



GRIGORE T. POPA UNIVERSITY OF
MEDICINE AND PHARMACY IASI

HABILITATION THESIS ABSTRACT

**“RESEARCH ON THE USE OF
NEW REAGENTS AND
ANALYTICAL METHODS IN
PHARMACEUTICAL ANALYSIS”**

PROF. GLADIOLA ȚÂNTARU, PhD

2020

ABSTRACT

The Habilitation thesis entitled “***Research on the Use of New Reagents and Analytical Methods in Pharmaceutical Analysis***” is a synthesis of the most representative research directions approached during the postdoctoral period.

The thesis presents the research activity carried out after the presentation of the doctoral thesis, entitled “*Analytical Reagents from the Group of Condensation Compounds of Ortho-Hydroxycarbonyl Combinations*”, including the main perspectives of academic, professional and research career development.

Scientific research in the pharmaceutical field has undergone lately an unprecedented development. We are currently witnessing the emergence of new drugs at an alarming rate, which greatly change the medication used in the treatment of many diseases.

The introduction into therapy of new pharmaceutical products have brought to the forefront the analytical studies because of the problems those products raise - biopharmaceutical studies, their biotransformation in the body, therapeutic dosage setting, stability problems, toxicity, etc.

The drug quality is a concept that includes and involves several problems whose resolution based on the performed analyzes, certifies that the medicine that receives the quality certificate, corresponds in terms of structure, purity and action, to the purpose for which it was prepared and to the current requirements, regarding patient safety.

Knowing the current requirements, demands and trends in the field of drug analysis is a major obligation for those who perform analyzes and the analytical results provided must be accurate, precise, correct, therefore highly reliable, because based on them decisions are made in all areas of activity.

Regardless of the area in which procedures, techniques and methods of analysis are applied, the decisions that are made based on the analytical results are also legal in nature, so the analyst has a great legal responsibility, and by that he confers that responsibility to the analytical act.

In performing an analysis, the analytical reagent plays an important role, which is the basis of an analytical method that facilitates that chemical analysis.

The use of organic reagents has led to the development of new methods of analysis which also benefited from the field of physical-chemical control of the drug. A newly created analytical method must be validated and the validation methodology applied is meant to demonstrate that the proposed method corresponds to the intended use. Statistical processing of the results of an analysis offers the possibility to obtain the most probable value that is as close to reality as possible.

The analysis methods presented have been validated in accordance with conventional regulations, such as those of the Food and Drug Administration (FDA), European Medicines Agency (EMA) and International Conference of Harmonization (ICH).

An important problem in pharmaceutical research is the optimization of the bioavailability of substances with low solubility and high permeability of the second class of biopharmaceuticals, which can be achieved through various methods such as complexation with carbohydrate derivatives such as cyclodextrins when inclusion complexes are obtained, encapsulation in lipo- or water-soluble systems for administration and transport or formulation in oral pharmaceutical forms with modified release.

In the last decades, the interest for complexation, as a scientific and technological method of optimizing the therapeutic performances of a biopharmaceutical class II drug, has increased greatly. Cyclodextrins contain a hydrophobic cavity in which the active principle is included with the formation of the inclusion complex, which has the following advantages: the solubility, bioavailability, and dissolution rate of the active substance increases, while the adverse effects are reduced and the complexation process contributes to the stabilization of the pharmaceutical form.

The main scientific research directions that have been approached after obtaining the Pharmacy PhD degree in 1998, aimed at introducing new analytical reagents from the Schiff base and bis Schiff base groups, the development and validation of analytical methods for the quantitative determination of various ions with biological importance and pharmaceutical substances, as well as the optimization of the bioavailability of pharmaceutical substances of class II of the Biopharmaceutical Classification System.

The Habilitation Thesis is divided into sections summarizing those research directions following the criteria recommended by CNATDCU.

The first research direction presented is entitled "*Schiff Bases and Bis Schiff Bases. Complexes of Schiff Bases and Bis Schiff Bases*". From those chemical classes, different compounds were selected for use as analytical reagents, they were characterized as far as their reactivity, selectivity and sensitivity in analytical reactions.

According to their structure, those substances offer two research directions, namely: their use as analytical reagents and interesting pharmacological properties: antibacterial, antifungal, antiviral, anti-inflammatory, anti-cancer, anti-HIV, anti-proliferative, anti-pyretic etc.

