

Optimisation of ultrasound-assisted extraction method of biologically active compounds from *Cynara scolymus* L.

*C. Ciobanu¹, E. Diug¹, T. Calalb¹, I. Tomuta², M. Achim²

¹Drug Technology Department and Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany
Nicolae Testemitsanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, the Republic of Moldova

²Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, Iuliu Hatieganu University of Medicine and Pharmacy
Cluj-Napoca, Romania

*Corresponding author: cristina.ciobanu@usmf.md. Manuscript received March 02, 2015; accepted April 02, 2015

Abstract

Background: Traditionally artichoke has been cultivated as a vegetable for human food in some Mediterranean regions and has been used in folk medicine since Roman times. Biological compounds of artichoke are mostly concentrated in leaves which contain high levels of caffeoylquinic acid derivatives. Obvious interest in this plant with hepatoprotective and cholesterol lowering qualities persuaded artichoke's introduction in the collection of the Centre for the Cultivation of Medicinal Plants at the Nicolae Testemitsanu State University of Medicine and Pharmacy in 2002. This study is focused on optimized ultrasound-assisted extraction parameters of polyphenols and flavonoids from artichoke leaves without the risk of thermal degradation for their main phytoconstituents.

Material and methods: In this study we have investigated the influence of some variables on extraction of polyphenols and flavonoids compounds from artichoke leaves based on ultrasound-assisted method. For this purpose an experimental design with 5 variables and 2 levels was used. The studied variables were: concentration of extraction solvent, temperature, extraction time and also the influence of parameters of ultrasonic processor pulse and amplitude; the total polyphenolic and flavonoid content were dependent variables.

Results: The results of composite design indicated that the optimal extraction parameters were as follows: concentration of ethanol solution 70%, temperature 80°C, ultrasound time 30 minutes, with ultrasonic power output and pulse mode factor 100%.

Conclusions: The influence of various parameters on the extraction of total flavonoid and polyphenolic content from artichoke's leaves was studied. The ethanol concentration, the temperature and the time were found to be the most effective in extracting phenolic compounds with ultrasound-assisted method respectively.

Key words: Artichoke leaf, ultrasound-assisted extraction, polyphenols, flavonoids content.

Optimizarea metodei de extracție cu ultrasunet a principiilor active din specia *Cynara scolymus* L.

Introducere

Astăzi putem constata că plantele sunt tot mai frecvent obiecte de investigații în instituțiile de cercetare științifică în vederea utilizării lor în scop terapeutic. Valorificarea unor noi surse de materie primă vegetală pentru producerea preparatelor medicamentoase în acest sens reprezintă o necesitate.

Un grup important de constituenți chimici ce se conțin în plante și formează o mare clasă de metaboliți secundari sunt compușii fenolici. Acest grup neomogen de compuși organici se întâlnesc fie liberi în formă monomerică sau legați cu oze. Din compușii fenolici fac parte flavonoidele (flavonozide, flavone, antociani), acizii fenolici, derivați ai acizilor hidroxicinamici, compușii fenolici polimeri etc. [11]. Biosinteza compușilor fenolici este parte din mecanismul de apărare al plantei cu implicare în adaptarea plantelor la condițiile de stres [1], astfel, se poate constata, că condițiile aride stau la baza formării unui complex bogat de constituenți chimici.

O plantă arhicunoscută ca produs comercial dietetic sănătos și ca sursă de principii active fenolice, localizată preponderent în frunzele plantei, este specia *Cynara scolymus* L. – anghinare. Grație componentei chimice a plantei, în care dominanți sunt compușii polifenolici și flavonoidici [6, 19], care cunosc un spectru vast de acțiuni fiziologice și terapeutice [2, 7, 14, 15, 16], specia *Cynara scolymus* L. a fost introdusă în colecția Centrului de Cultivare a Plantelor Medicinale a Instituției Publice Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie «Nicolae Testemițanu» [3].

În prezent, în vederea sporirii conținutului de principii active în produsele extractive obținute din plante, comparativ cu metodele clasice de extracție prin macerare și percolare, tot mai des se folosesc metode cu intensificarea procesului de extracție, în special prin metoda asistată de ultrasunete [10, 12].

