

FLAVONOIDE ȘI BIOCONJUGAȚI CU ACTIVITATE BIOLOGICĂ: OBȚINERE, ANALIZĂ ȘI BIODISPONIBILIZARE PRIN ÎNCAPSULARE MOLECULARĂ

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

Ing. Iulia Andreea PÎNZARU

Conducător științific: prof.univ.dr.ing. Francisc PETER
Referenți științifici: prof.univ.dr. ing. Dan CIUBOTARIU
prof.univ.dr. Vasile OSTAFE
conf.univ.dr.ing. Mihai MEDELEANU

Ziua susținerii tezei: 29.11.2011

Seriile Teze de doctorat ale UPT sunt:

- | | |
|------------------------|---|
| 1. Automatică | 7. Inginerie Electronică și Telecomunicații |
| 2. Chimie | 8. Inginerie Industrială |
| 3. Energetică | 9. Inginerie Mecanică |
| 4. Ingineria Chimică | 10. Știința Calculatoarelor |
| 5. Inginerie Civilă | 11. Știința și Ingineria Materialelor |
| 6. Inginerie Electrică | |

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, 2006

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

Teza de doctorat a fost elaborată pe parcursul activității prestate în perioada stagiului de doctorand cu frecvență la Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului a Universității "POLITEHNICA" din Timișoara.

Pentru realizarea acestei teze doresc să-i adresez mulțumiri deosebite conducătorului științific, domnul Prof. dr. ing. Francisc PETER, pentru competența îndrumare și sprijinul științific și moral acordat pe parcursul întregii perioade de doctorat.

De asemenea, doresc să aduc alese mulțumiri domnului Ș.I. dr. ing. Daniel HĂDĂRUGĂ pentru tot ce m-a învățat, pentru sprijinul moral și științific acordat.

Îmi exprim întreaga considerație față de membrii comisiei de doctorat, domnul președinte al comisiei Prof. dr. ing. Lucian Mircea RUSNAC, decanul Facultății de Chimie Industrială și Ingineria Mediului din Timișoara și domnii Prof. dr. ing. Dan CIUBOTARIU de la Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” din Timișoara, Prof. univ. dr. Vasile OSTAFE de la Universitatea de Vest din Timișoara și Conf. dr. ing. Mihai MEDELEANU de la Universitatea „Politehnica” din Timișoara, care au răspuns solicitării de a face parte din comisia de analiză a tezei și pentru timpul acordat lucrării.

Doresc să mulțumesc totodată domnului Prof. dr. ing. Constantin DĂESCU datorită căruia am ales frumoasa și, în același timp, laborioasă cale a cercetării.

Adresez mulțumiri CNCSIS-UEFISCSU pentru finanțarea cercetărilor prin Programul Planul Național II, grantul nr 62072 / 2008.

Mulțumesc colegilor mei de la departamentul CAICON pentru tot sprijinul acordat, în special doamnei Volica DAMȘA, domnului Asist. ing. Zlatimir Stanoiev, domnului Conf. dr. ing. Geza Bandur, domnului Asist. dr. ing. Valentin Badea și doamnei Asist. dr. ing. Cristina Paul și, de asemenea, țin să mulțumesc doamnei Conf. dr. ing. Nicoleta Hădărugă de la Facultatea de Tehnologia Produselor Agroalimentare a Universității de Științe Agricole a Banatului din Timișoara.

Nu în ultimul rând, doresc să mulțumesc soțului meu, fiilor mei, părinților și fraților mei pentru răbdarea, sprijinul și încurajările acordate pe parcursul acestor ani de doctorat.

Timișoara, noiembrie 2011

Iulia Andreea Pînzaru

Soțului meu, fiilor mei, părinților și fraților mei

Pînzaru, Iulia Andreea

FLAVONOIDE ȘI BIOCONJUGAȚI CU ACTIVITATE BIOLOGICĂ: OBTINERE, ANALIZĂ ȘI BIODISPONIBILIZARE PRIN ÎNCAPSULARE MOLECULARĂ

Teze de doctorat ale UPT, Seria 4, Nr. 54, Editura Politehnica, 2011, 254 pagini, 144 figuri, 27 tabele.

ISSN: 1842-8223

ISBN: 978-606-554-398-0

Cuvinte cheie:

flavonoide, acizi grași, bioconjuğați, ciclodextrine, biodisponibilizare

Rezumat:

Substanțele polifenolice, între care se numără și flavonoidele, reprezintă una dintre cele mai importante clase de compuși naturali care dispun de o remarcabilă activitate biologică. Utilizarea lor este limitată de stabilitatea redusă și solubilitatea redusă a acestora, atât în solvenți organici cât și în soluții apoase. Pentru a elimina aceste inconveniente, flavonoidele pot fi transformate în derivați glicozilați sau acilați, prin metode chimice, enzimatiche sau chemoenzimatiche. Metodele enzimatiche sunt mai eficiente, pentru că ele oferă posibilitatea de a fi exploatată regioselectivitatea ridicată a acestor biocatalizatori, realizând o funcționalizare selectivă a flavonoidei. Transformarea flavonoidelor în bioconjuğați prin acilare cu acizi carboxilici de diverse structuri oferă posibilitatea de a introduce în molecula lor o altă funcțiune biologic activă și de a modifica astfel în sens pozitiv nu numai proprietăți fizice ca solubilitatea, ci și activitatea biologică.

Protejarea și în special eliberarea controlată a diverselor molecule organice se realizează aproape exclusiv prin intermediul compușilor încapsulați. Ciclodextrinele fac parte din clasa celor mai utilizați receptori din chimia incluziunii gazdă-oaspete, fiind utilizați preponderent în industriile alimentară, cosmetică și farmaceutică. Avantajele încapsulării în ciclodextrine a substanțelor cu activitate biologică sunt: îmbunătățirea biodisponibilității, creșterea stabilității, reducerea efectelor secundare.

Până în prezent, nu există date de literatură referitoare la compușii de incluziune ai ciclodextrinelor cu bioconjuğați de tipul esterilor flavonoidelor și nici la modelarea moleculară a unor asemenea complecși.

Cercetările efectuate în cadrul prezentei teze de doctorat au avut următoarele obiective principale: obținerea de bioconjuğați pe calea esterificării enzimatiche directe a flavonoidelor cu acizi grași saturați și nesaturați; identificarea, separarea și caracterizarea acestor bioconjuğați prin tehnici cromatografice și spectrometrice; modelarea moleculară a interacțiunii bioconjuğaților cu ciclodextrinele; obținerea compușilor de incluziune ai ciclodextrinelor cu flavonoide, acizi grași (saturați și nesaturați) și bioconjuğații acestora prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă și studii de activități antioxidante și transferului prin membrană a sistemelor supramoleculare obținute.

CUPRINS

Introducere	7
Abrevieri	9
1. Studiu documentar	11
1.1. Flavonoide	11
1.1.1. Introducere	11
1.1.2. Structura și proprietățile flavonoidelor	11
1.1.3. Identificarea, separarea și caracterizarea flavonoidelor	14
1.1.4. Biosinteza flavonoidelor	18
1.1.5. Utilizări	20
1.2. Acizi grași	21
1.2.1. Introducere	21
1.2.2. Biodegradarea acizilor grași	21
1.2.3. Autooxidarea acizilor grași	23
1.2.4. Protejarea cu antioxidanți a acizilor grași	25
1.3. Bioconjuțați flavonoide/acizi grași	26
1.3.1. Acilarea flavonoidelor pe calea sintezei chimice	26
1.3.2. Acilarea flavonoidelor pe calea sintezei biocatalitice	33
1.4. Ciclodextrine	38
1.4.1. Introducere	38
1.4.2. Obținerea ciclodextrinelor	40
1.4.3. Derivatizarea ciclodextrinelor	43
1.4.4. Analiza ciclodextrinelor	44
1.4.5. Compuși de incluziune – complecși	44
1.4.6. Metode de analiză ale complecșilor	48
1.4.7. Avantajele încapsulării compușilor bioactivi	48
2. Contribuții originale	52
2.1. Sinteza enzimatică a unor bioconjuțați ai flavonoidelor	52
2.1.1. Esterificarea enzimatică	52
2.1.1.1. Acilarea enzimatică a flavonoidelor agliconice	56
2.1.1.2. Acilarea rutinei și silibininei. Influența solventului organic și a cantității de apă din sistemul de reacție	58
2.1.2. Separarea și purificarea bioconjuțaților	63
2.1.3. Caracterizarea bioconjuțaților purificați	66
2.1.3.1. Spectroscopia FT-IR	66
2.1.3.2. Spectrometria RMN	68
2.1.4. Concluzii parțiale	74
2.2. Modelarea moleculară a bioconjuțaților flavonoide/acizi grași și docarea în ciclodextrine	75
2.2.1. Bioconjuțați flavonoide/acizi grași	76
2.2.2. Ciclodextrine	87
2.2.3. Modelarea moleculară a interacțiunii bioconjuțați/ciclodextrine	90
2.2.4. Concluzii parțiale	99
2.3. Sisteme supramoleculare – Compuși de incluziune	100
2.3.1. Sisteme supramoleculare flavonoide/ciclodextrine	100
2.3.1.1. Analiza prin spectroscopie FT-IR	102

2.3.1.2. Analiza prin calorimetrie cu scanare diferențială (DSC)	104
2.3.1.3. Analiza prin microscopie electronică cu scanare	107
2.3.1.4. Analiza concentrației de apă prin titrare Karl-Fischer	109
2.3.1.5. Studiul activității antioxidante	112
2.3.2. Sisteme supramoleculare acizi grași/ciclodextrine	118
2.3.2.1. Analiza prin spectroscopie FT-IR	119
2.3.2.2. Analiza prin calorimetrie cu scanare diferențială (DSC)	122
2.3.2.3. Analiza prin microscopie electronică cu scanare	124
2.3.2.4. Analiza concentrației de apă prin titrare Karl-Fischer	125
2.3.3. Sisteme supramoleculare bioconjugate/ciclodextrine	128
2.3.3.1. Analiza prin spectroscopie FT-IR	129
2.3.3.2. Analiza prin calorimetrie cu scanare diferențială (DSC)	131
2.3.3.3. Studiul activității antioxidante a bioconjugatilor	133
2.3.3.4. Studiu asupra transferului prin membrană	138
2.3.4. Concluzii parțiale	140
3. Partea experimentală	142
3.1. Materiale utilizate	142
3.2. Metoda generală de obținere a bioconjugatilor	142
3.3. Modelarea moleculară	145
3.3.1. Materiale și metode	145
3.4. Metoda generală de obținere a compușilor de incluziune	146
3.5. Metode de analiză	148
3.5.1. Analiza concentrației de apă prin titrare Karl-Fischer	148
3.5.2. Analiza TLC	148
3.5.3. Analiza HPLC	148
3.5.4. Extracția lichid-lichid	149
3.5.5. Separarea pe coloană cromatografică	149
3.5.6. Spectroscopia FT-IR	150
3.5.7. Spectrometria RMN	150
3.5.8. Analiza prin calorimetrie de scanare diferențială (DSC)	150
3.5.9. Analiza prin microscopie electronică cu scanare	150
3.5.10. Determinarea activității antioxidante	151
3.5.11. Evaluarea transferului prin membrană	152
4. Concluzii finale	153
Bibliografie	156
Anexe	168
Anexa A	168
Anexa B	194
Anexa C	207
Lista de lucrări	250

INTRODUCERE

Un domeniu de mare interes și perspectivă în perioada actuală este cel al compușilor naturali. Un număr din ce în ce mai mare de asemenea compuși sunt utilizați atât în terapeutică, cât și pentru menținerea sănătății și prevenirea îmbolnăvirilor. Substanțele polifenolice, între care se numără și flavonoidele, reprezintă una dintre cele mai importante clase de compuși naturali.

Este foarte bine cunoscut faptul că flavonoidele, atât cele agliconice cât și cele glicozilate dispun de o remarcabilă activitate biologică. Efectele favorabile ale flavonoidelor pot fi grupate în jurul următoarelor procese biochimice: efect antioxidant și/sau fixarea radicalilor liberi, efect antiinflamator și de influență a funcționării sistemului imunitar, efect împotriva astmului și alergiilor, modificarea, în general inhibarea funcționării enzimelor, efect antibacterian și antivirotic, efect estrogen/antiestrogen (caracteristic numai izoflavonoidelor), efect antimutagen, efect de modificare, în principal de inhibare a proceselor legate de malformațiile cancerigene, efect hepatoprotector, efect asupra funcționării sistemului vascular, în special a capilarelor. În prezent, o mare varietate de flavonoide se utilizează în diferite suplimente alimentare, dar această utilizare este limitată de stabilitatea lor redusă și solubilitatea lor redusă, atât în solvenți organici cât și în soluții apoase.

Pentru a elimina aceste inconveniente, flavonoidele pot fi transformate în derivați glicozilați sau acilați, prin metode chimice, enzimatică sau chemoenzimatică. Metodele enzimatică sunt mai eficiente, pentru că ele oferă posibilitatea de a fi exploatată regioselectivitatea ridicată a acestor biocatalizatori, realizând o funcționalizare selectivă a flavonoidei. Transformarea flavonoidelor în bioconjugăți prin acilare cu acizi carboxilici de diverse structuri oferă posibilitatea de a introduce în molecula lor o altă funcțiune biologic activă și de a modifica astfel în sens pozitiv nu numai proprietăți fizice ca solubilitatea, ci și activitatea biologică. Această activitate biologică este determinată de structura flavonoidei, iar obținerea unui bioconjugat prin acilare enzimatică va putea avea efecte benefice, depinzând de poziția în care are loc substituția și de natura substituentului.

Acilarea se face și pentru a stabili funcțiunea fenolică, a crește lipofilicitatea și permeabilitatea prin membrană cu ajutorul grupării acil.

Este foarte dificilă realizarea unui echilibru între dorința de a îmbunătăți stabilitatea și solubilitatea flavonoidelor și menținerea proprietăților bioactive ale

acestora, având în vedere faptul că poziția acilării (regioselectivitatea) poate modifica drastic aceste proprietăți.

Sensibilitatea crescută la degradare și inactivare a compușilor bioactivi naturali (lipide, vitamine, peptide, acizi grași, antioxidanți, minerale, probiotice) a făcut posibilă dezvoltarea rapidă a tehnicilor de protejare a acestora. Cerința obligatorie este aceea de a proteja compușii bioactivi de degradările chimice (oxidare, hidroliză), fără a le modifica proprietățile. Protejarea și în special eliberarea controlată a diverselor molecule organice se realizează aproape exclusiv prin intermediul compușilor încapsulați. Ciclodextrinele fac parte din clasa celor mai utilizați receptori din chimia incluziunii gazdă-oaspete, fiind utilizați preponderent în industriile alimentară, cosmetică și farmaceutică. Avantajele încapsulării în ciclodextrine a substanțelor cu activitate biologică sunt: îmbunătățirea biodisponibilității, creșterea stabilității, reducerea efectelor secundare.

Până în prezent, nu există date de literatură referitoare la compușii de incluziune ai ciclodextrinelor cu bioconjuugați de tipul esterilor flavonoidelor și nici la modelarea moleculară a unor asemenea complecși.

Cercetările efectuate în cadrul prezentei teze de doctorat au avut următoarele obiective principale:

- obținerea de bioconjuugați pe calea esterificării enzimaticice directe a flavonoidelor (agliconice, glicozilate și flavonolignani) cu acizi grași saturați și nesaturați;

- identificarea, separarea și caracterizarea acestor bioconjuugați prin tehnici cromatografice și spectrometrice;

- modelarea moleculară a interacțiunii bioconjuugaților obținuți cu ciclodextrinele, utilizând programe de mecanică moleculară specifice și compararea rezultatelor obținute privind energiile de interacțiune cu cele rezultate din analiza DSC;

- obținerea compușilor de incluziune ai ciclodextrinelor cu flavonoide, acizi grași (saturați și nesaturați) și bioconjuugații acestora prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă și studiul activității antioxidante și transferului prin membrană a sistemelor supramoleculare obținute.

Cercetările din cadrul acestei teze au fost efectuate în cadrul colaborării dintre Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului a Universității „Politehnica” din Timișoara și Facultatea de Tehnologia Produselor Agroalimentare a Universității de Științe Agricole a Banatului din Timișoara. Spectrele RMN au fost realizate la Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași iar analizele prin microscopie electronică cu scanare la Centrul de Microscopie Electronică, Cluj Napoca. Costurile cercetărilor efectuate au fost parțial suportate din fondurile alocate contractului de cercetare „Nanoparticule hepatoprotectoare cu biodisponibilitate crescută (Nano-HEPAT)”, din Planul Național PN II, cod PN2 62072 / 2008.

ABREVIERI

LLE – extracție lichid-lichid (liquid-liquid extraction)
SE – extracție cu solvenți (solvent extraction)
SPME – micro-extracție pe fază solidă (solid phase micro-extraction)
SPE – extracție pe fază solidă (solid-phase extraction)
FID – detecție prin ionizare în flacără (flame ionization detection)
ECD – detecție prin captură de electroni (electron capture detection)
Q-MS – spectrometrie de masă cu cuadrupoli (quadrupole mass spectroscopy)
QqQ – triplu cuadrupol (triple quadrupole)
IT – trapă ionică (ion trap)
TOF – timp de zbor (time of flight)
CF FAB – bombardament în flux continuu cu atomi rapizi (continuous flow fast atom bombardment)
SIMS – spectrometrie de masă cu ioni secundari (secondary ion mass spectrometry)
ED – detecție electrochimică (electrochemical detection)
PLE – extracție lichidă sub presiune (pressurized liquid extraction)
ESI – ionizare prin electrospray (electrospray ionization)
APCI – ionizare chimică la presiune atmosferică (atmospheric-pressure chemical ionization)
CE – electroforeză capilară (capillary electrophoresis)
ROS – speciile reactive ale oxigenului
CoA – coenzima A
CAL B - lipază din *Candida antarctica* B
AK – lipază din *Pseudomonas fluorescens* (Amano Lipase AK)
PS – lipază din *Pseudomonas cepacia* (Amano Lipase PS)
An – lipază din *Aspergillus niger*
CGT – ciclodextrin glucozil transferază (cyclodextrin glucosil transferase)
COSY – spectroscopie de corelare (correlation spectroscopy)
HSQC – heteronuclear single quantum correlation
HMBC – heteronuclear multiple bond correlation
TFA – acid trifluoracetic
THF – tetrahidrofuran
DMF – dimetilformamidă
DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
 α CD – alfa-ciclodextrina
 β CD – beta-ciclodextrina
 γ CD – gama-ciclodextrina
HP β CD – hidroxipropil-beta-ciclodextrina
HP γ CD – hidroxipropil-gama-ciclodextrina
DM β CD – heptakis (2,6-di-O-metil) b-ciclodextrina

1. STUDIU DOCUMENTAR

1.1. Flavonoide

1.1.1. Introducere

Majoritatea plantelor medicinale își datorează calitățile terapeutice unor anumiți compuși aflați în componența acestora, cunoscuți sub denumirea de flavonoide (bioflavonoide pentru a scoate în evidență activitatea biologică).

Flavonoidele sunt un grup de compuși naturali, polifenolici care se găsesc în numeroase plante, fructe și băuturi. Forma în care acestea predomină este cea glicozilată, agliconii aferenți fiind mai rar întâlniți. Până în prezent au fost descoperite mai mult de 9000 de flavonoide în natură, dar teoretic numărul acestora ar putea fi mult mai mare dacă se au în vedere posibilitățile de substituție (cu radicali hidroxi, metoxi, metil etc.) la schelet (figura 1.1). Mai mult decât atât, fiecare grupare hidroxil din structura flavonoidelor și chiar unele grupări CH din schelet pot fi glicozilate cu diferite zaharuri, care la rândul lor pot fi substituie [1, 2].

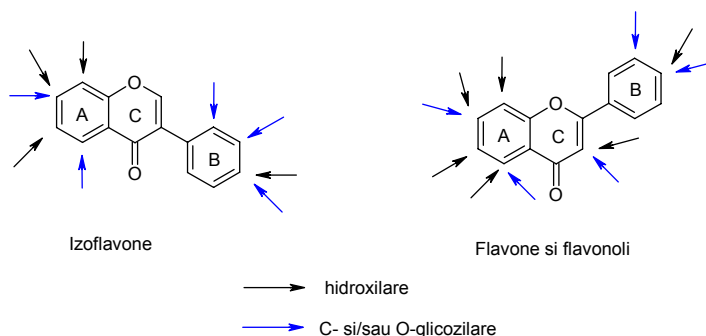


Figura 1.1. Modul de substituție în cazul izoflavonelor și flavonelor

1.1.2. Structura și proprietățile flavonoidelor

Termenul "flavonoida" este un termen generic, care include clasa de compuși formați din scheletul $C_6-C_3-C_6$, mai exact conține structura fenilbenzo[b]piran. În funcție de poziția de legare a inelului aromatic la jumătatea benzopiranică (cromanică), acest grup de compuși naturali poate fi împărțit în trei clase: flavonoide (2-fenilbenzopirani), izoflavonoide (3-fenilbenzopirani) și neoflavonoide (4-fenilbenzopirani) (figura 1.2). Aceste trei clase au în comun precursorul *calcona* (1,3-difenil-2-propen-1-ona) fiind astfel înrudite biogenetic și structural [1].

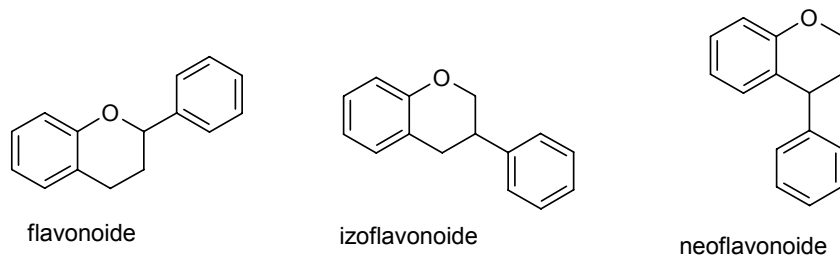


Figura 1.2. Structura de bază a flavonoidelor

Clasa 2-fenilbenzopiraniilor, se poate împărți, în urma oxidării și saturării inelului heterociclic C, în următoarele subclase, descrise în figura 1.3:

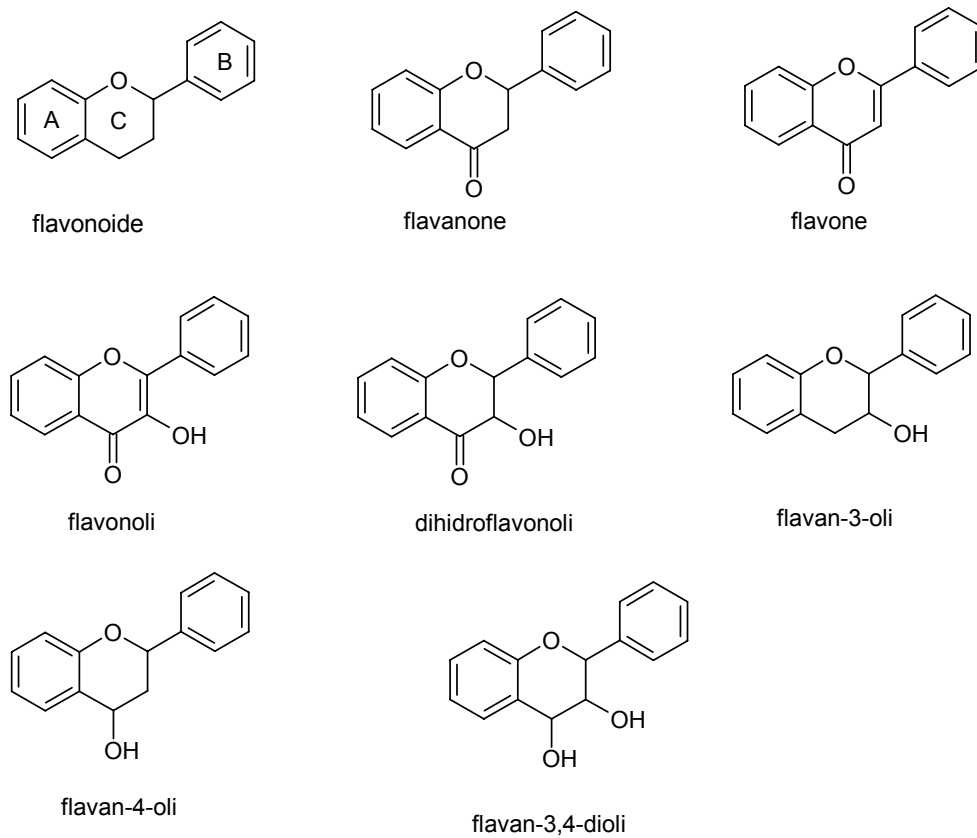


Figura 1.3. Structura derivaților 2-fenilbenzopiraniilor

Izoflavonoidele posedă scheletul 3-fenilcroman care este derivat biogenetic prin migrarea grupării 1,2-aryl a precursorului 2-fenilcroman, și pot fi împărțite în subclasele (figura 1.4):

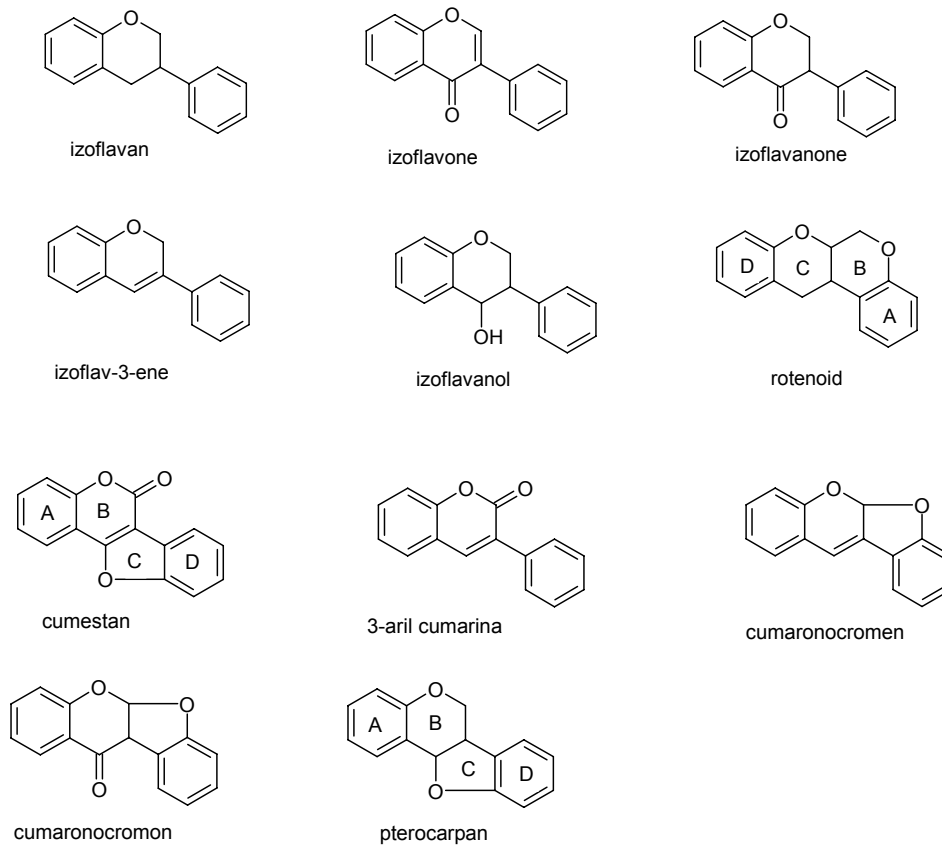


Figura 1.4. Structura izoflavonoidelor

Neoflavonoidele sunt apropiate biogenetic și structural flavonoidelor și izoflavonoidelor și cuprind 4-arylumarinele (4-aryl-2H-1-benzopirano-2-onele), 3,4-dihidro-arylumarinele și neoflavenele (figura 1.5):

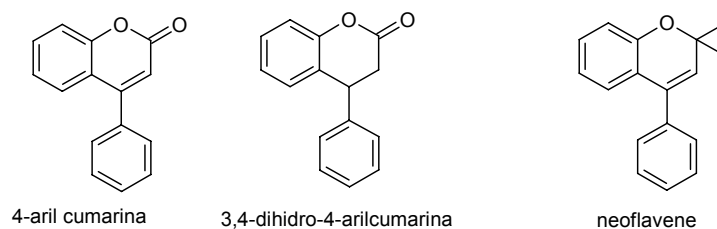


Figura 1.5. Structura neoflavonoidelor

Pe lângă aceste trei mari clase mai întâlnim flavonoidele minore care sunt produși naturali cum ar fi calconele și auroanele, care de asemenea posedă scheletul carbonic $C_6-C_3-C_6$. Acest grup de compuși include 2'-hidroxicalcone, 2'-hidroxi-dihidrocalcone, 2'-hidroxi-*retro*-calcone, auroanele (2-benzilidencumaronele) și auronoli (figura 1.6):

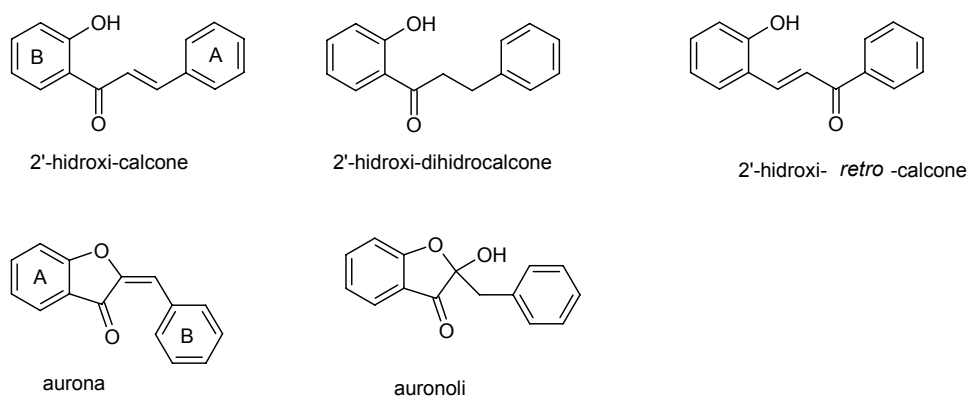


Figura 1.6. Flavonoide minore

Flavonoidele sunt solide cristaline a căror culoare variază între nuanțe albivoire și galben intens. Heterozidele sunt solubile în apă caldă, alcool, solvenți polari și sunt insolubile în solvenți organici nepolari. Sunt de asemenea solubile în soluții alcaline, acestea conferindu-le o culoare galbenă care dispare la adăugarea de acizi. Flavonoidele prezintă spectru de absorbție în domeniul ultraviolet cu maxime caracteristice variabile în funcție de tipul flavonoidului ceea ce permite identificarea lor.

1.1.3. Identificarea, separarea și caracterizarea flavonoidelor

În figura 1.7 este dată o schemă generală de izolare, separare și identificare a flavonoidelor, care ilustrează complexitatea acestor procese.

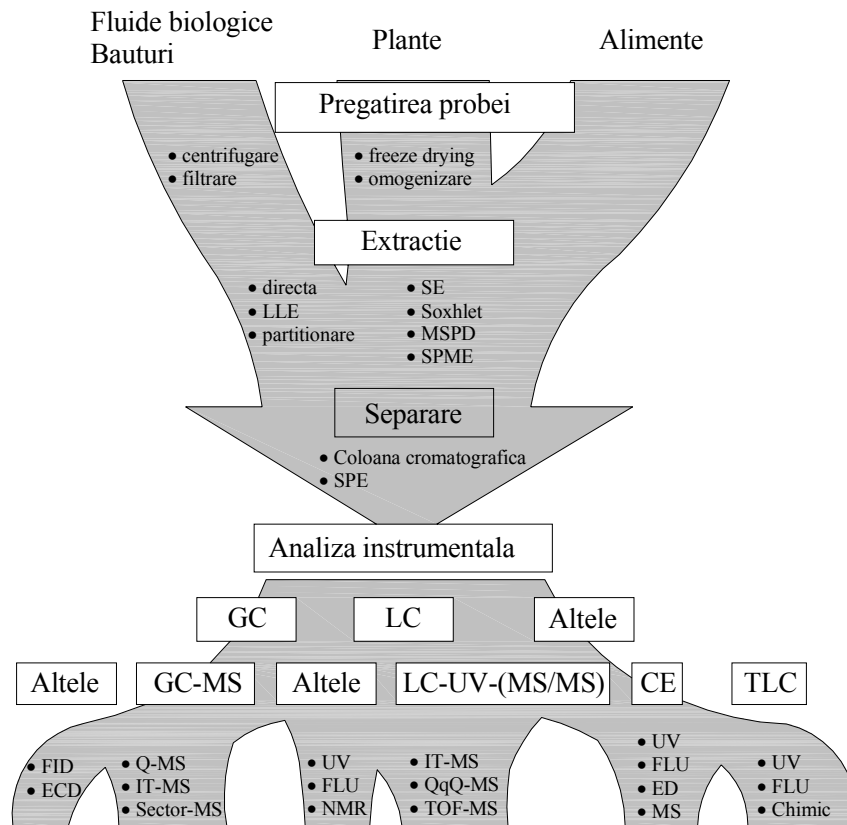


Figura 1.7. Shema generală a izolării, separării și identificării flavonoidelor [3]

În regnul vegetal diferite familii de plante au tipare caracteristice de flavonoide și conjugați ai acestora. Acești compuși joacă roluri biochimice și fiziologice deosebit de importante, în diferite tipuri de celule sau organe (semințe, rădăcină, frunze, tulpină, fructe). În interacțiunile plantei cu mediu înconjurător, cu factorii de stres biotici și abiotici, flavonoidele își etalează diversele funcțiuni [4]. În plus, datorită prezenței uzuale a conjugaților flavonoidelor în plante, aceștia au un rol important în dieta umană și animală. Acești metaboliți secundari ai plantelor, datorită activității biologice pe care o posedă pot avea consecințe serioase asupra sănătății, atât pozitive cât și negative [4-8]. Din motivele enumerate mai sus, un rol crucial în cercetările efectuate în diferitele domenii ale științelor medicale și biologice, îl are analiza eficientă și reproductibilă a flavonoidelor.

Identificarea și caracterizarea structurală a flavonoidelor și conjugaților acestora, din plante, ca și compuși individuali sau amestec de compuși, a creat probleme datorită prezenței formelor izomere a flavonoidelor agliconice și a formelor glicozilate diferite. De aceea, în cele mai multe cazuri, pentru identificarea exactă a compușilor necunoscuți este necesară analiza cu ajutorul rezonanței magnetice nucleare ($^1\text{H-RMN}$ și $^{13}\text{C-RMN}$); alte metode nu reușesc să furnizeze informațiile

necesare stabilirii exacte a structurilor (spectroscopia de masă - MS, spectroscopia în domeniul ultraviolet – vizibil - UV-VIS, spectroscopia în infraroșu - IR). La fel de importantă, în analiză, este utilizarea standardelor când se cunosc anumiți compuși prezenți în amestec. În ultimii ani, un domeniu important de cercetare este cel de identificare a metaboliților flavonoidelor în țesuturile animale și fluidele organismului (urină, sânge, lichid cefalorahidian), cercetătorii confruntându-se în acest caz cu diferite modificări a flavonoidelor inexistente în plante [9]. Metabolizarea flavonoidelor în organismele uman și animal, de cele mai multe ori se bazează pe procese de glucuronilare, sulfatare, metilare [10, 11].

Izolarea flavonoidelor și conjugărilor din materialul biologic

Pot fi aplicate diferite metode de izolare a produșilor naturali, dar strategiile de abordare se stabilesc în funcție de originea materialului din care urmează să fie extrași aceștia (plante, țesuturi animale sau fluidele organismului). În cazul flavonoidelor se ține cont în primul rând de identificarea pe cât posibil a componentelor individuale, pentru a putea stabili cât mai exact cărui fapt se datorează proprietățile biologice ale acestora. Prezența în mediu a carbohidraților și/sau a substraturilor lipofile poate avea o influență asupra compoziției (atât calitativă cât și cantitativă) extractului obținut. De aspectele prezentate anterior trebuie ținut cont la prepararea probelor și la extracția propriu-zisă.

Utilizarea materialului vegetal uscat poate cauza serioase pierderi, ținând cont de faptul că flavonoidele glicozilate sunt instabile la temperaturile ridicate necesare uscării materialului. În cazul flavonoidelor agliconice (prezente în frunze sau rădăcini) se pot utiliza pentru spălare diverși solvenți mai puțin polari (clorura de metilen, eterul etilic, dietil eterul sau acetatul de etil); flavonoidele glicozilate sunt solubile în solvenți mai polari (metanol, etanol) de aceea aceștia sunt utilizați la extracțiile cu aparate Soxhlet, unde pentru început se face extracția cu hexan pentru îndepărtarea lipidelor, ulterior cu etanol pentru extracția polifenolilor [85]. De cele mai multe ori, la extracția din materialul biologic solid, se folosește amestecul alcool-apă în diferite proporții. Pentru a crește eficiența separării se folosesc tehnici suplimentare, ca: ultrasonarea [12, 13], PLE (pressurized liquid extraction) procedură ce necesită temperaturi cuprinse între 60-200°C [14], extracția cu fluide supercritice cu dioxid de carbon [15]. În orice caz, condițiile de temperatură trebuie alese atent deoarece se poate ajunge la degradarea termică a derivaților flavonoidelor. În cazurile în care este necesară purificarea sau concentrarea fracțiunilor obținute cel mai des se utilizează LLE și SPE. Luând în considerare studiile laborioase care se fac pentru stabilirea proprietăților farmacologice a flavonoidelor alegerea procedurii de extracție joacă un rol determinant. Au fost publicate studii care prezintă strategiile de izolare și determinare a polifenolilor activi din plante sau produse alimentare [16, 17].

Pentru izolarea componentelor individual din extracte care conțin compuși necaracterizați sunt necesare metode cromatografice robuste. Ca faze staționare sunt folosite, în cromatografia pe coloană, poliamida, Sephadex LH-20 și silicagelul; este de asemenea crucială alegerea amestecului de solvenți optim, de multe ori fiind nevoie de utilizarea de gradienti a mai multor faze polare (fază normală) sau mai mulți solvenți hidrofobi (fază inversă). Cu toate acestea compușii obținuți de cele mai multe ori nu sunt puri, fiind necesare metode spectrometrice pentru stabilirea exactă a structurilor (UV-VIS, MS, RMN).

Pentru separarea flavonoidelor folosind metoda HPLC, condițiile cromatografice recomandate în general constau din utilizarea unei coloane C₁₈ cu

fază inversă, a unui detector UV-VIS cu șir de diode și a unui sistem binar de solvenți alcătuit din apă acidifiată (solventul A) și un solvent organic polar (solvent B) [33].

Metoda HPLC reprezintă cea mai potrivită alegere pentru identificarea flavonoidelor deoarece metodele de separare sunt deja bine stabilite și cuplarea cu MS este ușor de realizat.

Pentru izolarea flavonoidelor din probele lichide (băuturi) sau lichide fiziologice se abordează de obicei două căi: prima dintre ele este bazată pe extracția lichid-lichid, iar cea de-a doua pe SPE. În cazul lichidelor fiziologice se apelează la proceduri speciale ținând cont de activitatea diferitelor enzime prezente în mediu care pot duce la degradarea flavonoidelor, știut fiind faptul că, conjugății acestora pot fi hidrolizați enzimatic de sulfataze și glucuronidaze, înainte de a fi izolate și analizate.

Caracterizarea structurală a flavonoidelor

Caracterizarea compușilor individuali

Toate metodele fizico-chimice utilizate în chimia organică sunt folosite la identificarea și caracterizarea flavonoidelor și derivaților acestora.

De departe cea mai uzuală metodă pentru analiza structurală a unui compus este rezonanța magnetică nucleară. În anul 1960 a fost inițiată prima analiză pentru caracterizarea flavonoidelor utilizând ^1H -RMN, care ulterior împreună cu ^{13}C -RMN a devenit esențială în stabilirea exactă a flavonoidelor agliconice și glicozilate. În literatura de specialitate sunt numeroase studii prezentate și se observă o creștere rapidă a acestora în ultimii ani [18-21].

Spectroscopia de masă este o metodă analitică sensibilă, care oferă date structurale semnificative pentru probe mai mici de 1 mg la utilizarea în combinație cu diferite derivatizări chimice a compușilor caracterizați [22-24].

Izolarea și caracterizarea conjugăților flavonoidelor din amestecuri

În ultimele decenii, analiza gaz-cromatografică a fost utilizată pentru separarea flavonoidelor din amestecuri, dar în ciuda eficienței bune la separare a acestei metode, este necesară derivatizarea produșilor, lucru care îi scade aplicabilitatea. Procedura de derivatizare (metilare sau trimetilsilanizare) are limitele ei; la folosirea analizei GC-MS (cromatografie de gaze cuplată cu spectroscopie de masă), predomină spectrele de masă a compușilor silanizați care sunt dominate de fragmentele produșilor rezultați la eliminarea grupărilor silil, pe de altă parte pot avea loc anumite rearanjări moleculare pe parcursul metilării grupărilor hidroxil ale flavonoidelor, apărând noi compuși în amestecul de reacție în urma derivatizării (un exemplu concret fiind cel al flavanonei care se transformă în calcone). Există desigur și excepții, rezultate bune obținându-se la analiza MS a flavonolilor metilați, flavonolilor sau izoflavonolilor [25, 26]. Separarea cromatografică a trimetilsilanilor derivaților pentru un amestec dat este mai bună decât cea a derivaților metilați, dar spectrul de masă a izoflavonolilor metilate oferă mai multe informații decât cel al derivaților silil.

Alte două tehnici cromatografice, LC și CE permit separarea simultană a flavonoidelor agliconice și a celor glicozilate, fără a fi necesară derivatizarea acestora. Combinarea acestora cu MS permite utilizarea metodelor de ionizare. Cele

mai folosite sunt ionizările la presiune atmosferică, ESI și APCI, dar de menționat sunt o serie de metode: SIMS, CF FAB, CID MS/MS, UV DAD etc [27, 29].

Mai multe studii descriu combinarea diferitelor detectoare cuplate în linie, astfel că, de departe cel mai promițător sistem, care oferă o caracterizare structurală exactă, este cel format din UV DAD-RMN-MS, analiza extractelor din plante utilizând acest sistem fiind făcută pentru prima dată în anul 1998 [30]. S-a testat și sistemul LC-RMN, pentru prima dată în anul 1978 [31], ulterior fără mari progrese până în ultima decadă [32, 33], deoarece marea problemă a acestei metode este sensibilitatea scăzută a RMN-ului datorită solvenților protonați utilizați la RP HPLC, care acoperă unele semnale ale protonilor analizați. Unele din aceste probleme au fost rezolvate parțial în ultimii ani: utilizarea câmpurilor magnetice de intensitate mare în spectrometre conectate la HPLC a dat rezultate satisfăcătoare [34]; aplicarea modului „stop-flow” ce presupune prelungirea timpului de achiziție de date a spectrului RMN cu până la câteva zile [35-43].

Informații structurale crescute, la utilizarea sistemului LC-MS, se pot obține când se apelează la un tandem MS; MSⁿ poate oferi informații despre structura flavonoidelor agliconice [44, 45], poate face diferențierea între pozițiile C-6 și C-8 ale formelor glicozilate [46, 47] și se pot trage concluzii referitoare la O-glicozilare [48].

Există un interes crescut pentru metabolizarea acestor compuși datorită activităților biologice de care dispun și faptului că sunt consumate în mod frecvent atât de om cât și de animale, provenind din natură. Cele mai studiate sunt fitoestrogenii (izoflavonoidele – derivații genisteinului) și antioxidanții (flavonele, flavonolii, antocianinele). Tehnicile MS sunt esențiale în caracterizarea acestora, folosite în special în combinație cu sistemele cromatografice cu detectoare puternice (GC, LC, CE) care permit identificarea compușilor doriți din amestecuri complexe.

1.1.4. Biosinteza flavonoidelor

Fiecare grup de flavonoide posedă proprietăți chimice unice și are o distribuție particulară în plante. Flavanonele sunt întâlnite în concentrații mari în citrice, flavonele în speciile de plante cu frunze verzi, ca de exemplu pătrunjelul, izoflavonele în legume, flavonolii în majoritatea fructelor și legumelor din dieta umană. Antocianinele (antocianidinele glicozilate) și proantocianidinele (polimerii rezultați la hidroliza antocianidinelor) sunt responsabile pentru culoarea plantelor și florilor, și se găsesc în concentrații ridicate în pericarpul strugurilor roșii, în vinul roșu și în afine, zmeură, fragi. Flavan-3-olii sunt denumiți și „polifenolii din ceai” [141, 142].

Asocierea beneficiilor vinului, ciocolatei, dietelor bogate în fructe și vegetale cu culorile roșu, albastru, violet (pigmenții) găsite în plante asupra sănătății, a stârnit interesul oamenilor de știință, astfel că biosinteza flavonoidelor a devenit una dintre cele mai studiate căi metabolice secundare, caracteristice regnului vegetal. Până în prezent sunt descrise în literatură peste 9000 de flavonoide și derivați ai acestora, iar pentru numeroase specii de plante au fost elucidate căile responsabile pentru biosinteza acestora, figura 1.8 [2, 49-52, 93]. Biosinteza flavonoidelor se realizează într-o primă etapă, prin condensarea acidului hidroxicinamic activat cu trei molecule de acid malonic activat. Producții rezultați în urma condensării (ciclizare 1,6), calcone, se află în echilibru cu flavanonele (echilibru deplasat spre flavanone) iar producții rezultați în urma unei ciclizări 2,7 sunt stilbenii. Pe o cale de biosinteză

sunt transformate flavanonele în flavone, iar pe o altă cale sunt transformate în flavanonoli, care la rândul lor sunt transformați în flavandioli, flavanoli și flavonoli, precum și în antocianidine prin endioli și enoli.

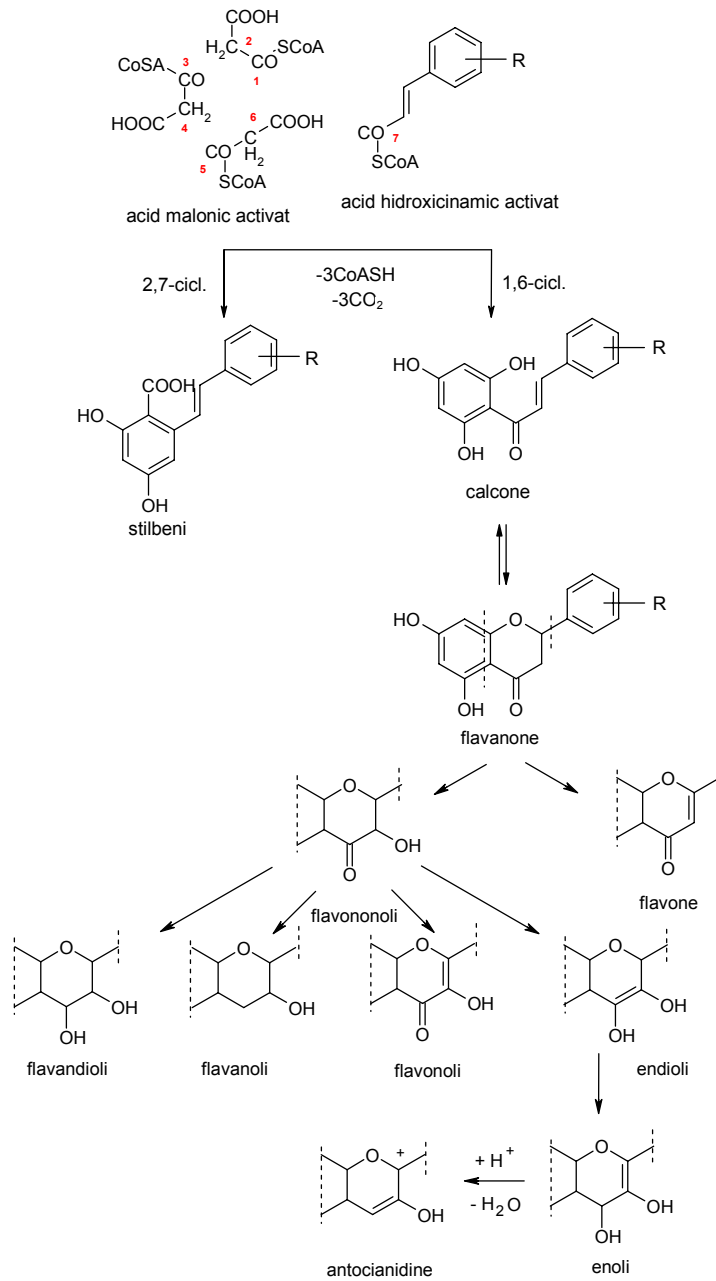


Figura 1.8. Biosinteza flavonoidelor [93]

1.1.5. Utilizări

Interesul crescut pentru flavonoide datorită beneficiilor asupra sănătății umane își are originea în anii '30, mai exact anul 1936, când au fost descoperite de cercetătorul ungar Szent-Gyorgyi (cel care a descoperit întâmplător și vitamina C), care le-a denumit vitamina P.

Pigmenții flavonoidelor sunt utilizați ca markeri vizibili, foarte convenabili în experimentele de genetică moleculară, pentru studiul expresiei genelor [53-57].

În anul 1979 Stephen DeFelice a introdus termenul "nutraceutical", definit ca aliment sau parte a unui aliment cu beneficii asupra sănătății, inclusiv prevenirea și tratarea diferitelor boli, și constând în orice extract nontoxic cu beneficii dovedite asupra organismului [58].

În ceea ce privește flavonoidele, o serie de studii redau prezența acestora în diferite alimente și băuturi (fructe, legume, ceai, cacao și vin) [59, 60]. Ceaiul și ceapa sunt sursa flavonolilor și flavonelor, cea mai des întâlnită în alimente fiind quercetina, dar sunt de menționat și kaempferolul, miricetina, apigenina și luteolina.

Activitatea antioxidantă

Dietele bogate în flavonoide, fructe și legume, și-au dovedit eficiența protectoare împotriva diferitelor boli, în special cele cardiovasculare și a unor tipuri de cancer [61]. Speciile reactive ale oxigenului se formează *in vivo* și pot cauza alterarea ADN-ului, proteinelor și lipidelor, contribuind la îmbătrânirea celulară, mutagenză, carcinogenză, bolile de inimă coronariene, posibil prin destabilizarea membranelor [62-65].

Efectele protectoare ale flavonoidelor în sistemele biologice sunt atribuite capacității lor de a transfera electronii radicalilor liberi, de a lega ionii de metal, de a activa enzimele antioxidante, de a reduce radicalii α -tocoferolici și de a inhiba oxidazele [66-69].

Anticarcinogeneza

O serie de studii *in vitro* au demonstrat inhibarea carcinogenezei de către flavonoide, existând unele dovezi esențiale că acest lucru se produce și *in vivo* [70, 71]. Cele mai studiate flavonoide din acest punct de vedere au fost quercetina, genisteina și daidzeina, antocianinele, dar și cele prezente în ceai. Inhibarea dezvoltării cancerului – efecte antiproliferative (quercetina, taxifolin, nobiletin și tangeretin) [72], inhibarea progresiei ciclului celular (genisteina, genistina, daidzeina și biochanin A [73], quercetina [74, 75], apigenina [76-78], silibinina [79-81]).

Numeroasele studii epidemiologice au arătat că un consum regulat de fructe și legume este asociat cu un risc redus pentru bolile cronice, cum ar fi cancerul și bolile cardiovasculare; mai mult decât atât consumul acestora s-a dovedit a avea un efect antioxidant mult mai puternic decât antioxidanții consacrați β -carotenul, vitamina C, vitamina E [82-84]. Pe baza analizelor, efectele favorabile ale flavonoidelor pot fi grupate astfel: efect antioxidant și/sau fixarea radicalilor liberi; efect antiinflamator și de influență a funcționării sistemului imunitar; efect împotriva astmului și alergiilor; modificarea, în general inhibarea funcționării enzimelor; efect

împotriva virusilor și bacteriilor; efect estrogen/antiestrogen caracteristic numai izoflavonoidelor; efect care influențează mutația survenită în materia genetică (ADN); efect de modificare, în principal de inhibare a proceselor legate de malformațiile cancerigene; efect hepatoprotector; efect care influențează funcționarea sistemului vascular, în special a capilarelor.

1.2. Acizi grași

1.2.1. Introducere

Acizii grași au o importanță relevantă în nutriția umană datorită implicării acestora în procesele metabolice, provenind fie din biosinteza de la acetyl-CoA, fie de la descompunerea grăsimilor și fosfolipidelor. În formă liberă se găsesc foarte rar în organism, fiind transportați în fluxul sanguin complexați cu albumina serică. Acizii grași pot fi saturați (cei mai des întâlniți fiind acizii palmitic și stearic) sau nesaturați (acizii oleic, palmitoleic, linoleic, linolenic), cei nesaturați de origine biologică conținând predominant legături duble *cis*. Mamiferele pot sintetiza acizi grași nesaturați ca acizii oleic și palmitoleic (legătură dublă în poziția 9) dar, nu pot sintetiza acizii linoleic (legături duble în pozițiile 9 și 12) sau linolenic (legături duble în pozițiile 9, 12 și 15) [90, 92, 96]. Acizii grași care nu pot fi sintetizați se numesc „acizi grași esențiali” deoarece trebuie să fie prezenți obligatoriu în dietă [91, 92].

Grăsimile sunt o formă de energie primară în animale și plante, în timp ce oxidarea metabolică a grăsimilor produce o energie de 37 J/g, cea a proteinelor și carbohidraților este de doar 17 kJ/g. O persoană normală cu o greutate de 70 kg poate avea următoarele rezerve de energie: 400,000 kJ din energia grăsimilor, 100,000 kJ din energia proteinelor, 2500 kJ din energia glicogenului și 170 kJ din energia glucozei. Creierul nu poate folosi grăsimile pentru energie și are o afinitate pentru energia stocată de glucoză, în aceste condiții când nivelul de glucoză din sânge scade creierul îl poate ajusta folosind corpii cetonici derivați de la acizii grași [92].

1.2.2 Biodegradarea acizilor grași

Pentru a înțelege căile de oxidare ale acizilor grași se vor prezenta aspectele legate de biodegradarea acestora. Procesele de biodegradare a acizilor grași se realizează pe trei căi, una principală și două secundare, și anume [86, 87]:

- a) biodegradarea pe calea β -oxidării – are loc în mitocondrii și reprezintă principala cale de biodegradare a acizilor grași;
- b) biodegradarea pe calea α -oxidării, respectiv pe calea ω -oxidării – se realizează în ribozomi și reprezintă căi secundare de biodegradare a acizilor grași.

Biodegradarea prin β -oxidare a acizilor grași saturați

Biodegradarea acizilor grași saturați, figura 1.9, a fost explicată inițial admitând că datorită proceselor succesive care au loc la nivelul carbonului Δ în raport cu gruparea hidroxilică, se produce scindarea catenei când rezultă la fiecare scindare o moleculă de acid acetic și un rest de acid gras.

22 Studiu documentar – 1

Ulterior, realizarea biodegradării cu acizi grași marcați (cu deuteriu – ^2H sau carbon 13 – ^{13}C) a confirmat mecanismul descris mai sus.

După descoperirea coenzimei A (CoA sau HS-CoA) s-a demonstrat că acizii grași pot fi degradați numai dacă în prealabil sunt transformați în acilderivați ai coenzimei A, aceasta fiind forma activă a acestora în cursul biodegradării [86].

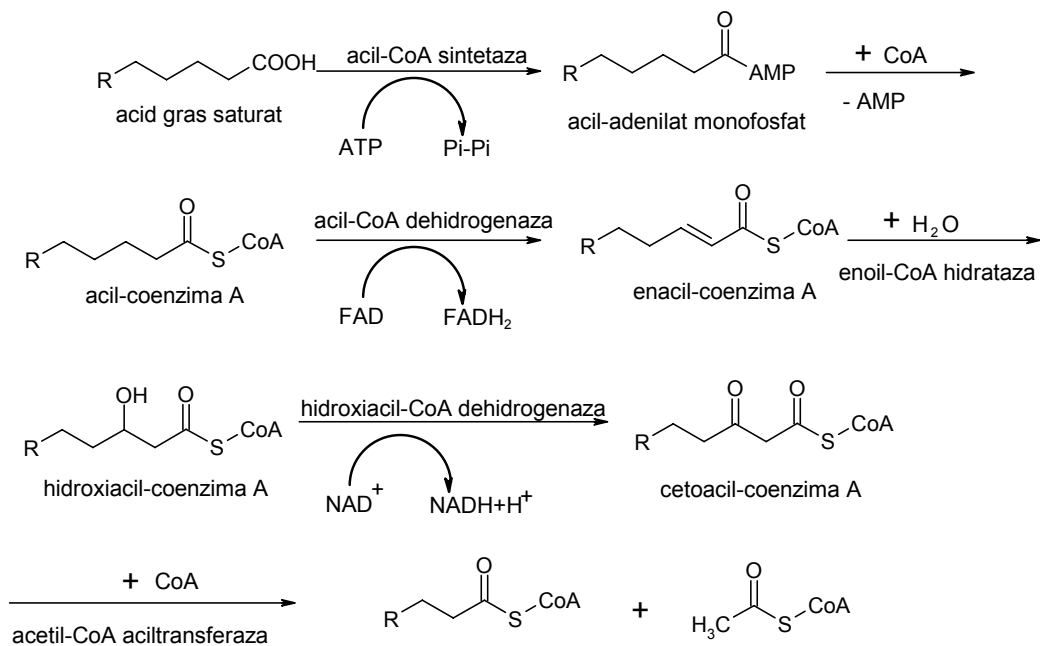


Figura 1.9. Biodegradarea prin β -oxidare a acizilor grași saturați [86]

În acest proces de biodegradare intervin sisteme transportoare enzimatice ca NADPH/ NAD^+ sau FAD/ FADH_2 și adenozintrifosfatul (ATP) care împreună cu coenzima A inițiază procesul de biodegradare.

Acizii grași saturați în prezența acil-CoA sintetazei (tiokinazei) sunt transformați în derivați care în prezență de ATP dau compușii acil-adenilmonofosfați. În etapa următoare, în prezența aceleiași tiokinaze dar cu participarea coenzimei A se formează acil derivatul coenzimei A, care sub acțiunea acil-CoA dehidrogenazei duce la un acil derivat nesaturat. Hidratarea acestui compus în prezența enoil-CoA dehidrogenazei formează hidroxilacil-CoA. Acest din urmă compus sub acțiunea hidroxilacil-CoA dehidrogenazei duce la cetoacil-CoA care într-o ultimă etapă sub acțiunea enzimei acetyl-CoA aciltransferaza este scindat la nivelul legăturii $\text{C}_2\text{-C}_3$ ducând la formarea unui rest de acil-CoA și a unei molecule de acetyl-CoA.

Biodegradarea totală a acizilor grași saturați este posibilă în cazul acizilor grași saturați cu număr par de atomi de carbon când are loc eliberarea succesivă de molecule de acetil-CoA.

1.2.3. Autooxidarea acizilor grași

Ca o reacție a radicalilor liberi, procesul de autooxidare are loc în trei etape, și anume [88]:

Inițierea	$X\cdot + RH \rightarrow R\cdot + XH$
Propagarea	$R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$ $ROO\cdot + R'H \rightarrow ROOH + R'\cdot$
Terminarea	$ROO\cdot + ROO\cdot \rightarrow ROOR + O_2$ $ROO\cdot + R\cdot \rightarrow ROOR$ $R\cdot + R\cdot \rightarrow RR$

Pe lângă aceste trei etape principale se mai întâlnesc și etapele:

Inițiere secundară	$ROOH \rightarrow RO\cdot + \cdot OH$ $2ROOH \rightarrow RO\cdot + ROO\cdot + H_2O$
Inițiere catalizată de metale	$M^{n+} + ROOH \rightarrow RO\cdot + \cdot OH + M^{(n+1)+}$ $M^{(n+1)+} + ROOH \rightarrow ROO\cdot + H^+ + M^{n+}$

Prima reacție este reacția de inițiere în care se formează radicalii liberi. În această etapă se consideră că rolul cel mai important îl are oxigenul singlet, care reprezintă o formă activată a oxigenului molecular și care poate reacționa cu legăturile duble din acizii nesaturați. Reacția de inițiere are loc prin extracția unui atom de hidrogen din poziția α față de dubla legătură.

Următoarele două reacții sunt reacțiile în lanț (de propagare) în care prin adiția oxigenului la dubla legătură se formează radicalii peroxi ($ROO\cdot$), iar acești radicali la rândul lor extrag un hidrogen de la gruparea metilenică nesaturată cu formare de hidroperoxid ($ROOH$) și un nou radical liber. Această secvență se repetă în continuare.

Ultimele trei reacții sunt reacții de terminare a lanțului, penultima dintre ele fiind cea mai importantă, în care se formează un peroxid ($ROOR$).

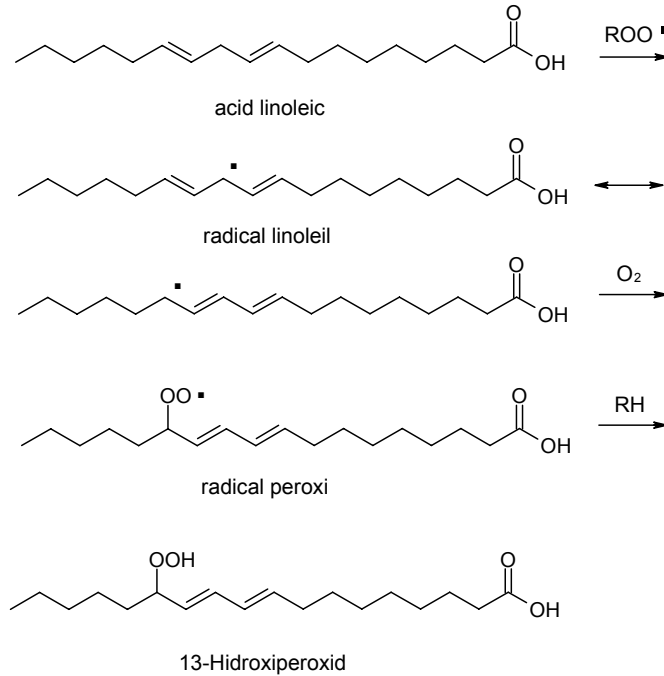


Figura 1.10. Formarea 13-hidroperoxidului din acid linoleic [88]

Hidroperoxizii, figura 1.10, produșii primari de autoxidare ai lipidelor, sunt compuși instabili care pot suferi o serie de reacții de degradare și alte reacții în urma cărora se formează substanțe cu miros neplăcut. Descompunerea hidroperoxizilor are loc pe măsura formării lor, rezultând o serie de compuși care se pot descompune mai departe la rândul lor, generând alte specii de radicali liberi (figura 1.11).

Aldehidele saturate care se formează în timpul autooxidării pot suferi mai departe reacții de oxidare, condensare sau polimerizare.

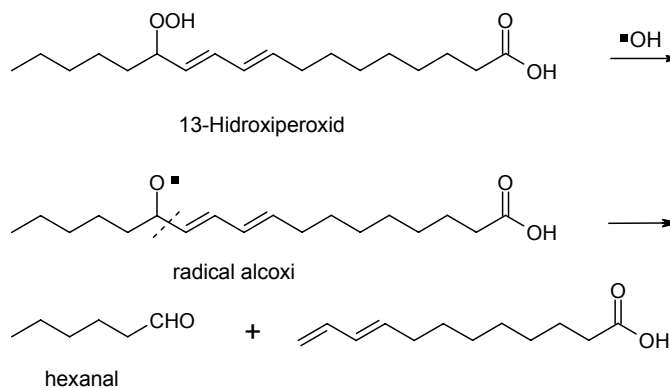


Figura 1.11. Descompunerea 13-hidroperoxidului la hexanal [88]

Pe lângă exemplele arătate, există și o serie de alte reacții care se pot produce în timpul procesului de autooxidare, rezultând o mare varietate de produși de oxidare dintre care mulți sunt toxici pentru organism (figura 1.12).

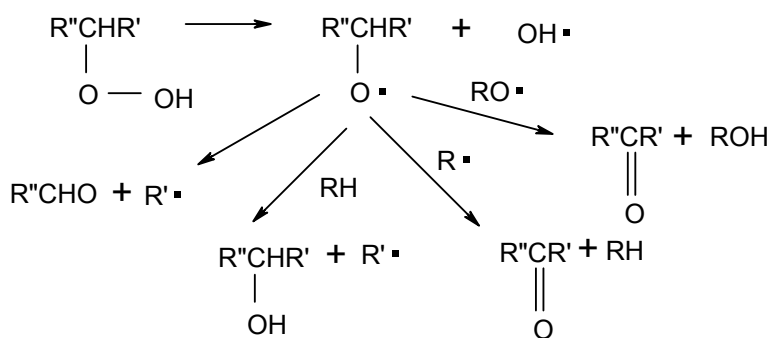


Figura 1.12. Formarea compușilor secundari la descompunerea hidroperoxizilor [88]

1.2.4. Protejarea cu antioxidanți a acizilor grași

Clasificarea antioxidanților se poate face după funcția lor principală și natura lor. După funcția lor principală avem:

- antioxidanți primari (propriu-zisi) – din această categorie fac parte acidul ascorbic și derivații săi, tocoferolii, esterii acidului galic, acidul erisorbic și sarea sa de sodiu, butilhidroxianisolul și butilhidroxitoluenul; în unele țări se utilizează și alți compuși ca trihidroxibutirofenona sau terț-butilhidrochinona;
- antioxidanți secundari (substanțe cu acțiune antioxidantă dar care au și alte funcții) – aici se încadrează bioxidul de sulf și sulfitii, dar și lecitina.

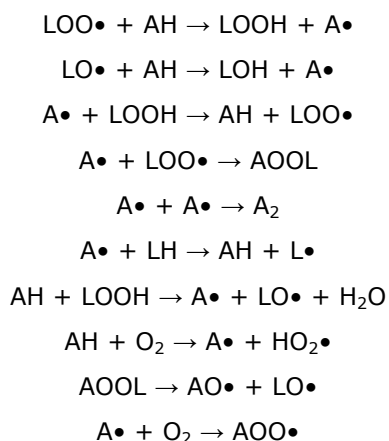
În afară de acești compuși mai există o serie de substanțe care pot întări acțiunea antioxidanților primari. Asemenea compuși, de exemplu acidul lactic și lactații, acidul citric și citrații, acidul tartric și tartrații, au fie acțiune sinergetică fie de complexare a metalelor care catalizează reacțiile de autooxidare.

În funcție de natura lor, antioxidanții pot fi:

- naturali – aici se încadrează tocoferolii, dar și o serie de compuși cu structuri diferite care se găsesc în plante (de exemplu flavonoidele) și a căror posibilă utilizare ca antioxidanți alimentari este tot mai intens studiată;
- sintetici.

Majoritatea antioxidanților comerciali utilizați la ora actuală sunt încă obținuți prin sinteză chimică. Deoarece autooxidarea lipidelor are loc prin mecanism radicalic, lanțul de reacții poate fi întrerupt în prezența unor substanțe care pot capta radicalii pentru a forma compuși inerti. Cea mai importantă clasă de antioxidanți sintetici acționează prin ruperea lanțului de reacții de oxidare. Fenolii substituiți fac parte din această categorie, ei reacționând cu radicalii liberi peroxidici prin cedarea unui hidrogen de la gruparea OH fenolică.

În ceea ce privește autooxidarea lipidelor, aceasta poate fi stopată de două categorii de inhibitori: antioxidanții și inhibitorii preventivi. Antioxidanții stopează formarea radicalilor liberi ($\text{LOO}\bullet$, $\text{LO}\bullet$) în etapa propagării, formând un radical antioxidant ($\text{A}\bullet$) care este foarte puțin reactiv [88].



Radicalul liber al antioxidantului este stabilizat datorită structurii moleculei respective, în general gruparea OH a antioxidantului fiind vecină cu una sau mai multe grupări voluminoase. O altă posibilitate de stabilizare a radicalului este prin mezoizomerie. Acești radicali pot reacționa fie cu radicali peroxidici, fie între ei, formându-se compuși care nu mai au caracter radicalic [93-97].

1.3. Bioconjuțați flavonoide/acizi grași

1.3.1. Acilarea flavonoidelor pe calea sintezei chimice

Numeroasele studii efectuate *in vitro* au demonstrat strânsa legătură dintre structura chimică a flavonoidelor și activitatea biologică a acestora. Datorită inconveniențelor apărute din cauza solubilității și stabilității scăzute a flavonoidelor este necesară modificarea structurii de bază a acestora. Acilarea se face pentru a stabili funcțiunea fenolică; a crește lipofilicitatea și permeabilitatea prin membrană cu ajutorul grupării acil [98, 108].

Dieta umană include numeroase clase de flavonoide din plante, multe dintre acestea având activitate biologică dovedită: antioxidantă [106, 112, 113], hepatoprotectoare, antitrombotică, antihipertensivă, antiinflamatoare, antialergică, antitumorală, bactericidă, antivirală, anticarcinogenă, împotriva bolilor renale și cardiovasculare etc. [100, 109-111]. Pe lângă aceste efecte flavonoidele inhibă numeroase enzime, în special protein-kinazele [101, 103].

În ultimii ani s-au efectuat numeroase studii asupra sintezei, elucidării funcționalității și evaluării biologice a quercetinei, cea mai răspândită flavonoidă. Huang și colab. au obținut o serie de derivați 3-O-amino acid esteri ai quercetinei (figura 1.13) cu activitate crescută ca inhibitori ai Src tirozin-kinazei [105]. Cea mai simplă cale de sinteză propusă de aceștia pornește de la rutină care, într-o primă

etapă prevede protejarea grupărilor hidroxi (1) urmată de deglicozilare (2) care duce la quercetina cu grupări hidroxi protejate. Reactivitatea mare a poziției 3 duce la o esterificare selectivă cu amino acizi protejați în tetrahidrofuran (THF), folosind ca agent de condensare *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) și drept catalizator 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (3). Într-o ultimă etapă se deprotejează grupările hidroxi (4).

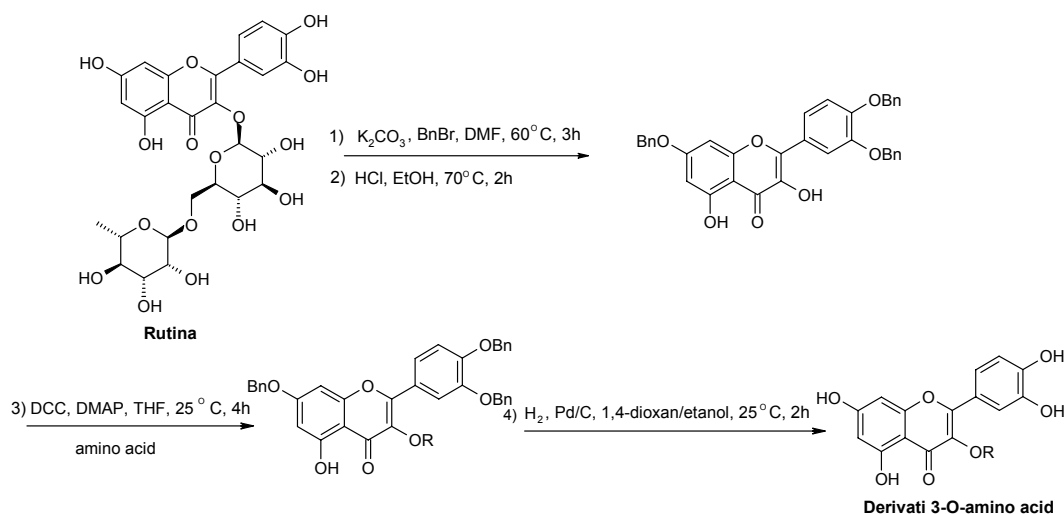


Figura 1.13. Schema de obținere a 3-O-amino acid esterilor quercetinei (R = rest aminoacid)

În vederea studierii stabilității în soluții apoase, hidrolizei enzimatică și permeabilității, Montenegro și colab., au sintetizat derivați 3-O-acil ai quercetinei (figura 1.14), combinând sinteza chimică cu cea enzimatică pentru obținerea acestora. Într-o primă etapă au fost obținuți chimic derivații pentaesterei care ulterior au fost selectiv hidrolizați în prezență de lipaze [113].

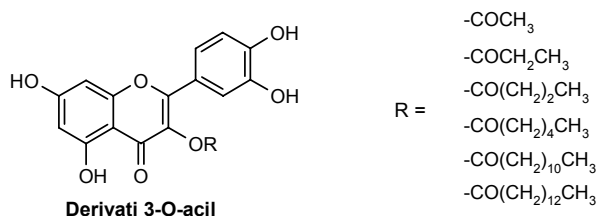


Figura 1.14. Derivații 3-O-acil ai quercetinei

Un alt studiu, realizat pentru îmbunătățirea solubilității și permeabilității quercetinei, tratează obținerea de derivați ai acesteia 3-O-amino acizi. Kim și colab. au studiat carbamatul glicinic al quercetinei și au sintetizat o serie de derivați ai acestuia, luând în considerare faptul că restul de carbamat glicinic se pierde în fluxul sanguin și rămâne quercetina care acționează ca principiu activ. Etapele sunt prezentate în figura 1.15, iar condițiile de reacție au fost : a) bis(4-nitrofenil) carbonat, N,N-diizopropiletil amina (DIPEA), THF/DMF, la temperatura camerei; b) quercetina, DIPEA, DMF, la temperatura camerei; c) TFA, CH₂Cl₂, la 0°C, urmată de agitare 4 ore la temperatura camerei [107]. Cercetătorii au remarcat creșterea solubilității în apă, stabilității și permeabilității pentru compușii conjugați, în comparație cu quercetina și derivatul acesteia Q12.

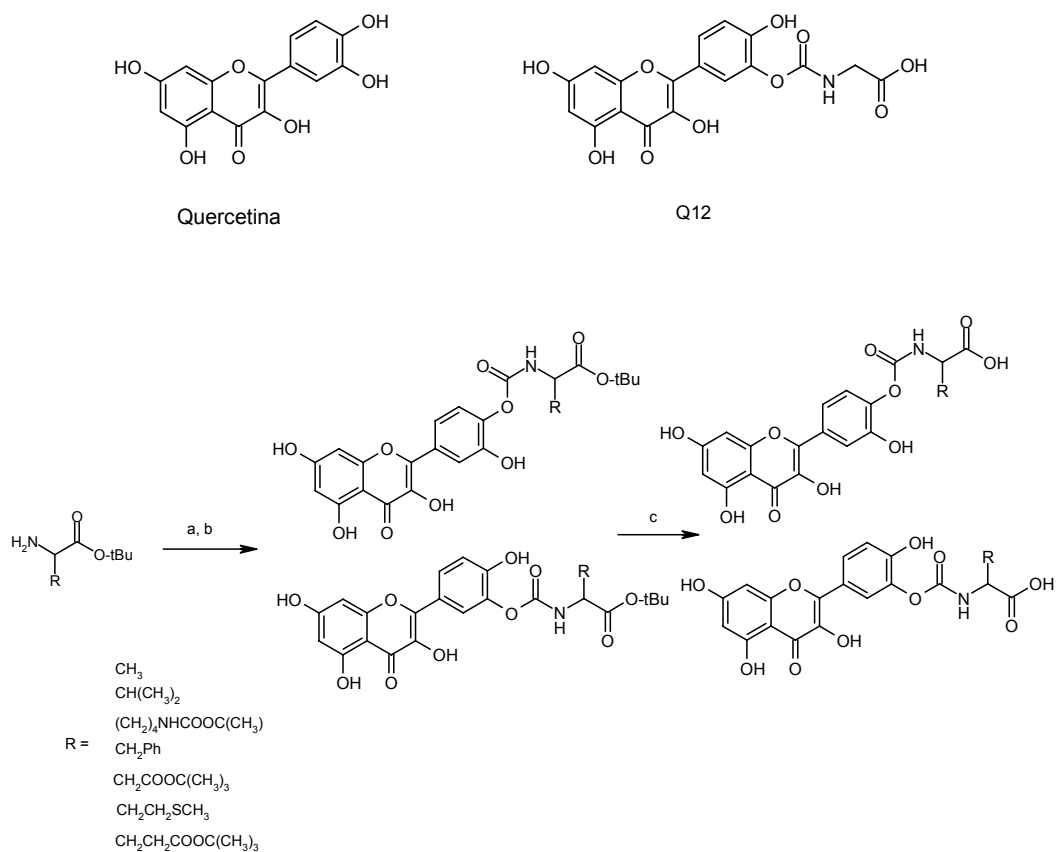


Figura 1.15. Shema de obținere a 3-O-amino acizilor quercetinei

Flavonoidele din citrice, naringenina și hesperetina, s-au dovedit eficiente în metabolismul colesterolului. Pentru îmbunătățirea activității biologice a acestora, Lee și colab., au sintetizat în laborator derivați ai acestora care prezintă o grupare C₁₆ eterică în locul grupării hidroxil (figura 1.16), compus care în urma evaluării s-a dovedit activ în modificarea metabolismului lipidic și scăderea colesterolului din plasmă. Naringenina s-a dizolvat într-un amestec de solvenți format din acetonă și dimetilformamidă, la care s-a adăugat hexadecanil bromură și carbonat de sodiu, după care masa de reacție s-a agitat la 80°C, timp de 12 ore; ulterior s-a răcit, s-au adăugat apă și acetat de etil, derivatul dorit extrăgându-se în acetatul de etil [108].

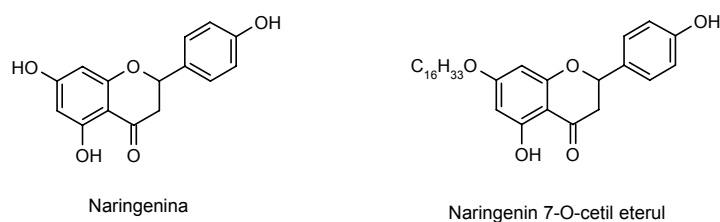


Figura 1.16. Structura naringeninei și a 7-O-cetil eterului corespunzător

În vederea obținerii de compuși activi contra îmbătrânirii și deteriorării tenului, Boumendjel și colab. au sintetizat derivați ai hesperetinei (figura 1.17) [98]. Ținând cont de faptul că radicalii liberi sunt implicați în procesul de peroxidare al membranelor lipidice, care este principala cauză a îmbătrânirii tenului, aceștia au căutat compuși cu solubilitate și permeabilitate crescută, dar care să păstreze și proprietățile biologice active.

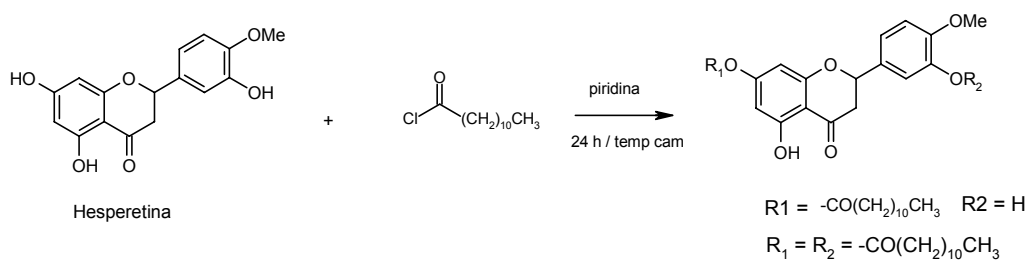


Figura 1.17. Acilarea hesperetinei în piridină la temperatura camerei

Naringenina, agliconul naringinei, s-a dovedit că inhibă formarea leziunilor aortei aterosclerotice. Lee și colab. au obținut și evaluat doi derivați ai naringeninei, și anume naringenin 7-O-oleic esterul și naringenin 7-O-cetil eterul (figura 1.18), care s-au dovedit a inhiba semnificativ formarea urmelor de grăsime pe aortă [109].

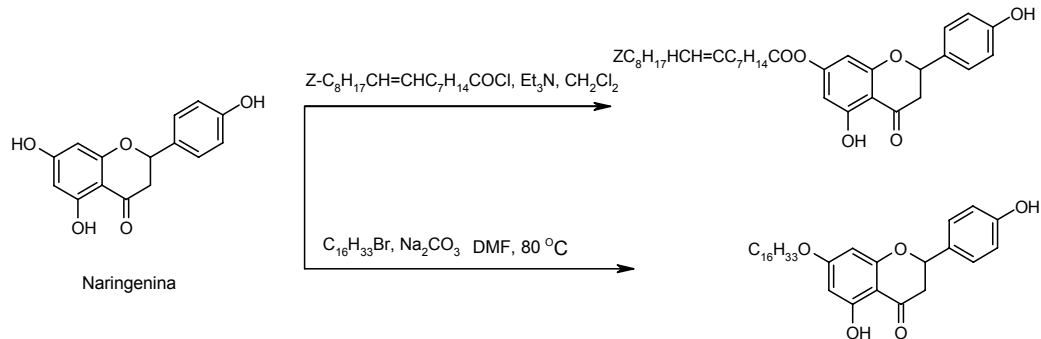


Figura 1.18. Obținerea derivaților naringeninei

Alte studii de alchilare a crisinei au arătat că odată cu creșterea hidrofobicității acestea datorită radicalilor metil, izopropil, benzil, 3,3-dimetil alil sau geranil crește și afinitatea de legare *in vitro* a P-glicoproteinei. Astfel, Comte și colab. au sintetizat derivați O- respectiv C-alchilați ai crisinei, figura 1.19 [99].

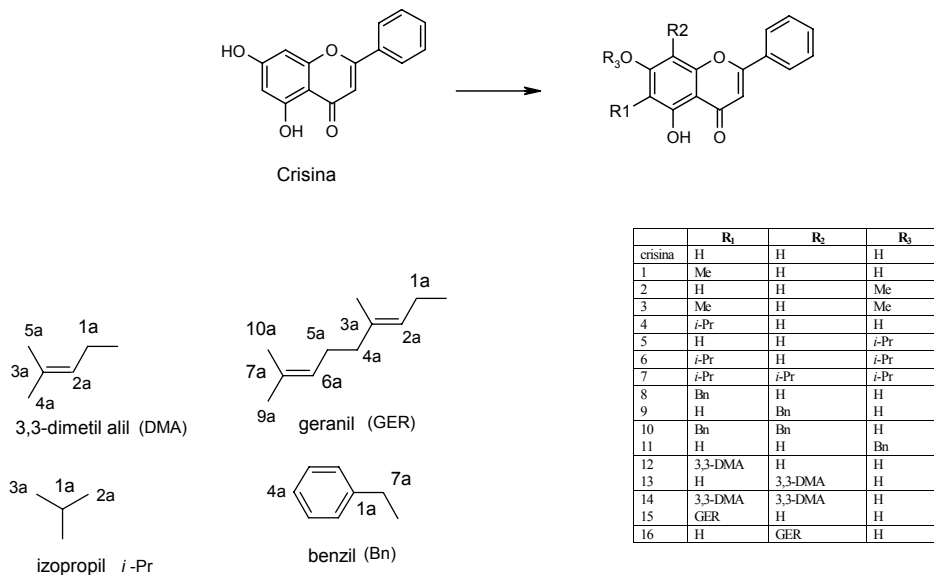


Figura 1.19. Derivații O- respectiv C-alchilați ai crisinei

Ca o încercare de a descoperi noi flavonoide sintetice, cu posibilă activitate antiinflamatorie, Park și colab. au sintetizat analogi ai flavonelor modificați la inelele A și B ale nucleului crisinei și le-au evaluat activitatea inhibitorie împotriva producției de prostaglandine. Rezultatele le-au indicat faptul că, metilarea grupărilor hidroxil (5,7) de pe structura A, ca de altfel și substituția pe inelul B al crisinei nu modifică bioactivitatea. Astfel, au sintetizat derivați 6,8-dihalogenați, 6,8-dimetilți și 6,8-dimetoxi, păstrând grupările hidroxil din pozițiile 5,7 (figurile 1.20, 1.21). Acești derivați au dovedit activitate inhibitorie mult mai puternică comparativ cu cea a crisinei [114].

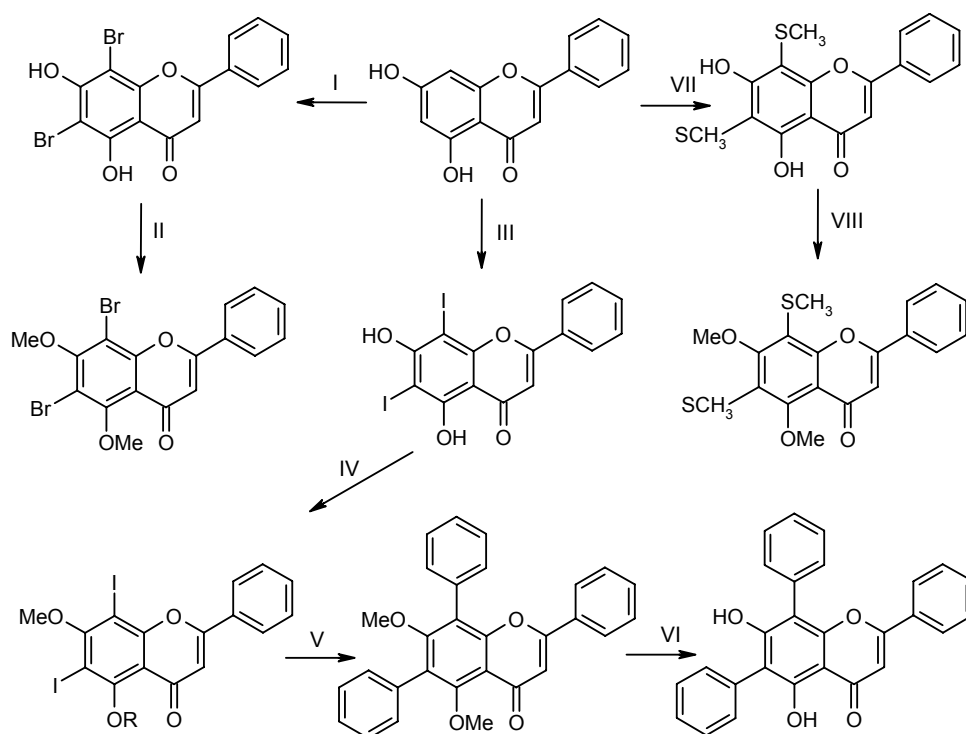


Figura 1.20. Sinteza derivaților 6,8-disubstituiți ai crisinei (condițiile de reacție: I – brom, CH_2Cl_2 , Me_2S , 0°C ; II – Me_2SO_4 , K_2CO_3 , acetonă, reflux; III – iod, acid acetic, 0°C ; IV – Me_2SO_4 , acetonă, reflux; V – acid benzenboronic, DMF, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 90°C ; VI – BBr_3 , cloroform, reflux; VII – DMDS, FeCl_3 , toluen, reflux; VIII – Me_2SO_4 , K_2CO_3 , acetonă, reflux)

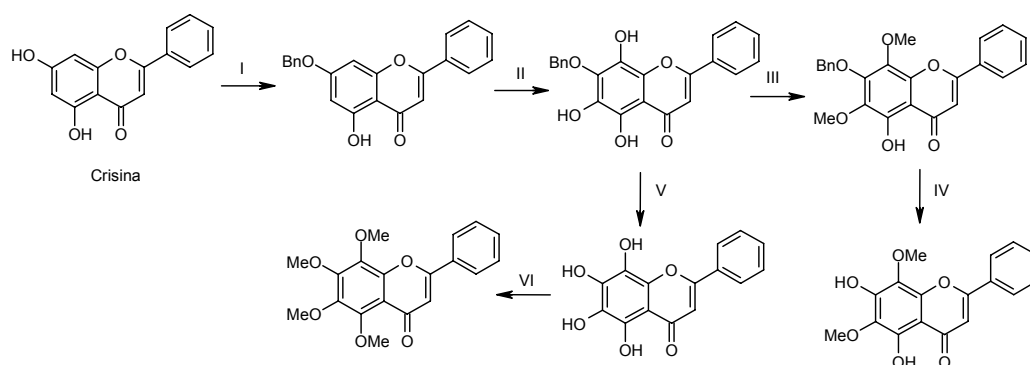


Figura 1.21. Sinteza derivaților 6,8-disubstituiți ai crisinei (condițiile de reacție: I – bromură de benzil, K_2CO_3 , acetonă, $60^\circ C$; II – $K_2S_2O_8$, piridină, KOH; III - Me_2SO_4 , K_2CO_3 , acetonă, $60^\circ C$; IV – acid clorhidric conc., acid acetic, $80^\circ C$; V - acid clorhidric conc., acid acetic, $80^\circ C$; VI - Me_2SO_4 , K_2CO_3 , acetonă, $60^\circ C$).

Flavonolignanul silibinina, componentul major biologic activ din semințele plantei *Sylibum marianum* (L.), este folosit pentru prevenirea și tratarea diverselor boli hepatice și este cunoscut protector împotriva unui număr de hepatotoxine și micotoxine [102]. Ca și în cazul flavonoidelor, biodisponibilizarea și eficacitatea terapeutică sunt influențate de slaba solubilitate în apă (430 mg/L). Din acest motiv s-au sintetizat o serie de derivați semi-sintetici ai silibininei cu scopul de a corecta inconvenientele enunțate. Astfel, derivații silibinin *bis*-hemisuccinat, silibinin 23-O-fosfat, silibinin 23-O- β -glicozidă sau acidul silibininic, au dus la o creștere semnificativă a solubilității dar, nu prezintă o activitate biologică multumitoare în mediu lipofil. În caz contrar, unele preparate lipofile ale silibininei, cum ar fi complexul non-covalent al acesteia cu fosfatidil colina, prezintă nu doar o biodisponibilizare mai bună decât silibinina ci și o activitate biologică crescută în comparație cu aceasta. Gazak și colab. au căutat o metodă de acilare selectivă a silibininei cu acizi grași (figura 1.22) iar derivații obținuți au fost supuși unor teste preliminare de evaluare a activității antioxidante în urma cărora s-au dovedit a avea activitate biologică crescută și o permeabilitate bună [104].

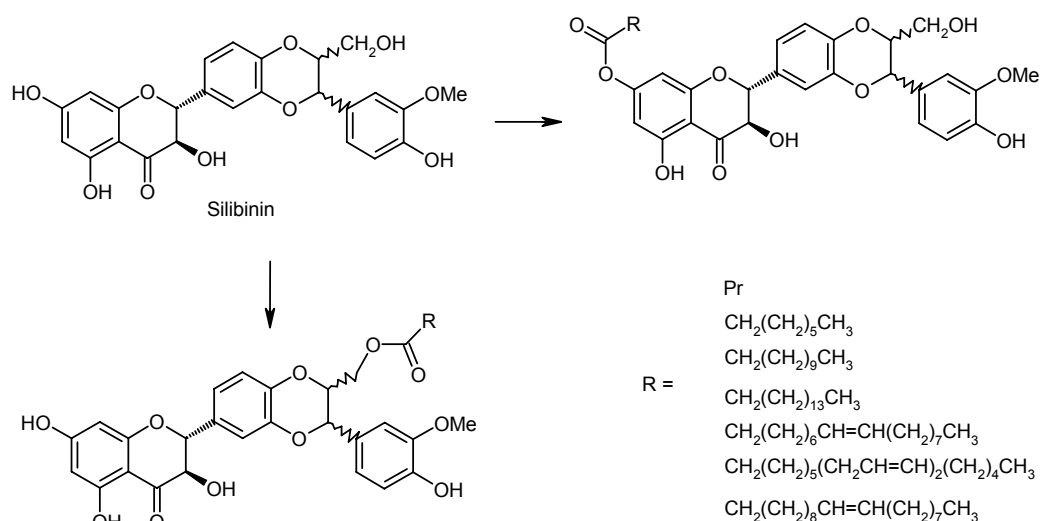


Figura 1.22. Derivații acilați ai silibininei

1.3.2. Acilarea flavonoidelor pe calea sintezei biocatalitice

Comparativ cu sinteza chimică, biosinteza, datorită enzimelor folosite drept catalizatori (biocatalizatori), dispune de o serie de avantaje printre care trebuie menționate următoarele: este atât enantio- cât și regioselectivă, putând fi aplicată și în cazul proceselor complexe fără a mai fi nevoie de etape suplimentare de protejare sau deprotejare a compușilor, necesită temperaturi normale de lucru, se poate desfășura în intervalul de pH 2-12, nu se obțin produși de reacție secundari etc.

Flavonoidele, atât cele glicozilate cât și cele agliconice, sunt intens folosite în industria farmaceutică, în cosmetică și în preparatele alimentare. Ele dispun de numeroase proprietăți fizico-chimice și le-a fost dovedită calitatea de compuși biologic activi, dar sunt caracterizate de o slabă solubilitate și stabilitate. Pentru a corecta aceste dezavantaje, s-au elaborat o serie de sinteze de acilare enzimatică a acestor molecule cu acizi grași, în prezența proteazelor și lipazelor, în diferite condiții de operare. Este foarte dificil de a realiza un echilibru între dorința de a îmbunătăți stabilitatea și solubilitatea flavonoidelor fără a afecta proprietățile bioactive ale acestora, având în vedere faptul că poziția acilării (regioselectivitatea) poate modifica drastic aceste proprietăți.

Efectul enzimei asupra randamentului și regioselectivității

Enzimele utilizate la acilarea flavonoidelor pe calea biosintezei sunt de cele mai multe ori în formă imobilizată, deoarece această prezentare facilitează recuperarea produsului și face mai accesibil accesul la situsul catalitic al enzimei.

Unele studii precizează că, imobilizarea enzimei crește rezistența acesteia la factorii degradanți din mediu, factori care în cele mai multe cazuri conduc la inactivarea ei.

Enzime ca: proteazele, acil-transferazele și lipazele au fost utilizate în încercările de acilare a flavonoidelor.

Danieli și colab. au realizat acilarea isoquercitrinei, quercitrinei și luteolin-7-glucozidei cu trifluoroetilbutirat și cinamat în prezența Subtilisin (*Bacillus licheniformis*) [115]. Tot în prezența Subtilisinului s-a realizat și esterificarea enzimatică a rutinei, hesperitinei, naringinei și peltatozidei cu trifluoroetilbutirat [116, 118] și a isoquercitrinei cu 2-cloroetil metil succinat [117]. Isoquercitrina, callistefina, crisantemina, rutina și naringina cu vinil cinamat și *p*-cumarat s-au esterificat în prezență de Lipase B (*Candida antarctica*) și Lipase PS (*Pseudomonas cepacea*) [131], catechina cu acetat de vinil, în prezență de Lipase PS (*Pseudomonas cepacea*) [132], isoquercetrina cu 3-fenilpropionat, 3-metoxicinamat, 2-metilcinamat, benzoat, 4-fenilbutirat, 2-naftilacetat, cinamat, *p*-cumarat, vinil hexanoat în prezență de Chirazyme L-2 (*Candida antarctica*), Lipoprotein lipase, Lipase PS (*Pseudomonas cepacea*) [133], catechina și epigalocatechina cu etil acetat, etil propionat, fenil propionat, fenil butirat în prezență de Carboxil-esteraze (*Streptomyces rochei* și *Aspergillus niger*) [134]. Cea mai eficientă enzimă s-a dovedit a fi Novozyme (*Candida antarctica*) în prezența căreia s-au studiat acilările isoquercitrinei, rutinei, naringinei cu dibenzil malonat și acetat de vinil [119, 120], naringinei cu acizii stearic, palmitic, lauric, oleic, capric, 12-hidroxistearic, linoleic, *p*-cumarinic, 4-clorofenilacetic, cinamic, 4-hidroxifenilacetic, 5-fenilvaleric, 4-fenilbutiric, 3-fenilpropionic [121], naringinei, isoquercitrinei, luteolin-7-glucozidei, catechin-7-*O*- α -D-glucozidei cu cinamat de vinil, cafeat de vinil, *p*-cumarat [122], rutinei și naringinei cu acizii octanoic, decanoic, dodecanoic [122] și palmitic [122], floridzinei cu etil cinamat, metil benzoat, metil *p*-hidroxifenilacetat, metil *p*-hidroxifenil-propionat, metil salicilat [126], quercetinei, hesperidinei, rutinei, esculin cu acizii lauric, miristic, palmitic, stearic, adipic, azelaic, dodecandioic, hexadecandioic, 11-aminoundecanoic, 11-mercaptoundecanoic [128], acizii hexanoic, heptanoic, nonanoic, lauric, miristic, palmitic, stearic, oleic [127], rutinei și esculin cu acizii palmitic, hexadecandioic, 16-hidroxihexadecanoic, benzoic, galic, cinamic, 4-nitrocinamic, hidrocinamic, 3,4-dihidroxi hidrocinamic, 4-hidroxifenil acetic, quinic, (R, S)-tioctic [129], zaharidei naringeninei cu vinil decanoat, laureat și stearat; acizii decanoic, lauric și stearic [130].

Schematic, acilarea flavonoidelor și agliconilor acestora este redată, după cum urmează: figura 1.23 prezintă enzimele cu care s-a reușit acilarea și pozițiile în care acestea își exercită regioselectivitatea în cazul agliconilor; figura 1.24 prezintă enzimele și pozițiile în care s-a reușit acilarea pentru flavonoidele cu un rest zaharidic iar figura 1.25 redă enzimele și pozițiile în care s-a reușit acilarea pentru flavonoidele cu două resturi zaharidice.

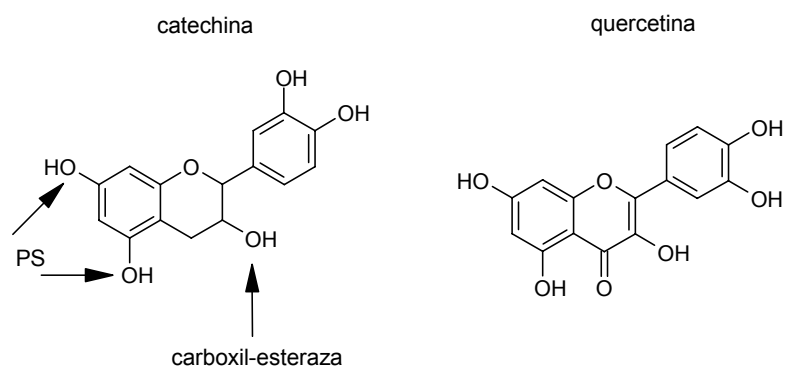


Figura 1.23. Enzimele și pozițiile de acilare pentru flavonoide agliconice

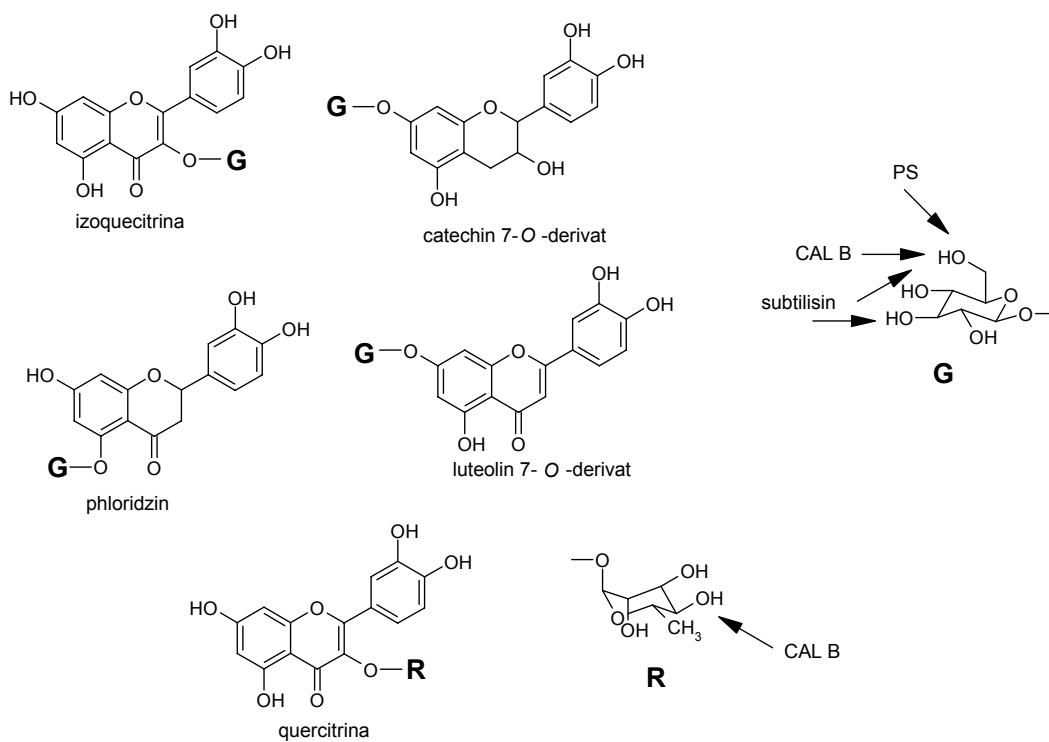


Figura 1.24. Enzimele și pozițiile în care acestea își exercită regioselectivitatea în cazul flavonoidelor cu un rest zaharidic (G – rest glucozidic, R – rest ramnozidic)

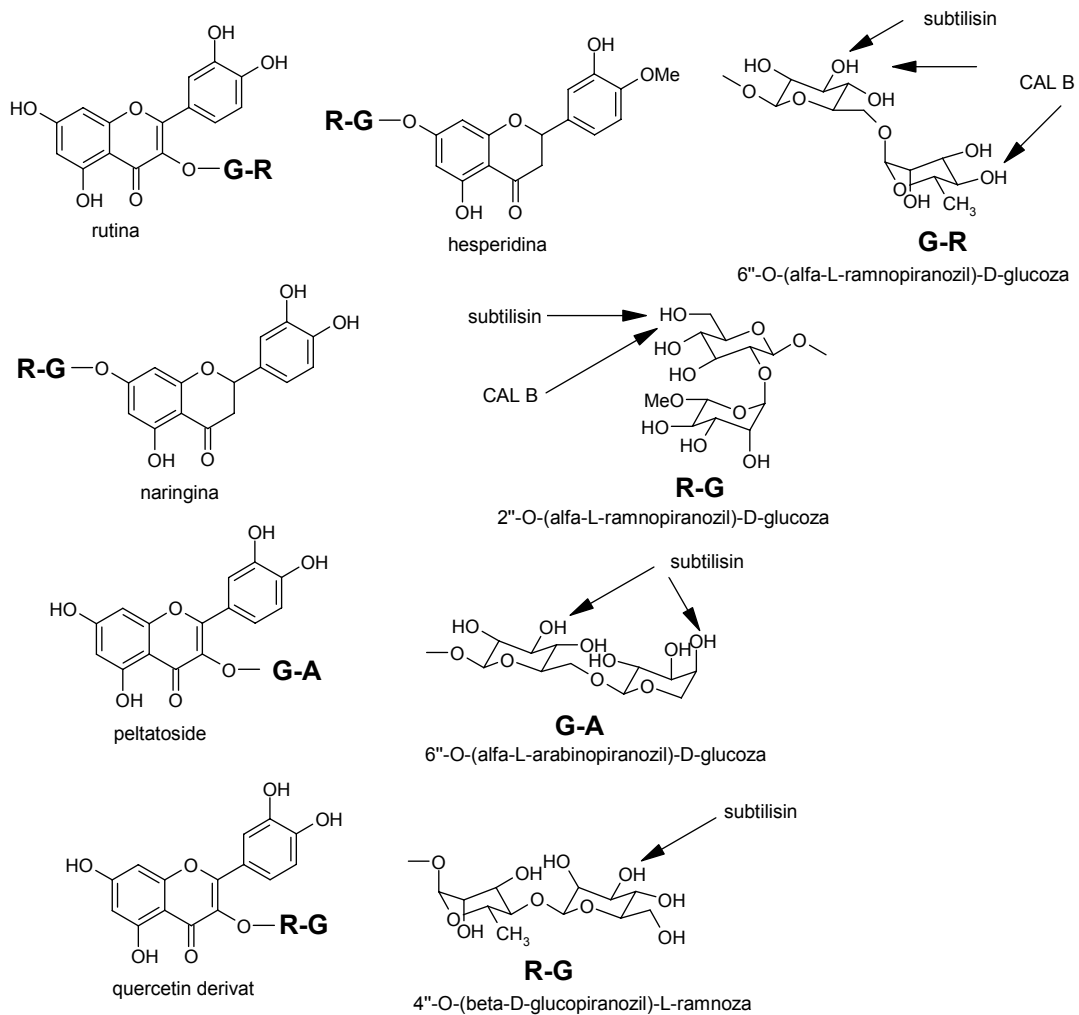


Figura 1.25. Enzimele și pozițiile în care acestea își exercită regioselectivitatea în cazul flavonoidelor cu două resturi zaharidice (G – rest glucozidic, R – rest ramnozidic, A – rest arabinozidic)

Biosinteza flavonoidelor în solvenți organici este influențată de conținutul de apă și de activitatea apei. Cercetările efectuate au arătat că utilizarea diferitelor tehnici de îndepărtare a apei din mediul de reacție duce la rezultate mult mai bune decât în caz contrar [136-138].