For that reason, we have addressed first and foremost their use as analytical reagents for cations, especially for those with an important biological role: Cu(II), Zn(II), Fe(II), Fe(III), Co(II), Mn(II), Ni(II), Bi(III).

In order to understand the action mechanism of the Schiff bases and bis Schiff bases either as analytical reagents or in the pharmacological field, their synthesis methods, and their physico-chemical and biological properties were studied. In particular, the Schiff bases and bis Schiff bases derived from salicylaldehyde and pyridine have been evaluated, underlining their structure which determines the complexation capacity of the transition metals when forming chelated rings. The studied Schiff bases were obtained through a classical method consisting of condensation of ortho-hydroxy-carbonyl combinations with various amines and then they were characterized in terms of their elemental composition, solubility, melting point, UV-VIS, IR and NMR spectra.

The studied Schiff bases and bis Schiff bases were used for the synthesis of their complexes with: Cu(II), Fe(II), Fe(III), Co(II), Mn(II), and Ni(II). Those complexes were prepared according to a well-known method from the scientific literature. The obtained and purified complexes were characterized physico-chemically and they were subjected to a screening of their *in vitro* biological activity on bacteria, fungi or anti-inflammatory effect in comparison to their corresponding Schiff bases and bis Schiff bases.

Because the complexation reaction of Schiff bases and bis Schiff bases is selective, sensitive and reproducible, it was the basis for the development of the analytical methods for quantitative determination of the aforementioned cations.

Using those methods various cations from pharmaceutical products with trace elements were analyzed. Some of those analytical methods have been validated.

In the chapter "*Validation of the analytical methods for the determination of biologically important ions and pharmaceutical substances*", validated spectrophotometric methods have been described which have been used for the quantitative determination of: Cr(III), Al(III), Se(IV), Fe(III), and amiodarone.

A research direction described in that section refers to the analysis of heavy metals, where based on the obtained results, quantitative determination methods have been developed and validated by atomic absorption spectroscopy or potentiometry, for the studied cations of Cu, Cd, Ni, and Pb. Selective membrane electrodes are important in the field of Analytical Chemistry because of their advantages: simple construction, results obtained directly as ionic activity, selectivity, sensitivity, applicable to analysis of complex samples or/and with small amounts of analyte. The results obtained using membrane electrochemical sensors with inclusion matrices are presented, which were the basis for the elaboration and validation of the method of quantitative determination of heavy metals in plants (Cu, Cd, Ni, Pb, and Hg).

Also, in this section, high performance liquid chromatographic methods are described, which have been validated and used for quantitative determination of serum amiodarone or amiodarone tablets with modified release and hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexed amiodarone.

In the section "*Study on the Optimization of the Biopharmaceutical Properties of Amiodarone*", the research led to the demonstration of the increased bioavailability of amiodarone through complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin, when the results were based on studies on the comparative evaluation of *in vitro* and *in vivo* amiodarone release from matrix tablets. Studies on matrix tablets have demonstrated the stability of amiodarone during the tablet production process.

The results obtained from the research carried out were materialized in articles published in scientific journals, two patents, participations in scientific events, as well as a silver and a bronze medal at the eighth edition of the European Exhibition of Creativity and innovation.

The last section of the Habilitation Thesis "*The Evolution and Development of the Professional, Scientific and Academic Career*" is dedicated to a synthesis of the scientific, didactic and academic achievements in the postdoctoral period and the presentation of the plans for the evolution and development of the scientific and professional career.

REZUMAT

Teza de abilitare intitulată "Cercetări privind profilul analitic al unor baze, bis baze Schiff și a unor metode analitice utilizate în practica farmaceutică" este o sinteză a celor mai reprezentative direcții de cercetare abordate în perioada postdoctorală.

Lucrarea prezintă activitatea de cercetare desfășurată după susținerea tezei de doctorat, intitulată "Reactivi analitici din clasa compușilor de condensare ai combinațiilor orto-hidroxycarbonilice" incluzând principalele perspective de dezvoltare a carierei academic, profesionale și de cercetare.

Cercetarea științifică în domeniul medicamentului a cunoscut în ultima perioadă o dezvoltare fără precedent, încât asistăm în prezent la un ritm alert în apariția de noi medicamente, grupe de medicamente, care schimbă în mare măsură medicația în tratamentul multor maladii.

