

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE “VICTOR BABEȘ”  
DIN TIMIȘOARA**

**FACULTATEA DE MEDICINĂ**

**Departmentul IV: Biochimie și Farmacologie**

**COJOCARIU CAROLINA-STANA**



# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**COMPUȘI BIOACTIVI, ANALIZĂ STRUCTURALĂ  
ȘI STUDIUL RELAȚIEI STRUCTURĂ-ACTIVITATE**

**– R E Z U M A T –**

**Coordonator științific:  
PROF. UNIV. DR. ȘIȘU EUGEN**

**T i m i ș o a r a  
2 0 2 3**



Teza de doctorat se circumscrie direcțiilor moderne de cercetare în chimia medicinală împletind armonios preocupările pentru problemele teoretice cu cele privind exploatarea tehnicilor analitice de investigare a structurii bioconjugatelor și biomacromoleculilor. Se utilizează astfel atât facilitățile oferite de programele performante ale chimiei medicale *in silico*, cât și dotarea de excepție cu mijloace de anvergură ale investigațiilor "omics". Lucrarea se structurează după următorul plan

**Partea generală** cuprinde aspecte generale legate de:

- 1) Elemente de bioinformatică
- 2) Glicomică
- 3) Lipidomică cu un accent particular pe datele de literatură care ilustrează preocuparea pentru o problemă de mare interes practic, analitic și teoretic cel al izomeriei *cis-trans* în acizii grași naturali.
- 4) Spectrometria de masă

**Partea specială**, care sumează contribuțiile originale ale demersului experimental este alcătuită din două subcapitole mari:

**A) Chimia computațională în analiza structurală organică și studiul relației structură-activitate**, cuprinde trei direcții de investigație ce aparțin chimiei medicale *in silico*, astfel:

- I) Studiul QSAR al unei serii de derivați ai camptotecinei
- II) Metodă de identificare a configurațiilor *cis* și *trans* în lipidele bioactive utilizând calcule cuantochimice și QSFR
- III) Utilizarea metodelor cuantochimice semiempirice și de tip *ab initio* în crearea de baze de date cu ioni de fragmentare și utilizarea QSFR în identificarea spectrelor de masă ale unor monozaharide diacetalizate izomere

**B) Rolul și aportul spectrometriei de masă în analiza structurii compușilor cu semnificație biologică**, care se încadrează direcțiilor de cercetare de tip omics (glicomicii în cazul nostru) și cuprinde la rândul său trei direcții de investigație, după cum urmează:

- I) Sinteza și analiza prin spectrometrie de masă MALDI-TOF a unei maltodextrine funcționalizate la capătul reducător
- II) Comportare neașteptată la analiza prin spectrometrie de masă (ESI-OT-HRMS) a trisilanolizobutil-POSS, un compus cheie în sistemele de eliberare a principiilor active medicamentoase
- III) Un studiu preliminar al izolării, separării, purificării și caracterizării prin spectrometrie de masă MALDI-TOF a polizaharidelor neutre din *Fomes fomentarius*

**Elemente de identificare a tezei:**

Partea Generală + Partea Specială + Concluzii + Bibliografie = 121 pag.

Nr. Tabele (Teză + Anexe) = 37

Nr. Figuri (Teză + Anexe) = 58

Nr. lucrări publicate și atasate = 6

Nr. lucrări din Bibliografie = 189

**Partea generală** începe cu prezentarea unor elemente de bioinformatică, aceasta fiind acea zonă a biologiei care se concentrează pe utilizarea metodelor bazate pe computer pentru studiul sistemelor biologice, care ar putea oferi unele predicții precise pentru experimentele de laborator și cele clinice. Metodele chimiei medicinale *in silico* includ baze de date, relații cantitative structură-activitate, generarea farmacoforilor, modele de omologie și alte abordări de modelare moleculară, învățarea automată, extragerea datelor, instrumente de analiză a rețelei și instrumente de analiză a datelor care utilizează un computer. Ea acoperă următoarele domenii ale utilizării pe scară largă a echipamentelor și softurilor de calcul:

- chimioinformatică (numită și cheminformatică),
- modelare moleculară și
- chimie computațională.

Aceasta din urmă acoperă următoarele subdomenii: modelarea moleculară, analiza similitudinilor, screening virtual, analiza de cluster, designul de novo și QSAR. În QSAR obiectivul este de a corela structura moleculară cu proprietăți biologice cunoscute, cum ar fi activitatea biologică și de a construi un model statistic. Avantajul unui astfel de model QSAR este că poate fi aplicat, cu grijă și precauție, pentru a prognoasta acțiunea unor molecule care nu au fost testate și nici măcar nu au fost sintetizate !! . Acest lucru permite ca biblioteci virtuale vaste să fie analizate și prioritizate pentru a permite concentrarea asupra acelor molecule care au cele mai multe șanse de a reuși. Glicomica este prezentată în legătură cu aspectele ei cele mai ardente, obiectivul major constituindu-l caracterizarea completă a setului de structuri de carbohidrați prezente într-o celulă sau organism, definită prin expresia și specificitatea enzimelor modificatoare de carbohidrați, cum ar fi glicoziltransferazele, glicozidazele și transglicozidazele. Cipurile cu carbohidrați (glicooarrays) au apărut recent și constituie un instrument puternic pentru studierea proteinelor care leagă carbohidrații și a enzimelor lor de procesare. Acestea din urmă fiind puternic responsabile de modificările co și postranslacionale, mai mult de 50% din proteine fiind în fapt glicoproteine.