Monitorizarea biosintezei cu ajutorul tehnicii TLC

Analiza TLC (thin layer chromatography – cromatografie în strat subțire) este o metodă practică pentru monitorizarea calitativă a biosintezei. Datele din literatură sunt destul de complexe în ceea ce privește sistemele de eluenți utilizate pentru identificarea flavonoidelor (atât cele agliconice cât și cele glicozilate). Pentru analiza TLC, probele se efectuează pe plăcuțe cu silicagel, cu factor de fluorescență, cele mai utilizate fiind plăcuțele Kieselgel G60 F254 (grosimea stratului: 0.25 mm). Eluarea componentelor se face cu diferite amestecuri de solvenți, în funcție de flavonoida analizată. În tabelul 1.1 sunt prezentate câteva dintre sistemele de eluție folosite pentru identificarea flavonoidelor [85].

Tabelul 1.1. Sisteme de eluție folosite pentru identificarea flavonoidelor [85]

Tipul flavonoidei	Amestecul de solvenți	Raportul amestecului (v/v)
Flavonoide agliconice	acetat de etil:alcool izopropilic:apă	100:17:13
	acetat de etil:cloroform	60:40
	cloroform:metanol	96:4
	toluen:cloroform:acetona	40:25:35
	toluen:formiat de etil:acid formic	50:40:10
	toluen:acetat de etil:acid formic	10:4:1
	toluen:metiletil cetona:acid formic	18:5:1
Flavonoide glicozilate	toluen:dioxan:acid acetic	90:25:4
	butanol:acid acetic:apă	65:15:25
	acetat de etil:metanol:apă	50:3:10
	acetat de etil:metanol:acid formic:apă	50:2:3:6
	acetat de etil:etanol:acid formic:apă	100:11:11:26
	acetat de etil:acid formic:apă	9:1:1
	acetat de etil:acid formic:acid acetic:apă	25:2:2:4
	tetrahidrofuran:toluen:acid formic:apă	16:8:2:1
	cloroform:acetona:acid formic	50:33:17
	cloroform:acetat de etil:acetona	5:1:4
Flavonoide glucuronide	cloroform:metanol:apă	65:45:12
	acetona:butanonă:acid formic	10:7:1
Flavanone agliconice	acetona:butanonă:apă	8:1:1
	acetat de etil:eter etilic:dioxan:acid formic:apă	30:50:15:3:2
Flavanone glicozilate	acetat de etil:metiletil cetona:acid formic:apă	60:35:3:2
	diclormetan:acid acetic:apă	2:1:1
Calcone	cloroform:acid acetic	100:4
	cloroform:metanol:acid acetic	90:5:5
Izoflavone	butanol:acid acetic:apă	4:1:5
	acetat de etil:hexan	1:1
Izoflavone glicozilate	cloroform:metanol	92:8
	cloroform:metanol	3:1
Dihidroflavonoli	butanol:acid acetic:apă	4:1:5
	cloroform:metanol:acid acetic	7:1:1

Biflavonoide	cloroform:acetona:acid formic toluen:formiat de etil:acid formic	75:16,5:8,5 5:4:1
Antocianidine și antociani	acetat de etil:acid formic:acid clorhidric 2M butanol:acid acetic:apă metiletil cetona:formiat de etil:acid formic:apă acetat de etil:butanonă:acid formic:apă	85:6:9 4:1:2 4:3:1:2 6:3:1:1
Proantocianidine	acetat de etil:metanol:apă acetat de etil:acid formic:acid acetic:apă	79:11:10 30:1,2:0,8:8

1.4. Ciclodextrine

1.4.1. Introducere

Sensibilitatea crescută la degradare și inactivare a compușilor bioactivi naturali (lipide, vitamine, peptide, acizi grași, antioxidanți, minerale, probiotice) a făcut posibilă dezvoltarea rapidă a tehnicilor de protejare a acestora. Cerința obligatorie este aceea de a proteja compușii bioactivi de degradările chimice (oxidare, hidroliză) fără a le modifica proprietățile. Protejarea și în special eliberarea controlată a diverselor molecule organice se realizează aproape exclusiv prin intermediul compușilor încapsulați [145].

Au fost studiate numeroase proceduri de încapsulare dar nici una nu s-a dovedit aplicabilă în mod general claselor de compuși naturali, datorită diferențelor majore existente între acestea (mase moleculare, solubilități, polarități etc, diferite). Încapsularea este tehnologia prin care un component bioactiv este anvelopat complet, fiind transformat într-o matrice, fără a-i fi afectate componentele bioactive (de precizat că încapsularea nu este similară cu imobilizarea – procedeu ce presupune transformarea unui component bioactiv într-o matrice dar fără a fi neapărat anvelopat).

Ciclodextrinele fac parte din clasa celor mai utilizați receptori din chimia incluziunii gazdă-oaspete, fiind utilizați în industriile alimentară, cosmetică și farmaceutică. În ultimul deceniu chimia ciclodextrinelor s-a dovedit intens studiată ținând cont de faptul că, doar între anii 2004-2005 au apărut în medie 4.4 publicații zilnice referitoare la acestea [162]. Progresele realizate se evaluează foarte bine și prin prisma prețului pe care îl au acești compuși, dacă în anii `70 kilogramul de β -ciclodextrină depășea suma de 2000 dolari, în prezent nu depășește 5 dolari, iar producția anuală este de peste 30000 tone [165].

Compușii numiți în zilele noastre ciclodextrine, au fost izolați prima dată de către Villiers, în anul 1891, când la degradarea enzimatică a amidonului a observat izolarea a două tipuri diferite de compuși cristalini, pe care i-a denumit „celulozine”. În anul 1904, Schardinger confirmă rezultatul și reușește identificarea structurilor ciclice a oligomerilor glucozei și enzima responsabilă de producerea acestora, *Bacillus macerans*, astăzi cea mai utilizată sursă pentru producerea ciclodextrinelor. Una dintre denumirile frecvent utilizate este cea de dextrine Schardinger; în literatura veche le mai întâlnim sub denumirile: cicloamiloze, ciclomalto-oligozaharide sau cicloglucani.

Profesorul Jozsef Szejtli a împărțit descoperirile chimice și industriale ale ciclodextrinelor în trei mari etape: perioada de descoperire, perioada de explorare și perioada de utilizare [145, 146].

Perioada de descoperire (1891-1930)

În anul 1891 omul de știință francez A. Villiers descrie izolarea a 3g de substanță cristalină la degradarea enzimatică (în prezența *Bacillus amylobacter*) a 1000g amidon. Substanța pare să fie rezistentă la hidroliza acidă și, la fel ca celuloza, nu prezintă proprietăți reducătoare. Experimentele sale indică faptul că substanța ar fi o dextrină. El i-a determinat compoziția chimică, $(C_6H_{10}O_5)_2 \cdot 3H_2O$, și a numit-o "celulozină".

Microbiologul austriac, Franz Schardinger, care lucra la un institut de cercetare în domeniul alimentar, făcând numeroase studii asupra bacteriilor care provoacă alterarea produselor alimentare, a raportat în anul 1903 izolarea a doi compuși cristalini, din amidonul din cartofi, numindu-le dextrine cristaline. Ulterior a numit compușii α -dextrină și β -dextrină. Austriacul și-a continuat studiile și a dovedit că pot fi obținute din amidon din diferite surse (cartofi, orez, grâu), deși până în 1911 când a publicat ultimul articol proprietățile fizico-chimice ale acestora erau parțial cunoscute, i s-a atribuit meritul pentru punerea bazelor chimiei ciclodextrinelor, în onoarea sa fiind denumite dextrine Schardinger.

În perioada de descoperire au fost obținute și caracterizate trei ciclodextrine; se știa că sunt oligozaharide dar, masa moleculară, ca de altfel și structura chimică și marea majoritate a proprietăților fizico-chimice au rămas încă necunoscute.

Perioada de explorare (1930-1970)

În anul 1938, Freudenberg și colaboratorii au arătat faptul că ciclodextrinele prezintă o structură inelară, formată din legături 1,4- α -glicozidice, cu o cavitate centrală. În următorii ani le-a fost determinată masa moleculară, structura chimică, mărimea cavității, solubilitatea, reactivitatea, abilitățile de complexare și efectul asupra stabilității chimice a moleculelor oaspete [147]. Se știa că, ciclodextrinele pot atât stabiliza cât și destabiliza compușii labili chimic, că pot fi utilizate ca modele enzimatică și că pot solubiliza compușii lipofili, insolubili în apă.

În această perioadă a fost intens studiată producția de ciclodextrine. La degradarea amidonului de enzima glucoziltransferază (CGT – Cyclodextrin Glucosil Transferase), produsul primar al lanțului splitat suferă o reacție intramoleculară fără participarea moleculelor de apă formându-se compușii ciclici cu legături 1,4- α -glicozidice. Multe microorganisme produc glucozil transferaza, dar doar câteva sunt capabile de a produce CGT, printre care se menționează tulpini ale *Bacilli*, tulpini din genul *Micrococcus* și din genul *Klebsiella* [148].

La sfârșitul acestei perioade obținerea ciclodextrinelor era pusă la punct doar la nivel de laborator, dar randamentele erau scăzute și compușii relativ impuri.

Perioada de utilizare (1970-prezent)

1.4.2. Obținerea ciclodextrinelor

Tratarea amidonului (provenit de la porumb, cartofi, tapioca etc.) cu amilază provenită de la tulpina *Bacillus macerans*, duce la un amestec crud de α -ciclodextrină (~60%), β -ciclodextrină (~20%) și γ -ciclodextrină (~20%), împreună cu mici cantități de ciclodextrine cu mai mult de opt unități, compuşii fiind foarte greu de separat și purificat. Descoperirile biotehnologice din anii '70 au dus la o creștere spectaculoasă în producția de ciclodextrine, obținându-se CGT și de la microorganismele ca *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus circulans*, *Alkalophylic bacillus No. 38-2*. Cu ajutorul ingineriei genetice s-au creat diferite tipuri de CGT, specializate în obținerea de ciclodextrine, figura 1.26. Aceste enzime împreună cu inovațiile tehnologice au făcut posibilă obținerea de α -, β - și γ -ciclodextrine de puritate înaltă, ce au putut fi utilizate în industria farmaceutică [165].

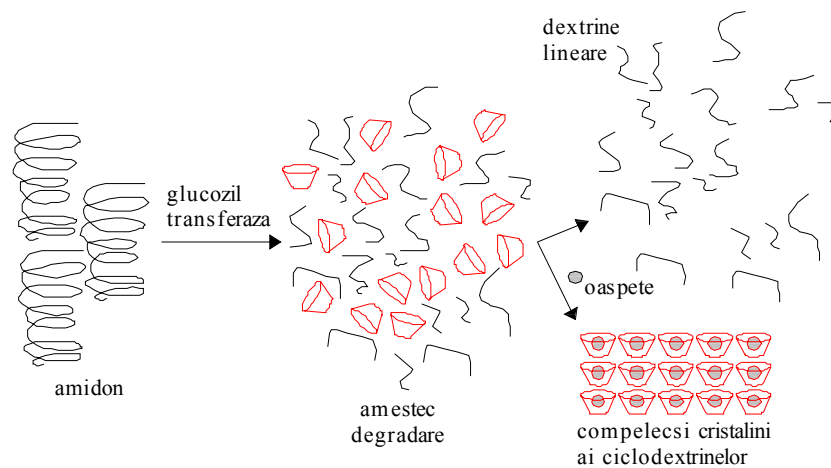


Figura 1.26. Obținerea ciclodextrinelor din amidon

Primul pas în producerea ciclodextrinelor îl constituie aducerea în stare lichidă a amidonului la o temperatură înaltă, iar pentru a reduce vâscozitatea trebuie hidrolizat la un grad optim care nu trebuie să conțină glucoză sau mici cantități de oligozaharide deoarece influențează negativ producția de ciclodextrine. După răcire la o temperatură optimă, soluției de amidon i se adaugă CGT. În așa-zisa tehnologie non-solvent se formează α -, β - și γ -ciclodextrinele care trebuie separate din amestecul parțial hidrolizat. În tehnologiile în care se folosesc solvenții separarea este ceva mai ușoară deoarece la adăugarea toluenului predomină formarea complexului toluen/ β -ciclodextrină, la adăugarea *n*-decanolului predomină formarea complexului *n*-decanol/ α -ciclodextrină în timp ce la adăugarea ciclohexanolului complexul format este ciclohexanol/ γ -ciclodextrină. Pot fi utilizați o serie de alți agenți de complexare, folosirea acestora depinzând de preț, toxicitate și eficiența îndepărtării solventului din complex.

Ciclodextrinele sunt o familie de trei oligozaharide ciclice produse industrial în cantități mari și câteva mai rare ce apar în cantități mici [149, 150]. Cele trei ciclodextrine mai importante sunt substanțe cristaline, omogene și nehigroscopice, care au o formă de inel cu aspect toroidal, construite din unități glucopiranozice. α -Ciclodextrina, cunoscută și ca α -dextrină Schardinger, ciclomaltohexoză, ciclohexaglucan, ciclohexaamiloză, α -CD, ACD și C6A, este compusă din șase unități glucopiranozice. β -Ciclodextrina, cunoscută de asemenea ca β -dextrină Schardinger, ciclomaltoheptoză, cicloheptaglucan, cicloheptaamiloză, β -CD, BCD, C7A, conține șapte unități glucopiranozice, iar γ -ciclodextrina, γ -dextrină Schardinger, ciclomaltooctoza, ciclooctaglucan, ciclooctaamiloză, γ -CD, GCD și C8A, conține opt astfel de unități (figura 1.27).

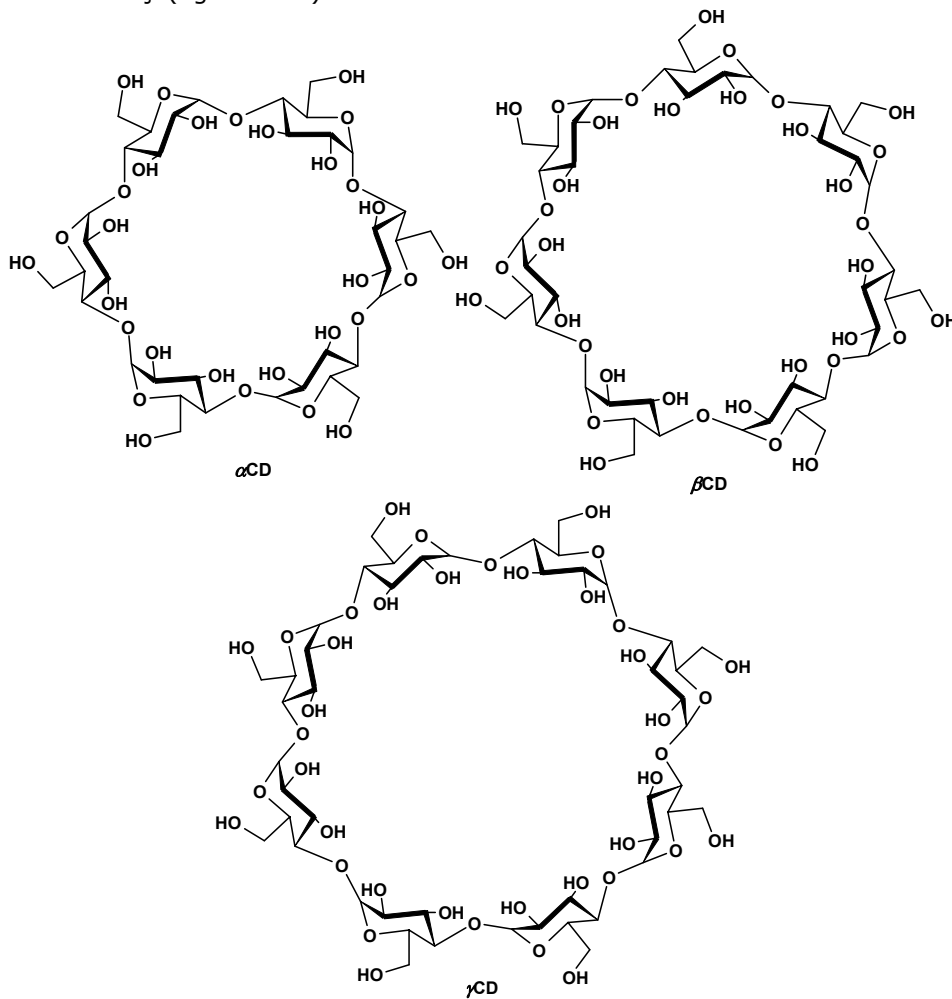


Figura 1.27. Structura α -, β - și γ -ciclodextrinei.

S-a demonstrat prin calcule de energie conformațională că nu se pot forma ciclodextrine cu mai puțin de șase membri în inel din motive sterice. Omologi

superiori, cum ar fi δ -, ε -, ζ - și η -ciclodextrina, au fost obținuți de către Pulley și French [149].

Ca o consecință a conformației atomului de carbon C_1 a unității glucozilpiranozice, toate grupele secundare hidroxil sunt situate pe una din cele două suprafețe marginale ale inelului, iar cele primare pe cealaltă. Cavitata este linearizată de către legăturile de hidrogen cu oxigenul glicozidic. 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. 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. Figura 1.28 ilustrează caracteristicile structurale ale ciclodextrinelor. Când este implicată în formarea unor complecși de incluziune, ciclodextrina este mai degrabă un con trunchiat decât cilindru [147, 162, 163, 165-168].

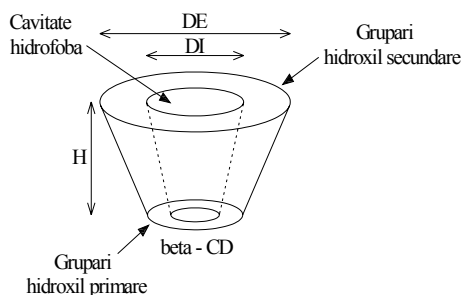


Figura 1.28. Schema structural-funcțională a ciclodextrinelor.

Proprietățile ciclodextrinelor uzuale sunt redate în tabelul 1.2 [147, 165]

Tabelul 1.2. Proprietățile α , β , γ -ciclodextrinelor

Proprietăți	α -CD	β -CD	γ -CD
Număr unități de glucoză	6	7	8
Masa moleculară	972	1134	1296
Diametrul aproximativ al cavității interioare (Å)	4,7-5,2	6,0-6,4	7,5-8,3
Diametrul aproximativ al cavității exterioare (Å)	14,2-15,0	15,0-15,8	17,1-17,9
Volumul aproximativ al cavității (Å ³)	174	262	427
[α] _D la 25°C	150 ± 0,5	162,5 ± 0,5	177,4 ± 0,5

Solubilitatea în apă (g/100mL, 25°C)	14,5	1,85	23,2
Tensiunea superficială (dyn/cm)	71	71	71
Intervalul de topire (°C)	255-260	255-265	240-245
Conținutul de apă cristalizată (%)	10,2	13,2-14,5	8,13-17,7
pK _a (25°C)	12,33	12,20	12,08

1.4.3. Derivatizarea ciclodextrinelor

Ciclodextrinele naturale, în special β -ciclodextrina, sunt slab solubile atât în apă cât și în solvenți organici (solubilitatea apoasă a acestora este mult mai mică comparativ cu cea a dextrinelor liniare) fapt care le limitează aplicarea în domeniul farmaceutic. Această solubilitate scăzută se datorează legăturilor de hidrogen intramoleculare puternice din structura cristalină [147, 151-154].

Nefrotoxicitatea ciclodextrinelor rămâne o necunoscută, doar se presupune că au legătură cu absorbția celulelor tubulare ale rinichilor având ca efect întreruperea funcției intracelulare sau extragerea componentelor membranei lipidice (colesterolul și fosfolipidele) [167].

În structura ciclodextrinelor fiecare unitate glucopiranozică are trei grupări hidroxil libere care diferă între ele atât din punctul de vedere al funcționalității cât și din cel al reactivității. Reactivitatea relativă a hidroxililor secundari aferenți C(2) și C(3) și a hidroxilului primar din C(6) depinde de condițiile de reacție (temperatură, pH, reactivi etc.). Astfel în cazul β -ciclodextrinei 21 de grupări hidroxil pot fi modificate prin substituția unui atom de hidrogen sau a unei grupări hidroxil cu diferiți radicali ca: alchil, hidroxialchil, carboxialchil, amino, tio, tosil, glucozil, maltozil etc. prin procedee chimice sau enzimatic. Au fost sintetizați o serie de derivați hidrofobi, hidrofilii și ionici. Scopul acestor derivatizări a ciclodextrinelor este de a îmbunătăți solubilitatea derivaților și implicit a complexilor acestora, de a îmbunătăți potrivirea și /sau asocierea între ciclodextrine și molecula oaspete, concomitent cu stabilizarea acesteia, de a atașa grupări specifice (catalitice) locului de legare, de a forma structuri insolubile, polimeri cu ciclodextrine (pentru separări cromatografice).

Din miile de derivați descriși în literatură, doar câțiva pot fi luați în considerare, care de altfel se produc și la scară industrială, nu doar la scară de laborator. Printre aceștia se numără derivații β -ciclodextrinei, heterogeni, amorfi și solubili în apă, β -ciclodextrina metilată (figura 1.29) și 2-hidroxipropil β -ciclodextrina. Datorită heterogenității HP β CD nu poate fi cristalizată, lucru ce este foarte avantajos de exemplu la obținerea medicamentelor în formă lichidă. Primele formulări cu conținut de HP β CD și HP γ CD se află deja pe piață în unele țări. β -Ciclodextrina metilată este mult mai hidrofobă decât β -ciclodextrina însăși, în consecință formează un complex mult mai stabil (și solubil) cu colesterolul.

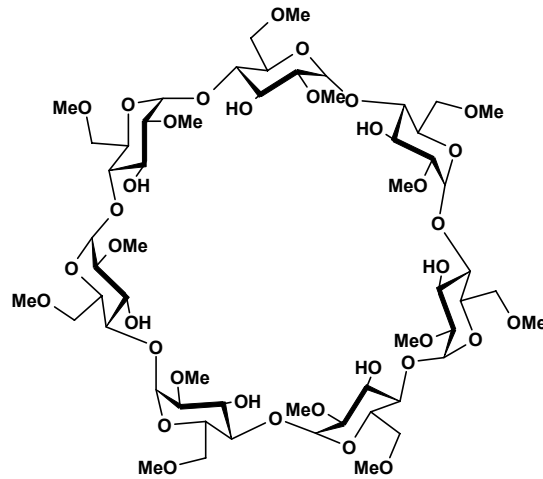


Figura 1.29. Structura β -ciclodextrinei metilate

1.4.4. Analiza ciclodextrinelor

Au fost propuse numeroase metode cromatografice pentru determinarea analitică a ciclodextrinelor [149, 155]. Cea mai veche metodă cromatografică este cromatografia pe hârtie care necesită un timp îndelungat 2-25 ore, în timp ce metodele moderne cum este HPLC (High Performance/Pressure Liquid Chromatography) necesită doar 10-15 min. De asemenea, cromatografia în strat subțire este o metodă convenabilă pentru determinarea ciclodextrinelor. Metoda recomandată, cea mai exactă și mai rapidă, pentru determinarea ciclodextrinelor este HPLC. Determinarea ciclodextrinelor prin gaz-cromaografie necesită o atenție deosebită la derivatizare [149].

Metodele fotometrice de analiză sunt rapide dar nu specifice. Deoarece ciclodextrinele nu prezintă absorbție decât în domeniul UV îndepărtat (190 nm), determinarea rapidă a conținutului de ciclodextrină prin fotometrie este posibilă doar în prezența unui indicator complexabil, determinarea fiind puternic dependentă de pH și de concentrația de ciclodextrină [149].

1.4.5. Compuși de incluziune – complecși

Caracteristica cea mai importantă a ciclodextrinelor o reprezintă capacitatea acestora de a forma compuși de incluziune cu o mare varietate de compuși fără a forma legături covalente. În soluții apoase cavitatea hidrofobă este umplută cu apă (figura 1.30), care este relativ instabilă datorită interacțiunilor polare și moleculele de apă pot fi ușor înlocuite de o moleculă "oaspete" mai puțin polară decât apa [147, 162].

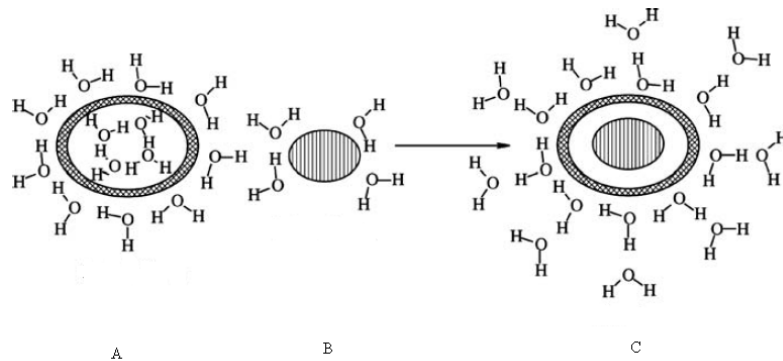


Figura 1.30. Efectul hidrofob [165]

Procesul de complexare este influențat de o serie de factori, printre care: potrivirea sterică, eliberarea apei legate, efectele hidrofobe, interacțiunile van der Waals, forțele de dispersie, interacțiunile dipol-dipol, interacțiunile electrostatice și legăturile de hidrogen.

Deoarece diametrul cavității unei ciclodextrine variază în funcție de numărul de unități de glucoză din structură, alegerea unei ciclodextrine de mărime apropiată de parametrii geometrici ai moleculei oaspete este de importanță majoră în formarea complexului de incluziune. Nu toți compușii formează complecși stabili, iar moleculele mari cum ar fi cele ale proteinelor, aminoacizilor sau polipeptidelor nu pot fi încorporate de acestea deși pot fi legate părți specifice ale acestor molecule de către ciclodextrine [162]. Figura 1.31 redă modurile cele mai uzuale de complexare a ciclodextrinelor cu moleculele oaspete.

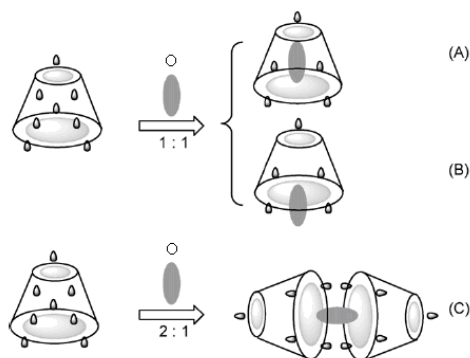


Figura 1.31. Reprezentarea schematică a celor mai uzuale moduri de complexare a ciclodextrinelor cu o moleculă oaspete [173]

Reacțiile de complexare se desfășoară în mod obișnuit în prezența unui solvent: apa, figura 1.32. Apa favorizează formarea complexelor pe baza interacțiunilor hidrofobe. În unele cazuri este necesară utilizarea solvenților organici pentru dizolvarea moleculelor "oaspete", dar alegerea acestora este de cele mai multe ori dificilă datorită faptului că aceștia pot intra în competiție cu molecula oaspete în vederea ocupării cavității ciclodextrinei, sau în vederea formării unui compus ternar.

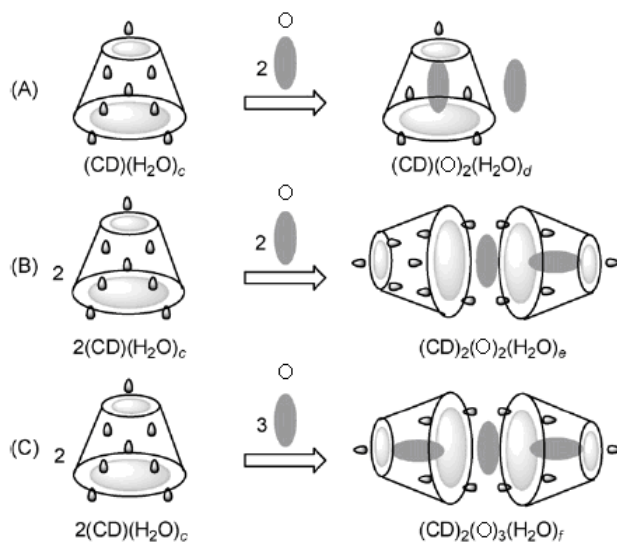


Figura 1.32. Reprezentarea schematică a interacțiunilor la încapsularea în β -Ciclodextrina

Termenul de *compus de incluziune* a fost introdus de Schlenk în 1950. Mai există însă și alți termeni utilizați în literatura de specialitate, cum ar fi *aduct*, *clatrat*, *compus molecular*, *criptat* și *complex de incluziune*. Considerând faptul că între gazdă și oaspete nu se stabilesc legături covalente, echilibrul de asociere-disociere în soluție fiind cea mai importantă caracteristică a asocierii de tip gazdă-oaspete, termenul de *complex de incluziune* (sau *complex al ciclodextrinei*) pare să fie cel mai potrivit pentru astfel de compuși.

Cristalele complexelor cu ciclodextrine se prezintă sub forma împachetării moleculelor de ciclodextrină deoarece acestea domină spațiul intermolecular din structură. Aceste împachetări nu sunt unice, ci pot fi de tipul cușcă, canal sau strat după cum se poate observa din figura 1.33 [147].

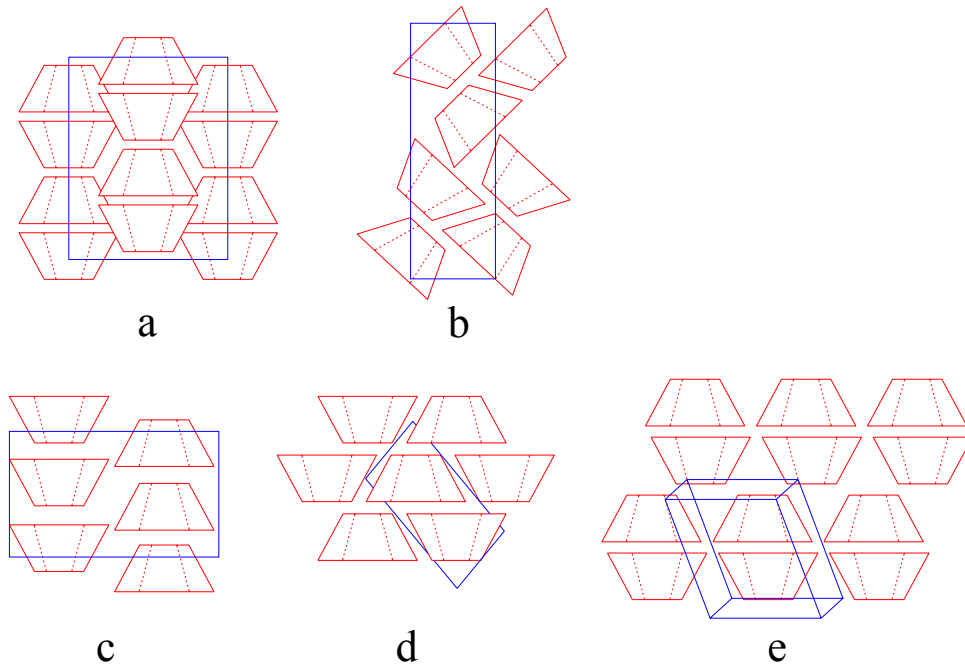


Figura 1.33. Reprezentarea schematică a aranjamentelor tip canal a) cap-cap, b) tip cușcă, c) cap-coadă, d) tip strat și e) tip strat compus din dimeri ai β -CD

În structurile cristaline aparținând tipului cușcă, cavitatea unei singure molecule de ciclodextrină este blocată pe ambele părți de molecule de ciclodextrine adiacente, producând astfel cavități izolate. În acest tip de aranjament moleculele de ciclodextrină pot fi împachetate reticular de tipul zig-zag (cel mai des întâlnit la α -, β - și γ -ciclodextrine) sau de tip intercalat. Acest tip de împachetare este caracteristic la încapsularea moleculelor mici. Tipul canal s-a observat a fi caracteristic lanțurilor alchil sau polimerilor încapsulați și poate fi de două feluri: cap-cap sau cap-coadă. Tipul strat este întâlnit la moleculele foarte mari care nu sunt complet încorporate [165].

Ciclodextrinele pot prezenta mai multe forme cristaline [149]. Astfel, α -ciclodextrina poate avea trei forme cristaline diferite (α -ciclodextrina·6H₂O forma I, α -ciclodextrina·6H₂O forma II și α -ciclodextrina·7,5H₂O forma III). Toate structurile de β -ciclodextrină·12H₂O, β -ciclodextrină·11H₂O și γ -ciclodextrină·13 H₂O sunt de tip zig-zag. În α -ciclodextrină·6H₂O doar două molecule de apă sunt izolate în interiorul cavității, iar celelalte 4 molecule sunt în afară. Hidratul de β -ciclodextrină are două forme cristaline: β -ciclodextrina·12H₂O și β -ciclodextrina·11H₂O. Diferența structurală dintre cele două forme este bazată în principal pe distribuția dezordonată a moleculelor de apă din cavitatea β -ciclodextrinei. În γ -ciclodextrina·13H₂O sunt incluse 5,5 molecule de apă. Inelul γ -ciclodextrinei este oarecum distorsionat de la structura ortogonală regulată.

1.4.6. Metode de analiză a complexelor

Pulberea microcristalină obținută prin amestecarea ciclodextrinei cu un compus potențial oaspete în soluție, în suspensie sau în pastă, nu prezintă garanția formării unui complex de incluziune omogen în adevăratul sens al cuvântului. Determinarea parametrilor calorimetrici este indispensabilă la o discuție cantitativă pentru înțelegerea fenomenului de recunoaștere moleculară care implică molecula oaspete, molecula gazdă și solventul. În ciuda diversității metodelor calorimetrice și procedurilor experimentale decriptate în literatura de specialitate, doar două metode microcalorimetrice se aplică pe scară largă la studierea ciclodextrinelor, acestea fiind DSC (Differential Scanning Calorimetry) și ITC (Isothermal Titration Microcalorimetry).

Calorimetria de Scanare Diferențială (DSC) presupune încălzirea/răcirea treptată a probei (lichidă sau solidă) cu o anumită viteză și modificările cauzate de variația de temperatură (tranziția fazelor, topire, descompunere) sunt înregistrate ca eliberare de căldură sau absorbție.

Spectrometria RMN este una dintre cele mai importante tehnici utilizate la elucidarea structurii moleculare, de aceea a fost intens aplicată și pentru studierea formării complexelor cu ciclodextrine.

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.

Suplimentar tehnicilor de analiză prezentate se pot adăuga și numeroase alte tehnici ca spectrometria de masă, electrochimia, absorbția UV-VIS, difracția circulară sau SPM (Scanning Probe Microscopy).

1.4.7. Avantajele încapsulării compușilor bioactivi

Flavonoidele o clasă de compuși polifenolici din plante dispun de o activitate biologică remarcabilă. Dezavantajul acestor compuși la utilizarea în industria farmaceutică este slaba solubilitate și stabilitate a acestora. Pentru a remedia aceste probleme s-au realizat o serie de studii de încapsulare a flavonoidelor în ciclodextrine. S-au folosit atât ciclodextrinele cât și derivații ai acestora. Astfel, quercetina și 3-O-metilquercetina au fost încapsulate în β -ciclodextrină, iar formarea complexelor obținuți a fost studiată cu ajutorul metodelor spectroscopice FT-IR, RMN, raze X și SEM și s-au realizat o serie de studii de modelare moleculară [169-171, 175, 177]. Mercader-Ros și colab. au studiat influența hiroxipropil- β -CD asupra complexării cu kaempferol, quercetină și miricetină [172] iar Kim și colab. au realizat complexarea galanginei, kaempferolului, quercetinei și miricetinei cu DM β CD și HP β CD făcând studii asupra solubilității, modelării moleculare și investigării complexelor cu ajutorul RMN [174]. De asemenea a fost studiată complexarea rutinei cu β -CD [176, 179] și complexarea isoquercitrinei (flavonoide glicozilate) [178]. Consecințele primare cele mai importante ale interacțiunii unei molecule oaspete slab solubilă și ciclodextrine în soluție apoasă sunt:

- concentrația moleculei oaspete în faza dizolvată crește semnificativ, în timp ce concentrația ciclodextrinei dizolvate scade (există și excepții în cazul în care aceste molecule pot crește solubilitatea ciclodextrinei în apă);

- proprietățile spectrale ale moleculei oaspete sunt modificate;
- reactivitatea moleculei încapsulate suferă modificări, în majoritatea cazurilor observându-se o scădere a acesteia;
- difuzia și volatilitatea moleculei încapsulate scad semnificativ;
- un compus hidrofob încapsulat în forma complexată prezintă o hidrofilitate crescută, prin urmare și mobilitatea cromatografică este influențată.

Interacțiunile în fază solidă au drept urmări:

- substanța complexată este dispersată în matrice formând o pudră microcristalină sau amorfă chiar și cu molecule oaspete gazoase;
- substanța încapsulată este protejată de orice tip de reacție;
- sublimarea și volatilitatea sunt reduse la cel mai scăzut nivel;
- complexul este hidrofil și foarte ușor solubil.

Complexarea flavonoidei glicozilate, rutina, duce la modificări majore a proprietăților flavonoidei comparativ cu forma neîncapsulată. Astfel, la folosirea substanței încapsulate concentrația de substanță activă este substanțial redusă, permeabilitatea este mult mai crescută, la fel și afinitatea acesteia (figura 1.34).

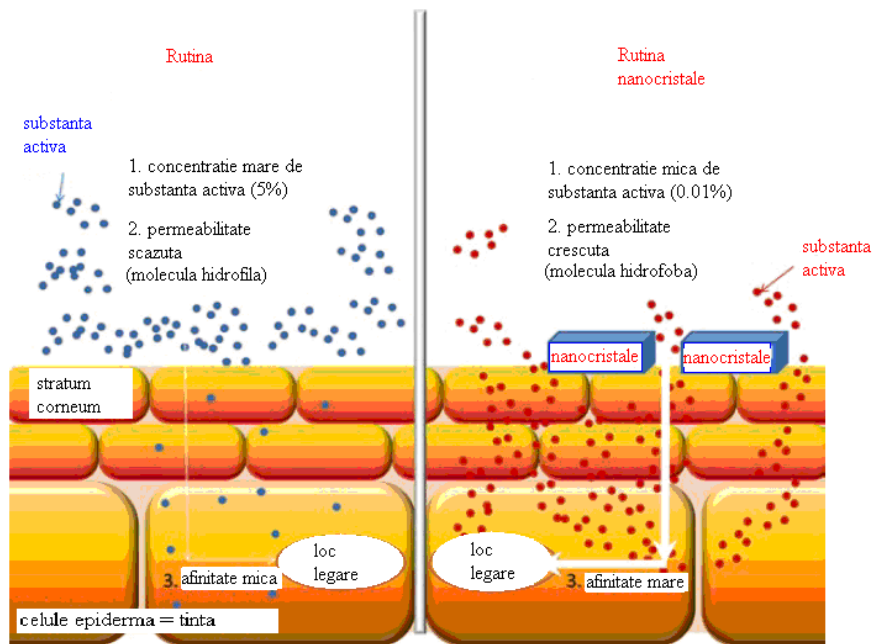


Figura 1.34. Mecanismul de acțiune al rutinei pure comparativ cu rutina încapsulată [184]

Complexarea substanțelor bioactive a fost luată în considerare datorită biodisponibilității și/sau stabilității scăzute a acestora. Motivele pentru care s-a recurs la complexare sunt următoarele:

- biodisponibilizarea substanței bioactive este incompletă sau neregulată datorită solubilității slabe a acesteia;
- viteza de dizolvare este scăzută, chiar în cazul unei absorbții complete timpul în care se atinge nivelul optim de acțiune în sânge este prelungit la administrarea orală;
- instabilitatea chimică - substanța este instabilă chimic (ținând cont de autodescompunere, degradare);
- instabilitatea fizică - substanța este instabilă fizic (volatilă, predispusă sublimării);
- solubilitatea slabă - datorită solubilității slabe în apă nu poate fi folosită în diverse formulări pentru aplicabilitate farmaceutică;
- forma de prezentare - dacă este sub formă lichidă nu poate fi produsă sub o formă solidă;
- incompatibilitatea cu alte componente din amestec.

Avantajele complexării sunt:

- îmbunătățirea biodisponibilizării;
- creșterea stabilității;
- reducerea efectelor secundare;
- manipularea ușoară sub formă de pudră sau chiar lichidă.

Studiile asupra comportării atât *in vitro* cât și *in vivo* a substanțelor active ca atare și a substanțelor active încapsulate în ciclodextrine au scos în evidență eficiența acestora din urmă atât în cazul dizolvării cât și al absorbției, figura 1.35.

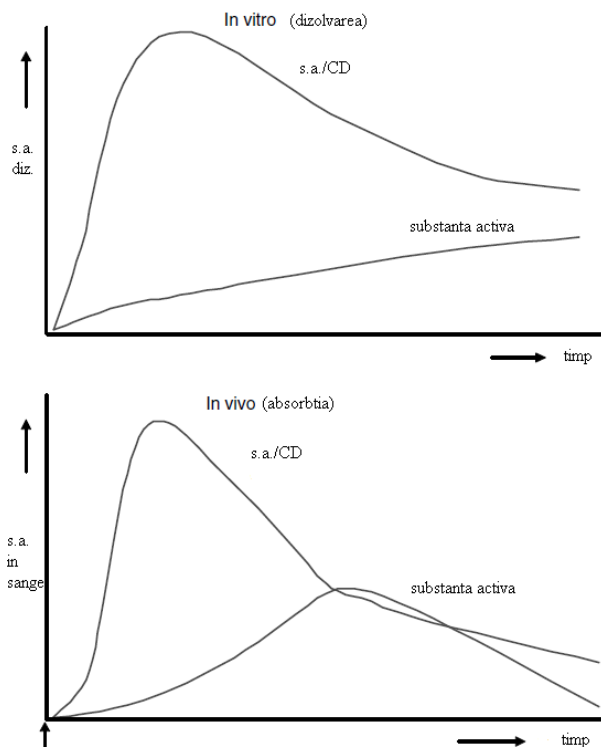


Figura 1.35. Studiu asupra comportării *in vitro*, respectiv *in vivo* a substanțelor active ca atare și încapsulate

Un sistem relativ nou care dorește încărcarea substanței active presupune complexarea acesteia cu ciclodextrine și apoi încapsularea în lipozomi (un sistem de genul substanță activă în ciclodextrine în lipozomi), figura 1.36 [166]. Lipozomii sunt vehicule biodegradabile non-toxice, care pot încapsula atât materialele hidrofile cât și cele hidrofobe. Sistemele de transport a substanțelor bioactive bazate pe lipozomi au proprietatea de a mări efectul terapeutic atât prin creșterea concentrației de substanță activă în celulele afectate cât și prin scăderea expunerii țesuturilor normale, datorită permeabilității corelată cu strategiile de eliberare controlată. Avantajele utilizării lipozomilor sunt: biocompatibilitatea crescută; prepararea ușoară; încărcarea compușilor hidrofilii, amfifili și lipofili; modularea simplă a proprietăților farmacocinetice prin schimbarea compoziției chimice a componentelor din cele două straturi. Dezavantajele care trebuie menționate, în legătură cu lipozomii, sunt: *in vitro* aceștia sunt sensibili la oxidare iar, *in vivo* sunt supuși degradării de către unele enzime [183].

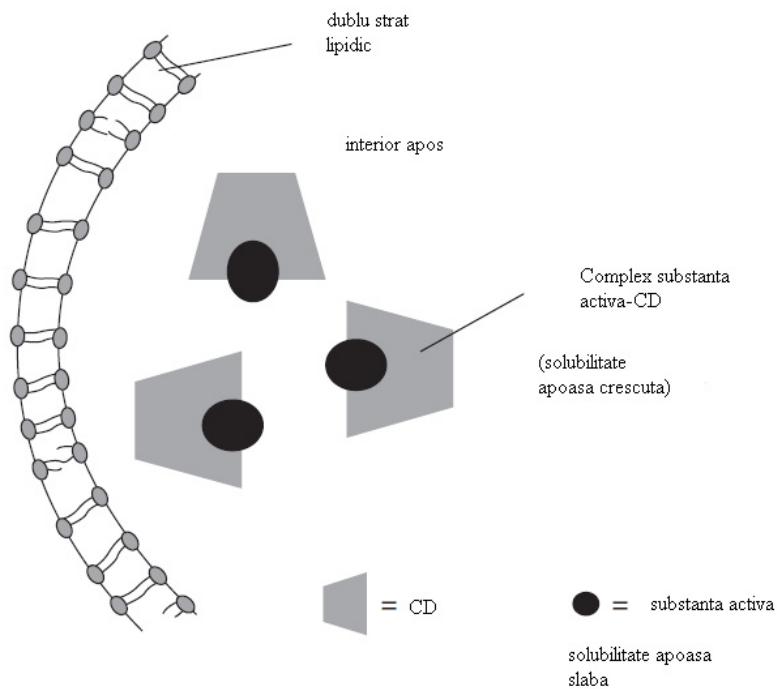


Figura 1.36. Sistem supramolecular substanță activă-CD-lipozomi

2. CONTRIBUȚII ORIGINALE

2.1. Sinteza enzimatică a unor bioconjuțați ai flavonoidelor

2.1.1. Esterificarea enzimatică

Prin bioconjugare se înțelege cuplarea a două biomolecule prin intermediul unei legături covalente. Se cunoaște faptul că atât flavonoidele (agliconice sau glicozilate) cât și acizii grași au activitate biologică. Interesul tot mai mare pentru utilizarea flavonoidelor are la bază activitatea lor biologică demonstrată în captarea radicalilor liberi, modularea activității unor enzime, inhibarea proliferării unor celule, dar și ca substanțe antibiotice, antialergice, antiulceroase, sau antiinflamatoare. În acest sens, o mare varietate de flavonoide se utilizează deja în diferite suplimente alimentare, dar această utilizare este limitată de stabilitatea lor redusă și solubilitatea lor redusă, atât în solvenți organici cât și în soluții apoase. Pentru a elimina aceste inconveniente, flavonoidele pot fi transformate în derivați glicozilați sau acilați, prin metode chimice, enzimatică sau chemoenzimatică. Metodele enzimatică sunt mai eficiente, pentru că ele oferă posibilitatea de a fi exploatată regioselectivitatea ridicată a acestor biocatalizatori, realizând o funcționalizare selectivă a flavonoidei. Transformarea flavonoidelor în derivați acilați, cu acizi carboxilici de diverse structuri, oferă posibilitatea de a introduce în molecula lor o altă funcțiune biologic activă și de a modifica astfel în sens pozitiv nu numai proprietăți fizice ca solubilitatea, ci și activitatea biologică. Această activitate biologică este determinată de structura flavonoidei, iar obținerea unui bioconjugat prin acilare enzimatică va putea avea efecte benefice, depinzând de poziția în care are loc substituția și de natura substituentului.

Au fost realizate reacții catalizate de lipaze pentru a obține esteri ai flavonoidelor cu acizi grași (ca de exemplu rutin palmitat, oleat etc.) în solvenți organici cât mai puțin toxici, necesitând de regulă câteva zile pentru a fi definitivate. Pentru aceste studii s-au folosit, în majoritatea cazurilor, ca agenți de acilare esteri vinilici ai acizilor grași respectivi. Asemenea reacții de transesterificare au avantajul că produsul secundar de reacție este alcoolul vinilic, care se izomerizează la acetaldehidă și în acest mod reacția devine ireversibilă, crescând randamentul în produs. Există însă și două dezavantaje majore, prezența unor urme de acetaldehidă în produs și costul mult mai ridicat al esterilor vinilici comparativ cu acizii grași liberi. Din acest motiv, în acest studiu s-a utilizat varianta esterificării directe a flavonoidelor cu acizii grași, mult mai dificil de realizat datorită necesității controlului cantității de apă din sistem, pentru a deplasa echilibrul reacției.

S-a urmărit obținerea unor bioconjuțați de tipul esterilor, prin metoda esterificării enzimatică a unor flavonoide agliconice (crisina, naringenina, hesperetina, quercetina), glicozilate (rutina), cât și a unui flavonolignan (silibinina), cu acizi grași saturați (decanoic, palmitic, stearic, arahidic, behenic) și nesaturați (oleic și linoleic). Deoarece obiectivul principal al tezei a fost obținerea esterilor flavonoidelor în scopul realizării de complecși cu ciclodextrinele, nu s-a efectuat un studiu sistematic al reacției enzimatică de esterificare, ci doar o evaluare a

parametrilor care influențează în mai mare măsură randamentul acestei reacții. Monitorizarea reacțiilor s-a realizat prin metode cromatografice, urmată de separarea și purificarea esterilor prin tehnici de extracție lichid-lichid și de cromatografie pe coloană.

Caracterizarea bioconjuțaților purificați s-a realizat cu ajutorul spectroscopiei FT-IR și spectrometriei de rezonanță magnetică nucleară RMN (metodologia detaliată este prezentată în Partea experimentală).

În moleculele acestor flavonoide există mai multe grupări hidroxilice care pot forma legături esterice. Pentru a studia efectele biologice și de altă natură ale bioconjuțaților, este necesară obținerea ca produs majoritar a monoesterului, cu legătura esterică într-o anumită poziție. În acest scop, biocataliza cu lipaze este metoda cea mai eficientă, cunoscându-se faptul că ele sunt enzime cu specificitate și selectivitate ridicată, regioselectivitatea fiind una dintre modalitățile de manifestare a acestei selectivități.

Pentru exemplificare, în figura 2.1.1 este redată reacția de acilare a rutinei cu acid palmitic, catalizată de lipază. În cazul rutinei, acilarea se produce cel mai probabil la hidroxilul secundar 4'''-OH din cea de-a doua grupare zaharidică, datorită împiedicărilor sterice existente.

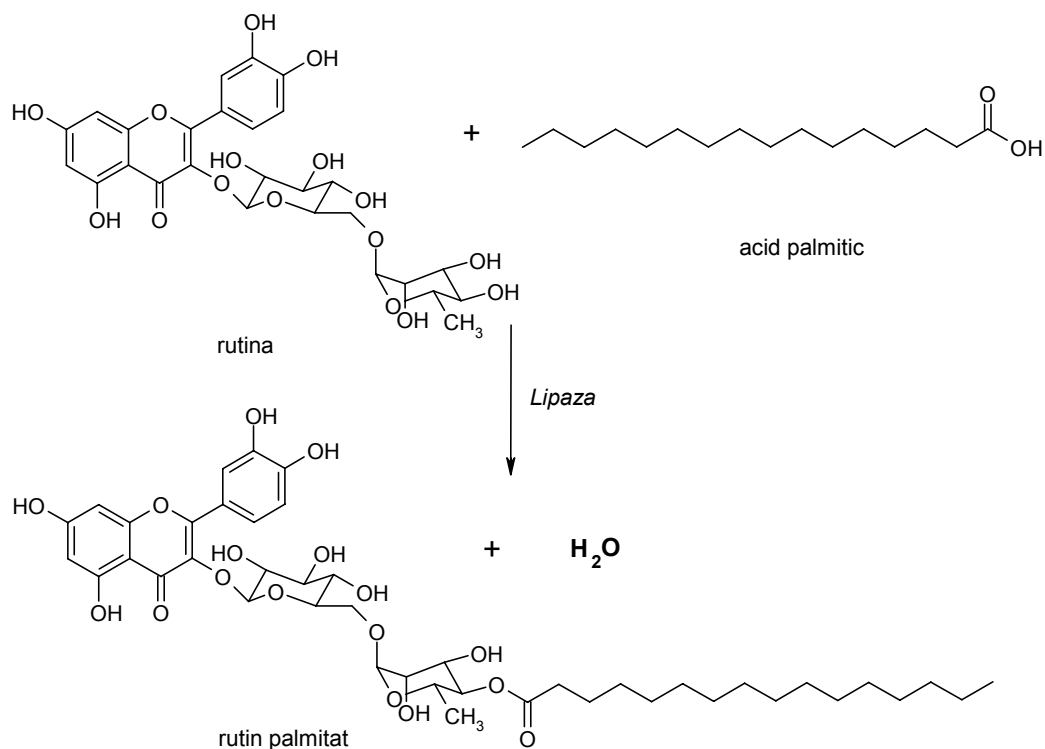


Figura 2.1.1. Esterificarea enzimatică a rutinei în prezența lipazei din *Candida antarctica*

În cazul flavonoidelor agliconice, cum este quercetina, poziția probabilă în care poate avea loc esterificarea este hidroxilul din poziția 3'-OH, în timp ce în cazul silibininei datele de literatură indică hidroxilul primar din poziția 23 ca fiind cel de care se leagă gruparea acil (figura 2.1.2).

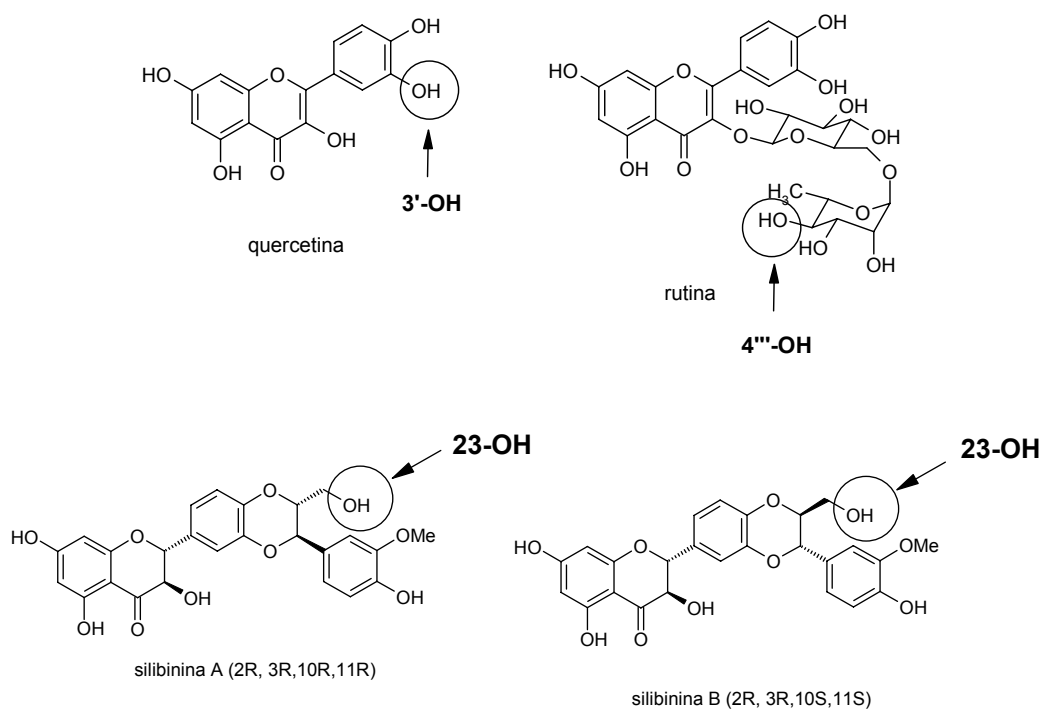


Figura 2.1.2. Pozițiile probabile în care are loc acilarea quercetinei, rutinei și silibininei

Biosintezele au fost monitorizate permanent, pentru a avea confirmarea formării produșilor, iar formarea esterilor a fost confirmată cu ajutorul cromatografiei în strat subțire (TLC) și cromatografiei de lichide de înaltă performanță (HPLC).

La analiza TLC s-au utilizat plăci cromatografice Merck – Kieselgel 60 F₂₅₄. Au fost studiate o serie de sisteme de eluenți pentru a stabili amestecul optim care duce la o separare și vizualizare bună și simplă a compușilor. Eluarea s-a realizat cu diferite amestecuri de solvenți: cloroform/metanol/apă (80/20/0,3, v/v/v), hexan/dietil eter/acid acetic (84/14/2, v/v/v), toluen/formiat de etil/acid formic (50/40/10, v/v/v), toluen/dioxan/acid acetic glacial (90/25/4, v/v/v), cloroform/acetat de etil (60/40, v/v). Cele mai bune rezultate s-au obținut la folosirea ca eluent a amestecului cloroform/metanol/apă (80/20/0,3, v/v/v), pentru rutină, respectiv a amestecului cloroform/acetat de etil (60/40, v/v), pentru silibinină, quercetină și hesperetină. Atât flavonoidele, cât și esterii acestora au fost vizualizați și identificați la lumină UV.

În majoritatea cazurilor studiate, s-a observat formarea unui singur produs final, fapt ce confirmă regioselectivitatea enzimei folosite, așa cum rezultă din figura

2.1.3 În care sunt prezentate exemple de asemenea analize, pentru acilarea silibininei cu diferiți acizi grași. Excepțiile au fost întâlnite la esterificarea rutinei cu acizii grași nesaturați oleic și linoleic, cazuri în care pe plăcuțele TLC au fost vizualizați (în urme) și alți compuși, neidentificați (figura 2.1.4).

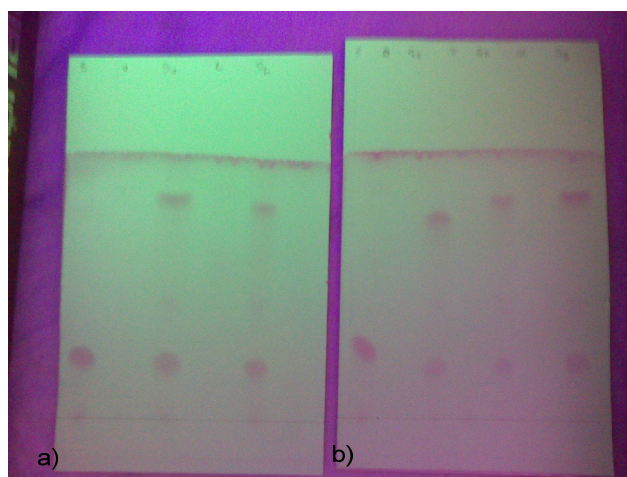


Figura 2.1.3. Analiza TLC a bioconjuugaților silibininei cu acizi grași: (a) acizii grași nesaturați oleic și linoleic și (b) acizii grași saturați decanoic, palmitic, stearic (în ordine, de la stânga la dreapta)

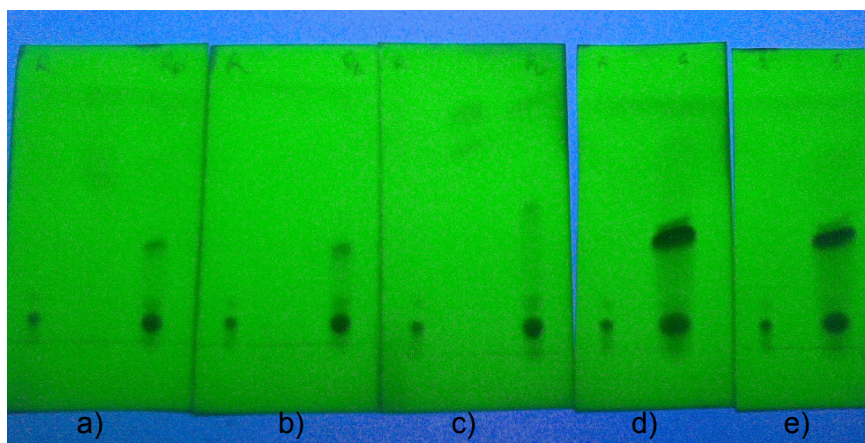


Figura 2.1.4. Analiza TLC a bioconjuugaților rutinei (a) cu acid palmitic, fără adaos de site moleculare (b) cu acid decanoic, fără adaos de site moleculare (c) cu acid linoleic fără adaos de site moleculare (d) și (e) cu acid palmitic, în prezență de site moleculare, cu variația raportului molar flavonoidă/acid gras

Pentru identificarea și analiza cantitativă a produșilor de reacție a fost utilizată analiza HPLC, ea având o rezoluție mult mai bună decât analiza prin TLC. În majoritatea cazurilor în care a avut loc acilarea s-a observat formarea unui singur pic cromatografic, fapt ce confirmă obținerea unui singur produs final.

2.1.1.1. Acilarea enzimatică a flavonoidelor agliconice

Acilarea flavonoidelor agliconice, crisina, naringenina, hesperetina și quercetina a fost studiată folosind drept biocatalizatori o serie de lipaze, de diferite proveniențe. S-a încercat esterificarea enzimatică a crisinei cu acid stearic în prezența enzimelor *Candida antarctica* imobilizată (Novozyme 435), *Pseudomonas fluorescens* (Amano Lipase AK), *Pseudomonas cepacia* (Amano Lipase PS), Lipozyme RM, *Candida cylindracea*, *Aspergillus niger* și *Candida antarctica* (CalB, C-Lecta) folosind ca mediu de reacție atât acetona cât și hexanul, dar analizele prin TLC și HPLC nu au arătat formarea produșilor de reacție în nici una dintre biosintezele realizate.

Esterificarea enzimatică a quercetinei cu acid palmitic în prezența lipazelor *Pseudomonas cepacia* (Amano Lipase PS), *Pseudomonas fluorescens* (Amano Lipase AK) și *Aspergillus niger* s-a realizat în mediu de acetonă. Datele din literatura de specialitate descriu posibilă acilarea quercetinei doar în prezența lipazei PS. Rezultatele obținute în urma acilării în prezența celor trei enzime menționate au arătat că lipaza din *Aspergillus niger* nu s-a dovedit activă pentru acilarea quercetinei cu acid palmitic, acilarea în prezența lipazei PS a fost foarte slabă, chiar și după un timp îndelungat (până la 144 ore), în timp ce la acilarea în prezența lipazei AK, formarea produsului poate fi observată clar, după 120 ore de reacție. În figurile 2.1.5, respectiv 2.1.6, sunt prezentate cromatogramele HPLC ale quercetinei (timp de retenție 10,3 min) și amestecului de reacție care conține quercetin palmitat (timp de retenție 12,2 min), după 120 de ore de reacție, în cazul folosirii ca biocatalizator a lipazei AK.

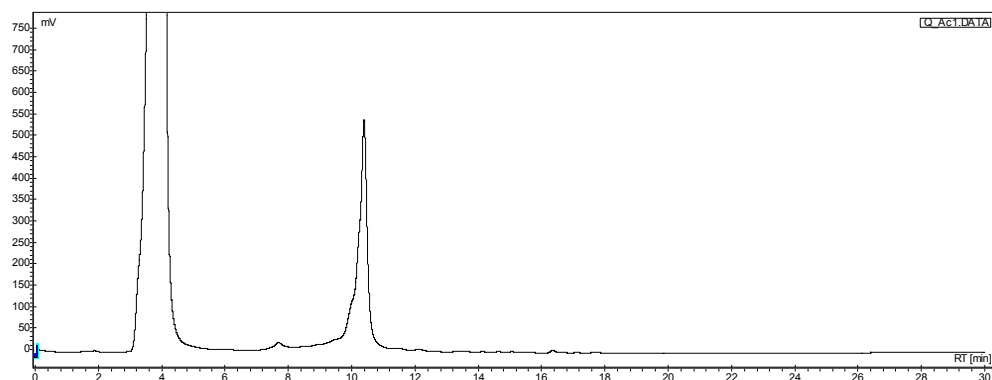


Figura 2.1.5. Cromatograma HPLC a quercetinei (dizolvată în acetonă) obținută cu gradient de eluent H₂O (0.1% AcOH) și acetonitril (0.1% AcOH) și detecție prin UV-VIS la 280 nm (detalii în Partea experimentală)

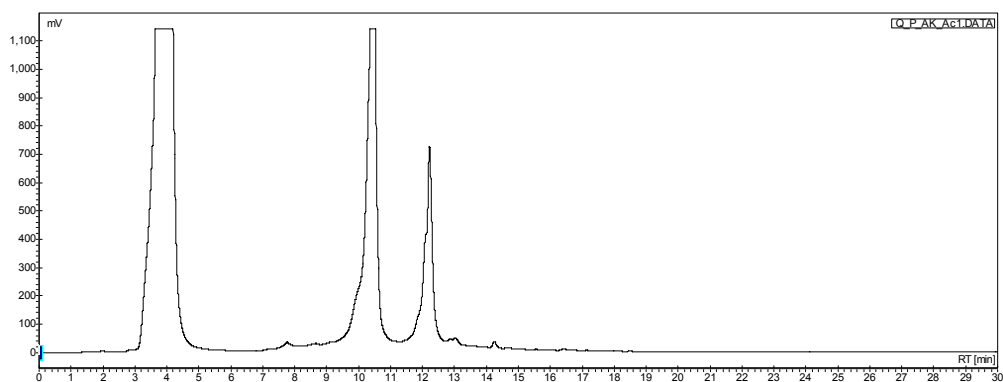


Figura 2.1.6. Cromatograma HPLC a amestecului de reacție de la acilarea quercetinei cu acid palmitic, în prezență de lipază AK, în acetonă, după 120 de ore. Timpi de retenție: quercetină 10,3 min, quercetin palmitat 12,2 min

La acilarea enzimatică a hesperetinei cu acid palmitic s-au folosit aceleași lipaze ca în cazul quercetinei (PS, AK și An), dar formarea produsului de reacție a fost observată doar în cazul utilizării lipazei PS. Figura 2.1.7 redă cromatograma HPLC a hesperetinei, în care picul acestei flavonoide apare la un timp de retenție de 11.5 min, în timp ce din figura 2.1.8 se observă, după 120 de ore de reacție, prezența picului corespunzător esterului, la un timp de retenție de 13,2 min.

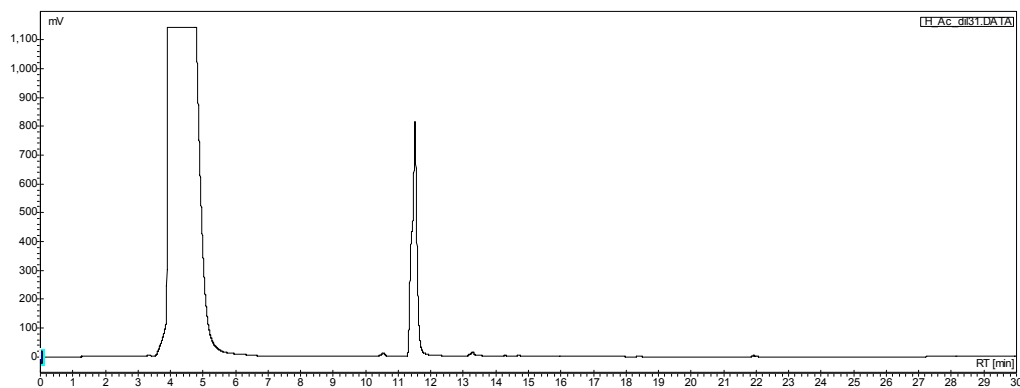


Figura 2.1.7. Cromatograma HPLC a hesperetinei (dizolvată în acetonă) obținută cu gradient de eluent H₂O (0.1% AcOH) și acetonitril (0.1% AcOH) și detecție prin UV-VIS la 280 nm

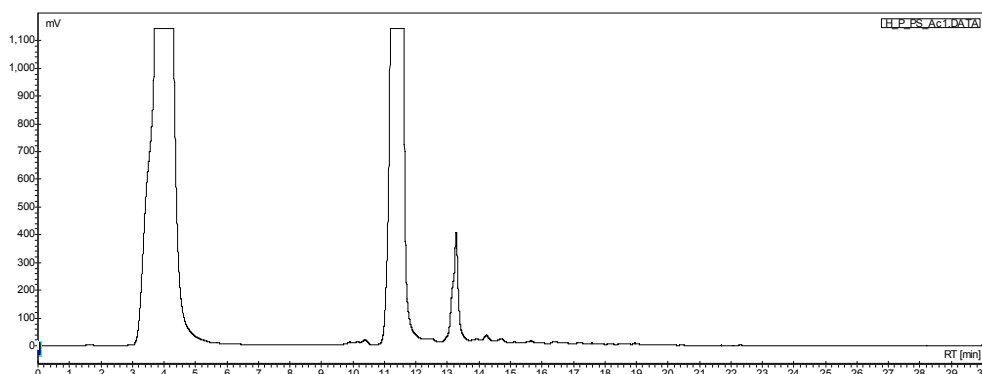


Figura 2.1.8. Cromatograma HPLC a amestecului de reacție de la acilarea hesperetinei cu acid palmitic, în prezență de lipază PS, în acetonă, după 120 de ore de reacție

2.1.1.2. Acilarea rutinei și silibininei. Influența solventului organic și a cantității de apă din sistemul de reacție

Dacă în cazul flavonoidelor agliconice esterificarea directă nu s-a realizat sau a avut loc cu randament scăzut, în cazul rutinei (care este o flavonoidă glicozilată) și a silibininei (care este un flavanolignan), s-au obținut rezultate mult mai bune.

Concentrația flavonoidei s-a stabilit luând în considerare solubilitatea slabă a acestora în solvenții organici, în special în cazul rutinei. Sintezele efectuate au arătat că este nevoie de un exces de acid gras pentru bunul mers al biosintezei, ceea ce este în concordanță cu datele existente în literatură. S-a lucrat la un raport molar flavonoidă/acid gras de 1/3. Concentrații mai ridicate de rutină în mediul de reacție nu au dus la creșterea randamentului final, iar productivitatea a fost sensibil redusă din cauza solubilității scăzute. În cazul silibininei, deși solubilitatea nu a fost o problemă majoră, s-a lucrat la același raport molar de 1/3.

Lipaza utilizată în aceste sinteze a fost Novozyme 435. Au fost testate și celelalte lipaze care au dat rezultate în cazul flavonoidelor agliconice: lipaza AK, lipaza PS și An, dar în cazul rutinei și silibininei cu aceste lipaze nu s-a obținut ester. Datele de literatură indică de asemenea folosirea de Novozyme 435 ca biocatalizator pentru reacții de acilare a acestor flavonoide (prin reacții de transesterificare). Temperatura de reacție a fost în toate cazurile 50°C. Din cauza solubilității reduse a flavonoidelor în solvenții organici utilizați a fost nevoie de o temperatură cât mai ridicată, însă ea a fost limitată de volatilitatea solvenților organici utilizați.

Deoarece în cazul reacțiilor de esterificare catalizate de enzime sunt foarte importante atât controlul cantității de apă din sistemul de reacție cât și natura solventului, s-a realizat optimizarea acestor parametri.

Pentru controlul cantității de apă din sistemul de reacție s-a ales metoda introducerii de site moleculare, cu rolul de a reține apa. Apa conținută de reactanți, în mică măsură, cât și cea prezentă în solventul utilizat și formată pe parcursul reacției de esterificare, într-o mai mare măsură, influențează semnificativ bunul mers al biosintezei. Cantitatea de apă din sistemul de reacție s-a determinat prin titrare Karl Fischer. În figura 2.1.9 este redat conținutul de apă în faza inițială, apoi

la intervale de 24 de ore, 72 de ore și 120 de ore de la inițierea biosintezei, atât în cazul utilizării sitelor moleculare, cât și fără site. Se poate observa diferența majoră în conținutul de apă în cazul utilizării sitelor moleculare (care realizează și îndepărtarea apei formate pe parcursul biosintezei) și conținutul de apă în cazul în care nu s-a îndepărtat apa. În reacțiile de acilare a rutinei cu acizii decanoic, palmitic, stearic, oleic și linoleic, în acetonă, pornind de la un conținut de apă inițial în mediul de reacție cuprins între 0,694-0,950%, la 24 ore de la inițierea biosintezei procentul de apă a crescut semnificativ, până la valori cuprinse între 0,823-1,311%. După 24 de ore, în sinteza cu acidul palmitic au fost introduse site moleculare. Procentul de apă din sistemul de reacție, la 72 de ore de la inițierea biosintezei, a fost cuprins între 0,915-1,592% în experimentele fără site moleculare, în timp ce în sinteza în care s-au utilizat site moleculare s-a determinat un conținut de apă de doar 0,309%. La finalul biosintezei, conținutul de apă din sistemele de reacție fără îndepărtarea apei a fost cuprins între 0,930-1,828%, în timp ce în cazul utilizării de site moleculare a fost de numai 0,259%.

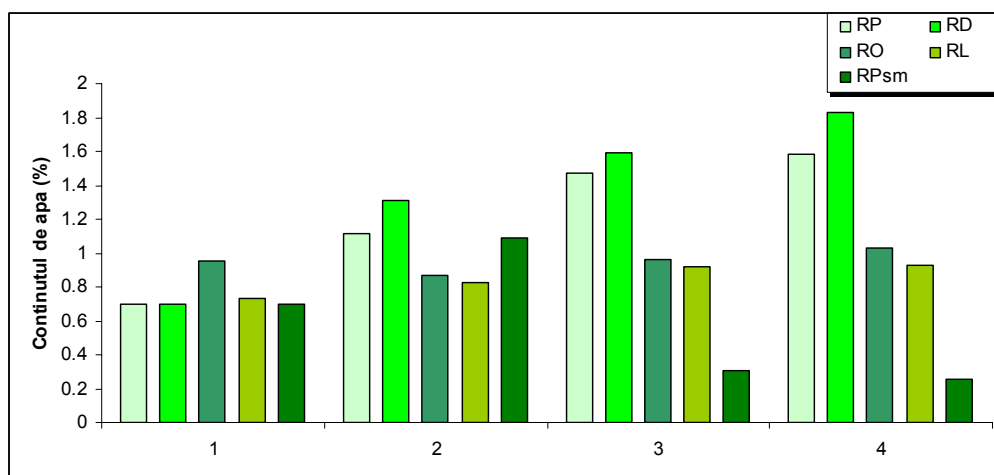


Figura 2.1.9. Conținutul de apă din mediul de reacție în diverse etape ale biosintezei rutinei (R) cu acizii palmitic (P), decanoic (D), oleic (O) și linoleic (L): (1) în fază inițială (2) după 24 de ore de la inițierea biosintezei (3) după 72 de ore de la inițierea biosintezei (4) după 120 de ore de la inițierea biosintezei. RPsm - esterificarea rutinei cu acid palmitic în prezență de site moleculare

Luând în considerare influența determinantă a apei formate pe parcursul desfășurării biosintezei, s-a realizat controlul cantității de apă prezente în mediul de reacție. Solvenții utilizați au fost deshidratați, cantitatea de apă din reactanți a fost determinată (a se vedea Partea experimentală), iar apa formată pe parcursul biosintezei a fost reținută prin adăugare de site moleculare (4Å, 100 g/L).

Cromatogramele produșilor de reacție confirmă influența majoră a apei asupra randamentului de esterificare. În cazurile în care nu s-a realizat controlul cantității de apă din sistem, randamentele au fost foarte scăzute, în cazul acilării rutinei observându-se practic numai picul de rutină (timp de retenție 8,2 min), la 48 de ore de la inițierea reacției (figura 2.1.10).

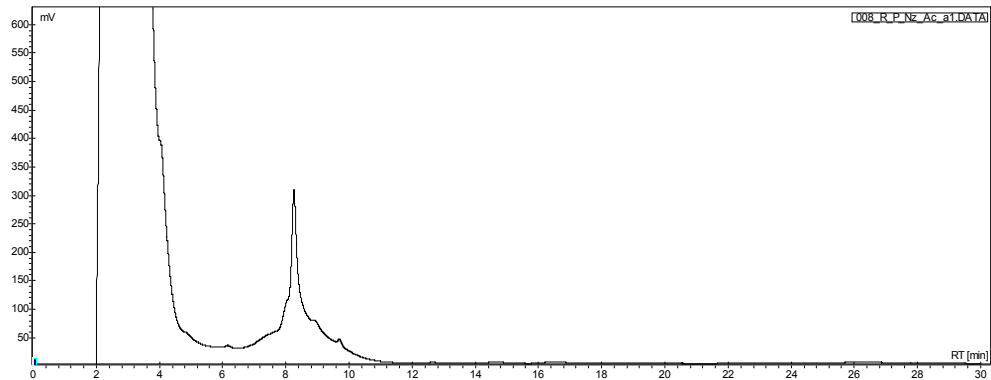


Figura 2.1.10. Cromatograma HPLC a amestecului de reacție rutină/acid palmitic, în prezență de Novozyme, fără adaos de site moleculare, în acetonă, la timp de reacție de 48 ore

Adăugarea de site moleculare pentru reținerea apei a determinat o creștere substanțială a randamentului de esterificare, după 120 de ore de reacție în amestecul de reacție fiind prezent rutin palmitatul (timp de retenție 15,7 min) și doar de o cantitate mică de rutină, așa cum se observă din cromatograma din figura 2.1.11.

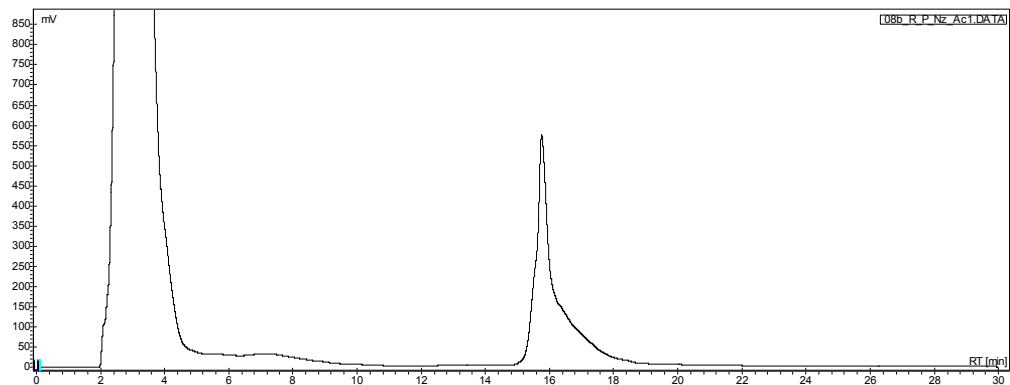


Figura 2.1.11. Cromatograma HPLC a amestecului de reacție rutină/acid palmitic, în prezență de Novozyme, cu adaos de site moleculare, la timp de reacție de 120 de ore, în acetonă

Evoluția în timp a reacțiilor de esterificare s-a monitorizat cromatografic, prin creșterea picului de ester (la același volum de probă analizată), așa cum se vede în figura 2.1.12, în care este prezentată cromatograma amestecului de reacție de la esterificarea rutinei cu acid palmitic, în acetonă, cu utilizarea de site moleculare, la 48, 96 și 120 de ore de la inițierea biosintezei.

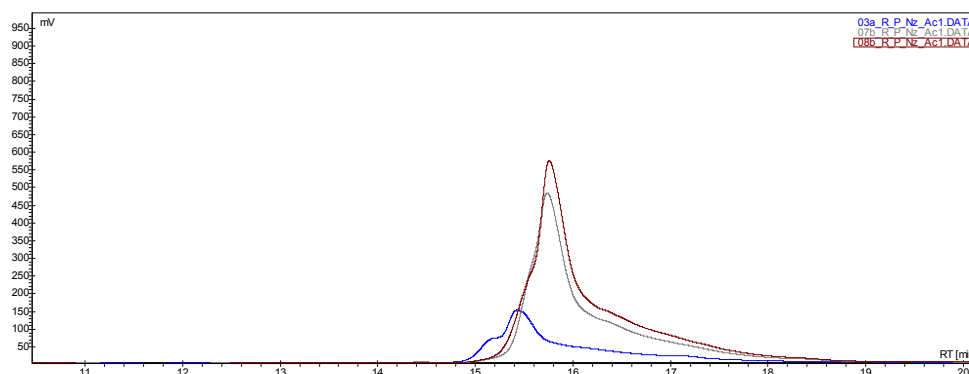


Figura 2.1.12. Evoluția reacției de esterificare a rutinei cu acid palmitic, în prezență de Novozyme 435, în acetonă, monitorizată prin creșterea picului esterului: la 48 de ore de la inițierea biosintezei (negru), la 96 de ore de la inițierea biosintezei (roșu) și la 120 de ore de la inițierea biosintezei (albastru)

Deși nu au fost efectuate calcule cantitative, a fost posibilă estimarea randamentelor prin metoda normării ariilor picurilor. Conform acestor estimări, în cazul sintezei rutin palmitatului, prin deshidratarea solvenților și utilizarea sitelor moleculare pentru îndepărtarea apei formate s-a ajuns la randament de esterificare de peste 80% după 120 de ore de reacție catalizată de lipaza din Novozyme, în acetonă. În cazul neîndepărtării apei, randamentul nu a depășit 20%, în aceleași condiții de reacție, deci o variație relativ mică în ceea ce privește conținutul de apă din mediu poate influența randamentul cu un procent de aproximativ 60%.

Și pentru esterificarea rutinei cu alți acizi grași: decanoic, stearic, oleic și linoleic, randamentul în ester în cazul în care nu s-au utilizat site moleculare a fost sub 20%, iar în cazul utilizării acestora s-a observat o creștere semnificativă, la peste 60%, după aceleași estimări. Lungimea catenei hidrocarbonate a acidului gras nu a influențat în mod semnificativ randamentul final.

Esterificarea enzimatică a silibininei în prezența lipazei imobilizate din *Candida antarctica* (Novozyme 435) a decurs de asemenea cu randamente bune, în condițiile utilizării sitelor moleculare pentru eliminarea apei. Din cromatogramele înregistrate în cazul esterificării cu diferiți acizi grași, în acetonă, se poate observa formarea unui singur produs final de reacție în toate cazurile, mai puțin cel al produsului de esterificare cu acid oleic, unde apare și un produs secundar, probabil linoleat provenit din acidul linoleic conținut ca impuritate în acidul oleic utilizat. Picurile esterilor cu acid oleic și palmitic au practic același timp de retenție în condițiile date de analiză (figurile 2.1.13 și 2.1.14).

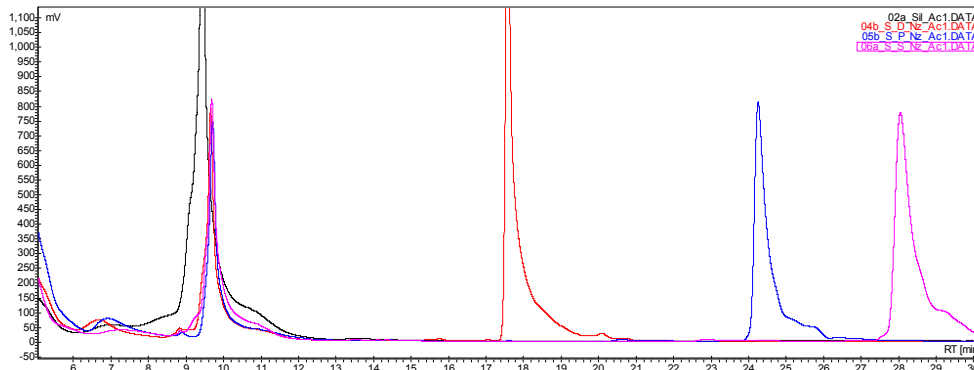


Figura 2.1.13. Cromatogramele HPLC suprapuse ale amestecurilor de reacție de la esterificarea silibininei (timp de retenție 9.6 min) cu acizii decanoic (timpul de retenție al esterului 17,9 min), palmitic (24,2 min) și stearic (28 min), în acetonă, în prezență de Novozyme 435, după 120 de ore de reacție

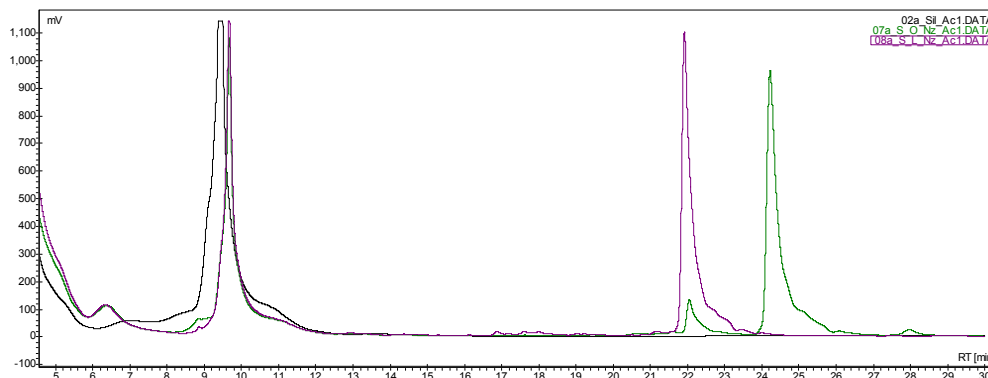


Figura 2.1.14. Cromatogramele HPLC suprapuse ale amestecurilor de reacție de la esterificarea silibininei (timp de retenție 9,6 min) cu acizii oleic (timpul de retenție al esterului 24,2 min) și linoleic (timp de retenție 21,9), în acetonă, în prezență de Novozyme 435, după 120 de ore de reacție

Una dintre problemele majore întâlnite în acest tip de biosinteză o constituie selectarea atentă a solventului. Numărul de solvenți organici capabili să solubilizeze în mod adecvat atât flavonoidele (polare) cât și acizii grași (nepolari), să asigure o activitate mare a enzimei și să fie cât mai puțin toxici (datorită utilizării produsilor finali în scopuri farmaceutice) este limitat.

S-au testat un număr de 4 solvenți: hexan, acetonă, acetonitril și *tert*-butanol, de diferite polarități. Experimentele au fost realizate în prezență de Novozyme 435, la temperatura de 50°C și timp de reacție de 120 de ore, cu adăugare de site moleculare. În figura 2.1.15 sunt reprezentate randamentele reacției de esterificare a silibininei cu acid palmitic în solvenții studiați, estimați în modul descris anterior. Cel mai bun randament, de 94% a fost obținut la biosinteza în care s-a folosit ca solvent acetona, în timp ce la utilizarea hexanului randamentele au fost mici, în jur de 1%, din cauza solubilității foarte mici a

flavonoidei în acest solvent. Randamente destul de bune, dar mai scăzute în comparație cu acetona, s-au obținut prin utilizarea ca solvent a *tert*-butanolului (61%) și acetonitrilului (59%). Rezultate asemănătoare s-au obținut și în cazul esterificării rutinei în aceiași solvenți.

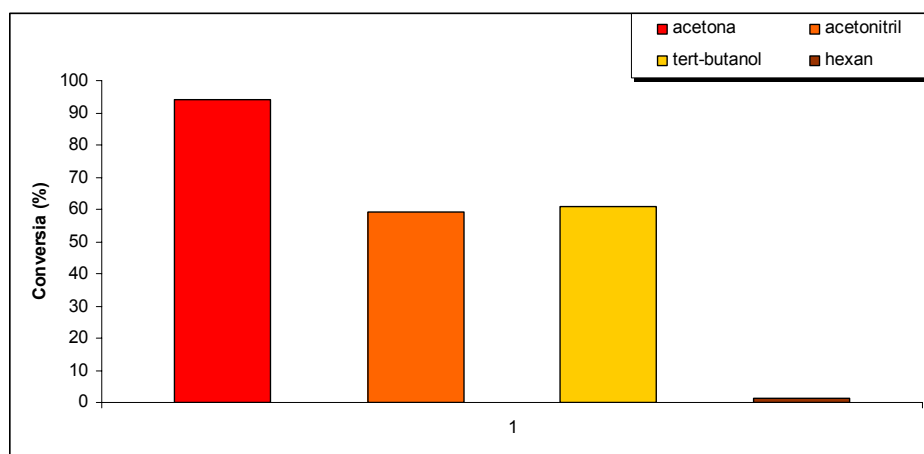


Figura 2.1.15. Influența solventului asupra esterificării silibininei cu acid palmitic, în prezență de Novozyme 435, la temperatura de 50°, timp de reacție 120 de ore

În urma studiului factorilor care influențează desfășurarea biosintezei, s-au determinat condițiile optime de obținere a bioconjuugaților flavonoide/acizi grași:

- mediu de reacție: acetona;
- temperatura: 50°C;
- raportul molar flavonoidă/acid gras: 1/3;
- utilizarea sitelor moleculare, 4Å, pentru îndepărtarea apei din mediul de reacție;
- timpul de reacție 120 ore.

2.1.2. Separarea și purificarea bioconjuugaților

Pentru separarea bioconjuugaților s-au utilizat extracția lichid-lichid și cromatografia pe coloană. În cazul extracțiilor lichid-lichid s-a realizat într-o primă etapă îndepărtarea acizilor grași nereacționați, cu ajutorul amestecului apă-heptan, apoi îndepărtarea flavonoidelor nereacționate în apă, la cald și ulterior extragerea bioconjuugaților în acetat de etil. Datorită faptului că acest tip de separare necesită timp îndelungat și mai multe etape pentru a obține produșii puri, s-a apelat la separarea pe coloană cromatografică.

Pentru a fi supuse separării pe coloană, probele au fost pregătite în două moduri: a) s-au evaporat la sec și au fost dizolvate ulterior în eluentul utilizat la separare; b) au fost concentrate și ulterior introduse pe coloană. Probele introduse pe coloana cu umplutură de silicagel au fost eluate cu un amestec de cloroform/metanol/apă în raport 80/20/0,3 (v/v/v) în cazul esterilor rutinei și cloroform/acetat de etil în raport 60/40 (v/v) în cazul esterilor silibininei, iar

fracțiunile colectate au fost analizate cu ajutorul tehnicii TLC. Fracțiunile care au indicat doar prezența bioconjugatilor au fost supuse evaporării la sec, iar bioconjugatii obținuți au fost recristalizați din acetonă și/sau metanol. În tabelul 2.1.1 sunt redate valorile R_f ale componentilor separați. Detecția s-a realizat în lumină ultravioletă. Dintre esterii prezenți în tabelul 2.1.1, arahidatul și behenoatul de silibinină au fost obținuți prin esterificare enzimatică, dar reacțiile respective nu au fost monitorizate și prin HPLC, de aceea nu au fost menționați anterior.

Tabelul 2.1.1. Valorile R_f ale componentilor separați pe coloană cromatografică a rutinei (eluent cloroform/metanol/apă în raport 80/20/0.3) și silibininei (eluent cloroform/acetat de etil în raport 60/40) cu acizi grași saturați și nesaturați

Nr. crt.	Produsul	Valori R_f
1.	Rutin decanoat	0,33
2.	Rutin palmitat	0,29
3.	Rutin stearat	0,33
4.	Rutin oleat	0,37
5.	Rutin linoleat	0,25
6.	Silibinin decanoat	0,65
7.	Silibinin palmitat	0,68
8.	Silibinin stearat	0,71
9.	Silibinin oleat	0,64
10.	Silibinin linoleat	0,68
11.	Silibinin arahidat	0,73
12.	Silibinin behenoat	0,65

Compușii separați prin cele două metode au fost ulterior analizați și cu ajutorul tehnicii HPLC. Atât în cazul bioconjugatilor rutinei (figurile 2.1.16 și 2.1.17), cât și ai silibininei (figura 2.1.18), purificați prin extracție lichid-lichid, se poate observa prezența unor impurități, probabil produși secundari a căror prezență se explică prin faptul că acizii grași utilizați nu au avut puritate de 100%.

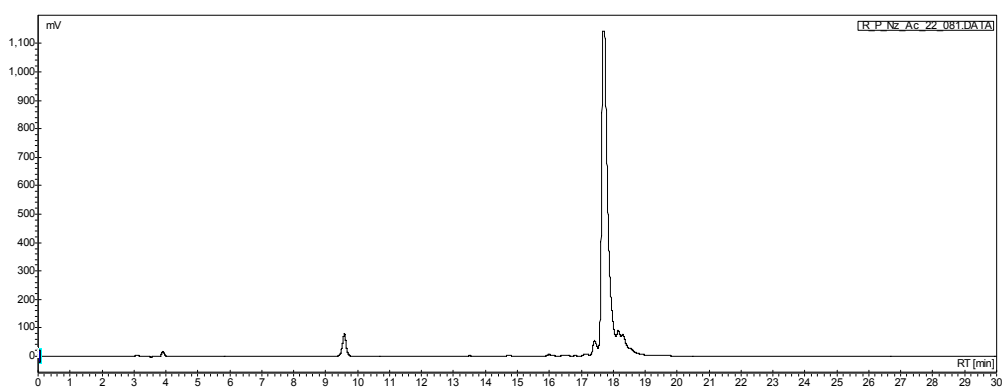


Figura 2.1.16. Cromatograma HPLC a rutin palmitatului, obținut în prezența enzimei Novozyme, în acetonă și separat prin extracție lichid-lichid (analiză în soluție metanolică)

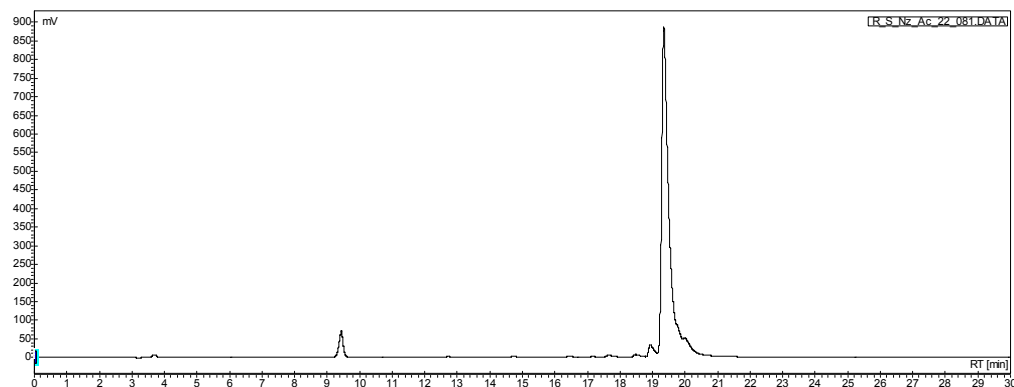


Figura 2.1.17. Cromatograma HPLC a rutin stearatului, obținut în prezența enzimei Novozyme, în acetonă și separat prin extracție lichid-lichid (analiză în soluție metanolică)

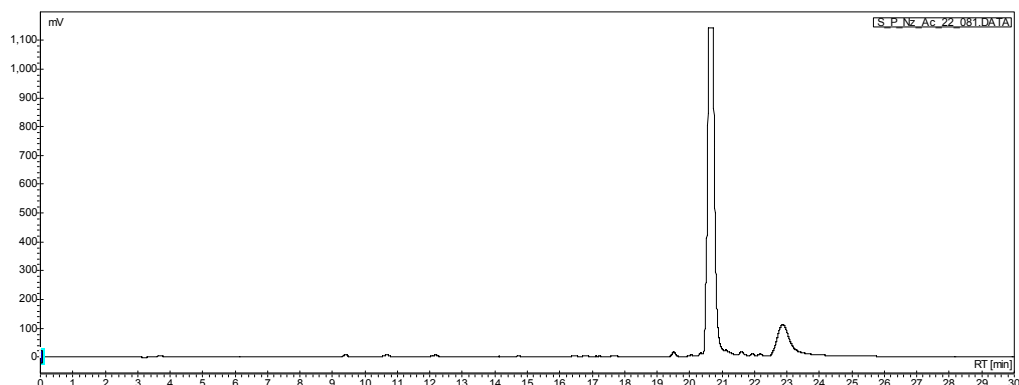


Figura 2.1.18. Cromatograma HPLC a silibinin palmitatului, obținut în prezența enzimei Novozyme, în acetonă și separat prin extracție lichid-lichid (analiză în soluție metanolică)

În schimb, bioconjuțații purificați pe coloană cromatografică au avut puritate foarte ridicată, în cromatogramă fiind prezent practic doar picul esterului (figura 2.1.19). Acest lucru demonstrează superioritatea metodei de purificare prin cromatografie pe coloană.

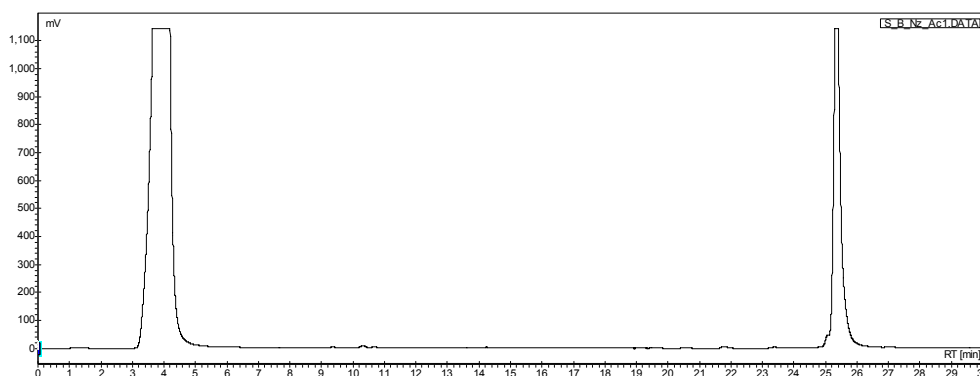


Figura 2.1.19. Cromatograma HPLC a silibinin behenoatului, obținut în prezența enzimei Novozyme, în acetonă și separat pe coloană cromatografică (analiză în soluție de acetonă)

2.1.3. Caracterizarea bioconjugaților purificați

2.1.3.1. Spectroscopia FT-IR

Spectrele FT-IR ale precursorilor și produșilor finali au fost realizate în pastile de bromură de potasiu pentru probele solide și în peliculă între două geamuri de bromură de potasiu pentru probele lichide. Acestea redau benzile caracteristice flavonoidelor, acizilor grași saturați și nesaturați și bioconjugaților acestora. În figura 2.1.20, care corespunde compusului obținut la acilarea rutinei cu acid palmitic, se poate observa dispariția benzii de la 1702 cm^{-1} caracteristică acizilor grași și apariția benzii caracteristice grupării carbonil esterice la numărul de undă 1724 cm^{-1} . Banda caracteristică grupării carbonil din poziția 4 a moleculei de rutină se regăsește la 1656 cm^{-1} (intensă), fiind identificată și în esterul rutinei cu acid palmitic tot la 1656 cm^{-1} , la fel de intensă. În ceea ce privește benzile caracteristice grupărilor hidroxil fenolice, acestea au fost identificate în spectrul FT-IR al rutinei la 3427 cm^{-1} și 1599 cm^{-1} , dar pot fi observate și în spectrul rutin palmitatului, unde le regăsim la aceleași numere de undă.

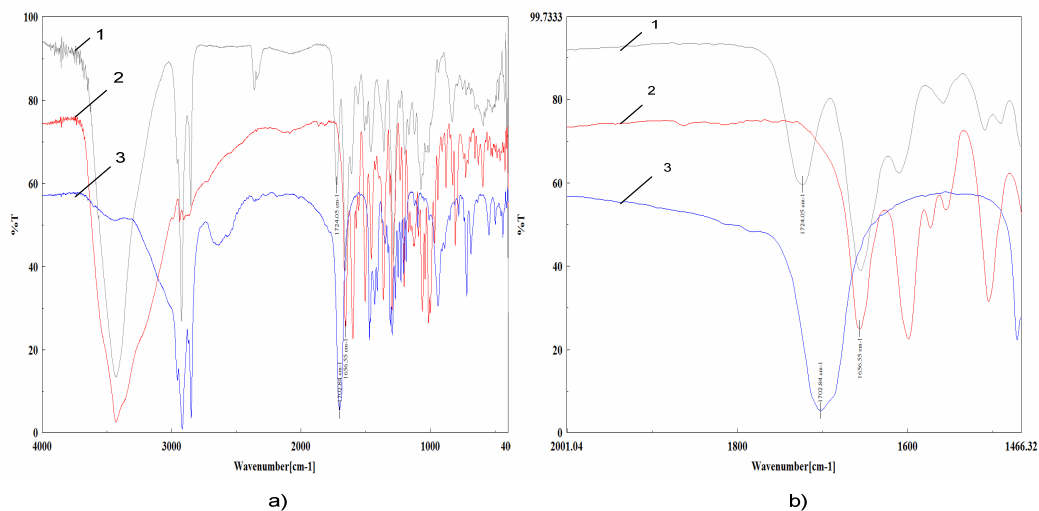


Figura 2.1.20. Suprapunerea spectrelor FT-IR ale (1) rutin palmitatului, obținut în urma esterificării enzimatică a rutinei cu acid palmitic în prezență de Novozyme 435, separat pe coloană cromatografică și purificat prin recristalizare în acetonă, (2) rutinei și (3) acidului palmitic: (a) pe întreg domeniul de la 400-4000 cm^{-1} și (b) pe domeniul 1460-2000 cm^{-1}

În cazul rutin linoleatului, figura 2.1.21, se poate observa deplasare a benzii de vibrație a grupării C=O de la 1710 cm^{-1} , caracteristică acizilor grași nesaturați la numărul de undă 1723 cm^{-1} , caracteristică grupării carbonil esterice. Benzile caracteristice flavonoidei, pentru gruparea carbonil (1656 cm^{-1}) și grupările hidroxil fenolice intense (3437 cm^{-1} și 1606 cm^{-1}) se regăsesc și în spectrul esterului.

