

Tehnologii de obținere a unor produse naturale cu proprietăți imunostimulatoare

Cod proiect: PN-III-P2-2.1-PED-2019-2118/381PED/2020

Acronim: IMUNOSTIM

Domeniu: Biotehnologii

Director proiect: Conf. univ. dr. Christina Marie Zalaru

Perioada implementării: 23.10.2020-23.10.2022

Parteneri:

Coordonator UB Universitatea din București, Facultatea de Chimie,

Director Proiect Conf. univ. Dr. Christina Marie Zalaru

P1-INCDSB Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Științe Biologice,

Responsabil proiect Dr. Rodica Tatia;

P2-UPB Universitatea Politehnica din București, Facultatea de Inginerie Chimică și Biotehnologii,

Responsabil proiect (Conf. univ. Dr. Adina Gavrilă);

P3-Hofigal Export Import SA ,

Responsabil proiect Dr. Anca Daniela Raiciu – Marketing and Commercial Director

Rezumat

Scopul propunerii proiectului constă în dezvoltarea de tehnologii specifice pentru obținerea unor extracte vegetale cu proprietăți imunostimulatoare, care vor avea ca finalizare un supliment alimentar pentru revigorarea organismului.

Noutăți ale acestei propuneri sunt: combinație proprie de principii active cu proprietăți imunostimulatoare; metodă specifică de obținere a principiilor active cu proprietăți imunostimulatoare; dovedirea proprietăților neagresive a metodelor de extracție utilizate asupra principiilor active.

Se va selecta cel mai optim extract vegetal obținut prin metode de extracție convenționale și neconvenționale, care va avea cel mai bun randament de extracție posibil în ceea ce privește principiile active conținute din frunze de *Hedera helix* L. fără să se modifice structura compușilor bioactivi din plantă. În toate etapele de extracție, se vor utiliza solvenți prietenoși (apă, etanol). Vor fi puse la punct metode de analiză și de cuantificare a compușilor bioactivi selectați saponine triterpenice, carbohidrați, precum și compușii standard corespunzători. Compușii bioactivi de interes (din extracte și cei standard) vor fi analizați calitativ și cantitativ prin metode spectroscopice (^1H -RMN, ^{13}C -RMN, IR, UV-Vis, HPLC/ LC/MS/MS. Structura compușilor bioactivi selectați va fi

pusă în evidență prin metode de modelare și studii de difracție de raze X, pentru a confirma proprietățile imunostimulatoare ale acestora.

Compușii bioactivi selectați din extracte și cei standard vor fi testați prin metode specifice pentru a pune în evidență proprietățile imunostimulatoare. Se va elabora tehnologia de obținere a produsului finit, supliment alimentar, pentru revigorarea organismului, ce va avea impact clinic.

Obiective specifice:

- O1. Selecția și identificarea principiilor active cheie din frunze de *Hedera helix L.*
- O2. Testarea proprietăților imunostimulatoare a compușilor selectați.
- O3. Punerea la punct a metodelor de cuantificare și analiza compușilor selectați, standard.
- O4. Obținerea extractelor vegetale prin metode convenționale.
- O5. Obținerea extractelor vegetale prin metode neconvenționale.
- O6. Analiza calitativă și cantitativă a extractelor obținute și a compușilor standard selectați.
- O7. Testarea compușilor cheie în urma stabilirii condițiilor de extracție.
- O8. Testarea proprietăților imunostimulatoare a extractelor vegetale obținute.
- O9. Diseminarea rezultatelor.

Derularea proiectului

Fazele proiectului:

Faza 1. Selectarea și identificarea principiilor active cheie și testarea compușilor selectați cu proprietăți imunostimulatoare

Rezultate preconizate și realizate fază 1

În cadrul fazei 1 au fost atinse toate obiectivele propuse și anume stabilirea metodelor de cuantificare și analiză a compușilor standard, obținerea extractelor vegetale prin metode convenționale și neconvenționale, analiza calitativă și cantitativă a extractelor obținute și a compușilor standard selectați, precum și testarea citotoxicității a probelor de extracte vegetale și a compușilor standard pe celule fibroblaste NCTC și evaluarea biocompatibilității probelor de analizat în cultura de celule macrofage raw 264.7.; diseminarea rezultatelor.

S-a realizat un studiu documentar asupra caracteristicilor generale ale plantei *Hedera helix* L, precum și compoziția chimică și proprietățile terapeutice ale componentelor sale bioactive;

Au fost identificați principalii compuși imunomodulatori macromoleculari de origine vegetală și au fost selectate principiile active cheie din *Hedera helix* L., care prezintă activitate imunostimulatoare;

Au fost stabilite și dezvoltate metode de cuantificare și analiză a compușilor standard selectați.

Obiectivele planului de implementare a proiectului au fost atinse.

Pe baza analizei datelor din literatura de specialitate a fost stabilită strategia care va fi abordată în etapele următoare ale proiectului.

Faza 2.

Obținerea extractelor vegetale prin metode convenționale și neconvenționale și analiza calitativă și cantitativă a extractelor obținute și a compușilor standard selectați

Rezultate preconizate și realizate fază 2

În cadrul fazei 2 au fost atinse toate obiectivele propuse și anume obținerea extractelor vegetale prin metode convenționale și neconvenționale, cât și analiza calitativă și cantitativă a extractelor obținute și a compușilor standard selectați.

