

**UNIVERSITATEA BABEȘ – BOLYAI, CLUJ – NAPOCA
FACULTATEA DE CHIMIE ȘI INGINERIE CHIMICĂ**

REZUMAT TEZĂ DE ABILITARE

Domeniul de studii universitare de doctorat: Chimie

**Analytical Methods and Chemometrics as Integrated Techniques
for Biochemical Profiling of Drugs and Natural Samples**

Lect. Universitar, dr. CASONI (IUGA) DORINA

Rezumat

Teza intitulată “*Analytical Methods and Chemometrics as Integrated Techniques for Biochemical Profiling of Drugs and Natural Samples*” (*Metode Analitice și Chemometrice ca Tehnici Integrate pentru Evaluarea Profilului Biochimic al Medicamentelor și al Probelor Naturale*) prezintă o parte din activitatea științifică desfășurată în ultimii 16 ani incluzând cele mai relevante rezultate obținute exclusiv după susținerea tezei de doctorat (anul 2010) și publicate în domeniul chimiei analitice. Rezultatele prezentate includ aspecte inovative în domeniul metodelor cromatografice și al spectrometriei de absorbție moleculară UV-Vis ca metode integrate de analiză, caracterizare și evaluare a medicamentelor și a probelor naturale complexe precum și studii de evaluare a potențialului fitochimic, biologic și farmacologic al extractelor din plante medicinale cu scopul de a identifica surse naturale de compuși bioactivi cu posibile aplicații în farmacologie, dezvoltarea de alimente funcționale și medicamentele terapeutice complementare.

Teza este structurată în două părți care cuprind rezultatele științifice obținute în dezvoltarea și aplicarea metodelor cromatografice și al spectroscopiei UV-Vis cuplate cu metode chemometrice avansate (*Partea I. Realizările științifice – patru capitole*), urmată de o expunere a perspectivelor științifice și profesionale viitoare (*Partea II. Perspective de dezvoltare a carierei profesionale*).

Rezultatele obținute în domeniul metodelor cromatografice sunt prezentate în primele două capitole ale tezei (*Capitolul 1. HPTLC- Analiza imaginilor pentru cuantificarea îmbunătățită și evaluarea profilului biochimic al medicamentelor și Capitolul 2. HPTLC- Analiza imaginilor cuplată cu metode chemometrice pentru amprentarea și clasificarea probelor naturale*) și includ dezvoltarea și validarea unor metode bazate pe cuplarea cromatografiei pe strat subțire de înaltă performanță cu tehnici avansate de prelucrare a imaginii (metode HPTLC-IA) și cu metode chemometrice și integrarea acestora în analiza simultană a unor medicamente și a metaboliților acestora din preparate farmaceutice și din probe biologice, studiul profilului de lipofilicitate și activitate antioxidantă a unor clase de medicamente și respectiv în caracterizarea, autentificarea și clasificarea probelor naturale.

Capitolul 1, intitulat „*HPTLC-Analiza imaginilor pentru cuantificarea îmbunătățită și evaluarea profilului biochimic al medicamentelor*”, prezintă o serie de aplicații privind analiza imaginilor în cromatografia în strat subțire de înaltă performanță (HPTLC) pentru identificarea, cuantificarea și caracterizarea compușilor de interes farmaceutic. Capitolul este structurat în trei secțiuni principale. Prima secțiune (Subcapitolul 1.1) abordează analiza medicamentelor

din preparate farmaceutice, cu accent pe determinarea parabenilor și a compușilor înrudiți cu catecolul. A doua secțiune (Subcapitolul 1.2) este dedicată cuantificării compușilor adrenergici în probe biologice, incluzând catecolaminele, metaboliții acestora și substanțele adrenergice interzise. În cea de-a treia secțiune (Subcapitolul 1.3) sunt prezentate metode de evaluare a profilului biochimic al medicamentelor în condiții fiziologice simulate, prin evaluarea proprietăților de lipofilicitate, a activității antioxidante și a afinității de legare.

Rezultatele prezentate în acest capitol (Capitolul 1) evidențiază potențialul analizei imaginilor în HPTLC ca instrument modern pentru studiul și caracterizarea substanțelor medicamentoase.