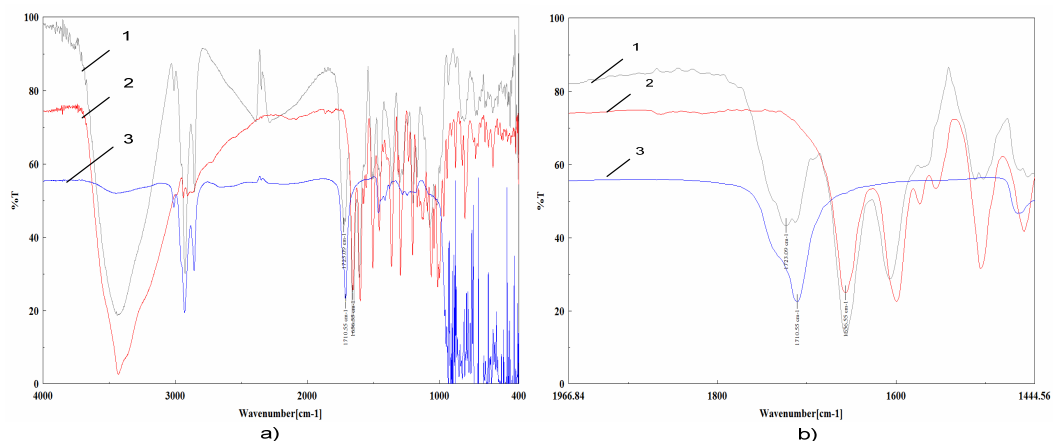


Figura 2.1.21. Spectrul FT-IR al rutin linoleatului (1) obținut în urma esterificării enzimatică a rutinei (2) cu acid linoleic (3) în prezență de Novozyme 435, separat pe coloană cromatografică și purificat prin recristalizare în acetonă

În figura 2.1.22 este prezentat spectrul FT-IR al silibinin palmitatului, suprapus cu spectrele silibininei și acidului palmitic. Silibinin palmitatul prezintă banda corespunzătoare grupării carbonil esterice la 1715 cm^{-1} și banda caracteristică grupării carbonil a silibininei de la 1636 cm^{-1} .

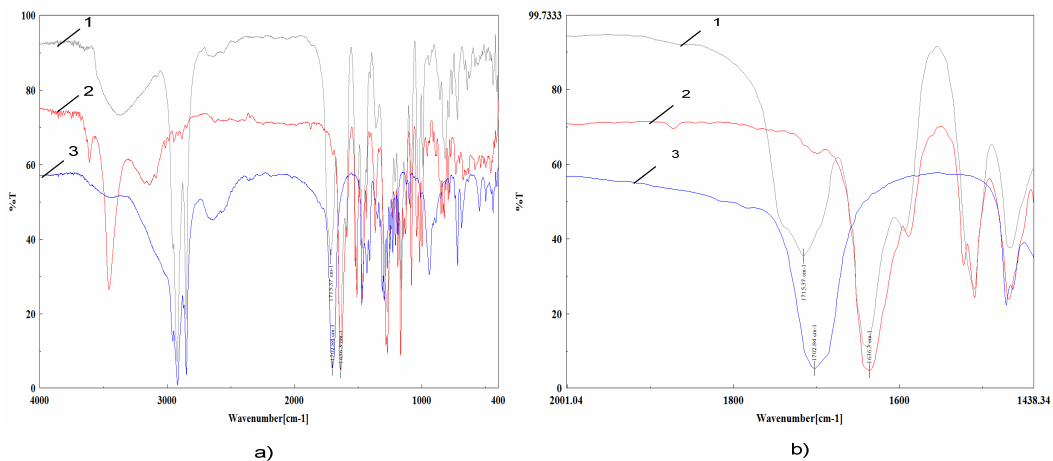
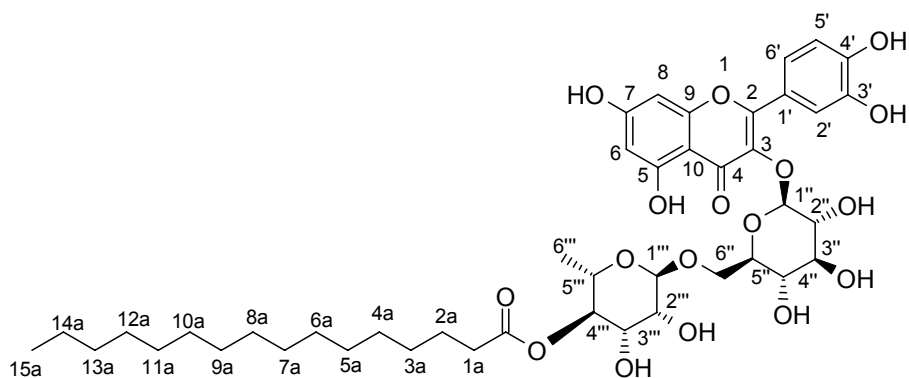


Figura 2.1.22. Spectrul IR al silibinin palmitatului obținut în urma esterificării enzimatică a silibininei cu acid palmitic în prezență de Novozyme 435, separat pe coloană cromatografică și purificat în acetonă (1), suprapus cu spectrele acidului palmitic (2) și silibininei (3)

2.1.3.2. Spectrometria RMN

Structura produșilor de esterificare ai rutinei, obținuți după separare și purificare, a fost analizată prin spectrometrie RMN, atât ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, cât și prin spectroscopie RMN bidimensională de tip 2D-HMBC ^1H - ^{13}C . Spectrele ^1H -RMN și ^{13}C -RMN ale rutin palmitatului prezintă deplasările chimice caracteristice acestui compus (figurile 2.1.23 și 2.1.24).



Rutin palmitat

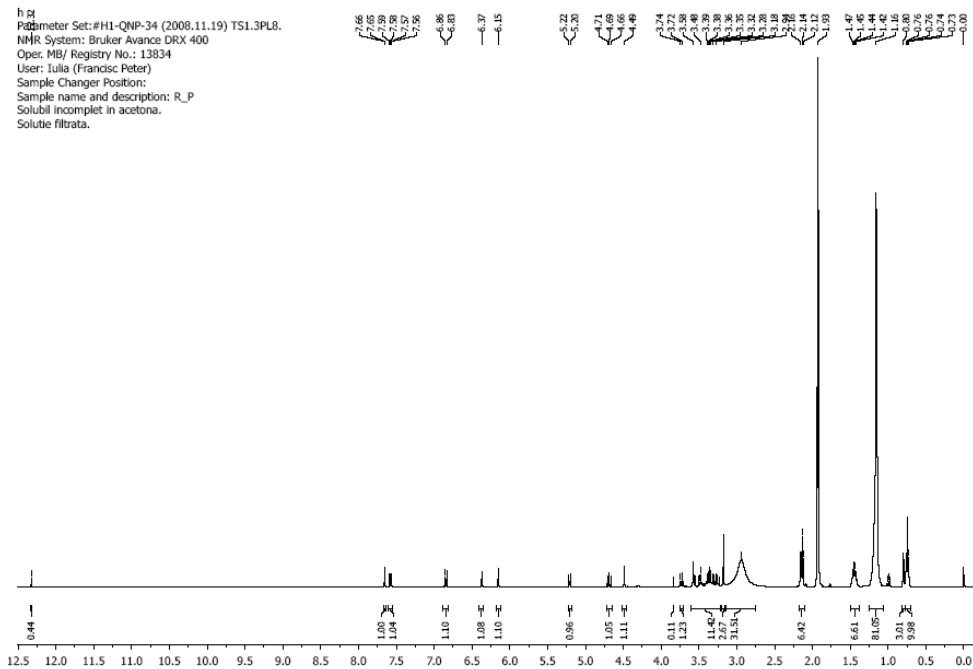


Figura 2.1.23. Spectrul ¹H-RMN (Acetona-d₆) al rutin palmitatului

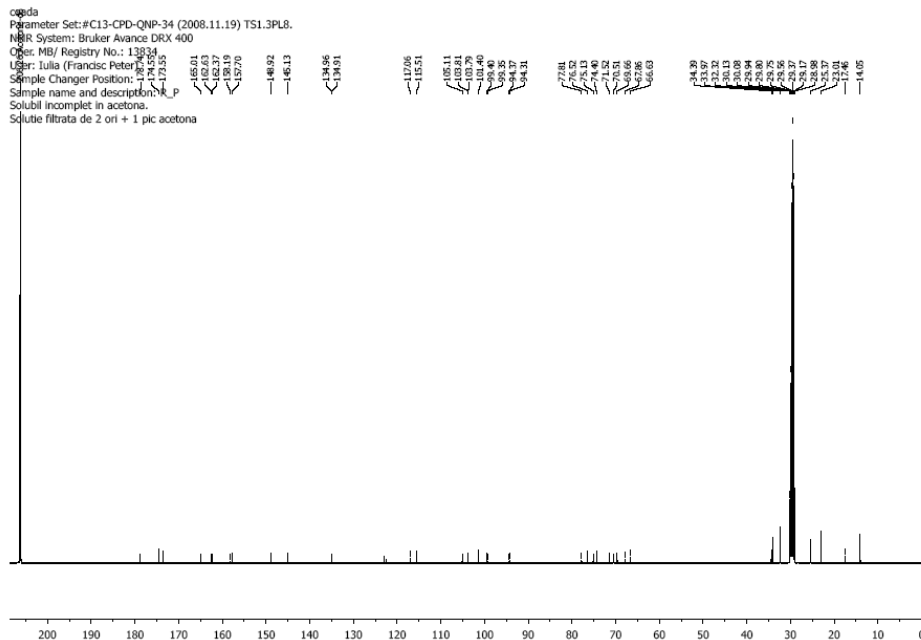


Figura 2.1.24. Spectrul ¹³C-RMN (Acetona-d₆) al rutin palmitatului

$^1\text{H-RMN}$ (Acetonă- d_6 , 400 MHz), δ (ppm): 12,32 (s, 1H, HO-C-5); 7,65 (d, 1H, $J_{\text{H-2}',\text{H-6}'} = 2,1\text{Hz}$, H-2'); 7,58 (dd, 1H, $J_{\text{H-6}',\text{H-2}'} = 2,1\text{Hz}$, $J_{\text{H-6}',\text{H-5}'} = 8,4\text{Hz}$, H-6'); 6,85 (d, 1H, $J_{\text{H-5}',\text{H-6}'} = 8,4\text{Hz}$, H-5'); 6,37 (s, 1H, H-8); 6,15 (s, 1H, H-6); 5,21 (d, 1H, $J_{\text{H-1}'',\text{H-2}''} = 6,0\text{Hz}$, H-1''); 4,69 (t, 1H, $J = 9,4\text{Hz}$, H-4'''); 4,49 (s, 1H, H-1'''); 3,74-3,18 (m, H-14, H-2'', H-3'', H-4'', H-3''', 2xH-6'', H-2''', H-3''', H-5''', HO-C-2'', HO-C-3'', HO-C-4'', HO-C-2''', HO-C-3'''); 2,14 (t, 2H, $J = 7,4\text{Hz}$, H-1a); 1,47-1,42 (m, 2H, H-2a); 1,16 (s, e, 12H, H-3a H-14a); 0,80 (d, 3H, $J = 6,2\text{Hz}$, H-6'''); 0,75 (t, 3H, $J = 6,0\text{Hz}$, H-15a) (figura 2.1.23)

$^{13}\text{C-RMN}$ (Acetonă- d_6 , 100 MHz), δ (ppm): 178,7 (C-4); 173,5 (C=O); 165,0 (C-7); 162,6 (C-5); 158,19 (C-2); 157,7 (C-9); 148,9 (C-4'); 145,13 (C-3'); 134,9 (C-3); 122,9 (C-1'); 122,5 (C-6'); 117,0 (C-2'); 115,5 (C-5'); 105,1 (C-10); 103,8 (C-1''); 101,4 (C-1'''); 99,4 (C-6); 94,3 (C-8); 77,8 (C-3''); 76,5 (C-5''); 75,1 (C-2''); 74,4 (C-4'''); 71,5 (C-2'''); 70,5 (C-4''); 69,6 (C-3'''); 67,8 (C-6'''); 66,6 (C-5'''); 34,4 (C-1a); 33,3 (C-13a); 30,1 (C-7a, C-8a, C-9a); 29,9 (C-6a, C-10a); 29,7 (C-5a, C-11a); 29,6 (C-4a, C-12a); 29,5 (C-3a); 17,8 (C-6'''); 14,1 (C-15a) (figura 2.1.24).

Din spectrul 2D-HMBC $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ al rutin palmitatului (figura 2.1.25) se observă cuplajul la distanță dintre protonul de la 12,32 ppm și atomii de carbon de la 99,4 ppm (C-6), 105,1 ppm (C-10) și 162,6 ppm (C-5) ceea ce ne conduce la concluzia că acest proton este protejat hidroxilic HO – legat de carbonul C-5.

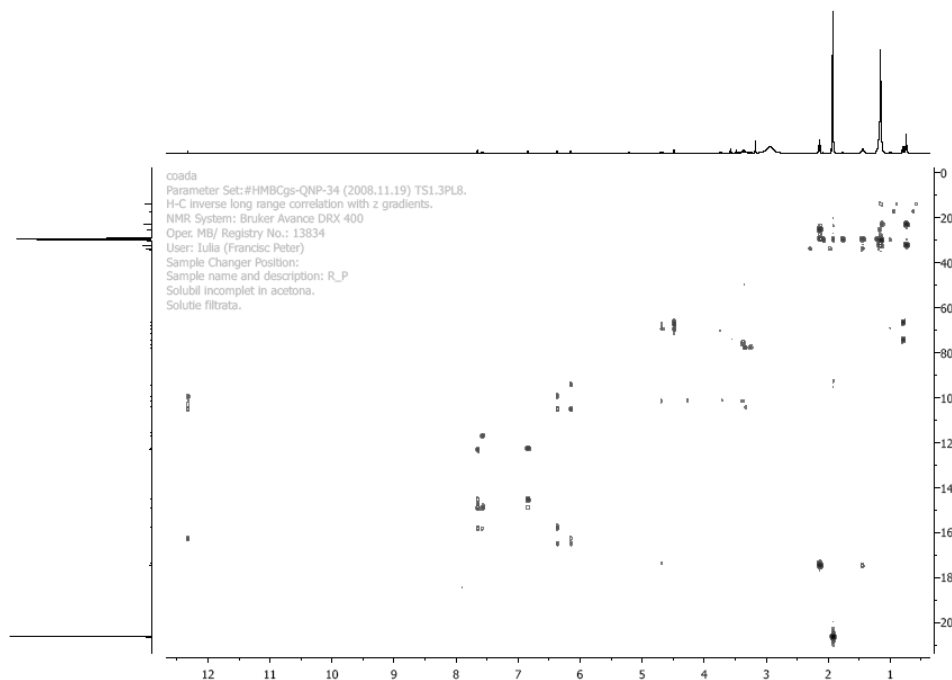


Figura 2.1.25. Spectrul $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ -HMBC al rutin palmitatului

În spectrul 2D-HMBC se observă și cuplajul la distanță (J^3) dintre carbonul carbonilic de la 173,5 ppm și protonul H-4''', cuplaj care demonstrează acilarea rutinei la hidroxilul din poziția C-4'''.

Tot în spectrul 2D-HMBC se mai observă și alte cuplaje la distanță, care demonstrează structura restului de rutină din compusul sintetizat:

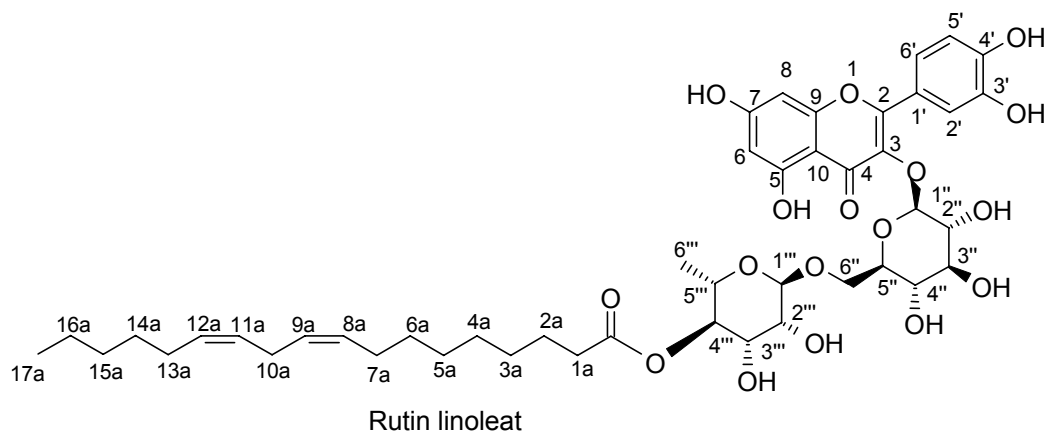
- cuplajul la distanță dintre H-2' și C-1', C-3', C-4' și C-2
- cuplajul la distanță dintre H-6' și C-2', C-4' și C-2
- cuplajul la distanță dintre H-5' și C-1', C-3' și C-4'
- cuplajul la distanță dintre H-8 și C-6, C-10, C-9 și C-7
- cuplajul la distanță dintre H-6 și C-8, C-10, C-5 și C-7
- cuplajul la distanță dintre H-4''' și C-5''', C-3''' și C-1'''
- cuplajul la distanță dintre H-1''' și C-5''', C-3''' și C-2'''
- cuplajul la distanță dintre H-6''' și C-5''' și C-4'''

Alte cuplaje din spectrul 2D-HMBC care demonstrează structura restului acil sunt:

- cuplajul la distanță dintre H-1a și C-2a, C-3a și C=O
- cuplajul la distanță dintre H-2a și C-3a, C-4a și C=O
- cuplajul la distanță dintre H-15a și C-14a și C-13a

Pe baza spectrului de protoni $^1\text{H-RMN}$ s-a determinat că, compusul sintetizat este un amestec ce conține rutină acilată și acid palmitic nereacționat, deci prin metoda de purificare pe coloană utilizată nu s-a reușit îndepărtarea completă a acidului nereacționat din produs.

În cazul esterului rutinei cu acidul linoleic, rezultatele analizei RMN sunt asemănătoare, acilarea realizându-se în aceeași poziție, ceea ce era de așteptat.



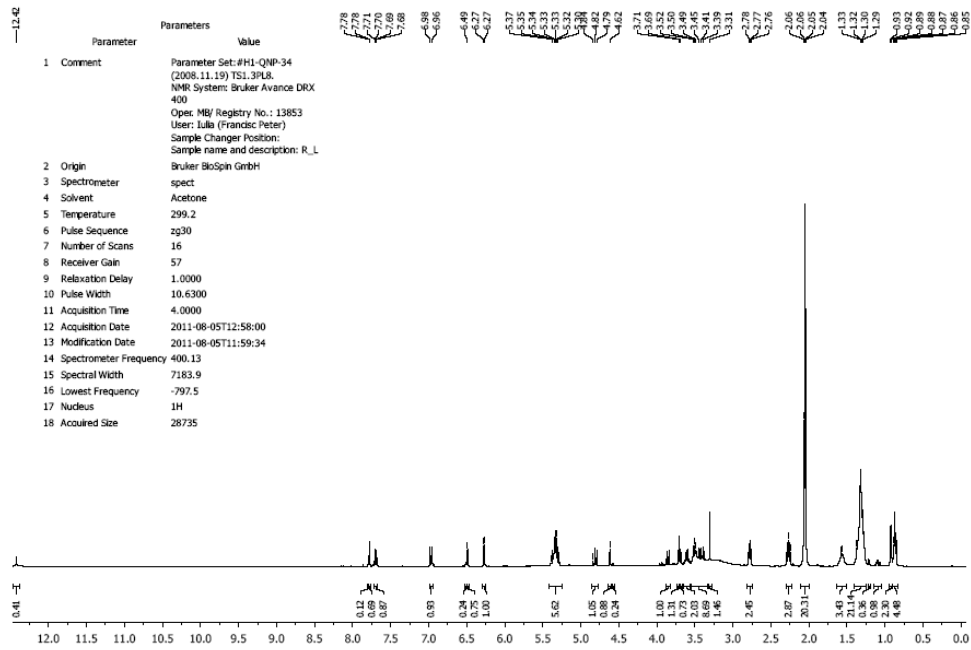


Figura 2.1.26. Spectrul ¹H-RMN (Acetona-d₆) al rutin linoleatului

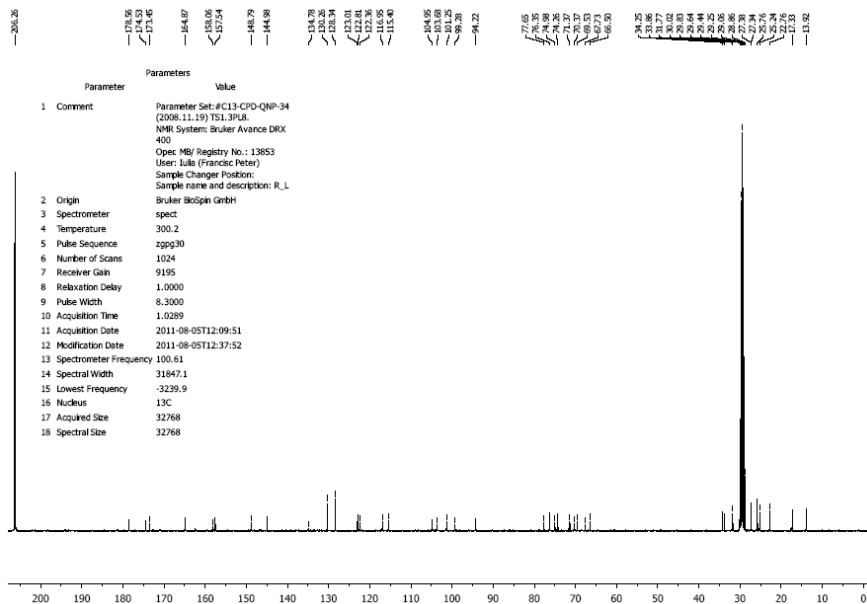


Figura 2.1.27. Spectrul ¹³C-RMN (Acetona-d₆) al rutin linoleatului

$^1\text{H-RMN}$ (Acetona- d_6 , 400MHz), δ (ppm): 12,42 (s, 1H, HO - C-5); 7,78 (d, 1H, $J_{\text{H-2}',\text{H-6}'} = 2,1\text{Hz}$, H-2'); 7,69 (dd, 1H, $J_{\text{H-6}',\text{H-2}'} = 2,1\text{Hz}$, $J_{\text{H-6}',\text{H-5}'} = 8,5\text{Hz}$, H-6'); 6,97 (d, 1H, $J_{\text{H-5}',\text{H-6}'} = 8,5\text{Hz}$, H-5'); 6,49 (d, 1H, $J_{\text{H-8},\text{H-6}} = 2,0\text{Hz}$, H-8); 6,27 (d, 1H, $J_{\text{H-6},\text{H-8}} = 2,0\text{Hz}$, H-6); 5,39-5,28 (m, 5H, H-8a, H-9a, H-11a, H-12a, H-1''); 4,82 (t, 1H, $J = 9,5\text{Hz}$, H-4'''); 4,62 (s, 1H, H-1'''); 3,87-3,31 (m, 1H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', 2xH-6'', H-2''', H-3''', H-5''', HO-C-7, HO-C-4', HO-C-3', HO-C-2'', HO-C-3'', HO-C-4'', HO-C-2''', HO-C-3'''); 2,78-2,76 (m, 2H, H-10a); 2,28-2,24 (m, 2H, H-1a); 1,60-1,54 (m, 2H, H-2a); 1,38-1,28 (m, 14H, H-3^a - H-6^a, 2xH-14a, 2H-15a, 2xH-16a); 0,92 (d, 3H, $J = 6,2\text{Hz}$, H-6'''); 0,89-0,85 (m, 3H, H-17a). Semnalul pentru protonii 2xH-7a și 2xH-13a este inclus în semnalul pentru protonii solventului, acetona- d_6 . (figura 2.1.26)

$^{13}\text{C-RMN}$ (Acetona- d_6 , 100MHz), δ (ppm): 178,5 (C-4); 173,4 (C=O); 164,8 (C-7); 162,5 (C-5); 158,1 (C-2); 157,5 (C-9); 148,8 (C-4'); 144,9 (C-3'); 134,8 (C-3); 130,3 (C-9a, C-12a); 128,3 (C-8a, C-11a); 123,0 (C-1'); 122,8 (C-6'); 116,9 (C-2'); 115,4 (C-5'); 104,9 (C-10); 103,7 (C-1''); 101,2 (C-1'''); 99,3 (C-6); 94,2 (C-8); 77,6 (C-3'''); 76,3 (C-5''); 74,9 (C-2''); 74,3 (C-4'''); 71,4 (C-2'''); 70,4 (C-4''); 69,5 (C-3'''); 66,7 (C-6''); 66,5 (C-5'''); 34,2 (C-1a); 33,8 (C-6a); 31,7 (C-15a); 29,9 (C-5a); 29,3 (C-3a); 27,4 (C-7a); 27,3 (C-13a); 25,7 (C-10a); 25,2 (C-2a); 22,7 (C-16a); 17,3 (C-6'''); 13,9 (C-17a). (figura 2.1.27)

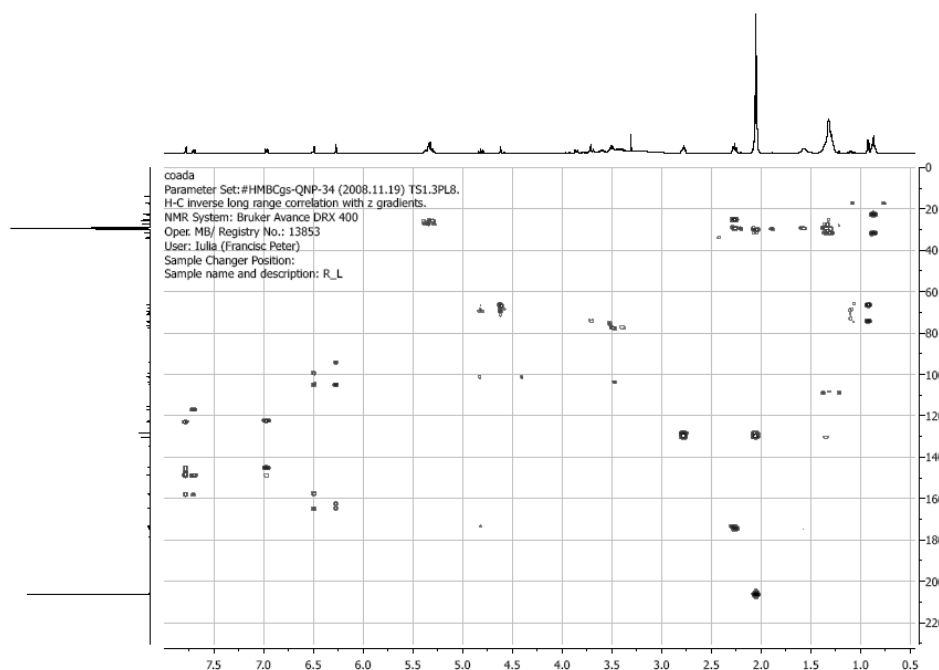


Figura 2.1.28. Spectrul $^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$ al rutin linoleatului

Din spectrul 2D-HMBC (figura 2.1.28) al compusului rutin linoleat se observă cuplajul la distanță (J^3) dintre carbonul de la 173,4 (C=O) și protonul de la 4,82 ppm (H-4'''), cuplaj care demonstrează că acilarea rutinei cu acid linoleic a avut loc la hidroxilul din poziția C-4'''.

Se observă de asemenea în spectrul 2D-HMBC și alte cuplaje la distanță care demonstrează prezența restului de rutină în compusul acilat (rutin linoleat), cum sunt:

- cuplajul la distanță dintre H-2 și C-1', C-3', C-4' și C-2
- cuplajul la distanță dintre H-6' și C-2', C-4' și C-2
- cuplajul la distanță dintre H-5' și C-1', C-3' și C-4'
- cuplajul la distanță dintre H-8 și C-6, C-10, C-9 și C-7
- cuplajul la distanță dintre H-6 și C-8, C-10, C-5 și C-7
- cuplajul la distanță dintre H-4''' și C-5''', C-3''' și C-1'''
- cuplajul la distanță dintre H-1''' și C-5''', C-3''' și C-2'''
- cuplajul la distanță dintre H-6''' și C-5''' și C-4'''

Alte cuplaje la distanță din spectrul 2D-HMBC care demonstrează structura restului acil sunt:

- cuplajul dintre protonul H-1a și carbonii C-2a, C-3a și C=O
- cuplajul dintre protonul H-17a și carbonii C-16a și C-15a.

Din raportul de protoni din spectrul $^1\text{H-RMN}$ al rutin linoleatului s-a calculat că în urma sintezei și a operațiilor ulterioare de separare a rezultat un amestec care conține ~60% rutină acilată cu acid linoleic și ~30% acid linoleic nereacționat.

2.1.4. Concluzii parțiale

În urma studiilor efectuate privind esterificarea enzimatică a unor flavonoide și flavonolignani cu acizi grași saturați și nesaturați, în vederea obținerii bioconjugatilor, izolarea, separarea și purificarea esterilor și caracterizarea acestora, se pot trage următoarele concluzii parțiale:

- S-au obținut bioconjugati ai rutinei și silibininei cu acizii grași saturați decanoic, palmitic, stearic, arahidic și behenic, și acizii grași nesaturați oleic și linoleic, cu randamente ridicate.
- Identificarea bioconjugatilor s-a realizat prin cromatografie în strat subțire folosind amestecurile de eluenți cloroform/metanol/apă pentru esterii rutinei și cloroform/acetat de etil pentru esterii silibininei, cât și prin HPLC, prin detecție în UV-VIS la 280 nm și utilizând un gradient de solvent acetonitril-apă. În majoritatea cazurilor, cromatogramele înregistrate au indicat formarea unui singur produs de reacție.
- Randamentele în produși finali sunt influențate de o serie de factori (natura enzimei, concentrația și natura substraturilor, solventul utilizat, îndepărtarea apei). Dintre toți acești factori, îndepărtarea apei formate prin utilizare de site moleculare a avut o influență decisivă asupra bunului mers al biosintezei, determinând o creștere a randamentului de aproximativ 60%.

- Dintre solvenții organici testați, acetona s-a dovedit a fi cel mai bun ca mediu de reacție.
- Acilarea flavonoidelor agliconice crisină, naringenină, hesperetină și quercetină cu acid palmitic, folosind drept biocatalizator șapte tipuri de lipaze microbiene de diferite proveniențe, în diferiți solvenți (acetona, hexan, acetonitril) și la diferite temperaturi (40-60°C), a avut ca rezultat formarea produsului de esterificare doar în cazurile acilării quercetinei (cu randamentele cele mai bune în prezența lipazei AK) și hesperetinei (în prezența lipazei PS).
- Separarea și purificarea bioconjugărilor s-a realizat mai eficient prin cromatografie pe coloană de silicagel decât prin extracție lichid-lichid. Pentru separarea esterilor rutinei eluentul folosit a fost amestecul cloroform/metanol/apă (80/20/0,3, v/v/v), iar pentru esterii silibininei amestecul cloroform/acetat de etil (60/40, v/v). Purificarea compușilor separați s-a realizat prin recristalizare din acetona sau metanol, randamente mai bune fiind obținute în acetona.
- Analiza esterilor purificați prin spectroscopie FT-IR și spectrometrie RMN a confirmat formarea unui singur produs de reacție, sub formă de monoester, datorită regioselectivității enzimei.
- Cu ajutorul spectrometriei RMN s-a demonstrat că acilarea rutinei cu acizii grași saturați și nesaturați a avut loc la hidroxilul din poziția C-4''.

2.2. Modelarea moleculară a bioconjugărilor flavonoide/acizi grași și docarea în ciclodextrine

Modelarea moleculară a bioconjugărilor flavonoide/acizi grași, a ciclodextrinelor, respectiv a încapsulării moleculare a presupus parcurgerea următoarelor etape principale:

- construcția moleculelor, cu respectarea configurației pentru atomii de carbon chirali;
- alocarea tipurilor de atomi;
- selectarea și denumirea tuturor legăturilor flexibile din moleculă (a unghiurilor de torsiune);
- selectarea ciclurilor cu flexibilitate ridicată;
- analiza conformațională a moleculelor studiate cu luarea în considerare a unghiurilor de torsiune și a ciclurilor flexibile selectate;
- selectarea conformației de minimă energie (cea mai stabilă din punct de vedere termodinamic);
- alegerea pozițiilor de start în experimentele de docare bioconjugat/ciclodextrină;
- realizarea docării până la obținerea unei energii minime a complexului (energie de interacțiune maximă);
- calculul energiilor de interacțiune din datele pentru complex, respectiv pentru componentele individuale.

2.2.1. Bioconjuțați flavonoide/acizi grași

În cazul bioconjuțaților s-au ales ca unghiuri de torsiune în analiza conformațională cele corespunzătoare legăturilor din pozițiile 2 și 3 de pe restul benzopiranonic, toate unghiurile de torsiune (cu unele limitări) corespunzătoare celor două resturi glicozidice, respectiv unghiurile de torsiune din restul de acid gras (figura 2.2.1).

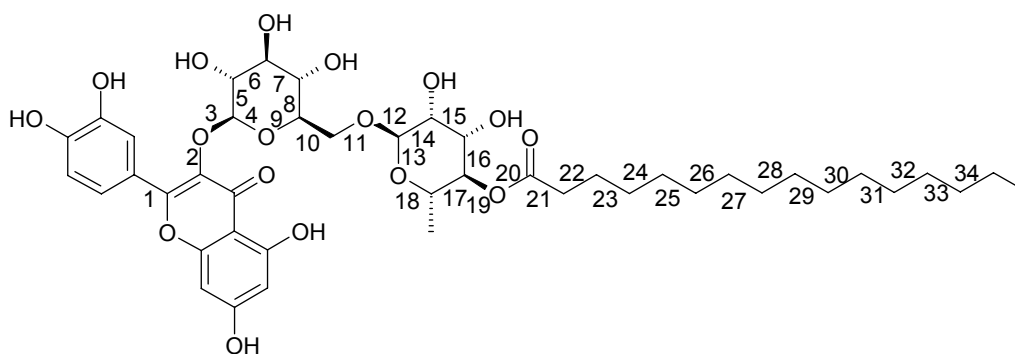


Fig. 2.2.1. Numerotarea unghiurilor de torsiune (legăturile flexibile) din molecula bioconjugatului rutin palmitat

În urma analizei conformaționale s-a constatat că majoritatea conformațiilor stabile prezintă restul de acid gras în formă spiralată, orientat spre restul benzopiranonic (figura 2.2.2). Numărul de conformații cu energie cu până la 4 kcal/mol mai mare decât energia conformației de stabilitate maximă a fost foarte mare: 42 conformații pentru rutin palmitat (tabel 2.2.1), 30 pentru rutin stearat, 42 pentru rutin oleat și 33 pentru rutin linoleat. Suprapunerea conformațiilor mai stabile (energie cu până la 0,5 kcal/mol mai mare decât cea corespunzătoare conformației cele mai stabile) a indicat o aliniere foarte bună pentru restul benzopiranonic și chiar pentru partea dizaharidică, în timp ce resturile de acid gras prezintă conformații diverse, însă toate în formă spiralată, orientate spre benzopiran (figurile 2.2.3 și 2.2.4).

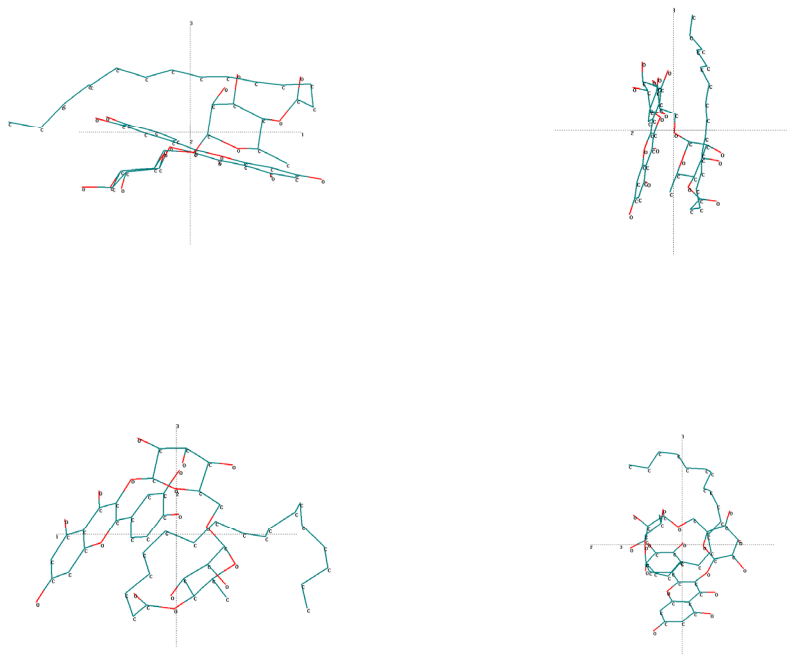
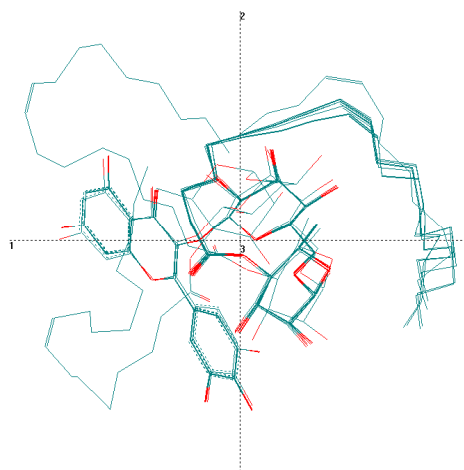


Figura 2.2.2. Conformațiile de minimă energie pentru rutin palmitat (sus) și rutin oleat (jos) prezentate în două orientări sugestive (aliniere după axele OX și OY)



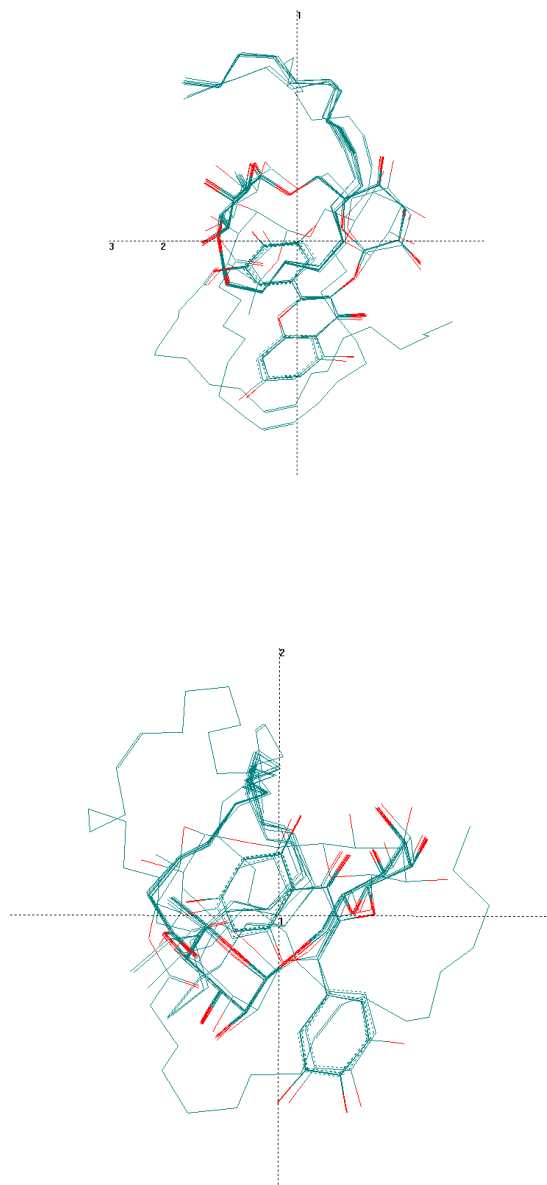
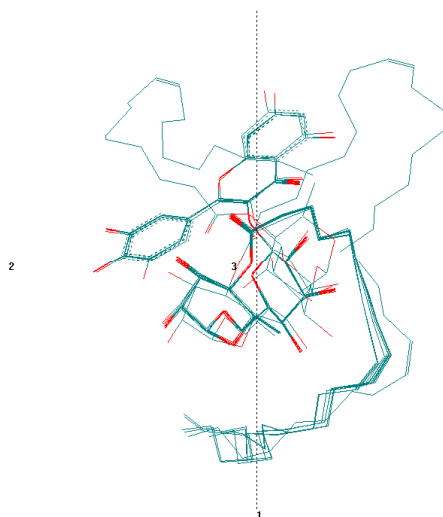
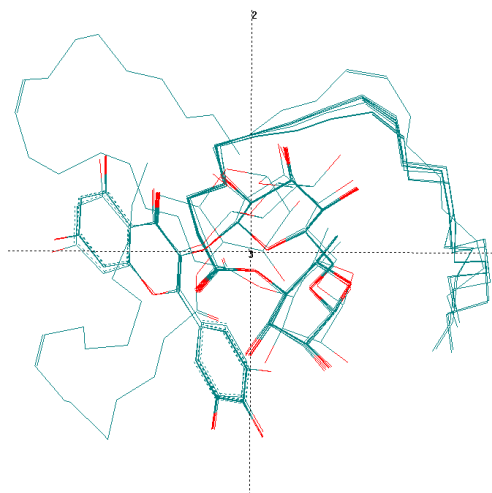


Figura 2.2.3. Suprapunerea primelor 10 conformații cu energie mai mare cu până la 0,5 kcal/mol față de energia celei mai stabile conformații în cazul bioconjugatului rutin palmitat



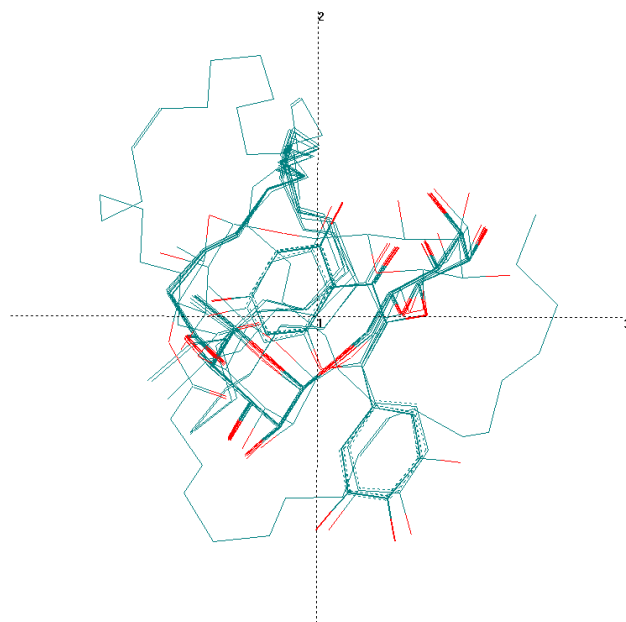


Figura 2.2.4. Suprapunerea primelor 10 conformații cu energie mai mare cu până la 0,5 kcal/mol față de energia celei mai stabile conformații în cazul bioconjugatului rutin oleat

Tabelul II.2.1. Valorile unghiurilor de torsiune (selecție N°1, N°2, N°3, N°19, N°22, corespunzătoare legăturilor flexibile dintre benzopiran și fenilul din poziția 2, celor două legături ce conectează benzopiranul cu restul dizaharidic, respectiv legăturile adiacente grupării carboxil la restul zaharidic, respectiv la restul alchil, cele mai importante legături pentru obținerea conformațiilor stabile) pentru conformațiile reținute în cazul bioconjugatului rutin palmitat

Nr.	Energie (kcal/mol)	Gradient (kcal/mol)	Conf. găsite	Conf. de start	No1 (°)	No2 (°)	No3 (°)	No19 (°)	No22 (°)
1.	28,58	9,32E-03	2	18	2,68	112,92	-91,20	-119,55	51,52
2.	28,60	9,01E-03	2	30	-176,45	112,56	-90,48	-119,99	51,53
3.	28,62	9,63E-03	2	67	-176,81	112,77	-88,01	-120,23	53,17
4.	28,63	9,60E-03	1	5	2,25	113,21	-89,46	-119,85	52,88
5.	28,77	9,68E-03	1	15	2,40	112,90	-89,56	-119,75	52,53
6.	29,00	9,89E-03	1	16	-176,75	112,71	-88,46	-119,53	53,71
7.	29,00	9,75E-03	1	8	2,35	113,12	-89,69	-119,05	53,72
8.	29,18	9,98E-03	1	1	-176,66	112,02	-89,81	-120,49	57,41
9.	29,35	8,59E-03	1	21	1,68	115,66	-95,79	-63,25	179,15
10.	29,48	9,39E-03	1	7	-177,38	124,60	-41,72	-107,67	170,17
11.	29,61	9,89E-03	1	14	0,33	118,37	-103,54	-62,93	-178,74
12.	29,74	9,97E-03	1	15	-176,51	112,78	-93,26	-120,44	52,98
13.	29,94	9,71E-03	1	1	2,06	110,87	-79,82	-68,69	61,61
14.	30,37	9,54E-03	1	15	2,67	112,62	-94,61	-118,11	50,40
15.	30,52	1,00E-02	1	12	-177,15	112,24	-84,50	-118,27	49,12
16.	30,71	9,64E-03	1	4	-179,03	114,02	-49,24	-58,27	58,16
17.	30,77	9,33E-03	1	5	3,93	113,60	-102,11	159,48	-56,93
18.	30,85	9,48E-03	1	2	179,72	122,18	-46,18	108,03	52,00

19.	30,91	9,82E-03	1	1	3,73	114,49	-100,30	140,94	67,55
20.	30,95	9,98E-03	1	24	-176,81	111,85	-83,50	-121,88	54,22
21.	31,04	9,20E-03	1	1	3,62	126,92	-34,62	148,01	59,19
22.	31,06	9,78E-03	1	16	-174,80	126,81	-30,70	-107,71	55,22
23.	31,07	5,55E-03	1	7	-176,49	113,50	-94,59	-121,08	52,39
24.	31,14	9,99E-03	1	53	-177,37	117,46	-96,26	-125,37	51,52
25.	31,17	6,75E-03	1	12	-176,51	113,51	-94,72	-121,11	52,53
26.	31,20	8,41E-03	1	4	177,39	-130,51	-111,01	123,63	45,53
27.	31,26	8,92E-03	1	9	-175,39	112,72	-103,21	158,86	-62,21
28.	31,51	9,81E-03	1	9	2,83	112,80	-95,61	-119,75	53,36
29.	31,74	9,83E-03	1	5	2,90	112,42	-94,87	-119,80	53,46
30.	31,85	9,48E-03	1	13	2,54	112,50	-93,67	-119,44	52,09
31.	31,85	7,74E-03	1	74	-176,84	112,06	-83,74	-121,98	54,27
32.	31,87	9,85E-03	1	35	2,03	111,86	-82,99	-122,17	54,46
33.	32,10	9,60E-03	1	40	2,48	112,84	-90,66	-118,63	49,47
34.	32,12	9,22E-03	2	25	-176,89	113,39	-88,54	-119,41	49,77
35.	32,14	9,25E-03	1	11	-0,22	-119,46	169,95	-114,44	60,86
36.	32,35	9,78E-03	1	14	-176,71	110,37	-82,70	-67,32	54,31
37.	32,36	9,82E-03	1	8	-176,91	105,91	-59,83	-118,26	52,64
38.	32,40	9,65E-03	1	17	178,21	-106,32	-32,60	-119,64	53,54
39.	32,46	9,69E-03	2	29	-177,25	106,33	-60,22	-118,33	52,72
40.	32,46	7,81E-03	1	31	179,86	117,75	-48,67	-111,04	93,87
41.	32,57	8,13E-03	1	4	2,49	112,87	-91,58	-118,35	49,48
42.	32,58	9,63E-03	1	33	1,91	115,86	-99,91	-65,20	67,99

În cazul bioconjugăților silibinină/acizi grași s-a observat o comportare asemănătoare a moleculelor la analiza conformațională. Numărul unghiurilor de torsiune a fost mai redus în cazul acestor bioconjugăți, fiind selectate unghiurile flexibile corespunzătoare legăturii restului benzopiranic cu cel benzodioxanic, cele corespunzătoare substituenților din pozițiile 2 și 3 de pe nucleul dioxanic, respectiv unghiurile de torsiune de pe restul de acid gras. Pentru bioconjugatul silibinin palmitat numărul acestor unghiuri a fost de 20 (figura 2.2.5).

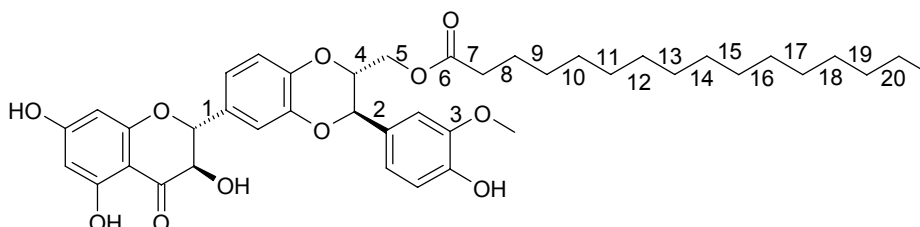


Figura 2.2.5. Numerotarea unghiurilor de torsiune (legăturile flexibile) din molecula bioconjugatului silibinin palmitat

Conformațiile de minimă energie prezintă o orientare spiralată a restului de acid gras dispus paralel cu restul benzopiranic al silibininei, cel mai probabil datorită unei interacțiuni de tip hidrofob între cele două resturi (figura 2.2.6). Numărul de conformații cu energii cu cel mult 4 kcal/mol peste energia conformației de stabilitate maximă a fost mai mare în cazul bioconjugăților de silibinină: 84 conformații în cazul silibinin palmitatului (tabel 2.2.2), 93 pentru silibinin stearat și

peste 100 în cazul bioconjugărilor cu acizi grași nesaturați (s-au reținut maximum 100 de conformații).

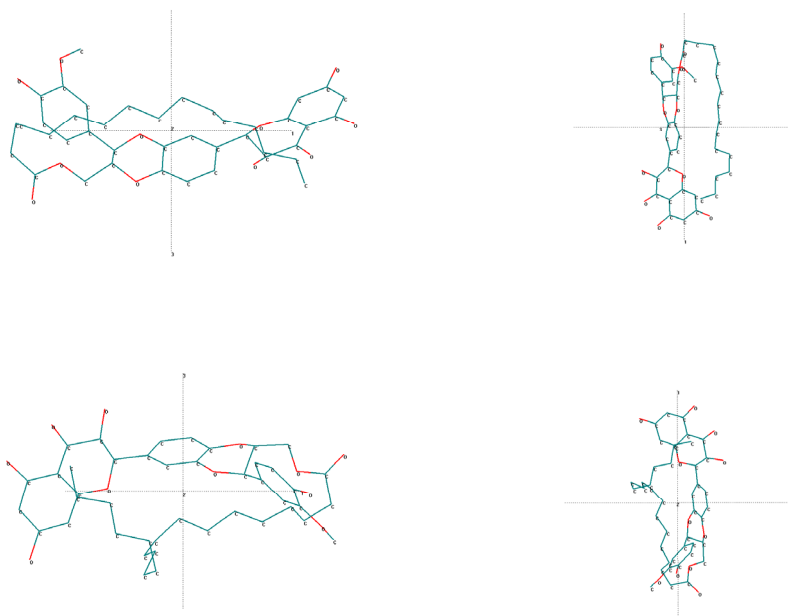
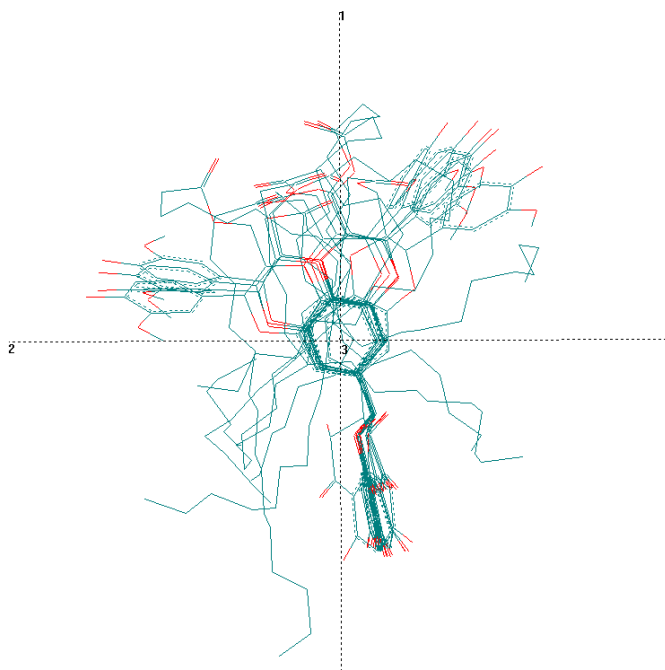
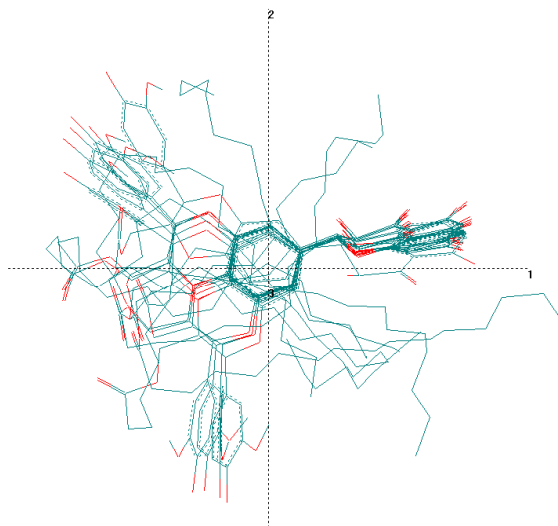


Figura 2.2.6. Conformațiile de minimă energie pentru silibinin palmitat (sus) și silibinin oleat (jos) prezentate în două orientări sugestive (aliniere după axele OX și OY)

Suprapunerea conformațiilor mai stabile (energiei cu cel mult 0,5 kcal/mol mai mari decât energia corespunzătoare conformației de stabilitate maximă) a indicat o bună aliniere a restului benzopiranic al silibininei și chiar al restului benzodioxanic (orientare perpendiculară față de primul rest), însă cu o distribuție variată a conformațiilor resturilor de acizi grași (figurile 2.2.7 și 2.2.8).



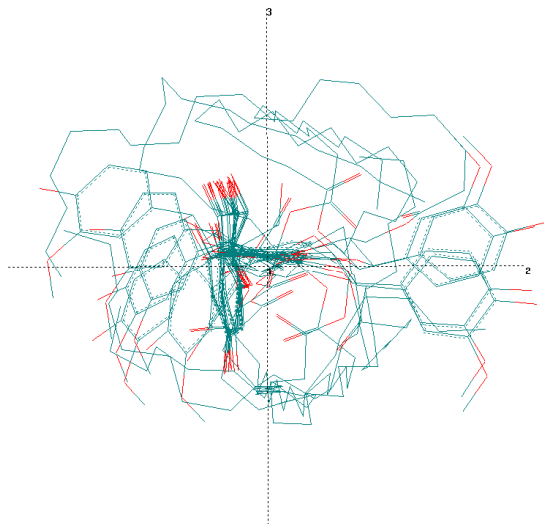
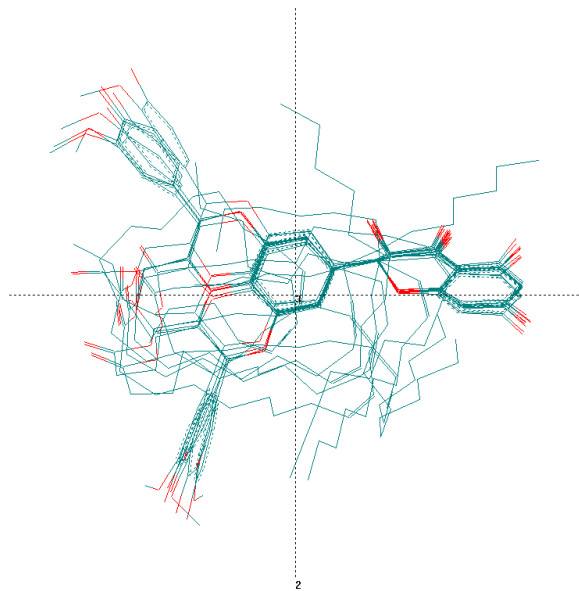


Figura 2.2.7. Suprapunerea primelor 10 conformații cu energie mai mare cu până la 0,5 kcal/mol față de energia celei mai stabile conformații în cazul bioconjugatului silibinin palmitat



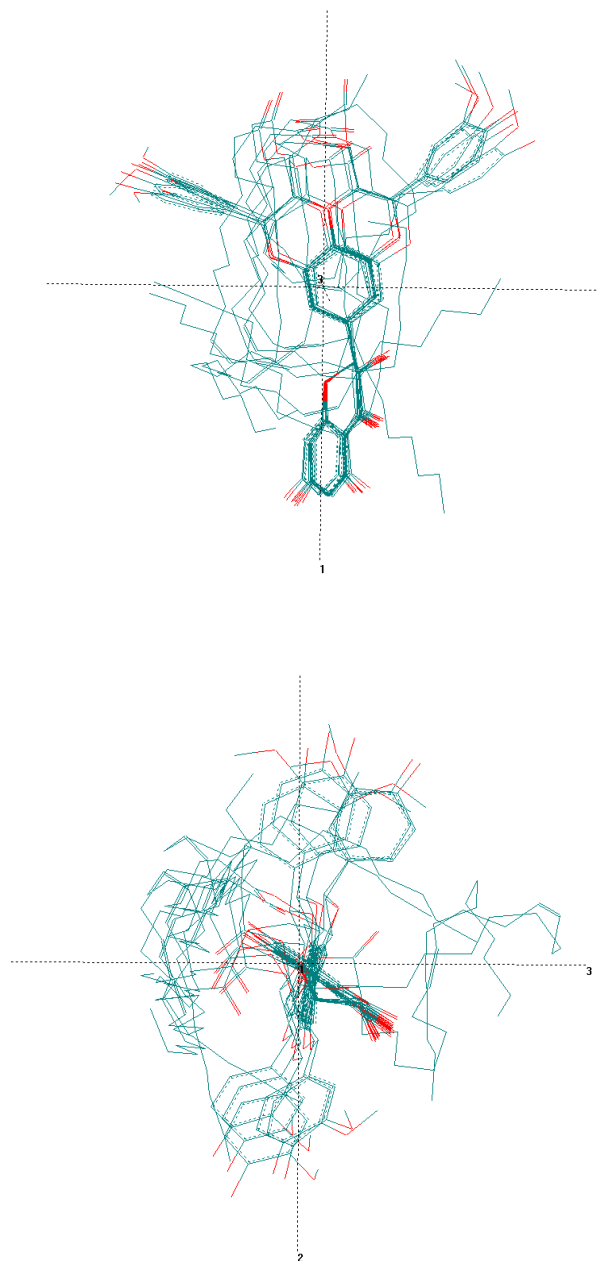


Figura 2.2.8. Suprapunerea primelor 10 conformații cu energie mai mare cu până la 0,5 kcal/mol față de energia celei mai stabile conformații în cazul bioconjugatului silibinin oleat

Tabelul II.2.2. Valorile unghiurilor de torsiune (selecție N°1, N°2, N°4, N°7, N°14, corespunzătoare legăturilor flexibile dintre benzopiran și benzodioxanul din poziția 2, legăturile ce conectează resturile fenilic și carboximetilic la dioxan, respectiv legătura adiacentă grupării carboxil la restul alchil, cele mai importante legături pentru obținerea conformațiilor stabile) pentru conformațiile reținute în cazul bioconjugatului silibinin palmitat

Nr. Crt.	Energie (kcal/mol)	Gradient (kcal/mol)	Conf. găsite	Conf. de start	No1 (°)	No2 (°)	No4 (°)	No7 (°)	No14 (°)
1.	6,73	8,57E-03	1	5	120,04	-47,47	-3,90	-52,71	-178,40
2.	7,42	9,92E-03	1	8	116,37	-52,32	-7,80	-49,44	179,24
3.	7,56	9,90E-03	1	18	-43,57	-50,71	-3,30	-60,90	-56,16
4.	7,76	9,96E-03	1	2	113,89	-57,31	-8,56	71,80	175,48
5.	7,80	9,48E-03	1	4	-46,63	-53,19	8,03	76,25	-178,40
6.	7,94	9,59E-03	1	9	129,70	-59,47	3,31	53,44	172,78
7.	8,17	6,39E-03	1	6	-45,16	110,30	-8,57	120,67	-179,77
8.	8,29	7,94E-03	1	5	112,96	-57,82	-8,86	116,38	-172,88
9.	8,35	8,84E-03	1	3	-43,50	121,42	2,81	-108,37	57,96
10.	8,41	9,20E-03	1	12	133,75	-57,64	-8,66	112,48	-179,69
11.	8,42	9,54E-03	1	10	-18,91	-61,40	-7,28	69,44	-177,92
12.	8,74	7,64E-03	1	15	143,06	120,71	0,68	-175,32	174,73
13.	8,77	9,15E-03	1	2	152,18	-46,82	-2,18	-52,99	69,76
14.	8,78	9,97E-03	1	21	145,24	106,92	3,52	-64,97	-176,58
15.	8,93	6,08E-03	1	2	-37,07	-33,64	19,75	157,88	56,57
16.	8,96	9,92E-03	1	7	-50,23	116,41	-11,93	-65,89	69,75
17.	9,03	8,87E-03	1	8	139,96	-42,47	15,90	-64,16	-177,98
18.	9,07	9,35E-03	1	3	143,11	-56,97	-12,96	65,70	159,84
19.	9,15	8,76E-03	1	4	146,62	127,02	0,91	-123,15	-68,32
20.	9,16	8,49E-03	1	14	131,73	-60,84	-11,00	-70,54	177,19
21.	9,23	9,45E-03	1	1	146,33	-47,80	-2,06	-52,79	69,29
22.	9,24	9,63E-03	1	11	120,01	-51,35	-0,56	39,32	169,69
23.	9,29	8,03E-03	1	20	111,67	-52,55	6,77	69,85	-175,00
24.	9,33	9,21E-03	1	2	144,61	-50,62	-0,01	62,01	173,39
25.	9,37	8,85E-03	1	77	120,09	-55,07	-6,71	73,51	-168,94
26.	9,43	9,07E-03	1	19	-42,31	159,23	8,61	54,68	65,19
27.	9,44	8,51E-03	1	4	152,94	-55,09	-8,41	51,68	-64,83
28.	9,44	8,99E-03	1	5	-41,88	-67,76	-10,91	129,17	-52,95
29.	9,47	9,68E-03	1	6	-40,86	157,46	13,95	-75,73	66,18
30.	9,48	9,34E-03	1	2	58,85	-56,04	-2,31	-65,94	179,71
31.	9,48	9,41E-03	1	10	148,51	124,88	-13,45	61,35	173,28
32.	9,54	9,66E-03	1	27	-46,94	-46,54	10,74	-38,58	-68,34
33.	9,54	9,77E-03	1	5	-96,36	-56,30	-8,28	79,03	-171,04
34.	9,61	8,79E-03	1	4	-61,71	-57,67	-9,04	71,98	-173,77
35.	9,62	9,83E-03	1	10	-41,59	149,56	14,12	-84,79	49,77
36.	9,64	9,27E-03	1	3	-39,76	116,49	-10,21	-65,99	63,84
37.	9,67	9,90E-03	1	2	-46,52	-51,40	2,40	-49,02	-56,51
38.	9,69	8,22E-03	1	6	137,51	-59,79	1,39	-71,42	177,04
39.	9,71	9,24E-03	1	2	-49,69	131,15	6,47	-54,36	59,36
40.	9,76	9,30E-03	1	3	-45,77	-47,27	98,62	-69,96	62,71
41.	9,76	9,56E-03	1	2	-86,13	-51,94	91,09	118,44	-171,65
42.	9,86	9,42E-03	1	24	142,50	95,97	4,83	-50,78	171,21
43.	9,98	8,99E-03	1	6	137,03	113,18	-5,04	-57,27	73,66
44.	10,05	9,32E-03	1	10	-57,95	111,34	-6,60	-64,54	-95,58
45.	10,08	9,23E-03	1	0	-52,62	-57,99	6,59	-26,23	-179,46
46.	10,10	9,71E-03	1	13	124,66	-49,00	-11,34	-43,08	-68,12
47.	10,12	9,41E-03	2	12	-43,51	-51,00	12,42	-116,00	-68,14
48.	10,13	8,33E-03	1	3	-40,12	-61,66	-11,52	27,87	177,07
49.	10,15	6,40E-03	1	10	-110,54	-53,64	0,51	-119,28	-59,59
50.	10,16	9,26E-03	1	10	-49,63	133,13	1,29	-125,61	-57,61
51.	10,18	9,99E-03	1	14	-45,47	-43,30	6,68	-70,71	54,60
52.	10,22	7,88E-03	1	23	151,39	131,73	3,29	67,08	-170,14
53.	10,23	9,78E-03	1	10	-58,50	112,83	-7,42	124,76	-177,36
54.	10,27	6,58E-03	1	4	75,55	-51,49	-1,76	-69,91	-177,64
55.	10,28	5,38E-03	1	13	-49,98	116,16	-9,60	-65,59	66,69
56.	10,35	9,56E-03	1	14	146,17	-57,12	-2,44	-60,57	-96,89
57.	10,36	9,34E-03	1	5	-44,37	-66,54	89,30	-57,84	-96,30
58.	10,38	9,31E-03	1	4	138,43	148,28	12,23	-19,05	178,01
59.	10,39	9,40E-03	2	25	134,74	-44,26	6,03	-69,58	55,42
60.	10,39	9,65E-03	1	13	-53,71	-57,22	9,95	-26,37	179,19

61.	10,40	9,46E-03	1	0	144,33	-51,88	91,75	27,08	174,18
62.	10,43	9,87E-03	1	5	134,72	132,12	91,28	78,96	-172,57
63.	10,44	9,69E-03	1	5	-45,85	-60,49	-0,41	153,15	61,15
64.	10,49	9,98E-03	1	5	-39,22	128,73	7,79	-69,04	65,38
65.	10,51	9,29E-03	1	4	-43,71	-56,77	91,52	-77,81	66,41
66.	10,55	9,68E-03	1	1	143,96	-51,36	11,90	-60,11	-175,87
67.	10,55	9,59E-03	1	13	109,41	-56,44	-2,29	-55,84	-177,06
68.	10,59	9,95E-03	1	6	123,67	-60,99	86,52	-125,78	-68,69
69.	10,62	9,62E-03	1	2	-114,72	-54,03	-90,81	48,41	-168,86
70.	10,63	6,90E-03	1	5	128,71	102,45	4,15	-85,15	159,58
71.	10,74	9,77E-03	1	22	154,62	135,03	6,23	75,12	-171,54
72.	10,75	9,95E-03	1	11	-120,15	128,44	6,23	-50,58	64,18
73.	10,80	5,49E-03	1	17	132,66	-55,67	2,69	69,56	62,26
74.	10,90	9,18E-03	1	7	121,32	-54,03	-5,78	79,89	65,27
75.	10,97	9,32E-03	1	14	125,96	124,90	-2,92	-47,79	174,17
76.	11,01	8,11E-03	1	10	-45,46	-61,59	-10,63	61,33	62,12
77.	11,04	7,67E-03	1	39	156,10	-53,90	-5,74	68,54	-173,52
78.	11,15	9,49E-03	1	5	135,44	119,30	15,03	-145,02	-166,79
79.	11,16	7,61E-03	1	18	149,73	130,58	91,38	67,04	-170,28
80.	11,25	9,06E-03	1	8	142,04	122,95	-8,69	-163,43	74,27
81.	11,36	9,57E-03	1	5	-28,05	123,03	6,01	-54,29	61,99
82.	11,37	7,85E-03	1	11	126,36	140,38	12,59	-92,82	-175,66
83.	11,38	8,29E-03	1	12	-24,77	-57,35	-9,07	83,90	-176,25
84.	11,39	8,58E-03	1	5	-44,06	140,53	6,10	-139,00	-101,85

2.2.2. Ciclodextrine

Moleculele ciclodextrinelor naturale (α -, β - și γ -ciclodextrina) au fost evaluate atât în vid (molecula singulară) cât și în mediu apos ("periodic box"). Aspectul α -ciclodextrinei în conformațiile de energie minimă este unul pseudo-tronconic (figura 2.2.9). În figura 2.2.10 se prezintă dimensiunile principale ale α -ciclodextrinei, calculate din coordonatele Carteziene ale atomilor (inclusiv cei de hidrogen) cu ajutorul relației:

$$d_{A-B} = \left[(x_A - x_B)^2 + (y_A - y_B)^2 + (z_A - z_B)^2 \right]^{1/2} (\text{Å})$$

unde, pentru atomii A și B, x, y și z sunt proiecțiile pe axele Ox, Oy și, respectiv, Oz din sistemul de axe rectangulare. Toate valorile acestor distanțe sunt date în angstromi (Å).

Pentru a determina valorile reale ale diametrelor (pentru bazele mari și mici ale trunchiului de con, exterioare și interioare) și a înălțimii, acestor distanțe li s-au adăugat și razele *van der Waals* ale atomilor implicați în calcul (în general atomul de hidrogen). S-au folosit razele *van der Waals* pentru atomul de hidrogen, calculate de Bondi [17] ($r_H^{vdW} = 1,20 \text{ Å}$). Cele două diametre mari exterioare (figura II.2.9) ale bazei trunchiului de con au valori foarte apropiate (14,6 Å - axa Ox, respectiv 14,8 Å - axa Oy), ca de altfel și diametrul exterior al bazei mici (11,6 Å pentru ambele direcții). Diametrul interior al bazei mari are valoarea de 5,5 Å, ceea ce indică faptul că în interiorul moleculei de α -ciclodextrină nu pot pătrunde structuri cu dimensiuni mai mari decât această valoare (împiedicare sterică), decât în condițiile deformării moleculei. Accesul în interiorul oligozaharidei se poate face doar dinspre baza mare a tronconului, diametrul interior al bazei mici, în conformația de minimă energie, fiind la valori subatomice (0,7 Å), datorită grupelor metilolice orientate spre interior. Încapsularea poate fi de natură mecanică, dar sunt importante și interacțiunile de tip legături de hidrogen sau forțe *van der Waals*.

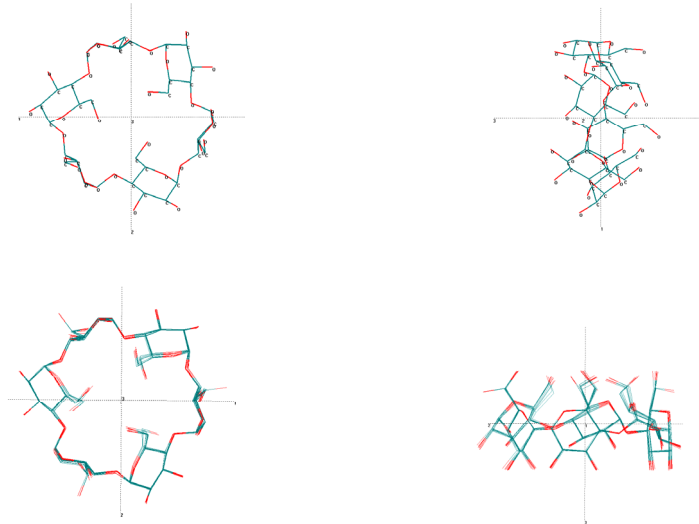


Figura 2.2.9. Conformația de minimă energie (sus) și suprapunerea primelor 10 conformații (jos) pentru molecula de α -ciclodextrină

Caracteristicile structurale ale α -ciclodextrinei în vid și în mediu apos nu diferă prea mult, valorile principalelor distanțe și unghiuri fiind prezentate în tabelul 2.2.3 și figura 2.2.10 pentru molecula optimizată în vid. Tot în figura 2.2.10 sunt prezentate structurile conformaționale suprapuse pentru α -ciclodextrină optimizată în vid, respectiv în mediu apos. Energia de interacțiune în acest ultim caz este de 41,7 kcal/mol.

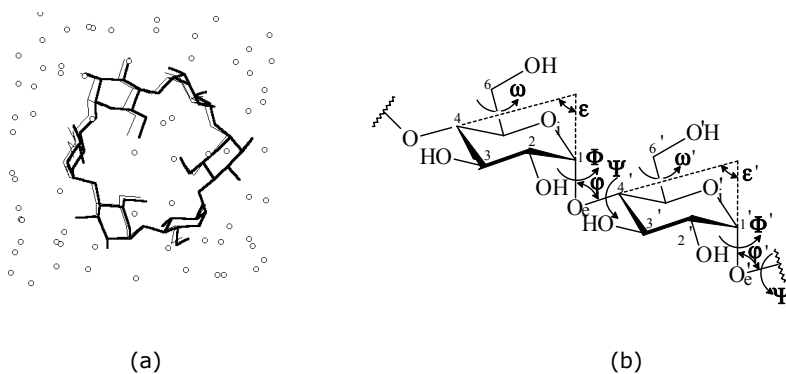


Figura 2.2.10. Suprapunerea celor două conformații ale α -ciclodextrinei (în vid - structura îngroșată, și în mediu apos; o - moleculele de apă; atomii de hidrogen s-au neglijat) (a) și caracteristicile structurale ale ciclodextrinelor în vid (Φ, Φ', Ψ, Ψ' - unghiuri de torsiune între resturile glucozidice, $C_2-C_1-O_e-C_4', C_2'-C_1'-O_e'-C_4, C_1-O_e-C_4'-C_3', C_1'-O_e'-C_4-C_3$; ω, ω' - unghiuri de torsiune în resturile glucozidice, $C_4-C_5-C_6-OH, C_4'-C_5'-C_6'-OH$; φ, φ' - unghiuri de legătură, $C_1-O_e-C_4', C_1'-O_e'-C_4$; ϵ, ϵ' - unghiuri de legătură improprii, $O_eC_4-O_eC_1, O_eC_4'-O_eC_1'$) (b).

Din tabelul 2.2.3 rezultă că unghiurile φ și φ' , corespunzătoare legăturilor $C_1-O_e-C_4'$, respectiv $C_1'-O_e-C_4$, sunt de valori apropiate ($115,6^\circ$, respectiv $118,4^\circ$), însă mai mari cu 6 , respectiv 9° față de structurile polizaharidice netensionate. De asemenea, unghiurile de legătură improprie, ε și ε' , au valori cu $7,8^\circ$, respectiv $13,4^\circ$ mai mici decât cele corespunzătoare structurii analoge netensionate ($\varepsilon = 62,6^\circ$, $\varepsilon' = 57^\circ$, față de $\varepsilon_{\text{netensionat}} = 70,3^\circ$).

Tabelul 2.2.3. Valorile principalelor distanțe interatomice și ale unghiurilor de legătură și de torsiune pentru α -ciclodextrina optimizată în vid (notațiile sunt conform figurii 2.2.10)

Param.	Valoare	Param.	Valoare	Param.	Valoare	Param.	Valoare
$d_{O_e-O_e'}$ (Å)	$4,3 \pm 0,1$	Φ ($^\circ$)	$-141,4 \pm 2,8$	ω ($^\circ$)	$177,7 \pm 2,0$	φ ($^\circ$)	$118,4 \pm 0,2$
$d_{O_i-O_i'}$ (Å)	$4,9 \pm 0,3$	Ψ ($^\circ$)	$168,1 \pm 6,8$	ω' ($^\circ$)	$177,4 \pm 2,4$	ε ($^\circ$)	$62,5 \pm 4,6$
Φ ($^\circ$)	$-145,8 \pm 4,1$	Ψ' ($^\circ$)	$90,5 \pm 3,6$	φ ($^\circ$)	$115,5 \pm 0,3$	ε' ($^\circ$)	$57,0 \pm 1,1$

În cazul β -ciclodextrinei cele două diametre mari exterioare ale bazei trunchiului de con au valori foarte apropiate ($17,5 \text{ \AA}$ - axa O_x , respectiv $18,3 \text{ \AA}$ - axa O_y), ca de altfel și diametrul exterior al bazei mici ($12,9 \text{ \AA}$ pentru ambele direcții). Diametrul interior al bazei mari are valoarea de $5,5 \text{ \AA}$, apropiată de cea corespunzătoare pentru baza mică.

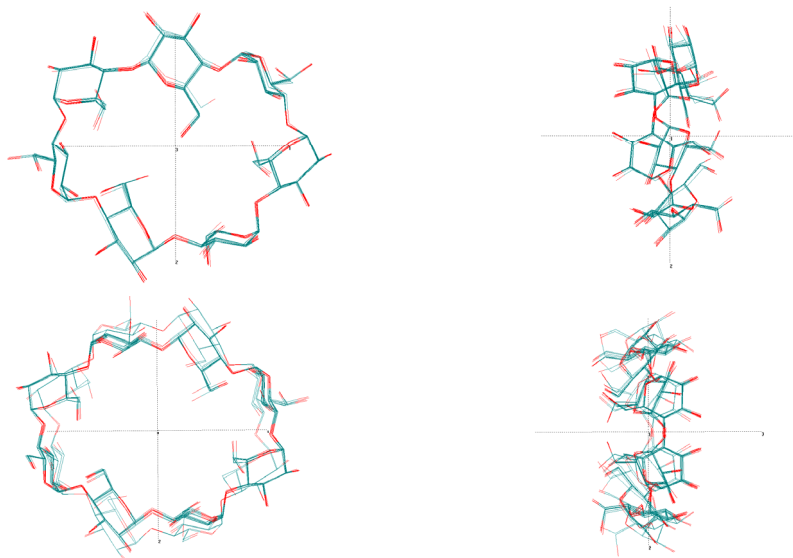


Figura 2.2.11. Suprapunerea primelor 10 conformații pentru molecula de β -ciclodextrină (sus) și pentru cea de γ -ciclodextrină (jos)

Din tabelul 2.2.4 rezultă că unghiurile φ și φ' , corespunzătoare legăturilor $C_1-O_e-C_4'$, respectiv $C_1'-O_e-C_4$, sunt de valori apropiate (115° , respectiv 117°), însă mai mari cu 6, respectiv 8° față de structurile polizaharidice netensionate. De asemenea, unghiurile de legătură improprie, ε și ε' , au valori cu 12° , respectiv 7° mai mici decât cele corespunzătoare structurii analoage netensionate ($\varepsilon = 63,6^\circ$, $\varepsilon' = 68,6^\circ$, față de $\varepsilon_{\text{netensionat}} = 75,6^\circ$). Pentru γ -ciclodextrină valorile sunt trecute în tabelul 2.2.5.

Tabelul 2.2.4. Valorile principalelor distanțe interatomice și ale unghiurilor de legătură și de torsiune pentru β -ciclodextrina optimizată în vid și în mediu apos (notațiile sunt conform figurii 2.2.10)

Parametru	Valoare		Parametru	Valoare	
	vid	mediu apos		vid	mediu apos
$d_{O_e-O_e'}$ (Å)	$4,3 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,2$	ω ($^\circ$)	$57,7 \pm 2,8$	$59,1 \pm 4,5$
$d_{O_1-O_1'}$ (Å)	$5,0 \pm 0,3$	$5,2 \pm 0,1$	ω' ($^\circ$)	$53,6 \pm 2,4$	$54,9 \pm 2,3$
Φ ($^\circ$)	$-139,8 \pm 5,2$	$-138,9 \pm 6,2$	φ ($^\circ$)	$115,4 \pm 0,6$	$115,2 \pm 0,8$
Φ' ($^\circ$)	$-122,3 \pm 4,6$	$-108,2 \pm 7,5$	φ' ($^\circ$)	$117,6 \pm 0,7$	$116,7 \pm 0,1$
Ψ ($^\circ$)	$161,7 \pm 14,0$	$137,8 \pm 9,3$	ε ($^\circ$)	$63,6 \pm 4,5$	$45,4 \pm 2,4$
Ψ' ($^\circ$)	$93,0 \pm 3,1$	$91,9 \pm 5,2$	ε' ($^\circ$)	$68,7 \pm 4,3$	$65,5 \pm 7,6$

Tabelul 2.2.5. Valorile principalelor distanțe interatomice și ale unghiurilor de legătură și de torsiune pentru γ -ciclodextrina optimizată în vid și în mediu apos (notațiile sunt conform figurii II.2.10)

Param.	Valoare		Param.	Valoare	
	vid	mediu apos		vid	mediu apos
$d_{O_e-O_e'}$ (Å)	$4,4 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,1$	ω ($^\circ$)	$56,7 \pm 3,7$	$58,1 \pm 4,8$
$d_{O_1-O_1'}$ (Å)	$5,1 \pm 0,2$	$5,1 \pm 0,3$	ω' ($^\circ$)	$56,1 \pm 2,6$	$56,2 \pm 2,7$
Φ ($^\circ$)	$-122,1 \pm 30,2$	$-124,4 \pm 27,4$	φ ($^\circ$)	$115,3 \pm 0,8$	$115,2 \pm 1,1$
Φ' ($^\circ$)	$-132,9 \pm 5,1$	$-133,8 \pm 2,7$	φ' ($^\circ$)	$116,2 \pm 0,6$	$116,5 \pm 0,7$
Ψ ($^\circ$)	$149,3 \pm 12,2$	$116,4 \pm 29,3$	ε ($^\circ$)	$67,5 \pm 4,3$	$64,1 \pm 4,1$
Ψ' ($^\circ$)	$90,6 \pm 5,3$	$124,9 \pm 45,8$	ε' ($^\circ$)	$72,0 \pm 2,4$	$72,2 \pm 5,7$

2.2.3. Modelarea moleculară a interacțiunii Bioconjugăți – Ciclodextrine

Pentru evaluarea capacității de încapsulare a bioconjugăților în α -, β - și γ -ciclodextrină 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). Pentru bioconjugății studiați, analizați din punct de vedere conformațional utilizând mecanica moleculară MM+, s-au selectat conformațiile cele mai stabile termodinamic (cu energia cea mai mică), ca de altfel și pentru ciclodextrine.

Bioconjugății par să se "acomodeze" (*docare*) mult mai bine în interiorul cavității β - și γ -ciclodextrinei, decât în cel al α -ciclodextrinei [189]. Astfel, în cazul încapsulării bioconjugatului rutin palmitat în α -ciclodextrină, s-a obținut o interacțiune semnificativă utilizând drept poziții de start orientări ale restului de acid gras spre baza mare (corespunzătoare hidroxiilor secundari) a ciclodextrinei, de-a lungul axei "de simetrie", la o distanță de $\sim 8\text{\AA}$ între centrele de greutate ale celor două molecule (figura 2.2.12).

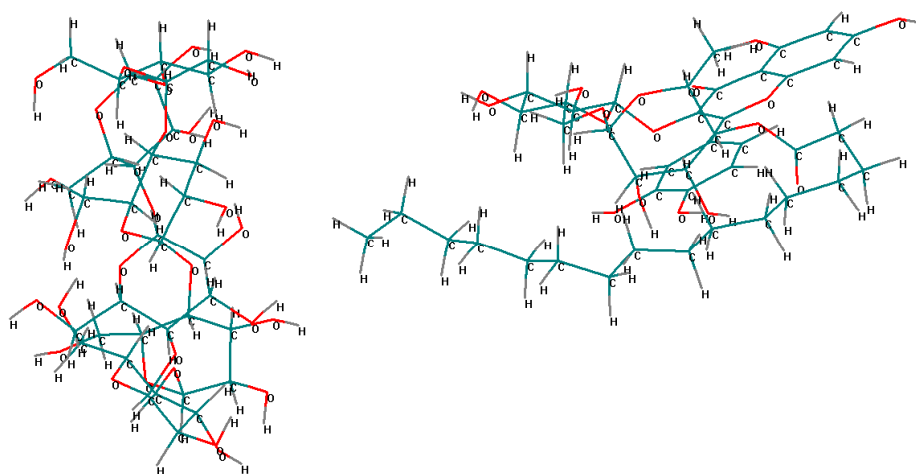


Figura 2.2.12. Poziții de start în cazul modelării interacțiunii bioconjugatului rutin palmitat cu α -ciclodextrina

Energia de interacțiune calculată pentru complexul rutin palmitat/ α CD este de doar 19,2 kcal/mol, în timp ce interacțiunea acestui bioconjugat cu β - și cu γ -ciclodextrina este mult mai bună 28 kcal/mol și, respectiv, 32,3 kcal/mol. Pentru bioconjugatul cu acid stearic, interacțiunea cu α - și β -ciclodextrina este mai puțin benefică (17-18 kcal/mol), însă la utilizarea γ -ciclodextrinei în experimente s-a constatat o dublare a valorii acestei energii. Comportări similare se observă și în cazul bioconjugăților rutinei cu acizii nesaturați: 18-21 kcal/mol pentru α -ciclodextrină, 21-23 kcal/mol pentru β -ciclodextrină și 27-33 kcal/mol pentru γ -ciclodextrină (figurile 2.2.13-2.2.20 și tabelul 2.2.6).

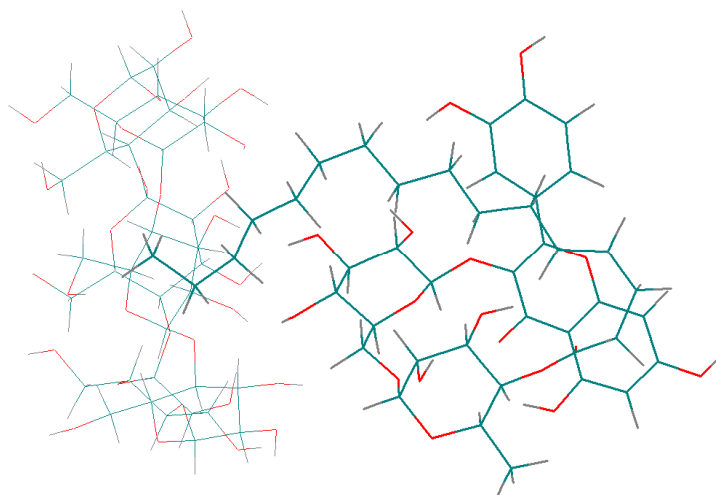


Figura 2.2.13. Complexul rutin palmitat/ α -ciclodextrină, obținut prin experimente teoretice de "docare"

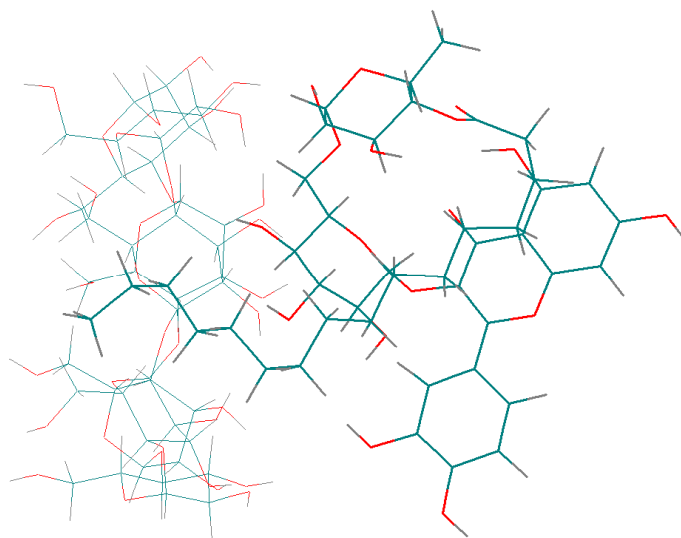


Figura 2.2.14. Complexul rutin palmitat/ β -ciclodextrină, obținut prin experimente teoretice de "docare"

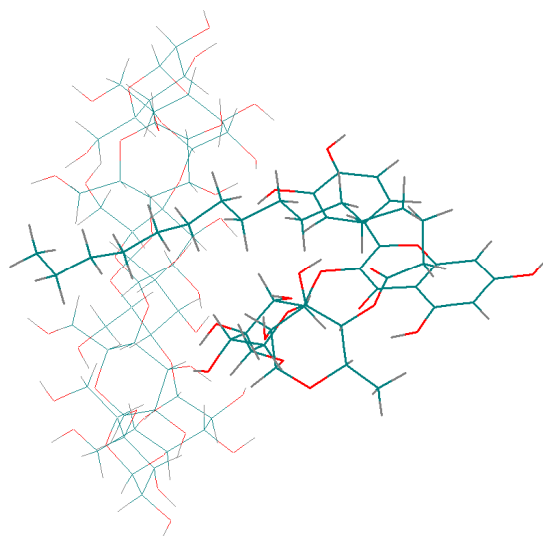


Figura 2.2.15. Complexul rutin palmitat/ γ -ciclodextrină, obținut prin experimente teoretice de "docare"

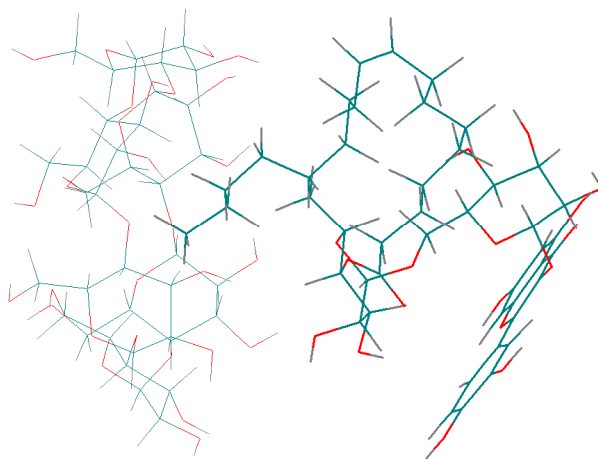


Figura 2.2.16. Complexul rutin oleat/ α -ciclodextrină, obținut prin experimente teoretice de "docare"

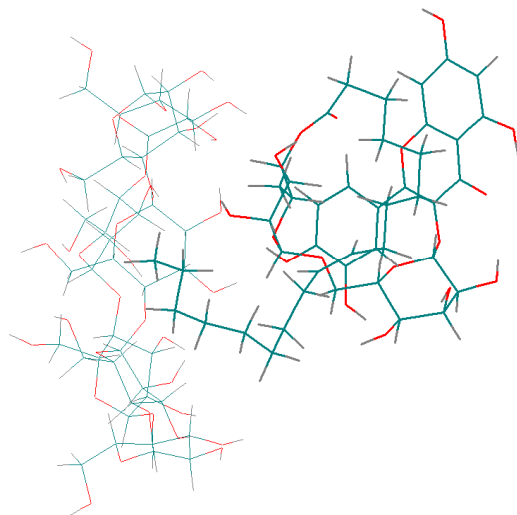


Figura 2.2.17. Complexul rutin oleat/ β -ciclodextrină, obținut prin experimente teoretice de "docare"

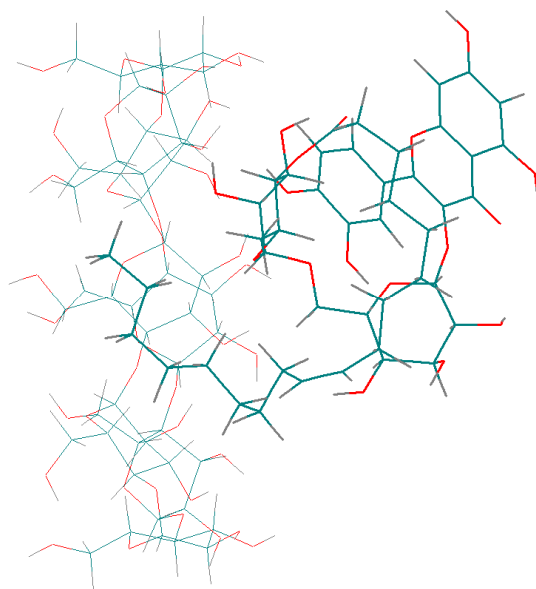


Figura 2.2.18. Complexul rutin oleat/ γ -ciclodextrină, obținut prin experimente teoretice de "docare"

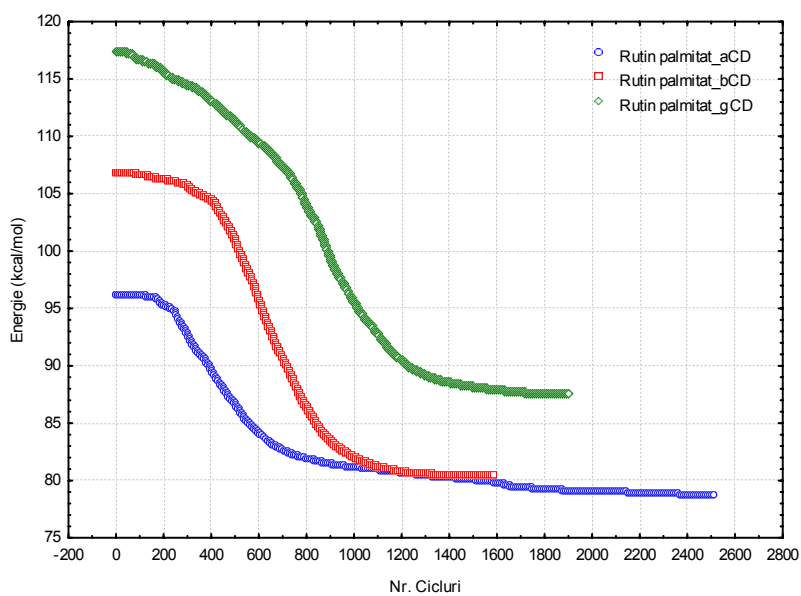


Figura 2.2.19. Variația energiei complexilor cu coordonata de interacțiune (kcal/mol) rutin palmitat/ α -, β - și γ -ciclodextrină din experimentele de docare

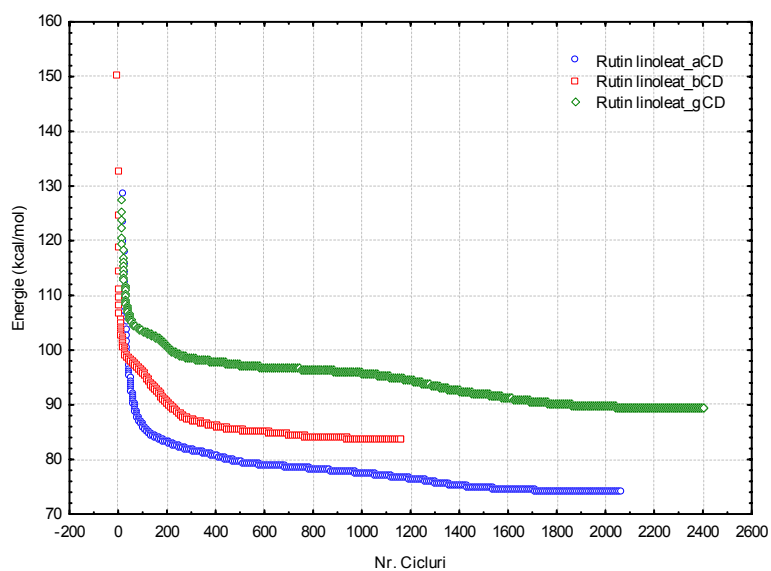


Figura 2.2.20. Variația energiei complexilor cu coordonata de interacțiune (kcal/mol) rutin linoleat/ α -, β - și γ -ciclodextrină din experimentele de docare

Pentru bioconjugății obținuți cu silibinină energiile de interacțiune au fost mai apropiate în cazul β - și γ -ciclodextrinei, în unele cazuri energia de interacțiune cu β -ciclodextrina fiind chiar mai mare decât în cazul γ -ciclodextrinei (de exemplu, pentru silibinin palmitat/ β CD și silibinin palmitat/ γ CD valorile energiilor de interacțiune au fost de 26,6 kcal/mol și 25,9 kcal/mol, respectiv pentru silibinin linoleat/ β CD și silibinin linoleat/ γ CD energii de 28,9 kcal/mol și 26,6 kcal/mol). Pentru celelalte două cazuri valorile acestor energii au fost destul de apropiate: 27,3 kcal/mol și 31,2 kcal/mol pentru bioconjugatul silibinin stearat, respectiv 22 kcal/mol și 26,5 kcal/mol pentru silibinin oleat. În figurile 2.2.21-2.2.23 se pot observa modalitățile de încapsulare ale bioconjugatului silibinin stearat în ciclodextrine și diferențele în ceea ce privește incluziunea moleculară în cazul α -ciclodextrinei, comparativ cu β - și γ -ciclodextrina, în ultimele două cazuri incluziunea moleculară fiind evidentă. Complexul se stabilizează relativ repede în cazul bioconjugăților cu silibinină (după câteva zeci de cicluri iterative, figura 2.2.24), cu o oarecare stagnare până la 400-800 de cicluri urmată de finisarea interacțiunii, aspect mai evident în cazul bioconjugăților cu rutină (figura 2.2.25).

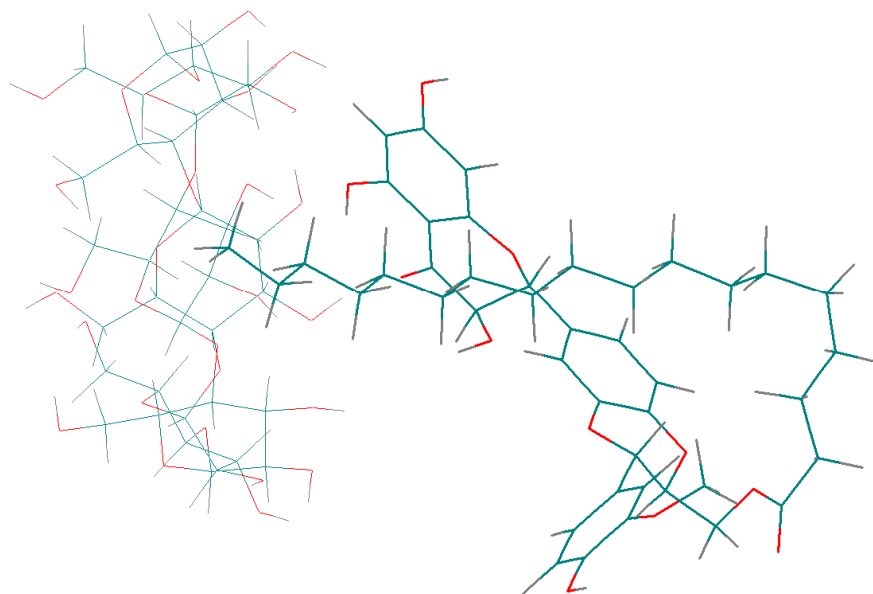


Figura 2.2.21. Complexul silibinin stearat/ α -ciclodextrină, obținut prin experimente teoretice de "docare"

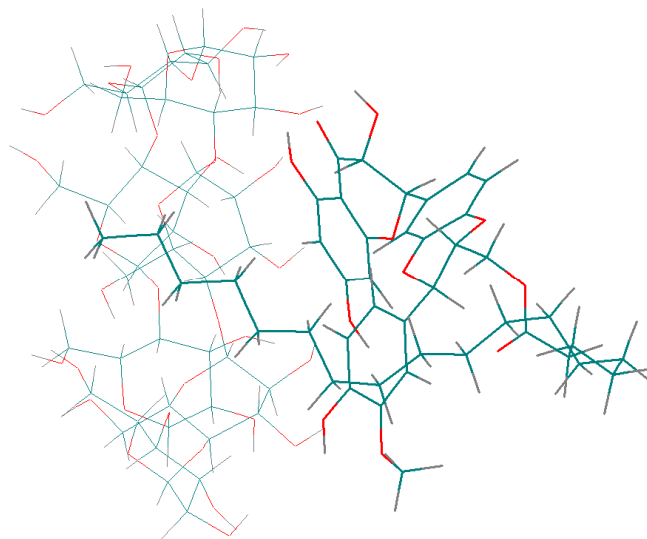


Figura 2.2.22. Complexul silibinin stearat/ β -ciclodextrină, obținut prin experimente teoretice de "docare"

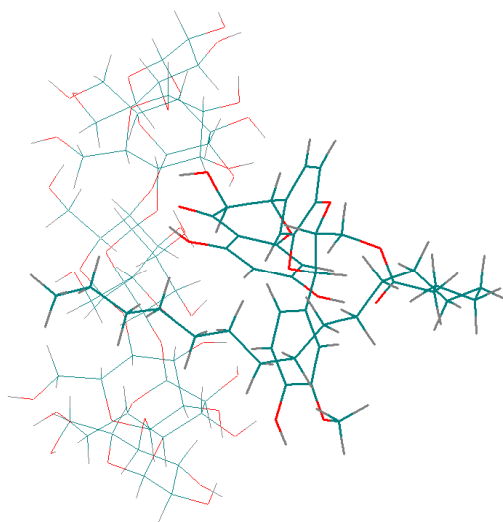


Figura 2.2.23. Complexul silibinin stearat/ γ -ciclodextrină, obținut prin experimente teoretice de "docare"

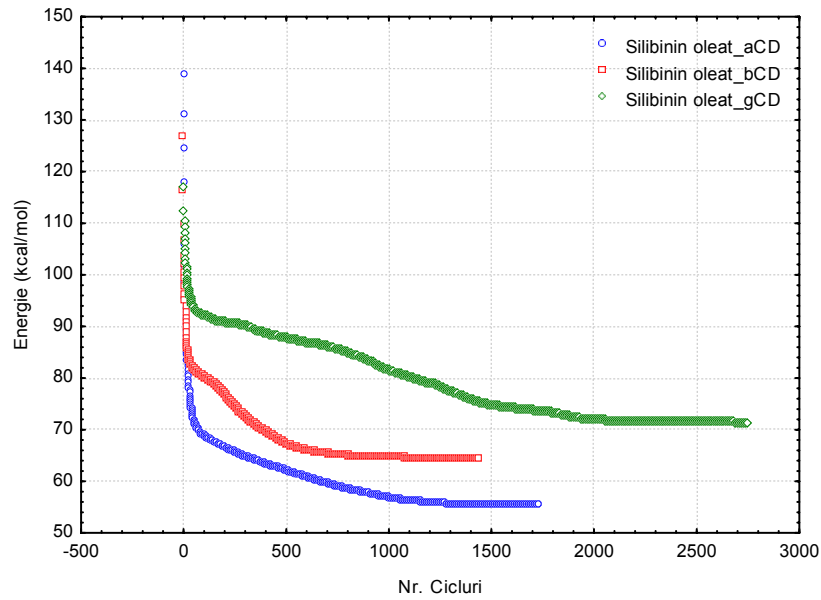


Figura 2.2.24. Variația energiei complexilor (kcal/mol) silibinin oleat/ α -, β - și γ -ciclodextrină din experimentele de docare

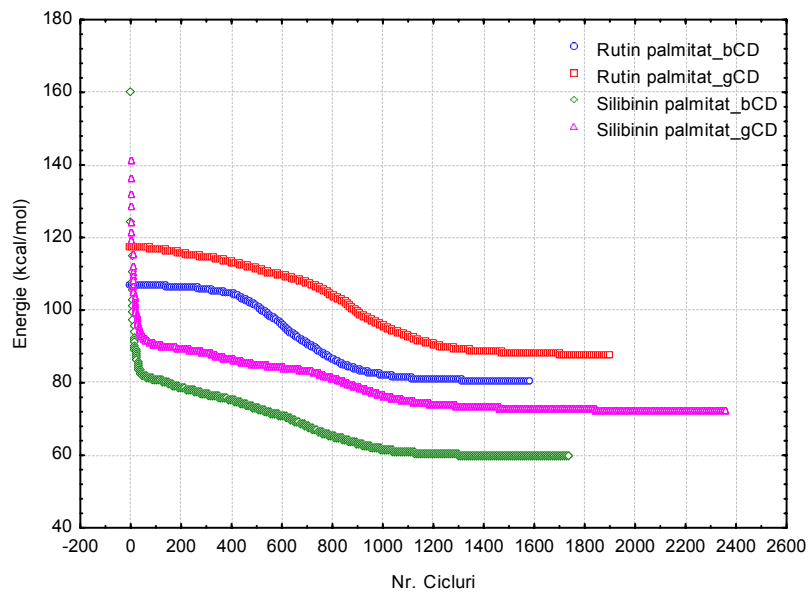


Figura II.2.25. Variația energiei complexilor (kcal/mol) rutin palmitat și silibinin palmitat/ β - și γ -ciclodextrină din experimentele de docare

Tablelul 2.2.6. Energiile de interacțiune ale bioconjugăților cu ciclodextrinele, obținute din experimentele de docare

Nr. Crt.	Compus	E (CD) (kcal/mol)	E (bioconj.) (kcal/mol)	E (CD+Bioconj.) (kcal/mol)	E (complex) (kcal/mol)	E (interact.) (kcal/mol)
1	Rutin palmitat/ α CD	69,35	28,58	97,93	78,72	19,21
2	Rutin palmitat/ β CD	79,80	28,58	108,39	80,40	27,99
3	Rutin palmitat/ γ CD	91,29	28,58	119,87	87,60	32,27
4	Rutin stearat/ α CD	69,35	30,22	99,57	83,07	16,50
5	Rutin stearat/ β CD	79,80	30,22	110,03	92,11	17,92
6	Rutin stearat/ γ CD	91,29	30,22	121,51	86,19	35,32
7	Rutin oleat/ α CD	69,35	28,58	97,93	79,51	18,42
8	Rutin oleat/ β CD	79,80	28,58	108,39	84,96	23,43
9	Rutin oleat/ γ CD	91,29	28,58	119,87	87,26	32,61
10	Rutin linoleat/ α CD	69,35	25,12	94,47	74,05	20,42
11	Rutin linoleat/ β CD	79,80	25,12	104,92	83,66	21,26
12	Rutin linoleat/ γ CD	91,29	25,12	116,41	89,46	26,94
13	Silibinin palmitat/ α CD	69,35	6,73	76,08	51,30	24,78
14	Silibinin palmitat/ β CD	79,80	6,73	86,53	59,89	26,64
15	Silibinin palmitat/ γ CD	91,29	6,73	98,02	72,14	25,88
16	Silibinin stearat/ α CD	69,35	7,51	76,86	57,52	19,34
17	Silibinin stearat/ β CD	79,80	7,51	87,31	59,98	27,34
18	Silibinin stearat/ γ CD	91,29	7,51	98,80	67,59	31,20
19	Silibinin oleat/ α CD	69,35	6,70	76,04	55,38	20,66
20	Silibinin oleat/ β CD	79,80	6,70	86,50	64,51	21,99
21	Silibinin oleat/ γ CD	91,29	6,70	97,98	71,51	26,47
22	Silibinin linoleat/ α CD	69,35	6,00	75,35	50,95	24,40
23	Silibinin linoleat/ β CD	79,80	6,00	85,81	56,93	28,88
24	Silibinin linoleat/ γ CD	91,29	6,00	97,29	70,73	26,56

2.2.4. Concluzii parțiale

În urma studiilor efectuate privind modelarea moleculară a interacțiunii bioconjugăților flavonoide/acizi grași cu principalele ciclodextrine naturale (α , β și γ) se pot trasa următoarele concluzii principale:

- Bioconjugății pot fi încapsulați molecular în cavitatea ciclodextrinelor datorită compatibilității sterice în special cu restul neramificat de acid gras; totuși, apar unele impedimente sterice legate de conformația spiralată a bioconjugăților, ceea ce determină o interacțiune mai puțin eficientă în cazul α -ciclodextrinei.

