>A. millefolium</i> (tulpină)	5.10	15	7	-
9	Cs_Fr	<i>A. millefolium</i> (frunze)	5.00	15	4	-
10	Cs_Fr	<i>A. millefolium</i> (frunze)	5.03	15	7.5	-
11	Cs_Fl	<i>A. millefolium</i> (flori)	5.01	15	3	-

3.2.2.3. Analiza HPLC. Analiza cromatografică a extractelor s-a realizat cu un aparat HPLC Jasco, prevăzut cu pompă cuaternară (PU-2080 Plus), unitate de amestecare (LG-2080-04 Quaternary Gradient), degazor (DG-2080-54 4), detector spectrofotometric (UV-2070 Plus Intelligent UV/VIS Detector), cu posibilitate de achiziție și prelucrare a datelor pe calculator (soft JASCO ChromPass Chromatography Data System, Version 1.7.403.1), prin intermediul unei interfețe LC-Net II / ADC. S-au utilizat următoarele condiții de analiză: *coloană* Nucleosil 100 C18, 25 x 0.46 cm, 5 μm diametru al particulelor, *lungime de undă UV* 288 nm, *fază mobilă*: Acetonitril : Apă 50 : 50, *temperatură* 25°C, *debit* 1 ml/min, *volum injectat* 20 μl.

3.2.2.4. Analiza UV-VIS. Analiza soluțiilor de compuși etalon sau a extractelor (diverse diluții) de *M. chamomilla*, *A. millefolium* și *S. marianum* s-a realizat cu ajutorul unui spectrofotometru UV-VIS CamSpec 501, iar datele obținute au fost prelucrate cu ajutorul programului UV-VIS Analyst, versiunea 4.67. Ca probă martor s-a folosit solvențul corespunzător.

3.2.3. Rezultate și discuții

3.2.3.1. Optimizarea obținerii biocompușilor din *M. chamomilla* prin extracție solid-lichid. În proiectarea și optimizarea experimentului trebuie specificat domeniul experimental. În cazul metodei "two-level factorial design" utilizate se aleg două nivele ale valorilor parametrilor implicați în proces și anume: una scăzută, (-), și una ridicată, (+). Pentru optimizarea eficienței separării biocompușilor din *M. chamomilla*, setul de parametri utilizați sunt prezentați mai jos (logaritmul coeficientului de partiție octanol/apă, $\log P$, pentru solvenții utilizați la extracție are următoarele valori: metanol -0.77, etanol -0.31, acetonă -0.24, tetrahidrofuran 0.46, acetat de etil 0.73, benzen 2.13, toluen 2.73, hexan 3.9, dicloretan 1.48):

Tabel 3.2.2. Variabile utilizate în design și optimizare

Factori	Nivele	
	(-)	(+)
A: Hidrofobitate solvent ($\log P$, hexan, metanol)	3.9	-0.77
B: Timp de extracție (ore)	1	3
C: Concentrare (0 – nu; 1 – 1:10)	0	1

Designul factorial pentru acest caz se realizează utilizând datele din tabelul de mai jos (tabel 3.2.3) și anume: valorile minime și maxime pentru variabile și răspunsul pentru fiecare caz. Eficiența obținerii biocompușilor s-a cuantificat pe baza ariilor totale HPLC (ponderate pentru același raport de concentrare a extractelor, dacă este cazul). Pentru realizarea optimizării este necesar să se realizeze tabelul semnelor (tabel 3.2.4), respectiv ilustrarea geometrică a experimentelor factoriale (figura 3.2.1).

Tabel 3.2.3. Design factorial pentru obținerea biocompușilor din *M. chamomilla*

Factori	Nivele							
	0		3		1		3	
C	0		1		3		1	
B	1		3		1		3	
A	3.9	-0.77	3.9	-0.77	3.9	-0.77	3.9	-0.77
Eficiență (Arie)	17	70	388	526	111	335	305	726
Etichetă	1	a	b	ab	c	ac	bc	abc

Tabel 3.2.4. Semnele utilizate în designul factorial

Etichetă	Factori			Eficiență (Arie totală HPLC, mV·min)
	A	B	C	
1	-	-	-	17
a	+	-	-	70
b	-	+	-	388
ab	+	+	-	526
c	-	-	+	111
ac	+	-	+	335
bc	-	+	+	305
abc	+	+	+	726

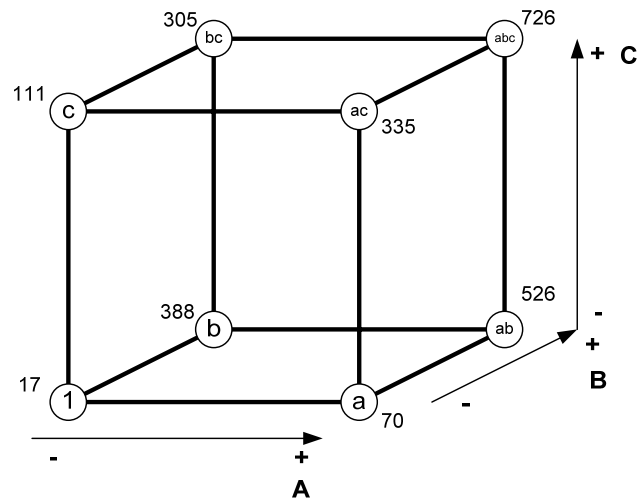


Figura 3.2.1. Distribuția punctelor experimentale în spațiul definit de factori

Principalele efecte A, B și C sunt definite ca jumătate din media diferențelor observate corespunzătoare:

$$A = \frac{1}{2} \cdot \frac{[(a-1) + (ab-b) + (ac-c) + (abc-bc)]}{4} = 104.5$$

$$B = \frac{1}{2} \cdot \frac{[(b-1) + (ab-a) + (bc-c) + (abc-ac)]}{4} = 176.5$$

$$C = \frac{1}{2} \cdot \frac{[(c-1) + (ac-a) + (bc-b) + (abc-ab)]}{4} = 59.5$$

Efectele de interacțiune se calculează conform următoarelor formule:

$$AB = \frac{1}{2} \cdot [A_{B+} - A_{B-}] = 35.25$$

$$AC = \frac{1}{2} \cdot [A_{C+} - A_{C-}] = 56.75$$

$$BC = \frac{1}{2} \cdot [B_{C+} - B_{C-}] = -30.25$$

$$A_{B+} = \frac{1}{2} \cdot \frac{[(ab - b) + (abc - bc)]}{2} = 139.75$$

$$A_{B-} = \frac{1}{2} \cdot \frac{[(a - 1) + (ac - c)]}{2} = 69.25$$

$$A_{C+} = \frac{1}{2} \cdot \frac{[(ac - c) + (abc - bc)]}{2} = 161.25$$

$$A_{C-} = \frac{1}{2} \cdot \frac{[(a - 1) + (ab - b)]}{2} = 47.75$$

$$B_{C+} = \frac{1}{2} \cdot \frac{[(bc - c) + (abc - ac)]}{2} = 146.25$$

$$B_{C-} = \frac{1}{2} \cdot \frac{[(b - 1) + (ab - a)]}{2} = 206.75$$

$$ABC = \frac{1}{2} \cdot \frac{[(abc - 1) + (a - bc) + (b - ac) + (c - ab)]}{4} = 14$$

Se constată că doar factorii A și B au un efect mai important asupra eficienței de separare a biocompușilor din *M. chamomilla*, primul cu o valoare de ~140, deci este necesar un solvent hidrofil pentru o extracție eficientă, iar al doilea cu o valoare pozitivă mai mare, de 176, deci un timp de extracție mai mare conduce la o creștere semnificativă a eficienței obținerii biocompușilor. În schimb efectele de interacțiune nu sunt foarte importante comparativ cu valorile mărimilor pentru factorii singulari, nici în cazul interacțiunilor de nivel doi, nici în cel de nivel trei. Datele de proiectare/optimizare se utilizează pentru stabilirea valorilor optime ale variabilelor de proces în acest caz.

3.2.3.2. Obținerea și analiza biocompușilor din *M. chamomilla*, *A. millefolium* și *S. marianum* prin extracție solid-lichid. Analiza extractelor de *M. chamomilla*, *A. millefolium* și *S. marianum* s-a realizat prin HPLC (Anexa A.3.2: figurile A.3.2.1.-A.3.2.19).

3.2.3.2.1. Obținerea curbelor de etalonare

Pentru determinarea cantitativă a principalelor flavonoide și compuși înrudiți din speciile aparținând familiei *Compositae* (*Matricaria chamomilla*, *Achillea millefolium* și *Silybum marianum*) a fost necesară obținerea curbelor de etalonare HPLC pentru cele 3 flavonoide etalon: rutină, separat prin HPLC la timp de retenție 2.3 și 3.1 minute, quercetină, la 4.2 minute, respectiv silibină la 4.4 minute.

Principalul compus din seria flavonoidelor, care se găsește în speciile *Matricaria*, este quercetina. Picul cromatografic pentru quercetină este unitar și apare la un timp de retenție de 4.2 minute, curba de etalonare determinată pentru o concentrație de până la 1 mg/ml având un coeficient de corelare de 0.9804.

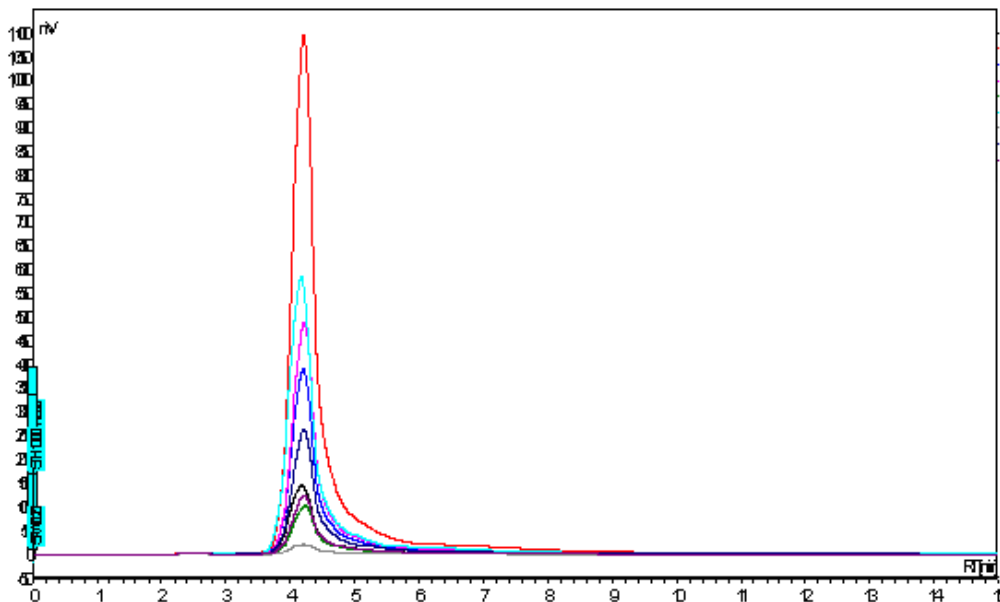
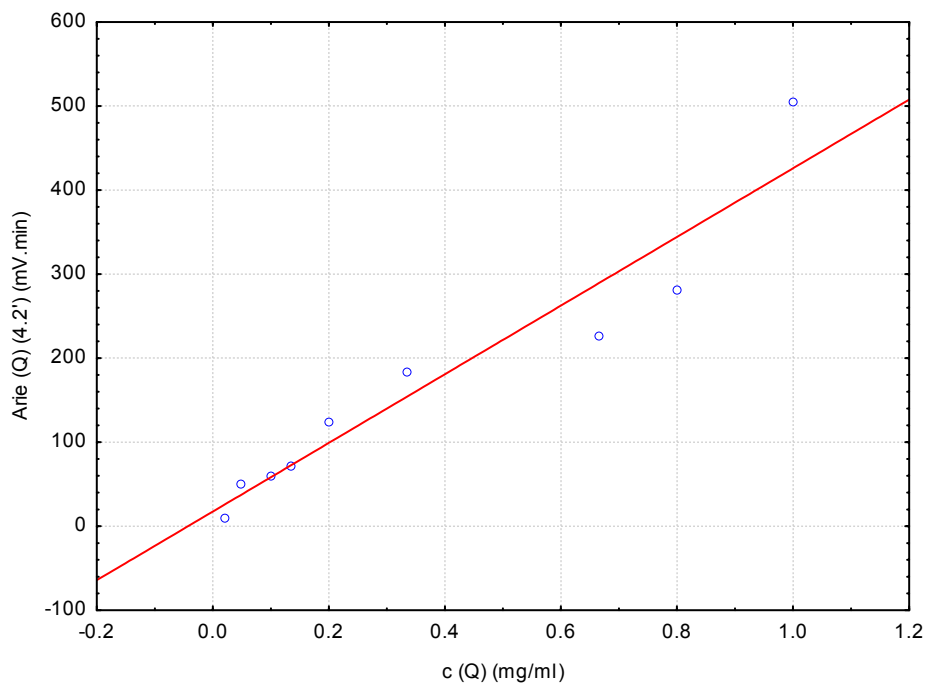


Figura 3.2.2. Cromatogramele HPLC suprapuse pentru soluțiile etalon de quercetină



$$Arie(mV \cdot \text{min}) = 433.95(\pm 30.81) \cdot c(mg / ml)$$

$$r = 0.9804; s = 46.38; F = 198$$

Figura 3.2.3. Curba de etalonare (reprezentare grafică și ecuația corespunzătoare) pentru quercetină

În cazul rutinei, s-a observat apariția a două picuri cromatografice la timpii de retenție 2.3 minute și 3.1 minute (figura 3.2.4), care se pot datora hidrolizei parțiale a resturilor zaharidice (figura 3.2.5), a prezenței în produsul utilizat a unor impurități rezultate din această degradare, sau a imposibilității separării foarte bune a rutinei unitare de către producător (pentru produsul Merck folosit ca etalon concentrația >90%). Pentru evaluarea cantitativă a rutinei în extractele din plantele studiate s-au luat în considerare ambii picuri cromatografici, deoarece și în unele probe s-a constatat prezența acestei aluri în urma analizei HPLC. Curba de etalonare obținută pentru soluții de concentrație până la 0.5 mg/ml a prezentat parametri statistici foarte buni ($r = 0.998$) (figura 3.2.6).

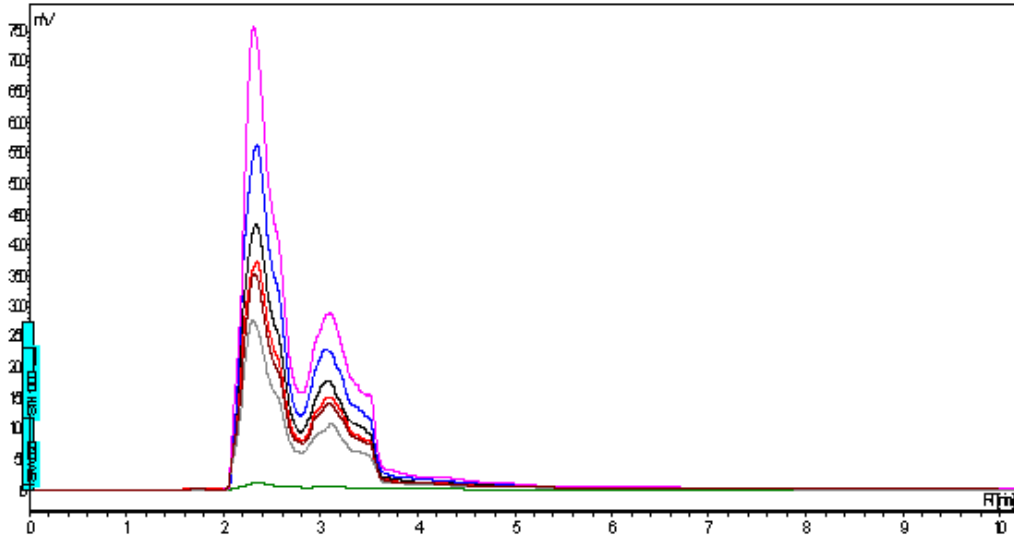


Figura 3.2.4. Cromatogramele HPLC suprapuse pentru soluțiile etalon de rutină

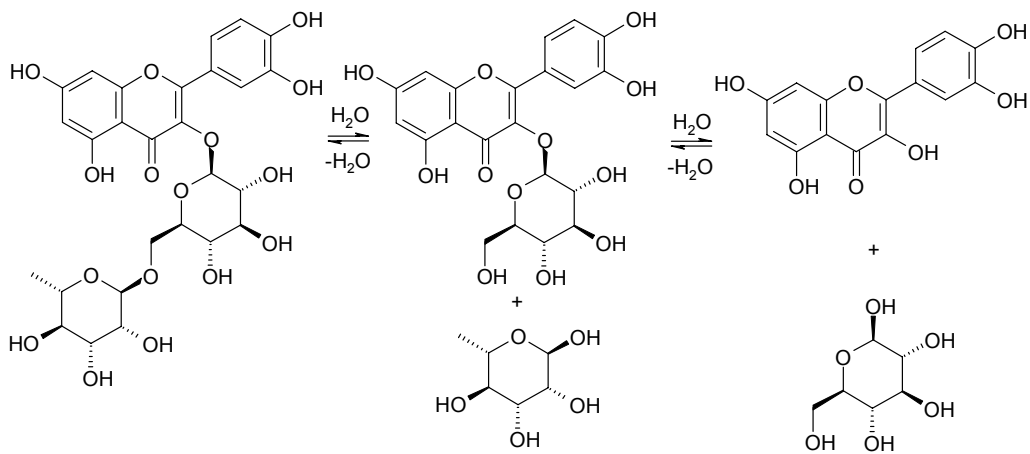
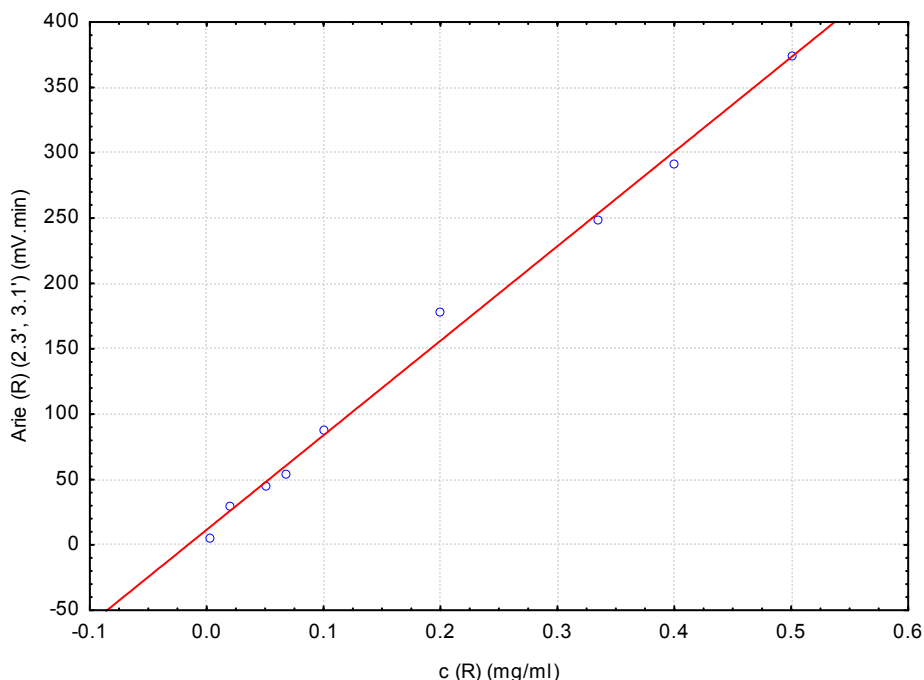


Figura 3.2.5. Degradarea hidrolitică a rutinei (quercetin-3-rutinozide)



$$Arie(mV \cdot \text{min}) = 756.45(\pm 16.72) \cdot c(\text{mg} / \text{ml})$$

$$r = 0.998; s = 12.72; F = 2048$$

Figura 3.2.6. Curba de etalonare (reprezentare grafică și ecuația corespunzătoare) pentru rutină

Pentru extractele obținute din specii *Silybum* a fost necesară obținerea curbei de etalonare pentru principalul compus bioactiv conținut: silibina. Ca și în cazul rutinei, silibina a prezentat tot două picuri cromatografice foarte apropiate, dintre care cel semnificativ apare la timpul de retenție de 4.4 minute. Picurile cromatografice minoritare se pot datora izomerilor corespunzători silibinei (figura 3.2.7), care sunt greu de separat prin metode clasice (separarea prin flash-cromatografie a diastereoizomerilor glicozilați, urmată de hidroliză enzimatică sau acidă sau folosind HPLC semipreparativ); silibina naturală este de fapt un amestec de 2 diastereoizomeri, în proporție de aproximativ 1:1 - silibina A și silibina B (figura 3.2.8). Curba de etalonare HPLC pentru silibină prezintă un coeficient de corelare excelent (0.998) pentru domeniul de concentrații utilizat (până la 0.24 mg/ml) (figura 3.2.9).

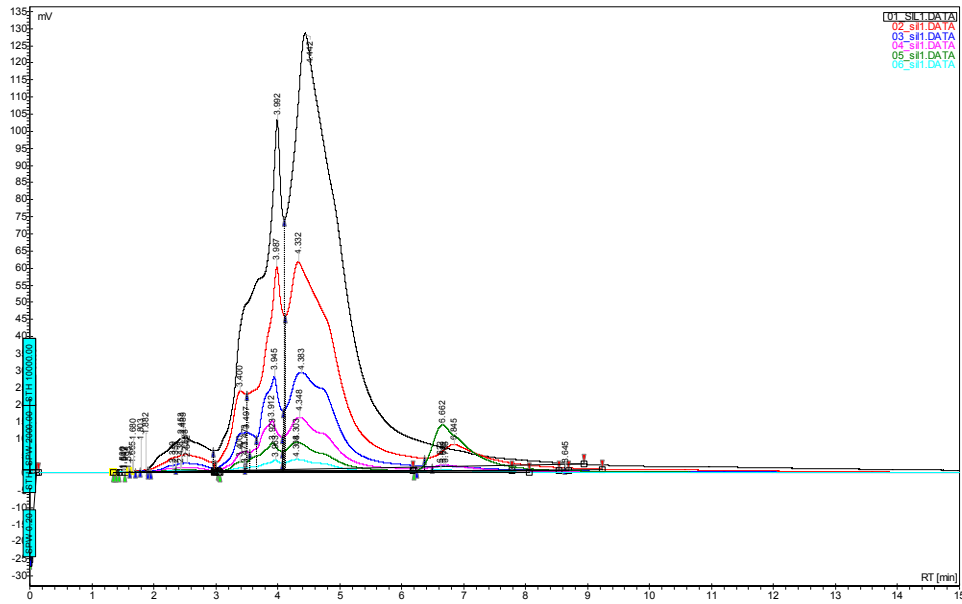


Figura 3.2.7. Cromatogramele HPLC suprapuse pentru soluțiile etalon de silibină

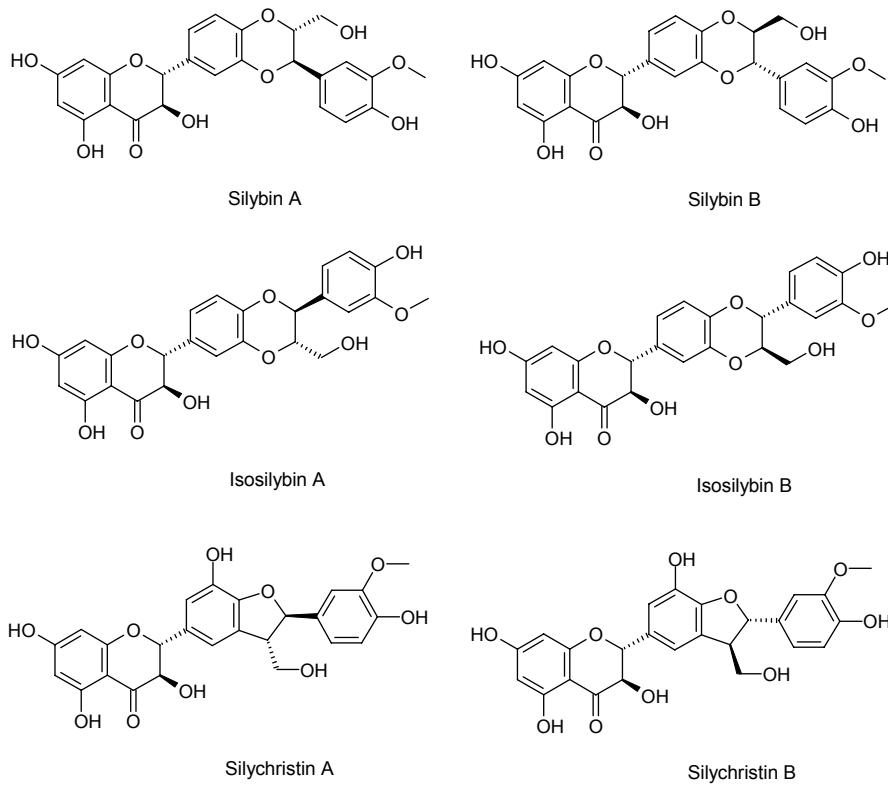
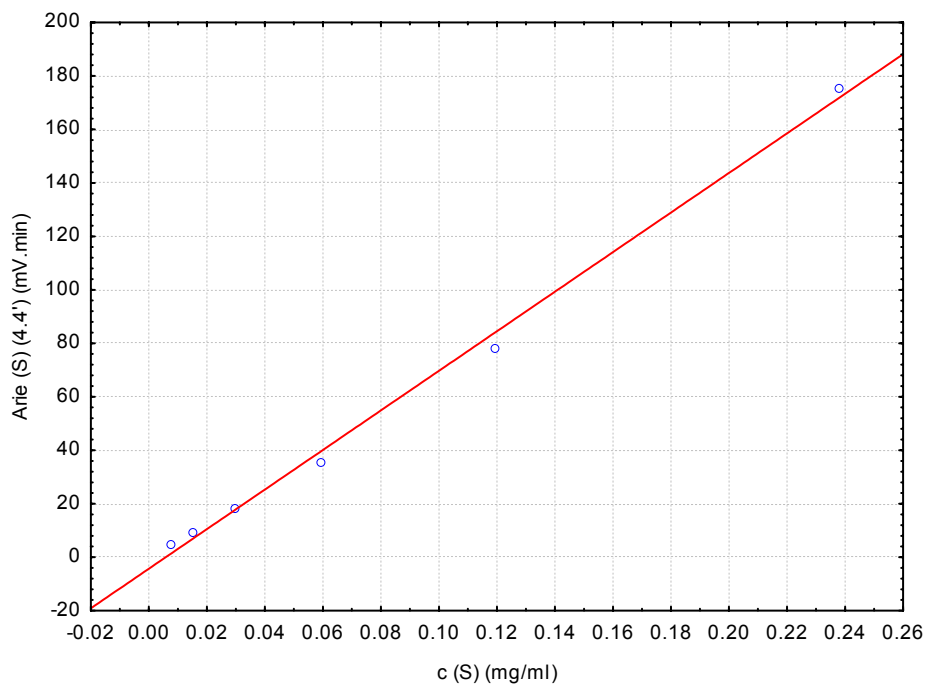


Figura 3.2.8. Principalii flavonolignani din *Silybum marianum* L. [186, 187]



$$Arie(mV \cdot \min) = 713.34(\pm 18.85) \cdot c(mg/ml)$$

$$r = 0.998; s = 5.18; F = 1431$$

Figura 3.2.9. Curba de etalonare (reprezentare grafică și ecuația corespunzătoare) pentru silibină

Valorile ariilor picurilor cromatografice HPLC pentru soluțiile etalon de quercetină, rutină și silibină, cu concentrațiile corespunzătoare, sunt prezentate în tabelul 3.2.5.

Tabel 3.2.5. Ariile picurilor cromatografice și concentrațiile soluțiilor etalon utilizate pentru obținerea curbelor de etalonare a quercetinei, rutinei și silibinei

Nr.	Arie _{Quercetină} (mV·min)	C _{Quercetină} (mg/ml)	Arie _{Rutină} (mV·min)	C _{Rutină} (mg/ml)	Arie _{Silibină} (mV·min)	C _{Silibină} (mg/ml)
1	504.3	1	374.7	0.5	175.3	0.238
2	281.4	0.8	291.6	0.4	78.3	0.119
3	226	0.667	248.7	0.334	35.6	0.060
4	182.5	0.333	178.5	0.2	17.9	0.030
5	122.8	0.2	87.2	0.1	9.5	0.015
6	70.8	0.133	54.7	0.067	4.4	0.008
7	59.1	0.1	44.7	0.05	-	-
8	49.1	0.05	29.2	0.02	-	-
9	10.5	0.02	4.7	0.002	-	-

3.2.3.2.2. Analiza extractelor de *Matricaria chamomilla* L.

S-au obținut extracte de *Matricaria chamomilla* prin extracție solid-lichid utilizând solvenți de diverse hidrofobități, pornind de la cei mai puțin hidrofobi (metanol, etanol de diverse concentrații, tetrahidrofuran) și finalizând cu cei de hidrofobitate ridicată (hexan, benzen, toluen). De asemenea, s-au efectuat extracții și cu solvenți de hidrofobitate intermediară, cum sunt acetatul de etil sau dicloretanul.

Cromatogramele HPLC pentru extractele metanolice de *Matricaria chamomilla* L. sunt prezentate în anexa A.3.2.: figurile A.3.2.1.-A.3.2.4, cromatogramele HPLC pentru extractele etanolice sunt prezentate în figurile A.3.2.5-A.3.2.12, extractele benzenice sunt prezentate în figura A.3.2.13, extractele toluenice în figura A.3.2.14, extractele în hexan în figura A.3.2.15, extractele în acetat de etil în figurile A.3.2.16-A.3.2.17, extractele în dicloretan sunt prezentate în figura A.3.2.18 și extractele tetrahidrofuranice în figura A.3.2.19.

Cele mai bune rezultate (în sensul posibilității de identificare și dozare a compușilor bioactivi importanți) s-au obținut la utilizarea metanolului ca solvent de extracție (figura 3.2.10). Analiza HPLC a extractelor metanolice din frunze și flori de *M. chamomilla* a indicat o concentrație de 0.75-1 mg quercetină/g probă (calculare corespunzătoare concentrațiilor de compus determinate din extracte), în timp ce tulpina și în special rădăcina au condus la concentrații reduse de quercetină (0.3 mg/g și, respectiv, 0.02 mg/g). Rutina a fost cuantificată în tulpină pe baza extractelor metanolice la concentrații de 0.5 mg/g, însă acesta a fost prezent și în celelalte probe, fiind dificil de cuantificat datorită, probabil, prezenței altor compuși care au fost separați la timpi de retenție apropiați (tabel 3.2.6).

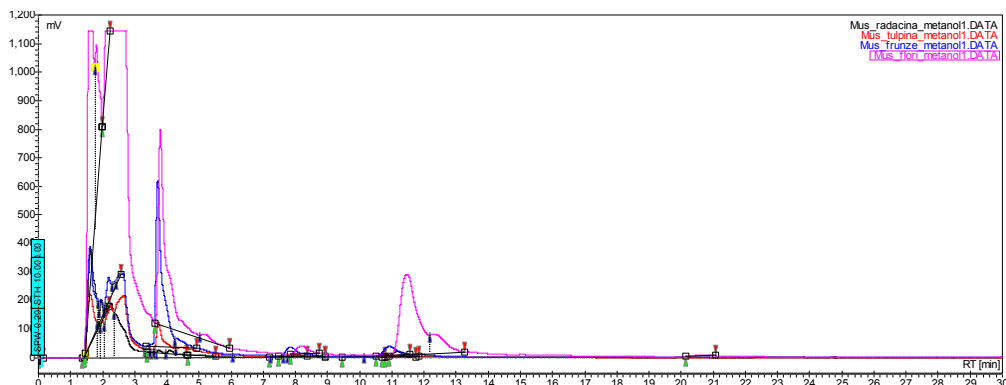


Figura 3.2.10. Cromatogramele HPLC suprapuse pentru extractele metanolice de *M. chamomilla*

Tabel 3.2.6. Rezultatele analizei HPLC pentru cazul extractelor metanolice de *M. chamomilla*

Nr.	Cod	Material vegetal	C _{Rutina} (mg/g)	C _{Quercetina} (mg/g)
1	Cm_Rd_M	<i>M. chamomilla</i> (rădăcină)		0.024
2	Cm_Tu_M	<i>M. chamomilla</i> (tulpină)	0.460	0.295
3	Cm_Fr_M	<i>M. chamomilla</i> (frunze)		1.076
4	Cm_Fl_M	<i>M. chamomilla</i> (flori)		0.744

În cazul utilizării etanolului de diverse concentrații s-a putut cuantifica rutina din extractele de flori, quercetina fiind prezentă în concentrații relative mult mai reduse, greu de evaluat pe baza analizelor HPLC (figura 3.2.11). Astfel, concentrația de rutină în probele de flori, evaluată pe baza analizelor HPLC pentru extractele etanolice, nu a variat în limite mari, fiind cuprinsă între 0.5 și 1.2 mg/g (tabel 3.2.7).

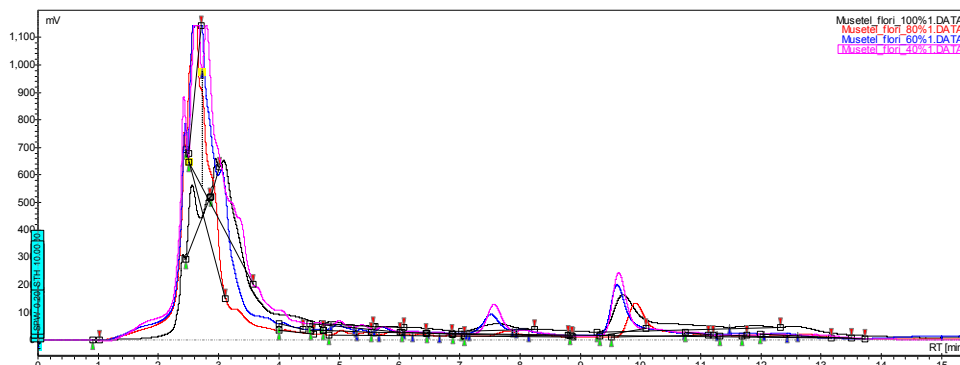


Figura 3.2.11. Cromatogramele HPLC suprapuse pentru extractele etanolice de *M. chamomilla* (flori)

Tabel 3.2.7. Rezultatele analizei HPLC pentru cazul extractelor etanolice de *M. chamomilla* (flori)

Nr.	Cod	Material vegetal	C _{Rutina} (mg/g)
1	Cm_Fl_20	<i>M. chamomilla</i> , extr. în etanol 20%	1.223
2	Cm_Fl_40	<i>M. chamomilla</i> , extr. în etanol 40%	0.687
3	Cm_Fl_80	<i>M. chamomilla</i> , extr. în etanol 80%	1.400

Cele mai concludente rezultate s-au obținut la utilizarea unui alt solvent de hidrofobie redusă, tetrahidrofuranul, pentru care rezultatele au fost similare extractelor metanolice. Valorile quercetinei în probele de flori și frunze, determinate pe baza analizelor HPLC a extractelor tetrahidrofuranice (figura 3.2.12), au fost cele mai ridicate (1 mg/g și, respectiv, 0.7 mg/g), în timp ce tulpina și rădăcina au prezentat doar o concentrație de 0.48 mg/g și 0.04 mg/g (tabel 3.2.8). Rutina a variat în același mod, dar cu valori mai mici decât în cazul quercetinei: 0.28-0.35 mg/g în flori și frunze și 0.1-0.26 mg/g în tulpină și rădăcină.

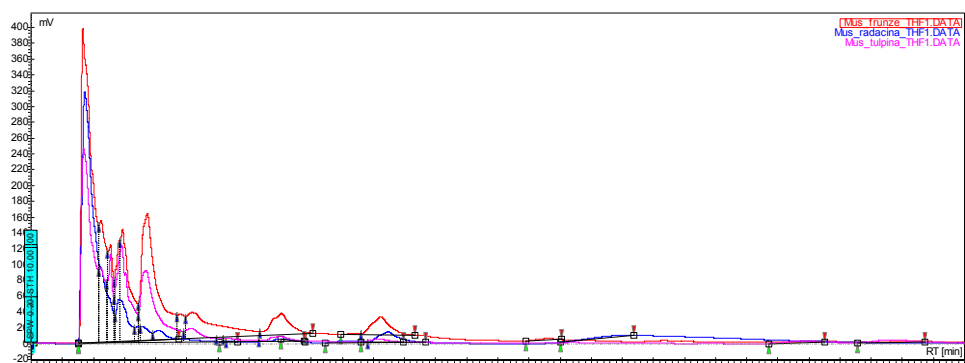


Figura 3.2.12. Cromatogramele HPLC suprapuse pentru extractele tetrahidrofuranice de *M. chamomilla*

Tabel 3.2.8. Rezultatele analizei HPLC pentru cazul extractelor tetrahidrofuranice de *M. chamomilla*

Nr.	Cod	Material vegetal	C _{Rutina} (mg/g)	C _{Quercetina} (mg/g)
1	Cm_Rd_THF	<i>M. chamomilla</i> (rădăcină)	0.103	0.038
2	Cm_Tu_THF	<i>M. chamomilla</i> (tulpină)	0.259	0.481
3	Cm_Fr_THF	<i>M. chamomilla</i> (frunze)	0.282	0.956
4	Cm_Fl_THF	<i>M. chamomilla</i> (flori)	0.352	0.695

Extractele în solvenți mai hidrofobi de tipul benzenului, toluenului, hexanului sau dicloretanului (anexa A.3.2.: figurile A.3.2.13 – A.3.2.15 și A.3.2.18) nu au permis o cuantificare exactă a componentilor flavonoidici, deși în cazul hexanului s-a putut face o dozare a quercetinei și rutinei în cele patru părți de plantă studiate. Astfel, rutina a fost cuantificată pe baza analizelor HPLC ale acestor extracte (figura 3.2.13) în concentrație mai mare decât quercetina, deși este posibil ca în zona de separare a acestuia să apară și alți compuși similari (~1 mg/g în frunze) (tabel 3.2.9).

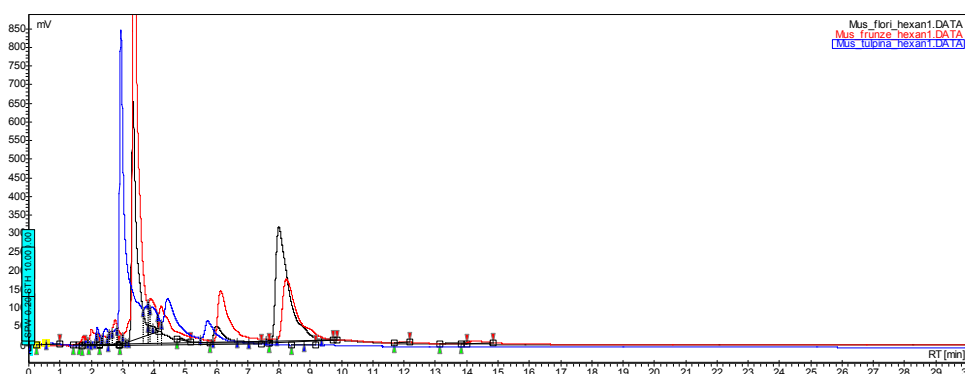


Figura 3.2.13. Cromatogramele HPLC suprapuse pentru extractele hexanice de *M. chamomilla*

Tabel 3.2.9. Rezultatele analizei HPLC pentru cazul extractelor hexanice de *M. chamomilla*

Nr.	Cod	Material vegetal	C _{Rutina} (mg/g)	C _{Quercetina} (mg/g)
1	Cm_Rd_H	<i>M. chamomilla</i> (rădăcină)	0.004	0.002
2	Cm_Tu_H	<i>M. chamomilla</i> (tulpină)	0.626	0.377
3	Cm_Fr_H	<i>M. chamomilla</i> (frunze)	0.969	0.218
4	Cm_Fl_H	<i>M. chamomilla</i> (flori)	0.257	0.006

3.2.3.2.3. Analiza extractelor de *Achillea millefolium* L.

Specia *A. millefolium* (coada șoricelului) are un conținut mai important de flavonoide și flavonozide de tipul rutinei (aglicon quercetină), apigeninei și luteolinei (în general sub formă glicozilată), însă varietatea acestor compuși cu structură înrudită a făcut relativ dificilă identificarea și cuantificarea componentelor flavonoidici unitari. Totuși, rutina a putut fi identificată și cuantificată (în unele cazuri cu dificultate datorită separării incomplete de compuși similari în analiza cromatografică) la timpuri de retenție de 2.3 minute (cu un pic adiacent ce apare probabil datorită unui compus de degradare sau izomer al rutinei la 3.1 minute), în special în cazul utilizării solvenților mai hidrofilii de tipul metanolului sau etanolului de diverse concentrații. Cele două picuri cromatografice se pot observa foarte bine în cazul utilizării etanolului 20-96% pentru extracția probelor din rădăcină de *A. millefolium* (figura 3.2.14a). Cuantificarea concentrației de rutină (inclusiv compuși similari exprimați ca rutină) a indicat o extracție eficientă în cazul utilizării etanolului 40% (2.4 mg rutină/g probă), cu valori apropiate la utilizarea etanolului de concentrație apropiată (20% sau 60%); dacă s-a mărit concentrația de etanol utilizat pentru extracție s-a constatat o micșorare a eficienței de extracție a flavonozidelor de tip rutină (<0.8 mg/g) (tabel 3.2.10a). Quercetina (agliconul rutinei) a fost de asemenea identificat în probele de rădăcină de *A. millefolium* (<0.2 mg/g). În probele de tulpină, flori și frunze concentrația de rutină (și compuși similari) a fost mai mare decât în cazul probelor de rădăcină, însă nu s-a reușit o separare cromatografică eficientă care să permită o cuantificare elocventă. Totuși, concentrația aproximativă de rutină în probele studiate a fost puțin peste 5 mg/g.

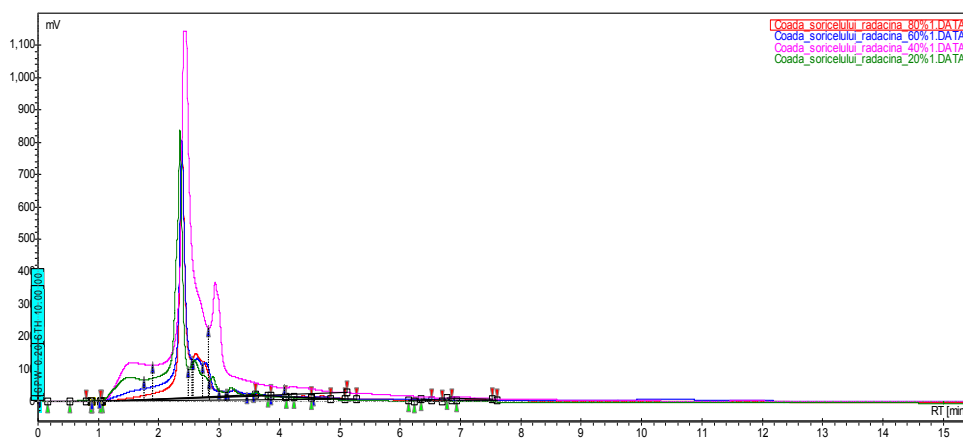


Figura 3.2.14a. Cromatogramele HPLC suprapuse pentru extractele în etanol 20-96% de *A. millefolium* (rădăcină)

Tabel 3.2.10a. Rezultatele analizei HPLC în cazul extractelor de rădăcină de *A. millefolium* în etanol 20-96%

Nr.	Cod	Material vegetal	C _{Rutina} (mg/g)	C _{Quercetina} (mg/g)
1	Cs_Rd_20	<i>A. millefolium</i> , extract în etanol 20%	0.863	0.060
2	Cs_Rd_40	<i>A. millefolium</i> , extract în etanol 40%	2.412	0.177
3	Cs_Rd_60	<i>A. millefolium</i> , extract în etanol 60%	1.015	0.005
4	Cs_Rd_80	<i>A. millefolium</i> , extract în etanol 80%	0.764	0.010
5	Cs_Rd_96	<i>A. millefolium</i> , extract în etanol 96%	0.158	0.033

În metanol și în tetrahidrofuran (solvenți mai hidrofilii) rezultatele analizei HPLC au condus la rezultate similare cu cazul etanolului de 80-96%, rutina fiind cuantificată în concentrații de maximum 0.5 mg/g, iar quercetina de până la 0.15 mg/g (tabel 3.2.10b).

Tabel 3.2.10b. Rezultatele analizei HPLC în cazul extractelor de *A. millefolium* în metanol și tetrahidrofuran

Nr.	Cod	Material vegetal	C _{Rutina} (mg/g)	C _{Quercetina} (mg/g)
1	Cs_Rd_M	<i>A. millefolium</i> (rădăcină), extract în metanol	0.006	0.004
2	Cs_Tu_M	<i>A. millefolium</i> (tulpină), extract în metanol	0.040	0.044
3	Cs_Fr_M	<i>A. millefolium</i> (frunze), extract în metanol	0.034	0.001
4	Cs_Fl_M	<i>A. millefolium</i> (flori), extract în metanol	0.161	0.014
5	Cs_Rd_THF	<i>A. millefolium</i> (rădăcină), extract în tetrahidrofuran	0.013	-
6	Cs_Tu_THF	<i>A. millefolium</i> (tulpină), extract în tetrahidrofuran	0.048	-
7	Cs_Fr_THF	<i>A. millefolium</i> (frunze), extract în tetrahidrofuran	0.019	-
8	Cs_Fl_THF	<i>A. millefolium</i> (flori), extract în tetrahidrofuran	0.221	-

Utilizarea solvenților mai hidrofobi (de tipul hexanului, toluenului sau benzenului, dicloretanului și acetatului de etil) a indicat o extracție mult mai puțin eficientă a flavonozidelor și a flavonoidelor (cazul quercetinei) (figura 3.2.14b). Conform rezultatelor prezentate în tabelul 3.2.10c, quercetina a fost extrasă mai eficient în unele cazuri decât rutina. Astfel, în hexan rutina s-a extras la o valoare de cel mult 0.023 mg/g din frunze, în timp ce quercetina a fost extrasă în cantitate aproape dublă. O comportare similară se observă și la utilizarea toluenului, în timp ce dicloretanul și mai ales acetatul de etil extrag preponderent rutina, mai puțin quercetina.

Această comportare este în **concordanță cu hidrofobicitatea solvenților utilizați**, exprimată ca logaritmul coeficientului de partiție octanol/apă (logP): 2.5 și 2.9 pentru toluen și, respectiv, hexan, iar pentru dicloretan și acetat de etil valorile logP sunt 1.6 și 0.2. Prin urmare, acești solvenți extrag preponderent flavonozidele mai hidrofobe și mai puțin flavonoidele (care nu conțin rest zaharidic hidrofil). Caracterul hidrofil avansat al soluțiilor de etanol (logP < -0.2) a permis o separare eficientă în special a flavonozidelor de tipul rutinei.

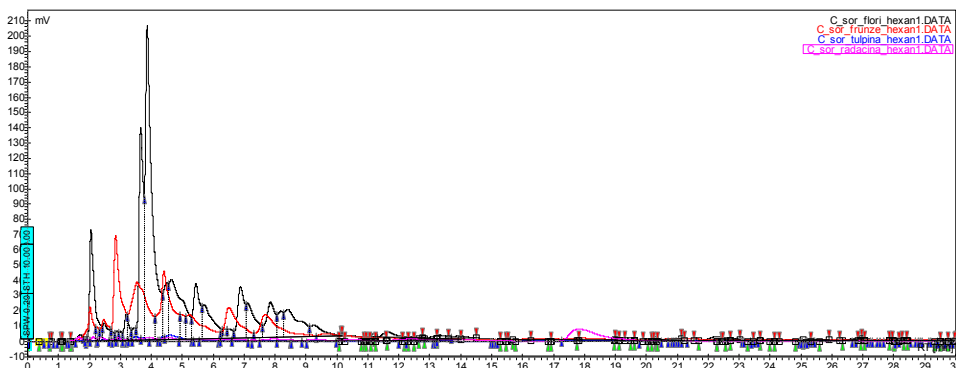


Figura 3.2.14b. Cromatogramele HPLC suprapuse pentru extractele în hexan de *A. millefolium*

Tabel 3.2.10c Rezultatele analizei HPLC în cazul extractelor de *A. millefolium* în solvenți hidrofobi

Nr.	Cod	Material vegetal	C _{Rutina} (mg/g)	C _{Quercetina} (mg/g)
1	Cs_Rd_H	<i>A. millefolium</i> (rădăcină), extract în hexan	-	0.002
2	Cs_Tu_H	<i>A. millefolium</i> (tulpină), extract în hexan	0.001	0.001
3	Cs_Fr_H	<i>A. millefolium</i> (frunze), extract în hexan	0.023	0.044
4	Cs_Fl_H	<i>A. millefolium</i> (flori), extract în hexan	0.017	0.016
5	Cs_Rd_T	<i>A. millefolium</i> (rădăcină), extract în toluen	0.012	0.132
6	Cs_Tu_T	<i>A. millefolium</i> (tulpină), extract în toluen	0.015	0.079
7	Cs_Fr_T	<i>A. millefolium</i> (frunze), extract în toluen	0.061	0.046
8	Cs_Fl_T	<i>A. millefolium</i> (flori), extract în toluen	0.052	0.001
9	Cs_Rd_DCE	<i>A. millefolium</i> (rădăcină), extract în dicloretan	0.002	0.004
10	Cs_Tu_DCE	<i>A. millefolium</i> (tulpină), extract în dicloretan	0.001	0.001
11	Cs_Fr_DCE	<i>A. millefolium</i> (frunze), extract în dicloretan	0.010	0.029
12	Cs_Fl_DCE	<i>A. millefolium</i> (flori), extract în dicloretan	0.022	0.026
13	Cs_Rd_AcE	<i>A. millefolium</i> (rădăcină), extract în acetat de etil	0.004	-
14	Cs_Tu_AcE	<i>A. millefolium</i> (tulpină), extract în acetat de etil	0.010	-
15	Cs_Fr_AcE	<i>A. millefolium</i> (frunze), extract în acetat de etil	0.055	-
16	Cs_Fl_AcE	<i>A. millefolium</i> (flori), extract în acetat de etil	0.144	-

3.2.3.2.4. Analiza extractelor de *Silybum marianum* L.

Pentru evaluarea concentrației de silibină (amestec de diastereoizomeri) în semințele de *Silybum marianum* L. de proveniență autohtonă s-a apelat la extracția cu solvenți de diverse polarități și analiza HPLC a acestora. Silibina a fost identificată foarte clar în cazul extractelor efectuate în etanol de diverse concentrații (timp de retenție 4.4 minute, figura 3.2.15), concentrația calculată a acesteia în semințele de *S. marianum*, pe baza acestor analize, variind în intervalul 0.6-1.5 mg/g, cele mai ridicate valori fiind obținute la utilizarea etanolului de 80% sau 96% (tabel 3.2.11).