Primul subcapitol (1.1. Analiza medicamentelor în preparate farmaceutice) cuprinde cercetări asupra tehnicilor de achiziționare și prelucrare a imaginii plăcilor cromatografice pentru detecția și determinarea sensibilă a parabenilor și a medicamentelor catecolice în preparate farmaceutice. O parte semnificativă a acestui subcapitol s-a concentrat pe evaluarea canalelor de culoare în procesarea și analiza imaginii pentru creșterea sensibilității de determinare cromatografică a acestor compuși în probele studiate. Strategia analitică propusă combină separarea prin HPTLC cu achiziția imaginii plăcii cromatografice folosind camere digitale și respectiv aparatură de scanare specializată dedicată analizei prin cromatografie pe strat subțire. O contribuție metodologică majoră a acestor studii este compararea sistematică a diferitelor strategii de analiză a imaginilor folosind programe software de integrare a ariilor spoturilor cromatografice care combină tehnica bi-dimensională (2D) și respectiv tri-dimensională (3D). De asemenea, un aspect metodologic cheie în aceste studii a constat în conversia imaginilor color (imagine RGB) în imagini monocromatice prin selectarea canalelor de culoare (roșu, verde și albastru) sau selectarea canalului gri (integrarea tuturor canalelor de culoare), ceea ce dus la îmbunătățirea liniarității între intensitatea semnalului optic și concentrația analitului. Pentru analiza cantitativă avansată au fost evaluate o serie de programe software (ImageDecipher-TLC) și platforme disponibile (Sorbfil TLC Videodensitometer și JustTLC) care permit cuantificarea compușilor separați.

Un alt element de noutate în domeniul metodelor cromatografice este prezentat în cel de-al doilea subcapitol (*1.2. Cuantificarea compușilor adrenergici în probe biologice*) prin introducerea unor noi strategii analitice originale care combină detecția post-cromatografică a medicamentelor adrenergice și metaboliților acestora utilizând radicalii ABTS^{•+} și DPPH[•] cu strategia de analiză a imaginii pe diferite canale de culoare. S-a demonstrat că utilizarea acestor radicali în combinație cu selectarea canalului potrivit pentru analiza imaginii îmbunătățesc

semnificativ sensibilitatea de detecție în comparație cu detecția UV convențională. Rezultatele obținute în cadrul acestor studii au dus la validarea unor metode HPTLC avansate, rapide și sensibile de determinare simultană a catecolaminelor (norepinefrină, epinefrină și dopamină) și metaboliților acestora (acid homovanilic (HVA), acid vanilmandelic (VMA), acid 4,4-dihidroxi mandelic (DOMA), acid 3,4 dihidroxifenilacetic (DOPAC)), a unor medicamente înrudite cu catecolaminele (izoprenalină, metildopa, levodopa și carbidopa) și a unor medicamente adrenergice interzise în competițiile sportive folosind radicalii DPPH[•] și ABTS^{•+} și procesarea digitală a imaginilor în combinație cu selectarea canalelor de culoare pentru analiza cantitativă.

Al treilea subcapitol (1.3. *Studiul profilului biochimic al medicamentelor în condiții fiziologice simulate*) este dedicat integrării metodei HPTLC-IA cuplate cu metodele chemometrice în evaluarea proprietăților fizico-chimice ale medicamentelor în condiții care simulează mediul fiziologic. Proprietățile vizate, lipofilicitate și activitate antioxidantă, au fost utilizate pentru a evalua interacțiunile intermoleculare și profilul de afinitate al medicamentelor adrenergice. Lipofilicitatea și activitatea antioxidantă sunt esențiale pentru înțelegerea absorbției, distribuției, permeabilității membranei, penetrării barierei hematoencefalice și a activității biologice generale a medicamentelor. Studiile cuprind evaluarea profilului biochimic a unor clase de medicamente adrenergice (amine biogene și compuși înrudiți și derivați heterociclici de interes farmaceutic și medical), monitorizarea și determinarea activității antioxidante precum și evaluarea afinității de legare și a profilului antioxidant în condiții fiziologice simulate folosind metoda HPTLC-IA cuplată cu tehnici chemometrice avansate.