▪ Stabilitatea complexului bioconjugat/ciclodextrină este demonstrată de energiile de interacțiune calculate, care pentru β - și γ -ciclodextrină sunt semnificativ mai mari comparativ cu α -ciclodextrina; pentru bioconjugatii de rutină stabilitatea este mult mai bună în cazul γ -ciclodextrinei (energie de interacțiune cu 13 ± 5 kcal/mol mai mare față de α -ciclodextrină), comparativ cu complexul cu β -ciclodextrină (diferență de $4 \pm 3,6$ kcal/mol); pentru derivații silibininei, aceste diferențe sunt foarte apropiate ($3,9 \pm 3,0$ kcal/mol și $5,2 \pm 4,8$ kcal/mol pentru cazul β -ciclodextrinei și, respectiv, γ -ciclodextrinei).

2.3. Sisteme supramoleculare – Compuși de incluziune

Compușii bioactivi naturali, din a căror clasă fac parte și flavonoidele, prezintă sensibilitate crescută la degradare și inactivare, dezavantaje ce au dus la o dezvoltare rapidă a tehnicilor de protejare a acestora. Cerința obligatorie este aceea de a proteja compușii bioactivi de degradările chimice (oxidare, hidroliză), fără a le modifica proprietățile. Protejarea și în special eliberarea controlată a diverselor molecule organice se realizează aproape exclusiv prin intermediul micro- sau nanocapsulelor.

2.3.1. Sisteme supramoleculare flavonoide/ciclodextrine

Unele dintre cele mai utilizate molecule gazdă pentru încapsulare moleculară sunt ciclodextrinele, oligozaharide ciclice conținând 6, 7 sau 8 unități glucopirazonice, dispuse într-o arhitectură tronconică cu proprietăți hidrofobe în interior (încapsulare de molecule bioactive compatibile geometric prin interacțiuni *van der Waals* și legături de hidrogen cu grupările hidroxilice de la baza structurii tronconice) și hidrofile spre exterior, ceea ce conferă hidrosolubilitate avansată, deci biodisponibilitate. Compușii încapsulați sunt protejați de acțiunea factorilor externi și pot fi eliberați treptat în mediul apos biologic datorită echilibrului de asociere-disociere care apare.

Obiectivul prezentului studiu a fost de obținere a complexilor flavonoidelor agliconice (crisina, naringenina, hesperetina, quercetina), glicozilate (rutina) și flavonolignanilor (silibinina) cu α - și β -ciclodextrină și de analiză a acestora din perspectiva spectroscopiei FT-IR, morfologiei cristalelor, a comportării termice, a conținutului de apă de cristalizare, a activității antioxidante și a transferului prin membrană. Pentru exemplificare, în figura 2.3.1, este redată formarea compusului de incluziune a quercetinei cu ciclodextrine.

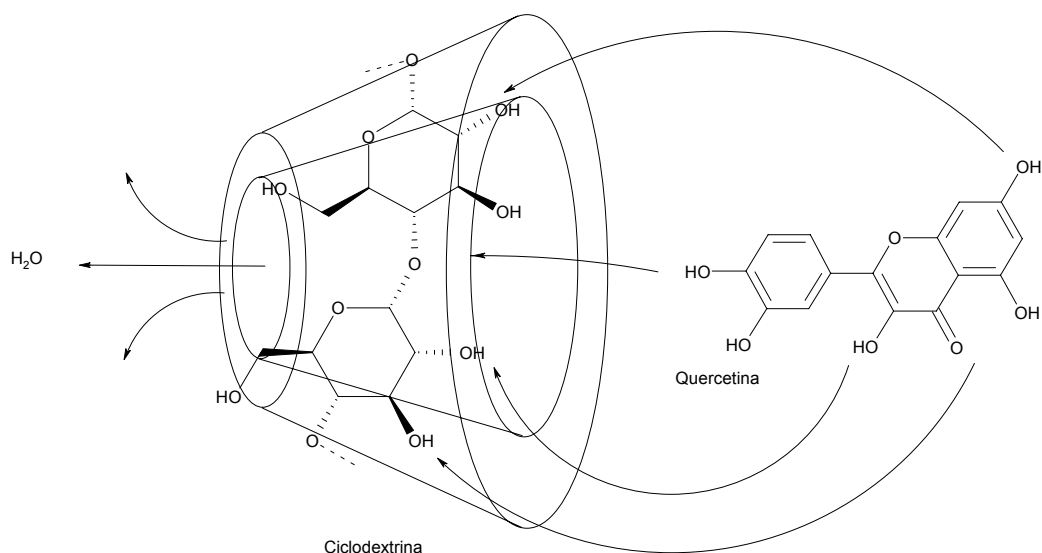


Figura 2.3.1. Formarea compusului de incluziune al quercetinei cu ciclodextrine

Obținerea sistemelor supramoleculare flavonoide/ciclodextrine s-a realizat prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă, metodă pusă la punct și aplicată cu succes la încapsularea uleiurilor volatile și compușilor odoranți [143,144, 185-187]. În cazul flavonoidelor, în urma procesului de complexare s-au obținut randamente de recuperare ridicate, cuprinse între 67,7% - 82,2%, cel mai bun fiind pentru complexul hesperetină/ α CD (82,2%). Complexul cu β CD a fost obținut cu un randament puțin mai scăzut (70,2%), probabil datorită unei solubilități mai ridicate a acestui complex în soluția etanol-apă utilizată pentru complexare.

În ceea ce privește flavonolignanii, în urma complexării s-au obținut randamente de recuperare ridicate, în cazul complexului silibinină/ α CD (82,8%), iar în cel al complexului cu β CD randamentul a fost puțin mai scăzut (74,7%), probabil datorită unei solubilități mai ridicate a acestui complex în soluția etanol-apă utilizată. În figura 2.3.2 sunt prezentate randamentele de recuperare obținute în urma complexării crisinei, naringeninei, hesperetinei, quercetinei, rutinei și silibinei cu α CD, respectiv cu β CD.

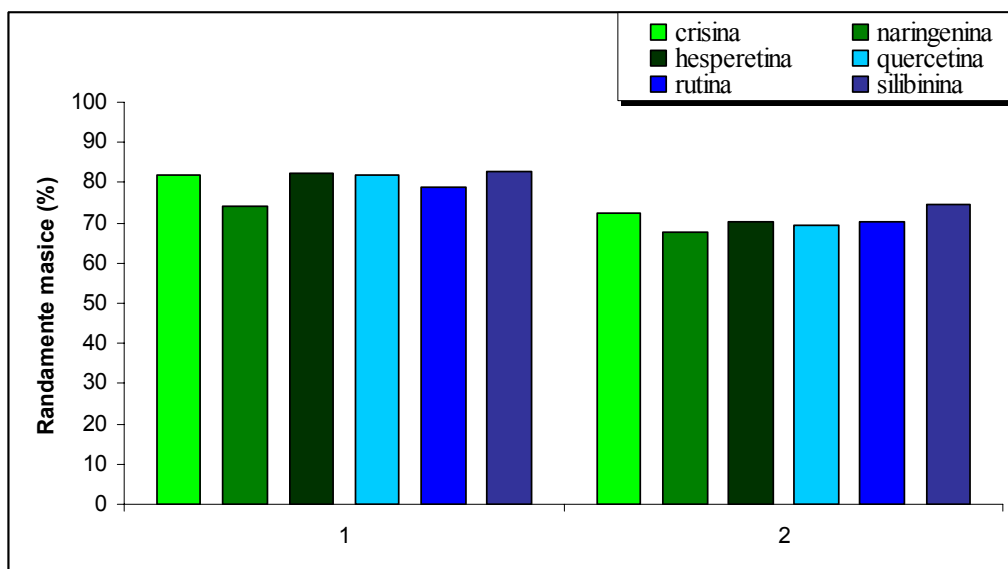


Figura 2.3.2. Randamentele de recuperare obținute în urma complexării flavonoidelor cu (1) α -ciclodextrină și (2) β -ciclodextrină prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă

2.3.1.1. Analiza prin spectroscopie FT-IR

Analiza spectroscopică FT-IR confirmă interacțiunea dintre flavonoide și ciclodextrine și implicit formarea complexelor acestora. Spectrele FT-IR ale complexelor au fost comparate cu cele ale substanțelor pure (flavonoide și ciclodextrine). Benzile de absorbție caracteristice substanțelor pure au fost regăsite și în spectrele complexelor confirmând realizarea încapsulării flavonoidei. În figura 2.3.3 sunt prezentate spectrele β -ciclodextrinei, complexului rutină/ β -ciclodextrină și cel al rutinei, suprapuse, unde banda caracteristică grupării carbonil din poziția 4 a moleculei de rutină de la numărul de undă 1656 cm^{-1} este mai intensă, iar în cazul complexului are o intensitate mai slabă, fiind regăsită la același număr de undă. Benzile caracteristice grupărilor hidroxil fenolice sunt mai puțin intense în cazul complexului, 3421 cm^{-1} și 1600 cm^{-1} , comparativ cu cele ale rutinei de la 3427 cm^{-1} și 1599 cm^{-1} . Banda caracteristică β CD, ν_{COC} la 1027 cm^{-1} , se regăsește și în complex la fel de intensă la 1026 cm^{-1} .

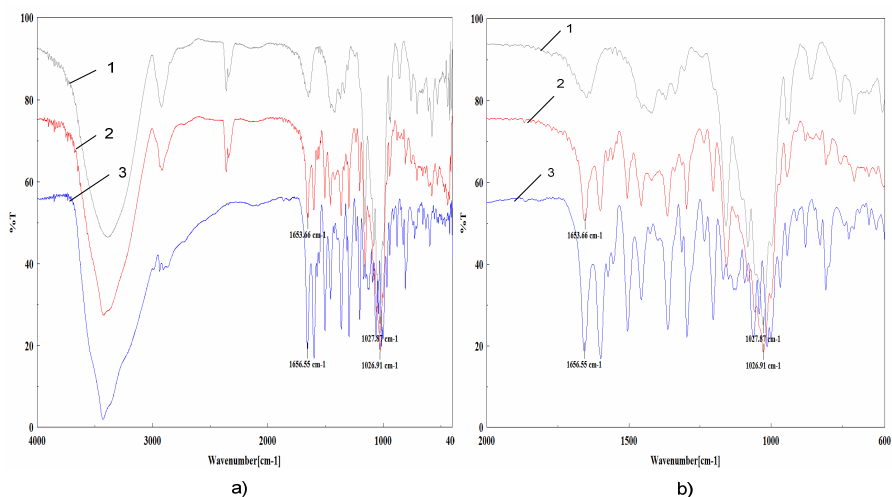


Fig. 2.3.3. Suprapunerea spectrelor FT-IR ale (1) β -ciclodextrinei, (2) complexului rutină/ β -ciclodextrină și (3) rutinei: (a) spectrul compușilor pe domeniul 4000-400 cm^{-1} , (b) spectrul compușilor pe domeniul 2000-600 cm^{-1}

Suprapunerea spectrelor FT-IR ale silibinei, complexului acesteia cu β CD și β CD pure, ca și în cazul rutinei, scoate în evidență modificările benzilor caracteristice doar în ce privește intensitatea. Astfel, din figura 2.3.4, se poate observa o scădere în intensitate și o mică deplasare a benzilor caracteristice grupărilor carbonil (1636 cm^{-1} , pentru silibinină, respectiv 1638 cm^{-1} , pentru complexul acesteia cu β CD) și hidroxil fenolic și prezența în complex a benzii caracteristice β CD, ν_{COC} la 1027 cm^{-1} .

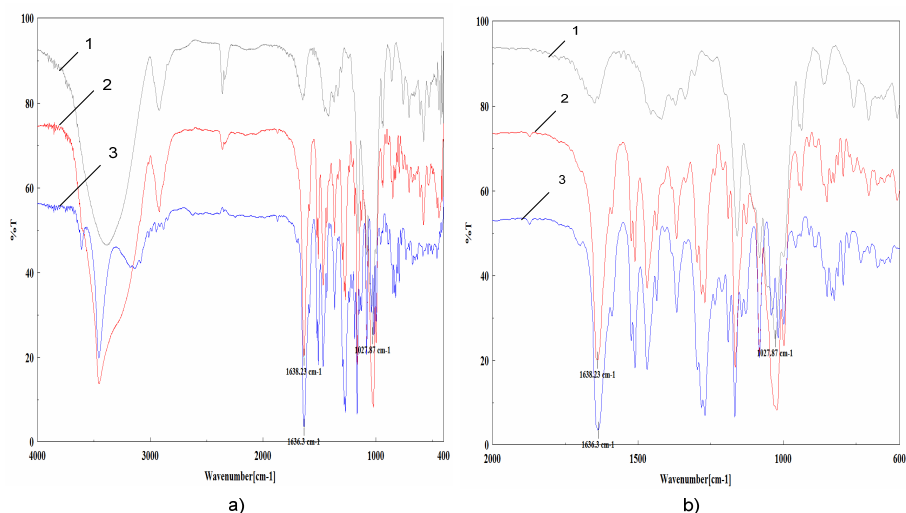


Fig. 2.3.4. Suprapunerea spectrelor FT-IR ale (1) β -ciclodextrinei, (2) complexului silibinină/ β -ciclodextrină și (3) silibinei: (a) spectrul compușilor pe domeniul 4000-400 cm^{-1} , (b) spectrul compușilor pe domeniul 2000-600 cm^{-1}

Și în cazul quercetinei, figura 2.3.5, modificările sunt aceleași, banda caracteristică grupării carbonil, foarte intensă la 1671 cm^{-1} pentru flavonoidă, scade mult în intensitate în cazul complexului și o regăsim la 1667 cm^{-1} ; banda caracteristică hidroxilului fenolic intensă la 1614 cm^{-1} pentru quercetină, mult mai slabă pentru complexul acesteia la 1613 cm^{-1} .

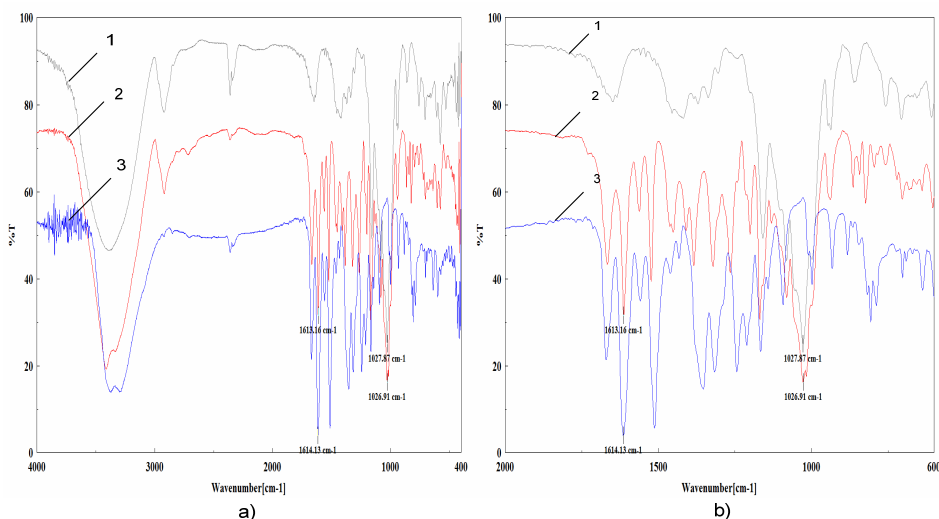


Fig. 2.3.5. Suprapunerea spectrelor FT-IR ale (1) β -ciclodextrinei, (2) complexului quercetină/ β -ciclodextrină și (3) quercetinei: (a) spectrul compușilor pe domeniul $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, (b) spectrul compușilor pe domeniul $2000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$

2.3.1.2. Analiza prin calorimetrie cu scanare diferențială (DSC)

Calorimetria cu Scanare Diferențială (DSC) este o măsură a variației cantității de căldură eliberată sau absorbită de probă în timpul unui program de temperatură. Prin tehnica DSC se pot pune în evidență și procesele de degradare termică și degradare termo-oxidativă a materialelor de natură anorganică și organică. Degradarea termică constă în descompunerea materialului în compuși cu masa moleculară mai mică și este caracterizată prin picuri endoterme. Curba DSC este specifică fiecărui material. De aceea, această metodă poate fi considerată drept o *spectroscopie termică* prin care se poate identifica un material.

Analiza DSC a α CD comerciale, figura 2.3.6, prezintă o energie de deshidratare de 942 J/g , cu temperaturile 65°C și 109°C , corespunzătoare procesului endoterm, cea din urmă temperatură o depășește pe cea de fierbere a apei în condiții normale, cel mai probabil datorită moleculelor de apă puternic legate în ciclodextrina hidratată. Nu se mai observă nici un efect calorimetric până la temperatura de 284°C când apare descompunerea ciclodextrinei.

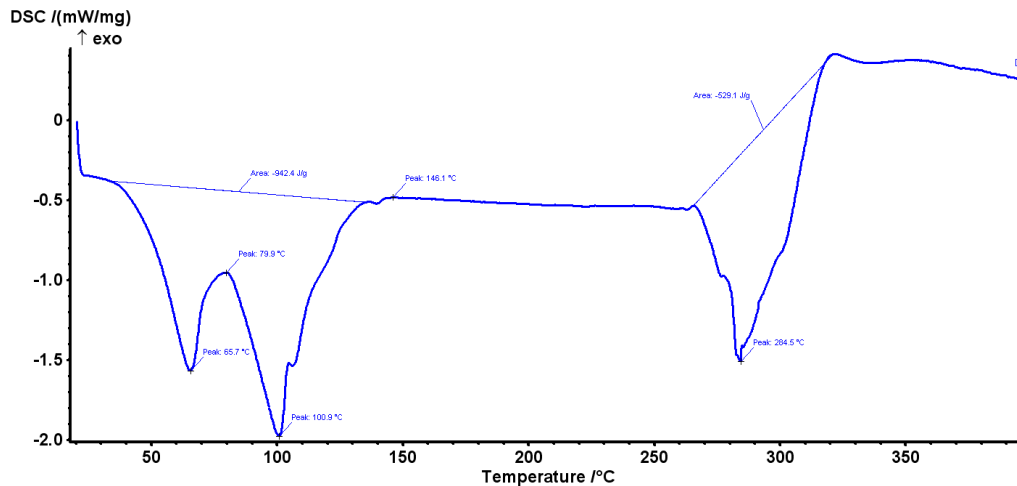


Fig. 2.3.6. Analiza DSC a α -ciclodextrinei comerciale pe intervalul de temperatură 20-400°C

Analiza DSC a β CD comerciale, figura 2.3.7, prezintă o energie de deshidratare (eliberare a apei de cristalizare/hidratare), de 1194 J/g, cu o temperatură a picului de 124°C, corespunzătoare procesului endoterm, temperatură mai mare decât cea de fierbere a apei în condiții normale, ca și în cazul α CD comerciale, cel mai probabil datorată moleculelor de apă puternic legate în ciclodextrina hidratată, iar până la temperatura de 270°C, când începe descompunerea ciclodextrinei, nu se mai observă nici un efect calorimetric.

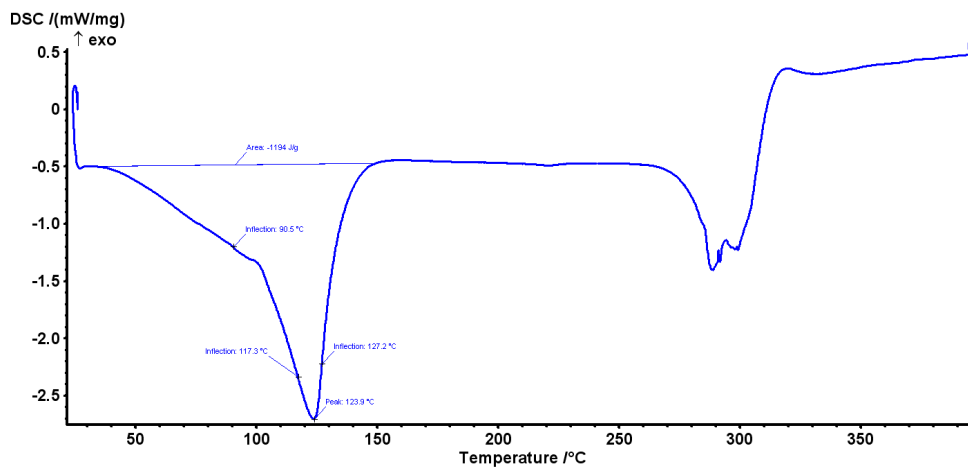


Figura 2.3.7. Analiza DSC a β -ciclodextrinei comerciale pe intervalul de temperatură 20-400°C

În termogramele DSC ale complexșilor (compușilor de incluziune) flavonoidelor cu ciclodextrine, formarea acestora este sugerată de absența (sau în unele cazuri prezența unui pic slab) picurilor endoterme corespunzătoare topirii flavonoidelor: 247-250°C (naringenina), 284-289°C (crisina), 316°C (quercetina), 227-232°C (hesperetina), 242°C (rutina) și 164-174°C (silibinina).

Analiza DSC a complexșilor flavonoide/ciclodextrine prezintă și alte două aspecte importante care duc la confirmarea formării complexului: efectul endoterm corespunzător deshidratării complexului este mai mic iar temperatura la care apare acesta este mai joasă, cel mai probabil datorită înlocuirii moleculelor de apă din cavitatea ciclodextrinei puternic legate, de către moleculele „oaspete”, flavonoide în cazul de față. În figura 2.3.8, se poate observa scăderea energiei de deshidratare, în cazul complexului silibinina/ β CD, la o valoare de 644 J/g și temperatura corespunzătoare efectului endoterm 80°C, comparativ cu valorile mai ridicate ale ciclodextrinei pure. Pe intervalul 120-270°C se poate observa apariția unui slab pic endoterm la 143°C, care poate fi atribuit transformărilor structurale, iar efectele atât endo- cât și exoterme care apar peste 270°C corespund descompunerii ciclodextrinei și flavonoidei.

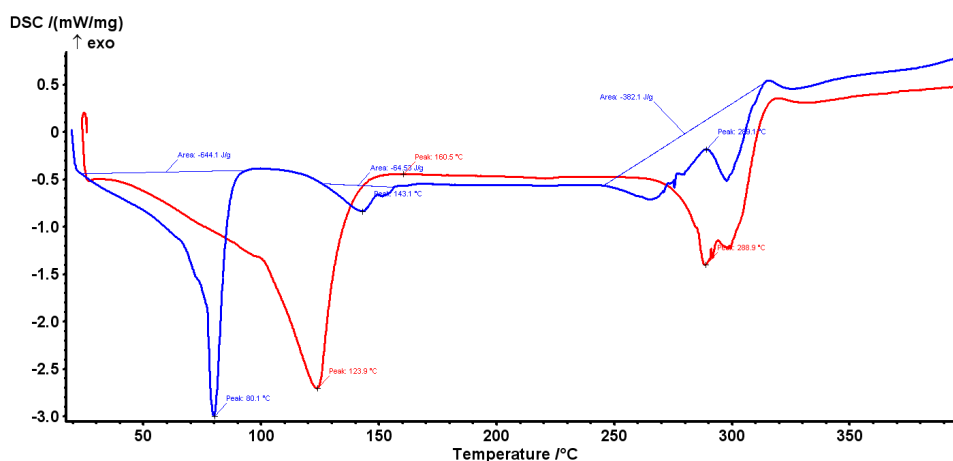


Figura 2.3.8. Suprapunerea curbelor DSC pentru complexul silibinină/ β CD (1) și β CD comercială (2), pe intervalul de temperatură 20-400°C

Și la analiza complexului naringenină/ β CD (figura 2.3.9) modificările efectelor calorimetrice apar la energia de deshidratare, care are o valoare de 900 J/g și temperatura corespunzătoare 108°C, un pic endoterm slab la 241°C atribuit probabil, neîncapsulării complete a acesteia și efectele atât endo- cât și exoterme caracteristice descompunerii, la 300°C, respectiv 318°C.

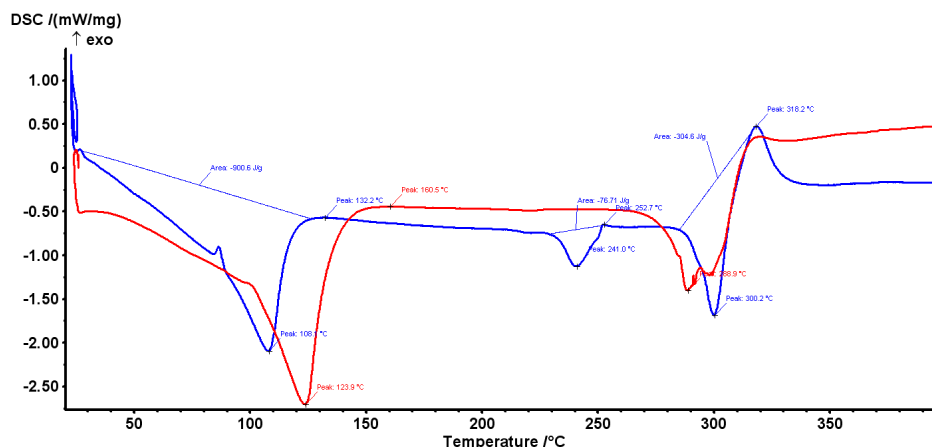


Figura 2.3.9. Suprapunerea curbelor DSC pentru complexul naringenină/ β CD (1) și β CD comercială (2), pe intervalul de temperatură 20-400°C

2.3.1.3. Analiza prin microscopie electronică cu scanare (SEM)

Pentru stabilirea dimensiunilor aproximative și a morfologiei cristalelor de complecși s-a apelat la microscopia electronică cu scanare (cu baleiaj), SEM. Analizele efectuate la magnitudini între 75-50000 \times au relevat faptul că cristalele de α -ciclodextrină au dimensiuni de aproximativ 10 μ m de formă romboidală regulată iar β -ciclodextrina comercială prezintă dimensiuni sub 10 μ m, cu forme hexagonale alungite.

Pentru o analiză cât mai concludentă s-au evaluat atât cristalele ciclodextrinelor pure cât și cele ale ciclodextrinelor recristalizate în sistem etanol-apă. Forme prismatice au fost observate în cazul cristalelor de complecși ai hesperetinei și quercetinei cu β CD (vezi anexele), cu dimensiuni de până la 3 μ m, dar mult mai uniforme și mai bine formate au fost nanocristalele de rutină cu cele două ciclodextrine, figurile 2.3.10 și 2.3.11, formele cristalelor fiind prismatic-aciculare de dimensiuni până la 1 μ m și grosimi de \sim 200 nm.

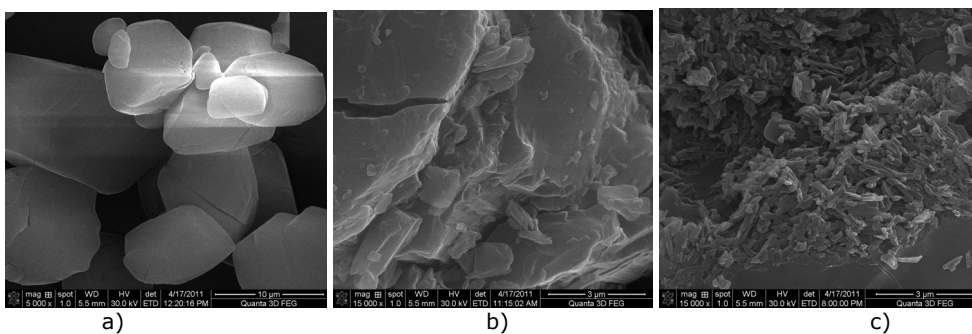


Figura 2.3.10. Imaginile SEM pentru a) α CD comercială, b) α CD recristalizată din sistem etanol-apă și c) complexul rutină/ α CD obținut prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă

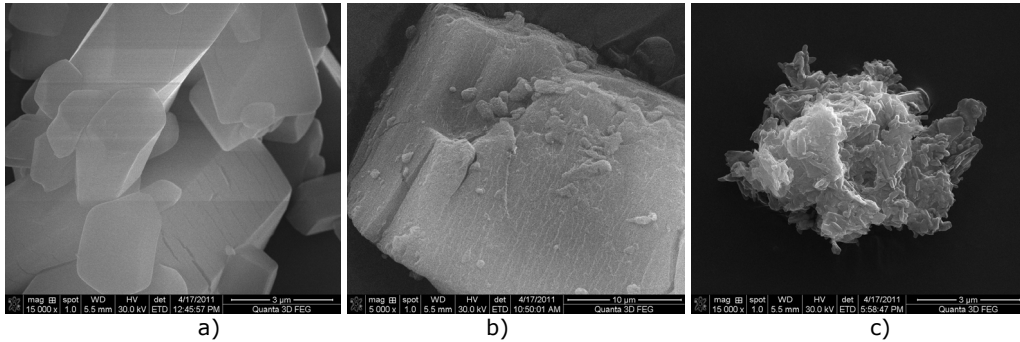


Figura 2.3.11. Imaginile SEM pentru a) β CD comercială, b) β CD recrystalizată din sistem etanol-apă și c) complexul rutină/ β CD obținut prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă

Pentru complexii silibininei cu β CD aspectul cristalelor a fost romboidal, cu dimensiuni ale laturilor cuprinse între câteva sute de nanometri și $\sim 5 \mu\text{m}$. Diferența formei de cristalizare și a dimensiunilor cristalelor este evidentă la compararea cu probele de ciclodextrină comercială utilizată pentru complexare, respectiv cu cea obținută prin recrystalizare din soluție etanol-apă (figura 2.3.12).

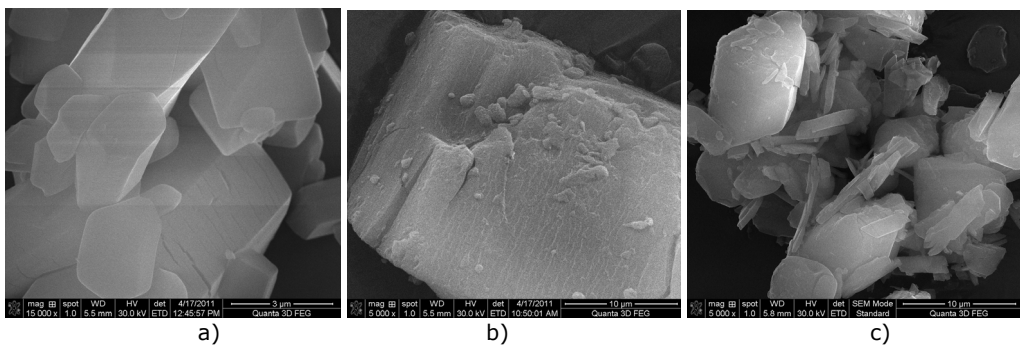


Figura 2.3.12. Imaginile SEM pentru a) β CD comercială, b) β CD recrystalizată din sistem etanol-apă și c) complexul silibinină/ β CD obținut prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă

Complexul naringeninei cu α CD a prezentat forme prismatice alungite, cu lungimi peste $20 \mu\text{m}$ și grosimi de $\sim 5 \mu\text{m}$ în timp ce complexul naringeninei cu β CD a prezentat forme cristaline mai uniforme, romboidale; cristalele de complexi ai crisinei au fost de dimensiuni peste $10 \mu\text{m}$, sub formă hexagonală alungită (figura 2.3.13).

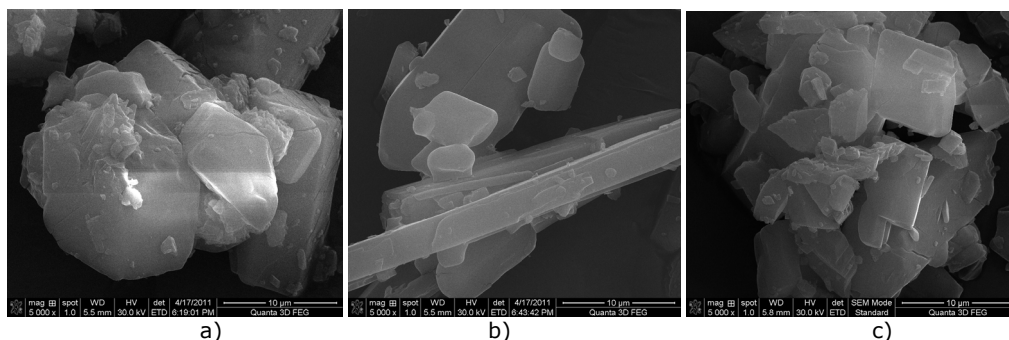


Figura 2.3.13. Imaginile SEM pentru complexii a) crisină/ β CD, b) naringenină/ α CD și c) naringenină/ β CD obținuți prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă

2.3.1.4. Analiza concentrației de apă prin titrare Karl Fischer (KFT)

Analizele concentrației de apă prin titrare Karl Fischer pentru complexii flavonoide/ciclodextrine au indicat valori ale concentrațiilor de apă relativ ridicate. Astfel, α CD a prezentat o concentrație de apă de $10,23 \pm 0,12\%$, în timp ce β CD are un conținut de apă de $15,27 \pm 0,15\%$. Toți complexii flavonoide/ α CD prezintă concentrații de apă cu 1-3% mai mici. Astfel, cele mai mici concentrații de apă s-au determinat pentru complexii α CD cu crisina și naringenina (7% și, respectiv, 7,2%), în timp ce quercetina și rutina au prezentat cele mai mari concentrații de apă în complexii cu α CD (9,2% și, respectiv, 8,3%). În cazul complexelor corespunzătoare cu β CD concentrațiile de apă determinate prin KFT au variat în mod asemănător: cele mai mici concentrații de apă s-au determinat pentru complexii cu crisină și naringenină (8,3% în ambele cazuri), iar cele mai mari pentru complexii cu quercetină și rutină (11,3% și, respectiv, 9,3%). Diferența față de β CD comercială a fost în acest caz mult mai mare (4-7%). În tabelul 2.3.1 sunt prezentate concentrațiile de apă din probe, cu precizarea că fiecare valoare este media a cel puțin trei determinări, iar deviația standard a fost sub 1,5%.

Tabelul 2.3.1. Rezultatele analizei KFT pentru complexii flavonoide/ α - și β -ciclodextrină

Nr.	Compus	Cantitatea de probă (g)	Volumul de titrare (mL)	Concentrația apă (%)
1	α CD	0,031	0,81	10,23
2	β CD	0,036	1,21	15,27
3	Crisină/ α CD	0,022	0,42	7,04
4	Naringenină/ α CD	0,025	0,48	7,19
5	Hesperetină/ α CD	0,024	0,53	8,13
6	Quercetină/ α CD	0,024	0,59	9,19
7	Rutină/ α CD	0,025	0,56	8,32
8	Crisină/ β CD	0,024	0,53	8,36
9	Naringenină/ β CD	0,023	0,50	8,32
10	Hesperetină/ β CD	0,027	0,66	9,15
11	Quercetină/ β CD	0,027	0,81	11,31
12	Rutină/ β CD	0,024	0,59	9,23

Tipul moleculelor de apă de cristalizare poate fi evaluat din curba de titrare a raportului volum de titrant/masă de probă (mL/g) în timp, unde cea mai mare parte a apei de cristalizare ("de suprafață") reacționează rapid în reacția Karl Fischer, iar o parte (apă de cristalizare "puternic legată", care se găsește probabil în mare parte în interiorul cavității ciclodextrinei) reacționează mai lent. Acest lucru se observă pentru α CD (figura 2.3.14) dar, în special pentru β CD comercială și pentru complexii bine formați ai β CD (figurile 2.3.15, 2.3.16).

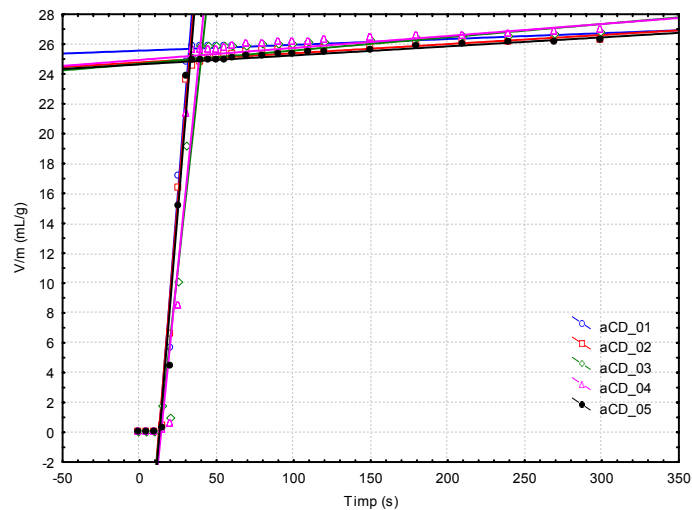


Figura 2.3.14. Analiza Karl Fischer pentru α -ciclodextrina comercială, pentru cinci determinări (pantele dreptelor de corelare V/m vs. $Timp$ (s) pentru intervalele de timp pe care variația este pseudolinară – 10-30s, 30-80s și 80-300s – s-au utilizat pentru determinarea vitezelor medii de reacție a apei)

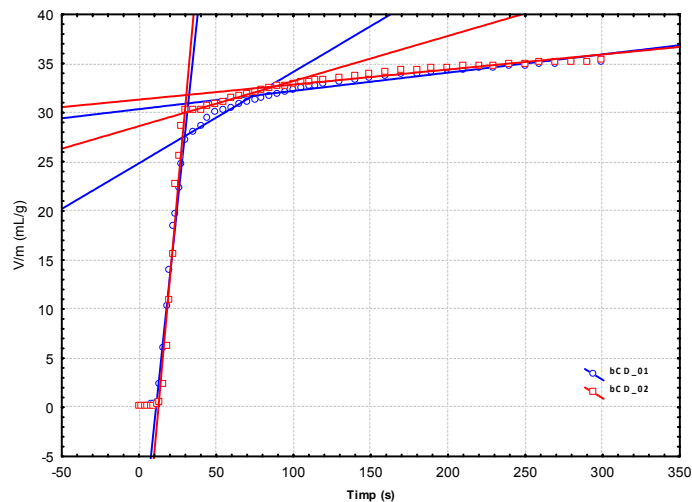


Figura 2.3.15. Analiza Karl Fischer pentru β -ciclodextrina comercială, duplicat (pantele dreptelor de corelare V/m vs. $Timp$ (s) pentru intervalele de timp pe care variația este pseudolinară – 10-30s, 30-80s și 80-300s – s-au utilizat pentru determinarea vitezelor medii de reacție a apei)

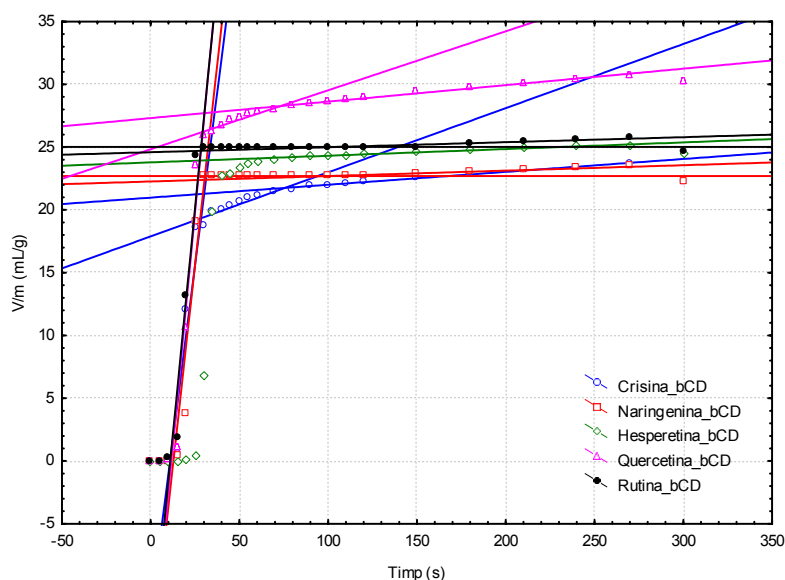


Figura 2.3.16. Analiza Karl Fischer pentru complexii flavonoide/ β -ciclodextrină (pantele dreptelor de corelare V/m vs. $Timp$ (s) pentru intervalele de timp pe care variația este pseudolinară – 10-30s, 30-80s și 80-300s – s-au utilizat pentru determinarea vitezelor medii de reacție a apei)

Din pantele dreptelor de corelare a raportului volum de titrant/masă de probă în timp (V/m (mL/g) vs. $Timp$ (s)) pentru intervalele de timp pe care variația este pseudolinară se pot determina vitezele medii ale reacției Karl Fischer, deoarece se cunosc titrul soluției de iod (4,485 mg/mL) și volumul de reacție (50 mL). Rezultatele calculelor vitezelor medii de reacție Karl Fischer, pentru intervalele 10-30s, 30-80s și 80-300s sunt prezentate în tabelul 2.3.2.

După cum se observă din tabelul 2.3.2, viteza de reacție pe primul interval este de 6,4 mM/s pentru α CD și de 9 mM/s pentru β CD, în timp ce pentru complexii corespunzători aceste viteze sunt puțin mai mici sau apropiate de aceste valori: valori mici pentru complexii bine formați ai crisinei și naringeninei (5,7 mM/s și 6,3 mM/s pentru α CD, respectiv 6,1 mM/s și 7,1 mM/s pentru β CD). Pentru quercetină și rutină valorile vitezelor sunt mai mari, ceea ce sugerează în special apă "de suprafață", slab legată (6,8-7,8 mM/s pentru α CD și 8-8,2 mM/s pentru β CD). Acest fapt se poate observa inclusiv în cazul vitezei pe intervalul al doilea (doar în cazul complexilor β CD), unde valoarea în cazul complexilor bine formați ai crisinei este de 10 ori mai mică decât în cazul complexilor quercetinei.

Tabelul 2.3.2. Vitezele de reacție* Karl Fischer din analiza apei pentru ciclodextrine și complexii acestora cu flavonoide

Nr.	Compus	Raport volum titrant/masă probă (1) (mL/g)	Raport volum titrant/masă probă (2) (mL/g)	Raport volum titrant/masă probă (3) (mL/g)	Viteza medie de reacție (1) (mM/s)	Viteza medie de reacție (2) (mM/s)	Viteza medie de reacție (3) (mM/s)
1.	α CD	1,158	0,006	0,006	6,44	0,040	0,040
2.	β CD	1,628	0,069	0,017	9,05	0,390	0,090
3.	Crisină/ α CD	1,021	0,006	0,006	5,68	0,035	0,035
4.	Naringenină/ α CD	1,133	0,005	0,005	6,30	0,029	0,029
5.	Hesperetină/ α CD	1,147	0,007	0,007	6,38	0,040	0,040
6.	Quercetină/ α CD	1,398	0,005	0,005	7,77	0,029	0,029
7.	Rutină/ α CD	1,218	0,006	0,006	6,77	0,036	0,036
8.	Crisină/ β CD	1,107	0,051	0,010	6,15	0,284	0,057
9.	Naringenină/ β CD	1,281	-	0,004	7,12	-	0,024
10.	Hesperetină/ β CD	-	-	0,005	-	-	0,029
11.	Quercetină/ β CD	1,483	0,469	0,013	8,25	2,608	0,073
12.	Rutină/ β CD	1,442	-	0,004	8,02	-	0,022

* Intervale pseudoliniare de evaluare a vitezelor de reacție Karl Fischer:

(1): 10-30s pentru complexii flavonoide/ α CD; complexii flavonoide/ β CD

(2): 30-80s pentru complexii flavonoide/ α CD; complexii flavonoide/ β CD

(3): 80-300s pentru complexii flavonoide/ α CD; complexii flavonoide/ β CD

2.3.1.5. Studiul activității antioxidante

Obiectivul prezentului studiu a fost de evaluare a activității antioxidante a complexilor flavonoidelor (quercetină, rutină și silibinină/ α - și β CD) comparativ cu activitatea antioxidantă a flavonoidelor neîncapsulate (quercetină, rutină și silibinină).

Activitatea antioxidantă a flavonoidelor, poate fi evaluată prin metode spectrofotometrice, utilizând metoda captării radicalilor cu DPPH.

Un aspect care trebuie luat în considerare în aceste studii este competitivitatea reactantului la echilibrul de asociere-disociere biocompus/ciclodextrină.

Un indicator important care cumulează aceste aspecte este viteza de reacție a DPPH în prezența probelor de analizat, care sugerează reactivitatea compușilor cu activitate antioxidantă, respectiv posibilitatea de eliberare controlată a acestora din complexii cu ciclodextrine. Chiar dacă activitatea antioxidantă finală este semnificativă, o viteză de reacție a DPPH nesemnificativă pe intervalul de timp final arată că nu mai există efect antioxidant (reactivitate mare și/sau neexistența unei eliberări controlate pentru compusul cu activitate antioxidantă).

Activitatea antioxidantă (AAO) a fost calculată ca diferență față de 100 a raportului, exprimat procentual, al absorbanței la timpul t față de absorbanta inițială (raportul dintre absorbanta momentană și absorbanta inițială la 517 nm).

Pentru evaluarea comportării compușilor bioactivi studiați în prezența unor specii reactive din organismul uman (de exemplu speciile de oxigen reactive, ROS,

radicalii liberi etc.) s-au determinat vitezele de reacție ale radicalului DPPH pe porțiunile pseudoliniare ale curbelor de variație a concentrației în timp.

Din absorbanțele amestecurilor de probă cu DPPH și cu ajutorul unei curbe de etalonare pentru DPPH s-au putut determina concentrațiile momentane de DPPH pe parcursul analizei activității antioxidante, ceea ce a permis determinarea vitezelor de reacție medii ale DPPH pe diferite intervale de timp. În tabelul 2.3.3 sunt prezentate valorile vitezelor medii de reacție pe 3 intervale de timp reprezentative (10-60s, 60-180s și 180-1800s) și valoarea finală a activității antioxidante.

Activitatea antioxidantă (figura 2.3.17) în cazul rutinei și complexului corespunzător cu β -ciclodextrină (la concentrații de compus bioactiv comparabile) prezintă valori de 82% și, respectiv, 74%, însă vitezele de reacție ale DPPH pe intervale de timp reprezentative (60-180s și 180-1800s) sunt relativ apropiate (0,003-0,006 $\mu\text{M/s}$ pentru ultimul interval), așa cum se observă din tabelul 2.3.3. Probabil încapsularea nu s-a realizat în întregime, iar grupările hidroxil fenolice sunt expuse mediului de reacție și în cazul complexului solubilizat.

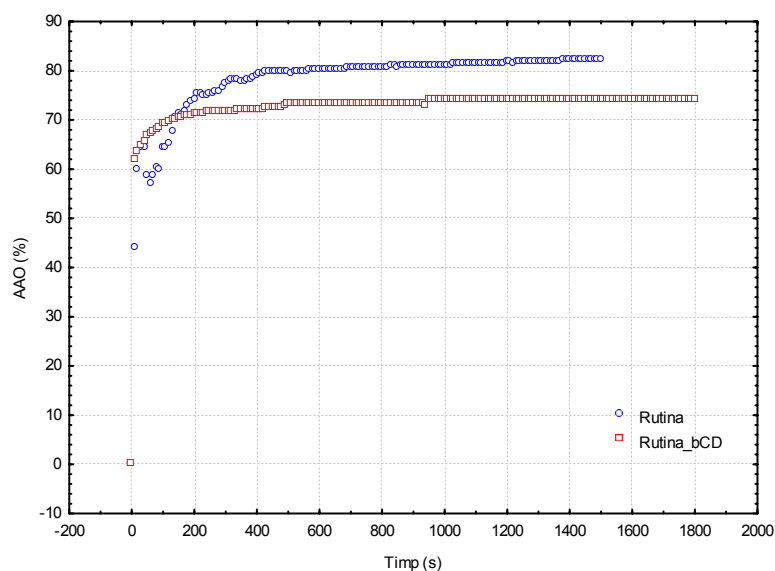


Figura 2.3.17. Reprezentarea variației activității antioxidante (AAO, %) în timp pentru probele de rutină (albastru) și complex al rutinei cu β -ciclodextrină (roșu)

În cazul silibininei și a complexului corespunzător, din figura 2.3.18 și tabelul 2.3.3 se observă că situația este diferită deoarece, comparativ cu rutina, există o viteză de reacție mai mare pe ultimele două intervale de timp considerate (doar 0,02 $\mu\text{M/s}$ pentru complexul rutină/ β -ciclodextrină față de 0,25 $\mu\text{M/s}$ pentru complexul silibininei, pe intervalul 60-180s, respectiv 0,002 $\mu\text{M/s}$ și 0,04 $\mu\text{M/s}$ pentru cei doi compuși pe ultimul interval, 180-1800s). În ceea ce privește silibinina și complexul acesteia cu β -ciclodextrina, dacă pe primul interval de timp valorile sunt apropiate, pe cel doilea interval valoarea complexului este de aproape trei ori mai mare comparativ cu silibinina neîncapsulată, și de două ori mai mare față de aceasta pe ultimul interval de timp.

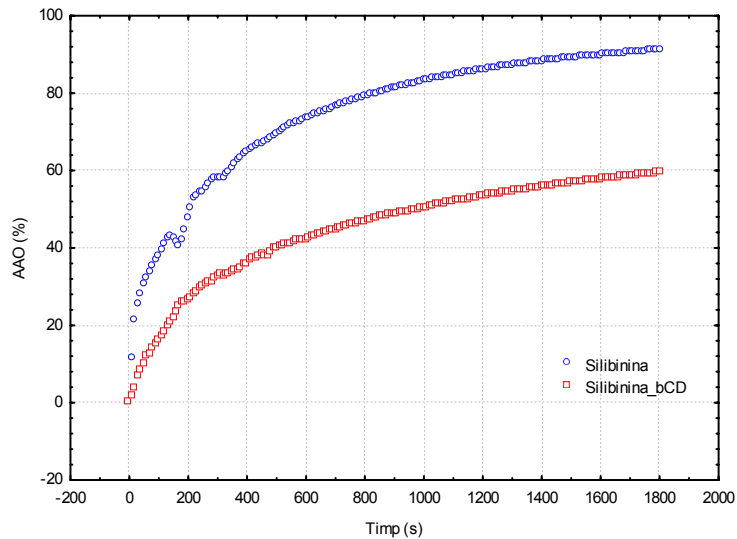


Figura 2.3.18. Reprezentarea variației activității antioxidante (AAO, %) în timp pentru probele de silibinină și complexul acesteia cu β -ciclodextrină

Comparativ, activitățile antioxidante variază după o alură similară în cazul rutinei și agliconului său, quercetină, având o valoare aproximativ constantă după $\sim 400s$, în timp ce în cazul silibininei există o variație semnificativă a activității antioxidante în timp chiar și după 1800s. Valorile activității antioxidante sunt destul de apropiate pentru aceste probe (80-90%) (figura 2.3.19 și tabelul 2.3.3).

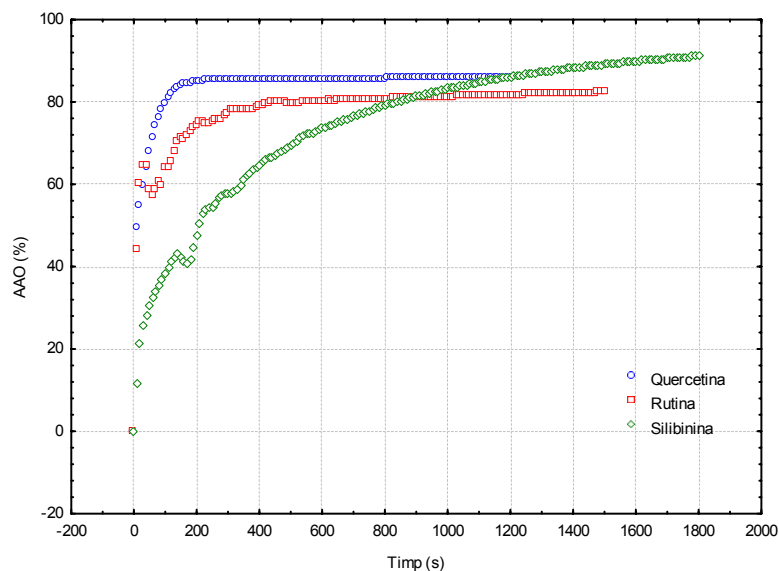


Figura 2.3.19. Reprezentarea variației activității antioxidante (AAO, %) în timp pentru probele de quercetină, rutină și silibinină

Tabelul 2.3.3. Vitezele de reacție medii* și activitatea antioxidantă

Nr. crt.	Compus	Viteza medie de reacție (1) ($\mu\text{M/s}$)	Viteza medie de reacție (2) ($\mu\text{M/s}$)	Viteza medie de reacție (3) ($\mu\text{M/s}$)	AAO (%)
1.	Rutina	-	0,175	0,006	82,3
2.	Complex rutina/ α CD (etanol)	0,032	0,024	0,008	58,4
3.	Complex rutina/ α CD (apa)	0,010	0,044	0,003	88,3
4.	Complex rutina/ β CD (etanol)	0,058	0,023	0,003	74
5.	Silibinina	0,486	0,100	0,029	91,1
6.	Complex silibinina/ α CD (etanol)	0,403	0,183	0,005	61
7.	Complex silibinina/ α CD (apa)	0,329	0,188	0,020	81
8.	Complex silibinina/ β CD (apa)	0,431	0,245	0,044	59,5
9.	Quercetina	0,649	0,164	0,001	85,8
10.	Complex quercetina/ α CD (etanol)	0,314	0,071	0,0004	79
11.	Complex quercetina/ β CD (apa)	0,550	0,109	0,0004	74

* Intervale pseudoliniare de evaluare a vitezelor de reacție medii

1: 10-60s pentru flavonoide și complexii acestora cu ciclodextrine;

2: 60-180s pentru flavonoide și complexii acestora cu ciclodextrine;

3: 180-1800s pentru flavonoide și complexii acestora cu ciclodextrine;

Fiecare probă analizată a fost preparată sub formă de soluție, lucrându-se atât cu soluții alcoolice cât și cu soluții apoase. În toate cazurile, pe primul interval s-a constatat o viteză medie de reacție cu DPPH mai mare în mediu apos, probabil și datorită unei solubilități mai mari a aerului/oxigenului în aceste sisteme de solvenți. De exemplu, pentru complexii rutinei cu α CD în mediul apos (figura 2.3.20) vitezele pe primul interval au fost de 0,1 $\mu\text{M/s}$, comparativ cu cazul utilizării etanolului, 0,03 $\mu\text{M/s}$.

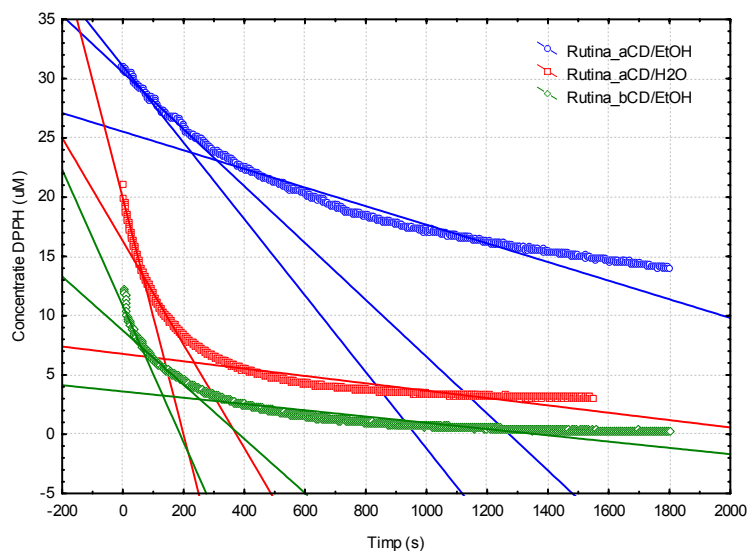


Figura 2.3.20. Vitezele de reacție ale DPPH în prezența probelor de rutină/ α -ciclodextrină (soluție alcoolică), rutină/ α -ciclodextrină (soluție apoasă) și rutină/ β -ciclodextrină (soluție alcoolică) pe cele trei intervale de timp considerate (10-60s, 60-180s, 180-1800s)

În ceea ce privește complexii silibininei cu α -ciclodextrina în soluție apoasă vitezele pe primele două intervale de timp au fost foarte apropiate cu cele din cazul utilizării soluției alcoolice, dar pe ultimul interval de timp aceste viteze au fost net diferite, cea din mediu apos a fost $0,02 \mu\text{M/s}$ față de doar $0,004 \mu\text{M/s}$ în cazul mediului alcoolic (figura 2.3.21).

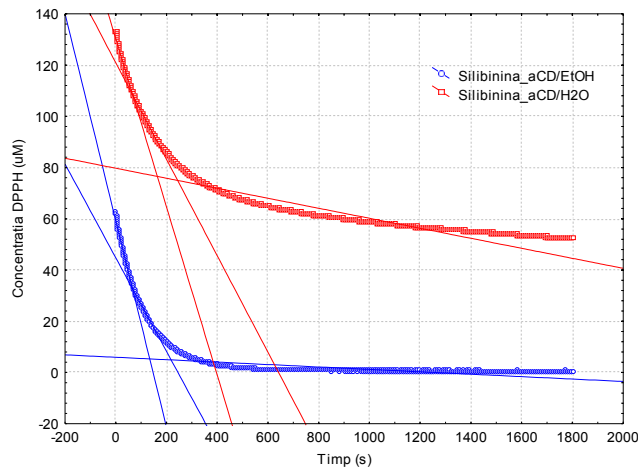


Figura 2.3.21. Vitezele de reacție ale DPPH în prezența probelor de silibinină/ α -ciclodextrină (soluție alcoolică) și silibinină/ α -ciclodextrină (soluție apoasă) pe cele trei intervale de timp considerate (10-60s, 60-180s, 180-1800s)

Complexii quercetinei cu cele două ciclodextrine (α CD, β CD) prezintă viteze medii mari pe primele două intervale de timp, care după aproximativ 300s devin constante, tinzând spre zero, fapt ce sugerează terminarea efectului antioxidant (încetarea activității antioxidante) (figura 2.3.22).

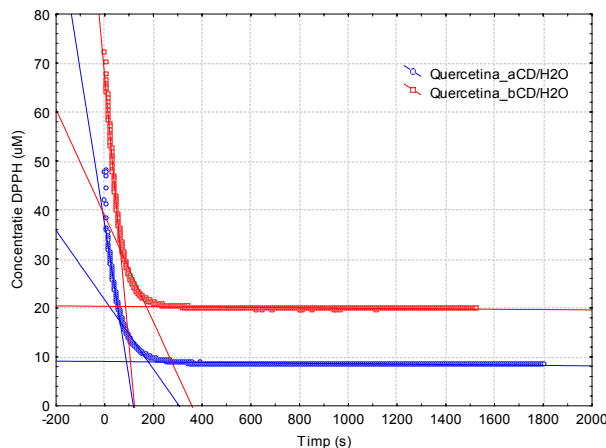


Figura 2.3.22. Vitezele de reacție ale DPPH în prezența probelor de quercetină/ α -ciclodextrină (soluție apoasă), quercetină/ β -ciclodextrină (soluție apoasă) pe cele trei intervale de timp considerate (10-60s, 60-180s, 180-1800s)

Studiul comparativ al celor trei flavonoide încapsulate în α -ciclodextrină, figura 2.3.23, și evaluate în mediu apos scoate în evidență diferența relevantă dintre complexii rutinei și quercetinei și cel al silibininei. Dacă pe primul interval de timp valorile vitezelor medii sunt comparabile, pe ultimele două intervale de timp, vitezele medii ale complexului silibinină/ α CD (0,18 μ M/s, respectiv 0,02 μ M/s) sunt mult mai mari față de cele ale complexșilor rutină/ α CD (0,04 μ M/s, respectiv 0,003 μ M/s) și quercetină/ α CD (0,07 μ M/s, respectiv 0,0004 μ M/s). În cazul complexșilor rutinei și quercetinei cu β -ciclodextrină se poate observa (figura 2.3.24) o viteză de reacție foarte mare în primele secunde ale analizei pentru complexul quercetinei, față de o viteză scăzută dar semnificativă a complexului rutinei.

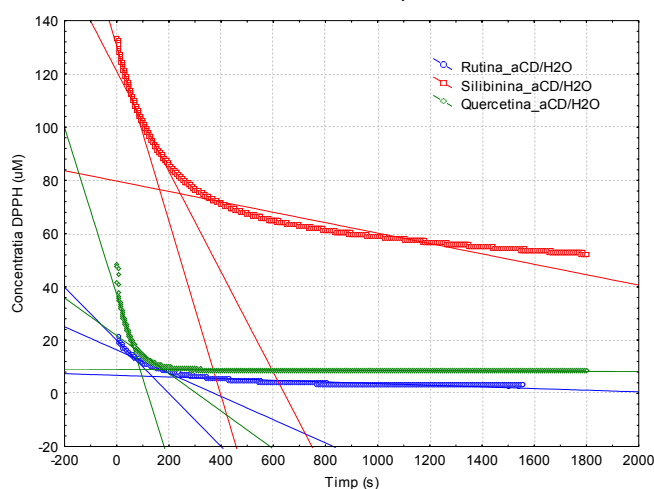


Figura 2.3.23. Vitezele de reacție ale DPPH în prezența probelor de rutină/ α -ciclodextrină (soluție apoasă), silibinină/ α -ciclodextrină (soluție apoasă) și quercetină/ α -ciclodextrină (soluție apoasă) pe cele trei intervale de timp considerate (10-60s, 60-180s, 180-1800s)

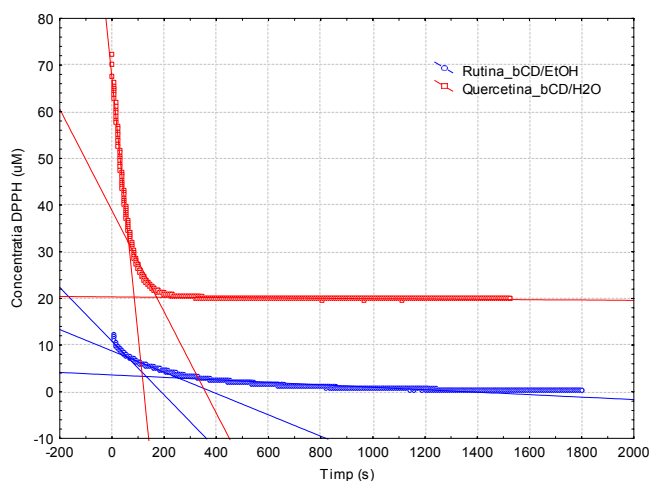


Figura 2.3.24. Vitezele de reacție ale DPPH în prezența probelor de rutină/ β -ciclodextrină (soluție alcoolică) și quercetină/ β -ciclodextrină (soluție apoasă) pe cele trei intervale de timp considerate (10-60s, 60-180s, 180-1800s)

2.3.2. Sisteme supramoleculare acizi grași/ciclodextrine

Metodologia abordată pentru obținerea și analiza nanocapsulelor acizilor grași saturați (decanoic, palmitic, stearic, arahidic și behenic) cu α - și β -ciclodextrină a fost similară cu cea utilizată în cazul flavonoidelor. În urma procesului de complexare a acizilor de puritate analitică în α CD și β CD s-au obținut randamente de recuperare ridicate, cel mai bun fiind pentru complexul acid stearic/ α -ciclodextrină (90,4%). Complexul cu β CD a fost obținut cu un randament mai scăzut (57,2%), probabil datorită aceleiași solubilități mai ridicate a acestui complex în soluția etanol-apă, față de cea a complexelor cu α CD. În figura 2.3.25 sunt prezentate randamentele masice obținute în urma formării compușilor de incluziune dintre acizii grași saturați și α CD, respectiv β CD.

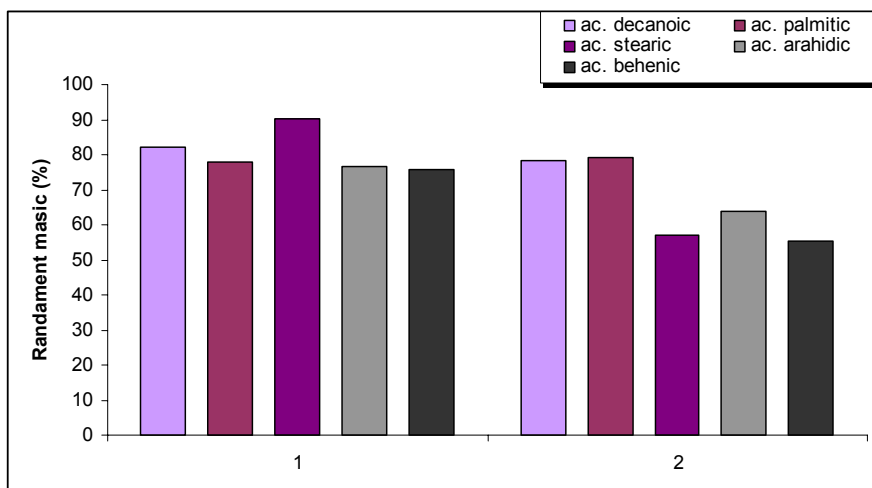


Figura 2.3.25. Randamentele de recuperare obținute în urma procesului de complexare a acizilor grași saturați (1) cu α -ciclodextrină și (2) cu β -ciclodextrină, prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă

În cazul obținerii sistemelor supramoleculare cu acizi nesaturați, acid oleic/ α - și β -ciclodextrină, respectiv acid linoleic/ α - și β -ciclodextrină, modul de lucru a fost similar cazurilor anterioare. În urma procesului de nanoîncapsulare a acizilor oleic și linoleic de puritate analitică în α - și β -ciclodextrină s-au obținut randamente de recuperare ridicate, cel mai bun fiind pentru complexul acid linoleic/ α CD (82,2%), iar cel mai scăzut pentru complexul acid oleic/ α CD (75,4%) (figura 2.3.26).

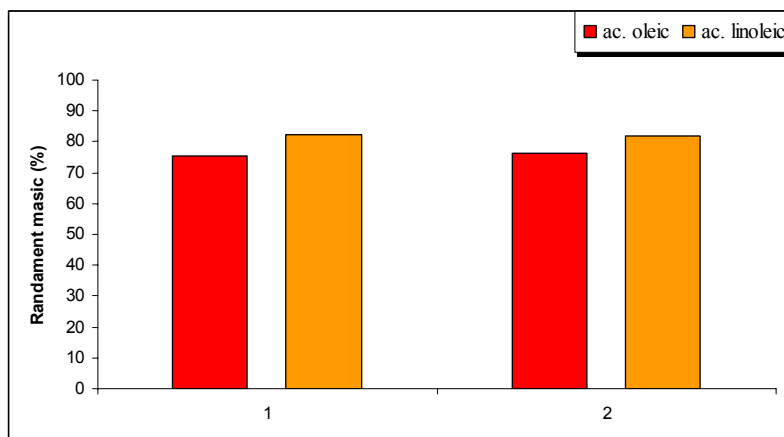


Figura 2.3.26. Randamentele de recuperare obținute în urma procesului de complexare a acizilor grași nesaturați (1) cu α -ciclodextrină și (2) cu β -ciclodextrină, în soluție etanol-apă

2.3.2.1. Analiza prin spectroscopie FT-IR

Analiza spectroscopică FT-IR confirmă, ca și în cazul flavonoidelor, interacțiunea dintre acizii grași saturați și nesaturați și ciclodextrine și implicit formarea complexelor acestora. Spectrele FT-IR ale complexelor au fost comparate cu cele ale acizilor grași puri și ciclodextrinelor comerciale. Schimbările benzilor caracteristice ale substanțelor pure confirmă existența complexului, cu benzi caracteristice specifice. În figura 2.3.27 sunt prezentate spectrele β -ciclodextrinei, complexului acid palmitic/ β -ciclodextrină și cel al acidului palmitic, suprapuse, unde se pot observa diferențele benzii caracteristice grupării carbonil, care în cazul acidului palmitic la numărul de undă 1701 cm^{-1} este mai intensă, iar în cazul complexului are o intensitate mult mai slabă și o regăsim la 1706 cm^{-1} . Banda caracteristică β CD, ν_{COC} la 1027 cm^{-1} , se regăsește și în complex la fel de intensă tot la 1027 cm^{-1} .

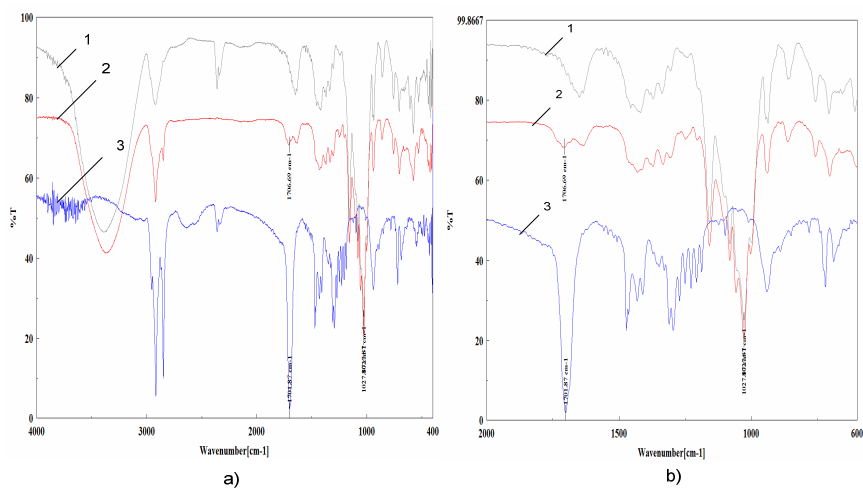


Fig. 2.3.27. Suprapunerea spectrelor FT-IR ale (1) β -ciclodextrinei, (2) complexului acid palmitic/ β -ciclodextrină și (3) acidului palmitic: (a) spectrul compușilor pe domeniul 4000-400 cm^{-1} , (b) spectrul compușilor pe domeniul 2000-600 cm^{-1}

În figurile 2.3.28 – 2.3.30, sunt prezentate suprapunerile spectrelor FT-IR pentru acizii stearic, behenic și oleic cu complexii acestora cu β CD iar modificările spectrale sunt evidente în toate cazurile: banda caracteristică grupării carbonil foarte intensă la 1714 cm^{-1} (acid stearic), 1702 cm^{-1} (acid behenic) și 1711 cm^{-1} (acid oleic) este mult mai slabă în cazul complexșilor acestora: 1703 cm^{-1} (acid stearic/ β CD), 1701 cm^{-1} (acid behenic/ β CD) și 1713 cm^{-1} (acid oleic/ β CD), iar ν_{COC} caracteristică β CD se regăsește în cazul tuturor complexșilor la fel de intensă.

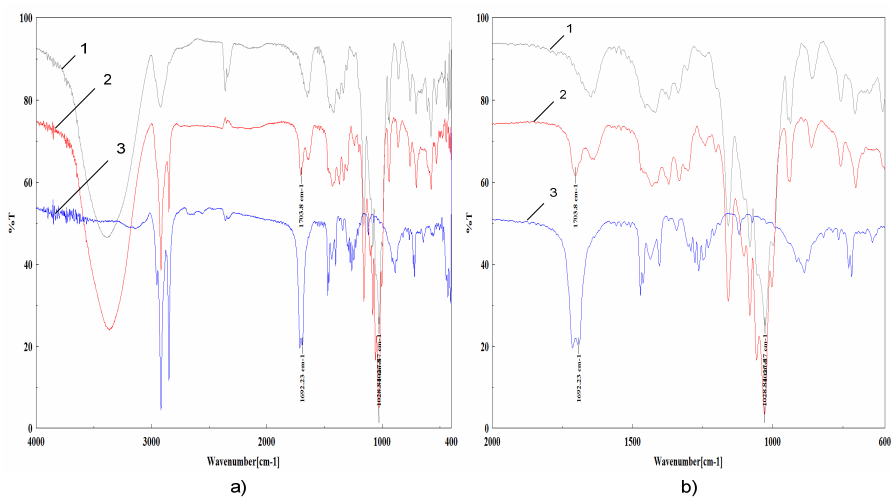


Figura 2.3.28. Suprapunerea spectrelor FT-IR ale (1) β -ciclodextrinei, (2) complexului acid stearic/ β -ciclodextrină și (3) acidului stearic: (a) spectrul compușilor pe domeniul 4000-400 cm^{-1} , (b) spectrul compușilor pe domeniul 2000-600 cm^{-1}

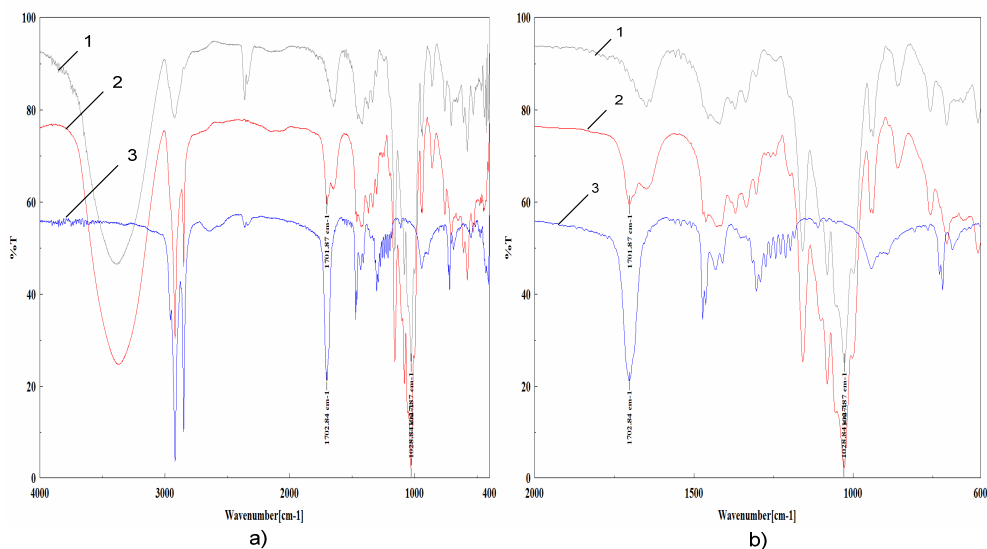


Fig. 2.3.29. Suprapunerea spectrelor FT-IR ale (1) β -ciclodextrinei, (2) complexului acid benenic/ β -ciclodextrină și (3) acidului benenic: (a) spectrul compușilor pe domeniul 4000-400 cm⁻¹, (b) spectrul compușilor pe domeniul 2000-600 cm⁻¹

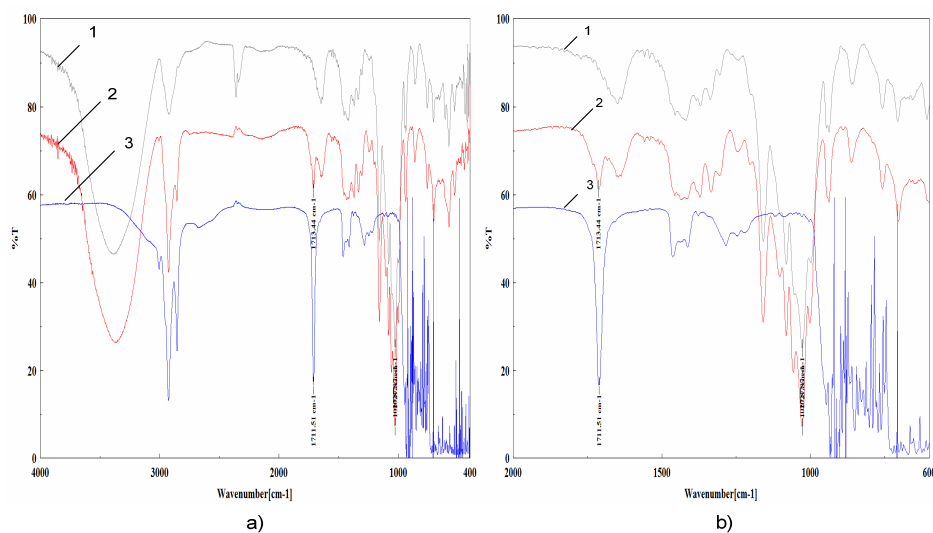


Figura 2.3.30. Suprapunerea spectrelor FT-IR ale (1) β -ciclodextrinei, (2) complexului acid oleic/ β -ciclodextrină și (3) acidului oleic: (a) spectrul compușilor pe domeniul 4000-400 cm⁻¹, (b) spectrul compușilor pe domeniul 2000-600 cm⁻¹

2.3.2.2. Analiza prin calorimetrie cu scanare diferențială (DSC)

Curbele DSC ale ciclodextrinelor comerciale, α și β , obținute pe intervalul de temperatură 20-400°C, cu o viteză de încălzire de 4°C /min, au fost prezentate și discutate în capitolul 2.3.1.2.

Ca și în cazul flavonoidelor, se poate observa scăderea energiei de deshidratare din complexii cu acizi grași față de cea din ciclodextrinele pure și, de asemenea, scăderea temperaturii picului corespunzător efectului endoterm.

În figura 2.3.31 este redată suprapunerea curbelor DSC pentru acidul oleic (care prezintă un pic larg endoterm la 230°C atribuit descompunerii acestuia), α CD comercială și complexul acesteia cu acid oleic. Pierderea apei în cazul complexului are loc mai repede, la 57°C, respectiv 76°C, comparativ cu ciclodextrina, iar energia de deshidratare este 878 J/g, de asemenea mai mică. Până la 284°C, când apare descompunerea ciclodextrinei, nu se mai observă nici un efect caloric.

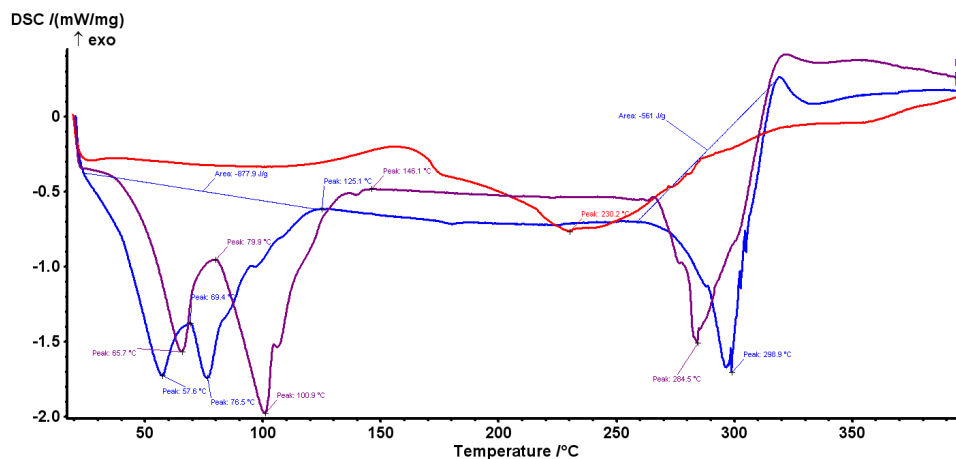


Figura 2.3.31. Suprapunerea curbelor DSC pentru complexul acid oleic/ α CD (1), a acidului oleic (2) și a α CD comercială (3), realizate pe intervalul de temperatură 20-400°C

Comparativ cu analiza DSC a complexului acid oleic/ α CD, în cazul complexului acidului linoleic cu α CD pierderea de apă are loc la o temperatură de 85°C, cu o energie de deshidratare de 559 J/g, fapt ce sugerează că apa conținută în complex este în special apă "de suprafață", slab legată, în cantitate mică, apa de cristalizare din interiorul cavității, puternic legată, fiind înlocuită de molecula de acid gras. Se poate observa un pic endoterm, slab, la 185°C, care poate fi atribuit transformărilor structurale din complexul supramolecular, iar până la 284°C când are loc descompunerea, nu mai este nici un efect caloric (figura 2.3.32).

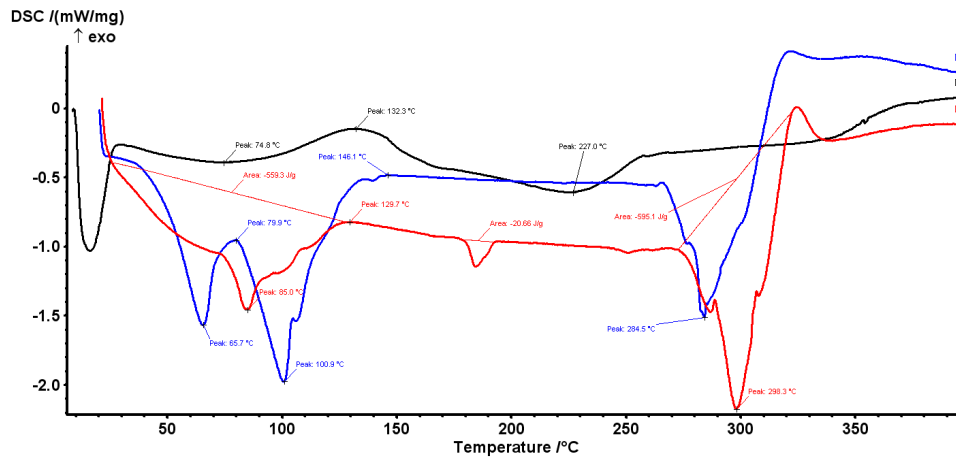


Figura 2.3.32. Suprapunerea curbelor DSC pentru acidul linoleic pur (1), complexul acid linoleic/αCD (2) și αCD comercială (3) realizate pe intervalul de temperatură 20-400°C

La analiza termică a complexului acidului linoleic cu βCD (figura 2.3.33) diferențele dintre compușii puri și complexul format sunt mai pronunțate decât în cazul αCD. Dacă în βCD comercială pierderea de apă are loc la o temperatură de până la 150°C cu o energie de deshidratare de peste 1100 J/g, în cazul complexului pierderea de apă are loc la 62°C cu o energie mult mai mică, de 591 J/g, lucru ce indică absența apei puternic legate din ciclodextrina pură și existența unor molecule de apă "de suprafață" în complex care sunt îndepărtate ușor din sistem. După 280°C are loc descompunerea compusului, reflectată printr-un pic endoterm.

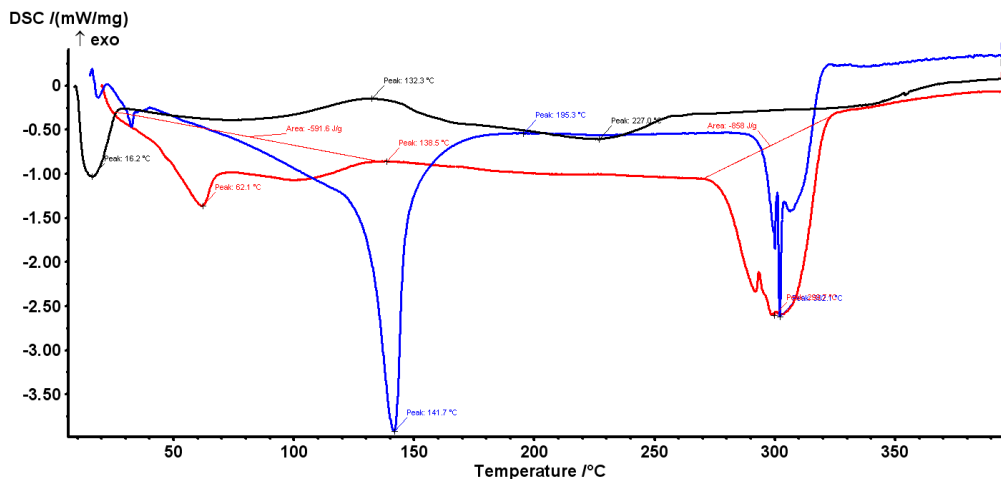


Figura 2.3.33. Suprapunerea curbelor DSC pentru acidul linoleic pur (1), complexul acid linoleic/βCD (2) și βCD comercială (3) realizate pe intervalul de temperatură 20-400°C

2.3.2.3. Analiza prin microscopie electronică cu scanare (SEM)

La fel ca în cazul complexelor flavonoidelor analiza prin microscopie electronică cu scanare (SEM) pentru micro/nanoparticulele acizi grași/ α - și β -ciclodextrină s-a realizat pentru stabilirea dimensiunilor aproximative și a morfologiei cristalelor de complecși. Analizele efectuate la magnitudini între 75-50000 \times au relevat faptul că cristalele complexelor acizilor grași cu α CD au dimensiuni sub 10 μm de formă romboidală regulată (figura 2.3.34), în timp ce complexii acizilor grași cu β CD prezintă dimensiuni de aproximativ 3 μm , cu forme hexagonale alungite (figura 2.3.35).

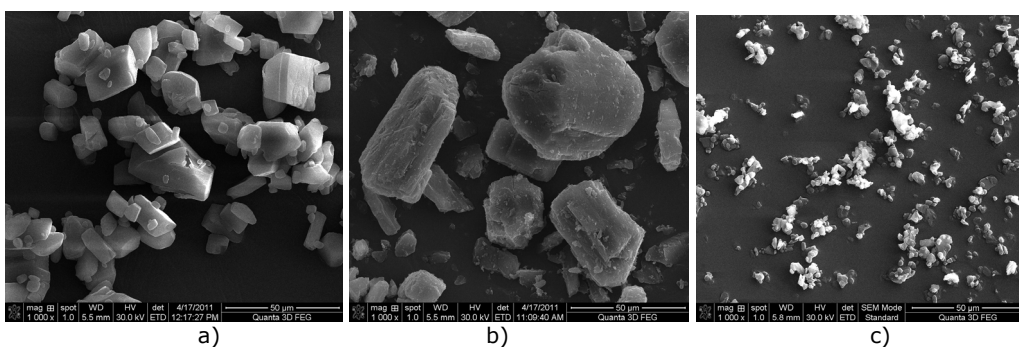


Figura 2.3.34. Imaginile SEM pentru a) α CD comercială, b) α CD recrystalizată din sistem etanol-apă și c) complexul acid palmitic/ α CD obținut prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă

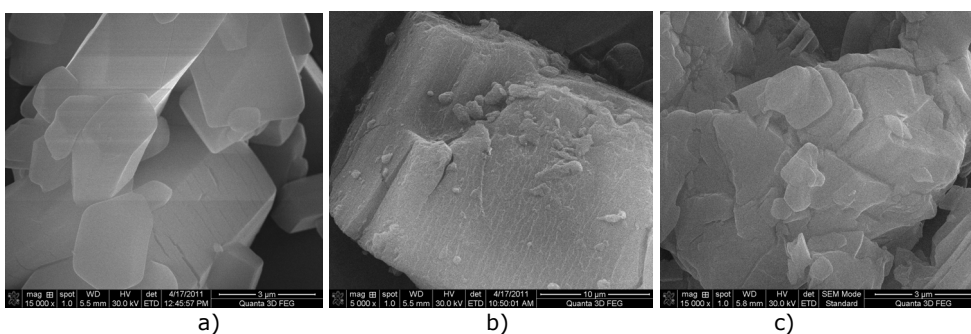


Figura 2.3.35. Imaginile SEM pentru a) β CD comercială, b) β CD recrystalizată din sistem etanol-apă și c) complexul acid arahidic/ β CD obținut prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă

Pentru complexul acidului oleic cu α CD se pot observa diferențele structurale legate de mărimea cristalelor și forma acestora în figura 2.3.36.

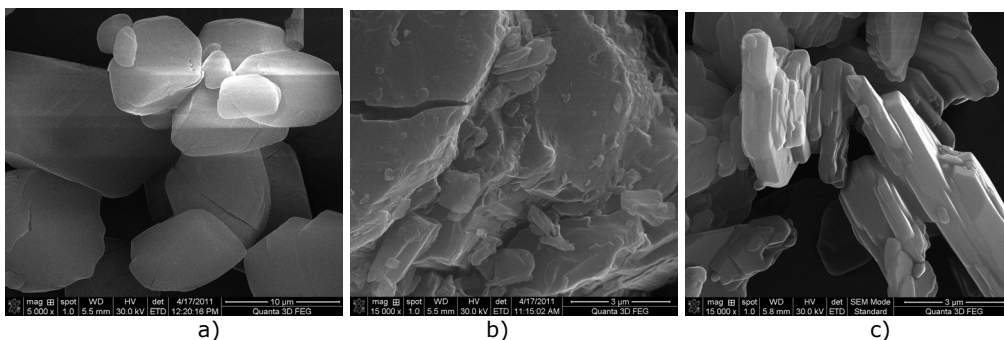


Figura 2.3.36. Imaginile SEM pentru a) α CD comercială, b) α CD recristalizată din sistem etanol-apă și c) complexul acid oleic/ α CD obținut prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă

2.3.2.4. Analiza concentrației de apă prin titrare Karl Fischer (KFT)

Și în cazul complexelor ciclodextrinelor cu acizii grași, cantitatea de apă reținută în complex, comparativ cu ciclodextrina inițială, poate fi considerată drept indicator al încapsulării. În tabelul 2.3.4 sunt prezentate concentrațiile de apă din probele analizate, cu precizarea că valorile sunt medii a cel puțin două determinări, iar deviația standard a fost sub 1,5%. Toți complexii acizii grași/ α CD prezintă concentrații de apă cu 2-3% mai mici comparativ cu α CD comercială, deși aceste concentrații sunt relativ ridicate. Astfel, cea mai mică concentrație de apă s-a determinat pentru complexul α CD cu acid decanoic (7%), în timp ce complexii acizilor palmitic, stearic și oleic au prezentat concentrații de apă mai ridicate (8,2%, 8,9% și, respectiv, 8,8%). În cazul complexelor corespunzătoare cu β CD concentrațiile de apă determinate prin KFT au variat în modul următor: cele mai mici concentrații de apă s-au determinat pentru complexii cu acizii arahidic, stearic și oleic (9,2% și 9,4% în celelalte două cazuri), iar cele mai mari pentru complexii cu acid palmitic și acid linoleic (9,8% și, respectiv, 10,1%). Diferența față de β CD comercială a fost în acest caz mult mai mare (5-6%).

Tabelul 2.3.4. Rezultatele analizei KFT pentru complexii acizii grași/ α - și β -ciclodextrină

Nr. crt.	Compus	Cantitatea de probă (g)	Volumul de titrare (mL)	Conc. apă (%)
1.	α CD	0,031	0,81	10,23
2.	β CD	0,036	1,21	15,27
3.	Acid decanoic/ α CD	0,021	0,39	7,06
4.	Acid palmitic/ α CD	0,022	0,49	8,20
5.	Acid stearic/ α CD	0,022	0,52	8,96
6.	Acid oleic/ α CD	0,021	0,51	8,87
7.	Acid decanoic/ β CD	0,024	0,63	9,68
8.	Acid palmitic/ β CD	0,021	0,56	9,82

9.	Acid stearic/ β CD	0,022	0,55	9,41
10.	Acid arahidic/ β CD	0,022	0,55	9,22
11.	Acid behenic/ β CD	0,028	0,72	9,56
12.	Acid oleic/ β CD	0,023	0,57	9,42
13.	Acid linoleic/ β CD	0,022	0,60	10,12

Tipul moleculelor de apă de cristalizare poate fi evaluat din curba de titrare a raportului volum de titrant/masă de probă în timp, unde cea mai mare parte a apei de cristalizare ("de suprafață") reacționează rapid în reacția Karl Fischer, iar o parte (apă de cristalizare "puternic legată", care se găsește probabil în mare parte în interiorul cavității ciclodextrinei) reacționează mai lent. Acest lucru se observă pentru α CD comercială și pentru complexii formați ai acesteia (figura 2.3.37).

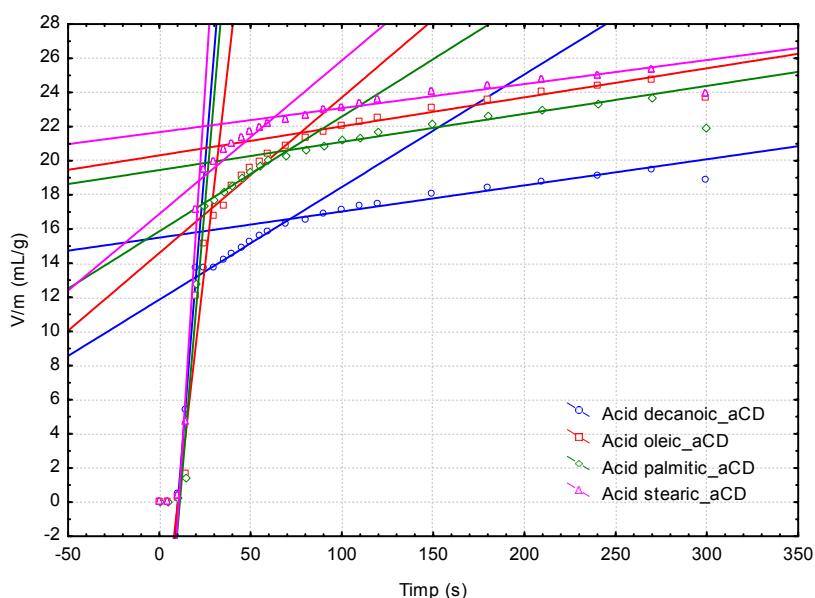


Figura 2.3.37. Analiza Karl Fischer pentru complexii acizi grași/ α -ciclodextrină (pantele dreptelor de corelare V/m vs. $Timp$ (s) pentru intervalele de timp pe care variația este pseudolinară – 10-30s, 30-80s și 80-300s – s-au utilizat pentru determinarea vitezelor medii de reacție a apei)

Compararea vitezelor de reacție a complexilor acizilor grași saturați decanoic, palmitic și stearic atât cu α -ciclodextrină cât și cu β -ciclodextrină, figura 2.3.38, scoate în evidență modul de legare al apei de hidratare în complexi: apa de cristalizare din interiorul cavității β CD reacționează cu o viteză medie care se poate calcula exact pe intervalul 30-80s (linearitate evidentă a dependenței raportului volum de titrant/masă de probă în timp) și care este mai mică în comparație cu primul interval corespunzător apei de suprafață. În cazul α CD această diferențiere este mai greu de realizat, probabil datorită modului de legare a apei de cristalizare (mai slab sau mai puternic legată).

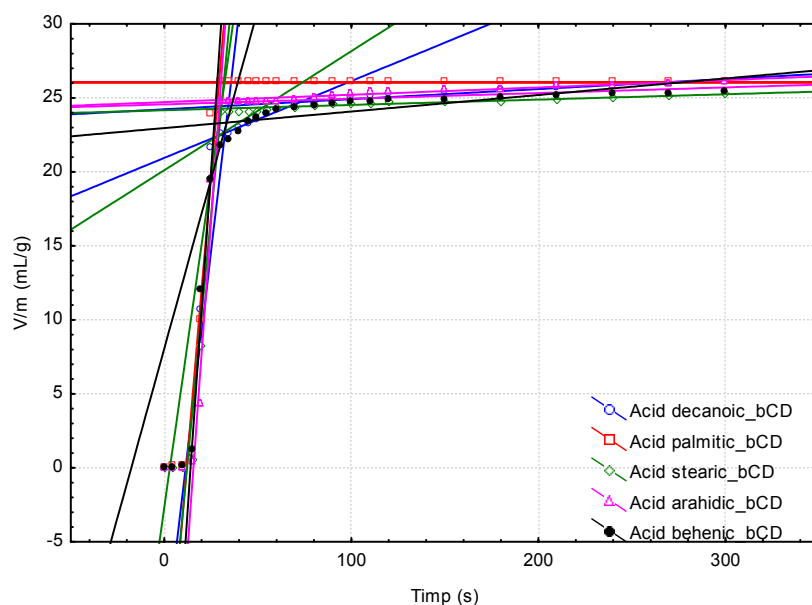


Figura 2.3.38. Analiza Karl Fischer pentru complexii acizi grași / β -ciclodextrină (pantele dreptelor de corelare V/m vs. $Timp$ (s) pentru intervalele de timp pe care variația este pseudoliniară – 10-30s, 30-80s și 80-300s – s-au utilizat pentru determinarea vitezelor medii de reacție a apei)

Din pantele dreptelor de corelare a raportului volum de titrant/masă de probă în timp, pentru intervalele de timp pe care variația este pseudoliniară se pot determina vitezele medii ale reacției Karl Fischer, deoarece se cunosc titrul soluției de iod (3,911 mg/mL) și volumul de reacție (50 mL). Rezultatele calculelor vitezelor medii de reacție Karl Fischer pentru intervalele 10-30s, 30-80s și 80-270s pentru complexii cu α -ciclodextrină, respectiv pentru intervalele 10-20s, 20-40s, 40-360 și 360-450 pentru complexii cu β -ciclodextrină sunt prezentate în tabelul 2.3.5.

După cum se observă din tabelul 2.3.5, viteza de reacție pe primul interval este de 6,4 mM/s pentru α CD și de 9 mM/s pentru β CD, în timp ce pentru complexii corespunzători aceste viteze sunt mai mici în comparație cu aceste valori: valori mici pentru complexul bine format al acidului decanoic (3,87% pentru α CD, respectiv 5,97% pentru β CD). Pentru acizii palmitic și stearic valorile vitezelor sunt mai mari, ceea ce sugerează în special apă "de suprafață", slab legată (5,6-6,0 mM/s pentru α CD).

Tabelul 2.3.5. Vitezele de reacție* Karl Fischer din analiza apei pentru complexii ciclodextrinelor cu acizi grași

Nr. Crt.	Compus	Raport volum titrant/masă probă (1a) (mL/g)	Raport volum titrant/masă probă (1b) (mL/g)	Raport volum titrant/masă probă (2) (mL/g)	Raport volum titrant/masă probă (3) (mL/g)	Viteza medie de reacție (1a) (mM/s)	Viteza medie de reacție (1b) (mM/s)	Viteza medie de reacție (2) (mM/s)	Viteza medie de reacție (3) (mM/s)
1.	α CD	1,158	-	0,006	0,006	6,44	-	0,04	0,04
2.	β CD	1,628	-	0,069	0,017	9,05	-	0,39	0,09
3.	Acid decanoic/ α CD	0,695	-	0,058	0,015	3,87	-	0,32	0,08
4.	Acid palmitic/ α CD	1,016	-	0,059	0,016	5,65	-	0,33	0,09
5.	Acid stearic/ α CD	1,079	-	0,052	0,014	6,00	-	0,29	0,08
6.	Acid oleic/ α CD	0,931	-	0,091	0,017	5,18	-	0,50	0,09
7.	Acid decanoic/ β CD	1,074	0,508	0,009	0,006	5,97	2,83	0,05	0,04
8.	Acid palmitic/ β CD	0,986	0,683	0,001	0,007	5,48	3,80	0,00	0,04
9.	Acid stearic/ β CD	0,821	0,720	0,004	0,009	4,57	4,00	0,02	0,05
10.	Acid arahidic/ β CD	0,426	0,923	0,005	0,009	2,37	5,13	0,03	0,05
11.	Acid behenic/ β CD	1,186	0,481	0,006	0,007	6,59	2,68	0,04	0,04
12.	Acid oleic/ β CD	1,225	0,488	0,003	0,008	6,81	2,71	0,01	0,04
13.	Acid linoleic/ β CD	1,487	0,494	0,002	0,008	8,26	2,74	0,01	0,05

* Intervale pseudoliniare de evaluare a vitezelor de reacție Karl Fischer:

1a: 10-30s pentru complecși acizi grași/ α CD; 10-20s pentru complecși acizi grași/ β CD

1b: 20-40s pentru complecși acizi grași/ β CD

2: 30-80s pentru complecși acizi grași/ α CD; 40-360s pentru complecși acizi grași/ β CD

3: 80-270s pentru complecși acizi grași/ α CD; 360-540s pentru complecși acizi grași/ β CD

2.3.3. Sisteme supramoleculare bioconjugăți/ciclodextrine

Metodologia abordată pentru obținerea și analiza compușilor de incluziune ai bioconjugăților/ α - și β -ciclodextrinei a fost similară cazului obținerii complexilor flavonoidelor și acizilor grași.