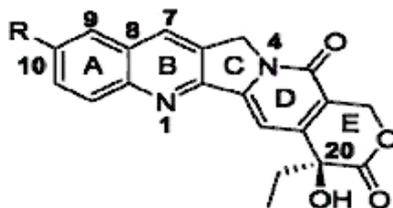
„Omics” reprezintă un set de tehnologii complexe utilizate pentru studiul rolurilor, relațiilor și activităților diferitelor tipuri de molecule care compun celulele unui organism. Spectrometria de masă (MS) este o tehnologie analitică esențială pe care se dezvoltă și se bazează domenii „omice” precum genomica, transcriptomica, proteomica și metabolomica ( în cadrul acestora din urmă cu adresare țintită: glicomica și lipidomica). Această tehnică permite identificarea a mii de compuși proteici sau compuși biologici activi, metaboliți în cantități extrem de mici din domeniul femto și până la atto molar.

Partea de lipidomica este tratată mai pe larg în legătură cu detectarea prin analiză instrumentală a proporției corecte de legatură cis- versus trans-. Folosirea spectrometriei de masă în studiul glicanilor, artificiali sau naturali în scopul descifrării structurii lor, preocupare ce se circumscrie glicomicii este de asemenea pe larg ilustrată

**Partea specială** conține două subcapitole mari, primul dedicat

(A) chimiei computaționale în analiza structurală organică și studiul relației structură-activitate și cel de-al doilea focusat pe (B) Rolul și aportul spectrometriei de masă în analiza structurii compușilor cu semnificație biologică

**(A1) Studiul QSAR al unei serii de derivați ai camptotecinei**



Camptotecina (CTP) este un alcaloid pentaciclic izolat din arborele chinezesc „*Camptotheca acumunata*”. Proiectarea unor modificări chimice pe ciclurile A și B în pozițiile 7 și 10 și estimarea eficacității lor face apel la metodele QSAR. Hansch a obținut cel mai bun model QSAR cu ajutorul descriptorilor moleculari care cuantifică hidrofobitatea substituenților  $\pi_x$  și  $\pi_y$  (parametrul hidrofobit de substituent). Descriptorii moleculari utilizați în cercetare au fost cei furnizați de programul DRAGON. Au fost testați peste 1000 de descriptori moleculari și au fost reținuți 37, marea majoritate fiind de tip GETAWAY sau 3D-MoRSE. Cele mai bune rezultate au fost obținute în corelări biparametrice cu indicii: **HATS**, **H** și **R**, cel de-al doilea parametru fiind întotdeauna constanta de substituent  $\pi_Y$ . O ordonare a descriptorilor după valoarea descrescândă a coeficientului de determinare, conduce la reținerea primelor 4 valori pentru care coeficientul de determinare  $>0.9$  și la construirea următoarelor ecuații corelaționale (7)-(10). Abilitatea predictivă a celor 4 modele a fost testată cu ajutorul coeficienților de validare încrucișată iar rezultatele obținute fiind sistematizate în Tabelul 2.4 [97]

$$A = \log 1/EC_{50} = -47,75(\pm 9,09)HATS7v - 1,46(\pm 0,15)\pi_Y + 10,19(\pm 0,89) \quad (7)$$

( $n = 14, r^2 = 0,916, q^2 = 0,864, F = 59,69, s = 0,176$ )

$$A = \log 1/EC_{50} = -5,72(\pm 1,20)H1v - 1,33(\pm 0,16)\pi_Y + 12,49(\pm 1,46) \quad (8)$$

( $n = 14, r^2 = 0,904, q^2 = 0,855, F = 51,66, s = 0,188$ )

$$A = \log 1/EC_{50} = -8,18(\pm 1,74)R2p - 1,33(\pm 0,16)\pi_Y + 12,64(\pm 1,52) \quad (9)$$

( $n = 14, r^2 = 0,902, q^2 = 0,852, F = 50,36, s = 0,190$ )

$$A = \log 1/EC_{50} = -4,60(\pm 0,97)H1p - 1,30(\pm 0,16)\pi_Y + 11,50(\pm 1,26) \quad (10)$$

( $n = 14, r^2 = 0,903, q^2 = 0,850, F = 51,16, s = 0,188$ )

**Tabelul 2.4. Rezultatele obținute în urma testării abilității de predicție a celor 4 modele QSAR (7) – (10) prin validare internă conform algoritmilor implementați în programul MobyDigs**

Modelul QSAR	$q_{boot}^2$	$r_{Y-s}^2$	$q_{Y-s}^2$	$r_{adj}^2$ (EV)	SDEP	SDEC
2	0,763	0.057	-0.537	0,900	0.198	0.156
3	0,789	0.155	-0.373	0,886	0.204	0.166
4	0,829	0.144	-0.396	0,884	0.207	0.168
5	0,710	0.274	-0.177	0,885	0.207	0.167

1) Noile modele QSAR întăresc semnificația descriptorului  $\pi_Y$  și influența lui asupra activității biologice de legare de topo I din complexul clivabil cu ADN.