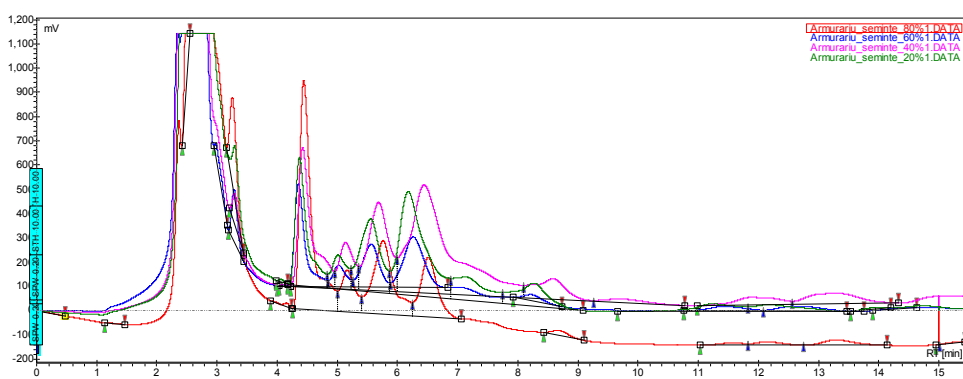


Figura 3.2.15. Cromatogramele HPLC suprapuse pentru extractele etanolice de *S. marianum*

Tabel 3.2.11. Rezultatele analizei HPLC pentru cazul extractelor de *S. marianum*

Nr.	Cod	Material vegetal	Csilibin (mg/g)
1	Arm_Se_20	<i>S. marianum</i> (semințe), extr. în etanol 20%	0.884
2	Arm_Se_40	<i>S. marianum</i> (semințe), extr. în etanol 40%	1.151
3	Arm_Se_60	<i>S. marianum</i> (semințe), extr. în etanol 60%	0.665
4	Arm_Se_80	<i>S. marianum</i> (semințe), extr. în etanol 80%	1.531
5	Arm_Se_96	<i>S. marianum</i> (semințe), extr. în etanol 96%	1.299
6	Arm_Se_T	<i>S. marianum</i> (semințe), extr. în toluen	0.161
7	Arm_Se_H	<i>S. marianum</i> (semințe), extr. în hexan	0.010
8	Arm_Se_DCE	<i>S. marianum</i> (semințe), extr. în dicloretan	0.007

Încercarea de cuantificare a silibinei pe baza analizei HPLC a extractelor efectuate în solvenți mai hidrofobi a condus la valori foarte mici a acestui compus în probele de semințe, deși s-a observat prezența silibinei la timpul de retenție corespunzător în toate cazurile studiate (figurile 3.2.16-3.2.18). Valorile concentrațiilor de silibină calculate pe baza acestor analize au fost de peste 10 ori mai mici (0.16 mg/g în cazul extractului toluenic) decât în cazul extractelor alcoolice, ceea ce indică o extracție necorespunzătoare a acesteia la utilizarea solvenților mai hidrofobi (tabel 3.2.11).

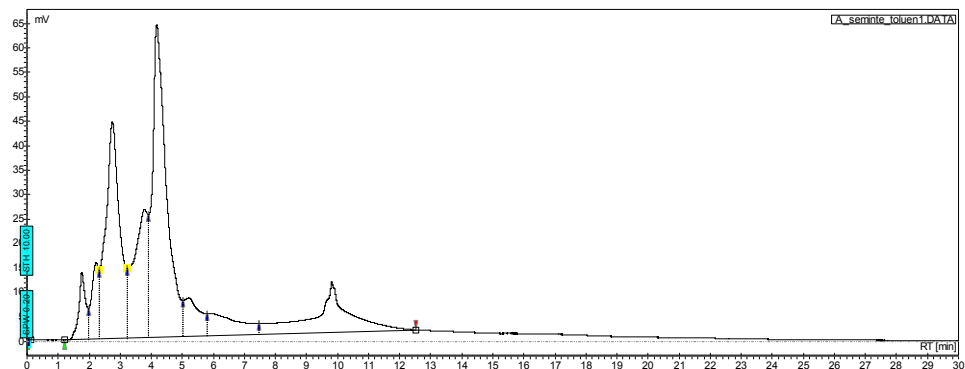


Figura 3.2.16. Cromatograma HPLC pentru extractul în toluen de *S. marianum*

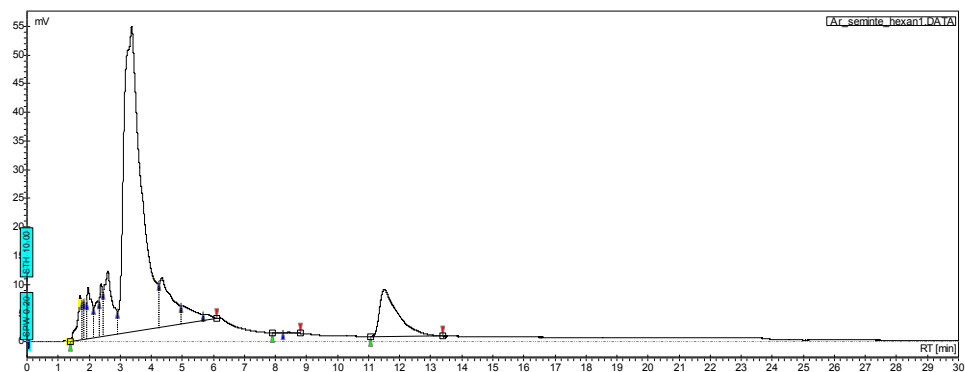


Figura 3.2.17. Cromatograma HPLC pentru extractul hexanic de *S. marianum*

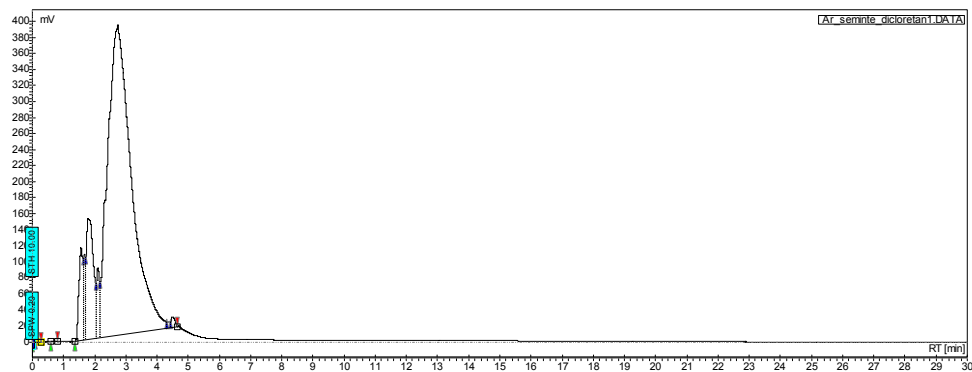


Figura 3.2.18. Cromatograma HPLC pentru extractul în dicloretan de *S. marianum*

3.2.3.3. Analiza spectrofotometrică a biocompușilor din *M. chamomilla* și *S. marianum* obținuți prin extracție solid-lichid. Pentru identificarea condițiilor de analiză HPLC (maxime de absorbție pentru detecție UV-VIS) și pentru evaluările de eliberări controlate ulterioare a fost necesară analiza spectrofotometrică a extractelor solid-lichid, comparativ cu compușii etalon corespunzători compoziției extractului.

În cazul extractelor de *M. chamomilla* s-au utilizat etaloanele Merck:

- terpineol λ_{\max} 213 nm (cu un umăr la 240 nm);
- limonen λ_{\max} 215 nm (cu un umăr la 230 nm);
- β -pinen λ_{\max} 217 nm;
- *p*-cimen λ_{\max} 222 nm, 265 nm;
- cineol λ_{\max} 204 nm (absorbție redusă și la 270 nm)
- camazulenă λ_{\max} 243 nm, 285 nm, 349 nm, 365 nm (umăr la 335 nm).

În cazul extractelor de *M. chamomilla* absorbanțele maxime se găsesc în principal la 322 nm, dar și la 202 nm, unde nu prezintă importanță semnificativă (figurile 3.2.19-3.2.21). Pe lângă azulenele conținute în extracte, absorbanta la 322 nm poate fi dată de prezența flavonoidelor și flavonozidelor, altele decât silibina. În figura 3.2.20 se prezintă spectrele UV-VIS al probelor de silibină (roz), silimarină (turcoaz), amestec de soluții etalon (rutină și crisină) (kaki), comparativ cu extracte de *M. chamomilla* (floare - negru, frunză - roșu, rădăcină - galben, tulpină - verde) în soluție etanolică de 96%, suprapuse.

În cazul acestor extracte, este cunoscută prezența quercetinei, rutinei și crisinei (pe lângă alte flavonoide), care absorb la:

- quercetina λ_{\max} 208 nm, 256 nm și 374 nm;
- rutina λ_{\max} 210 nm, 258 nm și 363 nm;
- cricina λ_{\max} 210 nm, 267 nm și 320 nm.

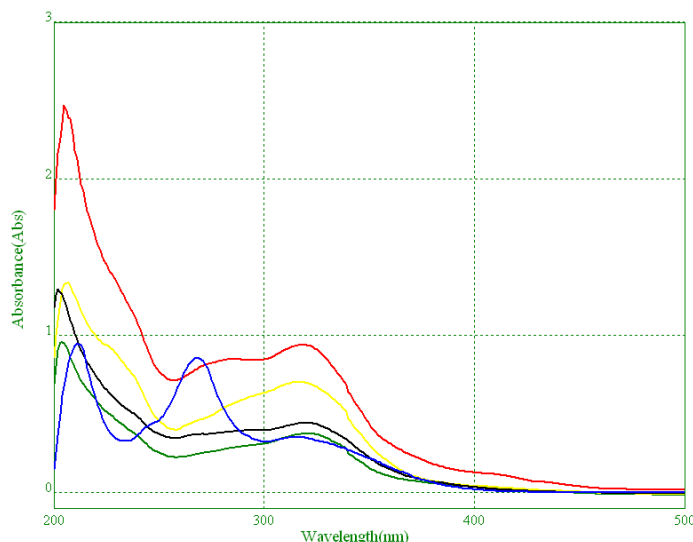


Figura 3.2.19. Analiza UV-VIS pentru probele de amestec de soluții etalon (rutină și crisină) (albastru), comparativ cu extracte de *M. chamomilla* (floare - negru, frunză - roșu, rădăcină - galben, tulpină - verde) în soluție etanolică de 96%

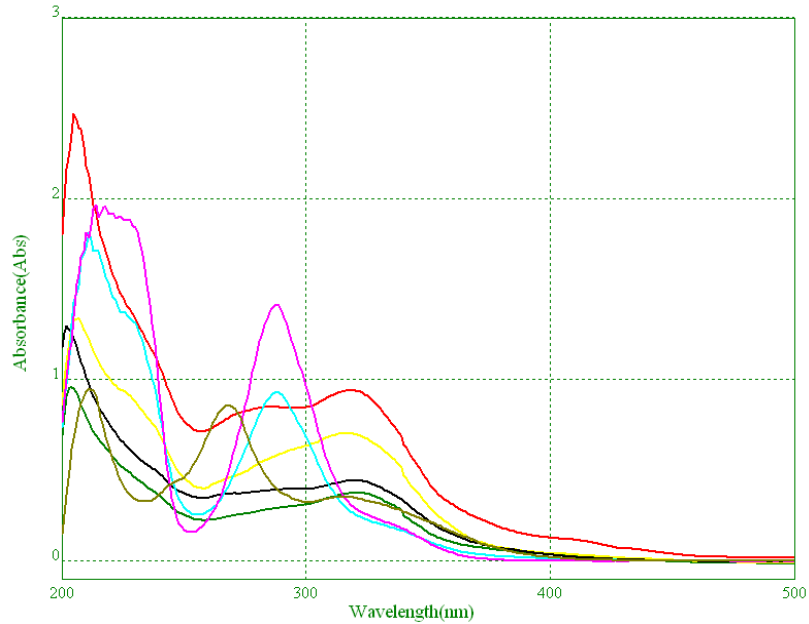


Figura 3.2.20. Analiza UV-VIS pentru probele de silibină (roz), silimarină (turcoaz), amestec de soluții etalon (rutină și crisină) (kaki), comparativ cu extracte de *M. chamomilla* (floare - negru, frunză - roșu, rădăcină - galben, tulpină - verde) în soluție etanolică de 96%

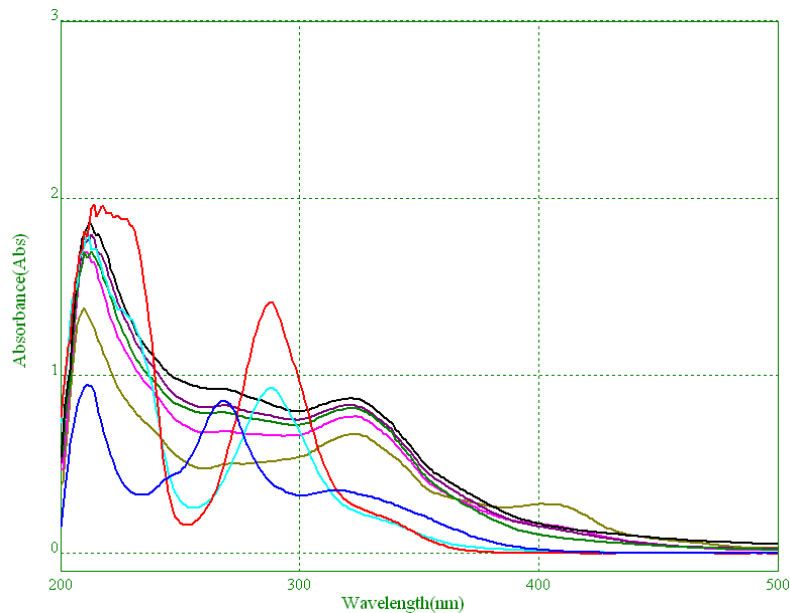


Figura 3.2.21. Analiza UV-VIS pentru probele de silibină (roșu), silimarină (turcoaz), amestec de soluții etalon (rutină și crisină) (albastru), comparativ cu extracte de *M. chamomilla* (frunze) în soluții etanolice de diverse concentrații 20% (negru), 40% (verde), 60% (mov), 80% (roz) și 96% (kaki)

Crisina este compusul cel mai apropiat de lungimea de undă la care absorbanta este maximă pentru extracte, deci este foarte posibil ca această absorbanta să se datoreze unor astfel de flavonoide (figura 3.2.22).

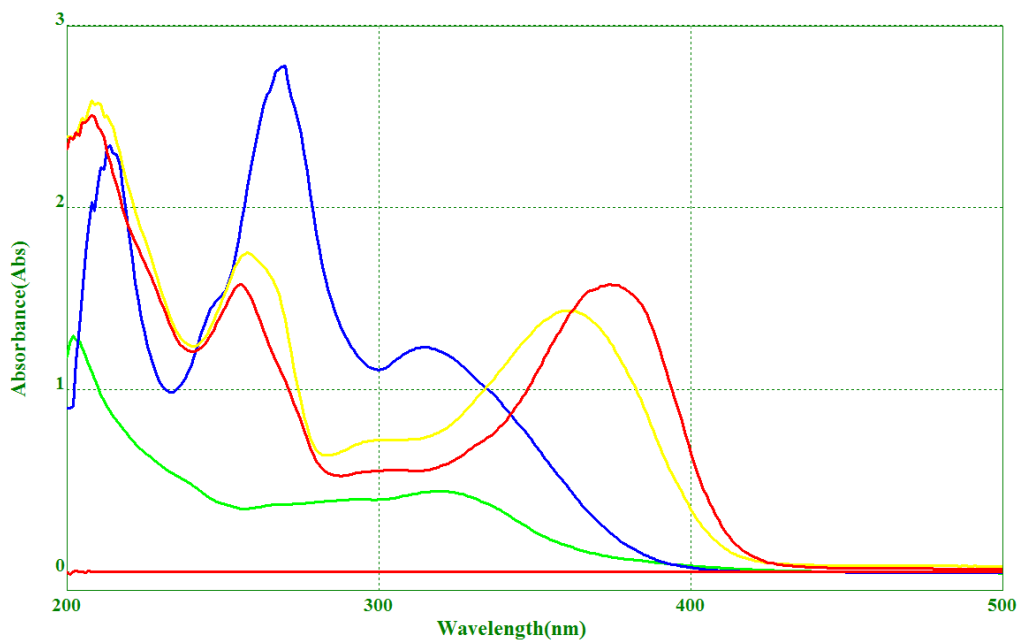


Figura 3.2.22. Analiza UV-VIS pentru probele de quercetină (roșu), rutină (galben), crisină (albastru), comparativ cu extractul de *M. chamomilla* (flori) în soluție etanolică 96% (verde)

Pentru extractele de *S. marianum* (armurariu) utilizate ca etalon al activității hepatoprotectoare, principalii constituenți sunt silibina (amestec de diastereoizomeri), respectiv silimarina (extractul purificat ce conține ~70% silibină). Analizele spectrofotometrice pentru soluțiile de silibină și silimarină au indicat o absorbanta maximă la 288 nm în ambele cazuri (figurile 3.3.22 și 3.3.23a, pag. 131-132). Toate extractele de *S. marianum* prezintă absorbanta maximă la 288 nm, ceea ce confirmă prezența silibinei în aceste extracte (figurile 3.2.23, 3.2.24).

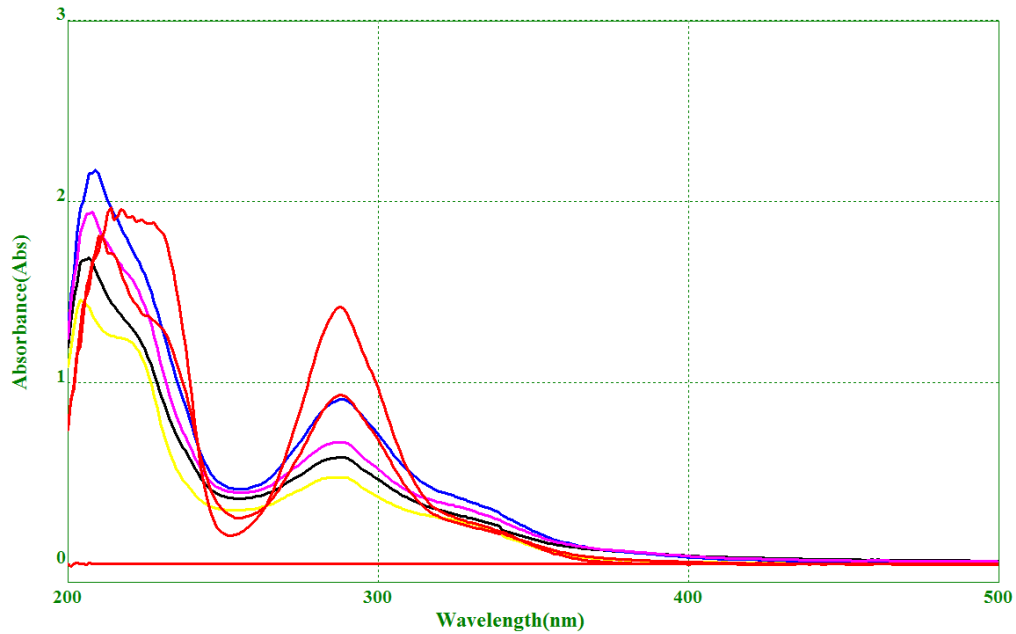


Figura 3.2.23. Analiza UV-VIS pentru probele de silibină, silimarină (roșu) și extracte de *S. marianum* în soluții etanolice de 20, 40, 60 și 80% (altele decât roșu)

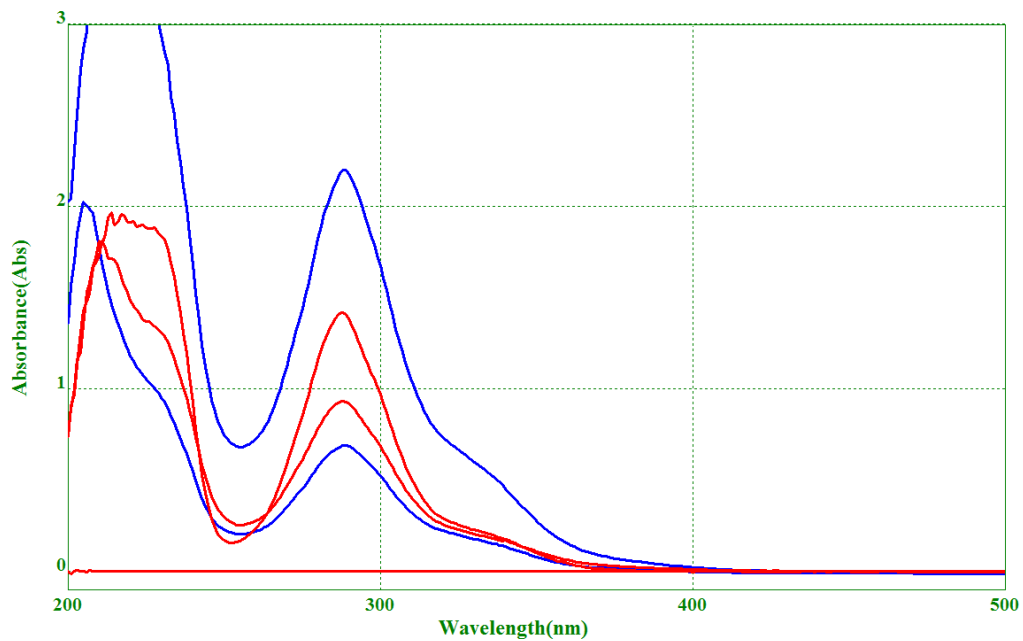


Figura 3.2.24. Analiza UV-VIS pentru probele de silibină, silimarină (roșu) și extracte de *S. marianum* în soluții etanolice de 96% (două diluții diferite, albastru)

3.2.4. Concluzii

În urma studiilor efectuate privind obținerea prin metode optimizate a biocompușilor cu activitate hepatoprotectoare potențială și analiza fizico-chimică a acestora se pot trasa următoarele concluzii principale:

- S-au obținut 126 extracte (56 din *M. chamomilla*, 56 din *A. millefolium* și 14 din semințe de *S. marianum*) în diverși solvenți organici (diverse polarități): metanol, etanol 20-96%, benzen, toluen, hexan, acetonă, acetat de etil, dicloretan, tetrahidrofuran care au fost analizate prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC) și spectrofotometrie;
- S-a realizat optimizarea obținerii biocompușilor din *M. chamomilla* prin metoda proiectării factoriale, condițiile optime fiind stabilite pe baza abundenței totale a biocompușilor în urma analizelor HPLC; astfel, condițiile optime de separare sunt: metoda extracției solid-lichid în solvent de polaritate mai ridicată, timp de extracție de 3 ore (extracție repetată) și reducerea pe cât posibil a etapei de concentrare (la presiune atmosferică);
- Extractele de *M. chamomilla* obținute prin metoda optimizată (solid-lichid, în etanol de diverse concentrații) prezintă concentrații totale însemnate de flavonoide și flavonozide, evidențiate de analizele HPLC și UV-VIS, în special quercetină, rutină, crisină și compuși similarinici. Reamintim că probele de *M. chamomilla* obținute prin hidrodistilare prezintă un conținut însemnat de camazulenă, dar și bisabololi și bisabolol-oxizi, în special în cazul florilor;
- Extractele model de *S. marianum* conțin concentrații semnificative de silibină în jur de 1,5 mg/g, fapt dovedit de analizele spectrofotometrice;
- Prezența compușilor de tip flavonoidic din extractele de *M. chamomilla* (înrudite structural cu flavonolignanii din *S. marianum*), dar și a compușilor sesquiterpenici volatili (camazulenă, bisabololi), face ca aceste extracte să prezinte activitate hepatoprotectoare potențială, asemănătoare celei cunoscute pentru *S. marianum*.

3.3. Eliberarea controlată a biocompușilor din nanoparticule

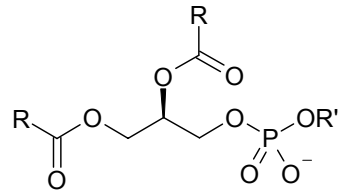
3.3.1. Introducere

Experimentele privind obținerea și analiza nanoparticulelor cu biocompuși puri cu activitate hepatoprotectoare potențială și eliberarea controlată a biocompușilor din nanoparticule au presupus parcurgerea în laborator a următoarelor etape:

1. Obținerea nanoparticulelor prin încapsularea extractelor de *Matricaria chamomilla* (mușețel) și *Sylibum marianum* (armurariu) în ciclodextrine naturale și modificate;
2. Obținerea nanoparticulelor prin încapsularea amestecurilor de biocompuși puri (silibină și silimarină) în ciclodextrine naturale și modificate;
3. Obținerea de micro/nanocapsule de tip liposomi conținând complecși ai ciclodextrinelor preparați anterior (punctele 1 și 2);
4. Analiza nanoparticulelor obținute prin microscopie cu scanare electronică;
5. Analiza nanoparticulelor obținute prin calorimetrie cu scanare diferențială (DSC);
6. Analiza conținutului de apă a nanoparticulelor obținute prin titrare Karl Fischer;
7. Analiza eliberării controlate a biocompușilor din nanoparticule.

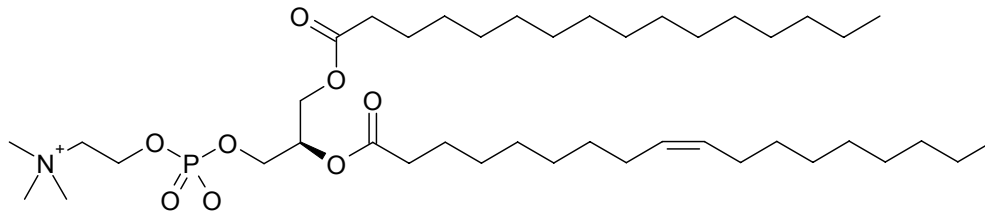
3.3.2. Materiale și metode

3.3.2.1. Materiale utilizate. Materialele utilizate în obținerea micro/nanoparticulelor cu activitate hepatoprotectoare potențială au fost silimarina (Sigma), și extractele din specii *Matricaria chamomilla* (mușețel), separate din diverse părți de plantă (flori, frunze, rădăcină, tulpină) și din *Sylibum marianum* (armurariu, semințe), utilizată ca etalon al activității hepatoprotectoare. Plantele au fost colectate în toamna anului 2009 din zona cultivată sau spontană (*M. chamomilla*, Salonta, România), respectiv din zona de vest a României (*S. marianum*, Grădina botanică Macea, Universitatea „Vasile Goldiș” din Arad) și au fost separate părțile de plantă de interes și depozitate la -20°C până în momentul extracției. Ca matrici de încapsulare s-au utilizat ciclodextrinele naturale α și β (α CD și β CD, Sigma, >99%) și modificate, 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP β CD, >98%, DS = 4.6, CycloLab). Pentru obținerea liposomilor s-au utilizat fie amestecuri naturale de fosfolipide (lecitină din ou, cu conținut de 35% fosfatidilcolină, 25% fosfatidiletanolamină, 15% fosfatidilinozitol, 7.5% acid fosfatidic și alte fosfolipide, rezultate din analiza HPLC), fie amestecuri artificiale de lipide (Sigma-Aldrich) pentru obținerea liposomilor unilamelari (~58 mg pudră liofilizată/probă, cu o compoziție de 63 μ moli de L- α -fosfatidilcolină, 9 μ moli colesterol și 18 μ moli stearylamină). Etanolul 96% (v/v) utilizat în procesele de obținere a micro/nanoparticulelor a fost obținut de la Chimopar, București.

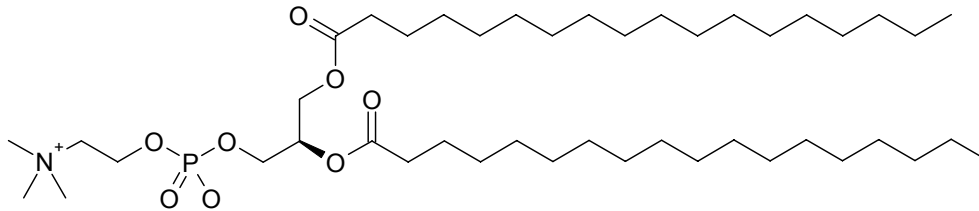


R - rest de acid gras
OR' = rest de cholina (fosfatidilcolina)

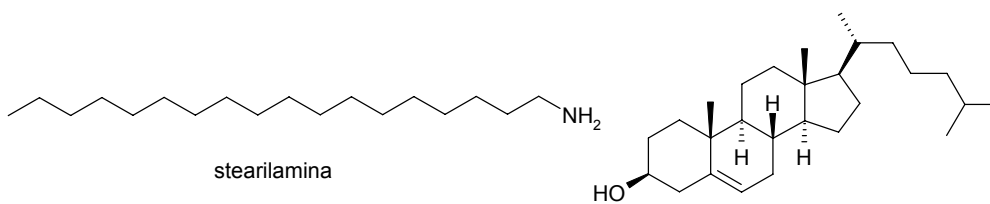
Figura 3.3.1. Structurile principalelor fosfolipide din lecitina utilizată pentru obținerea liposomilor



1-palmitoil-2-oleoil-L-alpha-fosfatidilcolina



1,2-distearoil-L-alpha-fosfatidilcolina



stearilamina

colesterol

Figura 3.3.2. Structurile principalelor fosfolipide și lipide din amestecul artificial, utilizat pentru obținerea liposomilor

3.3.2.2. Obținerea nanoparticulelor prin cristalizare din sistem etanol-apă. Obținerea nanoparticulelor cu extracte din specii *M. chamomilla* și *S. marianum* s-a realizat prin nanoîncapsularea în ciclodextrine prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă.

S-au cântărit la balanța analitică masele (0.25-0.5 mmoli) de ciclodextrină corespunzătoare unei molarități de 1:1, s-au dizolvat/suspendat în 2-4 ml apă distilată, s-au introdus într-un minireactor cu termostatare și agitare magnetică și s-au încălzit la temperatura de ~50°C. Peste soluția de ciclodextrină s-au introdus în picături, în decurs de 15 minute, volumele de extract de *M. chamomilla* sau *S. marianum* (volume corespunzătoare unui raport molar biocompuși : ciclodextrină de ~1:1) specificate. Soluția s-a picurat dintr-o pâlnie de picurare montată la partea superioară a refrigerentului instalației de complexare. După introducerea soluției alcoolice se mai agită amestecul un timp prestabilit, apoi se răcește lent, timp de 4 ore până la temperatura camerei. Se lasă la frigider ~12 ore pentru perfectarea cristalizării după care se filtrează la vid, se spală cu etanol 96%, se uscă cristalele la temperatura ambiantă și se cântăresc la balanța analitică. Filtratul se supune din nou cristalizării pentru ~12 ore la rece, după care se filtrează în mod similar, se spală și se uscă. Se determină randamentul de obținere a nanocapsulelor ca raport dintre masa de nanoparticule obținută și suma maselor de biocompuși (evaluați din extracte) și β-ciclodextrină utilizate la nanoîncapsulare. Nanocristalele s-au caracterizat prin microscopie cu scanare electronică (SEM) (pentru caracterizarea morfologică și dimensională), respectiv prin calorimetrie de scanare diferențială (DSC), titrare Karl Fischer, respectiv s-au evaluat posibilitățile de eliberare controlată din complexi.

3.3.2.3. Obținerea micro/nanocapsulelor de tip liposomi multilamelari cu conținut de nanoparticule biocompuși/ciclodextrine. Cei 14 liposomi multilamelari pe bază de lecitină (notată cu "L") cu conținut de nanoparticule extracte/ciclodextrine (tabelele 3.3.1a și 3.3.1b) au fost obținuți prin metoda ultrasonării. Într-o primă etapă s-au suspendat cantitățile de nanoparticule extracte/ciclodextrină din tabelul 3.3.1b în apă împreună cu cantitățile de lecitină indicate, iar suspensia a fost ultrasonată într-un recipient de ultrasonare termostatat (în baie de apă și gheață) utilizând un aparat de ultrasonare de tip Ultrasonic Liquid Processor Vibra Cell VC 505 cu o putere de 500 W. Condițiile de ultrasonare sunt prezentate în tabel. Într-o primă etapă suspensia de liposomi a fost separată gravimetric și analizată prin SEM și TEM. Suspensia de liposomi a fost apoi supusă fracționării: în eprubeta de centrifugare s-a introdus întreaga cantitate de probă de liposomi (bine agitată) și s-a echilibrat centrifuga cu eprubete cu apă (de masă egală cu cele corespunzătoare probelor) situate în diagonală cu probele. S-a centrifugat la turația și timpii indicați în tabelul 3.3.2, după care s-a oprit centrifugarea. S-au pipetat câte 0.5 ml probă (supernatant) care s-a depozitat în fiole ermetice închise (s-a notat cu codul corespunzător în terminație "a"). Din eprubeta corespunzătoare cu apă din diagonală s-au îndepărtat 0.5 ml. S-a continuat centrifugarea conform tabelului și din nou s-a luat probă de câte 0.5 ml (notată cu "b"). Reziduul rămas în eprubetă s-a notat cu terminația "r" și s-a depozitat (tabel 3.3.2).

3.3.2.4. Obținerea micro/nanocapsulelor de tip liposomi unilamelari cu conținut de nanoparticule biocompuși/ciclodextrine.

Pentru obținerea liposomilor unilamelari s-au utilizat amestecuri de lipide cu compoziție bine stabilită prin aceeași metodă a ultrasonării. Astfel, cantitățile amestec lipidic și de complecși din tabelul 3.3.1(a,b) au fost ultrasonate în recipientul de ultrasonare termostatat în condițiile prezentate în tabel, iar liposomii unilamelari au fost separați inițial gravimetric și analizați prin aceleași metode microscopice (SEM, TEM), respectiv au fost supuși separării fracționare în vederea obținerii liposomilor de dimensiuni de zeci de nanometri (tabel 3.3.2).

Tabel 3.3.1a. Descrierea liposomilor multilamelari (L) și unilamelari (LG) cu conținut de nanoparticule biocompuși/ciclodextrine

Nr.	Cod	Descriere
1	Cm_Fr_bCD_L	Complex Extract <i>M. chamomilla</i> (frunze)/β-ciclodextrina in Liposomi (lecitină)
2	Cm_Tu_bCD_L	Complex Extract <i>M. chamomilla</i> (tulpină)/β-ciclodextrina in Liposomi (lecitină)
3	Cm_Tu'_bCD_L	Complex Extract <i>M. chamomilla</i> (tulpină')/β-ciclodextrina in Liposomi (lecitină)
4	Cm_Rd_bCD_L	Complex Extract <i>M. chamomilla</i> (rădăcină)/β-ciclodextrina in Liposomi (lecitină)
5	Arm_Se_bCD_L	Complex Extract <i>S. marianum</i> (semințe)/β-ciclodextrina in Liposomi (lecitină)
6	Sbn_bCD_L	Complex Silibin/β-ciclodextrina in Liposomi (lecitină)
7	Smr_bCD_L	Complex Silimarin/β-ciclodextrina in Liposomi (lecitină)
8	Cm_Fr_bCD_LG	Complex Extract <i>M. chamomilla</i> (frunze)/β-ciclodextrina in Liposomi (am. lipide)
9	Cm_Tu_bCD_LG	Complex Extract <i>M. chamomilla</i> (tulpină)/β-ciclodextrina in Liposomi (am. lipide)
10	Cm_Tu'_bCD_LG	Complex Extract <i>M. chamomilla</i> (tulpină')/β-ciclodextrina in Liposomi (am. lipide)
11	Cm_Rd_bCD_LG	Complex Extract <i>M. chamomilla</i> (rădăcină)/β-ciclodextrina in Liposomi (am. lipide)
12	Arm_Se_bCD_LG	Complex Extract <i>S. marianum</i> (semințe)/β-ciclodextrina in Liposomi (am. lipide)
13	Sbn_bCD_LG	Complex Silibin/β-ciclodextrina in Liposomi (am. lipide)
14	Smr_bCD_LG	Complex Silimarin/β-ciclodextrina in Liposomi (am. lipide)

Fr = frunze; Tu = tulpină; Se = semințe; bCD = β-ciclodextrină; L = lecitină; LG = amestec de lipide

Tabel 3.3.1b. Valorile condițiilor și parametrilor de obținere a liposomilor multilamelari (L) și unilamelari (LG) cu conținut de nanoparticule biocompuși/ciclodextrine

Nr.	Cod	m _{L/LG} (g)	V _{solven} t apă (ml)	m _{compl.} (g)	Amp US (%)	timp US (min)	Puls on (sec)	Puls off (sec)
1	Cm_Fr_bCD_L	0.16	5	0.032	80	15	30	15
2	Cm_Tu_bCD_L	0.16	5	0.032	80	15	30	15
3	Cm_Tu' bCD_L	0.16	5	0.032	80	15	30	15
4	Cm_Rd_bCD_L	0.16	5	0.032	80	15	30	15
5	Arm_Se_bCD_L	0.16	5	0.032	80	30	30	15
6	Sbn_bCD_L	0.16	5	0.032	80	30	30	15
7	Smr_bCD_L	0.16	5	0.032	80	30	30	15
8	Cm_Fr_bCD_LG	0.014	4	0.008	80	30	30	15
9	Cm_Tu_bCD_LG	0.014	4	0.008	80	30	30	15
10	Cm_Tu' bCD_LG	0.014	4	0.008	80	30	30	15
11	Cm_Rd_bCD_LG	0.014	4	0.008	80	30	30	15
12	Arm_Se_bCD_LG	0.014	4	0.008	80	30	30	15
13	Sbn_bCD_LG	0.014	4	0.008	80	30	30	15
14	Smr_bCD_LG	0.014	4	0.008	80	30	30	15

Tabel 3.3.2. Valorile condițiilor și parametrilor de separare prin centrifugare a liposomilor cu conținut de nanoparticule biocompuși/ciclodextrine

Nr.	Cod	V _{probă} (ml)	m _{probă} (g)	Turație (rot/min)	Timp (min)
1	Cm_Fr_bCD_La	1.5		5000	15
2	Cm_Fr_bCD_Lb	1.5	1.5	5000	15+15
3	Cm_Fr_bCD_Lr	1.5			
4	Cm_Tu_bCD_La	1.5		5000	15
5	Cm_Tu_bCD_Lb	1.5	1.5	5000	15+15
6	Cm_Tu_bCD_Lr	1.5			
7	Cm_Tu' bCD_La	1.5		5000	15
8	Cm_Tu' bCD_Lb	1.5	1.5	5000	15+15
9	Cm_Tu' bCD_Lr	1.5			
10	Cm_Rd_bCD_La	1.5		5000	15
11	Cm_Rd_bCD_Lb	1.5	1.5	5000	15+15
12	Cm_Rd_bCD_Lr	1.5			
13	Arm_Se_bCD_La	1.5		5000	15
14	Arm_Se_bCD_Lb	1.5	1.5	5000	15+15
15	Arm_Se_bCD_Lr	1.5			
16	Sbn_bCD_La	1.5		5000	15
17	Sbn_bCD_Lb	1.5	1.5	5000	15+15
18	Sbn_bCD_Lr	1.5			

Tabel 3.3.2. *Continuare*

Nr.	Cod	Vprobă (ml)	mprobă (g)	Turație (rot/min)	Timp (min)
19	Smr_bCD_La	1.5		5000	15
20	Smr_bCD_Lb	1.5	1.5	5000	15+15
21	Smr_bCD_Lr	1.5			
22	Cm_Fr_bCD_LGa	1.5		5000	15
23	Cm_Fr_bCD_LGb	1.5	1.5	5000	15+15
24	Cm_Fr_bCD_LGr	1.5			
25	Cm_Tu_bCD_LGa	1.5		5000	15
26	Cm_Tu_bCD_LGb	1.5	1.5	5000	15+15
27	Cm_Tu_bCD_LGr	1.5			
28	Cm_Tu'_bCD_LGa	1.5		5000	15
29	Cm_Tu'_bCD_LGb	1.5	1.5	5000	15+15
30	Cm_Tu'_bCD_LGr	1.5			
31	Cm_Rd_bCD_LGa	1.5		5000	15
32	Cm_Rd_bCD_LGb	1.5	1.5	5000	15+15
33	Cm_Rd_bCD_LGr	1.5			
34	Arm_Se_bCD_LGa	1.5		5000	15
35	Arm_Se_bCD_LGb	1.5	1.5	5000	15+15
36	Arm_Se_bCD_LGr	1.5			
37	Sbn_bCD_LGa	1.5		5000	15
38	Sbn_bCD_LGb	1.5	1.5	5000	15+15
39	Sbn_bCD_LGr	1.5			
40	Smr_bCD_LGa	1.5		5000	15
41	Smr_bCD_LGb	1.5	1.5	5000	15+15
42	Smr_bCD_LGr	1.5			

3.3.2.5. Analiza prin microscopie cu scanare electronică (SEM).

Pentru analizele SEM, realizate la Centrul de Cercetare al Universității de Vest „Vasile Goldiș” Arad, s-a utilizat un aparat JEOL JSM 5510-LV în vederea evaluării morfologice și dimensionale a complexilor și/sau liposomilor cu conținut de complecși biocompuși/ciclodextrine. Pentru analiza SEM s-au utilizat următoarele condiții: tensiune 15 kV, magnitudine 100-30 000×.

3.3.2.6. Analiza prin microscopie cu transmisie electronică (TEM).

Pentru analizele morfologice ale liposomilor obținuți s-a utilizat un aparat tip JEOL JEM 1010, dotat cu cameră video Mega View III CCD pentru preluarea imaginilor, la o tensiune de accelerare de 100 kV.

3.3.2.7. Analiza prin calorimetrie de scanare diferențială (DSC).

Calorimetria de scanare diferențială (DSC) pentru complecși s-a realizat cu ajutorul unui aparat DSC Netzsch 204. S-au cântărit la balanța analitică, direct în capsulele speciale de Al_2O_3 utilizate pentru analiza calorimetrică, mase de aproximativ 20 ± 5 mg complex care au fost supuse analizelor DSC în următoarele condiții: program de temperatură de la 20°C la 400°C , cu o viteză de încălzire de $4^\circ\text{C}/\text{min}$, răcirea efectuându-se cu azot lichid; achiziția de date s-a realizat cu ajutorul programului specific DSC Netzsch 204-Acquisition Soft/2000; prelucrarea datelor s-a efectuat cu programul Netzsch Proteus-Thermal Analysis ver. 4.0 / 2000.

3.3.2.8. Determinarea apei prin titrare Karl Fischer (KFT).

Titrarea Karl Fischer pentru determinarea conținutului de apă din complecșii biocompuși/ciclodextrine s-a realizat cu ajutorul unui aparat Karl Fischer Titrand 701 (Metrohm), echipat cu sistem de dozare Metrohm 10 și sistem de amestecare Ti Stand 703. S-a utilizat tehnica bicomponent (Component 1: Titrant 5 apă ce conține soluție metanolică de iod, titru 3.6357 ± 0.0195 mg/g și Component 2: Solvent apă, ce conține soluție metanolică de imidazol și dioxid de sulf) (figura 3.3.3). Titrul soluției de iod a fost determinat utilizând Water standard 1% apă. Cantitățile de probă luate în lucru au fost 0.0200 - 0.0400 g. Pentru analiza KFT s-au setat următorii parametri: I(pol) $50\mu\text{A}$, end point 250 mV, viteza maximă 5 ml/min, panta curbei de titrare a fost utilizată drept criteriu de stop, cu o valoare a pantei de 15 $\mu\text{l}/\text{min}$. Timpul de extracție a fost de 300 s, toate determinările realizându-se în triplă.

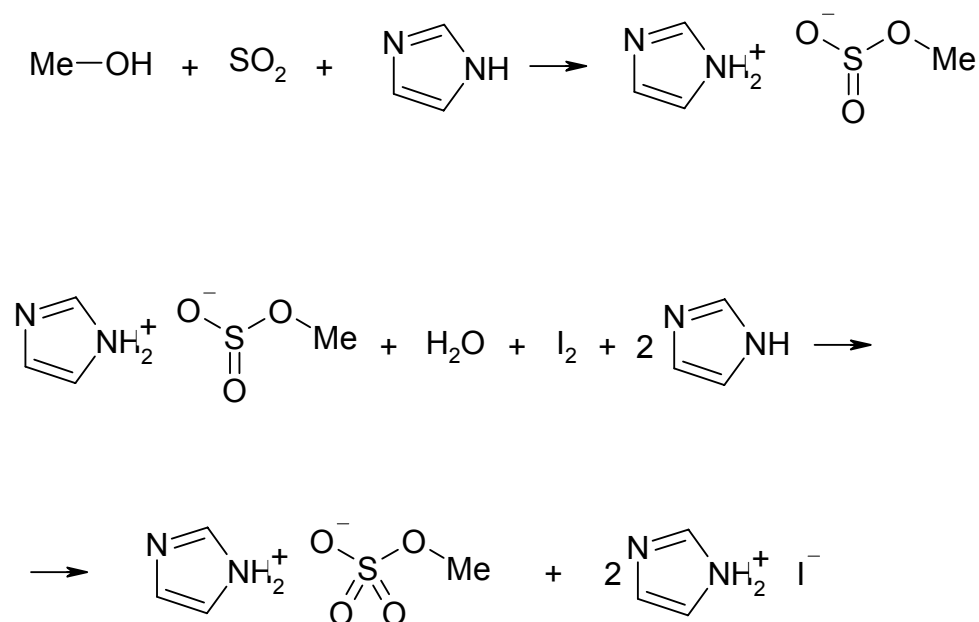


Figura 3.3.3. Reacția Karl Fischer (cu imidazol)

3.3.2.9. Analiza spectrofotometrică a soluțiilor de biocompuși și a complexilor acestora cu ciclodextrine și evaluarea eliberării controlate a compușilor bioactivi.

Prezența grupărilor OH-fenolice pe structurile principalilor biocompuși studiați și a amestecurilor din extractele analizate (e.g. silibina – principalul component din silimarina, etalon al activității hepatoprotectoare) conferă acestora caracter antioxidant, prin urmare stabilitatea lor la oxidare este redusă. Pentru protejarea împotriva oxidării nedorite și eliberarea controlată în mediul țintă (organism, produse farmaceutice etc.) s-a apelat la încapsularea moleculară a acestor compuși bioactivi în ciclodextrine naturale și modificate chimic, respectiv la supraîncapsulare în liposomi.

Analiza spectrofotometrică a soluțiilor de biocompuși puri (silibina și silimarina) și amestecuri din extracte, precum și obținerea unei curbe de etalonare, s-a realizat cu ajutorul unui spectrofotometru UV-VIS CamSpec 501, iar datele obținute au fost prelucrate cu ajutorul programului UV-VIS Analyst, versiunea 4.67. Pentru evaluarea eliberării controlate din complexii cu ciclodextrine a compușilor bioactivi s-au cântărit în cuva spectrofotometrului diverse cantități de complex, peste care s-a introdus etanol de diverse concentrații (20%, 60% și 96%, v/v) și s-a monitorizat absorbanta supernatantului la 322 nm pentru probele de biocompuși din *M. chamomilla* și la 288 nm pentru cele din *S. marianum*. Cu ajutorul curbelor de etalonare pentru compuși puri sau pentru extracte s-au putut calcula concentrațiile de biocompuși eliberați (sau de amestecuri de compuși bioactivi în cazul extractelor) din complexi pe toată durata determinării. Toate citirile s-au făcut față de solventul utilizat, de concentrație corespunzătoare ca referință.

3.3.3. Rezultate și discuții

3.3.3.1. Obținerea și analiza nanoparticulelor extracte /

ciclodextrine. În cazul amestecurilor de biocompuși din extractele de *M. chamomilla* și *S. marianum*, complexii cu β -ciclodextrină au fost obținuți prin metoda cristalizării cu randamente mai modeste (55-62% pentru primul caz și 76% pentru cel de-al doilea) (tabelul 3.3.3).

Tabelul 3.3.3. Condiții de obținere a complexilor de β -ciclodextrină și extractele etanolice de *M. chamomilla* L. și *S. marianum*

Nr	Proba	m (bCD) (g)	V (apa) (ml)	V (extr) (ml)	m (cplx) (g)	Timp picu- rare (min)	Timp perf. (min)	Timp racire lenta (ore)	Rnd. %
1	<i>M. chamomilla</i> (flori)	0.671	4	4	0.3946	15	30	4	58.81
2	<i>M. chamomilla</i> (frunze)	0.672	4	4	0.3744	15	30	4	55.71
3	<i>M. chamomilla</i> (rădăcină)	0.6704	4	4	0.4148	15	30	4	61.87
4	<i>M. chamomilla</i> (tulpină)	0.6713	4	4	0.4038	15	30	4	60.15
5	<i>S. marianum</i> (semințe)	0.6701	4	4	0.5074	15	30	4	75.72

La utilizarea metodei „în pastă” randamentele de complexare (recuperare) au fost mai mari în toate cazurile. Astfel, silimarina și silibina au fost încapsulate cu randamente destul de bune pentru ambele ciclodextrine naturale, dar pentru ciclodextrina modificată chimic aceste randamente au fost tot scăzute (41-78%).