Un aspect important abordat în studiile de lipofilicitate este influența stării de ionizare și a caracteristicilor structurale asupra retenției cromatografice și comportamentului lipofilic al aminelor biogene, neurotransmițătorilor de tip aminic, precursorilor și metaboliților acestora, precum și al medicamentelor simpatomimetice înrudite structural cu catecolaminele. Corelațiile semnificative statistic identificate între indicii cromatografici de lipofilicitate și parametrii de lipofilicitate care caracterizează atât speciile neutre cât și cele complet protonate (parametrii $\text{diff}(\log P^{N-I})$) au evidențiat rolul important al ionizării în comportamentul de retenție al acestor compuși. Rezultatele obținute au demonstrat că fazele staționare RP-18, RP-8 și CN simulează partiția clasică, în timp ce fazele Diol și RP-2 evidențiază efecte suplimentare ale interacțiunilor polare.

Influența substituenților asupra lipofilicității medicamentelor a fost studiată folosind o serie de compuși heterociclici de interes farmaceutic de tipul tioeteri azolici, baze Schiff și baze Mannich poliheterociclice, calcone tiazolice și aurone, precum și o nouă clasă de tioeteri. Rezultatele obținute au demonstrat că substituenții precum bromul pe nucleul acetofenonic cresc lipofilicitatea, în timp ce grupările metoxi și hidroxil scad în general lipofilicitatea calconelor tiazolice.

Studiile asupra lipofilicității au fost extinse pentru a evidenția rolul acestora ca descriptor molecular esențial în corelarea structurii cu afinitatea de legare la receptori și bioactivitatea unor derivați heterociclici. Noutatea acestor studii constă în combinarea determinărilor de lipofilicitate în sisteme cromatografice multiple cu metode computaționale *in silico* pentru evaluarea lipofilicității ca predictor fiabil al activității biologice și al potențialului legării de diverși receptori. Corelațiile semnificative statistic dintre descriptorii de lipofilicitate și o serie de indicatori de bioactivitate au confirmat faptul că parametrii de lipofilicitate pot servi drept instrumente predictive de estimare a comportamentului farmacologic al medicamentelor în organism.

Abordarea chemometrică utilizând analiza componentelor principale (PCA) s-a dovedit a avea o contribuție esențială în studiile de lipofilicitate, oferind un nivel suplimentar de interpretare și facilitând identificarea potențialilor candidați pentru medicamente cu profil farmacocinetic optim.

O altă contribuție semnificativă a studiilor prezentate în acest subcapitol se referă la dezvoltarea unei metode inovatoare HPTLC-IA pentru monitorizarea proprietăților antiradicalice ale medicamentelor redox-active utilizând radicalul DPPH[•]. Integrarea procesării digitale a imaginii cu metoda HPTLC a permis monitorizarea continuă în timp a activității față de radicalul DPPH[•], oferind o evaluare îmbunătățită a profilurilor activității antioxidante.

Progrese importante în evaluarea activității antioxidante a medicamentelor au fost obținute și prin dezvoltarea unui protocol micro-HPTLC asistat de tehnici de analiză a imaginii pentru determinarea potențialului antioxidant total al medicamentelor utilizând atât testele cu DPPH[•] cât și cu ABTS^{•+}. Studiul realizat a demonstrat că tehnicile de procesare a imaginii bazate pe analiza selectivă a canalelor de culoare au îmbunătățit semnificativ acuratețea cuantificării potențialului antioxidant al medicamentelor.

Cel mai recent studiu inclus în acest subcapitol a introdus o strategie originală pentru evaluarea interacțiunilor și a profilului activității antioxidante al medicamentelor adrenergice în condiții fiziologice simulate, utilizând faze staționare multiple cu polaritate diferită (Silica

gel și silicagel chimic modificat RP-8, RP-18, CN, DIOL). Abordarea cromatografică propusă simulează interacțiunile care au loc în mediile biologice și demonstrează efectul polarității mediului asupra caracteristicilor de retenție, penetrării membranelor și comportamentului antioxidant al medicamentelor. Utilizarea simultană a radicalilor DPPH[•] și ABTS^{•+} a furnizat informații complementare privind mecanismul de interacțiune al medicamentelor cu membranele și cu compușii din mediul biologic. Astfel, abordările cromatografice prezentate în acest studiu sunt foarte utile pentru estimarea posibilelor interacțiuni cu mediul fiziologic și a influenței acestora asupra comportamentului antioxidant și asupra profilului farmacologic al compușilor adrenergici.