Introducerea în terapeutică a unor noi produși farmaceutici și problemele pe care aceștia le ridică (studiul din punct de vedere biofarmaceutic, biotransformările lor în organism, stabilirea dozelor terapeutice, probleme de stabilitate, toxicitate etc.) au adus în prim planul cercetătorilor din domeniul medicamentului, studiile analitice.

Calitatea medicamentului este un concept care include și implică mai multe probleme a căror rezolvare pe baza analizelor efectuate, certifică că medicamentul care primește certificatul de calitate, corespunde ca structură, puritate și acțiune, scopului pentru care a fost preparat precum și exigențelor actuale referitoare la siguranța pacientului.

Cunoașterea cerințelor, exigențelor și tendințelor actuale care se manifestă în domeniul analizei este o obligație majoră pentru cei ce execută analize iar rezultatele analitice furnizate trebuie să fie exacte, precise, corecte, deci de mare încredere, deoarece pe baza lor se adoptă decizii în toate domeniile de activitate. Indiferent de domeniul în care se aplică procedee, tehnici și metode de analiză, deciziile care se iau pe baza rezultatelor analitice au și caracter juridic, deci analistul are o mare răspundere juridică, iar prin acesta se conferă această răspundere actului analitic.

În efectuarea unei analize, un rol important îl are reactivul analitic, care stă la baza unei metode analitice ce înlesnește acea analiză chimică.

Folosirea reactivilor organici a condus la instituirea unor noi metode de analiză de care a beneficiat și domeniul controlului fizico-chimic al medicamentului. O metodă analitică nou creată trebuie să fie validată, iar metodologia de validare aplicată are rolul de a demonstra că metoda propusă corespunde utilizării pentru care a fost prevăzută. Prelucrarea statistică a rezultatelor unei analize oferă posibilitatea de a obține valoarea cea mai probabilă ce se află cât mai aproape de realitate.

Metodele de analiză prezentate au fost validate în conformitate cu reglementările convenționale, cum ar fi Food and Drug Administration (FDA), European Medicines Agency (EMA) și International Conference of Harmonization (ICH).

O problemă importantă în cercetarea farmaceutică este optimizarea biodisponibilității substanțelor cu solubilitate redusă și permeabilitate înaltă din clasa a II-a biofarmaceutică, care se poate realiza prin diferite metode dintre care menționăm: complexare cu derivați de carbohidrați de tipul ciclodextrinelor cu formarea unor complecși de incluziune, încapsularea în sisteme particulare lipo sau hidrosolubile de administrare și transport sau formularea în forme farmaceutice orale cu cedare modificată.

În ultimele decenii a crescut foarte mult interesul pentru *complexare, ca metodă științifică și tehnologică de optimizare a performanțelor terapeutice ale unei substanțe medicamentoase* din clasa a II-a biofarmaceutică. Ciclodextrinele conțin o cavitate hidrofobă în care este internalizat principiul activ cu formarea complexului de incluziune, ce prezintă următoarele avantaje: determină o creștere a solubilității substanței active, a biodisponibilității și a vitezei de dizolvare a acestora, reduce efectele adverse și contribuie la stabilizarea formei farmaceutice.

Principalele direcții de cercetare științifică pe care le-am abordat după obținerea titlului în anul 1998 a titlului de *Doctor în domeniul Farmacie*, vizează introducerea de noi reactivi analitici din clasa baze și bis baze Schiff, elaborarea și validarea unor metode analitice pentru determinarea unor ioni cu importanță biologică, a unor substanțe medicamentoase și optimizarea biodisponibilității unor substanțe farmaceutice din clasa a II a biofarmaceutică.

Teza de abilitare este structurată pe secțiuni care sintetizează aceste direcții de cercetare respectând criteriile recomandate de CNATDCU.

Prima direcție de cercetare prezentată este intitulată „*Baze și bis baze Schiff. Complecși de baze și bis baze Schiff*”. Din aceste clase, diferiți compuși au fost selectați spre a fi utilizați ca reactivi analitici, caracterizați prin reactivitatea lor, selectivitatea și sensibilitatea în reacții analitice.

Prin structura lor, aceste substanțe oferă două căi de cercetare și anume: utilizarea lor ca reactivi analitici și proprietăți farmacologice interesante: antibacteriene, antifungice, antivirale, anti-inflamatoare, anti-cancer, anti-HIV, antiproliferative, anti-piretice, etc.