Analiza SEM a complecșilor obținuți prin metoda în pastă a indicat prezența unor cristale nu foarte bine formate, comparativ cu imaginile obținute în cazul probelor prin metoda cristalizării. În cazul complecșilor cu silibină și silimarină particulele nu sunt bine definite, sunt variate ca dimensiuni și formă, dar acești complecși obținuți prin metoda în „pastă” prezintă un conținut ridicat de compuși bioactivi (figurile 3.3.4-3.3.7).

Complecșii obținuți cu amestecuri de biocompuși din *M. chamomilla* (diverse părți de plantă) prezintă o oarecare uniformitate și au forme ușor romboidale, cu excepția probei din rădăcină (figurile 3.3.8-3.3.11).

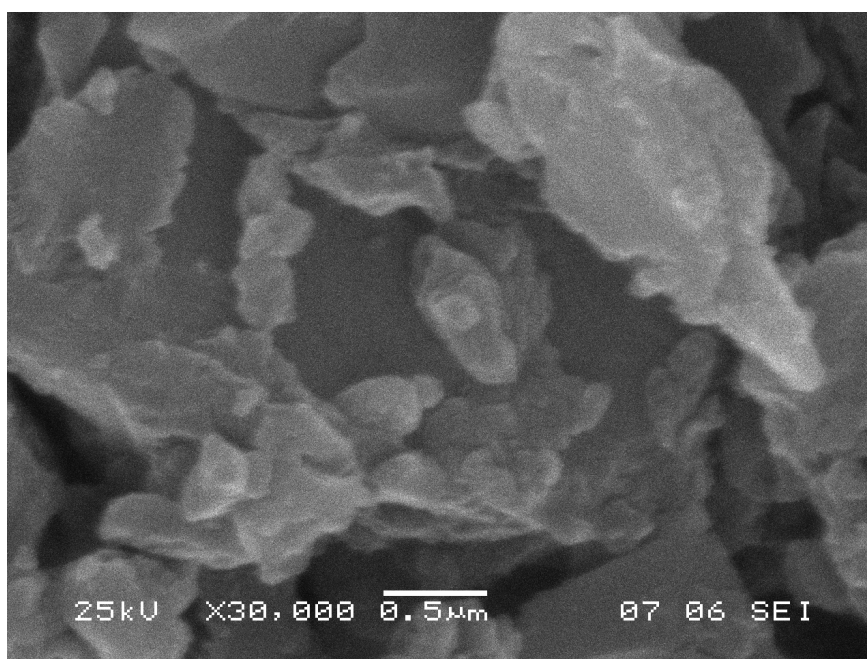


Figura 3.3.4. Imaginea obținută prin microscopie cu scanare electronică (SEM) a complecșilor silibină/aCD

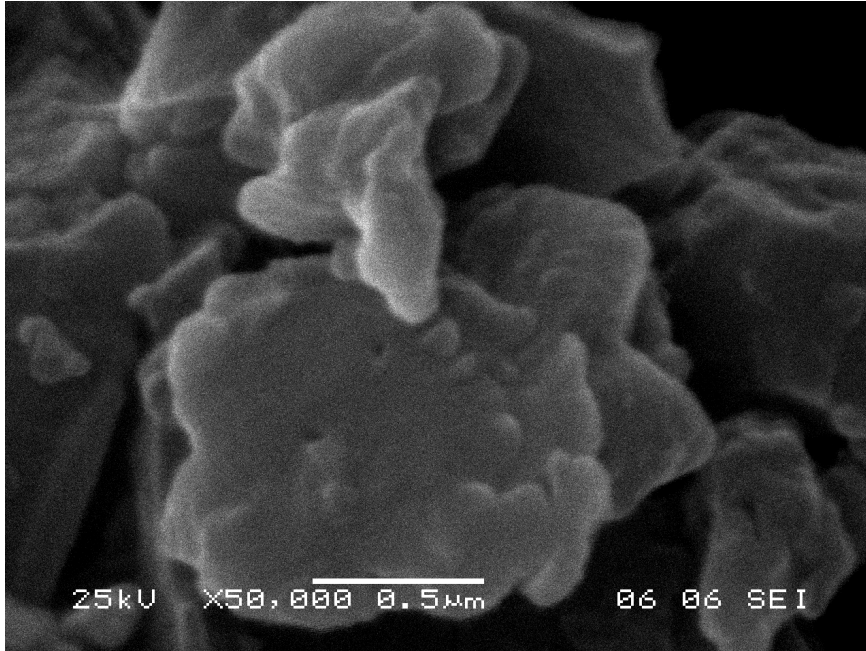


Figura 3.3.5. Imaginea obținută prin microscopie cu scanare electronică (SEM) a complexelor silibină/βCD

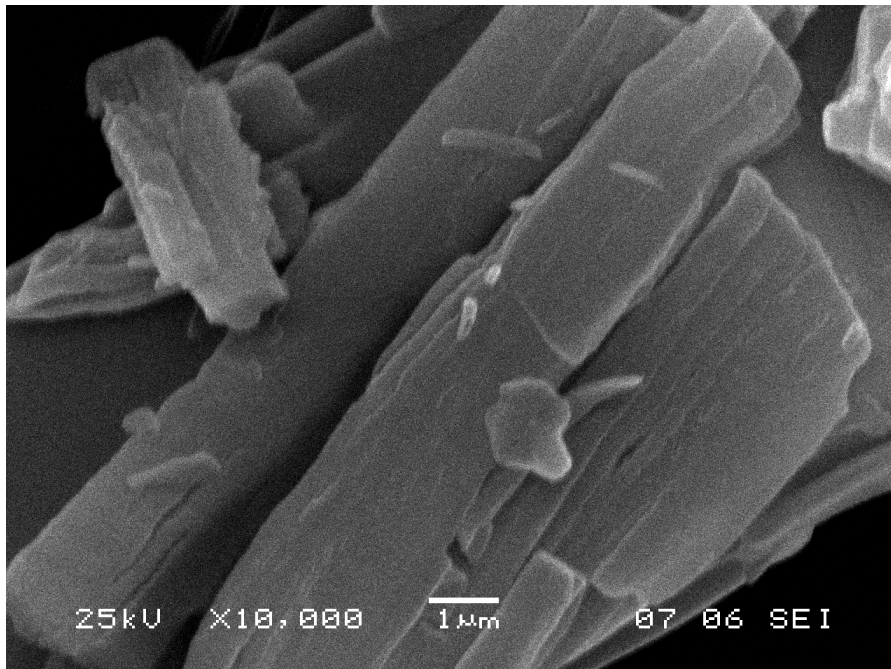


Figura 3.3.6. Imaginea obținută prin microscopie cu scanare electronică (SEM) a complexelor silimaritin/αCD

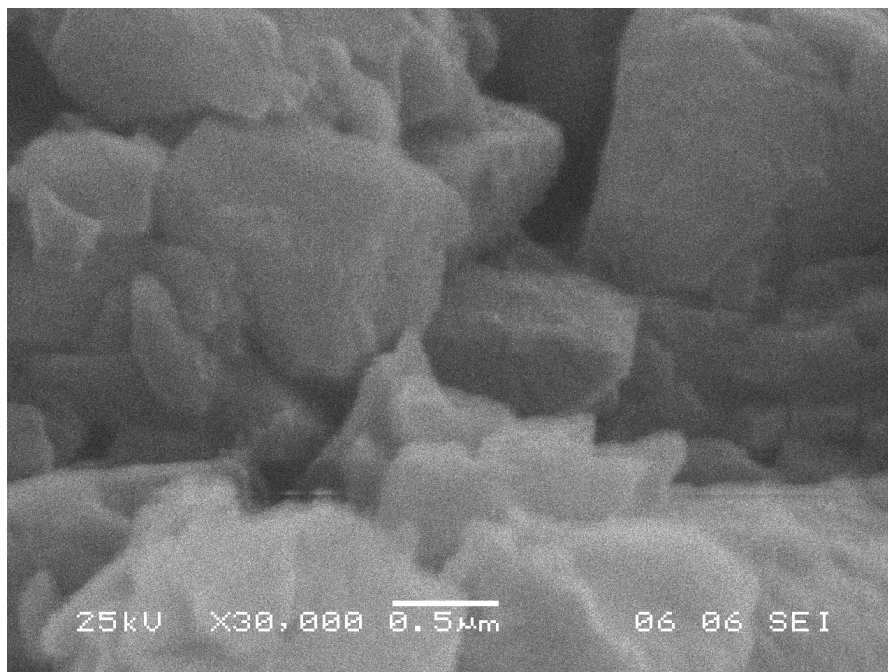


Figura 3.3.7. Imaginea obținută prin microscopie cu scanare electronică (SEM) a complexilor silimarină/bCD

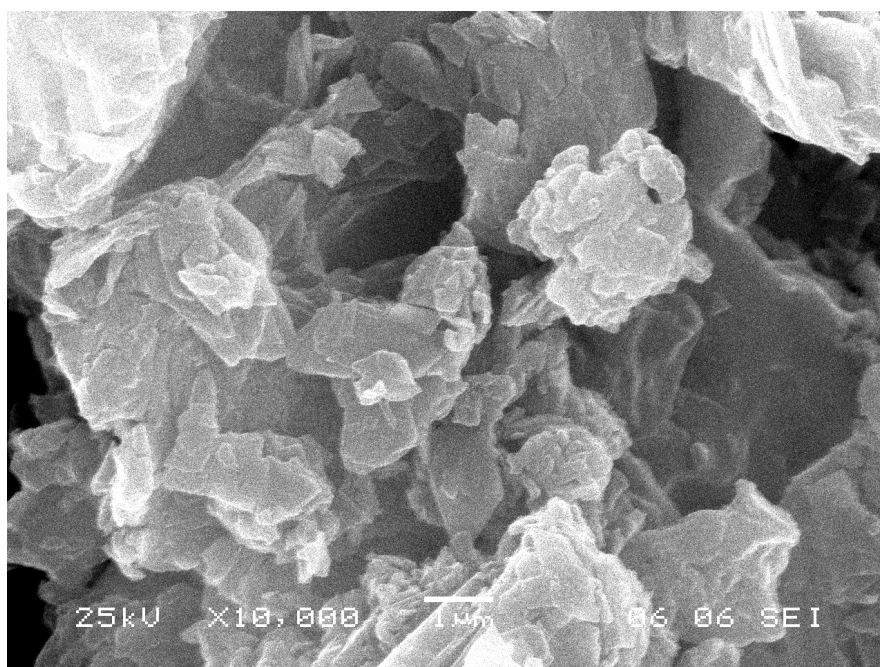


Figura 3.3.8. Imaginea obținută prin microscopie cu scanare electronică (SEM) a complexilor amestec de biocompuși din *M. chamomilla* (flori)/bCD

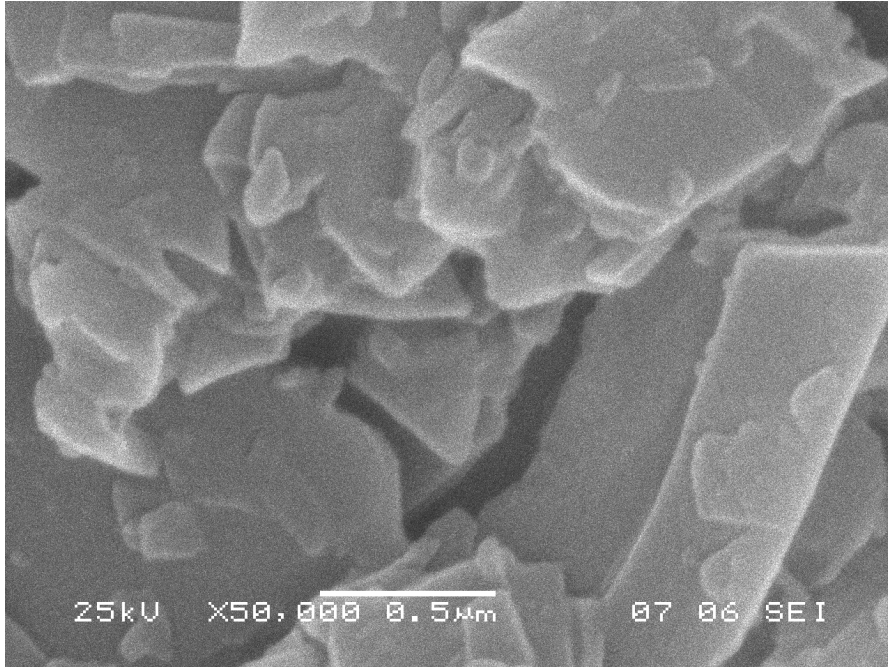


Figura 3.3.9. Imaginea obținută prin microscopie cu scanare electronică (SEM) a complexșilor amestec de biocompuși din *M. chamomilla* (frunze)/BCD

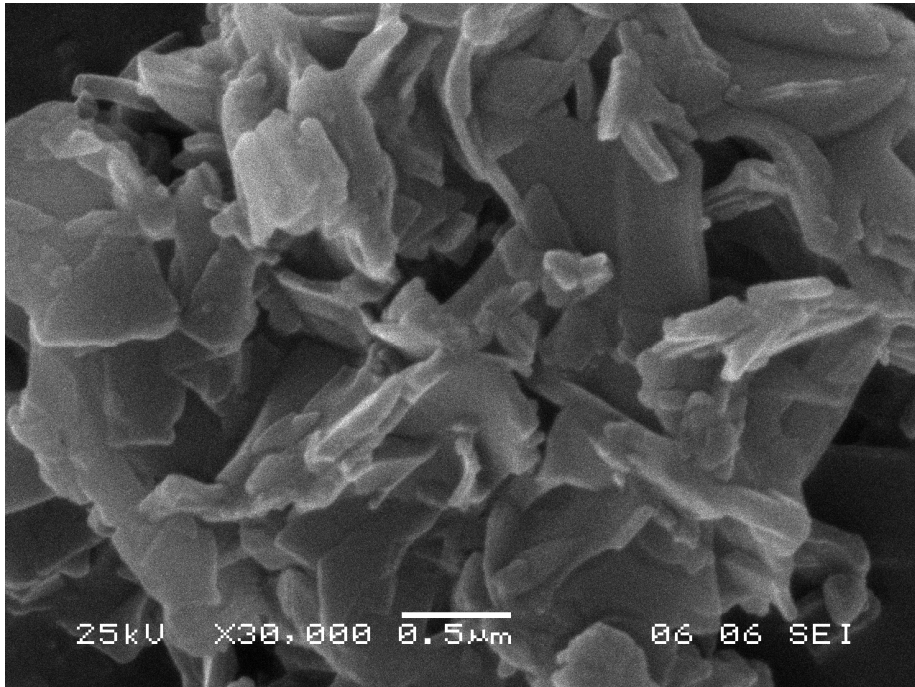


Figura 3.3.10. Imaginea obținută prin microscopie cu scanare electronică (SEM) a complexșilor amestec de biocompuși din *M. chamomilla* (tulpină)/BCD

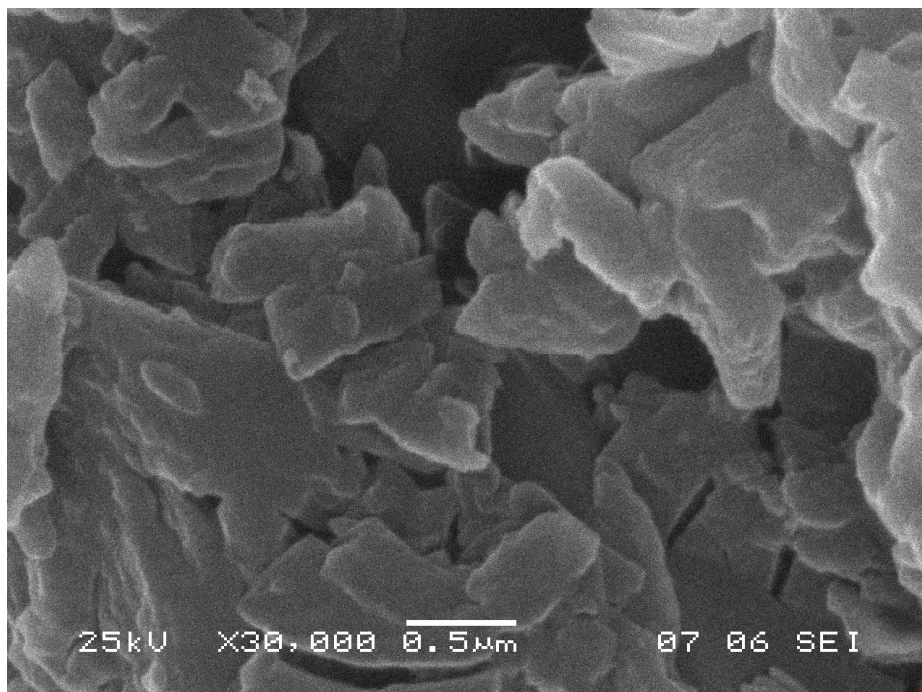
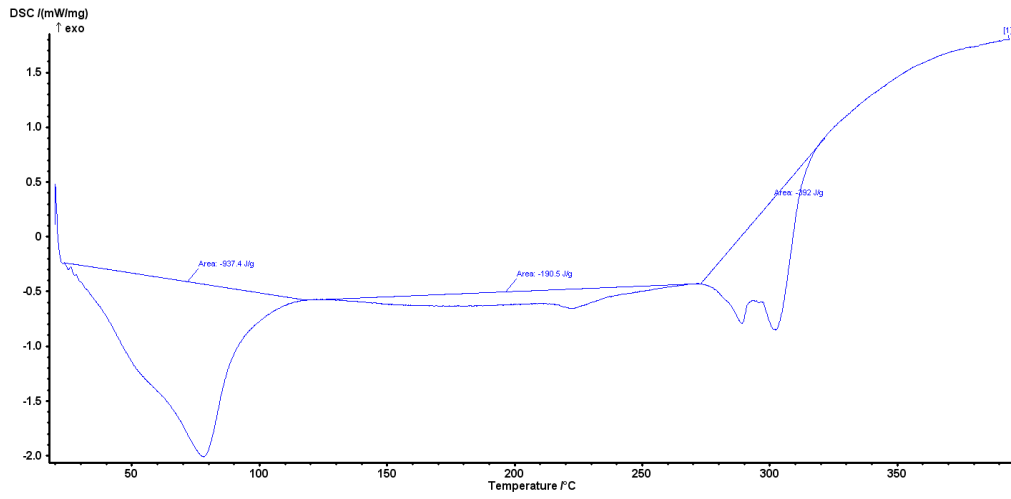
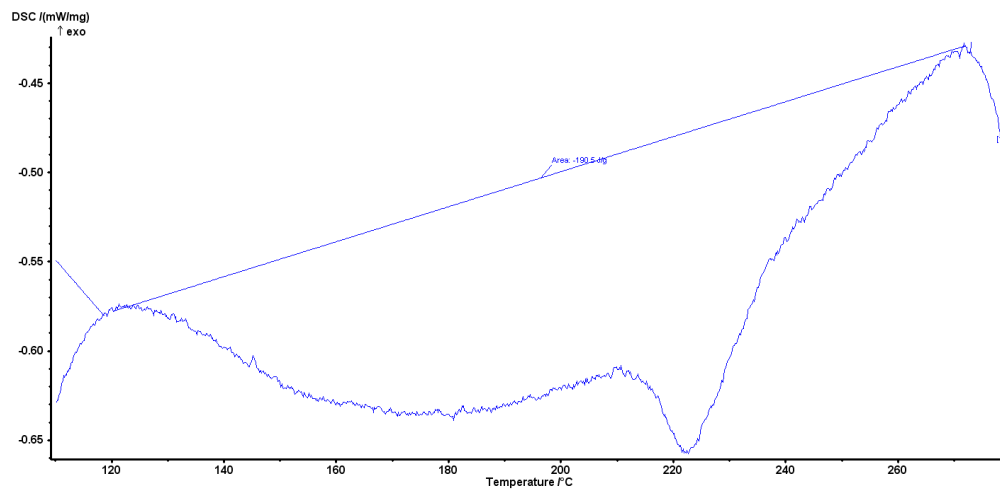


Figura 3.3.11. Imaginea obținută prin microscopie cu scanare electronică (SEM) a complexilor amestec de biocompuși din *M. chamomilla* (rădăcină)/βCD

Analiza DSC a complexilor amestecuri de biocompuși din *M. chamomilla*/βCD a confirmat formarea compușilor de incluziune prin prezența picului endotermic larg din domeniul 130-250°C și reducerea picului corespunzător eliberării apei de cristalizare. Astfel, în cazul complexului obținut din amestec de biocompuși din flori de mușețel/βCD (cod: Cm_Fl/βCD, figura 3.3.12a,b), efectul termic este semnificativ (190 KJ/g), observându-se un efect apropiat de cazul probelor din tulpină (106-173 KJ/g) (figura 3.3.15a,b). Efecte mult mai reduse se observă în cazul probelor din frunze și rădăcină (20-57 KJ/g) (figurile 3.3.13a,b și 3.3.14a,b), respectiv în cazul complexului biocompuși din semințe de *S. marianum*/βCD (48 KJ/g) (figura 3.3.16a,b). Pe intervalul 20-130°C apare deshidratarea complexilor cu efect termic semnificativ (850-1200 KJ/g), iar peste 250°C descompunerea ciclodextrinei.

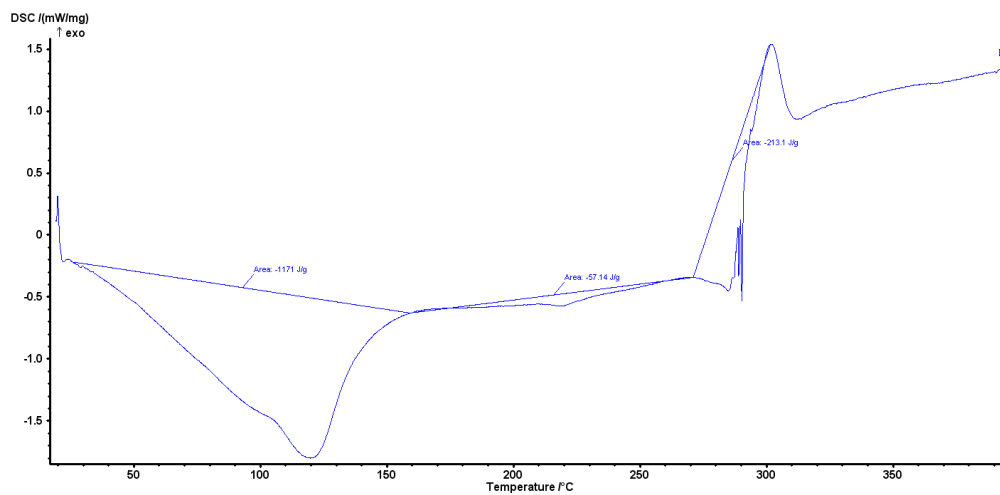


(a)

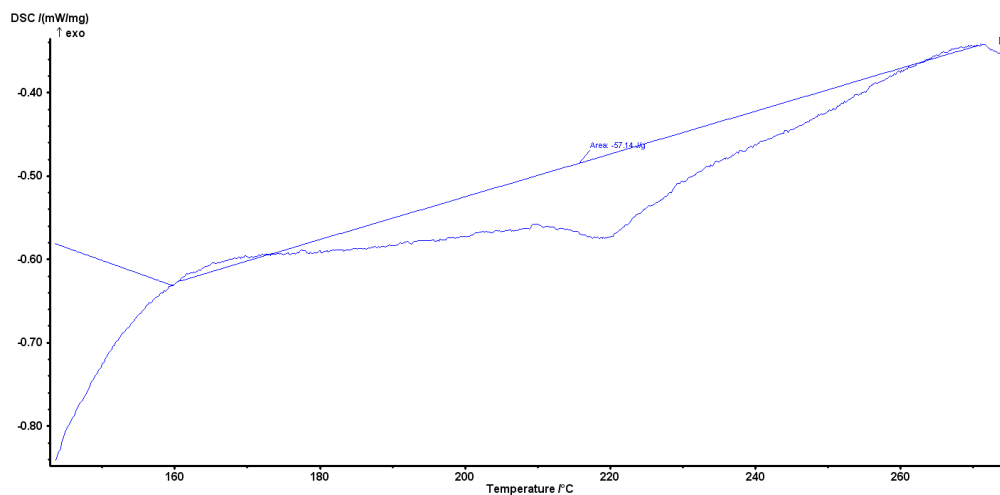


(b)

Figura 3.3.12. Analiza DSC a complexului extract etanolic din flori de mușețel/ β -ciclodextrină (Cm_FI/bCD)

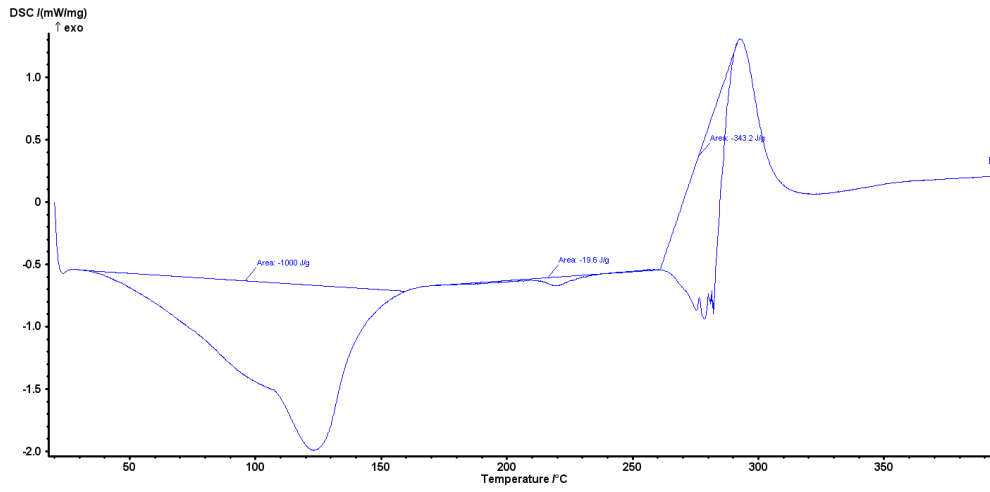


(a)

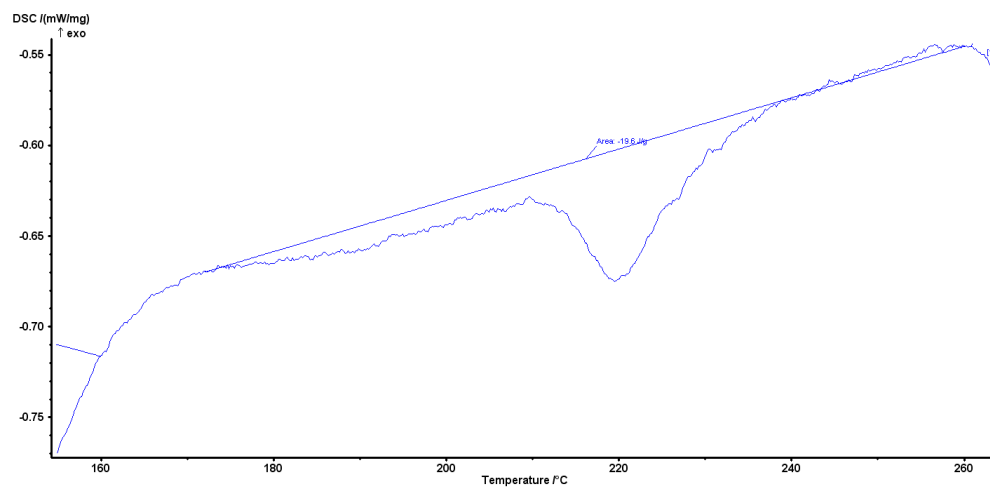


(b)

Figura 3.3.13. Analiza DSC a complexului extract etanolic din frunze de mușețel/ β -ciclodextrină (Cm_Fr/bCD)

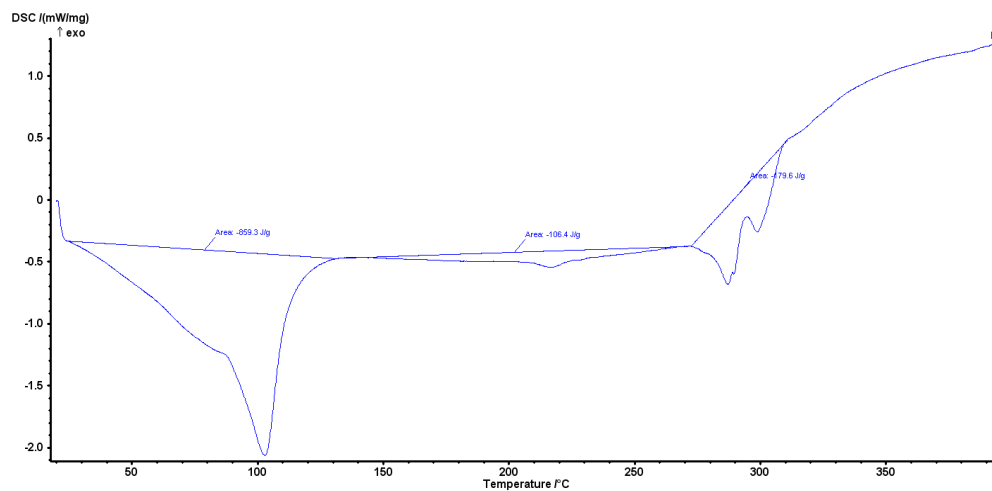


(a)

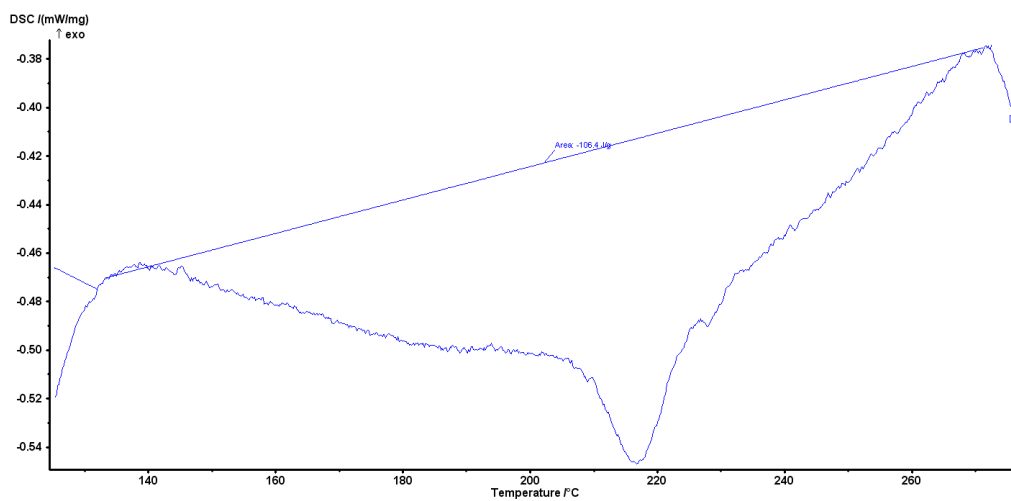


(b)

Figura 3.3.14. Analiza DSC a complexului extract etanolic din rădăcină de mușețel/ β -ciclodextrină (Cm_Rd/ β CD)

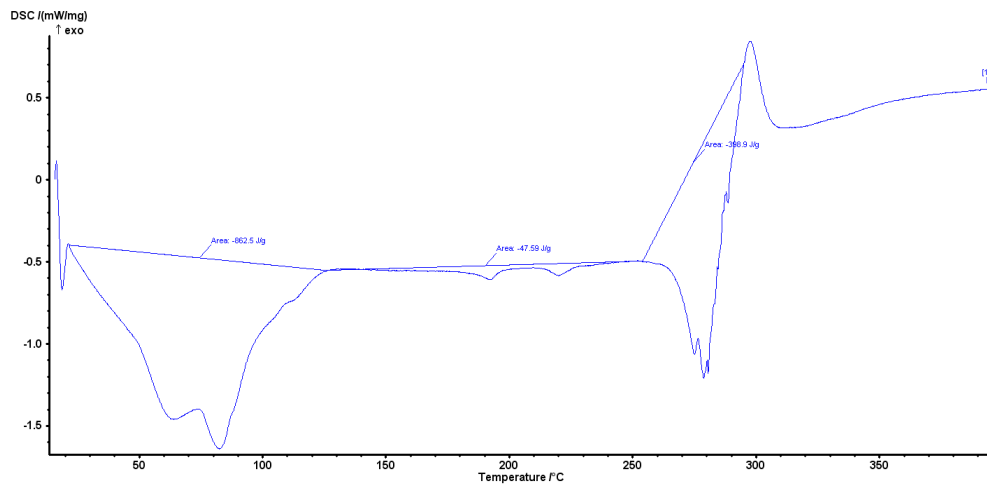


(a)

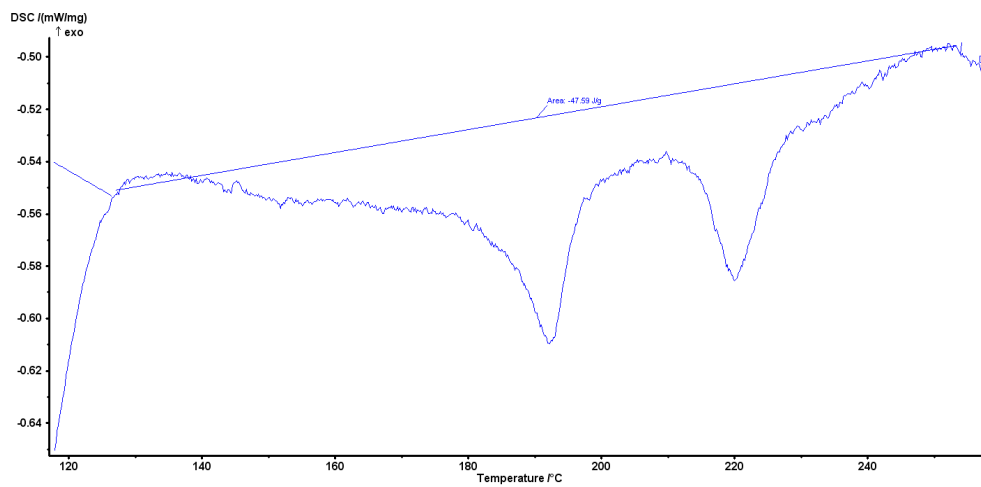


(b)

Figura 3.3.15. Analiza DSC a complexului extract etanolic din tulpină de mușețel/ β -ciclodextrină (Cm_Tu/bCD)



(a)



(b)

Figura 3.3.16. Analiza DSC a complexului extract etanolic din semințe de armurariu/ β -ciclodextrină (Arm_Se/bCD)

Analiza KFT a apei din complexii obținuți a indicat o concentrație de apă mai mică cu 2-3% comparativ cu ciclodextrinele comerciale. Astfel, complexii amestec de biocompuși din extract de *M. chamomilla*/bCD au prezentat concentrații între 10% și 12.4%, cele mai mici concentrații de apă fiind observate în cazul complexilor cu extracte din flori și tulpină; acest lucru este în concordanță cu analizele DSC și anume concentrația de biocompuși încapsulați este mai mare comparativ cu probele din frunze și rădăcină.

Pentru complexii corespunzători ai *S. marianum*, concentrația de apă este apropiată primelor cazuri de mai sus (10.6%). Pentru complexii biocompuși puri/ciclodextrine, concentrațiile de apă sunt puțin mai mari comparativ cu probele pentru amestecuri de biocompuși: silibina și silimarina complexate cu bCD au concentrații >12.4%. În cazul complexșilor acestor compuși cu aCD și HPbCD concentrațiile sunt corespunzător mai mici comparativ cu ciclodextrinele comerciale (8.5-9.8% și, respectiv, 11.5-11.6%), în condițiile în care aCD are ~11.5% apă, iar HPbCD este higroscopică (>12% apă) (tabel 3.3.4).

Tabel 3.3.4. Determinarea conținutului de apă prin titrare Karl Fischer (KFT) pentru complexii studiați

Nr.	Cod	Conc. apă (KFT) (%)
1	Cm_Fl_bCD	11.032
	Cm_Fl_bCD	11.0144
	Cm_Fl_bCD	11.0917
	Cm_Fl_bCD	11.0460±0.0405
2	Cm_Fr_bCD	13.1481
	Cm_Fr_bCD	11.8937
	Cm_Fr_bCD	12.0539
	Cm_Fr_bCD	12.3652±0.6827
3	Cm_Tu_bCD	11.218
	Cm_Tu_bCD	11.4798
	Cm_Tu_bCD	11.2464
	Cm_Tu_bCD	11.3147±0.1437
4	Cm_Tu'_bCD	10.2592
	Cm_Tu'_bCD	9.5796
	Cm_Tu'_bCD	10.2815
	Cm_Tu'_bCD	10.0401±0.3990
5	Cm_Rd_bCD	11.8414
	Cm_Rd_bCD	12.0282
	Cm_Rd_bCD	11.816
	Cm_Rd_bCD	11.8952±0.1159
6	Arm_Se_bCD	10.7754
	Arm_Se_bCD	10.7059
	Arm_Se_bCD	10.2089
	Arm_Se_bCD	10.5634±0.3090
7	Sbn_aCD	8.6816
	Sbn_aCD	8.6667
	Sbn_aCD	8.2269
	Sbn_aCD	8.5251±0.2583
8	Sbn_bCD	12.7784
	Sbn_bCD	12.4822
	Sbn_bCD	12.2267
	Sbn_bCD	12.4958±0.2761

Tabel 3.3.4. Continuare

Nr.	Cod	Conc. apă (KFT) (%)
9	Sbn_HPbCD	11.3558
	Sbn_HPbCD	11.3358
	Sbn_HPbCD	11.7436
	Sbn_HPbCD	11.4784±0.2299
10	Smr_aCD	9.6291
	Smr_aCD	9.728
	Smr_aCD	10.2254
	Smr_aCD	9.8608±0.3196
11	Smr_bCD	12.3366
	Smr_bCD	12.967
	Smr_bCD	12.8164
	Smr_bCD	12.7067±0.3292
12	Smr_HPbCD	11.7136
	Smr_HPbCD	11.6566
	Smr_HPbCD	11.5339
	Smr_HPbCD	11.6347±0.0918

3.3.3.2. Obținerea și analiza nanocapsulelor de tip liposomi cu conținut de nanoparticule biocompuși / ciclodextrine. Încercările preliminare de obținere a nanocapsulelor pe bază de liposomi cu conținut de complecși extracte/ciclodextrine au indicat prezența complecșilor (parțial nesolubiliizați) în capsulele lipidice, dar și a unor formațiuni aderente la aceste capsule. La nivel macroscopic se poate observa o separare a liposomilor de dimensiuni reduse în urma fracționării prin centrifugare, fracțiunile „La” și „Lb” din stânga seturilor de trei fracțiuni (ultima fracțiune - „Lr” fiind reziduu) fiind mai translucide.

Analizele TEM pentru aceste nanocapsule au indicat faptul că unele nanoparticule de complex sunt acoperite de fosfolipide, în timp ce o parte din complecșii neîncapsulați sunt aderente la aceste nanocapsule; de asemenea, complecșii solubiliizați sunt parțial încapsulați în entitatea liposomică (figurile 3.3.17-3.3.19).

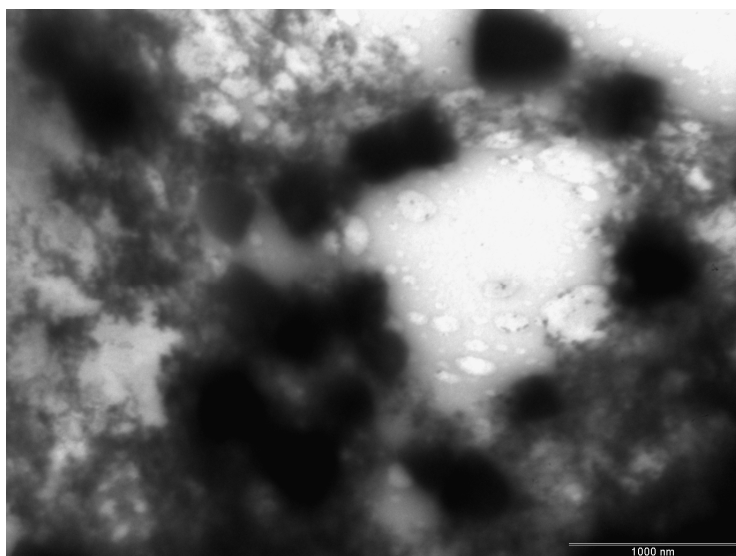


Figura 3.3.17. Analiza prin microscopie cu transmisie electronică (TEM) a liposomilor (lecitină) cu conținut de complex extract etanolic din semințe de armurariu/ β -ciclodextrină (Arm_Se/bCD)

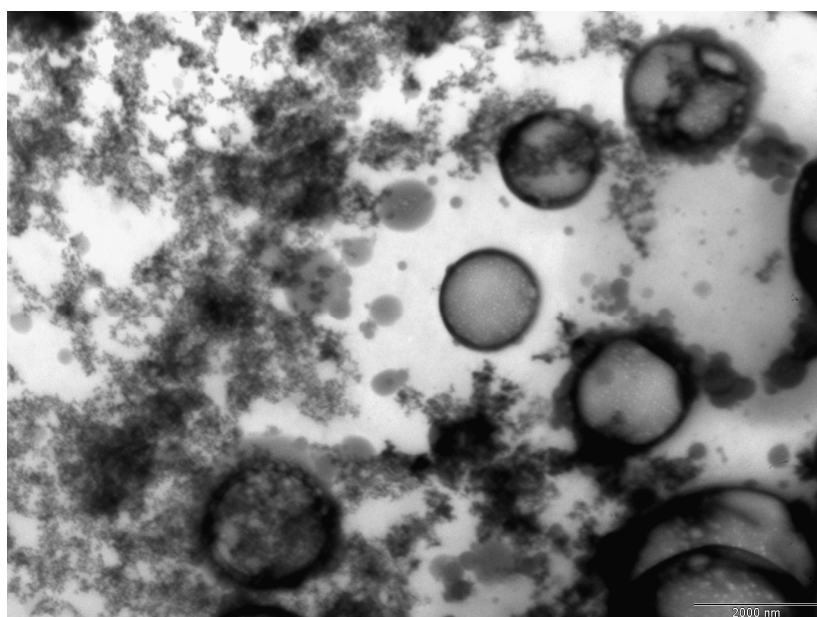


Figura 3.3.18. Analiza prin microscopie cu transmisie electronică (TEM) a liposomilor (lecitină) cu conținut de complex extract etanolic din semințe de armurariu/ β -ciclodextrină (Arm_Se/bCD)

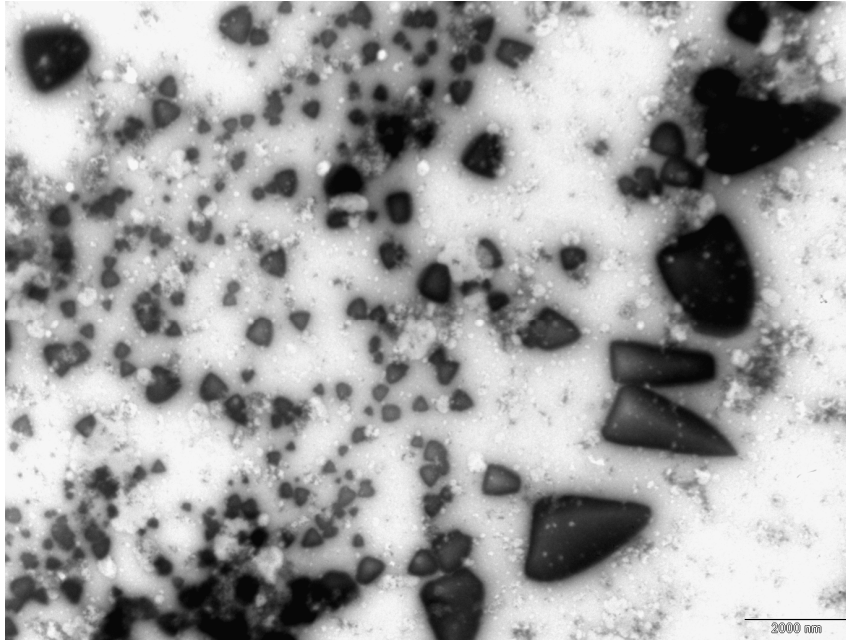


Figura 3.3.19. Analiza prin microscopie cu transmisie electronică (TEM) a liposomilor (lecitină) cu conținut de complex extract etanolic din semințe de armurariu/ β -ciclodextrină (Arm_Se/bCD)

În cazul liposomilor obținuți din amestecuri artificiale de lipide (fosfatidilcolină, stearylamină și colesterol), probabil dimensiunea particulelor este mult mai mică, fapt relevat de imaginea translucidă a liposomilor fără complecși (figura 3.3.20). Variația opacității probelor de liposomi pe bază de amestec lipidic cu conținut de complecși (amestecuri de biocompuși/ciclodextrine) este observată în figura 3.3.21, unde din seturile de trei fracțiuni, întotdeauna primele două (de la stânga) sunt mai translucide (fracțiunile „LGa” și „LGb”), comparativ cu ultima din fiecare set, care este reziduul „LGr”.



Figura 3.3.20. Imaginea liposomilor pe bază de amestec lipidic (LG) fără complecși



Figura 3.3.21. Imaginea liposomilor pe bază de amestec lipidic cu conținut de complecși ai PaCD_Sbn, PbCD_Sbn și PHPbCD_Sbn (fracționare, „LGA/LGb/LGr”)

3.3.3.3. Evaluarea eliberării controlate a biocompușilor din nanoparticulele cu ciclodextrină. Pentru evaluarea eliberării controlate a biocompușilor din complecșii cu ciclodextrină s-a apelat la analiza spectrofotometrică a unor probe de complecși în ser fiziologic sau soluții etanolice de diverse concentrații (20-96%) după un anumit interval de timp de la preparare (în jur de 7 zile).

Pentru aceasta a fost necesară obținerea unor curbe de etalonare pentru compuși puri disponibili în cazul extractului de *S. marianum* (silibină), respectiv pentru complexii inițiali. Curbele de etalonare pentru silibină (utilizată pentru evaluarea eliberării controlate din complexii) și silimarină (pentru comparație) sunt prezentate în figurile 3.3.22-3.3.23. Amestecul de biocompuși din *M. chamomilla* este prea complex și s-a recurs la utilizarea unor curbe de etalonare obținute pentru complexii corespunzători cu β -ciclodextrină. Aceste curbe de etalonare sunt prezentate în figurile 3.3.24-3.3.27, împreună cu analizele UV-VIS pentru soluțiile etalon utilizate.

