

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"VICTOR BABEȘ" DIN TIMIȘOARA
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL FARMACIE**



**CONTRIBUȚII ÎN DOMENIUL COMPUȘILOR
NATURALI ȘI SINTETICI CU APLICAȚII ÎN
SĂNĂTATE ȘI PROTECȚIA MEDIULUI**

REZUMAT

Conf. univ. dr. Ienașcu Ioana Maria Carmen

**Timișoara
2022**

Teza de abilitare „*Contribuții în domeniul compușilor naturali și sintetici cu aplicații în sănătate și protecția mediului*” este structurată pe două secțiuni, prima face referire la cele mai importante rezultate provenite din activitatea de cercetare a autoarei, din perioada imediat următoare obținerii titlului de doctor, iar cea de-a doua prezintă evoluția carierei profesionale, precum și direcțiile de cercetare științifică ce vor fi abordate în viitorul apropiat.

Partea principală a tezei se constituie în prezentarea rezultatelor obținute în urma cercetărilor care au vizat studiul compușilor naturali, polifenoli, antociani, glucozinolați și a celor sintetici, derivați o-hidroxibenzamidici, în ceea ce privește obținerea, caracterizarea și evaluarea activității biologice a acestora, dezvoltarea unor metode de sinteză și caracterizare eficiente și ecologice, precum și elaborarea unor biomateriale hibride din deșeuri biologice.

O atenție deosebită a fost acordată obținerii de noi derivați o-hidroxibenzamidici, continuând și dezvoltând astfel direcția de cercetare aprofundată în timpul doctoratului. Au fost sintetizați esteri etilici, metilici, hidrazide, hidrazone ale salicilamidelor, N-(3-bromofenil)-2-hidroxi-benzamidă, 5-cloro-2-hidroxi-N-fenilbenzamidă, 5-bromo-2-hidroxi-benzamidă, N-(2-bromo-fenil)-2-hidroxi-benzamidă, N-(2-clorofenil)-2-hidroxi-benzamidă și N-(4-clorofenil)-2-hidroxi-benzamidă, compuși noi, nementionați în literatura de specialitate consultată. Alături de folosirea sintezei clasice ce utilizează încălzirea convențională, au fost dezvoltate și metode ecologice de sinteză a acestor clase de compuși, sinteza în câmp cu microunde fiind de elecție în acest caz datorită randamentelor net superioare, a unor timpi de reacție mai scurți și a economiei de solvent. Compușii astfel sintetizați au fost caracterizați utilizând metode analitice moderne precum, spectroscopie de infraroșu, rezonanță magnetică nucleară, spectrometrie de masă, analiză elementală, confirmându-se identitatea acestora. Deoarece încapsularea medicamentelor în ciclodextrine crește stabilitatea chimică și fizică a medicamentului și îmbunătățește distribuția medicamentului prin membranele biologice și datorită solubilității scăzute în medii apoase a derivaților hidroxibenzamidici, s-a recurs la complexarea esterii etilici obținuți pornind de la N-(2-clorofenil)-2-hidroxi-benzamidă și N-(4-clorofenil)-2-hidroxi-benzamidă cu β -ciclodextrina folosind metoda triturării. Complecșii obținuți în fază solidă au fost caracterizați prin metode specifice precum difracție de raze X, microscopie electronică cu scanare, analiză termogravimetrică, spectroscopie de infraroșu și spectroscopie ultraviolet-vizibil. Pentru studiul în fază lichidă al complexării derivaților hidroxibenzamidici cu ciclodextrine a fost

ales ca și compus reprezentativ esterul etilic al acidului [2-(2-bromfenilcarbamoil) fenoxi]acetic, spectroscopia de absorbție UV-Vis fiind utilizată pentru a demonstra formarea complexului. Raportul stoichiometric ester: ciclodextrină al complexului a fost stabilit cu ajutorul ecuației Benesi-Hildebrand ca fiind 1:1. Prin modelare moleculară s-a dovedit că cea mai stabilă configurație a complexului este cea în care restul benzamidic al esterului se regăsește în cavitatea ciclodextrinei, fapt care este în concordanță cu datele obținute din spectrele H^1 -RMN.