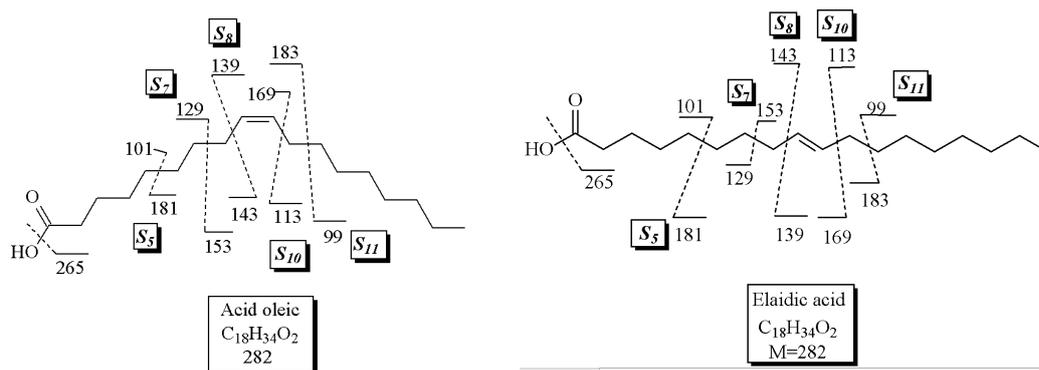
2) În locul descriptorului  $\pi_X$ , care cuantifică efectul hidrofob al substituentului X se propun variabilele predictor utilizate în modelele noastre QSAR (HATS7v, H1v, R2p și H1p) care conduc la ecuațiile (7) – (10) ai căror coeficienți de predicție (leave one out), au valorile cele mai mari (0.864-0.850)

4) Capacitatea corelațională și abilitatea predictivă a celor 4 modele QSAR propuse (ec 7-10) a fost validată statistic. În final se poate trage concluzia că volumul vdW și polarizabilitatea analogilor CPT sunt factori importanți care intervin în cursul interacțiunii biologice derivatii CPT și topo I din complexul clivabil (reversibil) cu ADN-ul celulelor canceroase;

5) Corelările dintre activitatea biologică experimentală (luată din literatura de specialitate) și descriptorii moleculari a fost efectuată cu ajutorul programului MobyDigs, fiind propuse în urma investigațiilor efectuate, modelele de o calitate statistică superioară modelului dezvoltat de Verma și Hansch [97]

**(A2) Metodă de identificare a configurațiilor cis și trans în lipidele bioactive utilizând profiluri masă-energie.**

European Food Safety Authority (EFSA) a aratat ca riscul de deces din cauza bolilor de inimă, crește cu 20-32% dacă peste 2% din totalul dietei zilnice este asigurat de grăsimi *trans*. Considerand cazul cel mai banal al acidului oleic (si-al izomerului lui elaidic), masiv prezent in grasimile animale si vegetale de consum, constatam ca baza de date **NIST Chemistry WebBook SRD 69** prezinta spectrele EI-MS cu sabloane de fragmentare quasi identice si cu un inalt grad de similitudine !!!



Pornind de la aceasta observatie ne-am pus problema dacă relativitatea intensității unor ioni primari selectați din spectru, conține informație structurală decodificabilă referitoare la configurația C=C și am încercat să răspundem prin abordarea tehnicii QSFR. În această abordare se compară profilurile masă-energie de fragmentare, calculate cuantochimic, cu profilul masă-intensitate ionică corespunzător, procurat din spectrul experimental al analitului. Structura adevărată este considerată aceea care oferă scorul de potrivire cel mai mare !!! Deoarece nu există baze de date unificate de entalpii, acestea au fost calculate folosind metoda cuantică semi-empirică RM1, folosind operatorii RHF pentru molecule sau ioni și UHF pentru radicali sau ioni radicali, accesibile prin pachetul de programe HyperChem. S-a calculat entalpia de fragmentare a moleculei ( $\Delta H_{frag}$ ) pentru obținerea fiecăruia dintre acești ioni, folosind metoda semi-empirică RM1 și ecuația:

$$\Delta H_{frag} = \Delta H(I_i^+) + \sum \Delta H(F_i) - \Delta H(M)$$

unde  $\Delta H(I_i^+)$  este entalpia de formare a ionului primar respectiv,  $\sum \Delta H(F_i)$  este suma entalpiilor de formare a fragmentelor care rezultă colateral cu ionul primar, iar  $\Delta H(M)$  este entalpia molară de formare a structurii candidate. Scorul de potrivire (P) al profilurilor structurilor candidate cu profilul experimental a fost calculat programul MS Excel folosind ecuația următoare în care apare coeficientul de corelație liniară R:

$$P (\%) = 100(1-R)/2$$

În Tabel 2.7 sunt prezentate intensitățile ionilor primari din spectrele etaloanelor chimice (coloanele E-M), scorurile de potrivire rezultate pentru acidul oleic (rândul 17) și pentru acidul elaidic (rândul 18).