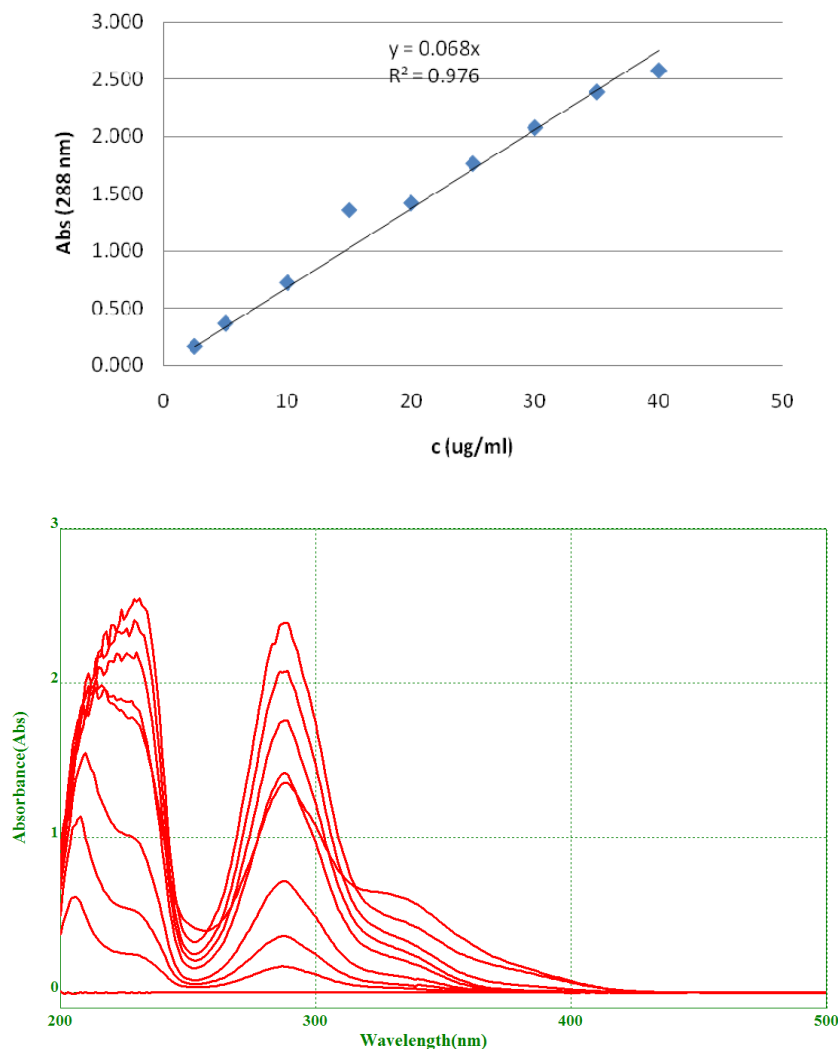


Figura 3.3.22. Curba de etalonare și analizele UV-VIS pentru silibină

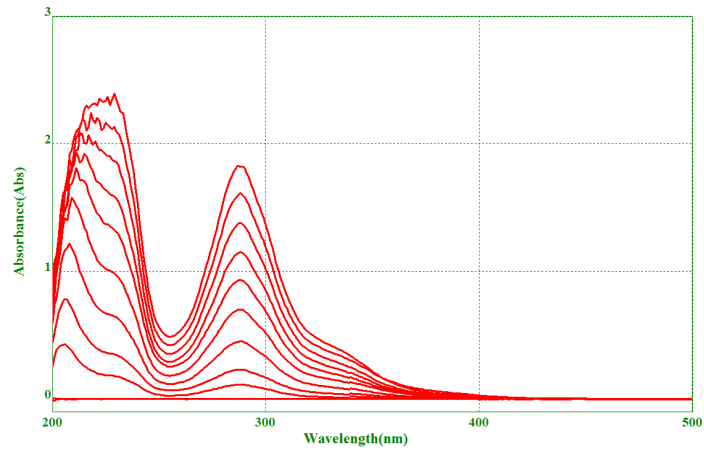
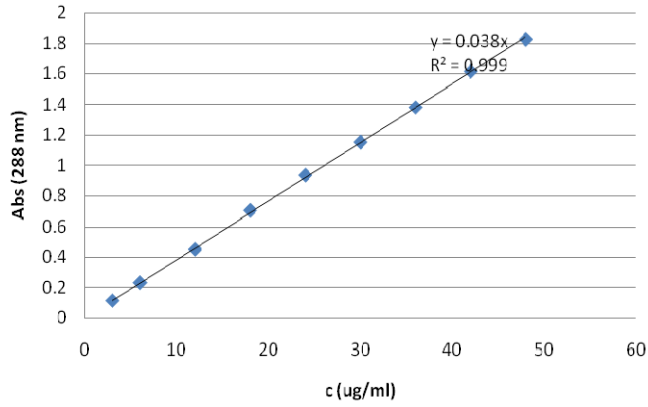


Figura 3.3.23a. Curba de etalonare și analize UV-VIS pentru silimarică

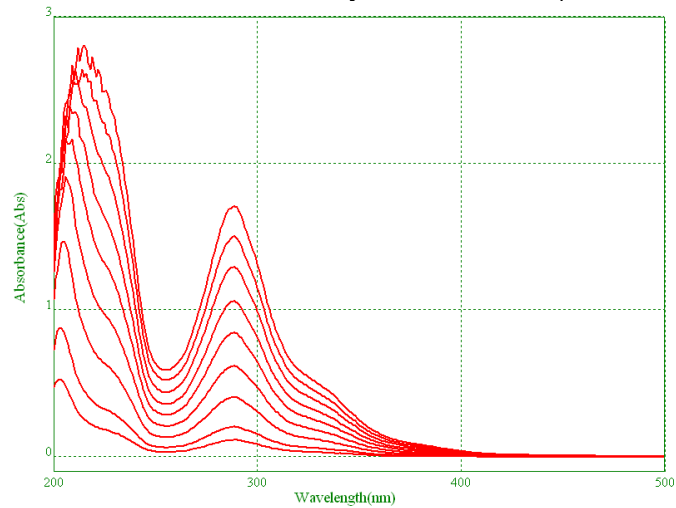


Figura 3.3.23b. Analizele UV-VIS pentru extractul etanolic 96% de armurariu (*S. marianum* L.) la diferite diluții

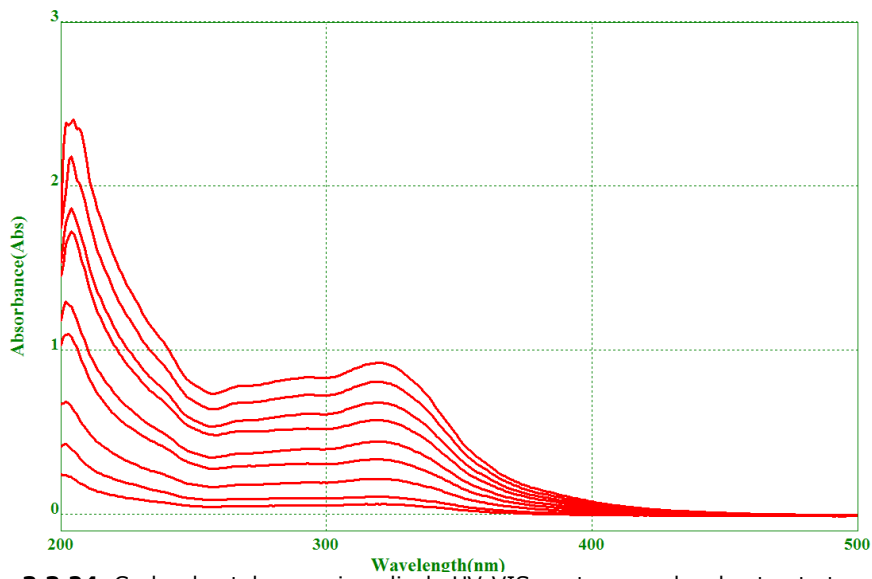
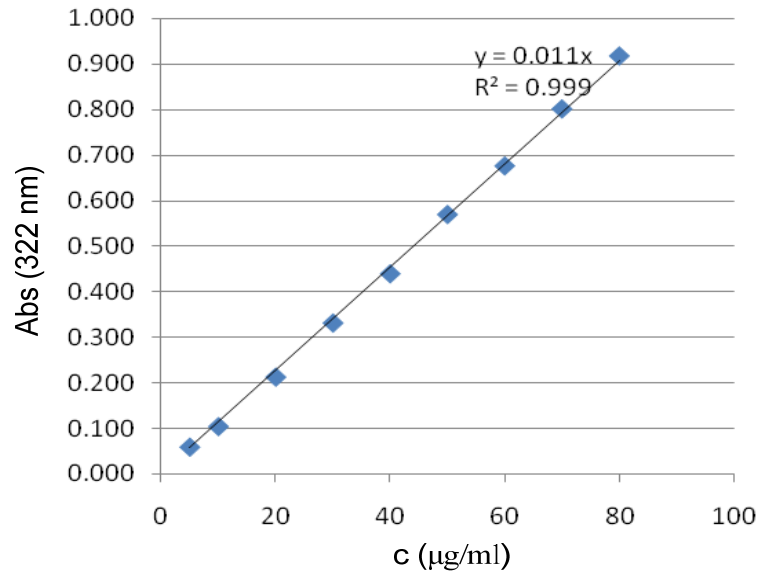


Figura 3.3.24. Curba de etalonare și analizele UV-VIS pentru complexul extract etanolic din flori de mușețel/ β -ciclodextrină (Cm_FI_bCD)

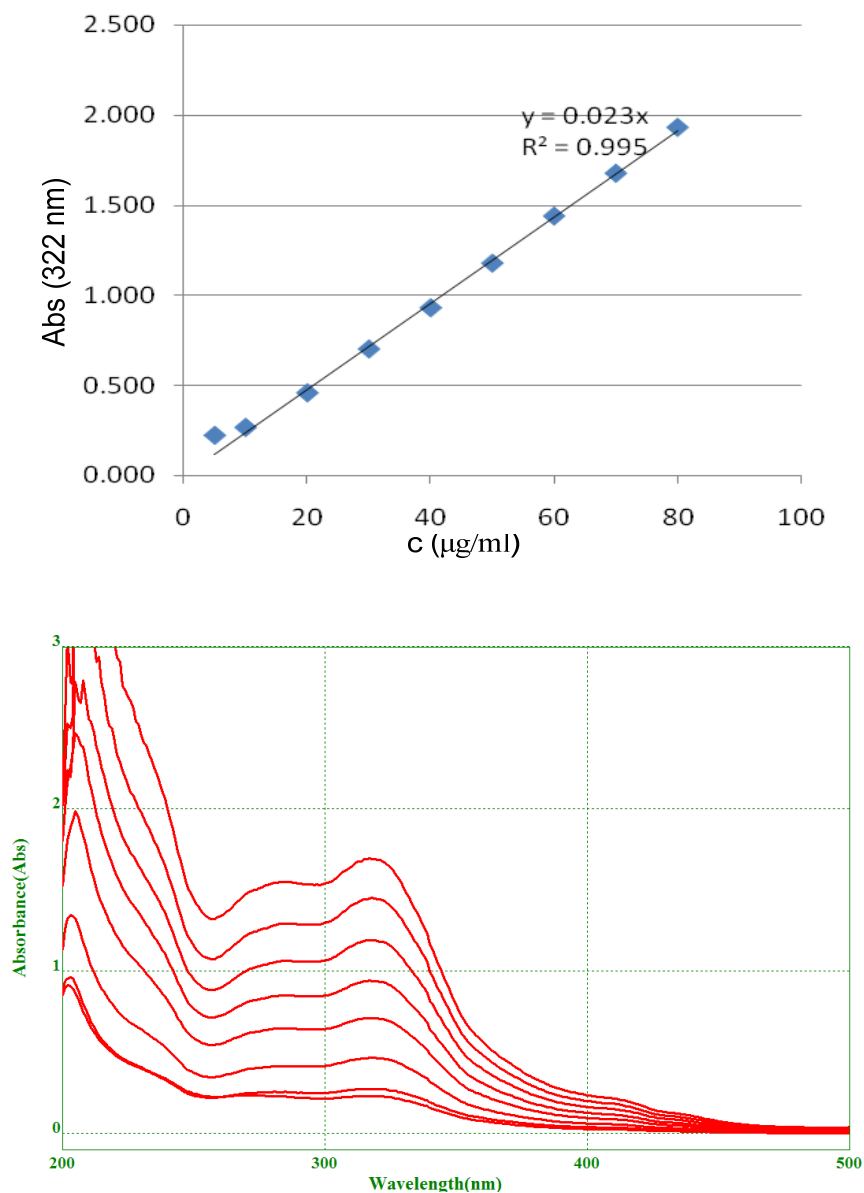


Figura 3.3.25. Curba de etalonare și analizele UV-VIS pentru complexul extract etanolic din frunze de mușețel/ β -ciclodextrină (Cm_Fr_bCD)

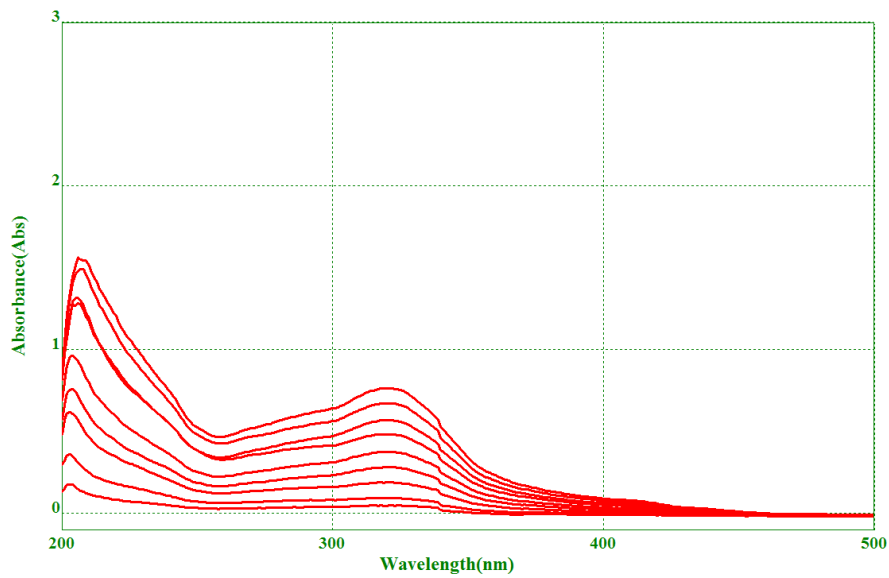
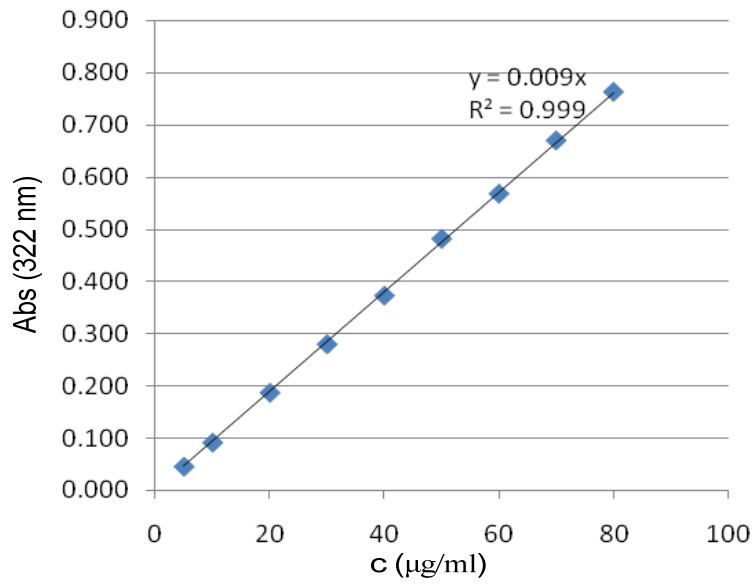


Figura 3.3.26. Curba de etalonare și analizele UV-VIS pentru complexul extract etanolic din tulpină de mușețel/ β -ciclodextrină Cm_Tu_bCD

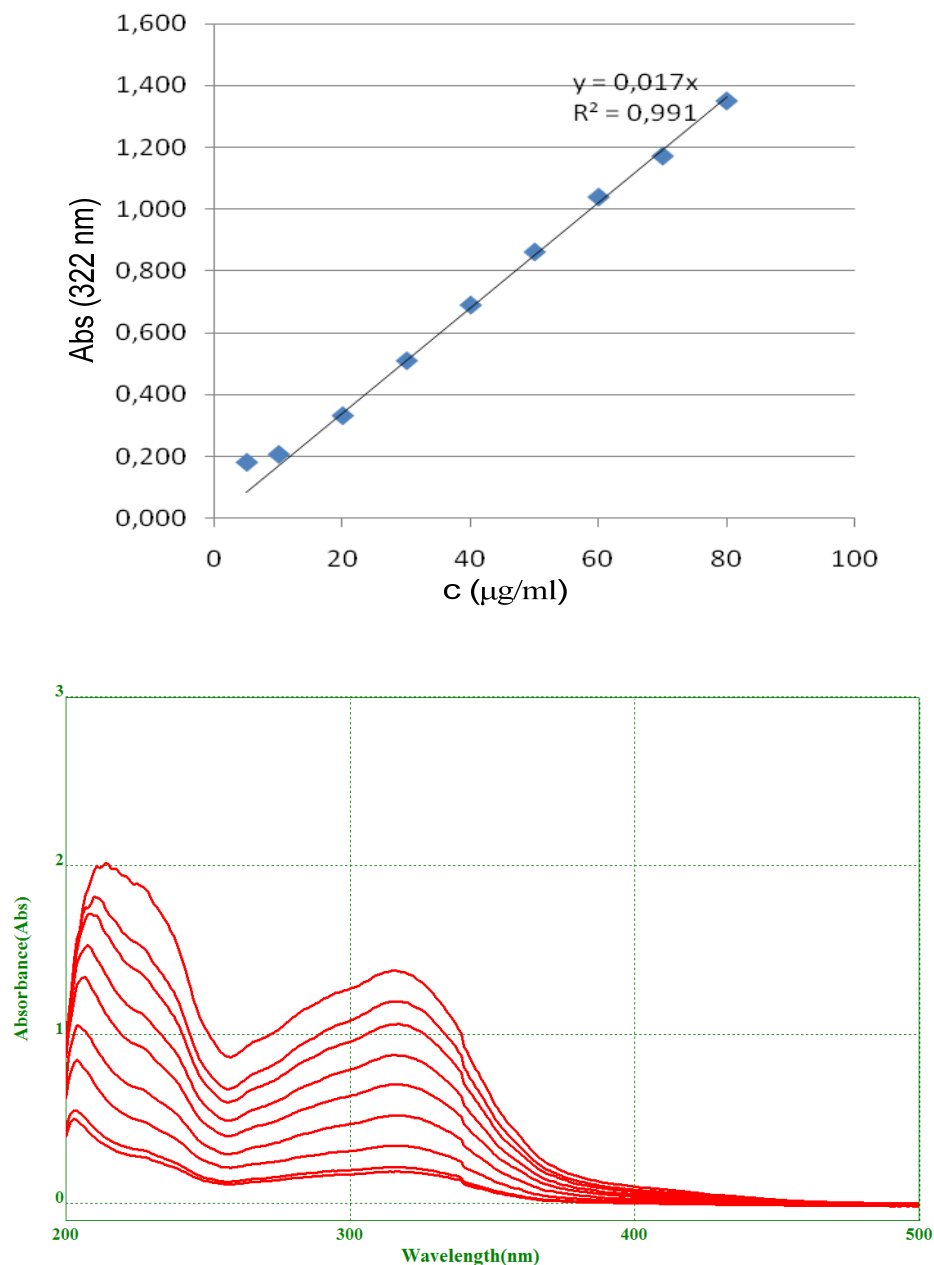


Figura 3.3.27. Curba de etalonare și analizele UV-VIS pentru complexul extract etanolic din rădăcină de mușețel/ β -ciclodextrină Cm_Rd_bCD

În cazul evaluării eliberării controlate din complecși (exprimată ca variație a concentrației de biocompus în cazul silibinei din *S. marianum* sau de amestec de biocompuși în cazul *M. chamomilla*) studiile s-au rezumat la soluții alcoolice de diverse concentrații, deoarece complecșii sunt solubili în fază apoasă (sau ser

fiziologic). Variația concentrației de compuși bioactivi se poate observa clar în special în cazul utilizării etanolului de concentrație 60% sau 96%.

Pentru cazul complexelor silibinei, eliberarea controlată în etanol diluat se realizează foarte lent, pentru toate cele trei tipuri de complecși (αCD, βCD și HPβCD) absorbanta nedepășind valoarea de 0.1, chiar după 30 de minute de monitorizare (figura 3.3.28).

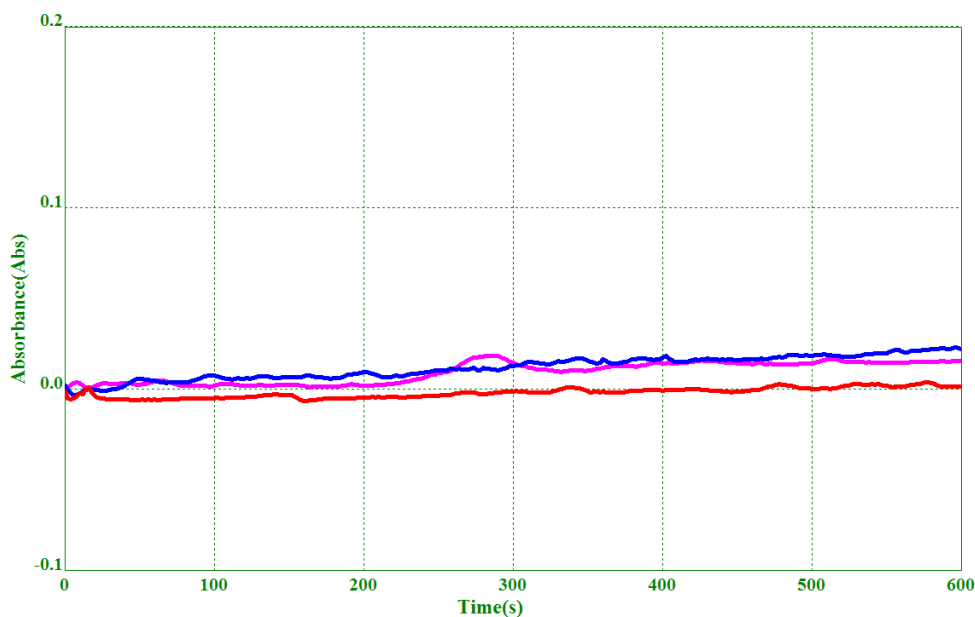


Figura 3.3.28. Evaluarea spectrofotometrică (288nm) a eliberării silibinei din complecși cu α-ciclodextrină (roșu), β-ciclodextrină (albastru) și HP-β-ciclodextrină (roz) (în etanol 20%)

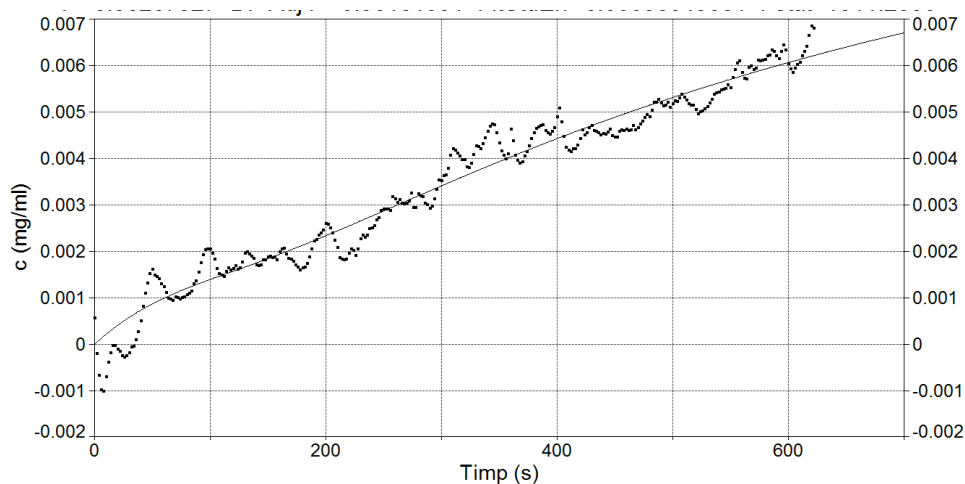


Figura 3.3.29. Evaluarea eliberării controlate a silibinei din complexul silibină/β-ciclodextrină (Sb_bCD) (în EtOH 20%)

Mărirea scării absorbantei pe domeniul 0 – 0.007 (figura 3.3.29), respectiv 0 – 0.1 (figura 3.3.32) evidențiază în mod clar eliberarea compusului „oaspete” (principiul bioactiv).

Concentrațiile de silibină eliberate ajung la 0.01 mg/ml după 30 minute în cazul complexului Sb_aCD și la ~0.006 mg/ml după 10-15 minute în cazul complexelor Sb_bCD și Sb_HPbCD.

În cazul complexelor corespunzătoare cu silimarină, există o comportare similară la eliberarea controlată în etanol 20% (figurile 3.3.30 și 3.3.31), concentrațiile de compuși bioactivi eliberați (exprimate ca silibină) sunt ceva mai mari (~0.1 mg/ml), după 30 de minute de monitorizare (figura 3.3.32).

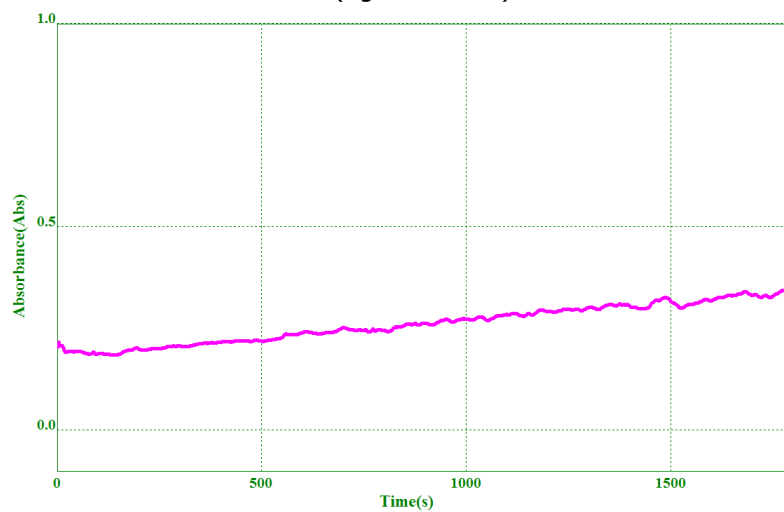


Figura 3.3.30. Evaluarea spectrofotometrică (288 nm) a eliberării compușilor bioactivi din complexul silimarinei cu α -ciclodextrină (în etanol 20%)

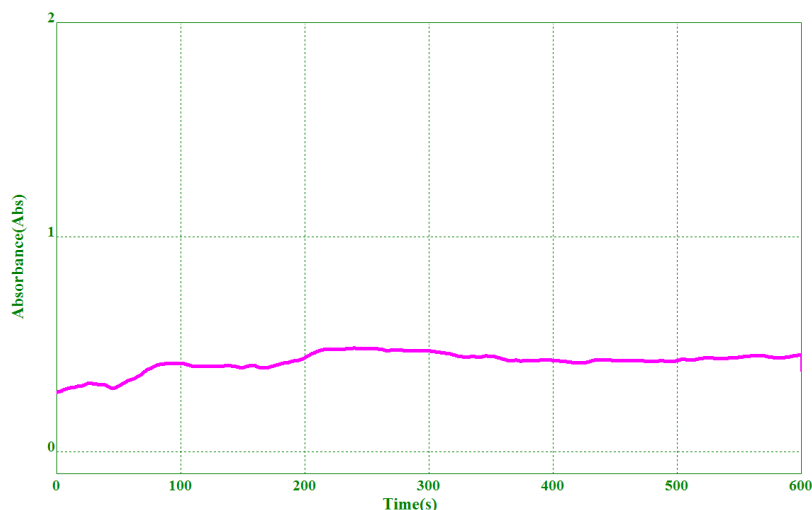


Figura 3.3.31. Evaluarea spectrofotometrică (288 nm) a eliberării compușilor bioactivi din complexul silimarinei cu β -ciclodextrină (în etanol 20%)

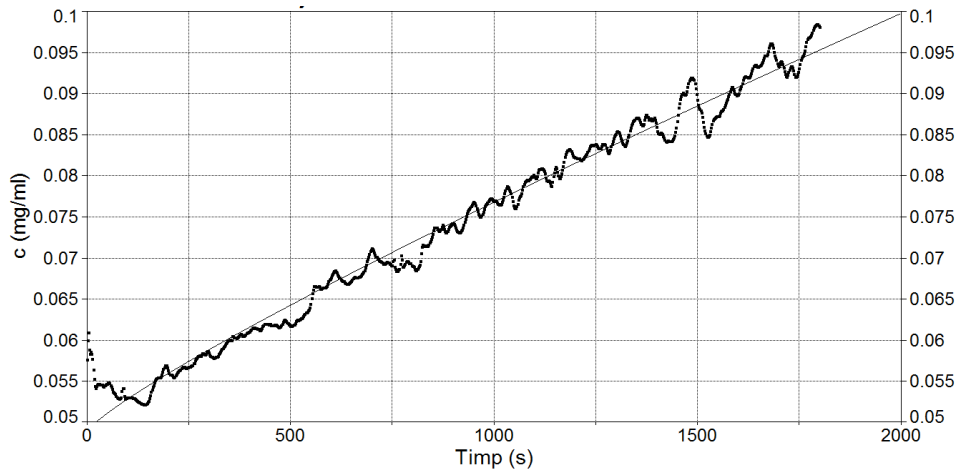


Figura 3.3.32. Evaluarea eliberării controlate a compușilor bioactivi (ca silibină) din complexul silimarinnă/ α -ciclodextrină (Sm_aCD) (în EtOH 20%)

La mărirea concentrației etanolului utilizat ca solvent model de eliberare (60% și 96%), s-a observat o eliberare mai accentuată a silibinei, în special în cazul complexelor cu α CD și β CD, mai puțin cu HP β CD, atât pentru etanol 60% (figura 3.3.33), cât și pentru etanol concentrat (figura 3.3.34).

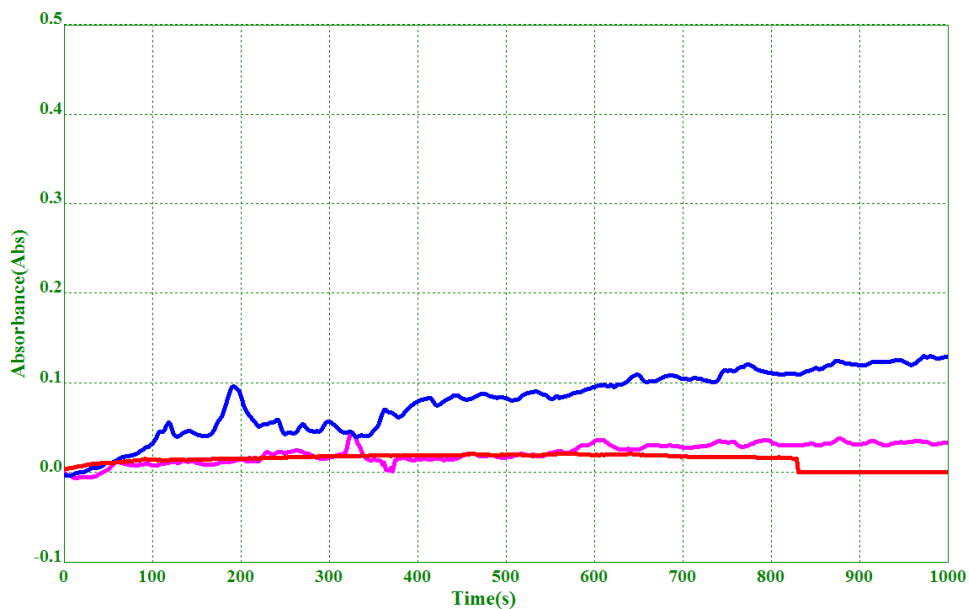


Figura 3.3.33. Evaluarea spectrofotometrică (288 nm) a eliberării silibinei din complexii cu α -ciclodextrină (roșu), β -ciclodextrină (albastru) și HP- β -ciclodextrină (roz) (în etanol 60%)

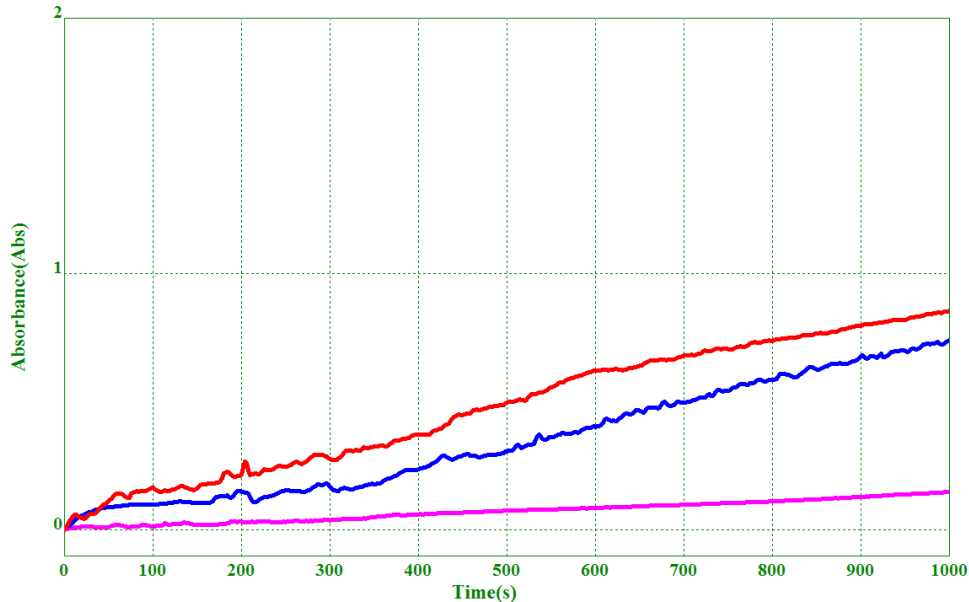


Figura 3.3.34. Evaluarea spectrofotometrică (288 nm) a eliberării silibinei din complexii cu α -ciclodextrină (roșu), β -ciclodextrină (albastru) și HP- β -ciclodextrină (roz) (în etanol 96%)

Cum era de așteptat, concentrațiile de silibină eliberată după 30 de minute au crescut de la 0.015 mg/ml în cazul complexului cu HPbCD la 0.06 mg/ml pentru complexii cu ciclodextrinele naturale în cazul utilizării etanolului 60% (figurile 3.3.35 și 3.3.36) și de la 0.045 mg/ml la 0.35 mg/ml în cazul aceluiași complexi analizați în etanol 96% (figurile 3.3.37 și 3.3.38).

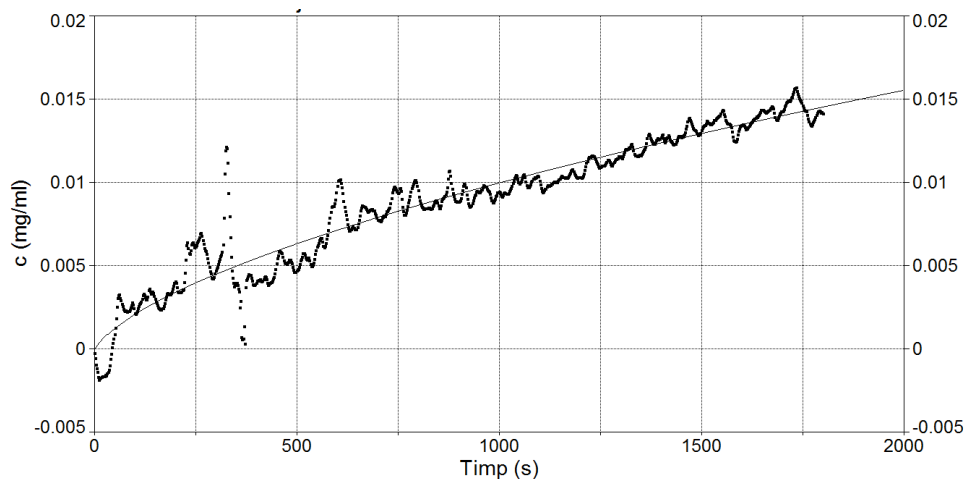


Figura 3.3.35. Evaluarea eliberării controlate a silibinei din complexul silibină/HP- β -ciclodextrină (Sb_HPbCD) (în EtOH 60%)

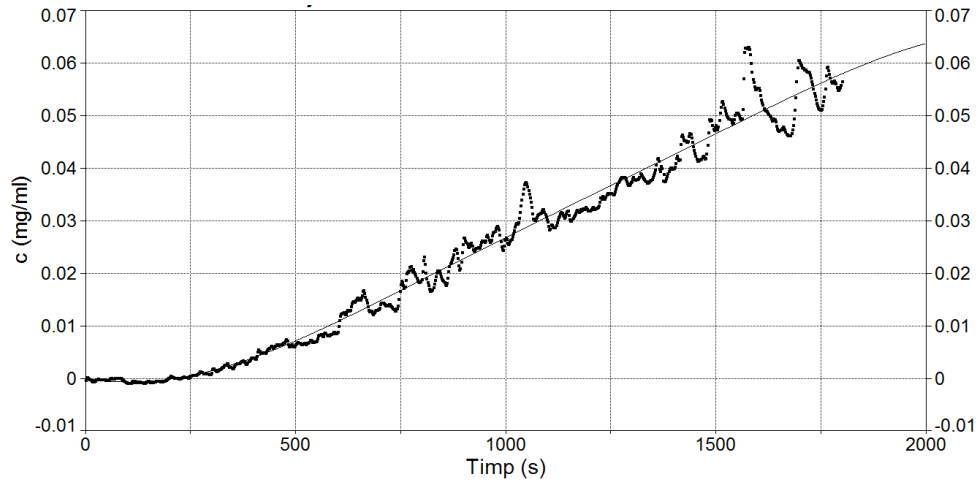


Figura 3.3.36. Evaluarea eliberării controlate a silibinei din complexul silibină/β-ciclodextrină (Sb_bCD) (în EtOH 60%)

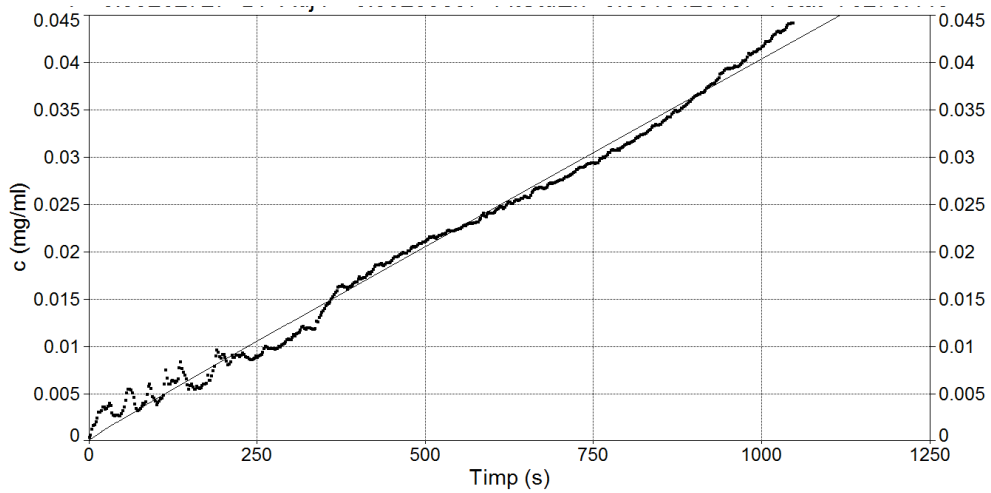


Figura 3.3.37. Evaluarea eliberării controlate a silibinei din complexul silibină/HP-β-ciclodextrină (Sb_HPβCD) (în EtOH 96%)

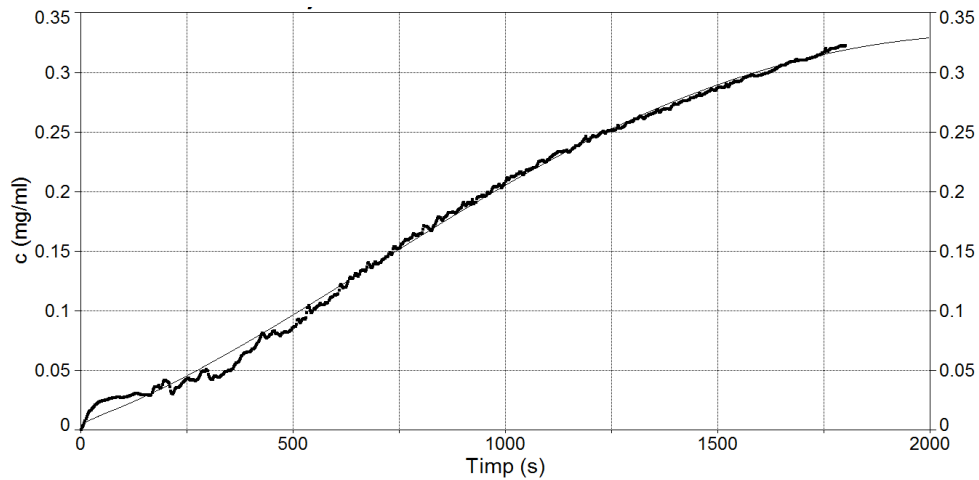


Figura 3.3.38. Evaluarea eliberării controlate a silibinei din complexul silibină/ β -ciclodextrină (Sb_bCD) (în EtOH 96%)

Și în cazul complexelor silimarinei eliberarea compușilor bioactivi a avut aceeași alură ca în cazul silibinei, însă diferențele între complexii cu bCD și HPbCD nu au fost așa de mari. Concentrațiile de compuși bioactivi eliberați au crescut în cazul utilizării etanolului 60% de la 0.15 mg/ml pentru complexul cu HPbCD la 0.2 mg/ml pentru complexul cu bCD și de la 0.16 mg/ml la peste 0.35 mg/ml pentru aceiași complexi (figurile 3.3.39 și 3.3.40).

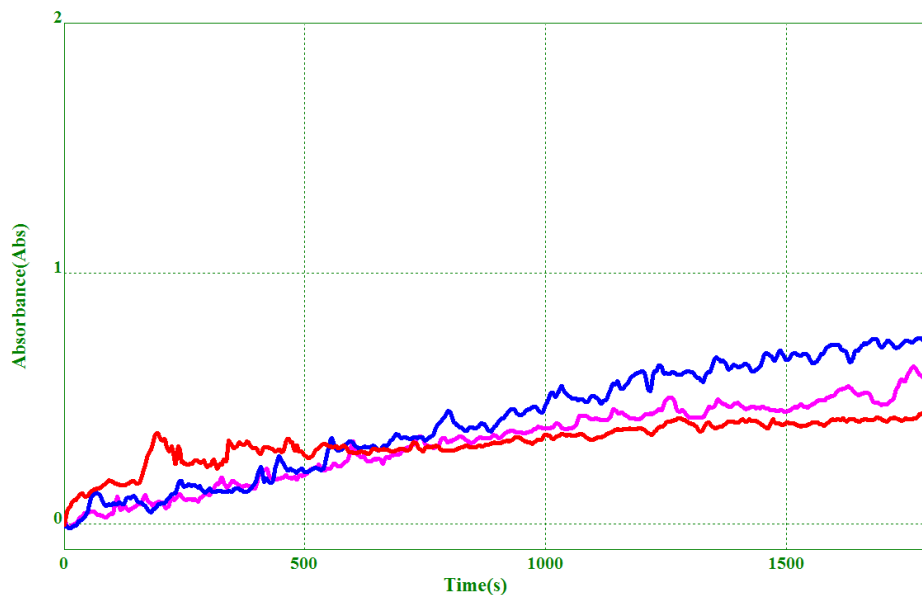


Figura 3.3.39. Evaluarea spectrofotometrică (288 nm) a eliberării compușilor bioactivi din complexii silimarinei cu α -ciclodextrină (roșu), β -ciclodextrină (albastru) și HP- β -ciclodextrină (roz) (în etanol 60%)

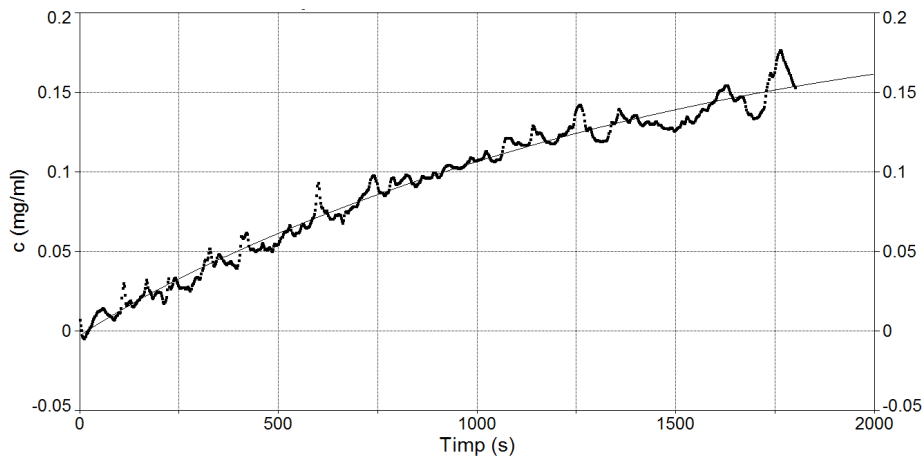


Figura 3.3.40. Evaluarea eliberării controlate a compușilor bioactivi (ca silibină) din complexul silimarină/HP-β-ciclodextrină (Sm_HPbCD) (în EtOH 60%)

În cazul complexelor bCD obținute cu amestecuri de biocompuși din extracte *M. chamomilla* eliberările biocompușilor s-au observat în special în cazul utilizării etanolului de concentrație mai ridicată. Astfel, în cazul complexului cu extract din flori eliberarea biocompușilor s-a realizat la concentrații de până la 0.05 mg/ml pentru etanol 96% și de până la 0.02 mg/ml pentru etanol 60% (figura 3.3.43).

Comportări similare se observă și în cazul extractelor din frunze, rădăcină și tulpină, dar la valori mai mici (până la ~0.02 mg/ml), chiar pentru etanol concentrat (figurile 3.3.41-3.3.44).

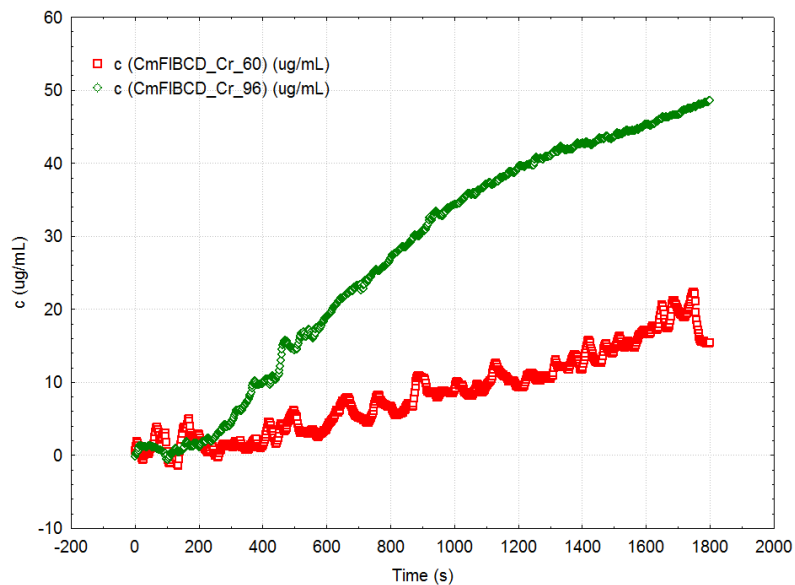


Figura 3.3.41. Evaluarea eliberării controlate a compușilor bioactivi (ca amestec de biocompuși) din complexul extract etanolic din flori de mușețel/β-ciclodextrină (Cm_FL_bCD)

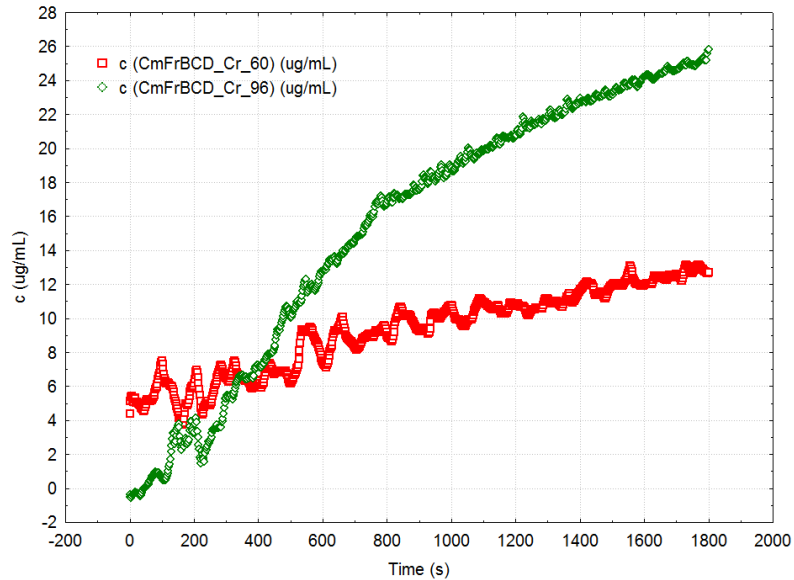


Figura 3.3.42. Evaluarea eliberării controlate a compușilor bioactivi (ca amestec de biocompuși) din complexul extract etanolic din frunze de mușețel/ β -ciclodextrină (Cm_Fr_bCD)

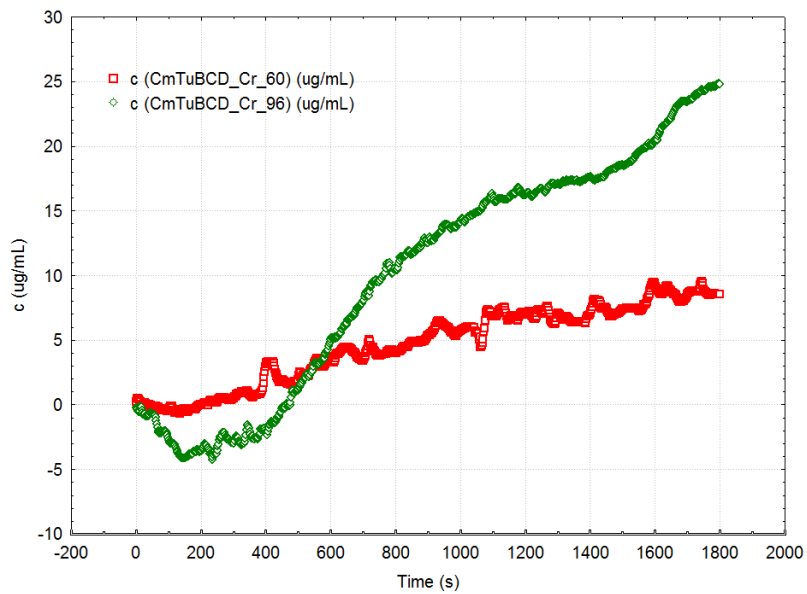


Figura 3.3.43. Evaluarea eliberării controlate a compușilor bioactivi (ca amestec de biocompuși) din complexul extract etanolic din tulpină de mușețel/ β -ciclodextrină (Cm_Tu_bCD)

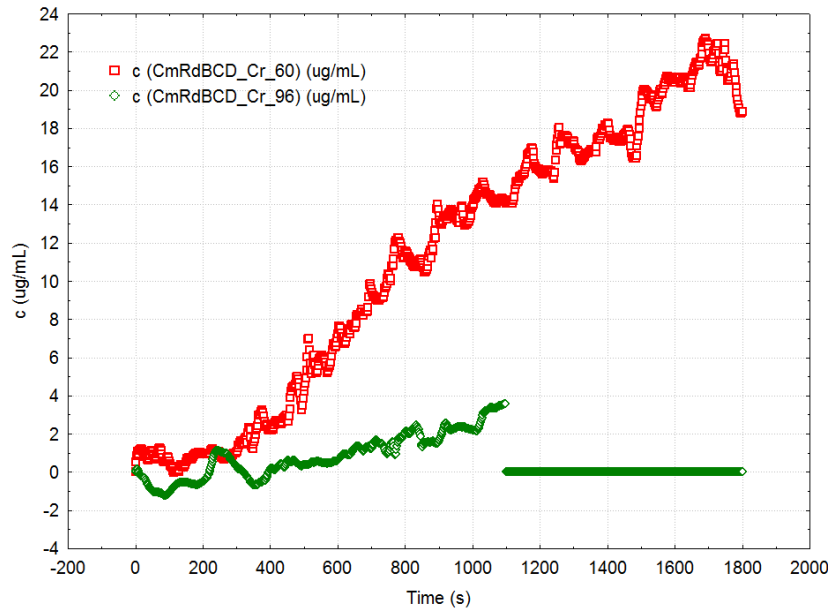


Figura 3.3.44. Evaluarea eliberării controlate a compușilor bioactivi (ca amestec de biocompuși) din complexul extract etanolic din rădăcină de mușețel/ β -ciclodextrină (Cm_Rd_bCD)

3.3.4. Concluzii

În urma studiilor efectuate privind experimentele preliminare de obținere și analiză a nanoparticulelor cu biocompuși și extracte se pot trasa următoarele concluzii principale:

- S-au obținut și analizat cinci complecși biocompuși și amestecuri din *Matricaria chamomilla* și *Silybum marianum* cu β -ciclodextrină;
- S-au obținut și analizat parțial 14 noi micro/nanocapsule tip liposomi multilamelari (lecitină) și unilamelari (amestecuri lipidice artificiale) cu conținut de complecși ai biocompușilor hepatoprotectori potențiali în ciclodextrine;
- Eliberarea controlată a compușilor bioactivi hepatoprotectori potențiali se realizează după o curbă logaritmică mai mult sau mai puțin evidentă; în general eliberarea continuă și după timpul de analiză de 30 de minute, în cazul complecșilor cu ciclodextrine.