În cazul bioconjugăților de tipul esterilor flavonoidelor cu acizi grași saturați, în urma procesului de complexare s-au obținut randamente de recuperare medii și mari, cuprinse între 43,6%-74,9%, cel mai bun fiind pentru complexul rutin palmitat/ β -ciclodextrină (74,9%). Complexul rutin decanoat cu β -ciclodextrină a fost obținut cu un randament mai scăzut (43,6%).

Complecșii bioconjugăților cu acizi grași nesaturați s-au obținut cu randamente mai bune: rutin oleat/ β -ciclodextrină 79,8%, iar rutin linoleat/ β -ciclodextrină 82,1%.

În ceea ce privește bioconjugății din clasa flavonolignanilor, în urma complexării s-au obținut randamente moderate: în cazul complexului silibinin stearat/ β -ciclodextrină 58,8%, iar în cel al complexului silibinin oleat/ β -ciclodextrină randamentul a fost 72,2%.

Figura 2.3.39 este reprezentarea schematică a formării compusului de incluziune a rutin palmitatului (stearatului) cu ciclodextrine.

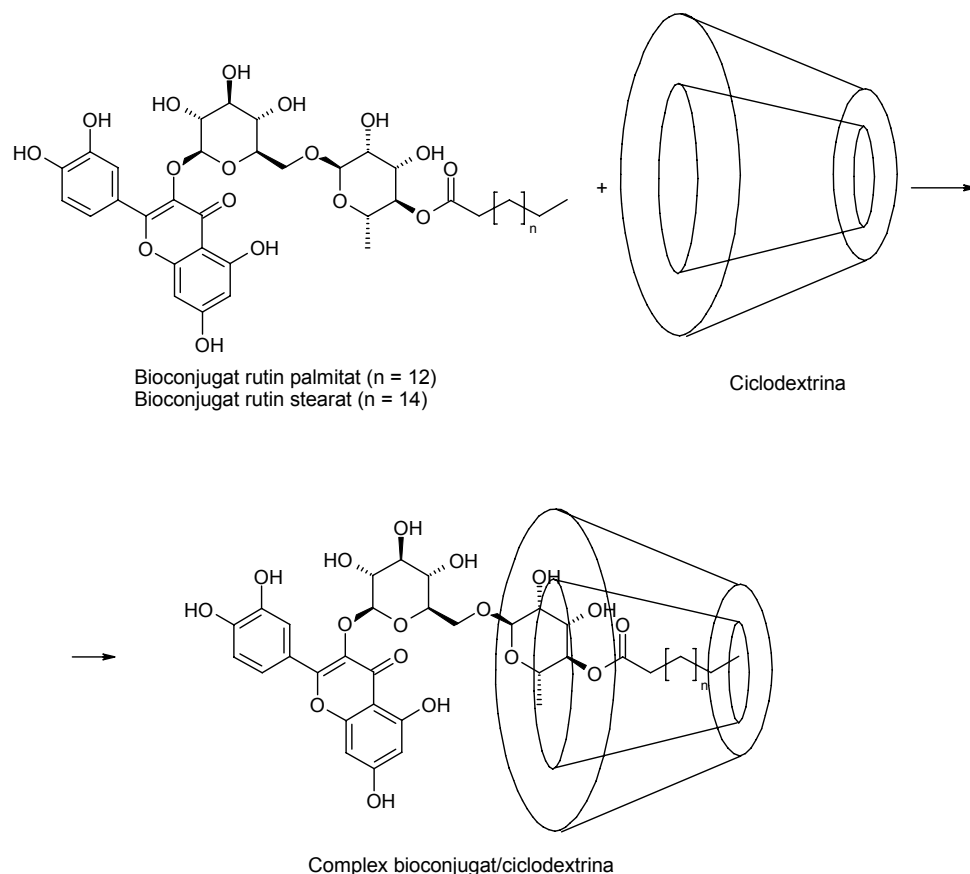


Figura 2.3.39. Reprezentarea schematică a procesului de încapsulare moleculară a bioconjugatilor rutin-ester/ciclodextrină

2.3.3.1. Analiza prin spectroscopie FT-IR

Analiza spectroscopică FT-IR confirmă, ca și în cazul flavonoidelor și acizilor grași, interacțiunea dintre bioconjugatii obținuți și ciclodextrine, și implicit formarea complexilor acestora. Spectrele FT-IR ale complexilor au fost comparate cu cele ale bioconjugatilor dintre flavonoide și acizi grași, obținuți pe calea esterificării enzimatică, separați și purificați, și ciclodextrinelor comerciale. Schimbările benzilor caracteristice ale substanțelor de pornire confirmă existența complexului cu benzi caracteristice specifice. În figura 2.3.40 sunt prezentate spectrele β -ciclodextrinei, complexului rutin palmitat/ β -ciclodextrină și cel al rutin palmitatului, suprapuse, unde se pot observa diferențele benzilor caracteristice grupării carbonil, care în cazul rutin palmitatului la 1724 cm^{-1} și 1655 cm^{-1} sunt mai intense, iar în cazul complexului intensitățile sunt mult mai slabe și le regăsim la 1715 cm^{-1} și 1653 cm^{-1} . Banda caracteristică β -ciclodextrinei, ν_{COC} la 1027 cm^{-1} , se regăsește și în complex

la fel de intensă la 1030 cm^{-1} . Aceleași schimbări specifice pot fi observate și în cazul spectrelor rutin stearatului și silibinin oleatului (figurile 2.3.41, 2.3.42).

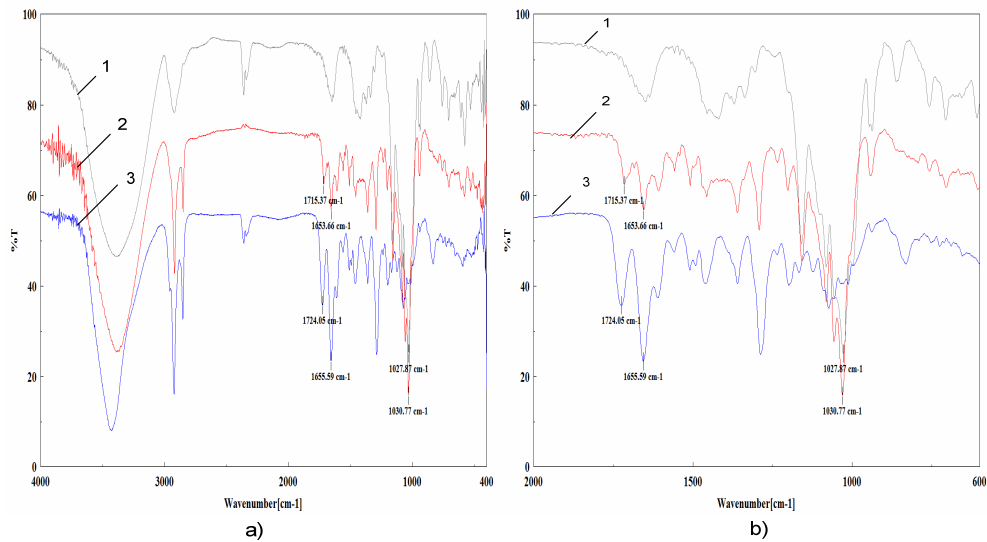


Figura 2.3.40. Suprapunerea spectrelor FT-IR ale (1) β -ciclodextrinei, (2) complexului bioconjugatului rutin palmitat/ β -ciclodextrină și (3) rutin palmitatului: (a) spectrul compușilor pe domeniul $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, (b) spectrul compușilor pe domeniul $2000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$

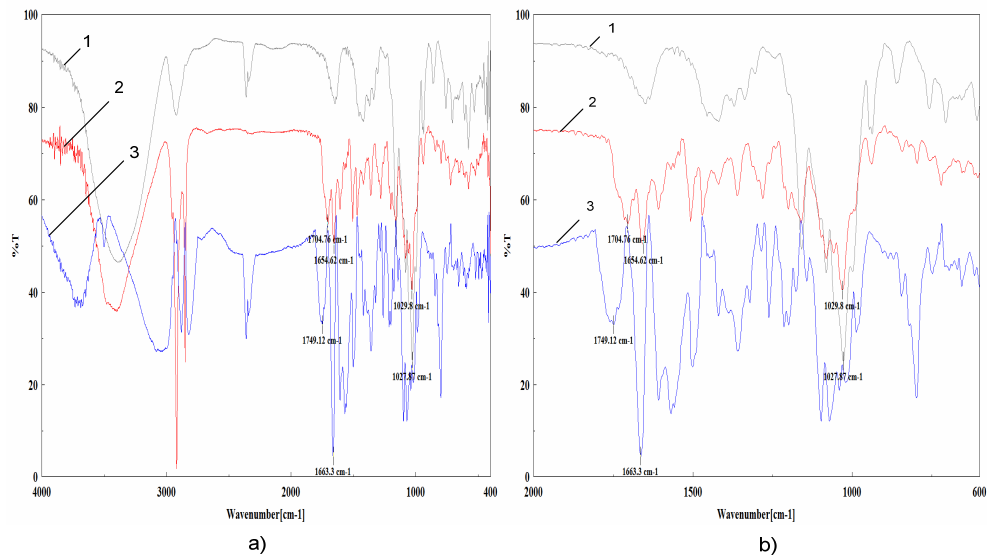


Figura 2.3.41. Suprapunerea spectrelor FT-IR ale (1) β -ciclodextrinei, (2) complexului bioconjugatului rutin stearatului/ β -ciclodextrină și (3) rutin stearatului: (a) spectrul compușilor pe domeniul $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, (b) spectrul compușilor pe domeniul $2000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$

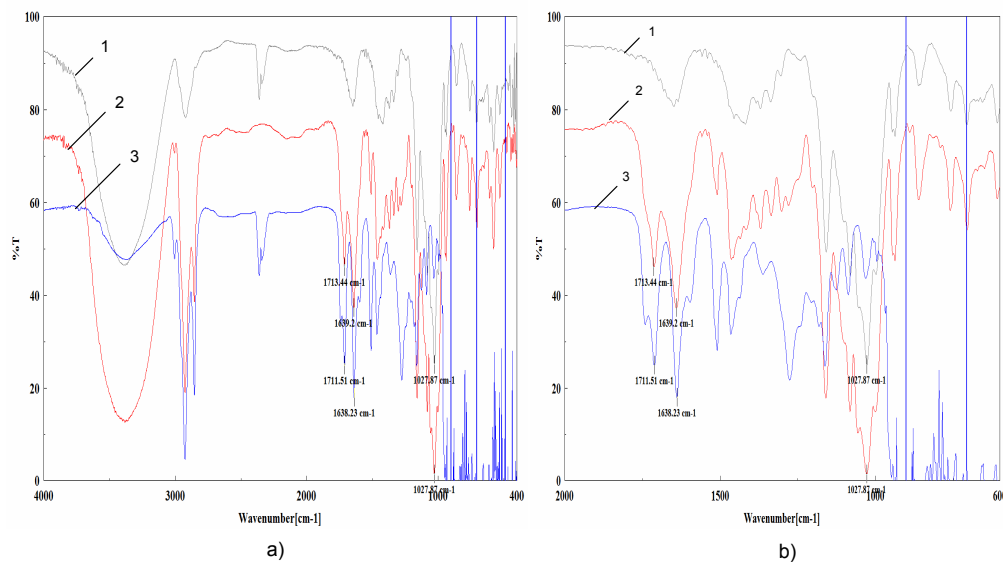


Figura 2.3.42. Suprapunerea spectrelor FT-IR ale (1) β -ciclodextrinei, (2) complexului bioconjugatului silibinin oleatului/ β -ciclodextrină și (3) silibinin oleatului: (a) spectrul compușilor pe domeniul $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, (b) spectrul compușilor pe domeniul $2000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$

2.3.3.2. Analiza prin calorimetrie cu scanare diferențială (DSC)

Analiza DSC a complexșilor bioconjuțați/ciclodextrine prezintă două aspecte importante care duc la confirmarea formării complexului: efectul endoterm corespunzător deshidratării este mai mic iar temperatura la care apare acesta este mai joasă, cel mai probabil datorită înlocuirii moleculelor de apă din cavitatea ciclodextrinei puternic legate, de către moleculele „oaspete”, flavonoide în cazul de față [190]. În figura 2.3.43, se poate observa scăderea energiei de deshidratare, în cazul complexului rutin decanoat/ β CD, la o valoare de 880 J/g și temperatura corespunzătoare efectului endoterm 86°C, comparativ cu valorile mai ridicate ale ciclodextrinei pure. Pe intervalul 120-270°C se poate observa apariția unui slab pic endoterm la 198°C care poate fi atribuit transformărilor structurale, iar efectele atât endo- cât și exoterme care apar peste 270°C corespund descompunerii ciclodextrinei și bioconjugatului.

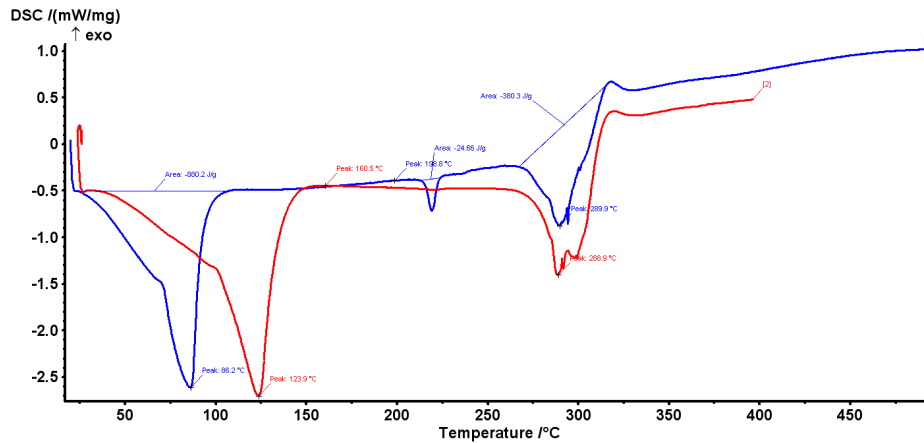


Figura 2.3.43. Suprapunerea curbelor DSC pentru complexul rutin-decanoat/ β CD (1) și β CD comercială (2) realizate pe intervalul de temperatură 20-500°C

Astfel, complexul rutin decanoat/ β CD are o energie de deshidratare de 880 J/g cu o temperatură a picului de 86,2°C (figura 2.3.43). În cazul complexului bioconjugatului rutin oleat/ β CD această temperatură este ceva mai scăzută (85,1°C) (figura 2.3.44).

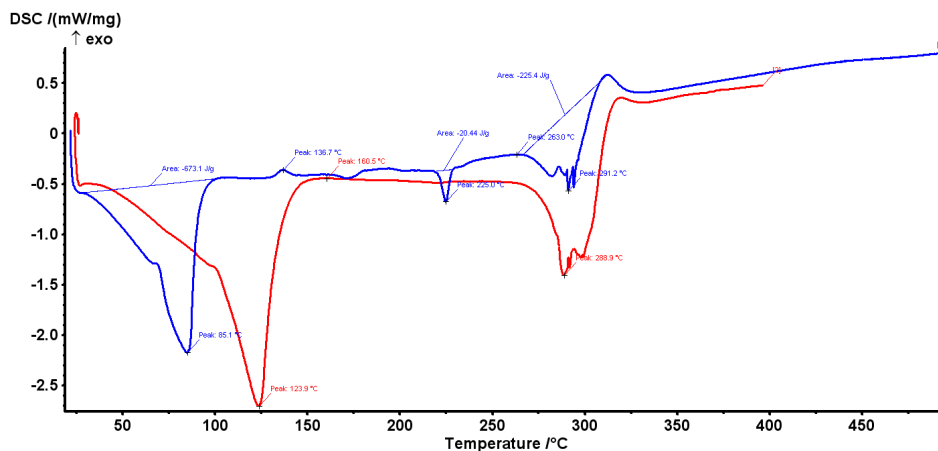


Figura 2.3.44. Curbele DSC (suprapuse) pentru complexul rutin oleat/ β CD (1) și β CD comercială (2), realizate pe intervalul de temperatură 20-500°C

În cazul nanoparticulelor bioconjugatilor silibininei cu β -ciclodextrină, analizele DSC conduc la rezultate similare celor din cazul bioconjugatilor rutinei, excepție făcând complexul bioconjugatului silibinin stearat/ β CD unde pot fi observate urme de acid gras (68,2°C), figura 2.3.45. Cele două picuri corespunzătoare deshidratării în cazul bioconjugatilor cu acizi grași nesaturați (corespunzătoare apei „de suprafață” și celei puternic legate) apar în cazul silibinin

oleat/ β CD la 57°C, respectiv 85°C iar pentru silibinin linoleat/ β CD la 80,1°C, respectiv 107,5°C (figura 2.3.46) [191].

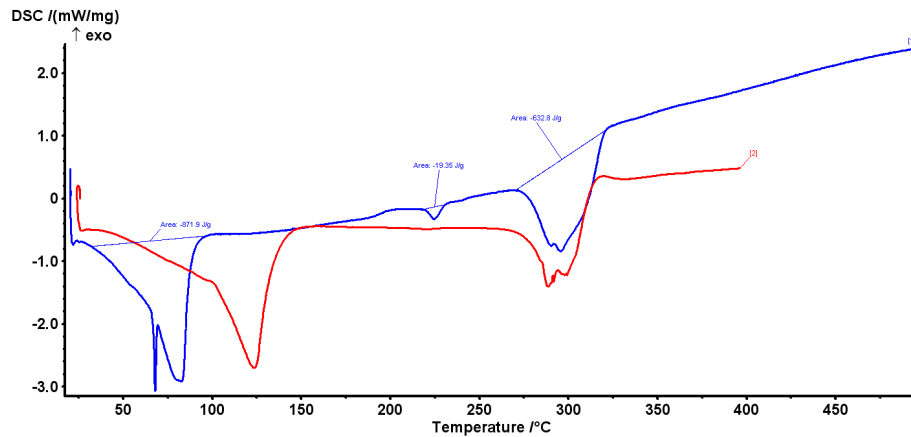


Figura 2.3.45. Suprapunerea curbelor DSC pentru complexul silibinin stearat/ β CD (1) și cea a β CD comerciale (2), realizate pe intervalul de temperatură 20-500°C

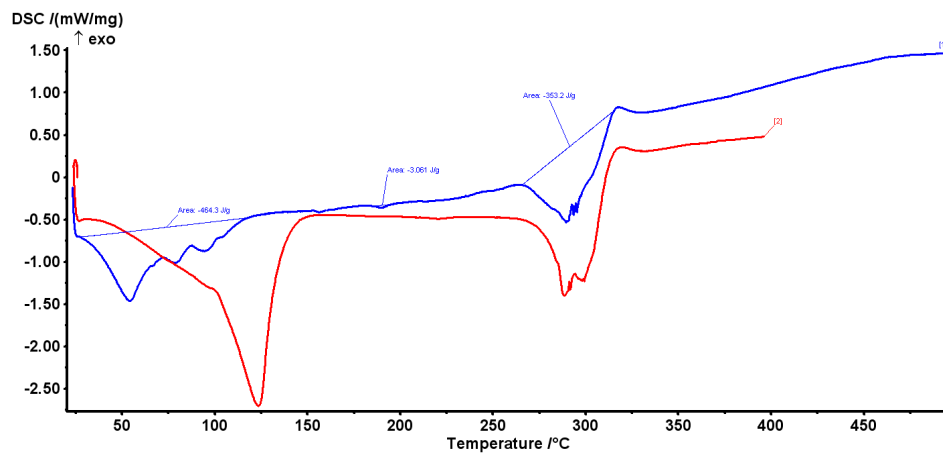


Figura 2.3.46. Suprapunerea curbelor DSC pentru complexul silibinin oleat/ β CD (1) și cea a β CD comerciale (2), realizate pe intervalul de temperatură 20-500°C

2.3.3.3. Studiul activității antioxidante a bioconjuțaților

Obiectivul prezentului studiu a fost de evaluare a activității antioxidante a bioconjuțaților (flavonoide/acizi grași) și complexilor acestora cu β -ciclodextrină, comparativ cu activitatea antioxidantă a flavonoidelor și complexilor acestora cu β -ciclodextrină, utilizând tot metoda captării radicalilor cu DPPH. Ca și în cazul evaluării activității antioxidante a flavonoidelor și complexilor acestora cu ciclodextrinele, s-a determinat variația activității antioxidante în timp pe trei

intervale de timp: 10-60s, 60-180s și 180-1800s, valorile fiind prezentate în tabelul 2.3.6 pentru rutină și derivații acesteia (bioconjuțați și complecșii corespunzătorii), respectiv 2.3.7 pentru silibinină și derivații acesteia (bioconjuțați și complecșii corespunzătorii).

Tabelul 2.3.6. Vitezele de reacție medii* și activitatea antioxidantă**

Nr. crt.	Compus	Viteza medie de reacție (1) ($\mu\text{M/s}$)	Viteza medie de reacție (2) ($\mu\text{M/s}$)	Viteza medie de reacție (3) ($\mu\text{M/s}$)	AAO (%)
1.	Rutina	-	0,175	0,006	82,3
2.	Rutin palmitat	0,056	0,044	0,019	92,6
3.	Rutin stearat	0,038	0,038	0,015	93,5
4.	Rutin oleat	0,343	0,018	0,001	92,1
5.	Rutin linoleat	0,075	0,066	0,020	93,3
6.	Complex rutina/ β CD	0,154	0,045	0,002	74
7.	Complex rutin palmitat/ β CD	0,552	0,075	0,025	86,2
8.	Complex rutin stearat/ β CD	0,494	0,063	0,038	80,9
9.	Complex rutin oleat/ β CD	0,133	0,077	0,022	87,8
10.	Complex rutin linoleat/ β CD	0,085	0,038	0,020	34,3

* Intervale pseudoliniare de evaluare a vitezelor de reacție medii

1: 10-60s pentru rutină, bioconjuțații rutinei și complecșii acestora cu ciclodextrine;

2: 60-180s pentru rutină, bioconjuțații rutinei și complecșii acestora cu ciclodextrine;

3: 180-1800s pentru rutină, bioconjuțații rutinei și complecșii acestora cu ciclodextrine;

** finală, după 1800s.

Variația activității antioxidante în timp pentru bioconjuțații rutinei cu acizi grași este net diferită comparativ cu rutina nederivatizată. Acest lucru se observă foarte bine din valorile vitezelor medii de reacție ale DPPH în prezența probelor studiate în special pentru ultimul interval de timp considerat: $\sim 0,02 \mu\text{M/s}$ pentru bioconjuțați și doar $0,006 \mu\text{M/s}$ pentru rutină (figura 2.3.47).

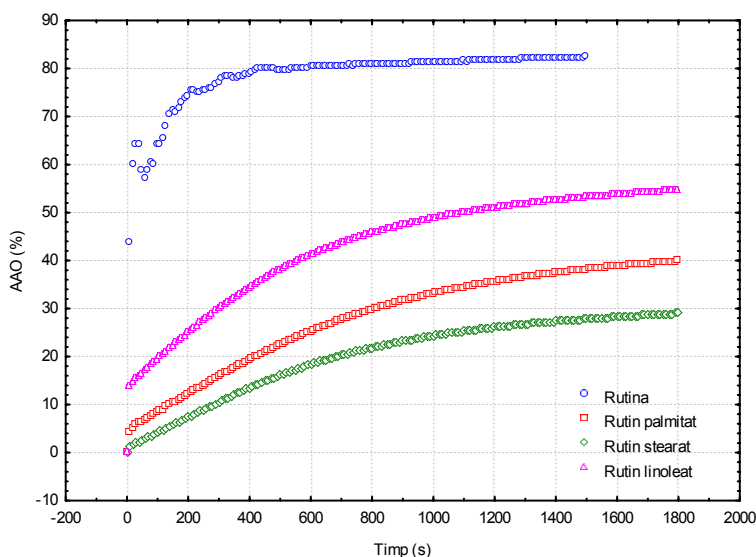


Figura 2.3.47. Reprezentarea variației activității antioxidante (AAO, %) în timp pentru probele de rutină, rutin palmitat, rutin stearat și rutin linoleat

Diferența este evidentă pentru complexii bioconjugărilor cu β -ciclodextrină: pe cel de-al doilea interval de timp vitezele de reacție sunt aproximativ duble ($\sim 0,07 \mu\text{M/s}$) comparativ cu bioconjugății neîncapsulați ($\sim 0,04 \mu\text{M/s}$); acest lucru se constată și pe cel de-al treilea interval de timp (de exemplu $0,04 \mu\text{M/s}$ pentru complexul rutin stearat/ βCD și doar $0,015 \mu\text{M/s}$ pentru biocompusul neîncapsulat), figurile 2.3.48 și 2.3.49.

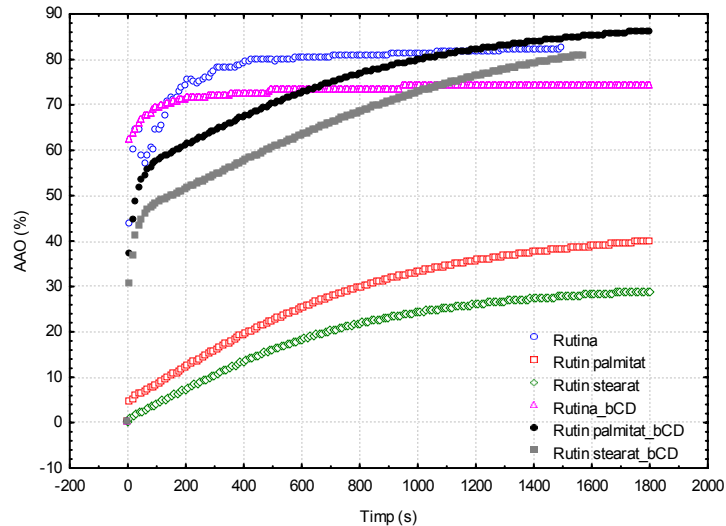


Figura 2.3.48. Reprezentarea variației activității antioxidante (AAO, %) în timp pentru probele de rutină, rutin palmitat și rutin stearat, suprapuse cu complexii acestora cu β -ciclodextrină

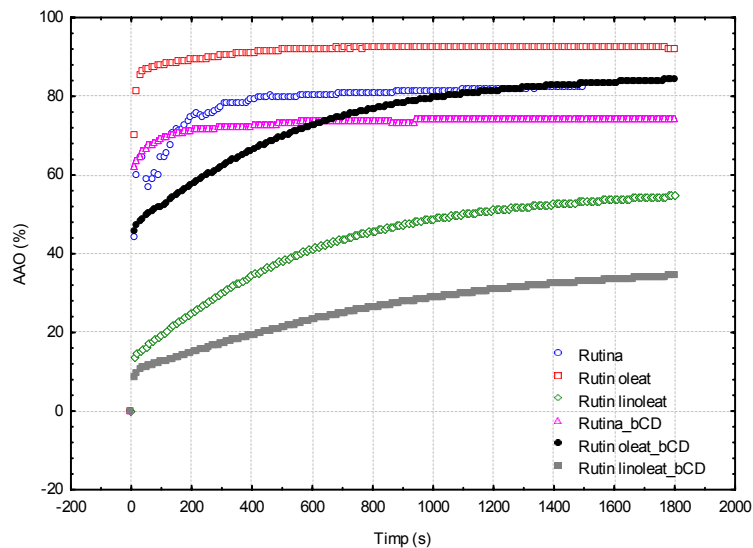


Figura 2.3.49. Reprezentarea variației activității antioxidante (AAO, %) în timp pentru probele de rutină, rutin oleat și rutin linoleat suprapuse cu cele ale complexurilor acestora cu β -ciclodextrină

Variația activității antioxidante în timp pentru bioconjugății silibininei cu acizi grași este diferită comparativ cu silibinina nederivatizată, valorile vitezelor medii de reacție ale DPPH sunt apropiate sau mai mici în prezența probelor studiate (figura 2.3.50).

Tabelul 2.3.7. Vitezele de reacție medii* și activitatea antioxidantă**

Nr. crt.	Compus	Viteza medie de reacție (1) ($\mu\text{M/s}$)	Viteza medie de reacție (2) ($\mu\text{M/s}$)	Viteza medie de reacție (3) ($\mu\text{M/s}$)	AAO (%)
1.	Silibinina	0,486	0,100	0,029	91
2.	Silibinin palmitat	0,269	0,090	0,014	31
3.	Silibinin behenoat	0,069	0,039	0,009	36,2
4.	Silibinin oleat	0,007	0,008	0,004	38,3
5.	Complex silibinina/ β CD	0,425	0,248	0,039	59,5
6.	Complex silibinin behenoat/ β CD	0,033	0,013	0,002	5
7.	Complex silibinin oleat/ β CD	0,028	0,010	0,004	15,4

* Intervale pseudoliniare de evaluare a vitezelor de reacție medii

1: 10-60s pentru silibinină, bioconjugății silibininei și complexii acestora cu ciclodextrine;

2: 60-180s pentru silibinină, bioconjugății silibininei și complexii acestora cu ciclodextrine;

3: 180-1800s pentru silibinină, bioconjugății silibininei și complexii acestora cu ciclodextrine;

** finală, după 1800s.

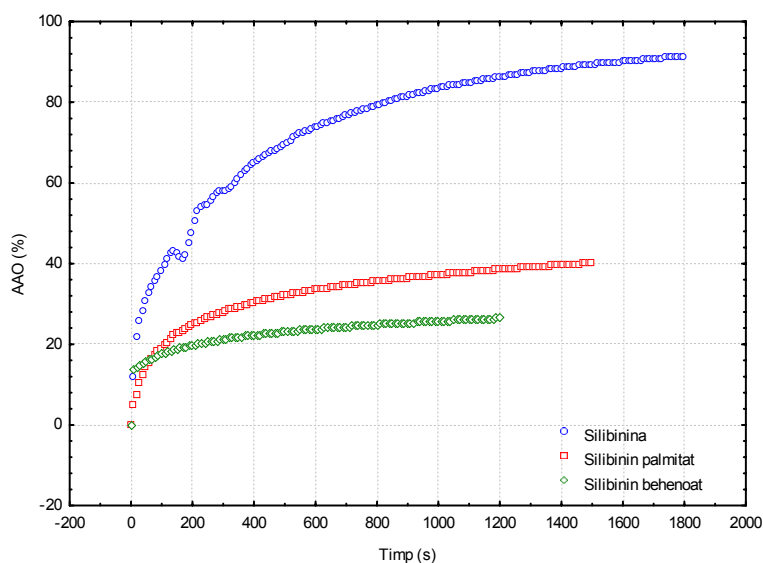


Figura 2.3.50. Reprezentarea variației activității antioxidante (AAO, %) în timp pentru probele de silibinină, silibinin palmitat și silibinin behenoat

Diferența este evidentă doar pentru complexii silibininei cu β -ciclodextrină: pe cel de-al doilea interval de timp vitezele de reacție sunt aproximativ triple ($\sim 0,25 \mu\text{M/s}$) comparativ cu silibinina neîncapsulată ($\sim 0,09 \mu\text{M/s}$); acest lucru se constată și pe cel de-al treilea interval de timp, $0,04 \mu\text{M/s}$ pentru complexul silibinină/ β CD și

doar $0,02 \mu\text{M/s}$ pentru compusul neîncapsulat). În figurile 2.3.51 și 2.3.52 se poate observa asemănarea dintre alura curbelor silibininei, bioconjugatului acesteia cu acid palmitic și complexul silibininei cu β -ciclodextrina. În cazul bioconjugatilor silibininei cu acizii oleic și behenic și complexilor corespunzători cu β -ciclodextrină, rezultatele au fost neconcludente.

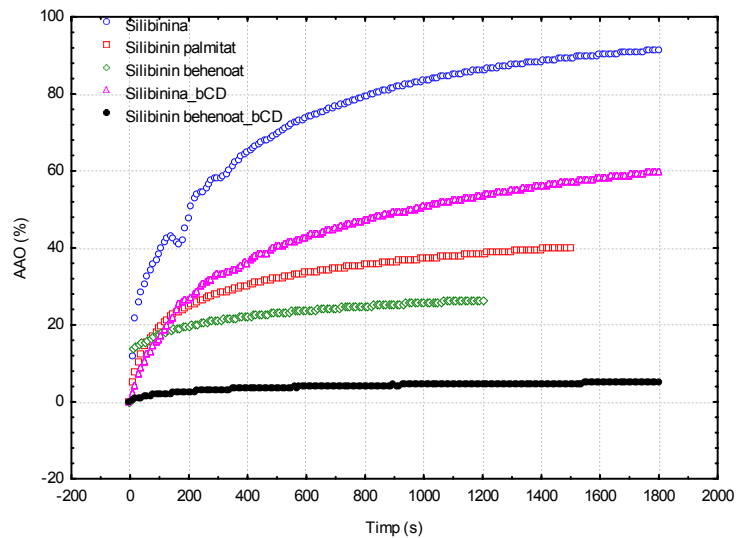


Figura 2.3.51. Reprezentarea variației activității antioxidante (AAO, %) în timp pentru probele de silibinină, silibinin palmitat și silibinin behenoat suprapuse cu cele ale complexelor acestora cu β -ciclodextrină

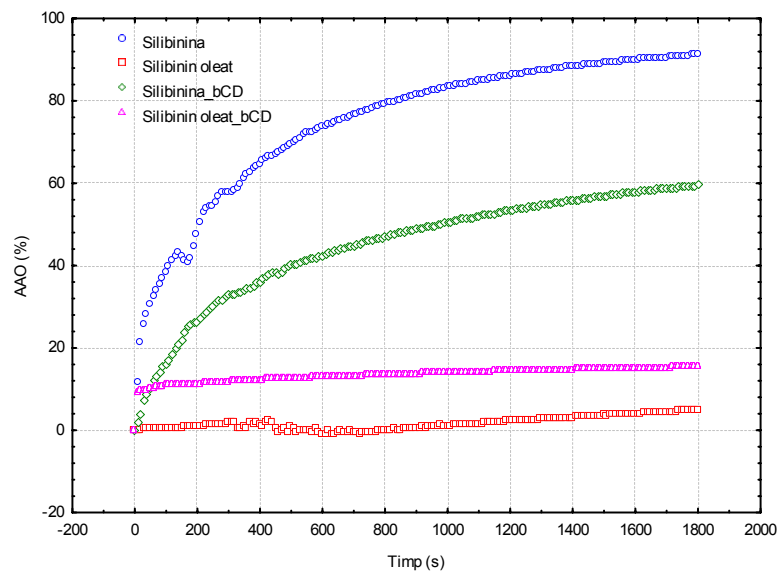


Figura 2.3.52. Reprezentarea variației activității antioxidante (AAO, %) în timp pentru probele de silibinină și silibinin oleat suprapuse cu cele ale complexelor acestora cu β -ciclodextrină

2.3.3.4. Studiu asupra transferului prin membrană

Transferul prin membrane semipermeabile a biocompușilor și complexilor corespunzători cu ciclodextrine, care poate fi util pentru evaluarea comportării acestora în formulări farmaceutice sau în procese de separare, a fost modelată folosind celofanul (celuloză regenerată, cu caracter preponderent hidrofil), una dintre cele mai comune membrane.

Monitorizarea transferului prin membrană a flavonoidelor, bioconjugăților cu acizi grași, atât neîncapsulați cât și sub formă de complecși ai ciclodextrinelor, s-a efectuat spectrofotometric, la lungimea de undă de 362 nm, determinându-se variația concentrației de biocompus în timp (în general până la 5-6 ore, respectiv cu verificarea concentrației de biocompus și după 12 ore de transfer în unele cazuri). S-au utilizat soluții de diverse polarități în compartimentul de transfer și anume soluție de clorură de sodiu 0,9% (ser fiziologic) și soluție alcoolică (etanol 60%), de polaritate mai redusă.

În general, alura curbelor care redau variația concentrației în timp a fost logaritmică, sau liniară pe intervalele mai mici de timp. Acest lucru se constată în special în cazul complecșilor evaluați în ser fiziologic, probabil datorită unei solubilizări și compatibilități mai bune a oligozaharidelor ciclice (ciclodextrinelor) cu structura celulozică a membranei. Pentru transferul în soluții alcoolice alura curbelor a fost exponențială pe domeniul de monitorizare.

Dacă se compară variația concentrației de rutină la transferul prin membrană de celofan din soluții ce conțin rutină sau complecși ai acesteia cu α CD sau β CD, se constată că alura curbelor este similară, complexul cu α CD având comportare mai apropiată de cazul rutinei necomplexate. Fenomenul poate fi explicat prin faptul că rutina este incomplet/parțial încapsulată (probabil reținută mecanic în complexul solid cu α CD și eliberată rapid la dizolvare în fază apoasă) (figura 2.3.53).

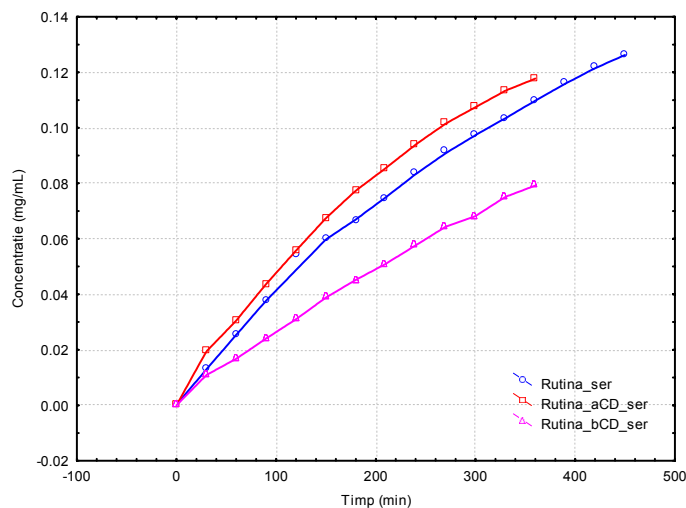


Figura 2.3.53. Variația concentrației de rutină în ser fiziologic (mg/mL) funcție de timp la transferul prin membrană de celofan, din soluții conținând rutină și complecși ai acesteia cu α CD și β CD

Complecșii bioconjuțaților rutinei cu β CD prezintă o solubilitate extrem de scăzută în soluția de ser fiziologic și de aceea s-a încercat evaluarea transferului prin membrană a acestora în soluție alcoolică de 60%. Comportarea la transferul în soluție alcoolică a complexului bioconjugatului rutin palmitat/ β CD este comparabilă cu cea a complexului rutină/ β CD, dar efectuată în soluție de ser fiziologic. În figura 2.3.54 sunt redată variațiile concentrației complexului rutinei/ β CD, a complexului rutin palmitat/ β CD și a complexului rutin linoleat/ β CD în soluție alcoolică, la lungimea de undă de 362 nm. O comparație a comportării rutinei, bioconjuțaților cu acizi grași și complecșilor corespunzători la transferul prin membrană de celofan poate fi observată în figura 2.3.55.

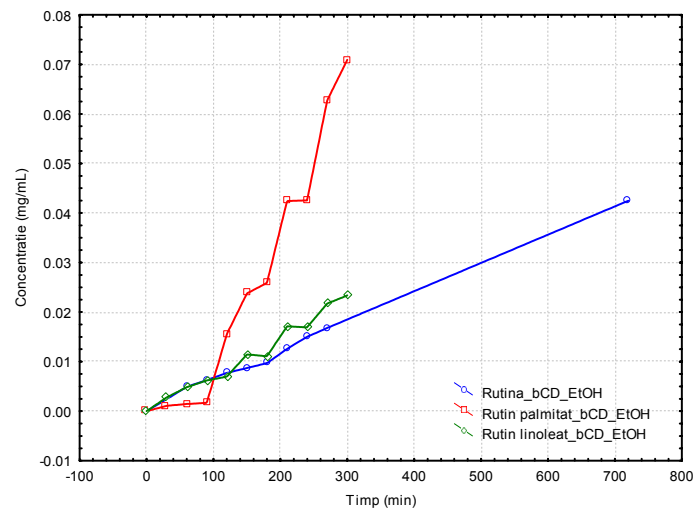


Figura 2.3.54. Variația concentrației de rutină și bioconjuțați ai rutinei în etanol 60% (mg/mL) funcție de timp la transferul prin membrană de celofan din soluții conținând complecși ai rutinei și bioconjuțaților rutin palmitat și rutin linoleat cu β CD

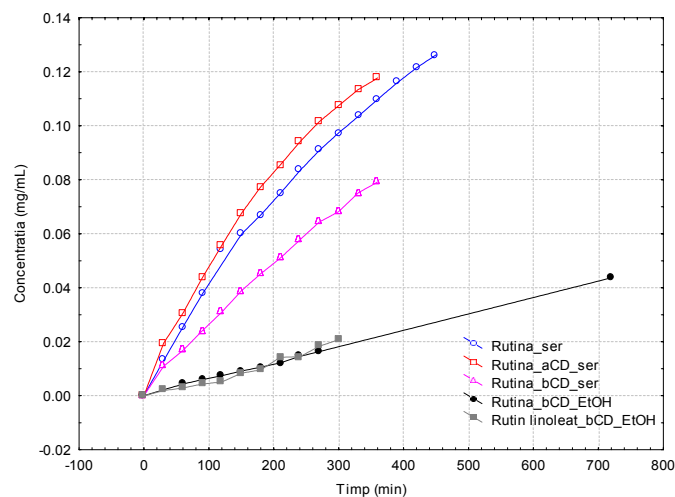


Figura 2.3.55. Variația concentrației de rutină și bioconjuțaților rutinei în soluție etanolică și ser fiziologic (mg/mL) funcție de timp, la transferul prin membrană de celofan din soluții conținând rutină, complecși ai acesteia cu α CD și β CD și complexul bioconjugatului rutin linoleat cu β CD

În cazul silibininei, bioconjugăților cu acid oleic și complexilor corespunzători cu β CD, transferul prin membrană în soluții hidrofile (ser fiziologic) nu a fost semnificativ, în timp ce în soluții alcoolice concentrația biocompușilor studiați a fost sensibil mai mare.

2.3.4. Concluzii parțiale

În urma studiilor efectuate privind micro/nanoîncapsularea flavonoidelor agliconice (crisina, naringenina, hesperetina, quercetina), flavonoidelor glicozilate (rutina) și flavonolignanilor (silibinina), acizilor grași saturați (decanoic, palmitic, stearic, arahidic și behenic) și nesaturați (oleic și linoleic) și bioconjugăților flavonoide/acizi grași cu α - și β -ciclodextrină și analiza complexilor obținuți, se pot trasa următoarele concluzii:

- S-au obținut doisprezece sisteme supramoleculare ciclodextrine/flavonoide, paisprezece sisteme supramoleculare ciclodextrine/acizi grași și zece sisteme supramoleculare bioconjugăți/ciclodextrine prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă (care să permită stabilirea echilibrului de asociere-disociere) cu randamente de recuperare bune.
- Cu ajutorul spectroscopiei FT-IR s-a confirmat în toate cazurile prezența în complexii formați a grupărilor carbonil și hidroxil fenolic din compușii de plecare și prezența benzii caracteristice β -ciclodextrinei, ν_{COC} de la 1027 cm^{-1} .
- Analizele DSC ale complexilor obținuți prezintă două aspecte importante care duc la confirmarea formării complexului: efectul endoterm corespunzător pierderii apei este mai mic iar temperatura la care apare acesta este mai joasă, comparativ cu ciclodextrina pură, ceea ce confirmă înlocuirea moleculelor de apă de către moleculele „oaspete”, flavonoide, acizi grași și bioconjugăți.
- Analizele SEM au arătat în majoritatea cazurilor modificări ale dimensiunilor și formelor complexilor analizați comparativ cu ciclodextrinele comerciale și formele acestora recristalizate din sistem etanol-apă.
- Activitatea antioxidantă finală este semnificativă în cazul flavonoidelor, dar o viteză de reacție a DPPH ne semnificativă pe intervalul de timp final arată că nu mai există efect antioxidant. În cazul bioconjugăților, activitatea antioxidantă finală este comparabilă cu cea a flavonoidelor dar viteza de reacție este dublă, triplă sau, în unele cazuri chiar și de zece ori mai mare pe ultimul interval de timp față de flavonoidele pure (fapt ce confirmă existența unei eliberări controlate pentru compușii cu activitate antioxidantă).
- Monitorizarea transferului prin membrană a flavonoidelor, bioconjugăților cu acizi grași, atât neîncapsulați cât și sub formă de complecși ai ciclodextrinelor, a arătat că rutina și complexii acesteia cu cele două ciclodextrine prezintă un transfer bun în soluția de ser fiziologic, în timp ce bioconjugății acesteia și complexii corespunzători

cu β CD prezintă un transfer mai bun în soluție alcoolică, probabil datorită solubilității mai bune a bioconjugatilor în această soluție. În cazul silibininei, bioconjugatilor cu acid oleic și complecșilor corespunzători cu β CD, transferul prin membrană în soluții hidrofile (ser fiziologic) nu a fost semnificativ, în timp ce în soluție alcoolică concentrația biocompușilor a fost mai ridicată și cu un transfer mai bun în timp.

3. PARTEA EXPERIMENTALĂ

3.1. Materiale utilizate

Enzimele: *Candida antarctica* imobilizată (Novozyme 435), *Pseudomonas fluorescens* (Amano Lipase AK, Aldrich), *Pseudomonas cepacia* (Amano Lipase PS, Aldrich), Lipozyme RM, *Candida cylindracea* (Sigma), *Aspergillus niger* (BioChemika) și *Candida antarctica* (C-Lecta, CalB).

Flavonoidele: crisina (Sigma Aldrich), naringenina (Sigma Aldrich), hesperetina (Sigma Aldrich), quercetina (Fluka), rutina (Fluka) și silibinina (Sigma Aldrich).

Acizii grași saturați și nesaturați: acid decanoic (Fluka, $\geq 99\%$), acid palmitic (Fluka, $\geq 99\%$), acid stearic (Fluka, $\geq 99,5\%$), acid oleic (Fluka, $> 99\%$), acid linoleic (Fluka, $> 99\%$), acid arahidic (Sigma Aldrich, analytical standard) și acid behenic (Sigma Aldrich, analytical standard).

Ciclodextrinele: α - și β -ciclodextrină (puritate $> 99\%$, Merck&Co, Inc.).

Solvenții: acetona (Merck, 99,8%), acetonitril (Merck, HPLC grade), *tert*-butanol (Chimopar), hexan (Riedel de Haën, HPLC grade), cloroform (Merck, 99,8%), metanol (Merck, 99,9%), acetat de etil (Chimopar), etanol (Chimopar, 96%) și apa distilată.

Bioconjuugații: rutin decanoat, rutin palmitat, rutin stearat, rutin oleat, rutin linoleat și silibinin stearat, silibinin behenoat, silibinin oleat și silibinin linoleat.

3.2. Metoda generală de obținere a bioconjuugaților

Pentru obținerea bioconjuugaților flavonoide/acizi grași s-a utilizat metoda esterificării enzimatică. Sinteza propriu-zisă a avut loc într-un incubator, prevăzut cu agitator orbital, în care s-a lucrat în microreactoare de 10-50 mL. S-au cântărit la balanța analitică flavonoidele și acizii grași, după care s-a adăugat solvent, uscat în prealabil cu site moleculare. Masa de reacție s-a supus agitării magnetice, la temperatura de 50°C, timp de 10-12 ore. Inițierea esterificării enzimatică s-a realizat odată cu adăugarea în masa de reacție a enzimei, urmată de introducerea la incubator, la o temperatură de 50°C, 250 rpm, timp de 120 ore. În vederea îndepărtării apei formate pe parcursul reacției, la 24 de ore de la adăugarea enzimei, în fiecare microreactor au fost introduse site moleculare.

Biosintezele au fost realizate inițial pentru a obține bioconjuugați ai rutinei cu acizii grași decanoic, palmitic, oleic și linoleic în trei tipuri de solvenți, tabelul 3.1, fără îndepărtarea apei din mediul de reacție.

Tabelul 3.1. Esterificarea enzimatică a rutinei în acetona, *terț*-butanol și acetonitril, fără îndepărtarea apei din sistem

Nr. crt.	Produs	masa _{flavonoida} (g)	masa _{acid} (g)	Solvent	Volum _{solvent} (mL)	masa _{enzima} (g)
1.	Rutin palmitat	0,051	0,106	acetona	10,0	0,10
2.	Rutin decanoat	0,051	0,072	acetona		
3.	Rutin oleat	0,051	0,116	acetona		
4.	Rutin linoleat	0,051	0,119	acetona		
5.	Rutin palmitat	0,051	0,106	<i>terț</i> -butanol		
6.	Rutin decanoat	0,050	0,072	<i>terț</i> -butanol		
7.	Rutin oleat	0,050	0,116	<i>terț</i> -butanol		
8.	Rutin linoleat	0,051	0,116	<i>terț</i> -butanol		
9.	Rutin palmitat	0,051	0,105	acetonitril		
10.	Rutin decanoat	0,051	0,072	acetonitril		
11.	Rutin oleat	0,050	0,116	acetonitril		
12.	Rutin linoleat	0,050	0,118	acetonitril		

Studiul influenței apei din mediul de reacție a presupus elaborarea de biosinteze atât în absență, cât și în prezență de agent deshidratant. În cazul biosintezelor în prezența agenților deshidranți s-a lucrat cu site moleculare de 4Å (tabelul 3.2).

Tabelul 3.2. Esterificarea enzimatică a rutinei cu/fără site moleculare, cu rapoarte molare flavonoidă/acid gras de 1/3, respectiv 1/5, în acetona

Nr. crt.	Produs	masa _{flavonoida} (g)	masa _{acid} (g)	Volum _{solvent} (mL)	masa _{enzima} (g)
1.	Rutin palmitat	0,123	0,154	20,0	0,20
2.	Rutin decanoat	0,123	0,105		
3.	Rutin oleat	0,124	0,168		
4.	Rutin linoleat	0,123	0,174		
5.	Rutin palmitat (sm)	0,122	0,167		
6.	Rutin palmitat (sm, 1/5)	0,125	0,257		

Condițiile optime de biosinteză au fost stabilite ca fiind: acetona solvent, raport molar flavonoidă/acid gras de 1/3, adăugarea de agent deshidratant (site moleculare) în mediu de reacție, tabel 3.3.

Tabelul 3.3. Esterificarea enzimatică rutinei și silibininei în condiții optime: raport molar 1/3, adaos de site moleculare, temperatură 50°C, solvent acetona

Nr. crt.	Produs	masa _{flavonoida} (g)	masa _{acid} (g)	Volum _{solvent} (mL)	masa _{enzima} (g)	masa _{site mol} (g)
1.	Rutin decanoat	0,153	0,131	25	0,250	3,75
2.	Rutin palmitat	0,153	0,192	25	0,250	3,75
3.	Rutin stearat	0,154	0,215	25	0,250	3,75
4.	Rutin oleat	0,154	0,224	25	0,250	3,75
5.	Rutin linoleat	0,153	0,208	25	0,250	3,75
6.	Silibinin decanoat	0,074	0,081	15	0,150	2,25
7.	Silibinin palmitat	0,073	0,116	15	0,150	2,25
8.	Silibinin stearat	0,072	0,128	15	0,150	2,25
9.	Silibinin oleat	0,074	0,134	15	0,150	2,25
10.	Silibinin linoleat	0,073	0,124	15	0,150	2,25

Pentru esterificarea flavonoidelor agliconice crisină, naringenină și hesperetină, biosintezele au fost realizate în prezența a diferite enzime, în acetonă și hexan (tabel 3.4).

Tabelul 3.4. Esterificarea enzimatică a flavonoidelor agliconice, în hexan (1-6) și acetonă (7-18)

Nr. crt.	Flavonoida	Acid gras	Enzima	masa _{flavonoida} (g)	masa _{acid} (g)	Volum _{solvent} (mL)
1.	Crisina	Ac. stearic	AK	0,026	0,029	1
2.	Crisina	Ac. stearic	PS	0,026	0,029	1
3.	Crisina	Ac. stearic	Lipozyme	0,025	0,029	1
4.	Crisina	Ac. stearic	C.C.	0,025	0,028	1
5.	Crisina	Ac. stearic	A.n.	0,026	0,028	1
6.	Crisina	Ac. stearic	C-Lecta	0,025	0,029	1
7.	Crisina	Ac. stearic	AK	0,025	0,028	1
8.	Crisina	Ac. stearic	PS	0,025	0,029	1
9.	Crisina	Ac. stearic	Lipozyme	0,025	0,028	1
10.	Crisina	Ac. stearic	C.C.	0,025	0,029	1
11.	Crisina	Ac. stearic	A.n.	0,026	0,029	1
12.	Crisina	Ac. stearic	C-Lecta	0,025	0,028	1
13.	Naringenina	Ac. palmitic	Novozyme	0,054	0,513	10
14.	Hesperetina	Ac. palmitic	Novozyme	0,061	0,513	10
15.	Naringenina	Ac. stearic	Novozyme	0,054	0,569	10
16.	Hesperetina	Ac. stearic	Novozyme	0,060	0,569	10
17.	Naringenina	Ac. oleic	Novozyme	0,054	0,565	10
18.	Hesperetina	Ac. oleic	Novozyme	0,060	0,565	10

Pentru esterificarea flavonoidelor agliconice quercetină, naringenină, hesperetină și silibinină, s-au folosit lipazele PS, AK și An și s-a lucrat cu solvenții acetonă și acetonitril, atât în prezență de site moleculare, cât și în absența acestor agenți deshidratanți (tabel 3.5).

Tabelul 3.5. Esterificarea enzimatică a flavonoidelor agliconice cu acid palmitic în acetonitril (1-12, 25-27) și acetonă (13-24, 28-30), cu/fără site moleculare

Nr. crt.	Flavonoida	Enzima	masa _{flavonoida} (g)	masa _{acid} (g)	Volum _{solvent} (mL)	masa _{enzima} (g)
1.	Quercetina	PS	0,006	0,016	2,0	0,02
2.	Quercetina	AK	0,006	0,016		0,02
3.	Quercetina	An	0,006	0,016		0,02
4.	Naringenina	PS	0,005	0,015		0,02
5.	Naringenina	AK	0,006	0,016		0,02
6.	Naringenina	An	0,005	0,016		0,02
7.	Hesperetina	PS	0,007	0,017		0,02
8.	Hesperetina	AK	0,007	0,016		0,02
9.	Hesperetina	An	0,006	0,016		0,02
10.	Silibinina	PS	0,009	0,016		0,02
11.	Silibinina	AK	0,009	0,016		0,02
12.	Silibinina	An	0,010	0,017		0,02
13.	Quercetina	PS	0,006	0,016		0,02
14.	Quercetina	AK	0,006	0,016		0,018
15.	Quercetina	An	0,006	0,016		0,02
16.	Naringenina	PS	0,005	0,015		0,02
17.	Naringenina	AK	0,006	0,015		0,018
18.	Naringenina	An	0,006	0,015		0,025
19.	Hesperetina	PS	0,007	0,015		0,02

20.	Hesperetina	AK	0,007	0,015	0,017
21.	Hesperetina	An	0,006	0,015	0,024
22.	Silibinina	PS	0,010	0,015	0,02
23.	Silibinina	AK	0,009	0,016	0,019
24.	Silibinina	An	0,010	0,016	0,02
25.	Quercetina (sm)	PS	0,006	0,016	0,02
26.	Quercetina (sm)	AK	0,006	0,015	0,017
27.	Quercetina (sm)	An	0,006	0,016	0,02
28.	Quercetina (sm)	PS	0,006	0,017	0,02
29.	Quercetina (sm)	AK	0,006	0,015	0,016
30.	Quercetina (sm)	An	0,008	0,017	0,018

3.3. Modelarea moleculară

3.3.1. Materiale și metode

Modelarea moleculară pentru compușii flavonoidici și ciclodextrine s-a realizat cu ajutorul pachetului de programe HyperChem 7.02 (programul MM+), folosindu-se un gradient RMS de 0.01 kcal/mol. Pentru optimizare s-a utilizat algoritmul Polak-Ribiere cu gradient conjugat.

Analiza conformațională. Deoarece structurile sunt în general flexibile, în special restul de acid gras, numărul unghiurilor de torsiune necesare a fi variate a fost mare. Analiza conformațională s-a realizat cu programul Conformational Search din pachetul de programe HyperChem 7.02. 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: 0.01 kcal/mol;
- număr maxim de iterații: 1000;
- număr maxim de optimizări: 1000;
- număr de conformații maxim reținut: 100.

Docarea bioconjugăților în ciclodextrine. S-a realizat mai întâi modelarea moleculară și analiza conformațională a α -, β - și γ -ciclodextrinei tot prin mecanică moleculară; structurile inițiale au fost construite în concordanță cu datele de raze X din literatura de specialitate. După construcția structurii ciclodextrinelor, acestea au fost optimizate prin metoda prezentată, cu obținerea unei conformații cu minim energetic local, cea mai stabilă conformație fiind utilizată în continuare în experimentele de docare.

Docarea biocompușilor în conformație de energie minimă în α -, β - și γ -ciclodextrină s-a realizat prin poziționarea structurii bioconjugăților cu partea hidrofobă, mai puțin încărcată steric 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 biocompusului cu restul hidrofob spre baza mare a ciclodextrinei, ce conține grupările hidroxil secundare.

3.4. Metoda generală de obținere a compușilor de incluziune

Obținerea compușilor de incluziune (sisteme supramoleculare) s-a realizat prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă. Astfel, s-au cântărit la balanța analitică masele de α - sau β -ciclodextrină corespunzătoare unei molarități de 1:1, s-au dizolvat în apă, s-au introdus într-un microreactor prevăzut cu termostatare, refrigerent ascendent și agitare magnetică, și s-au încălzit la temperatura de 50°C . Peste soluția de ciclodextrină s-a introdus în picături, în decurs de 15 minute, soluție alcoolică de flavonoidă, acid gras sau bioconjugat (molecule „oaspete”), raport molar „oaspete”:ciclodextrină de 1:1. 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 timp de 15 minute, pentru perfectarea reacției, apoi se răcește lent, tot sub agitare, în 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. Se determină randamentul de recuperare a complexelor ca raport dintre masa de produs obținută și suma maselor de biocompuși și α - sau β -ciclodextrină utilizate la nanoîncapsulare (tabelele 3.6-3.10).

Tabelul 3.6. Complexarea flavonoidelor cu α -ciclodextrină în sistem etanol-apă

Nr. crt.	Compus	masa _{αCD} (g)	masa _{flav} (g)	Volum _{EtOH} (mL)	Volum _{apă} (mL)	masa _{probă} (g)
1.	Naringenina/ α CD	0,541	0,137	2	4	0,503
2.	Hesperetina/ α CD	0,542	0,152	3	4	0,570
3.	Quercetina/ α CD	0,541	0,151	3	4	0,566
4.	Crisina/ α CD	0,542	0,128	3	4	0,547
5.	Rutina/ α CD	0,540	0,306	3	4	0,669
6.	Silibinina/ α CD	0,540	0,242	2	4	0,648
7.	α CD	0,540		2	4	0,429

Tabelul 3.7. Complexarea flavonoidelor cu β -ciclodextrină în sistem etanol-apă

Nr. crt.	Compus	masa $_{\beta\text{CD}}$ (g)	masa $_{\text{flav}}$ (g)	Volum $_{\text{apă}}$ (mL)	Volum $_{\text{EtOH}}$ (mL)	masa $_{\text{probă}}$ (g)
1.	Naringenina/ βCD	0,672	0,137	4	2	0,547
2.	Hesperetina/ βCD	0,672	0,152	4	3	0,578
3.	Quercetina/ βCD	0,672	0,151	4	3	0,597
4.	Crisina/ βCD	0,672	0,128	4	3	0,577
5.	Rutina/ βCD	0,672	0,306	4	3	0,686
6.	Silibinina/ βCD	0,671	0,241	4	2	0,688
7.	βCD	0,671		4	2	0,551

Tabelul 3.8. Complexarea acizilor grași cu α -ciclodextrină în sistem etanol-apă

Nr. crt.	Compus	masa $_{\alpha\text{CD}}$ (g)	masa $_{\text{acid}}$ (g)	Volum $_{\text{apă}}$ (mL)	Volum $_{\text{EtOH}}$ (mL)	masa $_{\text{probă}}$ (g)
1.	Acid decanoic/ αCD	0,542	0,086	4	2	0,516
2.	Acid palmitic/ αCD	0,541	0,129	4	2	0,521
3.	Acid stearic/ αCD	0,541	0,143	4	3	0,618
4.	Acid oleic/ αCD	0,542	0,140	4	2	0,514
5.	Acid linoleic/ αCD	0,541	0,143	4	2	0,562
6.	Acid arahidic/ αCD	0,540	0,157	4	3	0,535
7.	Acid behenic/ αCD	0,540	0,171	4	3	0,540

Tabelul 3.9. Complexarea acizilor grași cu β -ciclodextrină în sistem etanol-apă

Nr. crt.	Compus	masa $_{\beta\text{CD}}$ (g)	masa $_{\text{acid}}$ (g)	Volum $_{\text{apă}}$ (mL)	Volum $_{\text{EtOH}}$ (mL)	masa $_{\text{probă}}$ (g)
1.	Acid decanoic/ βCD	0,671	0,086	4	2	0,593
2.	Acid palmitic/ βCD	0,672	0,129	4	2	0,634
3.	Acid stearic/ βCD	0,671	0,143	4	2	0,465
4.	Acid oleic/ βCD	0,672	0,141	4	2	0,621
5.	Acid linoleic/ βCD	0,672	0,141	4	2	0,664
6.	Acid arahidic/ βCD	0,671	0,157	4	3	0,528
7.	Acid behenic/ βCD	0,672	0,171	4	2	0,468

Tabelul 3.10. Complexarea bioconjugatilor cu β -ciclodextrină

Nr. crt.	Compus	masa $_{\beta\text{CD}}$ (g)	masa $_{\text{ester}}$ (g)	Volum $_{\text{apă}}$ (mL)	Volum $_{\text{EtOH}}$ (mL)	masa $_{\text{probă}}$ (g)
1.	Rutin decanoat/ βCD	0,070	0,040	1	1	0,048
2.	Rutin palmitat/ βCD	0,031	0,019	1	1	0,037
3.	Rutin stearat/ βCD	0,040	0,025	1	1	0,038
4.	Rutin oleat/ βCD	0,072	0,048	1	1	0,096
5.	Rutin linoleat/ βCD	0,108	0,070	1	1	0,035
6.	Silibinin palmitat/ βCD	1,342	0,720	4	2	1,847
7.	Silibinin stearat/ βCD	0,040	0,025	1	1	0,018
8.	Silibinin behenoat/ βCD	0,050	0,034	1	1	0,050
9.	Silibinin oleat/ βCD	0,178	0,099	1	1	0,201
10.	Silibinin oleat/ βCD MeOH	0,060	0,034	1	1	0,036
11.	Silibinin linoleat/ βCD	0,075	0,041	1	1	0,059

3.5. Metode de analiză

3.5.1. Analiza concentrației de apă prin titrare Karl Fischer (KFT)

Titrarea Karl Fischer pentru determinarea conținutului de apă din probe 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 și Component 2: Solvent apă, ce conține soluție metanolică de imidazol și dioxid de sulf). Titrul soluției de iod a fost determinat înainte de fiecare set de analize utilizând Water standard 1% apă. Cantitățile de probă luate în lucru au fost ~0.2g. Pentru analiza KFT s-au setat următorii parametri: *I* (pol) 50μA, „end point” 250mV, viteza maximă de titrare 5mL/min, panta curbei de titrare a fost utilizată drept criteriu de stop, cu o valoare a pantei de 15 μl/min. Timpul de extracție a fost de 300s, toate determinările realizându-se cel puțin în duplicat.

3.5.2. Analiza TLC

Formarea produșilor a fost monitorizată calitativ, pe tot parcursul desfășurării biosintezei, prin cromatografie în strat subțire (TLC, thin layer chromatography), pe plăcuțe de silica gel 60 F254 (Merck). S-a folosit ca eluent amestecul cloroform/metanol/apă (80/20/0.3, v/v/v, solvenți pentru cromatografie, Merck), pentru flavonoidele glicozilate, respectiv a amestecului cloroform/acetat de etil (60/40, v/v, solvenți pentru cromatografie, Merck), pentru flavonoidele agliconice și flavonolignani. Atât flavonoidele, cât și esterii acestora au fost vizualizați și identificați la lumină ultravioletă.

3.5.3. Analiza HPLC

Analiza calitativă (în unele cazuri și cantitativă) a probelor s-a realizat cu ajutorul cromatografiei de lichide de înaltă presiune, HPLC (high-pressure liquid chromatography). Toate probele s-au analizat cu cromatograful HPLC Jasco, echipat cu pompă cuaternară (PU-2080 Plus), unitate de amestecare (LG-2080), degazor (DG-2080-54 4), detector spectrofotometric (UV-2070 Plus Intelligent UV/VIS Detector) cu posibilitate de achiziție de date Jasco ChromPass Chromatography Data System ver. 1.7.403.1, interfață LC-Net II / ADC. Condițiile de lucru au fost: coloană Nucleosil 100 C-18, 250 × 4.6 mm × mm, diametrul particulelor 5μm, lungimea de undă 280 nm. Separarea diferitelor componente din mediul de reacție s-a realizat utilizând gradient de solvent (tabelul 3.11) cu debit de 1 mL/min, la temperatura de 25°C, volumul de probă injectat 20μL.

Tabelul 3.11. Gradientul de eluție pentru HPLC folosit la separarea esterilor rutinei și silibininei

Timpul (min)	Solvent A (apă, 0.1% AcOH) (%)	Solvent B (acetonitril, 0.1% AcOH) (%)
0	90	10
15	0	100
25	0	100
30	90	10

La finalul esterificării enzimaticice, enzima imobilizată și sitele moleculare au fost îndepărtate prin filtrare, iar probele au fost supuse centrifugării deoarece doar filtrarea nu îndepărtează complet urmele acestora. Ulterior, solventul a fost îndepărtat prin evaporare pe evaporator rotativ. Separarea bioconjugatilor flavonoide/acizi grași, obținuți în urma biosintezelor efectuate s-a realizat prin două metode: extracție lichid-lichid și separare pe coloană cromatografică.

3.5.4. Extracția lichid-lichid

Pentru îndepărtarea acizilor grași nereacționați produsul brut obținut în urma îndepărtării solventului a fost supus extracțiilor repetate (4x20mL) cu amestecul de solvenți heptan/apă (30/20, v/v, solvent pentru cromatografie, Merck), la temperatura camerei, când în faza organică se extrag foarte bine acizii. La îndepărtarea flavonoidelor, s-a utilizat amestecul acetat de etil/apă (1/6, v/v, solvent pentru cromatografie, Merck), la temperatura de 60°C, cu agitare magnetică, timp de 30 minute. Flavonoidele se extrag în faza apoasă, iar esterii se găsesc în faza organică. Pentru grăbirea separării fazelor probele s-au centrifugat 5 minute, la 2000 rot/min. Faza organică a fost supusă evaporării rezultând compuși doriți, fără urme de substraturi nereacționate. Pentru purificare, compușii obținuți au fost recristalizați din acetonă sau metanol.

3.5.5. Separarea pe coloană cromatografică

Pentru a fi supuse separării pe coloană, probele au fost pregătite în două moduri: a) s-au evaporat la sec și au fost dizolvate ulterior în eluentul utilizat la separare; b) au fost concentrate și ulterior introduse pe coloană. Coloanele folosite, prevăzute cu frită, au fost umplute cu silicagel (Kieselgel 60, 70-230 mesh, Merck). Amestecul de solvenți utilizat la eluarea coloanei a fost: cloroform/metanol/apă (80/20/0.3, v/v/v, solvenți pentru cromatografie, Merck) în cazul bioconjugatilor flavonoidelor glicozidice și cloroform/acetat de etil (60/40, v/v, solvent pentru cromatografie, Merck), în cazul bioconjugatilor flavonolignanilor. Fracțiunile colectate, au fost analizate cu ajutorul TLC, iar cele în care a fost confirmată prezența bioconjugatilor au fost supuse evaporării la sec, cu ajutorul evaporatorului rotativ, pentru izolarea esterilor.

3.5.6. Spectroscopia FT-IR

Spectrele IR s-au realizat cu ajutorul spectrofotometrului FT-IR Jasco 430. Probele solide supuse analizei s-au preparat în pastile de bromură de potasiu iar cele lichide în peliculă între două geamuri de bromură de potasiu.

3.5.7. Spectrometria RMN

Spectrele de rezonanță magnetică nucleară (^1H -RMN și ^{13}C -RMN) s-au înregistrat la un spectrometru *Bruker Avance DRX400*. S-a folosit acetonă deuterată.

Valorile deplasărilor chimice (δ) în spectrele de ^1H -RMN se exprimă în ppm, iar constantele de cuplare (J) se exprimă în Hz. Abrevierile utilizate pentru multiplicitatea semnalelor sunt: s (singlet), d (dublet), t (triplet), q (cuartet) și m (multiplet).

3.5.8. Analiza prin calorimetrie cu scanare diferențială (DSC)

Calorimetria cu 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 s-au supus analizelor DSC în următoarele condiții: program de temperatură de la 20°C la 400°C (în cazul complexilor bioconjugatului până la 500°C), cu o viteză de încălzire de $4^\circ\text{C}/\text{min}$. Achiziția de date s-a realizat cu ajutorul programului DSC Netzsch 204-Acquisition Soft/2000; prelucrarea datelor s-a efectuat cu programul Netzsch Proteus-Thermal Analysis ver. 4.0/2000.

3.5.9. Analiza prin microscopie electronică cu scanare (SEM)

Analiza prin microscopie electronică cu scanare (SEM) pentru micro/nanoparticulele cu α - și β -ciclodextrină (pentru evaluarea morfologiei cristalelor și a dimensiunilor aproximative ale acestora) s-a realizat cu ajutorul unui aparat tip JEOL JEM 1010, dotat cu cameră video Mega View III CCD pentru preluarea imaginilor, la o tensiune de accelerare de 30kV, la o magnitudine de până la $50000\times$, focalizare 5.6mm.

3.5.10. Determinarea activității antioxidante

Evaluarea activității antioxidante a acestor sisteme complexe s-a realizat utilizând soluții separate de flavonoide (0.001 g/mL), complecși ai flavonoidelor (0.004 g/mL), bioconjuțați (0.002 g/mL) și complecși ai bioconjuțaților (0.004 g/mL). Analiza activității antioxidante s-a realizat cu ajutorul unui spectrofotometru CamSpec M501, iar datele obținute s-au prelucrat cu ajutorul programului Analyst ver. 4.67, Camspec Ltd. S-a lucrat în modul următor: în cuva pentru probă s-au introdus 2 mL etanol 96% (sau 2 mL apă distilată), 0.5 mL soluție de probă, alcoolică sau apoasă (flavonoidă, complex al acesteia, bioconjugat sau complex al acestuia cu ciclodextrine), și 0.5 mL soluție DPPH 1 mM și s-a început înregistrarea. S-a înregistrat absorbanta la 517 nm timp de 1800s. Soluția se decolorează în timp pe măsură ce DPPH reacționează cu radicalii liberi sau precursorii acestora din sistem, iar înaintarea reacției este monitorizată spectrofotometric. Toate citirile s-au făcut față de o soluție alcoolică sau apoasă de referință.

Activitatea antioxidantă s-a calculat conform formulei:

$$AAO(\%) = 100 - A\%(t) = 100 - \frac{A_{517nm}(t)}{A_{517nm}(t=0)} \cdot 100$$

unde $A\%(t)$ reprezintă absorbanta procentuală la timpul t a soluției analizate, față de absorbanta probei martor (fără probă de analizat).

Din absorbanțele amestecurilor de probă cu DPPH și cu ajutorul unei curbe de etalonare pentru DPPH s-au putut determina concentrațiile momentane de DPPH pe parcursul analizei activității antioxidante, ceea ce a permis determinarea vitezelor de reacție medii ale DPPH pe diferite intervale de timp:

$$\bar{v} = -\frac{\Delta C_{DPPH}}{\Delta t} (\mu M / s)$$

unde: \bar{v} – viteza medie de reacție a DPPH ($\mu M/s$);

$\Delta C_{DPPH}/\Delta t$ – variația concentrației de DPPH în timp pe intervalul considerat.

Curba de etalonare pentru DPPH:

$$c = \frac{Abs_{DPPH,517nm} - 0.025}{10.96} \cdot 10^3 (\mu M)$$

Din ecuația dreptei: $c(\mu M) = a - b \cdot t(s)$, rezultă $\Delta c/\Delta t = -b$, deci viteza medie pe porțiunea pseudoliniară a curbei va fi chiar panta cu semn schimbat a ecuației drepte de corelare pe intervalul de timp considerat, din reprezentarea variației concentrației de DPPH în timp.

3.5.11. Evaluarea transferului prin membrană

Analiza spectrofotometrică a flavonoidelor pure, a complexșilor acestora, a bioconjugatșilor precum și a complexșilor acestora și evaluarea transferului membranar 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. Toate citirile s-au făcut față de ser fiziologic sau soluție etanolică 60% ca referință, în funcție de soluția în care s-a lucrat. Transferul membranar s-a realizat într-o instalație din sticlă cu o suprafață a membranei de 9 cm²; în instalație s-au introdus probe diluate în ser fiziologic sau etanol 60% (20 mg/50 mL solvent), iar în compartimentul de transfer s-au introdus 8 mL solvent (etanol 60% sau ser fiziologic). Sistemul a fost încălzit la 37°C cu ajutorul unui termostat Julabo ED și menținut sub agitare magnetică timp de 4-8 ore, iar în unele cazuri analiza s-a realizat până la 12 ore; s-au prelevat probe din 30 în 30 de minute pentru analiza spectrofotometrică. Pentru flavonoidele pure s-a lucrat cu o concentrație de 0.1 M.

4. CONCLUZII FINALE

Principalele contribuții proprii ale acestei teze constau în obținerea prin esterificare enzimatică a unor bioconjugati ai flavonoidelor cu acizi grași saturați și nesaturați, modelarea moleculară a interacțiunii bioconjugatilor obținuți cu principalele ciclodextrine naturale, obținerea de compuși de incluziune ai flavonoidelor, acizilor grași și bioconjugatilor cu ciclodextrinele, studiul activității antioxidante și comportării la transportul prin membrane semipermeabile a acestor compuși.

Concluziile cele mai importante rezultate din cercetările efectuate sunt:

- S-au obținut cu randamente bune (de peste 60%) bioconjugati ai rutinei (o flavonoidă glicozilată) și silibininei (un flavonolignan), prin esterificare directă cu acizii grași saturați decanoic, palmitic, stearic, arahidic și behenic și acizii grași nesaturați oleic și linoleic, în prezența lipazei Novozyme 435, în acetonă, utilizând site moleculare pentru controlul cantității de apă din sistem.
- Studiul parametrilor care influențează reacția de esterificare enzimatică a scos în evidență rolul esențial al cantității de apă prezente în sistemul de reacție și al solventului. Acilarea a avut loc foarte greu în cazurile în care apa formată nu a fost îndepărtată, în timp ce utilizarea de site moleculare pentru a reține apa a determinat creșterea randamentelor cu până la 60%. Acetona s-a dovedit a fi cel mai bun mediu de reacție, dar și alți solvenți de polaritate medie au dus la rezultate apropiate.
- Monitorizarea sintezelor prin cromatografie în strat subțire și cromatografie de lichide HPLC a demonstrat că în majoritatea cazurilor s-a format un singur produs de reacție, confirmându-se regioselectivitatea lipazei.
- În cazul flavonoidelor agliconice, acilarea enzimatică prin esterificare directă s-a realizat cu randamente scăzute (hesperetina, quercetina), sau nu s-a format ester (crisina, naringenina), deși au fost încercate șapte tipuri de lipaze microbiene de diferite proveniențe drept biocatalizator și mai mulți solvenți organici ca mediu de reacție.
- Separarea și purificarea bioconjugatilor sintetizați s-a realizat prin tehnicile de extracție lichid-lichid și/sau cromatografie pe coloană de silicagel, cea de-a doua metodă dovedindu-se mai eficientă, în sensul că analiza prin HPLC a bioconjugatilor separați prin această metodă nu a mai indicat prezența flavonoidei sau a unor produși secundari. Purificarea compușilor separați s-a făcut prin recristalizare din acetonă sau metanol, randamente mai bune fiind obținute în acetonă.
- Structura de esteri de flavonoide a bioconjugatilor separați și purificați a fost confirmată prin spectroscopie FT-IR, iar analiza prin spectrometrie $^1\text{H-RMN}$ și $^{13}\text{C-RMN}$, a demonstrat că acilarea rutinei cu acizii grași saturați și nesaturați a avut

loc la hidroxilul din poziția C-4''', dar și faptul că produsul mai conține acid gras, care nu fost complet îndepărtat la separarea pe coloană cromatografică.

- Modelarea moleculară a interacțiunii bioconjugatilor flavonoide/acizi grași cu α -, β - și γ -ciclodextrina a arătat că bioconjugatii pot fi încapsulați molecular în cavitatea ciclodextrinelor datorită compatibilității sterice în special cu restul neramificat de acid gras, dar apar totuși unele impedimente sterice legate de conformația spiralată a bioconjugatilor, ceea ce determină o interacțiune mai puțin eficientă în cazul α -ciclodextrinei.

- Stabilitatea complexului bioconjugat/ciclodextrină este demonstrată de energiile de interacțiune calculate, care pentru β - și γ -ciclodextrină sunt semnificativ mai mari comparativ cu α -ciclodextrina. Pentru bioconjugatii de rutină stabilitatea este mult mai bună în cazul γ -ciclodextrinei comparativ cu complexul cu β -ciclodextrină, iar pentru derivații silibininei valorile sunt foarte apropiate.

- S-au obținut sisteme supramoleculare (compuși de incluziune) ai flavonoidelor (crisină, naringenină, hesperetină, quercetină, rutină și silibinină) cu α - și β -ciclodextrina, ai acizilor grași (decanoic, palmitic, stearic, arahidic, behenic, oleic și linoleic) cu α - și β -ciclodextrina și ai bioconjugatilor (rutin decanoat, rutin palmitat, rutin stearat, rutin oleat, rutin linoleat și silibinin palmitat, silibinin stearat, silibinin behenoat, silibinin oleat și silibinin linoleat) cu β -ciclodextrina, prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă, cu randamente de recuperare bune.

- Formarea complexilor a fost demonstrată cu ajutorul spectroscopiei FT-IR, prin prezența benzilor de absorbție caracteristice, atât ai compușilor care au fost supuși încapsulării cât și ai ciclodextrinei.

- Analizele calorimetrice au indicat formarea complexilor flavonoide/ciclodextrine, acizi grași/ciclodextrine, respectiv bioconjugati/ciclodextrine, prin faptul că s-au micșorat pierderile de masă și efectele calorice corespunzătoare pierderii apei la încălzire și au fost identificate efecte calorice pe intervalul de asociere-disociere a unor astfel de complecși. Cele mai importante dovezi aduse de analizele DSC, care confirmă formarea complexilor, sunt: micșorarea efectului endoterm corespunzător deshidratării și scăderea temperaturii la care apare acest efect, comparativ cu ciclodextrina pură. Explicația acestor fenomene este înlocuirea moleculelor de apă de către moleculele „oaspete” (flavonoide, acizi grași sau bioconjugati).

- Complecșii obținuți au avut în marea majoritate a cazurilor concentrații de apă mai mici comparativ cu ciclodextrinele comerciale. În consecință, cantitatea de apă reținută în complex poate fi considerată drept indicator al încapsulării ciclodextrinelor cu substanțele biologice active.

- Microscopia electronică cu scanare (SEM) a oferit informații utile privind dimensiunile aproximative și morfologia cristalelor de complecși, scoțând în evidență schimbările survenite în urma complexării, comparativ cu ciclodextrinele comerciale. Acestea se prezintă sub formele romboidală pentru α -ciclodextrină, respectiv hexagonală pentru β -ciclodextrină, în timp ce complecșii obținuți au avut forme și dimensiuni diferite de acestea.

- Activitatea antioxidantă a flavonoidelor a fost evaluată spectrofotometric, utilizând metoda captării radicalilor cu DPPH. În cazul rutinei și derivaților acesteia, valorile activității antioxidante a flavonoidei și complexilor acesteia cu β -ciclodextrină au scos în evidență diferențe relevante comparativ cu activitatea antioxidantă a bioconjugatilor (flavonoide/acizi grași) și complexilor acestora cu β -ciclodextrină. Astfel, bioconjugatii rutinei au prezentat o activitate antioxidantă mai mare comparativ cu rutina nederivatizată, iar complexii acestora cu β -ciclodextrina au avut activitate antioxidantă apropiată sau mai mică comparativ cu rutina și/sau complexul acesteia cu β -ciclodextrina.

- Viteza de reacție a DPPH în prezența flavonoidelor, bioconjugatilor și complexilor acestora poate fi considerată o măsură a reactivității compușilor cu activitate antioxidantă, respectiv a posibilității de eliberare controlată a acestora din complexii cu ciclodextrinele. S-a determinat variația activității antioxidante în timp pe trei intervale de timp: 10-60s, 60-180s și 180-1800s. Activitatea antioxidantă a rutinei a fost foarte mare pe primul interval, iar pe ultimele două intervale a fost neînsemnată, în timp ce derivații acilați și complexii acestora au prezentat activitate și pe ultimele două intervale. În ceea ce privește silibinina și derivații acesteia, rezultatele nu au fost la fel de relevante. Toți derivații au prezentat activitate antioxidantă mai slabă comparativ cu silibinina pură, care însă nu este de neglijat, deoarece se manifestă într-un timp mai îndelungat. Activitatea antioxidantă a flavonoidelor se manifestă cu precădere pe primul interval de timp, în timp ce bioconjugatii și complexii acestora prezintă o activitate semnificativă și pe ultimele două intervale de timp, ceea ce confirmă existența unei eliberări controlate în timp.

- Evaluarea comportării la transfer prin membrane semipermeabile a flavonoidelor și bioconjugatilor acestora cu acizi grași, atât neîncapsulați cât și sub formă de complecși ai ciclodextrinelor, s-a realizat folosind membrane de celofan. Rutina și complexii acesteia cu cele două ciclodextrine au prezentat un transfer bun în soluția de ser fiziologic, în timp ce la bioconjugatii rutinei și complexilor corespunzători cu β -ciclodextrina transferul a fost mai bun în soluție alcoolică (etanol 60%), probabil datorită solubilității mai ridicate. În cazul silibininei, bioconjugatilor cu acid oleic și complexilor corespunzători cu β -ciclodextrina, transferul prin membrană în soluția de ser fiziologic nu a fost semnificativ, în timp ce în soluție alcoolică (etanol 60%) concentrația biocompușilor a fost mai ridicată și cu un transfer mai bun în timp.

- Rezultatele acestor cercetări au deschis calea utilizării compușilor de incluziune, obținuți prin încapsularea unor bioconjugatii de tipul esterilor flavonoidelor, în aplicații care necesită eliberare controlată de substanțe bioactive. Aceste cercetări vor putea fi continuate și aprofundate prin optimizarea proceselor biocatalitice, sinteza de derivați noi, caracterizarea activității biologice a acestora și obținerea unor compuși de incluziune cu eficiență superioară de protecție și control pentru biodisponibilizare și eliberare controlată.

Rezultatele obținute în cadrul prezentei teze de doctorat au constituit subiectul unui număr de 10 lucrări științifice, dintre care 3 articole publicate în reviste cotate ISI, 1 articol aflat în curs de evaluare la o revistă cotată ISI (*European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*), 2 lucrări comunicate la conferințe internaționale din străinătate și 4 articole publicate în reviste indexate în baze de date internaționale (categoria B+ în clasificarea CNCS).

BIBLIOGRAFIE

- [1] Grotewold, E., *The Science of Flavonoids*, Springer Science + Business Media, Inc., **2006**.
- [2] Williams, C.A., Grayer R.J., 2004, Anthocyanins and other flavonoids, *Nat Prod Rep* **21**: 539-573.
- [3] de Rijke, E., 2006, Analytical separation and detection methods for flavonoids, *J Chromatogr A* **1112**:31-63.
- [4] Beck, V., Unterrieder, E., Krenn, L., Kubelka, W., Jungbauer A., 2003, Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy, *J Steroid Biochem Mol Biol* **84**: 259-268.
- [5] Le March, L., 2002, Cancer preventive effects of flavonoids—a review, *Biomed Pharmacother* **56**: 78-83.
- [6] Boue, S. M., Wiese, T. E., Nehls, S., Burow, M.E., Elliott, S., Carter-Wientjes, C.H., Shih, B. Y., Mclachlan, J. A., Cleveland, T. E., 2003, Evaluation of the estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens, *J Agric Food Chem* **51**: 2193-2199.
- [7] Fritz, K. L., Seppanen, C. M., Kurzer, M. S., Csallany, A. S., 2003, The *in vivo* antioxidant activity of soybean isoflavones in human subjects, *Nutr Res* **23**: 479-487.
- [8] Nestel, P., 2003, Isoflavones: their effects on cardiovascular risk and function, *Curr Opin Lipidol* **14**: 3-8.
- [9] Blaut, M., Schoefer, L., Braune, A., 2003, Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms, *Int J Vitamin Nutr Res* **73**: 79-87.
- [10] Sfakiaos, J., Coward, L., Kirk, M. C., Barnes, S., 1997, Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats, *J Nutr* **127**: 1260-1269.
- [11] Yasuda, T., Kano, Y., Saito, K., Ohsawa, K., 1994, Urinary and biliary metabolites of daidzin and daidzein in rats, *Biol Pharm Bull* **17**: 1369-1374.
- [12] Rostagno, M. A., Palma, M., Barroso, C. G., 2003, Ultrasound assisted extraction of soy isoflavones, *J Chromatogr A* **1012**: 119-128.
- [13] Herrera, M. C., Lague, M. D., de Castro, L., 2004, Ultrasound assisted extraction for analysis of phenolic compounds in strawberries, *Anal Bioanal Chem* **379**: 1106-1112.
- [14] Rostagno, M. A., Palma, M., Barroso, C.G., 2004, Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans, *Anal Chim Acta* **522**: 169-177.
- [15] Kaiser, C. S., Rompp, H., Schmidt, P. C., 2004, Supercritical carbon dioxide extraction of chamomile flowers: extraction efficiency, stability, and on-line inclusion of chamomile-carbon dioxide extract in beta cyclodextrin, *Phytochem Anal* **15**: 249-256.
- [16] Naczki, M., Shahidi, F., 2004, Extraction and analysis of phenolics in food, *J Chromatogr A* **1054**: 95-111.

- [17] Robards, K., 2003, Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables, *J Chromatogr A* **1000**: 657-691.
- [18] Markham, K. R., Geiger, H., 1994, ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and other their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide. In: Harborne, J. B. (Eds.), *The Flavonoids, Advances in Research Since 1986*. Chapman Hill, London, **1993**.
- [19] Albach, D.C., Grayer, R.J., Jensen, S.R., Özgökçe F., Veitch, N.C., 2003, Acylated flavone glycosides from *Veronica*, *Phytochem* **64**: 1295-1301.
- [20] Kazuma, K., Noda, N., Suzuki, M., 2003, Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*, *Phytochem* **62**: 229-237.
- [21] Francis, J.A., Rumbelha, W., Nair, M. G., 2004, Constituents in Easter lily flowers with medicinal activity, *Life Sci* **76**: 671-683.
- [22] Franski, R., Bednarek, P., Wojtaszek, P., Stobiecki, M., 1999, Identification of flavonoid diglycosides in yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) with mass spectrometric techniques, *J Mass Spectrom* **34**: 486-495.
- [23] Franski, R., Matlawska, I., Bylka, W., Sikorska, M., Fiedorow P., Stobiecki, M., 2002, Differentiation of interglycosidic linkages in permethylated flavonoid glycosides from linked-scan mass spectra (B/E), *J Agric Food Chem* **50**: 976-982.
- [24] Franski, R., Eitner, K., Sikorska, M., Matlawska, I., Stobiecki, M., 2003, Electrospray mass spectrometric decomposition of some glucuronic acid containing flavonoid diglycosides, *Phytochem Anal* **14**: 170-175.
- [25] Stobiecki, M., Wojtaszek, P., 1990, Application of gas chromatography-mass spectrometry for identification of isoflavonoids in lupin root extracts, *J Chromatogr* **508**: 391-398.
- [26] Bednarek, P., Franski, R., Kerhoas, L., Einhorn, J., Wojtaszek, P., Stobiecki, M., 2001, Profiling changes in metabolism of isoflavonoids and their conjugates in *Lupinus albus* treated with biotic elicitor, *Phytochem* **56**: 77-85.
- [27] Stobiecki, M., 2000, Review—Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides, *Phytochem* **54**: 237-256.
- [28] Stobiecki, M., 2001, Applications of separation techniques hyphenated to mass spectrometer for metabolic profiling, *Curr Opin Chem* **5**: 89-111.
- [29] Sumner, L. W., Mendes, P., Dixon, R. A., 2003, Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era, *Phytochem* **62**: 817-836.
- [30] Wolfender, J-L., Rodriguez, S., Hostettmann, K., 1998, Liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for screening of plant constituents, *J Chromatogr A* **794**: 299-316.
- [31] Watanabe, N., Niki, E., 1978, Direct coupling of FT-NMR to high performance liquid chromatography, *Proc Jpn Acad Ser B* **54**: 194-199.
- [32] Albert, K., 1999, Liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J Chromatogr A* **856**: 199-211.
- [33] Wolfender, J. L., Ndjoko, K., Hostettmann, K., 2003, Liquid chromatography with ultraviolet absorbance–mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites, *J Chromatogr A* **1000**: 437-455.

- [34] Wolfender, J. L., Ndjoko, K., Hostettmann, K., 2001, The potential of LC-NMR in phytochemical analysis, *Phytochem Anal* **12**: 2-22.
- [35] Wolfender, J. L., Rodriguez, S., Hostettmann, K., Hiller, W., 1997, Liquid chromatography/ultra violet/mass spectrometric and liquid chromatography/nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of crude extracts of Gentianaceae species, *Phytochem Anal* **8**: 97-104.
- [36] Hansen, S. H., Jensen, A. G., Cornett, C., Bjørnsdottir, I., Taylor, S., Wright, B., Wilson, I. D., 1999, High-performance liquid chromatography on-line coupled to high-field NMR and mass spectrometry for structure elucidation of constituents of *Hypericum perforatum* L., *Anal Chem* **71**: 5235-5241.
- [37] Lommen, A., Godejohann, M., Venema, D. P., Hollman, P. C. H., Spraul, M., 2000, Application of directly coupled HPLC-NMR-MS to the identification and confirmation of quercetin glycosides and phloretin glycosides in apple peel, *Anal Chem* **72**: 1793-1797.
- [38] Vilegas, W., Vilegas, J. H. Y., Dachtler, M., Glaser, T., Albert, K., 2000, Application of on-line C₃₀ RP-HPLC-NMR for the analysis of flavonoids from leaf extract of *Mayatenus aquifolium*, *Phytochem Anal* **11**: 317-321.
- [39] Andrade, F. D. P., Santos, L. C., Datchler, M., Albert, K., Vilegas, W., 2002, Use of on-line liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy for the rapid investigation of flavonoids from *Sorocea bomplandii*, *J Chromatogr A* **953**: 287-291.
- [40] Queiroz, E. F., Wolfender, J. L., Atindehou, K. K., Traore, D., Hostettmann, K., 2002, On-line identification of the antifungal constituents of *Erythrina vogelii* by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, ultraviolet absorbance detection and nuclear magnetic resonance spectrometry combined with liquid chromatography micro-fractionation, *J Chromatogr A* **974**: 123-134.
- [41] Le Gall, G., DuPont, M. S., Mellon, F. A., Davis, A. L., Collins, G. J., Verhoyen, M. E., Colquhoun, I. J., 2003, Characterization and content of flavonoid glycosides in genetically modified tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits, *J Agric Food Chem* **51**: 2438-2446.
- [42] de Rijke E., de Kanter, F., Ariese, F., Brinkman, U. A. T., Gooijer, C., 2004a, Liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance spectroscopy for the identification of isoflavone glucoside malonates in *T. pretense* L. leaves, *J Sep Sci* **27**: 1061-1070.
- [43] Waridel, P., Wolfender, J. L., Lachavanne, J. B., Hostettmann, K., 2004, Identification of the polar constituents of *Potamogeton* species by HPLC-UV with post column derivatization, HPLC-MSⁿ and HPLC-NMR, and isolation of a new *ent*-labdane diglycoside, *Phytochemistry* **65**: 2401-2410.
- [44] Sanchez-Rabameda, F., Jauregui, O., Casals, I., Andres-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido, M., Lamuela-Raventos, R. M., 2003, Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*), *J Mass Spectrom* **38**: 35-42.
- [45] de Rijke, E., Zappey, H., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U. A. T., 2003, Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion-trap instruments, *J Chromatogr A* **984**: 45-58.

- [46] Sikorska, M., Matlawska, I., Franski, R., Stobiecki, M., 2003, Application of mass spectrometric techniques for structural analysis of apigenin 8-C-(6-O-glucopyranosyl) glucopyranoside—a novel flavonoid C-diglycoside, *Rapid Comm Mass Spectrom* **17**: 1380-1382.
- [47] Waridel, P., Wolfender, J-L., Ndjoko, K., Hobby, K. R., Major, H. J., Hostettmann, K., 2001, Evaluation of quadrupole time of flight tandem mass spectrometry and ion trap multiple-stage mass spectrometry for differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers, *J Chromatogr A* **926**: 29-41.
- [48] Cuyckens, F., Claeys, M., 2004, Mass spectrometry in structural analysis of flavonoids, *J Mass Spectrom* **39**: 1-15.
- [49] Harborne, J. B., Williams, C. A., 2000, Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry* **55**: 481-504.
- [50] Harborne, J. B., Williams, C. A., 2001, Anthocyanins and other flavonoids, *Nat Prod Rep* **18**: 310-333. Heller, W., Forkmann, G., Britsch, L., and Griseback, H., 1985, Enzymatic reduction of (+)-dihydroflavonols to flavan-3,4-cis-diols with flower extracts from *Matthiola incana* and its role in anthocyanin biosynthesis, *Planta* **165**: 284-287.
- [51] Winkel-Shirley, B., 2001a, Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology, *Plant Physiol* **126**: 485-493.
- [52] Springob, K., Nakajima, J., Yamazaki, M., Saito, K., 2003, Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins, *Nat Prod Rep* **20**: 288-303.
- [53] Styles, E. D., Ceska, O., 1977, The genetic control of flavonoid synthesis in maize, *Can J Genet Cytol* **19**: 289-302.
- [54] Styles, E. D., Ceska, O., 1981, P and R control of flavonoids in *BRONZE* coleoptiles of maize, *Can J Genet Cytol* **23**: 691-704.
- [55] Styles, E. D., Ceska, O., 1989, Pericarp flavonoids in genetic strains of *Zea mays*, *Maydica* **34**: 227-237.
- [56] Dooner, H. K., Robbins, T. P., Jorgensen, R. A., 1991, Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis, *Annu Rev Genet* **25**: 173-199.
- [57] Koes, R. E., Verweij, W., Quattrocchio, F., 2005, Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways, *Trends Plant Sci* **10**: 236-242.
- [58] Dillard, C. J., German, J. B., 2000, Phytochemicals: nutraceuticals and human health, *J Sci Food Agric* **80**: 1744-1756.
- [59] Kelm, M. A., Hammerstone, J. F., Schmitz, H. H., 2005, Identification and quantitation of flavanols and proanthocyanidins in foods: how good are the datas? *Clin Dev Immunol* **12**: 35-41.
- [60] Schreier, P., 2005, Chemopreventive compounds in the diet, *Dev Ophthalmol* **38**: 1-58.
- [61] Ness, A. R., Powles, J. W., 1997, Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review, *Int J Epidemiol* **26**: 1-13.
- [62] Sastre, J., Pallardo, F. V., Vina, J., 2000, Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis, *IUBMB Life* **49**: 427-435.
- [63] Takabe, W., Niki, E., Uchida, K., Yamada, S., Satoh, K., Noguchi, N., 2001, Oxidative stress promotes the development of transformation: involvement of a potent mutagenic lipid peroxidation product, acrolein, *Carcinogenesis* **22**: 935-941.

- [64] Kawanishi, S., Hiraku, Y., Oikawa, S., 2001, Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging, *Mutat Res* **488**: 65-76.
- [65] Khan, M. A., Baseer, A., 2000, Increased malondialdehyde levels in coronary heart disease, *J Pak Med Assoc* **50**: 261-264.
- [66] Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini, L., Ciccoli, L., Giachetti, D., Comproti, M., 1997, Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity, *FEBS Lett* **416**: 123-129.
- [67] Elliott, A. J., Scheiber, S. A., Thomas, C., Pardini, R. S., 1992, Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. A structure-activity study, *Biochem Pharmacol* **44**: 1603-1608.
- [68] Hirano, R., Sasamoto, W., Matsumoto, A., Itakura, H., Igarashi, O., Kondo, K., 2001, Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation, *J Nutr Sci Vitaminol* **47**: 357-362.
- [69] Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck A.J., Vanden Berghe, D., 1998, Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers, *J Nat Prod* **61**: 71-76.
- [70] Caltagirone, S., Rossi, C., Poggi, A., Ranelletti, F. O., Natali, P. G., Brunetti, M., Aiello, F.B., Piantelli, M., 2000, Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential, *Int J Cancer* **87**: 595-600.
- [71] Miyagi, Y., Om, A. S., Chee, K. M., Bennink, M. R., 2000, Inhibition of azoxymethane-induced colon cancer by orange juice, *Nutr Cancer* **36**: 224-229.
- [72] Kandaswami, C., Perkins, E., Soloniuk, D. S., Drzewiecki, G., Middleton, E., Jr., 1991, Antiproliferative effects of citrus flavonoids on a human squamous cell carcinoma in vitro, *Cancer Lett* **56**: 147-152.
- [73] Zhou, J. R., Mukherjee, P., Gugger, E. T., Tanaka, T., Blackburn, G. L., Clinton, S. K., 1998, Inhibition of murine bladder tumorigenesis by soy isoflavones via alterations in the cell cycle, apoptosis, and angiogenesis, *Cancer Res* **58**: 5231-5238.
- [74] Hosokawa, N., Hosokawa, Y., Sakai, T., Yoshida, M., Marui, N., Nishino, H., Kawai, K., Aoike, A., 1990, Inhibitory effect of quercetin on the synthesis of a possibly cell-cycle-related 17-kDa protein, in human colon cancer cells, *Int J Cancer* **45**: 1119-1124.
- [75] Yoshida, M., Yamamoto, M., Nikaido, T., 1992, Quercetin arrests human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle, *Cancer Res* **52**: 6676-6681.
- [76] Lepley, D. M., Li, B., Birt, D. F., Pelling, J. C., 1996, The chemopreventive flavonoid apigenin induces G2/M arrest in keratinocytes, *Carcinogenesis* **17**: 2367-2375.
- [77] Lepley, D. M., Pelling, J. C., 1997, Induction of p21/WAF1 and G1 cell-cycle arrest by the chemopreventive agent apigenin, *Mol Carcinog* **19**: 74-82.
- [78] Wang, W., Heideman, L., Chung, C. S., Pelling, J. C., Koehler, K. J., Birt, D. F., 2000, Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines, *Mol Carcinog* **28**: 102-110.
- [79] Agarwal, C., Singh, R. P., Dhanalakshmi, S., Tyagi, A. K., Tecklenburg, M., Sclafani, R. A., Agarwal, R., 2003, Silibinin upregulates the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and causes cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma HT-29 cells, *Oncogene* **22**: 8271-8282.

- [80] Tyagi, A., Agarwal, C., Agarwal, R., 2002a, The cancer preventive flavonoid silibinin causes hypophosphorylation of Rb/p107 and Rb2/p130 via modulation of cell cycle regulators in human prostate carcinoma DU145 cells, *Cell Cycle* **1**: 137-142.
- [81] Tyagi, A., Agarwal, C., Agarwal, R., 2002b, Inhibition of retinoblastoma protein (Rb) phosphorylation at serine sites and an increase in Rb-E2F complex formation by silibinin in androgen-dependent human prostate carcinoma LNCaP cells: role in prostate cancer prevention, *Mol Cancer Ther* **1**:525-532.
- [82] Willett, W. C., 2002, Balancing life-style and genomics research for disease prevention, *Science* **296**:695-698.
- [83] Block, G., Patterson, B., Subar, A., 1992, Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence, *Nitr Cancer* **18**: 1-29.
- [84] Omenn, G. S., Goodman, G. E., Thornquist, M. D., Balmes, J., and Cullen, M. R., Glass, A., Keogh, J. P., Meyskens, F. L., Valanis, B., Williams, J. H., Barnhart, S., Hammar, S., 1996, Effects of a combination of beta-carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease, *N Engl J Med* **334**: 1150-1155.
- [85] Andersen, Q.M., Markham, K.R., *Flavonoids – Chemistry, Biochemistry and Applications*, Taylor & Francis Group, LLC, **2006**.
- [86] Lynen, F. , Reichert, E. , 1951, *Angew Chem* **63**, 47-48.
- [87] Ghisla, S., 2004, β -Oxidation of fatty acids, *Eur J Biochem* **271**:459-461.
- [88] Pokorny, J., Yanishlieva, Michael Gordon, M., *Antioxidants in food*, Woodhead Publishing Ltd, **2001**.
- [89] Chow, C.K., *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2008.
- [90] Newsholme, E.A., Leech, T.R., *Functional Biochemistry in Health and Disease*, John Wiley & Sons, Ltd, **2010**.
- [91] Nelson, D.L., Michael M. Cox, M.M., *Lehninger – Principles of Biochemistry*, Fifth edition, W. H. Freeman and Company, **2008**.
- [92] Mathews, C.K., van Holde, K.E., Ahern, K.E., *Biochemistry*, 3rd Edition, Prentice Hall, **1999**.
- [93] Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P., *Food Chemistry*, 4th revised and extended Edition, Springer, **2009**.
- [94] Mander, L., Liu, H.-W., *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology: 10 Volume Set*, Elsevier, **2010**.
- [95] Mostofsky, D.I., Yehuda, S., Salem Jr., N., *Fatty Acids*, Humana Press Inc., **2001**.
- [96] Vance, D.E., Vance, J.E., *Biochemistry of Lipids Lipoproteins and Membranes*, Fifth Edition, New Comprehensive Biochemistry, Elsevier, **2010**.
- [97] Horton, H.R., Moran, L.A., Scrimgeour, K.G., Perry, M.D., Rawn, J.D., *Principles of Biochemistry*, 4th Edition, Paerson Education Inc., **2006**.
- [98] Boumendjel, A., Mariotte, A.-M., Bresson-Rival, D., Perrier, E., 2003, Hesperitin Esters: Highly Stable Flavanones with Both Free Radical Scavenging and Anti-Elastase Activities, *Pharm Biol* **41**: 546-549.
- [99] Comte, G., Daskiewicz, J.-B., Bayet, C., Conseil, G., Viornerie-Vanier, A., Dumontet, C., Di Pietro, A., Barron, D., 2001, C-Isoprenylation of Flavonoids Enhances Binding Affinity toward P-Glycoprotein and Modulation of Cancer Cell Chemoresistance, *J Med Chem* **44**, 763-768.