Ultrasunetul emis în lichide cauzează la nivel local efecte extreme: undele de intensitate mare cauzează alternări de presiune înaltă (compresie) și presiune joasă (depresie) cu rate în funcție de frecvența undelor. În timpul ciclului de presiune joasă, undele ultrasonice crează bule de vid sau goluri în lichid. Când bulele ating un volum în care acestea nu mai pot absorbi energie, apare un colaps violent în timpul ciclului de presiune înaltă. Prin aceste forțe extreme apare fenomenul de liză sonică, pereții celulelor se distrug, iar principiile active sunt extrase [18].

Extracția asistată de ultrasunet este o alternativă ieftină, simplă și eficientă, în comparație cu tehnicile de extracție convenționale, deoarece suprafața dintre faza solidă și lichidă este semnificativ mai mare, datorită dispersiei particulelor. Un alt avantaj substanțial al ultrasunetelor constă în faptul, că în procesul de extracție pot fi influențați importanți parametri cum ar fi: timpul, temperatura, presiunea și vâscozitatea, iar în calitate de extragenți, pot fi utilizați atât solvenți polari cât și nepolari [20].

Datorită faptului că condițiile metodei de extracție cu

ultrasunet diferă în dependență de natura constituenților chimici și structura histologică a produselor vegetale [8, 17, 21, 22], ne-am propus studiul de optimizare a metodei de ultrasonare în vederea extracției principiilor active din specia *Cynara scolymus* L., care pe lângă cercetarea influenței factorilor de extracție, cum ar fi temperatura de lucru, durata și concentrația solventului, să stabilească influența intervalului de puls și amplitudinea aparatului de ultrasonare.

Material și metode

Material

Frunzele de anghinare au fost colectate la început de înflorire a plantei din colecția Centrului de Cultivare a Plantelor Medicinale a Instituției Publice Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie «Nicolae Testemițanu». Frunzele au fost uscate natural, la loc ferit de lumină.

Reactivi

În procesul de cercetare au fost folosiți următorii reactivi: substanță standard – acid galic, rutozidă – producător Sigma-Aldrich; reactiv Folin-Ciocalteu – producător Sigma-Aldrich; metanol, alcool etilic – producător Titolchimica, toate substanțele chimice folosite în experimente au fost de calitate analitică.

Aparate: spectrofotometru – JASCO V-530; aparat de ultrasunet – UP100H; baie de apă cu stabilizator de temperatură – Julabo.

Planul de experiență. Pentru realizarea scopului propus, a fost folosit un model matematic pentru a determina relația dintre factorii care acționează asupra extracției și proprietăților sistemului. Astfel, se planifică și se efectuează experimentele necesare cu o maximă eficiență, folosind resurse financiare și materiale optimizate spre a atinge obiectivul cât mai sigur, cu cea mai bună precizie, respectând și restricțiile care se impun [9].

Realizarea planului de experiență, calcularea coeficienților, a parametrilor statistici și a fitării datelor pentru evaluarea rezultatelor s-a efectuat cu ajutorul programului de optimizare Modde 9.0 (Umetrics, Suedia).

Pentru studiul optimizării extracției prin metoda cu ultrasunete a principiilor active din produsul vegetal *Cynarae folia* (frunză de anghinare) s-a folosit un plan experimental fracționat rezoluție V+ cu cinci factori și două niveluri 2^{5-2} . În calitate de variabile independente de formulare au servit temperatura de lucru, durata extracției, concentrația etanolului, amplitudinea și pulsul aparatului de ultrasonare, iar conținutul totalului polifenolic și flavonoidic extras servește drept variabile dependente (tab. 1).

Obținerea extractelor. Conform matricei planului experimental au fost obținute 19 extracte, preparate în raport 1:100, prin metoda de ultrasonare (tab. 2). Pentru obținerea extractelor au fost utilizați ca extragenți apă purificată și etanol de 35% și 70%. Studiul influenței duratei procesului

de extracție a cuprins intervalul de la 5 la 30 de minute. Influența temperaturii de extracție a fost cercetată de asemenea în 3 niveluri, extractele fiind obținute la temperaturi de 25°C, 52,5°C și 80°C; intervalul de puls a cuprins 0,3–1 minut, iar amplitudinea – de la 20 la 100 kHz. Extractele obținute au fost supuse analizei cantitative prin metode spectrofotometrice de dozare.