4. CONCLUZII FINALE

În urma studiilor efectuate privind obținerea, analiza, nanoîncapsularea și evaluarea proprietăților biocompușilor din specii ale familiei *Compositae* se pot trasa următoarele concluzii principale:

- S-au separat **23 tipuri de biosisteme de tip ulei volatil** din plante aparținând familiei *Compositae* (mușețel, coada șoricelului, anghinare, podbal) cu randamente sub 1%, care au fost analizate prin GC-MS;
- S-au cuantificat compușii din uleiurile volatile obținute, concentrațiile cele mai mari fiind observate în cazul uleiurilor obținute din flori, astfel: **α -bisabololul, bisabolol-oxizii A și B și camazulena** au fost principalii compuși din uleiurile volatile din mușețel și coada șoricelului, iar **β -cubebenul și 2-hexenalul** au fost principalii compuși din uleiurile volatile de anghinare;
- S-au obținut **23 de complecși ulei volatil/ β -ciclodextrină**, cu randamente cuprinse între 63% și 85%, cu un conținut în principii bioactive între 4 și 7.5%; complecșii au fost analizați prin TG, DSC și SEM, demonstrându-se formarea compușilor de incluziune și evaluându-se morfologia și dimensiunile particulelor;
- S-a realizat **recuperarea și cuantificarea biocompușilor** încapsulați în β -ciclodextrină, constatându-se o încapsulare mai avansată a monoterpenelelor, bisabololului, oxizilor acestuia și camazulenei, și o încapsulare mai redusă a sesquiterpenoidelor;
- S-au analizat statistic rezultatele obținute, **analiza statistică multivariată** relevând similitudinea speciilor *Matricaria*, *Achillea* și *Tussilago*, respectiv s-a evidențiat capacitatea de protecție a ciclodextrinelor împotriva acțiunii oxigenului atmosferic, în special asupra sesquiterpenelor labile (cum este cariofilenul);
- S-au evaluat energiile de interacțiune dintre β -ciclodextrină și principalii biocompuși din specii ale familiei *Compositae*, demonstrându-se **capacitatea de încapsulare** pentru compușii valoroși din punct de vedere terapeutic.
- S-au obținut **126 extracte** (56 din *M. chamomilla*, 56 din *A. millefolium* și 14 din semințe de *S. marianum*) în diverși solvenți organici (diverse polarități): metanol, etanol 20-96%, benzen, toluen, hexan, acetonă, acetat de etil, dicloretan, tetrahidrofuran care au fost analizați prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC) și spectrofotometrie;

- S-a realizat **optimizarea obținerii biocompușilor** din *M. chamomilla* prin metoda proiectării factoriale, condițiile optime fiind stabilite pe baza abundenței totale a biocompușilor în urma analizelor HPLC; astfel, condițiile optime de separare sunt: metoda **extracției solid-lichid** în **solvent de polaritate mai ridicată**, **timp de extracție de 3 ore** (extracție repetată) și **reducerea** pe cât posibil a etapei de **concentrare** (la presiune atmosferică);
- **Extractele de *M. chamomilla*** obținute prin metoda optimizată (solid-lichid, în etanol de diverse concentrații) prezintă **concentrații totale** însemnate de **flavonoide** și **flavonozide**, evidențiate de analizele HPLC și UV-VIS, în special quercetină, rutina, crisină și compuși similarinici. Reamintim că probele de *M. chamomilla* obținute prin **hidrodistilare** prezintă un conținut însemnat de **camazulenă**, dar și **bisabololi** și **bisabolol-oxizi**, în special în cazul **florilor**;
- **Extractele** model de *S. marianum* conțin concentrații semnificative de **silibină** în jur de 1,5 mg/g, fapt dovedit de analizele spectrofotometrice;
- Prezența compușilor de tip **flavonoidic** din extractele de *M. chamomilla* (înrudite structural cu flavonolignanii din *S. marianum*), dar și a compușilor **sesquiterpenici volatili** (camazulenă, bisabololi), face ca aceste extracte să prezinte **activitate hepatoprotectoare potențială**, asemănătoare celei cunoscute pentru *S. marianum*;
- S-au obținut și analizat **cinci complecși** biocompuși și amestecuri din *Matricaria chamomilla* și *Silybum marianum* cu **β -ciclodextrină**;
- S-au obținut și analizat parțial **14 noi micro/nanocapsule** tip **liposomi multilamelari** (lecitină) și **unilamelari** (amestecuri lipidice artificiale) cu conținut de complecși ai biocompușilor hepatoprotectori potențiali în ciclodextrine;
- **Eliberarea controlată** a compușilor bioactivi hepatoprotectori potențiali se realizează după o curbă **logaritmică** mai mult sau mai puțin evidentă; în general eliberarea continuă și după timpul de analiză de 30 de minute, în cazul complecșilor cu ciclodextrine.

Rezultatele cercetării experimentale în cadrul prezentei teze de doctorat au fost finalizate prin următoarele lucrări publicate sau prezentate oral sau ca postere în cadrul unor conferințe cu participare internațională sau națională.

Reviste tip ISI

1. N.G. Hădărugă, D.I. Hădărugă, A. Riviș, V. Păunescu, **C.I. Costescu**, A.X. Lupea, - Bioactive Nanoparticles. Essential oil from *Lamiaceae* family plants/ β -Cyclodextrin supramolecular systems, *Revista de Chimie*, **2007**, Vol 58, nr. 10, 909-914, ISSN 0034-7752
2. **C.I. Costescu**, N.G. Hădărugă, D.I. Hădărugă, A. Riviș, A. Ardelean, A.X. Lupea - Bionanomaterials: Synthesis, physico-chemical and multivariate analysis of the Dicotyledonatae and Pinatae essential oil/ β -cyclodextrin nanoparticles, *Revista de Chimie*, **2008**, Vol. 59 , nr. 7, 739-744, ISSN 0034-7752
3. D.I. Hădărugă, N.G. Hădărugă, G.N. Bandur, A. Riviș, **C.I. Costescu**, V.L. Ordodi, A. Ardelean - *Berberis Vulgaris* extract/ β cyclodextrin nanoparticles synthesis and characterization, *Revista de Chimie*, **2010**, Vol 61, nr. 7, 669-675, ISSN 0034-7752
4. **C.I. Costescu**, N.G. Hădărugă, D.I. Hădărugă, Z. Gârban - Cyclodextrins and small unilamellar liposomes: a comparative theoretical approach, *Studia Universitatis Babeş Bolyai Chemia*, **2011**, in press

Reviste tip B+

1. N.G. Hădărugă, D.I. Hădărugă, C. Tatu, A. Gruia, **C.I. Costescu**, A.X. Lupea - Multivariate analysis (PCA) in *Compositae* biocompounds class, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, **2009**, 15(2), 201-210, 15(2), ISSN 1453-1399
2. **C.I. Costescu**, N.G. Hădărugă, D.I. Hădărugă, A.X. Lupea, A. Riviș, D. Pârveu - Antioxidant activity evaluation of some *Matricaria chamomilla* L. Extracts, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, **2008**, 14(2), 417-432, ISSN 1453-1399
3. I. Gogoasă, M. Bragera, D. Bordean, N.G. Hădărugă, A. Riviș, D. Valimirovici, **C.I. Costescu**, O.F. Măruțoiu - Determination of cow milk radioactivity from Banat county, *Buletinul USAMV-CN*, **2006**, 62, 434, ISSN 1454-2382
4. R.T. Cristina, J. Cosoroabă, A. Trif, D. Pârveu, N.G. Hădărugă, E. Dumitrescu, D. Argherie, **C.I. Costescu** - Investigation on *Cypress Spurge (Euphorbia*

5. *Cyparissias* L.) and its activity in the veterinary therapeutics, *Buletinul USAMV-CN*, **2008**, 65(1-2), 358-363, ISSN 145-2382

Manifestări științifice organizate în străinătate

- sustinere lucrare în plen:
 1. **C.I. Costescu**, N.G. Hădărugă, D.I. Hădărugă, A.X. Lupea, A. Riviș, D. Pârvu - Obtaining, characterization, encapsulation and the antioxidant activity evaluation of some *Matricaria chamomilla* L. extracts, 15th Symposium on Analytical and Environmental Problems, SZAB Szeged, Hungary, 22 september **2008**, 367-370, ISBN 978-963-482-903-4

Manifestări științifice cu participare internațională organizate în România

- poster:
 1. D.I. Hădărugă, N.G. Hădărugă, G. Bandur, A.X. Lupea, D. Pârvu, V. Păunescu, C. Tatu, V.L. Ordodi, **C.I. Costescu** – Bioactive nanoparticles (8). Essential oil from *Cupressaceae* family plants/ β -cyclodextrin supramolecular systems, International Symposium „Research and Education in Innovation Era”, 16-18th of November 2006, Topic: Chemistry and application fields, Scientific and technical bulletin of University Aurel Vlaicu Arad, Vol. 11 (XII), **2006**, 46-55
 2. D. Pârvu, A. Riviș, **C.I. Costescu**, T. Trașcă - Physical-chemical characteristics – comparative study of volatile oil from *Petroselinum crispum*, Proceedings of international symposium Integrated Systems for Agrofood Production, Sipa '05, Timișoara – Opportunities of Integrated System for agrofood production, Ed. Orizonturi universitare, Timișoara, **2005**, p.131-134

Contracte de cercetare

- bursă câștigată prin competiție:
 1. *Stabilizarea unor principii bioactive din plante din familia Compositae prin nanoîncapsulare în ciclodesxtrine*, Grant CNCSIS (BD), Cod 149, Ministerul Educației și Cercetării, **2008**
- membre în echipe de cercetare:
 1. *Nanoparticule hepatoprotectoare cu biodisponibilitate crescută*, PN II, Nr. 62072, Ministerul Educației și Cercetării, **2008-2011**
 2. *Cercetări complexe privind obținerea și proprietățile magnetice ale sistemelor de nanoparticule ferimagnetice de $Co\delta Fe_3-\delta O_4$ surfactate/nosurfactate și biocompatibile cu potențiale aplicații în*

terapia cancerului, PNCDI 2/nr. inreg. 3239, Nr. proiect 418/**2007**, Ministerul Educației și Cercetării, **2007-2010**

3. *Testarea eficacității acaricide a unor extracte din plante provenite din flora spontană a României*, Grant CNCSIS, Ministerul Educației și Cercetării, **2006-2008**
4. *Obținerea unor nanocompozite/nanocristale cu aplicații în biotehnologie, agricultură, alimentație, sănătate și protecția mediului*, CEEEX P-CD 18/10.10.2005, Ministerul Educației și Cercetării, **2005-2007**

BIBLIOGRAFIE

1. Brewster, M.E.; Loftsson, T., Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, *59*, 645-666.
2. Simpson, S.L.J.; Quirino, J.P.; Terabe, S., On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis. Fundamentals and applications, *Journal of Chromatography A* **2008**, *1184*, 504-541.
3. Boldescu, V.; Kacso, I.; Borodi, G.; Bratu, I.; Duca, G., Physicochemical characterization of sanguinarine-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin binary and ternary systems, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2008**, *62*, 143-148.
4. Joguparthi, V.; Anderson, B.D., Effect of Cyclodextrin Complexation on the Liposome Permeability of a Model Hydrophobic Weak Acid, *Pharmaceutical Research* **2008**, *25*, 2505-2515.
5. Hadaruga, N.G.; Hadaruga, D.I.; Bandur, G.; Lupea, A.X., *The Complexation of alpha- and beta-Cyclodextrin with Odorant Compounds*. In: *Proceedings of the 5th International Symposium Young People and the Multidisciplinary Research*, Timisoara, 2003, 494-501.
6. Hadaruga, N.G.; Hadaruga, D.I.; Bandur, G.; Lupea, A.X.; Tatu, C.; Ordodi, V.L., *Bioactive Nanoparticles (4). The Complexation of the Essential Oils from the Lamiaceae Family Plants with beta-Cyclodextrin*. In: *Proceedings of the 6th International Symposium Young People and the Multidisciplinary Research*, Timisoara, 2004, 635-644.
7. Hadaruga, D.I.; Hadaruga, N.G.; Bandur, G.; Lupea, A.X.; Tatu, C.; Ordodi, V.L., *Bioactive Nanoparticles (5). Thermal Stability of the Oleic Acid / alpha- and beta-Cyclodextrin Complexes*. In: *Proceedings of the 6th International Symposium Young People and the Multidisciplinary Research*, Timisoara, 2004, 645-652.
8. Hadaruga, N.G.; Hadaruga, D.I.; Paunescu, V.; Tatu, C.; Ordodi, V.L.; Bandur, G.; Lupea, A.X., *Multivariate Analysis in the Essential Oil / beta-Cyclodextrin Complex Class*. In: *Proceedings of the 8th International Conference ISIRR*, Szeged, Hungary, 2005, 581-591.
9. Hadaruga, N.G.; Hadaruga, D.I.; Lupea, A.X.; Paunescu, V.; Tatu, C., *Bioactive Nanoparticles (7). Essential Oil from Apiaceae and Pinaceae Family Plants/beta-Cyclodextrin Supramolecular Systems*, *Revista de Chimie* **2005**, *56*, 876-882.
10. Cyr, B., *Methods and Therapeutic Compositions Comprising Plant Extracts for the Treatment of Cancer*, **2009**, United States Patent Application No 20090004302, 2009.
11. Hadaruga, N.G.; Hadaruga, D.I.; Paunescu, V.; Tatu, C.; Ordodi, L.; Bandur, G.; Lupea, A.X., *Bioactive Nanoparticles (6). Thermal Stability of Linoleic Acid / alpha- and beta-Cyclodextrin Complexes*, *Food Chemistry* **2006**, *99*, 500-508.
12. Fundueanu, G.; Constantin, M.; Mihai, D.; Bortolotti, F.; Cortesi, R.; Ascenzi, P.; Menegatti, E., *Pullulan-Cyclodextrin Microspheres. A Chromatographic Approach for the Evaluation of the Drug-Cyclodextrin Interactions and the Determination of the Drug Release Profiles*, *Journal of Chromatography B* **2003**, *791*, 407-419.

13. Szejtli, J., *Cyclodextrin Technology*, Kluwer Academic Publishers, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht - Boston - London, 1988.
14. Szente, L.; Szejtli, J., Cyclodextrins as food ingredients, *Trends in Food Science & Technology* **2004**, *15*, 137-142.
15. Vassileva, A.; Burhan, N.; Beschkov, V.; Spasova, D.; Radoevska, S.; Ivanova, V.; Tonkova, A., Cyclodextrin Glucanotransferase Production by Free and Agar Gel Immobilized Cells of *Bacillus circulans* ATCC 21783, *Process Biochemistry* **2003**, *38*, 1585-1591.
16. Gong, Y.; Xiang, Y.; Yue, B.; Xue, G.; Bradshaw, J.S.; Lee, H.K.; Lee, M.L., Application of Diaza-18-crown-6-capped beta-Cyclodextrin Bonded Silica Particles as Chiral Stationary Phases for Ultrahigh Pressure Capillary Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography A* **2003**, *1002*, 63-70.
17. Male, K.B.; Luong, J.H.T., Chiral Analysis of Neurotransmitters using Cyclodextrin-Modified Capillary Electrophoresis Equipped with Microfabricated Interdigitated Electrode, *Journal of Chromatography A* **2003**, *1003*, 167-178.
18. Guo, L.; Lin, S.J.; Yang, Y.F.; Qi, L.; Wang, M.X.; Chen, Y., Fast Enantioseparation of Arylglycine Amides by Capillary Electrophoresis with Highly Sulfated-beta-cyclodextrin as a Chiral Selector, *Journal of Chromatography A* **2003**, *998*, 221-228.
19. Berlicki, L.; Rudzinska, E.; Kafarski, P., Enantiodifferentiation of Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids with alpha- and beta-Cyclodextrins, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 1535-1539.
20. Schurig, V.; Schmidt, R., Extraordinary Chiral Discrimination in Inclusion Gas Chromatography. Thermodynamics of Enantioselectivity between a Racemic Perfluorodiether and a Modified gamma-Cyclodextrin, *Journal of Chromatography A* **2003**, *1000*, .
21. Lee, K.-P.; Choi, S.-L.; Ryu, E.-N.; Ryoo, J.J.; Park, J.H.; Kim, Y.; Hyun, M.H., Preparation and Characterization of Cyclodextrin Polymer and Its High-Performance Liquid-Chromatography Stationary Phase, *Analytical Sciences* **2002**, *18*, 31-34.
22. Ruderisch, A.; Pfeiffer, J.; Schurig, V., Mixed Chiral Stationary Phase Containing Modified Resorcinarene and beta-Cyclodextrin Selectors Bonded to a Polysiloxane for Enantioselective Gas Chromatography, *Journal of Chromatography A* **2003**, *994*, .
23. Groom, C.A.; Halasz, A.; Paquet, L.; D'Cruz, P.; Hawari, J., Cyclodextrin-assisted Capillary Electrophoresis for Determination of the Cyclic Nitramine Explosives RDX, HMX and CL-20. Comparison with High-performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography A* **2003**, *999*, 17-22.
24. Chen, H.-C.; Ding, W.-H., Analysis of Naphthalenesulfonate Compounds by Cyclodextrin-mediated Capillary Electrophoresis with Sample Stacking, *Journal of Chromatography A* **2003**, *996*, 205-212.
25. Culha, M.; Lavrik, N.V.; Schell, F.M.; Tipple, C.A.; Sepaniak, M.J., Characterization of Volatile, Hydrophobic Cyclodextrin Derivatives as Thin Films for Sensor Applications, *Sensors and Actuators B* **2003**, *92*, 171-180.
26. Salem, I.I.; Steffan, G.; Duzgunes, N., Efficacy of Clofazimine-Modified Cyclodextrin Against *Mycobacterium avium* Complex in Human Macrophages, *International Journal of Pharmaceutics* **2003**, *260*, 105-114.

27. Hergert, L.A.; Escandar, G.M., Spectrofluorimetric Study of the beta-Cyclodextrin-Ibuprofen Complex and Determination of Ibuprofen in Pharmaceutical Preparations and Serum, *Talanta* **2003**, *60*, 235-246.
28. Kinnarinen, T.; Jarho, P.; Järvinen, K.; Järvinen, T., Pulmonary Deposition of a Budesonide/gamma-Cyclodextrin Complex *in vitro*, *Journal of Controlled Release* **2003**, *90*, 197-205.
29. Gazpio, C.; Sánchez, M.; Zornoza, A.; Martín, C.; Martínez-Ohárriz, C.; Vélaz, I., A Fluorimetric Study of Pindolol and its Complexes with Cyclodextrins, *Talanta* **2003**, *60*, 477-482.
30. Zhenming, D.; Xiuping, L.; Guomei, Z.; Shaomin, S.; Jinghao, P., Study on Vitamin K3-Cyclodextrin Inclusion Complex and Analytical Application, *Spectrochimica Acta Part A* **2003**, *59*, 2073-2079.
31. Melo, P.S.; Justo, G.Z.; de-Azevedo, M.B.M.; Durán, N.; Haun, M., Violacein and Its beta-Cyclodextrin Complexes Induce Apoptosis and Differentiation in HL60 Cells, *Toxicology* **2003**, *186*, 217-225.
32. Mura, P.; Maestrelli, F.; Cirri, M., Ternary Systems of Naproxen with Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin and Aminoacids, *International Journal of Pharmaceutics* **2003**, *260*, 293-302.
33. Martín, L.; León, A.; Olives, A.I.; del-Castillo, B.; Martín, M.A., Spectrofluorimetric Determination of Stoichiometry and Association Constants of the Complexes of Harmane and Harmine with beta-Cyclodextrin and Chemically Modified beta-Cyclodextrins, *Talanta* **2003**, *60*, 493-503.
34. Wilson, D.; Perlson, L.; Breslow, R., Helical Templating of Oligopeptides by Cyclodextrin Dimers, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2003**, *11*, 2649-2653.
35. Cerchiara, T.; Luppi, B.; Bigucci, F.; Zecchi, V., Effect of Chitosan on Progesterone Release from Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin Complexes, *International Journal of Pharmaceutic* **2003**, *258*, 209-215.
36. Sinswat, P.; Tengamnuay, P., Enhancing Effect of Chitosan on Nasal Absorption of Salmon Calcitonin in Rats: Comparison with Hydroxypropyl- and Dimethyl-beta-cyclodextrins, *International Journal of Pharmaceutics* **2003**, *257*, 15-22.
37. Goubert, I.; Dahout, C.; Sémon, E.; Guichard, E.; Le-Quéré, J.-L.; Voilley, A., Competitive Binding of Aroma Compounds by beta-Cyclodextrin, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5916-5922.
38. Liu, X.D.; Furuta, T.; Yoshii, H.; Linko, P.; Coumans, W.J., Cyclodextrin encapsulation to prevent the loss of l-menthol and its retention during drying, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64*, 1608-1613.
39. Hanna, K.; de-Brauer, C.; Germain, P., Solubilization of the Neutral and Charged Forms of 2,4,6-Trichlorophenol by beta-Cyclodextrin, Methyl-beta-cyclodextrin and Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in Water, *Journal of Hazardous Materials B* **2003**, *100*, 109-116.
40. Manolikas, M.K.; Sawant, M.R., Study of Solubility of Isoproturon by its Complexation with beta-Cyclodextrin, *Chemosphere* **2003**, *51*, 811-816.
41. Ikeda, A.; Hatano, T.; Konishi, T.; Kikuchi, J.-i.; Shinkai, S., Host-guest Complexation Effect of 2,3,6-Tri-O-methyl-beta-cyclodextrin on a C60-Porphyrin Light-to-photocurrent Conversion System, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 3537-3540.

42. Zhang, H.R.; Wei, Y.S.; Jin, W.J.; Liu, C.S., Investigation of Six-membered Carbocyclic Compounds as a Molecular Switch Block of Room Temperature Phosphorescence in Nondeoxygenated beta-Cyclodextrin Solution, *Analytica Chimica Acta* **2003**, *484*, 111-120.
43. Lawtrakul, L.; Viernstein, H.; Wolschann, P., Molecular Dynamics Simulations of beta-Cyclodextrin in Aqueous Solution, *International Journal of Pharmaceutics* **2003**, *256*, 33-41.
44. Lino, A.C.S.; Takahata, Y.; Jaime, C., alpha- and beta-Cyclodextrin Complexes with n-Alkyl Carboxylic Acids and n-Alkyl p-Hydroxy Benzoates. A Molecular Mechanics Study of 1:1 and 1:2 Associations, *J. Mol. Struct. (Theochem)* **2002**, *594*, 207-213.
45. Ganzera, M.; Egger, C.; Zidorn, C.; Stuppner, H., Quantitative analysis of flavonoids and phenolic acids in *Arnica montana* L. by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Analytica Chimica Acta* **2008**, *614*, 196-200.
46. Gupta, A.K.; Misra, N., Hepatoprotective Activity of Aqueous Ethanolic Extract of *Chamomile capitula* in Paracetamol Intoxicated Albino Rats, *American Journal of Pharmacology and Toxicology* **2006**, *1*, 17-20.
47. Ciulei, I.; Grigorescu, E.; Stănescu, U., *Plante Medicinale. Fitochimie si Fitoterapie. Tratat de Farmacognozie*, Vol. 1, Editura Medicala, Bucuresti, 1993.
48. Dewick, P.M., 6. *Alkaloids*, In: *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, 2002, p. 291-403.
49. Saluk-Juszczak, J.; Pawlaczyk, I.; Olas, B.; Kolodziejczyk, J.; Ponczek, M.; Nowak, P.; Tsirigotis-Woloszczak, M.; Wachowicz, B.; Gancarz, R., The effect of polyphenolic-polysaccharide conjugates from selected medicinal plants of *Asteraceae* family on the peroxynitrite-induced changes in blood platelet proteins, *International Journal of Biological Macromolecules* **2010**, *47*, 700-705.
50. Tavares, W.d.S.; Cruz, I.; Petacci, F.; Júnior, S.L.d.A.; Freitas, S.d.S.; Zanuncio, J.C.; Serrão, J.E., Potential use of *Asteraceae* extracts to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and selectivity to their parasitoids *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae), *Industrial Crops and Products* **2009**, *30*, 384-388.
51. Hadaruga, D.I.; Hadaruga, N.G., *Compusi odoranti si aromatizanti*, Ed. Politehnica, Timisoara, 2003.
52. Hadaruga, D.I., *Compusi odoranti-aromatizanti naturali si de sinteza*, ArtPress, Timisoara, 2009.
53. Hadaruga, N.G.; Hadaruga, D.I., *Controlul calitatii produselor alimentare de origine vegetala*, ArtPress, Timisoara, 2008.
54. Hadaruga, N.G.; Hadaruga, D.I., *Arome naturale: arome din reactia Maillard, bioarome si arome încapsulate*, Ed. Augusta, Timisoara, 2004.
55. Ceausescu, V.E.; Rădoias, G.; Cădăriu, T., *Odorante si Aromatizante. Chimie, Tehnologie, Aplicatii*, Ed. Tehnica, Bucuresti, 1988.
56. ***, *Techniques for Analyzing Food Aroma*, Ed. Marsili, R., Marcel Dekker, Inc., New York - Basel - Hong Kong, 1997.
57. Amirghofran, Z.; Azadbakh, M.; Karimi, M.H., Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants, *Journal of Ethnopharmacology* **2000**, *72*, 167-172.

58. Babenko, N.A.; Shakhova, E.G., Effects of *Chamomilla recutita* flavonoids on age-related liver sphingolipid turnover in rats, *Experimental Gerontology* **2006**, *41*, 32-39.
59. Sajjadi, S.E.; Mehregan, I., Volatile constituents of flowers and leaves of *Anthemis hyalina*, *Chemistry of Natural Compounds* **2006**, *42*, 531-533.
60. Chyau, C.-C.; Tsai, S.-Y.; Yang, J.-H.; Weng, C.-C.; Han, C.-M.; Shih, C.-C.; Mau, J.-L., The essential oil of *Glossogyne tenuifolia*, *Food Chemistry* **2007**, *100*, 808-812.
61. Paolini, J.; Barboni, T.; Desjobert, J.-M.; Djabou, N.; Muselli, A.; Costa, J., Chemical composition, intraspecies variation and seasonal variation in essential oils of *Calendula arvensis* L., *Biochemical Systematics and Ecology* **2010**, *38*, 865-874.
62. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M., Biological effects of essential oils – A review, *Food and Chemical Toxicology* **2008**, *46*, 446-475.
63. Repcák, M.; Krausová, T., Phenolic glucosides in the course of ligulate flower development in diploid and tetraploid *Matricaria chamomilla*, *Food Chemistry* **2009**, *116*, 19-22.
64. Mohammad, R.; Hamid, S.; An, A.; Norbert, D.K.; Patrick, V.D., Effects of planting date and seedling age on agro-morphological characteristics, essential oil content and composition of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) grown in Belgium, *Industrial Crops and Products* **2010**, *31*, 145-152.
65. Heuskin, S.; Godin, B.; Leroy, P.; Capella, Q.; Wathelet, J.-P.; Verheggen, F.; Haubruge, E.; Lognay, G., Fast gas chromatography characterisation of purified semiochemicals from essential oils of *Matricaria chamomilla* L. (Asteraceae) and *Nepeta cataria* L. (Lamiaceae), **2009**, *1216*, 2768-2775.
66. Tolouee, M.; Alinezhad, S.; Saberi, R.; Eslamifar, A.; Zad, S.J.; Jaimand, K.; Taeb, J.; Rezaee, M.-B.; Kawachi, M.; Shams-Ghahfarokhi, M.; Razzaghi-Abyaneh, M., Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem, *International Journal of Food Microbiology* **2010**, *139*, 127-133.
67. Fonseca, F.N.; Tavares, M.F.M.; Horváth, C., Capillary electrochromatography of selected phenolic compounds of *Chamomilla recutita*, *Journal of Chromatography A* **2007**, *1154*, 390-399.
68. Kováčik, J.; Grúz, J.; Backor, M.; Tomko, J.; Strnad, M.; Repcák, M., Phenolic compounds composition and physiological attributes of *Matricaria chamomilla* grown in copper excess, *Environmental and Experimental Botany* **2008**, *62*, 145-152.
69. Giorgi, A.; Mingozzi, M.; Madeo, M.; Speranza, G.; Cocucci, M., Effect of nitrogen starvation on the phenolic metabolism and antioxidant properties of yarrow (*Achillea collina* Becker ex Rchb.), *Food Chemistry* **2009**, *114*, 204-211.
70. Tuberoso, C.I.G.; Montoro, P.; Piacente, S.; Corona, G.; Deiana, M.; Dessi, M.A.; Pizza, C.; Cabras, P., Flavonoid characterization and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts from *Achillea ligustica* All., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2009**, *50*, 440-448.
71. Rahimmalek, M.; Tabatabaei, B.E.S.; Etemadi, N.; Goli, S.A.H.; Arzani, A.; Zeinali, H., Essential oil variation among and within six *Achillea* species transferred from different ecological regions in Iran to the field conditions, *Industrial Crops and Products* **2009**, *29*, 348-355.

72. Kocevar, N.; Glavac, I.; Injac, R.; Kreft, S., Comparison of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography for determination of flavonoids in *Achillea millefolium*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2008**, *46*, 609-614.
73. Santoro, G.F.; Cardoso, M.G.; Guimarães, L.G.L.; Mendonça, L.Z.; Soares, M.J., *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes, *Experimental Parasitology* **2007**, *116*, 283-290.
74. Bocevaska, M.; Sovová, H., Supercritical CO₂ extraction of essential oil from yarrow, *Journal of Supercritical Fluids* **2007**, *40*, 360-367.
75. Gião, M.S.; Leitão, I.; Pereira, A.; Borges, A.B.; Guedes, C.J.; Fernandes, J.C.; Belo, L.; Santos-Silva, A.; Hogg, T.A.; Pintado, M.E.; Malcata, F.X., Plant aqueous extracts: Antioxidant capacity via haemolysis and bacteriophage P22 protection, *Food Control* **2010**, *21*, 633-638.
76. Lutz, M.; Henriquez, C.; Escobar, M., Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.), raw and cooked, *Journal of Food Composition and Analysis* **2011**, *24*, 49-54.
77. Lombardo, S.; Pandino, G.; Mauromicale, G.; Knödler, M.; Carle, R.; Schieber, A., Influence of genotype, harvest time and plant part on polyphenolic composition of globe artichoke [*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori], *Food Chemistry* **2010**, *119*, 1175-1181.
78. Pandino, G.; Lombardo, S.; Mauromicale, G.; Williamson, G., Profile of polyphenols and phenolic acids in bracts and receptacles of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) germplasm, *Journal of Food Composition and Analysis* **2011**, *24*, 148-153.
79. Fratianni, F.; Tucci, M.; Palma, M.D.; Pepe, R.; Nazzaro, F., Polyphenolic composition in different parts of some cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori), *Food Chemistry* **2007**, *104*, 1282-1286.
80. Pandino, G.; Lombardo, S.; Mauromicale, G.; Williamson, G., Phenolic acids and flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild *Cynara cardunculus* L. genotypes, *Food Chemistry* **2011**, *126*, 417-422.
81. Kukic, J.; Popovic, V.; Petrovic, S.; Mucaji, P.; Ciric, A.; Stojkovic, D.; Sokovic, M., Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts, *Food Chemistry* **2008**, *107*, 861-868.
82. Falleh, H.; Ksouri, R.; Chaieb, K.; Karray-Bouraoui, N.; Trabelsi, N.; Boulaaba, M.; Abdelly, C., Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities, *C. R. Biologies* **2008**, *331*, 372-379.
83. Lattanzio, V.; Kroon, P.A.; Linsalata, V.; Cardinali, A., Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients, *Journal of Functional Foods* **2009**, *1*, 131-144.
84. Coinu, R.; Carta, S.; Urgeghe, P.P.; Mulinacci, N.; Pinelli, P.; Franconi, F.; Romani, A., Dose-effect study on the antioxidant properties of leaves and outer bracts of extracts obtained from *Violetto di Toscana* artichoke, *Food Chemistry* **2007**, *101*, 524-531.
85. Mehmetçik, G.; Özdemirler, G.; Koçak-Toker, N.; Cvikbas, U.; Uysal, M., Effect of pretreatment with artichoke extract on carbon tetrachloride-induced liver injury and oxidative stress, *Experimental and Toxicologic Pathology* **2008**, *60*, 475-480.

86. Aydemir, T., Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, *Food Chemistry* **2004**, *87*, 59-67.
87. Portis, E.; Acquadro, A.; Longo, A.M.G.; Mauro, R.; Mauromicale, G.; Lanteri, S., Potentiality of *Cynara cardunculus* L. as energy crop, *Special Abstracts / Journal of Biotechnology* **2010**, *150S*, S165-S166.
88. ***, <http://www.cerasus.ro/potbal.html>, 2011.
89. ***, <http://www.medicultau.com/plante-medicinale/plante-medicinale/podbal.php>, 2011.
90. ***, <http://terapienaturist.blogspot.com/2011/07/armurariul-un-miracol-pentru-bolile-de.html>, 2011.
91. Wang, K.; Zhang, H.; Shen, L.; Du, Q.; Li, J., Rapid separation and characterization of active flavonolignans of *Silybum marianum* by ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2010**, *53*, 1053-1057.
92. Aghazadeh, S.; Amini, R.; Yazdanparast, R.; Ghaffari, S.H., Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of *Silybum marianum* in treatment of experimental steatohepatitis, *Experimental and Toxicologic Pathology* **2010**, .
93. Toklu, H.Z.; Akbay, T.T.; Velioglu-Ogunc, A.; Ercan, F.; Gedik, N.; Keyer-Uysal, M.; Sener, G., Silymarin, the antioxidant component of *Silybum marianum*, prevents sepsis-induced acute lung and brain injury, *Journal of Surgical Research* **2008**, *145*, 214-222.
94. Iosio, T.; Voinovich, D.; Perissutti, B.; Serdoz, F.; Hasa, D.; Grabnar, I.; Dall'Acqua, S.; Zara, G.P.; Muntoni, E.; Pinto, J.F., Oral bioavailability of silymarin phytocomplex formulated as self-emulsifying pellets, *Phytomedicine* **2011**, *18*, 505-512.
95. Subramaniam, S.; Vaughn, K.; Carrier, D.J.; Clausen, E.C., Pretreatment of milk thistle seed to increase the silymarin yield: An alternative to petroleum ether defatting, *Bioresource Technology* **2008**, *99*, 2501-2506.
96. El-Samaligy, M.S.; Afifi, N.N.; Mahmoud, E.A., Evaluation of hybrid liposomes-encapsulated silymarin regarding physical stability and in vivo performance, *International Journal of Pharmaceutics* **2006**, *319*, 121-129.
97. Basiglio, C.L.; Pozzi, E.J.S.; Mottino, A.D.; Roma, M.G., Differential effects of silymarin and its active component silibinin on plasma membrane stability and hepatocellular lysis, *Chemico-Biological Interactions* **2009**, *179*, 297-303.
98. Tsai, M.-J.; Liao, J.-F.; Lin, D.-Y.; Huang, M.-C.; Liou, D.-Y.; Yang, H.-C.; Lee, H.-J.; Chen, Y.-T.; Chi, C.-W.; Huang, W.-C.; Cheng, H., Silymarin protects spinal cord and cortical cells against oxidative stress and lipopolysaccharide stimulation, *Neurochemistry International* **2010**, *57*, 867-875.
99. Sánchez-Sampedro, M.A.; Peláez, R.; Corchete, P., An arabinogalactan protein isolated from medium of cell suspension cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn, *Carbohydrate Polymers* **2008**, *71*, 634-639.
100. Sánchez-Sampedro, M.A.; Fernández-Tárrago, J.; Corchete, P., Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn, *Journal of Biotechnology* **2005**, *119*, 60-69.

101. Sánchez-Sampedro, M.A.; Fernández-Tárrago, J.; Corchete, P., Some common signal transduction events are not necessary for the elicitor-induced accumulation of silymarin in cell cultures of *Silybum marianum*, *Journal of Plant Physiology* **2008**, *165*, 1466-1473.
102. Andrzejewska, J.; Sadowska, K.; Mielcarek, S., Effect of sowing date and rate on the yield and flavonolignan content of the fruits of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) grown on light soil in a moderate climate, *Industrial Crops and Products* **2011**, *33*, 462-468.
103. Thies, C., Microcapsules as drug delivery devices, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **1983**, *8*, 335-383.
104. ***, *Carbohydrate Chemistry*, Ed. Boons, G.-J., Blackie Academic & Professional, London - Weinheim - New York - Tokyo - Melbourne, 1998.
105. Popa, A.; Luca, C.; Mihaita, G., *Compusi de incluziune*, Ed. Stiintifica, Bucuresti, 1992.
106. Romberger, M.L., Cyclodextrins, *Agro-Food-Industry Hi-Tech.* **1997**, *8*, 2-5.
107. Venema, F., *Mono - Functionalised Cyclodextrins as Building Blocks for Supramolecular Systems*, Katholieke Universiteit Nijmegen, Nijmegen, 1996.
108. Versic, R.J., *Flavor Encapsulation: An Overview*, In: *Flavor Encapsulation*, American Chemical Society, Washington, D.C, 1988, p. 1-16.
109. Cramer, F., *Cyclodextrin - A Paradigmatic Model*. In: *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, Budapest, 1982, D. Reidel Publ. Co., Dordrecht, 3-14.
110. Hadaruga, N.G., Contributii Privind Protejarea si Eliberarea Controlata A Principiilor Bioactive, **2005**, .
111. Hadaruga, N.G.; Hadaruga, D.I.; Misca, C.D.; Jianu, I., *Gama-Cyclodextrin. Molecular Aspects and Its Flavor Interactions (III)*. In: *Zilele Academice Timisoara*, Timisoara, 2001, 155-160.
112. Yalpani, M., A Survey of Recent Advances in Selective Chemical and Enzymic Polysaccharide Modifications, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 2957-3020.
113. Kano, K., *Selectivities in Cyclodextrin Chemistry*, In: *Bioorganic Chemistry Frontiers*, Springer - Verlag, Berlin, 1993, p. 1-23.
114. Crittenden, R.G.; Playne, M.J., Production, Properties and Applications of Food - Grade Oligosaccharides, *Trends Food Sci. & Technol.* **1996**, *7*, 353-361.
115. ***, *Microencapsulation. Methods and Industrial Applications*, Ed. Benita, S., Marcel Dekker, Inc., New York - Basel - Hong Kong, 1996.
116. ***, *Les Arômes Alimentaires*, Ed. Multon, H.R.a.J.-L., TEC & DOC - LAVOISIER; APRIA, Paris, 1992.
117. Loftsson, T.; Kristmundsdóttir, T., *Microcapsules Containing Water - Soluble Cyclodextrin Inclusion Complexes of Water - Insoluble Drugs*, In: *Polymeric Delivery Systems. Properties and Applications*, American Chemical Society, Washington, 1993, p. 168-189.
118. Hadaruga, N.G.; Hadaruga, D.I.; Misca, C.; Jianu, I., *Beta-Cyclodextrin. Molecular Aspects and Their Flavor Interactions (II)*. In: *Conferinta Nationala de Biotehnologie si Ingineria Mediului*, Târgoviste,, 2000, 31-37.
119. Kim, H.-H.Y.; Baianu, I.C., Novel Liposome Microencapsulation Techniques for Food Applications, *Trends Food Sci. & Technol.* **1991**, *2*, 55-61.
120. Loukas, Y.L.; Gregoriadis, G., *Drugs-in-Cyclodextrins-in-Liposomes: A Novel Approach for the Reduction of Drug Leakage from Liposomes*. In: *The 24th*

- International Symposium on "Controlled Release of Bioactive Materials*, Stockholm, 1997, Controlled Release Society, Inc., 204-205.
121. Saarinen-Savolainen, P.; Järvinen, T.; Taipale, H.; Urtti, A., *New Drug Release Test for Liposome*. In: *The 24th International Symposium on "Controlled Release of Bioactive Materials*, Stockholm, 1997, Controlled Release Society, Inc., 1041-1042.
 122. Nii, T.; Takamura, A.; Mohri, K.; Ishii, F., Factors Affecting Physicochemical Properties of Liposomes Prepared with Hydrogenated Purified Egg Yolk Lecithins by the Microencapsulation Vesicle Method, *Colloids & Surfaces B* **2002**, *27*, 323-332.
 123. Sakurai, H.; Kawabata, K.; Sakurai, F.; Nakagawa, S.; Mizuguchi, H., Innate immune response induced by gene delivery vectors, *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *354*, 9-15.
 124. Bordi, F.; Cametti, C.; Sennato, S., Does a cluster phase in polyion-liposome colloidal suspensions exist? An integrated experimental overview, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2007**, *306*, 102-110.
 125. Castro, M.D.L.d.; Priego-Capote, F., Ultrasound-assisted preparation of liquid samples, *Talanta* **2007**, *72*, 321-334.
 126. Lee, K.Y.; Yuk, S.H., Polymeric protein delivery systems, *Progress in Polymer Science* **2007**, *32*, 669-697.
 127. Edwards, K.A.; Baeumner, A.J., Analysis of liposomes, *Talanta* **2006**, *68*, 1432-1441.
 128. Bilek, G.; Kremser, L.; Blaas, D.; Kenndler, E., Analysis of liposomes by capillary electrophoresis and their use as carrier in electrokinetic chromatography, *Journal of Chromatography B* **2006**, *841*, 38-51.
 129. Edwards, K.A.; Baeumner, A.J., Liposomes in analyses, *Talanta* **2006**, *68*, 1421-1431.
 130. Bramwell, V.W.; Eyles, J.E.; Alpar, H.O., Particulate delivery systems for biodefense subunit vaccines, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, *57*, 1247-1265.
 131. Ebrahim, S.; Peyman, G.A.; Lee, P.J., Applications of Liposomes in Ophthalmology, *Survey of Ophthalmology* **2005**, *50*, 167-182.
 132. Jaracz, S.; Chen, J.; Kuznetsova, L.V.; Ojima, I., Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, *13*, 5043-5054.
 133. Ruel-Gariepy, E.; Leroux, J.-C., In situ-forming hydrogels-review of temperature-sensitive systems, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, *58*, 409-426.
 134. Drasar, P.; Moravcova, J., Recent advances in analysis of Chinese medical plants and traditional medicines, *Journal of Chromatography B* **2004**, *812*, 3-21.
 135. Derycke, A.S.L.; de-Witte, P.A.M., Liposomes for photodynamic therapy, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, *56*, 17-30.
 136. Grabielle-Madelmont, C.; Lesieur, S.; Ollivon, M., Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography, *Journal of Biochemical & Biophysical Methods* **2003**, *56*, 189-217.
 137. Puglisi, G.; Fresta, M.; Mazzone, G.; Furneri, P.M.; Tempera, G., Formulation Parameters of Fluoroquinolone-Loaded Liposomes and *in vitro* Antimicrobial Activity, *International Journal of Pharmaceutics* **1995**, *118*, 65-76.

138. Saravolac, E.G.; Kournikakis, B.; Gorton, L.; Wong, J.P., Effect of Liposome-Encapsulation on Immunomodulating and Antiviral Activities of Interferon-gamma, *Antiviral Research* **1996**, *29*, 199-207.
139. Yen, G.-C.; Liu, M.-L., *Antioxidant and Prooxidant Activity of Xylose - Lysine Maillard Reaction Product*, In: *The Maillard Reaction in Foods and Medicine*, O'Brien, J.N., H.E.; Crabbe, M.J.C.; Ames, J.M., ((Ed.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998, p. 231-236.
140. Li, R.H., Materials for immunoisolated cell transplantation, *Advanced Drug Delivery Reviews* **1998**, *33*, 87-109.
141. Rihova, B., Immunocompatibility and Biocompatibility of Cell Delivery Systems, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2000**, *42*, 65-80.
142. Gombotz, W.R.; Wee, S.F., Protein Release from Alginate Matrices, *Advanced Drug Delivery Reviews* **1998**, *31*, 267-285.
143. Bollag, D.M.; Rozycki, M.D.; Edelstein, S.J., *Protein Methods*, Wiley - Liss, New York - Chichester - Brisbane - Toronto - Singapore, 1996.
144. González-Siso, M.I.; Lang, E.; Carrenõ-Gómez, B.; Becerra, M.; Otero-Espinar, F.; Blanco-Méndez, J., Enzyme Encapsulation on Chitosan Microbeads, *Process Biochemistry* **1997**, *32*, 211-216.
145. DeGroot, A.R.; Neufeld, R.J., Encapsulation of Urease in Alginate Beads and Protection from α -Chymotrypsin with Chitosan Membranes, *Enzyme and Microbial Technology* **2001**, *29*, 321-327.
146. Elçin, Y.M., Encapsulation of Urease Enzyme in Xanthan-Alginate Spheres, *Biomaterials* **1995**, *16*, 1157-1161.
147. Hearn, E.; Neufeld, R.J., Poly(methylene co-guanidine) Coated Alginate as an Encapsulation Matrix for Urease, *Process Biochemistry* **2000**, *35*, 1253-1260.
148. Lemoine, D.; Wauters, F.; Bouchend'homme, S.; Pr eat, V., Preparation and Characterization of Alginate Microspheres Containing a Model Antigen, *International Journal of Pharmaceutics* **1998**, *176*, 9-19.
149. Murtas, G.; Kuruma, Y.; Bianchini, P.; Diaspro, A.; Luisi, P.L., Protein synthesis in liposomes with a minimal set of enzymes, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2007**, *363*, 12-17.
150. Heurtault, B.; Saulnier, P.; Pech, B.; Benoit, J.P.; Proust, J.E., Interfacial Stability of Lipid Nanocapsules, *Colloids & Surfaces B* **2003**, *30*, 225-235.
151. Shah, J.C.; Sadhale, Y.; Chilukuri, D.M., Cubic Phase Gels as Drug Delivery Systems, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *47*, 229-250.
152. Winterhalter, M.; Hilty, C.; Bezrukov, S.M.; Nardin, C.; Meier, W.; Fournier, D., Controlling Membrane Permeability with Bacterial Porins: Application to Encapsulated Enzymes, *Talanta* **2001**, *55*, 965-971.
153. Riezman, H., The Long and Short of Fatty Acid Synthesis, *Cell* **2007**, *130*, 587-588.
154. Zeisberger, S.M.; Odermatt, B.; Marty, C.; Zehnder-Fjallman, A.H.M.; Ballmer-Hofer, K.; Schwendener, R.A., Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach, *British Journal of Cancer* **2006**, *95*, 272-281.
155. Engler, O.B.; Schwendener, R.A.; Dai, W.J.; Wolk, B.; Pichler, W.; Moradpour, D.; Brunner, T.; Cerny, A., A liposomal peptide vaccine inducing CD8+ T cells in HLA-A2.1 transgenic mice, which recognise human cells encoding hepatitis C virus (HCV) proteins, *Vaccine* **2004**, *23*, 58-68.