**Tabel 2.7. Pagina de calcul MS Excel pentru calculul scorului de potrivire a profilurilor masă-energie pentru acizii oleici și elaidici, cu spectrele de masă etalon**

E17		=100*(1-CORREL(E4:E16,\$C4:\$C16))/2											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1													
2		$\Delta H_{frag}$ (kcal/mol)			Curenți ionici (unitati arbitrare)								
3		Acid elaidic	Acid oleic	MS ions	#133071: 9-Octadecen oic acid (Z) (CAS) \$\$ Oleic acid	#133072: 9-Octadecen oic acid (Z) (CAS) \$\$ Oleic acid	#133073: 9-Octadecen oic acid (Z) (CAS) \$\$ Oleic acid	#133074: 9-Octadecen oic acid (Z) (CAS) \$\$ Oleic acid	#133075: 9-Octadecen oic acid (Z) (CAS) \$\$ Oleic acid	#133076: 9-Octadecen oic acid (Z) (CAS) \$\$ Oleic acid	#133077: 9-Octadecen oic acid (Z) (CAS) \$\$ Oleic acid	#133078: 9-Octadecen oic acid (Z) (CAS) \$\$ Oleic acid	#133080: 9-Octadecen oic acid (Z) (CAS) \$\$ Oleic acid
4		244.8	245.4	99	800	590	268						340
5		259	258.8	101	900	870	357						430
6		270.4	270.5	113	500	410							210
7		246.6	247.2	129	2900	1190				1140			370
8		269.6	268.3	139	300	400	268	490					230
9		271.7	271.9	143	700	210							100
10		232.2	234.3	153	200	200		240					140
11		270.4	270.5	169		70							60
12		254.3	254.3	181	100	50							50
13		233	235.2	183		20							30
14		229.3	229.2	264		410	1339	1120	300	420	864	1900	300
15		264.7	264.7	265		100	268	220	100	82	169	372	100
16		199.8	201.5	282		50	268	160	40	60	62	500	50
17		SCOR (%) Acid oleic →			59.5	44.4	63.9	49.4	42.5	36.8	47.4	57.3	45.4
18		SCOR (%) Acid elaidic →			59.3	43.9	63.2	48.2	41.6	36.8	46.5	56.4	44.7
19		Amprente masa-energie											
20		Spectre de masa											

Scorurile de potrivire sunt mai mari în cazul acidului oleic (formatate verde în **Tab.2.7**) pentru 8 din cele 9 etaloane ale acidului oleic. In concluzie:

1) Relativitatea intensității ionilor primari din spectrele de masă ale acizilor grași, conține informație structurală referitoare la configurația *cis-trans* a legăturii C=C din acizii grași.

2) Profilurile masă-energie de fragmentare calculate prin metode semiempirice (RM1) pot servi la decodificarea acestei informații structurale generate de configurația diferită a legăturii C=C [102]

**(A3) Profile energie de fragmentare - masa calculate pentru o serie de monozaharide acetalizate in vederea identificării lor prin spectrometrie de masa**

Metoda QSFR a fost aplicata cu succes la discriminarea a 10 stereozomeri di izopropilidenici: DAG(1), DAM(2), DAGal(3), DAF(4), DAS(5), DAAlO(6), DAF\_spiran(7), DAM-beta(9), DAGal\_furan(8), DAS-spiran(10), parcurgand urmatoarele etape: a) stabilirea structurilor candidate și calculul profilurilor masă-energie pentru acestea; b) înregistrarea spectrului de masă a di-O-izopropiliden derivatului etalon; c) optimizarea geometriei pentru structurile analizate prin: mecanica moleculara (MM+), calcul semiempiric (RM1 si PM7) si de tip *ab initio* (DFT) d) calcularea entalpiilor de fragmentare ( $\Delta fH$ ) (**RM1, PM7, DFT**) și energiilor de fragmentare Gibbs ( $\Delta fG$ ) (**DFT**); e) validarea metodei prin stabilirea corectă a structurii etalonului. Fiecare profil experimental masă-energie al etalonului va fi comparat cu cele zece profiluri calculate. Potrivirea maximă ar trebui să fie obținută pentru structura adevărată dacă energia calculată descrie corect fragmentarea. Calcule s-au făcut doar pentru **ionii primari**, formarea acestor ioni se face cu un consum minim de energie deoarece ei rezultă prin ruperea **unei singure legături chimice** și eventual eliminarea unor molecule mici (Tabelul 2.8)

**Tabel 2.8. Pentru profilurile masă-energie ale izomerilor 1-10 au fost luați în considerare șapte ioni care se formează prin pierderea din ionul molecular, a unor molecule și radicali**

Ion	Fragmentare
m/z 245	[M-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>
m/z 229	[M-CH <sub>2</sub> OH] <sup>+</sup>
m/z 187	[M-acetonă-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>
m/z 171	[M - acetonă - CH <sub>2</sub> OH] <sup>+</sup>
m/z 159	[M- dimetil dioxolanic]
m/z 127	[M - 2*acetonă - OH] <sup>+</sup>
m/z 101	[Inelul dimetil dioxolanic]

Pentru fragmentarea moleculei M, entalpiile de fragmentare ( $\Delta fH_{frag}$ ) au fost calculate cu relatia:

$$\Delta fH_{frag} = \Delta fH (I_i^+) + \sum \Delta fH (F_i) - \Delta fH (M) \quad (1) \text{ pt. } \Delta fG_{frag} \quad (2)$$

unde  $\sum \Delta fH (F_i)$  este suma entalpiilor de formare ale fragmentelor pierdute de moleculă,  $\Delta fH (I_i^+)$  este entalpia de formare a ionului primar rezultat iar  $\Delta fH (M)$  este entalpia de formare moleculară a structurii candidate. Similar se evalueaza  $\Delta fG_{frag}$ . Calculul cuantic al entalpiilor și energiilor Gibbs a utilizat trei metode: **RM1, PM7, DFT** atat pentru  $\Delta H$  cat si pentru  $\Delta G$ . Se obtin urmatoarele baze de date (pentru  $\Delta H$  si  $\Delta G$ ):