Tabelul 1

Variabile independente și dependente de formulare

Variabile de formulare	Simbol	Niveluri		
		-1	0	+1
Temperatura de lucru, °C	X ₁	25	52.5	80
Durata extracției, minute	X ₂	2	17.5	30
Concentrația solventului în alcool, %	X ₃	0	35	70
Intervalul de puls la ultrasunete, minute	X ₄	0.3	0.65	1
Amplitudinea ultrasunete, kHz	X ₅	20	60	100
Răspunsuri				
Concentrația în flavonoide, mg/ml	Y ₁			
Concentrația în polifenoli, mg/ml	Y ₂			

Dozarea principiilor active. Totalul compușilor polifenolici a fost determinat prin metoda utilizată pe larg Singleton & Rossi cu folosirea reactivului Folin-Ciocalteu [4, 13]. Conform metodei, la 300 μl probă de extract se adaugă 150 μl

reactiv Folin Ciocalteu (1/10). După incubare timp de 10 min la temperatura camerei, se adaugă 1,2 ml soluție de hidrocarbonat de sodiu 10% și 1,35 ml de apă purificată. Probele au fost depozitate timp de 45 de minute în întuneric. Absorbanta a fost citită la lungimea de undă 765 nm la spectrofotometru față de soluție blanc. Măsurătorile au fost înregistrate în triplicări. Totalul compușilor polifenolici în probele extractive a fost exprimat în miligrame, echivalent acid galic *per* ml (mgGAE/ml). Pentru construirea graficului de calibrare s-a utilizat acid galic în concentrații de 0-5 μg/ml, coeficient de corelație (R²) – 0,999.

Determinarea cantitativă a conținutului total de flavonoide a fost realizată prin metoda descrisă în Farmacopeea Română, ed. a X-a, pentru *Cynarae folium* [5]. Conform metodei, 10 ml extract sunt diluate cu metanol într-un balon cotate de 25 ml, și incubat timp de 10 minute. Ulterior, proba este filtrată, iar primele porțiuni de filtrat sunt eliminate. La 5 ml de filtrat se adaugă 5 ml de acetat de sodiu (100 g/l) și 3 ml de clorură de aluminiu (25 g/l), totul se agită și se completează cu metanol la cota de 25 ml. După 15 minute, se determină absorbanta soluției la lungimea de undă de 430 nm, folosind ca lichid de compensare o soluție obținută în condiții similare probei. Curba de calibrare a fost preparată prin obținerea soluției de rutozidă în concentrații cuprinse de la 4 la 16 mg/ml în metanol, coeficient de corelație (R²) – 0,999. Conținutul total de flavonoide a fost exprimat în miligram echivalent rutozidă *per* ml.

Tabelul 2

Matricea planului experimental cu răspunsuri

Exp Name	Run Order	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Y ₁	Y ₂
N1	3	25	5	0	0.3	100	0.06058	0.29498
N2	16	80	5	0	0.3	20	0.05430	0.16173
N3	10	25	30	0	0.3	20	0.05112	0.34923
N4	6	80	30	0	0.3	100	0.11666	0.45055
N5	4	25	5	70	0.3	20	0.09467	0.26296
N6	8	80	5	70	0.3	100	0.15859	0.40125
N7	18	25	30	70	0.3	100	0.16286	0.54823
N8	1	80	30	70	0.3	20	0.19987	0.51685
N9	14	25	5	0	1	20	0.06689	0.33531
N10	15	80	5	0	1	100	0.11518	0.37800
N11	11	25	30	0	1	100	0.04672	0.08234
N12	17	80	30	0	1	20	0.10062	0.50397
N13	12	25	5	70	1	100	0.15888	0.53283
N14	9	80	5	70	1	20	0.19071	0.47985
N15	7	25	30	70	1	20	0.12650	0.33179
N16	13	80	30	70	1	100	0.27760	0.76901
N17	2	52.5	17.5	35	0.65	60	0.11263	0.33313
N18	5	52.5	17.5	35	0.65	60	0.09895	0.26394
N19	19	52.5	17.5	35	0.65	60	0.10971	0.52019

Notă: X₁ – Temperatura de lucru; X₂ – Durata extracției; X₃ – Concentrația solventului în alcool; X₄ – Intervalul de puls la ultrasunete; X₅ – Amplitudinea ultrasunetelor; Y₁ – Concentrația în flavonoide; Y₂ – Concentrația în polifenoli.