156. Daemen, T.; Hoedemakers, R.; Stormb, G.; Scherphof, G.L., Opportunities in Targeted Drug Delivery to Kupffer cells: Delivery of Immunomodulators to Kupffer Cells-activation of Tumoricidal Properties, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, *17*, 21-30.
157. Vogel, A., *Vogel's Textbook of Quantitative Chemical Analysis*, Pearson Education Ltd., Essex, 2000.
158. Nussinovitch, A., *Hydrocolloid Applications. Gum Technology in the Food and Other Industries*, BLACKIE Academic & Professional, London - Weinheim - New York - Tokyo - Melbourne - Madras, 1997.
159. ***, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry®*, 6th Edition, *Electronic Release*, Wiley-VCH & AND CompLex Publ. Tech., ver. 3.5, Chichester, New York-Brisbane-Toronto-Singapore, 2002.
160. Kobayashi, T.; Aomatsu, Y.; Kanehiro, H.; Hisanaga, M.; Nakajima, Y., Protection of NOD Islet Isograft From Autoimmune Destruction by Agarose Microencapsulation, *Transplantation Proceedings* **2003**, *35*, 484-485.
161. Selim, K.; Tsimidou, M.; Biliaderis, C.G., Kinetic Studies of Degradation of Saffron Carotenoids Encapsulated in Amorphous Polymer Matrices, *Food Chemistry* **2000**, *71*, 199-206.
162. Boadi, D.K.; Neufeld, R.J., Encapsulation of Tannase for the Hydrolysis of Tea Tannins, *Enzyme and Microbial Technology* **2001**, *28*, 590-595.
163. Martinac, A.; Filipovic-Grcic, J.; Zorc, M.B.B.; Voinovich, D.; Jalsenjak, I., Gemfibrozil Encapsulation and Release from Microspheres and Macromolecular Conjugates, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2002**, *17*, 207-216.
164. Bakan, J.A., *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*, Ed. Lachman, L., Lieberman, H.A., Kanig, J.L., Marcel Dekker, New York, 1986.
165. Floy, B.J.; Visor, G.C.; Sander, L.M., *Polymeric Delivery Systems*, ACS Symposium Series, Vol. 520, American Chemical Society, Washington, DC, 1993.
166. Scher, H.B., *Pesticide Chemistry-Human Welfare and the Environment*, Vol. 4, Pergamon Press, Oxford, UK, 1983.
167. Jyothi, N.V.N.; Sakarkar, S.N.; Kumar, G.Y.S.; Prasanna, M., Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency: A Review, *Journal of microencapsulation* **2010**, *27*, 187-197.
168. Dietrich, K.; Herma, H.; Nastke, R.; Bonatz, E.; Teige, W., Amino resin microcapsules, *Acta Polymerica* **1989**, *40*, 243-251.
169. Brown, E.N.; Kessler, M.R.; Sottos, N.R.; White, S.R., *In situ* poly(urea-formaldehyde) microencapsulation of dicyclopentadiene, *Journal of Microencapsulation* **2003**, 1-14.
170. Brenner, J., The essence of spray-dried flavors, *Perfumer and Flavorist* **1983**, *40*, 886-888.
171. Lehmann, K., *Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1992.
172. Goodwin, J.T.; Somerville, G.R., Microencapsulation by physical methods, *Chemtech* **1974**, *4*, 623-626.
173. Sparks, R.E.; Jacobs, I.C.; Mason, N.S., *Polymeric Delivery Systems*. In: *ACS Symposium Series 520*, Washington, DC, 1993, 145-153.
174. Schubert, A.; Noszticzius, Z.; Patonay, G.; Haskó, T., *Transfer of Organic Molecules Through Aqueous Layers Mediated by CD's and CD - Derivatives*. In: *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, Budapest, 1982, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 195-204.

175. ***, *Flavor Encapsulation*, ACS Symposium Series, Ed. Risch, S.J., Reineccius, G.A., Vol. 370, American Chemical Society, Washington DC, 1988.
176. Connors, K.A., *Application of a Stoichiometric Model of Cyclodextrin Complex Formation*. In: *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, Budapest, 1982, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 163-172.
177. Ohara, M., *The Complex Formation of Cyclodextrins and Related (1-4)-Alfa-D-Glucans as Revealed by the Spin Labeling Techniques*. In: *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, Budapest, 1982, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 173-180.
178. Kajtár, M.; Horváth-Toró, C.; Kuthi, É.; Szejtli, J., *A Simple Rule for Predicting Circular Dichroism Induced in Aromatic Guests by Cyclodextrin Hosts in Inclusion Complexes*. In: *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, Budapest, 1982, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 181-194.
179. Drabowicz, J.; Micolajczyk, M., *Resolution of Chiral Sulfinyl Compounds via Beta-Cyclodextrin Inclusion Complexes*. In: *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, Budapest, 1982, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 205-216.
180. Saenger, W., *Structure Aspects of Cyclodextrin Inclusion Compounds*. In: *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, Budapest, 1982, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht, 141-150.
181. ***, *Spectrophotometry & Spectrofluorimetry. A Practical Approach*, The Practical Approach Series, Ed. Bashford, D.A.H.a.C.L., IRL Press, Oxford - Washington DC, 1988.
182. Sztatisz, J.; Gál, S.; Komives, J.; Stadler-Szoke, Á.; Szejtli, J., *Thermoanalytical Investigations of Cyclodextrin Inclusion Compounds*. In: *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, Budapest, 1982, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht.
183. Kernóczi, L.; Tétényi, P.; Mincsovics, E.; Zámbo, I.; Tyihák, E.; Szejtli, J., *Thermofractography of Cyclodextrin - Complexes by Classical and Overpressured TLC Techniques*. In: *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, Budapest, 1982, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht.
184. ***, *Calorimetry and Thermal Analysis of Polymers*, Ed. Mathot, V.B.F., Hanser Publ., Munich - Vienna - New York, 1994.
185. Simon, K.; Stadler, Á.; Hange, F., *Investigation of Cyclodextrin Complexes by X - Ray Powder Diffraction*. In: *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrin*, Budapest, 1982, D. Riedel Publ. Co., Dordrecht.
186. Hänsel, R.; Schulz, J.; Pelter, A., *Structure of silybin: synthetic studies*, *J. Chem. Soc.* **1972**, 195-196.
187. Wagner, H.; Hörhammer, L.; Münster, R., *On the chemistry of silymarin (silybin), the active principle of the fruits from *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Carduus marianus* L.), *Arzneimittelforschung* **1968**, *18*, 688-696.*
188. **Costescu C.I.**, Hădărugă N.G., Hădărugă D.I., Lupea AX., Riviş A., Pârvu D., "Antioxidant activity evaluation of some *Matricaria chamomilla* L. Extracts", *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, Timișoara, România, *14*(2), **2008**, 417-432
189. **Costescu C.I.**, Hădărugă N.G., Hădărugă D.I., Lupea A.X., Riviş A., Pârvu D., "Obtaining, characterization, encapsulation and the antioxidant activity

- evaluation of some *Matricaria chamomilla* L. extracts", 15th Symposium on Analytical and Environmental Problems, SZAB Szeged, Hungary. Proceeding: 15th Symposium on Analytical and Environmental Problems, SZAB Szeged, Hungary, ISBN 978-963-482-903-4, **2008**, 367-371
190. **Costescu C.I.**, Hădărugă N.G., Hădărugă D.I., Riviş A., Ardelean A., Lupea A.X., "Bionanomaterials: Synthesis, physico-chemical and multivariate analysis of the Dicotyledonatae and Pinatae essential oil/ β -cyclodextrin nanoparticles", *Revista de Chimie*, Vol. 59 , nr. 7, **2008**, 739-744
191. **Costescu C.I.**, Hădărugă N.G., Hădărugă D.I., Gârban Z., "Cyclodextrins and small unilamellar liposomes: a comparative theoretical approach", *Studia Universitatis Babeş Bolyai Chemia*, **2011**, in press
192. Hădărugă D.I., Hădărugă N.G., Bandur G.N., Riviş A., **Costescu C.I.**, Ordodi V.L., Ardelean A., "Berberis Vulgaris extract/ β cyclodextrin nanoparticles synthesis and characterization", *Revista de Chimie*, Vol 61, nr. 7, **2010**, 669-675
193. Hădărugă N.G., Hădărugă D.I., Riviş A., Păunescu V., **Costescu C.I.**, Lupea A.X., "Bioactive Nanoparticles. Essential oil from *Lamiaceae* family plants/ β -Cyclodextrin supramolecular systems", *Revista de Chimie*, Vol 58, nr. 10, **2007**, 909-914
194. Hădărugă N.G., Hădărugă D.I., Tatu C., Gruia A., **Costescu C.I.**, Lupea A.X. , "Multivariate analysis (PCA) in *Compositae* biocompounds class", *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, Timișoara, România, 15(2), **2009**, 201-210

ANEXE

Anexa A.3.1. Cromatogramele din analiza GC-MS pentru uleiurile volatile din familia *Compositae*

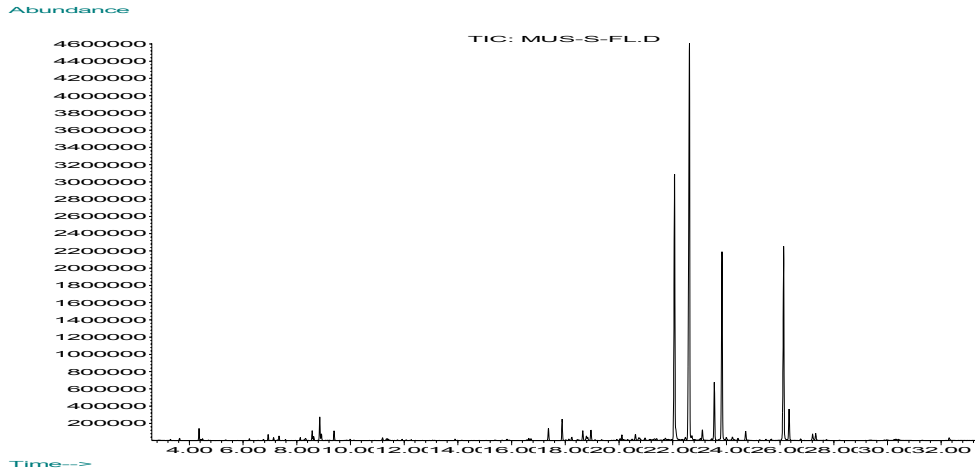


Figura A.3.1.1. Cromatograma din analiza GC-MS pentru uleiul volatil din flori de mușețel (Salonta)

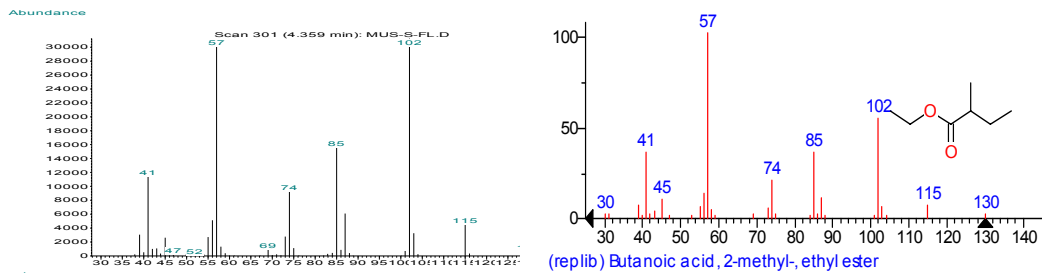


Figura A.3.1.2. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru 2-metilbutanoat de etil

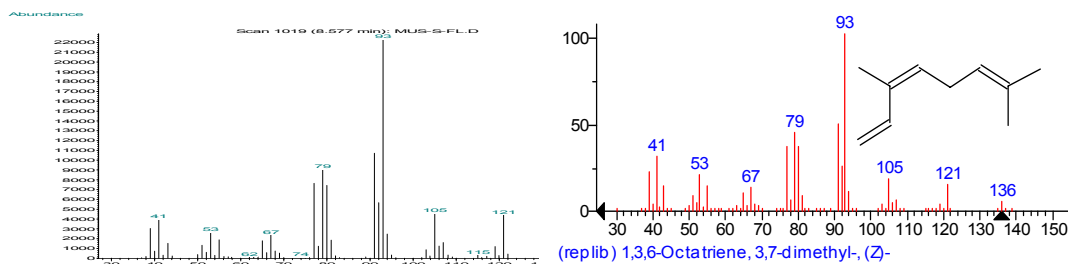


Figura A.3.1.3. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru ocimen

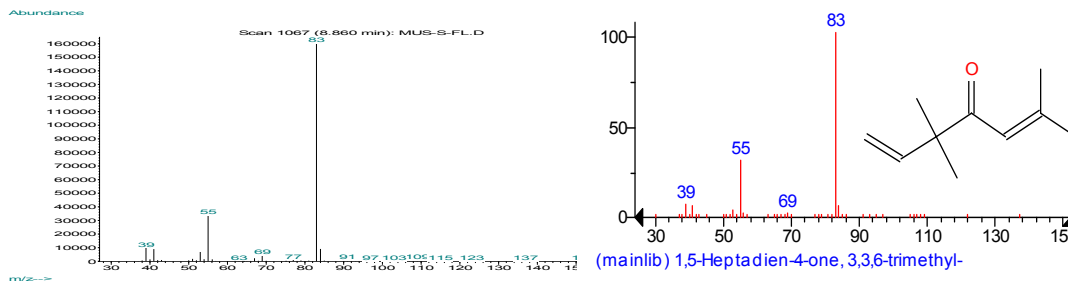


Figura A.3.1.4. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru artemisia cetonă

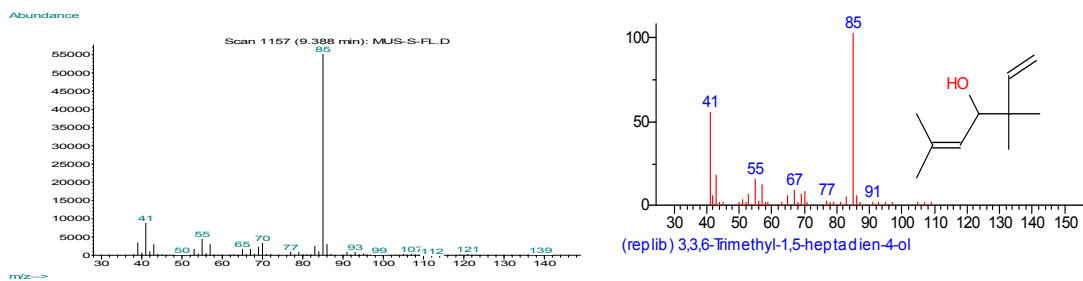


Figura A.3.1.5. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru artemisia alcool

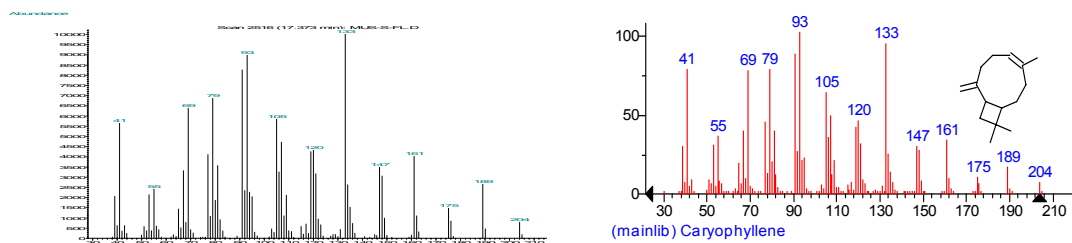


Figura A.3.1.6. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru cariofilen

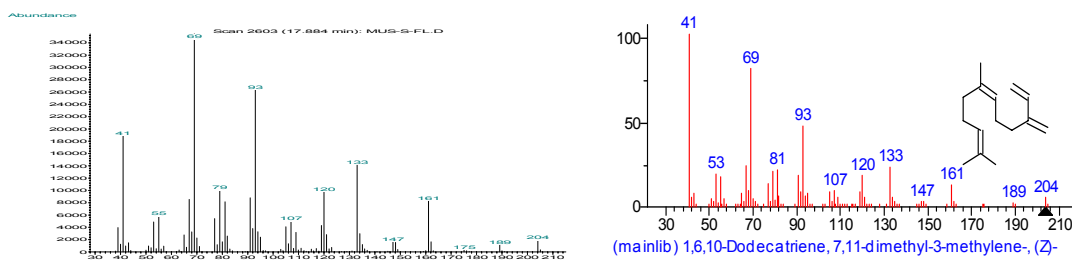


Figura A.3.1.7. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru β-Farnesen

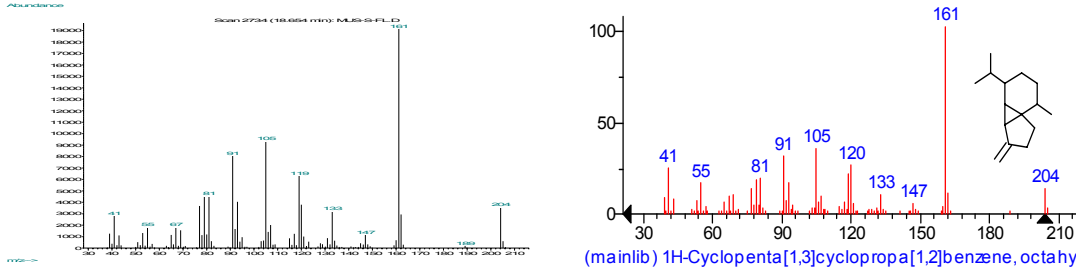


Figura A.3.1.8. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru β -Cubeben

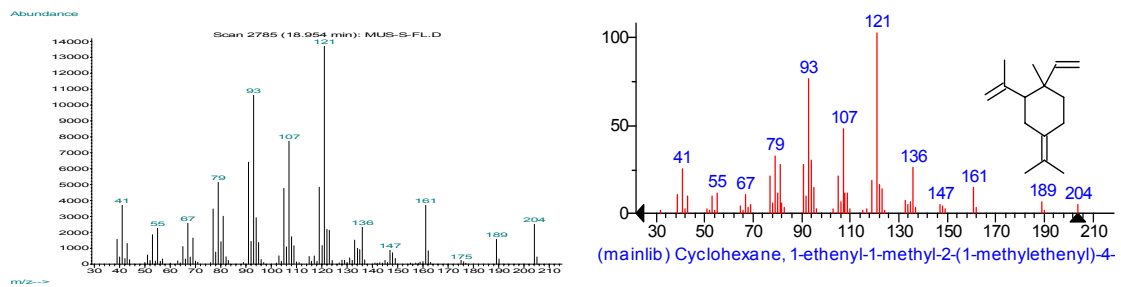


Figura A.3.1.9. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru elixen

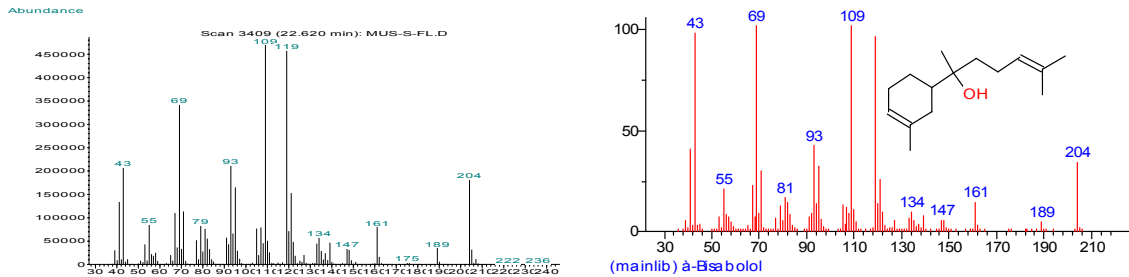


Figura A.3.1.10. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru α -bisabolol

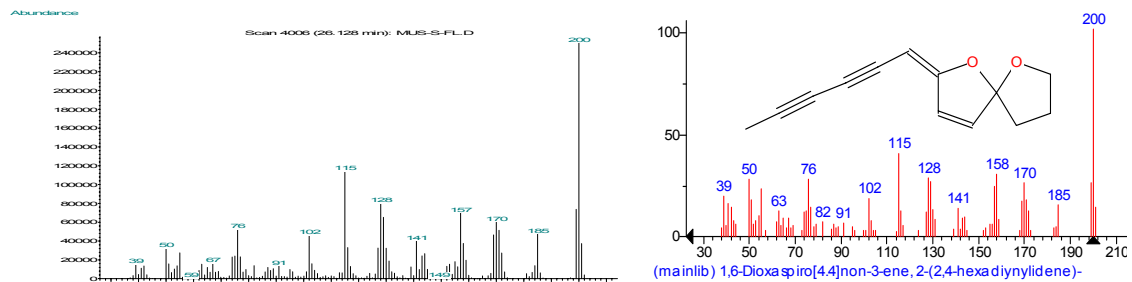


Figura A.3.1.11. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru 1,6-dioxaspiro[4.4]non-3-ene, 2-(2,4-hexadiynylidene)-

CS1. Coada șoricelului Salonta - flori

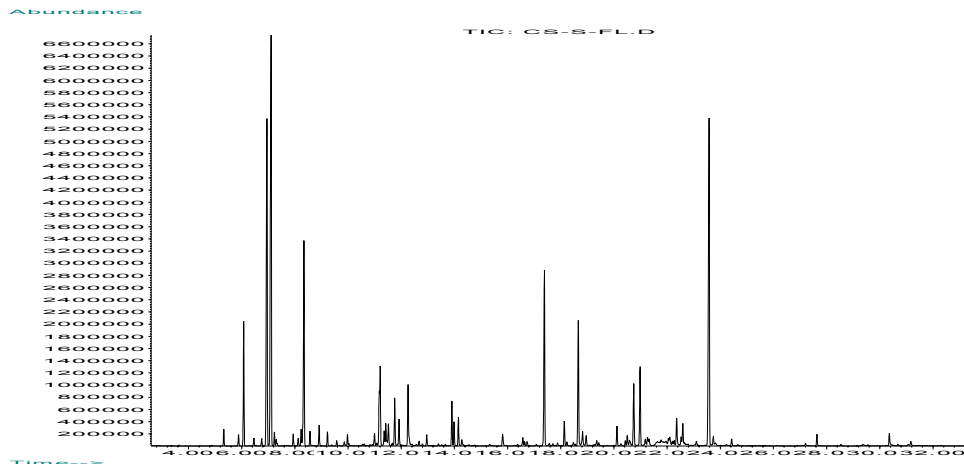


Figura A.3.1.12. Cromatograma din analiza GC-MS pentru uleiul volatil din flori de coada șoricelului (Salonta)

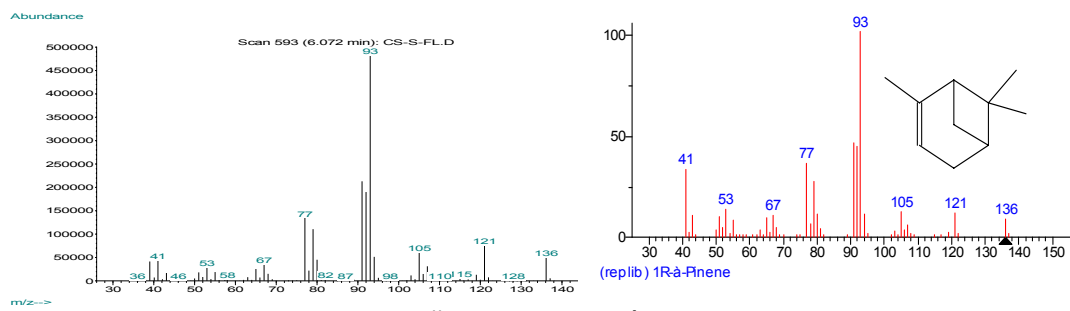


Figura A.3.1.13. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru α -pinen

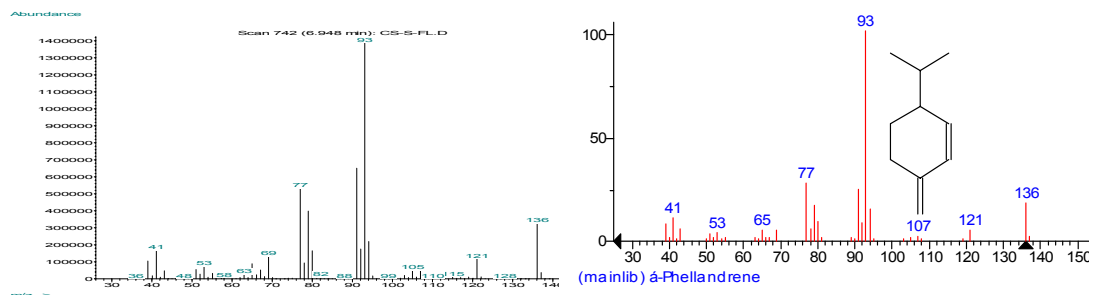


Figura A.3.1.14. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru β -phellandrene

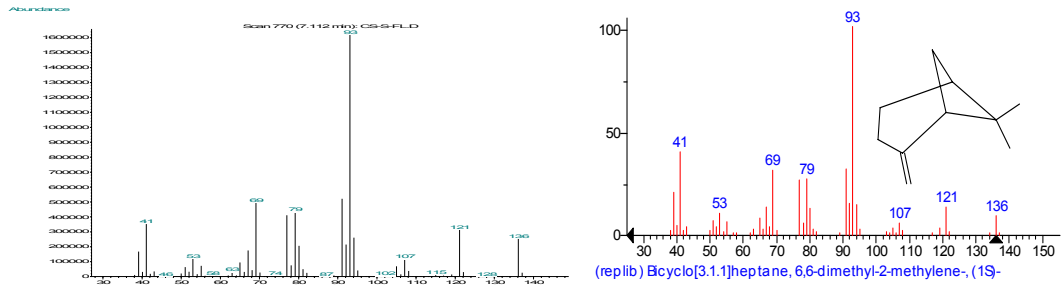


Figura A.3.1.15. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru β -pinen

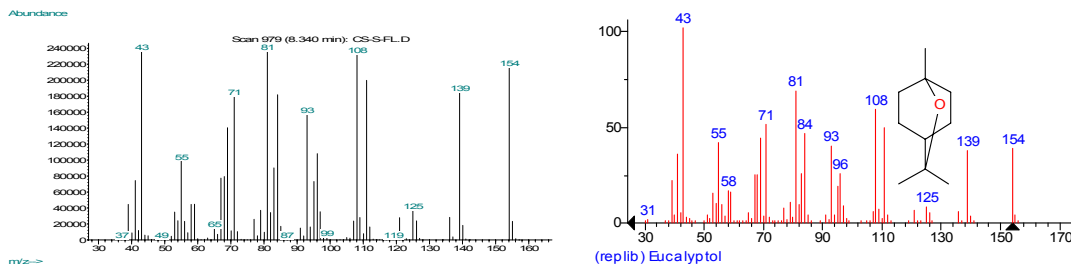


Figura A.3.1.16. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru eucaliptol

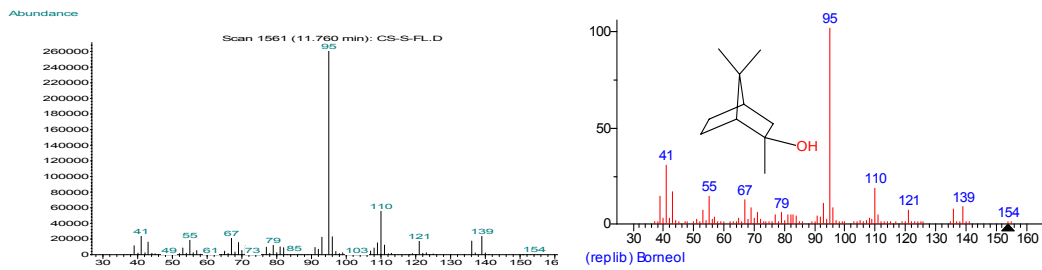


Figura A.3.1.17. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru borneol

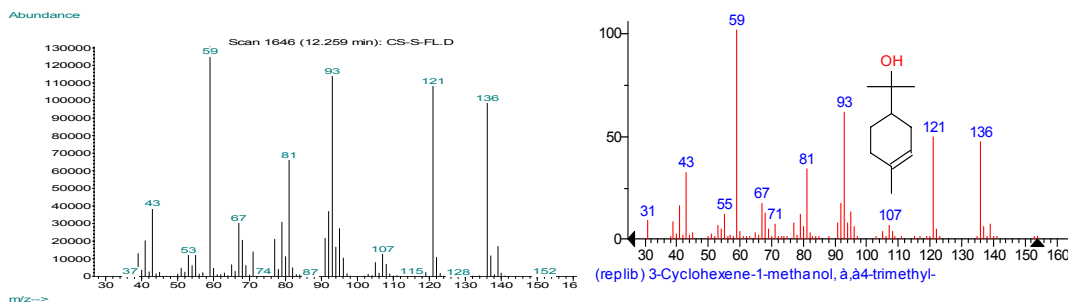


Figura A.3.1.18. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru α -terpineol

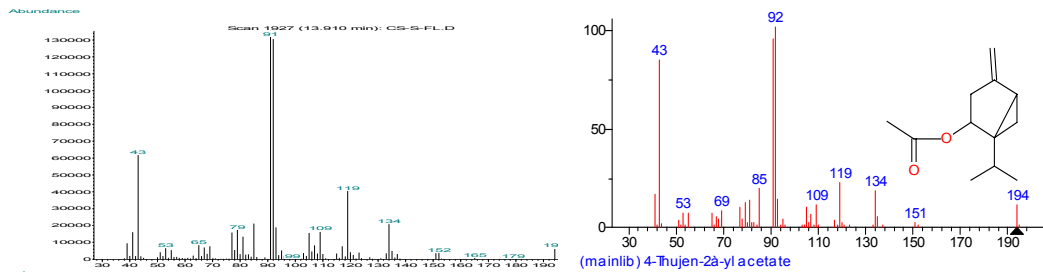


Figura A.3.1.19. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru tuienil-acetat

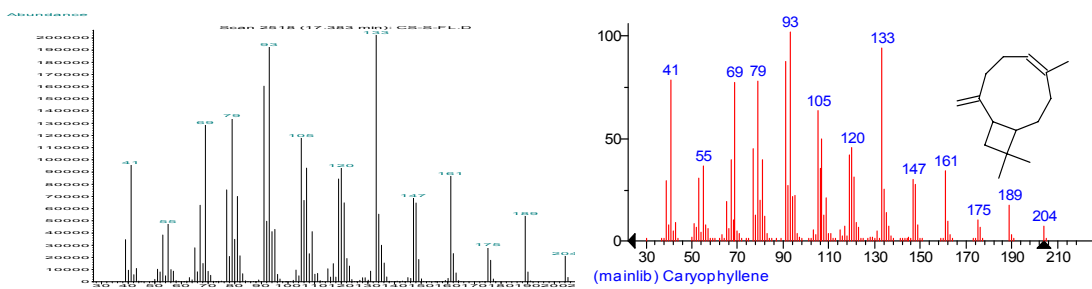


Figura A.3.1.20. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru cariofilen

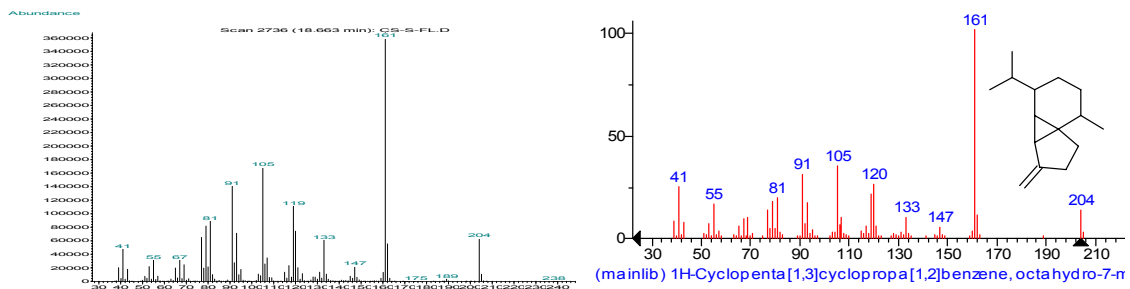


Figura A.3.1.21. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru β-cubeben

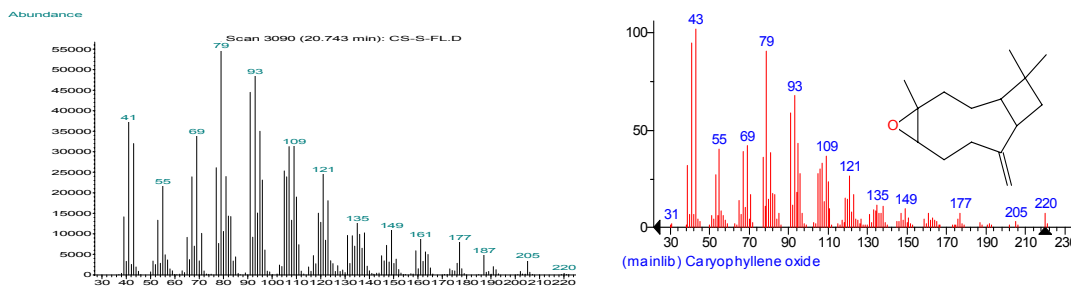


Figura A.3.1.22. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru cariofilen-oxid

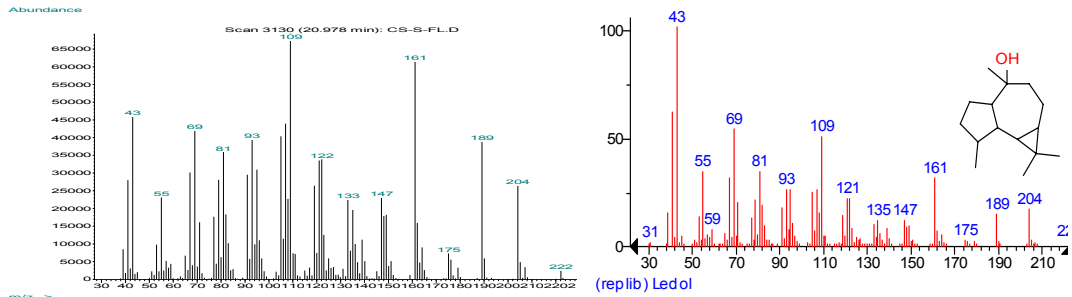


Figura A.3.1.23. Spectrele de masă experimental (jos) și din baza de date NIST pentru ledol

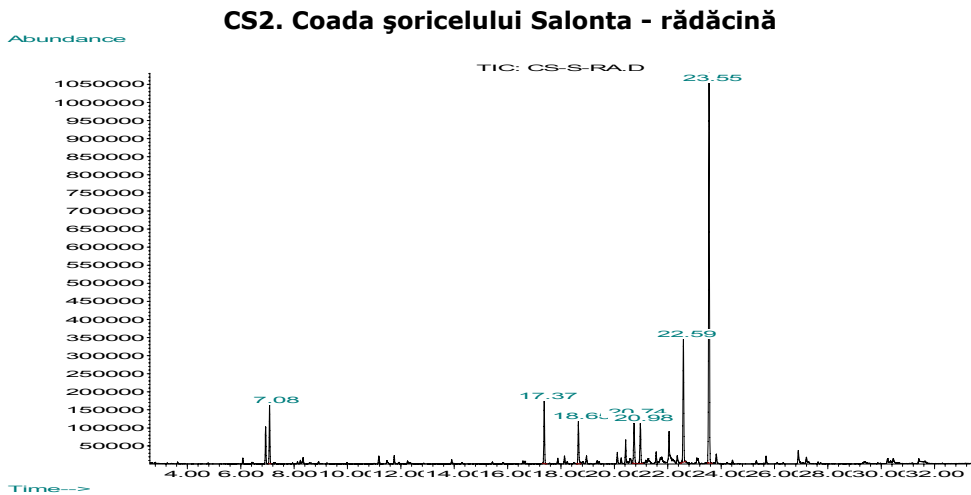


Figura A.3.1.24. Cromatograma din analiza GC-MS pentru uleiul volatil din rădăcină de coada șoricelului (Salonta)

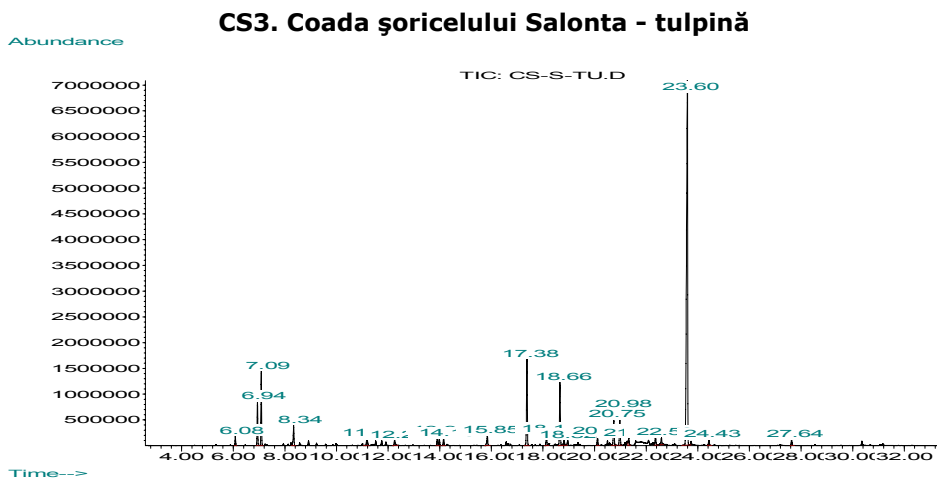


Figura A.3.1.25. Cromatograma din analiza GC-MS pentru uleiul volatil din tulpină de coada șoricelului (Salonta)

CS4. Coada șoricelului Câmpeni - flori

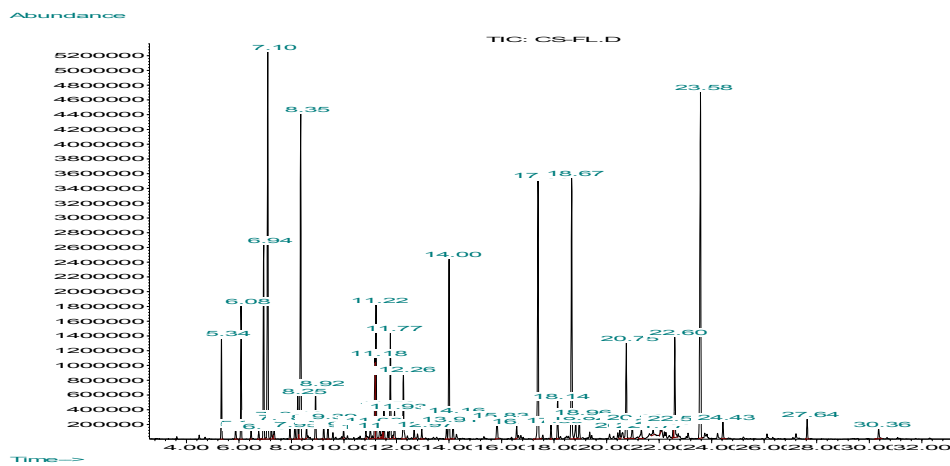
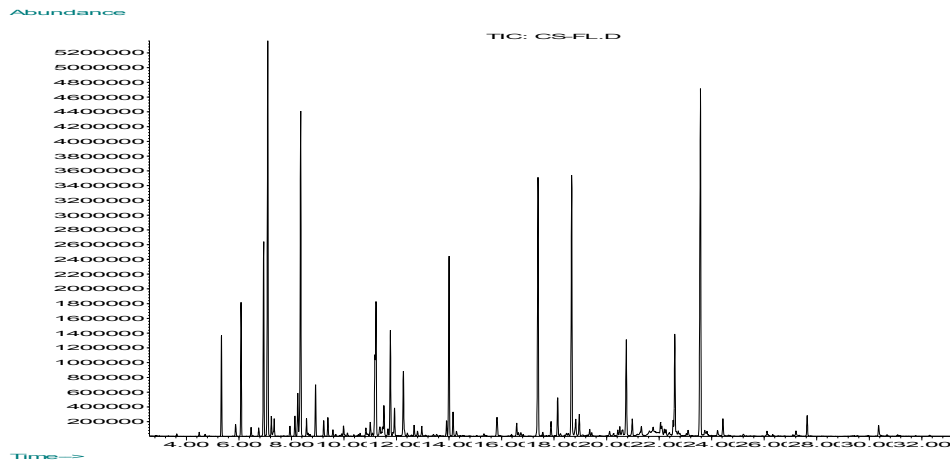


Figura A.3.1.26. Cromatograma din analiza GC-MS pentru uleiul volatil din flori de coada șoricelului (Câmpeni)

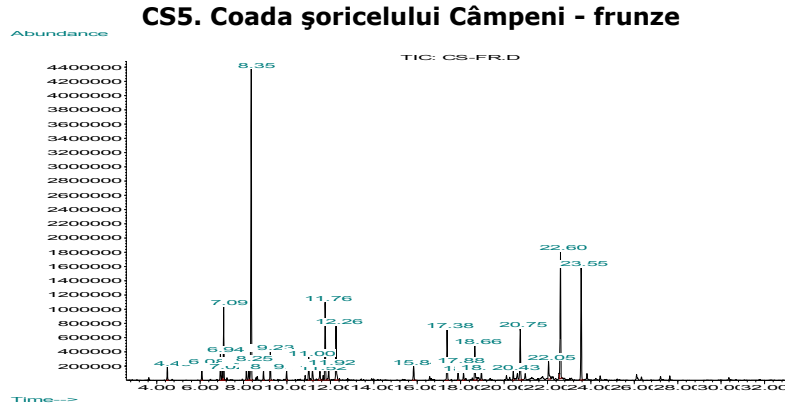


Figura A.3.1.27. Cromatograma din analiza GC-MS pentru uleiul volatil din frunze de coada șoricelului (Câmpeni)

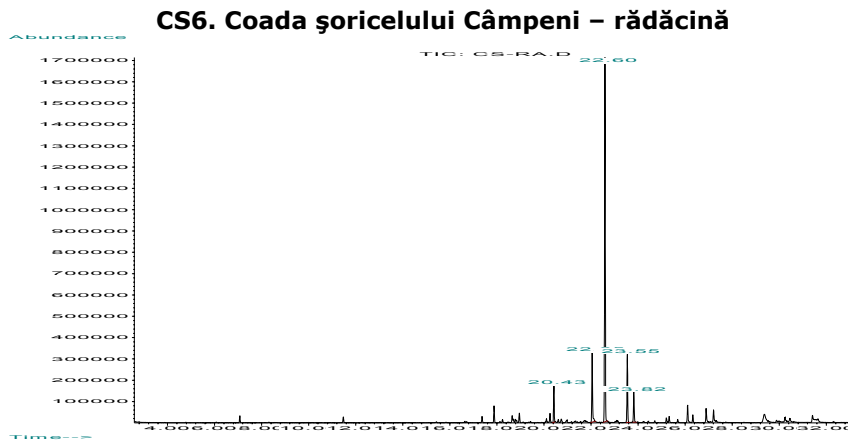


Figura A.3.1.28. Cromatograma din analiza GC-MS pentru uleiul volatil din rădăcină de coada șoricelului (Câmpeni)

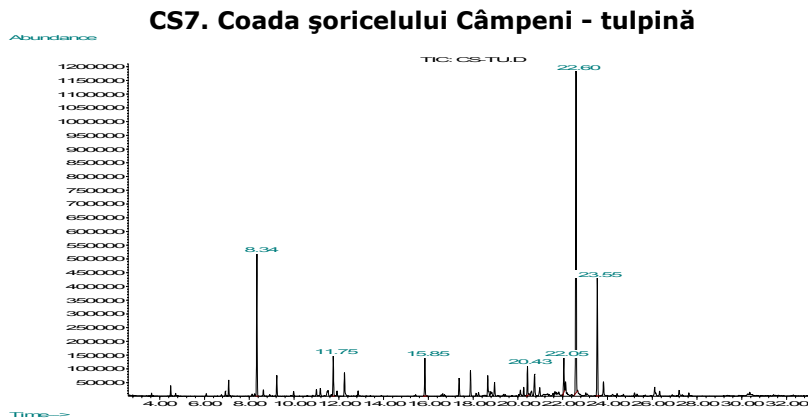


Figura A.3.1.29. Cromatograma din analiza GC-MS pentru uleiul volatil din tulpină de coada șoricelului (Câmpeni)

A1. Anghinare Câmpeni - flori

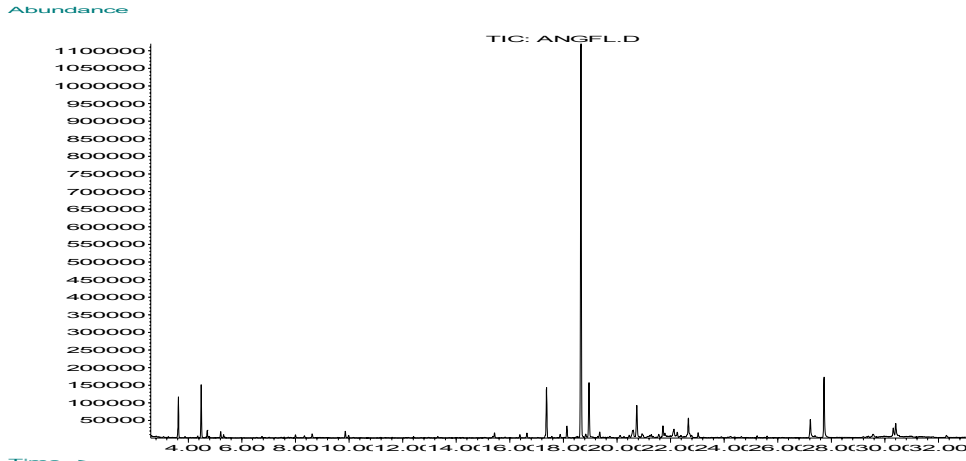


Figura A.3.1.30. Cromatograma din analiza GC-MS pentru uleiul volatil din flori de anghinare (Câmpeni)

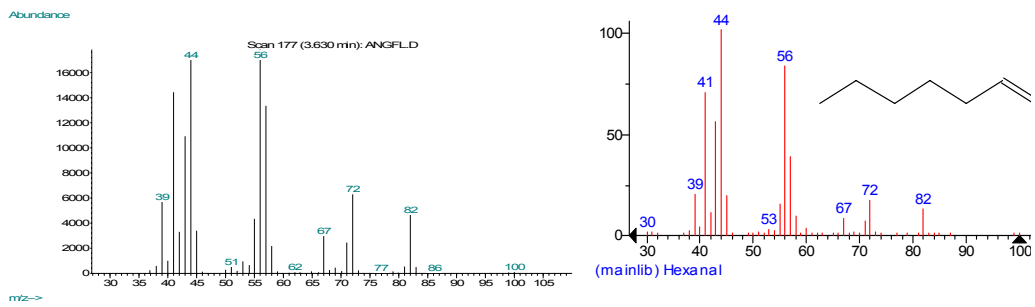


Figura A.3.1.31. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru hexanal

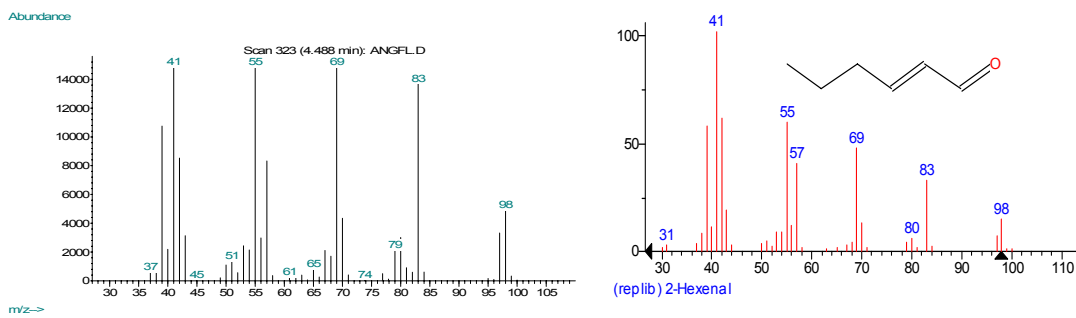


Figura A.3.1.32. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru 2-hexenal

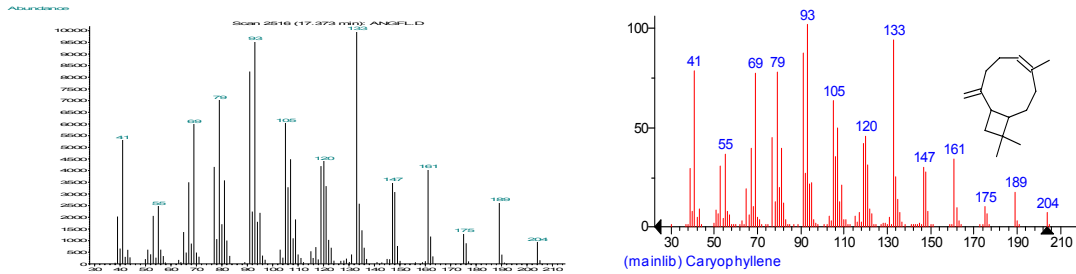


Figura A.3.1.33. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru cariofilen

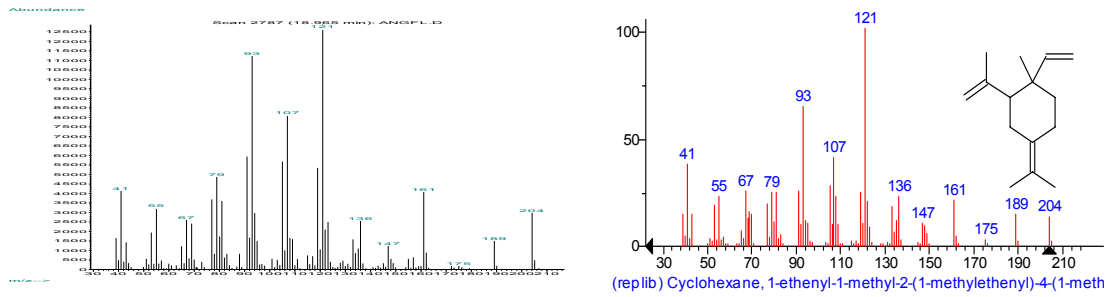


Figura A.3.1.34. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru elixen

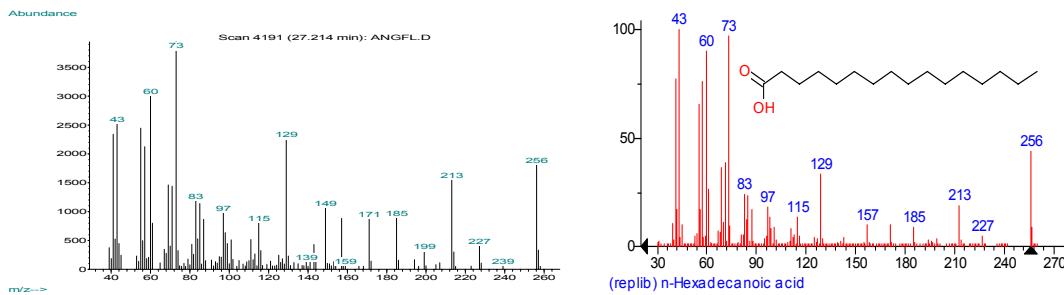


Figura A.3.1.35. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru hexadenanoic acid (palmitic)