Compușii sintetizați au fost testați în vederea evaluării activității lor biologice. Activitatea antioxidantă a noilor derivați de N-(2-brom-fenil)-2-hidroxi-benzamidă, 5-bromo-2-hidroxi-benzamidă și 5-cloro-2-hidroxi-N-fenil-benzamidă a fost evaluată folosind metode chimice (DPPH, TEAC, FRAP) și electrochimice (voltametrie ciclică), dovedindu-se caracterul antioxidant al acestora. A fost demonstrat, de asemenea potențialul antifungic al derivaților de N-(2-bromo-fenil)-2-hidroxi-benzamidă față de *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum* și *Saccharomyces cerevisiae*. Potențialul antimicrobian al derivaților N-(2-bromo-fenil)-2-hidroxi-benzamidei și N-(4-bromo-fenil)-2-hidroxi-benzamidei a fost evaluat față de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Candida parapsilopsis*, *Candida albicans*, cele mai sensibile microorganisme la acțiunea derivaților de 2-brom-substituiți fiind *Candida albicans* și *Streptococcus pyogenes*. Dintre derivații 4-brom-substituiți, doar anilida a prezentat activitate antimicrobiană, inhibând bacteriile *Pseudomonas aeruginosa* și *Streptococcus pyogenes*. Activitatea antibacteriană a derivaților N-(2-cloro-fenil)-2-hidroxi-benzamidei și N-(4-cloro-fenil)-2-hidroxi-benzamidei precum și a unor complecși de incluziune în β -ciclodextrină a esterilor, a fost testată față de cinci tulpini bacteriene, Gram-pozitive și Gram-negative. Compușii derivați din N-(2-clorfenil)-2-hidroxibenzamidă au prezentat o activitate mai mare împotriva tulpinilor de bacterii Gram-pozitive, valorile CMI variand între 0,125-0,5 mg/mL. Efect antibacterian mai scăzut sau lipsă a prezentat seria N-(4-clorfenil)-2-hidroxibenzamidei (CMI \geq 0,5 mg/mL). Cele mai sensibile la acțiunea derivaților de salicilanilide cloro-substituite s-au dovedit a fi *Streptococcus pyogenes* și *Streptococcus mutans*. Efectul complexării ciclodextrinei asupra activității antibacteriene a compusului necomplexat a fost studiat pentru cei doi esterii etilici, pornind de la premisa că, încapsularea compuşilor antimicrobieni în ciclodextrine ar trebui să conducă la un control adecvat al vitezei de eliberare a medicamentelor, astfel încât acestea să poată fi utilizate mai eficient. Rezultatele obținute au confirmat posibilitatea utilizării esterilor etilici în formă complexată, cu toate avantajele aferente.

O altă direcție de cercetare importantă urmărită după obținerea titlului de doctor a constat în studiul unor extracte naturale din plante în vederea determinării compoziției în principii active și evaluării activității biologice.

Astfel, au fost obținute prin macerare extracte etanolice bogate în compuși polifenolici care au demonstrat efecte antioxidante evaluate prin metodele chimice DPPH, TEAC, FRAP, efecte inhibante asupra speciilor reactive de oxigen în eritrocite umane supuse unui stres oxidativ indus cu H_2O_2 studiate prin citometrie în flux și activitate antitumorală pe celulele canceroase A375 – melanom uman și B164A5 – melanom de șoarece evaluată prin testul de proliferare MTT și testul “*wound healing*”. Celulele A375 s-au dovedit a fi mai susceptibile la stimularea cu extracte vegetale decât celulele B164A5, iar cea mai mare rată de inhibare celulară a fost observată după stimularea celulelor A375 cu extract de salcie, tei și salvie. Cel mai puternic efect antimigrator este atribuit extractului de afine care a prezentat și cea mai scăzută citotoxicitate determinată pe keratinocite umane HaCat sănătoase.

Extrakte din fructe bogate în antociani aparținând genului *Prunus* au fost obținute prin ultrasonare, iar compoziția acestora a fost determinată prin cromatografie de lichide de înaltă performanță și confirmată prin spectrometrie de masă. Acest studiu evidențiază variația conținutului în fenoli și antociani, precum și capacitățile antioxidante diferite întâlnite la diferite fructe din genul *Prunus*. Vișinele, cireșele amare și cireșele dulci au prezentat cele mai mari activități antioxidante determinate prin metodele DPPH, TEAC, FRAP, conținutul total de fenoli determinat prin metoda Folin-Ciocalteu, fiind puternic corelat cu activitatea lor antioxidantă.