S-au utilizat patru metode convenționale de obținerea extractelor vegetale și anume: macerarea la temperatura camerei cu agitare intermitentă, refluxarea, extracția continuă Soxhlet, hidrodistilarea, folosind diferiți solvenți. În urma analizei cantitative HPLC/MS/MS și a cuantificării cantităților de compuși activi din extractele obținute a fost aleasă metoda de refluxare, folosind doar solvenți prietenoși, apă etanol. S-au folosit două metode neconvenționale de obținerea extractelor vegetale, microunde și ultrasunete, cu utilizarea acelorași solvenți, cu stabilirea unor parametrii optimi, temperatură, timp, raport solvent. Și în acest caz în urma analizei cantitative HPLC/MS/MS au fost cuantificate cantitățile de compuși activi din extractele obținute prin cele două metode. De asemenea a fost testată stabilitatea compușilor cheie.

Rezultatele au fost diseminate prin comunicări științifice la conferințe internaționale de profil.

Faza 3.

Testarea proprietăților imunostimulatoare a extractelor obținute și elaborarea tehnologiei de preparare a produsului finit.

Rezultate preconizate și realizate fază 3

În cadrul fazei 3 au fost atinse toate obiectivele propuse și anume continuarea analizei calitativă și cantitativă a extractelor obținute și a compușilor standard selectați; testarea

stabilității compușilor cheie folosind condițiile de extracție stabilite, asistate de microunde și ultrasunete; testarea proprietăților imunostimulatoare ale extractelor obținute; elaborarea tehnologiei de obținere a produsului final; diseminarea rezultatelor.

În această etapă în plus, față de activitățile preconizate s-a realizat și izolarea celor două clase de compuși cheie, selectați, saponinele și glucidele, din trei extracte obținute prin metodele convenționale. Au fost testate proprietăților imunostimulatoare ale extractelor obținute atât prin metodele de extracție convenționale și neconvenționale, a compușilor standard selectați, cât și a fracțiilor izolate. A fost testată activitatea antiinflamatoare pe celule și macrofage, a extractelor obținute și a fracțiilor izolate din extracte, precum și morfologia celulară prin tehnici optice.

A fost elaborată tehnologia de obținere a produsului preconizat, adică un extract glicerinohidroalcoolic 1DH din părți aeriene de Iederă

Rezultatele au fost diseminate prin comunicări științifice la conferințe internaționale de profil, publicații ISI, și a trei brevete depuse și înregistrate la OSIM .

Astfel obiectivele celor 3 faze cu activitățile specifice acestora au fost îndeplinite în totalitate, iar rezultatele obținute au fost în concordanță cu țintele preconizate. Mai mult a fost realizată o activitate în plus, de izolare, din extractele obținute a fracțiilor de saponine și glucide.

Concluzii

Astfel obiectivele celor 3 faze cu activitățile specifice acestora au fost îndeplinite în totalitate, iar rezultatele obținute au fost în concordanță cu țintele preconizate. Mai mult a fost realizată o activitate în plus, de izolare, din extractele obținute a fracțiilor de saponine și glucide.

Imagini

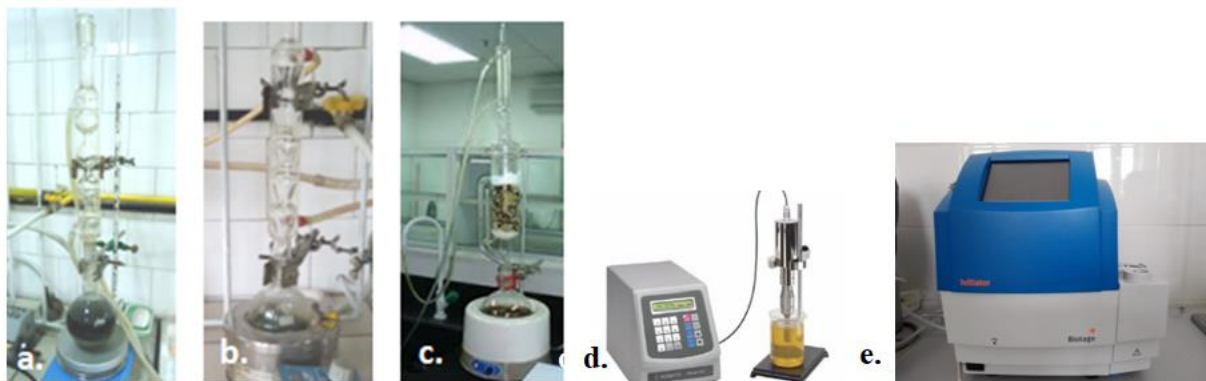


Figura 1. Metode de extracție convenționale
a. macerare; b. refluxare; c. extracția continuă Soxhlet.

Figura 2. Metode de extracție convenționale
d. Sonda de ultrasunete Vibracell VCX; e. Reactor cu microunde Biotage Initiator



Figura 3. *Hedera helix* L. înainte de a recolta



Figura 4. Material vegetal din părți aeriene de iederă după recoltare și condiționare (sortare, curățare și tocare) pregătit pentru macerare în solvent



Figura 5. Obținerea extractului glicerinohidroalcoolic din părți aeriene de Iederă



Figura 6. Frunze de *Hedera helix* L.



Figura 7. Pulbere de *Hedera helix* L.



Figura 8. Extract glicerinohidroalcoolic 1DH din părți aeriene de Iederă ambalat primar în formă de monodoză 1,5 mL

CONTACT:

Adresa: Șoseaua Panduri, nr. 90, Sector 5, 050663, București

Email: christina.zalaru@chimie.unibuc.ro; chmzalaru@gmail.com