A2. Anghinare Câmpeni - frunze

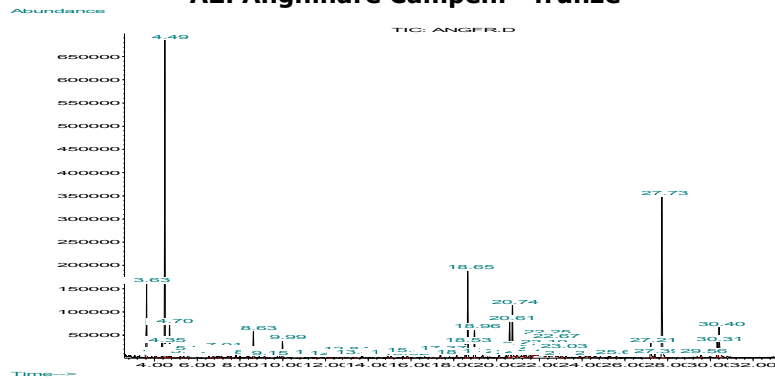


Figura A.3.1.36. Cromatograma din analiza GC-MS pentru uleiul volatil din frunze de anghinare (Câmpeni)

A3. Anghinare Câmpeni – rădăcină

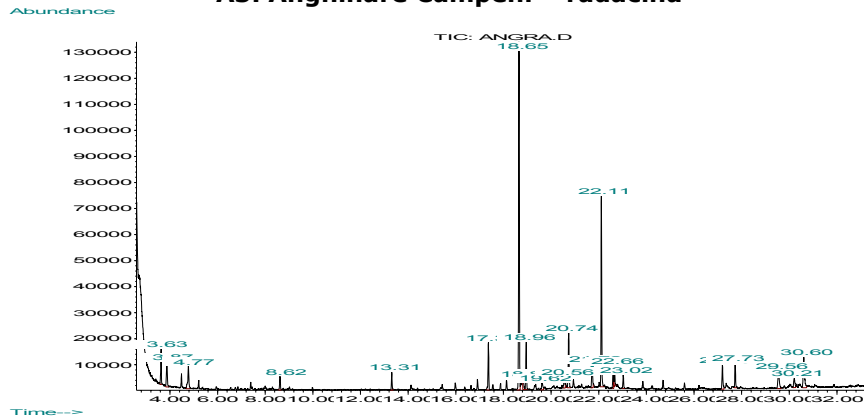


Figura A.3.1.37. Cromatograma din analiza GC-MS pentru uleiul volatil din rădăcină de anghinare (Câmpeni)

A4. Anghinare Câmpeni – tulpină

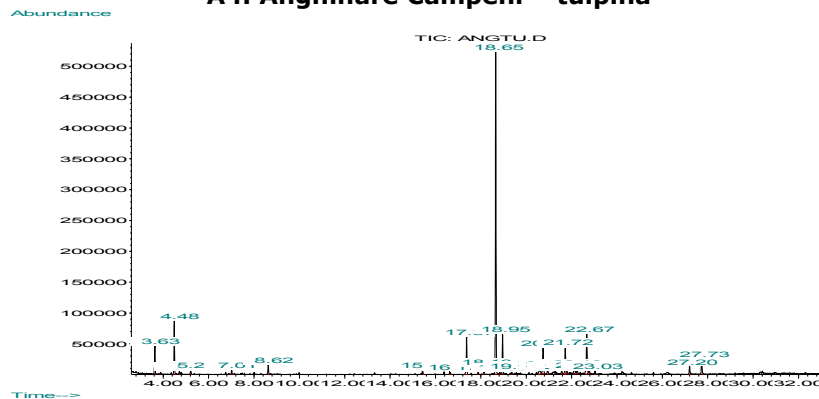


Figura A.3.1.38. Cromatograma din analiza GC-MS pentru uleiul volatil din tulpină de anghinare (Câmpeni)

P1. Podbal Câmpeni – Frunze

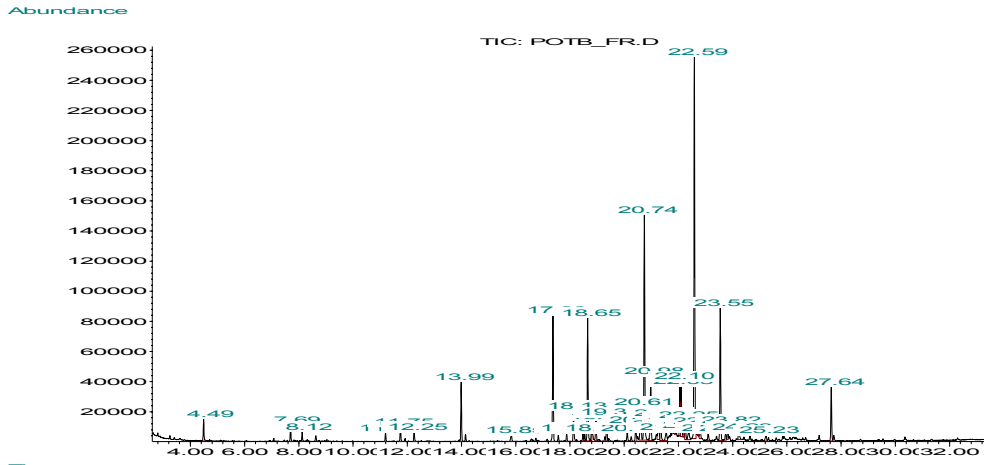


Figura A.3.1.39. Cromatograma din analiza GC-MS pentru uleiul volatil din frunze de podbal (Câmpeni)

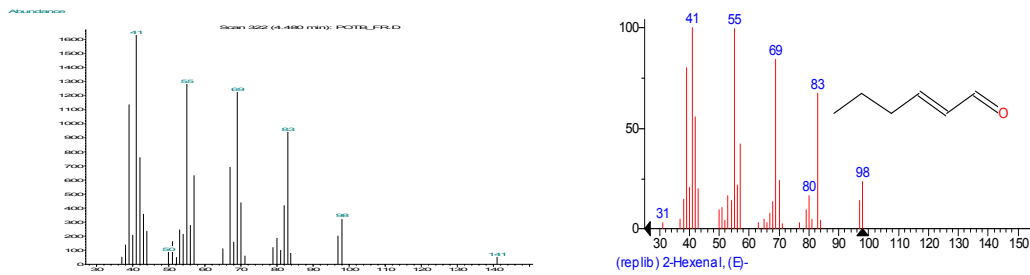


Figura A.3.1.40. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru 2-hexenal

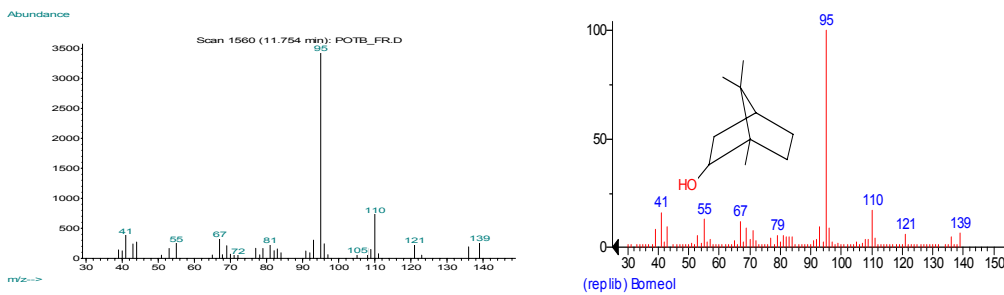


Figura A.3.1.41. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru borneol

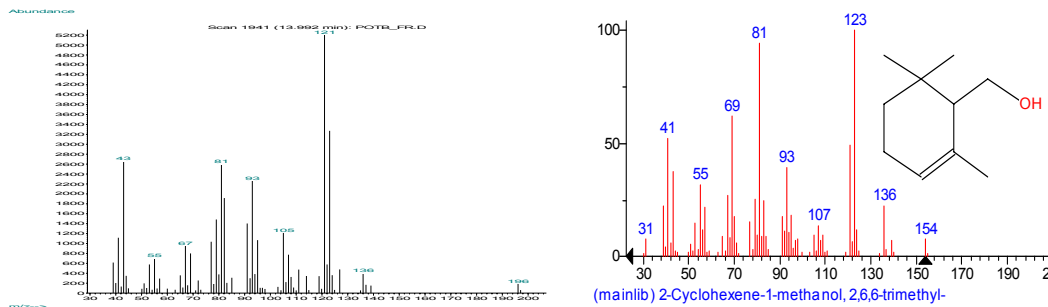


Figura A.3.1.42. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru 2-ciclohexene-1-methanol, 2,6,6-trimethyl-

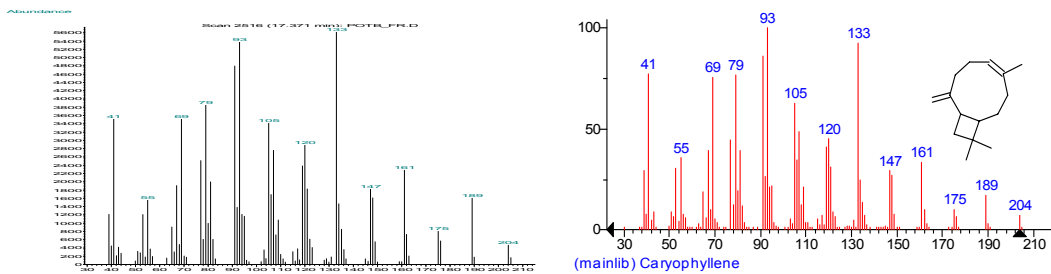


Figura A.3.1.43. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru cariofilen

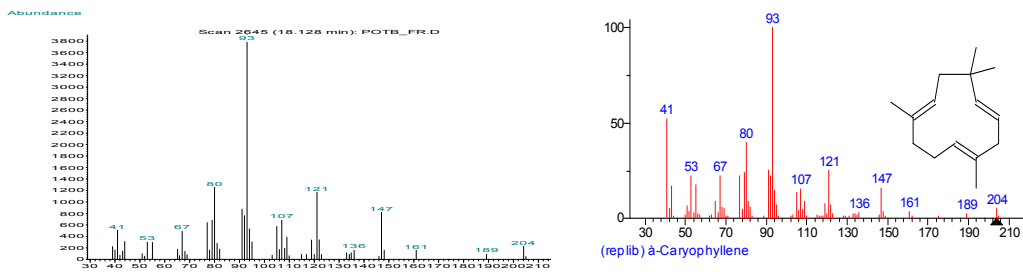


Figura A.3.1.44. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru α-cariofilen

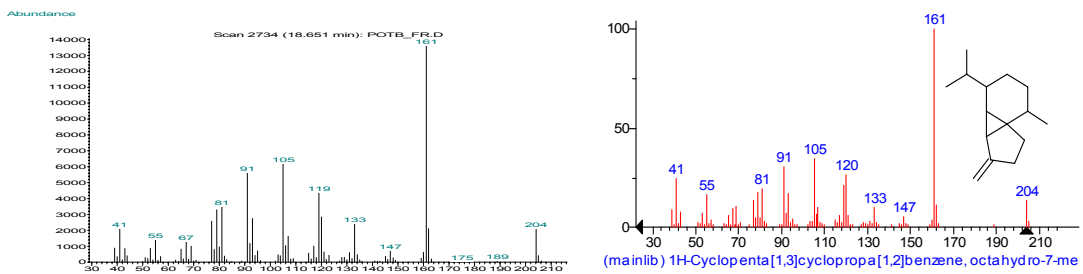


Figura A.3.1.45. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru β-cubeben

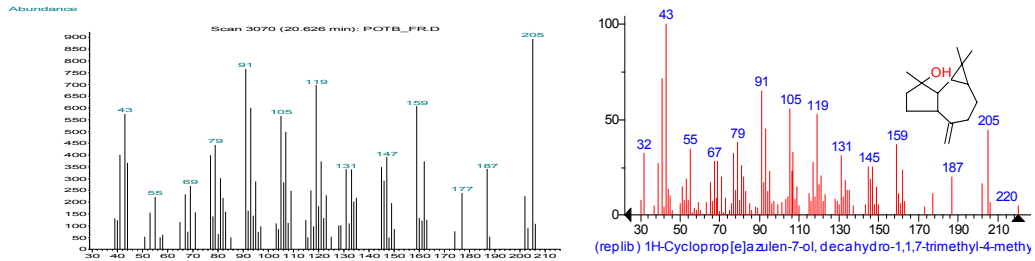


Figura A.3.1.46. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru spatulenol

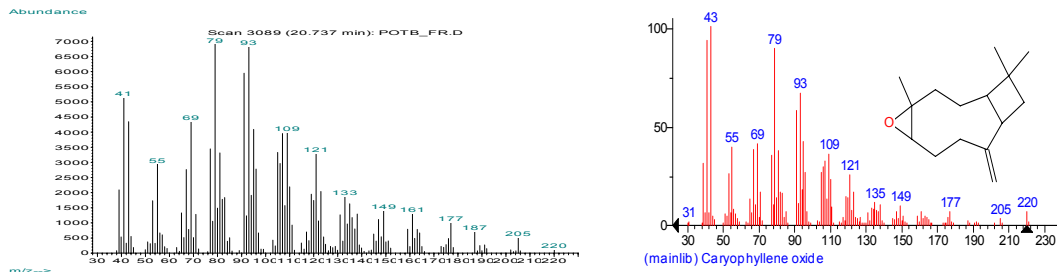


Figura A.3.1.47. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru cariofilen-oxid

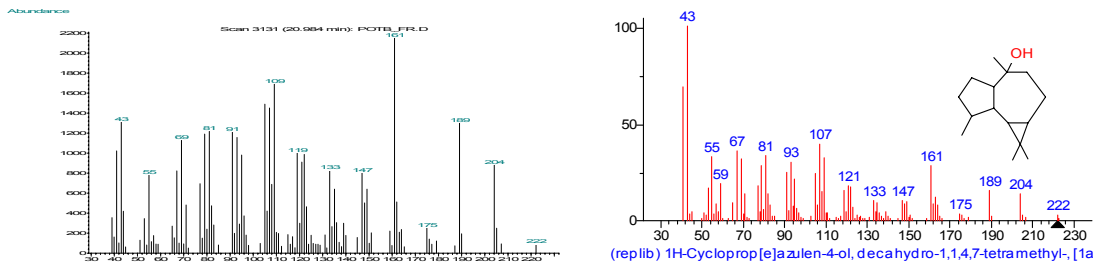


Figura A.3.1.48. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru viridiflorol

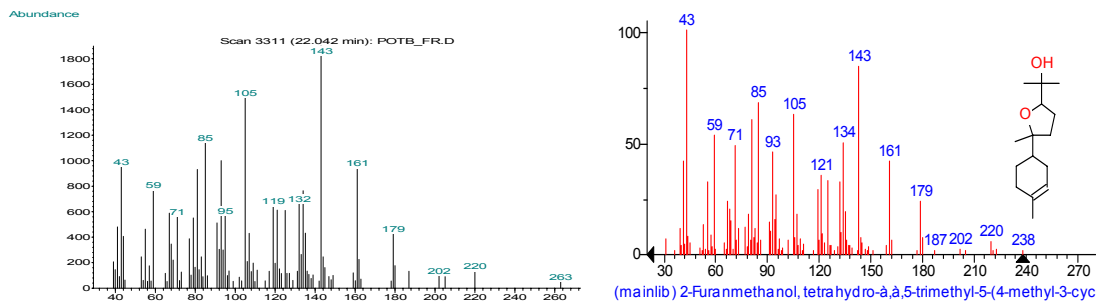
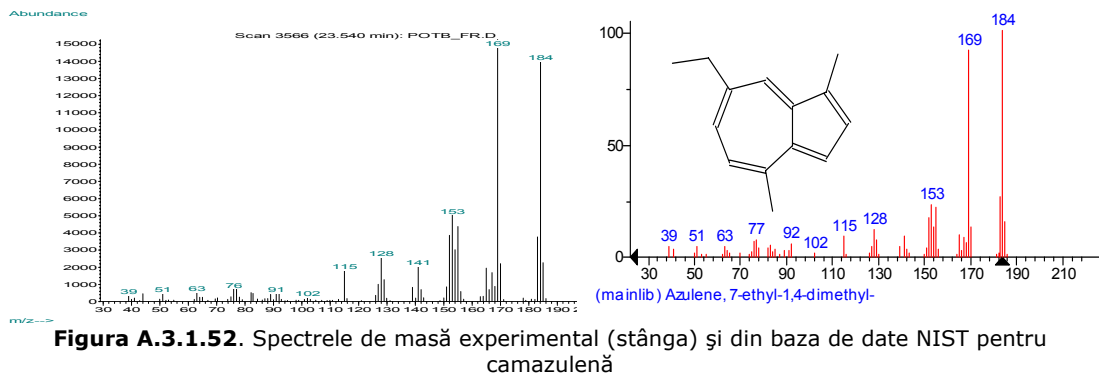
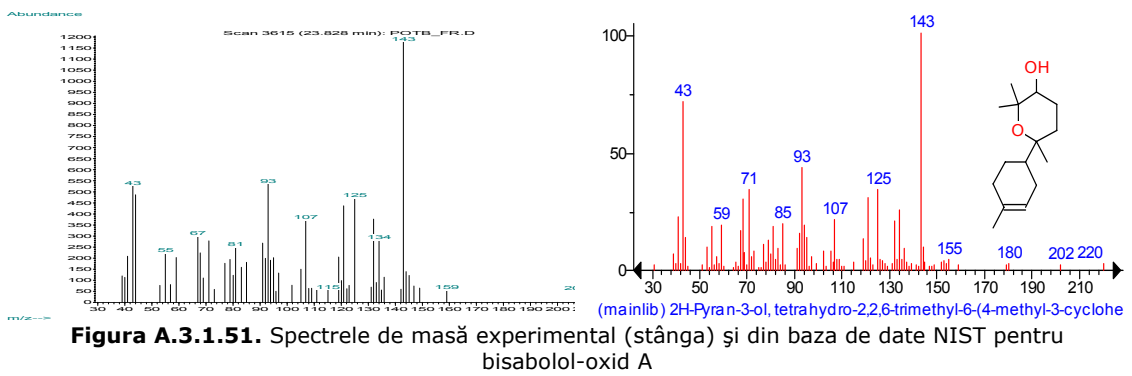
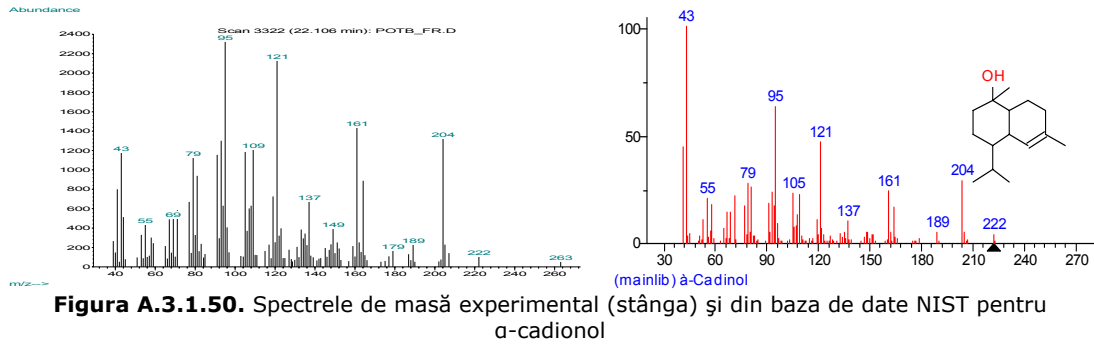
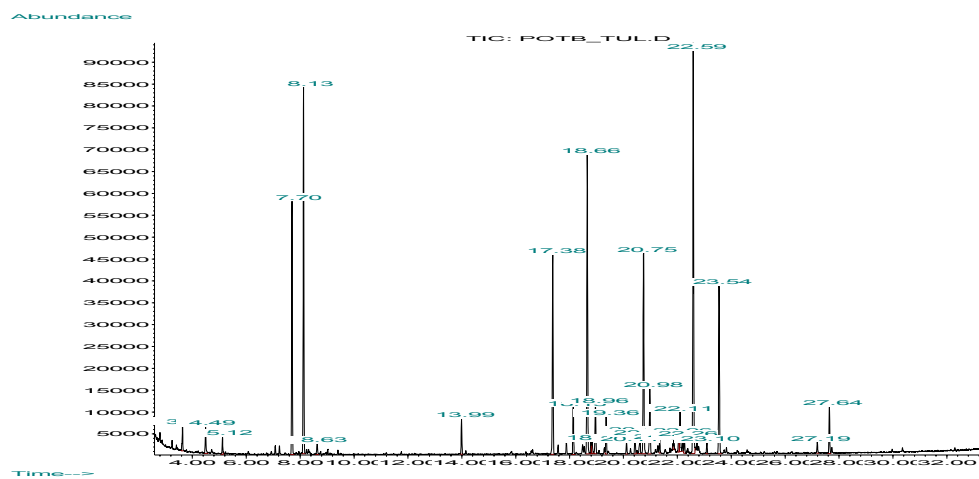


Figura A.3.1.49. Spectrele de masă experimental (stânga) și din baza de date NIST pentru α-bisabolol-oxid B



P2. Podbal Câmpeni – Rădăcină**Figura A.3.1.53.** Cromatograma din analiza GC-MS pentru uleiul volatil din rădăcină de podbal (Câmpeni)**P3. Podbal Câmpeni – Tulpină****Figura A.3.1.54.** Cromatograma din analiza GC-MS pentru uleiul volatil din tulpină de podbal (Câmpeni)

Anexa A.3.2. Rezultatele analizelor HPLC pentru extractele solid-lichid în diferiți solvenți

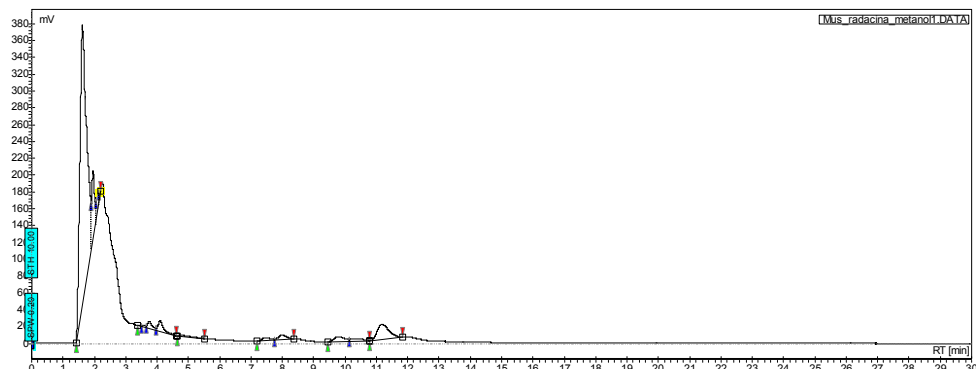


Figura A.3.2.1. Cromatograma HPLC pentru extractul metanolic din rădăcină de *M. chamomilla*

#	Name	Start [Min]	Time [Min]	End [Min]	Quantity [% Area]	Area [mV.Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN	1.427	1.612	1.903	73.73	82.1	73.725
2	UNKNOWN	1.903	1.952	2.03	6.56	7.3	6.556
3	UNKNOWN	2.03	2.07	2.132	2.31	2.6	2.309
4	Rutină	2.132	2.132	2.2	0.5	0.6	0.501
5	UNKNOWN	3.363	3.427	3.493	0.05	0.1	0.051
6	UNKNOWN	3.493	3.585	3.647	0.24	0.3	0.242
7	UNKNOWN	3.647	3.752	3.968	1.43	1.6	1.434
8	UNKNOWN	3.968	4.1	4.612	2.29	2.6	2.293
9	UNKNOWN	4.647	4.805	5.507	0.48	0.5	0.481
10	UNKNOWN	7.183	7.46	7.735	0.91	1	0.913
11	UNKNOWN	7.735	7.985	8.373	1.45	1.6	1.452
12	UNKNOWN	9.438	9.787	10.122	1.92	2.1	1.917
13	UNKNOWN	10.122	10.34	10.79	1.1	1.2	1.095
14	UNKNOWN	10.793	11.175	11.85	7.03	7.8	7.032
Total					100	111.3	100

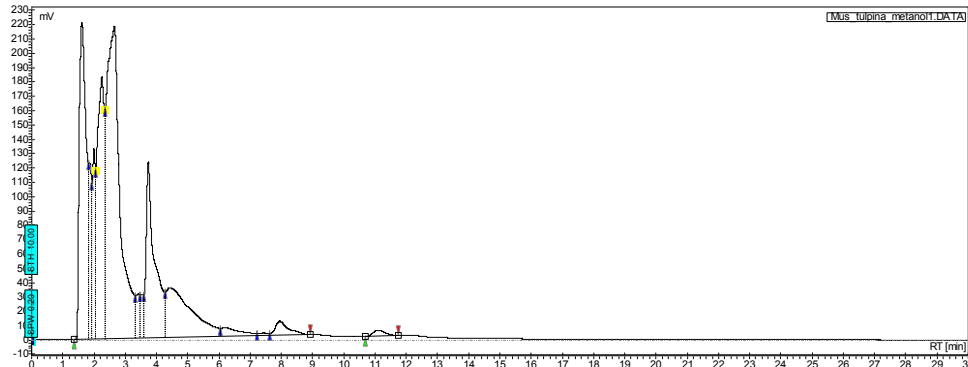


Figura A.3.2.2. Cromatograma HPLC pentru extractul metanolic din tulpină de *M. chamomilla*

#	Name	Start [Min]	Time [Min]	End [Min]	Quantity [% Area]	Area [mV.Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN	1.36	1.608	1.838	17.48	58.6	17.483
2	UNKNOWN	1.838	1.863	1.937	3.48	11.6	3.475
3	UNKNOWN	1.937	1.993	2.053	4.28	14.4	4.284
4	UNKNOWN	2.053	2.252	2.357	14.42	48.3	14.419
5	Rutină	2.357	2.648	3.327	32.38	108.5	32.385
6	UNKNOWN	3.327	3.422	3.48	1.39	4.7	1.392
7	UNKNOWN	3.48	3.518	3.588	0.98	3.3	0.984
8	UNKNOWN	3.588	3.74	4.273	11.9	39.9	11.9
9	Quercetină	4.273	4.423	6.053	10.19	34.1	10.191
10	UNKNOWN	6.053	6.198	7.222	1.27	4.3	1.272
11	UNKNOWN	7.222	7.418	7.633	0.2	0.7	0.196
12	UNKNOWN	7.633	7.957	8.92	1.43	4.8	1.435
13	UNKNOWN	10.688	11.098	11.733	0.58	2	0.584
Total					100	335	100

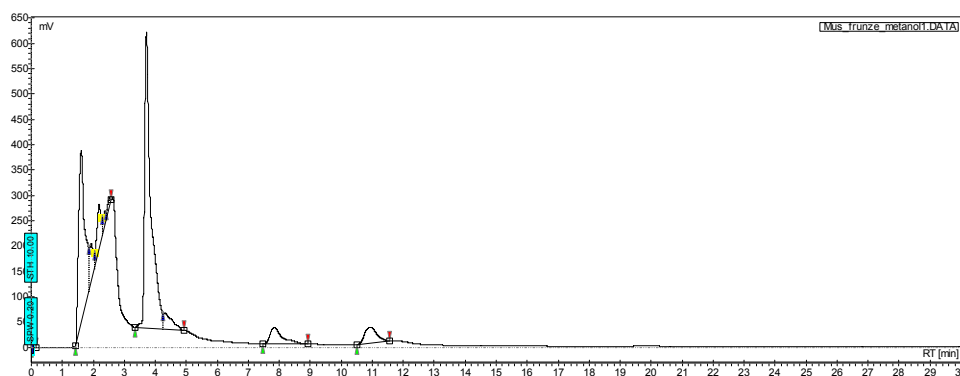


Figura A.3.2.3. Cromatograma HPLC pentru extractul metanolic din frunze de *M. chamomilla*

#	Name	Start [Min]	Time [Min]	End [Min]	Quantity [% Area]	Area [mV.Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN	0.002	0.005	0.16	0.01	0	0.006
2	UNKNOWN	1.433	1.605	1.858	26.93	77.7	26.928
3	UNKNOWN	1.858	1.858	2.035	3.91	11.3	3.907
4	UNKNOWN	2.035	2.18	2.288	5.13	14.8	5.128
5	Rutină	2.288	2.288	2.41	1.27	3.7	1.275
6	UNKNOWN	2.41	2.505	2.587	0.97	2.8	0.967
7	UNKNOWN	3.333	3.715	4.26	47.92	138.2	47.918
8	Quercetină	4.26	4.318	4.918	3.69	10.6	3.689
9	UNKNOWN	7.473	7.843	8.923	5.24	15.1	5.244
10	UNKNOWN	10.507	10.918	11.548	4.94	14.2	4.938
Total					100	288.5	100

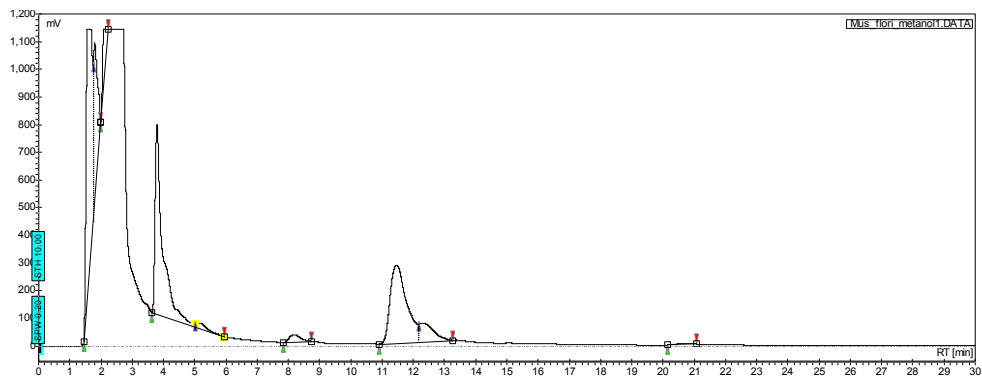


Figura A.3.2.4. Cromatograma HPLC pentru extractul metanolic din flori de *M. chamomilla*

#	Name	Start [Min]	Time [Min]	End [Min]	Quantity [% Area]	Area [mV.Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN	1.455	1.552	1.752	27.9	202.6	27.901
2	UNKNOWN	1.752	1.792	1.998	11.49	83.4	11.487
3	UNKNOWN	1.998	2.077	2.218	3.16	22.9	3.156
4	UNKNOWN	3.632	3.795	5.03	26.06	189.2	26.061
5	UNKNOWN	5.03	5.193	5.95	0.92	6.7	0.916
6	UNKNOWN	7.837	8.2	8.733	1.45	10.6	1.455
7	UNKNOWN	10.905	11.477	12.167	23.77	172.6	23.766
8	UNKNOWN	12.167	12.313	13.268	5.03	36.5	5.032
9	UNKNOWN	20.147	20.63	21.08	0.23	1.6	0.227
Total					100	726.1	100

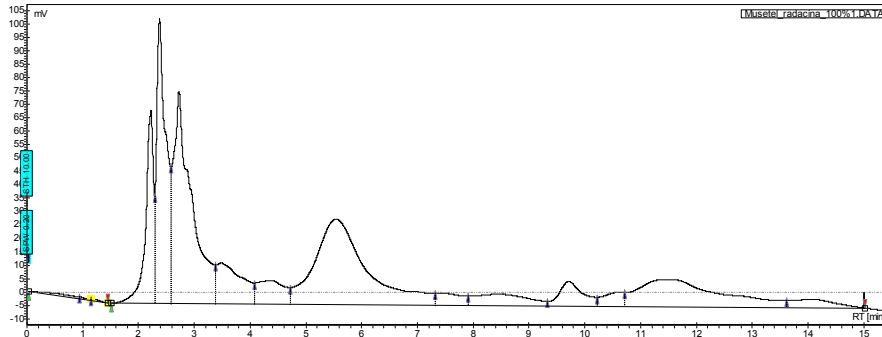


Figura A.3.2.5. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic din rădăcină de *M. chamomilla*

#	Name	Start [Min]	Time [Min]	End [Min]	Quantity [% Area]	Area [mV.Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN	0.028	0.548	0.933	0.34	0.5	0.34
2	UNKNOWN	0.933	0.962	1.147	0.07	0.1	0.071
3	UNKNOWN	1.147	1.225	1.452	0.07	0.1	0.068
4	UNKNOWN	1.508	2.222	2.29	8.06	11.7	8.058
5	UNKNOWN	2.29	2.377	2.582	14.23	20.7	14.233
6	UNKNOWN	2.582	2.725	3.385	20.69	30.1	20.691
7	UNKNOWN	3.385	3.48	4.075	5.53	8	5.527
8	UNKNOWN	4.075	4.36	4.713	3.46	5	3.463
9	UNKNOWN	4.713	5.54	7.312	23.75	34.5	23.748
10	UNKNOWN	7.312	7.473	7.912	1.68	2.4	1.679
11	UNKNOWN	7.912	8.477	9.333	3.32	4.8	3.324
12	UNKNOWN	9.333	9.708	10.213	3.15	4.6	3.15
13	UNKNOWN	10.213	10.59	10.707	1.53	2.2	1.532
14	UNKNOWN	10.707	11.445	13.618	12.17	17.7	12.17
15	UNKNOWN	13.618	15.002	15.013	1.95	2.8	1.946
Total					100	145.4	100

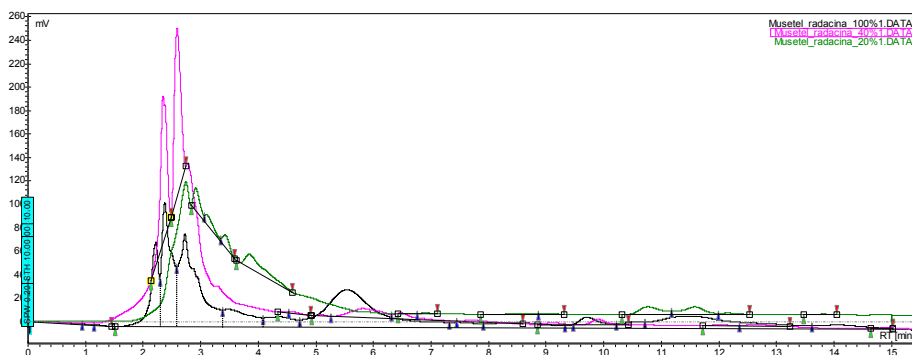


Figura A.3.2.6. Cromatogramele HPLC suprapuse pentru extractele etanolice din rădăcină de *M. chamomilla*

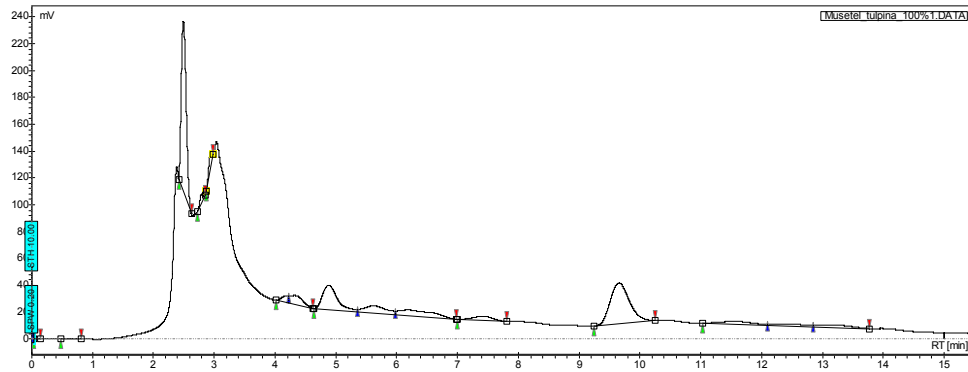


Figura A.3.2.7. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic din tulpină de *M. chamomilla*

#	Name	Start [Min]	Time [Min]	End [Min]	Quantity [% Area]	Area [mV.Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN	0.028	0.065	0.147	0	0	0.003
2	UNKNOWN	0.482	0.595	0.813	0.09	0	0.095
3	UNKNOWN	2.415	2.495	2.623	28.33	11.7	28.326
4	UNKNOWN	2.725	2.787	2.852	0.93	0.4	0.93
5	UNKNOWN	2.868	2.933	2.987	2.01	0.8	2.01
6	UNKNOWN	4.018	4.227	4.227	1.51	0.6	1.506
7	Quercetină	4.227	4.345	4.627	4	1.7	3.997
8	UNKNOWN	4.638	4.882	5.348	12.61	5.2	12.61
9	UNKNOWN	5.348	5.635	5.98	5.65	2.3	5.655
10	UNKNOWN	5.98	6.213	6.987	6.8	2.8	6.803
11	UNKNOWN	6.997	7.437	7.815	2.77	1.1	2.767
12	UNKNOWN	9.243	9.652	10.253	26.97	11.2	26.97
13	UNKNOWN	11.027	11.608	12.097	3.27	1.4	3.269
14	UNKNOWN	12.097	12.423	12.842	2.31	1	2.311
15	UNKNOWN	12.842	13.18	13.777	2.75	1.1	2.747
Total					100	41.3	100

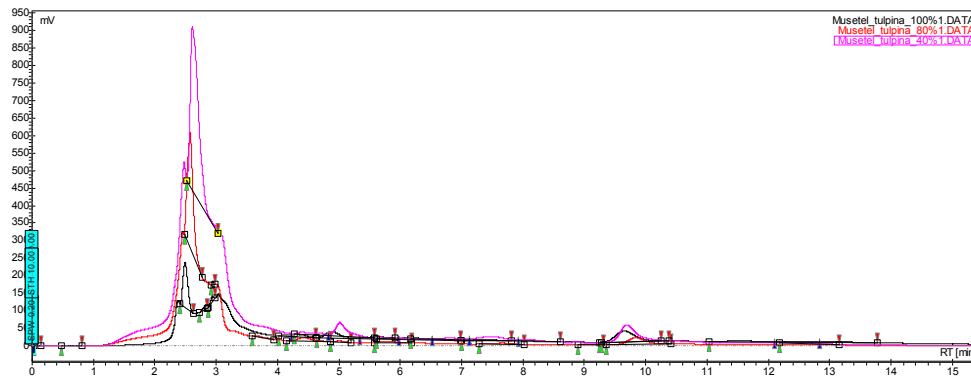


Figura A.3.2.8. Cromatogramele HPLC suprapuse pentru extractele etanolice din tulpinã de *M. chamomilla*

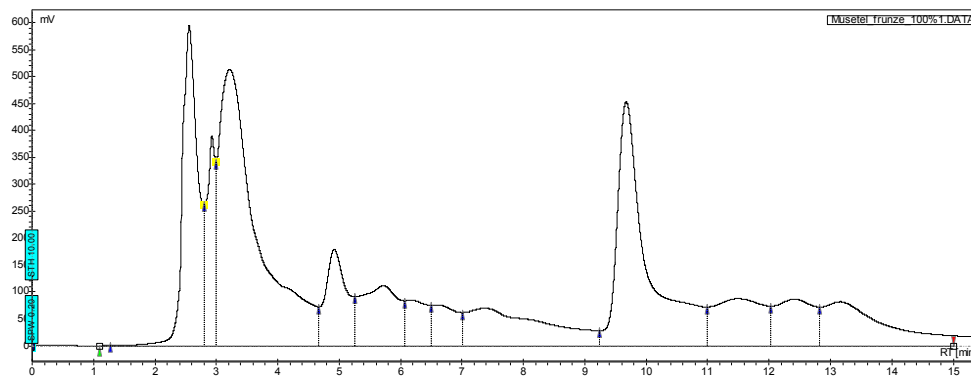


Figura A.3.2.9. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic din frunze de *M. chamomilla*

#	Name	Start [Min]	Time [Min]	End [Min]	Quantity [% Area]	Area [mV.Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN	1.102	1.212	1.275	0	0.1	0.004
2	UNKNOWN	1.275	2.557	2.8	11.84	170.1	11.836
3	UNKNOWN	2.8	2.928	2.995	4.41	63.4	4.413
4	UNKNOWN	2.995	3.222	4.668	25.82	371.2	25.824
5	UNKNOWN	4.668	4.92	5.252	4.93	70.8	4.926
6	UNKNOWN	5.252	5.718	6.063	5.53	79.5	5.531
7	UNKNOWN	6.063	6.177	6.493	2.43	34.9	2.426
8	UNKNOWN	6.493	6.595	7.008	2.52	36.2	2.52
9	UNKNOWN	7.008	7.373	9.247	7.45	107.2	7.455
10	UNKNOWN	9.247	9.675	10.985	17.93	257.8	17.933
11	UNKNOWN	10.985	11.5	12.033	5.87	84.3	5.868
12	UNKNOWN	12.033	12.415	12.83	4.41	63.4	4.413
13	UNKNOWN	12.83	13.158	15.002	6.85	98.5	6.85
Total					100	1437.3	100

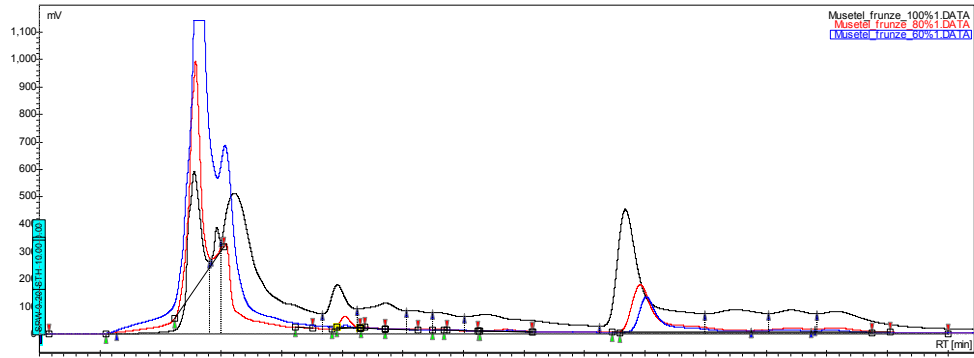


Figura A.3.2.10. Cromatogramele HPLC suprapuse pentru extractele etanolice din frunze de *M. chamomilla*

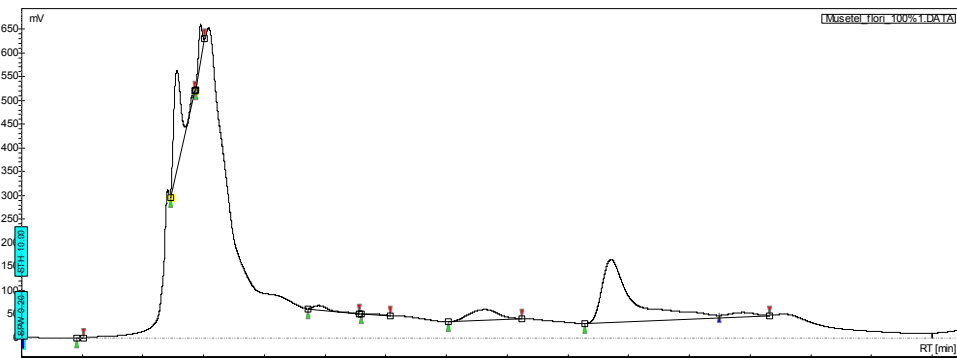


Figura A.3.2.11. Cromatograma HPLC pentru extractul etanolic din flori de *M. chamomilla*

#	Name	Start [Min]	Time [Min]	End [Min]	Quantity [% Area]	Area [mV.Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN	0.902	0.962	1.027	0.01	0	0.01
2	UNKNOWN	2.448	2.548	2.86	21.33	28.4	21.327
3	UNKNOWN	2.865	2.943	3.013	3.99	5.3	3.992
4	UNKNOWN	4.712	4.912	5.562	1.82	2.4	1.815
5	UNKNOWN	5.602	5.823	6.068	0.29	0.4	0.289
6	UNKNOWN	7.037	7.62	8.24	9.57	12.8	9.574
7	UNKNOWN	9.277	9.71	11.485	59.63	79.5	59.634
8	UNKNOWN	11.485	11.847	12.32	3.36	4.5	3.357
Total					100	133.3	100

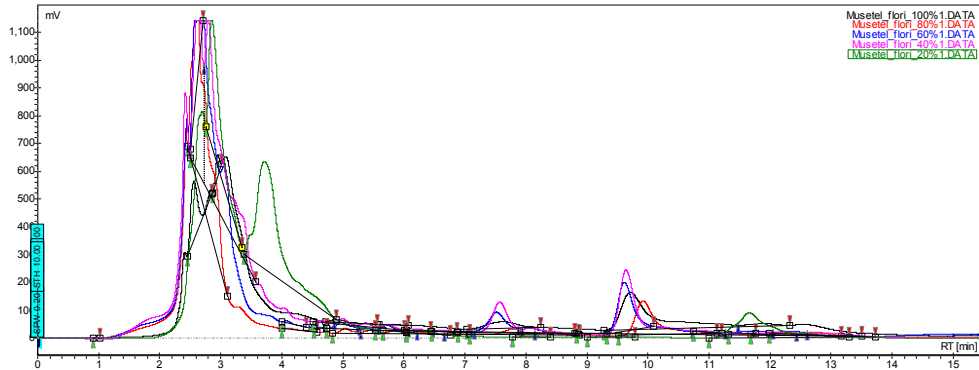


Figura A.3.2.12. Cromatogramele HPLC suprapuse pentru extractele etanolice din flori de *M. chamomilla*

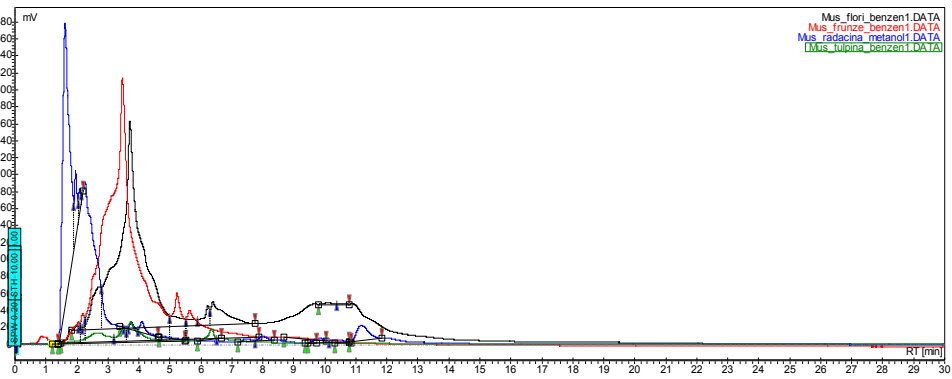


Figura A.3.2.13. Cromatogramele HPLC suprapuse pentru extractele benzenice de *M. chamomilla*

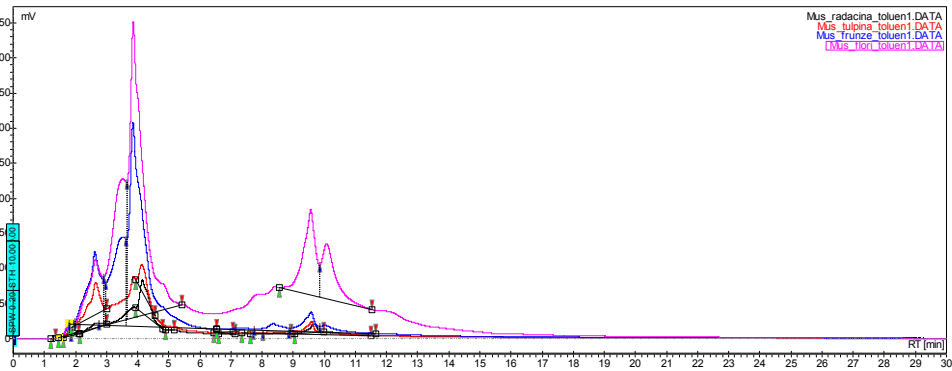


Figura A.3.2.14. Cromatogramele HPLC suprapuse pentru extractele toluenice de *M. chamomilla*

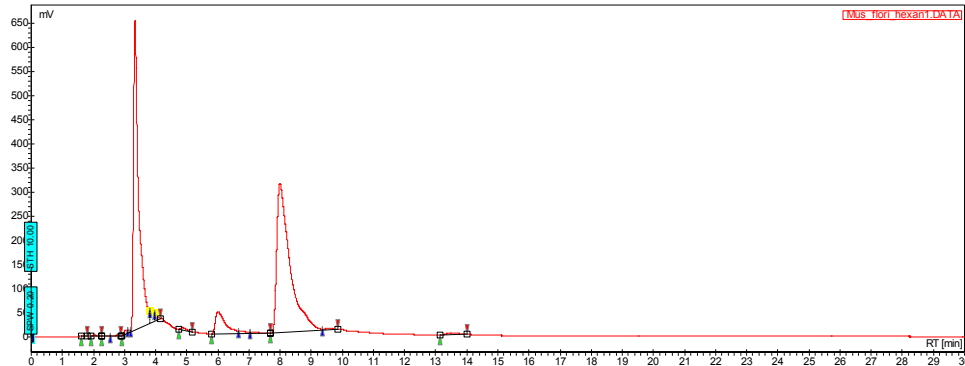


Figura A.3.2.15. Cromatograma HPLC pentru extractul hexanic din flori de *M. chamomilla*

#	Name	Start [Min]	Time [Min]	End [Min]	Quantity [% Area]	Area [mV.Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN	1.625	1.693	1.787	0.01	0	0.006
2	UNKNOWN	1.912	2.003	2.26	0.1	0.3	0.104
3	UNKNOWN	2.26	2.415	2.532	0.04	0.1	0.036
4	UNKNOWN	2.532	2.767	2.887	0.04	0.1	0.045
5	UNKNOWN	2.905	3.042	3.112	0.3	0.9	0.304
6	Rutină	3.112	3.112	3.198	0.1	0.3	0.1
7	UNKNOWN	3.198	3.333	3.803	39.95	122	39.955
8	UNKNOWN	3.803	3.803	3.973	1.22	3.7	1.223
9	UNKNOWN	3.973	3.973	4.15	0.53	1.6	0.528
10	UNKNOWN	4.737	4.883	5.187	0.29	0.9	0.29
11	UNKNOWN	5.782	6	6.668	5.72	17.5	5.723
12	UNKNOWN	6.668	6.737	7.047	0.55	1.7	0.551
13	UNKNOWN	7.047	7.147	7.678	0.37	1.1	0.371
14	UNKNOWN	7.685	7.995	9.36	49.88	152.3	49.882
15	UNKNOWN	9.36	9.567	9.853	0.36	1.1	0.36
16	UNKNOWN	13.132	13.488	14	0.52	1.6	0.523
Total					100	305.3	100

