

REZUMAT

Cuvinte cheie: *scualenă, *Amaranthus* sp., extracție supercritică, distilare moleculară*

Cercetările realizate în cadrul temei *Obținerea de principii biologice active din surse vegetale* au avut ca scop obținerea unui concentrat de scualenă din semințele speciei *Amaranthus* *sp.*

Lucrarea este structurată în două părți: Studiul critic al datelor de literatură (3 capitole, 63 pag.) și Partea experimentală (5 capitole, 167 pag). Teza mai cuprinde 4 anexe și o listă de referințe bibliografice ce însumează 341 titluri.

Importanța temei alese, scopul și obiectivele tezei sunt sintetizate în **Introducere**.

Primul capitol prezintă un scurt istoric al cercetărilor privind descoperirea scualenei.

Capitolul 2 (29 pag, 14 tabele) face o sinteză a datelor de literatură privind sursele naturale de scualenă. Sursa tradițională, cu cea mai mare concentrație de scualenă (>80%) o reprezintă uleiul din ficat de rechin. Preocupările legate de conservarea vieții marine constituie un prim motiv pentru căutarea altor surse de scualenei. Identificarea unor poluanți organici persistenti (POP) și a unor compuși ai metalelor grele în ficatul de rechin, a constituit o altă motivație pentru cautarea unor surse alternative de scualenă, de origine vegetală și/sau microbiană.

Deși scualena a fost identificată în multe plante, concentrațiile (de ordinul mg/100 g), sunt însă multe prea mici pentru izolarea acesteia. Pentru scopuri industriale au fost identificate în prezent 3 surse de origine vegetală: uleiul din semințele speciei *Amaranthus*, distilatul rezultat la dezodorizarea uleiului de măsline și distilatul rezultat la dezodorizarea uleiului de palmier.

Este de așteptat ca scualena de origine microbiană obținută prin biosinteză sau semisinteză să reprezinte o variantă cu potențial comercial în următorii ani.

În capitolul 3 (30 pag, 7 tabele) sunt prezentate principalele metode de analiză a scualenei precum și metodele de separare, concentrare și purificare a acestui compus din sursele cu relevanță industrială. Acest capitol se încheie cu o sinteză a principalelor aplicații ale scualenei în industria alimentară, cosmetică și farmaceutică.

Proprietățile emoliente și de hidratare ale scualenei, ca și biocompatibilitatea acesteia cu pielea au făcut din scualenă o componentă importantă în formulările cosmetice (creme hidratante, produse anti-ageing). Scualena este considerată unul dintre cei mai buni emolienți naturali, fiind absorbită rapid și eficient în piele, cu acțiune de refacere a supleții și flexibilității naturale a acesteia, fără a lăsa resturi uleioase pe piele.

Naziri și colab. (2011) au considerat că scualena are capacitatea de a controla colonizarea patogenă. Această proprietate stă la baza utilizării scualenei în tratamentul infecțiilor pielii cu bacterii și fungi.

Una din principalele utilizări ale scualenei în industria farmaceutică o constituie prepararea unor emulsii stabile, utilizate ca adjuvant în administrarea vaccinurilor, pentru stimularea răspunsului imun al pacientului la vaccin. Deși au existat temeri privind rolul scualenei în inducerea sau accentuarea unor reacții adverse, s-a demonstrat că administrarea scualenei nu produce anticorpi anti-scualenă. Datele publicate de Organizația Mondială a Sănătății (WHO, Global Advisory Committee Report on Vaccine Safety, 2008) au arătat că scualena a fost prezentă în peste 22 milioane de vaccinuri antigripale distribuite la pacienți în Europa din 1997 și că în acest timp nu au fost constatate efecte adverse.

Partea experimentală începe cu prezentarea metodelor utilizate în cadrul cercetărilor de laborator - **Capitolul 4** (20 pag). În acest capitol sunt prezentate metodele standard (ISO, AOAC, AOCS) utilizate pentru obținerea datelor experimentale.