Rezultate și discuții

Fitarea datelor obținute s-a făcut, utilizând metoda *Sumei pătratelor parțiale*. Această metodă permite evaluarea mai multor răspunsuri simultan, luând în considerație covariația lor [9]. Parametrii statistici calculați pentru validarea modelului au fost R^2 , Q^2 și analiza variației. Din rezultatele obținute la fitarea datelor, prezentate în fig. 1, se observă că valorile R^2 și Q^2 se apropie de 1, astfel putem conchide, că capacitatea de prevedere a planului experimental este bună. Analiza variației (testul ANOVA) este utilizată pentru a determina dacă există sau nu diferențe semnificative și stabilește dacă variația rezultatelor se datorează într-adevăr modificării factorilor de

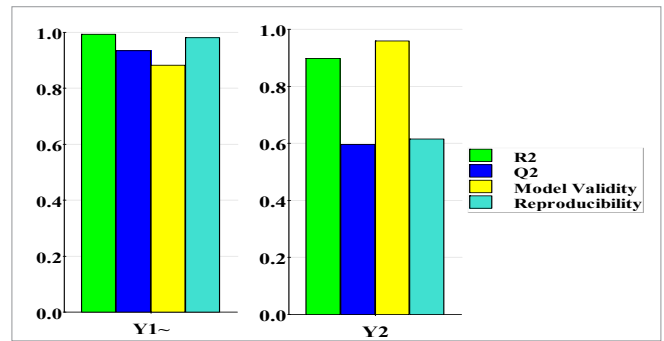


Fig. 1. Rezultatele obținute la fitarea datelor.

Y_1 – concentrația în flavonoide, Y_2 – concentrația în polifenoli.

Tabelul 3

Rezultatele testului ANOVA pentru factorul Y_1 (total flavonoide)

Y1~	DF	SS	MS (variance)	F	p	SD
Total	19	18.5472	0.976169			
Constant	1	17.7128	17.7128			
Total Corrected	18	0.834425	0.0463569			0.215307
Regression	11	0.828986	0.0753623	96.9886	0.000	0.274522
Residual	7	0.00543916	0.000777023			0.0278751
Lack of Fit (Model Error)	5	0.00367161	0.000734322	0.830893	0.626	0.0270984
Pure Error (Replicate Error)	2	0.00176755	0.000883775			0.0297284
	N = 19	Q2 =	0.934	Cond. no. =	1.09	
	DF = 7	R2 =	0.993	RSD =	0.02788	
		R2 Adj. =	0.983			

Tabelul 4

Rezultatele testului ANOVA pentru factorul Y_2 (total polifenoli)

Y2	DF	SS	MS (variance)	F	p	SD
Total	19	3.56449	0.187605			
Constant	1	3.13362	3.13362			
Total Corrected	18	0.430865	0.0239369			0.154716
Regression	9	0.386521	0.0429468	8.71641	0.002	0.207236
Residual	9	0.044344	0.00492711			0.0701934
Lack of Fit (Model Error)	7	0.0259218	0.00370311	0.402026	0.847	0.0608532
Pure Error (Replicate Error)	2	0.0184223	0.00921113			0.0959746
	N = 19	Q2 =	0.597	Cond. no. =	1.061	
	DF = 9	R2 =	0.897	RSD =	0.07019	
	Comp. = 1	R2 Adj. =	0.794			

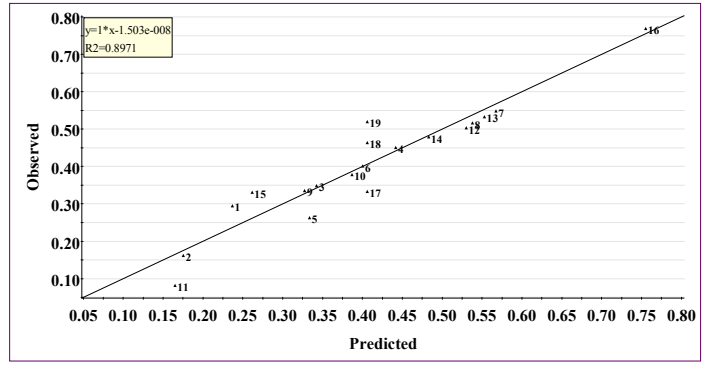
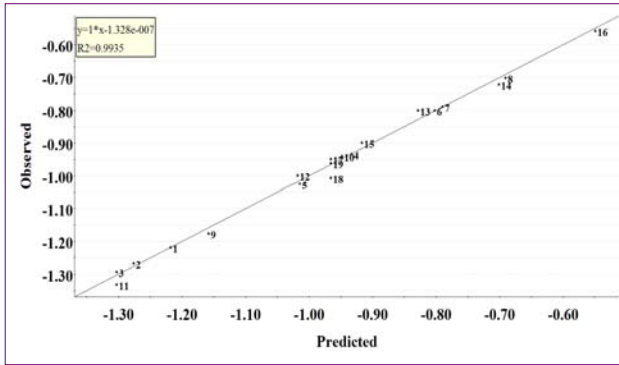