- [100] Cook, N. C., Sammam, S., 1996, Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *J Nutr Biochem* **7**: 66-76.
- [101] Cushman, M., Nagarathnam, D., Debra L. Burg, D.L., Geahlen, R.L., 1991, Synthesis and Protein-Tyrosine Kinase Inhibitory Activities of Flavonoid Analogues, *J Med Chem* **34**: 798-806.
- [102] Gallo, D., Giacomelli, S., Ferlini, C., Raspaglio, G., Apollonio, P., Prisley, S., Riva, A., Morazzoni, P., Bombardelli, E., Scambia, G., 2003, Antitumour activity of the silybin-phosphatidylcholine complex IdB 1016, against human ovarian cancer *Eur J Cancer* **39**: 2403-2410.
- [103] Gatto, M.T., Falcocchio, S., Grippa, E., Mozzanti, G., Battinelli, L., Nicolosi, G., Lambusta, D., Saso, L., 2002, Antimicrobial and Anti-Lipase Activity of Quercetin and its C2-C16 3-O-Acyl-Esters, *Bioorg Med Chem* **10**: 269-272.
- [104] Gažák, R., Purchartová, K., Marhol, P., Živná, L., Sedmera, P., Valentová, K., Kato, N., Matsumura, H., Kaihatsu, K., Křen, V., 2010, Antioxidant and antiviral activities of silybin fatty acid conjugates, *European Journal of Medicinal Chemistry* **45**: 1059-1067.
- [105] Huang, H., Jia, Q., Ma, J., Qin, G., Chen, Y., Xi, Y., Lin, L., Zhu, W., Ding, J., Jiang, H.; Liu, H., 2009, Discovering novel quercetin-3-O-amino acid-esters as a new class of Src tyrosine kinase inhibitors, *Eur J Med Chem* **44**: 1982-1988.
- [106] Jovanovic, S., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., Simic, M., 1994, Flavonoids as anti-oxydants, *J Am Chem Soc* **116**: 4846-4851.
- [107] Kim, M.K., Park, K.-S., Yeo, W.-S., Choo, H., Chong, Y., 2009, In vitro solubility, stability and permeability of novel quercetin-amino acid conjugates, *Bioorgan Med Chem* **17**: 1164-1171.
- [108] Lee, M.-K., Moon, S.-S., Lee, S.-E., Bok, S.-H., Jeong, T.-S., Bok Park, Y., Choi, M.-S., 2003, Naringenin 7-O-cetyl Ether as Inhibitor of HMG-CoA Reductase and Modulator of Plasma and Hepatic Lipids in High Cholesterol-Fed Rats, *Bioorgan Med Chem* **11**: 393-398.
- [109] Lee, S., Lee, C.-H., Moon, S.-S., Kim, E., Kim, C.-T.; Kim, B.-H., Bok, S.-H., Jeong, T.-S., 2003, Naringenin Derivatives as Anti-atherogenic Agents, *Bioorg Med Chem Lett* **13**: 3901-3903.
- [110] Manthey, J. A., Grohmann, K., Guthrie, N., 2001, Biological Properties of Citrus Flavonoids Pertaining to Cancer and Inflammation, *Curr Med Chem* **8**: 135-153.
- [111] Matsuo, N., Yamada, K., Yamashita, K., Shoji, K., Mori, M., Sugano, M., 1996, Inhibitory effect of tea polyphenols on histamine and leukotriene B4 release from rat peritoneal exudate cells, *In Vitro Cell Dev B* **32**: 340-344.
- [112] Miura, S., Watanabe, J., Sano, M., Tomita, T., Osawa, T., Hara, Y., Tomita, 1995, I., Effects of Various Natural Antioxidants on the Cu²⁺-Mediated Oxidative Modification of Low Density Lipoprotein, *Biol Pharm Bull* **18**: 1-4.
- [113] Montenegro, L., Carbone, C., Maniscalco, C., Lambusta, D., Nicolosi, G., Ventura, C.A., Puglisi, G., 2007, In vitro evaluation of quercetin-3-O-acyl esters as topical prodrugs, *Int J Pharm* **336**: 257-262.
- [114] Park, H., Dao, T.T., Kim, H.P., 2005, Synthesis and inhibition of PGE2 production of 6,8-disubstituted chrysin derivatives, *Eur J Med Chem* **40**: 943-948.
- [115] Danieli, B., De Bellis, P., Carrea, G., Riva, S., 1989, Enzyme-mediated acylation of flavonoid monoglycosides, *Heterocycles* **29**: 2061-2064.

- [116] Nakajima, N., Ishihara, K., Hamada, H., Kawabe, S.-I., Furuya, T., 2000, Regioselective acylation of flavonoid glucoside with aromatic acid by an enzymatic reaction system from cultured cells of *Ipomoea batatas*, *J Biosci Bioeng* **90**: 347–349.
- [117] Danieli, B., Bertario, A., Carrea, G., Redigolo, B., Secundo, F., Riva, S., 1993, Chemo-enzymatic synthesis of 6"-O-(3-arylprop-2-enoyl) derivatives of the flavonol glucoside isoquercitrin, *Helv Chim Acta* **76**: 2981–2991.
- [118] Kodelia, G., Athansiou, K., Kolisis, F.N., 1994, Enzymatic synthesis of butyl-rutin ester in organic solvents and its cytogenetic effects in mammalian cells in culture, *Appl Biochem Biotechnol* **44**: 205–212.
- [119] Riva, S., Danieli, B., Luisetti, M., 1996, A two-step efficient chemoenzymatic synthesis of flavonoid glycoside malonates, *J Nat Prod* **59**: 618– 621.
- [120] Danieli, B., Luisetti, M., Sampognaro, G., Carrea, G., Riva, S., 1997, Regioselective acylation of polyhydroxylated natural compounds catalyzed by *Candida Antarctica* lipase B (Novozym 435) in organic solvents. *J Mol Catal B: Enzym* **3**: 193–201.
- [121] Otto, R.T., Geers, B., Weiss, A., Petersohn, D., Schlotmann, K., Schroeder, K.-L., 2001, Novel flavone glycoside derivatives for use in cosmetics, pharmaceuticals and nutrition, WO 0179245.
- [122] Gao, C., Mayon, O., MacManus, D.A., Vulfson, E.N., 2001, Novel enzymatic approach to the synthesis of flavonoid glycosides and their esters, *Biotechnol Bioeng* **71**: 235–243.
- [123] Kontogianni, A., Skouridou, V., Sereti, V., Stamatis, H., Kolisis, F.N., 2001, Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media, *Eur J Lip Sci Technol* **103**: 655–660.
- [124] Kontogianni, A., Skouridou, V., Sereti, V., Stamatis, H., Kolisis, F.N., 2003, Lipase-catalyzed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain, *J Mol Catal B: Enzym* **21**: 59–62.
- [125] Yasuda, T., Kano, Y., Saito, K. and Ohsawa, K., 1994, Urinary and biliary metabolites of daidzin and daidzein in rats, *Biol Pharm Bull* **17**: 1369-1374.
- [126] Rostagno, M. A., Palma, M. and Barroso, C. G., 2003, Ultrasound assisted extraction of soy isoflavones, *J Chromatogr A* **1012**: 119-128.
- [127] Herrera, M. C., Lague, M. D., and de Castro, L., 2004, Ultrasound assisted extraction for analysis of phenolic compounds in strawberries, *Anal Bioanal Chem* **379**: 1106-1112.
- [128] Ardhaoui, M., Falcimaigne, A., Ognier, S., Engasser, J.M., Moussou, P., Pauly, G., et al., 2004, Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids, *J Biotechnol* **110**: 265–272.
- [129] Ardhaoui, M., Falcimaigne, A., Engasser, J.M., Moussou, P., Pauly, G., Ghoul, M., 2004, Enzymatic synthesis of new aromatic and aliphatic esters of flavonoids using *Candida antarctica* lipase as biocatalyst, *Biocatal Biotransfor* **22**: 253–259.
- [130] Mellou, F., Lazari, D., Skaltsa, H., Tselepis, A.D., Kolisis, F.N., Stamatis, H., 2005, Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity, *J Biotechnol* **116**: 295–304.
- [131] Nakajima, N., Ishihara, K., Itoh, T., Furuya, T., Hamada, H., 1999, Lipase-catalyzed direct and regioselective acylation of flavonoid glucoside for mechanistic investigation of stable plant pigments, *J Biosci Bioeng* **87**: 105–107.

- [132] Lambusta, D., Nicolosi, G., Patti, A., Piattelli, M., 1993, Enzyme-mediated regio-protection-deprotection of hydroxyl groups in (+)-catechin, *Synthesis* **11**: 1155–1158.
- [133] Ishihara, K., Nakajima, N., 2003, Structural aspects of acylated plant pigments: stabilization of flavonoid glucosides and interpretation of their functions, *J Mol Catal B: Enzym* **23**: 411–417.
- [134] Sakai, M., Suzuki, M., Nanjo, F., Hara, Y., 3-O-acylated catechins and methods of producing same, EP 0618203; **1994**.
- [135] Fujiwara, H., Tanaka, Y., Fukui, Y., Ashikari, T., Yamaguchi, M., Kusumi, T., 1998, Purification and characterization of anthocyanin 3-aromatic acyltransfer-ase from *Perilla frutescens*, *Plant Sci* **137**: 87–94.
- [136] Wehtje, E., J. Kaur, et al., 1997, Water activity control in enzymatic esterification processes, *Enzyme Microb Tech* **21**: 502–510.
- [137] Chamouleau, F., D. Coulon, et al., 2001, Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media, *J Mol Catal B: Enzym* **11**: 949–954.
- [138] Gayot, S., X. Santarelli, et al., 2003, Modification of flavonoid using lipase in non-conventional media: effect of the water content, *J Biotechnol* **101**: 29–36.
- [139] Dixon, R. A., and Steel, C. L., 1999, Flavonoids and isoflavonoids — a gold mine for metabolic engineering, *Trends Plant Sci* **4**: 394–400.
- [140] Dixon, R. A., Paiva, N. L., 1995, Stress-induced phenylpropanoid metabolism, *Plant Cell* **7**: 1085–1097.
- [141] Beecher, G.R., 2003, Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake, *J Nutr* **133**: 3248S–3254S.
- [142] Harnly, J.M., Doherty, R.F., Beecher, G.R., et al., 2006, Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts, *J Agr and Food Chem* **54**: 9966–9977.
- [143] Hadaruga, D.I., Hadaruga, N.G., Ravis, A., Gruia, A., **Pînzaru, I.A.**, 2007, Thermal and oxidative stability of the *Allium sativum* L. bioactive compounds/ α - and β -cyclodextrin nanoparticles, *Rev Chim - Bucharest* **58**: 1009–1015.
- [144] Ravis, A., Hadaruga, N.G., Hadaruga, D.I., Trasca, T., Druga, M., **Pînzaru, I.**, 2008, Bioactive nanoparticles: The complexation of odorant compounds with α - and β -cyclodextrin, *Rev Chim - Bucharest* **59**: 149–153.
- [145] Szejtli, J., 1998, Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry, *Chem Rev* **98**: 1743–1753.
- [146] Szejtli, J., 2004, Past, present, and future of cyclodextrin research, *Pure Appl Chem* **76**: 1825–1845.
- [147] Dodziuk, H., *Cyclodextrins and their complexes*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2006**.
- [148] Sicard, P.J., Saniez, M.-H., 1987, Biosynthesis of cycloglycosyltransferase and obtention of enzymatic reaction products. In: Duchêne, D. (Ed.), *Cyclodextrins and Their Industrial Uses*. Editions de Sant´e, Paris, 77–103, **1987**.
- [149] Szejtli, J., *Cyclodextrin Technology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **1988**.
- [150] *** *Carbohydrate Chemistry*, ed. Boons, G.-J., Blackie Academic & Professional, London, **1998**.

- [151] Loftsson, T., Brewster, M.E., 1996, Pharmaceutical applications of cyclodextrins.1. Drug solubilization and stabilization, *J Pharm Sci* **85**: 1017-1025.
- [152] Uekama, K., Hirayama, F., Irie, T., 1998, Cyclodextrin drug carrier systems, *Chem Rev* **98**: 2045-2076.
- [153] Rajewski, R.A., Stella, V.J., 1996, Pharmaceutical applications of cyclodextrins.2. In vivo drug delivery, *J Pharm Sci* **85**: 1142-1168.
- [154] Thompson, D.O., 1997, Cyclodextrins-enabling excipients: their present and future use in pharmaceuticals, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **14**: 1-104.
- [155] Hergert, L.A.; Escandar, G.M., 2003, Spectrofluorimetric Study of the b-Cyclodextrin-Ibuprofen Complex and Determination of Ibuprofen in Pharmaceutical Preparations and Serum, *Talanta* **60**: 235-246.
- [156] Brown, M.E.; Glass, B.D.; Worthington, M.S., 2002, Binary Systems of Nifedipine and Various Cyclodextrins in the Solid State Thermal, FTIR, XRD Studies, *J Therm Anal Calorim* **68**: 631-646.
- [157] Veiga, M.D.; Merino, M., 2002, Interactions of oxyphenbutazone with different cyclodextrins in aqueous medium and in the solid state, *J Pharmaceut Biomed* **28**: 973-982.
- [158] *** *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry®*, 6th Edition, Electronic Release, 6 ed, Wiley-VCH & AND CompLex Publ. Tech., ver. 3.5, Chichester, **2002**.
- [159] *** *Food Chemistry*, 3rd edition, ed. Fennema, Q.R., Marcel Dekker, Inc., New York, **1996**.
- [160] Nussinovitch, A., *Hydrocolloid Applications. Gum Technology in the Food and Other Industries*, Blackie Academic & Professional, London, **1997**.
- [161] Gill, I.; Ballesteros, A., 2000, Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 2): Non-sol-gel protein-polymer biocomposites, *Trends Biotechnol* **18**: 469-479.
- [162] Jonathan W. Steed, David R. Turner, Karl J. Wallace, *Core Concepts in Supramolecular and Nanochemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, **2007**.
- [163] Douhal, A., *Cyclodextrin Materials Photochemistry, Photophysics and Photobiology*, Elsevier, **2006**.
- [164] Brechignac, C., Houdy, P., Lahmani, M., *Nanomaterials and nanochemistry*, Springer, **2006**.
- [165] Steed, J.W., Atwood, J.L., *Supramolecular chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd., **2009**.
- [166] Gad, S.C., *Pharmaceutical manufacturing handbook*, John Wiley & Sons, Ltd., **2008**.
- [167] Wenz, G., *Advances in polymer science, Inclusion polymers*, Springer, **2009**.
- [168] Davis, F., Higson, S., *Macrocycles - Construction, Chemistry and Nanotechnology Applications*, John Wiley & Sons, Ltd., **2011**.
- [169] Yan, C.; Li, X.; Xiu, Z.; Hao, C., 2006, A quantum-mechanical study on the complexation of b-cyclodextrin with quercetin, *J Mol Struc-Theochem* **764**: 95-100.
- [170] Schwingel, L.; Fasolo, D.; Maribete Holzschuh, M.; Ivana Lula, I.; Sinisterra, R.; Koester, L.; Teixeira, H.; Bassani, V.L., 2008, Association of 3-O-methylquercetin with b-cyclodextrin: complex preparation, characterization and ex vivo skin permeation studies, *J Incl Phenom Macrocycl Chem* **62**: 149-159.

- [171] Jullian, C.; Moyano, L.; Yañez, C.; Olea-Azar, C., 2007, Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: An antioxidant study, *Spectrochim Acta A* **67**: 230–234.
- [172] Mercader-Ros, M.T., Lucas-Abellán, C., Fortea, M.I., Gabaldón, J.A., Núñez-Delicado, E., 2010, Effect of HP- β -cyclodextrins complexation on the antioxidant activity of flavonols, *Food Chem* **118**: 769–773.
- [173] Song, L.X.; Bai, L.; Xu, X.M.; He, J.; Pan, S.Z., 2009, Inclusion complexation, encapsulation interaction and inclusion number in cyclodextrin chemistry, *Coord Chem Rev* **253**: 1276–1284.
- [174] Kim, H.; Choi, J.; Jung, S., 2009, Inclusion complexes of modified cyclodextrins with some flavonols, *J Incl Phenom Macrocycl Chem* **64**: 43–47.
- [175] Zheng, Y.; Haworth, I.S.; Zuo, Z.; Chow, M.S.S.; Chow, A.H.L., 2005, Physicochemical and Structural Characterization of Quercetin- β -Cyclodextrin Complexes, *J Pharm Sci* **94**(5): 1079–1089.
- [176] Haiyun, D.; Jianbin, C.; Guomei, Z.; Shaomin, S.; Jinhao, P., 2003, Preparation and spectral investigation on inclusion complex of β -cyclodextrin with rutin, *Spectrochim Acta A* **59**: 3421–3429.
- [177] Pralhad, T.; Rajendrakumar, K., 2004, Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis, *J Pharmaceut Biomed* **34**: 333–339.
- [178] Wang, Y.; Qiao, X.; Li, W.; Zhou, Y.; Jiao, Y.; Yang, C.; Dong, C.; Inoue, Y.; Shuang, S., 2009, Study on the complexation of isoquercitrin with β -cyclodextrin and its derivatives by spectroscopy, *Anal Chim Acta* **650**: 124–130.
- [179] M.L. Calabro, S. Tommasini, P. Donato, R. Stancanelli, D. Raneri, S. Catania, C. Costa, V. Villari, P. Ficarra, R. Ficarra, 2005, The rutin/ β -cyclodextrin interactions in fully aqueous solution: spectroscopic studies and biological assays, *J Pharmaceut Biomed* **36**: 1019–1027.
- [180] Fang, Z.; Bhandari, B., 2010, Encapsulation of Polyphenols, *Trends Food Sci Tech* **21**: 510–523.
- [181] Kumari, A.; Yadav, S.K.; Pakade, Y.B.; Singh, B.; Yadav, S.C., 2010, Development of biodegradable nanoparticles for delivery of quercetin, *Colloid Surfaces B* **80**: 184–192.
- [182] Grabielle-Madelmont, C.; Lesieur, S.; Ollivon, M., 2003, Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography, *J Biochem Bioph Meth* **56**: 189–217.
- [183] Weissig, V., *Liposomes – Methods and Protocols*, Humana Press, **2010**.
- [184] Prokop, A., *Intracellular Delivery, Fundamentals and Applications*, Springer, **2011**.
- [185] Coneac, G.; Gafițanu, E.; Hădărugă, D.I.; Hădărugă, N.G.; Riviș, A.; Bandur, G.N.; **Pînzaru, I.A.**; Rusu, G.; Urșica, L.; Păunescu, V.; Gruia, A.; Sebeșan, M.; Grozescu, I.; Lazău, C.; Sfirloagă, P., 2008, Propolis Extract/ β -Cyclodextrin Nanoparticles: Synthesis, Physico-Chemical, and Multivariate Analyses, *J Agroalim Proc Technol* **14**: 58–70.
- [186] Coneac, G.; Gafițanu, E.; Hădărugă, D.I.; Hădărugă, N.G.; **Pînzaru, I.A.**; Bandur, G.; Urșica, L.; Păunescu, V.; Gruia, A., 2008, Flavonoid Contents of Propolis from the West Side of Romania and Correlation with the Antioxidant Activity, *Chem Bull "Politehnica" Univ (Timișoara)* **53**: 56–60.

- [187] Coneac, G.; Gafițanu, E.; Hădărugă, D.I.; Hădărugă, N.G.; **Pînzaru, I.A.**; Radu, Ana-Maria; Radu, Anca; Pantis, Violeta; Bandur, G.; Urșica, L.; Păunescu, V.; Gruia, A., Flavonoid contents of propolis from the west side of Romania and correlation with the antioxidant activity, *International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, 60 Years of Chemical Engineering Education*, Timișoara, 28-30 May **2008**.
- [188] **Pînzaru, I.A.**; Hădărugă, D.I.; Hădărugă, N.G.; Peter, F., Effect of Water Content on Enzymatic Esterification of Flavonoids and Flavonosides, *3rd European Chemistry Congress*, 29.08-02.09.**2010**, Nurnberg, Germany.
- [189] **Pînzaru, I.A.**, D. I. Hădărugă, N. G. Hădărugă, F. Peter, 2011, Rutin-saturated fatty acid bioconjugate/cyclodextrin supramolecular systems: molecular modeling and docking studies, *J Agroalim Proc Technol* **17**: 108-114.
- [190] **Pînzaru, I.A.**, Hădărugă, D.I., Hădărugă, N.G, Corpaș, L., Grozescu, I., Peter, F., 2011, Hepatoprotective flavonoid bioconjugate / β -cyclodextrin nanoparticles: DSC – molecular modeling correlation, *Dig J Nanomater Bios* **6**: 1605-1617.
- [191] Hădărugă, D.I.; **Pînzaru, I.A.**; Hădărugă, N.G.; Peter, F., New flavonoid derivative (silybin, rutin-fatty acid bioconjugates)/cyclodextrin supramolecular systems with potential hepatoprotective activity, *The 2nd European Conference on Cyclodextrins*, 2-4 October, **2011**, Asti, Italy.

ANEXE

ANEXA A – FLAVONOIDE

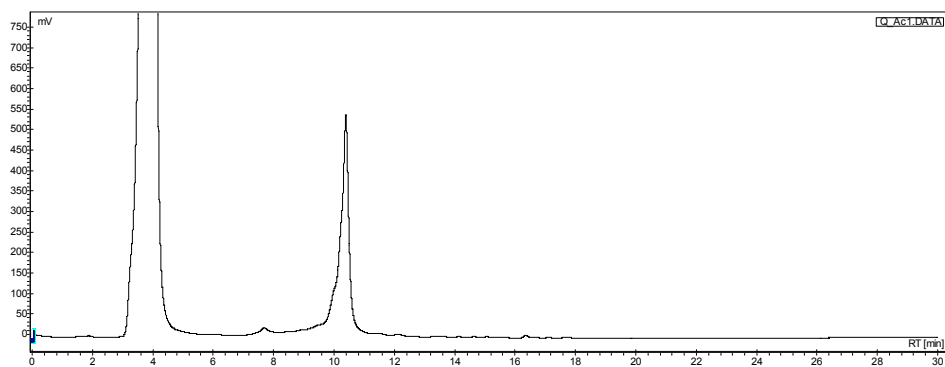


Figura 1. Cromatograma HPLC a quercetinei obținută în condițiile: solventi H₂O (0.1% AcOH) și acetonitril (0.1% AcOH), lungime de undă de 280 nm, timp de 30 minute

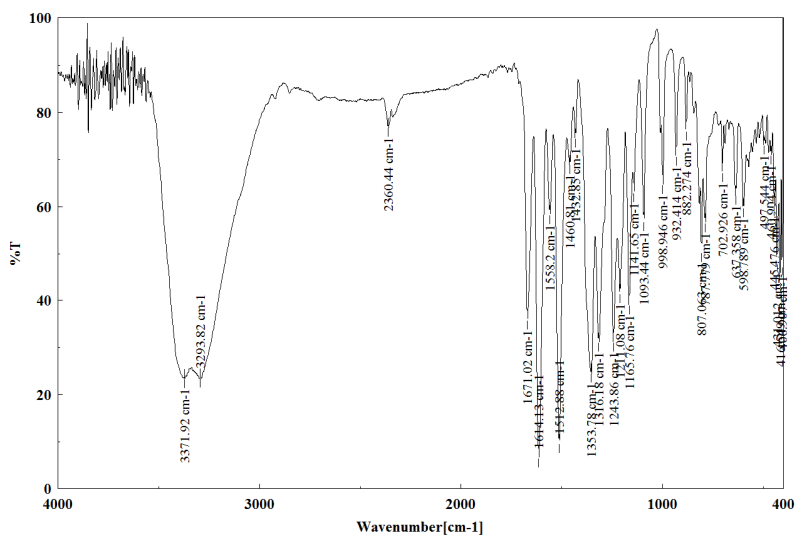


Figura 2. Spectrul FT-IR al quercetinei în pastilă de KBr

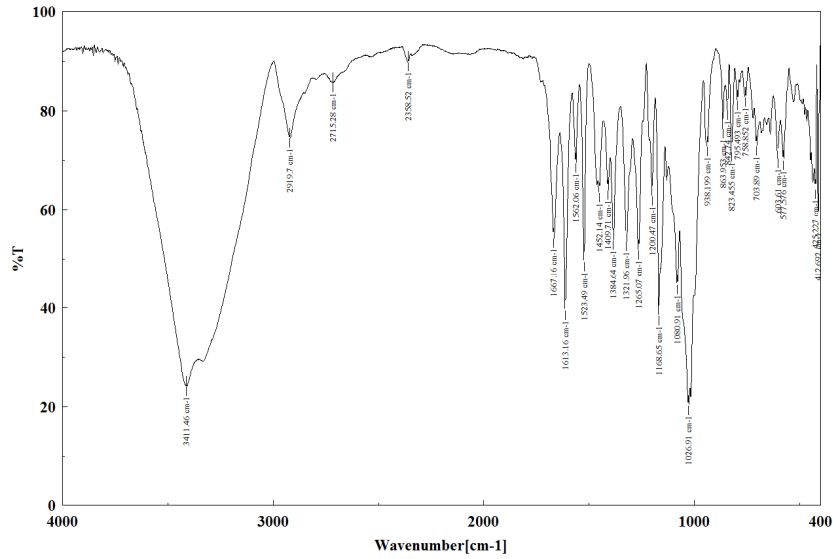


Figura 3. Spectrul FT-IR al complexului quercetinei/ β CD în pastilă de KBr

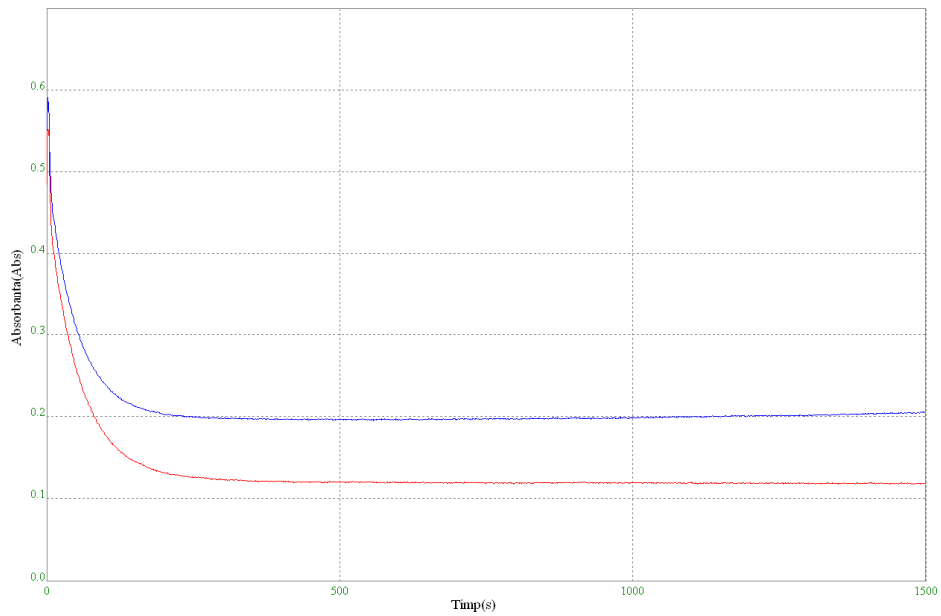


Figura 4. Variația absorbanței DPPH, în timp, în prezența complexelor quercetină/ α CD (soluție apoasă - roșu) și quercetină/ β CD (soluție apoasă - albastru)

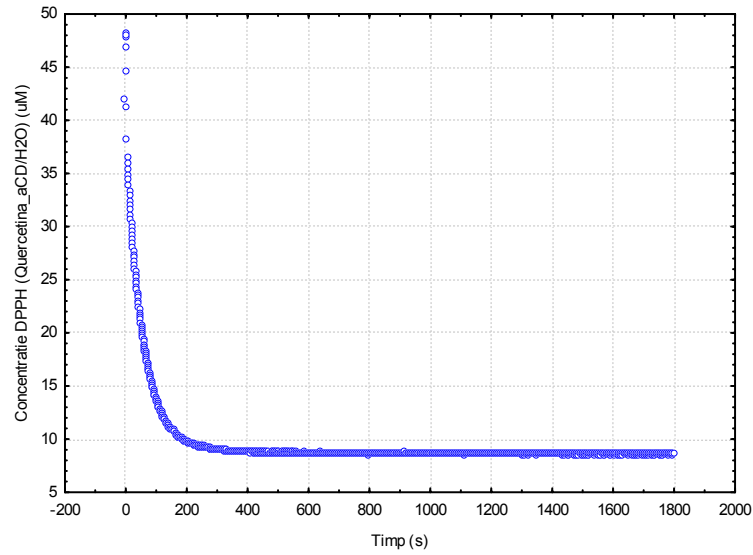


Figura 5. Evaluarea vitezei de reacție a DPPH pentru quercetină/ α CD (soluție apoasă)

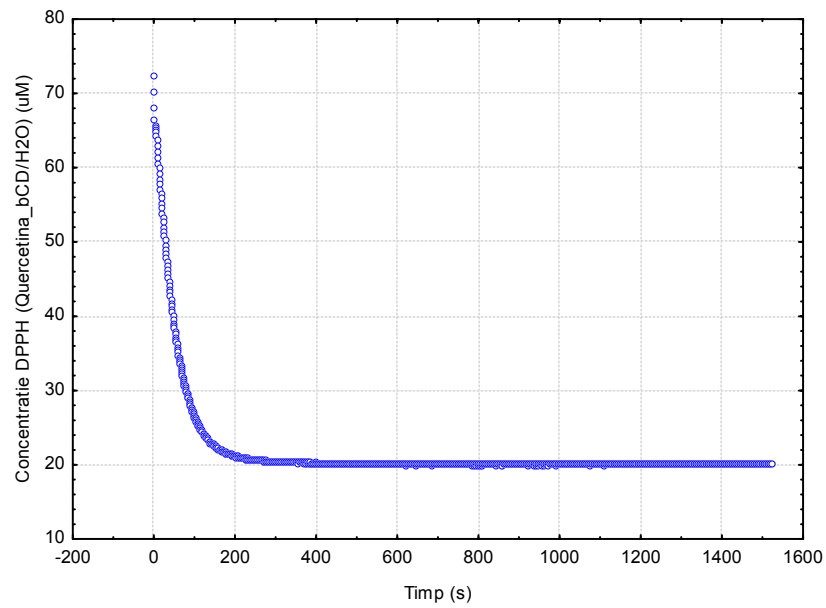


Figura 6. Evaluarea vitezei de reacție a DPPH pentru complexul quercetină/ β CD (soluție apoasă)

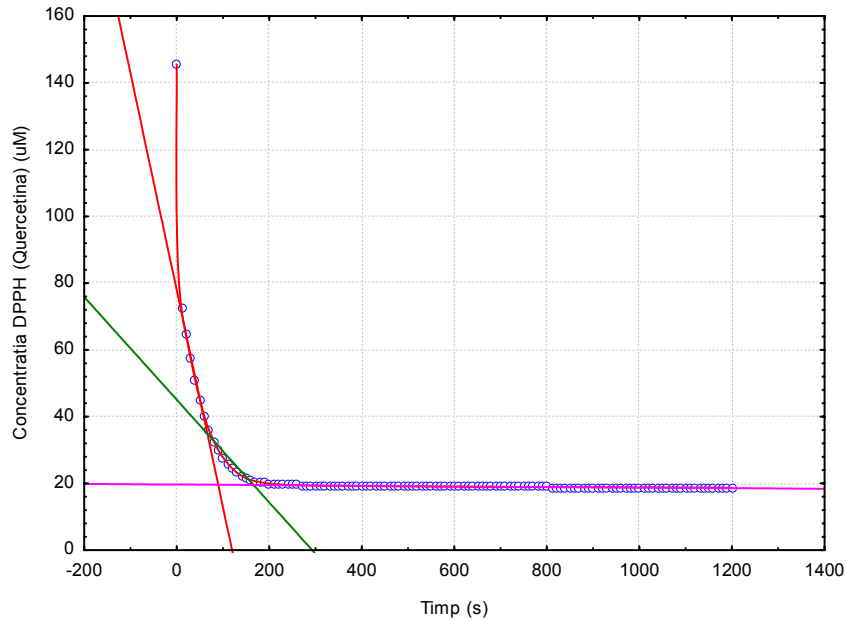


Figura 7. Evaluarea vitezei de reacție a DPPH pentru quercetina

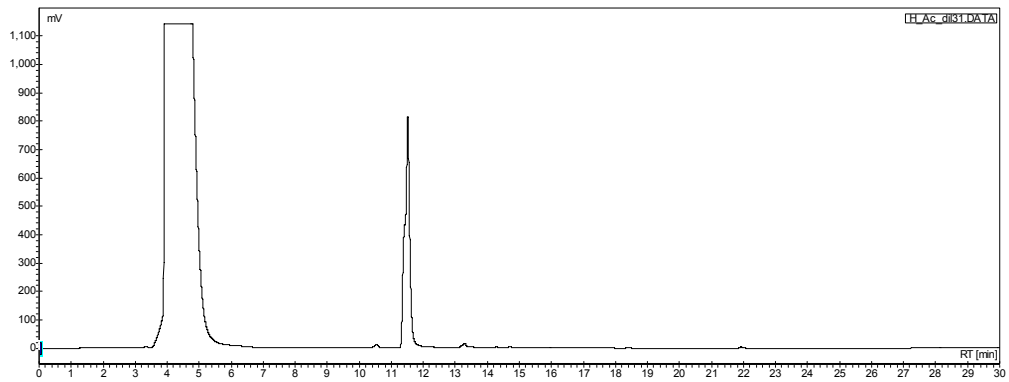


Figura 8. Cromatograma HPLC a hesperetinei obținută în condițiile: solvenți H₂O (0.1% AcOH) și acetonitril (0.1% AcOH), lungime de undă de 280 nm, timp de 30 minute

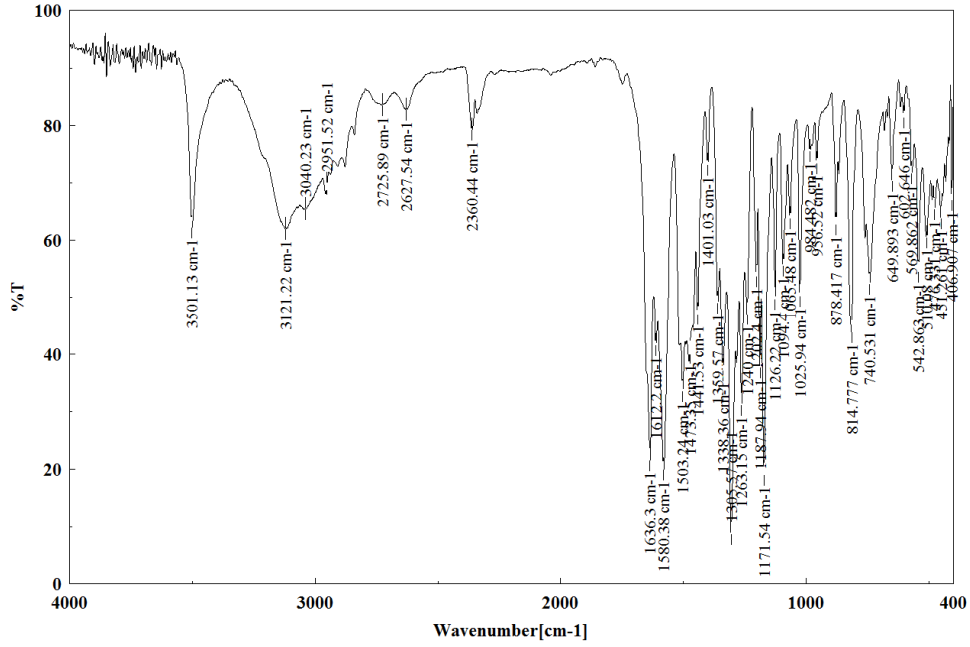


Figura 9. Spectrul FT-IR al hesperetiei în pastilă de KBr

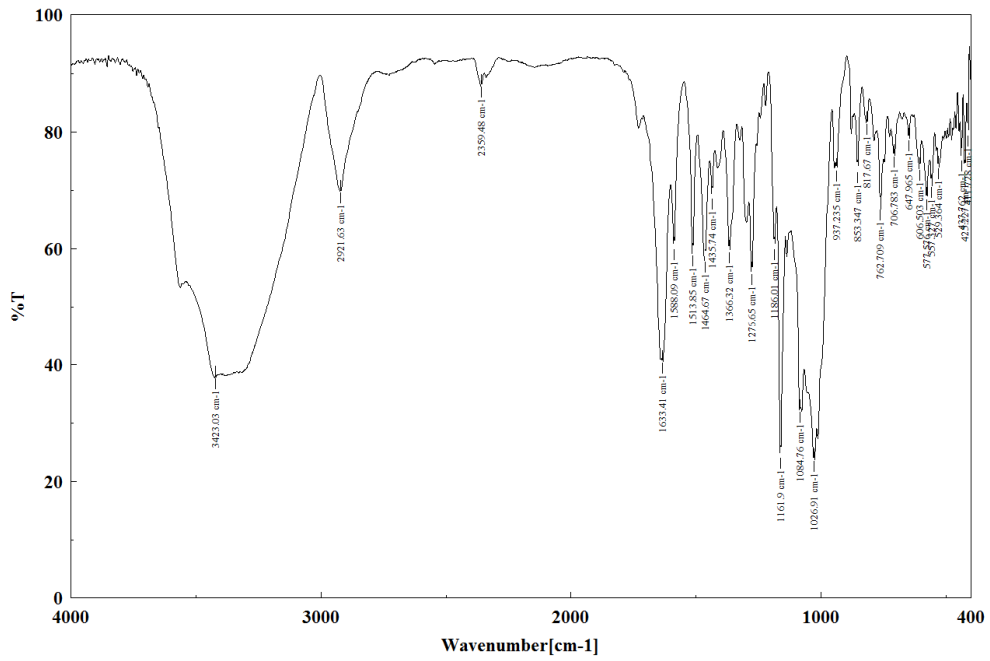


Figura 10. Spectrul FT-IR al complexului hesperetină/βCD în pastilă de KBr

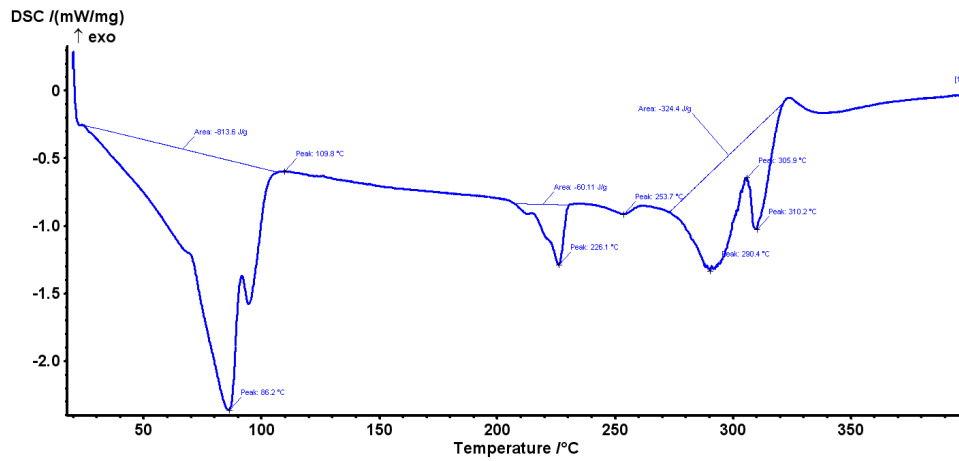


Figura 11. Analiza DSC a complexului hesperetină/ β CD (pe intervalul de temperatură 20-400°C, cu o încălzire de 4°C/min)

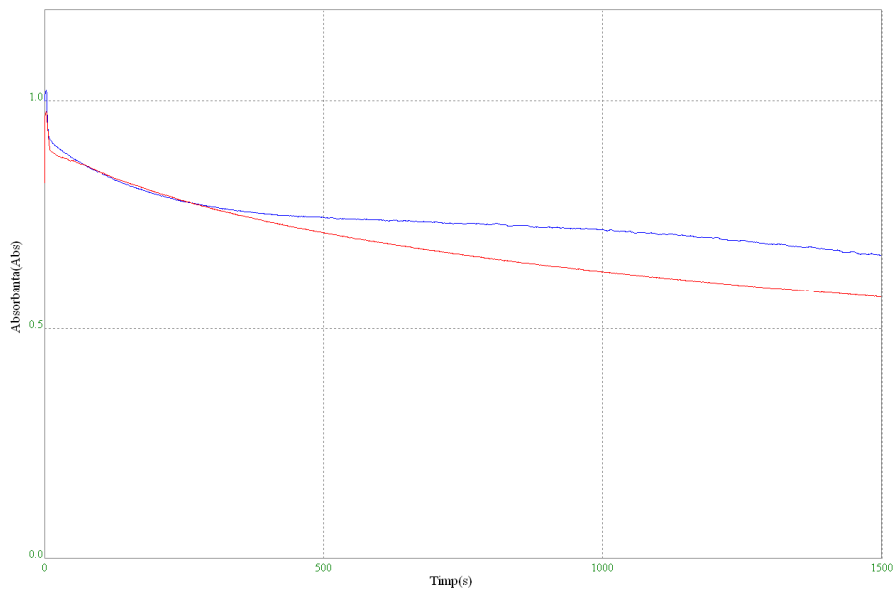


Figura 12. Variația absorbanței DPPH în timp în prezența complexului hesperetină/ α CD (soluție apoasă - roșu) și hesperetină/ β CD (soluție apoasă - albastru)

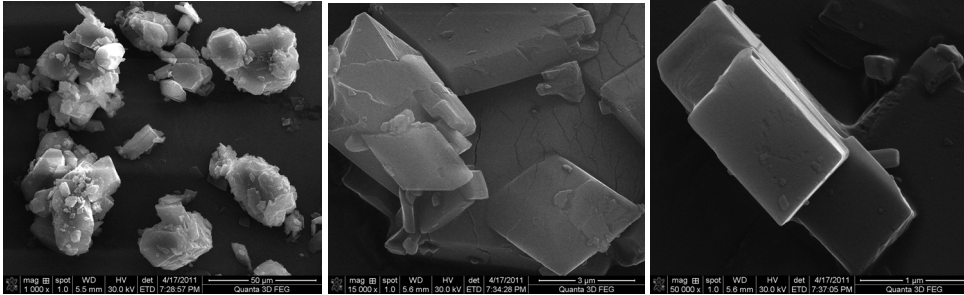


Figura 13. Imaginile SEM pentru complexul hesperetină/ β CD obținut prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă

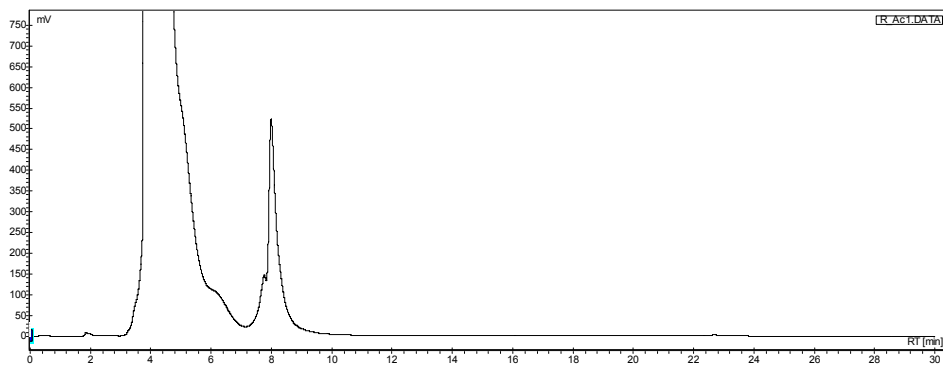


Figura 14. Cromatograma HPLC a rutinei obținută în condițiile: solvenți H_2O (0.1% AcOH) și acetonitril (0.1% AcOH), lungime de undă de 280 nm, timp de 30 minute

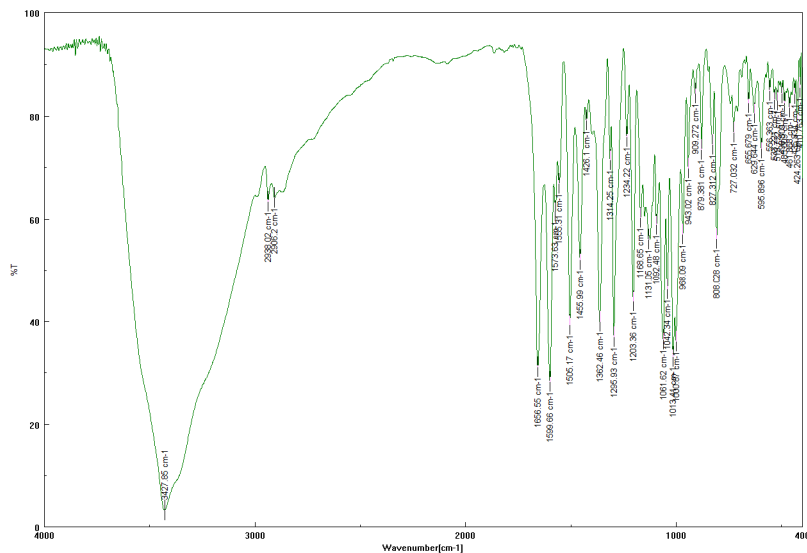


Figura 15. Spectrul FT-IR al rutinei în pastilă de KBr

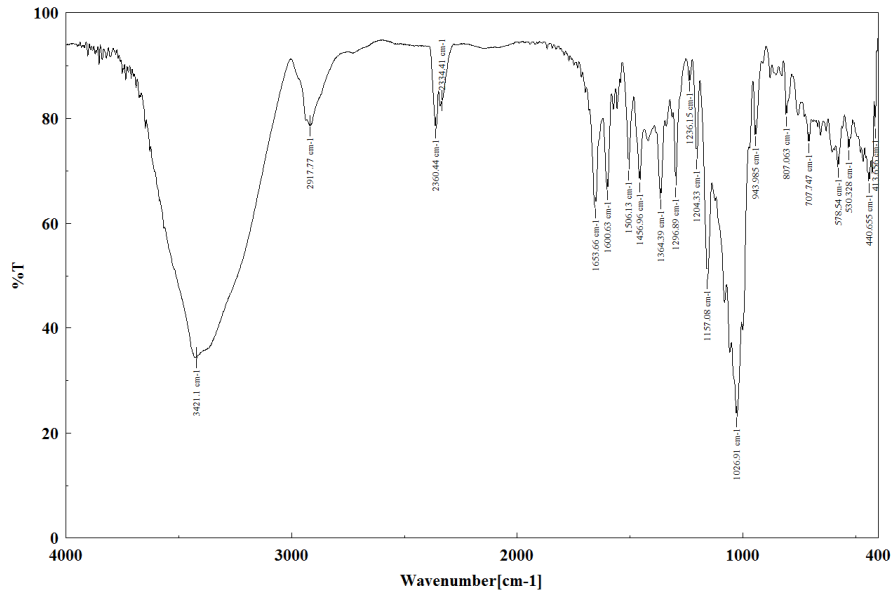


Figura 16. Spectrul FT-IR al complexului rutină/βCD în pastilă de KBr

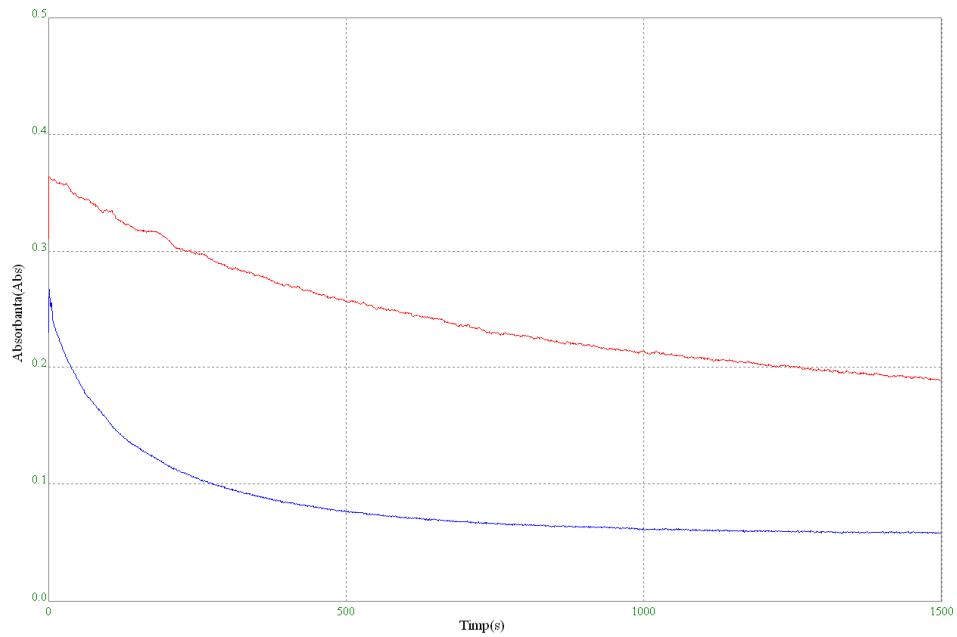


Figura 17. Variația absorbanței DPPH în timp în prezența complexelor rutină/αCD (soluție apoasă - albastru) și rutină/αCD (soluție etanolică - rosu)

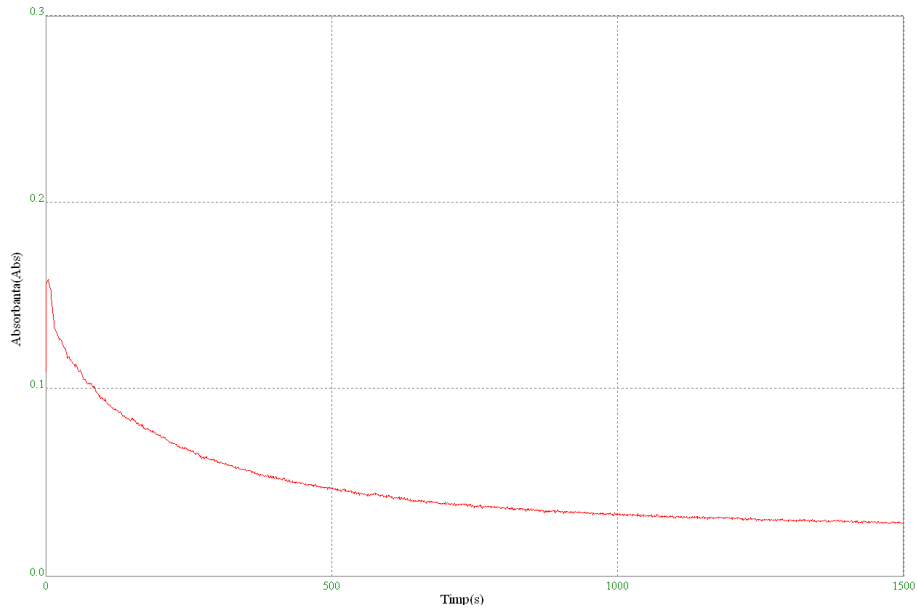


Figura 18. Variația absorbanței DPPH în timp în prezența complexului rutină/ β CD (soluție apoasă)

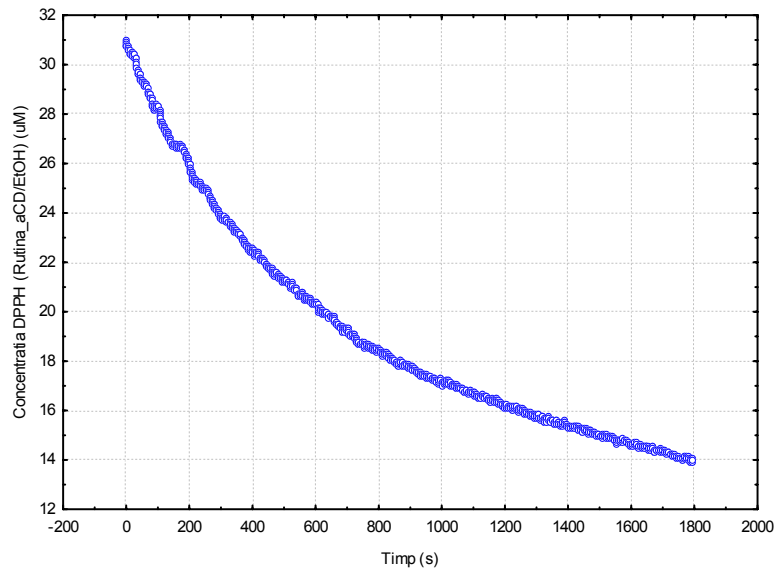


Figura 19. Evaluarea vitezei de reacție a DPPH pentru complexul rutină/ α CD (soluție etanolică)

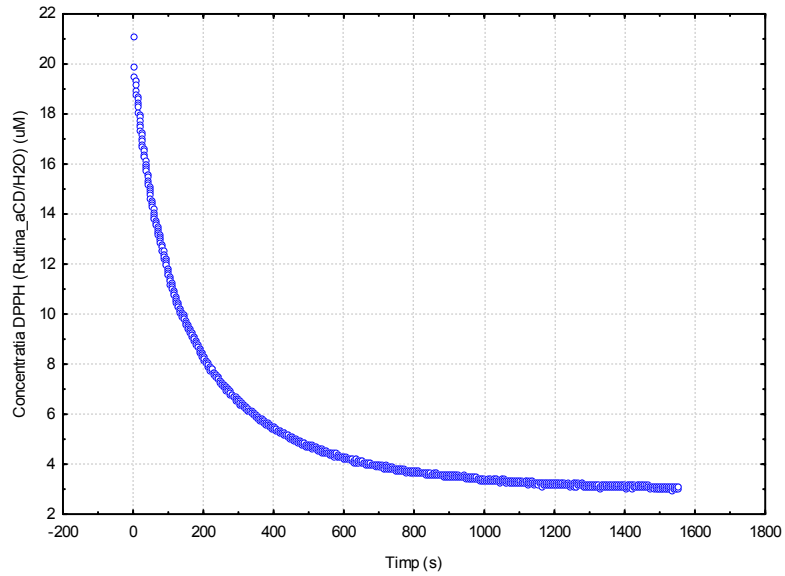


Figura 20. Evaluarea vitezei de reacție a DPPH pentru complexul rutină/αCD (soluție apoasă)

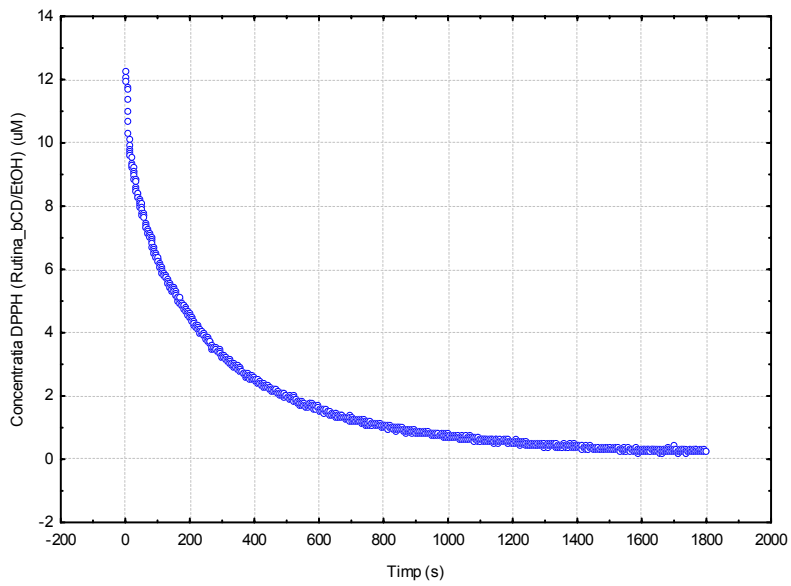


Figura 21. Evaluarea vitezei de reacție a DPPH pentru complexul rutină/βCD (soluție etanolică)

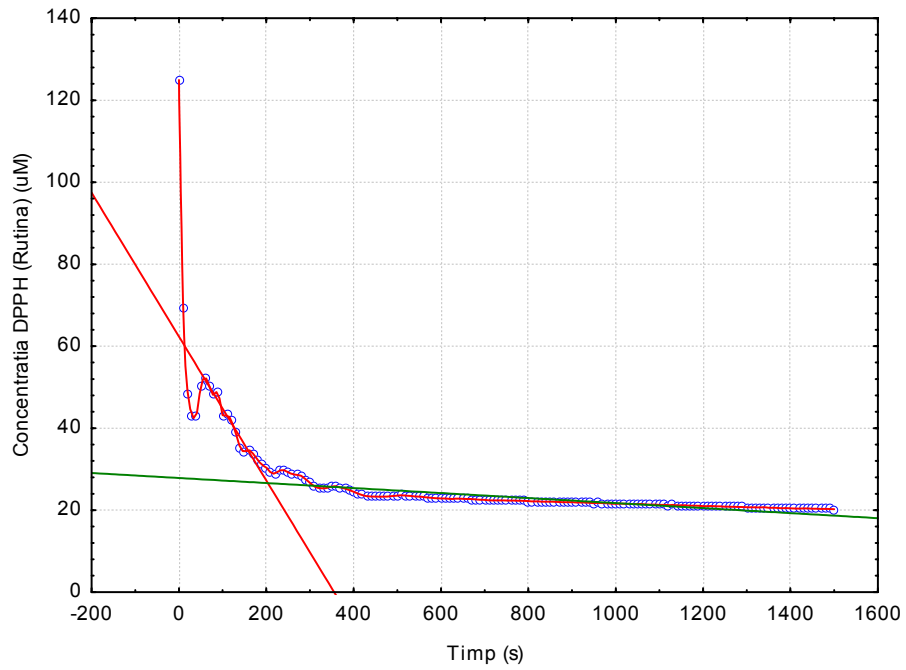


Figura 22. Evaluarea vitezei de reacție a DPPH pentru rutină/ βCD

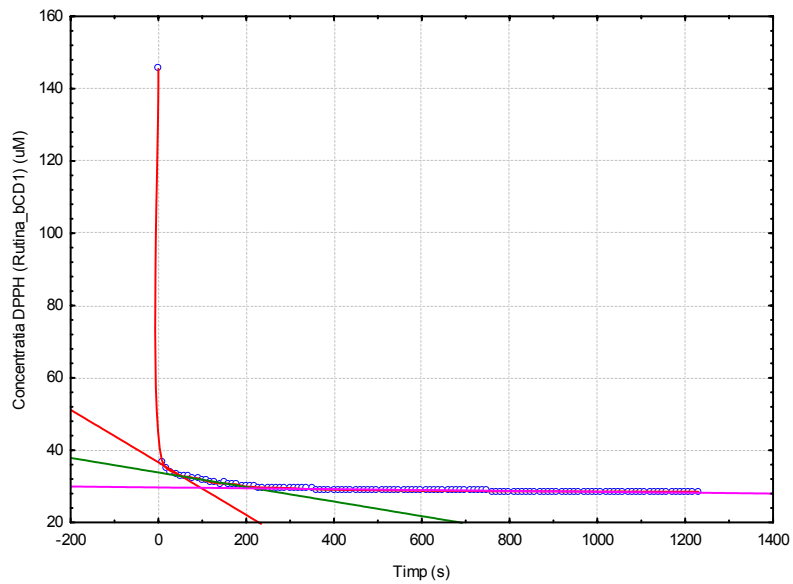


Figura 23. Evaluarea vitezei de reacție a DPPH pentru complexul rutină/ βCD

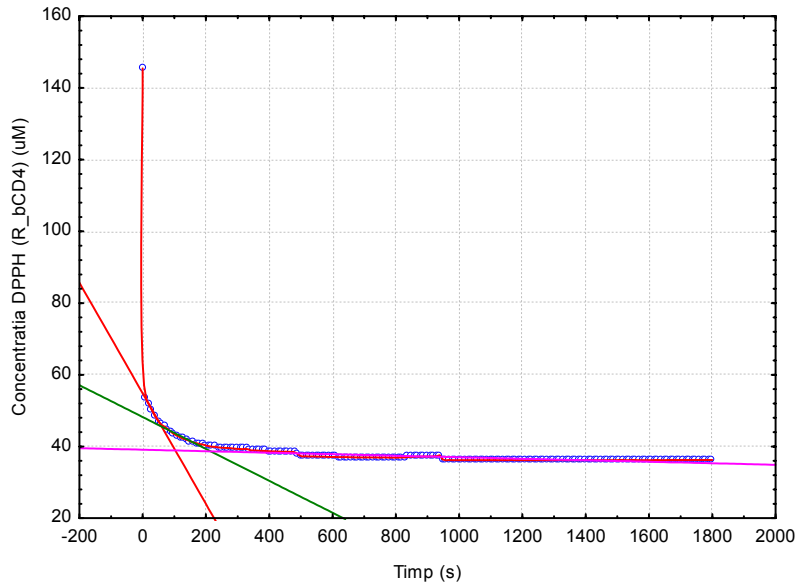


Figura 24. Evaluarea vitezei de reacție a DPPH pentru complexul rutină/ β CD

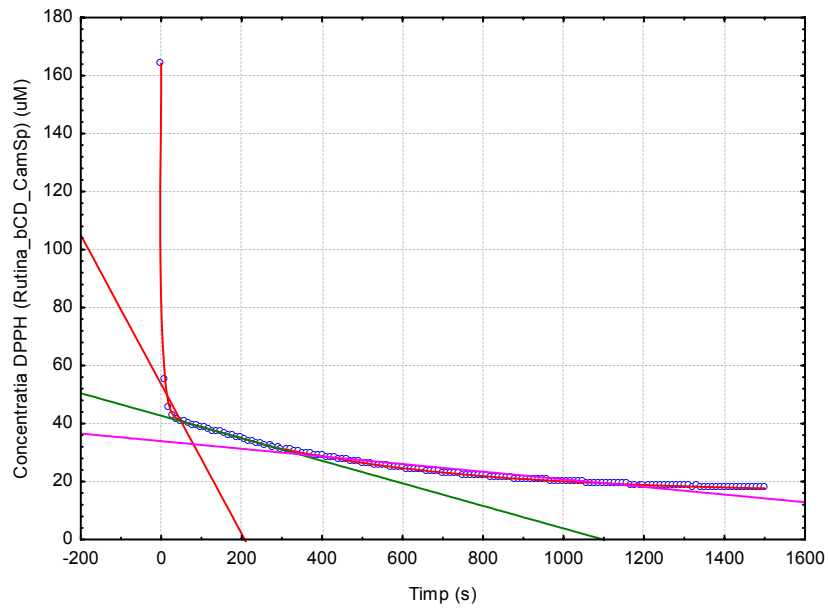


Figura 25. Evaluarea vitezei de reacție a DPPH pentru complexul rutină/ β CD

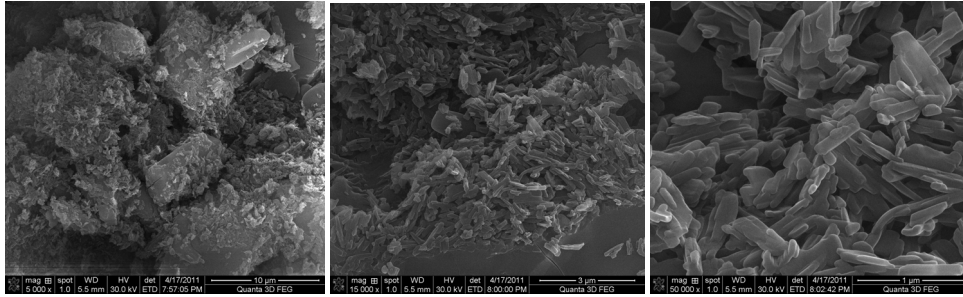


Figura 26. Imaginile SEM pentru complexul rutină/ α CD obținut prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă

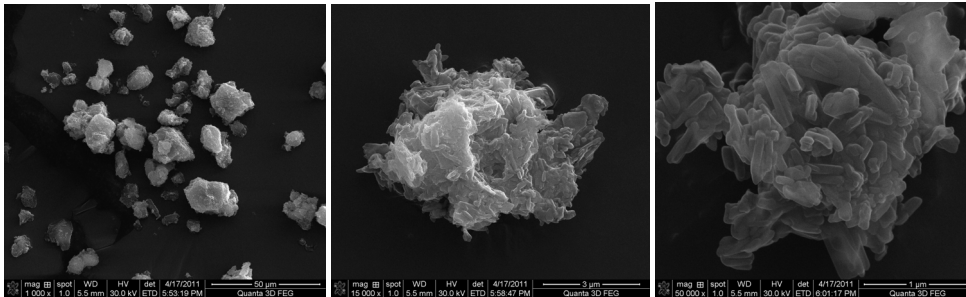


Figura 27. Imaginile SEM pentru complexul rutină/ β CD obținut prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă

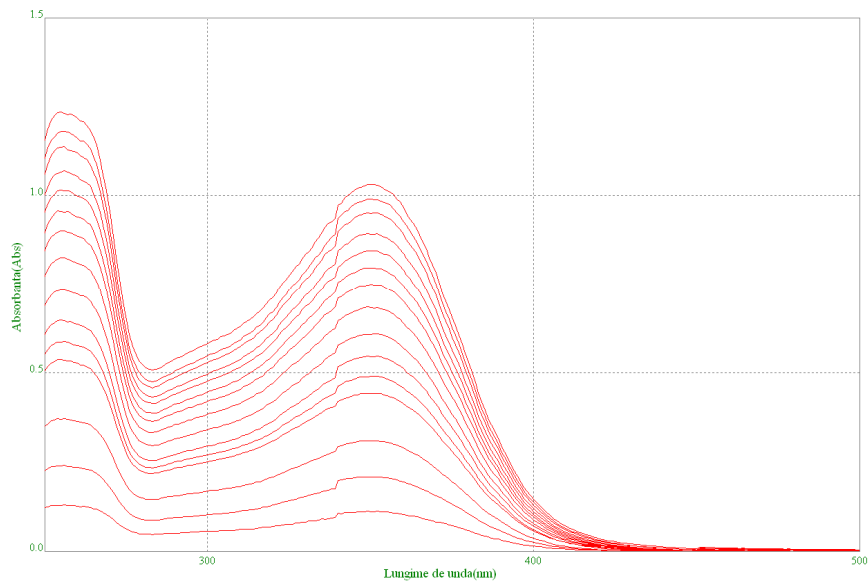


Figura 28. Spectrul UV-VIS al rutinei, la transfer membranal în soluție de ser fiziologic

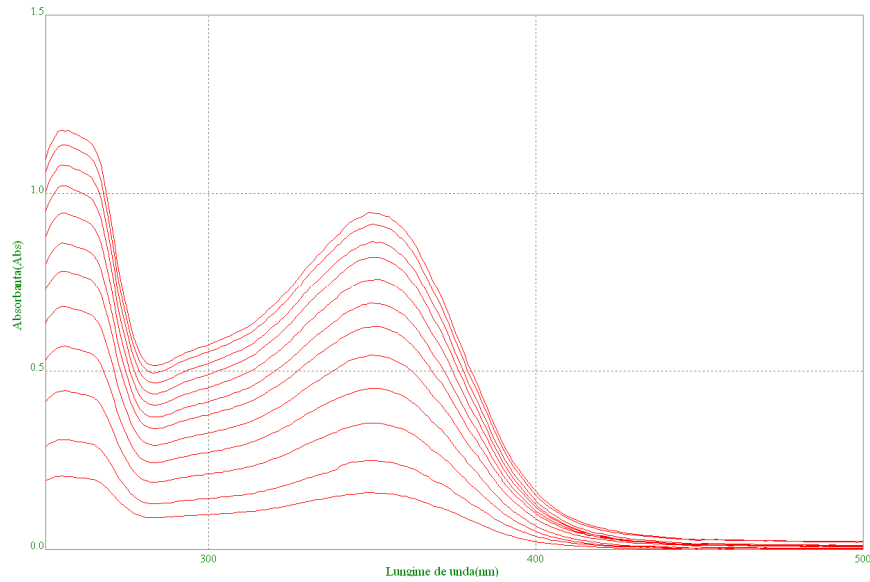


Figura 29. Spectrul UV-VIS al complexului rutinei cu α CD, la transfer membranal în soluție de ser fiziologic

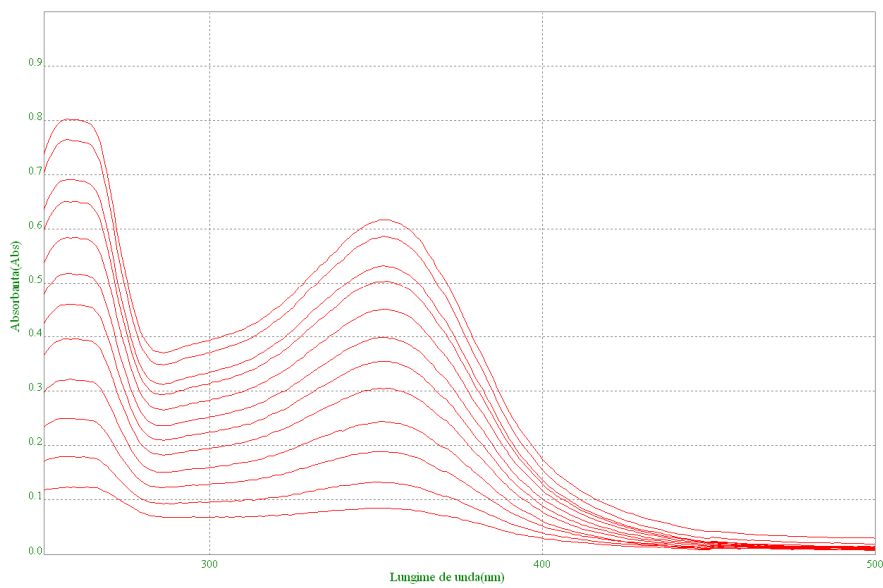


Figura 30. Spectrul UV-VIS al complexului rutinei cu β CD, la transfer membranal în soluție de ser fiziologic

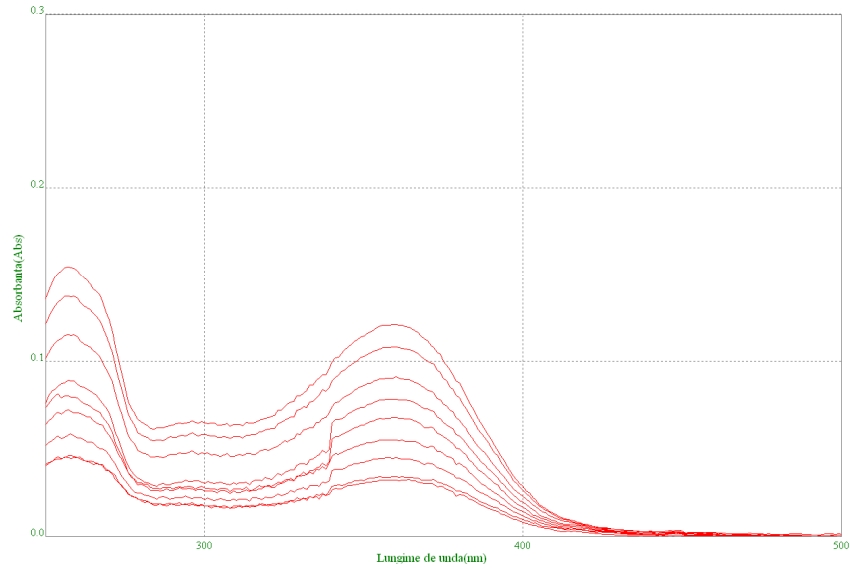


Figura 31. Spectrul UV-VIS al complexului rutinei cu β CD, la transfer membranal în soluție etanolică 60%

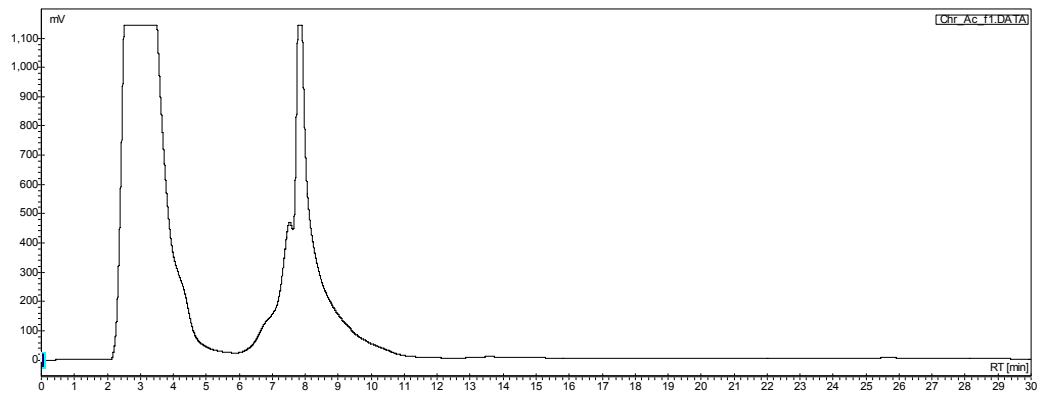


Figura 32. Cromatograma HPLC a rutinei, în acetonă

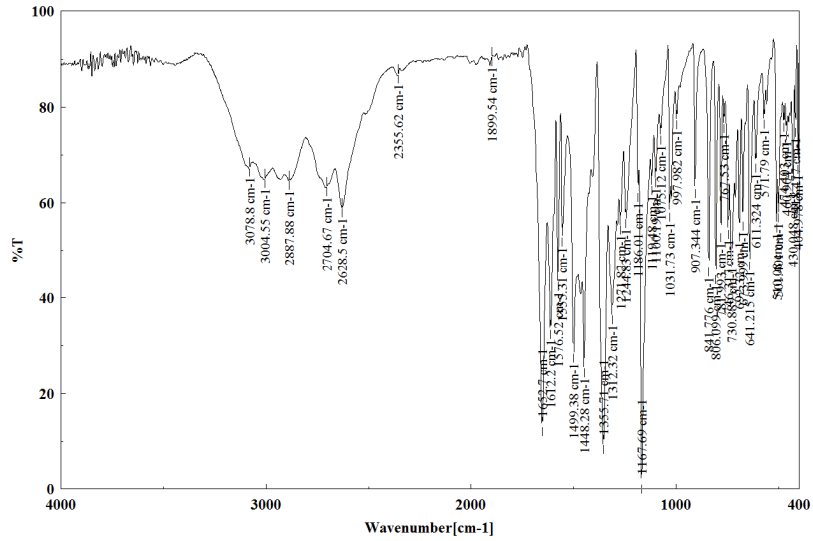


Figura 33. Spectrul FT-IR al crisinei în pastilă de KBr

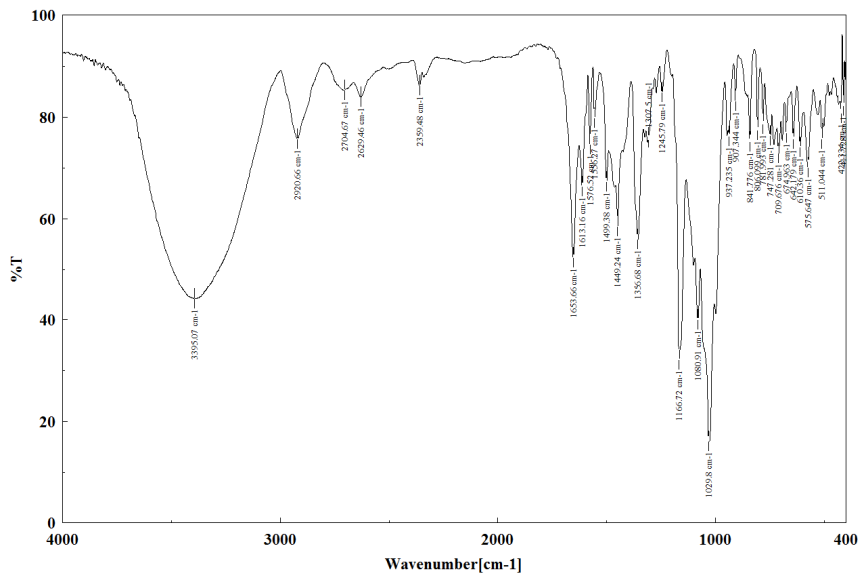


Figura 34. Spectrul FT-IR al complexului crisină/βCD în pastilă de KBr

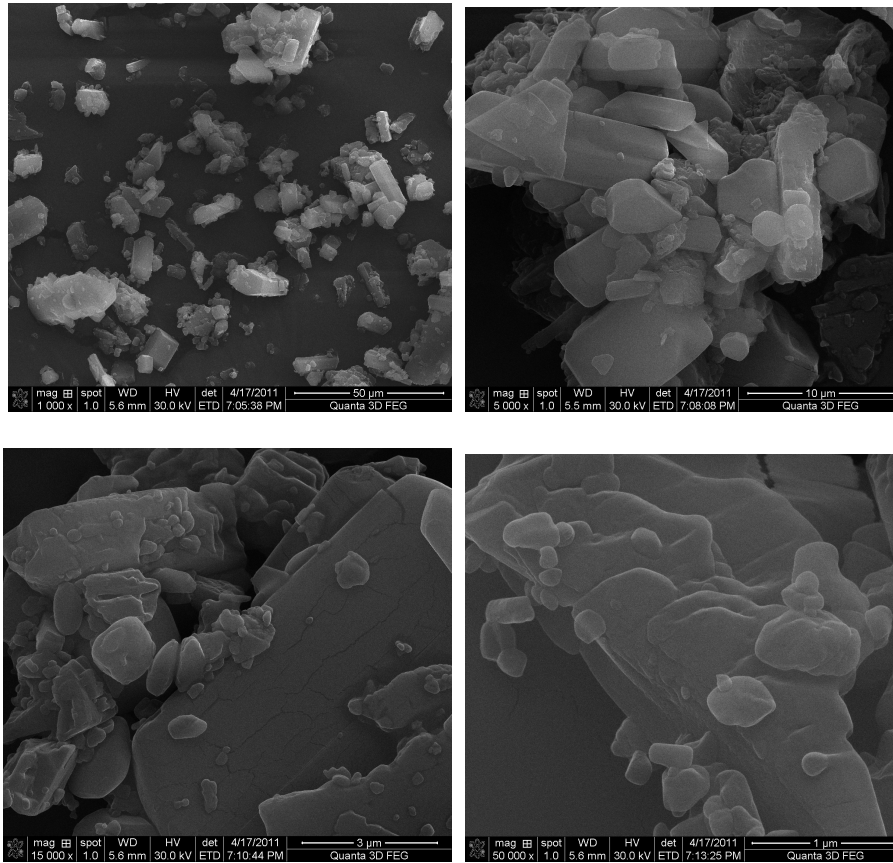


Figura 35. Imaginile SEM pentru complexul crisină/ α CD obținut prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă

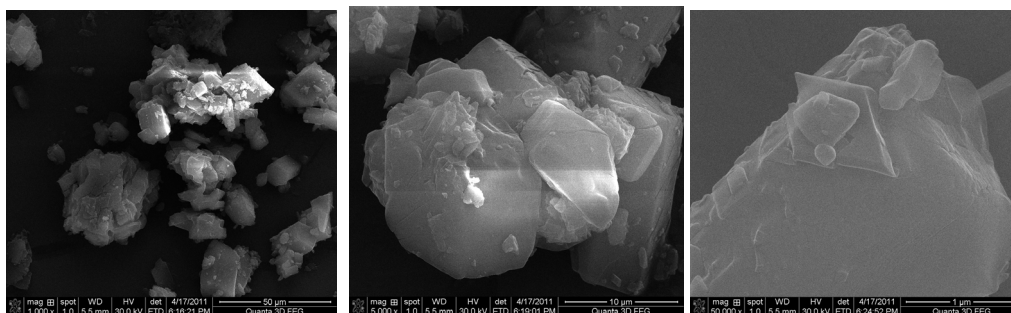


Figura 36. Cromatograma HPLC a naringeninei cu acid palmitic, în prezența enzimei PS, în acetona

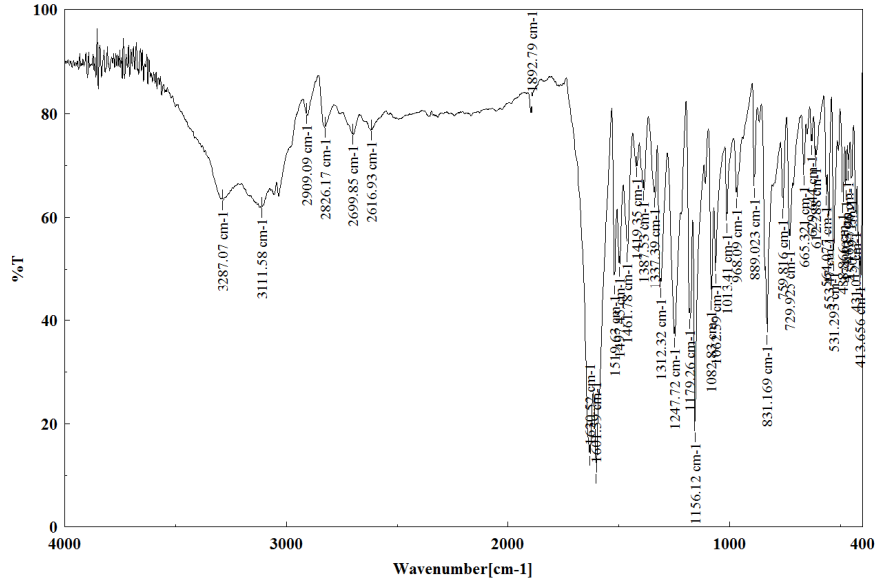


Figura 37. Spectrul FT-IR al naringeninei în pastilă de KBr

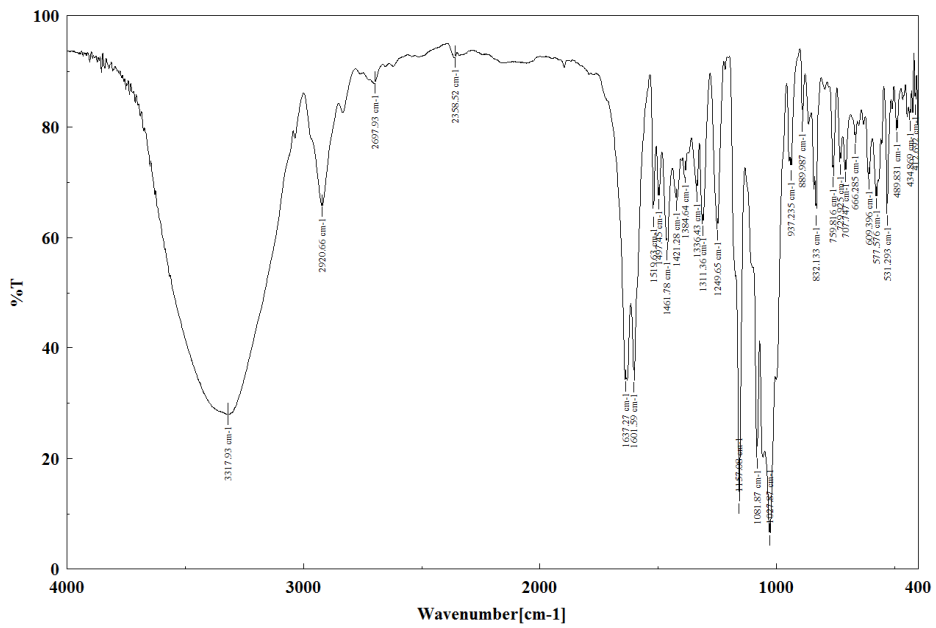


Figura 38. Spectrul FT-IR al complexului naringenină/βCD în pastilă de KBr

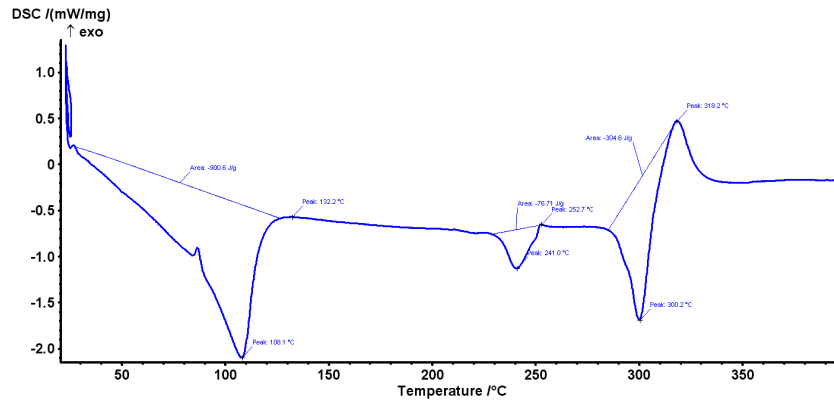


Figura 39. Analiza DSC a complexului naringenină/ β CD (pe intervalul de temperatură 20-400°C, cu o încălzire de 4°C/min)

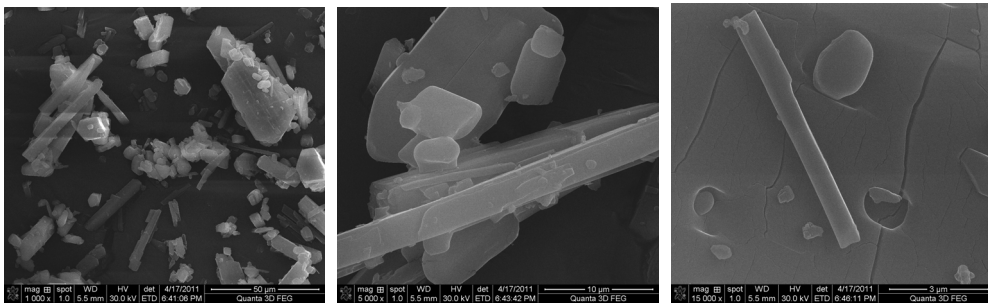


Figura 40. Imaginile SEM pentru complexul naringenină/ α CD obținut prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă

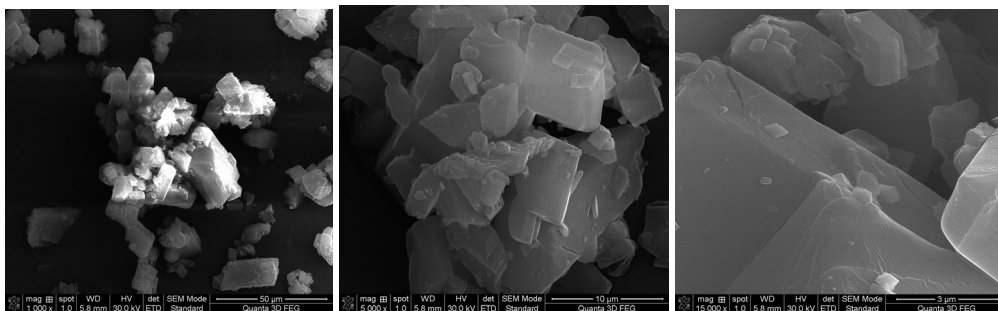


Figura 41. Imaginile SEM pentru complexul naringenină/ β CD obținut prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă

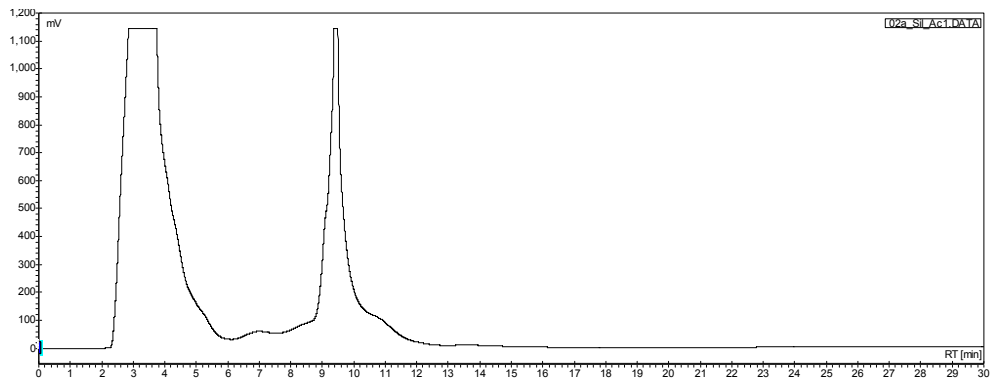


Figura 42. Cromatograma HPLC a silibininei, în acetonă

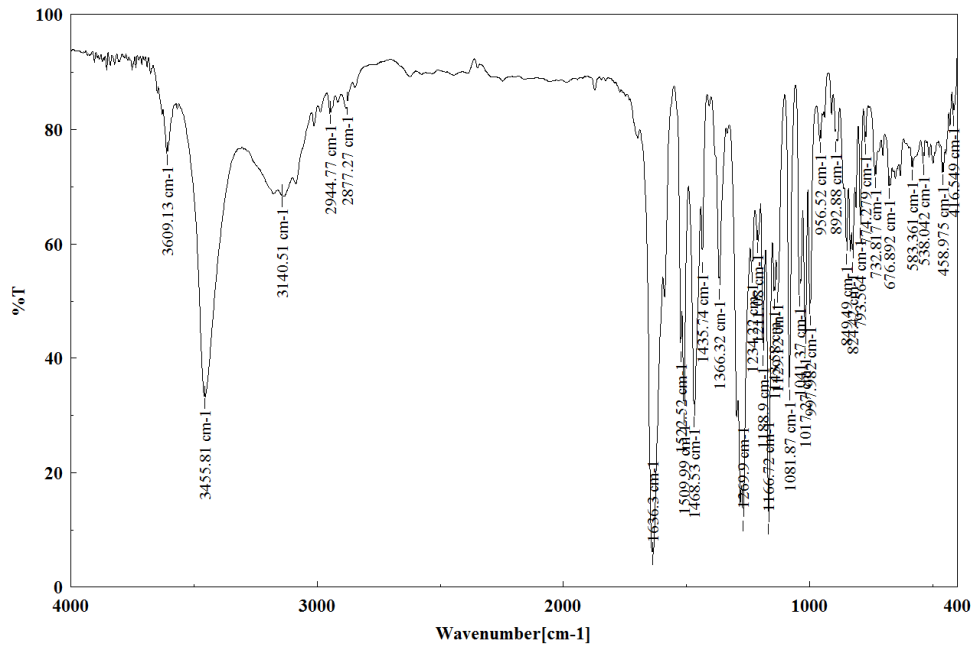


Figura 43. Spectrul FT-IR al silibininei în pastilă de KBr

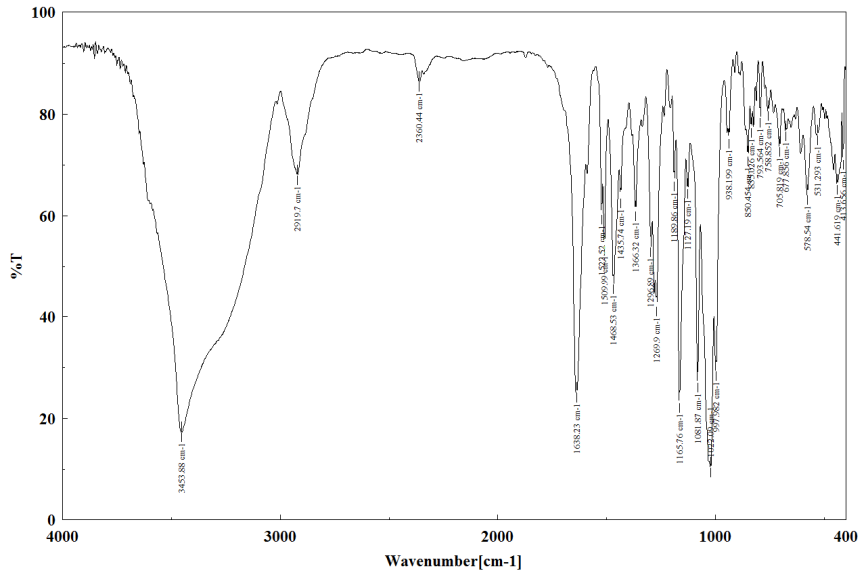


Figura 44. Spectrul FT-IR al complexului silibinină/ β CD în pastilă de KBr

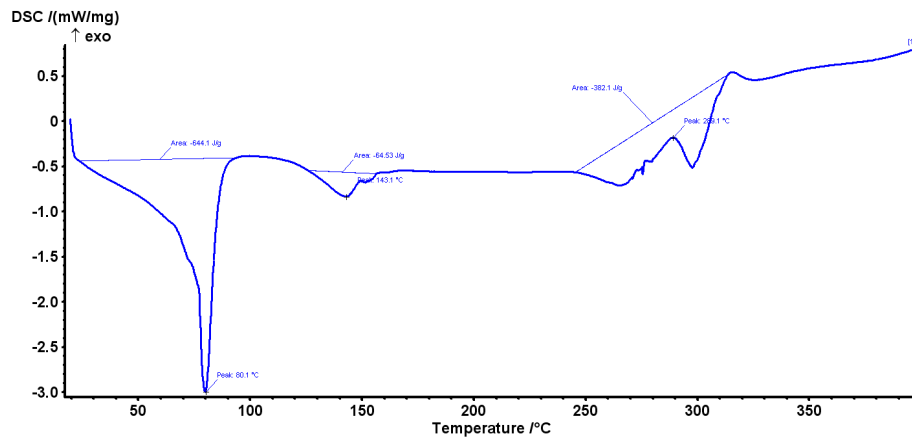


Figura 45. Analiza DSC a complexului silibinină/ β CD (pe intervalul de temperatură 20-400°C, cu o încălzire de 4°C/min)

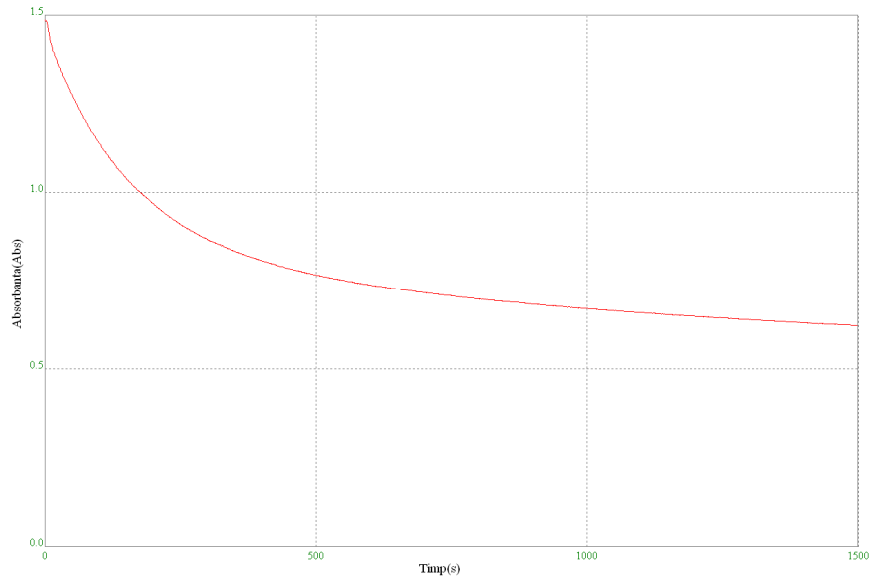


Figura 46. Variația absorbanței DPPH în timp în prezența complexului silibinină/ α CD (soluție apoasă)

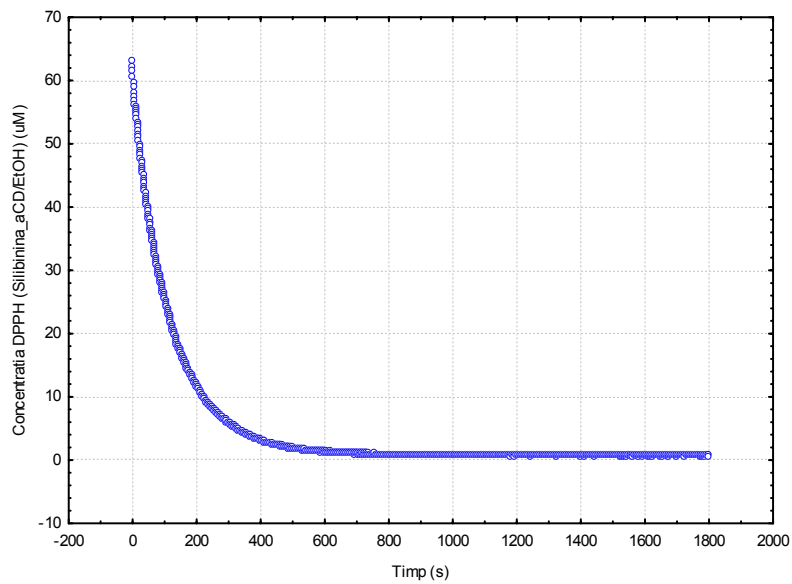


Figura 47. Evaluarea vitezei de reacție a DPPH pentru complexul silibinină/ α CD (soluție etanolică)

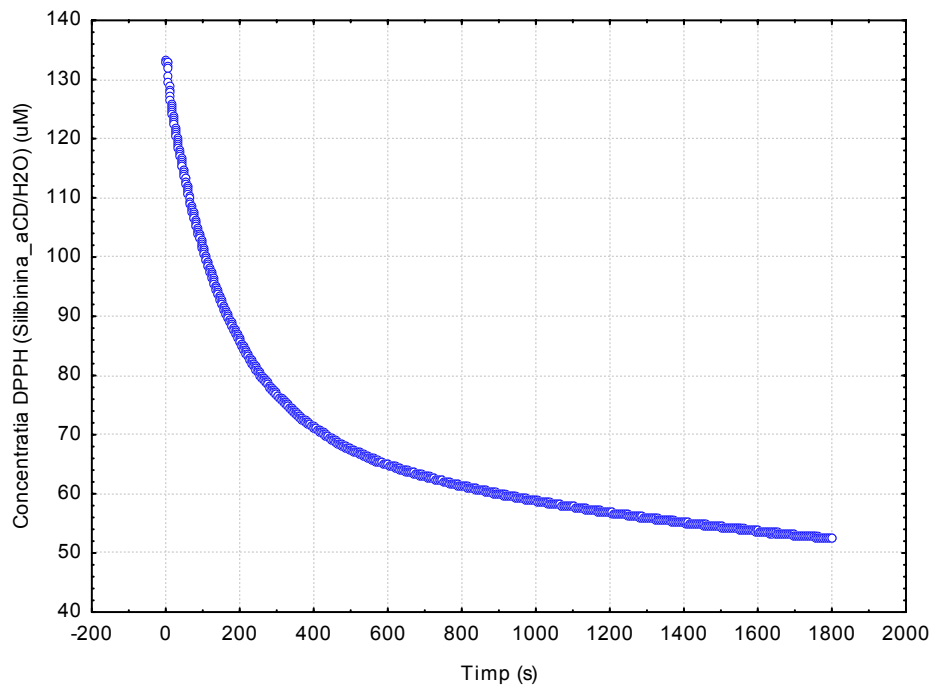


Figura 48. Evaluarea vitezei de reacție a DPPH pentru complexul silibinină/ α CD (soluție apoasă)