Capitolul 2, intitulat „*HPTLC-Analiza imaginilor și metode chemometrice pentru amprentarea și clasificarea probelor naturale*”, este dedicat utilizării tehnicilor moderne de procesare a imaginilor cromatografice obținute în HPTLC în combinație cu metode chemometrice pentru caracterizarea și diferențierea probelor de origine naturală. Capitolul debutează cu prezentarea abordărilor de procesare a imaginilor aplicate amprentării HPTLC a probelor naturale (Subcapitolul 2.1), evidențiind modul în care informațiile vizuale pot fi transformate în date analitice relevante. În continuare, s-a realizat o evaluare privind utilizarea canalelor de culoare pentru obținerea amprentelor cromatografice multivariate ale extractelor de plante medicinale (Subcapitolul 2.2), contribuind la evidențierea diferențelor dintre compozițiile acestora. Ultima secțiune (Subcapitolul 2.3) este dedicată clasificării plantelor medicinale prin aplicarea metodelor chemometrice asupra datelor obținute din procesarea multivariate a imaginii, demonstrând utilitatea combinării analizei imaginilor HPTLC cu instrumentele statistice moderne pentru identificarea și autentificarea probelor naturale.

Primul subcapitol (2.1. *Metode de procesare a imaginilor pentru amprentarea HPTLC a probelor naturale*) investighează posibilitatea îmbunătățirii analizei extractelor vegetale prin combinarea cromatografiei în strat subțire de înaltă performanță (HPTLC), analizei imaginilor și metodelor chemometrice. Noutatea principală constă în evaluarea sistematică a influenței procedurilor de procesare a imaginilor și a canalelor de culoare asupra rezultatelor chemometrice obținute din amprente HPTLC ale extractelor vegetale. În studiul prezentat au fost analizate extracte hidroalcoolice de *Galium verum* folosind două sisteme de achiziție a imaginilor (cameră digitală și scanner TLC UV-Vis) și diferite canale de culoare (roșu, verde, albastru și gri). Rezultatele obținute au demonstrat că informația conținută în imaginile cromatografice poate fi valorificată mult mai eficient prin selectarea adecvată a canalelor de culoare și prin utilizarea PCA pentru interpretarea datelor.

Cel de-al doilea subcapitol (2.2. *Analiza multivariată pe canale de culoare în amprentarea digitală a extractelor de plante medicinale*) dezvoltă o metodologie de analiză multivariată a datelor provenite din cromatogramele HPTLC utilizând diferite scale de culoare pentru clasificarea extractelor din plante medicinale. În cadrul studiului prezentat a fost investigat un număr de 42 de extracte provenite din specii aparținând unor grupuri taxonomice diferite. Metoda propusă combină analiza imaginilor cu analiza PCA, analiza factorială (FA) și analiza discriminantă (LDA). Noutatea studiului constă în evaluarea pentru prima dată a contribuției individuale a fiecărui canal de culoare în analiza amprentelor HPTLC și în dezvoltarea unei strategii chemometrice pentru selectarea celor mai eficiente canale pentru clasificarea probelor complexe. Rezultatele obținute au demonstrat că informația furnizată prin utilizare mai multor canale de culoare în procesarea imaginii plăcilor cromatografice este foarte eficientă pentru clasificarea taxonomică a plantelor medicinale.