Fig. 2. Curbele reziduale ale răspunsurilor observate în funcție de răspunsurile estimate.

Y_1 – concentrația în flavonoide, Y_2 – concentrația în polifenoli.

formulare sau reprezintă o variație naturală a fenomenului. Rezultatele testului ANOVA, obținute pentru cele 2 răspunsuri, sunt prezentate în tabelele 3 și 4.

Testul Anova a demonstrat, că rezultatele sunt bune la toate răspunsurile studiate, pentru toate răspunsurile p este mai mic de 0,05 pentru model și este mai mare de 0,05 pentru eroare.

Pentru evaluarea calității fitării s-au trasat curbele de dependență ale valorilor observate în funcție de valorile esti-

mate de model (curbele reziduale ale răspunsurilor observate în funcție de răspunsurile estimate). Graficele prezentate în fig. 2 indică o aliniere satisfăcătoare a punctelor experimentale pe o dreaptă (diagonala la 45°) și o suficientă fitare a datelor experimentale cu modelul ales.

Conform datelor prezentate (Q^2+R^2 , ANOVA, reziduale), sa poate trage concluzia că toate răspunsurile se fitează satisfăcător cu modelul ales.

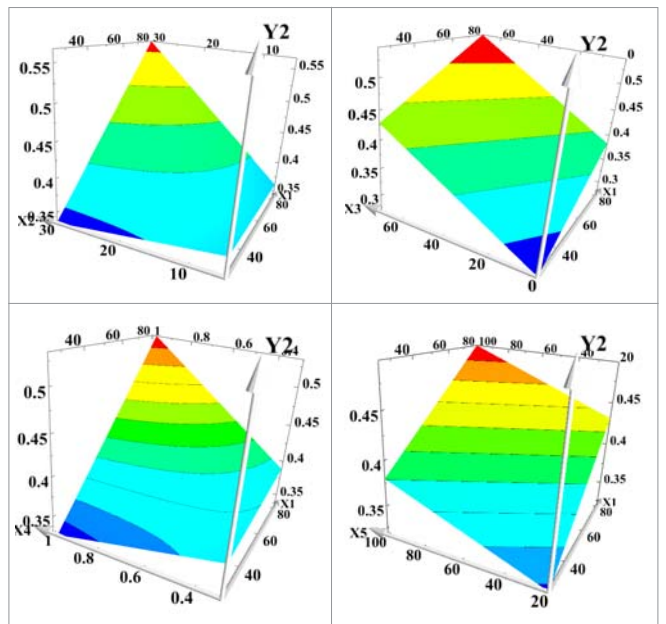
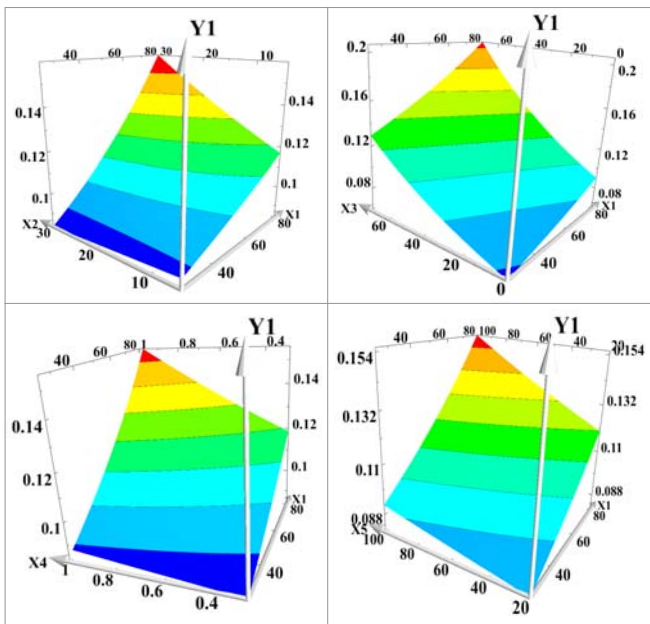
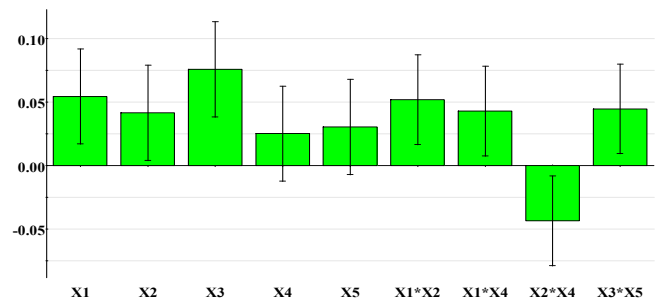
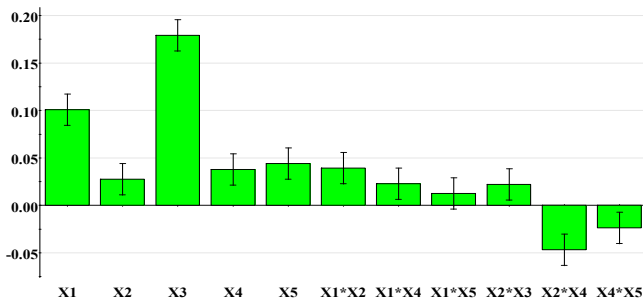