Tabel 2.10. Baza de date  $\Delta fH$  (kcal/mol) calculată cu RM1 și Ec. (1)

Tabel 2.11. Baza de date  $\Delta fH$  (kcal/mol) calculată cu PM7 și Ec. (1)

Tabel 2.12. Baza de date  $\Delta fH$  (kcal/mol) calculată cu DFT (B3LYP/6-31G) și Ec. (1)

Tabel 2.13. Baza de date  $\Delta fG$  (kcal/mol) calculată cu DFT (B3LYP/6-31G) și Ec. (2)

Validarea acurateții de identificare a unor izomeri ai di-O-izopropiliden monoza haridelor a fost realizata folosit etalonul chimic DAS (Diaceton-l-sorboza). Am utilizat entalpiile de fragmentare ( $\Delta fH$ ) și energiile Gibbs ( $\Delta fG$ ) ca descriptori energetici ai fragmentării și ecuația pentru calcularea scorului de potrivire a profilurilor:

$$P (\%) = 100(1-R)/2$$

Optimizarea a fost realizată în funcție de cele trei metode de calcul chimic cuantic: RM1, PM7, DFT $\Delta$ H și DFT $\Delta$ G. Spectrul de masă al etalonului DAS la 70 eV a fost determinat anterior [116]. Calculul scorului de potrivire a fost efectuat în programul MS Excel. S-au folosit doar cei trei ioni primari comuni (m/z 245, m/z 187 și m/z 127) ai structurilor candidate **1-10**. Valorile energiilor de fragmentare au fost extrase din baza de date calculată, prezentată mai sus. Structura adevărată indicată de metodă este cea care corespunde scorului maxim. S-au calculat astfel:

Tabel 2.22. Pagina Excel de obținere a scorului de potrivire a profilurilor masă-energie calculate cuanto-chimic cu metoda RM1

Tabel 2.23. Pagina Excel de obținere a scorului de potrivire a profilurilor masă-energie calculate cuanto-chimic cu metoda PM7.

Tabel 2.24. Pagina Excel de obținere a scorului de potrivire a profilurilor masă-energie calculate cuanto-chimic cu metoda DFT (pentru  $\Delta$ H).

Tabel 2.25. Pagina Excel de obținere a scorului de potrivire a profilurilor masă-energie calculate cuanto-chimic cu metoda DFT (pentru  $\Delta$ G).

În final s-au combinat cele 4 liste și obținându-se lista de probabilități rezultate la potrivirea profilurilor masă-energie calculate cuantic pentru cele zece structuri candidate, cu profilul experimental al analitului (etalonul DAS (5))

Tabel 2.26. Listele de probabilități rezultate la potrivirea profilurilor masă-energie calculate cuanto-chimic pentru cele zece structuri candidate, cu profilul experimental al analitului (etalonul DAS având structura (5)). Rezultatele corecte sunt formatate cu fond verde. Rezultatul fals pozitiv este formatat cu fond roșu.

Metoda → Locul în clasament ↓	RM1		PM7		DFT $\Delta$ H		DFT $\Delta$ G	
	Structura	P(%)	Structura	P(%)	Structura	P(%)	Structura	P(%)
1	<b>5</b>	<b>92,1</b>	<b>7</b>	<b>92,2</b>	<b>5</b>	<b>94,8</b>	<b>5</b>	<b>95,4</b>
2	<b>10</b>	89,9	<b>8</b>	91,7	<b>10</b>	91,0	<b>9</b>	92,6
3	<b>2</b>	83,4	<b>5</b>	86,7	<b>9</b>	89,4	<b>10</b>	92,5
4	<b>7</b>	82,5	<b>10</b>	85,7	<b>2</b>	87,7	<b>6</b>	91,3
5	<b>3</b>	82,5	<b>9</b>	85,4	<b>6</b>	85,5	<b>2</b>	91,3
6	<b>6</b>	82,3	<b>2</b>	82,5	<b>7</b>	82,4	<b>7</b>	87,0
7	<b>4</b>	82,1	<b>1</b>	80,9	<b>8</b>	80,4	<b>8</b>	86,0
8	<b>1</b>	80,7	<b>4</b>	80,2	<b>4</b>	79,7	<b>4</b>	85,1
9	<b>9</b>	80,7	<b>6</b>	79,9	<b>3</b>	76,7	<b>3</b>	84,3
10	<b>8</b>	79,4	<b>3</b>	78,4	<b>1</b>	76,4	<b>1</b>	83,7
Interval P(%)		12,6		13,8		18,4		11,7
Diferența locurile 1-2 (%)		<b>2,2</b>		<b>0,5</b>		<b>3,8</b>		<b>2,8</b>

Exactitatea (valoarea P a structurii adevărate) crește în ordinea: RM1 < DFTDH < DFTDG

Selectivitatea (diferența P dintre locurile 1 și 2) crește în ordinea: RM1 < DFTDG < DFTDH

Trei ioni primari cu intensitățile lor, prezenți în toate cele zece profile energetice posibile, **au fost suficienți** pentru a diferenția structura DAS de celelalte nouă structuri candidate [83]. În concluzie:

Studiul experimental al tezei demonstrează că profilurile masă-energie obținute prin calcule cuantice pot evidenția modificări ale intensității fragmentării datorate configurației diferite a atomului de carbon asimetric sau a configurației legăturii duble din structura chimică permitând următoarele concluzii:

1) bazele de date cu profiluri masă-energie pot fi utilizate la optimizarea descriptorilor energetici și a metodelor de calcul cuantic care asigură identificarea corectă a izomerilor fiind refolosibile

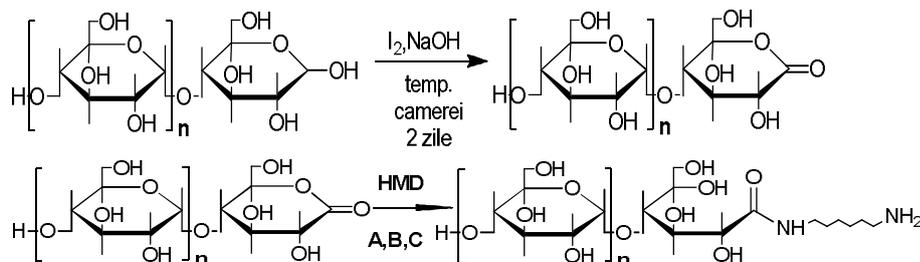
2) folosește date din spectrul de masă pe care discriminarea structurilor chimice izomere pe baza schemei de fragmentare nu le poate utiliza: ionii comuni din spectrele structurilor candidate și ale analitului;

3) nu necesită aparatură dedicată, ci doar pe cea uzuală (computer + programe QC) ; spectrele de masă utile analizei sunt cele obținute din unitățile de separare ale sistemului analitic: cromatografie, electroforeză, mobilitate ionică, separator de masă;

4) se poate optimiza și valida cu spectre de masă etalon din biblioteci întrucât metoda decodifică informații analitice ce nu depind de aparat [83].

**(B1) Sinteza și analiza prin spectrometrie de masa MALDI-TOF a unei maltodextrine funcționalizate la capătul reducător**

Bloc copolimerii amfifilici de tip A-B formează o varietate de structuri constând din agregate autoasamblate care în solvenți potriviți solvatează preferențial unul din blocuri. Pornind de la un glican cu masa moleculară medie, acesta a fost modificat la capătul reducător prin oxidare, obținându-se lactona corespunzătoare care prin aminoliza cu HMD conduce la un aminoglican conform secvenței de reacții

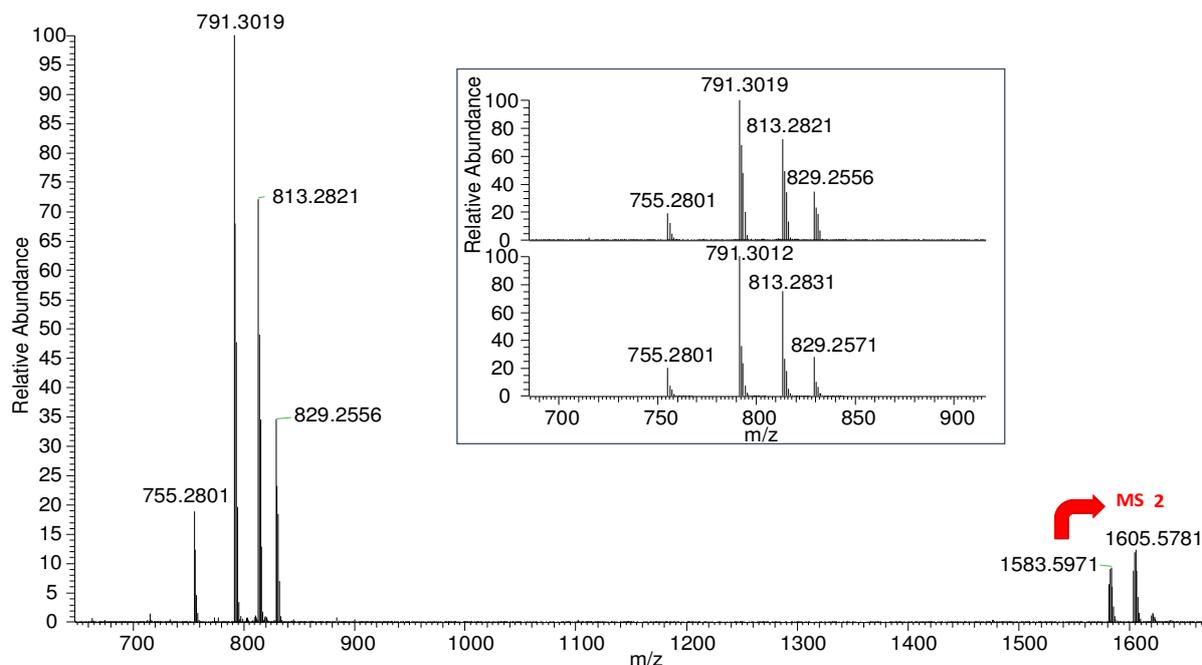


Atât lactona (Dextrinlactonei 10) cât și aminoglicanul (Dexamid 10) au fost caracterizați prin spectroscopie IR și spectrometrie de masă MALDI-TOF. În final se prezintă experimentele de analiză termică efectuate pe glican, lactona și aminoglican în scopul demonstrării formării aminoglicanului, fără a face apel la argumente spectroscopice [144]. În concluzie :