Extrakte etanolice bogate în antociani au fost obținute prin ultrasonare din afine, mure și dunde și au fost caracterizate din punct de vedere al activității antioxidante (metoda DPPH), conținutului de antociani (metoda diferențială de pH) și de compuși fenolici (metoda Folin-Ciocalteu). Extractul de afine a demonstrat cea mai puternică activitate antioxidantă și cel mai mare conținut de antociani și fenoli. Compoziția extractelor a fost determinată prin HPLC și confirmată prin spectrometrie de masă. Efectul antihiperglicemiant al extractelor a fost urmărit pe șobolani cărora li s-a indus artificial diabetul prin injectarea i.p. de streptozotocin. Toate extractele studiate au prezentat efect antihiperglicemiant, extractele de mure și dunde manifestând cea mai pronunțată activitate antihiperglicemică, cu menținerea nivelului de glucoză după 5-6 săptămâni de experimente la 270 mg/dL, respectiv 155 mg/dL.

Un alt studiu a vizat investigarea stabilității extractelor etanolice de antociani din afine, mure și dade cu și fără adaos de antioxidanți, acid ascorbic (AA) și butil hidroxianisol (BHA), având în vedere că tratamentul termic poate influența stabilitatea antocianilor în alimente. Au fost determinate variațiile conținutului de antociani (metoda diferențială de pH) și ale activității antioxidante (metoda FRAP) în timpul depozitării timp de 2 săptămâni la 60°C și 4 luni la temperatura camerei. La temperatura camerei, antocianii au prezentat o stabilitate mai bună, dar au suferit o degradare foarte rapidă la temperatură ridicată, extractele netratate fiind mai stabile decât cele tratate cu antioxidanți, și în plus, antocianii din extractele tratate cu acid ascorbic suferind o degradare mai rapidă. A fost evidențiat efectul negativ al acidului ascorbic asupra stabilității antocianilor la temperatura camerei și că adăugarea de BHA nu are nicio influență semnificativă, uneori chiar negativă (extractul de dade). Activitatea antioxidantă prezintă doar o scădere ușoară în comparație cu conținutul de antociani în timpul tratamentului termic.

A fost urmărit comportamentul electrochimic al unor extracte de fructe de pădure, voltametria ciclică fiind utilizată ca metodă de estimare a activității antioxidante. Capacitățile antioxidante ale extractelor au fost, de asemenea, evaluate prin metoda DPPH și corelate cu potențialul lor de oxidare.

Potențialul de electrod al cianidinei a fost determinat atât prin metode experimentale (voltametrie ciclică), cât și prin metode teoretice (compuționale). Dintre cei 6 conformeri ai cianidinei investigați a fost aleasă structura cea mai stabilă, comparația cu rezultatele experimentale arată o eroare de calcul de 0,05 V pentru potențialul de electrod, care poate fi atribuită subestimării energiilor libere calculate. Rezultatul studiului demonstrează utilitatea metodelor compuționale în predicția caracterului antioxidant al unor principii active.

Având în vedere avantajele complexării antocianilor cu ciclodextrine, interacțiunile dintre șase antociani (cianidin-3-O-glucozidă, delfinidin-3-O-glucozidă, malvidin-3-O-glucozidă, cianidin-3-O-rutinozidă, delfinidin-3-O-rutinozidă, malvidin-3-O-rutinozidă) și ciclodextrine au fost investigate prin tehnici compuționale (Gaussian 09W software). Rezultatele au evidențiat că antocianidin-3-O-rutinozidele sunt favorizate pentru obținerea de complecși de incluziune cu ciclodextrinele, în principal datorită numărului mai mare de grupări OH implicate în formarea legăturilor de hidrogen și că β -ciclodextrina reprezintă alegerea optimă ca moleculă gazdă.

Extracte etanolice din legume bogate în glucozinolați (varză albă, broccoli, ridiche neagră și conopidă) obținute prin iradiere cu microunde, au fost studiate cu scopul de a

evalua efectul antioxidant (metoda DPPH), conținutul total de fenoli (metoda Folin-Ciocalteu) și profilul HPLC al acestora și de a evalua capacitatea antimicrobiană a acestora față de o serie de agenți patogeni, inclusiv tulpini bacteriene rezistente, cum ar fi *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină (MRSA), *Escherichia coli* secretoare de β -lactamaze cu spectru extins (ESBL) sau *Pseudomonas aeruginosa* rezistent la carbapeneme. Extractele studiate au demonstrat capacități antioxidante bune, cele mai bune valori obținându-se la conopidă și broccoli, acestea prezentând și cel mai mare conținut de polifenoli. Tulpinile bacteriene au fost moderat sensibile la extractele de conopidă și broccoli prezentând o sensibilitate mai mare la extractele de varză și ridichi negre pentru care s-au putut constata și efecte bactericide. Valorile concentrației minime bactericide pentru aceste două extracte au fost mai mari decât valorile concentrației minime inhibitorii, exercitând un efect inhibitor mai pronunțat asupra bacteriilor Gram-negative. Diluțiile testate nu au prezentat activitate antifungică.