Fig. 3. Influența factorilor de formulare asupra procesului de extracție a totalului flavonoidic, (Y_1).

Fig. 4. Influența factorilor de formulare asupra procesului de extracție a totalului polifenolic, (Y_2).

Analiza coeficienților ecuațiilor, cu ajutorul cărora s-a realizat fitarea datelor experimentale, sunt prezentate în fig. 3 și fig. 4 sub forme de histograme și curbe de izorăspuns.

În baza rezultatelor prezentate în fig. 3, se observă că variabila independentă de formulare cu cel mai mare impact în procesul de extracție a conținutului total de flavonoide este reprezentată de solventul extractiv.

În literatura de specialitate, pentru obținerea extractelor din anghinare, este indicată utilizarea apei purificate [4, 5]. În cercetarea proprie am constatat, că odată cu micșorarea polarității extragentului, este avantajat procesul de extracție a principiilor active. Din analiza histogramelor și curbelor de izorăspuns (fig. 3 și 4) se observă faptul că la creșterea concentrației de etanol de la 0 la 70% și a temperaturii de la 25°C la 80°C, este influențată semnificativ concentrația atât a flavonoidelor, cât și a polifenolilor prin intensificarea procesului de extracție în probele experimentale.

Rezultatele evaluării temperaturii au demonstrat faptul că aceasta este a doua variabilă independentă de formulare după impact, în procesul de extracție a compușilor fenolici. Odată cu creșterea temperaturii până la 80°C, conținutul total de favonoide și conținutul total de polifenoli a crescut semnificativ. Astfel, putem concluziona, că compușii fenolici sunt termostabili, iar în procesul de mișcare a moleculelor cu viteză sporită, cauzată de temperatura înaltă, este influențată difuzia și desorbția flavonoidelor și polifenolilor din produsul vegetal.

Influența duratei de extracție pentru ambele răspunsuri s-a constatat ca fiind mai puțin semnificativă, aspect care avantajează metoda de extracție cu ultrasunete, prin posibilitatea de a reduce timpul de extracție.

În experimentul prezentat, s-au obținut date experimentale noi cu referință la metoda de extracție cu ultrasunet, în care a fost demonstrată influența intervalului de puls și amplitudinea aparatului de ultrasonare, ceea ce favorizează extracția la capacitatea maximă de lucru.

În rezultatul studiului, a fost stabilită formula optimă de extracție prin metoda asistată de ultrasunet a principiilor active din produsul vegetal *Cynarae folia*, după cum urmează: concentrația etanolului – 70%, temperatura – 80°C, durata procesului de extracție – 30 de minute; interval de puls al undelor ultrasonice – 1 minut, amplitudinea – 100 kHz.