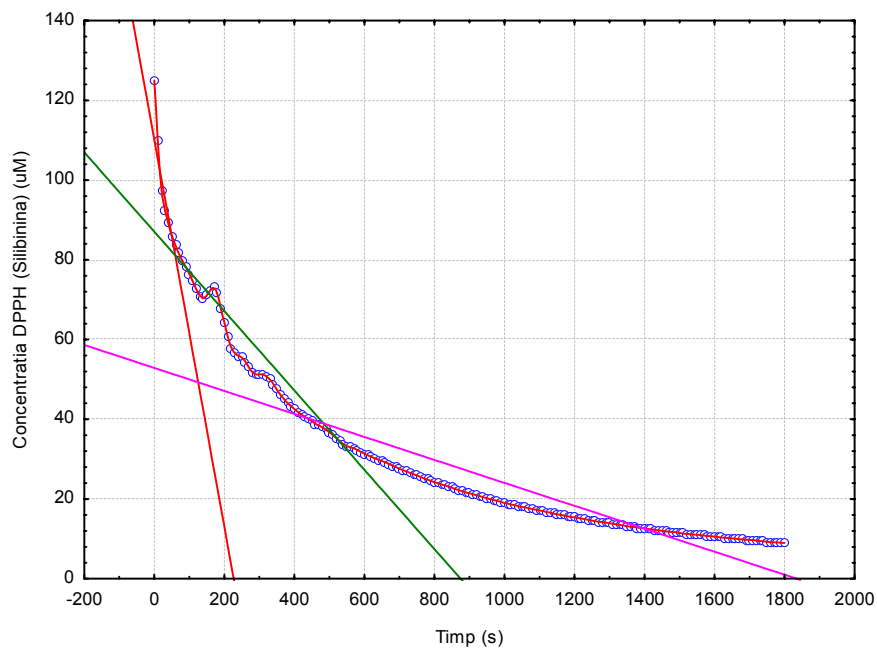


Figura 49. Evaluarea vitezei de reacție a DPPH pentru silibinină

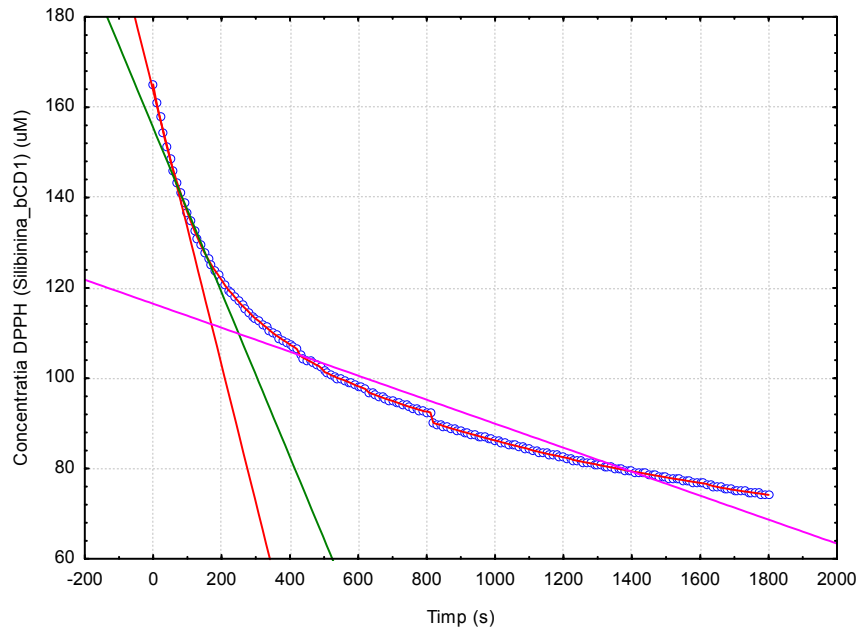


Figura 50. Evaluarea vitezei de reacție a DPPH pentru complexul silibinină/ β CD

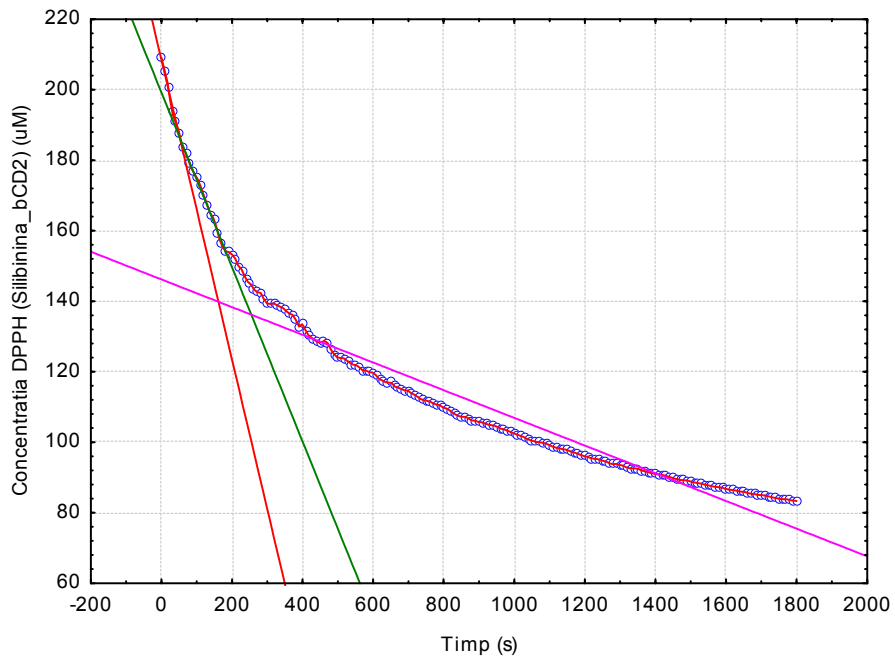


Figura 51. Evaluarea vitezei de reacție a DPPH pentru complexul silibinină/ β CD

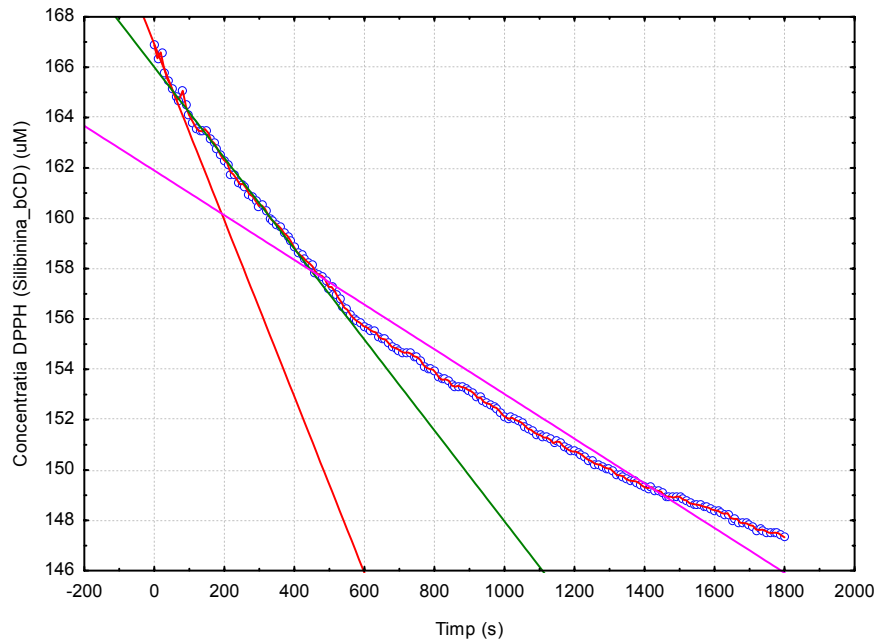


Figura 52. Evaluarea vitezei de reacție a DPPH pentru complexul silibinină/βCD

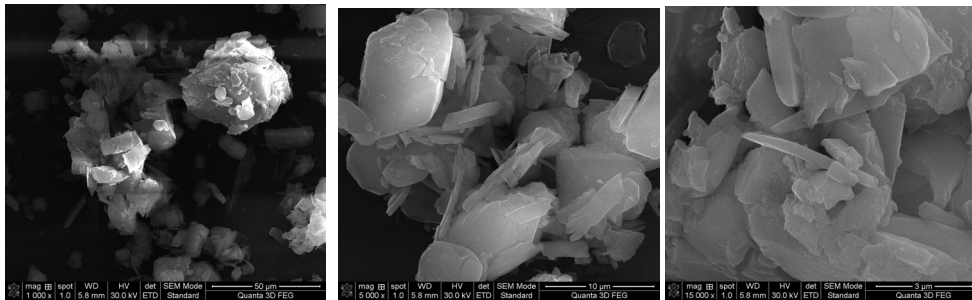


Figura 53. Imaginile SEM pentru complexul silibinină/βCD obținut prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă

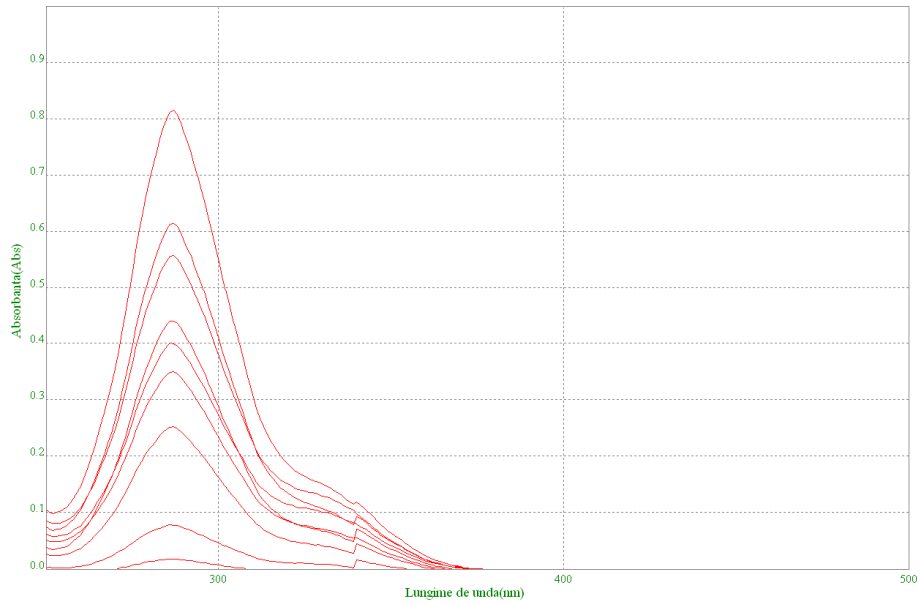


Figura 54. Spectrul UV-VIS al silibininei, la transfer membranal în soluție etanolică 60%

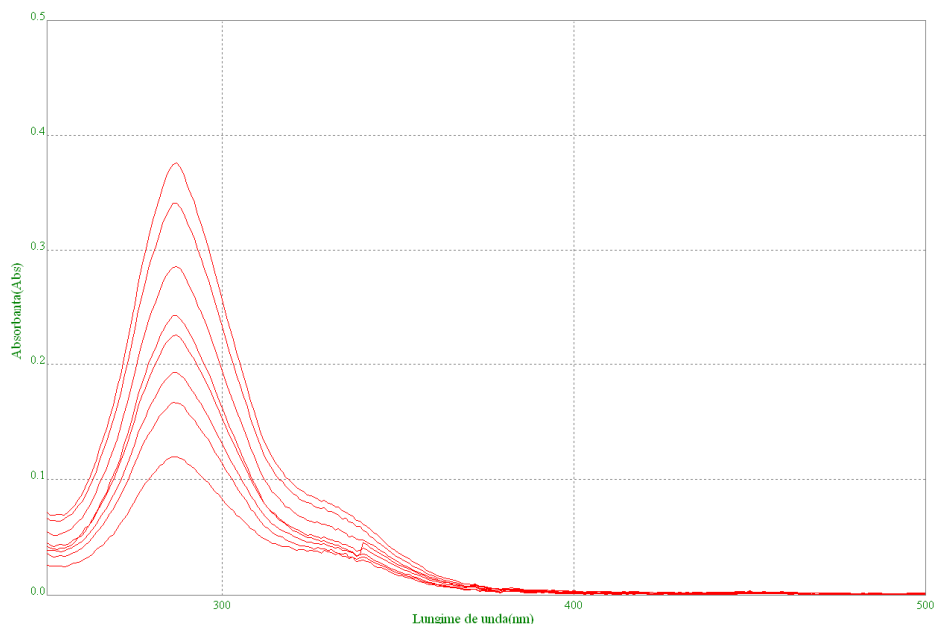


Figura 55. Spectrul UV-VIS al complexului silibininei cu β CD, la transfer membranal în soluție etanolică 60%

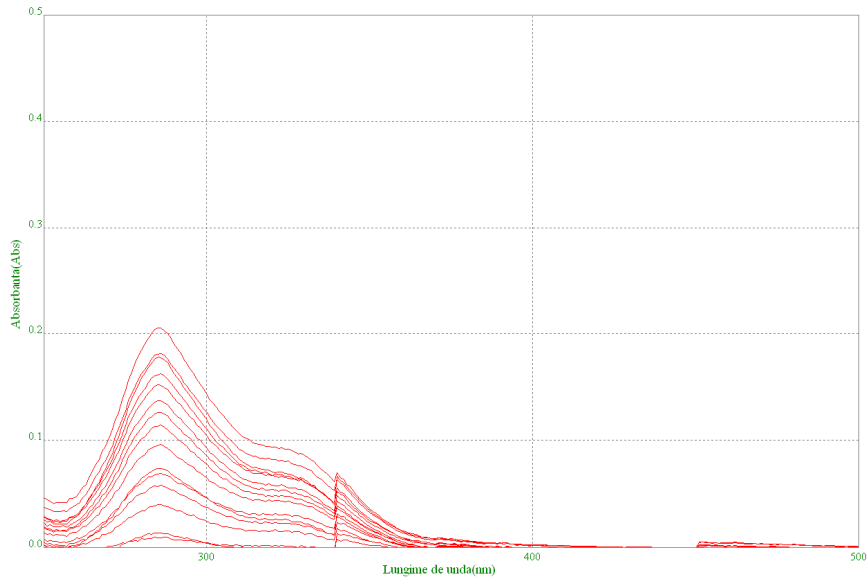


Figura 56. Spectrul UV-VIS al silibininei, la transfer membranal în soluție de ser fiziologic

ANEXA B - ACIZI GRAȘI

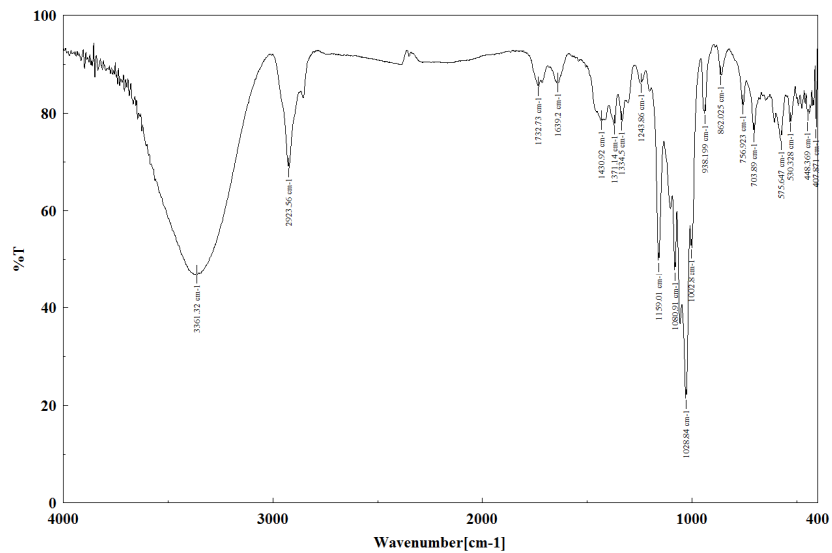


Figura 57. Spectrul FT-IR al complexului acid decanoic/ β CD în pastilă de KBr

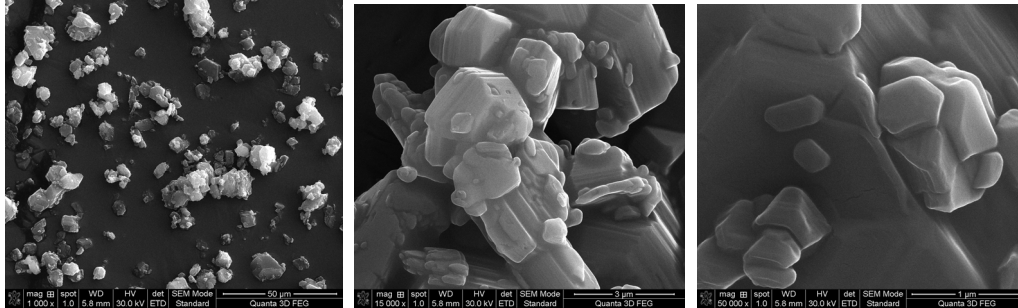


Figura 58. Imaginile SEM pentru complexul acid decanoic/ α CD obținut prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă

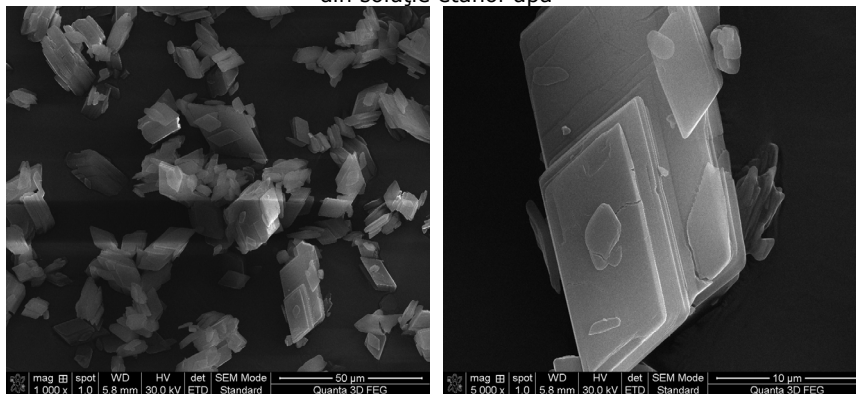


Figura 59. Imaginile SEM pentru complexul acid decanoic/ β CD obținut prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă

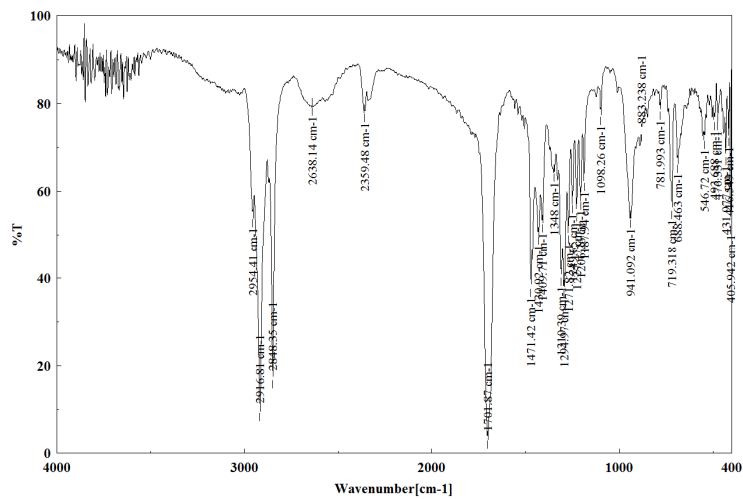


Figura 60. Spectrul FT-IR al acidului palmitic în pastilă de KBr

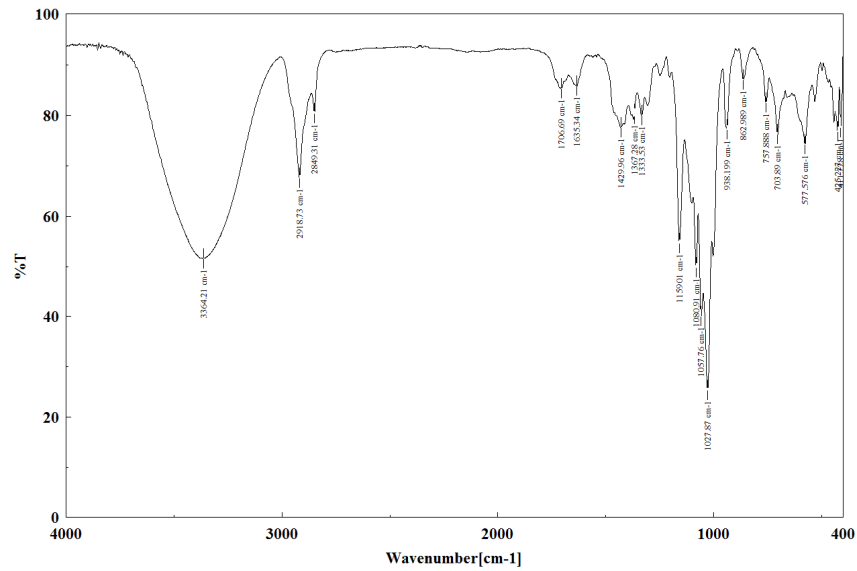


Figura 61. Spectrul FT-IR al complexului acid palmitic/ β CD în pastilă de KBr

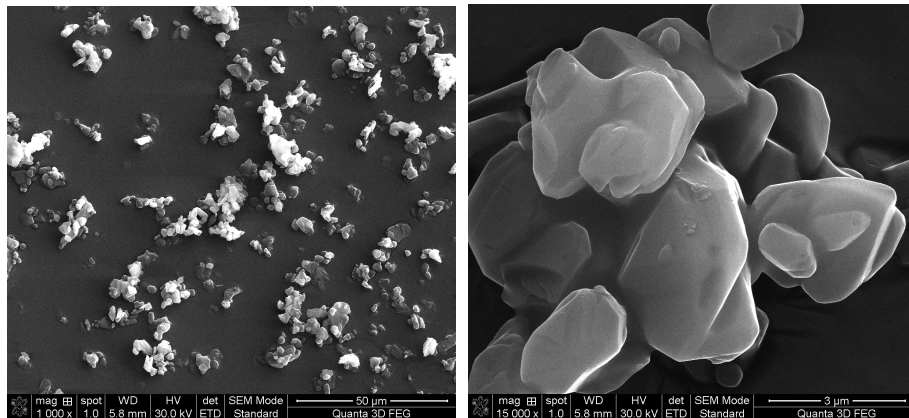


Figura 62. Imaginile SEM pentru complexul acid palmitic/ α CD obținut prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă

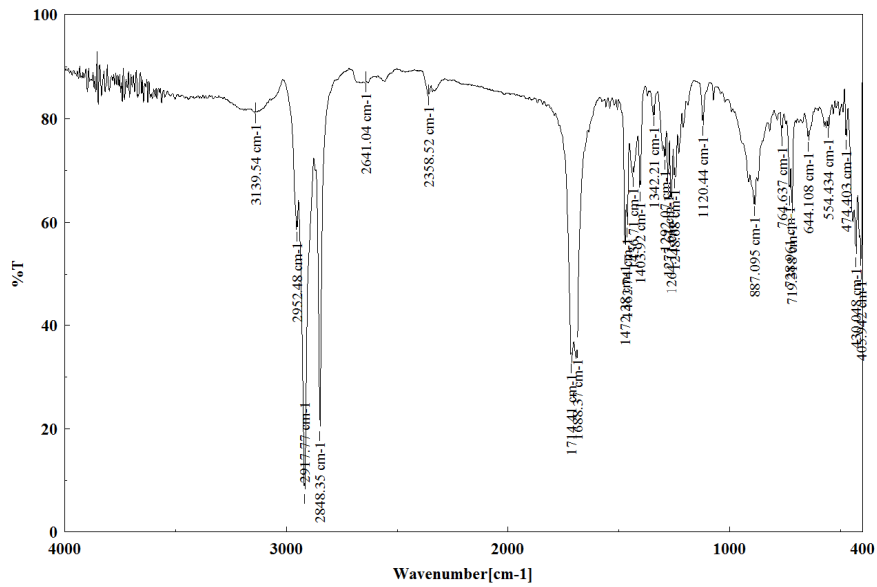


Figura 63. Spectrul FT-IR al acidului stearic în pastilă de KBr

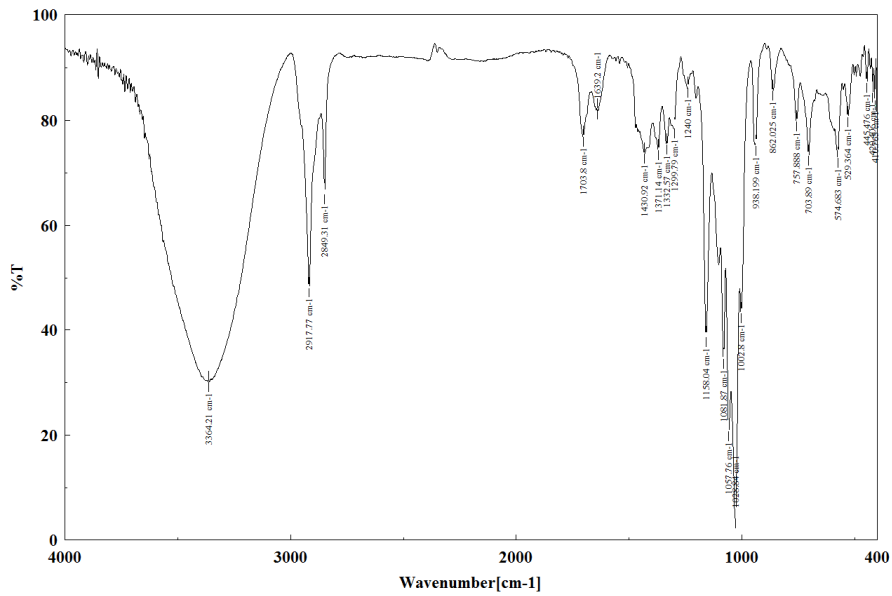


Figura 64. Spectrul FT-IR al complexului acid stearic/BCD în pastilă de KBr

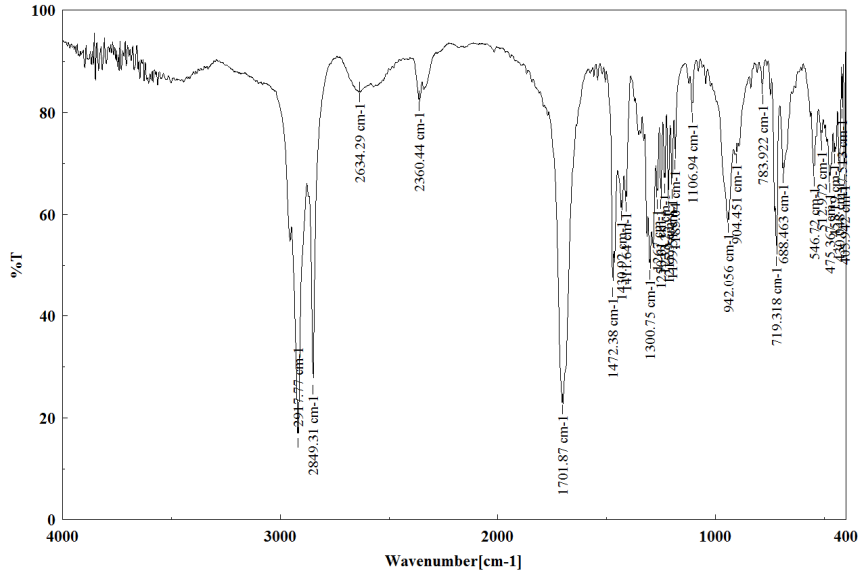


Figura 65. Spectrul FT-IR al acidului arahidic în pastilă de KBr

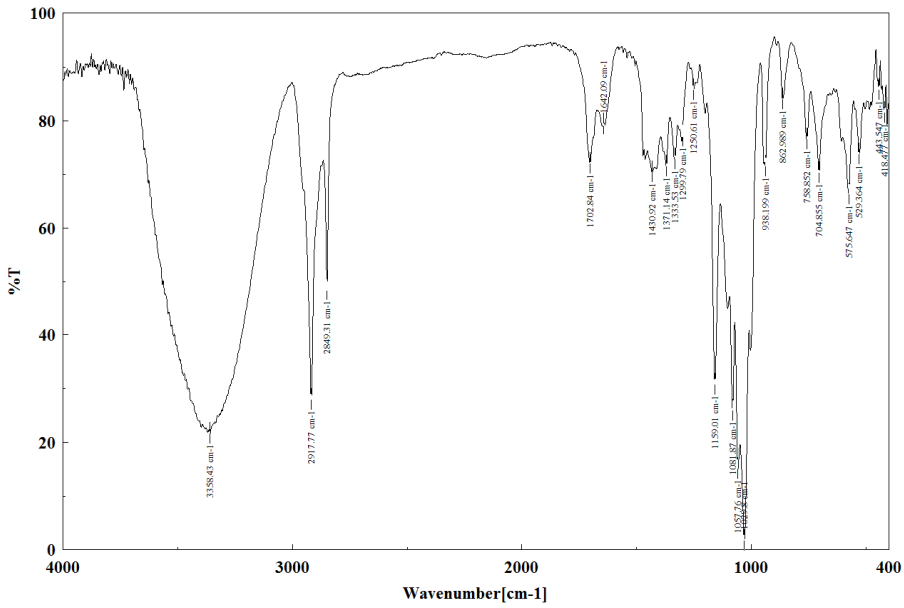


Figura 66. Spectrul FT-IR al complexului acidului arahidic/ β CD în pastilă de KBr

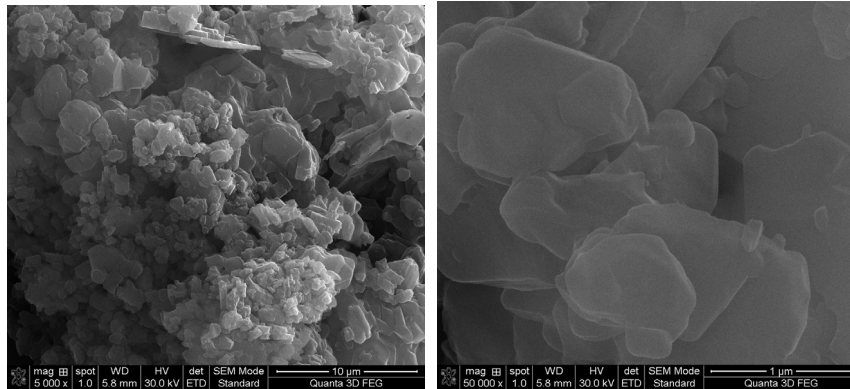


Figura 67. Imaginile SEM pentru complexul acid arahidic/ α CD obținut prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă

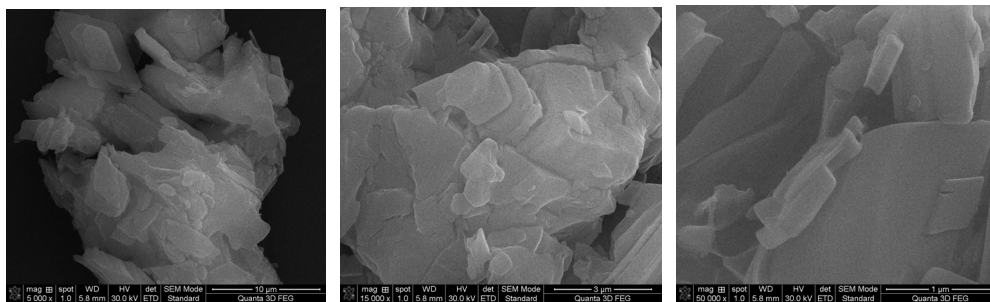


Figura 68. Imaginile SEM pentru complexul acid arahidic/ β CD obținut prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă

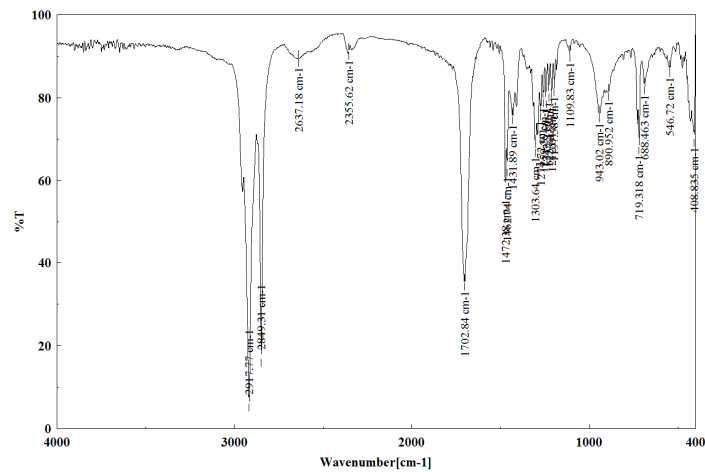


Figura 69. Spectrul FT-IR al acidului behenic în pastilă de KBr

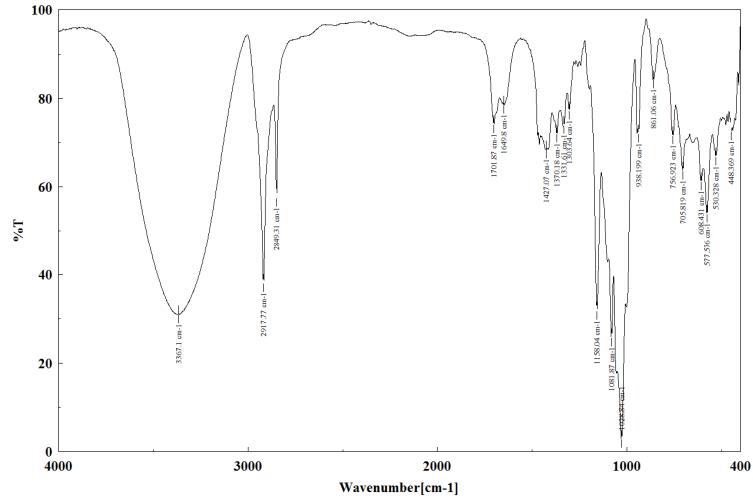


Figura 70. Spectrul FT-IR al complexului acidului behenic/ β CD în pastilă de KBr

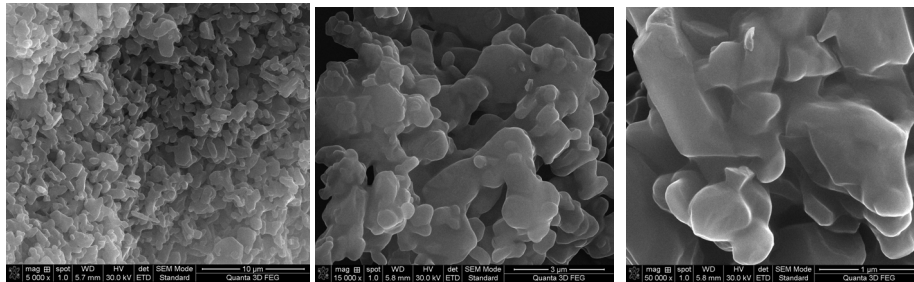


Figura 71. Imaginile SEM pentru complexul acid behenic/ α CD obținut prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă

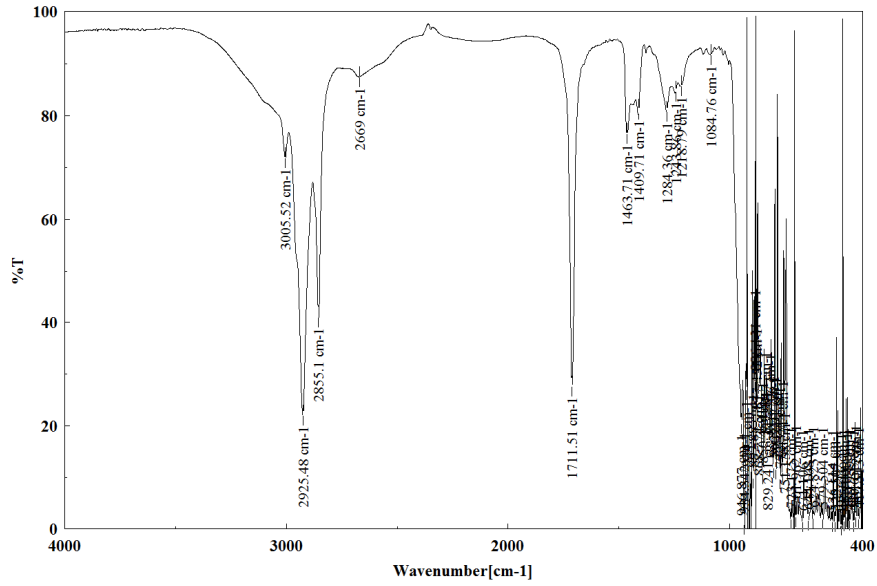


Figura 72. Spectrul FT-IR al acidului oleic în peliculă între geamuri de KBr

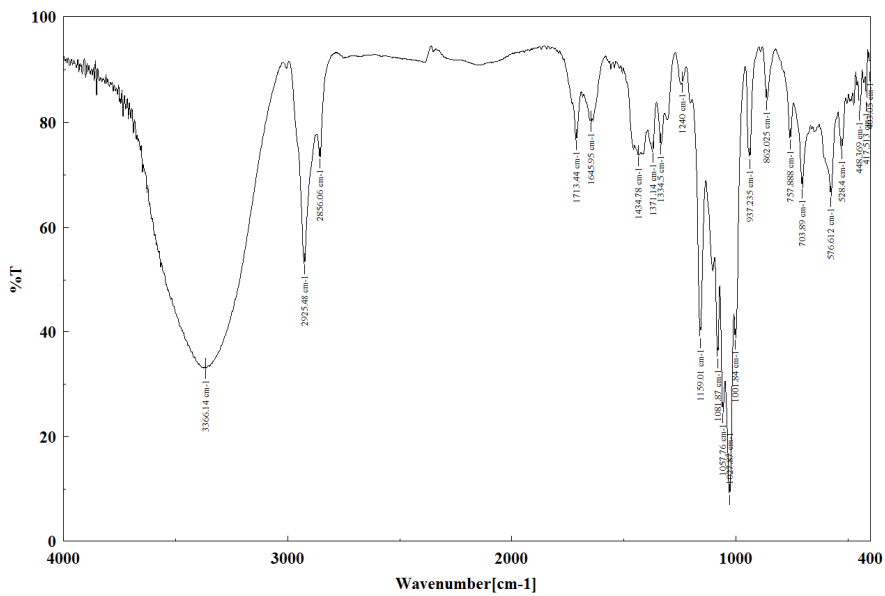


Figura 73. Spectrul FT-IR al complexului acidului oleic/BCD în pastilă de KBr

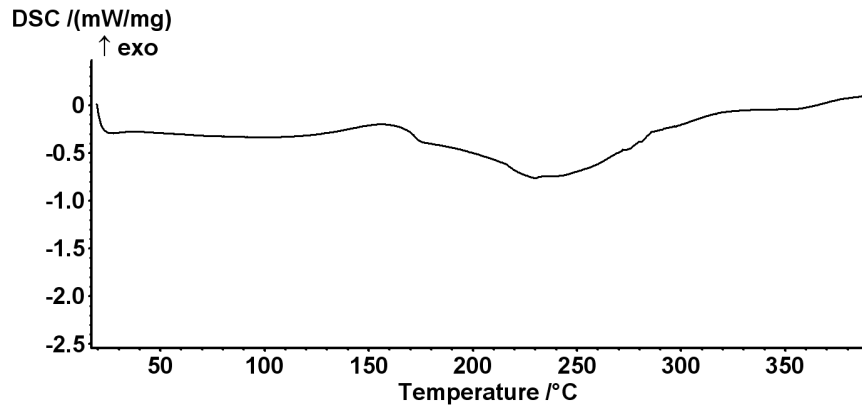


Figura 74. Analiza DSC a acidului oleic pe intervalul de temperatură 20-400°C, cu o încălzire de 4°C/min

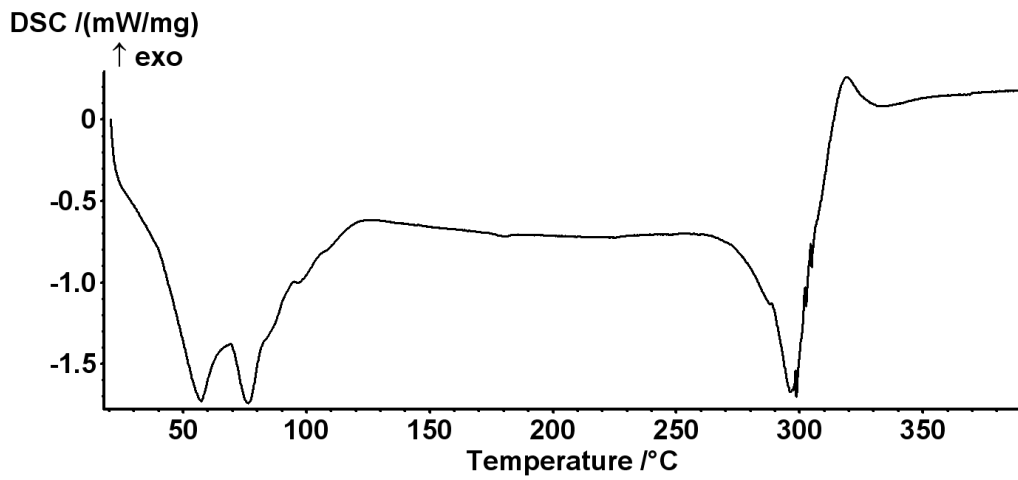


Figura 75. Analiza DSC a complexului acidului oleic/ α CD pe intervalul de temperatură 20-400°C, cu o încălzire de 4°C/min

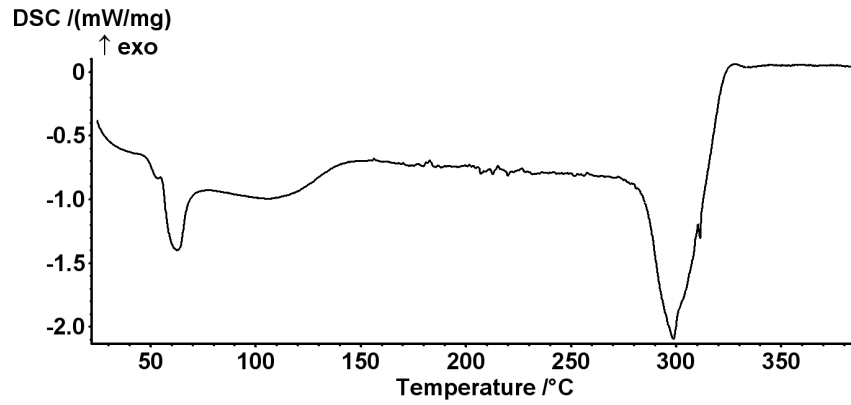


Figura 76. Analiza DSC a complexului acidului oleic/ β CD pe intervalul de temperatură 20-400°C, cu o încălzire de 4°C/min

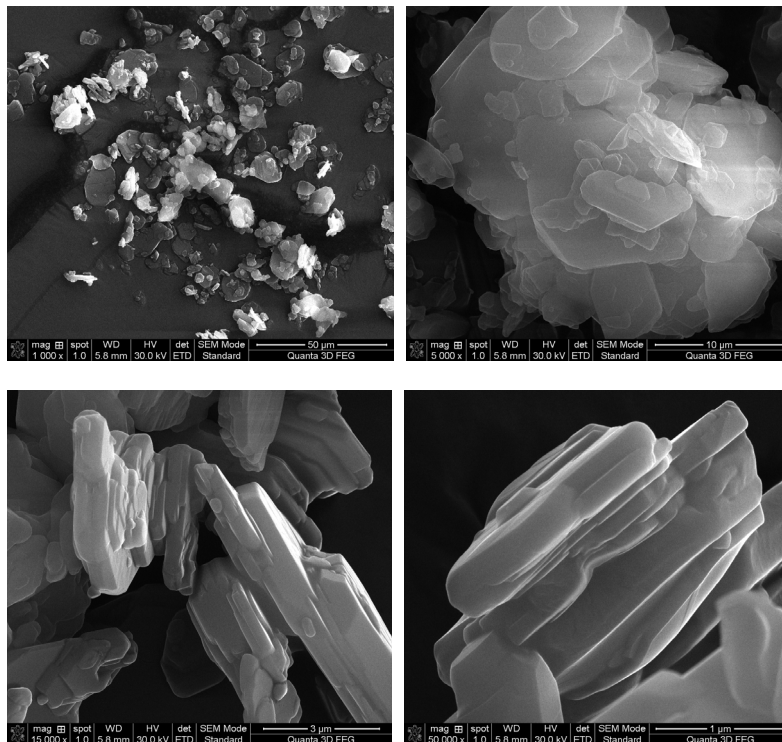


Figura 77. Imaginile SEM pentru complexul acid oleic/ α CD obținut prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă

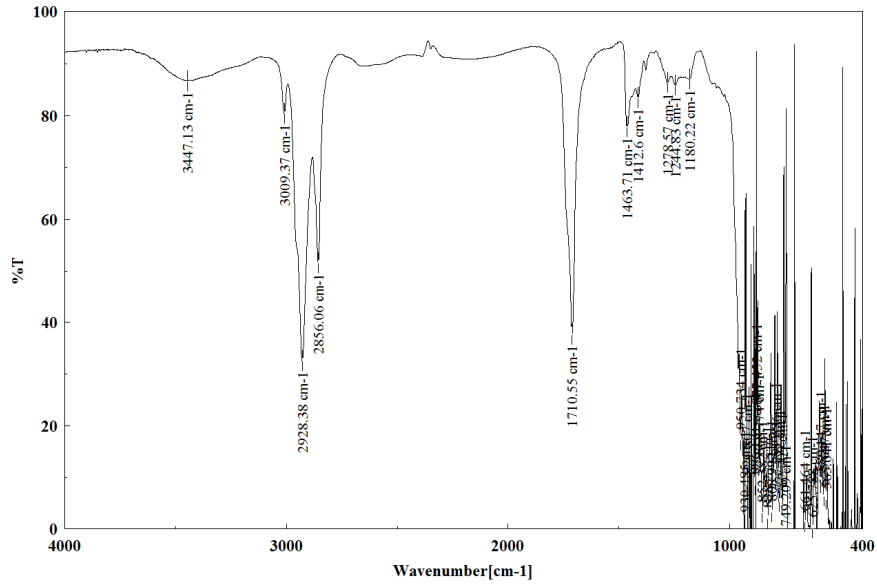


Figura 78. Spectrul FT-IR al acidului linoleic în peliculă între geamuri de KBr

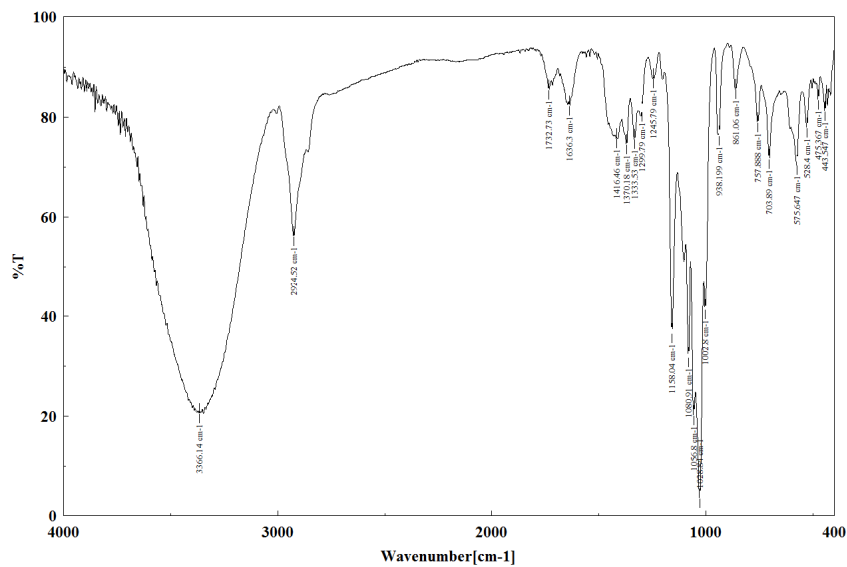


Figura 79. Spectrul FT-IR al complexului acidului linoleic/βCD în pastilă de KBr

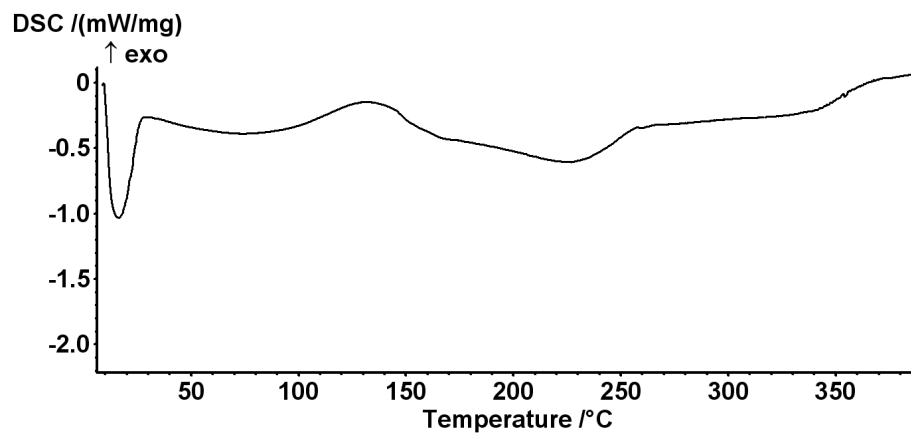


Figura 80. Analiza DSC a acidului linoleic pe intervalul de temperatură 20-400°C, cu o încălzire de 4°C/min

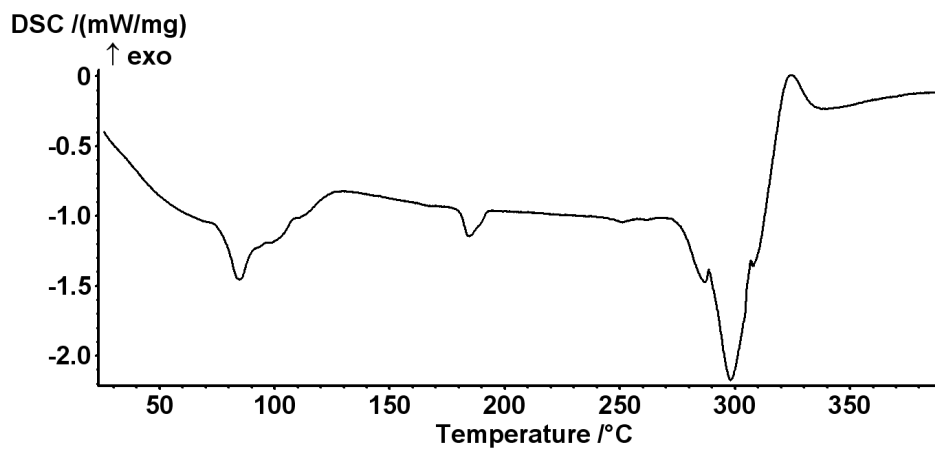


Figura 81. Analiza DSC a complexului acidului linoleic/aCD pe intervalul de temperatură 20-400°C, cu o încălzire de 4°C/min

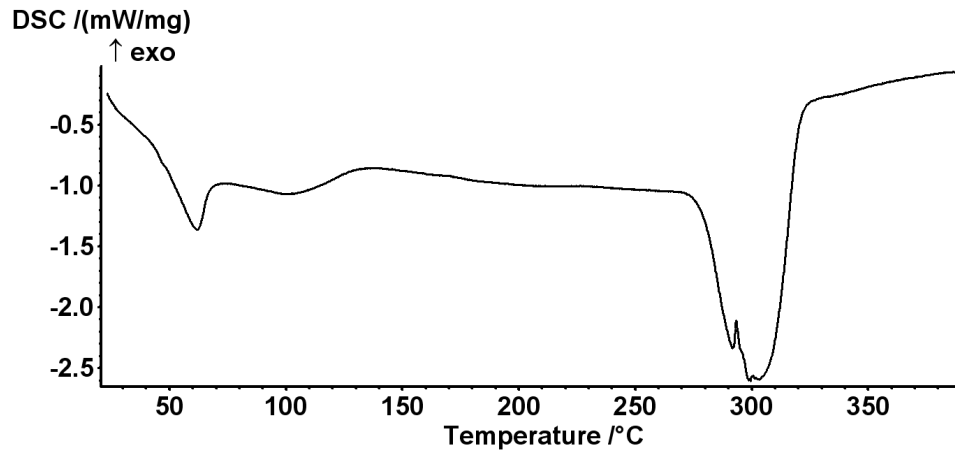


Figura 82. Analiza DSC a complexului acidului linoleic/ β CD pe intervalul de temperatură 20-400°C, cu o încălzire de 4°C/min

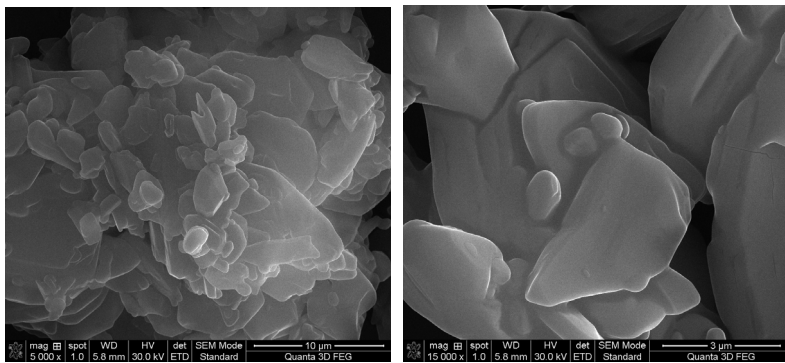


Figura 83. Imaginile SEM pentru complexul acid linoleic/ α CD obținut prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă

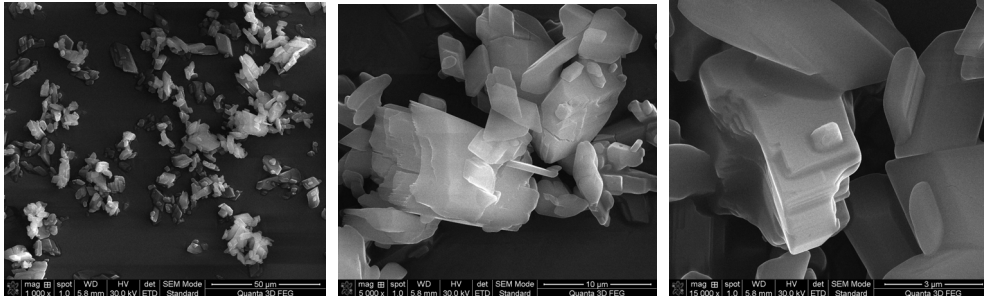


Figura 84. Imaginile SEM pentru complexul acid linoleic/ β CD obținut prin metoda cristalizării din soluție etanol-apă

ANEXA C - BIOCONJUGAȚI

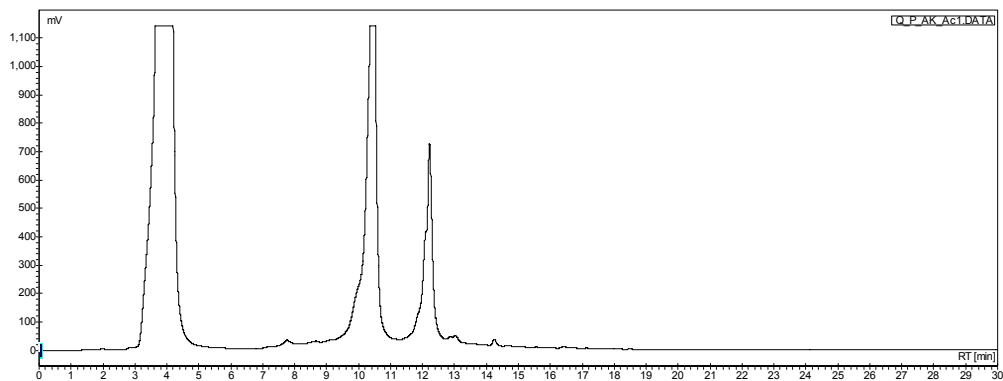


Figura 85. Cromatograma HPLC a quercetin palmitatului obținut în prezența enzimei AK, în acetona

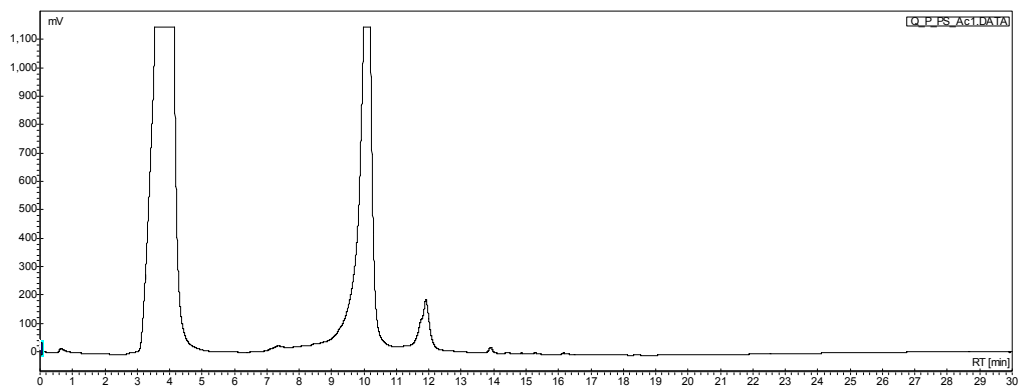


Figura 86. Cromatograma HPLC a quercetin palmitatului obținut în prezența enzimei PS, în acetona

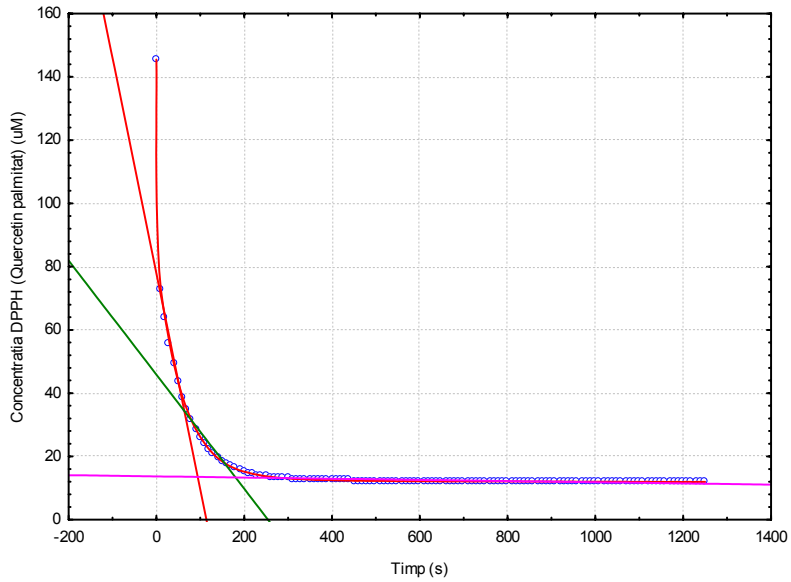


Figura 87. Evaluarea vitezei de reacție a DPPH pentru bioconjugatul quercetin palmitat

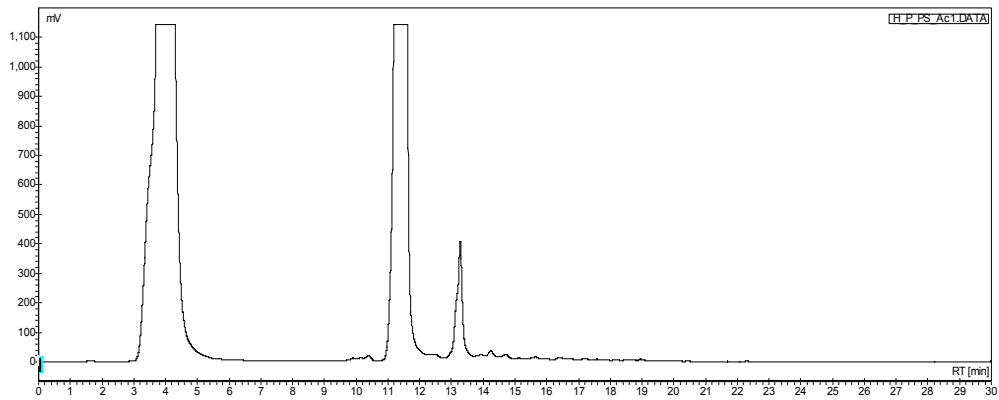


Figura 88. Cromatograma HPLC a hesperetin palmitatului, obținut în prezența enzimei PS, în acetona

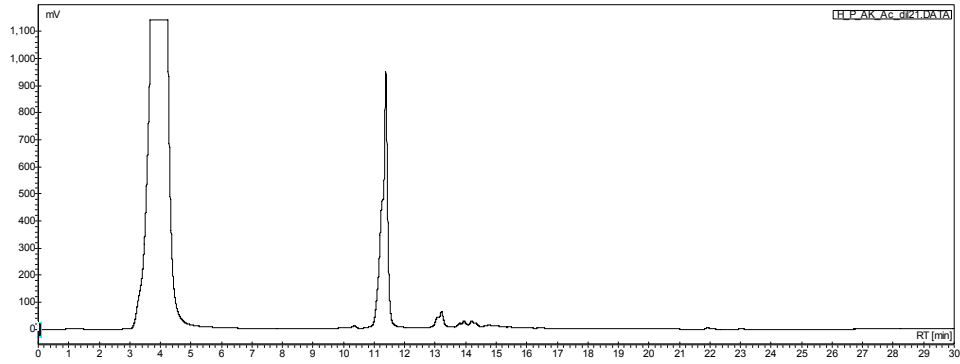


Figura 89. Cromatograma HPLC a hesperetin palmitatului, obținut în prezența enzimei AK, în acetona

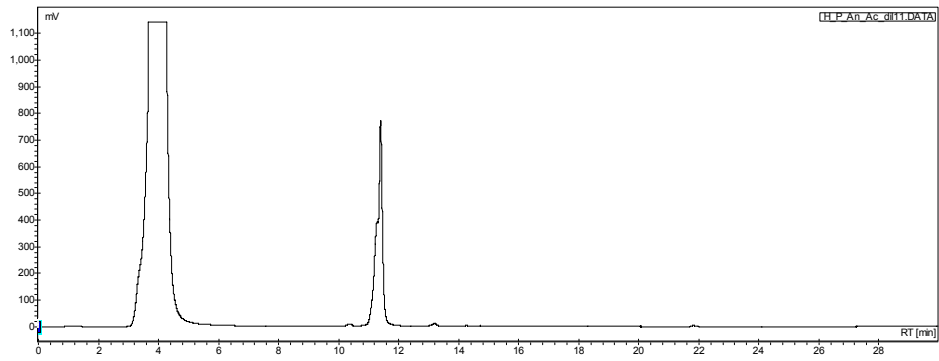


Figura 90. Cromatograma HPLC a hesperetin palmitatului, obținut în prezența enzimei An, în acetona

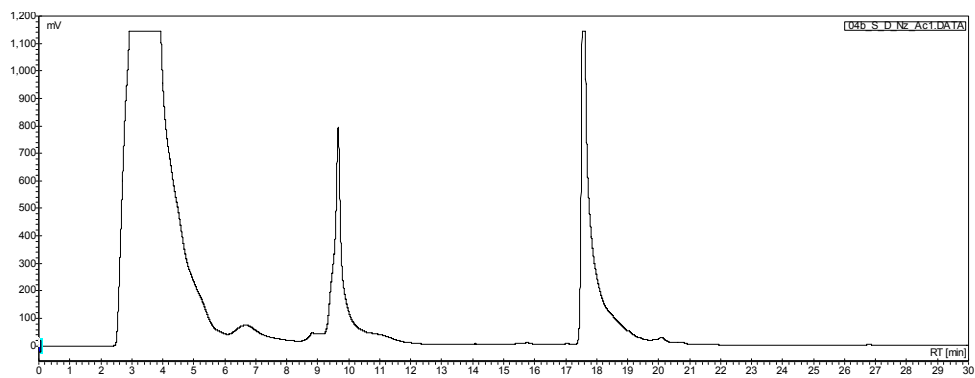


Figura 91. Cromatograma HPLC a silibinin decanoatului, obținut în prezența enzimei Novozyme, în acetona

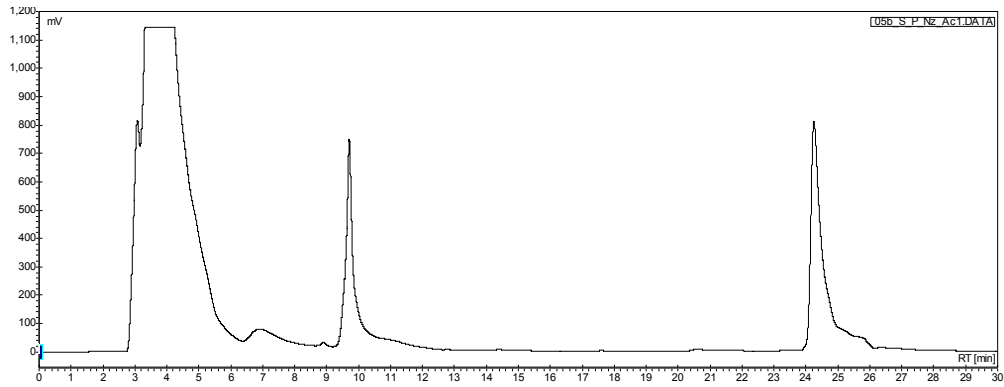


Figura 92. Cromatograma HPLC a silibinin palmitatului, obținut în prezența enzimelor Novozyme, în acetonă

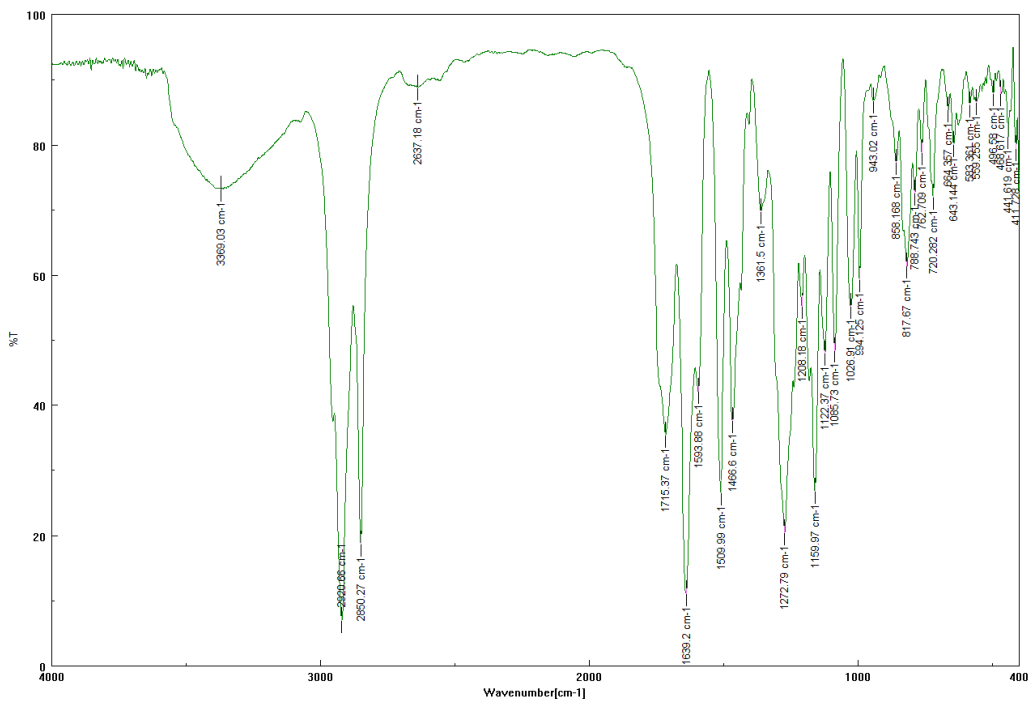


Figura 93. Spectrul FT-IR al silibinin palmitatului în pastilă de KBr

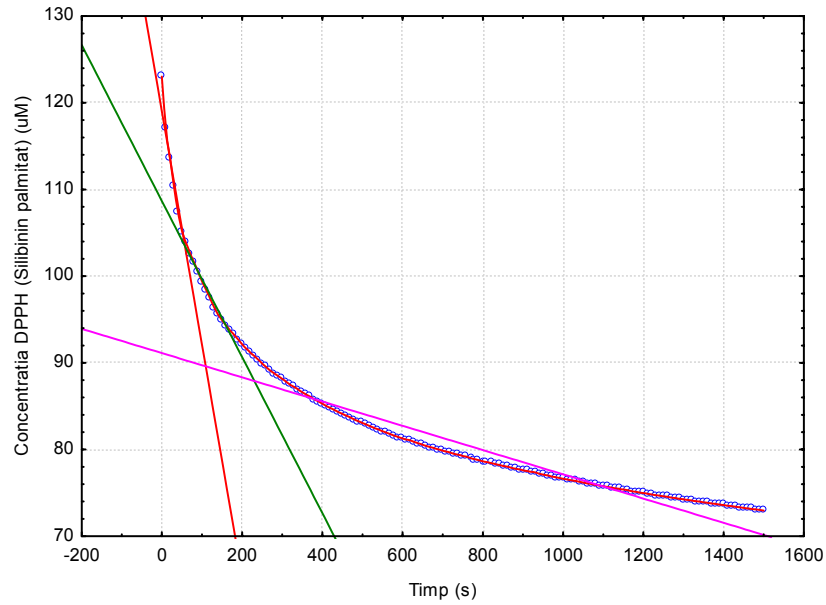


Figura 94. Evaluarea vitezei de reacție a DPPH în prezența bioconjugatului silibinin palmitat

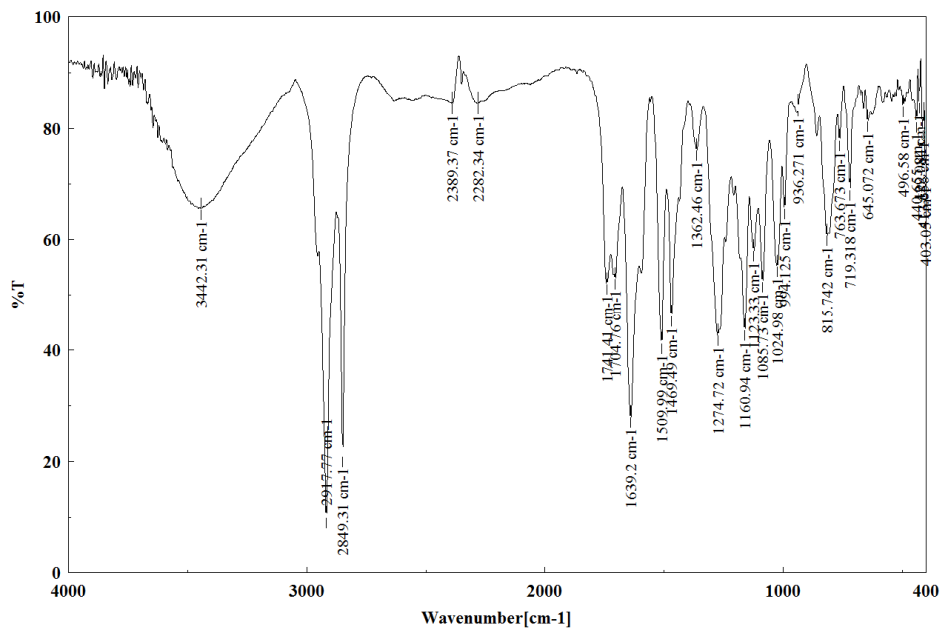


Figura 95. Spectrul FT-IR al bioconjugatului silibinin behenoat în pastilă de KBr

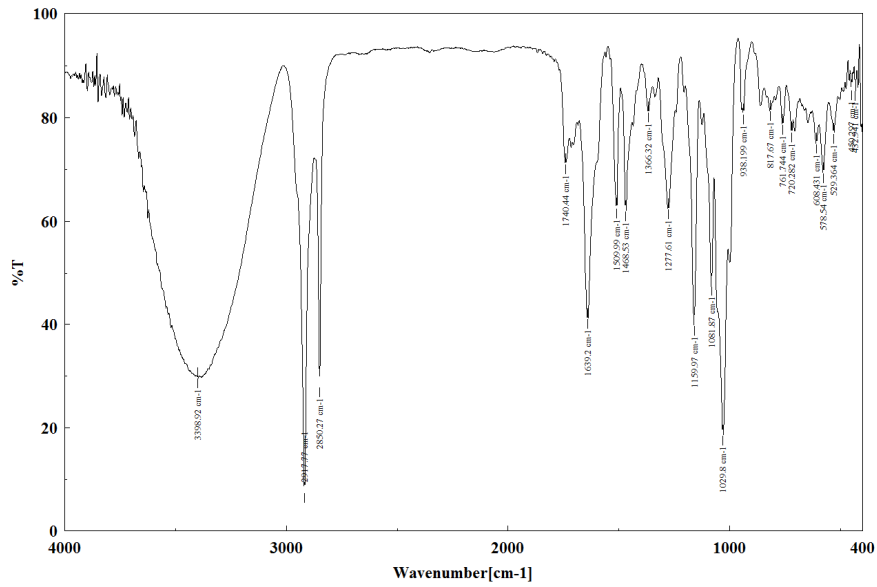


Figura 96. Spectrul FT-IR al complexului bioconjugatului silibinin behenoat/ β CD în pastilă de KBr

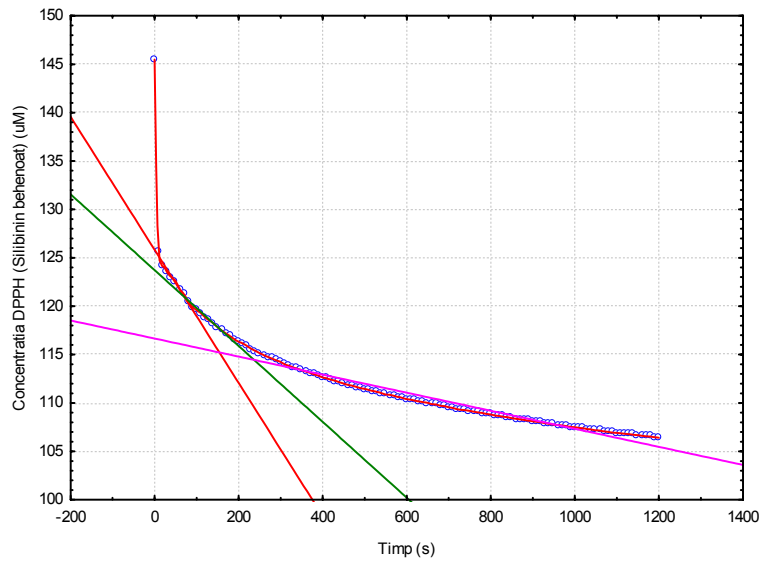


Figura 97. Evaluarea vitezei de reacție a DPPH în prezența bioconjugatului silibinin behenoat

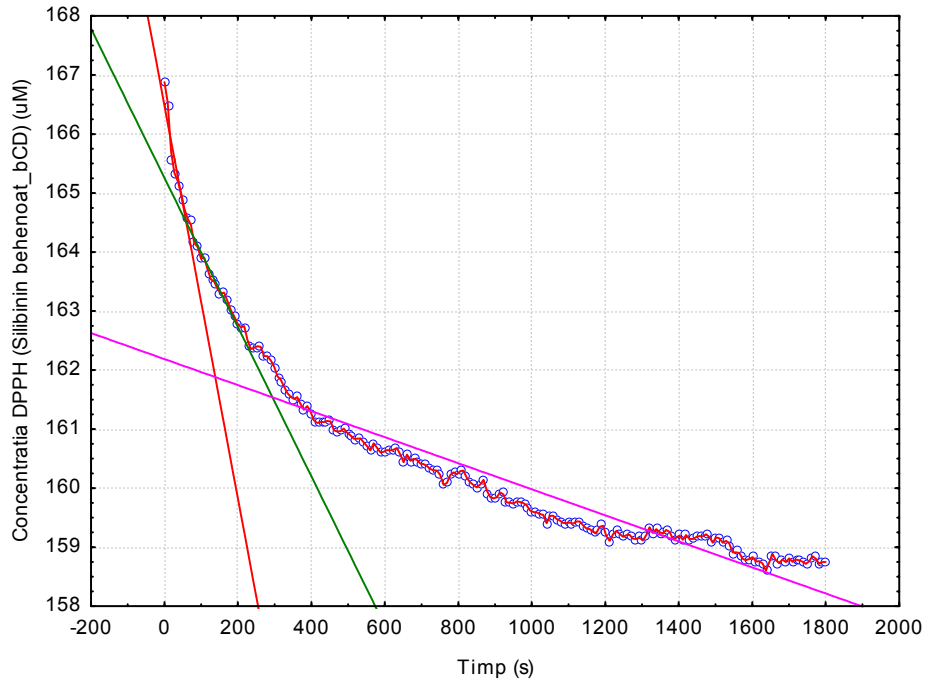


Figura 98. Evaluarea vitezei de reacție a DPPH în prezența complexului bioconjugatului silibinin behenoat/ β CD

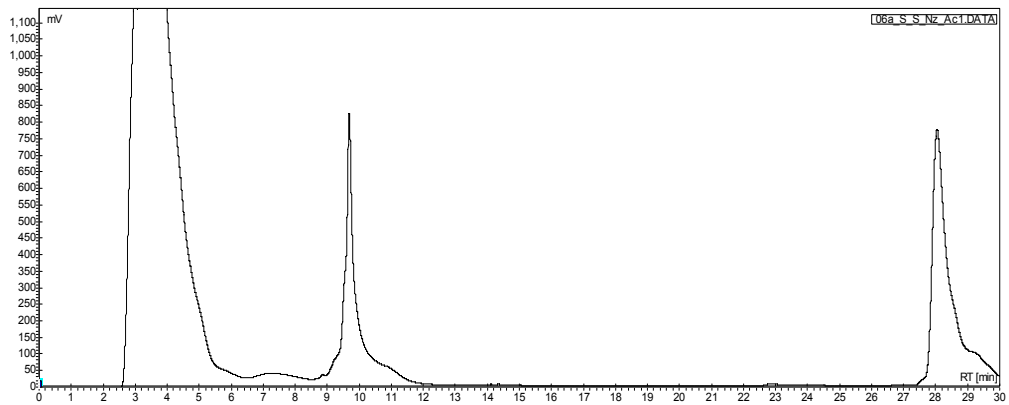


Figura 99. Cromatograma HPLC a silibinin stearatului, obținut în prezența enzimei Novozyme, în acetonă

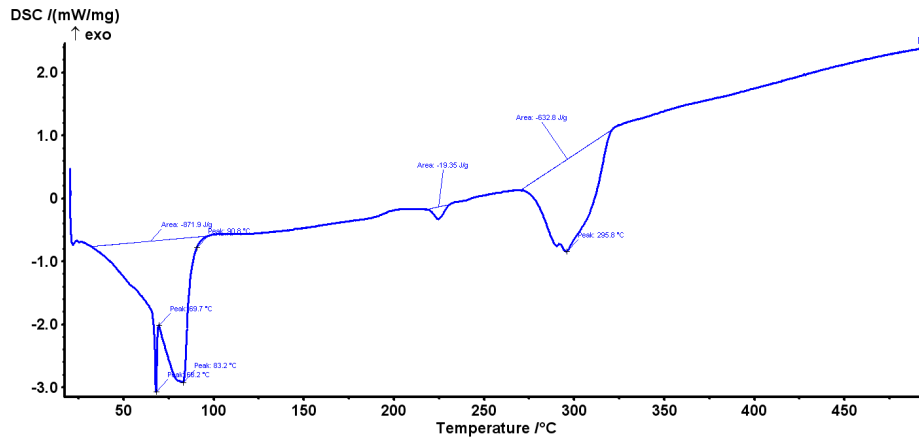


Figura 100. Analiza DSC a complexului silibinin stearat/ β CD

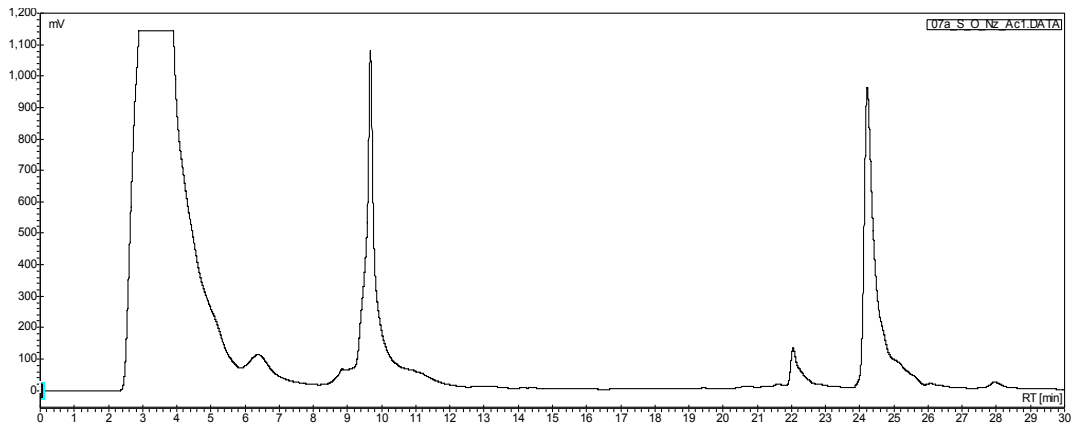


Figura 101. Cromatograma HPLC a silibinin oleatului, obținut în prezența enzimei Novozyme, în acetona

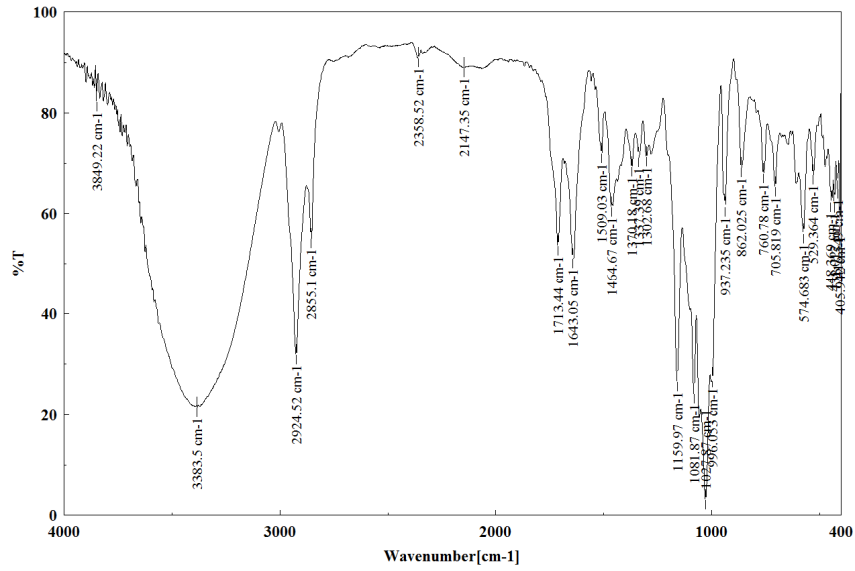


Figura 102. Spectrul FT-IR al bioconjugatului silibinin oleat în pastilă de KBr

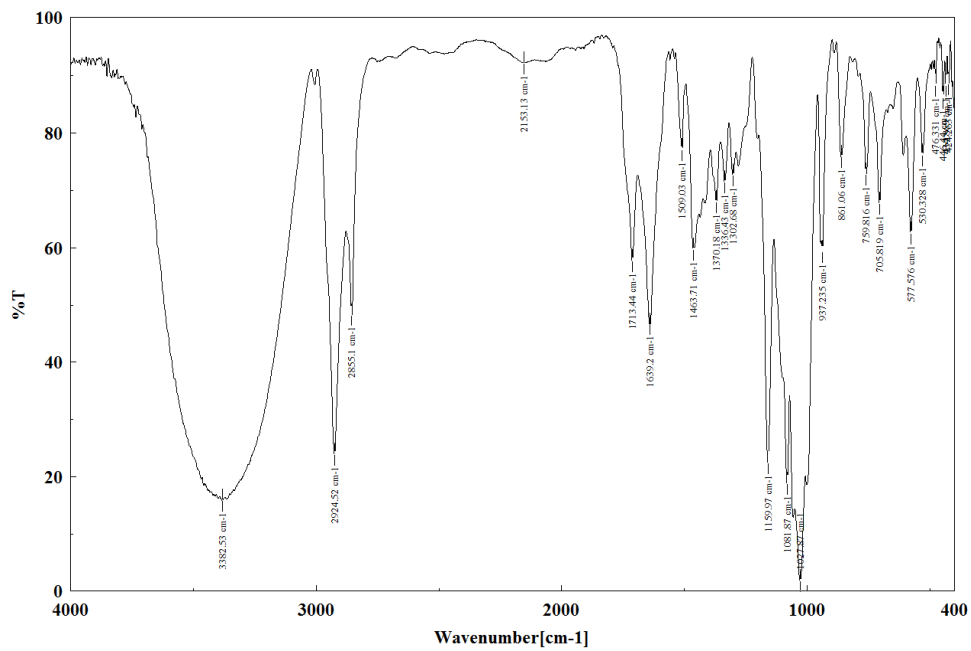


Figura 103. Spectrul FT-IR al complexului bioconjugatului silibinin oleat/βCD în pastilă de KBr

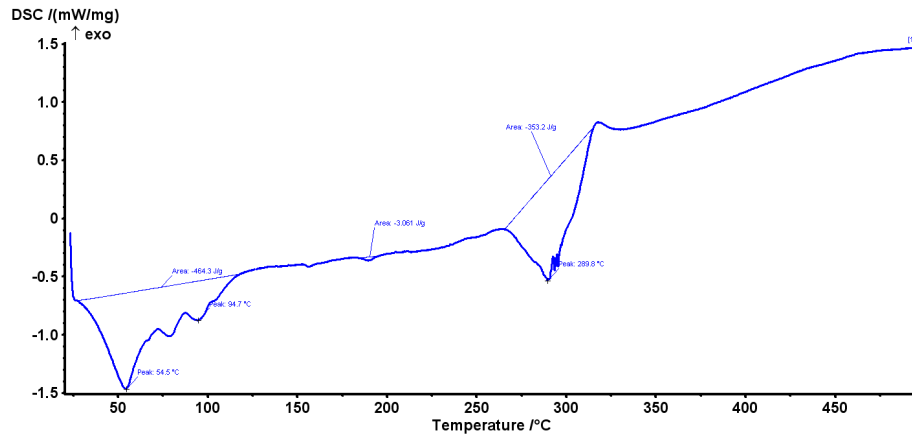


Figura 104. Analiza DSC a complexului bioconjugatului silibinin oleat/ β CD

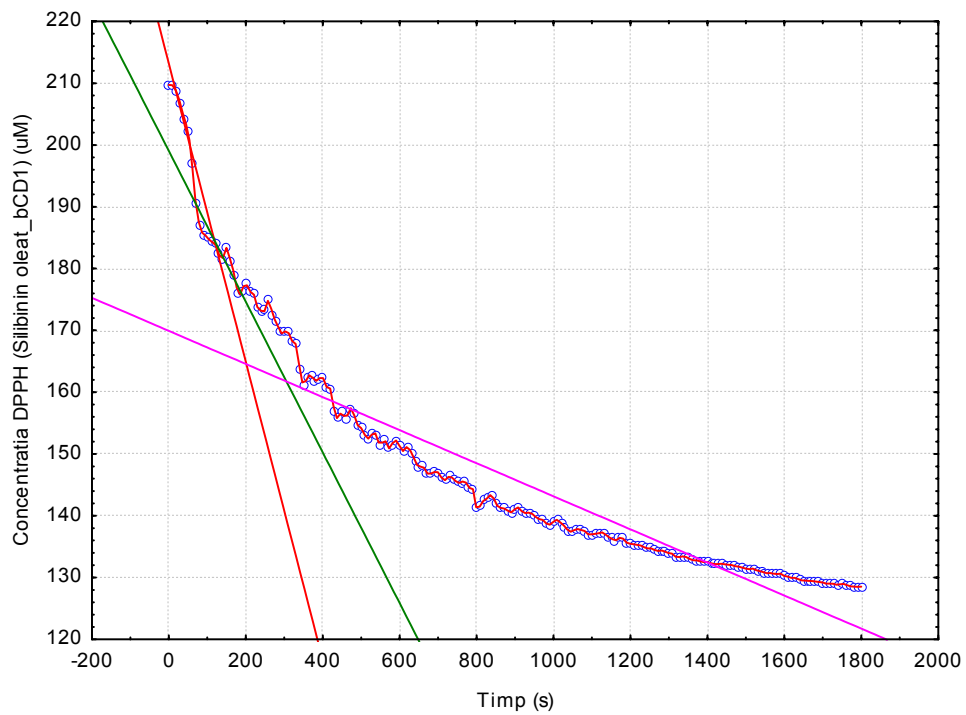


Figura 105. Evaluarea vitezei de reacție a DPPH în prezența complexului bioconjugatului silibinin oleat/ β CD

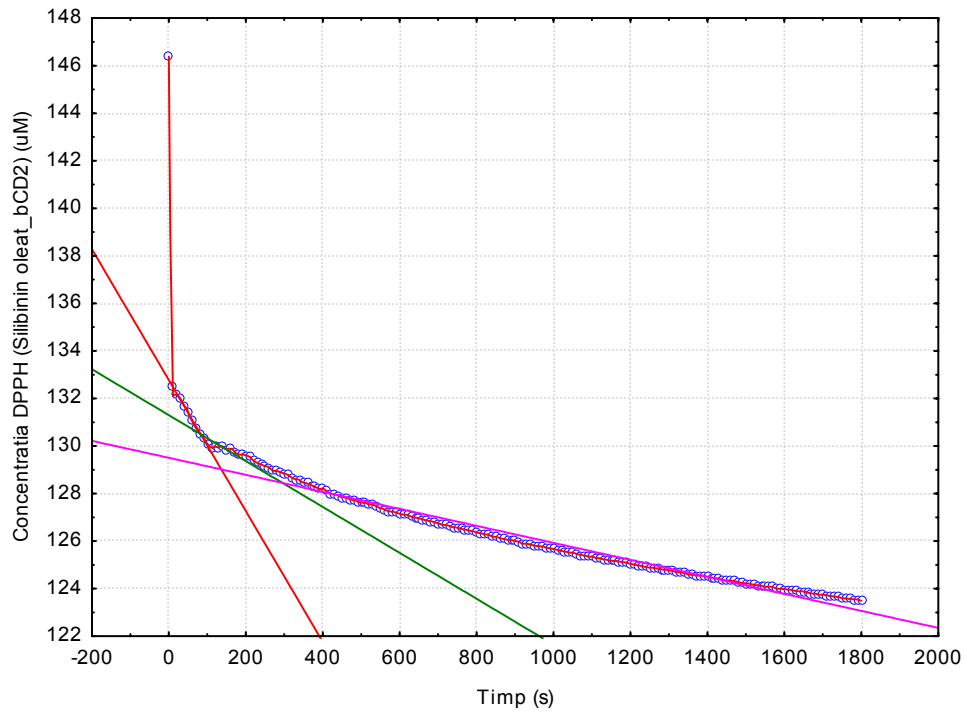


Figura 106. Evaluarea vitezei de reacție a DPPH în prezența complexului bioconjugatului silibinin oleat/ β CD

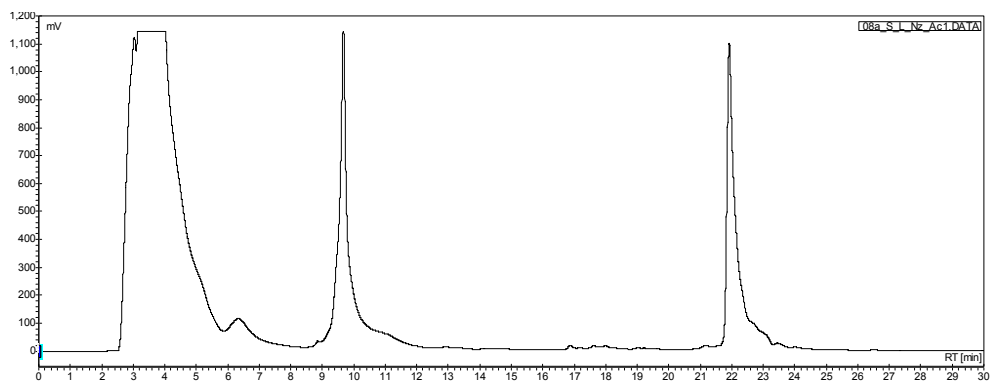


Figura 107. Cromatograma HPLC a silibinin linoleatului, obținut în prezența enzimei Novozyme, în acetonă

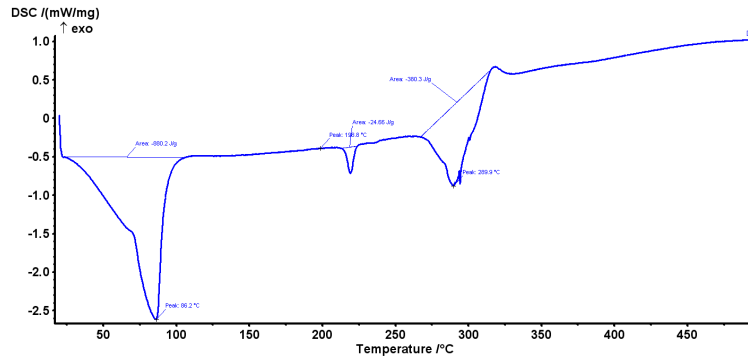


Figura 108. Analiza DSC a complexului bioconjugatului rutin decanoat/ β CD

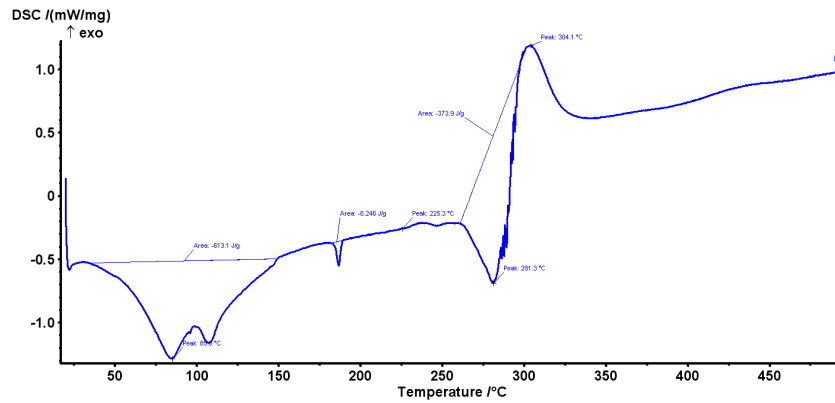


Figura 109. Analiza DSC a complexului bioconjugatului silibinin linoleat/ β CD

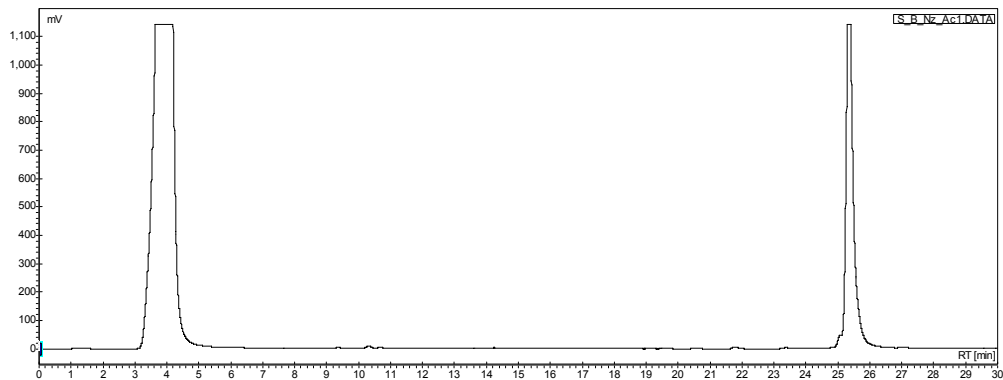


Figura 110. Cromatograma HPLC a silibinin behenoatului, obținut în prezența enzimei Novozyme, în acetonă

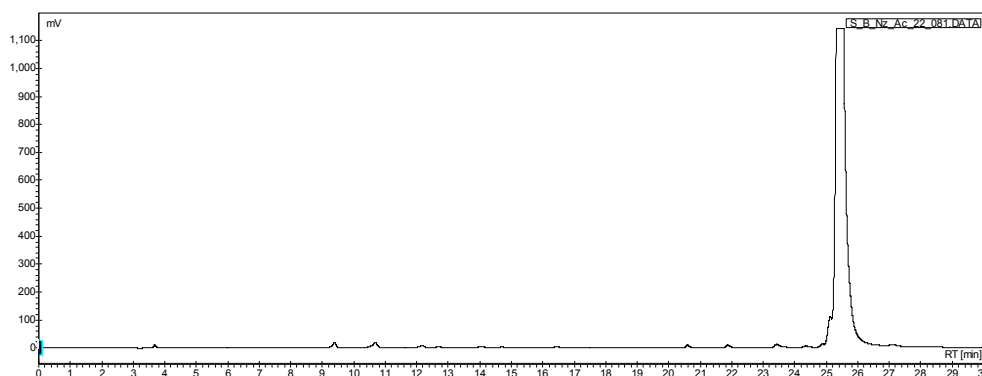


Figura 111. Cromatograma HPLC a silibinin behenoatului, obținut în prezența enzimei Novozyme, în metanol

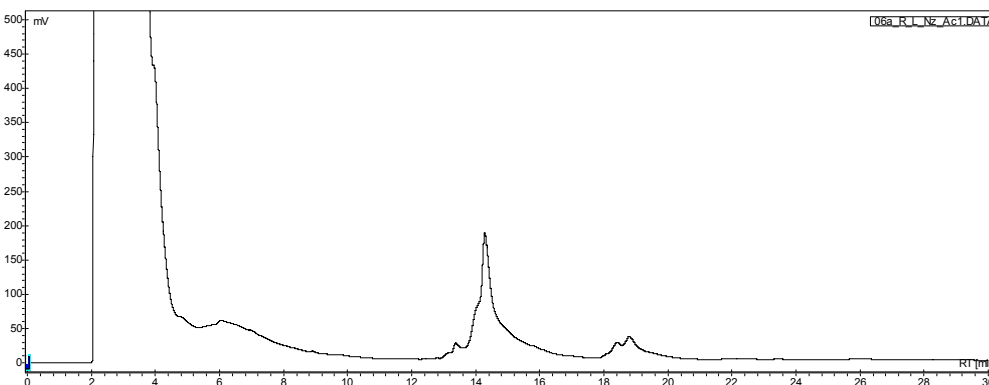


Figura 112. Cromatograma HPLC a rutin linoleatului, obținut în prezența enzimei Novozyme, în acetona