Un alt studiu prezentat în teză se referă la dezvoltarea de metode rapide și eficiente de detectare și cuantificare (HPLC-DAD și GC-MS) a reziduurilor unor fungicide, boscalid, tebuconazol, iprodionă și imazalil, în legume și fructe din comerț. Reziduuri de imazalil au fost găsite în clementine și lămâi. Concentrația de imazalil în lămâi a fost cuantificată, prin ambele metode, ca fiind mai mare decât limita maximă de reziduuri (LMR). Iprodiona a fost detectată numai prin metoda HPLC în cartofii albi și roșii dar în cantități mai mici decât LMR. Nu s-a constatat prezența de boscalid și tebuconazol în legumele și fructele analizate.

Prezența pesticidelor a fost urmărită în sol și unele culturi de porumb, grâu și rapiță, cultivate în Banat - zona Moravița. Au fost dezvoltate metode HPLC-DAD rapide și sensibile pentru detectarea simultană a reziduurilor mai multor pesticide, imidacloprid, amidosulfuron, bromoxinil și deltametrină. Prezența imidaclopridului a fost observată în solurile studiate, iar cantitățile reziduale determinate au fost cuprinse între 0,13-0,21 $\mu\text{g/g}$. Amidosulfuron, bromoxinil și deltametrin nu au fost detectate în sol și probele de porumb și grâu. Cantitatea de bromoxinil găsită în semințele și tulpinile de rapiță a fost de 0,25 și, respectiv, 1,29 $\mu\text{g/g}$. La porumb și grâu (Dealul Mare), valorile concentrației de imidacloprid au depășit valorile LMR.

Un alt studiu vizează transformarea unor deșeuri biologice în materiale biocompozite cu posibilă utilizare în medicină. Pentru obținerea hidroxiapatitei din oase bovine s-a folosit un procedeu de extracție hidrotermal cu apă în condiții sub- și super-critice și extracția în câmp de microunde. Metoda cea mai eficientă de extracție s-a dovedit a fi extracția în câmp

de microunde, iar compusul obținut a fost hidroxiapatita pură (FTIR și difracție de raze X), cu un raport Ca/P (TEM-EDX) mai apropiat de standard. Folosirea microundelor s-a dovedit a fi benefică și în cazul obținerii hidroxiapatitei prin sinteză, conducând la obținerea unui produs nanostructurat de înaltă puritate. Colagenul de tip I a fost obținut prin extracție din piele de porc și a fost caracterizat prin metoda spectrofotometrică de determinare a hidroxiprolinei și prin temperatura de denaturare. Au fost obținute prin ultrasonare membrane biomimetice de tipul colagen-hidroxiapatită și chitosan-hidroxiapatită caracterizate prin imagini SEM.

O altă direcție de cercetare abordată în teză se referă la valorificarea unor deșeuri de polietilen tereftalat (PET). A fost studiată depolimerizarea hidrotermală a deșeurilor PET în condiții sub- și supercritice și depolimerizarea hidrolitică a acestora în soluție alcalină folosind iradierea cu microunde pentru a obține acid tereftalic pur cu randamente ridicate. În comparație cu metodele convenționale de încălzire, prin aceste procedee s-a obținut o reducere semnificativă a timpului de reacție necesar depolimerizării totale a PET precum și randamente superioare de obținere a acidului tereftalic.

Lucrarea de față prezintă doar rezultatele deja publicate, fără a face referire la cele în curs de publicare sau care nu sunt complet finalizate.

Pe lângă activitatea științifică, căreia autoarea i-a dedicat mai mult spațiu, teza prezintă și activitatea profesională și academică desfășurată la Universitatea de Vest Vasile Goldiș din Arad și la Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Electrochimie și Materie Condensată, Timișoara.

Teza se încheie cu planul de dezvoltare a carierei universitare atât pe plan științific cât și pe plan didactic, cu propunerile autoarei pentru cercetări viitoare, respectiv cursuri universitare, post-universitare sau masterale, subliniind abilitatea acesteia de a îndruma doctoranzi.