1. În procesul de obținere al Dextrinlactonei 10 și Dexamid 10 au fost modificate protocoalele de lucru, conducând la sinteze economice fără a afecta randamentul
2. Dextrinlactona 10 a fost caracterizată structural prin spectrometrie de masă MALDI-TOF stabilindu-se condițiile de spectrometrie și procedându-se la atribuirea completă a tuturor picurilor din spectru. Este prima analiză prin MS consacrată unei lactone comunicată în literatură. S-a constatat că ionii amprentă ce caracterizează produsul sunt: (a) cu intensitate mare - monosodați  $[\text{Glc-L}_n + \text{Na}]^+$  (b) cu intensitate medie cei monopotasiați  $[\text{Glc-L}_n + \text{K}]^+$  (c) cu intensitate mică cei monoprotonați care în general se prezintă sub formă lor multiplu deshidratată:  $[\text{Glc-L}_n + \text{H}]^+ - 3,4,5\text{H}_2\text{O}$ .
3. Prima analiză prin MALDI-TOF-MS a unui aminoglican cu legătura amidică (Dexamid 10) care prezintă interpretarea exhaustivă a spectrului. Caracteristica este prezentă la intensități apreciabile a ionilor monosodați, flancați de ionii monopotasiați și cei monoprotonați (aceștia din urmă la intensități mici și doar sub formă lor dublu și triplu deshidratată)
4. Analiza termică a fost folosită în premieră pentru demonstrarea formării glicanului aminat, DEXAMID 10, prin compararea termogramelor (TG, DTA, DTG) pentru produsul obținut cu termogramele reactanților și a amestecului fizic al acestora.

**(B2) Comportare neașteptată la analiza prin spectrometrie de masă a trisilanol -izobutil-POSS, un compus cheie în sistemele de eliberare a principiilor active medicamentoase.**

În timpul progreselor recente în nanomedicină, derivații POSS și-au dovedit utilitatea, în principal datorită gradului lor ridicat de biocompatibilitate atunci când sunt utilizați în grefe, DDS avansate, senzori biologici etc. În timpul încercărilor de derivatizare a trisilanolisobutil-POSS (nici una încununată cu succes), analiza reactanților și a produșilor de reacție prin (+) ESI-OT-MS a condus la realizarea unui experiment de fragmentare în stagii multiple prin CID. Există doar trei mențiuni în literatura care ilustrează o secvență de fragmentări multiple  $MS^1$ - $MS^{10}$ , analiza trisilanol-izobutil-POSS prin (+) ESI-OT-MS constituind o premieră în clasa compusilor organosilicici și ocupând locul 4 în clasificarea all time al analizei în tandem MS.



**Figura 3.14.A** Spectrul (+)ESI-OT-HRMS al Trisilanolisobutyl-POSS ( $Si_7O_{12}C_{28}H_{66}$ ). În zoom se prezintă regiunea ionilor pseudomoleculari  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$  și  $[M+K]^+$  experimental (sus) și calculați (jos).

În Figura 3.14.A este prezentat spectrul  $MS^1$  al Trisilanolisobutyl-POSS ( $Si_7O_{12}C_{28}H_{66}$ ), ionul (pseudomolecular) dimer monoprotonat fiind izolat și fragmentat prin CID pentru a obține spectrul  $MS^2$ . În condițiile de spectrometrie stabilite cu deosebită atenție, s-a condus experimentul de izolare și fragmentare încă de 8 ori. Toate spectrele sunt prezentate în detaliu și atribuirea picurilor rezultate este completă. În concluzie:

1. În experimentele  $MS^1$ - $MS^{10}$ , atribuirea structurii ionilor de fragmentare a condus în funcție de intensitatea semnalelor la 3 serii majore de ioni, care au ca punct de plecare ionul molecular dublu dehidratat. Se pare că acest eveniment inițial, realizează o structură suficient de stabilă pentru a putea observa ulterior pierderea pas cu pas a câte unui rest de: a) ibutena (ionii cu intensitatea cea mai mare) b) a unui rest sau mai multe de propenă și ibutenă (ionii de intensitate medie) c) a doi radicali izobutil, urmate de pierderi de molecule de propenă și izobutenă.

2. Pentru generarea moleculelor de propenă (ce se elimină generând ionii de fragmentare de intensitate medie) din radicalii de izobutil s-au propus două alternative de transpoziție McLafferty [161].

3. Indiferent de condiții de spectrometrie au fost încercate, nu au fost observate pierderi de ibutenă sau propenă din ionii moleculari sau pseudomoleculari prezenți, înainte ca ionul precursor să se dublu dehidrateze. Nu au fost puși în evidență ioni monodehidratați.

4. În final s-a realizat "decarbonatarea" chirurgicală completă (Figura 3.15) a moleculei de trisilanoizobutil POSS în cușcă deschisă [161].