Din acest motiv am abordat în primul rând utilizarea lor ca reactivi analitici pentru cationi, în special pentru cei cu rol biologic important: Cu(II), Zn(II), Fe(II), Fe(III), Co(II), Mn(II), Ni(II), Bi(III).

Pentru a înțelege modul de funcționare al bazelor și bis bazelor Schiff fie ca reactivi analitici fie în domeniul farmacologic, s-au studiat metodele de obținere, proprietățile lor fizico-chimice și cele biologice. S-au urmărit în special bazele Schiff și bis bazele Schiff derivate de salicilaldehidă și piridină, subliniind structura lor care determină capacitatea de complexare a metalelor tranziționale prin închiderea de cicluri chelate. Bazele Schiff studiate s-au obținut printr-o metodă clasică ce constă în condensarea unor combinații orto-hidroxi-carbonilice cu diferite amine și au fost caracterizate prin analiza elementală, solubilitate, puncte de topire, spectre UV-VIS, IR sau RMN.

Bazele și bis bazele Schiff studiate au fost utilizate pentru obținerea complecșilor lor cu: Cu(II), Fe(II), Fe(III), Co(II), Mn(II) și Ni(II). Acești complecși au fost preparați după o metodă cunoscută din literatura de specialitate. Complecșii obținuți și purificați au fost caracterizați fizico-chimic și alături de bazele, bis bazele Schiff corespunzătoare au fost supuși unui screening al activității lor biologice *in vitro* asupra bacteriilor, fungilor sau al efectului antiinflamator.

Reacția de complexare a bazelor și bis bazelor Schiff fiind selectivă, sensibilă și reproductibilă a stat la baza elaborării metodelor analitice de determinare cantitativă a cationilor menționați anterior.

Prin metodele elaborate s-au determinat diferiți cationi din diverse produse farmaceutice cu oligoelemente. O parte din aceste metode analitice au fost validate.

În secțiunea „*Validarea metodelor de analiză pentru determinarea unor ioni cu importanță biologică și a unor substanțe medicamentoase*”, sunt descrise metode spectrofotometrice validate ce au fost aplicate la determinarea cantitativă a: Cr(III), Al(III), Se(IV), Fe(III), și a amiodaronei.

O direcție de cercetare descrisă în această secțiune se referă la analiza metalelor grele, unde pe baza rezultatelor obținute s-au elaborat și validat metode de determinare cantitativă prin spectroscopie de absorbție atomică sau prin potențimetrie pentru metalele luate în studiu

(Cu, Cd, Ni, Pb). Electrozii cu membrană selectivă sunt importanți în domeniul Chimiei Analitice datorită avantajelor lor: construcție simplă, obținerea rezultatelor direct în activitate ionică, selectivitate, sensibilitate, utilizabili în analiza de probe complexe și/sau cu cantități mici de analit. Sunt prezentate rezultatele obținute utilizând senzori electrochimici cu membrană cu matrici de incluziune, ce au stat la baza elaborării și validării metodei de determinare cantitativă a metalelor grele din plante (Cu, Cd, Ni, Pb, Hg).

Tot în această secțiune, sunt descrise metode cromatografice de lichide de înaltă performanță, ce au fost validate și utilizate pentru determinarea cantitativă a amiodaronei din ser sau comprimate cu cedare controlată cu amiodaronă și amiodaronă complexată cu hidroxipropil- β -ciclodextrină.

În secțiunea "*Studiul privind optimizarea proprietăților biofarmaceutice ale Amiodaronei*", cercetările au condus la demonstrarea creșterii biodisponibilității amiodaronei prin complexare cu hidroxipropil- β -ciclodextrină, rezultatele fiind fundamentate pe baza studiilor asupra evaluării cedării comparative *in vitro* și *in vivo* a amiodaronei din comprimatele matriceale. Studiile efectuate pe tabletele matriceale, au demonstrate stabilitatea amiodaronei în timpul procesului de obținere a comprimatelor.

Rezultatele obținute în urma cercetărilor întreprinse s-au concretizat în articole publicate în reviste de specialitate, două brevete de invenție, participări la manifestări științifice, precum și o medalie de argint și una de bronz la a VIII-a ediție a Expoziției Europene a Creativității și Inovării.

Ultima secțiune a tezei de abilitare "*Evoluția și dezvoltarea carierei profesionale, științifice și academic*" este dedicată unei sinteze a realizărilor științifice, didactice și academice în perioada postdoctorală și prezentării planurilor de evoluție și dezvoltare a carierei științifice și profesionale.