Capitolul 5: Obținerea și caracterizarea semințelor de *Amaranthus sp.* (18 pag, 8 tabele, 18 fig.) cuprinde descrierea materialului biologic, datele privind producția obținută în anul 2012 pentru 11 varietăți de *Amaranthus sp.*, producția de semințe, ulei și proteină. Producția medie a celor 11 variante a fost în anul 2012 de 1861 kg/ha. Cea mai bună producție de semințe a fost obținută cu varietatea *Amaranthus cruentus* - MT3, pentru care s-a înregistrat o producție de 2236 kg/ha. Pentru analizele de compoziție chimică, semințele au fost măcinate. A fost studiată influența duratei măcinării asupra distribuției granulometrice (determinată prin sitare cu site analitice) a particulelor rezultate. În ipoteza unei distribuții log-normale a diametrelor particulelor (validată prin analiza datelor experimentale), diametrul mediu al particulelor a variat între 660 μm ($S_g=269 \mu\text{m}$) și 396 μm ($S_g=187 \mu\text{m}$).

Pentru varietățile testate umiditatea semințelor a variat între 10,9% și 13%, conținutul de proteină determinat prin metoda Kjeldahl (factor de transformare 5,85) între 9,02 și 16,3%, conținutul de ulei între 3,69 și 5,88%. Producția de proteină a variat între 166,44 și 333,91 kg/ha (media 257,6 kg/ha), iar producția de ulei între 74,8 și 107,23 kg/ha (media 93,69 kg/ha). Ținând seama de rezultatele obținute, semințele varietății *Amaranthus cruentus*-Alegria ce are concentrații de ulei (5,78%) și de proteină (14,91%) bune și asigură o producție bună de semințe (1822 kg/ha în condițiile anului 2012) au fost folosite în experimentele ulterioare.

În capitolul 6 (75 pag, 32 tabele, 48 fig.) sunt prezentate rezultatele experimentale obținute pentru extracția și caracterizarea uleiului din semințele de *Amaranthus cruentus*.

Deoarece în literatură nu există o metodă cromatografică standardizată pentru determinarea scualenei, a fost necesară adaptarea metodelor propuse în literatură la aparatura existentă, verificarea

și validarea metodelor alese. Pe baza datelor de literatură și a rezultatelor testelor preliminare, au fost alese două metode: o metodă HPLC și o metodă GC.

Pentru determinarea scualenei s-a ales o metodă HPLC cu fază inversă, cu detecție la 214 nm. S-a folosit o coloană de oțel inoxidabil 250×4,6 mm cu fază staționară Kromasil - C18 (octadecilsilan), 5μm. Faza mobilă a fost metanol : i-propanol : acid acetic 920 : 80 : 0,5. Determinările au fost realizate pe un cromatograf (HPLC) Merck – Lachrom. Pentru scualenă s-a obținut un timp de reținere de 14,36 minute. Domeniul de liniaritate a fost cuprins între 0,063325 – 0,37995 mg/mL, coeficientul de corelare având valoarea de 0,9934.

Pentru determinarea concomitentă a conținutului de scualenă și acizi grași (sub formă de esteri metilici) s-a folosit un cromatograf de gaze 6890N – AGILENT dotat cu coloană capilară cu o fază staționară tip HP88 – (88% cianopropil + aril–polisiloxan), L=60 m, φ=0,25 mm, prevăzut cu detector FID (ionizare în flacără) și autosampler 7683B. Condițiile de lucru au fost optimizate pentru asigurarea unei bune separări a principalilor acizi grași existenți în uleiul de *Amaranthus* și a scualenei. Folosind un regim de temperatură în două trepte: treapta I 150-175°C, treapta a doua 175-220°C, durata totală a analizei a fost 45,5 min. Timpul de retenție pentru scualenă a fost 39,63 min, domeniul de liniaritate 0,2344 – 4,6872 mg/mL, coeficientul de corelare 0,99888, limita de cuantificare pentru scualenă 0,015mg/mL.