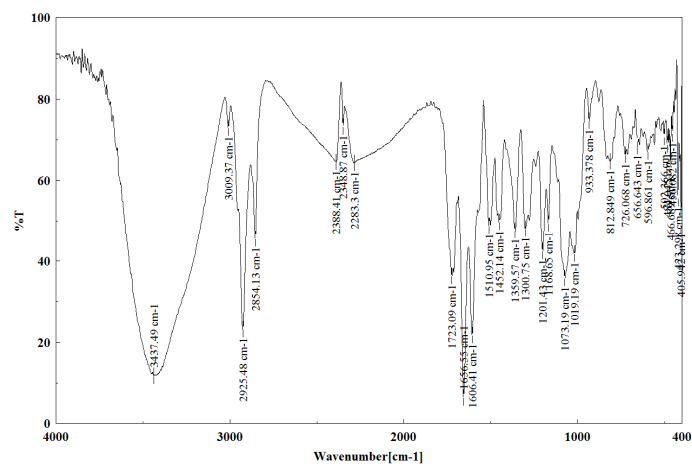


Figura 113. Spectrul FT-IR al rutin linoleatului în pastilă de KBr

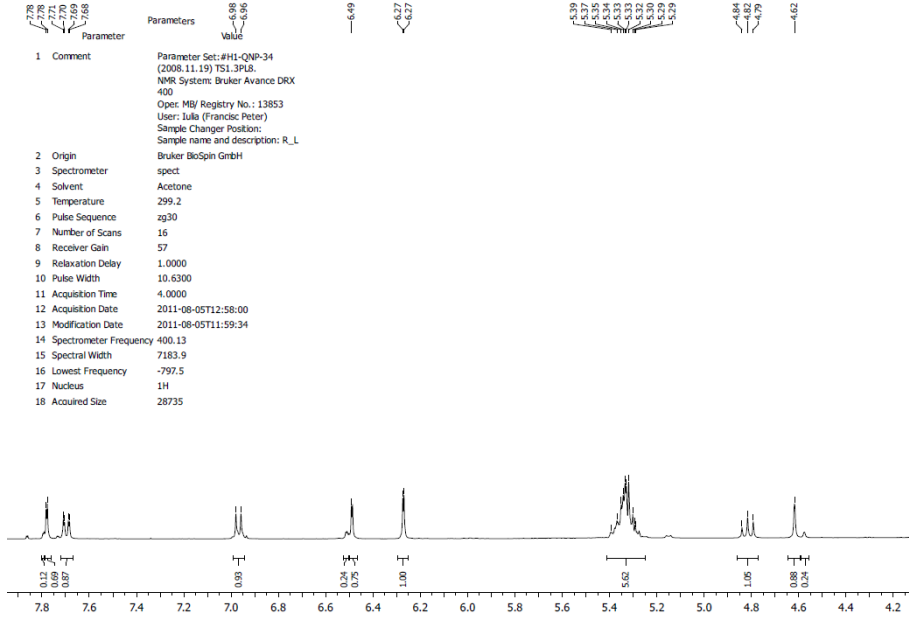


Figura 114. Spectrul ¹H RMN al rutin linoleatului

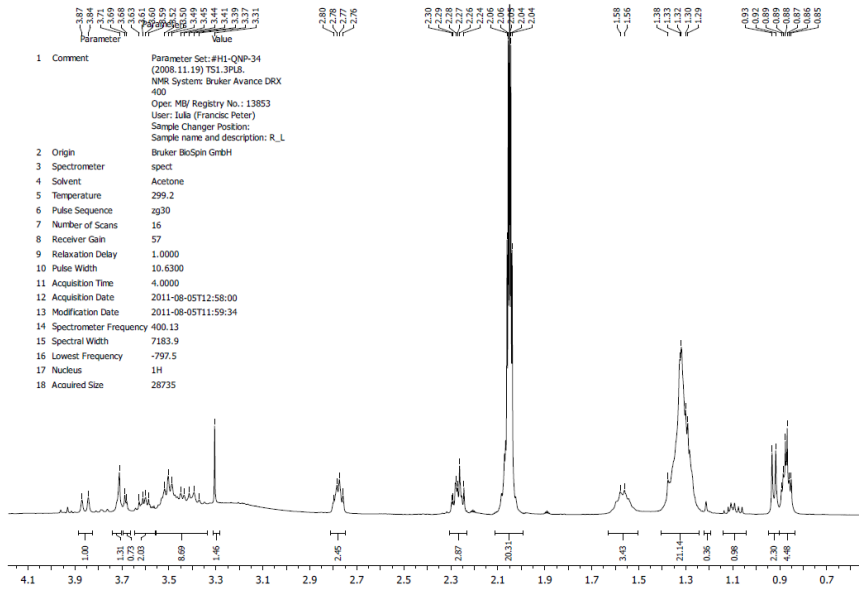


Figura 115. Spectrul ¹H RMN al rutin linoleatului

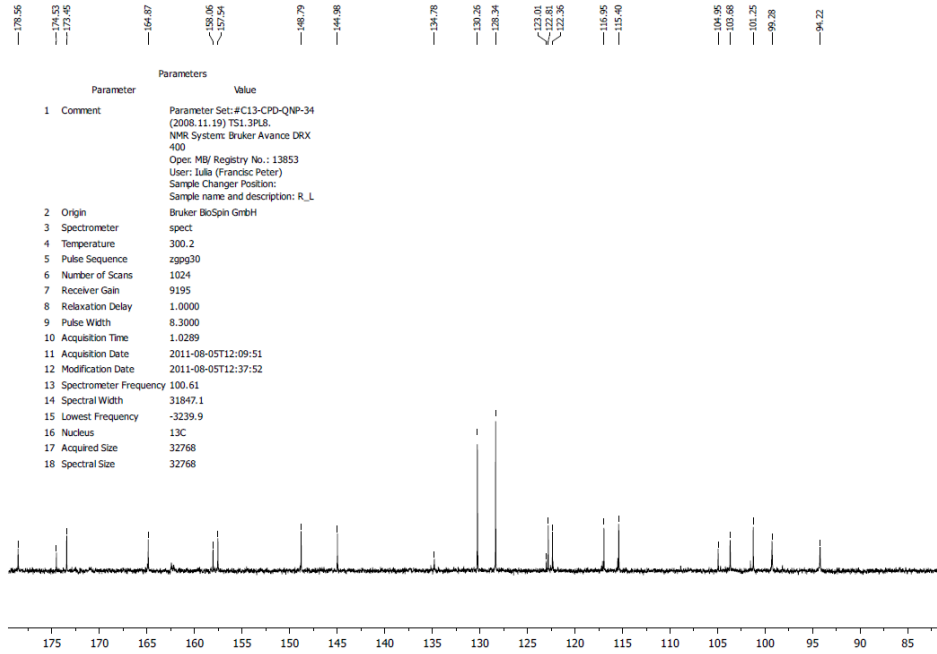


Figura 116. Spectrul ¹³C RMN al rutin linoleatului

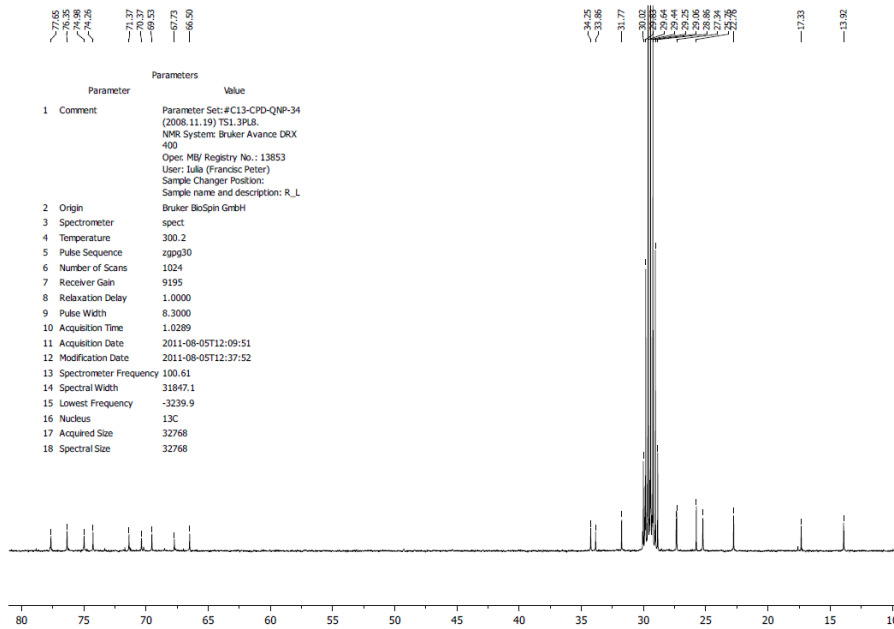


Figura 117. Spectrul ¹³C RMN al rutin linoleatului

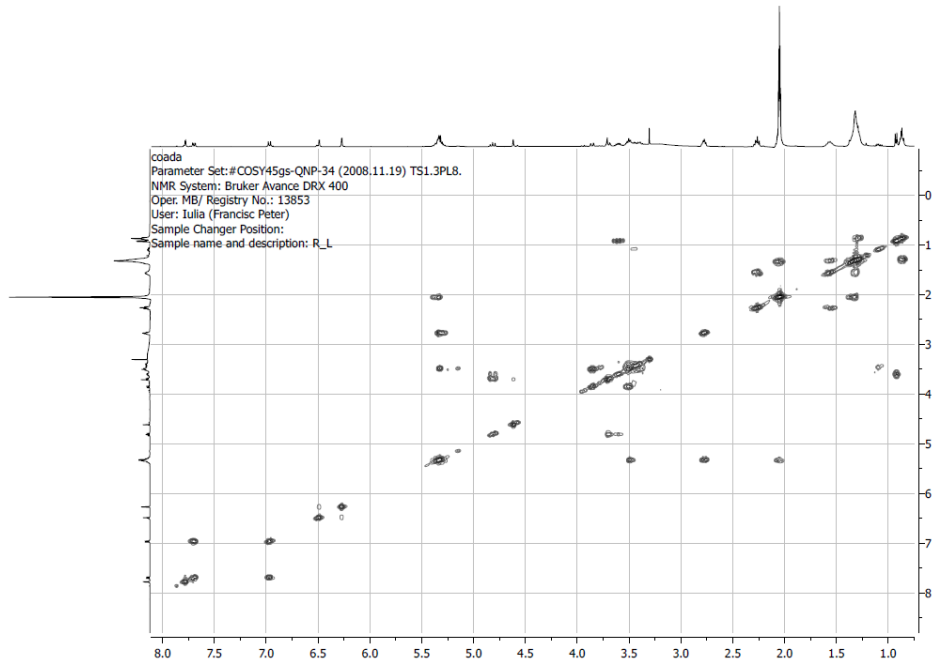


Figura 118. Spectrul COSY al rutin linoleatului

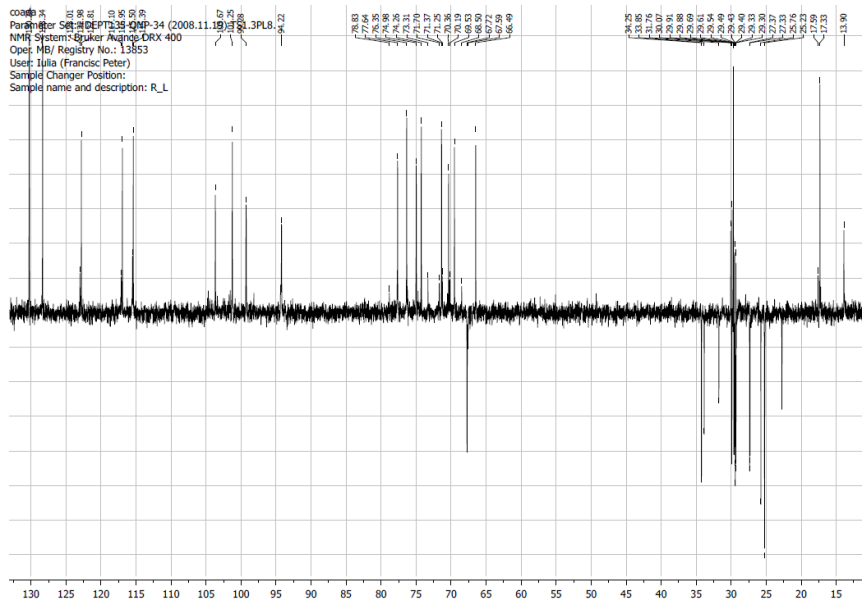


Figura 119. Spectrul DEPT al rutin linoleatului

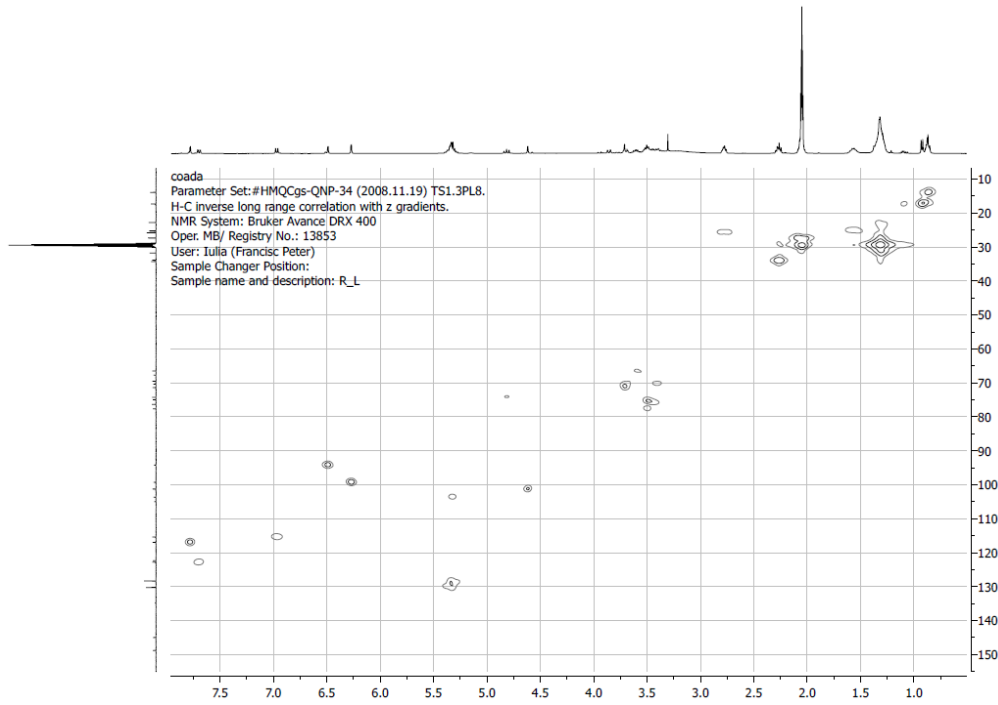


Figura 120. Spectrul HMQC al rutin linoleatului

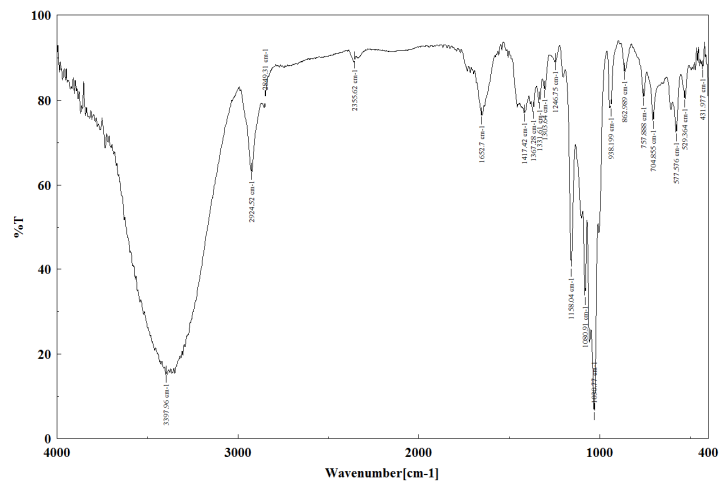


Figura 121. Spectrul FT-IR al complexului rutin linoleat/ β CD în pastilă de KBr

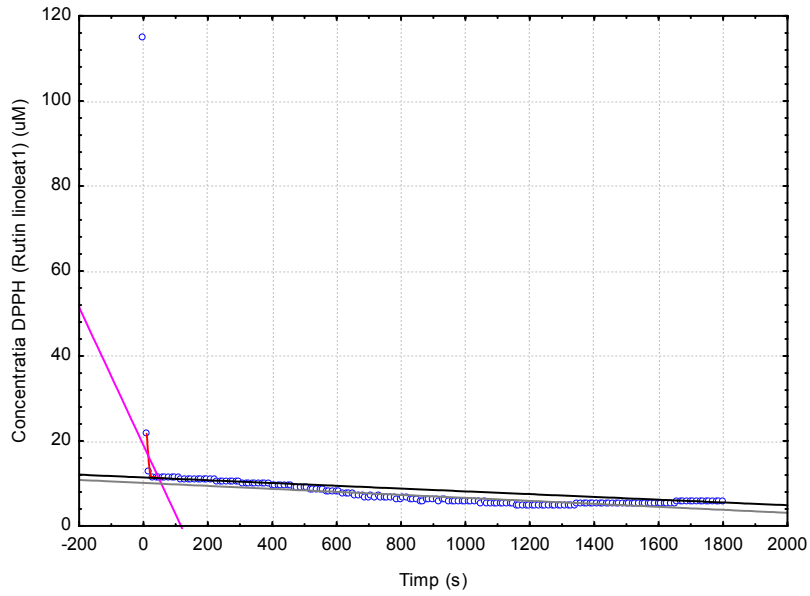


Figura 122. Evaluarea vitezei de reacție a DPPH în prezența rutin linoleatului

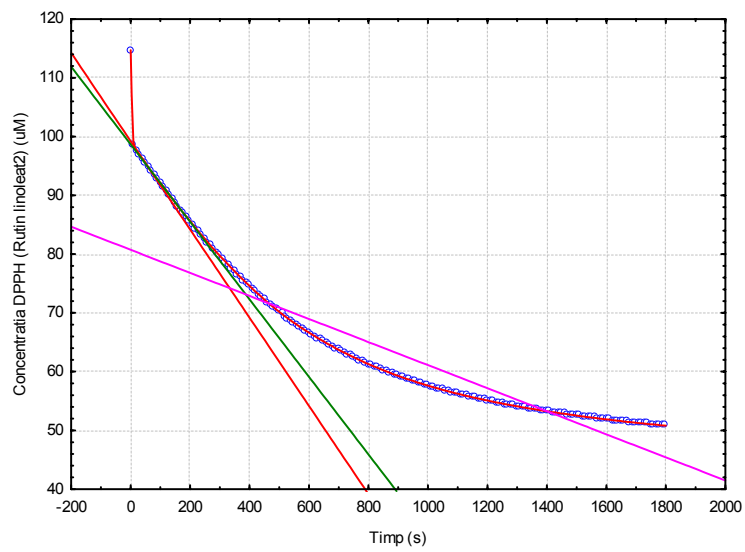


Figura 123. Evaluarea vitezei de reacție a DPPH în prezența rutin linoleatului

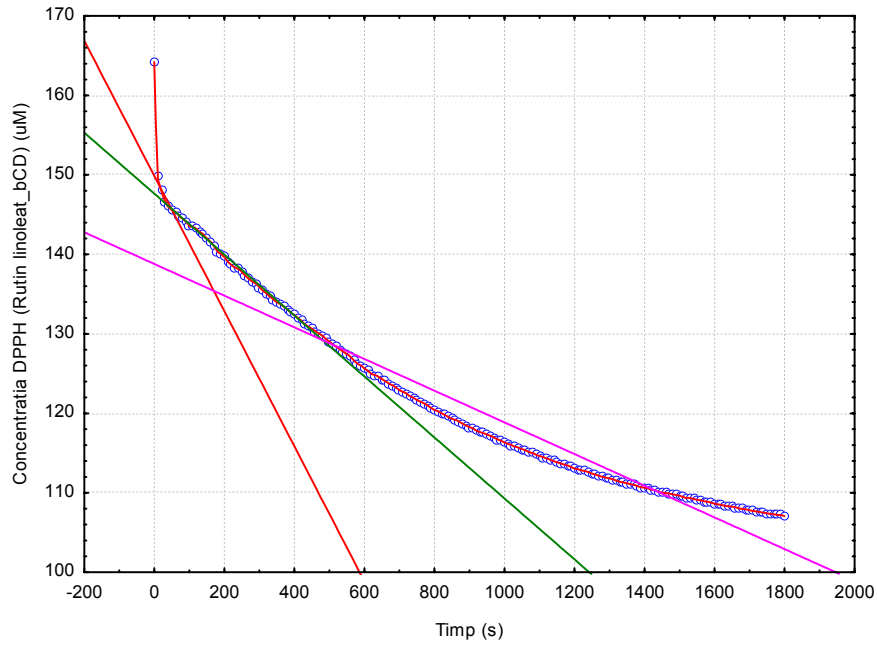


Figura 124. Evaluarea vitezei de reacție a DPPH în prezența complexului rutin linoleat/ β CD

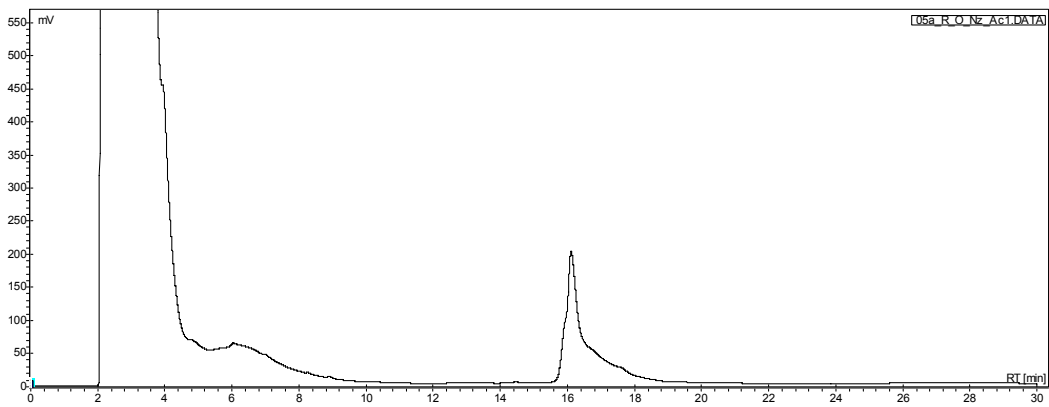


Figura 125. Cromatograma HPLC a rutin oleatului, obținut în prezența enzimei Novozyme, în acetona

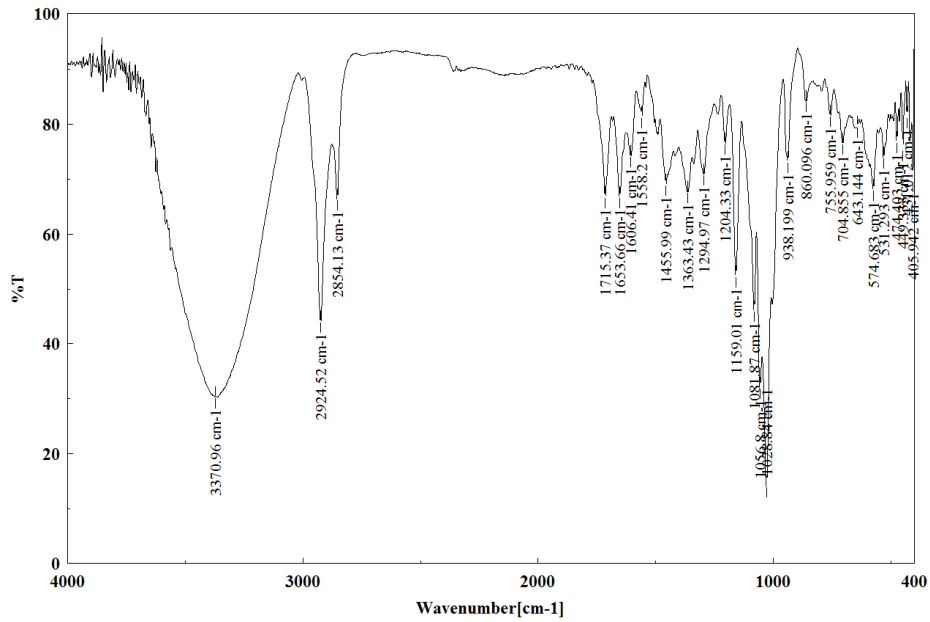


Figura 126. Spectrul FT-IR al rutin oleatului în pastilă de KBr

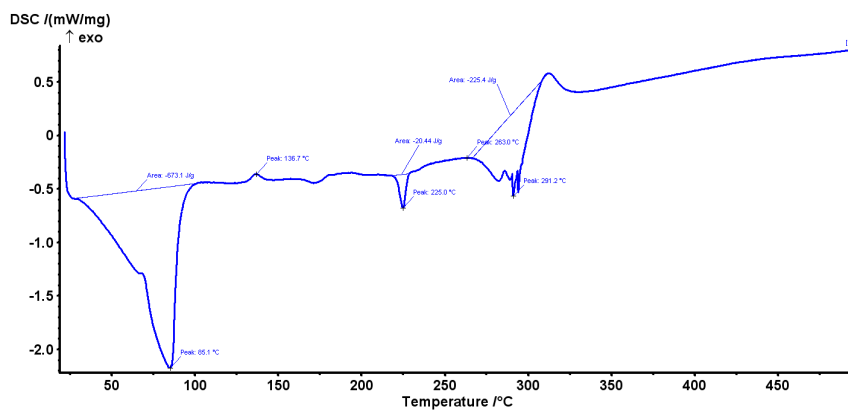


Figura 127. Analiza DSC a complexului bioconjugatului rutin oleat/βCD

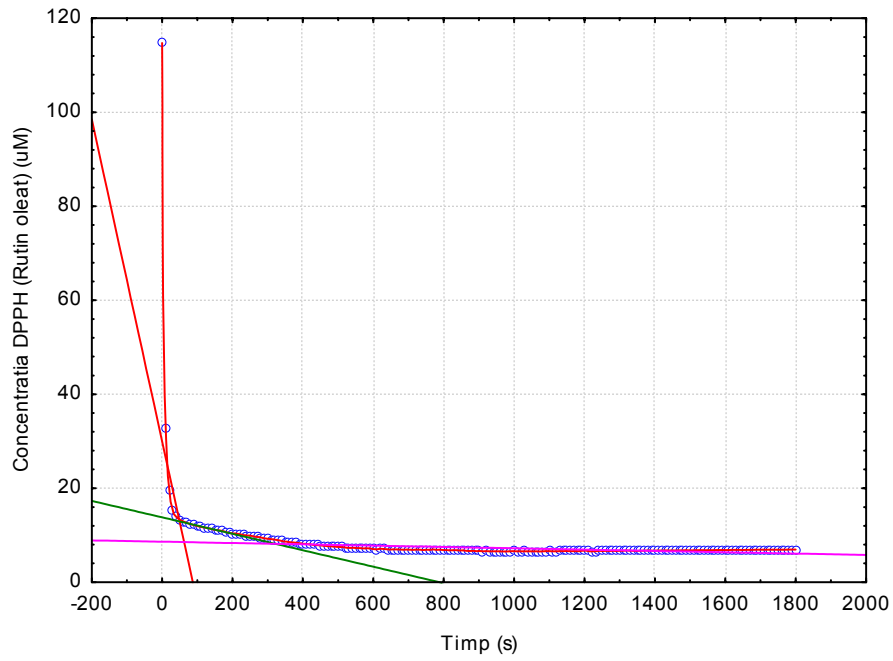


Figura 128. Variația vitezei DPPH în prezența rutin oleatului

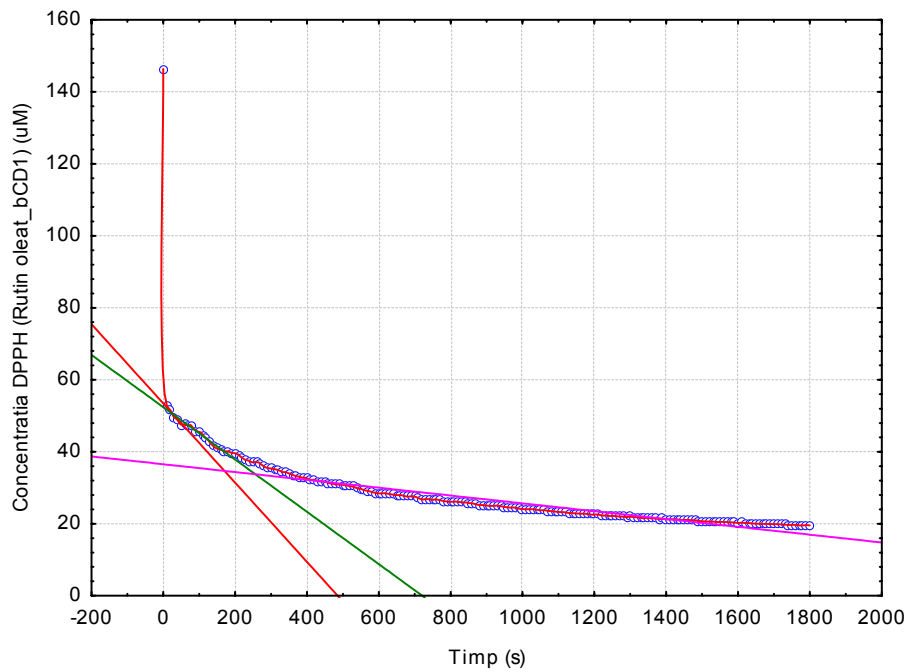


Figura 129. Variația vitezei DPPH în prezența complexului bioconjugatului rutin oleat/ β CD

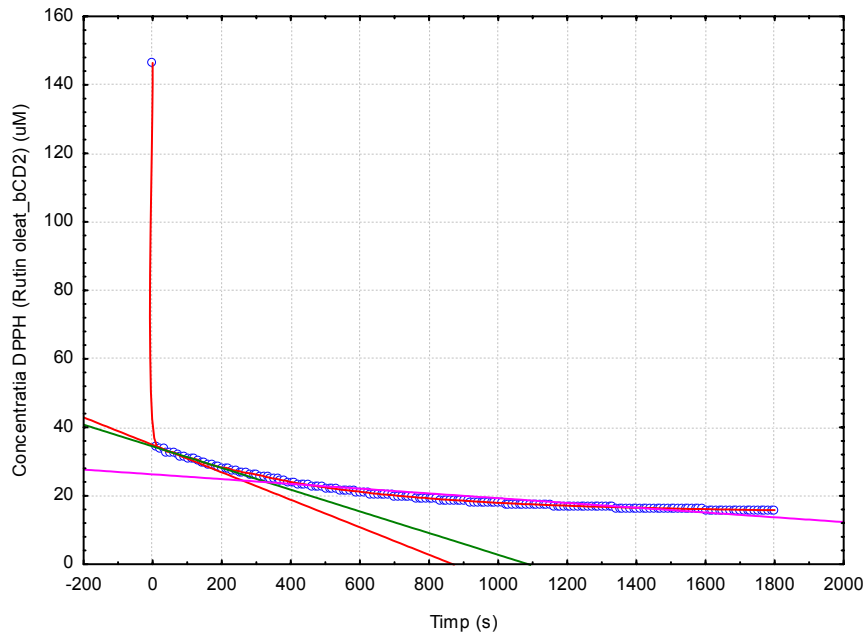


Figura 130. Variația vitezei DPPH în prezența complexului bioconjugatului rutin oleat/βCD

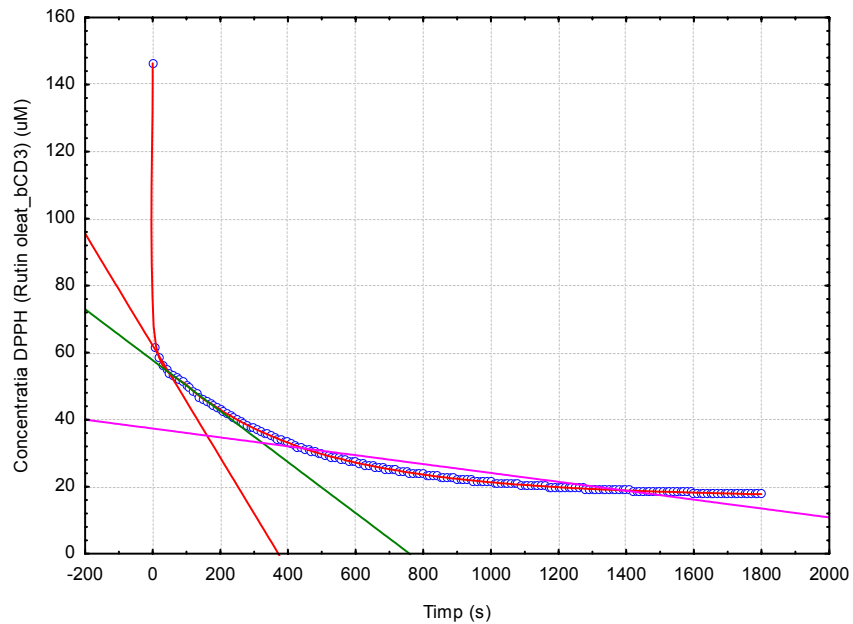


Figura 131. Variația vitezei DPPH în prezența complexului bioconjugatului rutin oleat/βCD

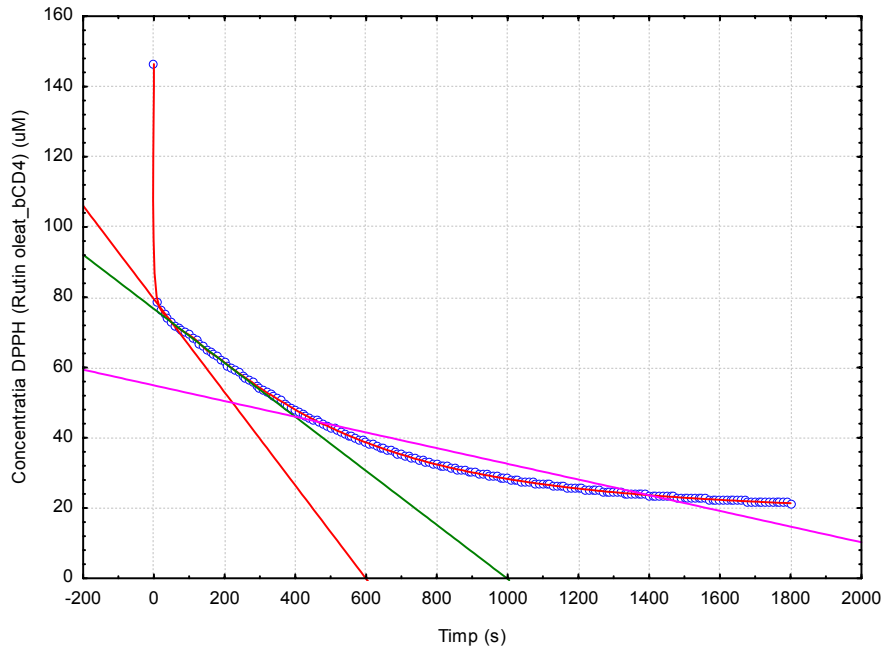


Figura 132. Variația vitezei DPPH în prezența complexului bioconjugatului rutin oleat/ β CD

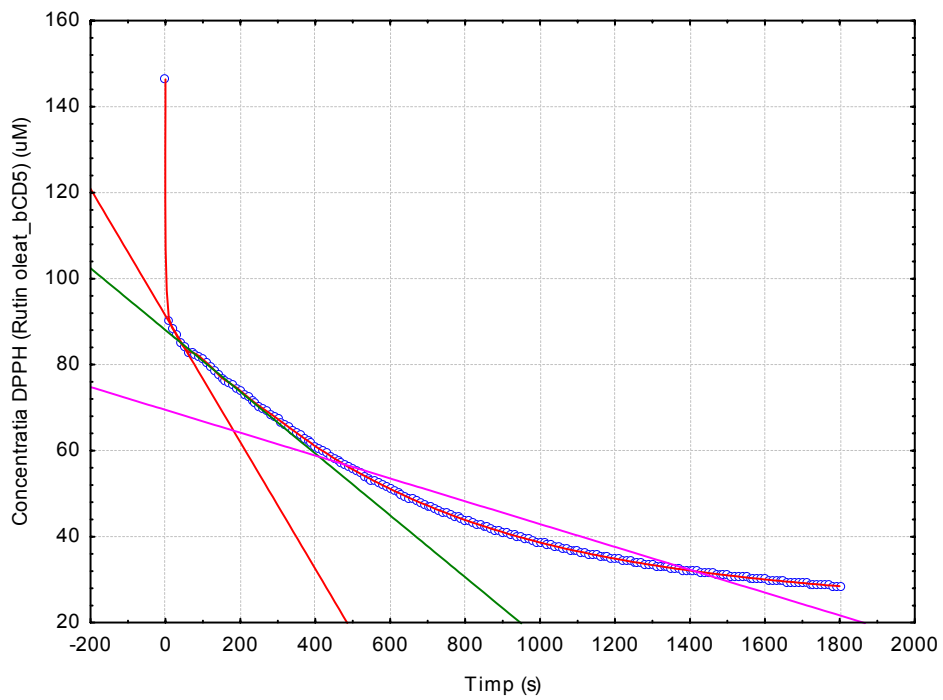


Figura 133. Variația vitezei DPPH în prezența complexului bioconjugatului rutin oleat/ β CD

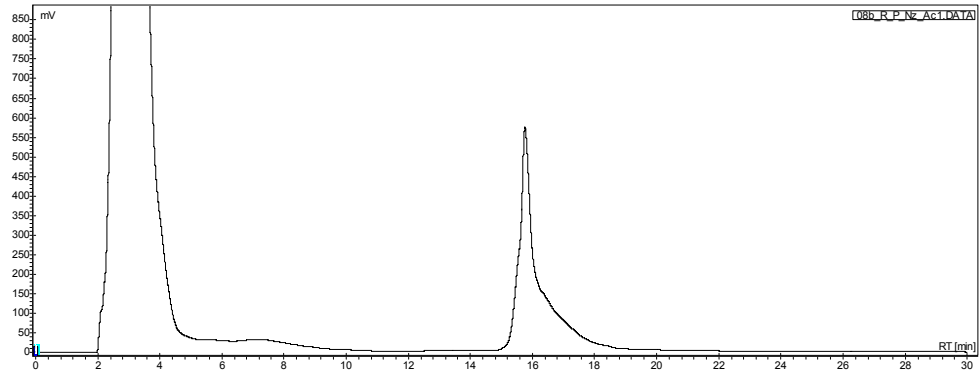


Figura 134. Cromatograma HPLC a rutin palmitatului obținut în prezența enzimei Novozyme, în acetonă, separat pe coloană cromatografică

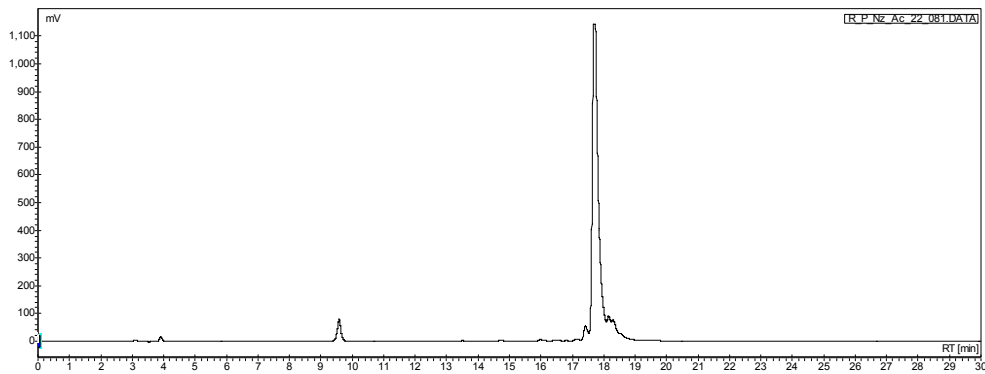


Figura 135. Cromatograma HPLC a rutin palmitatului obținut în prezența enzimei Novozyme, în metanol, separat pe coloană cromatografică

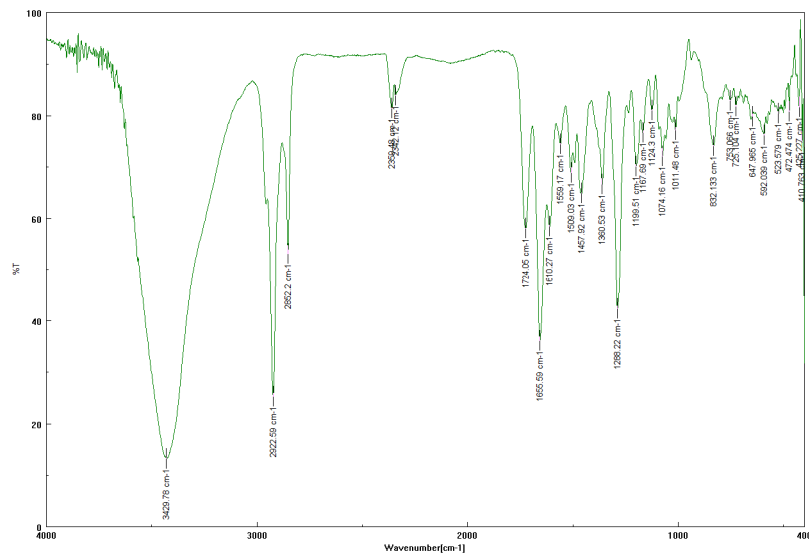


Figura 136. Spectrul FT-IR al rutin palmitatului în pastilă KBr

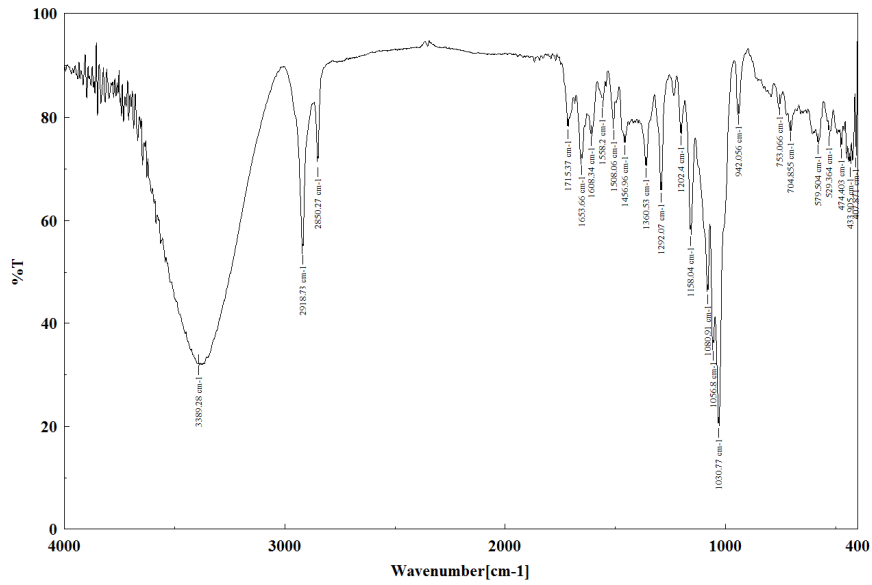


Figura 137. Spectrul FT-IR al complexului bioconjugatului rutin palmitat/ β CD în pastilă KBr

h 38 33 29 25 21
 Path: #11-QNP-34 (2008.11.19) TSP.PL8.
 NMR System: Bruker Avance DRX 400
 Oper: MB/ Registry No.: 13834
 User: Iulia (Francisc Peter)
 Sample Changer Position:
 Sample name and description: R_P
 Solubil incomplet in acetona.
 Solutie filtrata.

6.37

6.15

5.22

5.20

4.71

4.66

4.49

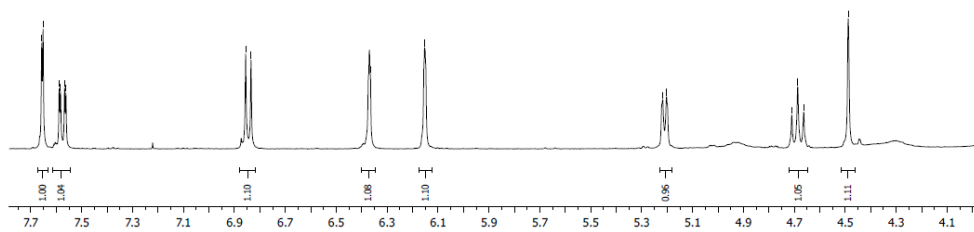


Figura 138. Spectrul ^1H RMN al rutin palmitatului

h
 Parameter Set: #1-QP-34 (20081119) 156308
 NMR System: Bruker Avance DRX 400
 Oper. MB/ Registry No.: 13834
 User: Iulia (Francisc Peter)
 Sample Changer Position:
 Sample name and description: R_P
 Solubil incomplet in acetona.
 Solutie filtrata.

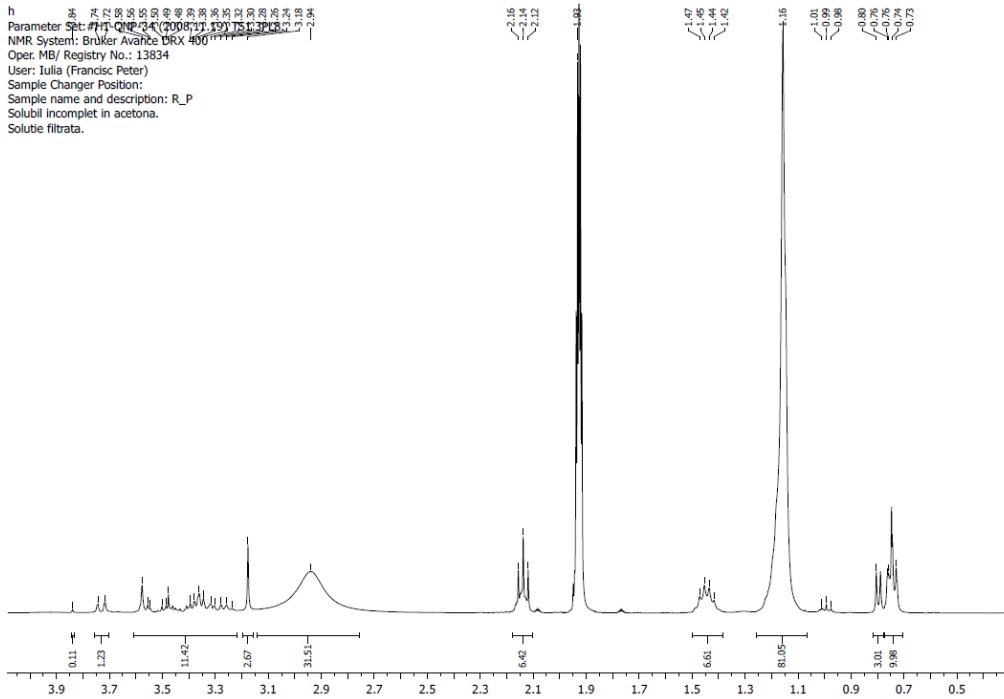


Figura 139. Spectrul ¹H RMN al rutin palmitatului

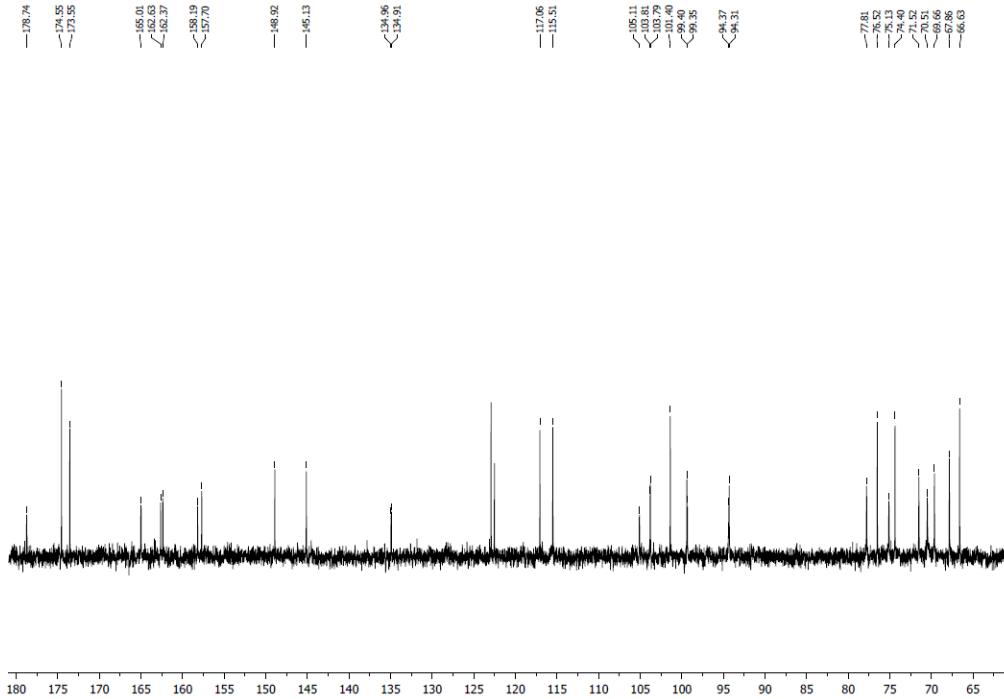


Figura 140. Spectrul ¹³C RMN al rutin palmitatului

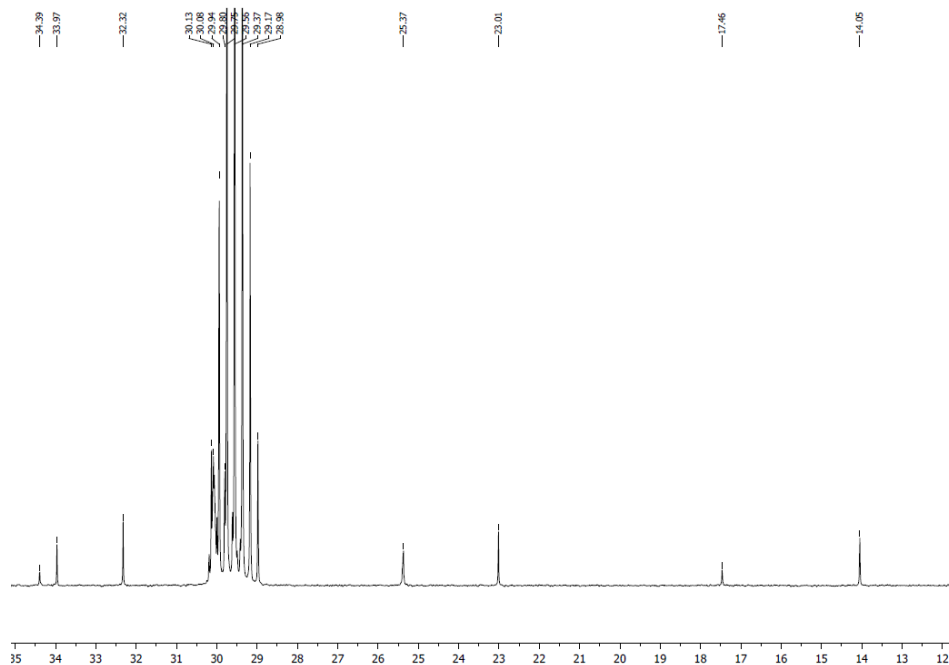


Figura 141. Spectrul ^{13}C RMN al rutin palmitatului

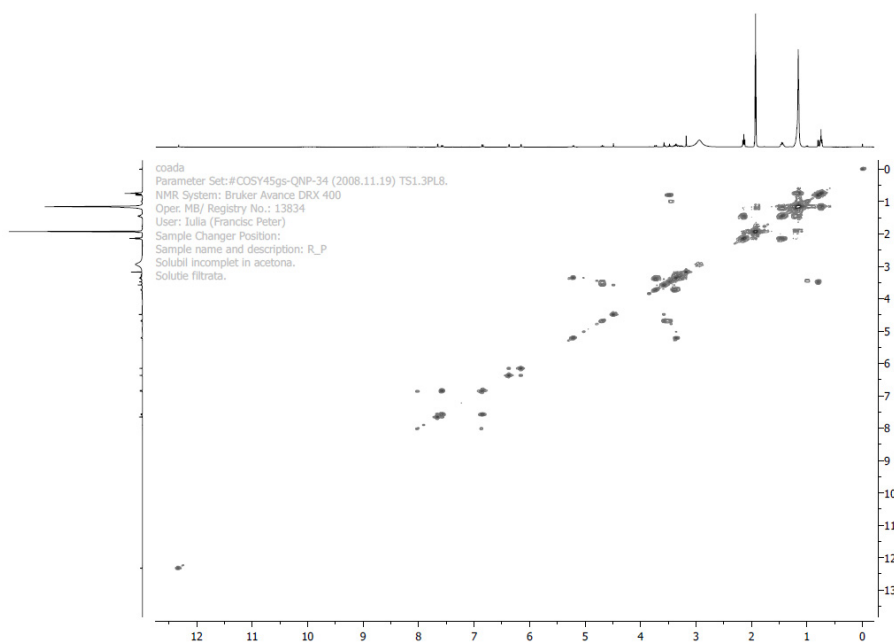


Figura 142. Spectrul COSY al rutin palmitatului

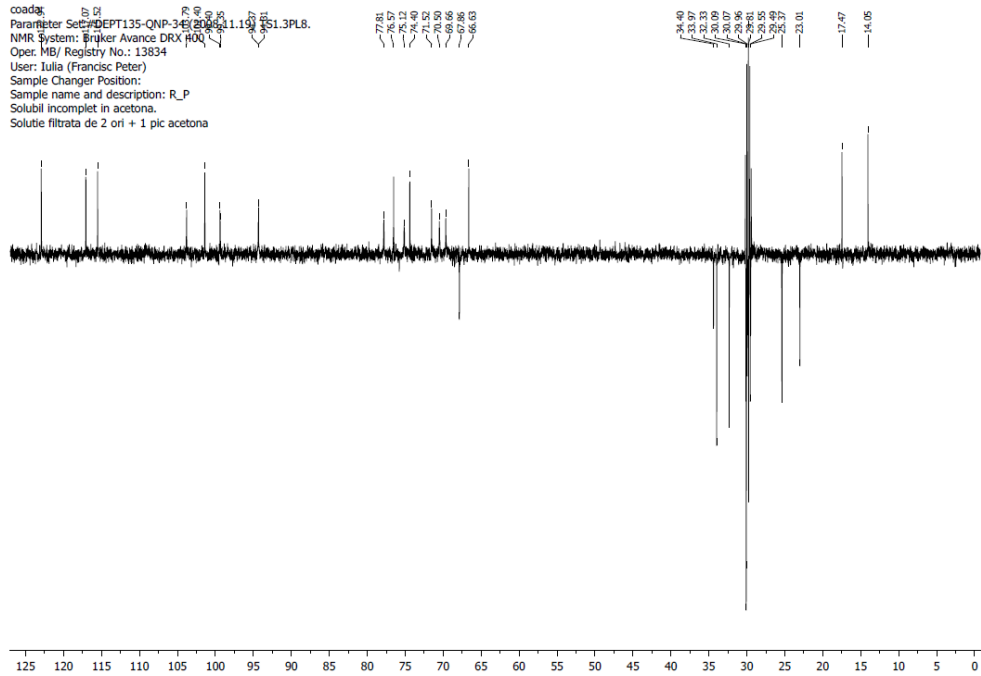


Figura 143. Spectrul DEPT 135 al rutin palmitatului

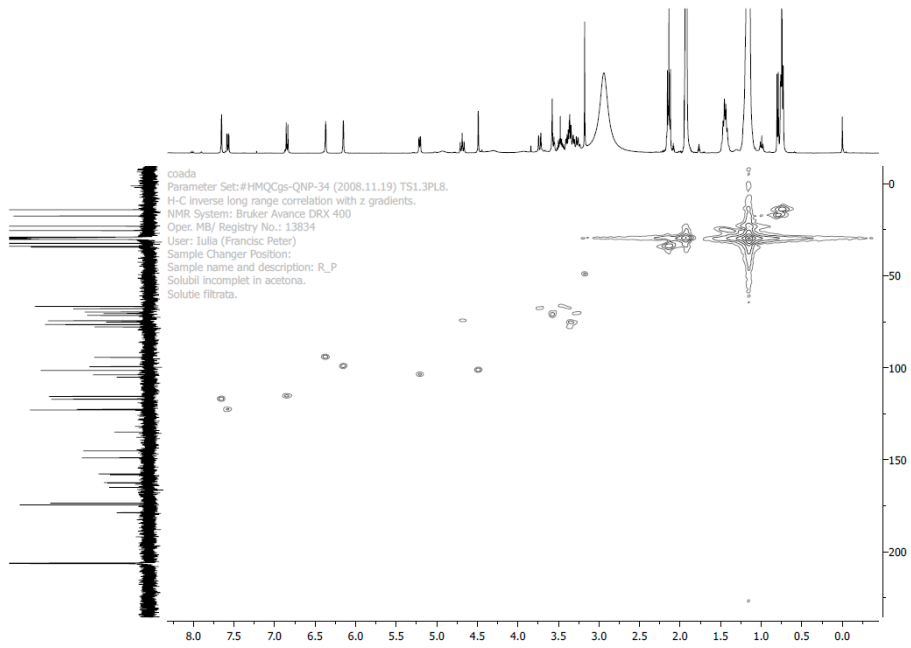


Figura 144. Spectrul HMQC al rutin palmitatului

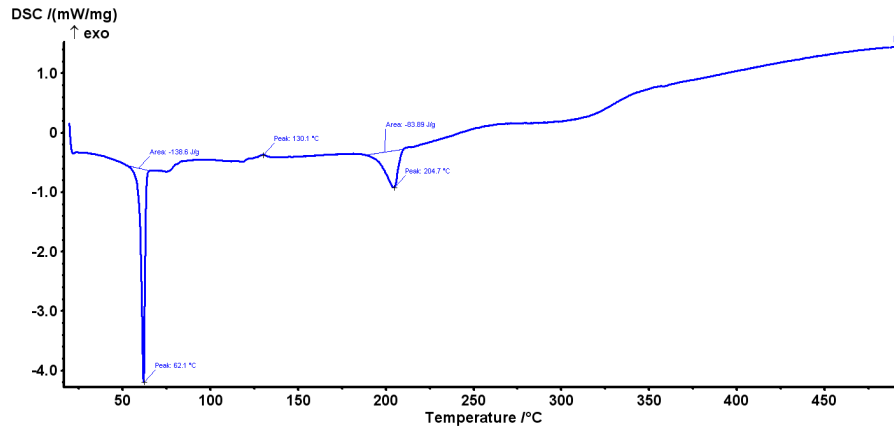


Figura 145. Analiza DSC a bioconjugatului rutin palmitat

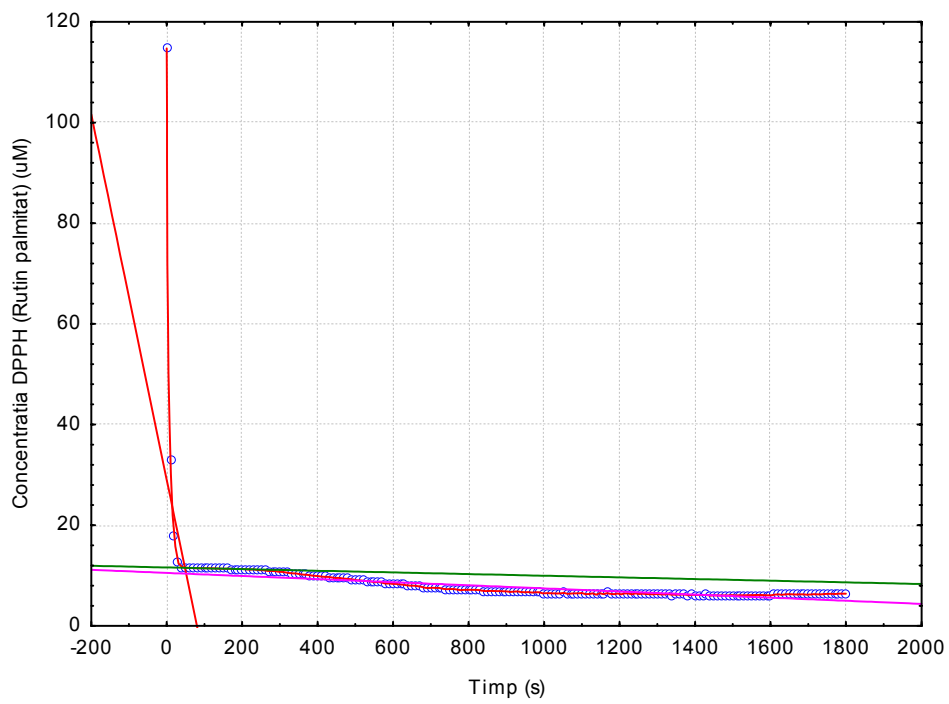


Figura 146. Variația vitezei DPPH în prezența rutin palmitatului

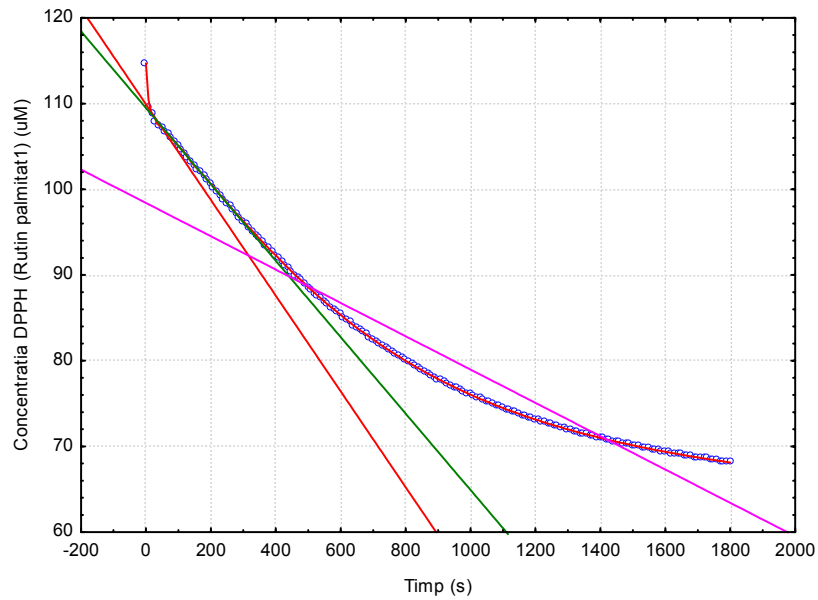


Figura 147. Variația vitezei DPPH în prezența rutin palmitatului

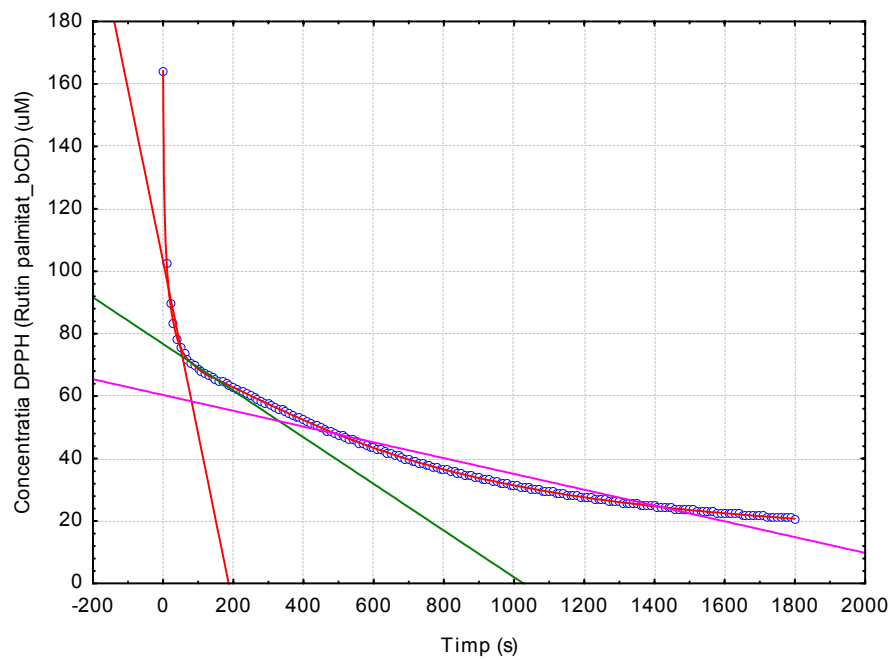


Figura 148. Variația vitezei DPPH în prezența complexului bioconjugatului rutin palmitat/ β CD

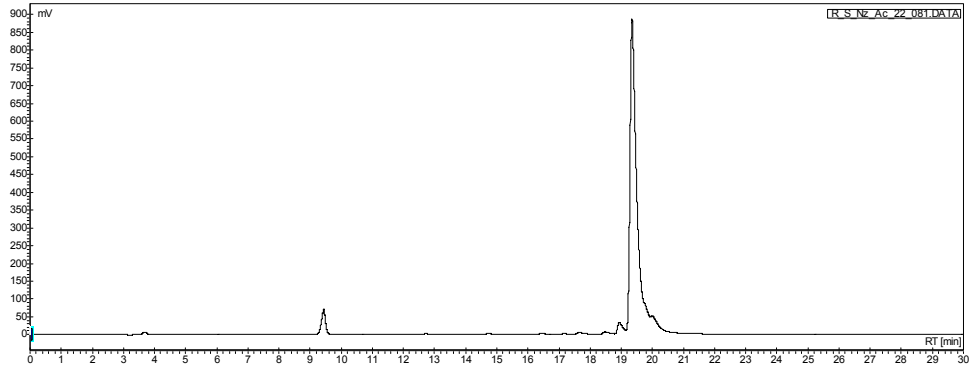


Figura 149. Cromatograma HPLC a rutin stearatului obținut în prezența enzimei Novozyme, în metanol, separat pe coloană cromatografică

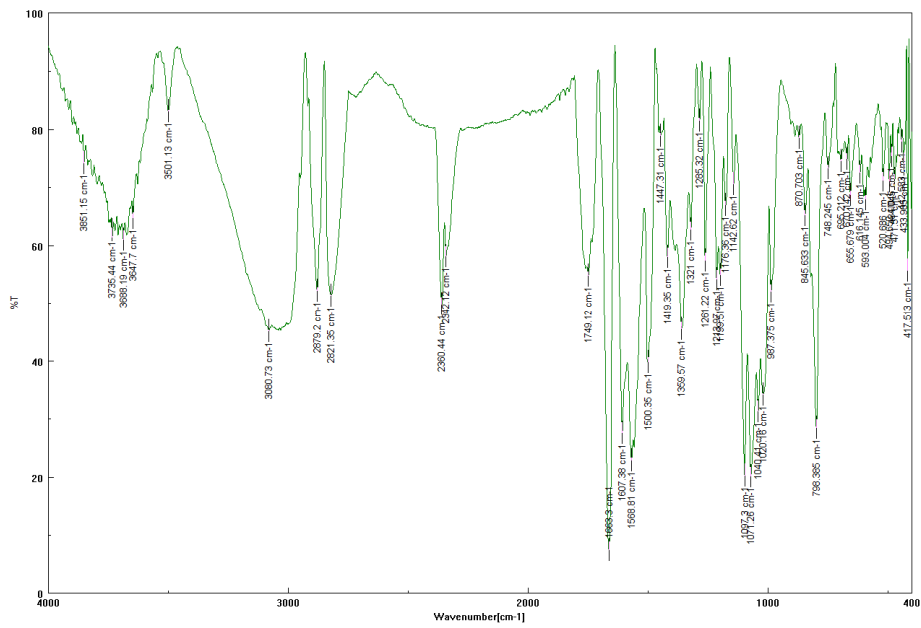


Figura 150. Spectrul FT-IR al rutin stearatului în pastilă de KBr

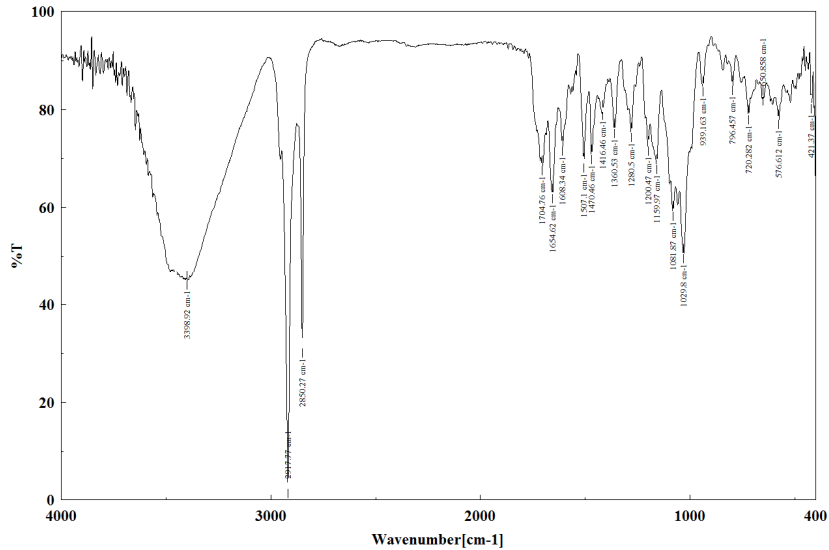


Figura 151. Spectrul FT-IR al complexului bioconjugatului rutin stearat/ β CD în pastilă de KBr

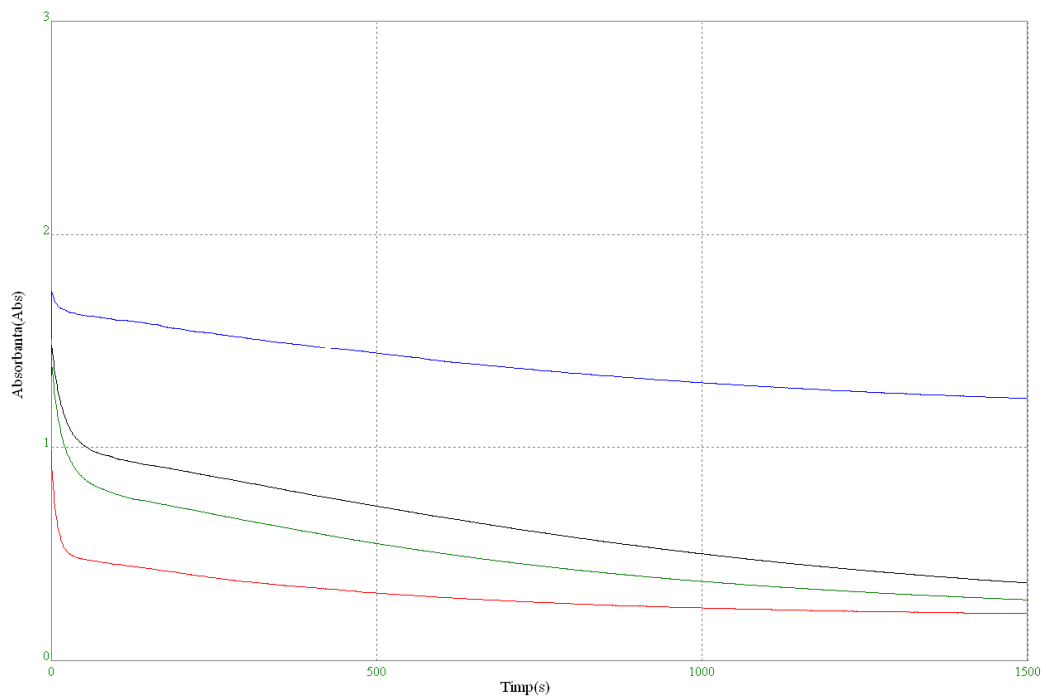


Figura 152. Variația absorbanței DPPH, în timp, în prezența complexelor bioconjugatelor rutin stearat/ β CD (negru), rutină/ β CD (rosu), rutin linoleat/ β CD (albastru), rutin palmitat/ β CD (verde)

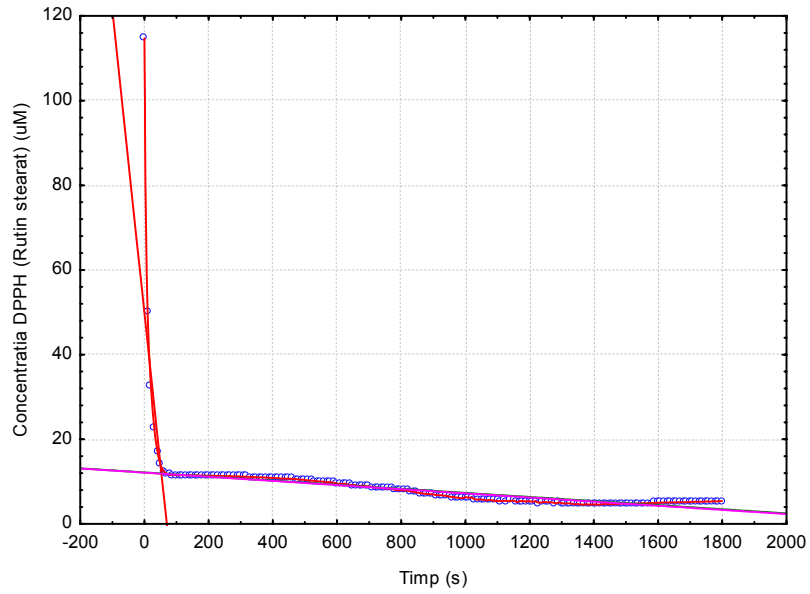


Figura 153. Variația vitezei DPPH în prezența rutin stearatului

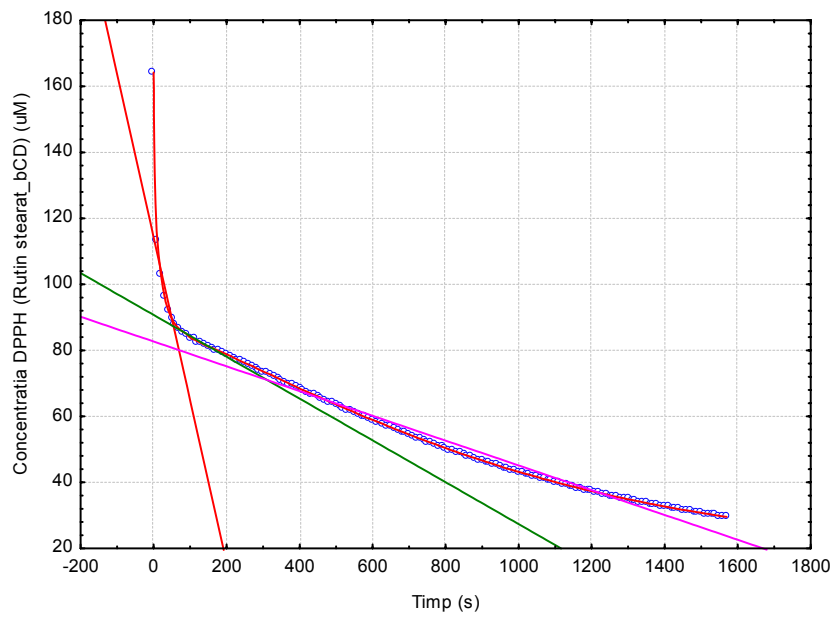


Figura 154. Variația vitezei DPPH în prezența complexului bioconjugatului rutin stearat/BCD

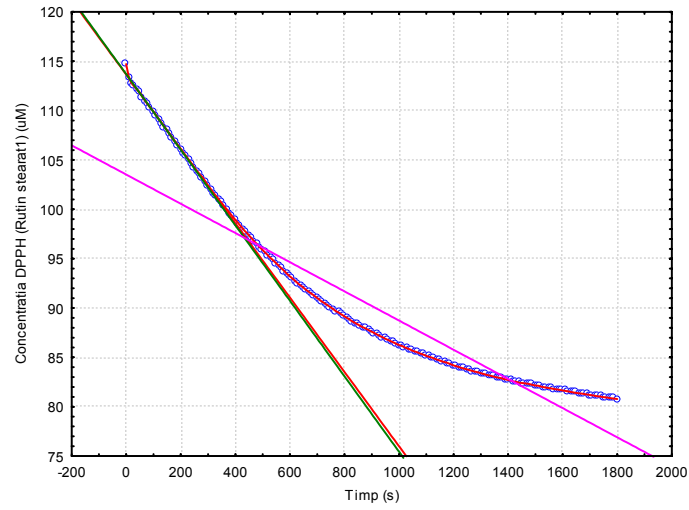


Figura 155. Variația vitezei DPPH în prezența rutin stearatului

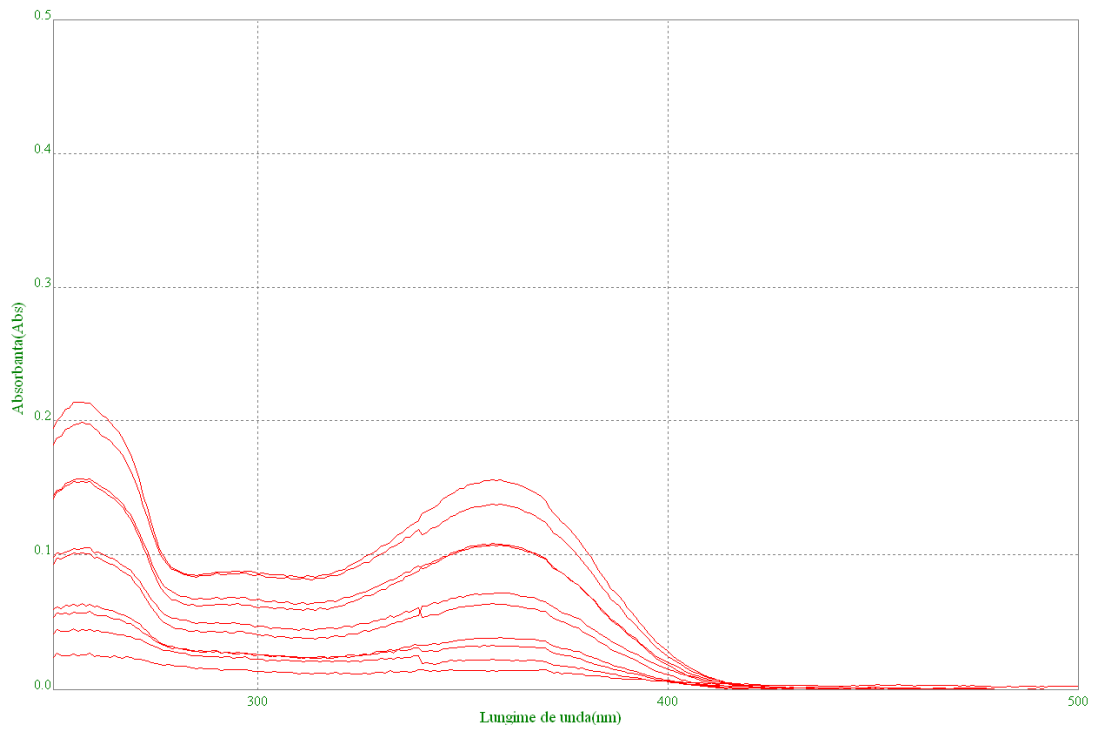


Figura 156. Spectrul UV-VIS al complexului rutin linoleat cu βCD , la transfer membrananr în soluție etanolică 60%

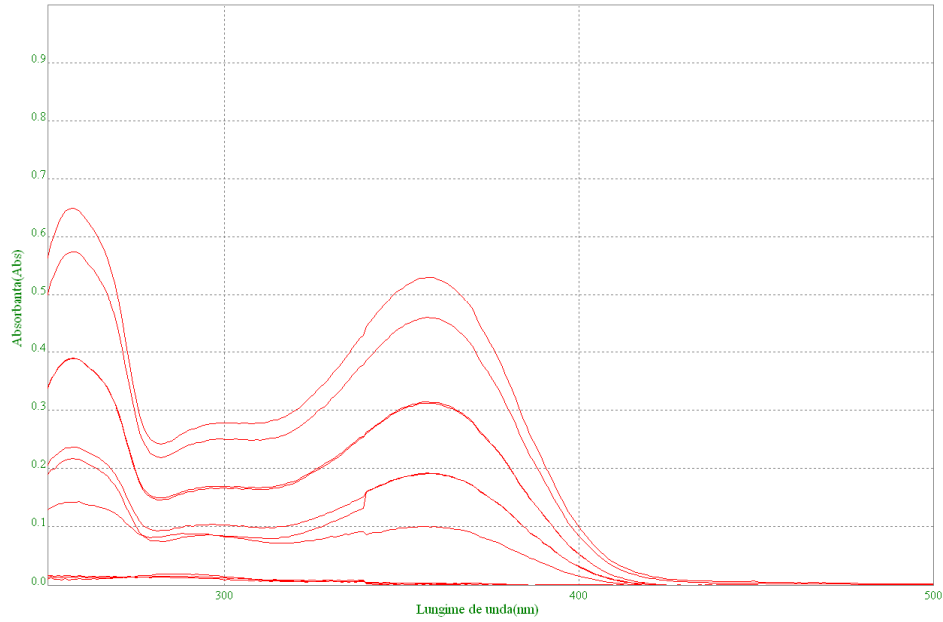


Figura 157. Spectrul UV-VIS al complexului rutin palmitat cu β CD, la transfer membrantar în soluție etanolică 60%

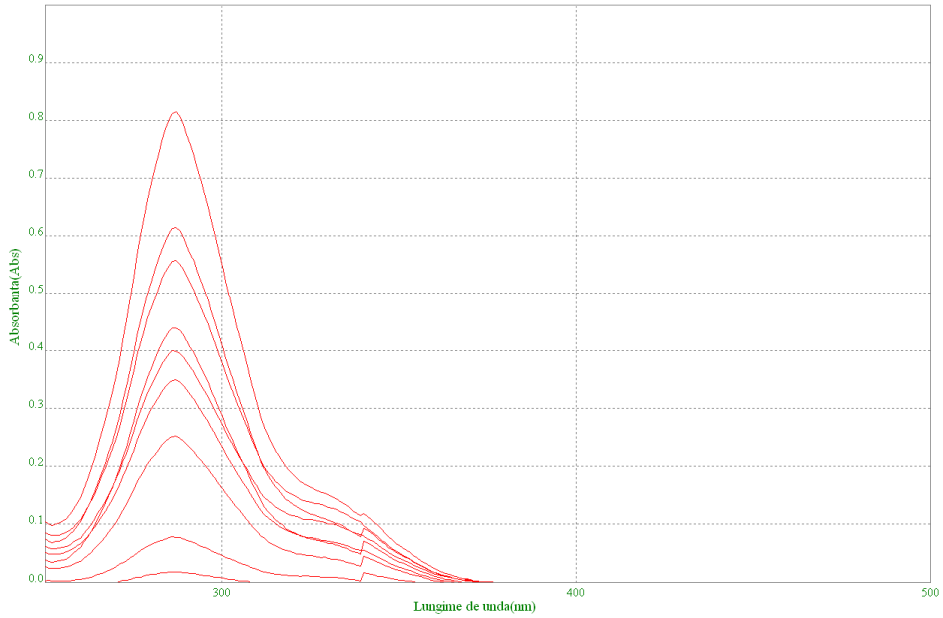


Figura 158. Spectrul UV-VIS al silibininei, la transfer membrantar în soluție etanolică 60%

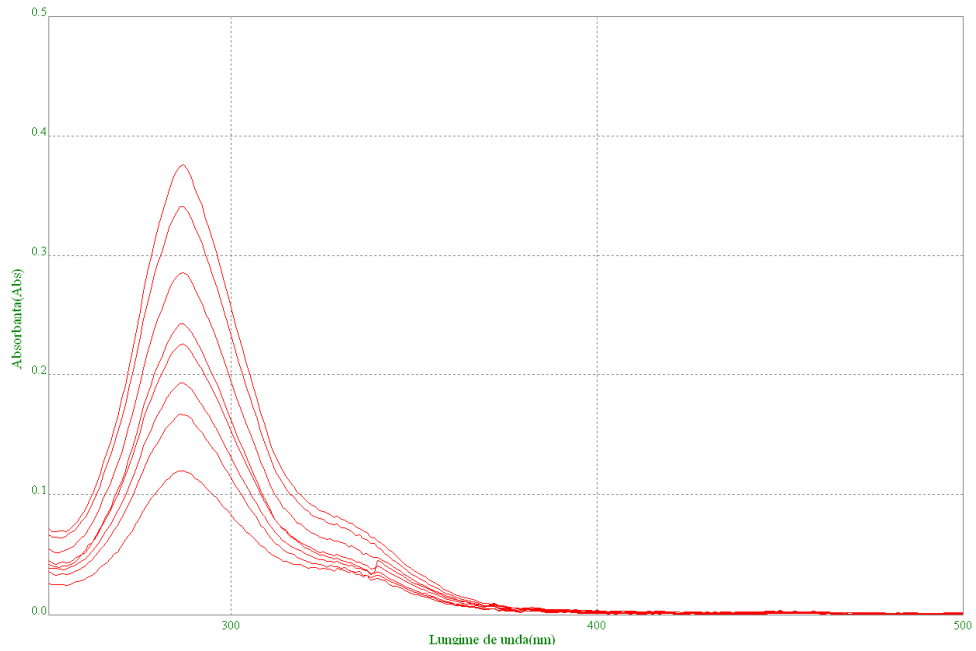


Figura 159. Spectrul UV-VIS al complexului silibininei cu β CD, la transfer membranal în soluție etanolică 60%

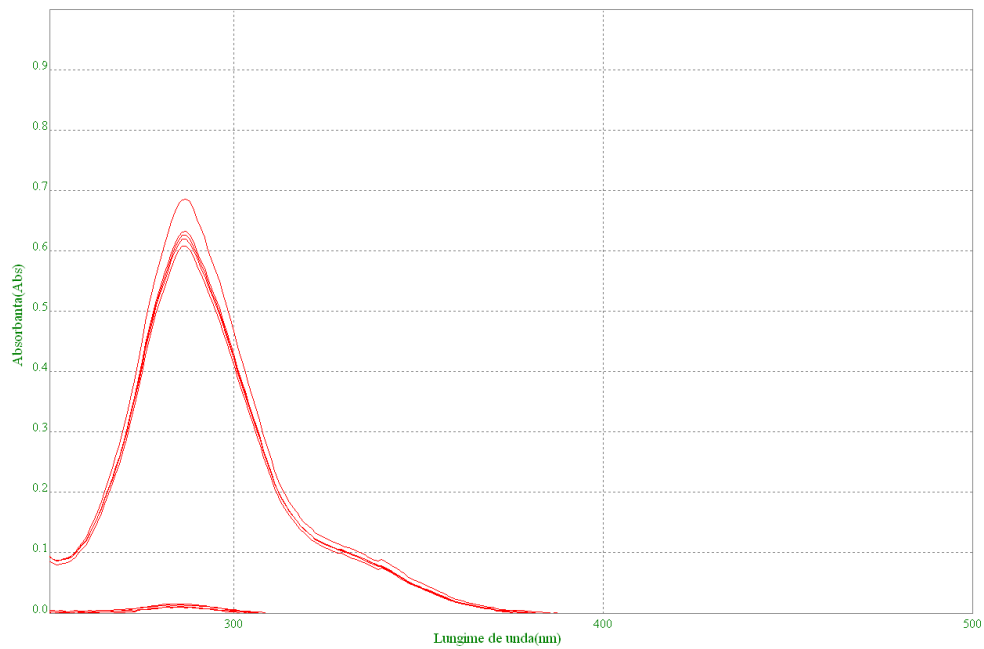


Figura 160. Spectrul UV-VIS al complexului silibinin oleat cu β CD, la transfer membranal în soluție etanolică 60%

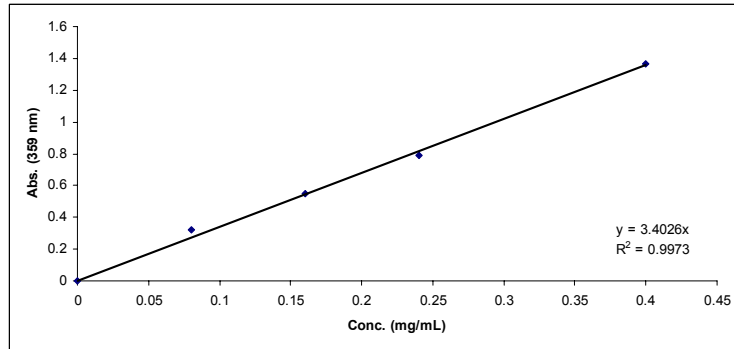


Figura 161. Curba de etalonare a rutin palmitatului

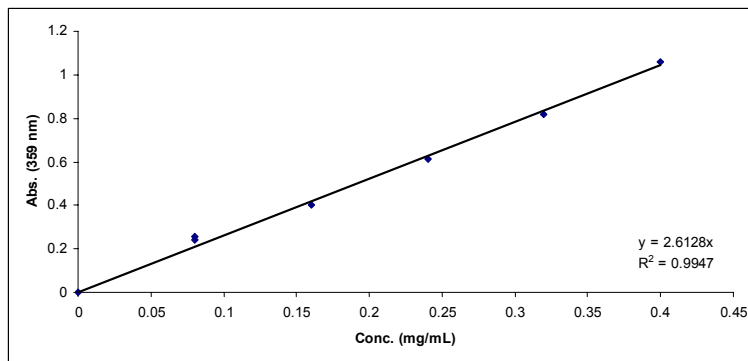


Figura 162. Curba de etalonare a rutin stearatului

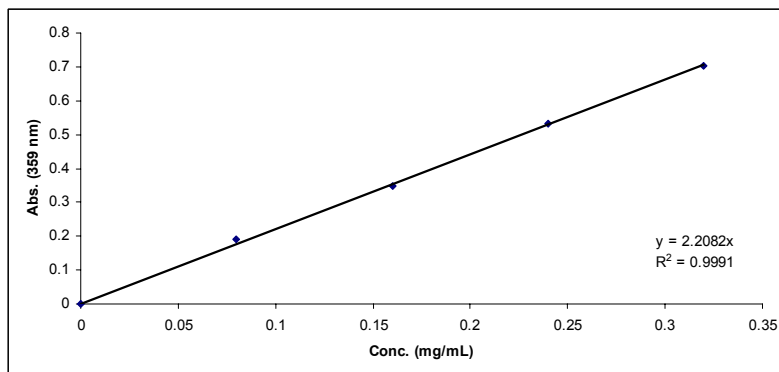


Figura 163. Curba de etalonare a rutin linoleatului

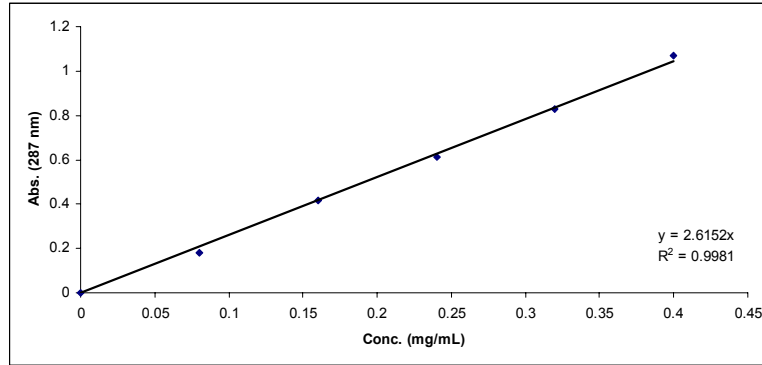


Figura 164. Curba de etalonare a silibinin palmitatului

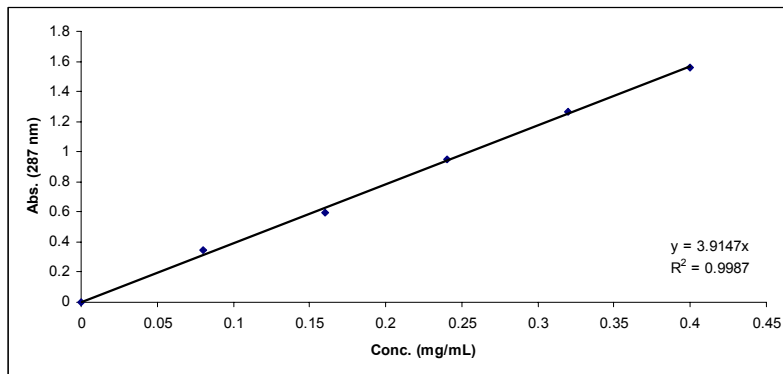


Figura 165. Curba de etalonare a silibinin behenoatului

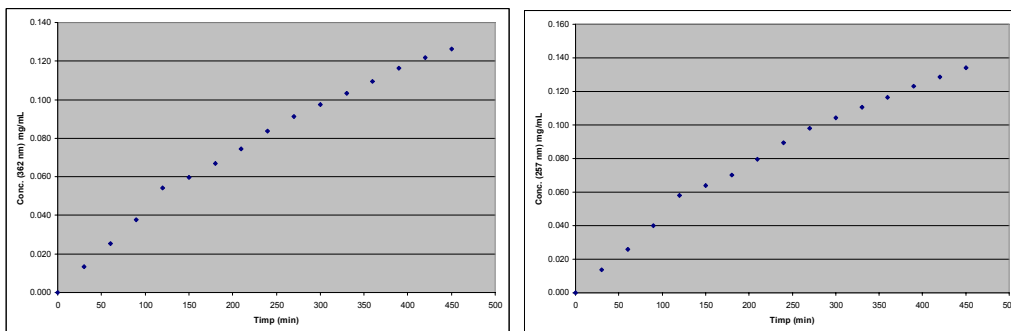


Figura 166. Variația concentrației la lungimile de undă 362 nm (stânga) și 257 nm (dreapta) în funcție de timp, la transferul membranar, pentru rutină în soluție de ser fiziologic

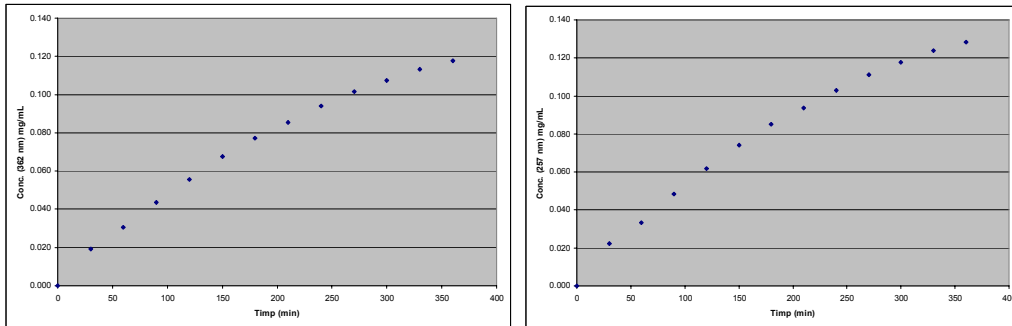


Figura 167. Variația concentrației la lungimile de undă 362 nm (stânga) și 257 nm (dreapta) în funcție de timp, la transferul membranar, pentru complexul rutină/ α CD în soluție de ser fiziologic

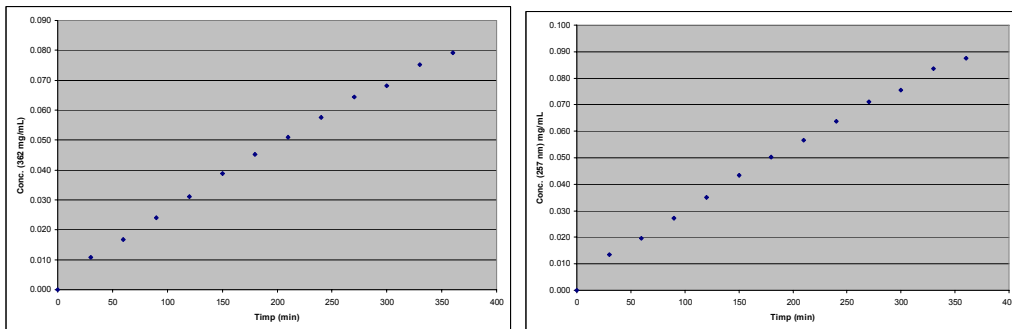


Figura 168. Variația concentrației la lungimile de undă 362 nm (stânga) și 257 nm (dreapta) în funcție de timp, la transferul membranar, pentru complexul rutină/ β CD în soluție de ser fiziologic

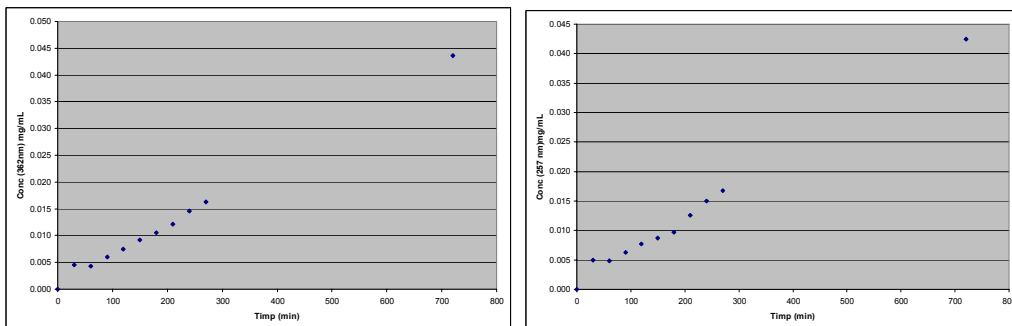


Figura 169. Variația concentrației la lungimile de undă 362 nm (stânga) și 257 nm (dreapta) în funcție de timp, la transferul membranar, pentru complexul rutină/ β CD în soluție etanolică 60%

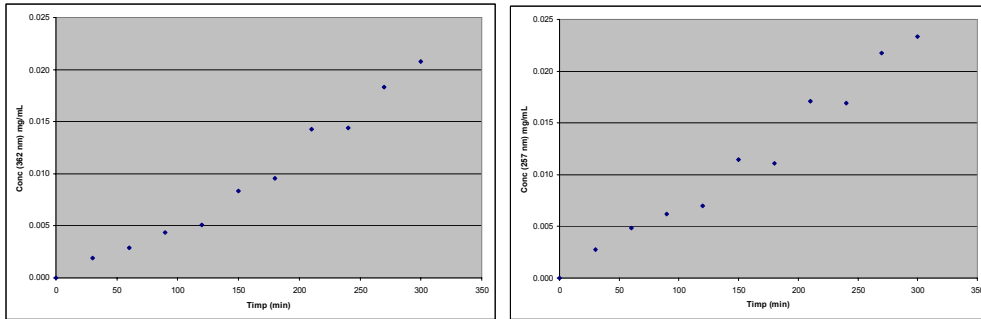


Figura 170. Variația concentrației la lungimile de undă 362 nm (stânga) și 257 nm (dreapta) în funcție de timp, la transferul membranar, pentru complexul rutin linoleat/ β CD în soluție etanolică 60%

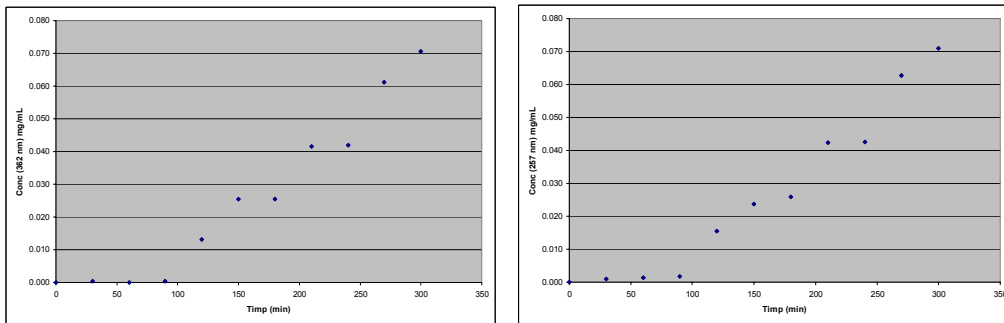


Figura 171. Variația concentrației la lungimile de undă 362 nm (stânga) și 257 nm (dreapta) în funcție de timp, la transferul membranar, pentru s complexul rutin palmitat/ β CD în soluție etanolică 60%

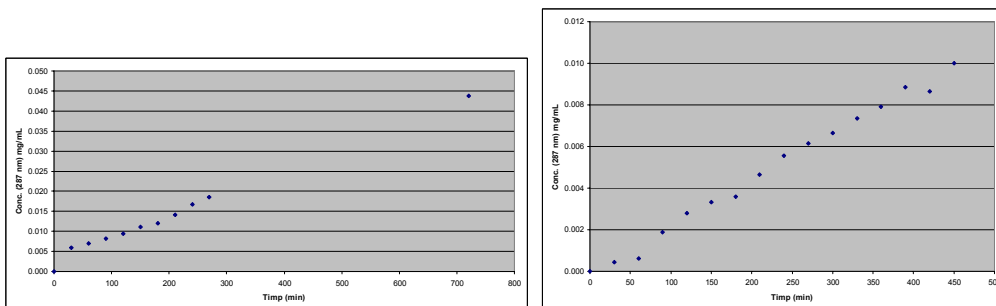


Figura 172. Variația concentrației la lungimea de undă 287 nm, în funcție de timp, pentru complexul silibinină/ β CD în soluție etanolică 60% (stânga) și pentru silibinină în soluție de ser fiziologic (dreapta)

CURBE ETALONARE FLAVONOIDE

$$Abs_{\cdot Rutina, 257nm} = 9.155(\pm 0.214) \cdot c_{Rutina(mg/mL)}$$

$$n = 5, r^2 = 0.998, s = 0.049, F = 1831$$

$$c_{Rutina(mg/mL)} = 0.109(\pm 0.003) \cdot Abs_{\cdot Rutina, 257nm}$$

$$n = 5, r^2 = 0.999, s = 0.054, F = 1831$$

$$Abs_{\cdot Rutina, 362nm} = 7.307(\pm 0.223) \cdot c_{Rutina(mg/mL)}$$

$$n = 5, r^2 = 0.996, s = 0.051, F = 1078$$

$$c_{Rutina(mg/mL)} = 0.136(\pm 0.004) \cdot Abs_{\cdot Rutina, 362nm}$$

$$n = 5, r^2 = 0.998, s = 0.007, F = 1078$$

$$Abs_{\cdot Silibinina, 287nm} = 20.319(\pm 1.247) \cdot c_{Silibinina(mg/mL)}$$

$$n = 5, r^2 = 0.985, s = 0.171, F = 266$$

$$c_{Silibina(mg/mL)} = 0.048(\pm 0.003) \cdot Abs_{\cdot Silibina, 287nm}$$

$$n = 5, r^2 = 0.993, s = 0.008, F = 266$$

$$Abs_{\cdot Quercetina, 265nm} = 11.502(\pm 0.098) \cdot c_{Quercetina(mg/mL)}$$

$$n = 7, r^2 = 0.999, s = 0.015, F = 13818$$

$$c_{Quercetina(mg/mL)} = 0.087(\pm 0.001) \cdot Abs_{\cdot Quercetina, 265nm}$$

$$n = 7, r^2 = 0.999, s = 0.001, F = 13818$$

$$Abs_{\cdot Quercetina, 371nm} = 14.542(\pm 0.246) \cdot c_{Quercetina(mg/mL)}$$

$$n = 7, r^2 = 0.998, s = 0.038, F = 3485$$

$$c_{Quercetina(mg/mL)} = 0.069(\pm 0.001) \cdot Abs_{\cdot Quercetina, 371nm}$$

$$n = 7, r^2 = 0.998, s = 0.003, F = 3485$$

Tabelul 1. Determinările conținutului de apă pe parcursul biosintezei: inițial, la 24h, la 72h, final, în cazul probelor cu/fără site moleculare

Nr. crt.	Proba	masa proba (g)	% apa	Volum titrant (mL)
1.	Rutin palmitat	0,385	0,69	0,86
		0,431	1,118	1,56
		0,422	1,468	2,00
		0,053	1,585	0,28
2.	Rutin decanoat	0,392	0,698	0,88
		0,143	1,311	0,61
		0,278	1,592	1,43
		0,051	1,828	0,31
3.	Rutin oleat	0,217	0,950	0,68
		0,182	0,868	0,52
		0,244	0,928	0,73
		0,139	0,963	0,44
4.	Rutin linoleat	0,209	1,033	0,70
		0,190	0,736	0,46
		0,165	0,823	0,45
		0,199	0,915	0,61
5.	Rutin palmitat (sm)	0,186	0,930	0,58
		0,266	0,699	0,60
		0,238	1,087	0,83
		0,173	0,309	0,18
6.	Rutin palmitat (sm, 1/5)	0,343	0,289	0,32
		0,221	0,259	0,19
		0,212	0,8025	0,57
		0,165	0,9328	0,51
		0,272	0,4596	0,42
		0,199	0,3552	0,23

Tabelul 2. Determinările conținutului de apă din precursori și pe parcursul biosintezei rutinei și silibininei, în acetonă, în prezență de Novozyme (inițial, 24h, 72h, final)

Nr. crt.	Proba	masa proba (g)	% apa	Volum titrant (mL)
1.	Acetona	0,183	0,180	0,11
2.	Rutina	0,020	9,586	0,64
3.	Silibinina	0,010	5,020	0,17
4.	Ac. decanoic	0,035	1,308	0,15
5.	Ac. palmitic	0,018	0,868	0,05
6.	Ac. stearic	0,017	1,220	0,07
7.	Ac. oleic	0,057	0,285	0,05
8.	Ac. linoleic	0,102	0,153	0,05
9.	Rutin decanoat	0,140	0,313	0,15
		0,086	0,458	0,13
		0,104	0,564	0,19
		0,166	0,340	0,19
10.	Rutin palmitat	0,164	0,238	0,13
		0,111	0,281	0,10
		0,201	1,148	0,77
		0,107	0,125	0,03
11.	Rutin stearat	0,121	0,347	0,14
		0,182	0,911	0,55
		0,100	0,417	0,14
		0,132	0,203	0,06
12.	Rutin oleat	0,245	0,285	0,23
		0,079	0,347	0,09
		0,162	0,523	0,28
		0,191	0,249	0,10
13.	Rutin linoleat	0,150	0,336	0,17

		0,199 0,172 0,230	0,778 0,300 0,264	0,52 0,17 0,13
14.	Silibinin decanoat	0,144 0,148 0,157 0,131	0,332 0,736 0,468 0,329	0,16 0,36 0,16 0,09
15.	Silibinin palmitat	0,164 0,125 0,138 0,160	0,609 0,635 0,336 0,206	0,22 0,17 0,15 0,11
16.	Silibinin stearat	0,171 0,129 0,120 0,152	0,635 0,806 0,393 0,340	0,23 0,34 0,16 0,11
17.	Silibinin oleat	0,097 0,189 0,161 0,149	0,286 0,360 0,269 0,227	0,09 0,15 0,14 0,11
18.	Silibinin linoleat	0,135 0,161 0,143 0,166	0,363 0,947 0,471 0,244	0,16 0,33 0,14 0,13

Tabelul 3. Determinarea conținutului de apă formată, la biosinteza rutinei cu acizi grași, în prezență de Novozyme, la utilizarea solvenților acetonă (1-4), *terț*-butanol (5-8) și acetonitril (9-12)

Nr. crt.	Proba	masa proba (g)	% apa	Volum titrant (mL)
1.	Rutin palmitat	0,115	0,940	0,23
2.	Rutin decanoat	0,169	0,598	0,34
3.	Rutin oleat	0,164	0,321	0,11
4.	Rutin linoleat	0,196	0,490	0,21
5.	Rutin palmitat	0,240	1,000	0,52
6.	Rutin decanoat	0,269	1,009	0,59
7.	Rutin oleat	0,318	0,786	0,54
8.	Rutin linoleat	0,283	0,997	0,61
9.	Rutin palmitat	0,228	1,184	0,58
10.	Rutin decanoat	0,215	0,464	0,21
11.	Rutin oleat	0,272	0,437	0,26
12.	Rutin linoleat	0,263	0,248	0,14

LISTA DE LUCRĂRI

Lucrări publicate:

- [1] **I.A. Pînzaru**, D.I. Hădărugă, N.G. Hădărugă, L. Corpaș, I. Grozescu, F. Peter, Hepatoprotective flavonoid bioconjugate / β -cyclodextrin nanoparticles: DSC – molecular modeling correlation, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **2011**, 6(4), 1605-1617, ISSN 1842-3582.
- [2] **I.A. Pînzaru**, D.I. Hădărugă, F. Peter, N.G. Hădărugă, Sylibin and rutin – fatty acid bioconjugates/ β -cyclodextrin supramolecular systems: biosynthesis, analysis, and antioxidant activity, în curs de evaluare la *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.
- [3] Riviș, A.; Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Trașcă, T.; Drugă, M.; **Pînzaru, I.A.**, Bioactive nanoparticles. The complexation of odorant compounds with α - and β -cyclodextrin, *Revista de Chimie* **2008**, 59(2), 149-153, ISSN 0034-7752.
- [4] Hădărugă D.I., Hădărugă N.G., Riviș A., Gruia A., **Pînzaru I.A.**, Thermal and oxidative stability of the *Allium Sativum* L. Bioactive compounds/ α - and β -cyclodextrin nanoparticles, *Revista de Chimie* **2007**, 58(10), 909-914, ISSN 0034-7752.
- [5] **I.A. Pînzaru**, D.I. Hădărugă, N.G. Hădărugă, F. Peter, Rutin-saturated fatty acid bioconjugate/cyclodextrin supramolecular systems: molecular modeling and docking studies, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* **2011**, 17(2), 108-114, ISSN 1453-1399.
- [6] Coneac, G.; Gafițanu, E.; Hădărugă, D.I.; Hădărugă, N.G.; Riviș, A.; Bandur, G.N.; **Pînzaru, I.A.**; Rusu, G.; Urșica, L.; Păunescu, V.; Gruia, A.; Sebeșan, M.; Grozescu, I.; Lazău, C.; Sfirloagă, P., "Propolis Extract/ β -Cyclodextrin Nanoparticles: Synthesis, Physico-Chemical, and Multivariate Analyses", *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* **2008**, 14(1), 58-70, ISSN 1453-1399.
- [7] Coneac, G.; Gafițanu, E.; Hădărugă, D.I.; Hădărugă, N.G.; **Pînzaru, I.A.**; Bandur, G.; Urșica, L.; Păunescu, V.; Gruia, A., "Flavonoid Contents of Propolis from the West Side of Romania and Correlation with the Antioxidant Activity", *Chem. Bull. "Politehnica" Univ. (Timișoara)* **2008**, 53(1-2), 56-60, ISSN 1224-6018.

LUCRĂRI COMUNICATE:

- [1] **Pînzaru, I.A.**; Hădărugă, D.I.; Hădărugă, N.G.; Peter, F., Effect of Water Content on Enzymatic Esterification of Flavonoids and Flavonosides, *3rd European Chemistry Congress*, 29.08-02.09, **2010**, Nurnberg, Germany.
- [2] Hădărugă, D.I.; **Pînzaru, I.A.**; Hădărugă, N.G.; Peter, F., New flavonoid derivative (silybin, rutin-fatty acid bioconjugates)/cyclodextrin supramolecular systems with potential hepatoprotective activity, *The 2nd European Conference on Cyclodextrins*, 2-4 October, **2011**, Asti, Italy.
- [3] Coneac, G.; Gafițanu, E.; Hădărugă, D.I.; Hădărugă, N.G.; **Pînzaru, I.A.**; Radu, Ana-Maria; Radu, Anca; Pantis, Violeta; Bandur, G.; Urșica, L.; Păunescu, V.; Gruia, A., Flavonoid contents of propolis from the west side of Romania and correlation with the antioxidant activity, *International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, 60 Years of Chemical Engineering Education*, Timișoara, 28-30 May **2008**.