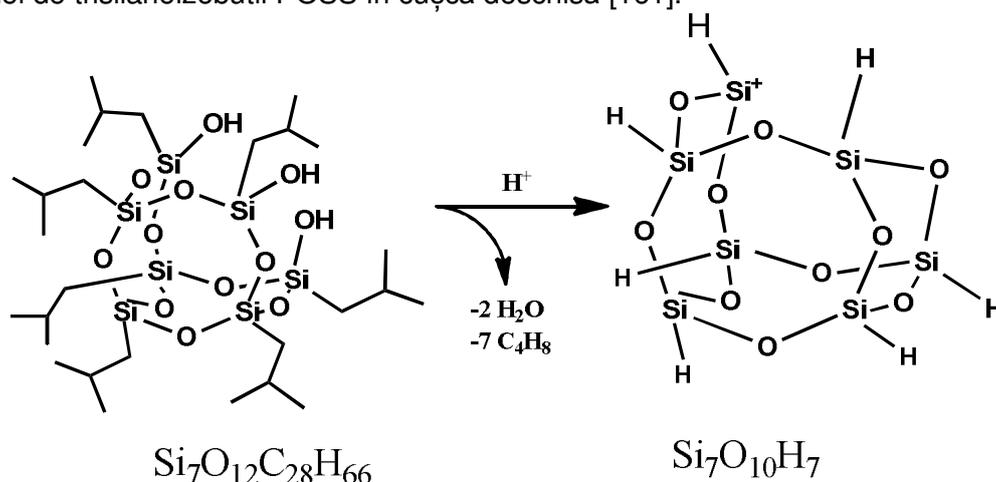


Figura 3.15. Îndepărtarea "chirurgicală" pas cu pas a radicalilor hidrocarbonați, prin fragmentări în stagii multiple din Trisilanolisobutyl-POSS.

**(B3) Investigarea polizaharidelor neutre din *Fomes fomentarius*: un studiu preliminar**

Tehnica MALDI-TOF a permis în ultimii 20 de ani progrese notabile atât în ceea ce privește lărgirea domeniului de măsurare cât și numeroasele îmbunătățiri prin lărgirea gamei de matrici, de promotori de ionizare atât în varianta analizei în mod ion pozitiv cât și în cea în mod ion negativ. Rezultatele obținute la extracția, izolarea, purificarea și determinarea structurii polizaharidelor neutre din corpul fructifer al *Fomes fomentarius*, recoltat din flora spontană a județului Vâlcea (România) folosind un experiment de tip "top-down" și utilizând spectrometria de masă MALDI-TOF este prezentată în continuare. Fructul înghețat prezervat sub azot lichid, este pulverizat și apoi degresat prin extracția contaminanților lipofili și a celor colorați în mod repetat. Apoi reziduul rezultat este extras apos în vederea separării fracțiunii polizaharidice. Extractul apos reunit și izolat este fracționat pe o coloană Sepharose Fast Flow într-o fracție conținând polizaharide neutre (PNI) și o alta conținând polizaharide acide (PAI) [166,188]. Frațiile de polizaharide neutre sunt apoi analizate prin MALDI-TOF-MS. Absența oricărei pierderi de masă de 146 uam, sugerează că polizaharidul nu conține fucoză, așa cum se cunoaște din literatură. Prin urmare o fracție neutră este supusă hidrolizei acide totale, urmata de identificarea prin TLC, cu standarde, a compoziției hidrolizatului. Identificarea pune în evidență existența manozei și galactozei și absența fucozei [166,188]. Fotodensitometrarea plăcilor de analiză a hidrolizatelor celor 3 fracțiuni sugerează existența unui heteropolimer Gal-Man, necunoscut în literatură și care are probabil formula  $[(\text{Gal})_5(\text{Man})_2]_n$ .

## Bibliografie (selectivă)

97. **Cojocariu C.**, Freiman P, Hosszu T, Ciubotariu D, Sisu E. The QSAR study of a series of camptothecin derivatives, *Curr.Top.Biotechnol.* 2020,11,63-72
102. **Cojocariu C.**, Pascariu M.C., Dinca N., Onulov R., Sisu E., Puscasiu D., Serb A., Georgescu M. Identification of cis and trans configurations in bioactive lipids using mass-energy profiles, *Physiology* 2022, 1(103),40-43
83. Pascariu MC, Dinca N, **Cojocariu C.** Sisu E, Serb A, Birza R, Georgescu M. Computed Mass-Fragmentation Energy Profiles of Some Acetalized Monosaccharides for Identification in Mass Spectrometry . *Symmetry* 2022; 14; 1074. <https://doi.org/10.3390/sym14051074>.
116. Pascariu MC, Sisu E, Ordodi VL, Rusnac LM. Spectral Analysis of Diisopropylidenedated Monosaccharides. Low Energy EI-MS Fragmentation Study. *Bul Stiint Univ "Politeh" Timisoara, Ser Chim Ing Mediului* 2011; 56; 6.

144. **Cojocariu Hoge** C, Serb A, Novaconi R, Georgescu M, Sisu E, Dinca N, Lădașiu-Ciolacu F-C., Pascariu M-C Polysaccharides modified at the reducing end: synthesis and characterization. The Academic days of Arad , XXXII-nd Edition, May 25-29, 2022
161. **Cojocariu C.** Hădăde N.D., Pascariu M.C., Ladasiu C, Serb A.,Sisu E, Georgescu M., Unexpected behavior of trisilanolisobutyl-poss, key compound in drug delivery systems, during mass spectrometry analysis, Farmacia, 2023, 71(1),144
166. Bojin LA, Georgescu M, **Cojocariu C**, Pascariu MC, Purcareea VL,Ivan MV, Puiu M, Dehelean C, Serb AF, Sisu E, Penescu MN, Structural investigation of raw and modified glycans by MALDI-TOF mass spectrometry.Farmacia,2020;68(5): 891-897
188. Bojin L, **Cojocariu C**, Georgescu M, Puiu M, Pascariu MC, Serb A, Puscasiu D, Tatu C, Sisu E, Investigation of neutral polysaccharides from *Fomes fomentarius*. A preliminary study. Fiziologia – Physiology, 2018; 28.2(96): 20-27.