Cel de-al treilea studiu (2.3. *Clasificarea plantelor medicinale*) prezentat în acest capitol extinde abordările anterioare prin utilizarea imaginilor HPTLC obținute prin detecție la mai multe lungimi de undă, împreună cu proceduri de dezvoltare simplă și dublă a plăcilor cromatografice și cu metode chemometrice avansate. În cadrul acestui studiu au fost analizate 39 de plante medicinale provenite din România, Ungaria și Macedonia de Nord. Noutatea principală a studiului constă în integrarea metodei HPTLC cu analiza simultană a imaginilor obținute aplicând detecția la diferite lungimi de undă și a analizei pe canale de culoare într-o singură strategie de fingerprinting. Rezultatele obținute au arătat că această abordare combinată cu analiza multivariată a datelor cromatografice permite autentificarea și clasificarea plantelor medicinale pe baza profilului global al extractului, indiferent de proveniența geografică sau de variațiile naturale ale compoziției chimice.

Studiile prezentate în capitolul al treilea (**Capitolul 3. Spectroscopia UV-Vis combinată cu tehnici chemometrice pentru clasificarea și autentificarea probelor naturale**) sunt axate pe dezvoltarea unor strategii analitice inovatoare bazate pe spectroscopia UV-Vis combinată cu tehnici chemometrice avansate pentru caracterizarea, clasificarea și autentificarea probelor naturale cum sunt uleiurilor vegetale și extractele de plante medicinale. Scopul central al acestor studii a fost demonstrarea fezabilității metodei spectrale cuplate cu analiza multivariată a datelor pentru diferențierea probelor în funcție de compoziția chimică, proprietățile antioxidante și originea geografică.

Primul studiu al acestui capitol (3.1. *Clasificarea uleiurilor comestibile în funcție de profilul lor antiradicalic*) propune o abordare nouă bazată pe integrarea datelor provenite din

profilele spectrale UV-Vis cu datele din profilele spectrale obținute după reacția probelor cu radicalul DPPH. Aplicarea metodelor chemometrice precum analiza componentelor principale (PCA), analiza fuzzy (FPCA) și analiza discriminantă (LDA), a dus la identificarea regiunilor spectrale caracteristice, asociate unor clase specifice de compuși antioxidanți prezente în uleiurile vegetale și a facilitat clasificarea acestora în funcție de activitatea lor față de radicalul DPPH[•].

Utilizând analiza componentelor principale au fost identificate lungimile de undă cu cea mai mare relevanță informațională din spectrele de absorbție, acestea contribuind semnificativ la clasificarea uleiurilor vegetale și permițând identificarea claselor specifice de compuși responsabili în diferențierea probelor de acest fel.

Utilizarea datelor furnizate de întreg profilul spectral (și nu doar a absorbanței la o lungime de undă fixă) obținut în urma reacției dintre medicamente și soluția de radical a dus la obținerea de informații suplimentare valoroase, conducând la o discriminare și clasificare superioară a uleiurilor vegetale. De asemenea aplicarea metodelor chemometrice combinate (FPCA-LDA) a demonstrat cea mai bună performanță în clasificarea uleiurilor vegetale pe baza profilului de activitate antiradicalică manifestate față de radicalul DPPH[•].

Rezultatele obținute în cadrul acestui studiu extind posibilitățile de analiză a uleiurilor vegetale prin integrarea spectroscopiei UV-Vis cu metode chemometrice avansate și prin introducerea informațiilor furnizate de întreg profilul antiradicalic ca abordare inovatoare și extrem de informativă pentru evaluarea capacității antioxidante și clasificarea uleiurilor vegetale.

Cel de-al doilea studiu (3.2. *Autentificarea materialului vegetal de plante medicinale provenit din diferite zone geografice*) s-a concentrat pe autentificarea plantelor medicinale provenite din diferite regiuni geografice utilizând amprentele spectrale UV-Vis ale extractelor lor hidroalcoolice. Prin combinarea analizei componentelor principale (PCA), analizei cluster ierarhice (HCA) și a analizei discriminante (DA) cu date provenite din spectre derivate, metoda a oferit o clasificare foarte precisă a probelor. O inovație importantă a acestui studiu este identificarea, pentru prima dată, a celor mai informative regiuni spectrale care contribuie la clasificarea plantelor medicinale, precum și demonstrarea puterii discriminatorii crescute a spectrelor derivate de ordin superior în evidențierea diferențelor spectrale subtile.