Concluzii

Pentru prima dată a fost aplicată metoda de optimizare a extracției cu ultrasunet a compușilor fenolici din frunze de anghinare, cultivate în condițiile pedo-climaterice ale Republicii Moldova.

A fost determinată influența factorilor de extracție cu utilizarea planului de design experimental, în care rezultatele apropiate de cele prezise, au demonstrat validitatea modelului de optimizare.

S-au obținut noi date experimentale, în baza cărora s-au stabilit condițiile optime de extracție a compușilor fenolici din frunzele de anghinare: extragent – etanol 70%, tempera-

tura – 80°C, durata extracției – 30 de minute, puls – 1 minut, amplitudine – 100 kHz.

Condițiile optimizate evaluate pot fi aplicate în procesul de fabricație a formelor farmaceutice extractive, obținute pe bază de produs vegetal *Cynarae folia*.

Referințe bibliografice

- Alaimo MG, Vizzi D, Melati MR. Histochemical properties and trace element concentrations in *Parietaria L.* from urban sites (Palermo, Italy). *Aerobiologia*. 2005;21:21-31.
- Brown J, Rice-Evans C. Luteolin-rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation in vitro. *Free Radic Res*. 1998;29:247-255.
- Bodrug M. Grădina de Plante Medicinale a USMF „Nicolae Testemițanu”. *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe medicale*. 2005;2(2):102-107.
- European Pharmacopoeia 5.0, Determination of tannins in herbal drugs. 01/2005:20814:221-222
- Farmacopeea Romană. Ed. X. București: Ed. Medicală, 2011:334-335.
- Fratianni F. Polyphenolic composition in different parts of some cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus L.* var. *scolymus L.*). *J. Food Chem*. 2007;104(3):1282-1286.
- Gebhardt R, Henke B, Fausel M. Antioxidative properties of extracts from leaves of the artichoke (*Cynara scolymus L.*) against hydroperoxide-induced oxidative stress determined in cultured rat hepatocytes are due to polyphenols and flavonoids. *European Journal of Cell Biology*. 1997;72:1023-1028.
- Herrera M, Luque de Castro M. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. *J. Chromatogr*. 2005;1100:1-7.
- Leucuța S, Tomuță I. Planuri experimentale și optimizarea formulării medicamentelor. Cluj Napoca: Risoprint, 2011;108-125.
- Luque de Castro M, Tena M. Strategies for supercritical fluid extraction of polar and ionic compounds. *Trends Anal Chem*. 1996;15:32-37.
- Nisteanu A. Farmacognozie. Univ. de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”. Chișinău: Tipografia Centrală, 2001;445-449.
- Nyiredy S. Separation strategies of plant constituents-current status. *J. Chromatogr*. 2004;812:35-51.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymology*. 1999;299:152-178.
- Shimoda H. Antihyperlipidemic sesquiterpenes and new sesquiterpene glycosides from the leaves of artichoke (*Cynara scolymus L.*): structure requirement and mode of action. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2003;13(2):223-228.
- Stănescu U, Miron A, Hâncianu M. Bazele farmaceutice, farmacologice și clinice ale fitoterapiei. Iași: Ed. „Gr.T.Popa”, 2002;265-26.
- Speroni E, et al. Efficacy of different *Cynara scolymus* preparations on liver complaints. *J. Ethnopharmacol*. 2003;86(2-3):203-211.
- Stylianou N, Gekas V, Iuliana A, et al. Research regarding taraxacum officinale weber. Optimum extraction parametres of caffeic acid derivatives using ultrasound - assisted extraction. *Farmacia*. 2014;62(6):1223-1229.
- Suslick KS. Sonochemistry, Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 4th Ed. New York: J. Wiley & Sons, 1998;26:517-541.
- Zhu X, Zhang H, Lo R. Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus L.*) and their antimicrobial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52:7272-7278.
- Wang L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*. 2006;17:300-312.
- Wang J, Zhao Y, Tian Y, et al. Ultrasound-Assisted Extraction of Total Phenolic Compounds from *Inula helenium*. *The Scientific World Journal*. 2013, Article ID 157527,5.
- Weirong C, Xiaohong G, Jian T. Extraction, purification, and characterisation of the flavonoids from *Opuntia milpa alta* Skin. *Czech J. Food Sci*. 2010;28(2):108-116.