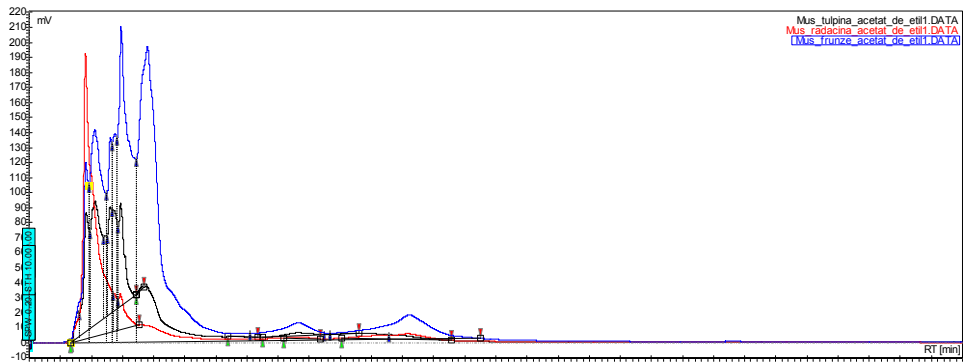


Figura A.3.2.16. Cromatogramele HPLC suprapuse pentru extractele în acetat de etil de *M. chamomilla*

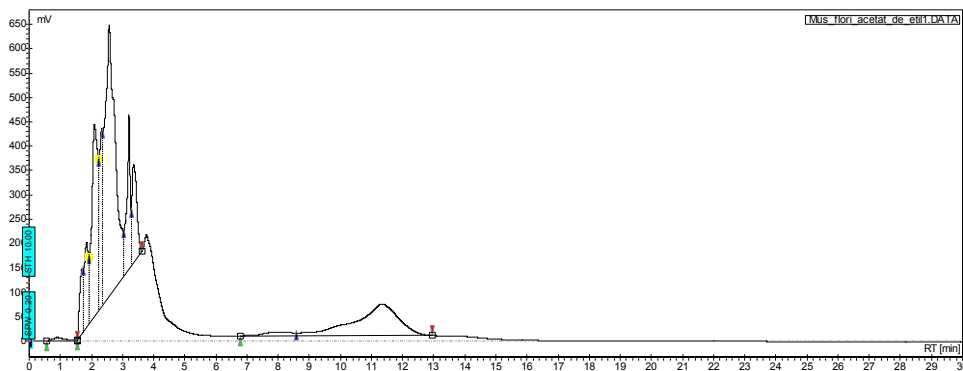


Figura A.3.2.17. Cromatograma HPLC pentru extractul în acetat de etil din flori de *M. chamomilla*

#	Name	Start [Min]	Time [Min]	End [Min]	Quantity [% Area]	Area [mV.Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN	0.573	0.895	1.537	0.44	2.6	0.439
2	UNKNOWN	1.542	1.692	1.73	2.76	16.1	2.756
3	UNKNOWN	1.73	1.835	1.912	4.68	27.4	4.681
4	UNKNOWN	1.912	2.095	2.242	16.25	95.1	16.255
5	UNKNOWN	2.242	2.327	2.37	7.56	44.2	7.561
6	UNKNOWN	2.37	2.57	3.032	35.8	209.5	35.799
7	Rutină	3.032	3.202	3.275	6.85	40.1	6.853
8	UNKNOWN	3.275	3.345	3.613	6.22	36.4	6.216
9	UNKNOWN	6.787	7.872	8.593	1.41	8.3	1.412
10	UNKNOWN	8.593	11.338	12.947	18.03	105.5	18.028
Total					100	585.2	100

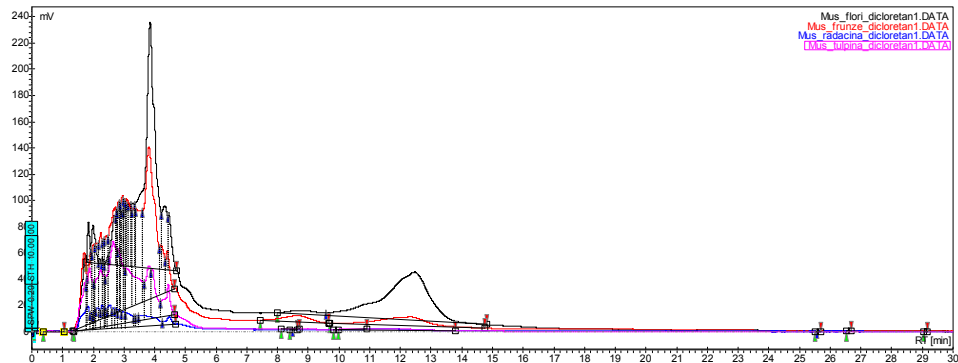


Figura A.3.2.18. Cromatogramele HPLC suprapuse pentru extractele dicloretanice de *M. chamomilla*

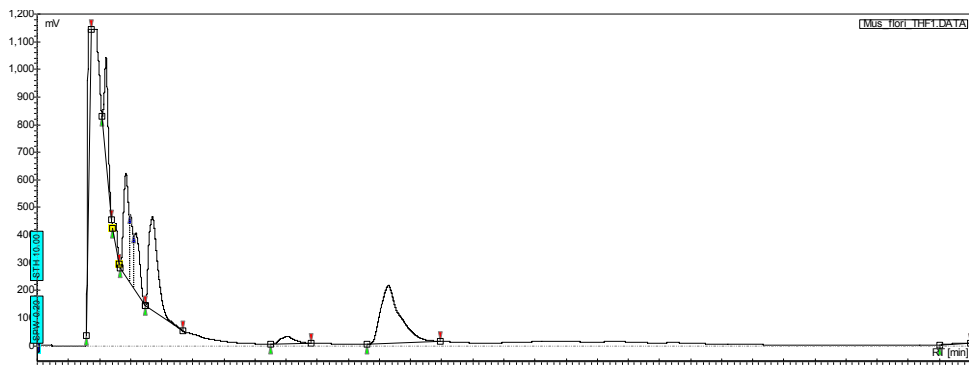


Figura A.3.2.19. Cromatograma HPLC pentru extractul tetrahidrofuranic din flori de *M. chamomilla*

#	Name	Start [Min]	Time [Min]	End [Min]	Quantity [% Area]	Area [mV.Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN	1.583	1.635	1.737	10.06	53.3	10.056
2	UNKNOWN	2.09	2.217	2.392	8.88	47.1	8.882
3	UNKNOWN	2.427	2.538	2.642	1.44	7.6	1.436
4	UNKNOWN	2.673	2.857	2.97	13.02	69.1	13.024
5	UNKNOWN	2.97	3.005	3.113	5.98	31.7	5.977
6	Rutină	3.113	3.173	3.462	7.82	41.4	7.817
7	UNKNOWN	3.467	3.707	4.673	21.51	114.1	21.513
8	UNKNOWN	7.507	8.05	8.8	2.73	14.5	2.729
9	UNKNOWN	10.613	11.282	12.947	28.3	150	28.296
10	UNKNOWN	29	29.573	29.987	0.27	1.4	0.27
Total					100	530.2	100

ANEXA A.3.3. Analiza UV-VIS a biocompușilor, extractelor și evaluarea eliberării controlate din complecși

Tabel A.3.3.1. Date experimentale privind preparare soluție standard: x ml extract se aduce la semn în balon cotate de 10 ml cu etanol 96%

Diluția	Soluție standard (ml)	Etanol (ml)
D1a	0.1	1.9
D1	0.2	1.8
D2	0.4	1.6
D3	0.6	1.4
D4	0.8	1.2
D5	1.0	1.0
D6	1.2	0.8
D7	1.4	0.6
D8	1.6	0.4

Tabel A.3.3.2. Condiții de obținere a extractelor din *M. chamomilla* L. (mușețel) (neconcentrate)

Parte din plantă	Concentrație	Notație	ML extract utilizat pentru soluția standard (x)
Frunze	20%	01_M_Fr_20	1
Frunze	40%	01_M_Fr_40	1
Frunze	60%	01_M_Fr_60	1
Frunze	80%	01_M_Fr_80	1
Frunze	96%	01_M_Fr_100	1
Tulpină	20%	01_M_T_20	1
Tulpină	40%	01_M_T_40	1
Tulpină	60%	01_M_T_60	1
Tulpină	80%	01_M_T_80	1
Tulpină	96%	EVAPORAT	-
Rădăcină	20%	01_M_R_20	1
Rădăcină	40%	01_M_R_40	1
Rădăcină	60%	01_M_R_60	1
Rădăcină	80%	01_M_R_80	1
Rădăcină	96%	01_M_R_100	1

Tabel A.3.3.3. Condiții de obținere a extractelor din *M. chamomilla* L. (mușețel) (concentrate)

Parte din plantă	Concentrație	Notație	ML extract utilizat pentru soluția standard (x)
Flori	20%	01_M_FL_conc_20	0.1
Flori	40%	01_M_FL_conc_40	0.1
Flori	60%	01_M_FL_conc_60	0.1
Flori	80%	01_M_FL_conc_80	0.1
Flori	96%	01_M_FL_conc_100	0.1
Frunze	20%	01_M_FR_conc_20	0.1
Frunze	40%	01_M_FR_conc_40	0.1
Frunze	60%	01_M_FR_conc_60	0.1
Frunze	80%	01_M_FR_conc_80	0.1

Frunze	96%	01_M_FR_conc_100	0.1
Tulpină	20%	01_M_T_conc_20	0.1
Tulpină	40%	01_M_T_conc_40	0.1
Tulpină	60%	01_M_T_conc_60	0.1
Tulpină	60%	01_M_T_conc_60	1
Tulpină	80%	01_M_T_conc_80	0.1
Tulpină	80%	01_M_T_conc_80	1
Tulpină	96%	01_M_T_conc_100	1
Rădăcină	20%	01_M_R_conc_20	0.1
Rădăcină	20%	01_M_R_conc_20	1
Rădăcină	40%	01_M_R_conc_40	1
Rădăcină	60%	01_M_R_conc_60	0.1
Rădăcină	80%	01_M_R_conc_80	1
Rădăcină	96%	01_M_R_conc_100	1

Tabel A.3.3.4. Condiții de obținere a extractelor din *S. marianum* L. (armurariu)
(neconcentrate)

Parte din plantă	Concentrație	Notație	ML extract utilizat pentru soluția standard (x)
Semințe	20%	01_Arm_Se_20_cod_005ml	0.05
Semințe	40%	01_Arm_Se_40_cod_05ml	0.5
Semințe	40%	01_Arm_Se_40_cod_02ml	0.2
Semințe	60%	01_Arm_Se_60_cod_02ml	0.2
Semințe	80%	01_Arm_Se_80_cod_02ml (fara D5)	0.2
Semințe	96%	01_Arm_Se_100_cod_02ml	0.2

Tabel A.3.3.5. Condiții de obținere a extractelor din *S. marianum* L. (armurariu)
(concentrate)

Parte din plantă	Concentrație	Notație	ML extract utilizat pentru soluția standard (x)
Semințe	20%	01_Arm_Se_20_conc_cod_01ml	0.1
Semințe	40%	01_Arm_Se_40_conc_cod_01ml	0.1
Semințe	60%	01_Arm_Se_60_conc_cod_01ml	0.1
Semințe	80%	01_Arm_Se_80_conc_cod_01ml	0.1
Semințe	96%	01_Arm_Se_100_conc_cod_01ml	0.1
Semințe	96%	01_Arm_Se_100_conc_cod_001ml	0.01

Tabel A.3.3.6. Condiții de obținere a extractelor din *M. chamomilla* L. (mușețel) și *S. marianum* L. (armurariu)

Notație (pe fiolă)	Plantă	Parte din plantă	Notație	ML extract utilizat pentru soluția standard (x)
5	Mușețel	Rădăcină	01_M_R_100_cod_01ml	0.1
6	Mușețel	Tulpină	01_M_T_100_cod_01ml	0.1
6'	Mușețel	Tulpină	01_M_T6'_100_cod_01ml	0.1
7	Mușețel	Frunze	01_M_Fr_100_cod_01ml	0.1
8	Mușețel	Flori	01_M_Fl_100_cod_01ml	0.1
9	Armurariu	Semințe	01_A_S_100_cod_01ml	0.1
9'	Armurariu	Semințe	01_A_S_100_cod_001ml	0.01

Tabel A.3.3.7. Date experimentale privind obținerea curbei de etalonare UV-VIS silibină

Nr	Conc. (ug/ml)	Abs.
1	2.5	0.167
2	5	0.363
3	10	0.719
4	15	1.355
5	20	1.416
6	25	1.761
7	30	2.076
8	35	2.389
9	40	2.576

Tabel A.3.3.8. Date experimentale privind obținerea curbei de etalonare UV-VIS silimarină

Nr	Conc. (ug/ml)	Abs.
1	3	0.111619
2	6	0.229782
3	12	0.450433
4	18	0.701577
5	24	0.932729
6	30	1.150348
7	36	1.379107
8	42	1.610462
9	48	1.821439

Tabel A.3.3.9. Date experimentale privind obținerea curbei de etalonare UV-VIS pentru extractul etanolic de *S. marianum L.* (amurariu)

Nr	Conc. (ul/ml)	Abs.
1	0.25	0.131
2	0.5	0.193
3	1	0.341
4	1.5	0.512
5	2	0.671
6	2.5	0.863
7	3	1.030
8	3.5	1.191
9	4	1.355

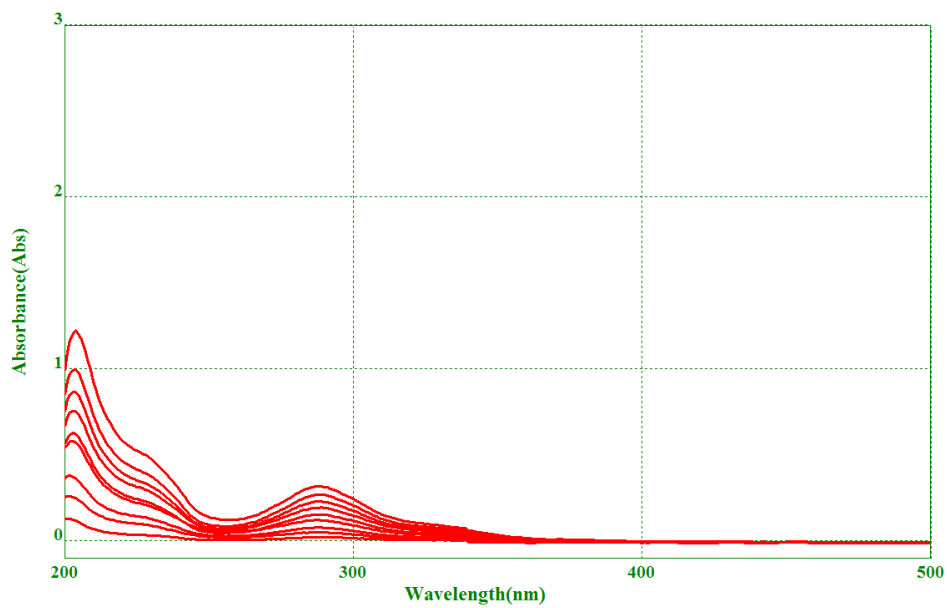
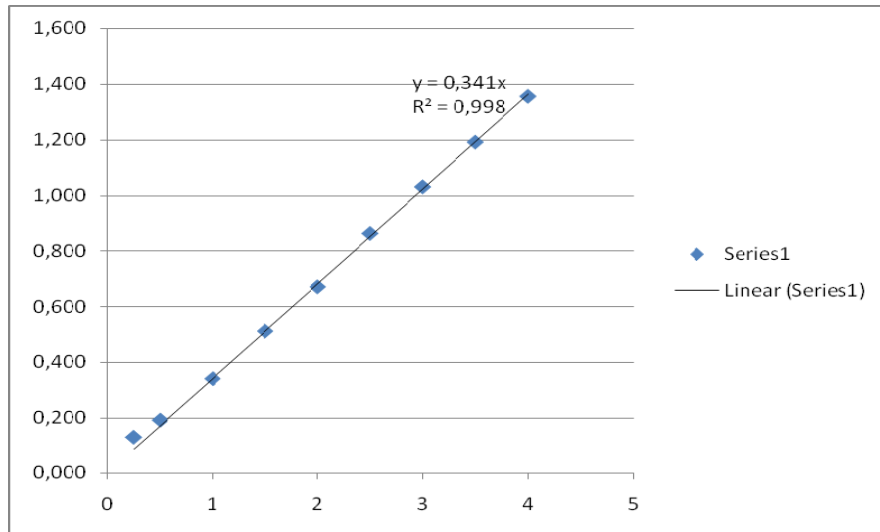


Figura A.3.3.1. Curba de etalonare și analizele UV-VIS pentru extractele etanolice 96% de *S. marianum* L. (armurariu) la diferite diluții (cod:Arm_0.01 ml)

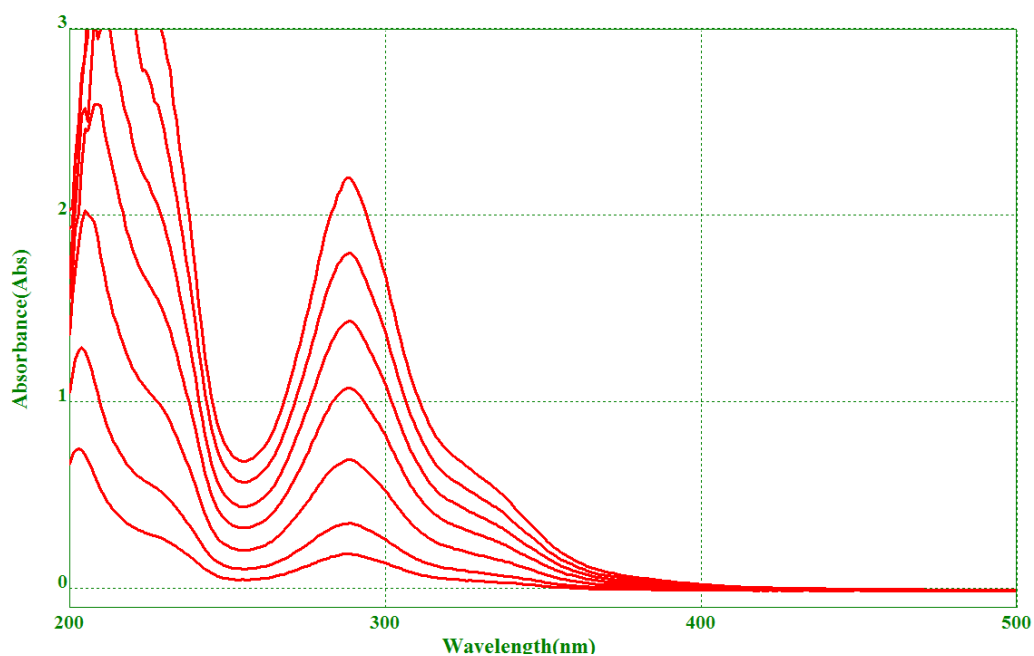


Figura A.3.3.2. Analizele UV-VIS pentru extractul etanolic 96% de *S. marianum* L. (armurariu) la diferite diluții (cod: Arm_0.1 ml)

Tabel A.3.3.10. Date experimentale privind obținerea curbei de etalonare UV-VIS pentru extractul etanolic de *M. chamomilla* (mușețel - floare)

Nr	Conc. (ul/ml)	Abs.
1	5	0.060
2	10	0.105
3	20	0.213
4	30	0.332
5	40	0.440
6	50	0.570
7	60	0.676
8	70	0.801
9	80	0.917

Tabel A.3.3.11. Date experimentale privind obținerea curbei de etalonare UV-VIS pentru extractul etanolic de *M. chamomilla* (mușetel - frunze)

Nr	Conc. (ul/ml)	Abs.
1	5	0.226
2	10	0.270
3	20	0.461
4	30	0.703
5	40	0.932
6	50	1.178
7	60	1.439
8	70	1.676
9	80	1.930

Tabel A.3.3.12. Date experimentale privind obținerea curbei de etalonare UV-VIS pentru extractul etanolic de *M. chamomilla* (mușetel - rădăcină)

Nr	Conc. (ul/ml)	Abs.
1	5	0.183
2	10	0.208
3	20	0.334
4	30	0.511
5	40	0.691
6	50	0.862
7	60	1.039
8	70	1.172
9	80	1.349

Tabel A.3.3.13. Date experimentale privind obținerea curbei de etalonare UV-VIS pentru extractul etanolic de *M. chamomilla* (mușetel - tulpină)

Nr	Conc. (ul/ml)	Abs.
1	5	0.046
2	10	0.092
3	20	0.187
4	30	0.280
5	40	0.373
6	50	0.481
7	60	0.568
8	70	0.669
9	80	0.762

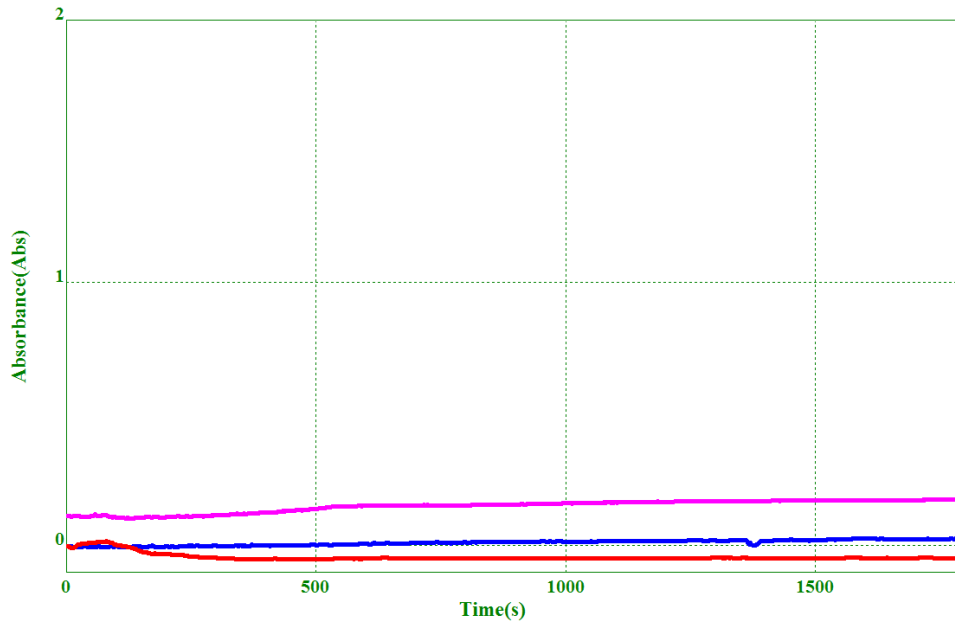


Figura A.3.3.3. Evaluarea spectrofotometrică (288nm) a eliberării silibinei din complexul de *S. marianum* L. (armurariu) / β -CD (cod:Arm_bCD)

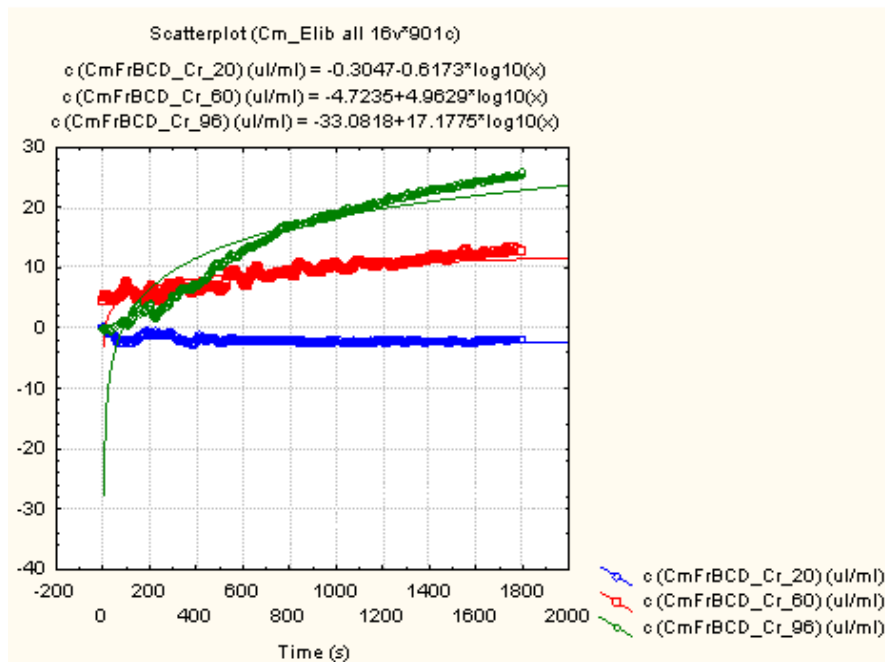


Figura A.3.3.4. Evaluarea eliberării controlate a compușilor bioactivi (ca amestec de biocompuși) din complexul de *M. chamomilla* L./ β -CD(cod:Cm_Fr_bCD)

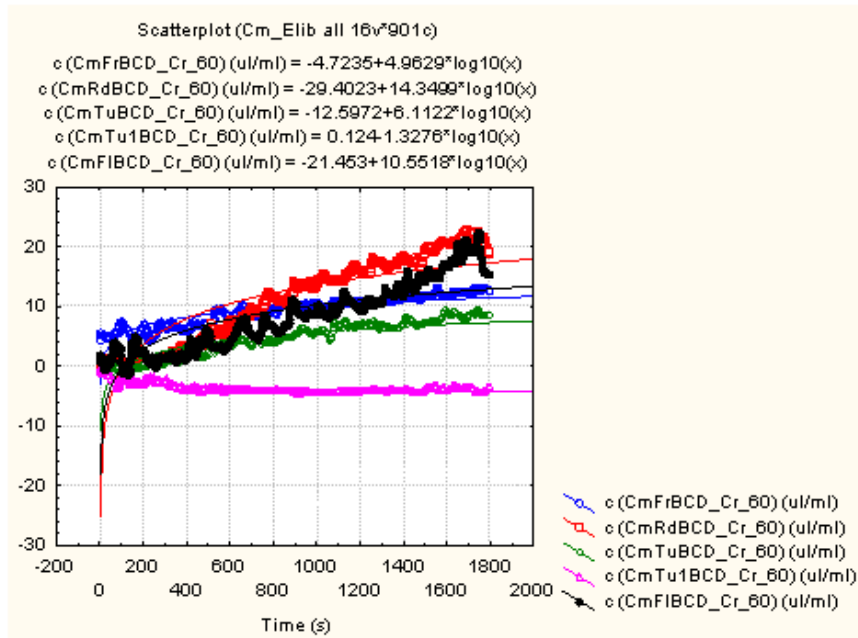


Figura A.3.3.5. Evaluarea eliberării controlate a compușilor bioactivi (ca amestec de biocompuși) din complexii de *M. chamomilla* L./ β -CD (cod:Cm_parte plantă_bCD) (în etanol 60%)

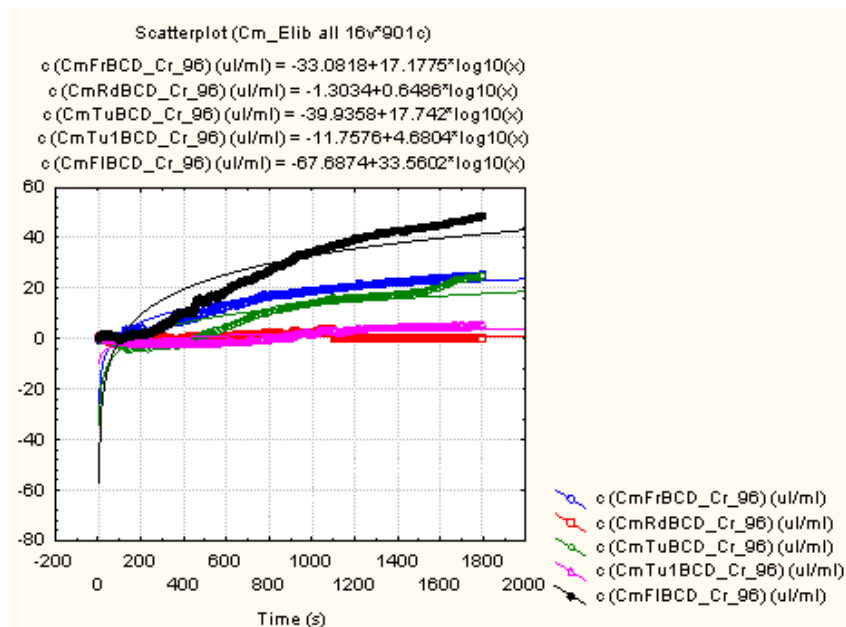


Figura A.3.3.6. Evaluarea eliberării controlate a compușilor bioactivi (ca amestec de biocompuși) din complexii de *M. chamomilla* L./ β -CD (cod:Cm_parte plantă_bCD) (în etanol 96%)

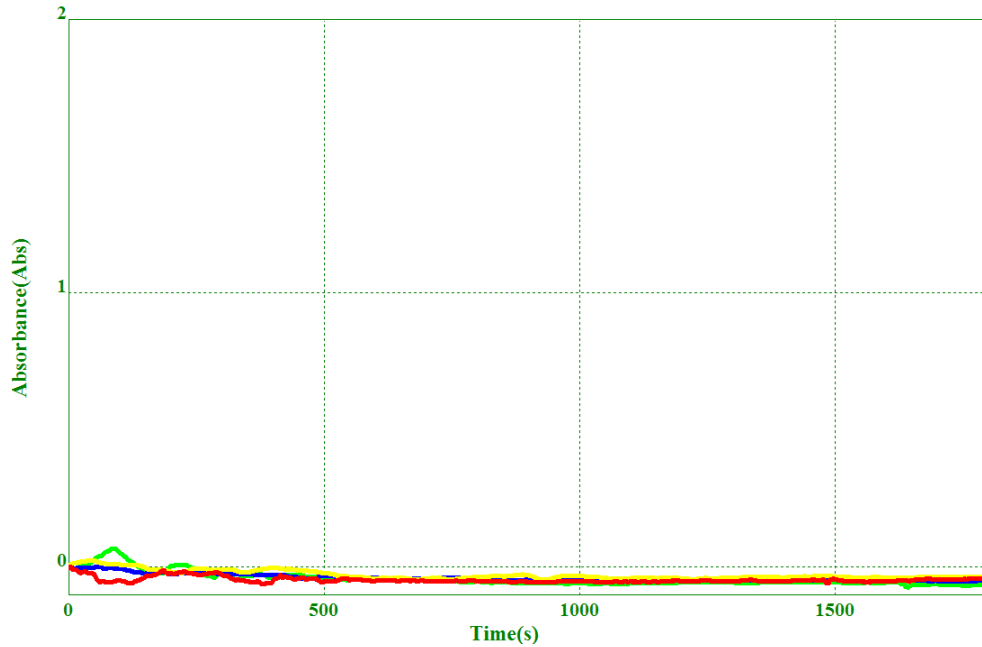


Figura A.3.3.7. Evaluarea spectrofotometrică (288nm) a eliberării silibinei din complexii de *M. chamomilla* L./ β -CD (cod:Cm_parte plantă_20 (Fr-roșu, Rd-galben, Tu-albastru, Fl-verde) (în etanol 20%)

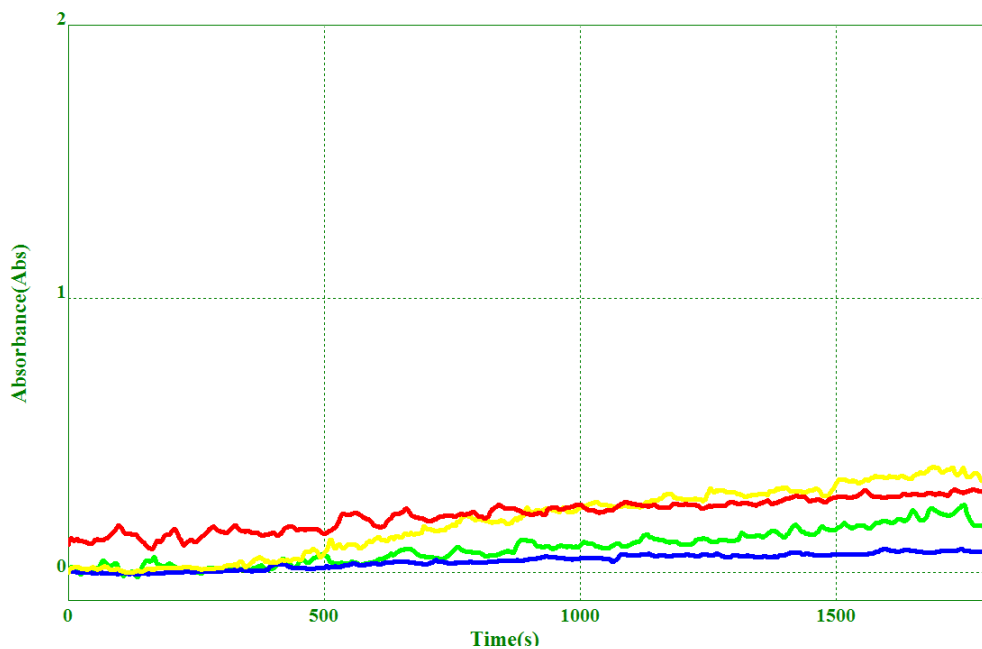


Figura A.3.3.8. Evaluarea spectrofotometrică (288nm) a eliberării silibinei din complexii de *M. chamomilla* L./ β -CD (cod:Cm_parte plantă_60) (în etanol 60%)

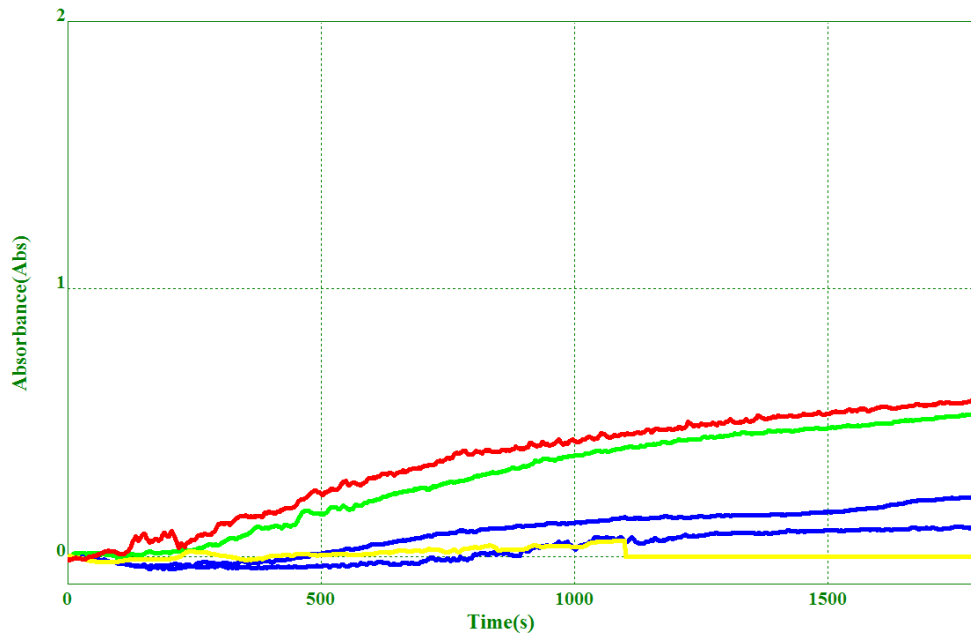


Figura A.3.3.9. Evaluarea spectrofotometrică (288nm) a eliberării silibinei din complexii de *M. chamomilla* L./ β -CD (cod:Cm_parte plantă_96) (în etanol 96%)

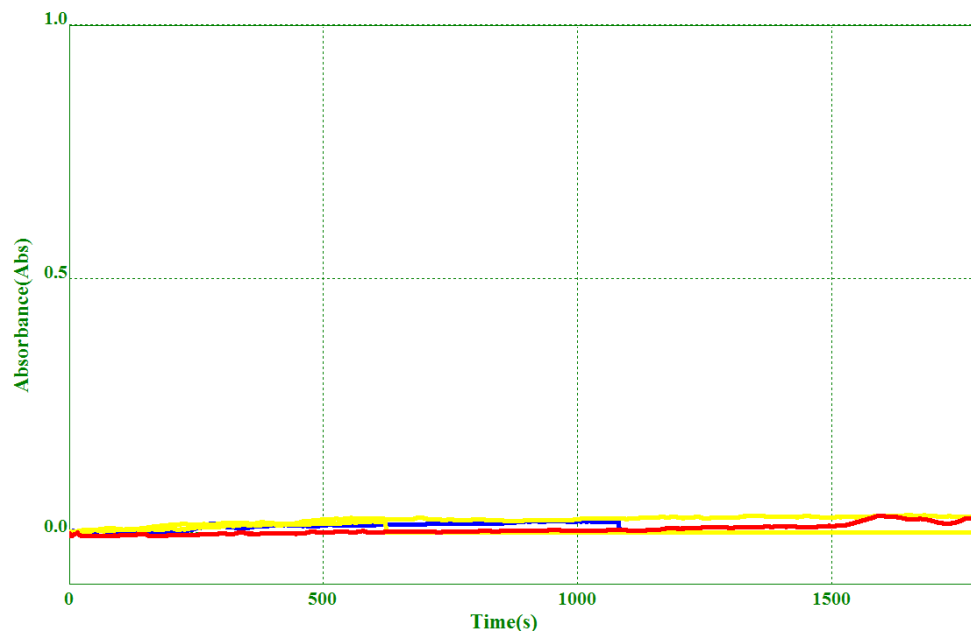


Figura A.3.3.10. Evaluarea spectrofotometrică (288 nm) a eliberării silibinei din complexii cu α -, β - și HP- β -ciclodextrină (în etanol 20%) Silibina_20 (aCD-roșu, bCD-galben, HPbCD-albastru)

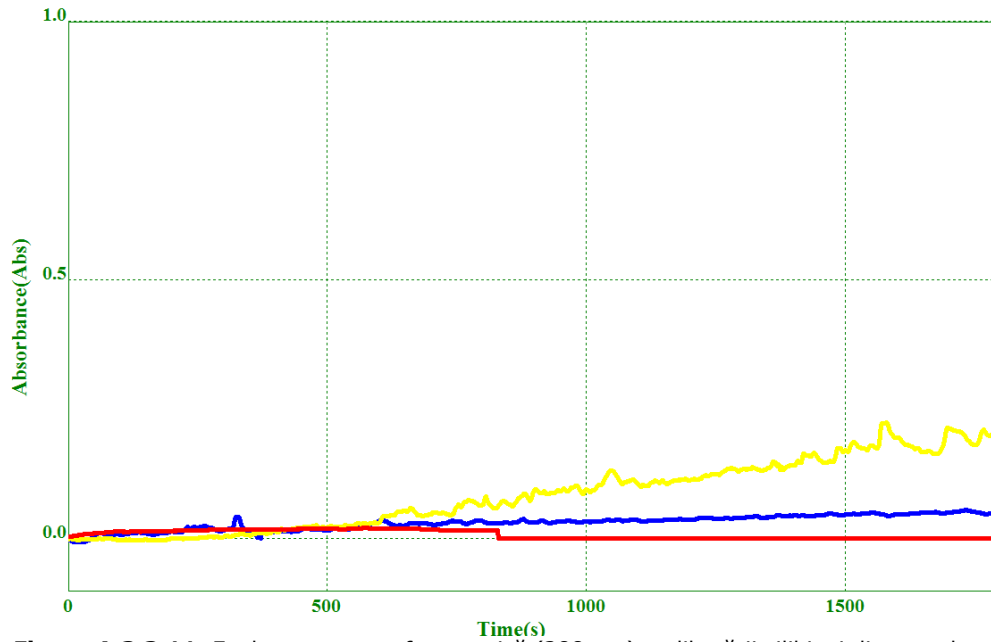


Figura A.3.3.11. Evaluarea spectrofotometrică (288 nm) a eliberării silibinei din complexii cu α -, β - și HP- β -ciclodextrină (în etanol 60%) Silibina_60 (aCD-roșu, bCD-galben, HPbCD-albastru)

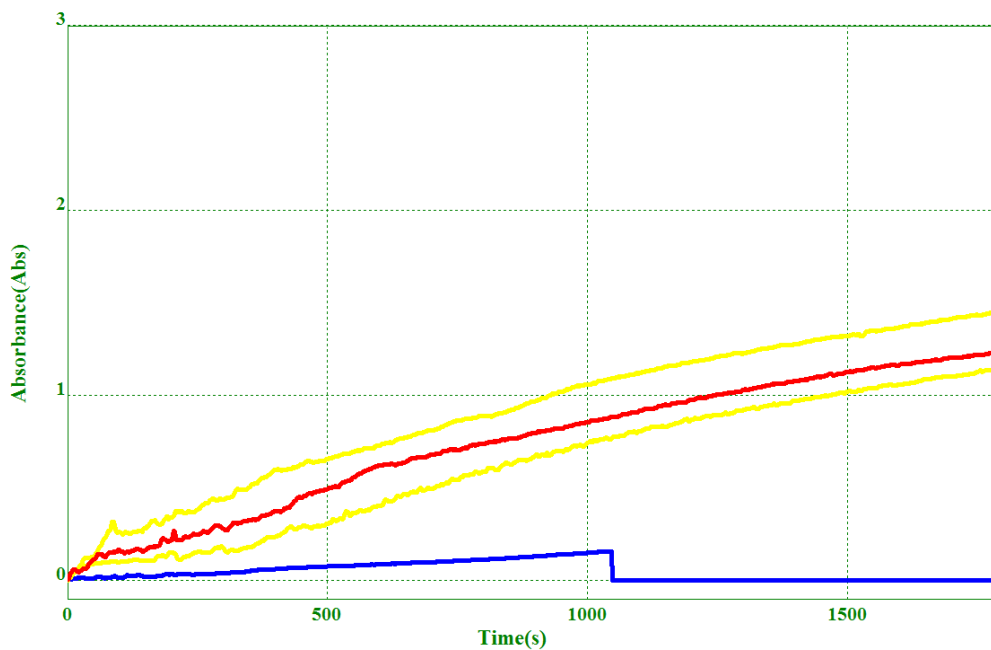


Figura A.3.3.12. Evaluarea spectrofotometrică (288 nm) a eliberării silibinei din complexii cu α -, β - și HP- β -ciclodextrină (în etanol 96%) Silibina_96 (aCD-roșu, bCD-galben, HPbCD-albastru)

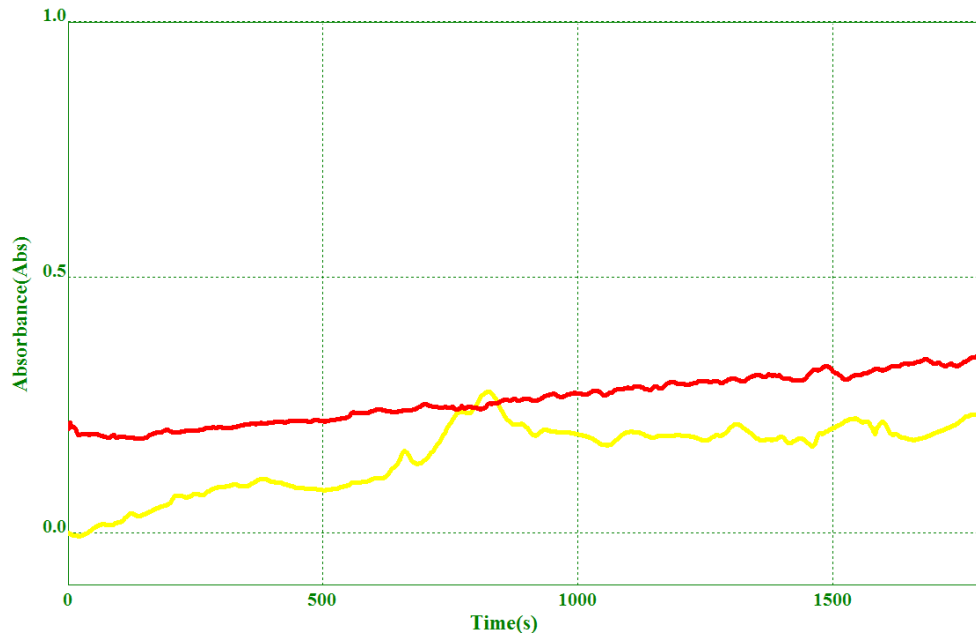


Figura A.3.3.13. Evaluarea spectrofotometrică (288 nm) a eliberării compușilor bioactivi din complexii silimarinei cu α -, β - și HP- β -ciclodextrină (în etanol 20%) Silimarin_20 (aCD-roșu, bCD-galben, HPbCD-albastru)

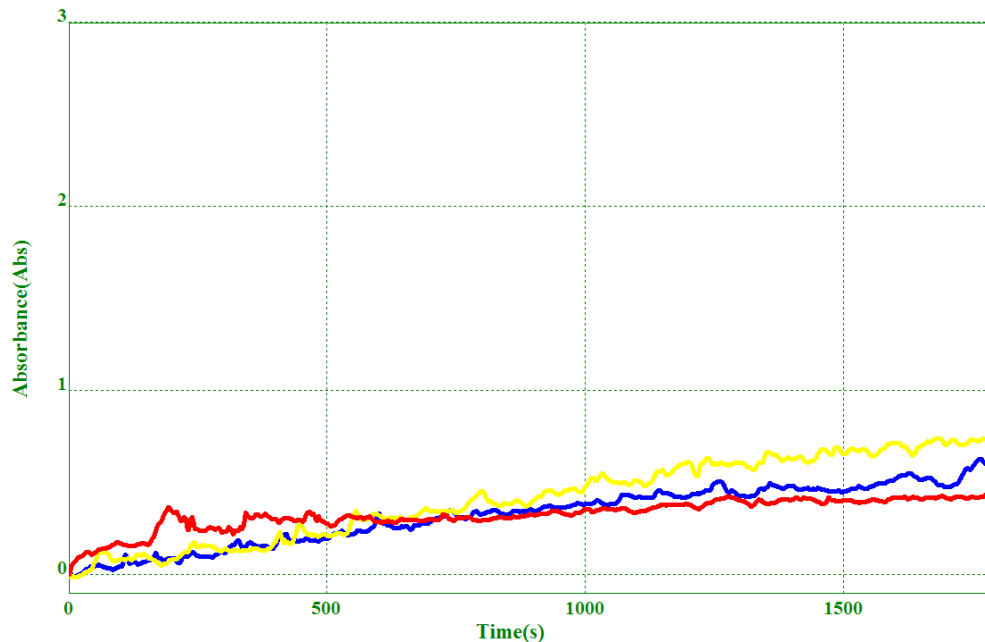


Figura A.3.3.14. Evaluarea spectrofotometrică (288 nm) a eliberării compușilor bioactivi din complexii silimarinei cu α -, β - și HP- β -ciclodextrină (în etanol 60%) Silimarin_60 (aCD-roșu, bCD-galben, HPbCD-albastru)

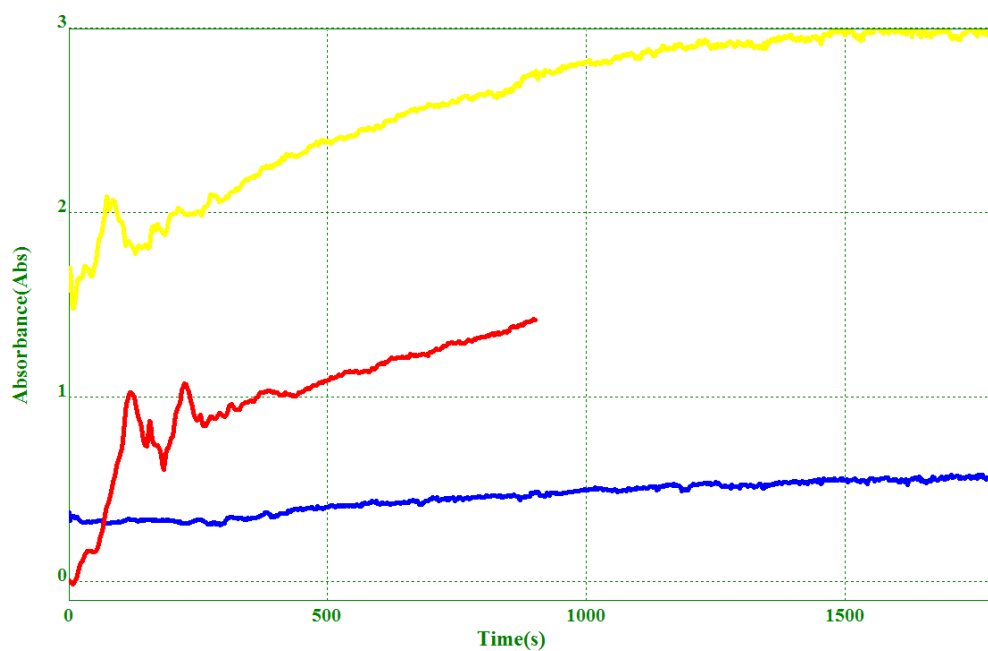


Figura A.3.3.15. Evaluarea spectrofotometrică (288 nm) a eliberării compușilor bioactivi din complexii silimarinei cu α -, β - și HP- β -ciclodextrină (în etanol 96%), Silimarín_96 (aCD-roșu, bCD-galben, HPbCD-albastru)