Studiile incluse în cel de-al patrulea capitol (**Capitolul 4. Integrarea metodelor analitice și a testelor biologice in vitro pentru dezvoltarea de farmaceutice din surse naturale**) reprezintă cele mai recente cercetări publicate în domeniul evaluării potențialului fitochimic, biologic și

farmacologic al extractelor din plante medicinale endemice și a plantelor medicinale tradiționale. Scopul acestor studii a fost identificarea surselor naturale de compuși bioactivi cu posibile aplicații în farmacologie și în dezvoltarea de medicamente complementare terapeutice. O direcție comună a cercetărilor incluse în acest capitol este corelarea dintre compoziția chimică (în special compuși fenolici, flavonoide și acid rozmarinic) și efectele biologice precum activitatea antioxidantă, activitatea diuretică, activitate de inhibare a tirozinazei și activitatea anticancerigenă. Cercetările au fost orientate în special asupra descoperirii unor inhibitori naturali ai anhidrazei carbonice cu potențial diuretic și relevanță terapeutică.

În primul studiu (4.1. *Evaluarea potențialului diuretic al extractelor de plante medicinale*) din acest capitol au fost comparate extractele hidroalcoolice a cinci plante medicinale provenite din două regiuni geografice diferite (România și Turcia). S-a demonstrat că cimbrul (*Satureja hortensis*) prezintă un potențial inhibitor ridicat asupra anhidrazei carbonice și că acest efect ar putea fi asociat cu un conținut ridicat de acid rozmarinic și o activitate antioxidantă relevantă. De asemenea s-a evaluat pentru prima dată activitatea diuretică a unor specii de plante endemice (*Gypsophila*) și s-a evidențiat specia cu potențialul diuretic cel mai ridicat.

Studiile dezvoltate în cel de-al doilea subcapitol (4.2. *Evaluarea potențialului neuroprotector și renoprotector al extractelor de plante medicinale*) au extins cercetarea către aplicații de evaluare a activității neuroprotectoare și renoprotectoare a plantelor medicinale. Studiul s-a realizat folosind specia *Mattiastrum paphlagonicum* (familia Boraginaceae) și pentru prima dată, extractul hidroalcoolic al acestei plante endemice a fost evaluat din punct de vedere al potențialului de inhibare a anhidrazei carbonice și a tirozinazei. Extractul a demonstrat o inhibare puternică a tirozinazei și o inhibare considerabilă a anhidrazei carbonice, împreună cu un conținut ridicat de acid rozmarinic și o activitate antioxidantă ridicată, susținând potențialul său pentru studii viitoare privind afecțiunile neurologice și renale.

O direcție complementară de cercetare este reprezentată în cel de-al treilea subcapitol (4.3. *Studii privind extractul din frunze de măslin ca și component alimentar funcțional în cercetarea cancerului*) dedicat analizei extractului apos din diferite specii de frunze de măslin (*Olea europaea*) care ar putea fi utilizat ca și adjuvant în tratamentul cancerului de sân. Noutatea acestui studiu constă în evaluarea extractelor de vâscozități diferite, a conținutului lor de vitamine și minerale, precum și a efectului lor citotoxic, atât individual, cât și în combinație cu agenți chimioterapeutici. Pe baza cercetărilor realizate, a fost identificat extractul cu cel mai puternic efect citotoxic. Mai mult, s-a demonstrat că asocierea acestuia cu agenții

chimioterapeutici docetaxel, paclitaxel și trastuzumab produce o inhibare sinergică puternică a creșterii celulelor cancerului mamar.

Contribuția semnificativă a studiilor din acest capitol constă în integrarea metodelor analitice și a testelor biologice *in vitro* pentru identificarea unor extracte vegetale cu potential în dezvoltarea de produse farmaceutice pe bază de extracte naturale. De asemenea, studiile dezvoltate în acest capitol deschid noi perspective de cercetare care vizează validarea farmacologică aprofundată orientată pe izolarea și testarea celor mai activi compuși, clarificarea mecanismelor de acțiune și a efectelor sinergice, evaluarea toxicității și biodisponibilității și dezvoltarea de studii *in vivo*.