Pentru extracția uleiului din semințele de *Amaranthus* s-a folosit eterul de petrol (SIGMA 24553) cu punctul de fierbere cuprins între 60–80°C și densitatea 0,660-0,680 (20°C). Extracția s-a realizat într-un extractor Soxhlet de laborator. Cantitatea de probă luată în lucru a fost 20-25 g. Umiditatea materialului supus extracției a fost <10%.

Pentru o durată a extracției mai mare sau egală cu 8 ore, dimensiunile particulelor nu influențează semnificativ cantitatea de ulei obținută prin metoda Soxhlet. Dimensiunile particulelor influențează viteza de extracție, constituind un parametru relevant pentru durate ale extracției mai mici sau egale cu 4 ore. Separarea făinii rezultate în urma măcinării pe fracții granulometrice (<300 μm; 300-500 μm, > 500 μm) a evidențiat existența unor concentrații mai mari de ulei și de proteină în fracția fină. Fracția cu diametrul mediu <300 μm, ce a reprezentat aproximativ 34% din masa totală a făinii, a avut o concentrație de ulei de 10,71% și o concentrație de proteină de 20,5%, adică de peste 1,8 ori mai mult ulei și de 1,38 ori mai multă proteină decât valorile obținute pe făina integrală (neseparată pe fracții granulometrice).

Particulele cu dimensiuni <300 μm conțin aproximativ 63% din întreaga cantitate de ulei, în timp ce în fracția grosieră nu se regăsește decât 9,3% din uleiul existent în întreaga cantitate de semințe. O observație similară se poate face și în ceea ce privește concentrația de proteină: fracția cu granulație fină conține aproximativ 47% din întreaga cantitate de proteină în timp ce fracția

grosieră doar 19% din proteină. Separarea pe fracții granulometrice nu modifică nici concentrația de scualenă în ulei și nici distribuția acizilor grași, diferențele înregistrate nefiind semnificative statistic.

O variantă modernă de extracție a uleiurilor vegetale o constituie extracția cu CO₂ supercritic. Acest solvent are un impact redus asupra mediului, este netoxic și neinflamabil. În plus permite obținerea unui extract “curat” (fără urme de solvenți). Extracția făinii integrale de *Amaranthus* cu CO₂ supercritic la o presiune de 517 bari, temperatură 100°C, debit de 15 g/min CO₂, o durată de 60 min și un consum specific de 45 g CO₂/g sămânță a condus la obținerea unei concentrații de 5,76±0,16 g ulei/g sămânță (față de 5,86 g ulei/g sămânță prin extracție cu eter de petrol). Uleiul obținut a avut un conținut de scualenă de 5,03±0,083 g/100 g ulei (față de 4,98 g scualenă/g sămânță prin extracție cu eter de petrol), un indice aciditate 1,05±0,12 (%) și un conținut de fosfor de 31±13 ppm. Din datele obținute rezultă că extracția cu CO₂ supercritic conduce la obținerea unor valori comparabile cu cele obținute la extracția cu eter de petrol, pentru conținutul de ulei, conținutul de scualenă și indicele de peroxid. Indicele de aciditate și conținutul de fosfor sunt mai reduse pentru uleiul obținut prin extracție cu CO₂ supercritic comparativ cu uleiul extras prin metoda Soxlet. Aceste caracteristici demonstrează că uleiul obținut prin extracție supercritică este superior calitativ uleiului rezultat prin extracție clasică.

Deoarece unul din cei mai importanți factori ce influențează eficiența extracției uleiului cu fluide supercritice îl reprezintă solubilitatea uleiului în solvent, cunoșterea efectelor presiunii și temperaturii asupra solubilității precum și determinarea cât mai exactă a valorilor solubilității reprezintă un prim pas pentru conducerea eficientă a extracției cu CO₂ supercritic. În literatură sunt prezentate numeroase date experimentale ale solubilității scualenei în CO₂ supercritic, însă între datele experimentale există diferențe mari, datorate atât aparaturii cât și metodelor diferite de determinare a solubilității (metode statice sau dinamice). În majoritatea cazurilor, solubilitatea substanțelor organice în CO₂ supercritic este modelată fie cu ajutorul ecuației de stare Peng-Robinson, fie prin ecuații (semi)empirice bazate pe densitatea solventului.

Modelarea influenței presiunii și temperaturii asupra solubilității scualenei în CO₂ supercritic cu modelul propus de Charstil pentru întreg domeniul de presiuni ($p=100-400$ bari) și temperaturi ($T=308,15-373,15$ K) pentru care au existat date experimentale a condus la obținerea unei valori a abaterii relative în valoare absolută (ARA) de 56,55% ($R^2=0,8347$), mult prea mare pentru ca predicțiile modelului să poată fi folosite în simulare. După excluderea valorilor corespunzătoare presiunii de 100 bari, au fost reținute 91 de valori ale solubilității. Parametrii modelului Charstil au fost optimizați prin regresie neliniară astfel încât să se obțină și o valoare totală ARA <25%.

Datele de solubilitate ale uleiului de *Amaranthus* în CO₂ supercritic au fost modelate cu 4 modele de solubilitate: Charstil (1982), Adachi-Lu (1983), del Valle –Aguillera (1998), del Valle și colab. (2012). Pentru solubilitatea uleiului de *Amaranthus*, cea mai bună concordanță între valorile experimentale și predicțiile teoretice s-au obținut cu modelul Adachi-Lu.

Prin combinarea modelului Charstil pentru solubilitatea scuulenei cu modelul Adachi-Lu pentru solubilitatea uleiului de *Amaranthus*, au fost identificate prin simulare, domeniile de variație a parametrilor ce prezintă cel mai mare interes pentru extracția uleiului de *Amaranthus* și a scuulenei. Pe baza rezultatelor simulării au fost realizate experimente de extracție la presiuni cuprinse între 200 și 400 bari, temperaturi între 30 și 70°C la un debit de CO₂ de 4,6 g/min, care au validat modelele propuse. Pentru extracția completă a uleiului, cele mai bune condiții sunt: 350 bari, aproximativ 180 min, temperatura 35°C.

Cinetica extracției uleiului de *Amaranthus* a fost modelată cu modelul BIC propus de Sovova (1994). Pentru identificarea parametrilor modelului s-a lucrat la trei valori ale debitului de CO₂: 3,5; 4,5 și 6,0 g/min, la presiunea de 300 bari și temperatura de 40°C. Au fost calculați parametrii modelului, coeficienții de transfer de masă în fază lichidă ($k_f \cdot a_0 = 1,17 \times 10^{-3} - 2,06 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) și în fază solidă ($k_s \cdot a_0 = 4,16 \times 10^{-5} - 8,65 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$), obținându-se o concordanță bună cu valorile existente în literatura de specialitate.

Capitolul 7 (47 pag, 39 tabele, 27 figuri) analizează rezultatele obținute la separarea scuulenei prin trei variante de flux tehnologic realizate practic la nivel de laborator. Prima variantă de flux tehnologic se bazează pe extracția integrală a făinii de *Amaranthus* cu solvenți organici, concentrarea misceleii, degumarea și neutralizarea uleiului. Uleiul a fost fracționat prin distilare moleculară. Utilizarea parametrilor optimi pentru fiecare din fazele procesului tehnologic a permis obținerea unui concentrat de scuulenă cu concentrație de 80-85 % și un randament de fracționare de 80%. În cea de-a doua variantă de flux tehnologic, uleiul de *Amaranthus* a fost transesterificat cu metanol/metoxid de sodiu (randament 92,24–95,1% reacție + separare + purificare). Fracționarea fazei organice prin distilare moleculară a condus la rezultate mult mai slabe decât prima variantă. Cea mai mare concentrație de scuulenă (87,3%) a fost obținută în varianta a treia, prin extracția fracției de făină cu diametrul mediu < 300 μm cu CO₂ supercritic și fracționarea prin distilare moleculară la 240°C, o presiune de $(2,2-2,5) \times 10^{-3}$ mbari, turație 500 rpm. Deoarece fracția fină conține doar 2/3 din cantitatea de ulei (și scuulenă) existentă în semințe, randamentul global este mai scăzut comparativ cu prima variantă.